

**Methyltransferasen aus *Papaver somniferum* L. -
Erzeugung und Analyse transgener Pflanzen sowie Klonierung,
heterologe Expression und Charakterisierung**

Promotionsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt an der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Diplom-Biochemikerin Stefanie Haase
geboren am 03. Oktober 1977 in Stendal

Gutachten: Prof. Dr. Wasternack, Halle (Saale)
Prof. Dr. Dräger, Halle (Saale)
Prof. Dr. Fischer, Aachen

verteidigt am 25. Mai 2007

*Niemand ist eine Insel ganz in sich selbst;
jeder ist ein Stück des Kontinents,
ein Teil des Ganzen.*

John Donne

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Die Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide	3
1.3 <i>Metabolic engineering</i> – Der Eingriff in den Stoffwechsel.....	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Materialien.....	13
2.1 Chemikalien.....	13
2.2 Enzyme und Kits.....	13
2.3 Materialien und Reagenzien	14
2.4 PCR-Primer.....	15
2.5 Standardpuffer	16
2.6 Ladepuffer.....	16
2.7 Nährmedien.....	16
2.7.1 LB-Medium	16
2.7.2 SOC-Medium	17
2.7.3 B5O-Medium.....	17
2.7.4 19D-Medium	17
2.8 Antibiotika	18
2.9 Plasmide.....	18
2.10 Organismen und ihre Kultivierung	19
2.11 Spezielle Geräte	20
3. Methoden	21
3.1 Probennahme	21
3.1.1 Latex.....	21
3.1.2 Pflanzenmaterial	21
3.2 Molekularbiologische Standardmethoden	21
3.3 Polymerasekettenreaktionen - PCR	21
3.4 RACE – PCR	22
3.5 Agarosegelelektrophorese.....	22
3.6 Herstellung kompetenter Zellen	23
3.6.1 Chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen – Calciumchlorid-Methode	23
3.6.2 Elektrokompente Agrobakterien.....	23
3.7 Aufarbeitung und Analyse der Latexproben.....	23

3.7.1	Aufarbeitung des Latex	23
3.7.2	Qualitative und quantitative Analyse des Latex	24
3.8	Transformationen.....	25
3.8.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Hitzeschock	25
3.8.2	Elektroporation von Agrobakterien (AGL1)	25
3.8.3	Agrobakterienvermittelte Transformation von <i>Papaver somniferum</i>	25
3.9	Isolation von Nukleinsäuren aus <i>Papaver somniferum</i>	26
3.9.1	Nukleinsäureextraktion mit Phenol/Chloroform	26
3.9.2	Isolation von RNS aus Pflanzengewebe (Trizol [®] -Methode).....	27
3.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
3.11	Sequenzierung von DNS.....	27
3.12	Southern Blot-Analyse.....	28
3.12.1	Southern Blotting.....	28
3.12.2	Radioaktive Markierung der Sonden.....	28
3.12.3	Hybridisierung und Analyse des Southern Blots.....	28
3.13	Northern Blots und ihre Analyse	29
3.14	Aufreinigung heterolog in <i>Escherichia coli</i> exprimierter His-tag-Proteine	29
3.14.1	Heterologe Expression.....	30
3.14.2	Lyse der Bakterien.....	30
3.14.3	Proteinreinigung mit Talon Resin	30
3.14.4	Entsalzen und Umpuffern mit PD-10-Säulen.....	31
3.15	Gewinnung von Bakterienrohextrakten	31
3.16	Quantifizierung von Proteinen.....	31
3.17	SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung.....	31
3.18	Enzymtests.....	31
3.19	LC-MS (TOF) - Massenspektrometrische Analysen	32
4.	Ergebnisse	33
4.1	Die <i>O</i> -Methyltransferasen	33
4.1.1	Klonierung von RNAi-Konstrukten zur Suppression.....	33
4.1.2	Klonierung von Volllängeegenen zur Überexpression	35
4.1.3	Zellkultur	36
4.1.4	Analysen der T0-Generation der <i>7omt-sense</i> -Pflanzen	37
4.1.5	Analysen der T1-Generation der <i>7omt-sense</i> -Pflanzen	42
4.1.6	Analysen der T2-Generation der <i>7omt-sense</i> -Pflanzen	49
4.2	Putative Stylopin- <i>N</i> -Methyltransferase	55
4.2.1	Isolation der cDNS mittels RACE-PCR.....	55

4.2.2	Klonierung und heterologe Expression und Reinigung des Enzyms	57
4.2.3	Aktivitätstest.....	57
4.3	(<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase	62
4.3.1	Isolation der cDNS und Sequenzvergleiche	62
4.3.2	Klonierung, heterologe Expression und Reinigung des Enzyms	63
4.3.3	Aktivitätstest.....	63
5.	Diskussion	69
5.1	<i>O</i> -Methyltransferasen	69
5.1.1	Transformation und Generierung transgener Pflanzen.....	69
5.1.2	<i>7omt-sense</i> -Pflanzen.....	71
5.2	Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase - <i>CNMT</i>	79
5.3	Stylopin- <i>N</i> -Methyltransferase - <i>SNMT</i>	82
6.	Zusammenfassung.....	85
	<i>O</i> -Methyltransferasen.....	85
	<i>N</i> -Methyltransferasen	87
7.	Literaturverzeichnis.....	89
8.	Anhang	V
8.1	Wildtyppflanzen CO58-34.....	V
8.2	T0-Generation der <i>7omt-sense</i> -Pflanzen	V
8.3	T1-Generation der <i>7omt-sense</i> -Pflanzen	VI
8.4	T2-Generation der <i>7omt-sense</i> -Pflanzen	VIII
8.5	Putative Stylopin- <i>N</i> -Methyltransferase	XII
8.5.1	Vergleich der Nukleotidsequenzen der <i>snmt</i> -Klone 4 und 5.....	XII
8.6	Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase	XIII
8.6.1	Aminosäuresequenzvergleich.....	XIII
8.6.2	Enzymassays <i>CNMT</i>	XIV
	Abbildungen und Tabellen	XXI
	Danksagung.....	
	Lebenslauf	
	Erklärung.....	

Anmerkungen zur Schreibweise

Die Bezeichnungen von Genen und Transkripten wurden klein und kursiv geschrieben (z.B. *7omt*), die von Proteinen in Großbuchstaben und regulär (z.B. *7OMT*).

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>analysis of variation</i>
as	<i>antisense</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> / Rinderserumalbumin
cpm	<i>counts per minute</i>
dATP / dNTP	2'-deoxyadenosin-5'-triphosphat / N= Cytidin, Adenosin, Thymin, Guanin
Dhc	Dihydrocodein
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazynil]-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
mcs / MCS	<i>multiple cloning site</i> / Multiple Klonierungsstelle
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / die Polymerasekettenreaktion
Pfl.	Pflanze(n)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PTGS	<i>post transcriptional gene silencing</i>
PVP / PVPP	Polyvinylpyrrolidon / Polyvinylpyrrolidon, <i>cross-linked</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> / schnelle Synthese von cDNA-Enden
RNAi	RNA <i>interference</i>
RNS / RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> / Umdrehungen je Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription; Retentionszeit
s	<i>sense</i>
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	<i>volume per volume</i> / Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volumen</i> / Masse pro Volumen

Antibiotika und Alkaloide

Amp	- Ampicillin	Rif	- Rifampicin
Carb	- Carbenicillin	Spec	- Spectinomycin
Mor	- Morphin	Ret	- Retikulin
Cod	- Codein	Laud	- Laudanin
Theb	- Thebain	Laus	- Laudanosin
Ori	- Oripavin		
MW328	- Gemisch aus Scoulerin, Salutaridin und 1,2-Dehydroretikulin		

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Alkaloide sind stickstoffhaltige Naturstoffe, die im Sekundärstoffwechsel vieler Pflanzen und einiger Tiere gebildet werden. Prominente Beispiele für Alkaloide sind Atropin, Chinin, Kokain, Koffein, Meskalin, Morphin, Nikotin und Strychnin. Der Begriff Alkaloid leitet sich von dem alkalischen Verhalten ab. Der charakteristische Stickstoff ist Bestandteil eines mehr oder weniger kompliziert gebauten heterozyklischen Ringsystems. Es existieren verschiedene Varianten der Einteilung, allgemein bevorzugt wird aber die Gruppierung nach dem zu Grunde liegenden Ringskelett, das beispielsweise ein Pyrrol-, Imidazol-, Tropan-, Chinolin-, Isochinolin- oder Indolsystem sein kann (Beyer und Walter, 1991).

Papaver somniferum (Abb. 1.1), bekannt als Schlafmohn, bildet Alkaloide vom Isochinolintyp.



Abb. 1.1: *Papaver somniferum*,
(<http://opioids.com/images>)

Aufgrund ihres Vorkommens in dem als Opiumsaft bezeichneten Latex, werden sie Opiumalkaloide genannt. Man ordnet sie in die Untergruppen Morphinane, Papaverine, Protopine und Benzo[c]phenanthridine ein. Die Meinungen über ihre Funktion in der Pflanze gehen auseinander. Bisher gibt es kaum Kenntnisse über phytochemische Wirksamkeiten, so dass sie oft als stickstoffhaltige „Abfallprodukte“ angesehen werden. In tierischen Organismen zeigen sie jedoch häufig schon in geringen Mengen physiologische Wirkung. Es ist daher nahe liegend, dass sie an der Abwehr von Herbivoren und Pathogenen beteiligt sind (Beyer und Walter, 1991; Kutchan, 1998; Morimoto et al., 2001).

P. somniferum ist eine der ältesten Kultur- und Arzneipflanzen.

Er gehört zur Familie der Papaveraceen und stammt wahrscheinlich vom Wildmohn *Papaver setigerum* ab (Hammer und Fritsch, 1977). Nur diese beiden Pflanzen sind in der Lage in ihrem Sekundärstoffwechsel Morphin zu synthetisieren.

In der im Jahr 1753 erschienenen „Genera Plantarum“ wurde *P. somniferum* durch den Botaniker Linnaeus charakterisiert. Der Name der Pflanze leitete sich von den betäubenden Eigenschaften ihrer Inhaltstoffe ab (*somnifer* = Schlaf bringend). Seit dem Altertum waren die schmerzlindernde und narkotische Wirkung des getrockneten Milchsafte (Opium) bekannt. Seine Renaissance als Heilpflanze erlebte Schlafmohn in Europa aber erst nachdem Paracelsus 1527 das aus Opium gewonnene Laudanum als exzellentes Schmerzmittel beschrieb. Opiumtinktur, ein ethanolischer Opiumextrakt, wurde bald als Allheilmittel eingesetzt. Die verschiedenen heilenden Wirkungen beruhten auf den im Milchsaft enthaltenen Alkaloiden.

Die einzelnen Komponenten des Opiums waren damals noch nicht bekannt. Erst 1803 gelang es F. W. A. Sertürner, Morphin zu isolieren (Jurna, 2003; Sertürner, 1806). Dabei handelte es sich um die erste Isolierung eines pflanzlichen Alkaloides. Es stellte sich heraus, dass es sich bei dem von Sertürner nach dem griechischen Gott Morpheus benannten Stoff „Morphium“ um den wichtigsten Wirkstoff des Opiums handelte. Auf dieser Basis gelang es, immer mehr medizinisch bedeutsame Alkaloide zu isolieren. Dadurch war es möglich, gezielter zu therapieren, und auf die Verwendung des Opiums zu verzichten, denn bedauerlicherweise besitzt dieses nicht nur eine heilende und berauschende, sondern auch suchterzeugende Wirkung. Es wird meist geraucht und führt zu physischer und psychischer Abhängigkeit. Seit Jahrhunderten wurde Opium im so genannten „Goldenen Dreieck“, an der Grenze zwischen Burma, Thailand und Laos, von Bergvölkern als Genussmittel genutzt. Um Opium zu gewinnen, werden die grünen Mohnkapseln angeritzt. Aus der Verwundungsstelle tritt weißer Milchsaft aus, der zu einer braunen Masse, dem Opium, eintrocknet, und anschließend mit einem speziellen Messer durch Abstreifen gesammelt wird. Aus dem Rohopium entsteht durch Fermentation, Kochen oder Erhitzen Rauchopium. Nachdem England in den Opiumkriegen (1840-42) das Recht erstritten hatte, vermehrt Opium nach China zu importieren, fand das Opiumrauchen dort weite Verbreitung. Zu dieser Zeit entstanden die legendären chinesischen Opiumhöhlen. Durch die Kolonialmächte wurden das Opiumrauchen und die Nutzung verschiedener aus Opium gewonnener Tinkturen auch in Europa populär. Aufgrund des Missbrauchs als Drogenlieferant unterliegt der Anbau von opiaterzeugenden Mohnsorten heute weltweit starken Restriktionen. Die Probleme bestehen jedoch weniger im Missbrauch des Opiums, als vielmehr des durch die Acetylierung von Morphin gewonnenen Heroins (Diacetylmorphin).

Legal, für die Lebensmittelindustrie und zur medizinischen Verwendung, darf Schlafmohn nur in wenigen Ländern angebaut werden. Der Anbau ist notwendig, da *P. somniferum* auch heute noch eine der wichtigsten Arzneipflanzen der Welt ist. Zwar können viele der Schlafmohnalkaloide chemisch synthetisiert werden, die bisher entwickelten Methoden sind aber noch immer unwirtschaftlicher als die Extraktion der Wirkstoffe aus der Pflanze (Novak et al., 2000). Die einzige Ausnahme ist das Papaverin, dessen Synthese bereits 1909 durch Pictet gelang. Die Totalsynthese des Morphins, das erstmals 1952 durch Gates und Tschudi hergestellt werden konnte, und für das bisher 19 Synthesen entwickelt wurden, ist im Gegensatz dazu mit einer maximalen Ausbeute von 29 % noch immer sehr ineffizient (Beyer und Walter, 1991; Rice, 1980).

Schlafmohn ist mit seinem komplexen Sekundärstoffwechsel in der Lage vom Tetrahydrobenzylisochinolin abgeleitete Alkaloide zu synthetisieren, die ein breites Spektrum an pharmakologischer Wirksamkeit besitzen. Von größter medizinischer Relevanz sind dabei

Morphin, Codein, Noscapin, Narcein, Papaverin, Thebain und Sanguinarin. Abgesehen von Thebain und Sanguinarin, werden sie aufgrund ihrer analgetischen Wirkung verwendet, wobei Morphin das effektivste Schmerzmittel ist. Codein wirkt stark antitussiv, aber auch Noscapin und Narcein werden als Hustenstiller eingesetzt. Das Muskel relaxierende Papaverin wird bei Krämpfen des Verdauungstraktes angewendet, ist aber auch in der Krebstherapie von Bedeutung. Sanguinarin, das nur in den Wurzeln des Schlafmohns vorkommt, wirkt antibakteriell, und ist ein Zusatz in vielen Zahnpflegeprodukten. Interessanterweise verhalten sich die einzelnen im Milchsaft enthaltenen Alkaloide in ihrer Wirkung oft antagonistisch. So senkt beispielsweise Morphin die Atemtätigkeit. In höheren Dosen führt diese Eigenschaft zum Tod. Noscapin und Narcein wirken dagegen Atem anregend und bronchodilatatorisch. Thebain nutzt man in der pharmazeutischen Industrie als Ausgangsstoff für die Produktion semisynthetischer Morphinanaloga. Viele davon finden sich in bekannten Medikamenten wie Percodan, Immobilon und Methadon. Die Wirksamkeit dieser synthetischen Opiate übersteigt die der natürlich vorkommenden oft um ein Vielfaches.

1.2 Die Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide

Ausführliche Darstellungen der Biosynthese sind in vielen Veröffentlichungen zu finden (Facchini, 2001; Kutchan, 1998). Einen besonderen Anteil an der katalytischen Aufklärung hatte das Labor von Professor Zenk. Die Biosynthese geht vom Primärstoffwechsel aus und beginnt mit zwei Molekülen der Aminosäure L-Tyrosin (1) (Abb. 1.2).

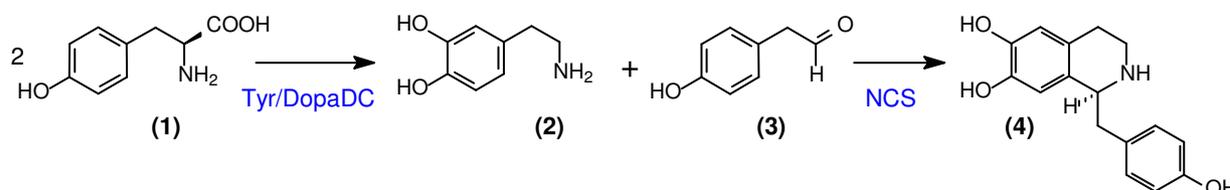


Abb. 1.2: vereinfachte Darstellung des ersten Teils der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* vom L-Tyrosin (1) zum (*S*)-Norcoclaurin (4) über Dopamin (2) und p-Hydroxyphenylacetaldehyd (3)

Die Tyrosinmoleküle durchlaufen eine Folge von Hydroxylierungen, Desaminierungen und Decarboxylierungen über die Intermediate Tyramin oder L-Dopa. Ein Tyrosin wird in Dopamin (2) umgewandelt, das andere in p-Hydroxyphenylacetaldehyd (3). Die verschiedenen Decarboxylierungsschritte werden durch die Tyrosin/Dopa-Decarboxylase (Tyr/DopaDC) katalysiert. In *P. somniferum* unterscheidet man die zwei Untergruppen Tyr/DopaDC1 und Tyr/DopaDC2 (Facchini und De Luca, 1994, 1995). Dopamin und p-Hydroxyphenylacetaldehyd werden durch die (*S*)-Norcoclaurinsynthase (NCS) zu (*S*)-Norcoclaurin (4) kondensiert (Rueffer et al., 1981; Samanani und Facchini, 2002; Samanani et al., 2004).

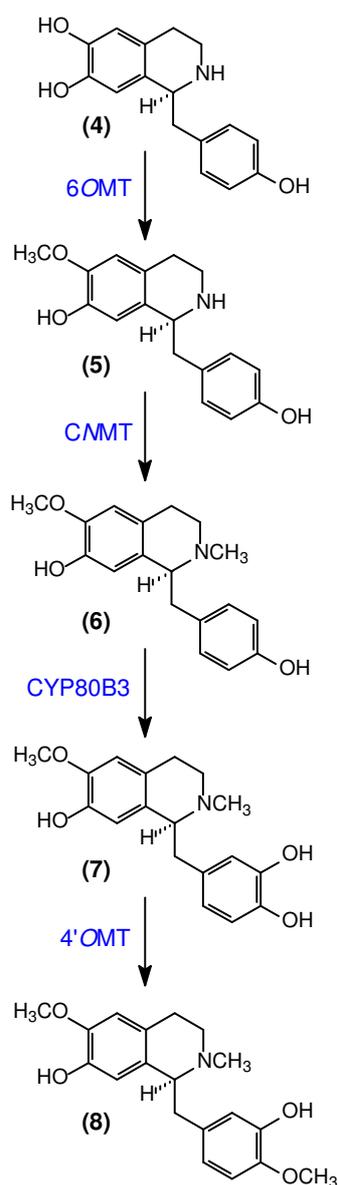


Abb. 1.3: Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* vom (*S*)-Norcoclaurin (4) zum (*S*)-Retikulin (8) über (*S*)-Coclaurin (5), (*S*)-*N*-Methylcoclaurin (6) und (*S*)-3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin (7)

(*S*)-Norcoclaurin ist das Substrat der (*S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT) (Rueffer et al., 1983; Sato et al., 1994). Als Methylgruppendonator fungiert *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM), das dadurch zu *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) reduziert wird (Abb. 1.2). Eine zweite Methylierung erfolgt anschließend am Stickstoff des (*S*)-Coclaurins (5), durch die (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT; SAM → SAH) (Choi et al., 2001; Choi et al., 2002; Frenzel und Zenk, 1990a; Loeffler et al., 1995). Das entstehende (*S*)-*N*-Methylcoclaurin (6) wird durch die (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (CYP80B3), einem P450-Enzym, in 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin (7) umgewandelt (Huang und Kutchan, 2000; Pauli und Kutchan, 1998). Dieses ist das Substrat einer weiteren *O*-Methylierung durch die 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'OMT; SAM → SAH), wobei (*S*)-Retikulin (8) entsteht (Frenzel und Zenk, 1990b; Morishige et al., 2000; Ziegler et al., 2005). Am (*S*)-Retikulin spaltet die Alkaloidbiosynthese des Schlafmohns in drei Richtungen auf. Es ist Ausgangspunkt für die Synthese der Protopine und Benzo[*c*]phenanthridine, der Morphinane und der Papaverine (Abb. 1.4).

In der ersten Reaktion der Synthese der Protopine und Benzo[*c*]phenanthridine oxidiert das Berberinbrückenenzym (BBE) die *N*-Methylgruppe des (*S*)-Retikulins (8) mit Sauerstoff unter Abspaltung von H₂O₂ zur Methylenbrücke des (*S*)-Scoulerins (9) (Dittrich und Kutchan, 1991; Facchini et al., 1996; Huang und Kutchan, 2000; Kutchan und Dittrich, 1995; Steffens et al., 1985).

Diese in der Natur einzigartige Umformung konnte bisher im Labor nicht durchgeführt werden. (*S*)-Scoulerin kann in mehreren Schritten, die enzymatisch bisher nicht genauer untersucht werden konnten, in Noscapin (16) umgewandelt werden.

Die Gruppe der Protopine entsteht aus (*S*)-Scoulerin, indem dieses zunächst durch zwei P450-abhängige Oxidasen, die (*S*)-Cheilanthifolinsynthase (CFS) und die (*S*)-Stylopinsynthase (StS), unter Beteiligung von NADPH und Sauerstoff in (*S*)-Stylopin (11) umgewandelt wird. Das geschieht über das Intermediat (*S*)-Cheilanthifolin (10) unter Bildung zweier Methylenedioxybrücken (Bauer und Zenk, 1989, 1991).

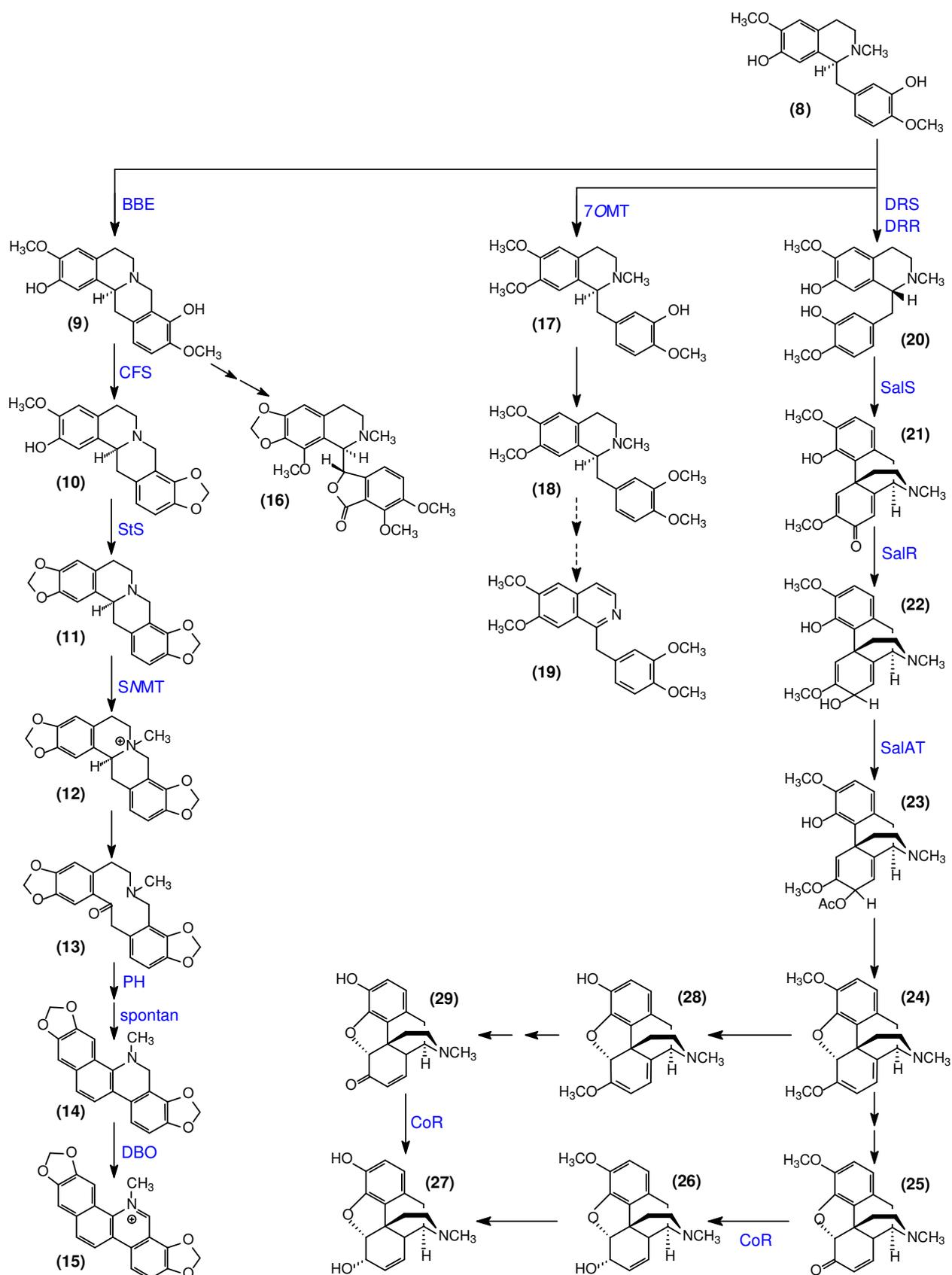


Abb. 1.4: Darstellung der Biosynthese der Benzylisochinoline in *P. somniferum* ausgehend vom (S)-Retikuline zu den Morphinanen, den Papaverinen, Protoberberinen und Benzo[c]phenanthridinen mit den Endprodukten Morphin, Papaverin, Noscapin und Sanguinarin; (S)-Scoulerin (9), (S)-Cheilanthifolin (10), (S)-Stylopin (11), (S)-N-Methylstylopin (12), Protopin (13), Dihydrosanguinarin (14), Sanguinarin (15), Noscapin (16), (S)-Laudandin (17), (S)-Laudanosin (18), Papaverin (19), (R)-Retikuline (20), Salutaridin (21), Salutaridinol (22), 7-O-Acetyl-Salutaridinol (23), Thebain (24), Codeinon (25), Codein (26), Morphin (27), Oripavin (28), Morphinon (29)

In einer durch die Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase ((*S*)-Stylopin-*N*-Methyltransferase, *SNMT*) katalysierten Reaktion wird anschließend eine Methylgruppe von SAM auf den tertiären Stickstoff des (*S*)-Stylopins übertragen (O'Keefe und Beecher, 1994; Rueffer und Zenk, 1986; Rueffer et al., 1990). Durch zwei P-450-Hydroxylasen wird (*S*)-*cis-N*-Methylstylopin (12) mit NADPH und Sauerstoff zu Protopin (13) und 6-Hydroxyprotopin, aus dem in einer spontanen Umlagerung Dihydrosanguinarin (14), das erste Alkaloid mit Benzophenanthridinkern, entsteht (Tanahashi und Zenk, 1990). Durch die Katalyse der Dihydrobenzophenanthridinoxidase (*DBO*) wird Dihydrosanguinarin in Gegenwart von Sauerstoff zu Sanguinarin (15), dem Endprodukt dieses Synthesezweiges in *P. somniferum*, oxidiert (Abb. 1.4).

Der zweite Abzweig vom (*S*)-Retikulin (8) führt zu den Papaverinen. (*S*)-Laudanin (17) und (*S*)-Laudanosin (18) entstehen durch die Aktivität der (*S*)-Retikulin-7-*O*-methyltransferase (*7OMT*). Sie überträgt hauptsächlich Methylgruppen auf die Hydroxygruppe des (*S*)-Retikulins in Position 7, in geringerem Maße aber auch in 4'-Position (Ounaroon et al., 2003). Es wird vermutet, dass in weiteren Schritten Papaverin (19) entsteht. Dieser Teil der Biosynthese wurde auf enzymatischer Ebene bisher noch nicht aufgeklärt (Abb. 1.4).

Der dritte vom (*S*)-Retikulin (8) ausgehende Weg führt zur Bildung der Morphinane. Dabei wird zunächst die Konformation des Retikulins von der (*S*)- in die (*R*)-Form umgekehrt. Die Reaktion verläuft über das intermediäre 1,2-Dihydroretikuliniumion, das durch die Abspaltung eines Protons durch die 1,2-Dehydroretikulinsynthase (*DRS*) entsteht (Hirata et al., 2004). Die Konformationsänderung wird mit NADPH durch die 1,2-Dehydroretikulinreduktase (*DRR*) vollendet (De-Eknamkul und Zenk, 1992). Die Salutaridinsynthase (*SalS*), eine zu den Cytochrom-P450-Enzymen zählende Oxigenase, oxidiert (*R*)-Retikulin (20) unter Beteiligung von NADPH und Sauerstoff zu Salutardin (21) (Gerardy und Zenk, 1992), welches anschließend durch die Salutaridinreduktase (*SalR*) mit NADPH und Sauerstoff zu Salutaridinol (22) reduziert wird (Gerardy und Zenk, 1993; Ziegler et al., 2006). Die Salutaridinol-7-*O*-Acetyltransferase (*SalAT*) überträgt eine Acetylgruppe vom Acetyl-*S*-Coenzym A, so dass Salutaridinol-7-*O*-Acetat (23) entsteht (Lenz und Zenk, 1995a). Dieses lagert sich unter Abspaltung der Acetylgruppe spontan zu Thebain (24), dem ersten Morphinan, um (Lenz und Zenk, 1994). Thebain wird durch eine Enol-Ether-Spaltung zu Neopinon demethyliert, das im Gleichgewicht mit seinem Positionsisomer Codeinon (25) steht (Gollwitzer et al., 1993). Durch die Katalyse der Codeinonreduktase (*CoR*) wird Codeinon an der Ketogruppe zu Codein (26) reduziert. Als Elektronendonator fungiert NADPH (Lenz und Zenk, 1995b, c). Im letzten Schritt der Biosynthese wird Codein in einer durch ein noch nicht bekanntes Enzym katalysierten Reaktion zum Endprodukt Morphin (27) demethyliert. Alternativ kann Thebain mit NADPH zu Oripavin (28)

demethyliert werden. Das Produkt einer weiteren Demethylierung ist ein Positionsisomer des Morphinons (29), das daraus durch eine Umlagerungsreaktion entsteht. Morphinon wird wie Codeinon durch CoR reduziert. Das Produkt dieser Reaktion ist Morphin (27) (Kodaira und Spector, 1988).

Bisher wurden 9 cDNS von Alkaloidbiosynthesegenen aus *P. somniferum* isoliert. Diese wurden zum Teil heterolog exprimiert und die Enzyme charakterisiert. Es handelt sich dabei um die cDNS der 6OMT und 7OMT (Ounaroon et al., 2003), CNMT (Facchini und Park, 2003), CYP80B3 (Huang und Kutchan, 2000), 4'OMT (Facchini und Park, 2003; Ziegler et al., 2005), BBE (Facchini et al., 1996), CoR (Unterlinner et al., 1999), SalAT (Grothe et al., 2001) und SalR (Ziegler et al., 2006)(Abb. 1.4). Zusätzlich wurde eine Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) kloniert und exprimiert, die als Elektronenlieferant der P450-Oxygenasen des Biosyntheseweges gilt (Rosco et al., 1997).

Von besonderer Bedeutung für die Biosynthese sind die Methyltransferasen. An der Synthese der Alkaloide in *P. somniferum* sind drei *O*-Methyltransferasen und zwei *N*-Methyltransferasen beteiligt. Es handelt sich dabei um SAM-anhängige Enzyme. Sie übertragen Methylgruppen von SAM unter Bildung von SAH auf ihre Substrate. Die cDNS der 6OMT und der 4'OMT waren bereits aus *Coptis japonica* bekannt (Frenzel und Zenk, 1990b; Morishige et al., 2000; Sato et al., 1994), bevor sie auch für *P. somniferum* isoliert und die Enzyme charakterisiert wurden (Ounaroon et al., 2003; Ziegler et al., 2005). Ounaroon et al. (2003) gelang es außerdem erstmals, die cDNS der 7OMT zu isolieren und das Enzym zu charakterisieren.

Obwohl die *O*-Methyltransferasen des Sekundärstoffwechsel gut untersucht sind, gibt es weniger Informationen über *N*-Methyltransferasen (Hibi et al., 1994). Prominente Beispiele sind die Putrescin-*N*-Methyltransferasen aus Tabak und Koffeinsynthasen (Kato et al., 2000; Uefuji et al., 2003). An der Alkaloidbiosynthese in Schlafmohn sind die (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase, die einen Schritt zur Synthese des zentralen Stoffwechselintermediates (*S*)-Retikulin katalysiert, und eine Stylopin umsetzende *N*-Methyltransferase beteiligt. (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferasen waren als native Proteine aus *Berberis koetianeana* (Frenzel und Zenk, 1990a) und *C. japonica* (Choi et al., 2001) isoliert und charakterisiert worden. Ausgehend von der Sequenz des aus *Coptis* isolierten Enzyms gelang es Choi et al. (2002) erstmals, die Nukleotidsequenz eines dieser Enzyms zu isolieren, sie heterolog zu exprimieren und zu charakterisieren. Dadurch war es ihr möglich, die Eigenschaften des nativen Enzyms mit denen des heterolog exprimierten zu vergleichen. Die von ihr veröffentlichte Sequenz machte es leichter, aus anderen isochinolinalkaloidproduzierenden Spezies die cDNS der CNMT zu isolieren bzw. zu identifizieren, wie es Facchini und Park (2003) für die *P. somniferum*-CNMT (*Papaver* CNMT) gelungen war. Allerdings wurde auf die Charakterisierung des Enzyms verzichtet.

Bereits 1986 wurde eine *N*-Methyltransferase beschrieben, die unter anderem aus *P. somniferum*-Zellsuspensionskulturen isoliert worden war und (*S*)-Canadin ((*S*)-7,8,13,14-Tetrahydroprotoberberin) und (*S*)-Stylopin methylierte (Rueffer und Zenk, 1986). Diese Arbeiten waren durch die partielle Aufreinigung und Charakterisierung der Enzyme aus Zellsuspensionskulturen von *E. californica* und *Corydalis vaginans* fortgeführt worden. Beide Enzyme methylierten (*S*)-Canadin, das bevorzugte Substrat war jedoch (*S*)-Stylopin (Rueffer et al., 1990). Infolge dieser zweiten Arbeit wurde das Enzym als SAM: (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase bezeichnet. Ähnliche Daten konnten auch für eine *N*-Methyltransferase aus *Sanguinaria canadensis* gezeigt werden (O'Keefe und Beecher, 1994).

Eine noch immer ungeklärte Frage ist die Regulation der Biosynthese. *In vitro* wurde gezeigt, dass sich beispielsweise die Salutaridinsynthese durch hohe Stereoselektivität auszeichnet und nur (*R*)-Retikulin als Substrat akzeptiert (Gerardy und Zenk, 1992). Die 1,2-Dehydroretikulinreduktase katalysiert ausschließlich die Hinreaktion und erzeugt dadurch gerichtet das Substrat für den Morphinanweg (De-Eknamkul und Zenk, 1992). Eine *negative feed back*-Hemmung konnte für SalAT durch Salutaridin, Thebain und Codeinon nachgewiesen werden, während Codein und Morphin keinen hemmenden Effekt hatten (Grothe et al., 2001; Lenz und Zenk, 1995b).

Die Transkription der Biosynthesenzyme ist in der Pflanze strikt entwicklungsreguliert, organ- und gewebesabhängig. Beispielsweise werden einige Gene wie die der Tyr/DopaDC und der NCS vorwiegend in der Wurzel transkribiert. Die Transkripte von *cor*, *bbe* und *cyp80b3* wurden in allen Pflanzenorganen nachgewiesen. Dies gilt auch für *salat*, *cnmt* und *6omt*, die Zahl ihrer Transkripte ist allerdings in den Blättern viel geringer als in den anderen Organen. Die meisten Transkripte der *4'omt* und *7omt* wurden im Stängel und der Blütenknospe nachgewiesen (Facchini und Park, 2003; Ounaroon et al., 2003).

Diese Ergebnisse wurden durch Western Blot Analysen für die 4'OMT, SalAT, CoR, die 7OMT und BBE bestätigt (Weid et al., 2004). Viele der Biosynthesegene können durch Pilzelicitorien und Methyljasmonat auf mRNA- und Proteinebene induziert werden (Frick und Kutchan, 1999; Gerardy und Zenk, 1992, 1993; Huang und Kutchan, 2000). Für die Tyr/DopaDC und BBE konnten nach Verwundung erhöhte Promotoraktivitäten nachgewiesen werden (Park et al., 1999). Die Transkription der Benzylisochinolinbiosynthesegene scheint also der Kontrolle durch konservierte Mechanismen unterworfen zu sein. Immunolokalisation zeigte, dass Tyr/DopaDC 2 und CoR phloemspezifisch in den Milchrohren exprimiert werden (Facchini und De Luca, 1994; Weid et al., 2004). Die Milchrohre bilden oberirdisch ein durch Fusion entstandenes, stark verzweigtes Netzwerk, das mit dem Gefäßbündel verbunden ist. Sie enthalten den

alkaloidhaltigen Latex, der dort in Vesikeln gesammelt wird. Die 4'OMT und SalAT sind in parenchymatischen Zellen lokalisiert, die an die Milchröhren angrenzen, die 7OMT dagegen in Parenchymzellen, die sich entfernt von den Milchröhren und Siebzellen befinden. Im Zusammenhang mit der Lokalisation der Alkaloide in den einzelnen Geweben, zeigt sich, dass es spezifische Transportsysteme geben muss, um die Alkaloide aus dem Parenchym in die Milchröhren zu transportieren (Weid et al., 2004).

1.3 *Metabolic engineering* – Der Eingriff in den Stoffwechsel

Das *metabolic engineering* von Naturstoffen ist ein neuer Ansatz, dessen Grundlage die Identifizierung von Biosyntheseenzymen ist. Es wird eingesetzt, um Stoffwechselprozesse besser zu verstehen, und für chemische Umwandlungen und supramolekulare Assemblierung zu nutzen. Um das zu erreichen, werden Stoffwechsellzyme oder Regulatorproteine auf genetischer Ebene manipuliert. Ziel dieser Eingriffe ist die Modifikation von Stoffwechselwegen, um die Produktion bestimmter Substanzen zu optimieren. Die Biosynthesen werden so verändert, dass man die Akkumulation spezieller Intermediate oder Biosyntheseprodukte erreicht oder Substanzen mit verbesserten Eigenschaften erhält. Transgene Pflanzen können beispielsweise zur Produktion bestimmter Naturstoffe eingesetzt werden und so ineffiziente, aufwendige Synthesen ersetzen.

Für die Steuerung der Produktion von Metaboliten müssen die einzelnen Reaktionen aufgedeckt werden. Sind die Stoffwechselwege und alle daran beteiligten Enzyme bekannt, können mittels *metabolic engineering* Schlüsselenzyme identifiziert werden. Daraus kann man die zu erwartenden Veränderungen des Stoffwechsels nach Deletion, Drosselung oder Verstärkung bestimmter Enzyme ableiten. Man kann Biosynthesen gezielt in die Richtung bestimmter Produkte lenken, unerwünschte Nebenreaktionen durch die Blockierung von Enzymen vermeiden und störende Intermediate abbauen. Das *metabolic engineering* beinhaltet aber nicht nur die Manipulation endogener Stoffwechselwege. Es ist auch möglich, spezifischere Enzyme im Zielorganismus zu exprimieren, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Außerdem können neue Enzyme aus anderen Organismen, sowie ganze Synthesen zur Etablierung neuer, alternativer Stoffwechselwege eingebracht werden.

Eine Erhöhung der Menge an Endprodukten gelingt beispielsweise durch die Überexpression limitierender Enzyme. Dabei wird die gebildete mRNA-Menge stark erhöht, was zu einer erhöhten Translation führt. Mit Hilfe von Antisenseexpression, Cosuppression oder RNAi kann man die Bildung bestimmter pflanzlicher Inhaltstoffe minimieren (Page, 2005). Die drei Verfahren bedienen sich des Mechanismus des PTGS, bei dem doppelsträngige RNS durch interne Abwehrmechanismen abgebaut wird, was auch den Abbau der Zielsequenz zur Folge hat

(Hutvagner und Zamore, 2002; Klahre et al., 2002).

Für den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel wurden erfolgreiche Versuche des *metabolic engineering*s dokumentiert. So konnte beispielsweise in *Hyoscyamus niger* der Gehalt an dem Tropanalkaloid Scopolamin durch die Überexpression einer Putrescine-*N*-Methyltransferase und einer 6- β -Hydroxylase erreicht werden (Zhang et al., 2004). Die Antisenseexpression der Deoxyxylolosephosphat-Reduktoisomerase in Pfefferminze führte zur Verringerung des Produktes Menthofuran (Mahmoud und Croteau, 2001). Durch die Transformation mit dem RNAi-Konstrukt einer der drei *N*-Methyltransferasen der Koffeinsynthese in Kaffee, konnten Pflanzen generiert werden, die Koffein nur in stark reduzierten Mengen produzieren (Ogita et al., 2003). Mit diesen Pflanzen könnte man auf das aufwendige Verfahren zur Gewinnung entkoffeinierten Kaffees verzichten.

Durch die Transformation mit Genen anderer Arten, können bestehende Biosynthesen im Zielorganismus modifiziert oder etabliert werden. So führte die Überexpression der Sequenz der (*S*)-Scoulerin-9-*O*-Methyltransferase (9OMT) aus *C. japonica* in *E. californica*, zu neuen Produkten (Sato et al., 2001). In *Arabidopsis thaliana* wurde die komplette Dhurrin-Synthese eingebracht, indem die Pflanze mit den Genen der erforderlichen Enzyme aus *Sorghum bicolor* transformiert worden war (Kristensen et al., 2005). Ein prominentes Beispiel von großem ernährungswissenschaftlichem Nutzen ist gentechnisch veränderter Reis, der β -Carotin synthetisiert, und so in bestimmten Gebieten der Welt dem Vitamin A-Mangel und seinen Folgen entgegenwirkt (Ye et al., 2000). Durch die stabile Integration von Genen in Tomaten, Kartoffeln und Bananen gelang es, sie in Bioreaktoren umzuwandeln, die in der Lage sind, Impfstoffe zu produzieren, die flächendeckender und leichter applizierbar eingesetzt werden könnten (Sala et al., 2003).

Aufgrund der großen Bedeutung der Schlafmohnalkaloide für die pharmazeutische Industrie und der durch die Anbaurestriktionen eingeschränkten Nutzbarkeit für die Lebensmittelindustrie wird die Veränderung der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* durch *metabolic engineering* angestrebt. Dadurch sollen zum einen Pflanzen geschaffen werden, die bestimmte Inhaltsstoffe mit medizinischer Relevanz verstärkt produzieren. Andererseits ist es erstrebenswert, die Biosynthese in den Pflanzen stillzulegen. Ohne die Biosynthese suchterzeugender Drogen und Drogenvorläufern könnte Schlafmohn auch in Mitteleuropa als Zier- und Nutzpflanze angebaut werden. In der Lebensmittelindustrie dienen Mohnsamen als Zutat vieler Backwaren. Aus ihnen wird außerdem Mohnöl gepresst, das reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und den Vitaminen E und K ist (Beyer und Walter, 1991).

Es gibt bereits Beispiele erfolgreichen *metabolic engineering*s von *P. somniferum*. Die Transformationen mit *bbe* in *antisense*-Orientierung und *cor*-RNAi führten zu überraschenden

Ergebnissen. Es war beabsichtigt, die Benzo[c]phenanthridinalkaloidbiosynthese durch die Expression von anti-*bbe* zu blockieren oder zu reduzieren. In den transgenen Pflanzen wurden aber keine Änderungen der Konzentration der Benzo[c]phenanthridine festgestellt, statt dessen kam es zu einem Anstieg der Alkaloide Retikulin, Laudanin, Laudanosin, Dehydroretikulin, Salutaridin und (*S*)-Scoulerin (Frick et al., 2004). Die Transformation mit einem *cor*-RNAi-Hybridkonstrukt, durch das alle Mitglieder der *cor*-Multigenfamilie ausgeschaltet werden konnten, führte zur Minimierung von Morphin und Codein im Latex und zur Intermediatakkumulation der Alkaloide Retikulin, Laudanin und Laudanosin (Allen et al., 2004). Neben der Akkumulation bestimmter Intermediate geben die Ergebnisse Hinweise auf die Regulation der Biosynthese in den Pflanzen. Bisher waren nur Transformationen von Zell- und Wurzelkulturen vorgenommen worden (Facchini und Park, 2003; Le Flem-Bonhomme et al., 2004; Park und Facchini, 2000; Park et al., 2002, 2003), die Manipulation der ganzen Pflanze eröffnet jedoch neue Möglichkeiten, um die Komplexität ihres Stoffwechsels zu verstehen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Von besonderer Bedeutung für die Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* sind die *O*- und die *N*-Methyltransferasen (Abb. 1.5).

Zu Beginn dieser Arbeit waren die drei *O*-Methyltransferasen 6OMT, 7OMT und 4'OMT, die Methylgruppen auf die Hydroxygruppen ihrer Substrate (*S*)-Norcoclaurin, (*S*)-Retikulin und 3'-Hydroxy-(*S*)-*N*-Methylcoclaurin übertragen, bekannt (Ounaron et al., 2003; Ziegler et al., 2005).

In dieser Arbeit sollten transgene Schlafmohnpflanzen generiert werden, die die *6omt* und die *7omt* aufgrund von eingebrachten *sense*-Konstrukten überexprimieren. Außerdem sollte die Expression beider Enzyme mit Hilfe von RNAi-Konstrukten minimiert werden.

Ins Genom integrierte RNAi-Konstrukte lösen spezifischen, *siRNA*-vermittelten Abbau von mRNA aus, wodurch die Transkriptmenge der Zielsequenz in der Zelle abnimmt (Wesley et al., 2001). Die genannten Konstrukte sollten in das Genom des Schlafmohns übertragen und mittels somatischer Embryogenese aus Kalluskulturen transgene Pflanzen generiert werden (Chitty et al., 2003). Diese Methode der Pflanzengenerierung war für Schlafmohn schon seit einigen Jahren am Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) etabliert.

Von Interesse waren die Auswirkungen auf die nachweisbaren Transkriptmengen und die Zusammensetzung der Alkaloide im Latex transgener Pflanzen, in denen die entsprechenden Gene überexprimiert, beziehungsweise nicht exprimiert werden.

Die Abfolge der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* ist seit langem bekannt. Zur vollständigen Aufklärung ihrer Mechanismen wird es angestrebt, alle beteiligten Enzyme zu

reinigen und als cDNS-Klone zu isolieren. Dazu zählen die (*S*)-Coclaurin und die (*S*)-Stylopin umsetzenden *N*-Methyltransferasen. Eine Aufreinigung der Enzyme und die Isolation der cDNS-Klone beider Enzyme aus *P. somniferum* waren bisher nicht gelungen. Die kodierenden Sequenzen beider *N*-Methyltransferasen sollten isoliert, exprimiert und die Enzyme charakterisiert werden.

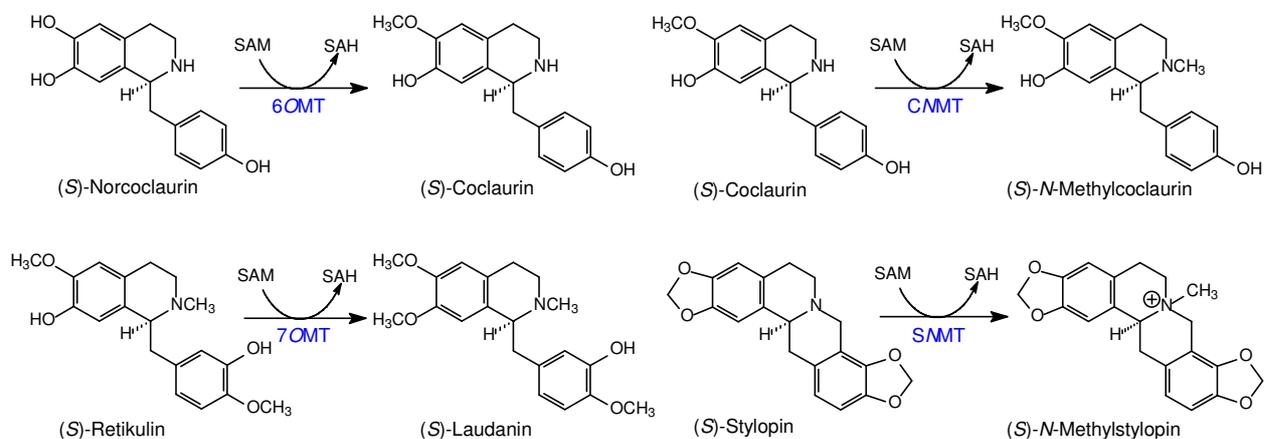


Abb. 1.5: Reaktionen der (*S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT), (*S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7OMT), (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT) und (*S*)-Stylopin-*N*-Methyltransferase (SMMT), die Methylgruppen vom SAM unter Bildung von SAH auf ihre Substrate übertragen

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Das Gros der im Labor benötigten hochreinen Chemikalien wurde durch Erzeugnisse der Firmen Roth, Serva, Merck und Sigma abgedeckt. Einige spezielle Chemikalien und Enzyme wurden bei anderen Firmen bezogen. Gesondert aufgeführt sind im Folgenden die genutzten Alkaloide:

Aus dem Labor von	(<i>R</i>)-Cocclaurin	Sigma:	β -Alanin
Prof. Dr. M. H. Zenk,	(<i>S</i>)-Cocclaurin		(<i>S</i>)-Norcocclaurin
Biozentrum Halle:	L-Dopa		(<i>S</i>)- <i>N</i> -Methylcocclaurin
	Dopamin		Putrescin
	Morphin		Salsolinol
	(<i>S</i>)-Norretikulin		Spermidin
	Papaverin		Theobromin
	(<i>S</i>)-Retikulin		Theophyllin
	(<i>S</i>)-Scoulerin		Xanthosin
	(<i>S</i>)-Stylopin		7-Methylxanthin
Fluka:	Koffein		(<i>S</i>)-3'-Hydroxy- <i>N</i> -Methylcocclaurin

2.2 Enzyme und Kits

Enzyme:

Alkalische Phosphatase

Lysozym

Pfu-Polymerase

Restriktionsendonukleasen

RNase A

T4-DNA Ligase

Kits:

QIAquick PCR Purification Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

QIAprep[®] Spin Miniprep Kit

verschiedene Topo cloning - Kits

pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems

Rapid DNA Ligation Kit

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit

GeneRacer[™] Kit

Megaprime DNA Labeling System

HexaLabel[™] DNA Labeling Kit

Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit

DNeasy[®] Plant Maxi Kit

Roche

Sigma, Fluka

Promega, Fermentas

Fermentas, Invitrogen,

New England Biolabs

Serva

Invitrogen, Promega

Qiagen

Qiagen

Qiagen

Invitrogen

Promega

Roche

Invitrogen

Invitrogen

Amersham

Fermentas

Promega

Qiagen

2.3 Materialien und Reagenzien

Steriles Verbrauchsmaterial:

Eppendorf, Greiner, Nunc
Sarstedt, Kisker

Southern/Northern Blot Analyse:

Phosphoimagerscreen
Filterpapier/GB 004 Gel Blotting Papier
Biodyne[®] B Membran, positiv geladene Nylon 6,6
Express Hyb[™] Hybridization Solution
ProbeQuant[™] G-50 Micro Columns

Molecular Dynamics
Schleicher und Schuell
Pall Corporation
BD Biosciences
Amersham

Sequenzierung:

BigDye Terminators Version 1.1 + Puffer

Applied Biosystems

Phytokammer:

L36 W/840 LUMILUX COOL WHITE

OSRAM

Gewächshaus:

Nützlinge: (*Chrysoperla carnea*, *Steinernema feltiae*,
Amblyseius cucumeris)

Hatto-Welte

Peters Professional
Flory 3 und Flory 10
Baymat flüssig
Schwefelverdampfer
SON-T PIA AGRO 400W

Scotts Deutschland
Euflo GmbH
Bayer
Kammlot
Philips

Elektroporation:

Elektroporator und Elektroporationsküvetten

BioRad

His-tag-Protein-Aufreinigung:

Talon und Gravity Flow Column
PD-10 Desalting column

BD Biosciences
Amersham Biosciences

Proteinkonzentrationsbestimmung:

BioRad Protein Assay Lösung

BioRad

Marker:

1 kb+ / 1 kb DNA Ladder
1 kb DNA-Ladder / 1 kb DNA-Ladder-Mix
 λ DNA-EcoRI/HindIII / λ -Pst-Marker
RNA Ladder High Range
Protein Molecular Weight Marker

Invitrogen
Fermentas
Fermentas
Fermentas
Fermentas

Radioaktivität:

α -³²P-dATP (3000 Ci/mmol)
Adenosyl-L-methionin, S-[methyl-¹⁴C]

ICN Pharmaceuticals
ARC

PCR:

Taq DNA Polymerase 10 x Reaktionspuffer mit MgCl₂
dNTP-Mix 10 mM
Oligo-Nukleotide (Primer)

Promega
Bioline
MWG-Biotech

2.4 PCR-Primer

Die in dieser Arbeit in Polymerasekettenreaktionen und für Sequenzierungen (3.11) verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: die verwendeten PCR-Primer und ihre Sequenzen, sowie die Referenz (Ref.)

Primer	Sequenz in 5'→3'-Orientierung	Ref.
6OMTRNA _{is}	CTCGAGTCTAGAAAGCGTTGGGGAAGAGTAT	1
6OMTRNA _{ias}	AATTCATCGATAGGGTAAGCCTCAATTACAGA	1
7OMTRNA _{is}	CTCGAGTCTAGATTGAGAGAGCTCATGGATGT	1
7OMTRNA _{ias}	GAATTCGGATCCCTCGATGATGCAAGGAAAT	1
6OMT _{fls}	GCGCGCTACGTAATGGAAACAGTAAGCAAGATTGAT	1
6OMT _{flas}	GCGCGCTACGTATTAATAAGGGTAAGCCTCAATTAC	1
7OMT _{fls}	GCGCGCTACGTAATGGATACTGCAGAAGAAAGGT	1
7OMT _{flas}	GCGCGCTACGTATTATTCTGGAAAGGCCTCGAT	1
NMT-Facchini-start	ATGCAGCTAAAGGCAAAGGAAG	1
NMT-Facchini-stop	TCATTTTTTCTTGAAGAGAAGATGGG	1
NMT-Facch-start_Bam	GCGCGGATCCATGCAGCTAAAGGCAAAGG	1
NMT-Facch-stop_Hind	GCGCAAGCTTTCATTTTTTCTTGAAGAGAAGA	1
NMT5'RACE	TGTCTCAATCTCTCCTGACATTTCCA	1
NMT5'RACEnested	GAGATGATTTATAACCCCATTCGACACG	1
NMT3'RACE	ACGTCTGCAATGGGGTTATAAATCA	1
NMT5'RACEnested	TGGAAATGTCAGGAGAGATTGAGACA	1
NMTstart	ATGGGTTCAATAGATGA	1
NMTstop	TCACTACTTCTTCTTGAAAA	1
NMTstartBamHI	GCGCGGATCCATGGGTTCAATAGATGA	1
NMTstopNotI	GCGCGCGGCCGCTCACTACTTCTTCTTGAAAA	1
NPTII _{sense}	CAGGCTATTCGGCTATGACTG	2
NPTII _{antisense}	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	2
S4S4 _{sense}	TAAGCGTACTCAGTACGCTTC	3
Me13' _{antisense}	GCATTACAACATGCATCTGAC	3
pHANs	ACAATCCCCTATCCTTCG	4
pHAN _s	TACAACGTGCACAACAGAAT	4
pHAN _{Introns}	GTCGAACATGAATAAACAAGG	4
pHAN _{Intronas}	CACTTAACATTTTATACTAAAAGG'	4

Referenzen: 1 = diese Arbeit

2 = Le Flem-Bonhomme et al. (2004)

3 = Frick et al. (2004)

4 = Kempe (2003)

2.5 Standardpuffer

TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
20 x SSC:	0,3 M Natriumcitrat/HCl, 3 M NaCl, pH 7,0
50 x TAE:	2 M Trisacetat, 50 mM EDTA
10 x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 6,5-7,0 mit NaOH
1 x FA-Puffer:	10 % v/v 10 x MOPS-Puffer, 2 % v/v Formaldehyd
5 x Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer:	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % w/v SDS, pH 8,3

2.6 Ladepuffer

Ladepuffer dienen dem „Beschweren“ und der Stabilität der Proben. Das enthaltene Glycerin sorgt dafür, dass die Proben zur Elektrophorese gut in die Ladetaschen der Gele sinken. Substanzen wie EDTA und DTT stabilisieren die Proben. Um die Lauffront im Gel sichtbar zu machen, enthalten die Ladepuffer einen Farbstoff.

DNS / RNS-Ladepuffer:

10 x Ladepuffer Orange G:	50 % v/v Glycerin, 200 mM EDTA, 1 Spatelspitze Orange G
2 x / 6 x RNS-Ladepuffer:	Fermentas

Proteinladepuffer:

2 x SDS-PAGE-Ladepuffer: (Sambrook et al., 1989)	100 mM Tris/HCl pH 6,8, 20 % v/v Glycerin, 4 % w/v SDS, 200 mM DTT, 0,2 % w/v Bromphenolblau
5 x SDS-PAGE-Ladepuffer:	225 mM Tris/HCl pH 6,8, 50 % v/v Glycerin, 5 % w/v SDS, 250 mM DTT, 0,05 % w/v Bromphenolblau

2.7 Nährmedien

Nährmedien sind unverzichtbar für die Anzucht von Bakterien, Zellkulturen und Pflanzen.

Es ist notwendig, die Medien vor Gebrauch zu autoklavieren, da nur so steriles Arbeiten garantiert werden kann. Die meisten Medien können sowohl flüssig für Schüttelkulturen, als auch in fester Form (Zugabe von Agar vor dem Autoklavieren) als Platten zur Kultivierung eingesetzt werden. Durch das Einbringen von Antibiotikaresistenzgenen über Vektoren in den zu kultivierenden Organismus ist eine Selektion über Antibiotika in/auf dem Medium möglich.

2.7.1 LB-Medium

Als klassisches Nährmedium wurde LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) zur Anzucht von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* verwendet (Sambrook et al., 1989).

2.7.2 SOC-Medium

Nach der Transformation mittels Elektroporation (3.8.2) benötigten die Agrobakterien dieses besonders reichhaltige Medium (Sambrook et al., 1989).

2.7.3 B5O-Medium

B5O ist das so genannte Embryogenesemedium bei der Entwicklung von Schlafmohnpflanzen aus Kalluskulturen. Es induziert die Bildung von Embryonen aus Typ-II-Kalli und wird für die Keimlingsanzucht unter sterilen Bedingungen genutzt (Chitty et al., 2003; Larkin et al., 1999).

100 ml/l	Makronährstoffe	10 x
1 ml/l	B5 Mikronährstoffe	1000 x
10 ml/l	B5 Eisenlösung	100 x
10 ml/l	B5 Vitaminlösung	100 x
2 g/l	MES-Puffer	
20 g/l	Saccharose	
11,3 g/l	Pflanzenagar	
	pH 5,6 mit NaOH	

10 x B5 Makronährstoffe: 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 250 mM KNO_3 , 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

1000 x B5 Mikronährstoffe: 60 mM $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$,
50 mM H_3BO_3 , 7 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 4,5 mM KJ
0,1 mM $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mM $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$,

100 x B5 Vitaminlösung: 0,8 mM Nicotinsäure, 3 mM Thiamin x HCl,
0,5 mM Pyridoxin x HCl, 55 mM Inositol

100 x B5 Eisenlösung: 10 mM Na_2EDTA , 100 mM $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

2.7.4 19D-Medium

2,4-D-Lösung: 4,5 mM 2,4-D, pH 6 mit 1 M HCl

19D-Medium: B5O-Medium + 1 ml/l 2,4-D-Lösung

19D-Medium dient der Kallusinduktion. Die transformierten *P. somniferum*-Hypokotyle wurden auf diesem Medium ausgelegt und entwickelten sich zu Kalluskulturen. Aus den zunächst entstandenen Typ-I-Kalli wurden hier Typ-II-Kalli gebildet, aus denen sich nach Inkubation auf B5O-Medium Embryonen entwickelten. In seiner Zusammensetzung entspricht 19D dem B5O-Medium, beinhaltet aber zusätzlich das Phytohormon 2,4-D, ein synthetisches Auxin (Chitty et al., 2003; Larkin et al., 1999).

2.8 Antibiotika

Stammlösung		eingesetzte Endkonzentration
100 mg/ml	Ampicillin in H ₂ O	100 µg/ml
50 mg/ml	Carbenicillin in H ₂ O	50 µg/ml
34 mg/ml	Chloramphenicol in Ethanol	34 µg/ml
25 mg/ml	Kanamycin in H ₂ O	25 µg/ml
7 mg/ml	Gentamicin in H ₂ O	7 µg/ml
25 mg/ml	Paromomycin in H ₂ O	25 µg/ml
20 mg/ml	Rifampicin in Methanol	20 µg/ml
50 mg/ml	Spectinomycin in H ₂ O	10 µg/ml
	Timentin (fest)	150 µg/l

2.9 Plasmide

Klonierungsvektoren:

pCR[®]2.1 , pCR[®]2.1 TOPO , pCR[®]4 TOPO[®] (www.invitrogen.com)

pGEM T, pGEM T Easy (www.promega.com)

pHannibal: 5,8 kb, zum Erstellen von RNAi-Konstrukten, 35S-Promotor/OCS-Terminator, Amp^r (Wesley et al., 2001)

Expressionsvektoren:

pQE30: 3,4 kb, N-terminaler 6 x His-tag, Amp^r, T5-Promotor (www.qiagen.com)

pHis 8: 4,6 kb, modifizierter pET 28a-Vektor, T7-Promotor/Terminator, Amp^r, N-terminaler 8 x His-tag, Thrombinschnittstelle (Jez et al., 2000)

pCRT7/NT-TOPO: 2,8 kb, T7-Promotor/Terminator, 3'-Thymidinüberhänge, Topoisomerase (kovalent gebunden), N-terminaler 6 x His-tag (www.Invitrogen.com)

pART27: 11,7 kb, Binärvektor zur Expression von RNAi-Konstrukten in Pflanzen, Spec^r, *nptII* mit NOS-Promotor/Terminator (Gleave, 1992)

pPLEX X002: 13,1 kb, NotI-Kassette aus pPLEX 3002 (Schünmann et al., 2003) in pBS435 (Allen und Larkin, nicht publiziert) (Abb. 2.1)

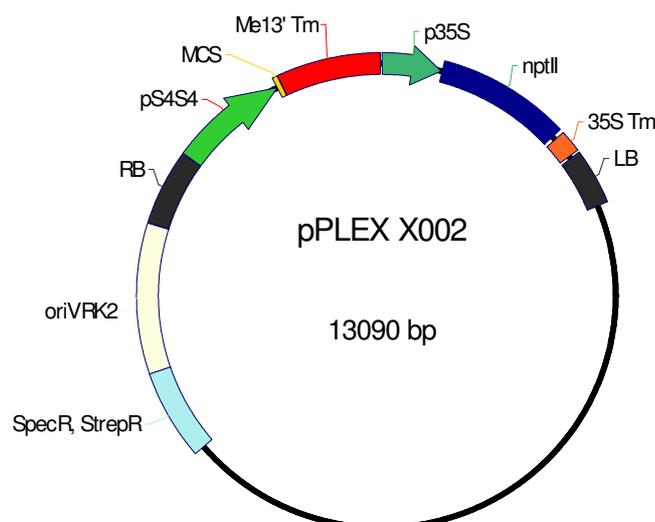


Abb. 2.1: pPLEX X002-Vektorkarte; SpecR, StrepR: Resistenzgen gegen Spectinomycin/Streptomycin; RB, LB: *right* und *left* border, Begrenzungen der übertragenen T-DNS; Expressionskassette: pS4S4: Doppelpromotor eines Kleevirus (*subterranean clover stunt virus*); Me13 Tm=Terminator aus *Flaveria bidentis* NADP-malic enzyme (Ali und Taylor, 2001a, b); MCS = *multiple cloning site*; Selektionskassette: *nptII* für Neomycinphosphotransferase II (Kanamycin-/Paromomycinresistenz) mit 35S-Promotor und -Terminator (Chitty et al., 2003; Frick et al., 2004)

2.10 Organismen und ihre Kultivierung

Papaver somniferum

Samen des *P. somniferum*-Kultivars CO58-34 wurden bereitgestellt von Tasmanian Alkaloids Pty Ltd, Westbury, Australien.

Phytokammerbedingungen: (Frick et al., im Druck)	Temperatur: 22-24°C; Fluxrate: 160 µMol/m ² s Belichtung: 16 h/d mit Standard-Tageslicht
Gewächshausbedingungen: (Frick et al., 2005b)	Temperatur tags: 22-24°C, nachts: 18-20°C Belichtung: 16 h/d mit Hochdrucknatriumdampfsystem Luftfeuchtigkeit: 50 %

Die Kalluskulturen von CO58-34 sind auf 19D- und B5O-Medium (2.7) mit den Antibiotika Paromomycin und Timentin in Phytokammern kultiviert worden. Paromomycin fungierte als Selektionsmarker, Timentin war zur Hemmung des Wachstums von Agrobakterien zugesetzt worden. Die Kalli wurden im Abstand von 21 d auf frisches Medium umgesetzt.

Die aus den Kalluskulturen generierten T0-Pflanzen und die ausgesäten Pflanzen der T1- und T2-Generation wurden ganzjährig im Gewächshaus in gedämpfter Komposterde mit Perlitt gezogen. Um sie optimal mit Nährstoffen und Spurenelementen zu versorgen, düngte man sie im Abstand von 7 bis 14 Tagen mit Flory 3 oder Peters Professional (2.3). Die transgenen Pflanzen zeigten in der T1- und T2-Generation Anzeichen von Eisen- und Magnesiummangel, die sich durch eine Weißfärbung der Blätter äußerten. Um diesen Mangel auszugleichen, wurde zusätzlich mit Flory 10 (10 % Mg) gedüngt und die Basisdüngung verstärkt.

Zum Schutz vor Schädlingen wie Tripslarven, Trauermückenlarven oder Roter Spinne setzte man Nützlinge auf den Pflanzen aus (*Chrysoperla carnea*, *Steinernema feltiae*, *Amblyseius cucumeris*; 2.3). Zur Bekämpfung von Mehltau, besprühte man die generierten T0-Pflanzen und die dazu ausgesäten CO58-34-Kontrollpflanzen mit Baymat. In der T1- und T2-Generation wurde der Mehltaubefall verhindert, indem die Gewächshauskammern mit Schwefelverdampfern ausgestattet wurden.

Escherichia coli

Die verschiedenen Stämme von *E. coli* wurden zur Vervielfältigung von Plasmiden in Klonierungen und zur Expression von Proteinen genutzt. Sie wachsen in/auf LB-Medium. Bei einer optimalen Kultivierungstemperatur von 37°C beträgt ihre Generationszeit 20-30 Minuten.

DH5α	www.Clontech.com
TOP10, TOP10F'	www.Invitrogen.com
BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS	www.Invitrogen.com
BL21(DE3)RIL	www.Stratagene.com
M15	www.Qiagen.com

Agrobacterium tumefaciens

Der Agrobakterienstamm AGL1 war von CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien zur Verfügung gestellt worden. Er wurde in/auf LB-Medium und SOC-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Rif, Carb) bei 28°C kultiviert (Hellens et al., 2000; Lazo et al., 1991).

2.11 Spezielle Geräte

PCR-Thermocycler:	PE Applied Biosystems MJ Research Eppendorf	GenAmp® PCR System 9700 200 Peltier Thermal Cycler Mastercycler gradient
Zentrifugen:	Eppendorf DuPont	Centrifuge 5403 Centrifuge 5415D Centrifuge 5810R Centrifuge 5815R Sorvall® RC 26 PLUS Sorvall® RC 28 S
Sequenzierer:	Applied Biosystems	ABI 310 Avant Genetic Analyzer ABI 3100 Avant Genetic Analyzer
Ultraschallgeräte:	Bandelin Electronics	UH 60 Sanopuls HD 60 Ultraschallbad
Szintillationszähler:	Beckman	LS 6000 TA
Phosphoimager:	Molecular Dynamics	Image Eraser Model #810 Storm 860
Phytokammern:	Heraeus Vötsch Climatron Tira Umweltsimulation GmbH	Typ: TBR 1203-700.5.4
HPLC:	Agilent Technologies	Agilent 1100
LC-MS(TOF):	Agilent Technologies Applied Biosystems PE-Sciex	Agilent 1100 LC-Anlage Mariner Turbulon Spray Quelle
LC-ESI-MS:	Finnigan ThermoFinnigan SepServ	MAT TSQ 7000 system Surveyor micro-HPLC Ultrasep ES RP18E-Säule

3. Methoden

3.1 Probennahme

3.1.1 Latex

Latexsammelpuffer: 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 23 mM Ascorbinsäure, 500 mM Mannitol,

Der Alkaloidgehalt des Schlafmohns wurde aus dem Kapsellatex bestimmt. Drei Tage nach dem Öffnen der Blüten wurden die inzwischen geschwellenen Kapseln mit einem Skalpell angeritzt und der austretende Milchsaft in 200 µl Latexsammelpuffer (Decker et al., 2000) überführt und gelöst (Frick et al., 2005b). Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.1.2 Pflanzenmaterial

Das für die Nukleinsäureextraktion aus *P. somniferum* benötigte Pflanzenmaterial wurde mit einem Skalpell von der Pflanze abgetrennt und zum Schutz vor nukleolytischem Abbau von RNS sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Durchführung der folgenden Standardmethoden richtete sich weitgehend nach den Protokollen der Hersteller von Enzymen oder Kits oder nach Sambrook et al., (1989):

- Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten
- Extraktion von DNS aus Agarosegelen
- Plasmidpräparation aus *E. coli* und *A. tumefaciens*
- Restriktionsverdaue
- Dephosphorylierung von Vektoren mit Phosphatasen
- Ligationen

3.3 Polymerasekettenreaktionen - PCR

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte eines Templates (zu kopierender DNS-Abschnitt), die durch die Sequenz der eingesetzten Primer begrenzt werden (Mullis und Faloona, 1987). Die Sequenzverlängerung wurde durch die *Taq*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) oder die *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) katalysiert.

Standard-PCR-Ansatz:

X µl Template- DNS
 5 µl 10xPuffer
 2,5 µl dNTPs (20 mM)
 2,5 µl 3'-Primer (20 µM)
 2,5 µl 5'-Primer (20 µM)
 0,5 µl Polymerase (2,5u)
 ad 50 µl Wasser

Standard-PCR-Programm:

	94°C	3 min
35 x	94°C	30 s
	primerspezifische <i>annealing</i> -Temperatur und -zeit	
	72°C	fragmentlängen- und polymeraseabhängige Elongationszeit
	72°C	7 min
		auf 4°C abkühlen

3.4 RACE – PCR

Um die Sequenz eines Gens, ausgehend von einem DNS-Fragment, dessen Sequenz weder ein Start- noch ein Stopkodon enthält, zu erhalten, bedient man sich einer RACE- (*rapid amplification of cDNA ends*)-PCR. Durch diese Methode ist es möglich, das 3'- sowie das 5'-Ende eines Gens zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde der GeneRacer™ Kit von Invitrogen genutzt. Der Kit ermöglicht das Anhängen von 5'-Oligos an die mRNA und von 3'-Oligos während der reversen Transkription. Von dem bekannten DNS-Fragment werden spezifische Primer abgeleitet (Abb. 3.1: Pfeil = Primer 1, 2, 3, 4), die in PCRs gemeinsam mit Primern gegen die angehängten Oligos eingesetzt werden, so dass die fehlenden Sequenzen zwischen 5'- und 3'-Ende der mRNA und dem DNS-Fragment synthetisiert werden. Mit nested Primern (2, 4, 6, 8) kann das Ergebnis verbessert werden (Abb. 3.1). Durch Sequenzierung (3.11) der erhaltenen Fragmente ließen sich die Sequenz des Gens und der untranslatierten Regionen ermitteln.

3.5 Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNS wurden in dieser Arbeit 0,8-1,0 %ige Agarosegele verwendet (0,8-1,0 % w/v Agarose in 1 x TAE, mit 0,33 µg/ml Ethidiumbromid). Vor dem Auftragen mischte man die DNS mit einem adäquaten Ladepuffer. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE. Zur Analyse von RNA wurden 1,2 %ige Formaldehyd-Agarosegele genutzt (1,2 % w/v Agarose in 1 x FA-Puffer (2.5) mit 1,8 % v/v Formaldehyd und 0,33 µg/ml Ethidiumbromid). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit RNS-Ladepuffer versetzt und denaturiert (5 min, 65°C). Als Laufpuffer fungierte 1 x FA-Puffer. Die Größenordnung der aufgetrennten Fragmente erfolgte anhand eines Längenstandards (Marker) (Sambrook et al., 1989).

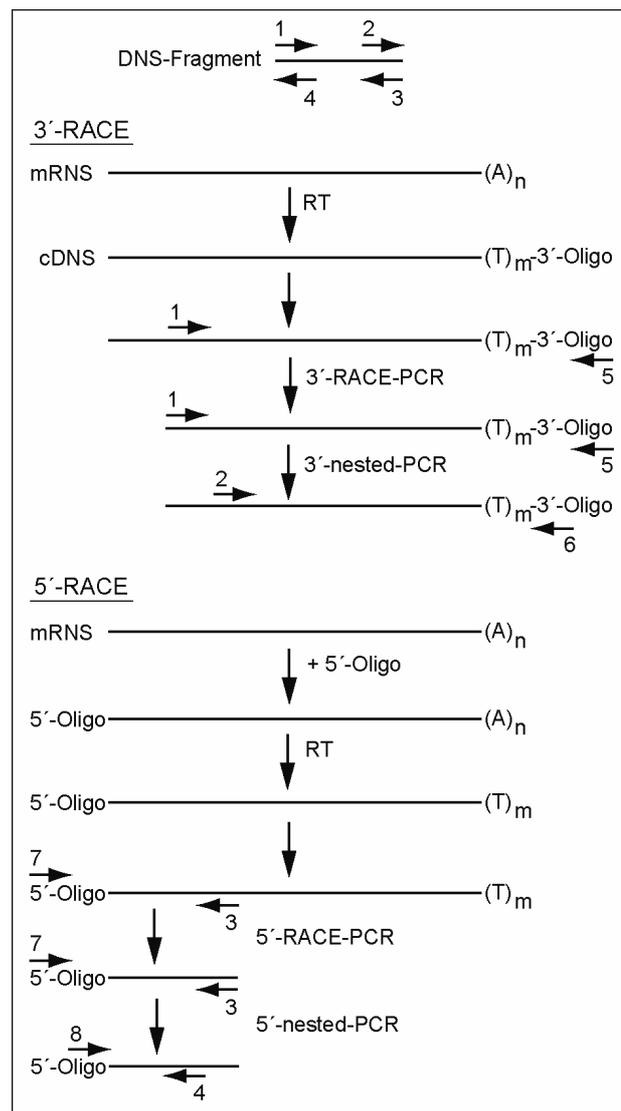


Abb. 3.1: schematische Darstellung der RACE-PCR; Die Reaktionen sind im Herstellerprotokoll des Kits detailliert beschrieben (GeneRacer™ Kit von Invitrogen).

3.6 Herstellung kompetenter Zellen

Um Fremd-DNS besser aufnehmen zu können, werden Mikroorganismen kompetent gemacht.

3.6.1 Chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen – Calciumchlorid-Methode

TfB I-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl_2 , 100 mM KCl, 10 mM CaCl_2
15 % v/v Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure

TfB II-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl_2 , 15 % v/v Glycerin,
pH 7 mit NaOH

200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer DH5 α -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{550} = 0,28$ wachsen gelassen. Je 25 ml der Kultur wurden bei 1200 x g und 4°C 5 min zentrifugiert. Jedes Pellet wurde in 25 ml TfB I-Puffer durch kräftiges Schütteln resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Nach einer weiteren Zentrifugation versah man die entstandenen Pellets mit 2 ml TfB II und resuspendierte sie durch vorsichtiges Schwenken im Eisbad. Je 200 μl -Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zum Verbrauch bei -80°C gelagert (Hanahan, 1983).

3.6.2 Elektrokompente Agrobakterien

MinA-Medium: 60 mM K_2HPO_4 , 33 mM KH_2PO_4 , 7,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
0,8 mM MgSO_4 , 2 mM Trinatriumcitrat

MG/L-Medium: 27,4 mM Mannitol, 6,8 mM Glutaminsäure, 0,25 % v/v Hefeextrakt,
0,5 % v/v Trypton, 1,7 mM NaCl, 0,4 mM MgSO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4 ,
pH 7 mit NaOH

25 ml MinA-Medium (Miller, 1972) wurden mit 250 μl Glukose (20 %), Rifampicin und Carbenicillin versetzt und mit 250 μl eines AGL1-Glycerinstocks angeimpft. Die Schüttelkultur wurde 1-2 d bei 28°C bis zum Erreichen der mittleren log-Phase inkubiert. Bei schlechtem Wachstum der Kulturen wurde statt des MinA-Mediums mit 2×10^{-2} mM Biotin, Rif und Carb versetztes MG/L-Medium (Garfinkel und Nester, 1980) genutzt. Je 1,5 ml der Kultur wurden in den entsprechenden Reaktionsgefäßen zentrifugiert (800 x g, 4°C, 5 min). Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen und die Pellets anschließend in 400 μl davon resuspendiert. Diese Agrobakteriensuspensionen vereinte man und lagerte sie als Aliquots zu je 40 μl bei -80°C.

3.7 Aufarbeitung und Analyse der Latexproben

3.7.1 Aufarbeitung des Latex

interner Standard: Dihydrocodein (Dhc); 1 μg Dhc-Tartrat/ μl \rightarrow 30 μl = 20,05 μg Dhc
 φ = Zentrifugation bei 16100 x g, 30 min, 4°C

Die im Latexsammelpuffer aufgenommenen Latexproben (3.1.1) wurden aufgetaut und mit 10 μl

Ascorbatlösung (1 g/25 ml) versetzt. Durch eine Zentrifugation (φ) der Lösung erhielt man ein Pellet (P1) und einen Überstand ($\ddot{U}1$), wobei sich hydrophile Komponenten im Sammelpuffer gelöst hatten und die hydrophoben Bestandteile im Pellet verblieben waren.

Für die quantitative Analyse war es notwendig, das Volumen von $\ddot{U}1$ ($V_{\ddot{U}1}$) zu ermitteln und den Gesamtproteingehalt zu bestimmen (3.16). Zur Bestimmung des Alkaloidgehaltes wurde ein Aliquot (50 μ l) entnommen, mit 30 μ l Standard und 320 μ l Ethanol (70 %) gemischt und zentrifugiert (φ). Der so erhaltene Überstand ($\ddot{U}2$) wurde mittels HPLC analysiert. Um die hydrophoben Bestandteile aus dem Pellet (P1) zu extrahieren, wurde dieses im Ultraschallbad in 970 μ l Ethanol (70 %) und 30 μ l Standard gelöst (6 min in Eiswasser). Eine Zentrifugation (φ) ergab Überstand ($\ddot{U}3$), der in der HPLC analysiert werden konnte. Bei zu hohen Alkaloidkonzentrationen war eine Verdünnung der Proben notwendig (Frick et al., 2005b).

3.7.2 Qualitative und quantitative Analyse des Latex

Lösung A: $H_2O + 2\% \text{ Acetonitril} + 0,001\% H_3PO_4$

Lösung B: $\text{Acetonitril} + 2\% H_2O + 0,001\% H_3PO_4$

Gradient: 0 min: 0 % B; 25 min: 46 % B; 26-33 min: 100 % B; ab 35 min: 0 % B

Die Analyse der Latexproben erfolgte mittels HPLC. Dieses Verfahren ermöglichte eine Auftrennung der Latexalkaloide anhand ihrer Größe und Hydrophobizität. Es wurde eine LiChrospher[®] 60 Rp select B-Säule (250-4 mm, Partikelgröße: 5 μ m) verwendet. Fließmittel waren die Lösungen A und B, die mit dem genannten Gradienten genutzt wurden. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Alkaloide wurden mit UV-Licht ($\lambda=210$ nm) detektiert. Ihre Identifikation erfolgte durch den Abgleich der Retentionszeit und des UV-Spektrums mit einem Standard. So konnten Morphin (Mor) Codein (Cod), Oripavin (Ori), Retikulin (Ret), Laudanin (Laud), Thebain (Theb) und Laudanosin (Laus) zweifelsfrei zugeordnet werden. Als MW328 wurde ein Gemisch der Alkaloide Scoulerin, Salutaridin und 1,2-Dehydroretikulin bezeichnet, die eine molare Masse von 328 g/mol besitzen und in der HPLC die gleiche Retentionszeit hatten. Ihre Identifikation wäre nur massenspektrometrisch möglich gewesen (Frick et al., 2005b).

Die quantitative Auswertung erfolgte über den internen Standard (Dhc) anhand der Peakfläche (A), des Gesamtgehaltes an löslichem Protein (P in μ g), des $V_{\ddot{U}1}$ (in μ l) und eines alkaloid-spezifischen Faktors (Mor = 49; Cod = 83; Ori = 80; Ret = 68; MW328 = 154; Laud = 125; Theb = 92; Laus = 128).

$$\ddot{U}3 = (A_{\text{Alkaloid}} * 20.05 * \text{Faktor}_{\text{Alkaloid}}) / (A_{\text{Dhc}} * P)$$

$$\ddot{U}2 = (A_{\text{Alkaloid}} * 20.05 * \text{Faktor}_{\text{Alkaloid}} * V_{\ddot{U}1}) / (A_{\text{Dhc}} * P * 50)$$

Die Summe $\ddot{U}2 + \ddot{U}3$ (unter Berücksichtigung der Verdünnung) gibt die Einzelalkaloidgehalte/100 μ g lösliches Protein an. Die Einzelwerte wurden zum Gesamtalkaloidgehalt addiert.

3.8 Transformationen

3.8.1 Transformation von *Escherichia coli* mit Hitzeschock

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mittels Hitzeschock (45 s bei 42°C) mit 20 ng Plasmid-DNS oder einem Aliquot eines Ligationsansatzes transformiert. Zur Selektion positiver Transformanden wurden sie auf LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen, und etwa 12 h bei 37°C inkubiert (Hanahan et al., 1991; Sambrook et al., 1989).

3.8.2 Elektroporation von Agrobakterien (AGL1)

Zu elektrokompetenten AGL1-Zellen wurden 50 ng Plasmid pipettiert. Die Zellsuspension wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte durch einen elektrischen Puls von 2 kV, bei 400 Ω und 50 μ F. Nach zweistündiger Inkubation in SOC-Medium bei 28°C (200 rpm) wurden die Zellen auf LB-Agarplatten + Spec (Resistenzgen auf dem eingebrachten Vektor), Rif und Carb ausplattiert.

3.8.3 Agrobakterienvermittelte Transformation von *Papaver somniferum*

Hypochloritlösung: 4 % v/v Hypochlorit, 2 % v/v Triton X 100, H₂O

Die Transformation von Schlafmohn beruht auf dem agrobakterienvermittelten Einbringen eines Vektors in die Pflanzenzellen. Dazu wurden zunächst sterile Hypokotyle von Keimlingen zur Transformation benötigt. Da es sich bei den Samen von *P. somniferum* um biologisches Material aus dem Gewächshaus handelte, mussten sie, bevor sie unter sterilen Bedingungen keimen und wachsen konnten, sterilisiert werden. Dadurch wurden Keime auf der Samenschale abgetötet, so dass eine Kontamination, Elicitierung und ungewollte Transformation ausgeschlossen werden konnten. Dazu wurden Mohnsamen, die in ihrer Menge einem Volumen von etwa 500 μ l entsprachen, 1 min in 70 % Ethanol inkubiert. Anschließend ersetzte man den Alkohol durch Hypochloritlösung, in der die Samen 20-30 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt wurden. Die sterilisierten Samen mussten vollständig von der Hypochloritlösung gereinigt werden, um ihre Keimungsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Dies geschah durch mehrmaliges Spülen mit insgesamt 500 ml sterilem Mili-Q-Wasser. Nachdem sie kurz auf Filterpapier getrocknet worden waren, wurden je 30-40 Samen auf B5O-Agarplatten ausgelegt. Mohnsamen benötigen Kälteinduktion, um keimen zu können. Deshalb wurden die verschlossenen Platten über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am folgenden Tag in die Phytokammer überführt. Die sterilen Keimlinge konnten nach 6 Tagen zur Transformation verwendet werden (Larkin et al., 1999).

Der gewählte Agrobakterienstamm war AGL1. Die transgenen Agrobakterien wurden in 10 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Rif, Spec, Carb) 1-2 d unter schütteln bei 28°C vermehrt. Die Kultur wurde anschließend bei 3100 x g zentrifugiert und das Zellpellet in LB-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ = 0,25 eingestellt.

Transformiert wurden die Hypokotyle steriler Keimlinge, deren Wurzeln und Keimblätter mit einem Skalpell entfernt worden waren. Um ein Austrocknen der Hypokotyle zu vermeiden, lagerten sie in sterilem Wasser, welches dann durch die Agrobakteriensuspension ersetzt wurde. Während der Inkubation in der AGL1-Kultur (15 min) lagerten sich die Agrobakterien auf der Oberfläche an. Nach dem Entfernen der Bakteriensuspension wurden die Hypokotyle in Linie auf 19D-Agarplatten ausgelegt und 3-5 d in der Phytokammer inkubiert. In dieser Zeit überwuchsen die Bakterien die Hypokotyle und transformierten sie mit der T-DNS der vorher eingebrachten Plasmide. Es war notwendig, die Agrobakterien nach der Transformation möglichst vollständig zu entfernen. Dazu wurden die transformierten Hypokotyle mit 500 ml sterilem Wasser gewaschen und nach kurzem Trocknen mit etwas Abstand auf 19D-Platten mit Timentin und Paromomycin ausgelegt (Chitty et al., 2003; Larkin et al., 1999).

3.9 Isolation von Nukleinsäuren aus *Papaver somniferum*

Zur Isolation von DNS und RNS aus *P. somniferum* wurden je nach gewünschter Nukleinsäuremenge und deren Reinheitsgrad vier verschiedene Methoden verwendet.

Die DNS-Extraktion mit dem Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit bot sich an, um aus kleinen Mengen Pflanzenmaterial (50 mg) schnell genomische DNS zu isolieren. Der DNeasy[®] Plant Maxi Kit wurde verwendet, um sehr reine DNS zu erhalten. Die so gewonnene DNS war allerdings sehr gering konzentriert (0,025 µg/µl). Die mit Hilfe dieser Kits isolierte DNS wurde als Template in den PCRs zum Nachweis des Transgens und des Resistenzgens eingesetzt. Die Phenol-Chloroform-Methode bietet den Vorteil, dass neben der DNS auch RNS hoher Reinheit in größeren Mengen und isoliert werden kann. Diese eignen sich sowohl als Templates bei PCRs und RT-PCRs, als auch zur Southern und Northern Blot-Analyse. Um innerhalb kurzer Zeit und mit geringem Aufwand RNS zu isolieren, wurde die Trizolmethode verwendet. Die dabei gewonnene RNS wurde für die Northern Blot-Analysen der T2-Generation eingesetzt.

Zentrifugationsschritte:	φ1: 10 min, 3095 x g, RT	φ4: 10 min, 16100 x g, 4°C
	φ2: 20 min, 3095 x g, 4°C	φ5: 20 min, 16100 x g, 4°C
	φ3: 15 min, 16100 x g, 4°C	

3.9.1 Nukleinsäureextraktion mit Phenol/Chloroform

Lysispuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 % SDS, 1 mM EDTA pH 8,0,
4 % w/v PVPP, 14 mM β-Mercaptoethanol

Die Proben wurden, um ein Auftauen zu vermeiden, in flüssigem Stickstoff mit Seesand gemörsert. Bezogen auf 1 g Probenmaterial, wurden hydrophobe Komponenten und Proteine durch 30-minütiges Ausschütteln mit 3,5 ml Lysispuffer und 3,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert [φ1]. Die Nukleinsäuren verblieben in der wässrigen Phase,

welche in zwei weiteren Extraktionsschritten mit 3,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) und 3 ml Chloroform ausgeschüttelt wurde [φ1]. Sowohl DNS, als auch RNS wurden mit 1/10 V Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 1 V Isopropanol 30 min bei -20°C ausgefällt [φ2]. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 500 µl TE resuspendiert. Mit 250 µl 6 M LiCl wurde die RNS über Nacht bei 4°C selektiv ausgefällt und zentrifugiert [φ3]. Das RNS-Pellet wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, zentrifugiert [φ4], getrocknet und in 50 µl TE resuspendiert. Der nach dem Ausfällen der RNS verbleibende Überstand enthielt die DNS, welche, wie oben mit Natriumacetat und Isopropanol ausgefällt und pelletiert [φ3] wurde. Das DNS-Pellet wurde ebenfalls mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, [φ4], und nach dem Trocknen in 50-100 µl TE resuspendiert.

3.9.2 Isolation von RNS aus Pflanzengewebe (Trizol[®]-Methode)

RNS-Extraktionspuffer: 0,8 M Guanidiniumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumacetat pH 5,0, 5 % Glycerin, 38 % Phenol

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff mit etwas Seesand gemörsert und das entstandene Pulver in 10 V (1 ml/0,1g) RNS-Extraktionspuffer aufgenommen. Zur Extraktion wurde die Probe 1 min gemischt, 5 min bei RT inkubiert und nochmals 1 min gemischt. Es folgten ein Ausschütteln mit 0,2 ml Chloroform (20 s) und eine weitere Inkubation (5 min, RT; φ5). Durch die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol kam es zum Ausfällen der RNS (10 min, RT). Diese wurde abzentrifugiert (φ3), das Pellet gewaschen und getrocknet. Die RNS wurde in 30 µl Wasser durch Erhitzen gelöst (10 min, 65°C).

3.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm am UV-Spektrometer bestimmt. Eine optische Dichte von 1 ($OD_{260}=1$) entspricht dabei für DNS einer Konzentration von 50 µg/ml und für RNS 40 µg/ml. Die Proben wurden vor der Messung fünfzigfach verdünnt.

3.11 Sequenzierung von DNS

Die Methode beruht auf dem durch den Einbau von Didesoxynukleotiden herbeigeführten Kettenabbruch in einer Polymerasekettenreaktion (Sanger et al., 1977). Die Detektion kann aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen der ddNTPs erfolgen. Die PCR-Produkte werden in einer Kapillargelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und anhand ihrer Endmarkierung mit einem Laser detektiert.

Die Markierungsreaktion erfolgte nach dem BigDye V 1.1.-Protokoll der Firma Applied Biosystems wobei sowohl PCR-Produkte, als auch Plasmid-DNS als Template fungierten. Die

Produkte der Markierungs-PCR wurden über Sephadex G-50 Superfine-Säulchen aufgereinigt. Die eigentliche Sequenzierung, d.h. die Kapillarelektrophorese und Detektion der Fluoreszenz-Marker erfolgte mit einem der oben genannten Sequenzierer (2.11). Die Sequenzen wurden mit den Programmen Chromas und dem DNASTar-Softwarepaket ausgewertet und gegebenenfalls mit anderen Sequenzen verglichen (Internet-Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.12 Southern Blot-Analyse

Mit Hilfe des Southern Blots (Southern, 1975) und anschließender Analyse lassen sich mit spezifischen Sonden Gene oder bestimmte Abschnitte davon in genomischer DNS nachweisen. Sie dient unter anderem der Bestimmung der Kopienzahl eines Genes im Genom.

3.12.1 Southern Blotting

Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 7,4
Transferpuffer:	6-10 x SSC
Striplösung:	0,1 % SDS, 4 μ M EDTA

5-10 μ g der nach der Methode der Nukleinsäureextraktion aus Pflanzen mit Phenol/Chloroform (3.9.1) gewonnenen genomischen DNS wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen (je 50 u) in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l mindestens 8 h verdaut. Die geschnittene DNS wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und im Gel denaturiert, so dass sie einzelsträngig vorlag. Dazu wurde das Gel auf einem Plattformschüttler mehrmals in 0,2 N HCl inkubiert (20 min). Anschließend folgten Inkubationen in je 10 Gelvolumen Denaturierungslösung (45 min) und Neutralisierungslösung (3 x 15 min). Für die spätere Analyse musste die denaturierte DNS durch Kapillartransfer (Sambrook et al., 1989) mit Transferpuffer aus dem Gel auf eine Nylonmembran (2.3) übertragen und durch UV-Fixierung ($\lambda=254$ nm) daran gebunden werden.

3.12.2 Radioaktive Markierung der Sonden

Genspezifische radioaktive Sonden wurden mit willkürlich bindenden („random“) Primern an dem nachzuweisenden Gen mit verschiedenen DNS Labeling Systemen (2.2) synthetisiert und über ProbeQuant™ G-50 Mikrosäulen gereinigt. Die Markierung der Sonde für die Southern und Northern Blot Analyse erfolgte über den Einbau von α -³²P-dATP.

3.12.3 Hybridisierung und Analyse des Southern Blots

50 x Denhardt:	1 % w/v BSA, 1 % w/v lösliches PVP 25, 1 % v/v Ficoll 400
Hybridisierungslösung:	1 x Denhardt, 5 x SSC, 0,5 % SDS 100 μ g/ml denaturierte Fischsperma-DNS

Bei der Southern Blot Analyse bildet die auf dem Blot gebundene, durch Denaturierung in Einzelstränge aufgespaltene DNS mit der ebenfalls denaturierten, radioaktiven Sonde Doppelstränge. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran 0,5-4 h mit

Express Hyb[®] Hybridization Solution (2.3) oder Denhardt-Hybridisierungslösung bei 60°C prähybridisiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde (5 min, 95°C) erfolgte die mindestens vierstündige Hybridisierung bei 60°C. Die Membran wurde durch mehrmalige Inkubation in zwei Waschlösungen von unstringent gebundener Sonde und Hybridisierungslösung gereinigt.

Waschlösung 1: 2 x SSC, 0,1 % SDS 3 x15 min, 60°C

Waschlösung 2: 0,2 x SSC, 0,1 % SDS 2 x15 min, 60°C

Der Nachweis der gebildeten Hybride erfolgte durch Detektion der von ³²P abgegebenen, radioaktiven Strahlung auf Phosphorimagerplatten. Diese wurden am Storm Scanner „gelesen“ und mit der zugehörigen Software entwickelt, so dass ein Bandenmuster erkennbar war. Die Identifizierung der Banden auf dem Blot erfolgte anhand der Laufstrecke des Markers durch Ausmessen. Die auf der Membran gebundene DNS konnte mehrfach markiert werden, wenn gebundene Sonden durch Waschen mit Striplösung entfernt worden waren (15 min, 95°C).

3.13 Northern Blots und ihre Analyse

Mit Hilfe der Northern Blot Analyse ist es möglich, die Stärke der Expression eines Genes auf RNS-Ebene zu quantifizieren. Im Gegensatz zur Southern Blot Analyse beruht die Markierung dabei auf der Bildung von RNS-DNS-Hybriden zwischen radioaktiver Sonde und der auf dem Blot gebundenen RNS.

Die denaturierten RNS-Proben wurden im Formaldehydagarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt (3.3), durch Kapillartransfer (Sambrook et al., 1989) auf eine Nylonmembran (2.3) übertragen und fixiert. Die Membran wurde wie bei der Southern Blot Analyse behandelt, allerdings betrug die Temperatur bei allen Schritten zwischen 63°C und 68°C. Die Auswertung erfolgte ebenfalls über die Detektion der gebundenen Radioaktivität.

3.14 Aufreinigung heterolog in *Escherichia coli* exprimierter His-tag-Proteine

His-tag-Lysispuffer (HLP): 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % v/v Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 % v/v Tween 20, 750 µg/ml Lysozym

His-tag-Waschpuffer (HWP): 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % v/v Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol

His-tag-Elutionspuffer (HEP): 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10 % v/v Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol

Enzymlagerungspuffer (ELP): 100 mM Tris/HCl pH 7,5

Durch die Klonierung in die Expressionsvektoren wurde an die zu exprimierenden Gensequenzen 5' oder 3' die Sequenz eines polyHis-tags angefügt, der aus sechs bis acht Histidinresten bestand. Die heterolog exprimierten polyHis-tag-Proteine wurden mittels Metall-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der Bindung der

negativ geladenen Histidine an immobilisierten Kationen. Das hier genutzte BD Talon Metal Affinity Resin nutzt dazu Cobaltionen. Der Zellaufschluss wurde mit dem Säulenmaterial inkubiert, so dass die Proteine gebunden werden konnten. Nach der Bindung wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen der Säule entfernt und das gereinigte Protein von der Säule eluiert. Um das sowohl im Waschpuffer, als auch im Elutionspuffer enthaltene Imidazol zu entfernen, ist die gereinigte Enzymfraktion zur Lagerung umgepuffert worden.

3.14.1 Heterologe Expression

Eine 50 ml Vorkultur aus einer Einzelkolonie wurde in LB-Medium, dem 1 % Glukose und Antibiotikum zugesetzt worden waren, bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0.6-1.0$ bei 28°C oder 37°C schüttelnd wachsen lassen. Die Kultur konnte bis zu ihrem Gebrauch bei 4°C gelagert werden. Der Startkultur wurden 950 ml auf 37°C erwärmtes LB-Medium + Antibiotikum zugeführt. Die Expressionskultur wurde dann bei 37°C geschüttelt, bis eine $OD_{600} = 0.6$ erreicht wurde. Nachdem die Kultur 5 min auf Eis abkühlte, wurde mit 1 mM IPTG die Expression des Proteins induziert. Bei einer optimierten Expressionstemperatur (16-37°C) wurde die Kultur im Folgenden zwischen 4 und 16 h schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde in 4 x 250 ml portioniert und die Zellen 10 min bei 4°C und $10000 \times g$ pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 20 ml HLP/I Expressionskultur suspendiert.

3.14.2 Lyse der Bakterien

Die in HLP gelösten Zellen wurden 1 h auf Eis inkubiert, so dass das im Puffer enthaltene Lysozym die Zellen andauen konnte. Anschließend wurde die Zellsuspension 2×30 s mit Ultraschall behandelt. Durch Zentrifugieren (20 min, $12000 \times g$, 4°C) wurden die entstandenen Zelltrümmer vom Bakterienlysate abgetrennt. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine.

3.14.3 Proteinreinigung mit Talon Resin

2 ml der Talonsuspension (= 1 ml Talonmaterial) wurden bei $700 \times g$ 2 min zentrifugiert und 2 x mit 10 ml His-tag-Waschpuffer (HWP) gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml des Bakterienlysates aufgenommen. Diese Suspension wurde 20-60 min vorsichtig auf einem Plattformschüttler bewegt, so dass der am Protein vorhandene His-tag durch die Ionen des Talon Resin gebunden werden konnte. Das Talonmaterial wurde abzentrifugiert ($700 \times g$, 5 min), 2 x in ~14 ml HWP resuspendiert und je 10 min auf dem Plattformschüttler gewaschen. Das gewaschene Talonmaterial wurde in 1 ml HWP resuspendiert und in eine 2 ml gravitationsgetriebene Durchflusssäule überführt. Nachdem sich das Säulenmaterial gesetzt hatte, wurde es nochmals mit 5 ml HWP gewaschen. Daraufhin konnte das Protein mit 5 ml HEP von der Säule eluiert und in 5×1 ml Fraktionen gesammelt werden. Der Proteingehalt in den einzelnen Fraktionen wurde mittels Proteinassay bestimmt (3.16).

3.14.4 Entsalzen und Umpuffern mit PD-10-Säulen

Die von der Talonsäule eluierten Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden vereint, und über eine Sephadex G-25-Säule (PD-10) laut Herstellerprotokoll entsalzt, wodurch das Enzym gleichzeitig zur Lagerung (ELP) umpuffert wurde.

3.15 Gewinnung von Bakterienrohextrakten

Für Rohextraktmessungen wurden die Bakterienrohextrakte aus 25-ml-Kulturen gewonnen, die mit 1 mM IPTG 1 d bei 16°C wuchsen. Die Zellen wurden pelletiert und in 1,5 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte durch Inkubation mit Lysozym (1 h auf Eis) und Ultraschall (2 x 30 s). Die Zelltrümmer und andere Bestandteile wurden 10 min bei 3095 x g (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand bildete den Rohextrakt.

3.16 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Anlehnung an das von Bradford entwickelte Protokoll photometrisch bei 595 nm mit Bradford Reagenz oder BioRad Protein Assay Lösung nach Angaben des Herstellers. Als Eichstandard diente eine Rinderserumalbuminverdünnungsreihe von 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml (Bradford, 1976).

3.17 SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung

Um die Expression von Proteinen und ihre Aufreinigung visuell verfolgen zu können, wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Blue Färbung verwendet (Laemmli, 1970; Sambrook et al., 1989).

3.18 Enzymtests

Der Enzymassay zur Charakterisierung der Coclaurin-*N*-Methyltransferase hatte die folgende Zusammensetzung (Choi et al., 2001):

- 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0
- 2,5 mM Natriumascorbat 0,5 M
- 100 µM Substrat
- 1 mM S-Adenosyl-L-Methionin; darin enthalten [Methyl-¹⁴C] S-Adenosyl-L-Methionin (20000cpm)

0,0125 µg gereinigtes Enzym/µl Reaktionsansatz; entsprechend 5 µl Enzym der Konzentration 0,125 µg/µl in einem 50 µl Reaktionsansatz

Die Reaktionszeit wurde auf 12,5 min bei einer Reaktionstemperatur von 30°C festgelegt. Einem 50 µl-Ansatz wurden 5 µl gereinigten Proteins der Konzentration 0,125 µg/µl zugesetzt. Die Reaktion wurde mit 70 µl 1 M NaHCO₃ gestoppt und die Alkaloide anschließend mit 200 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Während der Reaktion übertrug das Enzym die ¹⁴C- Methylgruppe

des SAM unter Bildung von SAH auf das Substrat. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Einbaurate der ^{14}C -Methylgruppe, die nach Messung im Szintillationszähler berechnet wurde.

Die Enzymtests mit der Stylopin-*N*-Methyltransferase wurden ebenfalls angelehnt an das von Choi et al. (2001) genutzte Protokoll durchgeführt. Es wurden aber keine gereinigten Enzyme, sondern Bakterienrohextrakte (3.15) verwendet. In einem 150 μl -Reaktionsansatz wurden als Puffer aber 100 mM Tris/HCl pH 8,0 genutzt und 100 μl Enzymrohextrakt eingesetzt.

3.19 LC-MS (TOF) - Massenspektrometrische Analysen

Zur Analyse von Substraten und Produkten in den Enzymreaktionsansätzen wurden die extrahierten Alkaloide massenspektrometrisch untersucht. Dadurch war es möglich, die Produkte und die Position der Methylierung im Molekül zu identifizieren.

Lösung A: $\text{H}_2\text{O} + 2\% \text{ Acetonitril} + 0,2\% \text{ HCOOH}$

Lösung B: $\text{Acetonitril} + 2\% \text{ H}_2\text{O} + 0,2\% \text{ HCOOH}$

Gradient: 0 min: 0 % B; 25 min: 46 % B; 26-33 min: 90 % B; ab 35 min: 0 % B

Die LC-MS (TOF)-Daten wurden mit einem Massenspektrometer, das mit einer Turbulon Spray Quelle in Kombination mit einer HPLC ausgerüstet war, erhalten. Die Fließmittel der HPLC waren die Lösungen A und B mit dem angegebenen Gradienten. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Es wurde eine Superspher 60 RP- select B Säule mit einer Länge von 125 mm und einem Innendurchmesser von 2 mm genutzt. Die Partikel hatten eine Größe von 5 μm . Das Volumen der injizierten Probe betrug 2 μl .

Die Massenspektren wurden mittels Elektro-Spray-Ionisierung (ESI) und einem Time-of-Flight (TOF) Detektor generiert. Dabei arbeitete das Massenspektrometer im Positiv-Ionen Modus. Die Flussraten der Gas-Parameter waren wie folgt definiert: N_2 -Schutzgas: 1,5 l/min, N_2 -Spraygas: 0,5 l/min und N_2 -Heizgas: 7 l/min. Das Potential der Ionenquelle betrug 5,5 kV, der Einlass-Spannung 180 V und der Detektorspannung 1,95 kV. Die Temperaturen waren 140°C für den Quadrupol und 350°C für das Heizgas der Turbulon Spray Quelle.

4. Ergebnisse

4.1 Die *O*-Methyltransferasen

4.1.1 Klonierung von RNAi-Konstrukten zur Suppression

Es war beabsichtigt, die Expression der Gene der (*S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT) und der (*S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7OMT) durch Transformation mit RNAi-Konstrukten zu unterdrücken, bzw. zu verringern. RNAi-Konstrukte bestehen aus komplementären, in *sense*- und *antisense*-Orientierung angeordneten Teilen einer Zielsequenz, die durch ein Intron verbunden sind (Waterhouse et al., 1998; Wesley et al., 2004) (Abb. 4.1A).

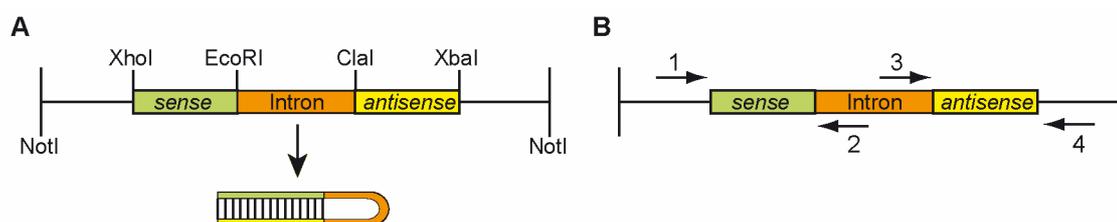


Abb. 4.1: **A:** schematische Darstellung zur Erstellung der RNAi-Konstrukte im Vektor pHannibal (Wesley et al., 2001) (Schnittstellen der *6omt*). Die komplementären *sense*- und *antisense*-Stränge bilden nach der Transkription eine Haarnadelstruktur. **B:** Anordnung der Primer der Nachweis-PCRs und Sequenzierungen am RNAi-Konstrukt, Primer = horizontale Pfeile: 1 = pHANs, 2 = pHANintronas, 3 = pHANintrons, 4 = pHANas (Tabelle 2.1)

Nach der Transkription hybridisieren die komplementären Sequenzen und bilden eine Haarnadelstruktur. Diese doppelsträngige RNS wird in der Zelle erkannt und durch den als RNAi oder auch PTGS bezeichneten Mechanismus abgebaut. Durch den RNAi-Effekt kommt es auch zum Abbau der mRNA mit der Zielsequenz (Waterhouse et al., 1998).

Zur Erstellung der RNAi-Konstrukte wurde sich an die Vorgaben von (Wesley et al., 2001) gehalten. Das RNAi-Konstrukt wurde im Vektor pHannibal zusammengefügt. In einer PCR mit einer *annealing*-Temperatur von 55°C und einer Elongationszeit von 1 min mit *Taq*-Polymerase und den Primern 6OMTRNAis und 6OMTRNAias bzw. 7OMTRNAis und 7OMTRNAias (Tabelle 2.1) wurden RNAi-Fragmente von etwa 650 bp Länge amplifiziert (Abb. 4.2A).

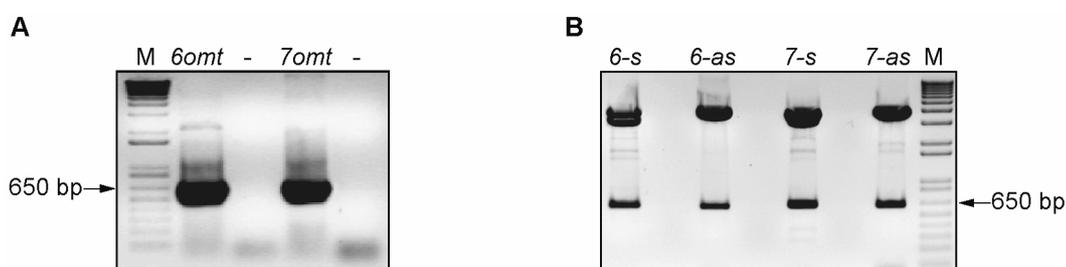


Abb. 4.2: Agarosegelelektrophoresen; **A:** PCR-Produkte der RNAi-Fragmente von *6omt* und *7omt* und der Negativkontrollen (-); **B:** spezifischer Verdau der RNAi-Fragmente aus pCR[®]2.1-TOPO[®] (3,9 kb) 6 = *6omt*, 7 = *7omt*, s = *sense*, as = *antisense*; M = Marker

Für die *6omt* umfasste dieses PCR-Fragment die Nukleotide 413 bis 1035, für die *7omt* die Nukleotide 425 bis 1053. An die Fragmente wurden während der PCR über die spezifischen

Primer Restriktionsschnittstellen zur gerichteten Klonierung angefügt. Die amplifizierten Fragmente hatten die folgenden schematischen Sequenzen:

6omt: XhoI – XbaI - 623 bp - ClaI - EcoRI Gesamtlänge: 647 bp
7omt: XhoI – XbaI - 629 bp - BamHI - EcoRI Gesamtlänge: 653 bp

Sie wurden in den Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO[®] und konnten anhand der angefügten Schnittstellen für die geplante *sense*- bzw. *antisense*-Ligation aus diesem ausgeschnitten werden. Für die spätere *sense*-Orientierung wurden die Fragmente mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI verdaut. Um die Fragmente für die *antisense*-Klonierung zu erhalten, schnitt man die RNAi-Fragmente der *6omt* mit XbaI und ClaI und der *7omt* mit XbaI und BamHI aus (Abb. 4.2B).

Die Produkte der Restriktionsverdau wurden zunächst in *antisense*- und anschließend in *sense*-Orientierung in den Vektor pHannibal ligiert. Positive Transformanden konnten in beiden Schritten durch Kolonie-PCR mit den an pHannibal bindenden Primern ermittelt werden (Abb. 4.1B). Für den Nachweis der *antisense*-Ligation wurden die Primer pHANIntrons und pHANas genutzt. Die Primer zum Nachweis der Ligation in *sense*-Orientierung waren pHANs und pHANIntrons (Tabelle 2.1). Die PCR-Reaktion wurde mit *Taq*-Polymerase bei einer *annealing*-Temperatur von 52°C und einer Elongationszeit von 1 min durchgeführt.

Das vollständige RNAi-Konstrukt wurde durch Restriktionsverdau mit XbaI bzw. NotI nachgewiesen (Abb. 4.3).

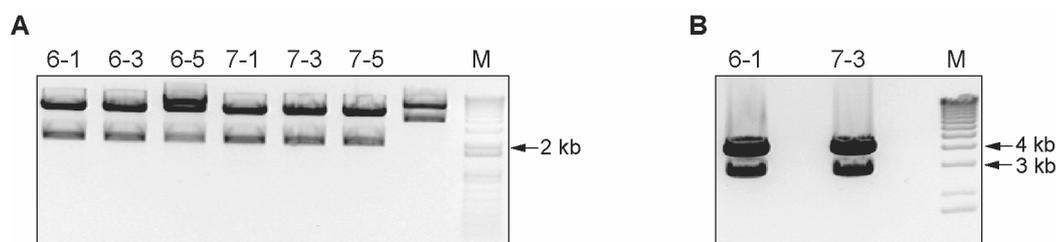


Abb. 4.3: **A**: Verdau des RNAi-Konstruktes aus pHannibal mit XbaI (*sense*-Intron-*antisense* ~ 2,1 kb); 6 = *6omt*, 7 = *7omt*; **B**: Verdau der Expressionskassette aus pHannibal mit NotI (Expressionskassette mit RNAi-Konstrukt ~ 4,5 kb, pHannibal ohne Expressionskassette ~ 2,9 kb)

Da sich durch die gewählte Klonierung die XbaI-Schnittstelle sowohl am Anfang als auch am Ende des RNAi-Konstruktes (*sense*-Intron-*antisense*) befand, konnte es mit diesem Restriktionsenzym aus dem Vektor pHannibal heraus verdaut und anhand der Fragmentgröße von etwa 2,1 kb nach Agarosegelelektrophorese identifiziert werden. Mit NotI wurde die gesamte Expressionskassette ausgeschnitten. Die verbleibende Größe des Vektors betrug dabei 2,9 kb, die Größe der Expressionskassette 4,5 kb. Durch eine anschließende Sequenzierung mit den auch für die Kolonie-PCR genutzten Primern konnten die Sequenzen und die richtige Orientierung der PCR-Fragmente im Konstrukt nochmals bestätigt werden.

Die Expressionskassetten der pHannibal-Klone 6-1 und 7-3 (Abb. 4.3B) wurden mit NotI

ausgeschnitten, und in den Binärvektor pART27 übertragen. Der Nachweis positiver Klone erfolgte wie oben durch Kolonie-PCR und Verdauung mit XbaI bzw. NotI.

Plasmidpräparationen von pART27 mit den enthaltenen RNAi-Konstrukten der *6omt* und der *7omt* (Klone 6-1 und 7-17) und pART27 als Vektorkontrolle wurden zur Elektroporation des Agrobakterienstammes AGL1 genutzt. Diese Transformationen ergaben die AGL1-RNAi-Linien 6-1-2, 7-17-2 und pART27, die für die anschließende Transformation der *P. somniferum*-Hypokotyle eingesetzt wurden.

4.1.2 Klonierung von Volllängeclonen zur Überexpression

Für die geplante Überexpression wurden Volllängeklone der beiden *O*-Methyltransferasen benötigt, die über eine SnaBI-Schnittstelle in den Expressionsvektor pPLEX X002 (pPLEX, 13,1 kb) ligiert werden sollten. Dazu wurden mit *Pfu*-Polymerase PCR-Fragmente von etwa 1,1 kb Länge amplifiziert, an die mit den genspezifischen Primern 6OMTfls, 6OMTflas, 7OMTfls und 7OMTflas (Tabelle 2.1) SnaBI-Schnittstellen angehängt worden waren. Als Templates der PCR dienten Volllängeklone der beiden aus der Varietät *München* isolierten *O*-Methyltransferasen. Die *6omt* wurde aus pCR[®]2.1-TOPO[®] amplifiziert und die *7omt* aus dem Vektor pHis8 (Ounaroon et al., 2003). Die *annealing*-Temperatur der Reaktionen betrug 59°C und die Elongationszeit 2 min. Die Längen der kodierenden Sequenzen betragen 1041 bp für die *6omt* und 1068 bp für die *7omt*. Nach Restriktionsverdauen der PCR-Produkte und des Vektors mit SnaBI wurden die beiden Methyltransferasen *blunt end* in pPLEX X002 ligiert. Positive Klone konnten durch Kolonie-PCR mit den zur Klonierung verwendeten, genspezifischen Primern und durch Ausschneiden der Expressionskassette aus dem Vektor mit NotI identifiziert werden. Da es sich nicht um eine gerichtete Klonierung handelte, wurde die Orientierung der Volllängeclone durch weitere Verdauung überprüft. Dazu wurden die Vektorklone der *6omt* mit HpaI und die der *7omt* mit XhoI und BglIII verdaut. Anhand der Größen der Restriktionsprodukte konnte die Orientierung in pPLEX bestimmt werden. Die Übereinstimmung mit den für die *6omt* und *7omt* vorgegebenen Sequenzen der Klone 6-4 (*as*), 6-6 (*s*), 7-1 (*as*) und 7-8 (*s*) wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die Sequenz der *7omt* differierte im Nukleotid 594 gegenüber der von Ounaroon et al. (2003) vorgegebenen Sequenz. Das Nukleotid Guanidin war durch Thymidin ersetzt worden. Dieser Austausch wurde ignoriert, da er nach der Translation nicht zu einem Aminosäureaustausch führte, denn das betroffene Triplet kodiert in beiden Fällen für Glycin. Die Sequenzierung der *6omt* zeigte trotz mehrfacher Klonierungen stärkere Abweichungen von der Originalsequenz. Daher wurde die Sequenz mit Hilfe des pFastbac-Systems in Insektenzellen (Sf9) exprimiert und die Funktionalität des Enzyms mit dem Substrat (*S*)-Norcoclaurin bestätigt (Ounaroon et al., 2003; Daten nicht gezeigt).

Der Vektor pPLEX X002 und die *omt*-pPLEX-Vektoren, die die Volllänge der *O*-Methyltransferasen in *sense*-Orientierung enthielten, wurden in den Agrobakterienstamm AGL1 transformiert und so zur Transformation von *P. somniferum*-Hypokotylen verwendet.

4.1.3 Zellkultur

Die agrobakteriengestützten Transformationen von Hypokotylen 6 Tage alter Keimlinge des *P. somniferum*-Kultivars CO58-34 mit den RNAi-Konstrukten (6-1-2, 7-17-2) und den OMT-Volllängeegenen in *sense*-Orientierung (6-6 und 7-8) ergaben mit den dazugehörigen Vektor-kontrollen die sechs Transformationslinien *6omt*RNAi, *7omt*RNAi und pART27, sowie *6omt-sense*, *7omt-sense* und pPLEX X002 in Zellkulturen.

Die transformierten Hypokotyle wurden in Phytokammern auf 19D-Medium kultiviert. Innerhalb weniger Wochen schwollen sie an, brachen auf, und begannen mit verstärkter Zellteilung. Die wuchernden, lose zusammenhängenden Zellen bildeten einen Kallus vom Typ-I (Abb. 4.4A).

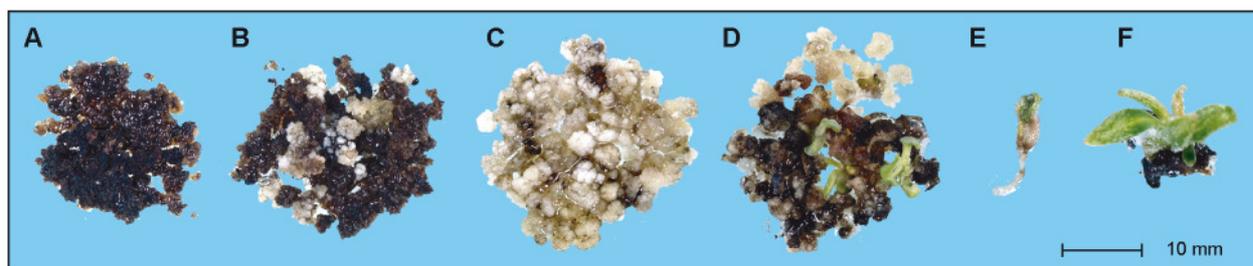


Abb. 4.4: Kalluskulturen: **A**: Typ-I-Kallus, **B**: weiße Zellaggregate bildender Typ-I-Kallus; **C**: Typ-II-Kallus; **D**: Typ-II-Kallus, der Embryonen bildet; **E** und **F**: Embryonen verschiedener Größe mit Wurzeln

Nach etwa 4 Monaten begannen die braun-schwarzen Typ-I-Kalli, weiße Zellaggregate zu bilden (Abb. 4.4B), die auf B50-Medium umgesetzt wurden und als Typ-II-Kalli bezeichnet werden (Abb. 4.4C). Typ-II-Kalli besitzen die Fähigkeit, nach einigen Monaten somatische Embryonen zu generieren, wie es in Abb. 4.4D zu sehen ist. Dabei bilden sich die Zellaggregate torpedoförmig mit rosa bis rot gefärbten Spitzen heraus. Daraus entwickelt sich ein Embryo, der Keimblätter und Wurzeln bildet. Die Embryonen (Abb. 4.4E+F) wurden zunächst auf B50-Platten isoliert und konnten anschließend in sterilen Töpfen auf B50-Medium bis zu einer Größe von etwa 7 cm wachsen. Alle Medien enthielten Paromomycin und Timentin (2.8).

12-14 Monate nach der Transformation waren die ersten Pflanzen kräftig genug, um aus der Sterilkultur in Erde und ins Gewächshaus überführt zu werden. Innerhalb von 8-10 Wochen wuchsen sie zu adulten Pflanzen heran und gingen in die generative Phase über. Soweit die Blüten fertil waren, wurden sie mit eigenem Pollen bestäubt. Drei Tage nach der Bestäubung wurden der Kapsellatex und verschiedene Pflanzenteile geerntet. Die Prozedur der Bestäubung und Latexernte wurde je nach Anzahl der Blüten bis zu vier mal wiederholt und die Latexproben vereint. Bis zur Samenreife verblieben die Pflanzen weitere 6-8 Wochen im Gewächshaus.

4.1.4 Analysen der T0-Generation der *7omt-sense*-Pflanzen

Die durch somatische Embryogenese entwickelten transgenen Pflanzen wurden als Generation T0 bezeichnet. Die T0-Pflanzen galten als transgen, wenn in PCR das Transgen und das Resistenzgen nachgewiesen werden konnten. Das Transgen wurde mit den spezifischen Primern S4S4sense und Me13'antisense (Tabelle 2.1) gegen den S4S4-Promotor und den Me13'-Terminator in einer PCR mit *Taq*-Polymerase, der *annealing*-Temperatur 50°C und einer Elongationszeit von 1,5 min amplifiziert. Die erwartete Bande nach Agarosegelelektrophorese hatte eine Größe von etwa 1,2 kb. Das Resistenzgen *nptII* kodiert die Neomycinphosphotransferase II, die für die Antibiotikaresistenz gegen Paromomycin verantwortlich ist. *nptII* wurde mit den genspezifischen Primern NPTII_{sense} und NPTII_{antisense} (Tabelle 2.1) und *Taq*, bei einer *annealing*-Temperatur von 55°C und einer Elongationszeit von 1,5 min nachgewiesen. Das amplifizierte Fragment hat eine Größe von 960 bp. In den Vektorkontrollen musste nur das Resistenzgen nachgewiesen werden, da zwischen Promotor und Terminator keine Sequenz eingefügt worden war. Die Wildtyppflanzen waren negativ in beiden PCR. Die Vektorkontrollen zeigten sich wie erwartet positiv gegen *nptII*, aber nicht gegen das Transgen. Alle Pflanzen der T0-Generation waren in den Polymerasekettenreaktionen gegen das Transgen und den Selektionsmarker positiv. Somit galt der Transgenstatus der Pflanzen der T0-Generation inklusive der Vektorkontrollen als bewiesen (Daten nicht gezeigt; siehe auch T1: Abb. 4.11).

Für die *6omt-sense*-Überexpressionslinie und die RNAi-Transformationslinien (*6omt*, *7omt* und pART27) konnten keine transgenen Pflanzen generiert werden. Unter Selektionsdruck durch das Antibiotikum Paromomycin wurden von fast allen Zelllinien nur kurzlebige Embryonen ohne Wurzeln gebildet. Ohne Selektionsdruck bildeten die Transformationslinien *6omt*-RNAi 2 Pflanzen, *7omt*-RNAi 30 Pflanzen, pART27 7 Pflanzen, *7omt-sense* 102 Pflanzen, *6omt-sense* 14 Pflanzen und pPLEX 18 Pflanzen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Transformationslinien und Anzahl der daraus generierten (transgenen) Pflanzen

Transformationslinie:	<i>6omt</i> - RNAi	<i>7omt</i> - RNAi	pART27	<i>6omt</i> - <i>sense</i>	<i>7omt</i> - <i>sense</i>	pPLEX X002
Anzahl Typ-II-Kalli:	108	118	100	62	110	35
Anzahl generierter Pflanzen:	2	30	7	14	102	18
davon transgen:	0	0	0	0	35	3

Die meisten dieser ohne Selektionsdruck generierten Pflanzen waren nicht transgen. Von den 102 durch die *7omt-sense*-Transformationslinie gebildeten Pflanzen wurden 35 Pflanzen als transgen identifiziert. Diese stammten von den beiden Kalli Nr. 24 und Nr. 26 ab, die auch unter Selektionsdruck in der Lage gewesen waren, lebensfähige Embryonen zu generieren. In der pPLEX-Linie waren von 18 generierten Pflanzen 3 aus dem Kallus Nr. 3 transgen.

Bei den Pflanzen der T0-Generation waren keine auffälligen äußeren phänotypischen

Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp festzustellen. Viele der Pflanzen zeigten aber eine veränderte Latexzusammensetzung.

Vergleichsproben aller Untersuchungen waren Wildtyppflanzen der *P. somniferum*-Varietät CO58-34. Parallel zur ausgepflanzten T0-Generation wurden 16 Wildtyppflanzen ausgesät und analysiert. Es wurde eine mittlere Alkaloidmenge von 2069,9 μg je 100 μg löslichem Protein mit einer Standardabweichung von 623,1 ermittelt (Abb. 4.5A und Tabelle 8.1).

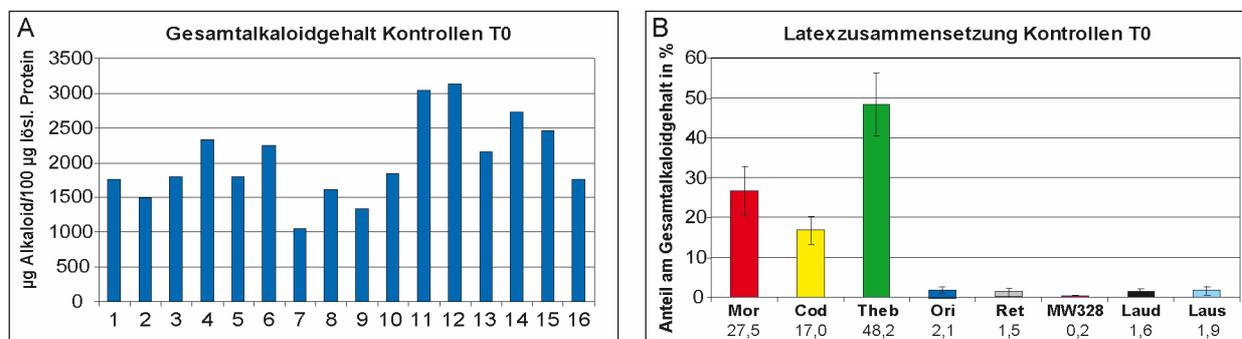


Abb. 4.5: Alkaloidgehalt der Wildtyppflanzen der T0-Generation. A: Gesamtalkaloidgehalt B: Zusammensetzung des Latex, prozentualer Anteil der mittels HPLC nachgewiesenen Alkaloide; Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n=16).

Aufgrund der hohen Schwankung für den Gesamtalkaloidgehalt der 16 Wildtyppflanzen mit Werten zwischen 1100 und 3300 μg je 100 μg löslichem Protein wurden weiterführend die prozentualen Anteile der einzelnen in der HPLC nachgewiesenen Alkaloide in Relation gesetzt, da diese unabhängig von der Gesamtalkaloidmenge im Latex waren. Die drei Hauptalkaloide waren Thebain, Morphin und Codein, die in einem Verhältnis von etwa 5:3:2 vorlagen. Oripavin, Retikulin, die als MW328 zusammengefassten Alkaloide, Laudanin und Laudanosin machten zusammen weniger als 7,5 % des Gesamtalkaloidgehaltes aus.

In die Untersuchungen der T0-Generation gingen 32 der 35 generierten *7omt-sense*-Pflanzen ein. Bei zwei Drittel der Pflanzen lag der Alkaloidgehalt unter dem Wildtypmittelwert (Abb. 4.6 und Tabelle 8.2).

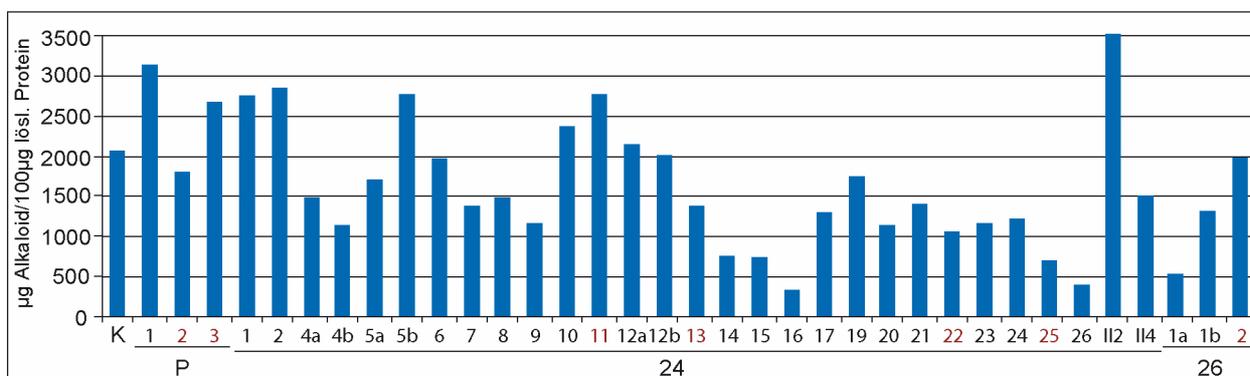


Abb. 4.6: Gesamtalkaloidgehalte der T0-Pflanzen, K = Wildtyp (n=16), P = pPLEX-Pflanzen (n=3), 24 = Pflanzen des Kallus 24 (n=29); 26 = Pflanzen des Kallus 26 (n=3); Rot beschriftet sind die als Eltern der T1 ausgesuchten Pflanzen.

Die Hälfte der Pflanzen hatte einen stark verringerten Alkaloidgehalt, dessen Wert ausserhalb der Standardabweichung lag. Nur sechzehn Prozent der transgenen Pflanzen hatte einen

Gesamtalkaloidgehalt, der den Wildtypwert inklusive der Standardabweichung überstieg. Die niedrigsten Alkaloidgehalte hatten die Pflanzen 24-16, 24-26 und 26-1a, mit Werten unter 520 µg. Der höchste Wert wurde für die Pflanze II-24-2 mit 3528 µg ermittelt.

Hinsichtlich des Gesamtalkaloidgehaltes hoben sich die Vektorkontrollen nicht von den 7OMTs-Pflanzen ab. Eine der drei Vektorkontrollpflanzen hatte einen Alkaloidgehalt ähnlich dem der Wildtyppflanzen, die Werte der beiden anderen Vektorpflanzen waren deutlich höher.

Die 7omt-sense-T0-Pflanzen zeigten größtenteils ein auffällig zugunsten von Thebain verschobenes Alkaloidprofil (Abb. 4.7).

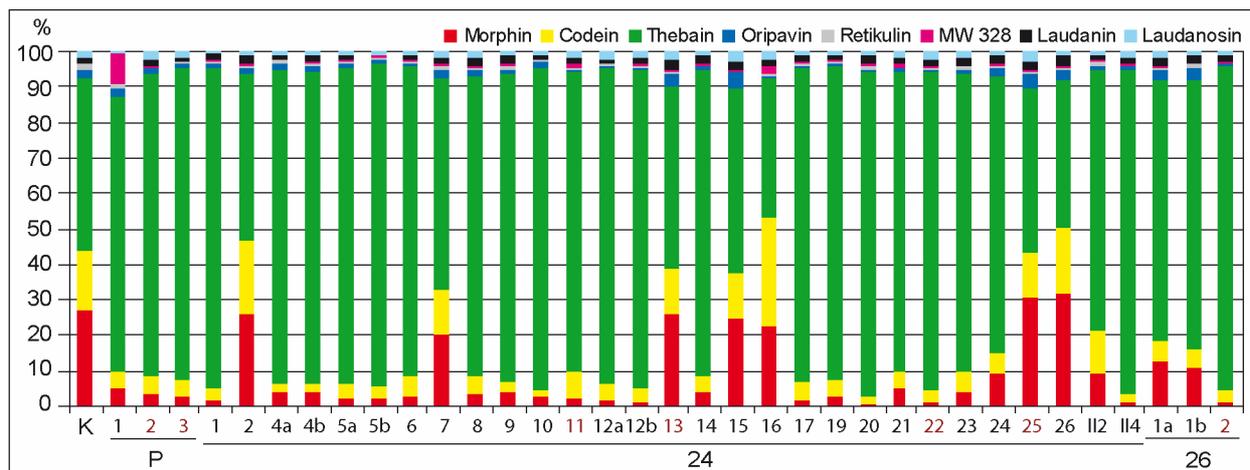


Abb. 4.7: prozentuale Anteile der im Latex nachgewiesenen Alkaloide der T0-Generation der 7omt-sense-Pflanzen; K = Mittelwert der Wildtypen (n=16), P = Vektorkontrollen vom Kallus 3 (n=3), 24 = Pflanzen vom Kallus 24 (n=29); 26 = Pflanzen vom Kallus 26 (n=3); Rot sind die als Eltern der T1 ausgesuchten Pflanzen beschriftet.

25 der 32 T0-Pflanzen hatten Thebaingehalte zwischen 73 und 92 %. Damit war der Gehalt an Thebain in diesen Pflanzen um 50 bis 92 % höher als im Wildtyp. Zu diesen Pflanzen gehörten die drei 7OMTs-Pflanzen des Kallus 26 und 22 Pflanzen des Kallus 24, von denen 24-11, 24-25 und 26-2 als Eltern der T1-Generation ausgesucht wurden. Nur sieben der 7OMTs-Pflanzen hatten eine Latexzusammensetzung, die der der Wildtyppflanzen gleich. Zu diesen gehörten die T1-Elternpflanzen 24-13 und 24-25.

Der Anteil des Thebains im Latex der drei vom Kallus pPLEX-3 abstammenden Vektorpflanzen war ebenfalls erhöht. Er betrug zwischen 77 und 88 % des Gesamtalkaloidgehaltes.

Eine Korrelation zwischen den Alkaloidprofilen, insbesondere dem Thebaingehalt, und der Gesamtalkaloidmenge wurde nicht festgestellt. Die prozentualen Alkaloidanteile und die Gesamtalkaloidgehalte der untersuchten T0-Pflanzen sind im Anhang in Tabelle 8.2 angegeben.

Die 7OMT katalysiert die Methylierung von (S)-Retikulin. Die Alkaloidgehalte in den Wildtypen betragen für Retikulin $1,5 \pm 1,3$ %, für Laudanin $1,6 \pm 0,4$ % und für Laudanosin $1,9 \pm 0,5$ %. Eine genauere Betrachtung der T0-Pflanzen in Bezug auf Retikulin, und die Produkte der Reaktion, Laudanin und Laudanosin, ergab das in Abb. 4.8 gezeigte Bild.

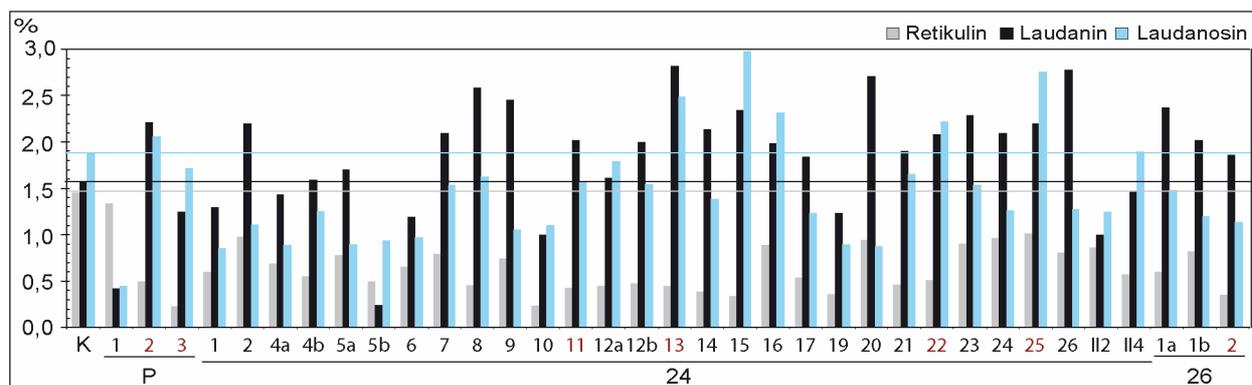


Abb. 4.8: prozentuale Anteile an Retikulin, Laudanin und Laudanosin in den T0-7omt-sense-Pflanzen; waagerechte Linien kennzeichnen den Wildtypwert = K, P = Vektorpflanzen vom Kallus 3 (n=3), 24 = Pflanzen vom Kallus 24 (n=29); 26 = Pflanzen vom Kallus 26 (n=3). Rot sind die als Eltern der T1 ausgesuchten Pflanzen beschriftet.

Alle 7omt-sense-Pflanzen hatten Retikulingehalte, die geringer waren als der Mittelwert der Wildtyppflanzen. Die Menge an Laudanin war in 53 % der Pflanzen erhöht, in 9 % der Pflanzen verringert und lag für 38 % der Pflanzen innerhalb der Standardabweichung der Wildtyppflanzen. Laudanosin war in 56 % der Pflanzen verringert und in nur 9 % der Pflanzen erhöht. In 41 % der T0-Pflanzen waren sowohl der Laudaningehalt erhöht, als auch der Laudanosingehalt verringert. In den Pflanzen 24-13, 24-15 und 24-25 waren sowohl die Laudanin als auch die Laudanosinwerte erhöht. Keine der Pflanzen zeigte eine verstärkte Laudanosinbildung und einen verminderten Laudaningehalt.

Die errechneten Prozentsätze aller nachgewiesenen Alkaloide wurden für die Gruppe der 7omt-sense-Pflanzen und die Wildtypen erfasst und mittels ANOVA mit dem Programm STRATGRAPHICS Plus 4.1 statistisch ausgewertet. Die Grundgesamtheit der Vektorpflanzen war mit 3 zu gering und wurde in die statistische Auswertung nicht einbezogen (Abb. 4.9).

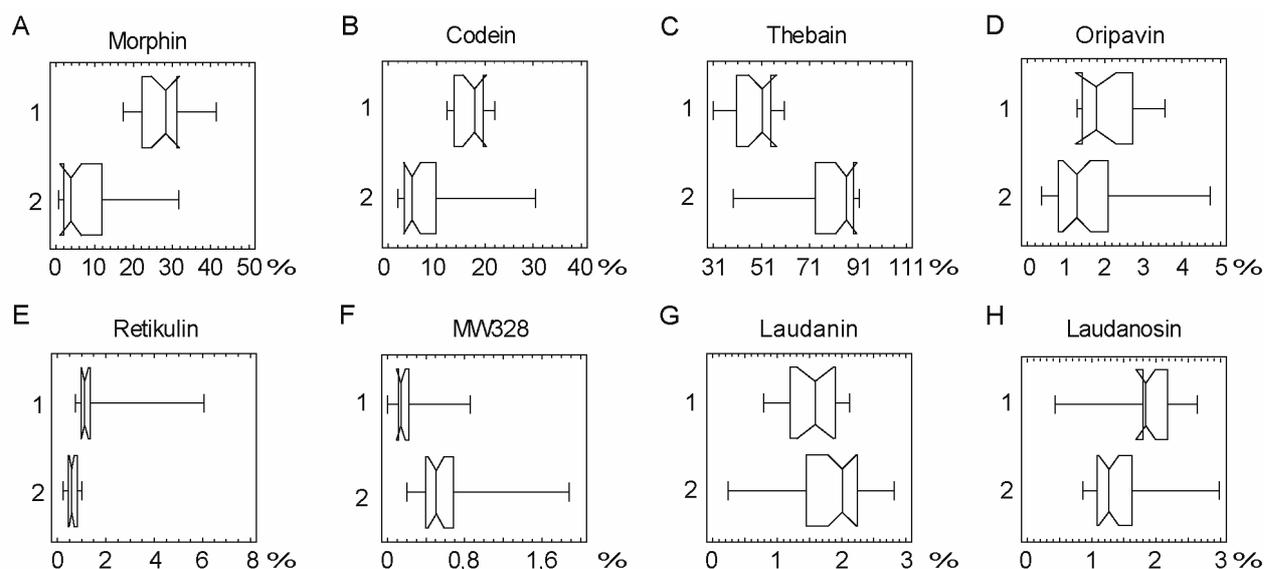


Abb. 4.9: Box and Whisker-Plots der Kruskal-Wallis-Analyse der prozentualen Anteile der acht analysierten Alkaloide in CO58-34 und den 7omt-sense-Pflanzen; Angegeben sind die Mediane, die Interquartilsabstände und die Variationsbreite. Y-Achse: Genotypen: 1 = Wildtyp (n=15), 2 = 7omt-sense-Pflanzen (n=32)

In Abb. 4.9 sind die Box-und-Whisker-Auftragungen für die einzelnen Alkaloide dargestellt. Angezeigt sind die Mediane, die Interquartilsabstände und die Variationsbreite.

Es ist deutlich zu erkennen, dass verglichen mit den Wildtyppflanzen in den T0-*7omt-sense*-Pflanzen weniger Morphin, Codein, Oripavin, Retikulin und Laudanosin gebildet wurde. Die Mengen an Thebain, den als MW328 zusammengefassten Alkaloiden, sowie Laudanin waren in den *7omt-sense*-Pflanzen erhöht.

Da die Werte nicht normal verteilt waren, wurde ein Signifikanztest nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Die Berechnung ergab die folgenden P-Werte: Thebain = $2,96 \cdot 10^{-5}$, Morphin und Codein = $1 \cdot 10^{-5}$, Oripavin = 0,02, Retikulin = $9 \cdot 10^{-7}$, MW328 = $9 \cdot 10^{-6}$, Laudanin = 0,03 und Laudanosin = $6 \cdot 10^{-3}$. Demnach ist der P-Wert für alle Alkaloide kleiner als 0,05, so dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Medianen im 95 % Konfidenzbereich besteht.

Da es sich ausschließlich um Pflanzen der Transformation der *7omt* in *sense*-Orientierung und deren Vektorkontrollen handelte, wurde das Expressionsniveau der *7omt* in den Pflanzen mittels Northern Blot Analysen überprüft. Die Analysen zur Lokalisation der Expression der *7omt* in Wildtyppflanzen (CO58-34) zeigten, dass sie vorwiegend in den oberen Pflanzenteilen transkribiert wird (Abb. 4.10A).

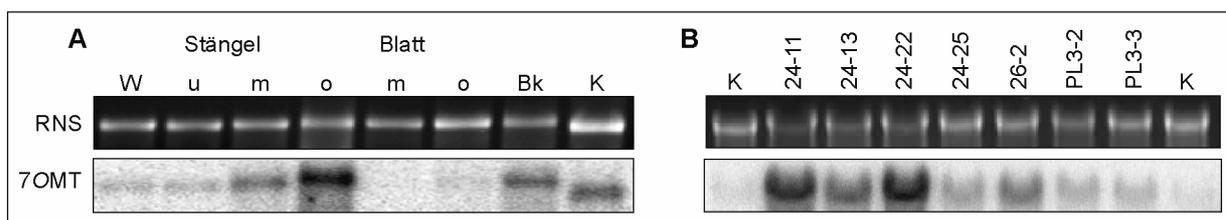


Abb. 4.10: Northern Blot-Analysen *7omt*; **A**: Expressionsniveau in verschiedenen Organen einer Wildtyppflanze: W = Wurzel, Bk = Blütenknospe, K = Kapsel, u = unten, m = mittel, o = oben; aufgetragen wurden je 10 μ g RNS; **B**: als Eltern der T1 ausgewählte T0-Pflanzen; K = Kontrolle; Es wurden je 20 μ g RNS aus Blättern aufgetragen und mit einer Volllängesonde gegen die *7omt* hybridisiert.

Die meisten Transkripte wurden im oberen Stängel nachgewiesen. Weniger stark transkribiert wurde die *7omt* im mittleren Stängel, in der Blütenknospe und in der Kapsel. In der Wurzel, dem unteren Stängelbereich und den Blättern wurden nur wenige *7omt*-Transkripte detektiert.

Alle Pflanzen der Generation T0 zeigten in Northern Blot-Analysen von RNS aus Blättern, einem Organ, in dem die *7omt* im Wildtyp nur schwach exprimiert wird, leicht bis stark erhöhte Transkriptionsraten (Abb. 4.10B). Von den als Eltern der T1 ausgewählten Pflanzen konnten die meisten Transkripte in 24-11, 24-13 und 24-22 nachgewiesen werden. In 24-25 und 26-2 war die Menge an Transkripten geringer, aber trotzdem deutlich erhöht. Auch in den Vektorkontrollpflanzen war ein leichter Anstieg an *7omt*-RNS gegenüber den Kontrollpflanzen zu beobachten, dieser war jedoch weniger stark als in den *7omt-sense*-Pflanzen.

4.1.5 Analysen der T1-Generation der *7omt-sense*-Pflanzen

Die Tochtergeneration der T0 wurde als T1 bezeichnet. Als Elternpflanzen für die T1-Generation waren 5 *7omt-sense*-Pflanzen und zwei pPLEX-Pflanzen ausgewählt worden. Die vier Pflanzen 24-11, 24-13, 24-22, 24-25 stammten vom Kallus 24, und die Pflanze 26-2 vom Kallus 26 ab. Die beiden Vektorkontrollpflanzen P-3-2 und P-3-3 und die Pflanzen 24-11, 24-22 und 26-2 gehörten zu den Pflanzen mit Thebaingehalten über 73 %. Im Gegensatz dazu verhielten sich 24-13 und 24-25 in ihrem Alkaloidprofil ähnlich den Kontrollpflanzen.

Die ausgewählten T0-Pflanzen hatten in der T1-Generation zwischen 10 und 17 Nachkommen. Außerdem wurden 8 Vektorkontrollpflanzen und 21 Wildtypkontrollpflanzen angezogen.

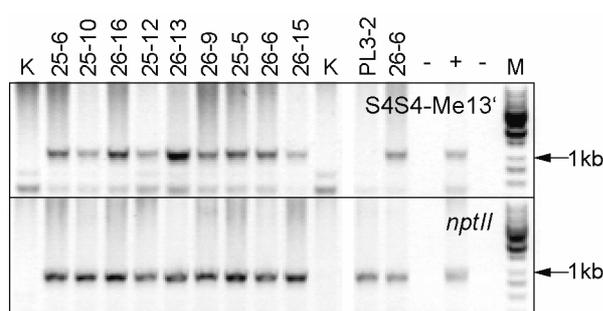


Abb. 4.11: PCR zum Nachweis transgener T1-Pflanzen; oben: das Transgen (1,2kb); unten: *nptII* (980 bp); K = Wildtyp, - und + = PCR-Kontrollen, M = Marker

Die T1-Pflanzen wurden hinsichtlich ihres Alkaloidgehaltes, der Expression der *7omt* und der Kopienzahl des Transgens im Genom überprüft. Die PCR-Ergebnisse zum Nachweis des Transgens und *nptII* sind in Abb. 4.11 für einige T1-Pflanzen, eine Vektorpflanze und zwei Wildtypen dargestellt. Die PCRs wurden wie für die Generation T0 beschrieben

durchgeführt. Aus der DNS aller Pflanzen der T1-Generation waren in PCRs gegen *nptII* 985 bp große DNS-Fragmente amplifiziert worden. In den *7omt-sense*-Pflanzen wurde außerdem das Transgen durch ein Fragment von etwa 1,2 kb nachgewiesen.

Die Latexanalysen der T1-Kontrollpflanzen sind in Abb. 4.12 und Tabelle 8.1 dargestellt.

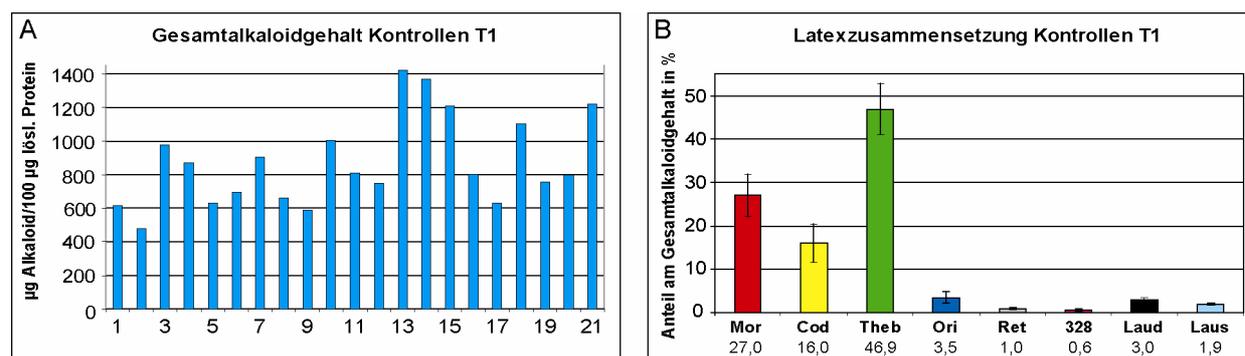


Abb. 4.12: Alkaloidgehalt der Wildtyppflanzen der T1-Generation. **A**: Gesamtalkaloidgehalt **B**: Zusammensetzung des Latex, prozentualer Anteil der in der HPLC nachgewiesenen Einzelkomponenten; Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n=21).

Die Wildtyppflanzen hatten einen Gesamtalkaloidgehalt von $872 \pm 264 \mu\text{g} / 100 \mu\text{g}$ löslichem Protein (Abb. 4.12). Ihr durchschnittliches Alkaloidprofil unterschied sich durch leicht verringerte Mittelwerte für Morphin, Codein, Thebain und Retikulin geringfügig von den T0-Kontrollen. Die Werte für Oripavin, MW328 und Laudanin waren etwas höher als bei den Wildtyppflanzen der T0 (siehe auch Abb. 4.5)

In Abb. 4.13 sind die Veränderungen im Alkaloidgehalt der T1-Pflanzen schematisch dargestellt.

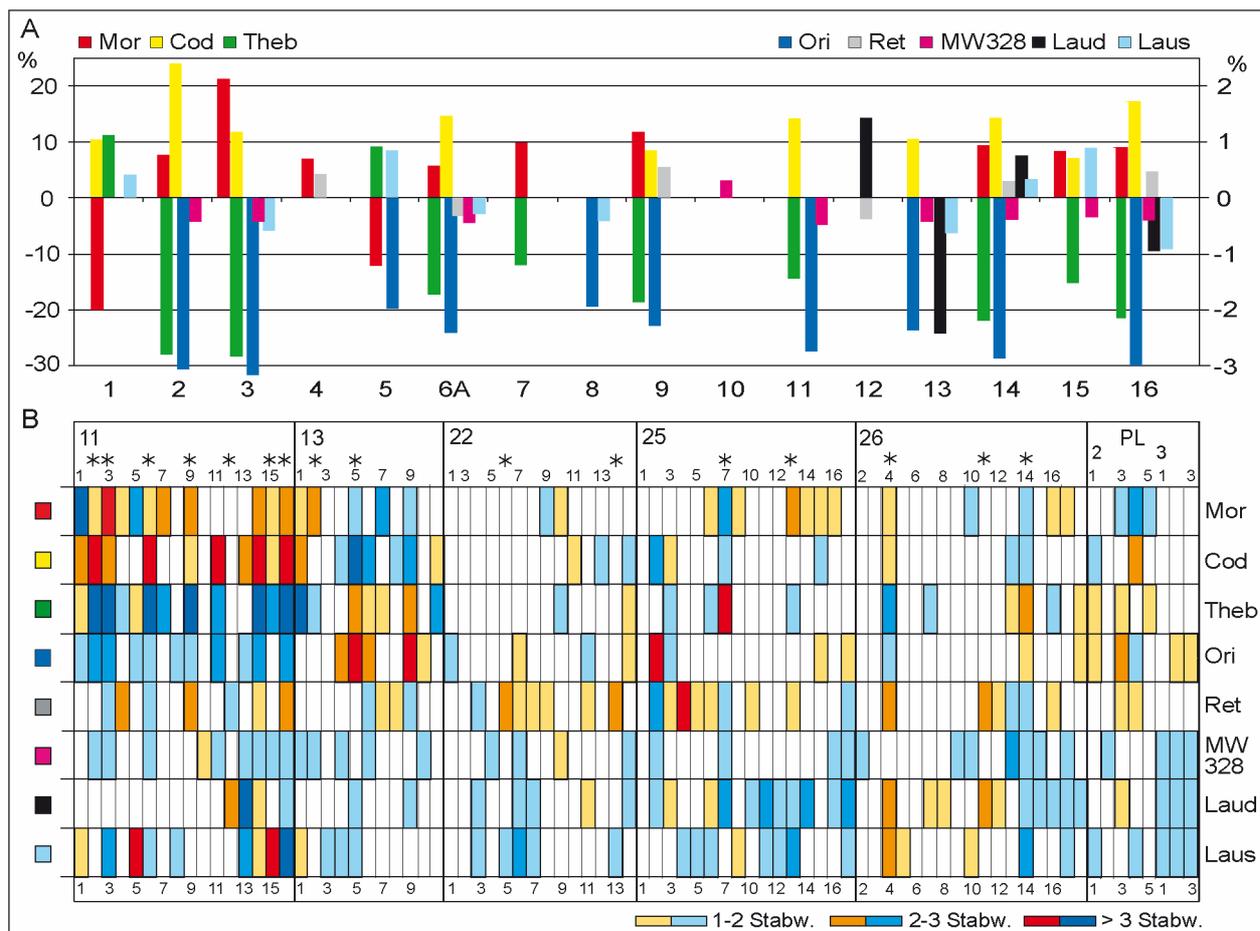


Abb. 4.13: T1-Alkaloidprofile; dargestellt sind die über die einfache Standardabweichung hinausgehenden Änderungen im Vergleich zum Wildtyp; **A**: Nachkommen von T0: 24-11; Die aufgetragenen Alkaloide sind den unterschiedlich skalierten Achsen durch die Anordnung der Legenden zugeordnet. **B**: Abweichungen der Alkaloidgehalte von den Kontrollen; Jede Spalte symbolisiert eine Pflanze. weiß = Werte innerhalb der Stabw.; Blautöne geben die Abweichung in den negativen, Gelb- und Rottöne in den positiven Bereich an; Elternpflanzen: 11= T0:24-11, 13= T0:24-13, 22= T0:24-22, 25= T0:24-25, 26= T0:26-2; PL= T0:pPLEX-2/3

Die Werte ergaben sich aus den ermittelten prozentualen Alkaloidanteilen, von denen der für die Kontrollpflanzen errechnete Mittelwert subtrahiert wurde (Werte in Tabelle 8.1 und Tabelle 8.3). Aufgetragen wurden der Einfachheit halber nur Werte, die die Standardabweichung überstiegen. Starke Veränderungen in der Latexzusammensetzung zeigten sich bei den von T0:24-11 und T0:24-13 abstammenden Pflanzen, vereinzelt aber auch bei Pflanzen, die von T0:24-25 abstammten (Abb. 4.13B).

In Abb. 4.13A sind die über die Standardabweichung hinausgehenden Abweichungen von den Wildtypwerten für die Nachkommen von T0:24-11 dargestellt. Gut zu erkennen ist die Zunahme der Alkaloide Morphin und Codein gegenüber der Abnahme von Thebain, Oripavin und MW328. Einige der Pflanzen zeigten auch starke Veränderungen der gebildeten Mengen von Retikulin, Laudanin oder Laudanosin. Zu diesen zählten die Pflanzen T1:11-3, 11-5, 11-9, 11-13, 11-15 und 11-16. Erläutert an der T1-Pflanze 11-2 gibt das Diagramm einen Gehalt von 8 % mehr Morphin, 24 % mehr Codein, 28 % weniger Thebain und 3 % weniger Oripavin an als im

Wildtyp. Der Latex bestand zu 35 % aus Morphin, 40 % aus Codein und 19 % aus Thebain.

Die Latexzusammensetzung der Nachkommen von T0:24-13 zeigt ein anderes Bild (Abb. 4.13B). Zwar fanden sich auch dort mit 13-1, 13-2 und 13-11 einige Pflanzen mit erhöhtem Morphin-/Codeingehalt, die meisten der Pflanzen bildeten aber weniger Morphin und Codein und hatten erhöhte Gehalte an Thebain und Oripavin. Zu diesen Pflanzen zählten 13-4 bis 13-9.

Für die *7omt-sense*-Pflanzen der Generation T1 lässt sich für die Nachkommen von T0:24-11 und T0:24-13 sagen, dass die prozentualen Anteile an Morphin und/oder Codein, verglichen mit den Wildtyppflanzen verändert hatten. Diese Veränderungen lagen im Bereich zwischen einfacher und mehr als dreifacher Standardabweichung und verhielten sich dabei gegenläufig den gebildeten Mengen an Thebain und Oripavin. Auch in den anderen T1-Pflanzen ist diese Beobachtung zu machen, die Werte für die geänderten Alkaloidgehalte liegen dabei aber meist zwischen einfacher und doppelter Standardabweichung.

Auch bei den Alkaloiden mit niedrigem Latexanteil waren Effekte zu verzeichnen. Die Menge an den Alkaloiden MW328 war bei 26 Pflanzen verringert und nur in zwei Pflanzen erhöht worden. Die Betrachtung der durch die *7OMT* beeinflussten Alkaloide Retikulin, Laudanin und Laudanosin zeigte, dass die Anteile dieser Alkaloide jeweils bei etwa 40 % der T1-Pflanzen verändert waren. Bei je zwei Drittel dieser Pflanzen war die Menge an Retikulin erhöht bzw. an Laudanin und/oder Laudanosin verringert worden. Dabei konnten bei den von T0:24-11, T0:24-25 und T0:26-2 abstammenden Pflanzen die stärksten Änderungen festgestellt werden.

Eine erhöhte Menge an Retikulin verbunden mit einer Abnahme von Laudanin und Laudanosin bzw. Laudanin oder Laudanosin zeigten 11 Pflanzen. Zu diesen gehörten z.B. 11-16, 22-6, 22-14, 25-4, 25-13 und 26-16.

Eine Verringerung der Retikulinmenge zeigte sich bei 12 Pflanzen. In zehn dieser Pflanzen war außerdem die Menge an Laudanin und/oder Laudanosin reduziert. In ebenfalls 12 Pflanzen war der Retikulingehalt nicht verändert, es lagen aber in 4 Pflanzen verringerte Mengen an Laudanin, in 3 Pflanzen an Laudanosin und in 5 Pflanzen an beiden Alkaloiden vor.

Ein Anstieg der *7OMT*-Produkte lag in 17 Pflanzen vor. Fünf dieser Pflanzen waren Nachkommen der T0-Pflanze 26-2. Die Menge an Laudanin war in neun Pflanzen und an Laudanosin in zehn Pflanzen der T1-Generation gestiegen. Ein Anstieg beider Alkaloide lag in zwei dieser Pflanzen vor. Steigerungen um einen Faktor ≥ 2 der Standardabweichung des Laudanin- bzw. Laudanosingehaltes gab es in den T1-Pflanzen 11-5, 11-12, 11-15, 26-4 und 26-11. Eine Abnahme der Mengen in der gleichen Größenordnung war dagegen in 10 Pflanzen vorhanden. Von den 74 Pflanzen der T1-Generation konnte nur für die Pflanze T1:11-12 eine Verringerung des Retikulingehaltes, verbunden mit einer Zunahme von *7OMT*-Produkten, in diesem Fall Laudanin, festgestellt werden. Neunzehn Pflanzen zeigten keine Veränderungen im

Gehalt an Retikulin, Laudanin und Laudanosin.

Die Latexzusammensetzungen der Vektorkontrollpflanzen zeigten wie der Großteil der Nachkommen von T0:24-22, T0:24-25 und T0:26-2 nur geringe Veränderungen, die sich im Bereich zwischen einfacher und doppelter Standardabweichung der Kontrollpflanzen befanden. Die Verschiebungen der Werte bewegen sich für Morphin in den negativen Bereich, für Thebain, Oripavin und Retikulin in den positiven Bereich. Für MW328, Laudanin und Laudanosin waren die ermittelten Werte niedriger als bei den Kontrollpflanzen.

Der Gesamtalkaloidgehalt der Pflanzen der T1-Generation wich nur bei einem Drittel von den Wildtyppflanzen ab. Von den 74 T1-*7omt-sense*-Pflanzen bildeten nur 13 mehr Alkaloide im Verhältnis zum löslichen Protein, 12 Pflanzen hatten einen geringeren Alkaloidgehalt. Die detaillierten Werte der Alkaloidmessungen der T1-Generation zeigt Tabelle 8.3 im Anhang.

Mit Northern Blots wurden 63 der T1-Pflanzen hinsichtlich der Überexpression der *7omt* untersucht (Abb. 4.14).

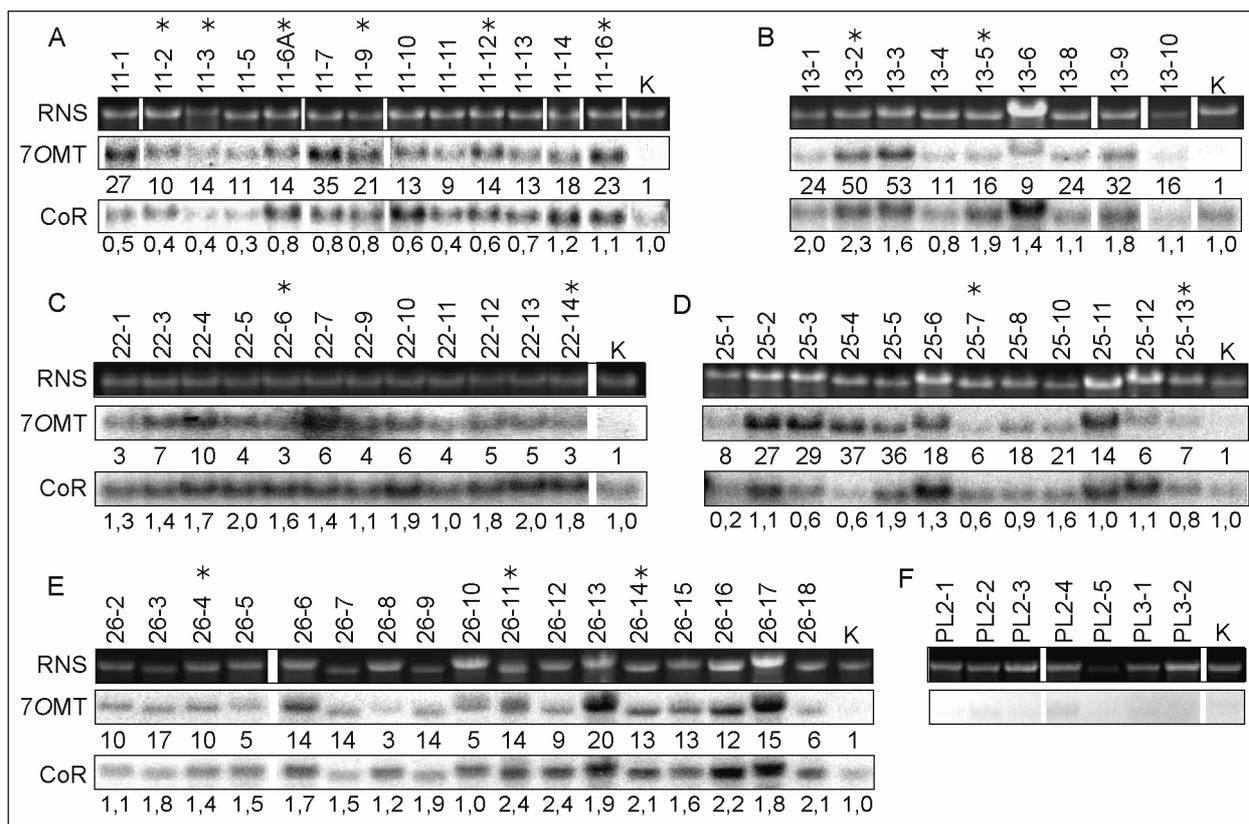


Abb. 4.14: Northern-Blot-Analysen der T1-*7omt-sense*-Pflanzen; A-F symbolisieren die Elternpflanzen: **A**: T0:24-11; **B**: T0:24-13; **C**: T0:24-22; **D**: T0:24-25; **E**: T0:26-2; **F**: T0:pPLEX 3-2 und T0:pPLEX 3-3. Gezeigt sind die RNS-Ladekontrolle (10 µg Gesamt-RNS aus Blättern) und die Ergebnisse der Hybridisierungen mit einem Fragment der *7omt* und *cor*. Die unter den Northern Blots angegebenen Zahlen sind die Faktoren der Expression von *7omt* und *cor* relativ zur Kontrolle (K).

Die Quantifizierung erfolgte über die Berechnung eines Quotienten aus Faktoren, die sich durch die Quantifizierung des vom Northern Blot detektierten radioaktiven Signals und der auf das Gel aufgetragenen RNS-Menge relativ zur Kontrolle ergaben. Zur Berechnung der Faktoren waren

die ermittelten Werte der Kontrollen jeweils Eins gesetzt worden.

Alle Nachkommen zeigten in den Blättern ein deutlich erhöhtes Maß an mRNA der *7omt*. Die Transkriptmengen in den Blättern der *7omt-sense*-Pflanzen waren im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf das drei- bis dreiundfünfzigfache erhöht. Zu den Pflanzen mit einem geringen Anstieg der Transkriptmenge, das heißt mit einem Faktor <10 , zählen vor allem die Nachkommen der T0-Pflanze 24-22, zwei Nachkommen von T0:24-11, vier von T0:24-25 abstammende Pflanzen und fünf der Nachkommen von T0:26-2. Die höchsten Transkriptmengen mit einem Faktor >30 wurden für die T1-Pflanzen 11-7 mit Faktor 35, 13-9 mit Faktor 32, 25-4 mit Faktor 37 und für 25-5 mit dem Faktor 36 bestimmt. Die höchsten Werte lieferten 13-2 und 13-3 mit den Faktoren 50 und 53.

Eine Quantifizierung der *7omt*-mRNA der Vektorpflanzen war aus technischen Gründen nicht möglich, die Abbildung zeigt jedoch keine stärkere Expression gegenüber der Wildtyppflanze.

In mehreren T1-Pflanzen waren Änderungen der Alkaloidgehalte von Morphin, Codein, Thebain und Oripavin festgestellt worden. Das letzte bekannte Enzym zur Synthese von Codein und Morphin ist die Codeinonreduktase (CoR), deren Produkt Codein in Morphin umgewandelt wird. Außerdem synthetisiert CoR Morphin aus Morphinon. Beide Varianten gehen vom Thebain aus und der Weg über Morphinon verläuft über Oripavin, so dass diese vier Alkaloide über CoR miteinander in Verbindung stehen. Daher wurde neben der Transkriptmenge der *7omt* auch die mRNA-Menge an *cor* bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Alkaloidprofil und der Transkriptionsstärke ausmachen zu können. Die mRNA-Menge von *cor* war bei elf Nachkommen von T0:24-11, bei sechs von T0:24-25, sowie bei einem von T0:24-13 um 20 bis 80 % verringert. Maximale Erhöhungen der *cor*-Transkriptmengen ($\geq 2,0$) zeigten die Pflanzen 13-1, 13-2, 22-5, 22-10, 22-13, 26-11, 26-12, 26-14, 26-16 und 26-18.

Das Verhältnis der Expressionsdaten der *7omt* und *cor* zueinander sind in Abb. 4.15 gezeigt.

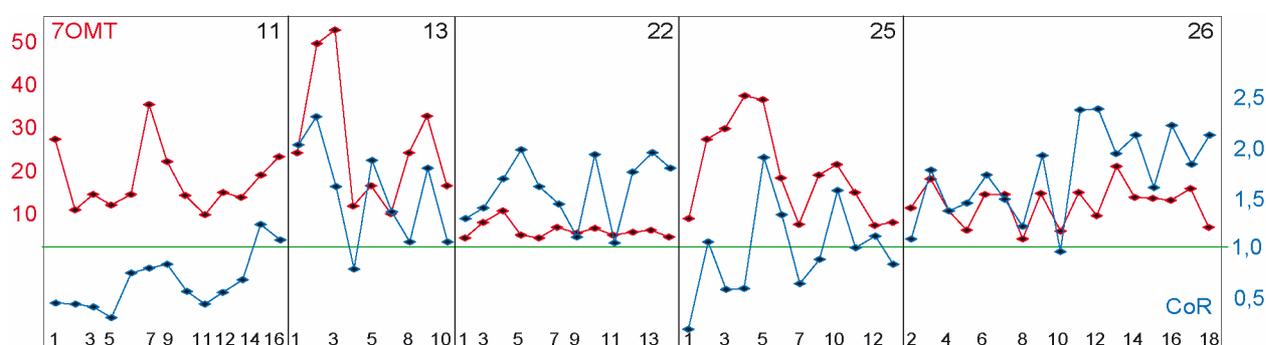


Abb. 4.15: Verhalten der Expressionsdaten der *7omt* und *cor* zueinander. Die grüne Linie kennzeichnet das Expressionsniveau der Kontrollen. Angegeben sind die Faktoren der Expression relativ zur Kontrolle

Die beiden Kurven verhalten sich an einigen Stellen ähnlich, an vielen Stellen aber gegensätzlich zueinander. Innerhalb der Abkömmlinge einer T0-Pflanze sind Trends erkennbar.

Bei den Nachkommen von T0:24-11 war wie in allen T1-Pflanzen die Menge an *7omt*-

Transkript gestiegen und mit Ausnahme von 11-14 und 11-16 die *cor*-Transkriptmenge gesunken. Die von T0:24-13, T0:24-22 und T0:26-2 abstammenden Pflanzen haben mit wenigen Ausnahmen erhöhte *7omt*- und *cor*-Transkriptmengen. Folgt man den Kurvenverläufen, sieht man, dass die *7omt*-Menge in vielen Fällen mit der Menge von *cor* einhergeht. Zu diesen zählten beispielsweise 13-2, 13-4, 13-9 und 13-10, 22-4, 22-10, 25-1, 25-2, 25-5 bis 25-11, 26-2 bis 26-12. Eine Korrelation zwischen beiden Transkriptionsstärken konnte aber nicht für alle Pflanzen gezeigt werden. Deutlich zu sehen waren die Unterschiede an den T1-Pflanzen 22-5 bis 13, 25-3 und 4, 25-13 und 26-12 bis 18.

Durch Southern Blot-Analysen der T0- und T1-Pflanzen wurde die Kopienzahl des Transgens im Genom bestimmt. Genomische DNS wurde mit BglIII verdaut. BglIII schneidet die endogene *7omt* in Position 980 in zwei ungleichlange Stücke mit Längen von 980 bp und nur 88 bp. Die durch die agrobakterienvermittelte Transformation eingebrachte T-DNS enthielt ebenfalls nur die BglIII-Schnittstelle in der *7omt* (Abb. 4.16C).

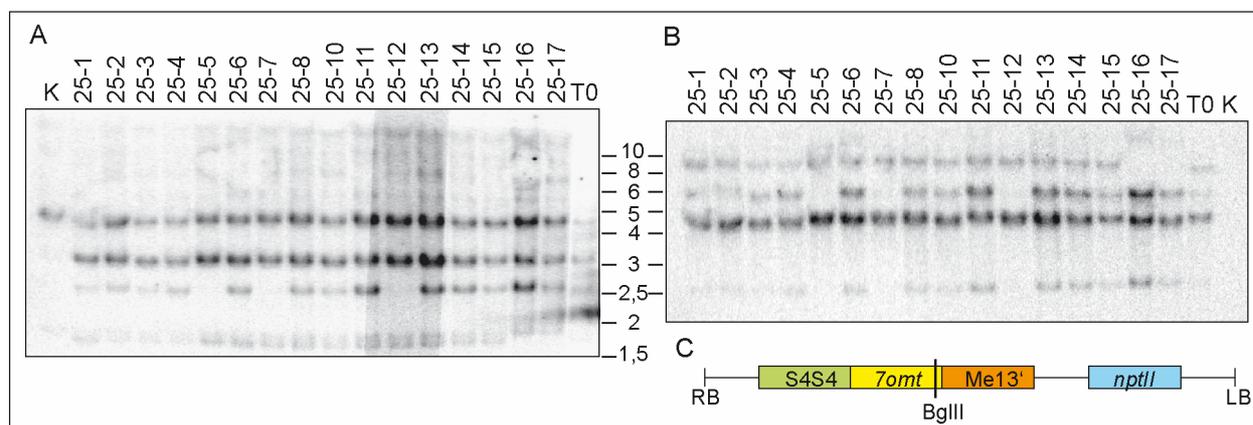


Abb. 4.16: Southern Blot Analyse der Nachkommen von T0:24-25. Auf das Gel wurden je 10µg über Nacht mit BglIII verdauter genomischer DNS von Wildtyppflanzen (K), der Elternpflanze (T0:24-25) und deren T1-Pflanzen 25-1 bis 25-17; A: Bandenmuster nach Hybridisierung mit der *7omt*; B: Bandenmuster nach Hybridisierung mit *nptII*; Die Skala gibt die Größe der DNS-Fragmente in kb an. C: schematische Darstellung der Expressionskassette von pPLEX X002 mit Kennzeichnung der BglIII-Schnittstelle

In Abb. 4.16 sind die Southern Blots der Nachkommen von T0:24-25 zu sehen. Zunächst wurde mit einer Volllänge-sonde der *7omt* hybridisiert (Abb. 4.16A). Aufgrund der Lage der Schnittstelle entstanden durch den Restriktionsverdau Fragmente genomischer DNS, die entweder das 980 bp-*7omt*-Fragment oder das 88 bp-*7omt*-Fragment enthielten. Auf Southern Blots waren die Signale der Banden mit dem 980-bp-Fragment gut zu detektieren. Die Banden, die die 88 bp-Fragmente enthielten, emittierten nur ein schwaches Signal, das schlecht detektierbar war. Daher wurden die gleichen Blots mit *nptII* hybridisiert (Abb. 4.16B). Da *nptII* nicht durch BglIII geschnitten wird, konnte eine auf dem Blot detektierte Bande als eine Kopie gezählt werden. Die unterschiedlichen Bandenstärken ließen eine Überlagerung vermuten, so dass von einer Mindestanzahl ausgegangen werden musste.

In den Pflanzen der Generation T0 konnten *nptII*-Banden der Größen 9 kb, 6 kb, 4,5 kb und

2,5 kb nachgewiesen werden, wobei die 4,5 kb-Bande ein stärkeres Signal gab als die anderen drei Banden. Der in Abb. 4.16A und B sichtbare Verlust einiger in der T0-Generation vorhandener Banden belegt die Heterozygotie der T0-Pflanzen, die zu einer Aufspaltung in der T1-Generation führte. Beispielsweise fehlten den T1-Pflanzen 25-5, 25-7 und 25-12 die Banden der Größe 6 kb und 2,5 kb. Die Pflanzen 25-16 und 25-17 zeigen die 9 kb-Bande der T0-Generation nicht mehr. Die für die Pflanzen der T1-Generation und deren Elternpflanzen ermittelten Kopienzahlen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Mindestanzahl der Transgenkopien in der T0- und der T1-Generation. Unter T0 ist die Anzahl der Transgenkopien der Elternpflanzen (T0-Pflanzen) aufgeführt; T1: die Mindestanzahl an Kopien ist fett gedruckt. Darunter aufgeführt ist die Zahl der Nachkommen mit dieser Kopienzahl. Die Menge an analysierten Nachkommen ist unter n angegeben.

T0-Pflanze	Kopien T0	T1					n
		≥ 1	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	
24-11	4	2	2	7	4	0	15
24-13	4	0	3	1	5	0	9
24-22	4	0	0	1	11	0	12
24-25	4	0	3	2	11	0	16
26-2	4	0	1	4	0	12	17
PL-3-2	1	-	-	-	-	-	-
PL-3-3	1	-	-	-	-	-	-

Alle T1-Elternpflanzen trugen mindestens 4 Kopien des Transgens. In der T1 spaltete dieser Genotyp. Insgesamt waren in der T1-Generation Pflanzen mit Transgenkopienzahlen zwischen 1 und 5 zu finden. Eine Pflanze hatte nur eine Kopie geerbt, neun Pflanzen trugen zwei Kopien und 15 Pflanzen trugen drei Kopien. In 31 Pflanzen konnte die gleiche Transgenkopienzahl nachgewiesen werden wie in den T0-Pflanzen. Unter den 17 Nachkommen von T0:26-2 waren zwölf, bei denen fünf *nptII*-Banden erkennbar (Abb. 8.1).

4.1.6 Analysen der T2-Generation der *Tomt-sense*-Pflanzen

Von den 16 als Eltern der T2-Generation ausgesuchten Pflanzen wurden je 8 Nachkommen ausgesät. Insgesamt gingen 103 T2-Pflanzen in die Analysen ein. Zusätzlich waren 15 Kontrollpflanzen des Kultivars CO58-34 gezogen worden.

Der Transgenstatus der T2-Pflanzen konnte mit PCR auf das Transgen mit Primern gegen den S4S4-Doppelpromotor und den Me13'-Terminator bestätigt werden. Die Pflanzen wurden hinsichtlich ihres Alkaloidgehaltes (Latex zweier Kapseln) und der Expression verschiedener Biosynthesegene mittels Northern Blot-Analysen untersucht.

Die Latexanalyse der Kontrollen zur T2 zeigte, dass die Mittelwerte für Morphin, Oripavin und MW328, höher waren als in den Kontrollpflanzen der beiden vorangegangenen Generationen. Für Codein, Thebain, Retikulin und Laudanosin waren die Werte geringer. Das Alkaloid Laudanin lag mit 1,82 % zwischen den für die T0- und T1-Kontrollen ermittelten Werten. Die Analyse ergab für die T2-Kontrollen die folgende gemittelte prozentuale Zusammensetzung:

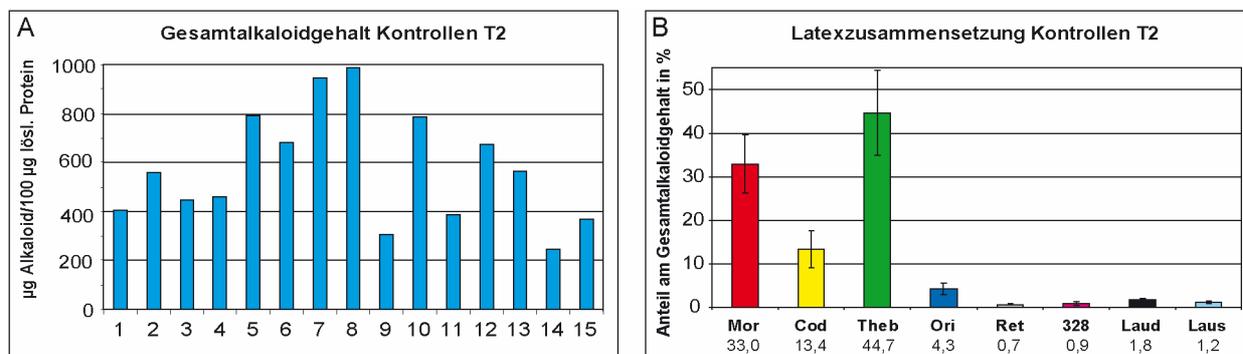


Abb. 4.17: Alkaloidgehalte der Wildtyp-Kontrollpflanzen zur T2-Generation. **A:** Gesamtalkaloidgehalt **B:** Zusammensetzung des Latex, prozentualer Anteil der in der HPLC nachgewiesenen Einzelkomponenten; Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n=15)

Der gemittelte Gesamtalkaloidgehalt der T2-Kontrollpflanzen betrug $573 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ lösliches Protein und lag damit deutlich unter den Werten der Kontrollen der T0-Generation (2070 ± 623) und der T1-Generation (872 ± 264). 35 der 100 T2-Pflanzen hatten einen geringeren Alkaloidgehalt als die Wildtyppflanzen, bei 13 Pflanzen war der Alkaloidgehalt höher (Tabelle 8.4). Besonders auffällig war die Anhäufung von Pflanzen mit geringerem Alkaloidgehalt unter den Nachkommen von T1:11-2, T1:11-6A, T1:11-16 und T1:26-11. Erhöhte Alkaloidgehalte waren unter den von T1:25-7 und T1:26-14 abstammenden Pflanzen zu verzeichnen. Die extremsten Werte lieferten die Pflanzen 11-2-8, 11-9-8 und 26-4-7 mit Gesamtalkaloidgehalten zwischen 88 und $123 \mu\text{g}$, sowie die Pflanzen 25-7-4, 25-7-7, 26-14-2, 26-14-3, 26-14-4, 26-14-6 und 26-14-8 mit Werten zwischen 1060 und $1777 \mu\text{g}$ (Tabelle 8.4).

In Abb. 4.18 sind je ein Profil zurückgehend auf die T0-Pflanzen 24-11, 24-13, 24-22, 24-25 und 26-2 anhand der Nachkommen der T1-Pflanzen 11-2, 13-5, 22-14, 25-13 und 26-14 gezeigt.

Weitere Profile sind in den Abbildungen Abb. 8.2 und Abb. 8.3 dargestellt.

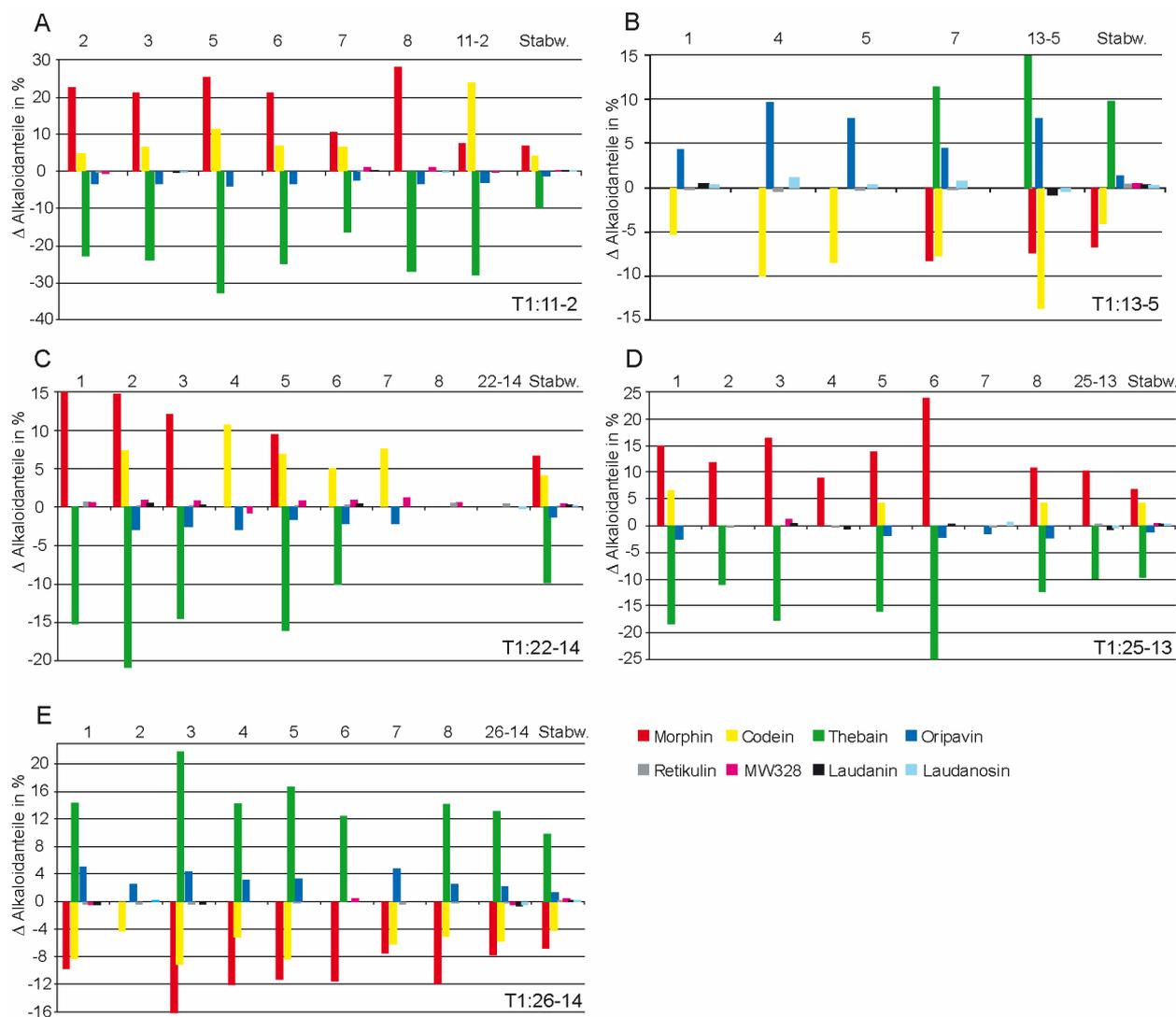


Abb. 4.18: T2-Alkaloidprofile der Nachkommen ausgewählter T1-Pflanzen. Dargestellt sind die Abweichungen (Δ) vom Alkaloidgehalt der Wildtyppflanzen. Gezeigt sind die über die einfache Standardabweichung hinausgehenden %-Werte; Aufgetragen wurden die Veränderungen im Latex der T2-Pflanzen, die Abweichung der T1-Pflanzen von den T1-Kontrollen und die Standardabweichungen. Die Eltern der T2-Pflanzen sind A: T1:11-2, B: T1:13-5, C: T1:22-14, D: T1:25-13, E: T1:26-14.

Die dargestellten Werte ergaben sich aus den ermittelten prozentualen Alkaloidanteilen, von denen der für die Kontrollpflanzen errechnete Mittelwert subtrahiert wurde. Aufgetragen wurden nur Werte, die die einfache Standardabweichung überstiegen. Erläutert am Beispiel der T1:11-2-Nachkommen (Abb. 4.18A) ist ersichtlich, dass sowohl die sechs T2-Pflanzen, als auch die Elternpflanze weniger Thebain und Oripavin bildeten als die Wildtyppflanzen. Betrachtet man die T2-Pflanze 11-2-3, gibt das Diagramm einen Gehalt von 21 % mehr Morphine, 7 % mehr Codein, 24 % weniger Thebain und 3 % weniger Oripavin an als im Wildtyp vorhanden.

Wie es sich schon in der T1-Generation von T0:24-11 und T0:24-13 andeutete, zeigten die T2-Pflanzen antagonistische Verschiebungen der Alkaloidgehalte von Morphine und Codein gegen Thebain und Oripavin (Abb. 4.19). Diese Beobachtung gab es auch bei den T2-Nachkommen von Pflanzen wie T1:22-14, die in der T1-Generation diesen Effekt nicht zeigten (Abb. 4.18C).

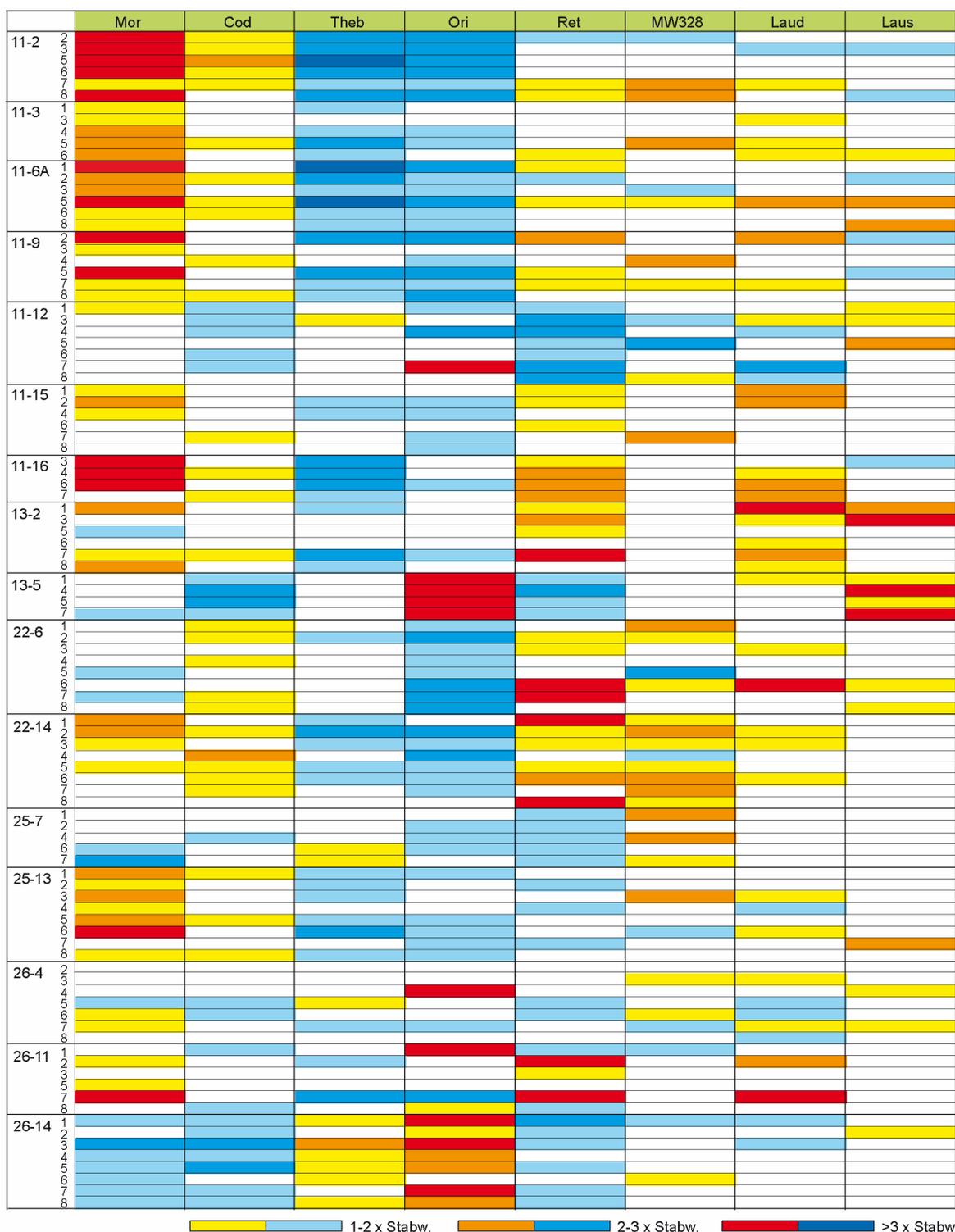


Abb. 4.19: T2-Generation: Abweichungen der Alkaloidgehalte gemessen an der Standardabweichung (Stabw.); links angegeben sind die T1-Pflanzen, die als Eltern ausgesucht worden waren und ihre T2-Nachkommen; weiß = Werte in der Stabw.; Blautöne geben die Abweichung in den negativen, Gelb- und Rottöne in den positiven Bereich an.

Die Nachkommen der T1-Pflanzen 11-2, 22-14 und 25-13 bildeten fast ausschließlich mehr Morphin und/oder Codein und weniger Thebain und/oder Oripavin als die CO58-34-Kontrollen (Abb. 4.18). Zu dieser Gruppe gehörten auch die Nachkommen der T1-Pflanzen 11-3, 11-6A, 11-9, 11-15, 11-16 und 13-2 (Abb. 4.19, Abb. 8.2, Abb. 8.3). Bei den Nachkommen der T1-Pflanzen 13-5 und 26-14 verhielt es sich umgekehrt. Sie bildeten mehr Thebain und/oder

Oripavin und weniger Morphin und/oder Codein.

Die Veränderungen am prozentualen Anteil der Alkaloide der T2-Pflanzen variierten. 48 Pflanzen hatten einen erhöhten Gehalt an Morphin. Dagegen war der Morphingehalt nur in 14 Pflanzen geringer als im Wildtyp. Der Codeingehalt war in 28 Pflanzen erhöht und in 21 Pflanzen verringert. Im Gegensatz dazu zeigten nur 10 Pflanzen einen gestiegenen, aber 42 Pflanzen einen verringerten Thebaingehalt. Mit dem Gehalt an Oripavin verhielt es sich ähnlich. Er war in 51 Pflanzen geringer als im Wildtyp und in 15 Pflanzen gestiegen.

Für Morphin lagen die Änderungen zwischen 10 und 20 % mit Spitzenwerten von 28 % für 11-2-8, 32 % für 11-6A-1 und 30 % für 11-16-3. Die Werte für Codein betragen zwischen 4 und 8%. Die Änderungen der Gehalte an Thebain bewegten sich zwischen 15 und 30 %, und für Oripavin betragen sie 3-6 %, mit dem Höchstwert 9,6 % in der Pflanze 13-5-4.

Die meisten festgestellten Änderungen bewegten sich im Bereich zwischen einfacher und doppelter Standardabweichung (Abb. 4.19, gelb bzw. hellblau). Änderungen stärkeren Ausmaßes fanden sich unter den Nachkommen von T1:11-2 für Morphin, Thebain und Oripavin, T1:11-6A und T1:11-16 für Morphin und Thebain, T1:13-5, T1:22-6 und T1:26-14 für Oripavin.

In den meisten Fällen zeigten die Nachkommen einer T1-Pflanze die gleichen Tendenzen in der Zusammensetzung ihres Latex. Sie hatten entweder einen höheren Morphin-/Codeingehalt, oder den Gehalt an Thebain/Oripavin erhöht. Für die Nachkommen einiger T1-Pflanzen ließen sich allerdings keine eindeutige Aussage treffen. Zu diesen gehörten T1:11-12 und T1:26-11.

Von den 100 untersuchten T2-Pflanzen war in 25 Pflanzen die Menge an den Alkaloiden MW328 gestiegen und in zehn Pflanzen gesunken. Die Betrachtung der Alkaloide Retikulin, Laudanin und Laudanosin zeigt, dass 58 Pflanzen einen veränderten Retikulingehalt hatten. Bei 30 dieser Pflanzen war der Retikulingehalt gesunken. Die Gehalte an Laudanin und Laudanosin waren in 37 bzw. 23 Pflanzen verändert. Dabei produzierten 28 Pflanzen mehr Laudanin und 17 Pflanzen mehr Laudanosin. Vier Pflanzen zeigten bei geringeren Retikulinwerten erhöhte Werte für Laudanosin. In zwei Pflanzen ging die verminderte Retikulinmenge mit einer Erhöhung der Alkaloide Laudanin und Laudanosin einher. Neben einer verstärkten Bildung von Retikulin wurde in 14 Pflanzen auch eine Erhöhung der Werte von Laudanin, in fünf Pflanzen von Laudanin und Laudanosin festgestellt. Nur die Pflanze T2:26-11-3 zeigte keine Veränderungen in ihrem Alkaloidprofil gegenüber dem Wildtyp.

Die Unterschiede der Alkaloidspektren zu den Wildtyppflanzen ließen einen Zusammenhang zwischen der Überexpression der *7omt* in den Pflanzen mit der Transkription der Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase (SalAT) und/oder *cor* vermuten. SalAT liefert Substrate im Morphinanzweig der Biosynthese und beeinflusst dadurch die Synthesen von Thebain, Oripavin, Morphin und Codein. Wie schon zur T1-Generation angemerkt, ist CoR maßgeblich an der Umwandlung

von Thebain in Morphin über Codein bzw. Oripavin beteiligt. Daher wurden in der Generation T2 auch die Transkriptmengen dieser Enzyme in Northern Blot-Analysen überprüft.

Anders als bei den Northern Blot Analysen der T1-Generation wurde für die T2-Analyse RNS aus dem obersten Stängelfragment (ca. 4 cm) verwendet, denn die Expression der 7OMT war in den Stängeln der Wildtyppflanzen viel höher als in den Blättern (Abb. 4.10).

Die Ergebnisse der Hybridisierungen der RNS von 80 T2-Pflanzen gegen die *7omt*, *cor* und *salat* sind in Abb. 4.20 dargestellt. Unter der Abbildung des jeweiligen Blots sind die Quantifizierungen angegeben.

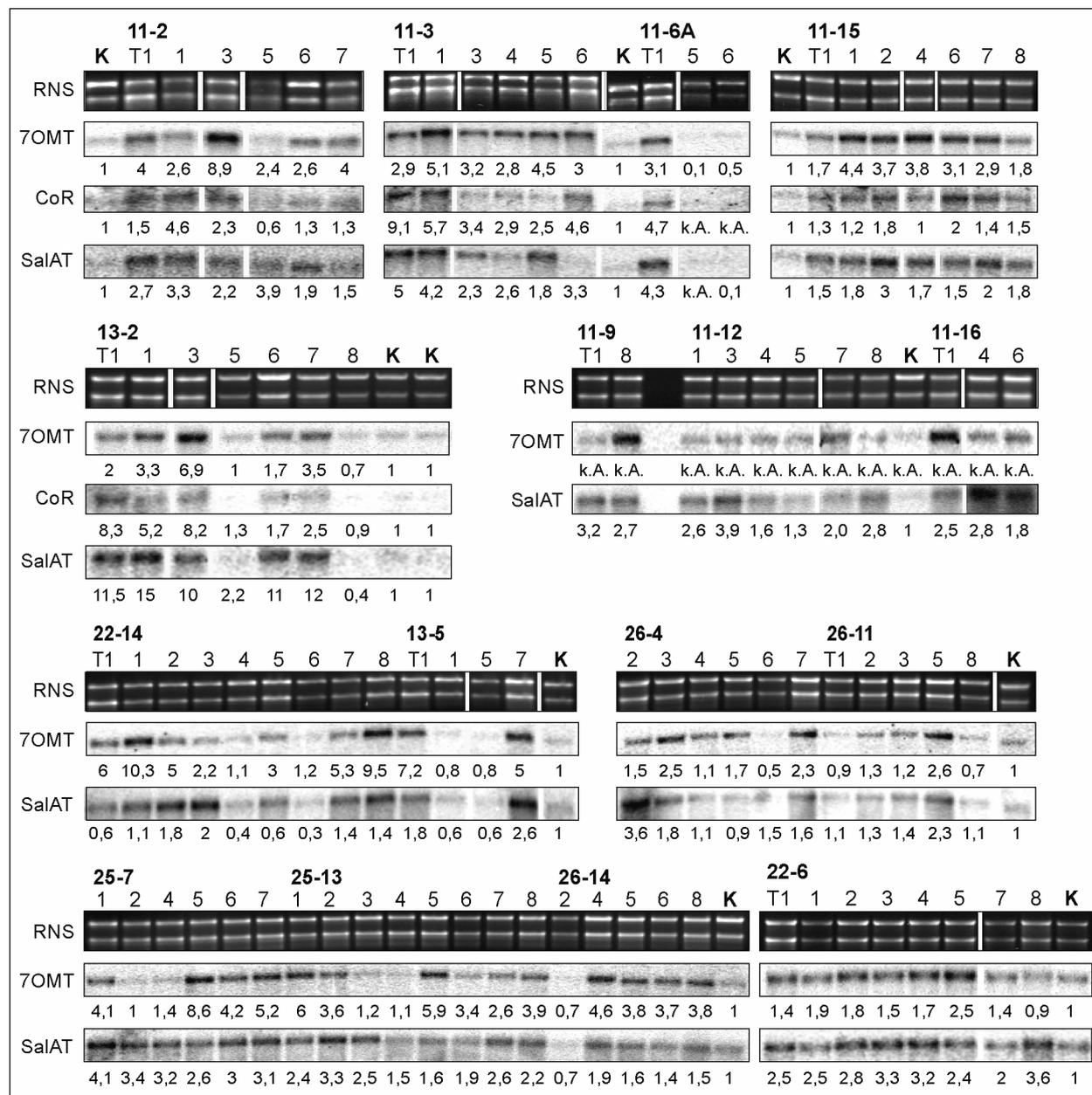


Abb. 4.20: Northern Blot Analysen der Pflanzen der T2-Generation und einiger Elternpflanzen. Abgebildet sind die RNS-Ladekontrolle und die Hybridisierungen mit der *7omt*, *cor* und *salat*. Es wurden jeweils 10 µg aus den obersten Stängelstücken (4 cm) isolierte Gesamt-RNS aufgetragen. Die Ergebnisse der Quantifizierungen sind unter dem jeweiligen Abbild der Hybridisierung angegeben; k.A. = keine Angabe möglich

38 der 80 untersuchten T2-Pflanzen zeigten eine verstärkte Transkription der *7omt* die dem Zwei- bis Sechsfachen der Expression in den Wildtyppflanzen entsprach. Die höchsten Expressionsdaten lieferten die Pflanzen 11-2-3 mit einem Faktor 8,9, 13-2-3 mit dem Faktor 6,9, 22-14-1 und 22-14-8 mit den Faktoren 10,3 und 9,5 und 25-7-5 mit dem Faktor 8,6. Bei einem Fünftel der Pflanzen lag die Expression der *7OMT* zwischen der einfachen und doppelten Menge an detektierter *7omt*-mRNS der Wildtyppflanzen. In 10 Fällen fiel die Transkriptionsrate geringer aus als in den Wildtyppflanzen. Zu diesen Pflanzen gehörten 11-6A-5, 13-5-5, 26-4-6 und 26-11-8. Für die Blots der von T1:11-9, T1:11-12 und T1:11-16 abstammenden Pflanzen konnten keine Auswertungen zur *7omt* vorgenommen werden, da durch die genutzte Auswertungs-*software* ein negativer Wert für die Bande der Kontrollpflanze angegeben wurde. Anhand der Bandenstärken ist aber deutlich zu sehen, dass die detektierten Signale der T1- und T2-Pflanzen stärker waren als das Signal der Wildtyppflanze (K).

Für *cor* konnten nur für 22 Pflanzen Werte ermittelt werden. In zwei Pflanzen war die Expression geringer als in den Kontrollen. Zehn Pflanzen zeigten eine leichte Erhöhung im Bereich der Faktoren eins bis zwei auf. In elf Pflanzen war die Expression auf Faktoren zwischen 2 und 8 gesteigert. Die höchsten Faktoren betragen 9,6 für die Pflanze 11-3-2 und 8,2 für 13-2-3 relativ zur Expression in den Wildtyppflanzen.

Die Expression von *salat* wurde für 42 von 80 Pflanzen auf einen Faktor kleiner gleich 2 bestimmt. 38 Pflanzen zeigten eine Erhöhung der Expression von *salat* auf Faktoren zwischen 2,1 und 15. Die höchsten Werte waren unter den Nachkommen der Pflanze T1:13-2 zu finden, von denen insgesamt vier Pflanzen einen Faktor >10 erreichten.

4.2 Putative Stylopin-N-Methyltransferase

4.2.1 Isolation der cDNS mittels RACE-PCR

Durch ein AFLP-Projekt (*amplified fragment length polymorphism*) (Ziegler et al., 2005) war es gelungen, eine cDNS-Sequenz zu isolieren, die Homologien zu den Aminosäuren 40-84 im C-terminalen Bereich der bereits aus *C. japonica* bekannten Coclaurin-N-Methyltransferase (CNMT) aufwies (Choi et al., 2002). Es handelte sich um ein 136 bp (45 AS) langes Fragment, das als Basis der RACE-PCR (3.4) eingesetzt wurde, um die bisher unbekannte Sequenz der CNMT aus *P. somniferum* zu ermitteln.

Von der Sequenz des vorhandenen cDNS-Fragmentes wurden die vier spezifischen Primer NMT 5'RACE, NMT 5'RACEnested, NMT 3'RACE, NMT 3'RACEnested für die RACE-PCR abgeleitet (Tabelle 2.1), mit denen die noch unbekanntes 5'- und 3'-Enden der Sequenz an cDNS aus Blatt-RNS des Kultivars *München* amplifiziert werden sollten (Abb. 4.21).

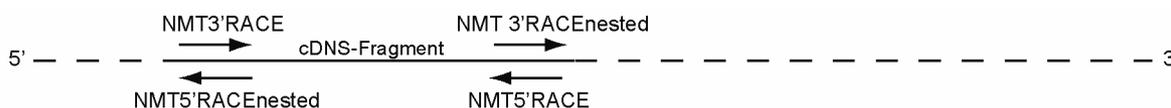


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der RACE-Primer und der *nested* Primer für die 5'- und 3'-RACE-PCR am cDNS-Fragment

Die RACE-PCRs wurde als *touch down*-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	95°C	3 min						
5 x	95°C	30 s	5 x	95°C	30 s	25 x	95°C	30 s
	65°C	30 s		62°C	30 s		58°C	30 s
	72°C	1:30		72°C	1:30		72°C	1:30
							72°C	7 min

In dieser Reaktion entstand in der 3'-RACE ein Produkt von 1250 bp (Abb. 4.22A).

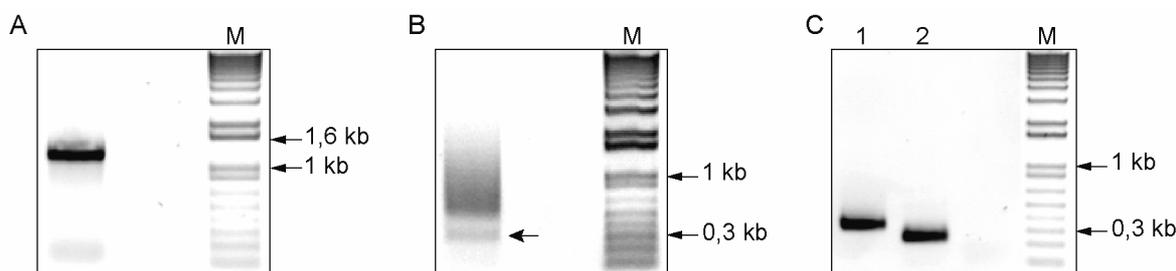


Abb. 4.22: Agarosegelelektrophoresen der Ergebnisse der RACE-PCR; **A**: 3'-RACE, Primer: NMT3'RACE und Oligo-dT; **B**: 5'-RACE, Primer: 5'RACE-Oligo und NMT5' RACE, die mit dem Pfeil markierten Produkte wurden gereinigt und als Template für die PCRs in Abb. C eingesetzt; **C**: 5'-RACE, **1**: Primer: NMT5'RACE und 5'RACE-Oligo, **2**: Primer: NMT5'RACEnested und 5'RACE-Oligo-nested; M=Marker

Die Sequenzierung verschiedener Klone der 3'-RACE ergab DNS-Fragmente mit einer Größe von 1,2 kb, die eine untranslatierte Region von etwa 200 bp enthielten. In der 5'-RACE-PCR entstanden viele Produkte, die keine klare Bande auf dem Agarosegel bildeten (Abb. 4.22B). Die

Produkte des per Pfeil markierten Bereiches mit einer Länge von etwa 300 bp wurden aus dem Gel eluiert und als Templates weiterer Polymerasekettenreaktionen mit den Primern NMT5'RACE und 5'RACE-Oligo, NMT5'RACE-nested und 5'RACE-Oligo-nested eingesetzt (Tabelle 2.1). In beiden Reaktionen entstanden Produkte, die nach Elektrophorese auf dem Agarosegel klare Banden mit Längen von 300 bp und 360 bp bildeten (Abb. 4.22C). Die Sequenzierung zeigte, dass sie eine 5'-untranslatierte Region von 135 bp enthielten.

Sequenzvergleiche im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bestätigten das 3'-RACE-Produkt und das 5'-RACE-Produkt als Homologe zur CNMT aus *Coptis* (Choi et al., 2002).

Mit PCR-Primern gegen die 5'-untranslatierte Region und dem nested-Primer gegen das 3'-Oligo wurde aus der für die 3'-RACE genutzten cDNS mit *Pfu*-Polymerase ein fast 1,6 kb langes DNS-Fragment amplifiziert. Mehrere Klone davon wurden sequenziert und ergaben zwei fast identische Vollängesequenzen (Klone 4 und 5; Abb. 8.4).

Die Klone 4 und 5 glichen sich in ihrer Aminosäuresequenzen zu 98,6 % und waren vollständig identisch mit der Sequenz des Ausgangsfragmentes. Die Übereinstimmungen zur CNMT aus *C. japonica* betragen 46,5 % und 47,4 % (Abb. 4.23).

MAVEAKQT	KKAAI	VEL	LKQLEL	GLVPYDDI	KQLI	RRELARRL	QWGYKPTYEEQI	AEI	QNLTHSL	RQMKI	ATEVET	Coptis-CNMT																																																							
MG-	SI	DDVKKESAGET	LRRL	LKGEI	KDEEL	KKLI	KFQFEKRL	QWGYKSSHQEQ	LSFNLD	DFI	KSLKKMEMSGEI	ET	Klon 4																																																						
MG-	SI	DEVKKESAGET	LRRL	LKGEI	KDEEL	KKLI	KFQFEKRL	QWGYKSSHQEQ	LSFNLD	DFI	KSLKKMEMSGEI	ET	Klon 5																																																						
-----												KRLQWGYKSSHQEQ	LSFNLD	DFI	KSLKKMEMSGEI	ET	cDNS-Fragment																																																		
LDSQL	YEI	PI	EFLKI	MNGSNL	KGSCCYFKED	STTL	DEAEI	AML	DL	YCERAQI	QD	GGS	VL	DL	GCGQG	AL	TL	HVAQK	Coptis-CNMT																																																
MNKETYEL	PSEFL	EAVFGK	TVKQSMCYF	THESATI	DEAEAAHEL	YCERAQI	KDGQT	VL	DI	GCGQG	GL	VL	YI	AQK					Klon 4																																																
MNKETYEL	PSEFL	EAVFGK	TVKQSMCYF	KHESATI	DEAEAAHEL	YCERAQI	KDGQT	VL	DI	GCGQG	GL	VL	YI	AQK					Klon 5																																																
MNKETYELP																			cDNS-Fragment																																																
YKNCRVT	AV	TNSV	SQKEYI	EEESRRRNL	LN	VEVKLADI	T	THE	MAETYDRI	LVI	EL	F	E	H	M	K	N	Y	E	L	L	R	K	I	SEW	SK	Coptis-CNMT																																								
YKNCHVT	GL	TNSKAQV	VN	LLKQAEK	LGL	TNVD	AI	LADVT	QYESDKTYDRL	LMI	EAI	E	H	M	K	N	L	Q	L	F	M	K	L	S	T	W	M	T	K	Klon 4																																					
YKNCHVT	GL	TNSKAQV	VN	LLKQAEK	LGL	TNVD	AI	LADVT	QYESDKTYDRL	LMI	EAI	E	H	M	K	N	L	Q	L	F	M	K	L	S	T	W	M	T	K	Klon 5																																					
DGL	L	F	L	F	L	E	H	I	CHKT	F	A	H	Y	E	P	L	D	D	D	W	F	T	E	Y	V	F	P	A	G	T	M	I	P	S	A	S	F	F	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	N	H	W	L	S	G	K	H	F	S	R	T	N	E	E	V	L	K	R	Coptis-CNMT
ESLL	F	V	D	H	V	CHKT	F	A	H	F	F	E	A	V	D	E	D	D	W	S	G	F	I	F	P	P	G	C	A	T	I	L	A	A	N	S	L	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	D	H	W	V	N	G	M	H	M	A	R	S	V	D	I	W	R	K	A	Klon 4	
ESLL	F	V	D	H	I	CHKT	F	A	H	F	F	E	A	V	D	E	D	D	W	S	G	F	I	F	P	P	G	C	A	T	I	L	A	A	N	S	L	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	D	H	W	V	N	G	M	H	M	A	R	S	V	D	I	W	R	K	A	Klon 5	
L	D	A	N	L	D	V	I	K	P	M	F	E	T	L	M	G	N	E	E	A	V	K	-	L	I	N	Y	W	R	G	F	C	L	S	G	M	E	M	F	G	Y	N	N	G	E	W	A	S	H	V	L	F	K	K	K	Coptis-CNMT											
L	D	K	N	M	E	A	A	K	E	I	L	L	P	G	L	G	S	H	E	T	V	N	G	V	V	T	H	I	R	T	F	C	M	G	G	Y	E	Q	F	S	M	N	N	G	D	E	W	W	A	Q	L	L	F	K	K	K	Klon 4										
L	D	K	N	M	E	A	A	K	E	I	L	L	P	G	L	G	S	H	E	A	V	N	G	V	V	T	H	I	R	T	F	C	M	G	G	Y	E	Q	F	S	M	N	N	G	D	E	W	W	A	Q	L	L	F	K	K	K	Klon 5										

Abb. 4.23: Vergleich der Aminosäuresequenzen der CNMT aus *C. japonica* (Choi et al., 2002) mit den Klonen 4 und 5 der putativen *N*-Methyltransferasen und der Ausgangssequenz für die RACE-PCR nach der *clustal method*; Die Konsensussequenz ist grau unterlegt. Das SAM-Bindemotiv A (Joshi und Chiang, 1998) ist eingerahmt.

Die Proteine hatten eine Länge von 358 Aminosäuren und ein berechnetes Gewicht von 40,9 kDa. In den Aminosäuresequenzen ist das von Joshi und Chiang (1998) postulierte Motiv A (V/I/L)(V/L)(D/K)(V/I)GGXX(G/A) zur Bindung von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) in den Aminosäuren 132-140 mit einer Abweichung vorhanden (VLDIGCGQG).

4.2.2 Klonierung und heterologe Expression und Reinigung des Enzyms

Vom Leserahmen der Nukleotidsequenzen wurden die Start- und Stop-Primer NMTstartBamHI und NMTstopNotI mit den zusätzlichen Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und NotI abgeleitet, die die kodierende Sequenz begrenzen (Tabelle 2.1). In einer PCR mit *Pfu*-Polymerase wurden an den vorher sequenzierten Klonen 4 und 5 bei einer *annealing*-Temperatur von 45°C und einer Elongationszeit von 2 min Volllängeklone mit zusätzlichen Schnittstellen amplifiziert. Die Produkte dieser PCR konnten über BamHI- und NotI-Schnittstellen in den Expressionsvektor pHis8 ligiert. Erhalten wurden die Plasmide pHis8-*snmt4* und pHis8-*snmt5*, welche zur Expression in den *E.coli*-Stamm BL21(DE3)RIL transformiert wurden.

Im Vergleich der *E. coli*-Expressionsmuster des leeren Vektor pHis8 mit pHis8-*nmt* waren die zusätzlichen Banden der Klone 4 und 5 auf dem Coomassie-Blue-gefärbten SDS-Gel mit einer Größe von 41 kDa deutlich zu erkennen (Abb. 4.24A, Pfeil).

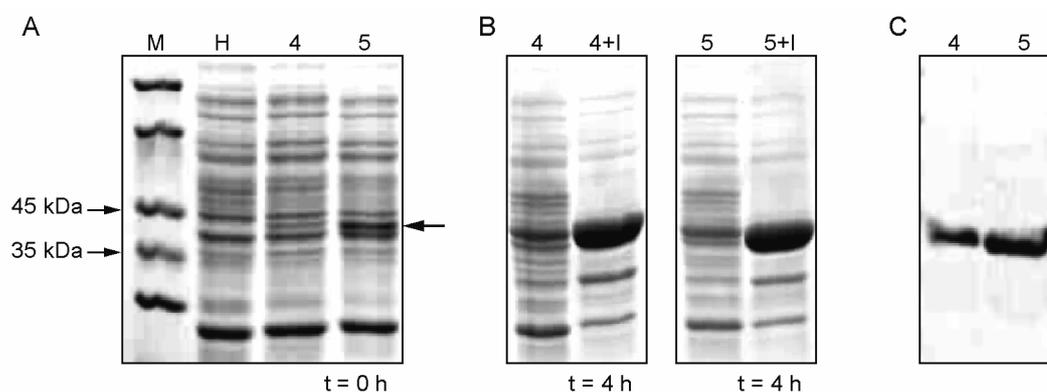


Abb. 4.24: SDS-PAGE zur Expression der putativen *N*-Methyltransferase-Klone 4 und 5; **A**: $t = 0\text{h}$, 24°C, Bandenmuster der lösl. Fraktion beider Klone im Vergleich zur Vektorkontrolle, der Pfeil markiert die NMT-Banden; **B**: $t = 4\text{h}$, 24°C; Induzierbarkeit der Expression beider Klone mit IPTG; **C**: mit Talon-Resin aufgereinigte Proteine; M = Marker, H = pHis8-Vektorkontrolle, 4 = Klon 4; 5 = Klon 5; +I = 1mM IPTG zugesetzt

Die Expression der Proteine konnte durch IPTG stark induziert werden. Vier Stunden nach der Induktion war in den induzierten Kulturen deutlich mehr Protein gebildet worden als in den Kontrollen (Abb. 4.24B). Da sich der Hauptanteil des Proteins in der unlöslichen Fraktion des Aufschlusses als *inclusion bodies* befand, wurde die Expressionstemperatur auf 16°C verringert und die Expressionsdauer auf 1 d verlängert. So konnte mehr Protein aus der löslichen Fraktion gewonnen und mittels Metall-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Abb. 4.24C).

4.2.3 Aktivitätstest

Als Vortest für mögliche Enzymassays wurden verschiedene Rohextraktmessungen mit den beiden putativen *N*-Methyltransferaseklonen 4 und 5 durchgeführt. In einem radioaktiven Assay (1 h, 30°C) mit ^{14}C -markiertem *S*-Adenosyl-L-Methionin wurden für die Substrate (*S*)-Coclaurin und (*S*)-Stylopin mittels Szintillationsmessung keine Umsätze nachgewiesen.

Inzwischen war durch Facchini und Park (2003) eine andere Sequenz mit größerer Homologie zur CNMT aus *Coptis* (Choi et al., 2002) veröffentlicht worden, so dass verstärkt nach der

eventuellen Funktion des Enzyms als Stylopin umsetzende *N*-Methyltransferase gesucht wurde. Weitere, nicht radioaktive Enzymtests mit (*S*)-Stylopin wurden mittels LC-MS (TOF) analysiert. Anhand der Spektren konnte ein Umsatz des (*S*)-Stylopins zu (*S*)-*N*-Methylstylopin bestätigt werden. Die Ergebnisse des Assays mit dem Rohextrakt der Expression von pHis8-*snmt4* sind in Abb. 4.25 dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung sind die Strukturformeln des Substrates (*S*)-Stylopin und des Produktes (*S*)-*N*-Methylstylopin und die Fragmentierung während der massenspektrometrischen Analyse gezeigt.

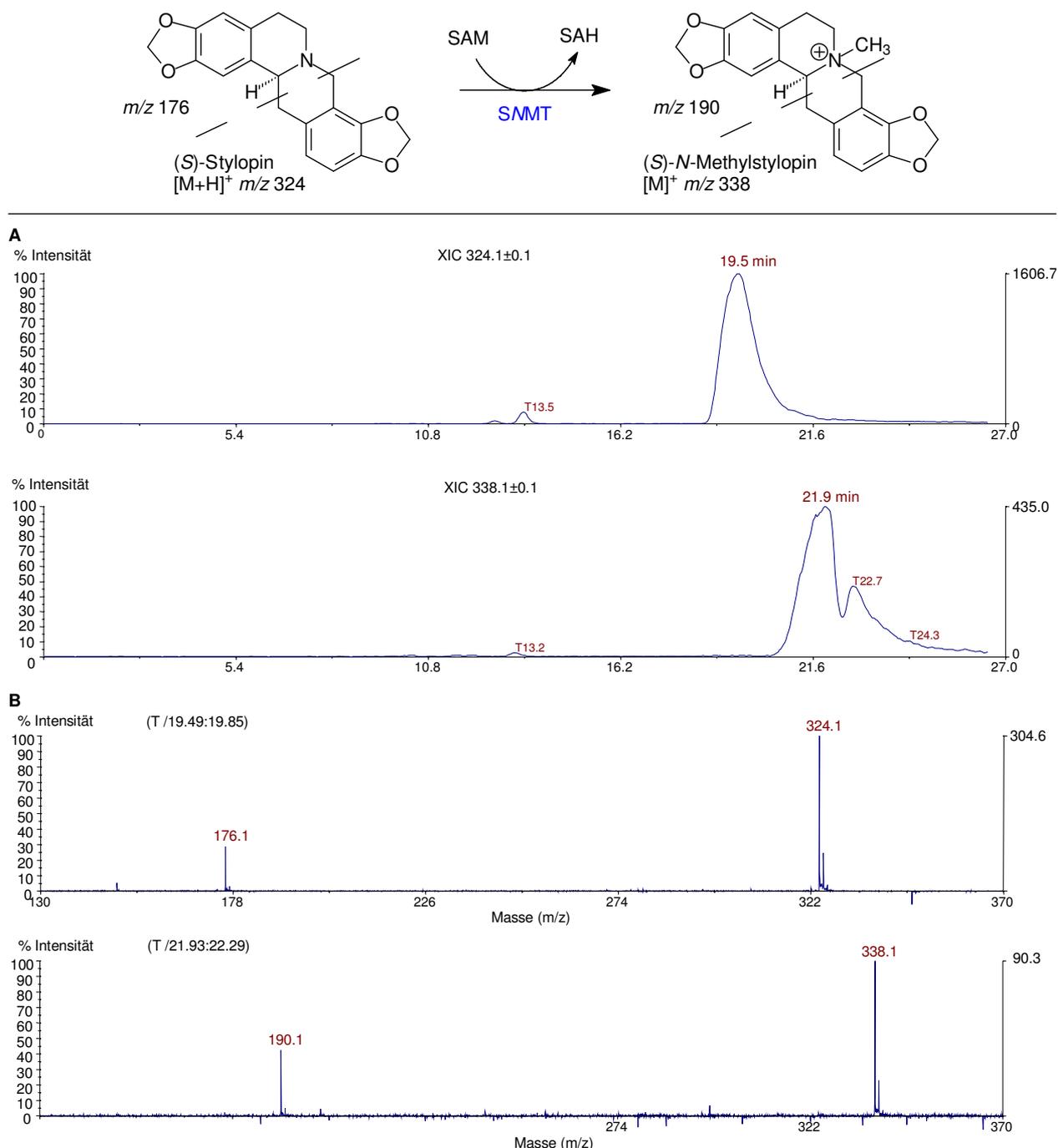


Abb. 4.25: LC-MS (TOF)-Analyse der Reaktion der SNMT4 mit (*S*)-Stylopin: Im oberen Teil der Abbildung sind die Reaktion und die Fragmentierungen während der Analyse gezeigt. Die Massenzahlen der Molekülionen und der Fragmentierungen der Isochinolinuntereinheiten sind angegeben. A: Ionenchromatogramme; Die Peaks entsprechen (*S*)-Stylopin (RT=19,5 min) und (*S*)-*N*-Methylstylopin (RT=21,9 min). B: Ionenspektren: (*S*)-Stylopin bei m/z 324 und (*S*)-*N*-Methylstylopin bei m/z 338.

Im Ionenchromatogramm wurden das Substrat Stylopin mit der Retentionszeit 19,5 min und ein Methylierungsprodukt mit der Retentionszeit 21,9 min detektiert (Abb. 4.25A). Stylopin hat ein Molekulargewicht von 323 g/mol. Durch die Methylierung tritt eine Verschiebung um 14 Masseneinheiten ein. Die massenspektrometrische Untersuchung des Substratpeaks (19,5 min) zeigte einen protonierten Molekülionenpeak $[M+H]^+$ bei m/z 324 und ein Fragmention bei m/z 176 an (Abb. 4.25B). Dabei entsprach das Fragment bei m/z 176 der abgespaltenen Isochinolinuntereinheit. Das Spektrum des Methylierungsproduktes (21,9 min) ergab neben dem Molekülionenpeak bei m/z 338 ein Fragmention bei m/z 190. Die Masse 338 entspricht einer Erhöhung um 14 Masseneinheiten. Um ebenfalls 14 Einheiten wurde die Masse des gebildeten Isochinolinfragmentes erhöht, was bewies, dass Stylopin am Stickstoff methyliert wurde.

In Abb. 4.26 und Abb. 4.27 sind die Spektren der Enzymreaktionen mit den Rohextrakten der Expression von pHis8-*smt5* und der Vektorkontrolle pHis8 gezeigt.

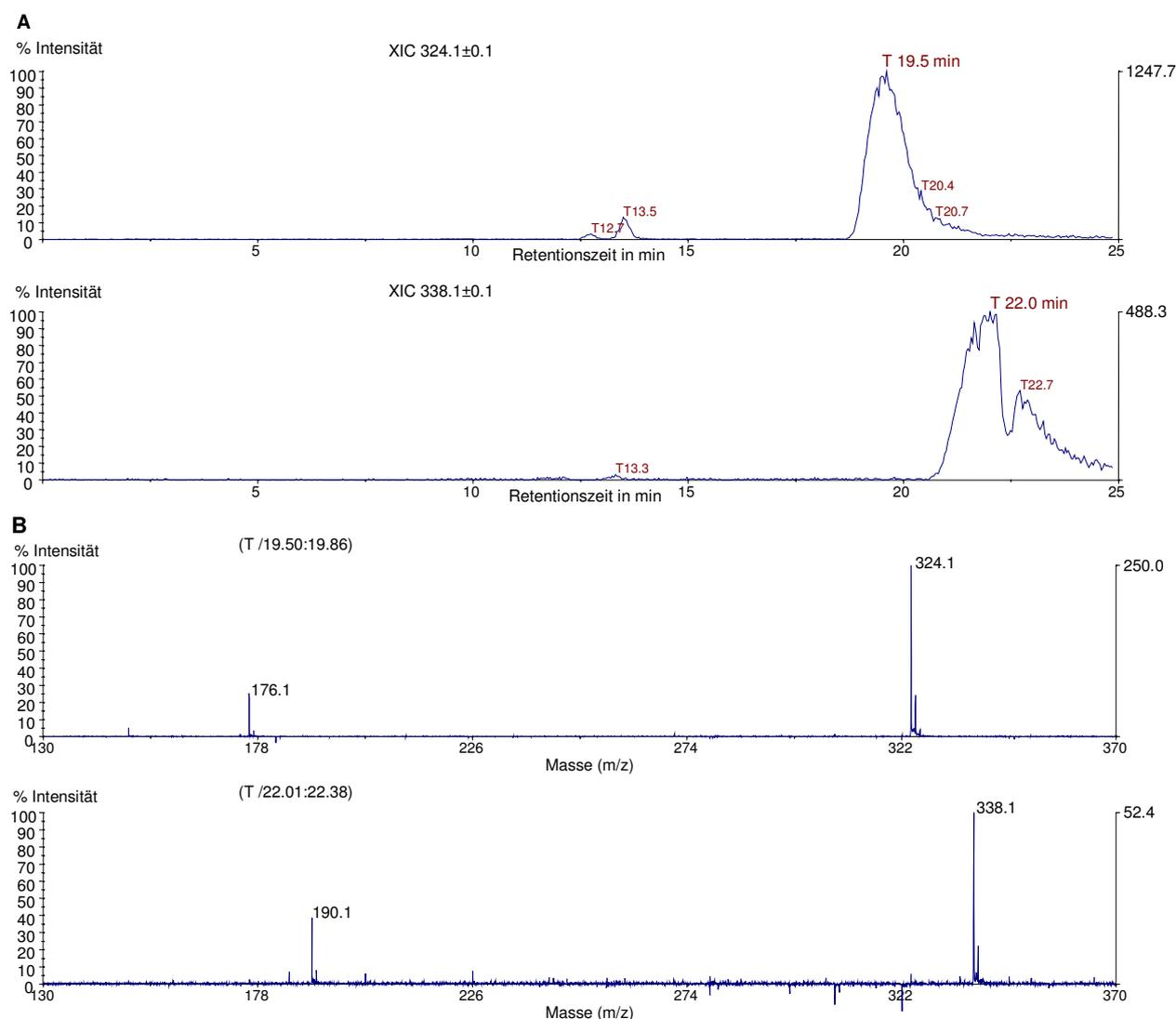


Abb. 4.26: LC-MS (TOF)-Analyse der Reaktion des Rohextraktes der SMT5 mit dem Substrat (*S*)-Stylopin; **A**: Ionenchromatogramme: Die Peaks entsprechen (*S*)-Stylopin mit der Retentionszeit 19,5 min und (*S*)-*N*-Methylstylopin mit der Retentionszeit 22,0 min. **B**: Ionenspektren des (*S*)-Stylopins m/z 324 (T 19,5 min) mit dem Fragmention der Isochinolinuntereinheit m/z 176 und des (*S*)-*N*-Methylstylopins m/z 338 (T 22,9 min) mit dem Fragmention der Isochinolinuntereinheit m/z 190

Auch für den Versuch mit *SNMT5* wurde im Ionenchromatogramm eine Verschiebung der Retentionszeit des methylierten Produktes (22,0 min) gegenüber dem Substrat Stylopin mit der Retentionszeit 19,5 min festgestellt (Abb. 4.26A). Die Ionenspektren zeigten wie in den Untersuchungen mit *SNMT4* für Stylopin den protonierten Molekülionenpeak bei m/z 324 und ein Fragmentation bei m/z 176 und für *N*-Methylstylopin einen Molekülionenpeak bei m/z 338 und ein Fragmentation bei m/z 190 an (Abb. 4.26B). Die Verschiebungen der Retentionszeit und der Masse des Molekülions und des Fragmentations um 14 Einheiten belegen auch für *SNMT5* die *N*-Methylierungsaktivität gegenüber Stylopin.

Anhand der Ionenspektren des Enzymtests mit dem Rohextrakt der Expression der Vektorkontrolle pHis8 ist erkennbar, dass auch in dieser Analyse *N*-Methylstylopin (RT 22,0 min) detektiert wurde (Abb. 4.27). Die Intensität dieses Peaks betrug aber nur 2,5 % der detektierten Stylopinmenge (RT 19,4 min).

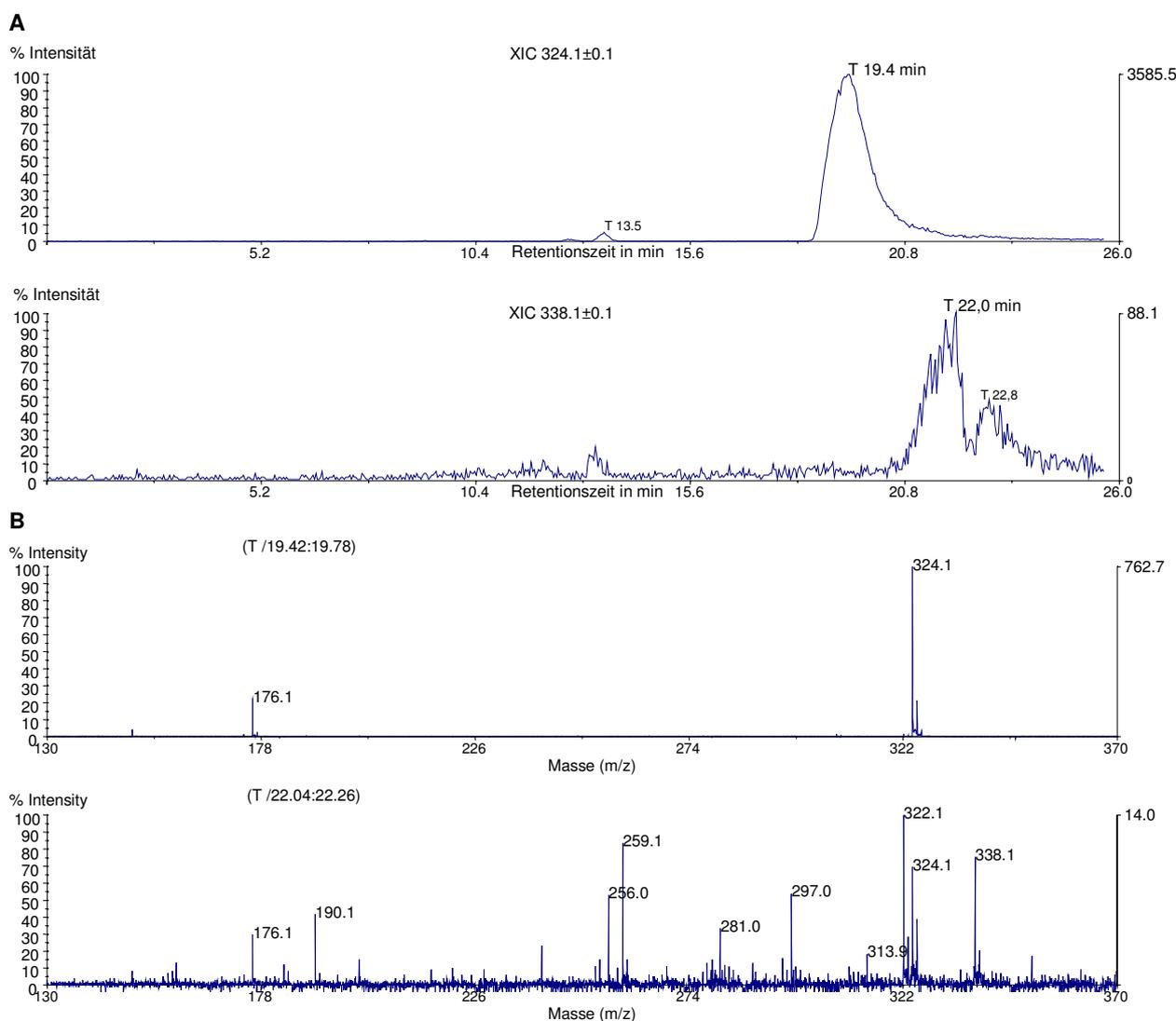


Abb. 4.27: LC-MS (TOF)-Analyse der Reaktion des Rohextraktes der Vektorkontrolle pHis8 zur *SNMT* mit dem Substrat (*S*)-Stylopin; **A**: Ionenchromatogramme: Die Peaks entsprechen Stylopin mit der Retentionszeit 19,4 min und (*S*)-*N*-Methylstylopin mit der Retentionszeit 22,0 min. **B**: Ionenspektren des (*S*)-Stylopin m/z 324 (T 19,5 min) mit dem Fragmentation der Isochinolinuntereinheit m/z 176 und des (*S*)-*N*-Methylstylopins m/z 338 (T 22,9 min) mit dem Fragmentation der Isochinolinuntereinheit m/z 190

Im Gegensatz zur Vektorkontrolle betrug in den Ansätzen der Enzymrohextrakte der Anteil an (*S*)-*N*-Methylstylopin für den Assay mit SNMT4 27 % und für den Assay mit SNMT5 39 % der Intensität des Stylopinpeaks. Die Methylierung von Stylopin wurde in zwei Messungen mit unabhängigen Rohextraktpräparationen bestätigt.

Mit den über Metall-Affinitäts-Chromatographien aufgereinigten Enzymen konnten die Tests nicht reproduziert werden. Die Versuche der Modifizierung der Lagerung der Enzyme unter verschiedenen Bedingungen (Puffer, β -Mercaptoethanol, DTT, Lagerungstemperatur 4°C, -20°C, -80°C, Zusatz verschiedener Glyzerinkonzentrationen) und der Reaktionsbedingungen über Puffer und pH-Werte, sowie die Expression in anderen Vektorsystemen, *E. coli*-Stämmen und Insektenzellkulturen (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) waren nicht erfolgreich.

4.3 (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase

4.3.1 Isolation der cDNS und Sequenzvergleiche

Im Jahr 2003 war es der Gruppe um Peter Facchini gelungen, eine bisher nicht bekannte cDNS mit großer Homologie zu der von Choi et al. (2001 und 2002) veröffentlichten (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase (CNMT) aus *C. japonica* zu isolieren (Facchini und Park, 2003). Die publizierte Sequenz unterschied sich von der durch RACE-PCR isolierten, putativen Stylopin-N-Methyltransferase dieser Arbeit. Sie sollte ebenfalls eine (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase kodieren, war aber nicht exprimiert und das Enzym nicht charakterisiert worden.

Mit Hilfe der angegebenen Sequenz (Facchini und Park, 2003) konnten die genspezifischen Primer NMT-Facchini-start, NMT-Facchini-stop, NMT-Facch-start_BamHI, NMT-Facch-stop_HindIII abgeleitet werden (Tabelle 2.1). Die Primer NMT-Facchini-start und NMT-Facchini-stop wurden in einer RT-PCR mit mRNA aus Blättern der Schlafmohnvarietät *München* eingesetzt. Mit *Pfu*-Polymerase wurde bei einer *annealing*-Temperatur von 53°C und einer Elongationszeit von 2 min die CNMT aus Schlafmohn (*Papaver* CNMT) amplifiziert. Die Sequenzierung mehrerer Klone ergab eine einzige Sequenz. Diese wich in 44 Nukleotiden bzw. 12 Aminosäuren von der durch Facchini und Park (2003) vorgegebenen Sequenz ab (Abb. 4.28), so dass die beiden Sequenzen im Aminosäurevergleich zu 96 % identisch waren.

MQLKAKEEELLRNMEELGLIPDQEIRQLIRVELEKRLQWGYKETHEEQLSQL	Facch CNMT
MQLKAKEEELLQNMELGLIPDQEIRERIRIELEKRLRWGYKETHEEQLSQL	Paso CNMT
LDLVHSLKGMKMATEMENLDLKL YEAPMEFLKIQHGSNMKQSAGYYTDES	Facch CNMT
LDLVHSLKGMKMATEMENLDLKL YEAPMEFLKIQHGSNMKQSAGYYTDES	Paso CNMT
TTLDEAEIAMLDDL YMERAIKDGQS	Facch CNMT
TTLDEAEIAMLDDL YMERAIKDGQSVLDLGCGLGAVALFGANKFKKCQFT	Paso CNMT
GVTSSVEQKDYIEGKCKELKLTNVKVL LADITTYETEERFDRIFAVELIE	Facch CNMT
GVTSSVEQKDYIQGKCKELKLTNVKVL LADITTYETEERFDRIFAVELIE	Paso CNMT
HMKNYQLLLKKI SEWMKDDGLLFVEHVCHKT LAYHYEPVDAEDWYTN YIF	Facch CNMT
HMKNYQLLLKKI SEWMKDDGLLFVEHVCHKT LAYHYEPVDAEDWYTN YV F	Paso CNMT
PAGTLT LSSASMLLYFQDDVSVVNQWTL S GKHYSRSHEEWLKNMDKNIVE	Facch CNMT
PAGTLT LSSASMLLYFQDDVA VVNQWTL S GKHYSRSHEEWLKNMDKNIVE	Paso CNMT
FKEIMRSITKTEKEA I KLLNFWRIFCMCGAELFGYKNGEEWMLTHLLFKKK	Facch CNMT
FKEIMRSITKTEEEA NRLLNFWRIFCMCGAELFGYKNGEEWMLTHLLFKKK	Paso CNMT

Abb. 4.28: Aminosäurevergleich der von Facchini und Park (2003) veröffentlichten Sequenz der CNMT (Kultivar *Marianne*) und der in dieser Arbeit amplifizierte Sequenz (Kultivar *München*). Das SAM-Bindemotiv A (Joshi und Chiang, 1998) ist eingerahmt.

Die Aminosäuresequenz der isolierten *Papaver* CNMT war zu 62 % identisch mit der der *Coptis* CNMT und stimmte zu 47 % mit den Sequenzen der Stylopin-NMTs überein. Die *Papaver* CNMT war gegenüber der *Coptis*-Sequenz um 21 Nukleotide verkürzt. Die sieben Aminosäuren fehlten N-terminal zwischen den Positionen 8 und 14 (Abb. 8.5).

In der Aminosäuresequenz der CNMT konnte das SAM-Bindemotiv A (V/I/L)(V/L)(D/K)(V/I)

GGXX(G/A) (Joshi und Chiang, 1998) zur Bindung von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) mit zwei Abweichungen identifiziert werden (VLDLGCGLG) (Abb. 4.28).

4.3.2 Klonierung, heterologe Expression und Reinigung des Enzyms

Die Sequenz der CNMT aus *P. somniferum* wurde über BamHI- und HindIII-Schnittstellen in pQE30 ligiert und nach Induktion mit 1 mM IPTG in *E. coli* M15-Zellen exprimiert. Sie hatte eine Länge von 351 Aminosäuren mit einem berechneten Gewicht von 41,1 kDa, das durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigt wurde (Abb. 4.29A).

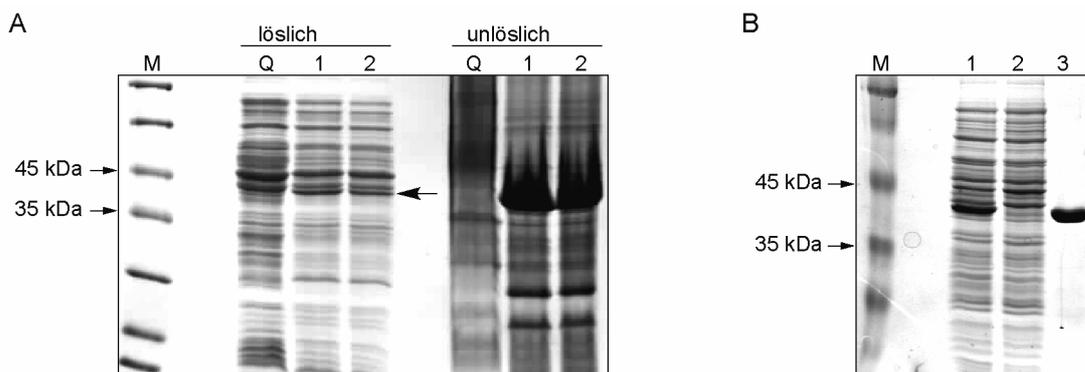


Abb. 4.29: heterologe Expression und Reinigung der CNMT aus *P. somniferum*; 10 %-SDS-Gele, Färbung: Coomassie; **A**: lösliche und unlösliche Fraktionen der Expression bei 30°C nach 4h, Vektorkontrolle Q (pQE30) und zwei unabhängige Expressionen der CNMT (1+2); In der löslichen Fraktion ist die CNMT-Bande mit einem Pfeil markiert. **B**: Reinigung der CNMT; Expression bei 24°C nach 16 h: 1 = Rohextrakt nach Lyse, 2 = Waschfraktion der Talonsäule, 3 = gereinigtes Protein

Analysen der Expression unter verschiedenen Bedingungen mit SDS-PAGE zeigten, dass sich ein Großteil des Proteins nach Aufschluss der Zellen mit Lysozym und Ultraschall in der unlöslichen Fraktion als *inclusion bodies* befand. Der Anteil an löslichem Protein wurde durch die Veränderung der Expressionsbedingungen auf 24°C und 16 h erreicht.

Durch die gerichtete Klonierung über BamHI- und HindIII-Schnittstellen in den pQE30-Expressionsvektor wurde dem Protein ein N-terminaler 6 x His-tag angehängt. Dieser ermöglichte die Aufreinigung über Affinitätsäulen mit divalenten Kationen (Abb. 4.29B, Talon Resin mit Co^{2+}). Das gereinigte Enzym (0,5 mg/ml) wurde in 100 mM Tris/HCl pH 7,5 bei -80°C gelagert. Die Zugabe von 25-50 % Glycerin zum Lagerpuffer beeinflusste weder die Aktivität, noch die Stabilität.

4.3.3 Aktivitätstest

Die Enzymtests wurden angelehnt an das durch Choi et al. in ihren Veröffentlichungen zur CNMT aus *C. japonica* vorgegebene Protokoll mit 5 µl gereinigten Enzyms der Konzentration 0,125 µg/µl in einem 50 µl Reaktionsansatz radioaktiv durchgeführt (3.18; Choi et al., 2001 und 2002). Während der Reaktion schüttelte der Ansatz mit 600 rpm, um eine gleichmäßige Temperatur und Durchmischung zu garantieren. Die Enzymaktivität wurde anhand der Einbaurate von ^{14}C -markierten Methylgruppen des Methyl donors SAM quantifiziert.

Vortests mit 0,025 µg gereinigtem Enzym/µl Reaktionsansatz zeigten im radioaktiven Assay Aktivität bei der Umsetzung von (*S*)-Coclaurin und (*S*)-Norretikulin (Choi et al., 2001). Mit (*S*)-Norretikulin wurden die Zeitabhängigkeit der Reaktion und das Temperatur- und pH-Optimum bestimmt (Abb. 4.30).

Das Temperaturoptimum lag bei 45°C. Da die Reaktion bei dieser Temperatur für eine Messung zu schnell ablief wurden die Reaktionstemperatur 30°C und eine Dauer von 12,5 min gewählt.

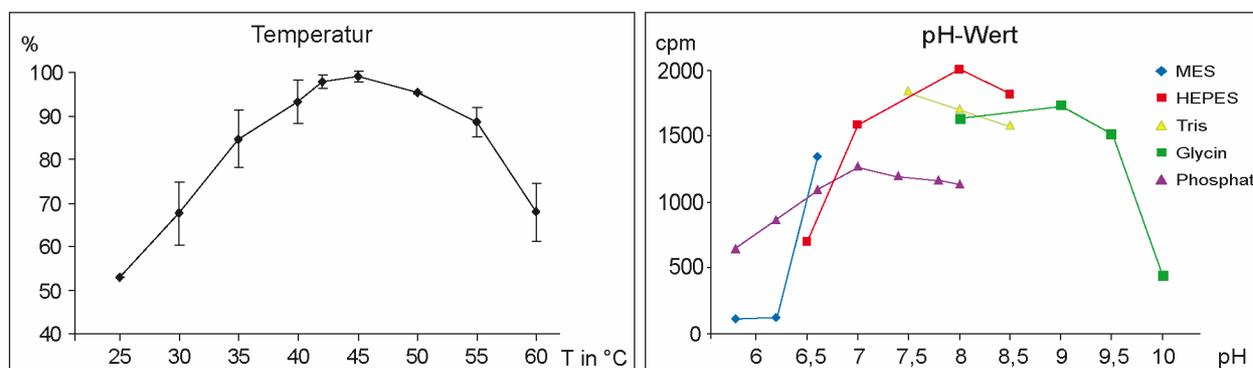


Abb. 4.30: Abhängigkeit der CNMT-Reaktion von Temperatur und pH-Wert mit (*S*)-Norretikulin als Substrat, (n=2); In der Temperaturkurve wurde der höchste Umsatz = 100 % gesetzt und die anderen Umsätze relativ dazu aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Zur Ermittlung des pH-Optimums wurden verschiedene Puffer mit einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Im Diagramm wurden die gemessenen cpm aufgetragen.

Das pH-Optimum lag bei Pufferkonzentrationen von 100 mM zwischen den pH-Werten 7 und 9. Die höchsten Umsätze wurden mit HEPES-Puffer bei pH 8, Glycinpuffer bei pH 9 und Phosphatpuffer bei pH 7 erzielt. Die pH-Bereiche der Messungen mit Tris- und MES-Puffern waren nicht ausreichend, um eine Kurve zu erhalten. Zur Durchführung der Enzymtests wurde Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 mit einer Endkonzentration von 100 mM eingesetzt.

Mit (*S*)-Norretikulin (100 µmol) wurde der Einfluss der Ionen Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ und Mg²⁺ in einer Endkonzentration von 5 mM auf die Enzymaktivität getestet (Abb. 4.31).

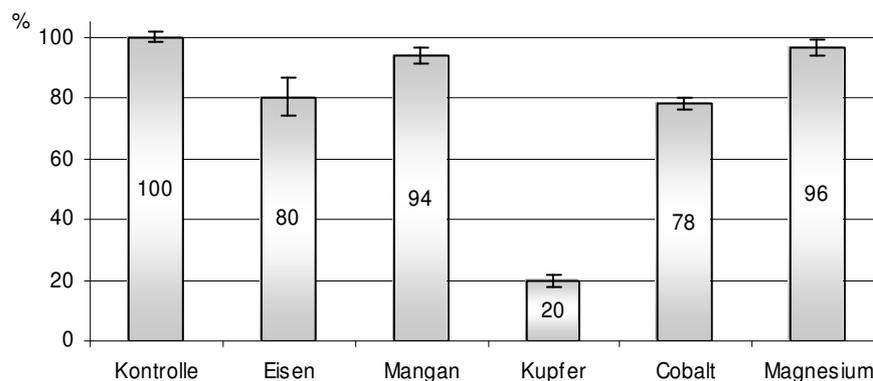


Abb. 4.31: Einfluss divalenter Kationen auf die Enzymaktivität der CNMT. Die Endkonzentration der Ionen betrug 5 mM. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3). Mangan, Cobalt und Magnesium lagen als Chloride, Eisen und Kupfer als Sulfate vor.

Den größten Einfluss auf die Enzymaktivität hatte Kupfer. Der Zusatz von Kupferionen verringerte die Enzymaktivität um 80 %. Einen geringeren hemmenden Effekt hatten Eisen und Cobalt, die den Substratumsatz auf etwa 80 % der Kontrollreaktion senkten. In Gegenwart von

Mangan und Magnesium war die Aktivität der CNMT mit 95 % kaum vermindert.

Mit je 100 μM Substrat wurde die Affinität der Coclaurin-*N*-Methyltransferase für verschiedene Substrate getestet ($n=3$). Zu diesen Substraten gehörten einfache Amine, Aminosäuren und Aminosäurederivate, Purine, und Alkaloide (Abb. 4.32).

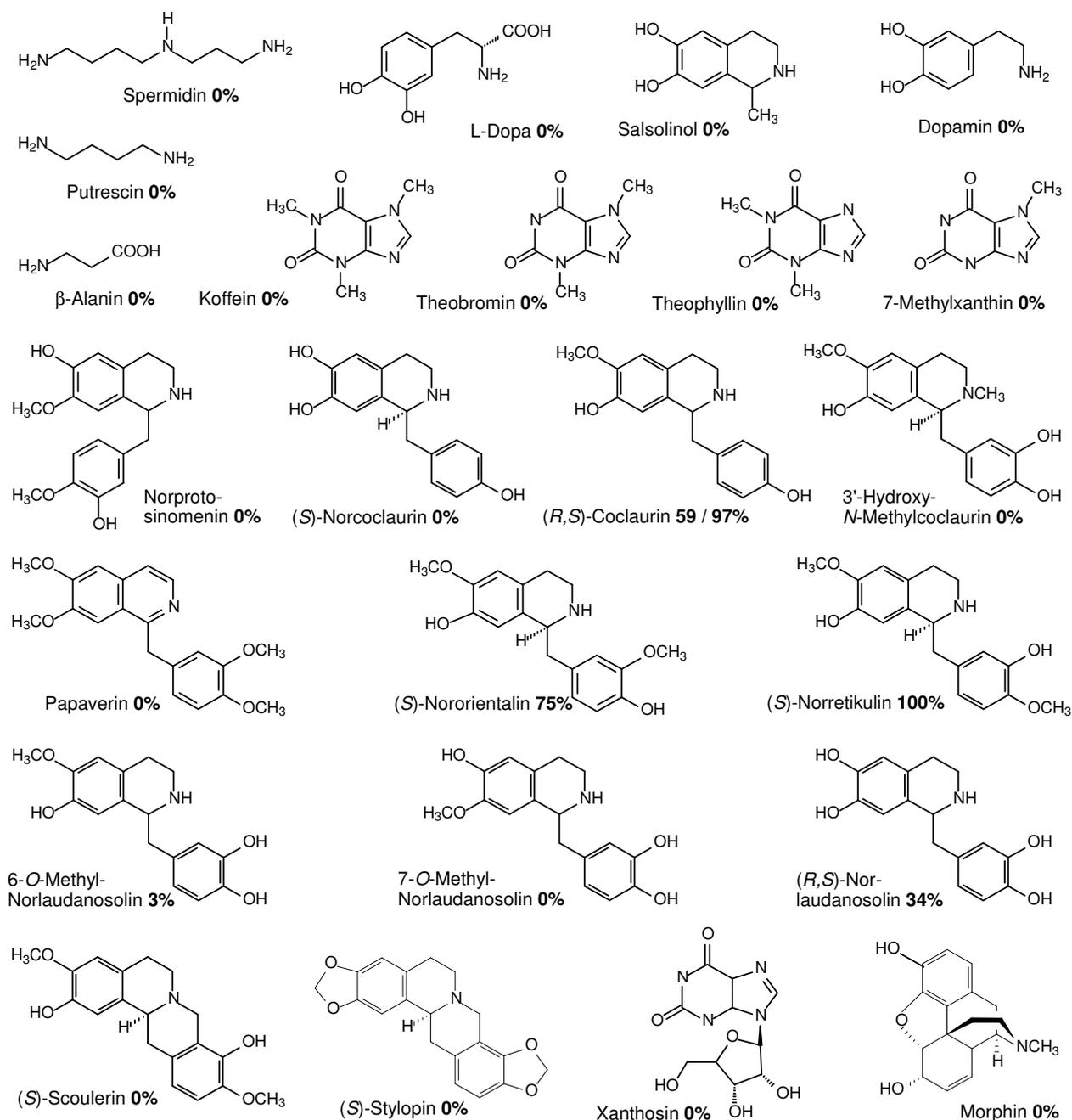


Abb. 4.32: Strukturformeln und relative Umsetzung der als Substrate der *Papaver* CNMT getesteten Substanzen.

Von den 25 getesteten Substraten wurden nur (*S*)-Coclaurin, (*R*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin, (*S*)-Nororientalin, (*R,S*)-Norlaudanosolin und in geringen Mengen 6-*O*-Methylnorlaudanosolin (3 % von Norretikulin) methyliert. Nicht methyliert wurden die Alkaloide (*S*)-Scoulerin, (*S*)-Stylopin, Xanthosin und Morphin, deren Stickstoff in den Molekülen tertiär gebunden vorliegt. Außerdem wurden Putrescin, Spermidin, β -Alanin, Dopamin, L-Dopa, die freie Aminogruppen haben, und Purine nicht umgesetzt. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten zu den als Substrate akzeptierten

Alkaloiden, konnte eine *N*-Methylierung von Norprotosinomenin, (*S*)-Norcoclaurin, 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin, 7-*O*-Methylnorlaudanosolin und Papaverin, nicht nachgewiesen werden.

Die *N*-Methylierung der fünf gut umgesetzten Substrate wurde in LC-MS (TOF)-Analysen bestätigt. Die Spektren des Enzymassays mit (*S*)-Coclaurin sind in Abb. 4.33 exemplarisch dargestellt.

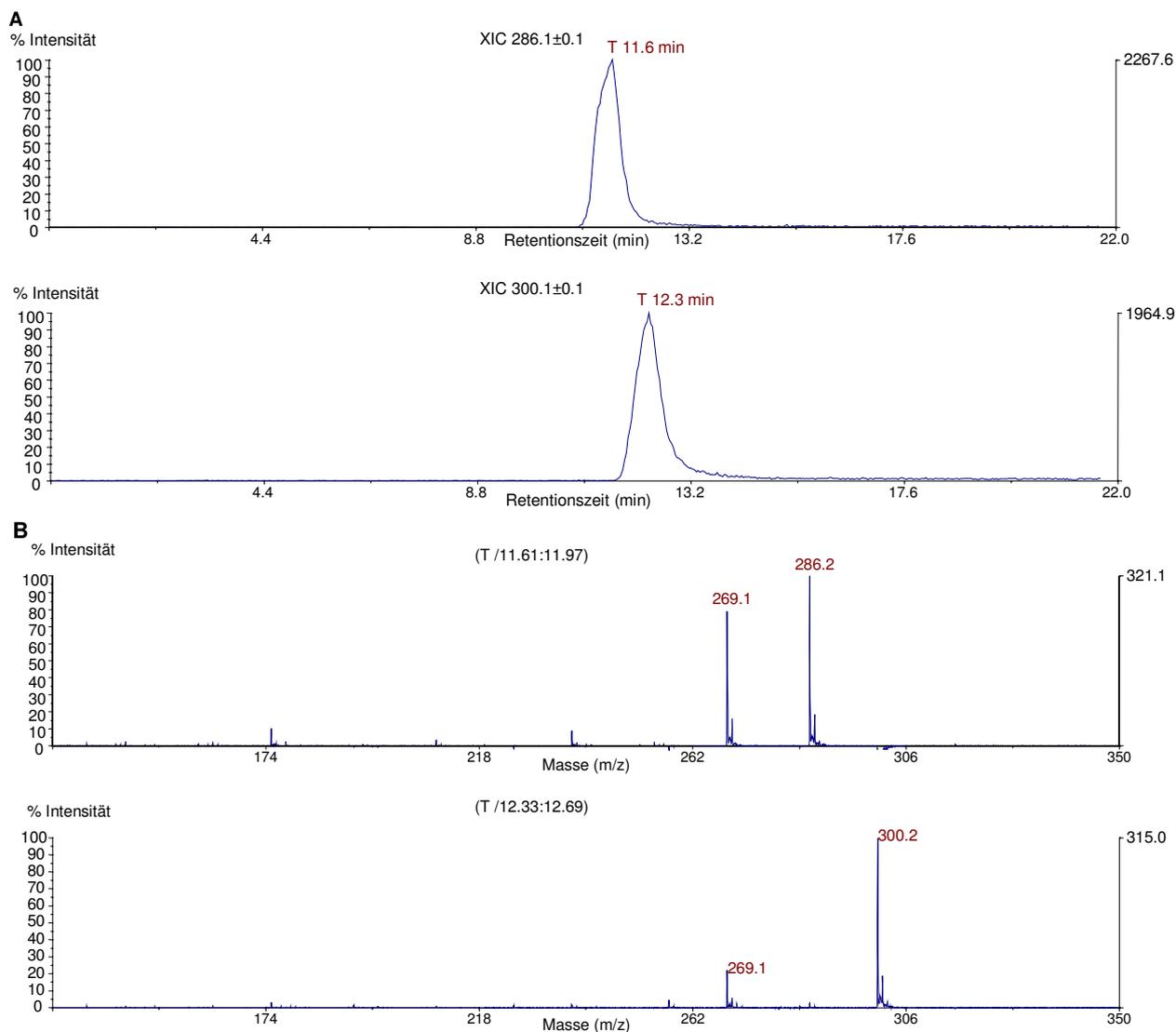


Abb. 4.33: massenspektrometrische Analyse (LC-MS (TOF) der Umsetzung von (*S*)-Coclaurin durch die CNMT; **A**: Ionenchromatogramme des Substrates (*S*)-Coclaurin (11,6 min) und des Produktes (*S*)-*N*-Methylcoclaurin (12,3 min), **B**: Ionenspektren: (*S*)-Coclaurin (m/z 286) mit dem Fragmentation m/z 269 (nach Abspaltung von NH_3), und (*S*)-*N*-Methylcoclaurin (m/z 300) mit dem Fragmentation m/z 269 (nach Abspaltung von CH_3NH_2)

Das Ionenchromatogramm zeigte den Substratpeak mit einer Retentionszeit von 11,6 min und den Produktpeak mit einer Retentionszeit von 12,3 min an (Abb. 4.33A).

Im Massenspektrum wies das Substrat einen protonierten Molekülionenpeak bei m/z 286 auf. Das Molekülion des Produktes $[\text{M}+\text{H}]^+$ trat bei m/z 300 auf und entsprach der Masse des methylierten (*S*)-Coclaurins. Beide Ionenspektren zeigten Fragmentationen bei m/z 269 an. Aus dem Substrat entstand dieser Fragmentationenpeak durch die Eliminierung von Ammoniak (NH_3 ; 17 Masseneinheiten). Aus dem Produkt wurde das Fragmentation bei m/z 269 durch Abspaltung

von Methylamin (CH_3NH_2 , 31 Masseneinheiten) gebildet (Abb. 4.33B).

Die Massenspektren der Reaktionen mit (*R*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin, (*S*)-Nororientalin und (*R,S*)-Norlaudanosolin sind im Anhang abgebildet (Abb. 8.6, Abb. 8.7, Abb. 8.8, Abb. 8.9).

Auffallend sind die Verschiebungen der Retentionszeiten der methylierten Produkte gegenüber den Substraten in den Ionenchromatogrammen. In den Massenspektren treten für (*R*)-Coclaurin die gleichen Fragmentationen bei m/z 286 und bei m/z 269 und für (*R*)-*N*-Methylcoclaurin bei m/z 300 und bei m/z 269 auf, wie für die Reaktion des (*S*)-Coclaurins beschrieben. Für die Reaktion mit (*S*)-Norretikulin entstanden neben den protonierten Substrat- und Produktpeaks bei m/z 316 und bei m/z 330 zwei Fragmentationen. Das Fragmentation des Substrates trat bei m/z 178 auf, und entsprach der Isochinolinuntereinheit. Für das Produkt (*S*)-Retikulin wurde ein Fragmentation bei m/z 192 detektiert, das der methylierten Isochinolinuntereinheit entsprach. In beiden Spektren trat zusätzlich ein Fragmentation bei m/z 299 auf. Dieses entstand bei der massenspektrometrischen Analyse von (*S*)-Norretikulin durch die Eliminierung von Ammoniak (17 Masseneinheiten), bei der Analyse von (*S*)-Retikulin durch die Eliminierung von Methylamin (31 Masseneinheiten). Die gleichen Fragmentationen traten auch in den Massenspektren von (*S*)-Nororientalin (m/z 316, 178, 299) und (*S*)-Orientalin (m/z 330, 192, 299) auf. Bei (*R,S*)-Norlaudanosolin verschob sich die Massenzahl durch die Methylierung von m/z 288 auf m/z 302. Es entstanden Fragmentationen des Substrates bei m/z 164 (Isochinolinuntereinheit) und Fragmentationen des Produktes bei m/z 178 (methylierte Isochinolinuntereinheit). Sowohl für Norlaudanosolin, als auch für das Reaktionsprodukt entstanden Fragmentationen bei m/z 271 durch Abspaltung von NH_3 aus dem Substrat, bzw. durch Abspaltung von CH_3NH_2 aus dem methylierten Produkt.

Für die fünf Substrate der *Papaver* CNMT wurden mit Enzymkinetiken (Abb. 4.34) die Michaelis-Menten-Konstanten und die Maximalgeschwindigkeiten bestimmt (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: kinetische Parameter der Substrate der CNMT. K_m ist die Michaelis-Menten-Konstante in μmol , V_{max} ist die Maximalgeschwindigkeit in pkatal , die katalytische Effizienz: kat/Km ($\cdot 10^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$); r^2 ist die Korrelation mit der Regressionskurve; Reaktionsbedingungen: 30°C , $12,5 \text{ pg}/\mu\text{l}$ Protein, 1 mmol SAM, $50 \mu\text{l}$ -Ansätze

Substrat	K_m	V_{max}	kat/Km	r^2
(<i>S</i>)-Coclaurin	$19,8 \pm 2,3$	$8,4 \pm 0,4$	27,8	0,99
(<i>R</i>)-Coclaurin	$20,0 \pm 2,2$	$5,0 \pm 0,2$	16,4	0,98
(<i>S</i>)-Norretikulin	$41,0 \pm 6,7$	$9,2 \pm 0,76$	14,7	0,98
(<i>S</i>)-Nororientalin	$78,5 \pm 10,0$	$11,7 \pm 0,7$	9,8	0,98
(<i>R,S</i>)-Norlaudanosolin	$34,4 \pm 6,2$	$9,0 \pm 0,5$	17,1	0,97

Die Reaktionsbedingungen waren dabei definiert auf eine Proteinmenge von $62,5 \text{ pg}$ gereinigten Proteins in einem $50 \mu\text{l}$ -Ansatz bei einer Reaktionszeit von $12,5 \text{ min}$. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C und die Konzentration des Cosubstrates (SAM) war 1 mmol . Die Michaelis-Menten Konstanten hatten für (*S*)-Coclaurin und (*R*)-Coclaurin mit $19,8 \mu\text{mol}$ und $20,0 \mu\text{mol}$ die

geringsten Werte. Höher waren die Werte für (*R,S*)-Norlaudanosolin mit 34,4 μmol und (*S*)-Norretikulin mit 41,0 μmol . Am schlechtesten umgesetzt wurde (*S*)-Nororientalin mit einem K_m -Wert von 78,5 μmol . Anders verhielten sich die ermittelten Maximalgeschwindigkeiten der fünf Substrate. Die Umsetzung von (*S*)-Nororientalin hatte mit 11,72 pkatal die höchste Maximalgeschwindigkeit. Die Werte für (*S*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin und (*R,S*)-Norlaudanosolin lagen im Bereich von 8,4 bis 9,2 pkatal. Die kleinste Maximalgeschwindigkeit wurde für die Umsetzung von (*R*)-Coclaurin ermittelt. Sie betrug 4,98 pkatal.

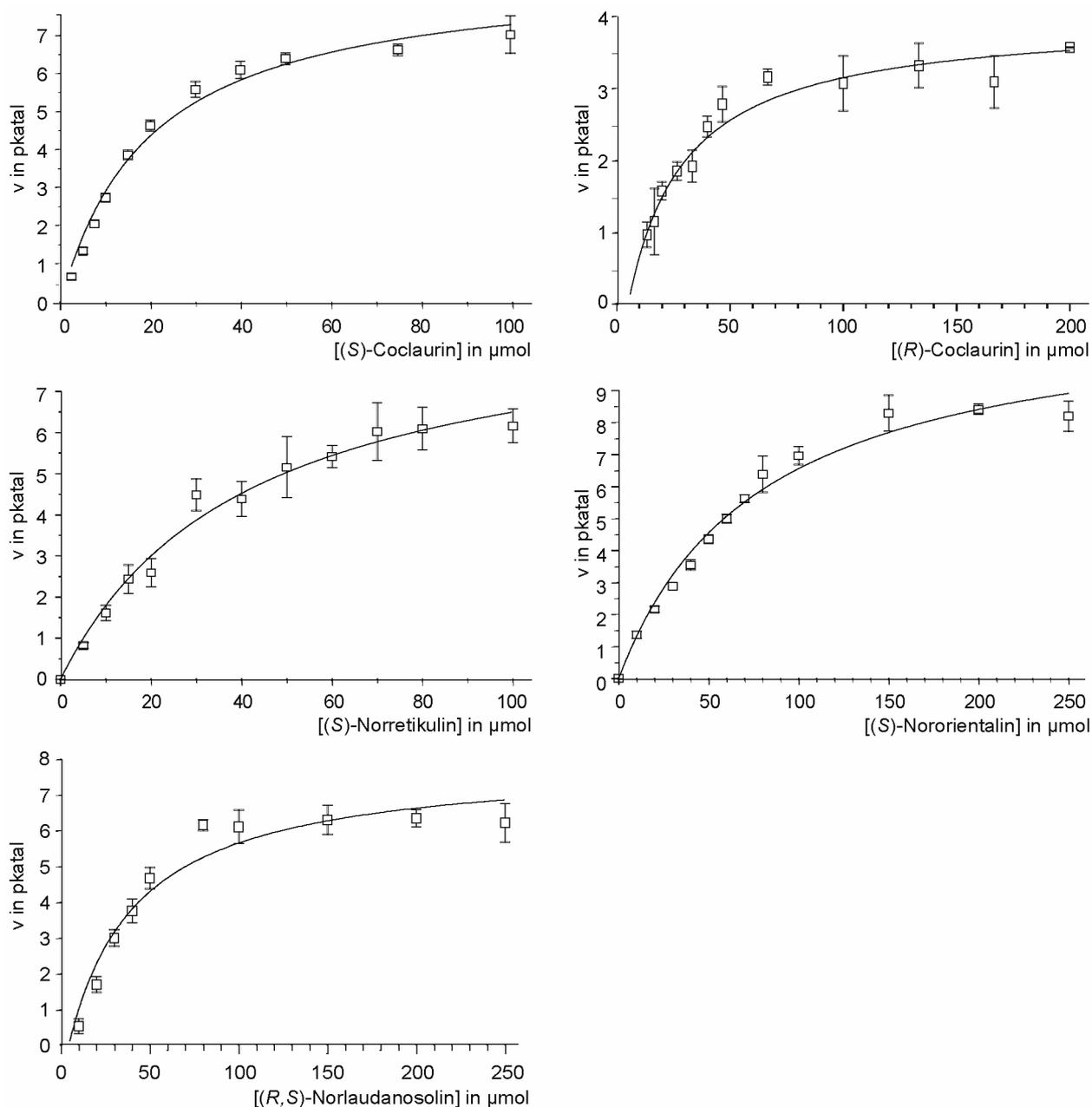


Abb. 4.34: Enzymkinetiken der (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase aus *P. somniferum* mit den Substraten (*S*)-Coclaurin, (*R*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin, (*S*)-Nororientalin und (*S*)-Norlaudanosolin. Reaktionsbedingungen: 12,5 min, 30°C, 600 rpm, 62,5 μg gereinigtes Protein, [SAM] = 1 mmol, 50 μl -Ansätze; pro Datenpunkt wurden zwei bis drei Messungen mit zwei unabhängigen Enzympräparationen durchgeführt.

5. Diskussion

5.1 O-Methyltransferasen

5.1.1 Transformation und Generierung transgener Pflanzen

Ziel der Arbeit war es, die Gene der 6OMT und der 7OMT als *sense*-Volllängekonstrukte und als RNAi-Konstrukte in *P. somniferum* zu exprimieren und die transgenen Pflanzen zu charakterisieren. Es wurde vermutet, dass es durch die Expression zu einer Anhäufung bzw. der Abnahme der Metabolite beider Genprodukte kommen würde. Aufgrund der Komplexität der Stoffwechselforgänge in der Pflanze, erwartete man außerdem, Rückschlüsse auf die Regulation der Biosynthese ziehen zu können.

Schlafmohn steht aufgrund seiner Funktion als Lieferant von Arzneistoffen im besonderen Interesse der pharmazeutischen Industrie. Zur exakten Untersuchung der Stoffwechselforgänge in Schlafmohn und der Manipulation der Biosynthese zum Zweck des *molecular farmings* ist das System der transgenen Pflanze besser geeignet als Zellkulturen. Transformationen von Zellsuspensionskulturen sind z.B. in *E. californica* von Nutzen. Diese Zellkulturen produzieren wie die Pflanze Benzophenanthridine, so dass Hinweise auf regulatorische Prozesse erhalten oder bestimmte Metabolite gezielt produziert werden können (Lee und Pedersen, 2001; Park et al., 2002). Die Zellkulturen von Schlafmohn spiegeln dagegen nicht die Komplexität der Vorgänge in der Pflanze wieder, da sie die wichtigsten Produkte der Pflanze, die Morphinane, nicht bilden (Kassem und Jacquin, 2001). Um die Auswirkungen der Transformationen mit Volllängeegenen und RNAi-Konstrukten auf den Organismus untersuchen zu können, wurde die Generierung transgener Pflanzen der Transformation von Zellkulturen bevorzugt, denn nur im pflanzlichen System können die Veränderungen der Alkaloide aller Syntheseweige gemessen werden.

Zur Generierung der transgenen Pflanzen wurde die durch Chitty et al. (2003) entwickelte Methode der somatischen Embryogenese aus Kalluskulturen genutzt. Sie war auch schon erfolgreich in den Arbeiten von Frick et al. (2004) und Allen et al. (2004) zur Generierung transgener Schlafmohnpflanzen verwendet worden.

Die Transformation und somatische Embryogenese waren für die *7omt* in *sense*-Orientierung und die pPLEX X002-Vektorkontrolle erfolgreich. Es gelang, 35 *7omt-sense*- und drei pPLEX-Pflanzen zu generieren.

Aufgrund der Tatsache, dass nur drei von etwa 400 Kalli aller Transformationszelllinien Embryonen bildeten, aus denen sich transgene Pflanzen entwickelten, kann die Effizienz des genutzten Transformationssystems für die Versuche dieser Arbeit (0,0075) nur als sehr schlecht bewertet werden. In anderen Arbeiten wird die Transformationseffizienz dieser Methode mit

0,39 für *bbe-antisense* und 0,06 für *cyp80b3-sense* bzw. 0,35 für *cyp80b3-antisense* angegeben (Frick et al., im Druck; Frick et al., 2005a). Da die angegebenen Effizienzen zehnfach bis etwa 100mal höher sind als die hier ermittelte, muss die geringe Effizienz der Methode auf die Versuche dieser Arbeit beschränkt werden.

Viele der gebildeten Embryonen starben vor der Wurzelbildung ab. Eine Ursache für das Ausbleiben der Embryonengenerierung bzw. für den Tod der Embryonen kann die mögliche Akkumulation toxisch wirkender Intermediate der Alkaloidbiosynthese gewesen sein. Es wurden keine Alkaloidbestimmungen an Kalli bzw. an Embryonen vorgenommen, so dass keine Aussagen über eine veränderte Alkaloidakkumulation darin gemacht werden können.

Es war in dieser Arbeit außerdem nicht versucht worden, das Transgen bzw. das Resistenzgen in den Kalli nachzuweisen, weshalb keine Rückschlüsse über den Erfolg der Transformation der *Papaver*-Hypokotyle durch die Agrobakterien gezogen werden können. In dieser Arbeit konnten 173 Pflanzen von verschiedenen Kalli generiert werden. Von diesen Pflanzen wurde nur in 38 das Transgen nachgewiesen. Es wird daher angenommen, dass von den Kalluskulturen, die Embryonen bildeten, nur die *7omt-sense*-Kalli Nr. 24 und Nr. 26 und der pPLEX-Kallus Nr. 3 transgen waren.

Die Zeitspanne bis zum Erhalt der transgenen Pflanzen aus den Kalluskulturen war mit 12-14 Monaten doppelt so lang wie im Protokoll (Chitty et al., 2003) angegeben. Auch diese Beobachtung wurde bereits früher für 12 unabhängige Transformationslinien gemacht (S. Frick, persönliche Mitteilung). Die Zeitvorgabe des Protokolls ist mit 6-8 Monaten im Vergleich zur Transformation von Modellorganismen wie *A. thaliana* ein langer Zeitraum. Die Nutzung einer schnelleren und effizienteren Methode zur Generierung transgener Schlafmohnpflanzen ist anstrebenswert. Eine ähnliche Transformationsmethode für Hypokotyle, an denen die Keimblätter verblieben waren ist für *E. californica* veröffentlicht. Demnach dauerte es mit B5-Medium, dem 1-Naphtalenessigsäure und 6-Benzylaminopurin zugesetzt wurden, nur 4 Monate, bis die durch somatische Embryogenese entstandenen Pflanzen in Erde ausgesetzt werden konnten (MacLeod und Facchini, 2005). Außerdem sollen aus embryogenen Zellsuspensionskulturen von *E. californica* schon nach 40 Tagen Embryonen isoliert werden können. Eine Methode der Generierung, die mit 500 Embryonen aus 25 ml Kultur sehr effizient erscheint (Park und Facchini, 2001). Sollten diese Varianten der Generierung transgener Pflanzen auf Schlafmohn übertragbar und tatsächlich in den angegebenen, kurzen Zeiträumen möglich sein, würden sie geeignete Alternativen zu der hier genutzten Methode darstellen. Es ist aber anzumerken, dass beide Protokolle im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie für Schlafmohn bisher nicht reproduziert werden konnten (S. Frick, persönliche Mitteilung).

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden stabile Transformationen angestrebt. Eine

transiente Transformation hätte aber schon Erkenntnisse über eine veränderte Latexzusammensetzung infolge der Expression der *O*-Methyltransferasen bzw. ihrer RNAi-Konstrukte gegeben. Eine Methode zur transienten Transformation junger Schlafmohnpflanzen wurde kürzlich publiziert (Hileman et al., 2005). Zum Zweck des effektiven *silencings* der Phytoendesaturase mittels Vakuuminfiltration mit einem Agrobakterienbinärvektor, der Virussequenzen (*tobacco rattle virus*) enthielt, waren schon nach 14 Tagen phänotypische Veränderungen sichtbar. Diese Methode kann in Zukunft schnellere Ergebnisse bei der Untersuchung von Kandidatengen zur gezielten Manipulation der Latexzusammensetzung liefern. Die Daten könnten dann die Basis für die Auswahl von Genen für das *metabolic engineering* mittels stabiler Transformationen bilden, so dass gezielt transgene Pflanzen für die pharmazeutische und die Lebensmittelindustrie erzeugt werden können.

5.1.2 *7omt-sense*-Pflanzen

Die Expression der *7omt* unter der Kontrolle des S4S4-Promotors und des Me13'-Terminators sollte der Überexpression und Steigerung der Enzymmenge in den transgenen Pflanzen dienen. Es wurde vermutet, dass es aufgrund der Position des Enzyms in der Biosynthese zu einer Anhäufung von Laudanin und Laudanosin in der Pflanze käme.

Mit PCR gelang es, in den transgenen Pflanzen der Generationen T0 und T1 sowohl das Transgen mit Primern gegen den S4S4-Promotor und den Me13'-Terminator, als auch das Resistenzgen *nptII* mit spezifischen Primern nachzuweisen. In der T2-Generation wurde das Transgen nachgewiesen. Southern-Blot-Analysen zeigten, dass die Eltern der T1-Generation je mindestens vier Kopien der T-DNS trugen. Der durch die Transformation bedingte heterozygote Charakter der T0-Pflanzen wurde durch das Aufspalten aller Pflanzen in der Generation T1 bestätigt. Die vom Kallus Nr. 24 abstammenden T1-Pflanzen trugen eine bis vier Transgenkopien (Abb. 4.16, Tabelle 4.2). In den T1-Pflanzen, die auf den Kallus Nr. 26 zurückgingen, wurden größtenteils fünf Kopien festgestellt (Abb. 8.1). Da es sich bei der zusätzlichen Bande um ein relativ schwaches Signal handelte, ist nicht auszuschließen, dass sie in der T0-Pflanze zwar vorhanden, aber nicht stark genug war, um detektiert zu werden. Für die Pflanzen der T2-Generation wurden keine Southern Blot-Analysen durchgeführt. Diese Analyse würde Aufschluss über ihre Mindestanzahl an Transgenkopien geben und die PCR-Ergebnisse zum Nachweis des Transgens bzw. des Resistenzgens bestätigen.

Für die *7omt-sense*-Pflanzen wurde eine erhöhte Menge der *7omt*-mRNS erwartet. Diese Annahme konnte in den Pflanzen der T0 und der T1 anhand einer Überexpression in den Blättern bestätigt werden. Die T1-Pflanzen exprimierten die *7omt* 3 bis 53 mal stärker als die Wildtyppflanzen (Abb. 4.14). Dagegen war die Expression der *7omt* in den T1-pPLEX-Pflanzen nicht sichtbar erhöht (Abb. 4.14), so dass die verstärkte Transkription in den *7omt-sense*-

Pflanzen auf das in die Schlafmohnpflanzen eingebrachte Transgen unter Kontrolle des S4S4-Promotors und des Me13'-Terminators zurückzuführen ist. Ein numerischer Zusammenhang zwischen den Kopienzahlen und den Transkriptmengen konnte nicht festgestellt werden. Beispielsweise hatten die Pflanzen 26-4 und 26-11 mit 5 Kopien des Transgens eine auf das Zehn- bis Vierzehnfache erhöhte Transkriptmenge. Den mit 50 höchsten Faktor für die *7omt*-Expression erreichte jedoch die Pflanze 13-2 mit nur zwei Kopien. Das widerspricht vorangegangenen Beobachtungen, die in transgenem Mais einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Zahl der inserierten Kopien und der Stärke der Expression zeigten (Ku et al., 1999). Eine mögliche, durch Dosisseffekte verursachte *sense*-Kosuppression, kann in dem vorliegenden Fall nicht ausgeschlossen werden (Jorgensen et al., 1996).

Anders als in den vorangegangenen Generationen wurden die Expressionsdaten der T2-Pflanzen für die Stängel-RNS bestimmt. Die ermittelten Werte der Expression der *7omt* waren in 87,5 % der Pflanzen erhöht. Die Faktoren, um die die Expression gesteigert wurde sind geringer als in der T1-Generation. Die *7omt* wird im oberen Stängelbereich in Wildtyppflanzen viel stärker exprimiert als in den Blättern (Abb. 4.10; Ounaroon et al., 2003). Daher erscheint die Zunahme an Transkripten bei gleich starker Überexpression weniger gesteigert als in der T1-Generation, denn eine Zunahme um x Transkripte entspricht beispielsweise im Blatt einem Faktor von 10, im Stängel aber nur einem Faktor von 2, da die als Bezugsgröße dienende Ausgangsmenge an Transkripten im Stängel viel höher ist als im Blatt.

Mittels HPLC-Analysen wurden die Werte für die in direktem Zusammenhang mit der *7OMT* stehenden Alkaloide Retikulin, Laudanin und Laudanosin ermittelt. Es stellte sich heraus, dass in mehr als 50 % der T0-Pflanzen die Überexpression der *7omt* mit einer generellen Abnahme des *7omt*-Substrates Retikulin und mit einer Zunahme des *7omt*-Produktes Laudanin einherging. In den T1-Pflanzen war der *7omt*-mRNS-Spiegel ebenfalls erhöht. Insgesamt zeigten nur 23 % der Pflanzen einen Anstieg an *7OMT*-Produkten. Die Mehrzahl bildete erhöhte Mengen an Retikulin, wobei weniger Laudanin und Laudanosin synthetisiert worden waren. In der T2-Generation war bei 40 % der Pflanzen eine Zunahme der Metabolite Laudanin und/oder Laudanosin festzustellen. Ein Zusammenhang zwischen der Überexpression der *7omt* und einem Anstieg von Laudanin bzw. Laudanosin kann für den Großteil der Pflanzen mit gestiegenem Laudaninanteil ausgemacht werden (Abb. 4.19, Abb. 4.20). Dieser Zusammenhang ist aber unter den T2-Pflanzen nicht allgemein gültig (Abb. 4.19, Abb. 4.20), denn in vielen Pflanzen ist die Überexpression der *7omt* nicht an eine Steigerung von Laudanin und Laudanosin gebunden, die Pflanzen produzieren sogar weniger dieser Metabolite (Abb. 4.19, Abb. 4.20). Die Annahme, dass eine Überexpression der *7omt*, des Startenzym des Papaverinweges, einen positiven Einfluss auf die Bildung von Laudanin und Laudanosin haben würde, kann nicht für alle

transgenen *7omt-sense*-Pflanzen bestätigt werden.

Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass sich die Gehalte an Laudanin und Laudanosin in den Pflanzen relativ zum Gesamtalkaloidgehalt nur geringfügig änderten. Der Mittelwert für Laudanin betrug in den T2-Kontrollpflanzen 1,8+/-0,3 %. Die höchste Steigerung an Laudanin zeigten die drei Pflanzen T2: 13-2-1, T2:22-6-6 und T2:26-11-7, in denen der Gehalt um bis zu 1,38 % stieg. Für Laudanosin betrug der Mittelwert 1,2 +/- 0,24 %. Die höchsten Steigerungen zeigten die Pflanzen T2:13-2-2, T2:13-5-4 und T2:13-5-7 mit Zunahmen um Werte bis zu 1,34 %. Dabei handelte es sich aber um einzeln auftretende Extremwerte. Allgemein sind die Zunahmen der Alkaloide Laudanin und Laudanosin in den T2-Pflanzen, die überhaupt eine Zunahme zeigen, sehr gering und fallen in den meisten Pflanzen kaum ins Gewicht.

Da die Gehalte an Laudanin und Laudanosin kaum verändert waren, ist anzunehmen, dass die Pflanzen die erhöhte *7omt*-Transkriptmenge nicht in Protein umsetzten oder das Enzym gleich wieder abgebaut wurde. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das Enzym nach der Translation nicht aktiv war oder die Aktivität gehemmt wurde. Western-Blot-Analysen und Untersuchungen zur *7OMT*-Aktivität in pflanzlichen Extrakten der *7omt-sense*-Pflanzen können Aufschluß zu diesen Vermutungen geben.

Die Wildtyppflanzen und die transgenen Pflanzen zeigten von Generation zu Generation verminderte Gesamtalkaloidgehalte. Diese lassen sich teilweise durch die Abhängigkeiten der Alkaloidproduktion von den durch die unterschiedlichen Aussaatzeitpunkte bedingten jahreszeitlichen Schwankungen erklären. Der Einfluss jahreszeitlicher Schwankungen auf den Alkaloidgehalt konnte schon für europäische Schlafmohnkultivare gezeigt werden (Bernáth und Tetenyi, 1982). Hinzu kam die Anzucht der Pflanzen in unterschiedlichen Gewächshäusern. Für die T0- und die T1-Generation konnten die vorgegebenen Wachstumsbedingungen in den Gewächshauskammern nicht immer garantiert werden, was temporär zu erhöhter Luftfeuchtigkeit und Temperatur führte. Unterschiedliche Bedingungen und Stressfaktoren können zu veränderten Alkaloidgehalten und Alkaloidprofilen führen (Szabo et al., 2005). Eine Vergleichbarkeit der Daten der transgenen Pflanzen zu den Wildtyppflanzen sollte durch die parallele Aussaat und gleiche Wachstumsbedingungen gewährleistet sein.

Es wurde gezeigt, dass sich die Alkaloidprofile der Gesamtheit der transgenen T0-Pflanzen signifikant gegenüber den Wildtyppflanzen geändert hatten (Abb. 4.9). Bei den Untersuchungen fiel der mit 87,5 % hohe Anteil der Pflanzen auf, die einen Thebaingehalt über 73 % hatten. Anhand der Alkaloidmessungen an den generierten, aber nicht transgenen Pflanzen dieser Arbeit zeigte sich, dass ein Viertel der nicht transgenen Pflanzen einen vergleichbar hohen Thebaingehalt wie die transgenen T0-Pflanzen hatten. Die Verschiebungen der Alkaloidspektren der T0-Pflanzen können also nicht auf die Expression der *7omt* in den Pflanzen zurückgeführt

werden. Eine verstärkte Bildung von Thebain in den nach der Methode von Chitty et al. (2003) generierten T0-Pflanzen wurde bereits häufiger in Arbeiten zur Pflanzengenerierung aus Schlafmohnkalluskulturen beobachtet (S. Frick, persönliche Mitteilung). Gegensätzliche Daten wurden von Allen et al. (2004) veröffentlicht. Die gesamte T0-Generation der *cor*-RNAi-Pflanzen zeigte einen Retikulinphänotyp mit Gehalten an Retikulin, Laudanin und Laudanosin, die in der Summe 25-100 % betrug. Außerdem wurden auch in anderen Arbeiten die hohen Thebaingehalte an generierten T0-Pflanzen beobachtet, wobei es sich sowohl um nicht transgene Pflanzen als auch um Vektorkontrollen handelte (S. Frick, persönliche Mitteilung). Der hohe Thebaingehalt der T0-Pflanzen wird mit der Methode der Transformation und Pflanzengenerierung begründet. Hinzu kamen zugeführter biotischer und abiotischer Stress durch Umsetzen in neues Medium, das Umsetzen in Erde verbunden mit dem Ausbringen ins Gewächshaus und den dadurch extrem veränderten Umweltbedingungen wie Temperatur, Feuchtigkeit, Licht und Schädlingsbefall.

Die Alkaloidspektren der T1-Pflanzen wichen von den Spektren der Wildtyppflanzen und der T0-Pflanzen ab. Die T1-Pflanzen zeigten anders als die T0-Pflanzen weder in ihrer Gesamtheit noch innerhalb der Nachkommen einer Elternpflanze einheitlich veränderte Alkaloidprofile. Auch die Stärke der Änderung der verschiedenen Alkaloidmengen in den T1-Pflanzen variierte. Die Nachkommen der T0-Pflanzen 24-22, 24-25 und 26-2 zeigten Verschiebungen im Bereich der einfachen bis doppelten Standardabweichung, seltener gingen die Werte über die doppelte Standardabweichung hinaus. Viel stärkere Effekte gab es unter den Nachkommen von T0:24-11 und T0:24-13, in denen besonders die Werte für Morphin, Codein, Thebain und Oripavin im Vergleich zu den Kontrollen häufig Veränderungen über die doppelte und dreifache Standardabweichung hinaus aufzeigten (Abb. 4.13). Entsprechende Veränderungen wurden ebenfalls in der T2-Generation der *7omt-sense*-Pflanzen festgestellt (Abb. 4.19, Abb. 8.2, Abb. 8.3). Sie zeigten sich auch unter den Nachkommen von Pflanzen, die in der T1 nur leicht veränderte Alkaloidprofile hatten. Die Alkaloidzusammensetzungen der T2-Pflanzen lieferten dabei kein einheitliches Muster wie beispielsweise einen generellen Anstieg von Morphin oder Thebain (Abb. 4.19). Die relativen Abweichungen von den Wildtypwerten verhielten sich aber wie schon bei den T1-Nachkommen von T0:24-11 und T0:24-13 für Morphin und Thebain, sowie für Oripavin und Codein meist gegenläufig zueinander.

Da von den starken Veränderungen an den relativen Prozentsätzen in einigen Pflanzen der T1-Generation und vielen Pflanzen der T2-Generation vorwiegend die Verhältnisse von Morphin und Codein gegen Thebain und Oripavin verschoben waren, wurde für die T1- und die T2-Generation auch das Transkriptionsniveau des Genes der Codeinonreduktase (CoR) untersucht. CoR reduziert Codeinon zu Codein, das anschließend zu Morphin umgesetzt wird. Außerdem

wandelt dieses Enzym Morphinon, das aus Thebain über Oripavin gebildet wird, in Morphin um. Eine Erhöhung des Morphin-/Codeingehaltes hätte auf eine erhöhte CoR-Aktivität zurückgeführt werden können. Die Erhöhung des Thebain-/Oripavingehaltes wäre ein mögliches Indiz für eine Intermediatakkumulation im Fall verminderter CoR-Aktivität. *Cor* wird in Blättern nur schwach exprimiert und die Orte der Hauptexpression sind der Stängel, die Kapsel und die Blattmittelrippe (Huang und Kutchan, 2000; Ounaroon et al., 2003). Die größten Mengen an Protein sind dagegen hauptsächlich in der Kapsel, im Stängel und in der Wurzel nachgewiesen worden (Weid et al., 2004). Zusätzlich zur *7omt* und *cor* wurde in der T2-Generation die Expression des Genes der Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase (SalAT) überprüft. *Salat* wird nicht organspezifisch transkribiert (Grothe et al., 2001) und ist aufgrund der Position in der Biosynthese der Metabolitlieferant zur Bildung von Thebain, aus dem Morphin, Codein und Oripavin synthetisiert werden. Eine erhöhte Enzymmenge hätte einen Metabolitschub in Richtung dieser Biosyntheseprodukte und eine Abnahme der Produktmengen der anderen Biosyntheseweige, wie Laudanin und Laudanosin, erklären können.

Die für RNS aus Blättern von T1-Pflanzen ermittelten Faktoren für die Transkription von *cor* betragen zwischen 0,3 und 2 und deuteten auf unerhebliche Änderungen der CoR-mRNS-Mengen hin. Die Werte für die *cor*-Expression konnten nicht in Zusammenhang mit den Alkaloidspektren gebracht werden. Beispielsweise lagen die Faktoren der Nachkommen von T0:24-11 unter dem Vergleichswert der Wildtypen, obwohl gerade diese Pflanzen mehr Morphin und Codein und weniger Thebain und Oripavin bildeten als die Wildtypen. Im Gegensatz dazu standen die Nachkommen der Pflanzen T0:24-22 und T0:26-2, bei denen die *cor*-Expressionsdaten häufig bis auf den Faktor 2,4 erhöht waren, deren Alkaloidspektren aber kaum Effekte zeigten. Ein Zusammenhang zwischen den Alkaloidspektren und den Expressionsdaten der *7omt* und *cor* war nicht auszumachen. Auch eine eindeutige Korrelation der *7omt*- und der *cor*-Expressionsdaten war nicht erkennbar.

Die Hälfte der untersuchten T2-Pflanzen hatte eine verstärkte *cor*-Expression. Aufgrund der geringen Zahl der Pflanzen, die Daten für diese Untersuchung lieferten (20 %), lassen sich aber keine Aussagen treffen. Das Expressionsniveau von *salat* konnte dagegen für 80 Pflanzen ermittelt werden. Etwa die Hälfte der Pflanzen hatte die *salat*-Transkription verdoppelt. Sollte auch die SalAT-Enzymmenge erhöht gewesen sein, hatte das keinen oder nur wenig Einfluss auf den Metabolitfluss, denn die Mehrproduktion eines der Alkaloide Morphin, Codein, Thebain und Oripavin wurde durch die Abnahme eines oder mehrerer dieser vier Alkaloide ausgeglichen, so dass die vor der SalAT-Aktivität angesiedelten Alkaloide kaum betroffen waren.

Die erhöhten *7omt*-, *cor*- und *salat*-Transkriptmengen deuten auf eine verstärkte Bildung dieser Enzyme hin. Ein erhöhter mRNS-Gehalt bedingt aber nicht zwangsläufig eine erhöhte Menge an

aktivem Enzym. Im Falle von posttranslativem Abbau hätten die erhöhten Transkriptmengen keine Auswirkungen auf die Enzymmengen. Um den Nachweis zu erbringen, ob mehr Transkripte tatsächlich zu einer erhöhten Menge an Enzymen in der Pflanze führten, müßten Western-Blot-Analysen durchgeführt werden. Die erhöhte Aktivität wäre durch Enzymtests zu bestätigen. Beispielsweise könnten durch den Nachweis veränderter CoR-Mengen, bzw. einer veränderten CoR-Aktivität die Veränderungen der Latexanteile der Intermediate Codein, Thebain und Oripavin und des Endproduktes Morphin im Morphinanzweig der Biosynthese erklärt werden.

Auch in anderen Arbeiten wurde noch kein Zusammenhang zwischen der Expression von *7omt*, *cor* und *salat* gezeigt. Obwohl bei Allen et al. (2004) aufgrund der Alkaloidspektren eine erhöhte Aktivität der *7OMT* erwartet wurde, konnte in Northern Blot-Analysen weder ein Einfluss auf die *7omt*-Transkriptmenge noch auf die Substrate in Richtung CoR schiebende SalAT nachgewiesen werden. Auch die Transkriptmengen der Gene von BBE, dem Startenzym des dritten Syntheseweges ab (*S*)-Retikulin, und der Enzyme *6OMT*, *CNMT*, *CYP80B3* oder *4'OMT* zur Synthese des zentralen, stark angereicherten Intermediates (*S*)-Retikulin waren nicht erhöht. Ein Einfluss der *7omt*-Überexpression auf die Expression anderer Biosynthesegene ist trotzdem nicht auszuschließen. Weitere Northern-Blot-Analysen zur Auswirkung auf die Expression der Gene der genannten Enzyme und der Salutaridinolreduktase (Ziegler et al., 2006) könnten Informationen über solche Zusammenhänge und mögliche Regulationsmechanismen auf der Ebene der Transkription liefern.

Die veränderten Alkaloidgehalte von Morphin, Codein, Thebain und Oripavin, und die damit verbundene Verschiebung der Werte für Morphin und/oder Codein gegen Thebain und/oder Oripavin sind wahrscheinlich auf Einflüsse auf die Codeinonreduktase zurückzuführen. Bei Millgate et al. (2004) wird außerdem eine möglicherweise existierende, bisher aber nicht isolierte Thebaindemethylase (TDM) genannt, deren Aktivität Einfluß auf die Mengen an den vier Alkaloiden in der Pflanze haben könnte.

Die Codeinonreduktase ist maßgeblich an der Synthese von Morphin und Codein aus Thebain und Oripavin beteiligt. Allen et al. (2004) zeigten in ihren *cor*-RNAi-Pflanzen eine starke Reduktion von Morphin. Erstaunlicherweise waren aber statt der im Syntheseweg vor der Aktivität von CoR angesiedelten Intermediate Oripavin und Thebain, die Alkaloide Retikulin, Laudanin und Laudanosin angereichert. Der Gehalt der drei Alkaloide war in der Summe auf 25-100 % der Latexalkaloide erhöht. Somit war durch das Ausschalten des CoR-Proteins der gesamte Biosyntheseweg abgeschaltet und die deshalb nicht umgesetzten Mengen an (*S*)-Retikulin akkumuliert und in den Papaverinzweig geleitet worden. Die Autoren vermuteten, dass Codeinon eine *feed back*-Hemmung von Enzymen und Transportern des Morphinanzweiges

bewirken könnte. Eine solche Hemmung der Enzymaktivität wurde bereits für die native SalAT aus Schlafmohn gezeigt (Lenz und Zenk, 1995a).

Von der Thebaindemethylase, deren Existenz bisher nicht geklärt ist, wird vermutet, dass sie sowohl Thebain, als auch Oripavin in Position 6 demethyliert. Eine Mutationsstudie mit einer als *top1* bezeichneten Schlafmohnmutante ergab einen Stopp in der Morphinbiosynthese. Die Pflanzen synthetisierten weder Codein noch Morphin. Stattdessen waren die Intermediate Thebain und Oripavin angereichert. Die Autoren nahmen an, dass *top1* dem Gen der TDM entspricht (Millgate et al., 2004). Eine verminderte Aktivität dieses Enzyms würde die Anreicherung von Thebain und Oripavin begünstigen, eine verstärkte Aktivität könnte zur Bildung von Morphin und Codein und zur Abnahme von Thebain und Oripavin führen, wie sie bei den *7omt-sense*-Pflanzen vorlag. Die Isolation der TDM und ihrer cDNS mit Hilfe der *top1*-Mutanten und Western-Blot-Analysen und Aktivitätstests von CoR und TDM in den *7omt-sense*-Pflanzen könnten Aufschluß über ihre Beteiligung an den veränderten Alkaloidprofilen geben und Rückschlüsse auf die regulatorischen Einflüsse der *7omt*-Überexpression zulassen.

Die Verringerung des Morphingehaltes und die starke Erhöhung des Retikulin/Laudanin/Laudanosin-Gehaltes in den *cor*-RNAi-Pflanzen (Allen et al., 2004) wurde außerdem durch ein putatives Metabolon der Enzyme im Morphinanzweig erklärt. Als Metabolon werden supramolekulare Multienzymkomplexe bezeichnet, in denen durch die räumliche Nähe der Enzyme die Intermediate direkt zum aktiven Zentrum des nächsten Enzyms weitergeleitet werden (*metabolite channeling*). Bisher wurden Metabolons für den Primärstoffwechsel, z.B. im Calvinzyklus und im Citratzyklus postuliert (Winkel, 2004). Für den Sekundärstoffwechsel gibt es Beispiele wie die Dhurrin-Synthese und das Zusammenwirken der Enzyme der Flavonoid- und Polyaminbiosynthesen in *Arabidopsis* (Burbulis und Winkel-Shirley, 1999; Panicot et al., 2002). In *P. somniferum* sind aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen der Biosyntheseenzyme mehrere solcher Multienzymkomplexe, je nach Teil der Alkaloidbiosynthese, denkbar. Der erste Teil zur Synthese des (*S*)-Retikulins findet in den Geleitzellen an den Milchröhren statt (Bird et al., 2003). Anhand von Immunolokalisationsanalysen der *7OMT* wurde bereits gezeigt, dass die Synthesen des Papaverinweges in den parenchymatischen Zellen distal der Milchröhren lokalisiert sind (Weid et al., 2004). Die Syntheseschritte des Morphinanweges bis zum Salutaridinol-7-*O*-Acetat laufen dagegen in den parenchymatischen Zellen, die die Milchröhren umgeben, ab. Ab dem Intermediat Thebain ist die Morphinbiosynthese in den Milchöhren lokalisiert (Weid et al., 2004). In die regulatorischen Mechanismen müssen spezifische Alkaloidtransportsysteme zwischen den verschiedenen Zelltypen eingebunden sein.

Es kann vermutet werden, dass die Verminderung des CoR-Proteins in den *cor*-RNAi-Pflanzen in Verbindung mit einer möglichen Hemmung von SalAT einen Transportstopp des (*S*-

Retikulins in die parenchymatischen Zellen, die die Milchröhren umgeben, bedingte. Eventuell wurde stattdessen ein verstärkter Transport in die distal der Milchröhren gelegenen Zellen verursacht und (*S*)-Retikulin in den Papaverinzweig gepumpt. Eine verminderte CoR-Aktivität hätte so zu erhöhter 7OMT-Aktivität geführt. Ein Einfluss der erhöhten Menge an 7OMT in den *7omt-sense*-Pflanzen auf die CoR-Aktivität wäre denkbar, wenn sie Alkaloidtransporter beeinflussen würde, was als sekundären Effekt auch die Ausbildung putativer Metabolons beeinflussen könnte. Die experimentellen Untersuchungen zu den Zusammenhängen zwischen Enzymaktivitäten und Transportsystemen steht unter anderem noch aus, da bisher nur wenig über Alkaloidtransporter bekannt ist.

Der Transport von (*S*)-Retikulin in die parenchymatischen Zellen mit 7OMT-Aktivität scheint trotz der durch die Überexpression vermutlich erhöhten Enzymmenge in den *7omt-sense*-Pflanzen, nicht verstärkt worden zu sein. Der Transport hätte sonst zu einer Zunahme von Laudanin und Laudanosin und einer Abnahme der Alkaloide Morphin, Codein, Thebain und Oripavin geführt.

Es muss berücksichtigt werden, dass durch die Aktivität des S4S4-Promotors die *7omt* in der Pflanze ubiquitär exprimiert wird. Es wurden in dieser Arbeit keine gewebsspezifischen Analysen zur Expression der *7omt* in den transgenen Pflanzen durchgeführt. Es ist jedoch denkbar, dass eine verstärkte Enzyymbildung in den Zellen, in denen die Morphinbiosynthese bis zum Salutaridinol-7-*O*-Acetat stattfindet, zu einer Konkurrenz um die Substrate (*S*)-Retikulin und (*R*)-Retikulin führte. Beide Substrate werden durch die rekombinante 7OMT umgesetzt (Ounaron et al., 2003) und sind gleichzeitig Ausgangsstoffe für die Morphinsynthese. Durch die entstandene Konkurrenzsituation um die Substrate kann es in den betroffenen Zellen zu einem Anschlag der Biosynthese in Richtung des Morphins gekommen sein, was weiter gehend durch erhöhte CoR-Aktivität die Synthese des Morphins vorantrieb, bzw. durch verminderte CoR-Aktivität die Synthese auf der Stufe des Thebains stoppte.

Die Überexpression der *7omt* bewirkte in nur wenigen transgenen Pflanzen einen Anstieg der Biosyntheseprodukte der 7OMT. Auch die Pflanzen, in denen ein Effekt auf den Gehalt an Laudanin und Laudanosin beobachtet werden konnte, zeigten Veränderungen nur in sehr geringem Maß. Ob die Überexpression der *7omt* die auffälligen Veränderungen in den prozentualen Anteilen an Morphin, Codein, Thebain und Oripavin bewirkte, ist aufgrund der geringen Zahl an unabhängigen Transformationslinien schwer auszumachen. Die in einigen Pflanzen der T1 und in fast allen T2-Pflanzen vergleichbaren Veränderungen der Alkaloidspektren sprechen für eine Stabilisierung des Effektes. Weitere Untersuchungen zu Enzymmengen und Enzymaktivitäten sowie zu den Transportprozessen der Alkaloide in der Pflanze müssten folgen, um die getroffenen Aussagen zu verifizieren.

5.2 Coclaurin-N-Methyltransferase - CNMT

Ausgehend von der durch Facchini und Park (2003) veröffentlichten Sequenz konnte in dieser Arbeit die cDNS der CNMT aus Schlafmohn kloniert, heterolog exprimiert und das Protein gereinigt werden. Im Unterschied zu *B. koetianeana*, aus der drei Isoformen des Enzyms mit unterschiedlichen molaren Massen und kinetischen Parametern isoliert worden waren (Frenzel und Zenk, 1990a), ergab die Sequenzierung der *cnmt* aus Schlafmohn nur eine Sequenz, wie es auch für die *cnmt* aus *C. japonica* gezeigt worden war (Choi et al., 2002).

Die Sequenzunterschiede von 44 Nukleotiden bzw. 12 Aminosäuren zur Sequenz von Facchini und Park (2003), sind mit den unterschiedlichen Schlafmohnkultivaren *Marianne* und dem hier genutzten *München* zu erklären, aus denen die mRNS für die cDNS-Synthese isoliert wurde.

Die drei CNMTs (aus *B. koetianeana*, *C. japonica* und *P. somniferum*) hatten ähnliche, jedoch nicht vollkommen identische Substratspezifitäten. Die *Berberis* CNMT methylierte beispielsweise beide Stereoisomere von Norretikulin, Coclaurin und 6-*O*-Methylnorlaudanosolin (Frenzel und Zenk, 1990a). Die Substrate der nativen CNMT aus *Coptis* waren (*R*)- und (*S*)-Coclaurin, (*R,S*)-Norretikulin, (*R,S*)-Norlaudanosolin, 6-*O*-Methylnorlaudanosolin, 6,7-Dimethoxyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin und 1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (Choi et al., 2001). Für die *Papaver* CNMT konnte Aktivität bei der Umsetzung von fünf Substraten gezeigt werden. Mit (*R*)- und (*S*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin und (*S*)-Norlaudanosolin überschneidet sich die Aktivität mit den beiden anderen CNMTs. Die *Papaver* CNMT war aber außerdem bei der Umsetzung von (*S*)-Nororientalin aktiv, das nicht als Substrat der anderen CNMTs getestet worden war. Im Gegensatz zu den bereits bekannten nativen CNMTs, die 6-*O*-Methylnorlaudanosolin zu 38 % (*C. japonica*) und 37-67 % (*B. koetianeana*) umgesetzt haben konnte nur ein minimaler Umsatz von 3 % durch die *Papaver* CNMT nachgewiesen werden. Die drei Enzyme besitzen demnach die für die Umsetzung von (*S*)-Coclaurin notwendige Aktivität in der Biosynthese.

Die *Berberis* CNMT (Frenzel und Zenk, 1990a), die *Coptis* CNMT (Choi et al., 2001) und die *Papaver* CNMT methylierten einfache Amine und Alkaloide mit tertiär gebundenem Stickstoff nicht, waren aber aktiv gegen unterschiedlich substituierte Benzylisochinoline.

Die Methylierungen von (*S*)-Coclaurin, (*R*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin, (*S*)-Nororientalin und (*R,S*)-Norlaudanosolin (Tabelle 5.1) durch die *Papaver* CNMT konnten mit LC-MS (TOF)-Analysen gezeigt werden (Abb. 4.33, Abb. 8.6, Abb. 8.7, Abb. 8.8, Abb. 8.9).

In den Ionenchromatogrammen waren die Retentionszeiten der Produktpeaks gegenüber den Substratpeaks deutlich um 0,5-0,8 min verschoben. In den Ionenspektren waren die Molekülpeaks der Produkte gegenüber den Substraten um 14 Masseneinheiten erhöht. Eine Massenzunahme um 14 Einheiten entspricht einer dem Substrat zugeführten Methylgruppe. Die

Ionenspektren wiesen für das jeweilige Molekülion eindeutig auf Methylierungen hin. Da diese Massenverschiebung auch für die Fragmentationen der Isochinolinuntereinheiten gezeigt werden konnten, wurde die Position der Methylierung auf diesen Teil des Moleküls eingegrenzt (Abb. 4.33, Abb. 8.6, Abb. 8.7, Abb. 8.8, Abb. 8.9).

Tabelle 5.1: Darstellung der Strukturgleichungen der durch die CNMT katalysierten Reaktionen

Substrat/Produkt	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(<i>R,S</i>)-Coclaurin / (<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methylcoclaurin	OCH ₃	OH	H	OH
(<i>S</i>)-Norretikulin / (<i>S</i>)-Retikulin	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
(<i>S</i>)-Nororientalin / (<i>S</i>)-Orientalin	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH
(<i>R,S</i>)-Norlaudanosolin / (<i>R,S</i>)-Laudanosolin	OH	OH	OH	OH

Da alle Substrate in Position 7 des Isochinolinringsystems eine freie Hydroxylgruppe besaßen, Norlaudanosolin zusätzlich auch in Position 6, musste eine *O*-Methylierung ausgeschlossen werden. Die Annahme der *N*-Methylierung der Isochinolinuntereinheit wurde durch die Abspaltung von Ammoniak (m/z 17) aus dem entstehenden Fragmentation des Substrates und von Methylamin (m/z 31) aus dem Fragmentation des Produktes untermauert. Die Annahme einer möglichen *O*-Methylierung konnte durch die Abspaltung des Methylamins aus dem Fragmentation der Isochinolinunterheit des Produktes widerlegt werden.

Für die nativen CNMTs aus *Berberis* und *Coptis* betragen die K_m -Werte für die Umsetzung von Norretikulin 200 und 380 μM und für die heterolog exprimierte *Coptis* CNMT 160 μM . Der für die *Papaver* CNMT bestimmte K_m -Wert mit (*S*)-Norretikulin liegt mit 41 μM weit darunter. Die K_m -Werte für (*R*)- und (*S*)-Coclaurin betragen 20 μM , für (*S*)-Nororientalin 79 μM und für (*R,S*)-Norlaudanosolin 34 μM (Abb. 4.34). Die Affinitäten der *Papaver* CNMT nahmen von (*R*)- und (*S*)-Coclaurin über (*R,S*)-Norlaudanosolin und (*S*)-Norretikulin zum (*S*)-Nororientalin ab.

Am aussagekräftigsten in Bezug auf die Reaktivität wird die Spezifitätenkonstante, die die katalytische Effizienz beschreibt, betrachtet (angegeben in $\cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Demnach wurde durch die *Papaver* CNMT das native Substrat (*S*)-Coclaurin mit 27,8 am effektivsten umgesetzt. Für (*R,S*)-Norlaudanosolin, (*R*)-Coclaurin und (*S*)-Norretikulin betrug die katalytische Effizienz mit 17,1, 16,4 und 14,7 nur etwa 60 % des (*S*)-Coclaurinwertes. Für (*S*)-Nororientalin wurde der Wert 9,8 bestimmt. Der geringe Umsatz von (*S*)-Nororientalin könnte strukturell durch die in 5'-Position vorhandene Methylgruppe begründet sein, die bei den anderen Substraten nicht vorhanden ist. Das widerspricht jedoch der geringen Affinität gegenüber (*S*)-6-*O*-

Methylnorlaudanosolin, das diese Methylgruppe nicht trägt.

Divalente Kationen haben aufgrund ihrer positiven Ladung hohe Affinitäten zu negativ geladenen Gruppen wie der Seitenkette der Aminosäure Histidin. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Co^{2+} und Ni^{2+} -Säulen zur Reinigung mit His-tag versehener Proteine genutzt. Die Affinitäten der Kationen wirken auch gegen Histidinreste in den Aminosäuresequenzen der Proteine. Durch die sterischen Einflüsse der Kationen kann es zu Konformationsänderungen in der Tertiärstruktur der Proteine kommen, die sich auch auf das aktive Zentrum auswirken und zu einem Aktivitätsverlust führen. Wie für die *Coptis* CNMT gezeigt, nahmen die divalenten Kationen von Cobalt, Kupfer und Mangan hemmend Einfluss auf die Enzymaktivität, die um 52, 37 und 52 % zurückging. Eisen- und Magnesiumionen hatten keinen Effekt (Choi et al., 2001). Für die *Papaver* CNMT verringerte sich dagegen die Aktivität in Gegenwart von Cu^{2+} um 80 %, von Co^{2+} und Fe^{2+} um 20 % und von Mg^{2+} und Mn^{2+} um nur 5 %. Die homologen Enzyme werden durch verschiedene Kationen in unterschiedlichem Maß gehemmt. Der deutliche Einfluss von Kupfer auf die Aktivität der *Papaver* CNMT ist durch das hohe Redoxpotential und die relativ kleine Größe des Ions zu erklären. Es scheint besonders geeignet, auf die Struktur der *Papaver* CNMT Einfluss zu nehmen und eventuell sogar Gruppen im aktiven Zentrum zu blockieren.

Während der Reaktion wird die Methylgruppe des SAM als Cosubstrat auf den Stickstoff des Substrates übertragen, wodurch SAH und das methylierte Produkt entstehen. Joshi und Chiang (1998) publizierten für pflanzliche O-Methyltransferasen drei Sequenzmotive A, B und C, die an der Bindung des SAM während der Reaktion beteiligt sind. Sowohl in der Sequenz der CNMT aus *Coptis* (AS 133-141) (Choi et al., 2002), als auch in den *Papaver*-Sequenzen der CNMT (AS 126-134) und der beiden SNMT-Klone (AS 132-140) konnte nur das Motiv A identifiziert werden. Die Differenz in der Position des Motivs in der *Papaver* CNMT entspricht den fehlenden 7 Aminosäuren gegenüber der *Coptis* CNMT-Sequenz am N-Terminus. Das Motiv A ist in den CNMTs und den SNMTs dichter am N-Terminus lokalisiert als in den bekannten O-Methyltransferasen (6OMT, 7OMT, 4'OMT, SMT)(Zubieta et al., 2003).

Für O-Methyltransferasen gibt es weit mehr Beispiele in der Literatur als für N-Methyltransferasen. Es gibt Sequenzvergleiche und strukturelle Untersuchungen zur Bindung des SAM, die die von Joshi und Chiang (1998) postulierten Motive zur Bindung von SAM manifestieren. In den vier hier betrachteten N-Methyltransferasen des Sekundärstoffwechsels konnte nur das Motiv A von Joshi und Chiang (1998) identifiziert werden. Aufgrund des *modellings* zur SAM-Bindung der Salicylsäure-C-Methyltransferase-Familie konnte gezeigt werden, dass zur SAM-Bindung mehrere Domänen notwendig sind (Zubieta et al., 2003). Dem Ansatz von Joshi und Chiang (1998) folgend, könnten groß angelegte Sequenzvergleiche

bekannter *N*-Methyltransferasen, *modelling*-Versuche, und Strukturaufklärungen nach Kristallisationen zur Identifikation der SAM-Bindedomänen in dieser Enzymklasse führen.

5.3 Stylopin-*N*-Methyltransferase - SNMT

In dieser Arbeit konnten aus *P. somniferum* mittels RACE-PCR die zwei cDNS-Klone *snmt4* und *snmt5* amplifiziert werden. Die Aminosäuresequenzen der Klone 4 und 5 stimmten zu 98,6 % überein. Die Ausgangssequenz der RACE-PCR konnte in beiden Klonen zu 100 % nachgewiesen werden. SNMT4 und SNMT5 zeigten Übereinstimmungen von 47 % mit der Aminosäuresequenz der CNMTs aus *Coptis* (Choi et al., 2002) und *Papaver* (Facchini und Park, 2003). Die Sequenzübereinstimmungen und das Motiv A führten zu dem Schluss, dass es sich bei den isolierten Sequenzen um cDNS handelte, die für eine S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige *N*-Methyltransferase kodierten.

Inzwischen wurde die Sequenz einer SAM-abhängigen Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase aus Schlafmohn durch Liscombe und Facchini (2005) veröffentlicht (DQ028579, Nukleotiddatenbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Übereinstimmung mit den hier isolierten Sequenzen der *snmt* beträgt auf Aminosäureebene mehr als 99 % (Daten nicht gezeigt). Aminosäuresequenzvergleiche verschiedener Methyltransferasen des Sekundärstoffwechsels führten zu dem in Abb. 5.1 gezeigten Stammbaum.

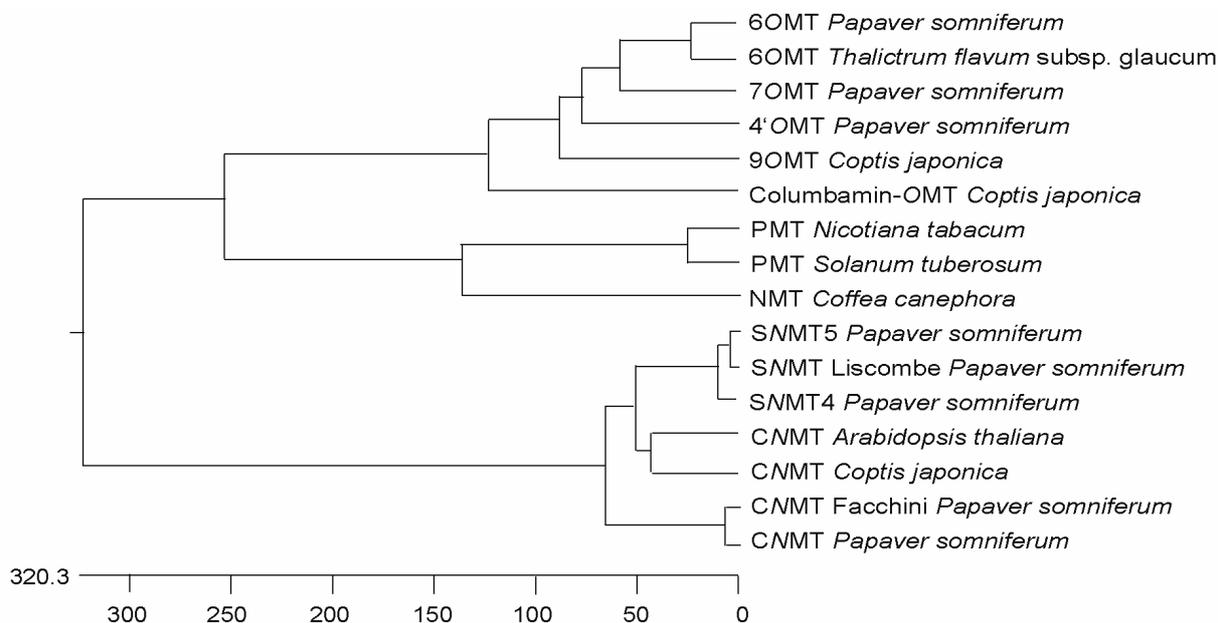


Abb. 5.1: phylogenetischer Stammbaum für den Aminosäuresequenzvergleich der Enzyme: 6OMT *P. somniferum* (AAQ01669), 6OMT *T. flavum* (AAU20765), 7OMT *P. somniferum* (AAQ01668), 4'OMT *P. somniferum* (AAP45313), 9OMT *C. japonica* (BAA06192), Columbamin-OMT *C. japonica* (BAC22084), PMT *N. tabacum* (AAF14881), PMT *S. tuberosum* (CAE53633), NMT *C. canephora* (AAY56107), SNMT4 und SNMT5 (diese Arbeit), SNMT Liscombe *P. somniferum* (AAY79177), CNMT *A. thaliana* (AAM65762), CNMT *C. japonica* (BAB71802), CNMT Facchini *P. somniferum* (AAP45316); CNMT *P. somniferum* (diese Arbeit), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Proteindatenbank)

Verglichen wurden die Aminosäuresequenzen von *O*-Methyltransferasen aus *P. somniferum* (AAQ01669, AAQ01668, AAP45313) (Facchini und Park, 2003; Ounaroon et al., 2003), *Thalictrum flavum* (AAU20765) (Samanani et al., 2005) und *C. japonica* (BAA06192) (Takeshita et al., 1995), zwei Putrescin-*N*-Methyltransferasen aus Tabak (AAF14881) und *S. tuberosum* (CAE53633) (Riechers und Timko, 1999; Stenzel et al., 2006), eine *N*-Methyltransferase aus *Coffea canephora* (AAY56107) (Satyanarayana et al., 2005), vier Sequenzen von CNMTs aus *P. somniferum* (AAP45316, diese Arbeit), *C. japonica* (BAB71802) und *A. thaliana* (AAM65762) (Choi et al., 2002; Facchini und Park, 2003; Haas et al., 2003; diese Arbeit) und die Sequenzen der Stylopin-*N*-Methyltransferasen aus *P. somniferum* (diese Arbeit; AAY79177) (Liscombe und Facchini, nicht veröffentlicht).

Der Stammbaum zeigt eine Clusterung der sechs *O*-Methyltransferasen. Einen weiteren Cluster bilden die Putrescin-*N*-Methyltransferasen und die *N*-Methyltransferase aus Kaffee. Geringere Verwandtschaft besteht zwischen diesen beiden Clustern und der Gruppe der Coclaurin- und Stylopin-*N*-Methyltransferasen. Überraschenderweise ist unter diesen die Nähe der Stylopin-*N*-Methyltransferasen zu der CNMT aus *Coptis* und einer zur CNMT homologen Sequenz aus *A. thaliana* (Haas et al., 2002) größer als zu den CNMT aus *P. somniferum*. Offensichtlich ist jedoch die enge Verwandtschaft der SNMT- und CNMT-Sequenzen, die auf einen gleichen Ursprung in der Entwicklung dieser Enzyme schließen lassen.

Die beiden hier isolierten *smt*-Sequenzen wurden heterolog im Vektor pHis8 in *E. coli* BL21(DE3)RIL exprimiert. Das Molekulargewicht der SNMTs war auf 41 kDa berechnet und durch SDS-PAGE bestätigt worden (Abb. 4.24). Damit bewegt sie sich im gleichen molekularen Massenbereich wie das *Sanguinaria*-Enzym mit einem Molekulargewicht von 39 kDa (O'Keefe und Beecher, 1994) und die CNMT aus *C. japonica*, dessen experimentell bestimmtes Molekulargewicht 45 kDa, das berechnete aber 41,7 kDa beträgt (Choi et al., 2001; Choi et al., 2002), sowie der CNMT Schlafmohn mit einem Molekulargewicht von ebenfalls 41 kDa (diese Arbeit). Nach Gelfiltration der Enzyme aus *E. californica*, *C. vaginans* und *S. canadensis* waren die Molekulargewichte im nativen Zustand auf 78 kDa, 72 kDa und 70 kDa bestimmt worden (Rueffer und Zenk, 1986; Rueffer et al., 1990; O'Keefe und Beecher, 1994). Das lässt die Annahme zu, dass es sich bei den drei Enzymen um Homodimere oder nicht globuläre Proteine handelte, wie es schon von O'Keefe und Beecher (1994) diskutiert worden war. Auf eine Gelfiltration des Schlafmohnenzym war verzichtet worden, weil das gereinigte Enzym instabil war und keine Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Die Methylierungsaktivität und die Größenübereinstimmung lassen aber die Vermutung zu, dass es sich bei diesem zu den anderen Methyltransferasen Homologen ebenfalls um ein Homodimer handelt.

LC-MS (TOF)-Analysen von Enzymtests mit Bakterienrohextrakten belegten die *N*-Methyl-

transferaseaktivität an Stylopin. Dabei zeigten die Ionenchromatogramme eine Verschiebung der Retentionszeit des Produktes gegenüber dem Substrat (Abb. 4.25, Abb. 4.26). In den Ionenspektren des Produktes waren die Massen des Molekülionenpeaks und des Fragmentionenpeaks (Isochinolinuntereinheit) gegenüber den Substratpeaks um 14 Masseneinheiten verschoben. Diese entsprechen der Masse der zusätzlichen Methylgruppe. Da Stylopin an der Isochinolinuntereinheit keine freien Hydroxylgruppen trägt, kann die Methylierung nur am Stickstoff erfolgt sein. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Messungen bestätigt.

Anhand der Ionenspektren der drei Analysen (Abb. 4.25, Abb. 4.26, Abb. 4.27) ist erkennbar, dass auch im Reaktionsansatz mit dem Rohextrakt der Vektorkontrolle pHis8 *N*-Methylstylopin detektiert wurde. Die Intensität dieses Peaks betrug aber nur 2,5 % der detektierten Stylopinmenge und ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung des Substrates oder eine mögliche *N*-Methyltransferaseaktivität des *E. coli*-Rohextraktes zurückzuführen. Eine Messung des BL21(DE3)RIL-Rohextraktes ohne Vektor wurde nicht durchgeführt.

Da das Enzym sehr instabil war, konnte es nicht charakterisiert werden. Um die Bedingungen für das Enzym zu optimieren und es zu stabilisieren, sollten Versuche mit unterschiedlichen Lagerungstemperaturen, Lagerpuffern, stabilisierenden Substanzen wie β -Mercaptoethanol und DTT und unterschiedlichen pH-Werten unternommen werden. Möglicherweise ist eine Zugabe von Cofaktoren notwendig. Allerdings benötigten die bereits bekannten *O*-Methyltransferasen aus Schlafmohn und die *CNMTs* keine Cofaktoren (Choi et al., 2001; Choi et al., 2002; Ounaroon et al., 2003).

Die nun bekannte Sequenz der Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase eröffnet neue Möglichkeiten der Untersuchung der Synthesen von Sanguinarin und Berberin. Transformationen von Zellkulturen und die Generierung transgener Pflanzen mit Volllänge- und RNAi-Konstrukten könnten auch mit diesem Enzym zur Akkumulation bestimmter Alkaloide genutzt werden und neue Erkenntnisse über regulierende Mechanismen bringen.

6. Zusammenfassung

O-Methyltransferasen

O-Methyltransferasen spielen im Sekundärstoffwechsel von *P. somniferum* eine wichtige Rolle in der Biosynthese der Opiumalkaloide.

P. somniferum (Kultivar CO58-34) sollte mit der (S)-Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase (6OMT) und der (S)-Retikulin-7-O-Methyltransferase (7OMT) mit *sense*-Konstrukten zur Überexpression und mit RNAi-Konstrukten zum *silencing* transformiert werden.

Die entsprechenden Konstrukte wurden kloniert. Dem Protokoll von Chitty et al. (2003) folgend wurden sie zur agrobakterienvermittelten Transformation von Schlafmohnhypokotylen verwendet. Aus den entstandenen Kalluskulturen konnten durch somatische Embryogenese *7omt-sense*-Pflanzen generiert und bis in die T2-Generation untersucht werden.

In den transgenen Pflanzen wurden mittels PCR mit spezifischen Primern gegen den S4S4-Promotor und den Me13'-Terminator ein 1,2 kb-Fragment des Transgens und für die Pflanzen der T0- und T1-Generation mit genspezifischen Primern das Resistenzgen *nptII* nachgewiesen.

Die Überexpression der *7omt* konnte in Northern-Blot-Analysen für die T0- und die T1-Generation mit Blatt-RNS und für die T2-Generation mit RNS des obersten Stängelabschnittes gezeigt werden.

In Southern-Blot-Analysen der T0-Pflanzen wurde die Zahl der ins Genom integrierten Transgenkopien anhand der *nptII*-Hybridisierung auf mindestens vier bestimmt. Für die Pflanzen der T1-Generation konnte die Mindestanzahl der Kopien auf eins bis fünf festgelegt werden.

Die 7OMT setzt im Alkaloidbiosyntheseweg in Schlafmohn (S)-Retikulin zu (S)-Laudanin und (S)-Laudanosin um. Eine Überexpression der *7omt* ließ eine verstärkte Bildung der Syntheseprodukte erwarten.

Die Latexalkaloide wurden mittels HPLC qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Überexpression der *7omt* hatte in den Generationen T1 und T2 kaum Einfluss auf die Mengen des Substrates Retikulin und der Produkte Laudanin und Laudanosin.

In der T1-Generation waren die Anteile dieser Alkaloide bei jeweils etwa 40 % der T1-Pflanzen verändert. Etwa 66 % dieser Pflanzen zeigten die Menge an Retikulin erhöht bzw. an Laudanin und/oder Laudanosin verringert. Ein Anstieg der 7OMT-Produkte lag in 17 Pflanzen vor. Dabei war die Menge an Laudanin in neun Pflanzen und an Laudanosin in zehn Pflanzen der T1-Generation gestiegen. Ein Anstieg beider Alkaloide lag in zwei dieser Pflanzen vor.

Die Änderungen bewegten sich dabei meist in dem geringen Bereich zwischen einfacher und doppelter Standardabweichung. Steigerungen um das Doppelte der Standardabweichung des Laudanin- bzw. Laudanosingehaltes gab es in 5 T1-Pflanzen. Eine Abnahme der Mengen in der gleichen Größenordnung war dagegen in 10 Pflanzen vorhanden.

Nur für eine T1-Pflanze konnte eine Verringerung des Retikulingehaltes, verbunden mit einer Zunahme von 7OMT-Produkten, in diesem Fall Laudanin, festgestellt werden.

Die Betrachtung der Alkaloide Retikulin, Laudanin und Laudanosin in den 100 T2-Pflanzen zeigte, dass in 30 Pflanzen der Retikulingehalt gesunken war, 28 Pflanzen produzierten mehr Laudanin und 17 Pflanzen mehr Laudanosin. Nur vier Pflanzen zeigten bei geringeren Retikulinwerten erhöhte Werte für Laudanosin. In nur zwei Pflanzen ging die verminderte Retikulinmenge mit einer Erhöhung der Alkaloide Laudanin und Laudanosin einher.

In einigen Pflanzen der T1-Generation und in vielen Pflanzen der T2-Generation war die Synthese der Endmetabolite des Morphinanweges beeinflusst. Diese Pflanzen zeigten starke Veränderungen der Gehalte von Morphin, Codein, Thebain und Oripavin. Diese auffälligen Änderungen bewegten sich in Bereichen bis zu 28 % des Gesamtalkaloidgehaltes für Morphin, 22 % für Codein, 32% für Thebain und 9 % für Oripavin

Die Pflanzen zeigten dabei kein einheitliches Muster, auffallend war jedoch, dass die Verschiebung der Werte für Morphin/Codein häufig antagonistisch zur Verschiebung der Werte für Thebain/Oripavin war.

***N*-Methyltransferasen**

An der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* sind zwei *N*-Methyltransferasen beteiligt. Es handelt sich dabei um die (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT), die (*S*)-Coclaurin methyliert, und die (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase (SNMT), deren Substrat (*S*)-Stylopin ist.

Facchini et al. (2003) isolierten aus *P. somniferum* eine Sequenz mit großer Homologie zu der bereits aus *C. japonica* bekannten CNMT. Dadurch war es in dieser Arbeit möglich, aus dem Kultivar *München* eine cDNS zu isolieren. Die Aminosäuresequenzhomologie zu der bereits aus *C. japonica* bekannten Sequenz der CNMT betrug 62 %.

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden auf den pH-Wert 8,0 in HEPES-Puffer und eine Temperatur von 45°C bestimmt. Das Enzym ist SAM-abhängig. Die CNMT akzeptierte die Alkaloide (*R*)-Coclaurin und (*S*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin, (*S*)-Nororientalin und (*R,S*)-Norlaudanosolin als Substrate. Die Aktivität des Enzyms war in Anwesenheit von divalenten Ionen (5 mM) durch Kupfer um 80 % und durch Eisen und Cobalt um etwa 20 % vermindert.

Die Methylierung der Substrate mit SAM als Methylgruppendonator wurde in LC-MS-Analysen bestätigt. Die Ionenchromatogramme zeigten eindeutige Verschiebungen der Retentionszeiten der Reaktionsprodukte gegenüber den Substraten. In den Ionenspektren wurde die Methylierung durch das Enzym bestätigt. Dabei war für die jeweiligen Produkte eine Erhöhung der Massen der Molekülonen und der Fragmentionen der Isochinolinuntereinheit um 14 Einheiten, entsprechend der angefügten Methylgruppe, zu verzeichnen. Weitere Fragmentionen, die durch Abspaltung von Ammoniak aus dem Substrat und von Methylamin aus dem Produkt entstanden waren, wiesen eindeutig auf *N*-Methylierungen hin.

Die ermittelten K_m -Werte und Maximalgeschwindigkeiten wurden für (*S*)-Coclaurin auf 20 μmol und 8 pkatal, für (*R*)-Coclaurin auf 20 μmol und 5 pkatal, für (*S*)-Norretikulin auf 41 μmol und 9 pkatal, für (*S*)-Nororientalin auf 79 μmol und 12 pkatal und für (*R,S*)-Norlaudanosolin auf 34 μmol und 9 pkatal bestimmt.

Aufgrund der Sequenzhomologien und funktionellen Übereinstimmungen mit dem bereits bekannten Enzym aus *Coptis* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die isolierte Sequenz die CNMT aus *P. somniferum* kodiert.

Ausgehend von einer 135 bp umfassenden cDNS mit Homologie zur CMMT aus *C. japonica*, gelang es, mittels RACE-PCR zwei Klone einer bisher unbekanntes cDNS mit Homologie zu bekannten Methyltransferasen zu isolieren.

Rohextraktmessungen zeigten Aktivität beider Klone bei der *N*-Methylierung von (*S*)-Stylopin. Diese Ergebnisse wurden massenspektrometrisch bestätigt. Es handelte sich um die bis *dato* noch nicht bekannte Sequenz der (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase, die (*S*)-Stylopin im Benzophen[*c*]anthridinzweig der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* umsetzt.

7. Literaturverzeichnis

- Ali, S. und Taylor, W.C. (2001a) The 3' non-coding region of a C4 photosynthesis gene increases transgene expression when combined with heterologous promoters. *Plant Mol Biol* (46) 325-34.
- Ali, S. und Taylor, W.C. (2001b) Quantitative regulation of the Flaveria Me1 gene is controlled by the 3'-untranslated region and sequences near the amino terminus. *Plant Mol Biol* (46) 251-61.
- Allen, R.S., Millgate, A.G., Chitty, J.A., Thisleton, J., Miller, J.A., Fist, A.J., Gerlach, W.L. und Larkin, P.J. (2004) RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat Biotechnol* (22) 1559-66.
- Bauer, W. und Zenk, M.H. (1989) Formation of both methylenedioxy groups in the alkaloid (*S*)-stylophine is catalyzed by cytochrome P-450 enzymes. *Tetrah Lett* (30) 5257-60.
- Bauer, W. und Zenk, M.H. (1991) Two methylenedioxy bridge forming cytochrome P-450 dependent enzymes are involved in (*S*)-stylophine biosynthesis. *Phytochemistry* (30) 2953-61.
- Bernáth, J. und Tetenyi, P. (1982) Production characteristics of *Papaver somniferum* L. cultivars of different origin and vegetation cycles. *Bull Narc* (34) 113-27.
- Beyer, H. und Walter, W. (1991) *Lehrbuch der organischen Chemie*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 22. Auflage.
- Bird, D.A., Franceschi, V.R. und Facchini, P.J. (2003) A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* (15) 2626-35.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal Biochem* (72) 248-54.
- Burbulis, I.E. und Winkel-Shirley, B. (1999) Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *PNAS USA* (96) 12929-34.
- Chitty, J.A., Allen, R.S., Fist, A.J. und Larkin, P.J. (2003) Genetic transformation in commercial Tasmanian cultivars of opium poppy, *Papaver somniferum*, and movement of transgenic pollen in the field. *Func Plant Biol* (30) 1045-58.
- Choi, K.B., Morishige, T. und Sato, F. (2001) Purification and characterization of coclaurine *N*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* (56) 649-55.
- Choi, K.B., Morishige, T., Shitan, N., Yazaki, K. und Sato, F. (2002) Molecular cloning and characterization of coclaurine *N*-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *J Biol Chem* (277) 830-5.
- Decker, G., Wanner, G., Zenk, M.H. und Lottspeich, F. (2000) Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* (21) 3500-16.
- De-Eknamkul, W. und Zenk, M.H. (1992) Purification and properties of 1,2-dehydroreticuline reductase from *Papaver somniferum* seedlings. *Phytochemistry* (31) 813-21.
- Dittrich, H. und Kutchan, T.M. (1991) Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *PNAS USA* (88) 9969-73.
- Facchini, P.J. und De Luca, V. (1994) Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *J Biol Chem* (269) 26684-90.
- Facchini, P.J. und De Luca, V. (1995) Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase Genes and the Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in Opium Poppy. *Plant Cell* (07) 1811-21.
- Facchini, P.J., Penzes, C., Johnson, A.G. und Bull, D. (1996) Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiol* (112) 1669-77.
- Facchini, P.J. (2001) ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (52) 29-66.
- Facchini, P.J. und Park, S.U. (2003) Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* (64) 177-86.
- Frenzel, T. und Zenk, M.H. (1990a) Purification and characterization of three isoforms of *S*-adenosyl-L-methionine: (*R,S*)-tetrahydrobenzylisoquinoline-*N*-methyltransferase from *Berberis koetianeana* cell cultures. *Phytochemistry* (29) 3491-97.
- Frenzel, T. und Zenk, M.H. (1990b) *S*-adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-*N*-methyl-(*S*)-coclaurine-4'-*O*-methyl transferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (*S*)-reticuline pathway. *Phytochemistry* (29) 3505-11.
- Frick, S. und Kutchan, T.M. (1999) Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases

- common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J* (17) 329-39.
- Frick, S., Chitty, J.A., Kramell, R., Schmidt, J., Allen, R.S., Larkin, P.J. und Kutchan, T.M. (2004) Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with antisense berberine bridge enzyme gene (*anti-bbe*) via somatic embryogenesis results in an altered ratio of alkaloids in latex but not in roots. *Transgenic Res* (13) 607-13.
- Frick, S., Kramell, R., Larkin, P.J. und Kutchan, T.M. (2005a) Studying morphine biosynthesis using transgenic opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Acta Horticulturae* (680) 37-43.
- Frick, S., Kramell, R., Schmidt, J., Fist, A.J. und Kutchan, T.M. (2005b) Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *J Nat Prod* (68) 666-73.
- Frick, S., Kramell, R. und Kutchan, T.M. (im Druck) Metabolic engineering of a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metabolic Engineering*.
- Garfinkel, D.J. und Nester, E.W. (1980) *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol* (144) 732-43.
- Gerardy, R. und Zenk, M.H. (1992) Formation of salutaridine from (*R*)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* (32) 79-86.
- Gerardy, R. und Zenk, M.H. (1993) Purification and characterization of salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* (34) 125-32.
- Gleave, A.P. (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* (20) 1203-7.
- Gollwitzer, J., Lenz, R., Hampp, N. und Zenk, M.H. (1993) The transformation of neopinone to codeinone in morphine biosynthesis proceeds non-enzymatically. *Tetrah Lett* (34) 5703-06.
- Grothe, T., Lenz, R. und Kutchan, T.M. (2001) Molecular characterization of the salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *J Biol Chem* (276) 30717-23.
- Haas, B., Volfovsky, N., Town, C., Troukhan, M., Alexandrov, N., Feldmann, K., Flavell, R., White, O. und Salzberg, S. (2002) Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation. *Genome Biol* (03) RESEARCH0029. Epub 2002 May 30.
- Hammer, K. und Fritsch, R. (1977) Zur Frage nach der Ursprungsart des Kulturmahns (*Papaver somniferum* L.). *Kulturpflanze* (25) 113-24.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* (166) 557-80.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R. (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* (204) 63-113.
- Hellens, R., Mullineaux, P. und Klee, H. (2000) Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* (05) 446-51.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T. und Yamada, Y. (1994) Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* (06) 723-35.
- Hileman, L.C., Drea, S., Martino, G., Litt, A. und Irish, V.F. (2005) Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant J* (44) 334-41.
- Hirata, K., Poeaknapo, C., Schmidt, J. und Zenk, M.H. (2004) 1,2-Dehydroreticuline synthase, the branch point enzyme opening the morphinan biosynthetic pathway. *Phytochemistry* (65) 1039-46.
- Huang, F.C. und Kutchan, T.M. (2000) Distribution of morphinan and benzo[*c*]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* (53) 555-64.
- Hutvagner, G. und Zamore, P.D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* (12) 225-32.
- Jez, J.M., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Dixon, R.A. und Noel, J.P. (2000) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* (39) 890-902.
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J., Que, Q. und Napoli, C.A. (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* (31) 957-73.
- Joshi, C.P. und Chiang, V.L. (1998) Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol Biol* (37) 663-74.
- Jurna, I. (2003) Sertürner und Morphin - eine historische Vignette. In *Der Schmerz*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, Vol. 17, pp. 280-83.

- Kassem, M.A. und Jacquin, A. (2001) Somatic Embryogenesis, Rhizogenesis, and Morphinan Alkaloids Production in Two Species of Opium Poppy. *J Biomed Biotechnol* (01) 70-78.
- Kato, M., Mizuno, K., Crozier, A., Fujimura, T. und Ashihara, H. (2000) Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature* (406) 956-7.
- Kempe, K. (2003) Herstellung von Vektoren zur "RNA interference" für Gene der Benzylisochinolin-Biosynthese aus *Papaver somniferum* L. *Diplomarbeit, Technische Universität Bergakademie Freiberg*.
- Klahre, U., Crete, P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A. und Meins, F., Jr. (2002) High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *PNAS USA* (99) 11981-6.
- Kodaira, H. und Spector, S. (1988) Transformation of thebaine to oripavine, codeine, and morphine by rat liver, kidney, and brain microsomes. *PNAS USA* (85) 1267-71.
- Kristensen, C., Morant, M., Olsen, C.E., Ekstrom, C.T., Galbraith, D.W., Moller, B.L. und Bak, S. (2005) Metabolic engineering of dhurrin in transgenic Arabidopsis plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *PNAS USA* (102) 1779-84.
- Ku, M.S., Agarie, S., Nomura, M., Fukayama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, M. und Matsuoka, M. (1999) High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol* (17) 76-80.
- Kutchan, T.M. und Dittrich, H. (1995) Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* (270) 24475-81.
- Kutchan, T.M. (1998) Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In Cordell, G.A. (ed.), *The Alkaloids*. Academic Press, San Diego, Vol. 50, pp. 257-316.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (227) 680-5.
- Larkin, P.J., Chitty, J.A. und Brettell, R.I.S. (1999) Methods for plant transformation and regeneration. International patent publication number WO 99/34663.
- Lazo, G.R., Stein, P.A. und Ludwig, R.A. (1991) A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology (NY)* 963-7.
- Le Flem-Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D. und Fliniaux, M.A. (2004) Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A rhizogenes* LBA 9402. *Planta* (218) 890-3.
- Lee, J. und Pedersen, H. (2001) Stable genetic transformation of *Eschscholzia californica* expressing synthetic green fluorescent proteins. *Biotechnol Prog* (17) 247-51.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1994) Closure of the oxide bridge in morphine biosynthesis. *Tetrah Lett* (35) 3897-900.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1995a) Acetyl coenzyme A:salutaridinol-7-O-acetyltransferase from *Papaver somniferum* plant cell cultures. The enzyme catalyzing the formation of thebaine in morphine biosynthesis. *J Biol Chem* (270) 31091-6.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1995b) Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *Eur J Biochem* (233) 132-9.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1995c) Stereoselective reduction of codeinone, the penultimate enzymic step during morphine biosynthesis in *Papaver somniferum*. *Tetrah Lett* (36) 2449-52.
- Liscombe, D.K. und Facchini, P.J. (nicht veröffentlicht) Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine:(S)-tetrahydroprotoberberine-cis-N-methyltransferase from opium poppy. *unveröffentlicht*.
- Loeffler, S., Deus-Neumann, B. und Zenk, M.H. (1995) S-adenosyl-L-methionine:(S)-coclaurine-N-methyltransferase from *Tinospora cordifolia*. *Phytochemistry* (38) 1387-95.
- MacLeod, B.P. und Facchini, P.J. (2005) Methods for regeneration and transformation in *Eschscholzia californica* – a model plant to investigate alkaloid biosynthesis. In Vasquez-Flota, V.M.L.-V.a.F. (ed.), *Plant Cell Culture Protocols, Second Edition*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Mahmoud, S.S. und Croteau, R.B. (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *PNAS USA* (98) 8915-20.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Millgate, A.G., Pogson, B.J., Wilson, I.W., Kutchan, T.M., Zenk, M.H., Gerlach, W.L., Fist, A.J. und Larkin, P.J. (2004) Analgesia: morphine-pathway block in top1 poppies. *Nature* (431) 413-4.
- Morimoto, S., Suemori, K., Moriwaki, J., Taura, F., Tanaka, H., Aso, M., Tanaka, M., Suemune, H., Shimohigashi, Y. und Shoyama, Y. (2001) Morphine metabolism in the opium poppy and its possible physiological function. Biochemical characterization of the morphine metabolite, bismorphine. *J Biol Chem* (276) 38179-84.
- Morishige, T., Tsujita, T., Yamada, Y. und Sato, F. (2000) Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J Biol Chem* (275) 23398-405.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* (155) 335-50.
- Novak, B.H., Hudlicky, T., Reed, J.W., Mulzer, J. und Trauner, D. (2000) Morphine Synthesis and Biosynthesis: An Update. *Curr Org Chem* (04) 343-62.
- Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. und Sano, H. (2003) Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* (423) 823.
- O'Keefe, B.R. und Beecher, C. (1994) Isolation and Characterization of S-Adenosyl-L-Methionine:Tetrahydroberberine-cis-N-Methyltransferase from Suspension Cultures of *Sanguinaria canadensis* L. *Plant Physiol* (105) 395-403.
- Ounaron, A., Decker, G., Schmidt, J., Lottspeich, F. und Kutchan, T.M. (2003) (R,S)-Reticuline 7-O-methyltransferase and (R,S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum* - cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant J* (36) 808-19.
- Page, J.E. (2005) Silencing nature's narcotics: metabolic engineering of the opium poppy. *Trends Biotechnol* (23) 331-33.
- Panicot, M., Minguet, E., Ferrando, A., Alcazar, R., Blazquez, M., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C. und Tiburcio, A. (2002) A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* (14) 2539-51.
- Park, S.U., Johnson, A.G., Penzes-Yost, C. und Facchini, P.J. (1999) Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberine bridge enzyme genes involved in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Mol Biol* (40) 121-31.
- Park, S.U. und Facchini, P.J. (2000) Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *J Exp Bot* (51) 1005-16.
- Park, S.U. und Facchini, P.J. (2001) Somatic embryogenesis from embryogenic cell suspension cultures of California poppy, *Eschscholzia californica* Cham. *In Vitro Cell Devel Biol - Plant* (37) 35-39.
- Park, S.U., Yu, M. und Facchini, P.J. (2002) Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Physiol* (128) 696-706.
- Park, S.U., Yu, M. und Facchini, P.J. (2003) Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Mol Biol* (51) 153-64.
- Pauli, H.H. und Kutchan, T.M. (1998) Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J* (13) 793-801.
- Rice, K.C. (1980) Synthetic opium alkaloids and derivatives. A short total synthesis of (+)-dihydrothebainone, (+)-dihydrocodeinone, and (+)-nordihydrocodeinone as an approach to a practical synthesis of morphine, codeine, and congeners. *J Org Chem* (45) 3135-37.
- Riechers, D.E. und Timko, M.P. (1999) Structure and expression of the gene family encoding putrescine N-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: new clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Mol Biol* (41) 387-401.
- Rosco, A., Pauli, H.H., Priesner, W. und Kutchan, T.M. (1997) Cloning and heterologous expression of NADPH-cytochrome P450 reductases from the Papaveraceae. *Arch Biochem Biophys* (348) 369-77.
- Rueffer, M., El-Shagi, H., Nagakura, N. und Zenk, M.H. (1981) (S)-Norlaudanosoline Synthase: The first enzyme in the benzyloquinoline biosynthetic pathway. *FEBS letters* (129) 5-9.

- Rueffer, M., Nagakura, N. und Zenk, M.H. (1983) Partial purification and properties of S-adenosylmethionine:(R), (S)-norlaudanolin-6-O-methyltransferase from *Argemone platyceras* cell cultures. *Planta Med* (49) 131–37.
- Rueffer, M. und Zenk, M.H. (1986) S-adenosyl-L-methionine: (S) -7,8,13, 14-tetrahydroberberine-N-methyltransferase, a branch point enzyme in the biosynthesis of benzophenanthridine and protopine alkaloids. *Tetrah Lett* (27) 5603-04.
- Rueffer, M., Zumstein, G. und Zenk, M.H. (1990) Partial purification of S-adenosyl-L-methionine:(S)-tetrahydroprotoberberine-cis N-methyltransferase from suspension cultured cells of *Eschscholtzia* and *Corydalis*. *Phytochemistry* (29) 3727-33.
- Sala, F., Manuela Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A.M. und Castiglione, S. (2003) Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* (21) 803-08.
- Samanani, N. und Facchini, P.J. (2002) Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* (277) 33878-83.
- Samanani, N., Liscombe, D.K. und Facchini, P.J. (2004) Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J* (40) 302-13.
- Samanani, N., Park, S.U. und Facchini, P.J. (2005) Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* (17) 915-26.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* (74) 5463-7.
- Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y., Yoshida, S. und Yamada, Y. (1994) Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: norcoclaurine 6-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur J Biochem* (225) 125-31.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K., Choi, K.B., Morishige, T., Fujimoto, H. und Yamada, Y. (2001) Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *PNAS USA* (98) 367-72.
- Satyanarayana, K.V., Kumar, V., Chandrashekar, A. und Ravishankar, G.A. (2005) Isolation of promoter for N-methyltransferase gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. *J Biotechnol* (119) 20-25.
- Schünmann, P.H.D., Llewellyn, D.J., Surin, B., Boevink, P., Feyter, R.C.D. und Waterhouse, P.M. (2003) A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology. *Func Plant Biol* (30) 443-52.
- Sertürner, F. (1806) Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. *J Pharm (Leipzig)* (14) 33–37.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* (98) 503-17.
- Steffens, P., Nagakura, N. und Zenk, M.H. (1985) Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry* (24) 2577-83.
- Stenzel, O., Teuber, M. und Dräger, B. (2006) Putrescine N-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta* (223) 200-12.
- Szabo, B., Lakatos, A., Koszegi, T., Katay, G. und L, B. (2005) Thin-layer chromatography-densitometry and liquid chromatography analysis of alkaloids in leaves of *Papaver somniferum* under stress conditions. *J AOAC Int* (88) 1571-7.
- Takeshita, N., Fujiwara, H., Mimura, H., Fitchen, J.H., Yamada, Y. und Sato, F. (1995) Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol* (36) 29-36.
- Tanahashi, T. und Zenk, M.H. (1990) New hydroxylated benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *J Nat Prod* (53) 579-86.
- Uefuji, H., Ogita, S., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. und Sano, H. (2003) Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiol* (132) 372-80.

- Unterlinner, B., Lenz, R. und Kutchan, T.M. (1999) Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Plant J* (18) 465-75.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. und Wang, M.B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *PNAS USA* (95) 13959-64.
- Weid, M., Ziegler, J. und Kutchan, T.M. (2004) The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *PNAS USA* (101) 13957-62.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. und Waterhouse, P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* (27) 581-90.
- Wesley, S.V., Helliwell, C., Wang, M.B. und Waterhouse, P. (2004) Posttranscriptional gene silencing in plants. *Methods Mol Biol* (265) 117-29.
- Winkel, B.S.J. (2004) METABOLIC CHANNELING IN PLANTS. *Ann Rev Pl Biol* (55) 85-107.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. und Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* (287) 303-5.
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K.M., Xu, T., Pi, Y., Wang, Z., Zhang, H., Kai, G., Liao, Z., Sun, X. und Tang, K. (2004) Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *PNAS USA* (101) 6786-91.
- Ziegler, J., Diaz-Chavez, M.L., Kramell, R., Ammer, C. und Kutchan, T.M. (2005) Comparative macroarray analysis of morphine containing *Papaver somniferum* and eight morphine free *Papaver* species identifies an *O*-methyltransferase involved in benzyloquinoline biosynthesis. *Planta* (222) 458-71.
- Ziegler, J., Voigtlander, S., Schmidt, J., Kramell, R., Miersch, O., Ammer, C., Gesell, A. und Kutchan, T.M. (2006) Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *Plant J* (im Druck, Epub 13. September).
- Zubieta, C., Ross, J.R., Koscheski, P., Yang, Y., Pichersky, E. und Noel, J.P. (2003) Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell* (15) 1704-16.

8. Anhang

8.1 Wildtyppflanzen CO58-34

Tabelle 8.1: gemittelte prozentuale Zusammensetzung des Latex der Wildtyppflanzen zu den Generationen T0, T1 und T2 und der Gesamtalkaloidgehalt ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ lösl. Protein)

Gen.	Mor	Cod	Theb	Ori	Ret	MW328	Laud	Laus	gesamt
T0	27,6 \pm 6,3	17,0 \pm 3,3	48,2 \pm 8,2	2,1 \pm 0,8	1,5 \pm 1,3	0,2 \pm 0,2	1,6 \pm 0,4	1,9 \pm 0,5	2070 \pm 623
T1	27,0 \pm 4,9	16,0 \pm 4,5	46,9 \pm 5,9	3,5 \pm 1,3	1,0 \pm 0,2	0,6 \pm 0,3	3,0 \pm 0,5	1,9 \pm 0,2	872 \pm 264
T2	33,0 \pm 6,8	13,4 \pm 4,2	44,7 \pm 9,8	4,3 \pm 1,3	0,7 \pm 0,2	0,9 \pm 0,5	1,8 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	574 \pm 229

8.2 T0-Generation der *7omt-sense*-Pflanzen

Tabelle 8.2: T0-Generation: prozentuale Zusammensetzung des Latex der T0-Pflanzen und ihr Gesamtalkaloidgehalt ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ lösl. Protein); Die Elternpflanzen der T1-Generation sind gelb unterlegt.

Probe	Mor	Cod	Theb	Ori	Ret	MW328	Laud	Laus	gesamt
PL-3-1	5,12	4,69	77,49	2,06	1,34	8,45	0,42	0,44	3146
PL-3-2	3,66	4,97	85,06	1,42	0,50	0,11	2,21	2,06	1810
PL-3-3	3,16	4,46	87,83	1,23	0,22	0,14	1,25	1,72	2677
24-1	1,77	3,18	90,71	0,84	0,60	0,76	1,29	0,86	2748
24-2	26,06	20,71	46,91	1,47	0,98	0,58	2,20	1,11	2861
24-4-A	3,86	2,62	88,58	1,73	0,69	0,21	1,43	0,89	1480
24-4-B	4,07	2,38	88,00	1,27	0,55	0,89	1,59	1,25	1150
24-5-A	2,19	4,12	89,11	0,88	0,78	0,33	1,71	0,90	1719
24-5-B	2,42	3,09	91,20	1,25	0,50	0,38	0,24	0,94	2771
24-6	2,98	5,56	87,22	0,90	0,65	0,52	1,19	0,97	1981
24-7	20,10	12,67	59,48	2,84	0,79	0,49	2,10	1,53	1385
24-8	3,47	5,18	84,35	1,63	0,46	0,70	2,59	1,62	1487
24-9	3,76	3,33	86,48	1,49	0,74	0,68	2,45	1,05	1173
24-10	2,65	2,18	90,74	1,63	0,23	0,47	1,00	1,10	2379
24-11	2,13	7,79	84,47	0,53	0,43	1,06	2,02	1,58	2767
24-12-A	1,56	4,11	89,48	0,61	0,45	0,39	1,61	1,79	2161
24-12-B	1,44	3,50	90,00	0,64	0,48	0,40	2,00	1,54	2017
24-13	25,73	12,73	51,96	3,22	0,45	0,60	2,82	2,49	1381
24-14	4,11	4,70	85,75	1,29	0,38	0,26	2,14	1,39	774
24-15	24,85	13,01	51,50	4,73	0,34	0,25	2,34	2,98	738
24-16	22,81	30,49	39,27	0,37	0,89	1,88	1,98	2,32	334
24-17	1,82	5,23	88,07	0,71	0,54	0,57	1,84	1,23	1299
24-19	2,79	4,56	88,56	0,79	0,36	0,81	1,24	0,90	1756
24-20	0,60	2,19	91,61	0,60	0,94	0,49	2,71	0,87	1155
24-21	4,97	4,70	84,38	1,15	0,46	0,79	1,90	1,65	1416
24-22	1,35	3,45	89,35	0,83	0,51	0,21	2,08	2,21	1063
24-23	3,79	6,14	83,54	1,41	0,90	0,40	2,29	1,54	1171
24-24	9,46	5,45	77,88	2,48	0,96	0,41	2,09	1,26	1225
24-25	30,43	13,21	45,86	3,95	1,02	0,59	2,20	2,75	712
24-26	31,65	18,37	41,82	2,91	0,81	0,40	2,77	1,27	401
II-24-2	9,51	11,81	73,29	1,62	0,86	0,66	1,00	1,25	3528
II-24-4	1,19	2,54	91,12	0,82	0,57	0,40	1,47	1,89	1509
26-1-A	12,86	5,63	73,30	2,93	0,60	0,84	2,37	1,48	519
26-1-B	10,85	5,36	75,80	3,42	0,82	0,53	2,02	1,20	1303
26-2	1,21	3,55	91,02	0,66	0,35	0,20	1,86	1,14	1979
MW K	27,55	17,05	48,21	2,10	1,46	0,20	1,57	1,87	2070
Stabw.	6,3	3,3	8,2	0,8	1,3	0,2	0,4	0,5	623

8.3 T1-Generation der *7omt-sense*-Pflanzen

Southern-Blot der T1-Nachkommen von T0:26-2

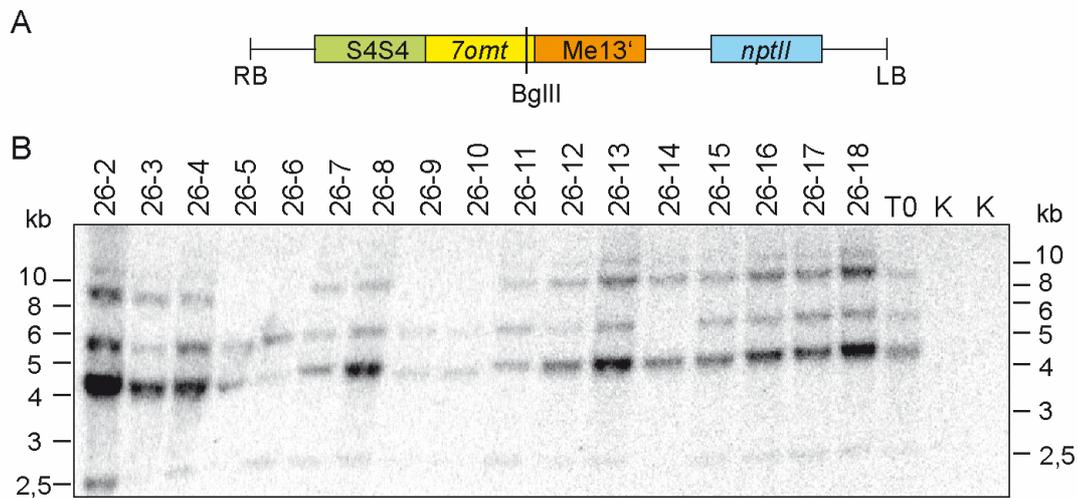


Abb. 8.1: Southern Blot-Analyse der Nachkommen der T0-Pflanze 26-2; **A**: Schematische Darstellung der ins Genom übertragenen T-DNS mit der BglIII-Schnittstelle. **B**: Southern-Blot mit DNS von 17 Nachkommen, der Elternpflanze T0:26-2 (T0) und des Wildtyps CO58-34 (K). Aufgetragen wurden je 10 µg genomische DNS nach BglIII-Verdau. Die Hybridisierung erfolgte mit *nptII*. Eine auf dem Blot sichtbare Bande entspricht mindestens einer eingebrachten Kopie des Transgens.

Tabelle 8.3: T1-Generation: prozentuale Anteile der gemessenen Alkaloide im Kapsellatex und der Gesamtalkaloidgehalt in µg/100 µg lösliches Protein; Die Eltern der T2-Generation sind gelb unterlegt.

Probe	Mor	Cod	Theb	Ori	Ret	MW328	Laud	Laus	gesamt
11-1	6,86	26,43	58,22	2,14	0,98	0,38	2,69	2,29	996
11-2	34,60	39,95	18,99	0,50	1,06	0,20	2,99	1,71	436
11-3	48,32	27,75	18,53	0,38	0,81	0,20	2,68	1,33	450
11-4	33,95	15,59	40,97	2,79	1,42	0,48	3,06	1,74	1129
11-5	15,00	19,97	56,09	1,58	0,96	0,55	3,14	2,71	641
11-6A	32,80	30,77	29,57	1,13	0,69	0,17	3,26	1,61	455
11-7	36,97	18,98	34,93	2,63	0,84	0,45	3,23	1,97	663
11-8	27,96	18,08	45,75	1,61	1,09	0,78	3,22	1,50	910
11-9	38,73	24,58	28,30	1,26	1,54	0,63	3,17	1,79	736
11-10	24,80	16,61	49,20	2,82	0,95	0,91	2,66	2,05	1091
11-11	31,02	30,24	32,58	0,81	0,88	0,14	2,63	1,71	330
11-12	28,27	18,93	42,64	2,71	0,64	0,48	4,39	1,93	1292
11-13	26,78	26,66	42,46	1,19	0,83	0,20	0,61	1,28	375
11-14	36,41	30,44	25,04	0,69	1,29	0,23	3,70	2,20	616
11-15	35,30	23,13	31,65	2,49	1,09	0,28	3,30	2,75	549
11-16	36,06	33,23	25,45	0,56	1,46	0,21	2,04	1,00	365
13-1	33,95	26,55	29,83	3,04	0,86	0,19	3,34	2,23	636
13-2	38,14	16,87	36,03	3,08	0,92	0,14	3,07	1,75	386
13-3	26,55	14,12	49,32	4,30	1,15	0,42	2,55	1,59	1148
13-4	27,27	7,87	52,52	6,35	0,84	0,14	3,44	1,58	821
13-5	19,65	2,32	61,79	11,36	0,83	0,42	2,17	1,47	873
13-6	22,18	5,90	59,08	7,32	0,72	0,32	2,81	1,66	960
13-7	16,53	17,52	56,63	3,00	1,31	0,38	2,93	1,72	1497
13-8	28,81	9,17	51,22	3,72	1,28	0,53	3,23	2,04	909
13-9	20,61	3,01	63,48	7,97	0,67	0,42	2,13	1,71	904
13-10	26,09	13,39	48,86	5,06	1,12	0,27	3,07	2,13	921
13-11	30,78	23,07	35,71	4,02	0,87	0,40	3,20	1,95	939

Fortsetzung: nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 8.3

Probe	Mor	Cod	Theb	Ori	Ret	MW328	Laud	Laus	gesamt
22-1	23,58	18,48	48,43	2,00	1,18	0,78	3,46	2,09	1427
22-3	25,06	17,75	48,52	2,57	1,08	0,59	2,76	1,67	1315
22-4	27,29	12,30	51,81	3,32	0,78	0,56	2,34	1,60	896
22-5	22,82	15,54	52,55	3,31	0,91	0,36	2,82	1,69	794
22-6	25,05	16,78	49,24	2,91	1,47	0,42	2,51	1,62	951
22-7	30,96	13,16	45,55	4,94	1,30	0,28	2,39	1,43	892
22-8	23,69	14,44	51,36	4,45	1,23	0,74	2,47	1,62	1275
22-9	21,43	17,99	50,90	2,28	1,24	0,79	3,43	1,95	881
22-10	31,35	20,39	38,69	2,45	1,18	0,93	3,08	1,92	564
22-11	26,32	21,50	43,53	2,24	1,08	0,42	2,86	2,04	493
22-12	25,30	19,95	44,90	1,92	1,30	0,82	3,69	2,11	642
22-13	29,26	11,18	49,09	3,99	1,04	0,59	3,00	1,86	1073
22-14	28,64	15,56	46,47	2,63	1,47	0,59	3,00	1,64	916
22-15	23,92	11,32	54,37	4,98	1,04	0,35	2,26	1,75	1199
25-1	24,73	16,78	48,46	3,15	1,02	0,72	3,28	1,86	798
25-2	25,96	9,43	50,44	8,62	0,60	0,36	2,46	2,13	1044
25-3	24,39	24,86	41,17	2,18	1,27	0,46	3,81	1,87	789
25-4	29,44	17,59	44,19	2,38	1,58	0,38	2,79	1,65	802
25-5	25,31	19,58	46,09	3,05	1,34	0,55	2,50	1,58	1167
25-6	32,82	17,64	40,68	3,28	1,22	0,55	2,21	1,60	1079
25-7	16,18	9,00	65,62	4,30	0,80	0,37	1,90	1,82	1942
25-8	34,17	12,30	43,64	3,68	1,01	0,41	2,53	2,26	976
25-10	29,58	16,83	44,50	3,23	1,33	0,54	2,23	1,76	1054
25-11	24,60	14,39	51,74	4,13	1,04	0,63	1,86	1,61	951
25-12	28,82	15,55	46,75	3,67	1,03	0,49	2,11	1,59	829
25-13	37,21	17,33	37,00	2,82	1,35	0,70	2,18	1,42	655
25-14	32,45	15,32	43,66	3,52	0,95	0,40	1,85	1,84	668
25-15	33,59	11,35	43,15	5,84	0,95	0,48	2,55	2,10	1192
25-16	32,68	15,64	43,49	2,91	1,05	0,28	2,10	1,87	719
25-17	26,53	11,73	52,54	4,97	0,77	0,29	1,64	1,52	933
26-2	25,90	12,38	50,68	4,64	0,93	0,37	3,41	1,68	1376
26-3	28,49	13,10	47,57	4,33	1,06	0,58	3,19	1,69	1601
26-4	33,73	22,65	33,50	1,13	1,50	0,68	4,37	2,45	474
26-5	26,01	18,67	45,47	2,92	1,08	0,78	2,87	2,19	918
26-6	27,32	15,94	46,46	3,20	1,08	0,73	3,30	1,98	862
26-7	29,64	19,52	39,56	3,71	1,10	0,66	3,66	2,15	887
26-8	23,76	14,28	50,93	3,90	1,10	0,64	3,52	1,87	1132
26-9	28,64	16,40	46,01	3,10	0,99	0,29	2,78	1,79	469
26-10	19,89	14,25	54,74	4,19	1,14	0,25	3,37	2,17	1094
26-11	26,97	14,56	46,41	3,97	1,56	0,68	4,00	1,85	906
26-12	26,05	16,86	46,33	3,61	1,20	0,42	3,57	1,96	846
26-13	26,89	9,46	53,90	4,27	0,74	0,07	2,74	1,92	852
26-14	19,33	10,22	59,99	5,77	0,71	0,16	2,41	1,41	896
26-15	28,30	11,74	51,05	3,53	0,81	0,37	2,45	1,74	860
26-16	33,63	17,91	39,30	3,41	1,23	0,48	2,36	1,69	719
26-17	34,10	15,04	41,88	3,82	1,07	0,19	2,36	1,54	678
26-18	24,22	11,71	53,52	4,88	0,88	0,41	2,41	1,95	1467
PL2-1	22,19	9,94	56,51	5,61	0,82	0,47	2,88	1,59	1421
PL2-3A	29,17	18,54	42,15	4,09	0,93	0,26	3,16	1,71	3320
PL2-3B	17,31	13,59	55,80	6,26	1,28	0,48	3,53	1,74	1416
PL2-4	14,57	26,36	50,81	1,33	1,37	0,70	3,23	1,63	1152
PL2-5	17,86	14,45	57,81	3,66	1,08	0,81	2,60	1,73	1180
PL3-1	26,74	16,98	46,69	4,29	1,09	0,34	2,23	1,65	993
PL3-2	23,58	14,16	51,84	5,48	0,93	0,36	2,05	1,61	1045
PL3-3	29,34	15,04	46,25	4,78	0,85	0,17	2,03	1,55	778
MW-K	27,04	16,04	46,89	3,52	1,01	0,61	2,99	1,90	872
StabwK	4,85	4,45	5,85	1,29	0,19	0,26	0,49	0,24	264

8.4 T2-Generation der *7omt-sense*-Pflanzen

Tabelle 8.4: T2-Generation: prozentualer Anteil der gemessenen Alkaloide im Latex und der Gesamtalkaloidgehalt in µg/100µg lösliches Protein

Probe	Mor	Cod	Theb	Ori	Ret	MW328	Laud	Laus	gesamt
11-2-2	55,64	18,09	21,65	0,87	0,52	0,39	1,63	1,20	249
11-2-3	54,32	20,08	20,64	0,86	0,65	1,01	1,49	0,95	180
11-2-5	58,41	24,86	11,71	0,40	0,69	0,99	1,82	1,12	236
11-2-6	54,19	20,38	19,56	0,76	0,74	1,13	2,08	1,17	227
11-2-7	43,45	19,88	28,35	1,78	1,04	2,13	2,23	1,14	699
11-2-8	60,97	15,13	17,67	0,88	0,91	1,81	1,82	0,80	88
11-3-1	44,65	13,90	33,40	3,12	0,75	0,82	1,99	1,37	367
11-3-3	39,88	12,44	39,02	3,61	0,77	0,87	2,22	1,18	631
11-3-4	49,81	13,80	30,59	1,74	0,70	0,68	1,60	1,08	250
11-3-5	48,38	18,51	24,47	2,32	0,57	2,23	2,18	1,34	399
11-3-6	48,04	14,28	28,69	3,25	0,99	0,91	2,29	1,54	309
11-6A-1	64,84	17,31	12,36	0,96	0,89	0,66	1,94	1,03	274
11-6A-2	50,36	19,42	25,05	1,74	0,44	0,55	1,71	0,73	260
11-6A-3	50,27	15,11	27,95	2,83	0,63	0,45	1,69	1,06	239
11-6A-5	63,53	18,42	10,57	0,48	1,03	1,64	2,64	1,68	312
11-6A-6	43,11	18,99	31,99	1,76	0,68	0,54	1,75	1,18	278
11-6A-8	45,17	14,92	31,46	2,71	0,86	1,23	1,96	1,68	475
11-9-2	54,24	16,91	21,90	1,29	1,14	1,01	2,56	0,95	407
11-9-3	43,53	12,03	36,24	3,77	0,67	0,92	1,69	1,14	341
11-9-4	37,08	18,07	36,14	2,64	0,77	2,02	1,91	1,37	252
11-9-5	56,59	16,02	21,45	1,40	1,05	0,80	1,79	0,92	288
11-9-7	44,06	13,86	33,68	2,59	0,99	1,39	2,37	1,06	493
11-9-8	45,59	19,55	25,76	1,26	0,81	3,54	2,09	1,39	123
11-12-1	40,38	9,10	40,25	5,81	0,53	0,68	1,59	1,65	622
11-12-3	26,95	7,76	55,49	5,44	0,34	0,34	2,13	1,57	423
11-12-4	28,37	6,95	53,92	7,52	0,26	0,60	1,25	1,12	788
11-12-5	36,58	10,11	44,80	4,35	0,53	0,00	1,84	1,78	477
11-12-6	39,48	8,80	42,03	5,27	0,50	0,72	1,77	1,43	608
11-12-7	30,78	6,99	50,38	8,71	0,21	0,50	1,16	1,28	526
11-12-8	34,78	11,08	45,20	4,33	0,31	1,53	1,43	1,35	646
11-15-1	42,28	12,83	36,18	3,07	1,05	0,87	2,52	1,21	554
11-15-2	48,59	12,00	31,26	2,80	1,02	0,82	2,45	1,05	461
11-15-4	45,12	15,45	32,10	2,60	0,61	0,96	1,90	1,27	216
11-15-6	37,18	10,29	42,97	4,15	0,97	1,35	2,07	1,01	621
11-15-7	31,69	19,67	40,90	2,37	0,56	1,85	1,81	1,15	502
11-15-8	29,28	10,68	49,38	6,16	0,67	0,80	1,65	1,38	919
11-16-3	62,92	14,28	17,23	1,27	0,92	0,79	1,71	0,87	191
11-16-4	57,42	17,92	18,11	0,90	1,17	1,16	2,22	1,10	156
11-16-6	53,70	16,16	22,84	1,72	1,07	0,89	2,54	1,09	438
11-16-7	43,64	19,24	30,40	1,43	1,27	0,53	2,42	1,07	295
13-2-1	48,46	15,79	25,77	3,12	1,01	1,18	2,96	1,71	538
13-2-3	34,11	14,44	38,46	5,40	1,40	1,28	2,37	2,54	847
13-2-5	25,77	11,17	53,75	4,02	1,06	1,03	1,97	1,23	965
13-2-6	29,17	12,39	48,25	5,14	0,79	0,78	2,12	1,35	482
13-2-7	45,36	21,61	24,11	2,50	1,58	1,07	2,48	1,30	276
13-2-8	48,90	12,48	29,14	4,11	0,68	0,98	2,31	1,40	345
13-5-1	36,54	8,09	41,21	8,65	0,50	1,16	2,29	1,56	406
13-5-4	26,73	3,45	51,23	13,90	0,28	0,47	1,58	2,37	643
13-5-5	26,59	4,88	51,73	12,12	0,40	0,72	1,97	1,58	874
13-5-7	24,67	5,69	56,11	8,79	0,45	0,62	1,68	1,99	763

Fortsetzung: nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 8.4

Probe	Mor	Cod	Theb	Ori	Ret	MW328	Laud	Laus	gesamt
22-6-1	31,72	18,46	41,63	2,07	0,70	2,10	2,04	1,29	294
22-6-2	37,94	21,54	33,40	1,49	0,92	1,65	1,79	1,27	141
22-6-3	31,65	14,12	46,46	2,39	1,06	0,88	2,21	1,24	539
22-6-4	36,84	18,24	38,57	1,76	0,74	0,91	1,89	1,06	348
22-6-5	25,88	16,07	51,19	2,77	0,88	0,00	2,01	1,19	242
22-6-6	38,95	16,89	35,22	1,62	1,47	1,54	2,72	1,58	212
22-6-7	24,04	20,38	49,02	1,53	1,21	0,63	1,81	1,38	461
22-6-8	37,27	20,39	35,81	1,69	0,67	0,70	1,96	1,50	370
22-14-1	47,92	11,65	29,49	4,81	1,44	1,54	1,98	1,15	215
22-14-2	47,74	20,87	23,74	1,32	0,96	1,85	2,34	1,18	337
22-14-3	45,10	16,98	30,16	1,73	0,99	1,80	2,17	1,07	411
22-14-4	26,99	24,17	43,15	1,32	0,87	0,20	1,99	1,30	149
22-14-5	42,44	20,35	28,59	2,70	0,92	1,72	2,00	1,27	361
22-14-6	38,29	18,44	34,55	2,13	1,08	1,86	2,25	1,39	408
22-14-7	35,40	21,09	35,14	2,16	0,78	2,11	2,02	1,30	794
22-14-8	38,45	14,52	37,61	3,72	1,27	1,52	1,89	1,02	539
25-7-1	27,11	10,72	51,75	5,24	0,43	1,87	1,67	1,22	959
25-7-2	37,29	11,06	40,97	6,32	0,39	0,91	1,74	1,32	663
25-7-4	26,71	8,21	53,14	6,36	0,47	2,02	1,77	1,31	1147
25-7-6	19,68	9,30	60,41	6,47	0,42	0,98	1,56	1,18	680
25-7-7	16,47	9,89	63,41	5,56	0,42	1,47	1,56	1,21	1060
25-13-1	47,87	19,99	26,29	1,73	0,56	0,92	1,57	1,07	272
25-13-2	44,79	13,53	33,68	3,52	0,47	1,29	1,56	1,18	388
25-13-3	49,26	13,64	26,84	3,55	0,86	2,13	2,30	1,41	455
25-13-4	41,88	12,75	37,10	4,47	0,39	0,96	1,25	1,21	700
25-13-5	46,86	17,69	28,67	2,46	0,62	0,70	1,91	1,09	521
25-13-6	56,91	16,82	19,68	2,13	0,66	0,46	2,19	1,15	461
25-13-7	38,18	12,01	42,47	2,80	0,44	0,64	1,65	1,81	880
25-13-8	43,74	17,71	32,21	1,89	0,69	0,81	1,88	1,05	406
26-4-2	37,20	10,49	43,51	4,57	0,34	1,05	1,61	1,23	371
26-4-3	36,68	13,43	40,40	3,66	0,57	1,68	2,29	1,29	382
26-4-4	30,18	10,77	46,28	7,88	0,58	0,65	2,06	1,60	418
26-4-5	25,02	7,26	58,26	5,37	0,40	1,12	1,38	1,19	725
26-4-6	44,43	9,00	36,27	5,33	0,47	1,68	1,50	1,31	412
26-4-7	45,04	16,45	31,33	2,37	0,60	0,23	2,40	1,58	114
26-4-8	36,66	14,57	41,32	3,59	0,58	0,67	1,51	1,11	406
26-11-1	32,01	7,95	47,84	8,05	0,39	0,30	2,06	1,40	254
26-11-2	47,88	13,71	29,10	3,11	1,63	0,58	2,68	1,30	169
26-11-3	31,40	11,53	48,28	4,30	0,89	0,99	1,56	1,06	312
26-11-5	42,09	11,21	36,78	5,04	0,69	0,72	2,09	1,39	236
26-11-7	56,04	15,25	20,38	1,63	1,58	0,49	3,20	1,43	153
26-11-8	36,14	8,19	44,34	6,82	0,53	1,19	1,67	1,11	134
26-14-1	23,20	5,22	59,02	9,31	0,32	0,43	1,30	1,19	786
26-14-2	28,46	9,11	51,02	6,83	0,40	0,90	1,79	1,50	1111
26-14-3	16,80	4,37	66,45	8,78	0,36	0,57	1,47	1,20	1777
26-14-4	20,93	8,24	58,97	7,55	0,54	0,91	1,63	1,24	1216
26-14-5	21,61	5,00	61,40	7,65	0,50	1,02	1,57	1,25	644
26-14-6	21,42	10,76	57,14	5,23	0,81	1,38	1,86	1,39	1359
26-14-7	25,42	7,22	54,39	9,06	0,39	0,76	1,58	1,18	980
26-14-8	21,05	8,44	58,82	6,95	0,48	1,22	1,69	1,36	1515
MW K.	33,0	13,4	44,7	4,3	0,7	0,9	1,8	1,2	574
Stabw.	6,8	4,2	9,8	1,3	0,2	0,5	0,3	0,2	229

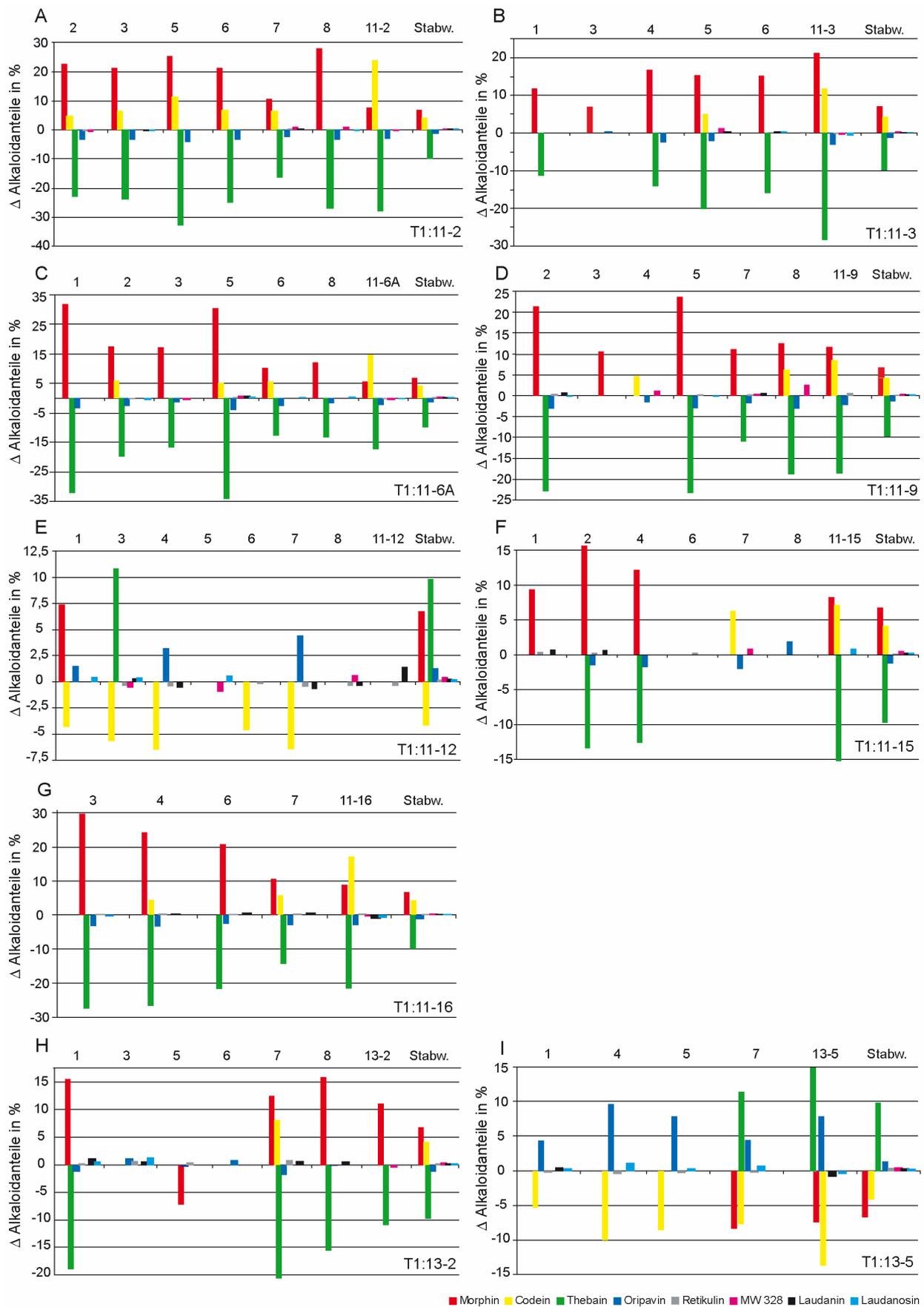


Abb. 8.2: T2-Alkaloidprofile: Dargestellt sind die Abweichungen (Δ) vom Alkaloidgehalt der Wildtyppflanzen. Gezeigt sind die über die einfache Standardabweichung hinausgehenden %-Werte; Aufgetragen wurden die Veränderungen im Latex der T2-Pflanzen, die Abweichung der T1-Pflanzen von den T1-Kontrollen und die Standardabweichungen (Stabw.). Die Eltern der T2-Pflanzen sind A: T1:11-2, B: T1:11-3, C: T1:11-6A, D: T1:11-9, E: T1:11-12, F: T1:11-15, G: T1:11-16, H: T1:13-2, I: T1:13-5

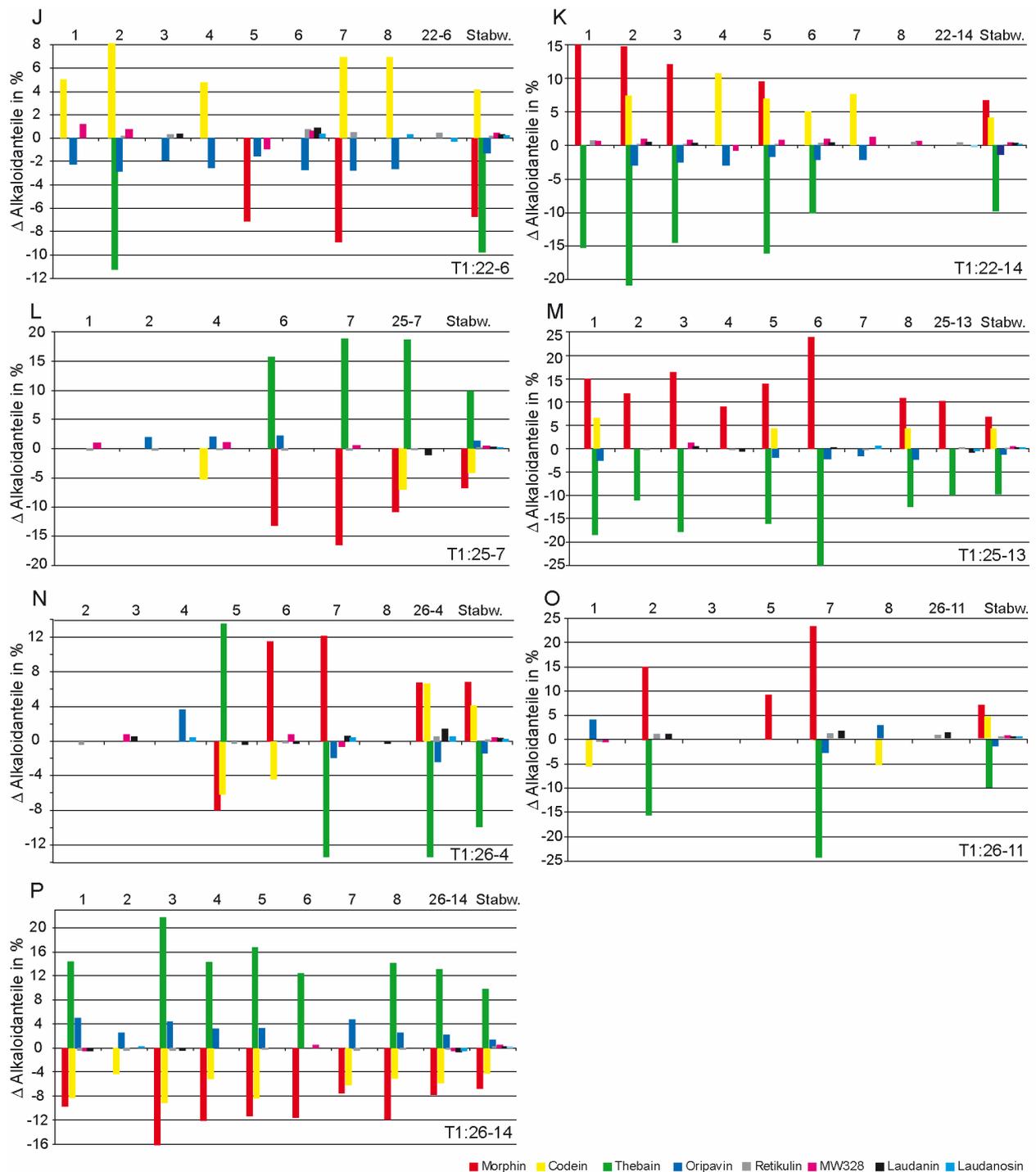


Abb. 8.3: T2-Alkaloidprofile: Dargestellt sind die Abweichungen (Δ) vom Alkaloidgehalt der Wildtyppflanzen. Gezeigt sind die über die einfache Standardabweichung hinausgehenden %-Werte; Aufgetragen wurden die Veränderungen im Latex der T2-Pflanzen, die Abweichung der T1-Pflanzen von den T1-Kontrollen und die Standardabweichungen (Stabw.). Die Eltern der T2-Pflanzen sind J: T1:22-6, K: T1:22-14, L: T1:25-7, M: T1:25-13, N: T1:26-4, O: T1:26-11, P: T1:26-14

8.5 Putative Stylopin-*N*-Methyltransferase

8.5.1 Vergleich der Nukleotidsequenzen der *smt*-Klone 4 und 5

```

1      ATGGGTTCAATAGATGATGTCAAGAAGGAATCAGCAGGGGAAACACTAAGGAGATTGTTGAAAGGAGAGATTTAAA
1      ATGGGTTCAATAGATGAAGTGAAGAAGGAATCAGCAGGGGAAACACTAGGGAGATTGTTGAAAGGAGAGATTTAAA

76     GATGAGGAACTGAAGAAGCTGATTAAAGTTTTCAATTCGAGAAACGCTCTGCAATGGGGTTATAAATCATCTCATCAA
76     GATGAGGAACTCAAGAAGCTGATTAAAGTTTTCAATTCGAAAAACGCTCTGCAATGGGGTTATAAATCATCTCATCAA

151    GAACAACCTCTCCTTCAACCTTGACTTCATTAATCCTTAAAAAAGATGGAAATGTCAGGAGAGATTGAGACAATG
151    GAACAACCTCTCCTTCAACCTTGACTTCATTAATCCTTAAAAAAGATGGAAATGTCAGGAGAGATTGAGACAATG

226    AACAAGGAAACCTATGAATTACCGTCAAGAATTCTTAGAGGCAGTTTTGGGAAAACGTGTCAAGCAAAGTATGTGT
226    AACAAGGAAACCTATGAATTACCGTCTGAATTCTTAGAGGCAGTTTTGGAAAACGTGTCAAGCAAAGTATGTGT

301    TACTTCACACATGAATCAGCAACAATAGACGAAGCAGAAGAAGCTGCACATGAATTATACTGTGAACGAGCACAA
301    TACTTCAACATGAATCAGCAACAATAGACGAAGCAGAAGAAGCTGCACATGAATTATACTGCGAACGAGCACAA

376    ATCAAAGAAGGACAAAACCTGTTCTTGACATTGGTTGTGGTCAAGGTGGTCTAGTCTATACATTGCTCAGAAATAT
376    ATCAAAGATGGACAAAACCTGTTCTTGACATTGGTTGTGGTCAAGGTGGTCTAGTCTATACATCGCTCAGAAATAT

451    AAGAAGTGCATGTTACAGGGCTCACTAATCAAAGGCACAAGTCAATTACTTACTCAAGCAAAGCAGAGAAGCTT
451    AAGAAGTGCATGTTACAGGGCTCACTAATCAAAGGCACAAGTCAATTACTTACTCAAGCAAAGCAGAGAAGCTT

526    GGGTTGACAAAACGTCGACGCCATACTAGCAGATGTTACTCAGTATGAATCTGACAAGACATACGATCGTCTACTT
526    GGGTTGACAAAACGTCGACGCCATACTAGCAGATGTTACTCAGTATGAATCTGACAAGACATACGATCGTCTACTT

601    ATGATTGAAGCCATAGAGCATATGAAAAAATTACAGCTGTTTATGAAGAACTATCAACTTGGATGACAAAAGAA
601    ATGATCGAAGCCATAGAGCATATGAAAAATTTACAGCTGTTTATGAAGAACTATCAACTTGGATGACAAAAGAA

676    AGTCTTCTCTTTGTGGACCAAGTCTGCCACAAAACATTTGCTCACTTTTTTGAGGCAGTCGATGAGGATGACTGG
676    AGTCTTCTCTTTGTGGACCATATCTGCCACAAAACATTTGCTCACTTTTTTGAGGCCGTCGAGAGGATGACTGG

751    TACTCAGGTTTTCATTTTCCCCCAAGGTTGTGCAACATACTAGCTGCTAATAGTCTCCTCTATTTCCAGGATGAT
751    TACTCTGGTTTCATTTCCCCCCTGGTTGTGCAACGATACTAGCTGCTAATAGTCTCCTCTATTTCCAGGATGAT

826    GTTTCAGTTGTGGATCATTGGGTTGTCAATGGAATGCACATGGCTCGTTCAGTAGACATTTGGAGAAAAGGCGCTA
826    GTTTCAGTTGTGGATCATTGGGTTGTCAAAGGAATGCACATGGCTCGTTCAGTAGACATTTGGAGAAAAGGCGCTA

901    GACAAAAATATGGAAGCTGCAAAAAGAAATTTCTATTACCTGGACTTGGAGGAAGCCACGAAACAGTGAATGGAGTC
901    GACAAAAATATGGAAGCTGCAAAAAGAAATTTCTATTACCTGGACTTGGAGGAAGCCACGAAACAGTGAATGGAGTC

976    GTTACTCACATTAGAACATTTCTGTATGGGAGGCTATGAACAATTTCTCAATGAACAATGGAGATGAGTGGATGGTT
976    GTTACTCACATTAGAACATTTCTGTATGGGAGGCTATGAACAATTTCTCAATGAACAATGGAGATGAGTGGATGGTT

1051   GCGCAGCTGCTTTTCAAGAAGAAGTAGTGA
1051   GCGCAGCTACTTTTCAAGAAGAAGTAGTGA

```

Abb. 8.4: Vergleich der Nukleotidsequenzen der Klone der beiden putativen (*S*)-Stylopin-*N*-Methyltransferasen; obere Sequenz: Klon 4, untere Sequenz: Klon 5; grau unterlegt sind die von der Konsensussequenz abweichenden Nukleotide

8.6 Coclaurin-*N*-Methyltransferase

8.6.1 Aminosäuresequenzvergleich

1	MAVEAKQT	KKAAI	VELL	QLEL	GLVPYDDI	KQLI	RREL	ARRL	QWGYKPT	YEEQI	AEI	QNL	THSL	RQMKI	ATEVET	CojaCNMT.																																																									
1	MQLKAKE	-----	ELLRN	MELGLI	PDQEI	RQLI	RVEL	EKRL	QWGYKET	HEEQ	SQL	LDL	VHSL	KGMK	MATEMEN	FaccCNMT																																																									
1	MQLKAKE	-----	ELLQN	MELGLI	PDQEI	RERI	RI	EKRL	RWGYKET	HEEQ	SQL	LDL	VHSL	KGMK	MATEMEN	PasoCNMT																																																									
1	MG-SI	DDVKKES	AGETL	RRLL	LKGEI	KDEEL	KKLI	KFQF	EKRL	QWGYKS	SHQEQL	SFNL	DFI	KSL	KKMEMSGEI	ET	4-alle.pro																																																								
1	MG-SI	DEVKKES	AGETL	GRLL	LKGEI	KDEEL	KKLI	KFQF	EKRL	QWGYKS	SHQEQL	SFNL	DFI	KSL	KKMEMSGEI	ET	5-alle.pro																																																								
76	LDSQ	LYEI	PI	EFL	KI	MNGSNL	KGSCCYFKED	STTL	DEAEI	AML	DL	YCERAQI	QDGQSVL	DL	GCGQ	GALT	L	HVAQK	CojaCNMT.																																																						
69	LDLKL	YEAP	MEFL	KI	QHGS	NKQSAGY	TDEST	TTL	DEAEI	AML	DL	YMERAI	KDGQSVL	DL	GCGL	GAVAL	F	GANK	FaccCNMT																																																						
69	LDLKL	YEAP	MEFL	KI	QHGS	NKQSAGY	TDEST	TTL	DEAEI	AML	DL	YMERAI	KDGQSVL	DL	GCGL	GAVAL	Y	GANK	PasoCNMT																																																						
75	MNKET	YELP	SEFL	EAVF	GKT	VKQSMCYF	THESATI	DEAE	EAAHEL	YCERAQI	KDGT	VLDI	GCGQ	GL	VLYI	AQK			4-alle.pro																																																						
75	MNKET	YELP	SEFL	EAVF	GKT	VKQSMCYF	KHESATI	DEAE	EAAHEL	YCERAQI	KDGT	VLDI	GCGQ	GL	VLYI	AQK			5-alle.pro																																																						
151	YKNOR	VTA	VNTSV	SQKEYI	EEES	RRRN	L	NVE	VKLADI	THEMA	ETYDRI	LVI	EL	F	E	H	M	K	N	Y	E	L	L	R	K	I	SEW	SK	CojaCNMT.																																												
144	FKKCQ	FTGVT	SSVE	QKDYI	E	G	K	C	K	E	L	K	L	T	N	V	K	V	L	L	A	D	I	T	T	Y	E	T	E	E	R	F	D	R	I	F	A	V	E	L	I	E	H	M	K	N	Y	Q	L	L	L	K	K	I	SEW	M	K	D		FaccCNMT													
144	FKKCQ	FTGVT	SSVE	QKDYI	Q	G	K	C	K	E	L	K	L	T	N	V	K	V	L	L	A	D	I	T	T	Y	E	T	E	E	R	F	D	R	I	F	A	V	E	L	I	E	H	M	K	N	Y	Q	L	L	L	K	K	I	SEW	M	K	D		PasoCNMT													
150	YKNCH	V	T	G	L	T	N	S	K	A	Q	V	N	L	L	K	Q	A	E	K	L	G	L	T	N	V	D	A	I	L	A	D	V	T	Q	Y	E	S	D	K	T	Y	D	R	L	L	M	E	A	I	E	H	M	K	N	L	Q	L	F	M	K	K	L	S	T	V	M	T	K		4-alle.pro		
150	YKNCH	V	T	G	L	T	N	S	K	A	Q	V	N	L	L	K	Q	A	E	K	L	G	L	T	N	V	D	A	I	L	A	D	V	T	Q	Y	E	S	D	K	T	Y	D	R	L	L	M	E	A	I	E	H	M	K	N	L	Q	L	F	M	K	K	L	S	T	V	M	T	K		5-alle.pro		
226	DGLL	F	L	E	H	I	C	H	K	T	F	A	Y	H	Y	E	P	L	D	D	D	W	F	T	E	V	F	P	A	G	T	M	I	P	S	A	S	F	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	V	N	H	W	T	L	S	G	K	H	F	S	R	T	N	E	E	W	L	K	R		CojaCNMT.			
219	DGLL	F	V	E	H	V	C	H	K	T	L	A	Y	H	Y	E	P	V	D	A	E	D	W	T	N	Y	I	F	P	A	G	T	L	T	L	S	S	A	S	M	L	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	V	N	Q	W	T	L	S	G	K	H	Y	S	R	S	H	E	E	W	L	K	N		FaccCNMT
219	DGLL	F	V	E	H	V	C	H	K	T	L	A	Y	H	Y	E	P	V	D	A	E	D	W	T	N	Y	I	F	P	A	G	T	L	T	L	S	S	A	S	M	L	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	V	N	Q	W	T	L	S	G	K	H	Y	S	R	S	H	E	E	W	L	K	N		PasoCNMT
225	ESLL	F	V	D	H	V	C	H	K	T	F	A	H	F	F	E	A	V	D	E	D	D	W	S	G	F	I	F	P	P	G	C	A	T	I	L	A	A	N	S	L	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	D	H	W	V	N	G	M	H	M	A	R	S	V	D	I	W	R	K	A		4-alle.pro		
225	ESLL	F	V	D	H	I	C	H	K	T	F	A	H	F	F	E	A	V	D	E	D	D	W	S	G	F	I	F	P	P	G	C	A	T	I	L	A	A	N	S	L	L	Y	F	Q	D	D	V	S	V	D	H	W	V	N	G	M	H	M	A	R	S	V	D	I	W	R	K	A		5-alle.pro		
301	L	D	A	N	L	D	V	I	K	P	M	F	-	E	T	L	M	G	N	E	E	E	A	V	K	L	I	N	Y	W	R	G	F	C	L	S	G	M	E	M	F	G	Y	N	N	G	E	E	W	A	S	H	V	L	F	K	K	-	K		CojaCNMT.												
294	M	D	K	N	I	V	E	F	K	E	I	M	-	R	S	I	T	K	T	E	K	E	A	I	K	L	L	N	F	W	R	I	F	C	M	C	G	A	E	L	F	G	Y	K	N	G	E	E	W	L	T	H	L	L	F	K	K	-	K		FaccCNMT												
294	M	D	K	N	I	V	E	F	K	E	I	M	-	R	S	I	T	K	T	E	E	E	A	N	R	L	L	N	F	W	R	I	F	C	M	C	G	A	E	L	F	G	Y	K	N	G	E	E	W	L	T	H	L	L	F	K	K	-	K		PasoCNMT												
300	L	D	K	N	M	E	A	A	K	E	I	L	L	P	G	L	G	G	S	H	E	T	V	N	G	V	T	H	I	R	T	F	C	M	G	G	Y	E	Q	F	S	M	N	G	D	E	W	M	V	A	Q	L	L	F	K	K	K	-		4-alle.pro													
300	L	D	K	N	M	E	A	A	K	E	I	L	L	P	G	L	G	G	S	H	E	A	V	N	G	V	T	H	I	R	T	F	C	M	G	G	Y	E	Q	F	S	M	N	G	D	E	W	M	V	A	Q	L	L	F	K	K	K	-		5-alle.pro													

Abb. 8.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen der CMNTs mit den SNMTs; grau unterlegt sind die mit der Konsensussequenz übereinstimmenden Aminosäuren; Sequenzen: Coja=*C. japonica* (Choi et al., 2002), Paso = *P. somniferum* (diese Arbeit), Facc = *P. somniferum* (Facchini und Park, 2003); 4-alle, 5-alle = SNMT4 und SNMT5 (diese Arbeit)

8.6.2 Enzymassays CNMT

(*R*)-Cocclaurin

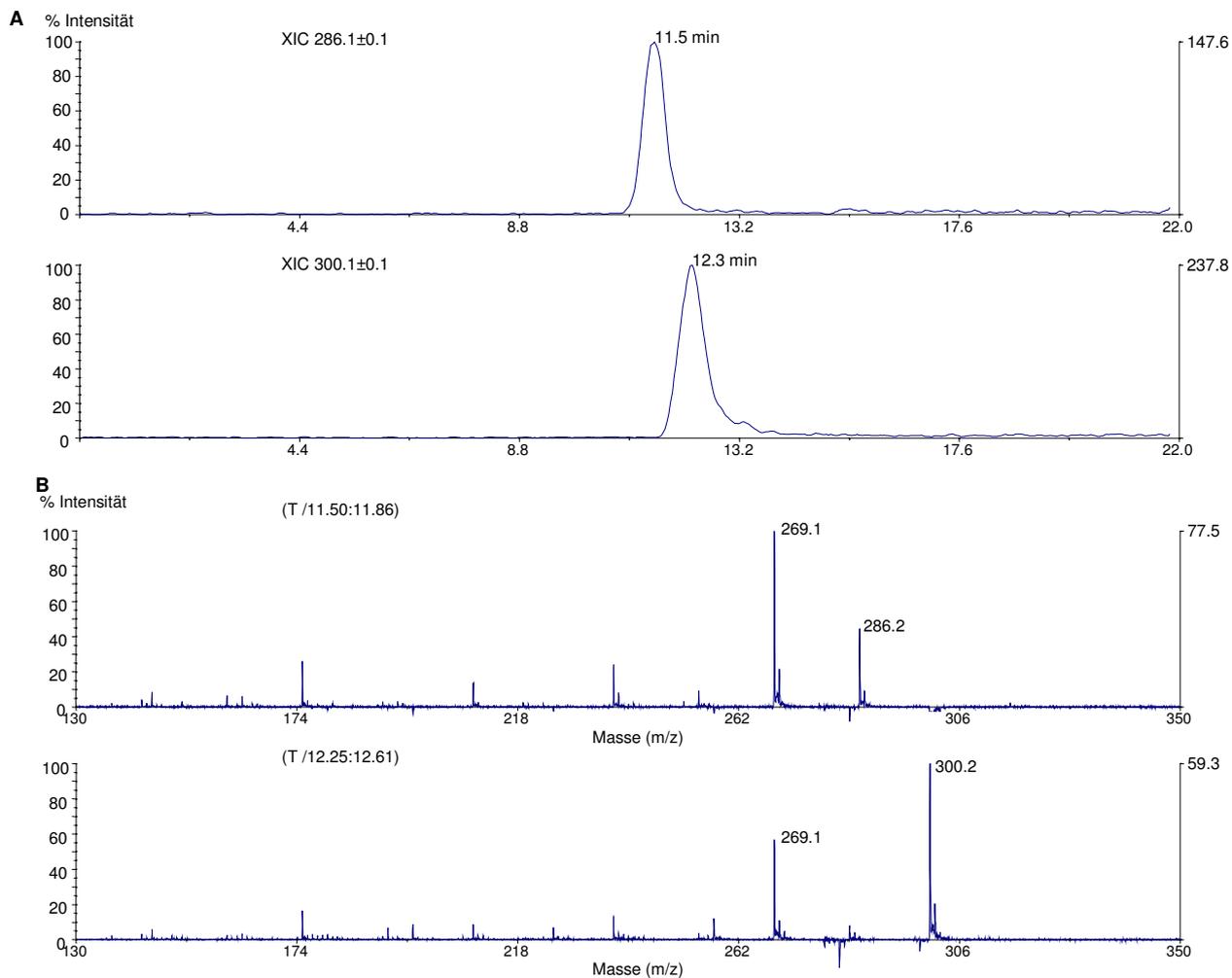


Abb. 8.6: LC-MS (TOF) -massenspektrometrische Analyse der Umsetzung von (*R*)-Cocclaurin durch die *Papaver* CNMT; **A**: Ionenchromatogramme: (*R*)-Cocclaurin (11,5 min) und das Produkt (*R*)-*N*-Methylcocclaurin (12,3 min); **B**: Ionenspektren (*R*)-Cocclaurin (m/z 286) mit dem Fragmentation m/z 269 (nach Abspaltung von NH_3); (*R*)-*N*-Methylcocclaurin (m/z 300) mit dem Fragmentation m/z 269 (nach Abspaltung von CH_3NH_2)

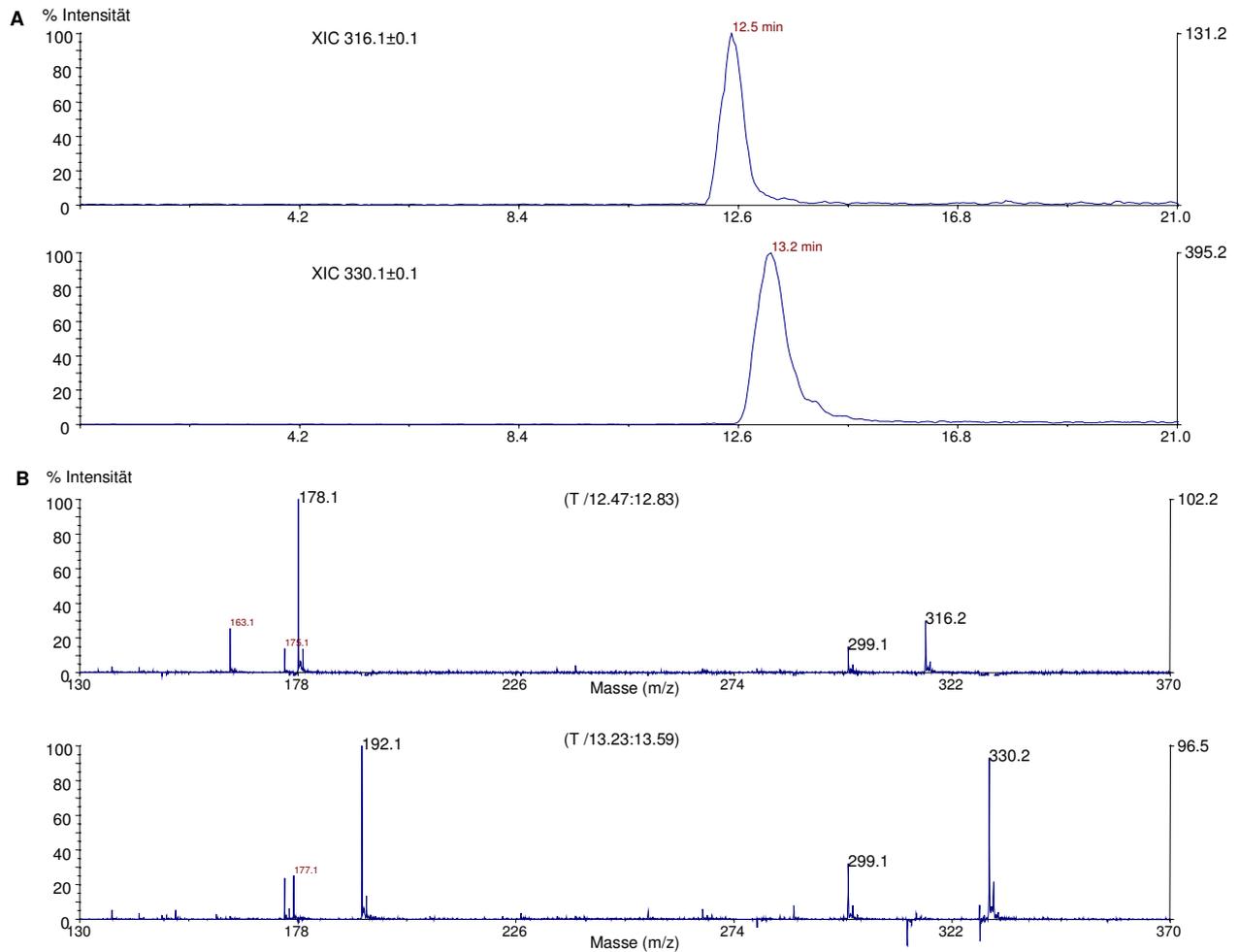
(S)-Norretikulin

Abb. 8.7: LC-MS (TOF) - massenspektrometrische Analyse der Umsetzung von (*S*)-Norretikulin durch die *Papaver* CMMT; **A**: Ionenchromatogramme: Substrat (*S*)-Norretikulin (12,5 min) und das Produkt (*S*)-Retikulin (13,2 min); **B**: Ionenspektren (*S*)-Norretikulin (m/z 316) mit den Fragmentationen m/z 178 (Isochinolinuntereinheit) und m/z 299 (nach Abspaltung von NH_3); (*S*)-Retikulin (m/z 330) mit den Fragmentationen m/z 192 (Isochinolinuntereinheit) und m/z 299 (nach Abspaltung von CH_3NH_2)

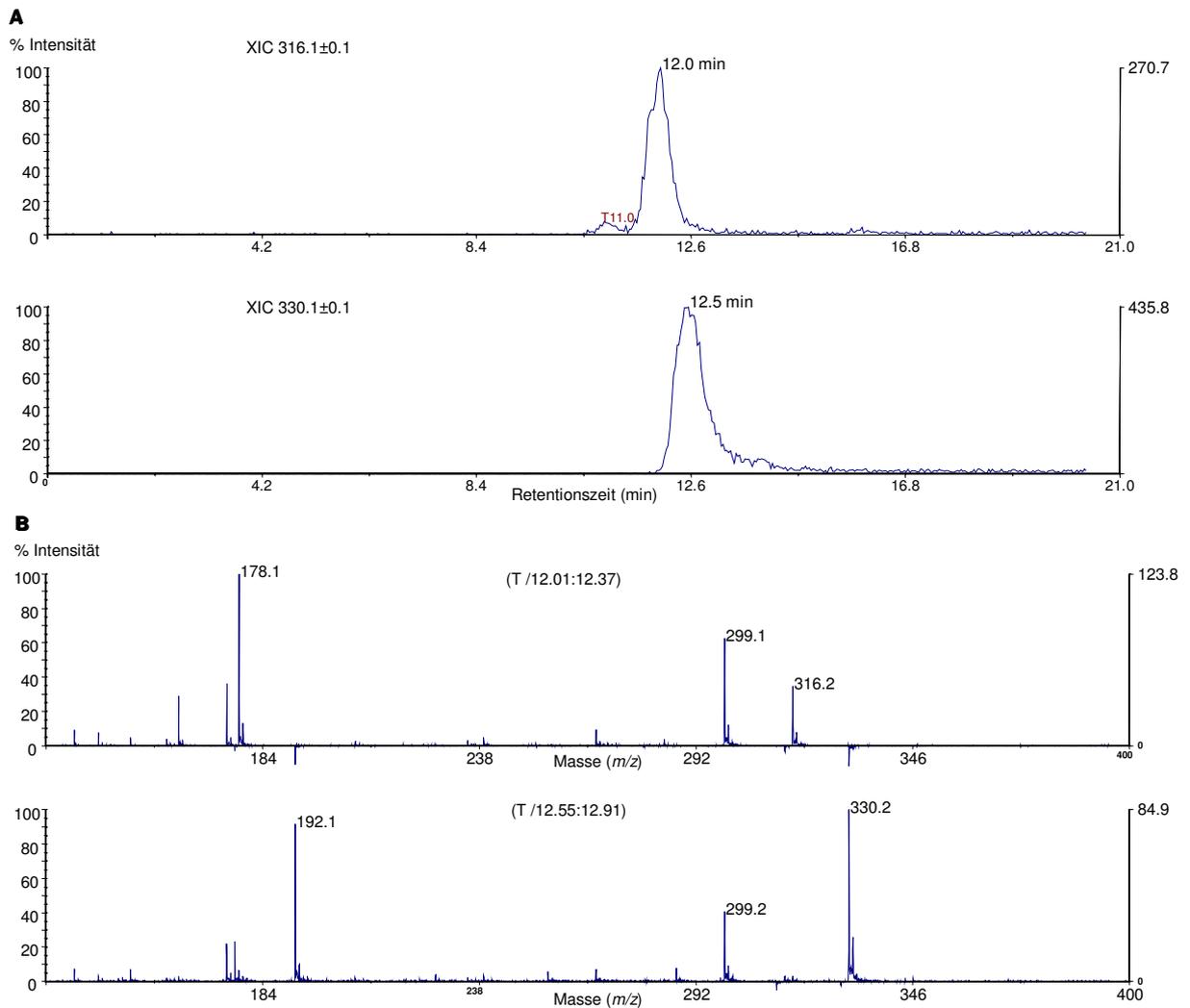
(S)-Nororientalin

Abb. 8.8: LC-MS (TOF) - massenspektrometrische Analyse der Umsetzung von (*S*)-Nororientalin durch die *Papaver* CNMT; **A**: Ionenchromatogramme: Substrat (*S*)-Nororientalin (12,0 min) und das Produkt (*S*)-orientalin (12,5 min); **B**: Ionenspektren (*S*)-Nororientalin (m/z 316) mit den Fragmentationen m/z 178 (Isochinolinuntereinheit) und m/z 299 (nach Abspaltung von NH_3); (*S*)-orientalin (m/z 330) mit den Fragmentationen m/z 192 (Isochinolinuntereinheit) und m/z 299 (nach Abspaltung von CH_3NH_2)

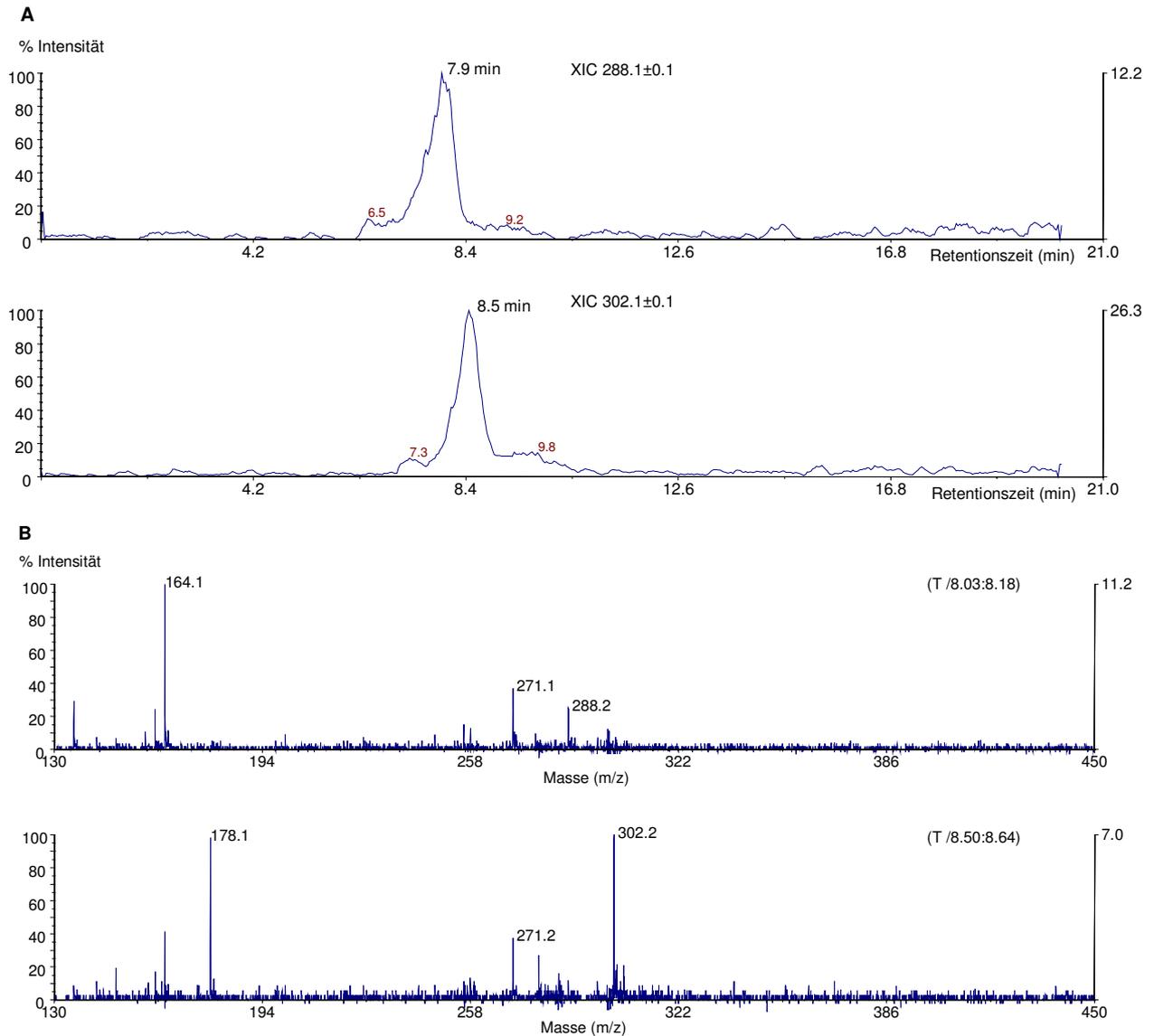
(R,S)-Norlaudanosolin

Abb. 8.9: LC-MS (TOF) - massenspektrometrische Analyse der Umsetzung von (*R,S*)-Norlaudanosolin durch die *Papaver CNMT*; **A**: Ionenchromatogramme: Substrat (*R,S*)-Norlaudanosolin (7,9 min) und das Produkt (*R,S*)-Laudanosolin (8,5 min); **B**: Ionenspektren (*R,S*)-Norlaudanosolin (m/z 288) mit den Fragmentionen m/z 164 (Isochinolinuntereinheit) und m/z 271 (nach Abspaltung von NH_3); (*R,S*)-Norlaudanosolin (m/z 302) mit den Fragmentionen m/z 178 (Isochinolinuntereinheit) und m/z 271 (nach Abspaltung von CH_3NH_2)

Abbildungen und Tabellen

Abb. 1.1: <i>Papaver somniferum</i>	1
Abb. 1.2: Alkaloidbiosynthese vom L-Tyrosin zum (S)-Norcoclaurin.....	3
Abb. 1.3: Alkaloidbiosynthese vom (S)-Norcoclaurin zum (S)-Retikulin	4
Abb. 1.4: Alkaloidbiosynthese vom (S)-Retikulin zu den Endprodukten Morphin, Papaverin, Noscapin und Sanguinarin.....	5
Abb. 1.5: Reaktionen der 6OMT, 7OMT, CNMT und SMMT.....	12
Abb. 2.1: pPLEX X002-Vektorkarte.....	18
Abb. 3.1: schematische Darstellung der RACE-PCR.	22
Abb. 4.1: Erstellung der RNAi-Konstrukte im Vektor pHannibal.....	33
Abb. 4.2: Agarosegelelektrophoresen zur Erstellung der RNAi-Konstrukte	33
Abb. 4.3: Verdau des RNAi-Konstruktes aus pHannibal.....	34
Abb. 4.4: Kalluskulturen	36
Abb. 4.5: Alkaloidgehalt der Wildtyppflanzen der T0-Generation.....	38
Abb. 4.6: Gesamtalkaloidgehalte der T0-Pflanzen.....	38
Abb. 4.7: Alkaloidzusammensetzung in der T0-Generation.....	39
Abb. 4.8: T0: Anteile an Retikulin, Laudanin und Laudanosin.	40
Abb. 4.9: T0: Box and Whisker-Plots der Kruskal-Wallis-Analyse	40
Abb. 4.10: T0: Northern Blot-Analysen <i>7omt</i>	41
Abb. 4.11: PCR zum Nachweis transgener T1-Pflanzen	42
Abb. 4.12: Alkaloidgehalt der Wildtyppflanzen der T1-Generation.....	42
Abb. 4.13: T1-Alkaloidprofile.....	43
Abb. 4.14: Northern-Blot-Analysen der T1- <i>7omt-sense</i> -Pflanzen.....	45
Abb. 4.15: T1: Verhalten der Expressionsdaten der <i>7omt</i> und <i>cor</i> zueinander.....	46
Abb. 4.16: Southern Blot Analyse der Nachkommen von T0:24-25	47
Abb. 4.17: Alkaloidgehalte der Wildtyppflanzen zur T2-Generation	49
Abb. 4.18: T2-Alkaloidprofile der Nachkommen ausgewählter T1-Pflanzen	50
Abb. 4.19: T2-Generation: Abweichungen der Alkaloidgehalte.....	51
Abb. 4.20: Northern Blot Analysen der Pflanzen der T2-Generation.....	53
Abb. 4.21: Bindungsstellen der RACE-Primer	55
Abb. 4.22: Ergebnisse der RACE-PCR.....	55
Abb. 4.23: Aminosäuresequenzvergleiche der CNMTs.	56
Abb. 4.24: SDS-PAGE zur Expression der putativen N-Methyltransferase-Klone	57
Abb. 4.25: LC-MS (TOF)-Analyse der Reaktion der SNMT4 mit (S)-Stylopin.....	58
Abb. 4.26: LC-MS (TOF)-Analyse der Reaktion der SNMT5 mit (S)-Stylopin.....	59
Abb. 4.27: LC-MS (TOF)-Analyse der Reaktion der Vektorkontrolle pHis8 (S)-Stylopin	60
Abb. 4.28: Aminosäurevergleich der <i>Papaver</i> CNMTs.	62
Abb. 4.29: heterologe Expression und Reinigung der CNMT aus <i>P. somniferum</i>	63

Abb. 4.30: Abhängigkeit der CNMT-Reaktion von Temperatur und pH-Wert	64
Abb. 4.31: Einfluss divalenter Kationen auf die Enzymaktivität der CNMT.....	64
Abb. 4.32: Strukturen und relative Umsetzung der als Substrate getesteten Substanzen.....	65
Abb. 4.33: (LC-MS (TOF))-Analyse der Umsetzung von (<i>S</i>)-Coclaurin durch die CNMT.....	66
Abb. 4.34: Enzymkinetiken der (<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase aus <i>P. somniferum</i>	68
Abb. 5.1: phylogenetischer Stammbaum.....	82
Abb. 8.1: Southern Blot-Analyse der Nachkommen der T0-Pflanze 26-2.....	VI
Abb. 8.2: T2-Alkaloidprofile.....	X
Abb. 8.3: T2-Alkaloidprofile.....	XI
Abb. 8.4: Nukleotidsequenzvergleich der Klone der putativen SNMT.....	XII
Abb. 8.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen der CNMTs mit den SNMTs.....	XIII
Abb. 8.6: LC-MS (TOF)-Analyse der Umsetzung von (<i>R</i>)-Coclaurin durch die CNMT.....	XIV
Abb. 8.7: LC-MS (TOF)-Analyse der Umsetzung von (<i>S</i>)-Norretikulin durch die CNMT	XV
Abb. 8.8: (LC-MS (TOF))-Analyse der Umsetzung von (<i>S</i>)-Nororientalin durch die CNMT	XVI
Abb. 8.9: (LC-MS (TOF))-Analyse der Umsetzung von (<i>R,S</i>)-Norlaudanolin (CNMT).....	XVII
Tabelle 2.1: verwendete PCR-Primer.....	15
Tabelle 4.1: Transformationslinien und daraus generierte (transgene) Pflanzen	37
Tabelle 4.2: Mindestanzahl der Transgenkopien in der T0- und der T1-Generation.	48
Tabelle 4.3: kinetische Parameter der Substrate der CNMT	67
Tabelle 5.1: Strukturgleichungen der durch die CNMT katalysierten Reaktionen	80
Tabelle 8.1: prozentuale Zusammensetzung des Latex der Wildtyppflanzen.....	V
Tabelle 8.2: T0-Generation: prozentuale Zusammensetzung des Latex.	V
Tabelle 8.3: T1-Generation: prozentuale Zusammensetzung des Latex.	VI
Tabelle 8.4: T2-Generation: prozentuale Zusammensetzung des Latex	VIII

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich durch ihr waches Interesse, ihre Diskussionsbereitschaft und die Hilfe in theoretischen und praktischen Fragen unterstützt haben und so zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Toni M. Kutchan für die Vergabe der Arbeit und die Möglichkeit, diese am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie anzufertigen. Ihre Präsenz in der Abteilung war mir stets ein Ansporn, meine Leistungen zu verbessern.

Frau Dr. Susanne Frick hat als Arbeitsgruppenleiterin die Arbeit fachlich betreut. Sie war stets bemüht die Organisation der praktischen Tätigkeiten zu begleiten und hat mit wertvollen Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Herrn Dr. Jörg Ziegler, weil er durch die Isolation eines cDNS-Fragmentes, das mir freundlicherweise überlassen wurde, die Basis zur Identifizierung der cDNS-Sequenz einer *N*-Methyltransferase schuf. Dr. Ziegler und Dr. Jon Page standen mir mit zahlreichen Anregungen, wertvollem fachlichen und methodischen Rat zur Seite. Sie übten konstruktive Kritik, hatten stets ein offenes Ohr und halfen mit praktikablen und sinnvollen Vorschlägen.

Dr. Robert Kramell danke ich für die Analysen unzähliger Latexproben die er immer geduldig und zuverlässig durchgeführt hat. Außerdem danke ich ihm für die massenspektrometrische Bestimmung der Substrate und Produkte verschiedener Enzymtests.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Zenk, aus dessen Labor im Biozentrum Halle ich verschiedene Alkaloide als Substrate für die Enzymtests erhielt. Außerdem danke ich CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien, die freundlicherweise den Agrobakterienstamm AGL1 zur Verfügung stellten, sowie Dr. Anthony Fist von Tasmanian Alkaloids, Westbury, Australien für die Samen des Schlafmohnkultivars CO58-34. Die Agrobakterien und *Papaver somniferum*-CO58-34 wurden zur Transformation genutzt wurden.

Natürlich möchte ich allen danken, die zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben. Dazu zählen besonders die Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Katja Kempe, Kathleen Gutezeit und Elke Hillert. Nicht zu vergessen sind die anderen Mitarbeiter der Abteilung Naturstoff-biotechnologie, die mir unermüdlich und immer freundlich mit Rat und Tat zur Seite standen.

Von Herzen danke ich meiner Familie, Daniel Mörlein und Oskar Haase. Ihr habt mir gezeigt, mich selbst und mein Umfeld durch die bewußte Wahrnehmung anderer Perspektiven zu erkennen und besser zu verstehen. Durch Oskar habe ich viele längst vergessene, wunderbare Kleinigkeiten der Welt neu entdecken können. Er schenkte mir seine bedingungslose Liebe, gab mir Kraft und hat auf manches verzichten müssen.

Unschätzbar wertvoll war für mich die Unterstützung meiner Freundinnen Carolin Delker, Silke Richter und Jana Neumerkel. Sie zählen für mich zu den verlässlichsten Menschen. Meine Hochachtung verdienen sie sich, weil sie mir gegenüber immer ehrlich waren. Wie es nur beste Freundinnen können, stellten sie mich in Frage und fingen mich, wann immer es nötig war, auf. Sie haben mir einen Platz in ihrem Leben gegeben und sich ihren in meinem auf ewig verdient. Ich danke Euch für das Halten und Aushalten.

Das Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle bot mir für diese Arbeit mit seiner qualitativ hochwertigen und modernen Ausstattung alle notwendigen technischen Möglichkeiten. Nicht zu vergessen ist die sehr gut ausgestattete Bibliothek, die durch die engagierte Frau Piskol noch an Wert gewinnt. Die Verwaltung des Institutes zeigte sich mir gegenüber stets hilfsbereit und um Unterstützung bemüht. Neben den technischen Mitarbeitern, die kleine Reparaturen schnell vornahmen und jedes mir vollkommen unerklärbare Computerproblem lösten, stand ein Team gut ausgebildeter Gärtner zur Verfügung, das die hervorragende Versorgung der Versuchspflanzen gewährleistete.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-Projekt FR 1613/1-5) gefördert und teilweise vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle finanziert.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name: Stefanie Haase
Geburtsdatum: 03. Oktober 1977
Geburtsort: Stendal (Altmark)
Eltern: Dr. Volkmar Haase
Dr. Inge Reinhardt
Familienstand: ledig
Kind: Oskar Haase, geboren am 27. Juli 2001

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1984 – 1990 Polytechnische Oberschule Werben (Elbe)
1990 – 1991 Polytechnische Oberschule Seehausen
1991 – 1996 Winckelmann-Gymnasium Seehausen
Abschluss: Abitur, Note 1,6

STUDIUM

1996 – 2002 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale)
Diplomthema: „Untersuchung putativer Schwermetalltransporter in *Schizosaccharomyces pombe*“ in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale)
Abschluss: Diplom, Note gut

PROMOTION

Mai 2002 – Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen der
März 2006 Doktorarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) unter der Leitung von Prof. Dr. Toni M. Kutchan

PUBLIKATIONEN

Im Zusammenhang mit Anan Ounaroons Arbeiten zur den *O*-Methyltransferasen der Tetrahydroisochinolinalkaloidbiosynthese aus *Papaver somniferum* war erfolgreich ein Patent eingereicht worden.

Erklärung

Halle, 14. November 2006

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur, angefertigt zu haben.

Stefanie Haase