

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

**Identifizierung der Salutaridinsynthase CYP719B1 und  
einer FAD-abhängigen Oxygenase der  
Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese**

**Dissertation**

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

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Andreas Gesell  
geb. am 14.05.1976 in Freiberg

Gutachter:

Prof. B. Draeger  
Prof. A. Gierl (München)  
Prof. T. M. Kutchan (USA)

Tag der Verteidigung: 25.02.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013208**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013208>]

Diese Arbeit ist in Liebe meinen Eltern gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	
1	<i>Berberis</i> spp., <i>Papaver somniferum</i> und ihre Alkaloide	1
2	Zur Aufklärung der Morphin- und Protoberberinbiosynthese	2
3	Die Morphin- und Protoberberinbiosynthese auf der Transkriptebeine	3
4	Sauerstoffabhängige bivalent FAD-bindende Oxygenasen	8
5	Cytochrom-P450 Enzyme	9
II	Material	
1	Organismen	14
1.1	Pflanzen und pflanzliche Zellkulturen	14
1.2	Bakterien	14
1.3	Pilze	14
1.4	Insektenzellen	14
2	Insektenzellkultur: Medien & Supplementierung	14
3	Vektoren	14
4	Enzyme und Kits für molekularbiologisches Arbeiten	15
5	Antikörper	15
6	Chemikalien & Substanzen	15
7	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	16
8	Geräte	17
III	Methoden	
1	Anzucht von <i>Papaver somniferum</i> L. Pflanzen	18
2	Anzucht von <i>Papaver somniferum</i> L. Suspensionszellkulturen	18
3	Elicitierung der <i>Papaver somniferum</i> L. Suspensionszellkulturen	18
4	Isolierung der Nukleinsäuren	19
4.1	RNA-Isolierung (TRIzol-Methode)	19
4.2	Kapsel RNA-Aufreinigung (LiCl Fällung)	20
4.3	Aufreinigen von Poly A+ RNA aus total RNA	21
4.4	Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. somniferum</i> (Phenol/SDS)	21
4.5	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	22
4.6	Plasmid DNA Isolierung aus Hefe	22
4.7	Bacmidisolierung aus <i>E. coli</i>	23
4.8	Baculovirus DNA aus <i>Sf9</i> Zellen	24
5	Konzentrierung und Reinigung von DNA durch Phenol-CHCl <sub>3</sub> Extraktion	24
6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	24
7	Auftrennung der Nukleinsäuren	25
7.1	Auftrennung von RNA in Agarosegelen	25
7.2	Auftrennung von DNA in- und Isolierung aus Agarosegelen	25
7.3	Auftrennung von DNA in- und Isolierung aus Polyacrylamidgelen	26
8	Fixierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren	26
8.1	Northern Blot	26
8.2	Makroarray	27
9	Umschreiben von RNA in DNA (Erststrangsynthese)	29
10	Herstellen doppelsträngiger DNA (Zweitstrangsynthese)	29
11	Modifizierung der DNA	30
11.1	Restriktion der DNA	30
11.2	Ligation der DNA	30
11.3	Dephosphorylierung der DNA	31
11.4	Phosphorylierung und Markierung mit $\gamma$ [P <sup>33</sup> ] ATP von Oligonukleotiden	32
11.5	Markierung von DNA durch Zweitstrangsynthese mittels Random priming	32

12	Amplifikation der DNA	33
12.1	DNA Amplifikation in <i>E. coli</i>	33
12.2	Amplifikation von DNA durch PCR	35
13	spezielle PCR Anwendungen	37
13.1	DNA Sequenzierung	37
13.2	AFLP Technik zur Amplifikation von P450 Fragmenten	38
13.3	Isolierung von Volllänge-cDNAs mittels RACE u. Genome Walker Technik	40
14	Datenanalyse	41
14.1	Auswertung von Sequenzierungsdaten	41
14.2	Auswertung der Makroarraydaten	42
15	Proteinexpression	43
15.1	Expression von Proteinen in <i>Sf-9</i> Zellen	43
15.2	Expression von Proteinen in Hefe	45
16	Isolierung des mikrosomalen Pellets	46
17	Proteinnachweis	47
17.1	Proteinbestimmung nach Bradford	47
17.2	Aufnahme von CO Spektren zum Expressionsnachweis von CYP450	47
17.3	Spezifischer Nachweis von His getaggten Proteinen mit Antikörper	47
17.4	Detektion von Protein in Polyacrylamidgelen	48
17.5	Detektion von Protein auf Nitrozellulosemembranen	48
18	Trennung von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	49
19	Fixierung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen – Westernblot	49
20	Enzymansätze	50
20.1	Enzymansätze für Cytochrom P450 Enzyme	50
20.2	Enzymansätze für die Cytochrom P450 Reduktase	50
20.3	Enzymansatz für die (S)-Tetrahydroprotoberberinoxidase	50
21	Analyse der Produkte durch HPLC	51
22	Durchführung von LC-MS, LC-MS-MS und FT-MS Messungen	52
IV Ergebnisse		
1.	Isolierung neuer cDNAs	53
1.1.	AFLP Technik zur Amplifizierung von CYP450 - Isolierung mittels RT-PCR	53
2.	Auswahl von CYP450 zur Überexpression	57
2.1.	Änderung im Transkriptniveau – Interspeziesvergleich	58
2.2.	Vergleich von Zellkulturen nach Behandlung mit <i>Botrytis cinerea</i> und Methyljasmonat	60
3.	Bestimmung der Induktion der Alkaloidproduktion in der Zellkultur <i>Papaver somniferum</i> Stamm <i>Paris</i>	63
4.	Volllänge cDNAs der CYP450 Klone 11F4 und GFC55	64
5.	Überexpression von CYP719B1 und dem Klon 11F4	70
5.1.	Substratspezifität und Identifizierung des Reaktionsproduktes	71
6.	Charakterisierung des CYP719B1	79
6.1.	Temperatur, pH Optimum	79
6.2.	Zeitabhängigkeit und Substratabhängigkeit	80
6.3.	Aktivität der Cytochrom-P450-Reduktase in den Reaktionen	81
7.	(S) - Tetrahydroprotoberberinoxidase	82
7.1.	cDNA Volllängeisolierung der (S) - Tetrahydroprotoberberinoxidase	82
7.2.	Überexpression und Aktivitätsnachweis der (S) - Tetrahydrprotoberberinoxidase	82
V Diskussion		88
Zusammenfassung und Ausblick		100
VI. Literaturverzeichnis		

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	C-C Kopplungsreaktionen ausgehend vom Tetrahydrobenzylisochinolin	4
Abb. 2	Transformation von ( <i>S</i> )-Norcoclaurin zu ( <i>S</i> )-Retikulin	5
Abb. 3	Biosynthese der Protoberberine und Morphinane ausgehend vom ( <i>S</i> )-Retikulin.	6
Abb. 4	Alignment von FAD-abhängigen Oxygenasen bekannter Funktion	8
Abb. 5	Systematische Bezeichnung von CYP450	10
Abb. 6	Invertiert repetitive Sequenzen sowie Primer für „supression PCR“	37
Abb. 7	Übersicht AFLP Technik	53
Abb. 8	Intronsequenz des Klonen CYP80B3	54
Abb. 9	CYP450 Domainenprimer	55
Abb. 10	Homologien der isolierten Fragmente zu bekannten CYP450 Sequenzen	56
Abb. 11	Identischer Sequenzbereich zwischen den Fragmenten CAG3 & 7 und GFC55	56
Abb. 12	Untersuchte CYP450 Fragmente und Volllängeklone	58
Abb. 13	Cluster mit Cytochrome 11F4 , Vergleich dreier morphinhaltiger <i>P.somnifer</i> ...	58
Abb. 14	Hoeher exprimierte Gene in morphinhaltigen Pflanzen	59
Abb. 15	Vergleich des Expressionsverhaltens der CYP450 Fragmente in den verschi...	60
Abb. 16	Alkaloidspezifische cDNAs enthaltendes Cluster der durch <i>Botrytis cinerea</i> ...	61
Abb. 17	Induktion von CYP450 Transkripten durch <i>Botrytis cinerea</i> (botry) und MeJ..	62
Abb. 18	Induktion der Alkaloidbiosynthese nach Elicitierung mit <i>Botrytis cinerea</i>	63
Abb. 19	Primer zur Volllängeisolierung von CYP450 cDNAs	65
Abb. 20	Hydrophathieplot der CYP719B1 Sequenz	65
Abb. 21	Aminosäure- und Nukleotidsequenz von CYP719B1	66
Abb. 22	Sekundärstrukturvorhersage für die CYP719B1 Sequenz nach Rost und Sander	67
Abb. 23	Nukleotide- und Aminosäuresequenz des CYP450 cDNA Klonen 11F4	68
Abb. 24	Hydrophathieplot anhand der 11F4 Sequenz	69
Abb. 25	CO-Differenzspektren zum Nachweis der Expression nativer CYP450s	70
Abb. 26	Substrate für den Test auf Methylendioxybrückenbildung	72
Abb. 27	Substanzen für die Untersuchung der Substratspezifität von CYP719B1	72
Abb. 28	(A) HPLC Chromatogramm des Enzymumsatzes von CYP719B1, (B) von...	73
Abb. 29	LC-MS Analyse der Kontrolle links und des CYP719B1 Enzymumsatz	74
Abb. 30	LC-MS/MS Analyse des Substrat ( <i>R</i> )-Retikulin	75
Abb. 31	LC-MS/MS Analyse des Produktes Salutaridin	76
Abb. 32	LC-MS/MS Analyse der Salutaridinkontrollsubstanz	77
Abb. 33	Massenspektrometrische Fragmentierung von Salutaridin unter ESI-CID...	78
Abb. 34	pH- und Temperaturoptimum der Salutaridinsynthese	79
Abb. 35	Zeitabhängigkeit und Abhängigkeit der Reaktion von der ( <i>R</i> )-Retikulinkon..	80
Abb. 36	Aktivität der Cytochrom-P450-Reduktase im Vergleich zur Kontrolle	81
Abb. 37	RACE Primer zur Volllängeisolierung der ( <i>S</i> )-Tetrahydroberberinoxidase	82
Abb. 38	( <i>S</i> ) – Tetrahydroprotoberberinoxidase Volllängesequenz	83
Abb. 39	In vivo Assay für rekombinante ( <i>S</i> )-Tetrahydroprotoberberinoxidase	84
Abb. 40	UV Chromatogramme der aus Scoulerin im in vivo Assay entstehenden Prod	85
Abb. 41	UV-Spektren der Produkte (I-III) die aus Scoulerin im in vivo Assay entstehen	86
Abb. 42	LC-MS Spektren der aus Scoulerin entstehenden Dehydroderivate (I-III)	86
Abb. 43	STOX Enzymumsatz mit Canadin	87
Abb. 44	$\alpha/\beta$ Struktur der CYP450 Enzyme n. Werck-Reichhart & Freyereisen 2000	91
Abb. 45	SRS1 und SRS2 Region der CYP719 Familie, von ausgewählten Enzymen	92
Abb. 46	SRS 4 Region	93
Abb. 47	SRS5 (links) und SRS6 (rechts) Region	94
Abb. 48	Vergleich der Phenolkopplung die zu Aporphinen bzw. Morphinanen führt	98

## Tabellen

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese	29
Tabelle 2: Reaktionsbedingungen für die Ligation	31
Tabelle 3 Reaktionsansätze für PCR	35
Tabelle 4 Reaktionszyklen bei Pfu und Taq PCR	36
Tabelle 5 Reaktionszyklen bei RACE und AFLP Experimenten	36
Tabelle 6 HPLC-Programm: Anteil Laufmittel B über die Zeit t	51
Tabelle 7 Auswahl der CYP450 Primer	55
Tabelle 8 Für Identifizierung und anschließende Semiquantifizierung durch LC-MS/M	64
Tabelle 9 Für die Enzymtests verwendete Substrate	71

## Anhang

Anhang 1	Eine Stunde nach <i>Botrytis cinerea</i> Behandlung induzierte Gene
Anhang 2a	Sequenzierung der „multiple cloning site“ des pYEDP60 Vektors
Anhang 2b	Vorgenommene Veränderungen in der „multiple cloning site“
Anhang 3	Enzymumsatz von rekombinanten STOX-Protein mit Tetrahydropalmitin

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	bis auf
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
BBE	Berberinbrückenenzym
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary</i> , durch Reverse Transkription erhaltene DNA
CYP450	Cytochrom P450
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
EK	Endkonzentration
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
OD	Optische Dichte
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	pondus hydrogenii
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
<i>RNase</i>	<i>Ribonuklease</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
STOX	(S)-Tetrahydroberberinoxidase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	<i>unit(s)</i> , Einheit(en)
UV	Ultraviolett
(v/v)	volume per volume, Volumenprozent
(w/v)	weight per volume, Masse pro Volumen

# I Einleitung

## 1 *Berberis* spp., *Papaver somniferum* und ihre Alkaloide

Die Alkaloide der Wilson Berberitze *Berberis wilsoniae* sowie des Schlafmohns *Papaver somniferum*, den Pflanzen an denen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten, sind Alkaloide vom Benzylisochinolintyp (s.u.). Diese kommen hauptsächlich in den Pflanzenordnungen der *Papaverales* (Mohnartige), *Ranunculales* (Hahnenfußartige) *Magnoliales* (Magnolienartige), *Laurales* (Lorbeerartige) und *Nelumbonales* (Lotusartige) vor. Untersuchungen zu deren Biosynthese erfolgen vor allem mit den Pflanzen *Papaver somniferum*, *Eschscholzia californica* der Ordnung *Papaverales* sowie *Berberis* spp., *Coptis japonica* und *Thalictrum flavum* der Ordnung *Ranunculales*. Aufgrund des Vorkommens an Morphinandienonen oder deren Dimeren sind *Croton flavens*, *C. linearis* und *C. plumieri* der Ordnung *Malpighiales* (Malpigienartig) sowie *Stephania cepharantha* der Ordnung *Ranunculales* von Interesse.

Die Berberitzen kommen ursprünglich aus dem nördlichen Afrika. Die Pflanzen besitzen eine lange Tradition in der Anwendung als Färbemittel und Gewürz (bspw. Berberitzenreis). Aus der Pflanze werden noch immer Berberitzenfarbstoffe gewonnen. Sie werden als Fluoreszenzfarbstoff für die Mikroskopie genutzt. Es erfolgt auch eine Anwendung als Heilmittel, diese aber nicht auf evidenzbasierender Grundlage. Die Pflanze wurde immer wieder, in Deutschland zuletzt in den 60er Jahren, bekämpft. Grund dafür ist, dass die Berberitze dem Rostpilz *Puccinia graminis* zur Ausbildung dessen haploiden Mycel dient, bevor dieser in seiner dikaryotischen Form auf Gräsern Krankheiten, wie z.B. den Getreiderost des Getreides, hervorruft.

Die Hauptalkaloide der Berberitze sind Benzylisochinoline, wie Berberin und Bisbenzylisochinoline, wie Berbamin. Von den Benzylisochinolininen sind zwölf verschiedene Strukturtypen isoliert wurden (s. Karimov 1993, s. Abb.1). Berberin ein Alkaloid vom Protoberberintyp wird industriell gewonnen und aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften als Zusatz zu pharmazeutischen und kosmetischen Produkten gegeben. Außerdem wird es als Lebensmittelfarbstoff in Konzentrationen bis zu 0,1 mg/kg, bei alkoholischen Getränken bis 10 mg/kg, verwendet (Aromaverordnung). Dass alle Pflanzenteile außer den Beeren schwach giftig sind, Übelkeit und Erbrechen hervorrufen, geht auf ihren Alkaloidgehalt zurück.



Die Kulturpflanze *Papaver somniferum* gehört zu den ältesten Heil- und Rauschmittel (Kritikos & Papadaki 1967). Das aus Schlafmohn gewonnene Opium sowie seine Inhaltsstoffe Morphin, Thebain, Codein, Noscapin und Papaverin sind Teil des Europäischen Arzneibuches. Seiner Anwendung als Arznei- und Rohstoff in der Medizin steht, aufgrund seiner halluzinativen Eigenschaften, die Verwendung als Droge gegenüber. Nach dem UNDOC Drogenbericht 2005 haben Opiate einen über 50%igen Anteil am Missbrauch illegaler Drogen in Eurasien. Jährlich werden weltweit, zu fast 90% in Afghanistan, mehr als 150.000 ha Schlafmohn angebaut. Die entspricht einem Opium-Trockengewicht von über 4.500 t. Zum Vergleich, es wurden im Jahre 2004 knapp 500 t Opium für medizinische Zwecke gehandelt (INCB, 2005). Der Anbau für medizinische Zwecke, wie auch der Anbau zur Gewinnung von Samen, wird durch den Drogenkontrollrat der Vereinten Nationen („International Narcotics Control Board“, ICNB) lizenziert und erfolgt vor allem in Indien, Australien, der Türkei und Frankreich. In Deutschland erfolgt der kommerzielle Anbau von morphinarmen Sorten. Er unterliegt der Genehmigung durch die Bundesopiumstelle.

Die Hauptalkaloide des Schlafmohns sind Codein, Morphin und Thebain. Sie gehören der Gruppe der Morphinane an. Neben diesen sind im Mohn neun weitere Hauptgruppen bekannt, die durch Unterschiede im Kohlenstoffgrundgerüst definiert sind (s.Abb.1). Die letzte zusammenfassende, wenn auch unvollständige, Auflistung zählt im Schlafmohn 57 verschiedene Alkaloide (Preininger, 1986). Das Vorkommen von Morphin ist dabei charakteristisch für *Papaver somniferum*, es wurde bisher nur im Schlafmohn und im *Papaver setigerum* nachgewiesen (Farmilo *et al.*, 1957).

## 2 Zur Aufklärung der Morphin- und Protoberberinbiosynthese

Meilensteine die zur Identifizierung und Einordnung der Berberis- und Schlafmohnalkaloide in die Gruppe der Benzylisochinolinalkaloide führten, sind die Isolierung der Substanzen, beginnend Anfang des 19. Jahrhunderts, die Strukturaufklärungen, Anfang des 20. Jahrhunderts, und die Totalsynthesen, seit den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts. Für Morphin, den bis heute bekanntesten Inhaltsstoff, sind diese mit den Namen von Sertürner (1806/1817) und Séguin (1814) für die Isolierung sowie Gulland und Robinson (1952) für die erste Herstellung verbunden (s. Blackmore & White 2002). Die Aufklärung der Stereochemie gelang Mackay & Hodgkin 1955 (ebd.) durch Analyse der Röntgenstruktur.

Ausgehend von der Synthese, biogenetischen Strukturüberlegungen, welche unter anderem zur Strukturaufklärung des Berberins durch Robinson, Perkin und Ray 1925 beitrugen (Robinson 1947), und der Anwendung der seit Ende der 40er Jahre möglichen

Isotopenmarkierung etablierte sich die Vorstellung eines 1-Benzyltetrahydroisochinolins als Vorstufe der Morphin-, Protopin- und Protoberberinbiosynthese (Battersby *et al.* 1963). Die Arbeiten der Gruppen um Barton/Battersby, Leete und Rapoport führten zu einer Vorstellung der Biosynthese ausgehend von L-Tyrosin bzw. Dopamin über ein 1-Benzyltetrahydroisochinolin zum Retikulin und weiter zum Salutaridin sowie der Umwandlung von Thebain zu Morphin (s. Kirby 1967, Parker *et al.*, 1972).

Anfang der 70er Jahre entwickelte sich zusehends die Aufreinigung und Charakterisierung von Enzymen der Alkaloidbiosynthesen. Die Verwendung von Pflanzenzellkulturen erwies sich dabei als äußerst erfolgreich (s. Zenk *et al.*, 1977; Zenk, 1991) und führte ab Ende der 70er Jahre bis Mitte der 90er Jahren zur nahezu vollständigen Aufklärung der Biosynthesen der Morphine und Protoberberine auf enzymatischer Ebene (s. Kutchan 1998).

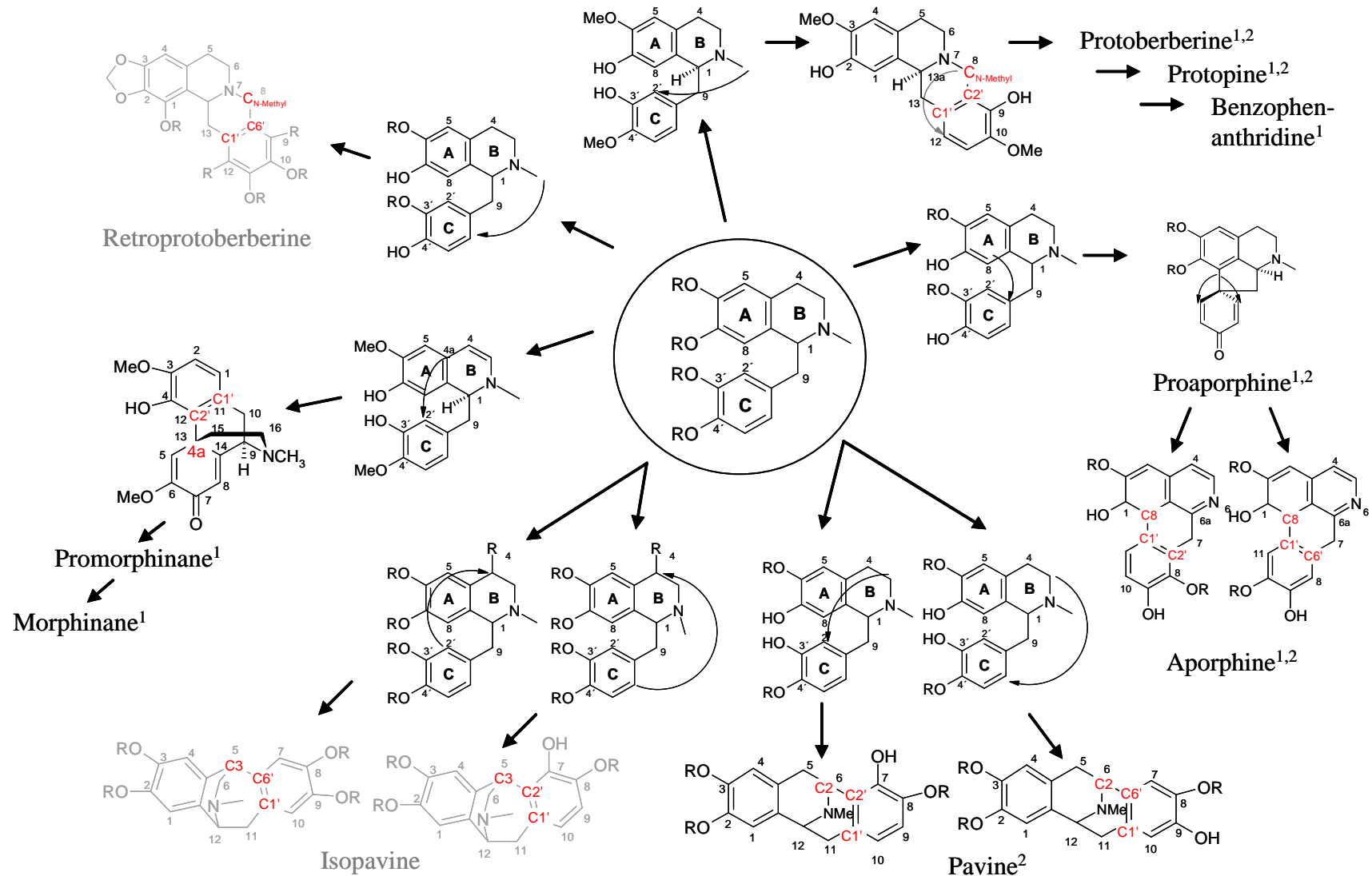
Es zeigte sich, dass beginnend von der Aminosäure L-Tyrosin zuerst Dopamin und *p*-Hydroxyphenylacetaldehyd gebildet werden, durch deren Kondensation das erste Intermediat (*S*)-Norcoclaurin entsteht (Rueffer & Zenk 1987). Das Enzym das (*S*)-Retikulin in den Protoberberinbiosyntheseweg leitet wurde ebenso charakterisiert (Rink & Böhm 1975; Steffens *et al.*, 1985), wie das den entscheidenden Schritt hin zur Morphinbiosynthese katalysierende Enzym (De-Eknamkul & Zenk 1992). Diese stereospezifische Reduktion durch die 1,2-Dehydroretikuliniumionreduktase, ist Teil der Konfigurationsumkehr am C1-Atom des 1-Benzyltetrahydroisochinolins und folgt auf eine Dehydrierung des (*S*)-Retikulins. Diese die Synthese des 1,2-Dehydroretikuliniumions konnte ebenfalls als enzymatischer Schritt beschrieben werden (Hirata *et al.*, 2004), wobei ein fünffach aufgereinigtes Protein keine Kofaktorabhängigkeit zeigte. Eine vergleichbare Konfigurationsumkehr erfolgt vom (*S*)-Canadin zum (*R*)-Canadin, ebenfalls durch Oxidation des Ringsystems und anschließender stereospezifischer Reduktion. Das die Dehydrierung von (*S*)-Canadin zu Berberin katalysierende Enzym, die (*S*)-Tetrahydroprotoberberinoxidase, konnte aus Zellkulturen von *Berberis wilsoniae* aufgereinigt und charakterisiert werden (Amann *et al.*, 1988)

### 3 Die Morphin- und Protoberberinbiosynthese auf der Transkriptebene

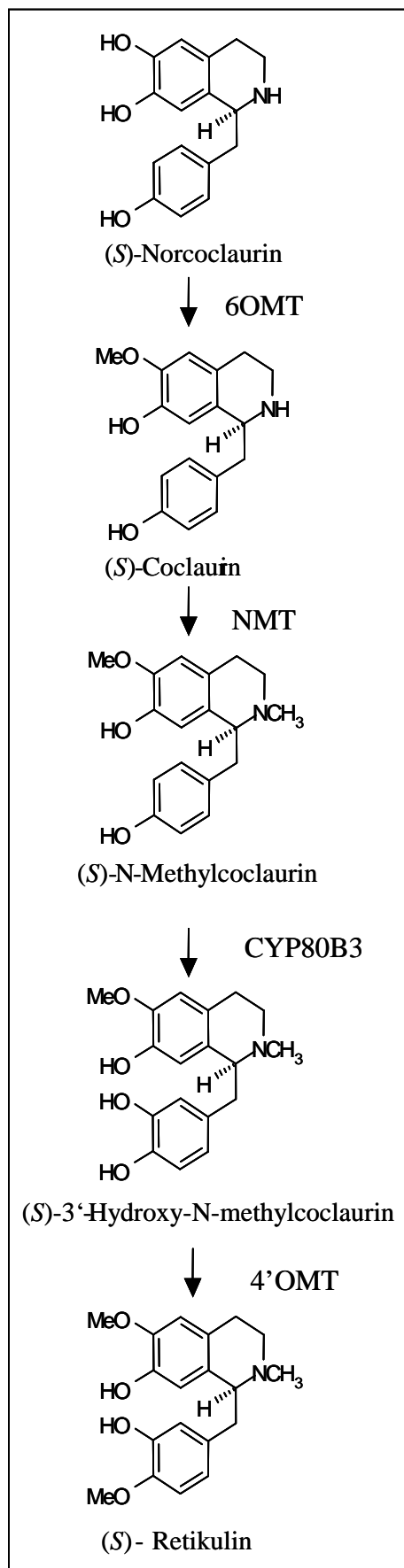
Seit der Veröffentlichung der Nukleotidsequenz des Berberinbrückenenzymes (Dittrich & Kutchan 1991), der ersten bekannten cDNA des Isochinolinalkaloidstoffwechsels, sind weitere cDNAs der Biosynthese isoliert wurden.

*Bildung des ersten Intermediates - Norcoclaurinsynthase:* Die cDNA des Enzyms das die Kondensation von Aminen den Schritt in die Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide katalysiert ist identifiziert (Minami *et al.*, 2007 und dortige Diskussion).

Abb. 1 C-C Kopplungsreaktionen ausgehend vom Tetrahydrobenzylisochinolin und die Alkaloidhauptgruppen in *P. somniferum* (1) und *Berberis spp.*(2)



Weitere Hauptgruppen : Bisbenzylisoquinoline<sup>1,2</sup>, Phthalidisochinoline<sup>1,2</sup>, Rhoeadine<sup>1</sup>, Cularine<sup>2</sup>, Isoindolbenzazepine<sup>2</sup>  
 Aporphin-Benzylisochinolindimere<sup>2</sup>, Proaporphin-Benzylisochinolindimere<sup>2</sup>, Seco-bisbenzylisochinoline<sup>2</sup>

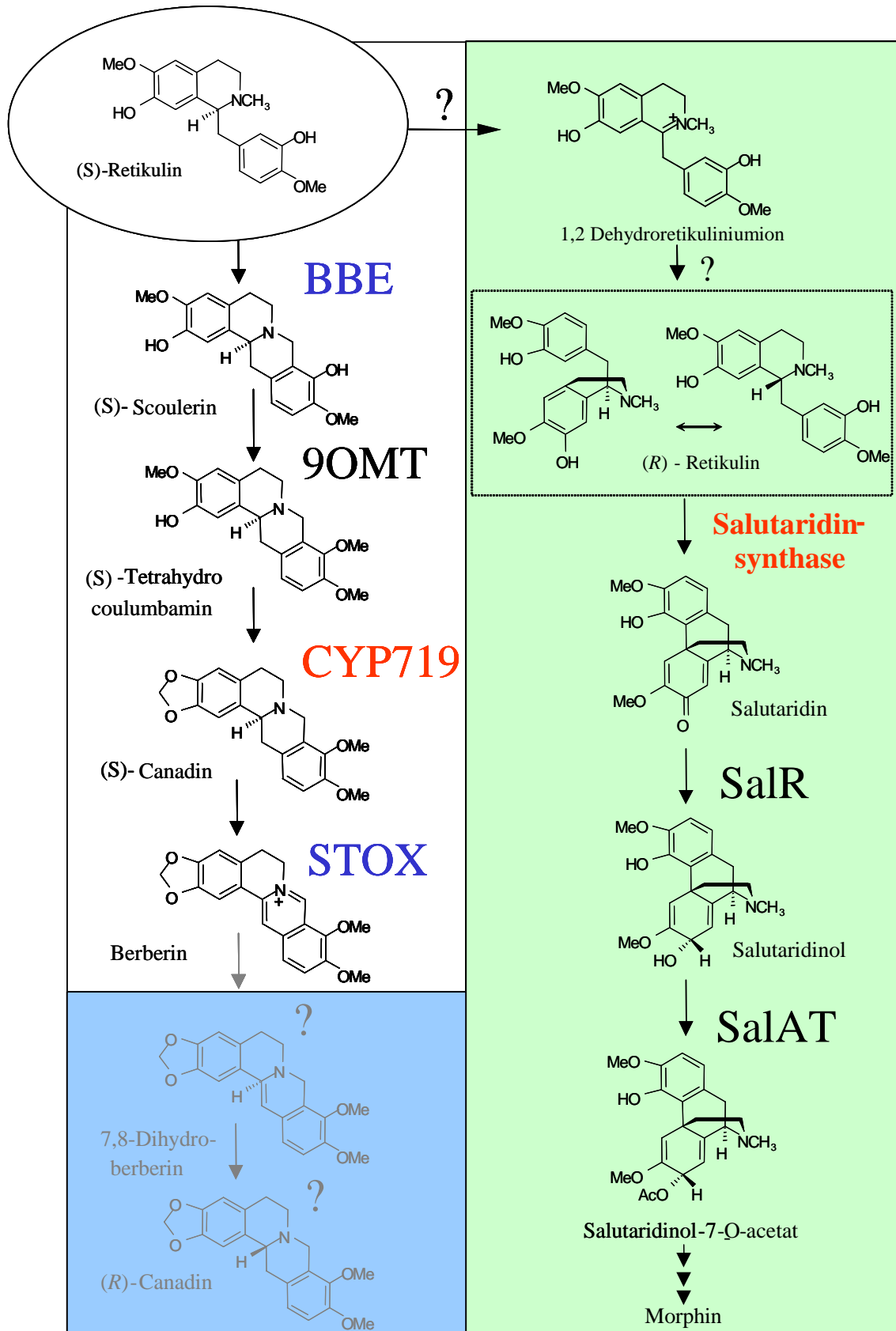


**Abb. 2 Transformation von (S)-Norcoclaurin zu (S)-Retikulin**

*Modifizierungen der Tetrahydrobenzylisochinolinstruktur:* Inzwischen ist der Weg vom (S)-Norcoclaurin bis zum (S)-Retikulin vollständig auf cDNA Ebene bekannt (s. Kutchan 1998, Abb. 2). Das Tetrahydrobenzylisochinolin (S)-Norcoclaurin wird dabei so modifiziert das die Hydroxygruppen in 6 und 4' Position sowie der Ringstickstoff durch S-Adenosylmethionin abhängige Methyltransferasen methyliert (6OMT, 4'OMT Morishige *et al.*, 2000, NMT) werden. Dem Tetrahydroisochinolinring widerfährt eine Hydroxylierung in 3' Position durch eine NADPH abhängige Monooxygenase (CYP80B3, Huang & Kutchan 2000). Durch diese Modifikationen entsteht mit (S)-Retikulin ein Intermediat für die oxidative Phenolkupplung zu einem Morphinandion bzw. des oxidativen Ringschlusses zum (S)-Scoulerin.

*Bildung der Strukturtypen durch C-C und C-O Kopplungsreaktionen:* Das bereits erwähnte Berberinbrückenenzym (BBE) setzt (S)-Retikulin zu (S)-Scoulerin um und leitet dieses so in die Protoberberinbiosynthese (Dittrich & Kutchan 1991). Ein weiteres Enzym, dessen cDNA Information bekannt ist, katalysiert die Dimerisierung von Tetrahydrobenzylisochinolineinheiten. Diese Dimere stellen die größte Anzahl an den sich vom Benzylisochinolin ableitenden Alkaloiden. Ihre Biosynthese wird auf oxidative Phenolkupplung zurückgeführt (CYP80A1 Kraus & Kutchan 1995).

*Morphinbiosynthese - Aktivierung zur Bildung des Dihydrofuranringes:* Für die Morphinbiosynthese wurde die cDNA des Enzymes, das das Ringsystems für die Umlagerung zum Thebain aktiviert, isoliert (SalAT, Grothe *et al.* 2001). Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von Acetyl-CoA an die 7-Hydroxy-



**Abb. 3 Biosynthese der Protoberberine und Morphinane ausgehend vom (S)-Retikulin**

Hintergrundfarben: Vorkommen der Biosynthese: **Weiss** in Berberis und Schlafmohn, **Blau** in Berberis nicht in Schlafmohn, **Grün** in Schlafmohn nicht in Berberis

Schriftfarben: **Blau** FAD-abhängige Oxygenasen; **Rot** NADPH abhängige Monooxygenasen (P450)

gruppe des Salutaridins ( s. Abb. 3). Auch die vorangehende stereospezifische Reduktion einer Ketogruppe zum OH-Donor ist seit dem Jahr 2006 auf der DNA Ebene bekannt (SalR, Ziegler *et al.* 2006). Für den Biosyntheseweg vom Salutaridinol bis zum Morphin ist bisher nur die Sequenz der Reduktase des Codeinons bekannt (Unterlinner *et al.*, 1999).

*Modifikation der Protoberberine und Benzophenanthridine:* Für die Biosynthese der Protoberberine und Benzophenanthridine sind neben dem Berberberinbrückenzym ebenfalls weitere Enzyme auf DNA Ebene identifiziert. Dies ist eine *S*-Adenosylmethionin abhängige Methyltransferase (9OMT, Morishige *et al.*, 2002) sowie methyldioxybrückenbildende NADPH abhängige Monooxygenasen (CYP719 Ikezawa *et al.*, 2003 & 2007). Durch die Modifikation entstehen neue Alkaloide mit geringerer Reaktivität und veränderter Löslichkeit. Unbekannt sind unter anderem die DNA Sequenzen der an der Umkehr von der *S* zur *R* Konfiguration des Retikulins bzw. Canadins beteiligten Enzyme. Auch die C-C koppelnden Enzyme außer des Berberins wie die Salutaridinsynthase sind nicht identifiziert. Für die nur in *P. somniferum* und *setigerum* vorkommende Demethylierung des Codeinons konnte bisher kein Enzym charakterisiert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung von cDNAs die für Enzyme kodieren, die oxidative Reaktionen der Biosynthese katalysieren. Oxidationen sind an der Umkehr der Konfiguration durch Dehydrierung, der Ausbildung der Grundstrukturen durch die Katalyse der C-C bzw. C-O Knüpfung sowie deren Modifikation durch Hydroxylierung, Methyldioxybrückenbildung, *N*- und *O*-Demethylierung beteiligt.

Nach der Nomenklatur des Nomenklaturkomitees der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (NC-IUBMB)\* gehören Oxidoreduktasen zu einer der sechs Enzymklassen und werden zuerst nach Elektronendonorguppe und weiter nach Elektronenakzeptorguppe eingeteilt. Wenn man der für Untersuchungen des Sekundärstoffwechsels üblichen Einteilung nach Kofaktoren folgt (s. Luckner 1991), so sind, neben unspezifischen kupferhaltigen Phenoloxidasen am Anfang der Biosynthese und der Dihydrobenzophenanthridinoxidase am Ende der Benzophenanthridinbiosynthese, zwei Klassen von Enzymen an der Oxidation der Benzylochinoline beteiligt, die Sauerstoff abhängigen FAD-bindenden Oxygenasen und die Enzyme der NADPH abhängigen Monooxygenasen, die Proteine der CYP450 Familie.

---

\* <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

# I Einleitung

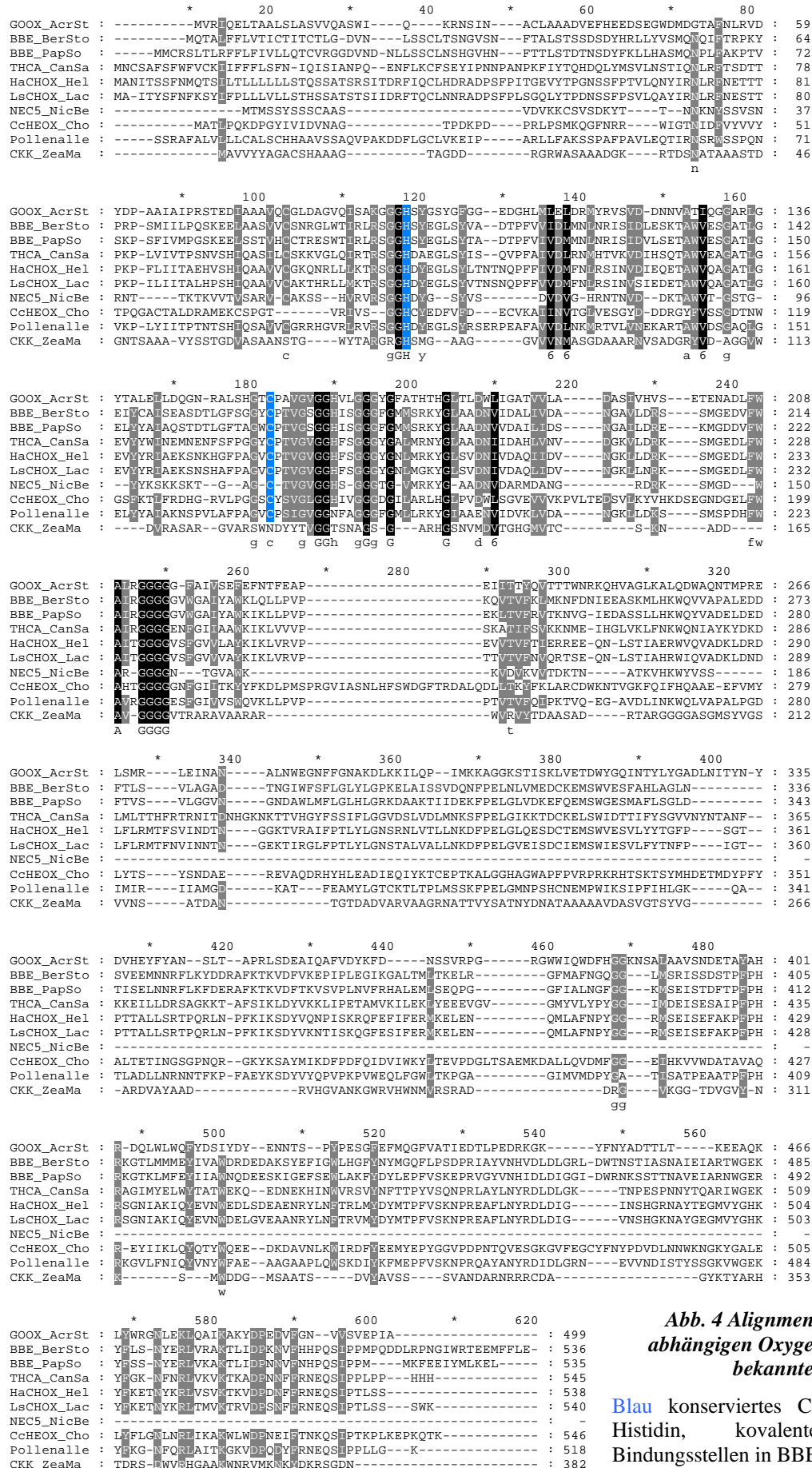


Abb. 4 Alignment der FAD-abhängigen Oxygenasen mit bekannter Funktion

Blau konserviertes Cystein und Histidin, kovalente FAD Bindungsstellen in BBE u. GOOX

### 4 Sauerstoffabhängige bivalent FAD-bindende Oxygenasen

Die Enzymfamilie der Sauerstoffabhängigen bivalent FAD-bindenden Oxygenasen ist erst kürzlich durch die Kristallstruktur einer bakteriellen Glucopoligosaccharidoxidase aus *Acremonium strictum* definiert wurden (Huang *et al.*, 2005). Das Berberinbrückenenzym (BBE, s. Abb. 3) konnte als erstes pflanzliches Enzym dieser Gruppe zugeordnet werden (Winkler *et al.*, 2006). Die Gemeinsamkeit der Enzyme beruht auf einer kovalenten Bindung des Flavinadenindinukleotides sowohl an einen Histidin- als auch an einen Cysteinrest (s. Abb.4). Das Enzym mit der höchsten Homologie zu BBE und mit bekannter Funktion ist ebenfalls ein Enzym des Sekundärstoffwechsel, die  $\Delta^1$ -Tetrahydrocannabinolsäuresynthase aus *Cannabis sativa L.* Von der Gruppe um Taura wurde dieses FAD-bindende Enzyme heterolog exprimiert (Sirikantaramas *et al.*, 2004). Weitere pflanzliche Proteine mit Homologie zu BBE und identifizierter Funktion sind Zuckeroxidasen von *Nicotiana langsdorffii*, *Helianthus anus* und *Chondrus crispus*, Cytokinindehydrogenasen von *Zea mays* sowie Pollenallergene deren katalytische Funktion unbekannt ist (s. Huang *et al.*, 2005, Liaw *et al.*, 2001, DeWitt *et al.*, 2006, s. Abb. 4).

In der Berberinbiosynthese gibt es mit dem (S)-Canadin dehydrierenden Enzym, die (S)-Tetrahydroprotoberberinoxidase (STOX, s. Abb. 3), ein weiteres der Enzymcharakteristik des aufgereinigten Proteins nach, ebenfalls zu den FAD-abhängigen Oxygenasen gehörendes Enzym (Amann *et al.*, 1988). Auch für bisher nicht charakterisierte Dehydrierungen und Ringbildungen der Isochinolinalkaloidbiosynthese, wie z.B. die zu den Retroprotoberberinen führenden C-C Kopplung, können weitere Enzyme dieser Familie als Katalysatoren angenommen werden.

### 5 Cytochrom-P450 Enzyme

Cytochrom-P450 Enzyme (CYP450) kommen in Bakterien und in allen drei Reichen der Eukaryoten vor. Ihre Aufgabe liegt in der Synthese von Hormonen, sekundären Metaboliten, Aminosäuren und Fettsäuren wie im Abbau und der Biotransformation endogener und exogener Substanzen. Pflanzliche CYP340 zeichnen sich durch eine hohe Substratspezifität aus (Schuler & Werck-Reichhart 2003). Man nimmt an, dass ihnen neben der Synthese auch eine Funktion in der Koordination der Biosynthesen durch Verankerung der Biosyntheseenzyme am Endoplasmatischen Retikulum zukommt (s. Jørgensen *et al.*, 2005). Eine weitere Charakteristik der CYP450 der Alkaloidbiosynthesen ist die Induktion ihrer Genexpression nach Elicitorbehandlung, die eine Relevanz in der Aktivierung und



Koordination der Biosynthese zur Pathogen- bzw. Herbivorenabwehr nahelegt (u.a. Camalexine: Hansen & Halkier 2005, Benzylisochinoline: Huang & Kutchan 2000, Indolalkaloide: Lopes Cardoso *et al.*, 1997). CYP450 Enzyme der Catharanthusalkaloidbiosynthese sind darüber hinaus lichtinduzierbar (Schröder *et al.*, 1999)

Durch Dr. David Nelson von der Universität Tennessee wird eine auf Sequenzhomologie basierende systematische Nomenklatur für CYP450 fortlaufend erstellt (Nebert *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1993, s. Abb.5)\*. Sequenzhomologien können zur Identifizierung von Homologen herangezogen werden. Die Homologie für die Enzyme hängt zuerst von der spezifischen Funktion und danach vom Verwandtschaftsverhältnis der Pflanzen ab.

Symbol	CYP
Familie (mehr als 40% Identität)	80
Unterfamilie (mehr als 55% Identität)	B
Identifikation	1
Ausnahme: CYP51 Familie 14alpha-Demethylase Nach Funktion der Hauptvertreter geordnet, da ubiquitär (< 40% Identität möglich)	

### **Abb. 5**

#### **Systematische**

#### **Bezeichnung von CYP450**

Eine Unterfamilie kann dabei Enzyme der gleicher Funktion, wie die Zimtsäurehydroxylasen CYP73A oder unterschiedlich Substrate verstoffwechselnde Enzyme, wie die Tabersonin-16-hydroxylase, (-) 4S-Limonene-3-hydroxylase, 5-*epi*-Aristolochen-1,3-dihydroxylase der CYP71D Unterfamilie enthalten. Für die Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide beträgt die Identität der Proteinsequenz zwischen CYP719A1 von *C. japonica*, und den methylenedioxybrückenbildenden Enzymen der Stylopinbiosynthese in *Eschscholzia californica* 64,8% ( CYP719A2 ) und 65,1% ( CYP719A3 ). CYP719A1, die (S) - Canadinsynthase, und CYP80B2 die *N*- Methylcocclaurin-3'-hydroxylase von *C. japonica* haben 25% identische Aminosäuren. Die Identität von CYP80B2 zu den *N*- Methylcocclaurin-3'-hydroxylasen von *P. somniferum* CYP80B3 und *E. californica* CYP80B1 beträgt 71% bzw. 69% ( Reaktionen der Enzyme s. Abb. 2 & 3).

Während bisher für die CYP719 Familie nur die Unterfamilie A nachgewiesen ist, besteht die CYP80 Enzymfamilie aus mehreren Unterfamilien. So existieren in den Unterfamilien 80A und 80F zwei weitere Enzyme mit bekannter Funktion. Während, wie Oben bereits erwähnt,

---

\* <http://drnelson.utm.tn.edu/CytochromeP450.html>

CYP80A1 ebenfalls Tetrahydrobenzylisochinoline als Substrat für eine Dimerisierung nutzt (Kraus & Kutchan 1995), katalysiert CYP80F1 die Umwandlung von (*R*)-Littorin in den Hyoscyaminaldehyd der Tropanalkaloidbiosynthese von *Hyoscyamus niger* (Li *et al.*, 2006). Enzyme der Unterfamilie CYP80C werden in Euphorbiaceae (*Euphorbia esula*, *Hevea brasiliensis*) in *Ipomoea nil* (Solanaceae) und in *Populus trichocarpa* (Salicaceae) exprimiert. Die weiteren Unterfamilien D und E stammen aus dem Genomsequenzierprojekt von *Populus trichocarpa*. Den Unterfamilien G und H sind wiederum Enzyme benzylisochinolinhaltiger Ranunculaceae (*Coptis japonica*, *Aquilegia formosa* x *Aquilegia pubescens*) zugeordnet.

Durch die Sequenzierung der Genome von Arabidopsis und Reis konnten 272 bzw. 457 Cytochrom-P450 Enzyme identifiziert werden. Keines dieser Cytochrom-P450 lässt sich der CYP80 Familie zuordnen. Der Vergleich von CYP450 des Reis- und Arabidopsisgenoms zeigt Orthologen, wie CYP77B1 und 77B2 (60% Identität), die in die gleiche Unterfamilie gehören, als auch solche die unterschiedlichen Unterfamilien zuzuordnen sind (Sequenzidentitäten zwischen 40-50%, Nelson *et al.*, 2004). Zusammen mit dem Auftreten von sehr ähnlichen CYP450s mit unterschiedlicher Funktion in nur einer der zwei Spezies, wie den Kaurenoxidasehomologen (fünf Reisgene mit 64-93% Identität auf Aminosäureebene, Sakamoto *et al.*, 2004) limitiert dies den Nutzen der Einteilung in Unterfamilien für die Funktionsvorhersage. Als Hauptproblem der Bestimmung der Funktion anhand von Sequenzvergleichen kommt die oft fehlende Identifikation der Funktion der meisten CYP450 hinzu. Für *Arabidopsis thaliana* sind 41 der 231 CYP450\* in ihrer Funktion bekannt, demzufolge konnte bisher 85% aller Arabidopsis CYP450 keine enzymatische Reaktion zugeordnet werden. Ein aktueller Ansatz für die *Arabidopsis thaliana* - Enzyme dieses Problem zu Lösen geht über Koexpressionsanalyse (Ehrling *et al.*, 2006)\*\*.

Für die Isolierung von alkaloidmetabolisierenden Cytochrom-P450 sind demnach zwei Probleme zu lösen 1) das Auffinden von CYP450 Sequenzen und 2) die Identifizierung von Alkaloidstoffwechsel-relevanten Enzymen.

Für die bisher bekannten CYP450 der Alkaloidbiosynthesen wurde dies wie folgt gelöst:

- Proteinaufreinigung mit anschließender Proteinsequenzierung, Ableitung degenerierter Primer und Amplifizierung eines cDNA Fragmentes sowie Isolierung der Volllänge cDNA mittels RACE, Überprüfung der Funktion durch heterologe Expression (CYP80A, Kraus & Kutchan 1995; CYP76B6, Collu *et al.*, 2001)

---

\* <http://arabidopsis-p450.biotech.uiuc.edu/functions.pdf>

\*\* <http://ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/>

- Isolierung von cDNAs aus der cDNA Bibliothek einer Suspensionskultur die in guten Ausbeuten Alkaloide produziert mittels degenerierten Primern der konservierten CYP450 Domänen, Isolierung der Volllängeklone, Überexpression, Bestimmung der Integrität des Proteins mittels CO-Spektrum und Identifizierung des Substrates durch Test des Enzymumsatzes (CYP719A1 Ikezawa *et al.*, 2003).
- Isolierung von cDNA Fragmenten aus der mRNA induzierter Suspensionskulturen, Test des Expressionsverhaltens der Transkripte, Screen einer cDNA Bibliothek auf Volllänge cDNAs, Überexpression, Bestimmung der Integrität des Proteins mittels CO-Spektrum und Identifizierung des Substrates durch Test des Enzymumsatzes (CYP72A1 Vetter *et al.*, 1992, CYP80B1, Pauli & Kutchan 1998; CYP71D12, Schröder *et al.*, 1999).
- Isolierung von Fragmenten mit Homologie zu bereits bekannten CYP450 (CYP80B3 Huang & Kutchan 2000; CYP80B2, CYP719A2 und A3 Ikezawa *et al.*, 2006; CYP80F1 Li *et al.*, 2006)
- Untersuchung von Mutanten deren Phenotyp auf einen Beteiligung an der Biosynthese hinweist und Überprüfung der Funktion des isolierten Genes durch Überexpression und heterologe Expression (CYP71B15 Schuegger *et al.*, 2006)

Die Anwendung der Korrelation des Vorkommens eines Alkaloids mit über Mikroarrays erhaltenen Genexpressionsdaten von produzierender zu nicht produzierender Pflanze wurde von Siminszky und Mitarbeitern beschrieben (Siminszky *et al.*, 2005). Dabei führte der Vergleich von nikotinhaltigen mit nornikotinhaltigen Pflanzen zur Isolierung des die Demethylierung von Nikotin zu Nornikotin katalysierenden CYP450s (CYP82E4).

Für die vorliegende Arbeit konnte auf ein vergleichbares System, die Genexpressionsanalyse von verschiedenen Papaver Arten mittels Makroarrays zurückgegriffen werden. Das Unterscheidungsmerkmal war hierbei das Vorkommen von Morphin. Vorhergehende Arbeiten der Arbeitsgruppe von Dr. J. Ziegler führten mit dieser Methode zur Identifizierung der 4'OMT und der SalR der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* (Ziegler *et al.*, 2005 u. 2006). Für die Analyse wurden CYP450 cDNA Fragmente durch PCR mittels degenerierten Domainenprimern isoliert, und Fragmente aufbauend auf den Sequenzdaten der Promotionsarbeiten von Fon-Chin Huang (2000) und Wiebke Priesner (1998) amplifiziert. Auch wurden diese Fragmente zusammen mit einer EST Sammlung von *P. somniferum* (Ziegler *et al.*, 2005) zur Untersuchung der Elicitierung von Suspensionszellkulturen und zur Bestimmung der auftretenden Transkriptänderung mittels Makroarrays verwendet.

Ziel der Promotionsarbeit war demnach die Isolierung neuer CYP450 Enzyme der Alkaloidbiosynthese. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit einem Enzym der Sauerstoffabhängigen FAD-bindenden Oxygenasen. Für die (*S*)-Tetrahydroprotoberberinoxidase wurde versucht die entsprechende cDNA Sequenz zu erhalten und durch heterologe Expression des Proteins zu bestätigen. Es konnte dabei auf die Arbeiten von Christian Böttcher (Reinigung des Enzyms) von der Arbeitsgruppe von Prof. Zenk des Biozentrums Halle und von Christin Richter (cDNA Fragmentisolierung aus Peptidsequenzen) von der Abteilung Naturstoffbiochemie, aufgebaut werden.

## II Materialien

### 1 Organismen

#### 1.1 Pflanzen und pflanzliche Zellkulturen

*Papaver somniferum* L. Institut für Pflanzenbiochemie/ Abt. NBT  
*Papaver somniferum* L. Stamm Paris Institut für Pflanzenbiochemie/ Abt. NBT

#### 1.2 Bakterien

*Escherichia coli*

XL1 Blue MRF' STRATAGENE F-, pro AB, lacIqZDM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>), Δ(mcrA)183  
 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1  
 gyrA96 relA1 lac

DH10 Bac INVITROGEN F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74*  
*recA1 endA1 araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK λ-*  
*rpsL nupG* /pMON14272 / pMON7124

#### 1.3 Pilze

*Saccharomyces cerevisiae*

Watt 11 Pompon, D et al., 1996  
 freundlicher Weise erhalten von Prof. Dr. Danièle Werck-Reichhardt  
 vom IBMP- CNRS in Strasbourg, FRA

*Botrytis cinerea* DSMZ Braunschweig

#### 1.4 Insektenzellkulturen

*Spodoptera frugiperda*

*Sf-9* freundlicher Weise von Dr. Reimar Johné aus der Arbeitsgruppe von  
 Prof. Müller am Institut für Virologie, veterinärmedizinische Fakultät, der  
 Universität Leipzig erhalten

### 2 Insektenzellkultur Medien & Supplementierung

TC-100 Insect Medium INVITROGEN	13055-025
Foetal Calf Serum INVITROGEN	10270-106
Pluronic F-68 INVITROGEN	24040-32
Antibiotic, antimycotic (100X) liquid INVITROGEN	15240-096
Cryo-SFM PROMOCCELL	C-29910

### 3 Vektoren

- TA-Klonierung

pGEMT PROMEGA	A3600
pGEMT <sub>EASY</sub> PROMEGA	A1360
pCR®2.1 (TA-Cloning) INVITROGEN	K2020-20

- Proteinexpression in *Sf-9* cells

pFastBac1	INVITROGEN (Teil des Bac-to Bac® Systems)	
pVL1393	BD BIOSCIENSE	21201P
pACGP67A	BD BIOSCIENSE	21223P

- Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

pYEDP60 freundlicher Weise erhalten von Prof. Dr. Danièle Werck-Reichhardt vom IBMP- CNRS in Strasbourg, FRA

**4 Enzyme und Kits für molekularbiologisches Arbeiten****Kits**

BD GenomeWalker™ Universal Kit	BD BIOSC./ TAKARA BIO INC.	638904
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	BD BIOSC./ TAKARA BIO INC.	634914
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	APPLIED BIOSYSTEMS	4336917
Megaprime™ DNA Labeling System	AMERSHAM CO./GE HEALTHCARE	RPN1604

**Enzyme**

Antarctic Phosphatase	NEB	M0289G
BD Advantage 2 Polymerase Mix	BD BIOSC.	639201
DNA Polymerase I ( <i>E. coli</i> )	NEB	M0209S
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	NEB	M0210S
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant	PROMEGA	M3681
Pfu DNA Polymerase	FERMENTAS	EP0501
RNaseA	BÖHRINGER MANNHEIM/ROCHE	109142
RNaseH	NEB	M0297S
T4 DNA Ligase	NEB	M0202S
T4 Polynucleotide Kinase	NEB	M0201S
Taq DNA Polymerase	PROMEGA	M2031

**5 Antikörper**

His•Tag® Monoclonal Antibody	NOVAGEN/ MERCK BIOSC.	70796-4
Goat anti-Mouse IgG HRP	NOVAGEN/ MERCK BIOSC.	71045-3

**6 Chemikalien & Substanzen**

Ammoniumpersulfat	ROTH	9592.2
5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP)	FLUKA/SIGMA-ALDRICH	16670
Bradford Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)	BIO-RAD	9500-0006
Bromphenolblau	ROTH	A512.1
Coomassie® Brilliant Blue G 250	SERVA	35050.01
1,4- Dithiothreitol (DTT)	ROTH	6908.2
Dynabeads®M-280 Streptavidin	DYNAL/INVITROGEN	112.05 / 602-10
Emulgen 913	KARLAN	2846
Flavinadenindinukleotid (FAD)	FLUKA/SIGMA-ALDRICH	446360
Flavinadeninmononukleotid (FMN)	SIGMA-ALDRICH	F-6750
Leupeptin	SIGMA-ALDRICH	L-2884
Long Ranger® Gel Solution	CAMBREX	50611

3-(N-morpholino)-2-propansulfon acid (MOPS) ROTH	69794
NADPH FLUKA/SIGMA-ALDRICH	43420
Nitroblue tetrazolium (NBT) FLUKA/SIGMA-ALDRICH	74032
Nonidet P-40 SIGMA-ALDRICH	N-6507
Pepstatin A SIGMA-ALDRICH	P-5318
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) SIGMA-ALDRICH	P-7626
Ponceau S SIGMA-ALDRICH	A980.3
Polyvinylpyrrolidon (PVP) SIGMA-ALDRICH	PVP40
Roti®-Aqua-Phenol ROTH	A980.3
Roti®-Phenol (pH 7,5-8)-Chloroform-Isoamylalkohol ROTH	A156.2
Rotiphorese® Gel 30 ROTH	3029.1
Sodium dodecyl sulfate (SDS /Natriumlaurylsulfat) SIGMA-ALDRICH	5136.1
Sephadex G-50 Superfine AMERSHAM CO./GE HEALTHCARE	17-0573-02
N,N,N',N'-tetramethylethylen-diamin (TEMED) ROTH	2367.1
Thioglykolsäure (TGA) FLUKA/SIGMA-ALDRICH	88650
N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycine(Tricin) APPLICHEM	A1085,1000
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) ROTH	5429.3
Tween 20 ROTH	A9127.1
Xylencyanol FF SIGMA-ALDRICH	X-4126
$\gamma$ [P <sup>33</sup> ] ATP HARTMANN ANALYTIC	SRF-301
$\alpha$ [P <sup>33</sup> ] dATP HARTMANN ANALYTIC	SRF-203
$\alpha$ [P <sup>32</sup> ] dATP HARTMANN ANALYTIC	SRP-203

Alkaloide sind fast ausschließlich der Naturstoffsammlung der Abteilung Naturstoffbiotechnologie des IPB Halle entnommen und stammen von den Synthesen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Meinhard Zenk der Universität München. Scoulerin wurde von ROTH, Salsolinol von SIGMA bezogen.

Freundlicher Weise wurden Phenylpropanoide von Dr. Thomas Vogt der Abteilung Sekundärstoffwechsels des IPB Halle erhalten. Epibrassinolide, Epithyphasterol und Epicatasterone stammen dankenswerter Weise von PD Dr. Bernd Schneider vom MPI für chemische Ökologie, Jena.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ROTH, SIGMA-ALDRICH und MERCK BIOSC. bezogen.

## 7 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Bodyne Membrane PALL	
3130/3100-Avant™ Genetic Analyzer Capillary Array, 36 cm APPLIED BIOSYSTEMS	4333464
3130/3100-Avant™ Genetic Analyzer Capillary Array, 50 cm APPLIED BIOSYSTEMS	4333466
Cellstar® Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well GREINER BIO-ONE	657160
Cellstar® Zellkultur Multiwellplatte, 12 Well GREINER BIO-ONE	665180
MinElute Gel Extraction Kit (50) QIAGEN	28604
QIAfilter Plasmid Midi Kit QIAGEN	12243
QIAprep® Spin Miniprep Kit QIAGEN	27106
Oligotex® mRNA Midi Kit QIAGEN	70042
POP-6™ Polymer for 3100/3100-Avant™ Genetic Analyzers APPLIED BIOSYSTEMS	4316357
ProbeQuant™ G-50 Micro Columns AMERSHAM BIOSCIENCE/GE HEALTHCARE	27-5335-01
T-25 EasyFlasks™ Nunclon™Δ NUNC	156340

## 8 Geräte

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	APPLIED BIOSYSTEMS
Centrifuge 5810 R	EPPENDORF
Centrifuge 5415 D	EPPENDORF
Centrifuge RC28S	SORVALL
Gel Doc 1000	BIO RAD
HPLC, Agilent 1100 Serie	HEWLETT PACKARD
Mastercycler Gradient	EPPENDORF
Speed Vac SPD 111V	THERMO SAVANT
Storage Phosphor Screen	MOLECULAR DYNAMICS / GE HEALTHCARE
Storm 860 Molecular Imager	MOLECULAR DYNAMICS / GE HEALTHCARE
Stratalinker-1800™	STRATAGENE
Ultracentrifuge LE-80	BECKMAN
Ultrospec® 3000 Photometer	PHARMACIA BIOTECH / GE HEALTHCARE
Varioklav Dampfsterilisator 250T (H+T)	VARIOKLAV



## III Methoden

### 1 Anzucht von *Papaver somniferum* L. Pflanzen

*P. somniferum* L. wurde auf einem Freilandbeet in Sachsen-Anhalt angebaut. Ab April erfolgte die Aussaat, was im Juni/Juli desselben Jahres zur Blüte führte. Parallel erfolgte die Anzucht von Pflanzen bei 24°C und 50% Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus unter 18 h Belichtung pro Tag.

### 2 Anzucht von *Papaver somniferum* L. Suspensionszellkulturen

---

Für einen Liter Linsmaier & Skoog Medium (LS) pH 6,0

*Mikroelemente:* 0,025 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O // 0,025 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O // 36,7 mg FeNaEDTA  
6,2 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> // 0,83 mg KJ // 16,9 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O // 0,25 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·  
2H<sub>2</sub>O // 8,6 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

*Makroelemente:* 332,0 mg CaCl<sub>2</sub> // 170 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> // 1900 mg KNO<sub>3</sub> // 180,5 mg  
MgSO<sub>4</sub> // 1650 mg NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

*Vitamine:* 100 mg myo-Inositol // 0,4 mg Thiamin·HCl

*Hormone:* 0,22 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure // 0,186 mg 1-Naphtylessigsäure  
30 g Saccharose

---

Die *Papaver somniferum* L. Stamm Paris Suspensionszellkulturen wurden seit 1999 kontinuierlich in der Abteilung Naturstoff Biotechnologie gehalten. Sie stammen ursprünglich aus der Sammlung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zenk der Universität München.

Die Zellkulturen von *Papaver somniferum* wurden in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 400 ml LS-Medium (nach Linsmaier & Skoog, 1965) bei 23°C unter Dauerbeleuchtung geschüttelt (Lichtintensität 750 lux / 100 rpm). Von jeder Suspensionskultur wurden nach sieben Tagen 150 ml Kultur abgenommen und mit Medium auf ein Endvolumen von 400 ml gebracht.

### 3 Elicitierung der *Papaver somniferum* L. Suspensionszellkulturen

---

Für einen Liter Gamborg Medium (B5) pH 5,5

20 g Saccharose

*Mikroelemente:* 0,025 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O // 0,025 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O // 43 mg FeNaEDTA  
3 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> // 0,75 mg KJ // 10 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O // 0,25 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O //  
2 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

*Makroelemente:* 150 mg CaCl<sub>2</sub> // 150 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> // 2500 mg KNO<sub>3</sub> // 250 mg MgSO<sub>4</sub>  
// 134 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

*Vitamine:* 100 mg myo-Inositol // 10 mg Thiamin-HCl // 1 mg Nicotinsäure //  
1 mg Pyridoxin-HCl

*Hormone:* 1mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

*Botrytis cinerea* DSMZ Braunschweig

---

Für die Elicitierung mit *Botrytis cinerea* wurde dieser aus einer Kultur des DSMZ in 100 ml B5 Medium (Gamborg et al., 1968) sechs Tage lang unter Schütteln (155 rpm) und wenig Licht angezogen. Das Mycel wurde im Medium mittels Glashomogenisator homogenisiert und zentrifugiert. Der autoklavierte Überstand wurde als Elicitor verwendet (nach Eilert et al., 1985). Elicitiert wurden 4 Tage alte *Papaver somniferum* Zellkulturen. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen zu 100 ml Kultur zwei Milliliter *Botrytis cinerea* Präparation, Methyljasmonat (EK 100µM), Brassinolid (EK 1,5µM) oder 24 Epi-Brassinolid (EK 1,5µM) hinzugegeben.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden 10 ml Zellkultur steril entnommen. Davon wurden für die Alkaloidbestimmung 5 ml abgenommen und nach Zugabe von ein paar Metallkugeln (Ø 1 mm), durch sehr starkes Schütteln in einem mini-Bead-Beater-8™ aufgeschlossen und mit Ethylacetat sauer extrahiert (3-4h bei RT; pH 3-4). Für die RNA Isolierung wurde das Medium durch Vakuumfiltration mittels Wasserstrahlpumpe durch einen Büchnertrichter abgetrennt, das Feuchtgewicht der auf dem Filterpapier verbleibenden Zellen bestimmt und diese in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **4 Isolierung der Nukleinsäuren**

##### **4.1 RNA-Isolierung (TRIzol-Methode)**

---

*Extraktionspuffer:* 0,8 M Guanidiniumthiocyanat // 0,4 M Ammoniumthiocyanat //  
0,1 M Natriumacetat pH 5,0 // 5% Glycerol // 38% Phenol pH 4,5-5  
Chloroform; Isopropanol; Ethanol

---

Die RNA Isolierung erfolgte durch die TRIzol-Methode (Chrigwin et al. 1979, Chomczynski & Sacchi 1987). Sie beruht auf der Fällung von Proteinen und Zellwandbestandteilen durch Wasserentzug mittels des chaotropen Salzes Guanidiniumthiocyanat, der Abtrennung von DNA durch saure Phenol-Chloroform Extraktion sowie der Fällung der RNA aus der

wässrigen Phase unter Zugabe von Alkohol (Verringerung der Dielektrizität) und einem monovalenten Kation (Salzbildung) in der Kälte.

Ein bis fünf Gramm Pflanzengewebe bzw. Zellen der Suspensionskulturen wurden je zu 1-5 g in flüssigen Stickstoff zu einem Pulver gemörsert und portionsweise im RNA-Extraktionspuffer (10 Volumenteile) vollständig suspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 2 Volumenteilen Chloroform. Es wurde erneut fünf Minuten, jetzt unter langsamen Schütteln auf einem Vertikalschüttler, bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation (10 min / 3200×g, 24°C). Die entstandene obere Phase wurde abgenommen und mit einem gleichgroßen Volumen Isopropanol versetzt. Nach Mischen durch Invertieren der Gefäße wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur gefällt und anschließend erneut zentrifugiert (10 min / 3200×g, 4°C). Mit 70% Ethanol (1 ml) wurde das Pellet gewaschen, d.h. kurz geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min / 3200×g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ca. 0,2-0,3 Volumenteilen Wasser gelöst. Wenn notwendig, wurde zum Herauslösen der RNA zehn Minuten auf 65°C erhitzt und Verunreinigungen danach abzentrifugiert (1 min / 15.000×g, RT). Die erhaltene RNA wurde, mit Ausnahme der Kapsel RNA Präparationen (s. III.4.2), direkt verwendet (III.7/8/9) bzw. die enthaltene Poly A+ RNA isoliert (s.III.4.3).

#### **4.2 Kapsel RNA-Aufreinigung (LiCl Fällung)**

---

6 M LiCl - Lösung

Ethanol

---

Da Kapsel RNA Präparationen nur geringe Ausbeuten bei Kopräzipitation mit größeren Mengen fadenförmig ausfallenden Verunreinigungen ergaben, wurden diese Proben weiter aufgereinigt. Dazu erfolgte eine Lithiumchloridfällung in Anlehnung an ein Protokoll zur RNA Isolierung nach der Phenol/SDS Methode (Palmiter 1974, s.III.4.4.) durchgeführt. Die Isolierung der Kapsel RNA durch die TRIzol-Methode mit anschließender LiCl- Fällung ergab wesentlich bessere Ausbeuten als die Isolierung nach der TRIzol- bzw. Phenol/SDS-Methode. Die Kapsel TRIzol RNA Präparation (s.III.4.1) wurde in Wasser (3,5 Volumenteilen der Ausgangsmenge) vollständig gelöst und mit demselben Volumen einer 6 M LiCl - Lösung (3,5 Volumenteile) über Nacht bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugieren (15 min / 15.000×g, 4°C) und Waschen mit 0,5 ml 70% Ethanol, wurde die RNA getrocknet und in 0,2-0,3 Volumenteilen Wasser aufgenommen.

#### 4.3 Aufreinigen von Poly A+ RNA aus total RNA

---

##### Oligotex<sup>®</sup> mRNA Midi Kit

Bindungspuffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5 // 1 M NaCl // 2 mM EDTA // 0,2% SDS

Waschpuffer 10 mM Tris-HCl pH 7,5 // 150 mM NaCl // 1 mM EDTA

Elutionspuffer 5 mM Tris-HCl pH 7,5

---

Zur Isolierung von mRNA aus total RNA (s.o.) wurde das Oligotex<sup>™</sup> Kit der Firma QIAGEN genutzt. Nach Erhitzen der DNA zur Zerstörung von Sekundärstrukturen (3 min 70°C) wurde nach den Anweisungen des Herstellers bei Raumtemperatur die RNA in Bindungspuffer mit, kovalent an Polystyren-Latex Partikeln gebundenen, dC<sub>10</sub>T<sub>30</sub> Oligonukleotiden für 10 min hybridisiert, dem Firmenprotokoll folgend gewaschen und mit 70°C heißen Elutionspuffer eluiert.

#### 4.4 Isolierung von genomischer DNA aus *P. somniferum* L. (Phenol/SDS Methode)

---

*Resuspensionspuffer:* 10 mM Tris-HCl pH 7,5 // 50 mM NaCl // 1% SDS // 4% PVPP  
// 1 mM EDTA // 14 mM β-Mercaptoethanol

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

6 M LiCl- Lösung

Ethanol; Isopropanol

---

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde 1 g Gewebe unter Kühlung mit flüssigem N<sub>2</sub> gemörsert und in Resuspensionspuffer aufgenommen, mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert (1 VT, 5 min / 3200×g, RT). Die wässrige Phase abgenommen, mit Isopropanol (1 VT) 10 min auf Eis gefällt und anschließend zentrifugiert (15 min / 3200×g, 4°C). Das Pellet wurde gewaschen (70% Ethanol, 5 min / 3200×g, 4°C), getrocknet, in 50 µl Wasser aufgenommen und über Nacht bei 4°C, durch Zugabe von 50 µl 6 M LiCl- Lösung, die RNA gefällt. Nach dem Pelletieren (15 min / 15.000×g, 4°C) wurde der Überstand erneut wie oben beschrieben mit Isopropanol gefällt, das DNA Pellet gewaschen und in 50 µl Wasser aufgenommen.

#### 4.5 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

---

*Resuspensionspuffer*: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 // 10 mM EDTA pH 8,0 //

RNase 100 µg/ml

*Lysispuffer (2X)*: 1% SDS // 200 mM NaOH

*TE-Puffer*: 10 mM Tris-HCl pH 8,0 // 1 mM EDTA pH 8,0

3M Kaliumacetatlösung pH 5,5; Ethanol

---

Übernachtskulturen (1-1,5 ml) wurden abzentrifugiert (1 min / 15.000×g, RT), der Überstand vollständig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl Resuspensionspuffer suspendiert. Nach drei bis max. fünf Minuten Lyse der Zellen durch Zusatz von 150 µl Lysispuffer wurde die Lösung durch Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetat-lösung pH 5,5 neutralisiert. Zur Abtrennung von genomischer DNA, Proteinen, Zellwandbestandteilen und SDS wurden die Proben durch invertieren der Gefäße gemischt, 10 -15 min auf Eis inkubiert, erneut gemischt und zentrifugiert (10 min / 15.000×g, RT). Der Überstand (400 µl) wurde zu 1 ml eiskaltem Ethanol gegeben, die DNA 10 min auf Eis gefällt und pelletiert (10 min / 15.000×g, 4°C). Das Pellet wurde mit 500 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen (5 min / 15.000×g, 4°C), getrocknet und in 50 µl TE - Puffer gelöst.

#### 4.6 Plasmid DNA Isolierung aus Hefe

---

QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit

P1 RNasehaltiger Puffer (50 mM Glucose // 25 mM Tris-HCl pH 8,0 // 10 mM EDTA // 0,1 mg/ml RNaseA)\*

P2 NaOH SDS-haltiger Lysispuffer (200 mM NaOH // 1% SDS)\*

N3 Essigsäure und Guanidinhydrochlorid-haltiger Neutralisierungs- und Bindungspuffer (4 M Kaliumacetat pH 5,5 // 3 M Guanidinhydrochlorid)\*

PB Guanidin- und Isopropanol-haltiger Waschpuffer,

PE Waschpuffer (50 mM NaCl // 10 mM Tris-HCl pH 7,5 // 2,5 mM EDTA // 50% Ethanol)\*

---

Zur Isolierung wurden 5 ml der Hefekulturen nach 16-24 h Inkubation verwendet. Die Kulturen wurden für 5 min bei 5000×g pelletiert, resuspendiert (250 µl P1) und anschließend aufgeschlossen. Dafür wurden nach der Resuspension ca. 50 µl Glaskugeln (Sigma) zugesetzt

---

\* keine Herstellerangaben erhältlich, Angaben aus vergleichbaren Protokollen zur Verwendung mit ca. 2g SiO<sub>2</sub> d=1-5 µm

und für 5 min heftig geschüttelt. Nach dem Absetzen der Glaskugel wurde dem QIAprep Protokoll von QIAGEN folgend, vergleichbar der Plasmidisolierung aus *E. coli*, lysiert (250 µl P2) und neutralisiert (350 µl N3), bevor zur Aufreinigung die DNA unter Anwesenheit eines Guandinsalzes an eine Silicagelmembran gebunden wurde. Die vollständige Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen erfolgte durch zwei Waschschrte (mit 500 µl PB, 750 µl PE). Die DNA wurde danach mit Wasser (50 µl) eluiert. Die Inkubationszeit vor der Elution wurde abweichend von den Herstellerangaben auf 3-5 min verlängert.

#### 4.7 Bacmidisolierung aus *E. coli*

---

##### QIAfilter Plasmid Midi Kit

P1 Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 // 10 mM EDTA // 100 µg/ml RNaseA
P2 Lysispuffer	200 mM NaOH // 1% SDS (w/v)
P3 Neutralisationspuffer	3 M Kaliumacetat pH 5,5
QBT Equilibrierungspuffer	750 mM NaCl // 50 mM MOPS pH 7,0 // 15% (v/v) Isopropanol // 0,15% (v/v) Triton® X-100
QC Waschpuffer	1,0M NaCl // 50 mM MOPS pH 7,0 // 15% (v/v) Isopropanol
QF Elutionspuffer	1,25M NaCl // 50 mM Tris-HCl pH 8,5 // 15% (v/v) Isopropanol
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 // 1 mM EDTA

---

Aus 3 ml einer mindestens 8 h gewachsenen Starterkultur wurden 500 µl zu 50 ml neuen Medium gegeben und über Nacht inkubiert. Der Zellaufschluss und ein erster Reinigungsschritt entsprach denen der Plasmidreinigungen (s.III.4.5/6). Die Bakterien wurden pelletiert (10 min / 2500×g) und in 4 ml Resuspensionspuffer suspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lysispuffer wurde die Zellen bis zu 5 Minuten lysiert und danach mit 6 ml P3 neutralisiert. Zur Fällung von Verunreinigungen wurde 20 min auf Eis inkubiert. Durch zweimaliges Zentrifugieren (30 min / 2500×g, 4°C u. 15 min / 2500×g, 4°C) wurden diese abgetrennt. Die DNA wurde als Kaliumsalz unter Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol aus dem Überstand für 30 min bei 4°C gefällt und bei 2500×g 30 min 4°C pelletiert. Die DNA wurde gewaschen (2 ml 70% Ethanol; 10 min / 2500×g, 4°C), der Überstand abgenommen, die DNA getrocknet, in ca. 500 µl TE aufgenommen und mit 5 ml QBT Puffer versetzt.

Im Gegensatz zu der vorher beschriebenen Methode beruht die weitere Aufreinigung auf der Interaktion der DNA mit einem Anionenaustauscherharz. Eine fertig im Kit enthaltene Anionenaustauschersäule wurde mit 4 ml des Puffers QBT equilibriert. Die DNA wurde in

einem neutralen, salzhaltigen Puffer (QBT) auf die Säule gegeben. RNA und Verunreinigungen wurden durch einen Waschschrift mit leicht erhöhter Salzkonzentration (GC-Puffer) vollständig entfernt. Die DNA wurde durch Schwächung der Interaktion mittels pH Erhöhung (pH 8,5) und weiter erhöhter Salzkonzentration von der Säule eluiert (QF-Puffer). Die DNA wurde wie oben beschrieben mit 0,7 VT Isopropanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in ca. 100 µl Wasser aufgenommen.

#### **4.8 Baculovirus DNA aus Sf9 Zellen**

Aus 5 ml des Überstandes der Virenamplifikation (Virusstock) wurde durch Phenol-Chloroform- Extraktion DNA angereichert (s. folgend III.5).

### **5 Konzentrierung und Reinigung von DNA durch Phenol-CHCl<sub>3</sub> Extraktion**

---

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

*TE-Buffer*: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 // 1 mM EDTA pH 7,5

3M Natriumacetat pH 5,5; Ethanol

---

Die Aufreinigung der DNA von Proteinen, Lipiden und Oligonukleotiden erfolgte über ein Zweiphasensystem. Ein Teil wässrige DNA-haltige Lösung (kleinstes Volumen 100 µl) wurde mit einem Teil Phenol-Chloroform versetzt, 30 s gemischt, 30 s stehen gelassen und erneut gemischt. Danach wurden die Phasen mittels Zentrifugation(1 min / 15000×g, RT) getrennt, die obere Phase vorsichtig abgenommen und wenn notwendig die wässrige Phase erneut extrahiert bzw. verbleibende Phenolverunreinigungen aus der Wasserphase mit Chloroform abgetrennt. Die erhaltene wässrige Phase wurde mit 1/10 VT 3 M Natriumacetat und 2,5 VT Ethanol bei -20°C 2 h gefällt, zentrifugiert (30 min / 15000×g, 4°C), mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen (50 µl) und nach dem Trocknen im gewünschtem Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

### **6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Lambert Beer durch Absorptionsmessung bei 260 nm (Absorbtion =  $k \cdot \text{Konzentration} \cdot \text{Schichtdicke}$ ;  $k_{\text{ds DNA}} = 20 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;

$k_{\text{RNA}} = 25 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\text{Ø MW}_{\text{bp}} 660 \text{ g/mol}$ ) an einem Ultrospec® 3000 Photometer (Pharmacia Biotech). Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde durch die Bestimmung des Koeffizienten aus  $\lambda_{260}$  und  $\lambda_{280}$  bestimmt (positiv  $\lambda_{260}/\lambda_{280} = 1,8-2,0$ ).

## 7 Auftrennung der Nukleinsäuren

### 7.1 Auftrennung von RNA in Agarosegelen

---

*Denaturierungspuffer:* 1xMOPS-Puffer // 6% (v/v) Formaldehyd // 50% (v/v) Formamid // 1,5x Ladepuffer

*1x MOPS-Puffer:* 100 mM MOPS // 5 mM Na-Acetat // 1 mM EDTA pH 7,0

*10x Ladepuffer:* 50% (v/v) Glycerol // 0,1M EDTA pH 8,0 // Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol // 100  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid

*Formamid-haltiges Agarosegel:* 1,2% (w/v) Agarose // 1xMOPS // 2% Formaldehyd

---

Die Proben wurden mit dem 2-2,5 fachen Volumen an Denaturierungspuffer versetzt, 20 min bei 60°C erhitzt, auf RT abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Für die Auftrennung von RNA wurden 1,2 prozentige Formaldehydgele verwendet. Beim Gießen der Gele wurde das Formaldehyd erst bei einer Temperatur von unter 60°C zugegeben. Getrennt wurde bei 70-90V im MOPS-Puffer.

### 7.2 Auftrennung von DNA in- und Isolierung aus Agarosegelen

---

*TAE-Puffer:* 2 M Tris-Acetat // 50 mM EDTA

*10x Ladepuffer:* 50% (v/v) Glycerol // 0,1 M EDTA pH 8,0 // Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol // 100 $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid

MiniElute™ KIT QIAGEN

---

#### A. Auftrennung

Die DNA Fragmente wurden auf einprozentigen Agarosegelen aufgetragen (bei einer Größe >5 kb, 0,7%) und bei 70-100 V in TAE-Puffer getrennt.

#### B. Reinigung

Nach dem Auftrennen der Fragmente wurden diese unter UV (360 nm) ausgeschnitten und bei 50°C für 10 min unter gelegentlichem Umschütteln im dreifachen Volumen QG-Puffer



gelöst. Mit einem Volumen Isopropanol versetzt und nach Herstellerangaben ( MiniElute™ der Firma QIAGEN™) an eine Silicamembran gebunden, gewaschen und eluiert. Prinzipiell ist die Methode mit der Plasmidreinigung wie unter III.4.6 beschrieben identisch. Dem Bindungspuffer QG ist zusätzlich ein pH Indikator zugesetzt um einen pH von  $\leq 7,5$  sicherzustellen.

### 7.3 Auftrennung von DNA in- und Isolierung aus Polyacrylamidgelen

---

*Polyacrylamidgel:* 7 M Harnstoff // TBE // 5% Long Ranger® Gel Solution\* //

0,0625% (v/v) TEMED // 0,05% (w/v) APS

*Ladungspuffer:* 98% Formamid // 10 mM EDTA // Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol

*10x TBE pH 8,3:* 89 mM Tris // 89 mM H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> // 2 mM EDTA

---

Auf ein equilibriertes Polyacrylamidgel (20 min, 2000 V in TBE) wurden die Fragmente in formamidhaltigen Ladepuffer aufgetragen und bei 2000 V ca. 2 h 30 min in TBE Puffer getrennt. Danach wurde das Gel getrocknet und ein Film für mindestens 2 Tage exponiert. Nach der Entwicklung des Filmes wurden Banden ausgewählt und ausgeschnitten. Die cDNA Fragmente wurden aus dem Gel bei 25°C 10 min und bei 99°C 15 min in 50µl H<sub>2</sub>O extrahiert und der Überstand direkt zur Amplifikation mittels PCR (s. III.12.2 Programm Taq) eingesetzt.

## 8 Fixierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren

### 8.1 Northern Blot

---

*1xSSC:* 150 mM NaCl // 15 mM Natriumcitrat

*Hybridisierungslösung.:* 5xSSC // 0,1% SDS // 5xDehnhardt Lösung (0,1 g BSA / 0,1g PVP / 0,1 g Ficoll auf 100 ml) // 125 µg/ml Heringssperma DNA

---

#### A. Blot

Die RNA wurde im Agarosegel aufgetrennt (vgl.III.7.1) und das Gel anschließend in 10 x SSC für 15 min equilibriert. Das Gel wurde auf drei Lagen Blotpapier gelegt und über

---

\* entspricht von den Eigenschaften her, einer 5 % Polyacrylamidgellösung (19:1)

Filterpapier mit einem Pufferreservoir verbunden. Auf das Gel wurde eine mit Wasser vollständig befeuchtete Nylonmembran sowie folgend drei Lagen Blotpapier gelegt und für den Kapillarblot ausreichend trockenes saugfähiges Papier darüber geschichtet, beschwert und über Nacht die RNA auf die Membran transferiert. Es wurde dabei sorgfältig darauf geachtet, dass kein Überlappen zwischen den einzelnen Lagen auftrat. Am nächsten Morgen wurde das Gel unter UV auf RNA Rückstände überprüft sowie die RNA mit der Nylonmembran durch UV Bestrahlung ( $120 \text{ mJ/cm}^2$  Stratalinker-1800™ Stratagene) vernetzt. Die Membranen konnten jetzt direkt hybridisiert oder über längere Zeit in 2xSSC / 0,1% SDS gelagert werden.

#### *B Hybridisierung und Datenaufnahme*

Die fertigen Membranen wurden 3 h prähybridisiert (5-10 ml Prähybridisierungslösung, 65°C). Die markierte Probe wurde zugesetzt und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Vor dem Auflegen eines Imagerscreen (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics) wurden die Membranen dreimal mit ca. 10 ml 2xSSC, 0,1%SDS für je 20 min bei 65°C gewaschen und in Saranfolie verpackt. Nach ca. 2 Tagen Exposition wurden die Screens mit einem Storm 860 Molecular Imager (Molecular Dynamics) ausgelesen.

## **8.2 Makroarray**

Grundprinzip ist eine Reverse Northern Hybridisierung, d.h. cDNA mit bekannter Sequenz wird auf einer Membran fixiert und mit einer markierten Population umgeschriebener RNA hybridisiert, die Intensitäten bestimmt sowie die cDNAs mit den ähnlichsten Trends in der Intensitätsänderung zwischen den Experimenten ermittelt.

#### *A Spotten der cDNAs*

---

*Denaturierungspuffer:* 0,5 M NaOH// 1,5 M NaCl

*Neutralisierungspuffer:* 1 M Tris-HCl pH 7,0 // 1,5 M NaCl

*2xSSC:* 0,3 M NaCl // 0,03 M Natriumcitrat

Nylonmembran Biodyne® B

---

Knapp zweitausend cDNAs von *P. somniferum* wurden von Dr. Jörg Ziegler zur Verfügung gestellt (Ziegler et al., 2005 & 2006) und um 16 cDNAs kodierend für zwölf verschiedene P450 Monooxygenasen ergänzt. Die trocken gelagerten cDNAs wurden zu einer Konzentration von 100 ng/μl in Wasser resuspendiert. Durch einen Microgrid II Spotter (BioRobotics) wurden mit einem 384 Printtool schätzungsweise 10ng pro cDNA auf eine

Nylonmembran Biotodyne® B (PALL Corporation) aufgetragen, wobei jede cDNA vierfach auf jeden Filter aufgebracht wurde.

Die Membranen wurden 2x10 min mit Denaturierungspuffer benetzt, danach für 2x10 min neutralisiert und abschließend mit 2xSSC ebenfalls 2x10 min inkubiert. Dabei wurde vermieden, dass die Oberfläche der Membranen in direkten Kontakt mit den Flüssigkeiten kam. Die cDNAs wurden auf der Nylonmembran durch UV Bestrahlung (120 mJ/cm<sup>2</sup> Stratalinker-1800™ Stratagene™ ) fixiert.

#### *B Herstellung der Sonde*

Die RNA Isolierung der verschiedenen induzierten Suspensionszellkulturproben erfolgte wie unter III.3.1 beschrieben. Vierzig Mikrogramm RNA wurden jeweils zur Erststrangsynthese eingesetzt (s. III.9). Die erhaltenen cDNAs wurden, wie unter III.11.5 beschrieben, während der Zweitstrangsynthese radioaktiv markiert und aufgereinigt. Das erhaltene Eluat wurde direkt als Sonde genutzt.

#### *C Hybridisierung*

---

Hybridisierungslösung: 5xSSC // 0,1% SDS // 5X Dehnhardt Lösung (0,1 g BSA /0,1 g PVP / 0,1 g Ficoll auf 100 ml) // 125 µg/ml Heringssperma DNA

Waschlösung: 2xSSC // 0,1% SDS

1xSSC: 150 mM NaCl // 15 mM Natriumcitrat

---

Die Sonde wurde zu den fixierten und mit Hybridisierungslösung 3 h bei 65°C bereits prähybridisierten Membranen gegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Danach wurde dreimal mit je 10 ml Waschlösung 15 min bei 65°C gewaschen und die Membranen in Saranfolie auf einen Phosphorimager Screen (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics) gelegt.

#### *D Datenaufnahme*

Nach ungefähr einer Woche Exposition wurde der Screen mit einem Storm 860 Molecular Imager (Molecular Dynamics) entwickelt. Mithilfe des AIDA Programms von Raytest wurden die Spots markiert, deren Intensität bestimmt und eine Hintergrundkorrektur der Werte vorgenommen. Die Datenanalyse erfolgte wie unter III.14. 2 beschrieben.

## 9 Umschreiben von RNA in DNA (Erststrangsynthese)

RNA	AFLP	RACE	Standard
	mRNA aus 150µg RNA	mRNA aus 100µg RNA	40µg RNA
OligodT <sub>20</sub> VN bzw. 3'CDS *	200pmol (8µM)	12pmol (1,2µM)	200pmol (5µM)
BD Smart II <sup>TM</sup> A	-	12pmol (1,2µM)	-
dNTPs	0,5 mM	1 mM	0,25 mM
Endvolumen	25 µl	10 µl	40 µl

**Tabelle 1: Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese**

*1X RT-Puffer*: 10 mM Tris-HCl pH 8,3 // 15 mM KCl // 0,6 mM MgCl<sub>2</sub> // 2 mM DTT  
200 Units M- MLV Reverse Transcriptase, RNaseH minus, Point Mutant (200 U/µl) \*\*

RNA bzw. mRNA wurde mit einem „anchored“ OligodT<sub>20</sub>VN Primer bzw. für die Isolierung von 3'Enden einem „anchored“ OligodT<sub>30</sub>VN Linker Primer versetzt. Für die 5'RACE wurde zusätzlich das BD Smart II<sup>TM</sup>A Oligonukleotid zugegeben. Nach fünfminütigen Denaturieren bei 70°C wurde durch Abkühlen auf Eis die Primer mit der RNA hybridisiert. Nach Zugabe des entsprechenden Volumens eines fünffachen RT-Puffers und der dNTPs wurde 2 min auf 42°C erhitzt, darauf folgend die Reverse Transkriptase (RNase H minus, Point Mutant\*) zugegeben und für 1h 30 min inkubiert.

## 10 Herstellen doppelsträngiger DNA (Zweitstrangsynthese)

0,1 U/µl Unit RNaseH

*1xSS-Puffer (NEB2 Puffer)*: 10 mM Tris-HCl pH 7,9 // 50 mM NaCl // 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
// 1 mM DTT zusätzlich plus 0,25 mM (each) dNTPs

6 U/µl T4 DNA Ligase; 0,15 U/µl DNA Polymerase I (*E. coli*)

\* 3'CDS nur für 3'RACE - Oligo dT30VN Linker Primer (s. RACE III.13.3)

\*\* Reverse Transkriptase, die durch Punktmutationen ihre RNase Aktivität verloren hat, aber im Gegensatz zu Deletionsmutanten noch terminale Transferaseaktivität besitzt (s. RACE III.13.3)

Der RNA Strang der Erststrangsynthese wurde mit RNaseH 15 min bei 37°C verdaut und auf 4°C gekühlt. Für die Zweitstrangsynthese wurde das 1,6-fache Volumen SS-Puffer zugesetzt und DNA Polymerase sowie T4 DNA Ligase zugegeben. Anschließend erfolgte bei 16°C für 2 h die Inkubation.

Eine Zweitstrangsynthese mittels des Klenowfragments der DNA Polymerase I wurde zur Markierung von DNA genutzt (s.III.11.5).

## **11 Modifizierung der DNA**

### **11.1 Restriktion der DNA**

Zur Restriktion wurden die im Ergebnisteil aufgeführten Restriktionsenzyme der Firmen NEB und Fermentas verwendet. Bei Vektorgrößen größer 8 kb wurden Ansätze mit einer minimalen Plasmidkonzentrationen von 1 µg verwendet. Diese Proben wurden 2 h mit der kleinstmöglichen Enzymmenge inkubiert und nach erneuter Zugabe der gleichen Menge Enzym wiederum 2 h verdaut. Für alle anderen Restriktionsverdaue wurden in einem Volumen von 20-30 µl den Herstellerangaben folgend zwischen 2-3 h bei den jeweils optimalen Temperaturen und Pufferbedingungen geschnitten.

Für das AFLP wurde ein Drittel der ds cDNA in einem Volumen von 40 µl mit 12,5 Units (ApoI-5xCutter) bzw. 25 Units (Tsp509I-4xCutter) für 2 h verdaut.

### **11.2 Ligation der DNA**

---

Ligasepuffer(1), - für Stundenligation(2), - für Ligationen mit T-Überhangvektoren(3)

(1) 50 mM Tris-HCl pH 7,5 // 10 mM MgCl<sub>2</sub> // 1 mM ATP // 10 mM DTT // 25µg/ ml BSA

(2) 132 mM Tris-HCl pH 7,6 // 20 mM MgCl<sub>2</sub> // 2 mM ATP // 2 mM DTT // 15% PEG 6000

(3) 60 mM Tris-HCl, pH 7,8 // 20 mM MgCl<sub>2</sub> // 2 mM ATP // 20 mM DTT // 10% PEG 8000

TA-Klonierung Kits

pGEMT und pGEMT<sub>EASY</sub>      PROMEGA

TA-Cloning pCR2.1      INVITROGEN

T4 DNA Ligase: 400 - 2000 Units (NEB) bzw. 3 Weiss Units (Promega)

---

Ligationen wurden bei den in Tabelle 2 angegebenen Temperaturen in einem Volumen von 10-20 µl durchgeführt.

	DNA Konzentration	Temperatur	Zeit
T-Überhang	Vektor 50 ng (3 kb) : 3x n Insert	4°C bzw. 12°C	ü.N.
“blunt end”	Vektor ~100 ng : 3x-5x n Insert	RT	ü.N.
“sticky end”	Vektor ~100 ng : 3x n Insert	12°C bzw. RT	1-3 h
AFLP Adaptoren	5-50 pmol Adaptor: ca. 100 ng cDNA*	37°C	3 h

**Tabelle 2: Reaktionsbedingungen für die Ligation**

Die Pfu-PCR-Produkte wurden vor der TA-Klonierungen wie folgt präpariert; 1–7 µl gereinigtes PCR Fragment wurde mit 1 µl zehnfachen Taq DNA Polymerase Puffer mit MgCl<sub>2</sub> und dATP (EK 0,2 mM) versetzt und 5 Units Taq DNA Polymerase hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min bei 70°C inkubiert und 1–2 µl für die Ligation verwendet. Alternativ wurde vor dem letzten Zyklus der Pfu-Polymerase-PCR Reaktion 0,2 µl Taq Polymerase (1U) und dNTP (1 mM) zugegeben.

Nur Vektor Kolonien traten als Probleme bei T-Überhangsklonierungen durch Kontamination einer der Komponenten des Reaktionsansatzes auf. Bei TA-Klonierungen von Pfu-PCR Produkten stieg die Ausbeute bei erhöhter Insertkonzentration im Ligationsansatz deutlich an

### 11.3 Dephosphorylierung der DNA

*IX Reaktionspuffer:* 50 mM Bis-Tris-Propan pH 6,0 // 1 mM MgCl<sub>2</sub> // 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>  
5 Units Antarctic Phosphatase

Für die Dephosphorylierung wurde zu gereinigter DNA bzw. direkt zu inaktivierten Restriktionsansätzen zehnfacher Reaktionspuffer gegeben, für bis zu 1 µg DNA mit 1 µl „Antarctic Phosphatase“ (5U) versetzt und für 15 min (blunt, 5' Extension) bzw. 1 h (3' Extension) bei 37°C erhitzt. Die Phosphatase wurde durch Erhitzen für 5 min auf 65°C inaktiviert.

\* vgl. 12.2.

#### 11.4 Phosphorylierung und Markierung mit $\gamma$ [ $P^{33}$ ] ATP von Oligonukleotiden

---

*1xReaktionspuffer*: 70 mM Tris-HCl pH 7,6 // 10 mM  $MgCl_2$  // 5 mM DTT

5 Units T4 Polynukleotidkinase

1 mM ATP

~ 50  $\mu Ci$   $\gamma$  [ $P^{33}$ ] ATP (entsprechen 15-50 pmol)

---

##### A) Phosphorylierung von PCR Fragmenten

Zu den PCR Fragmenten (ca. 0,5-1  $\mu g$ ) wurden der Reaktionspuffer und 1 mM ATP zugesetzt. Nach Zugabe der Kinase (5 Units) wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Kinase wurde anschließend für 20 min bei 65°C inaktiviert.

##### B) Markierung von Oligonukleotiden durch Phosphorylierung mit $\gamma$ [ $P^{33}$ ] ATP

Zwischen 25-250 ng Oligonukleotid wurden in Reaktionspuffer zusammen mit  $\gamma$  [ $P^{33}$ ] ATP und der Kinase für 45 min auf 37°C und anschließend zur Inaktivierung der Kinase für 20 min auf 65°C erhitzt.

#### 11.5 Markierung von DNA durch Zweitstrangsynthese mittels Random priming

---

2  $\mu g$  RNaseA (SL: 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl 7,5 / 15 mM NaCl; 15 min bei 100°C gekocht, auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert)

10 Units RNaseH

EDTA // NaOH

Megaprime Kit

25 ng DNA (empfohlene Menge)

Random Primer (Random Hexamer dp(N)<sub>6</sub> / 60 ng auf 200 ng Template) \*

Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,9, 10 mM  $MgSO_4$ , 0,1 mM DTT) \*

dCTP; dGTP; dTTP (jeweils 0,6 mM) \*

2 Units Klenow Fragment

~ 50  $\mu Ci$   $\gamma$  [ $P^{32}$ ] dATP bzw. ~ 50  $\mu Ci$   $\gamma$  [ $P^{33}$ ] dATP (entsprechen 15-50 pmol)

ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (entspricht Sephadex® G-50 2cm(h)x1cm(d))

---

\* keine Herstellerangaben erhältlich, Angaben aus alternativ Protokollen

Der RNA Strang des RNA:DNA Hybrides der Erststrangsynthese wurde mittels RNaseA und RNaseH im Puffer der Erststrangsynthese bei 37°C für 2 min verdaut oder nach Zugabe von 1/10 Volumenteil 0,5 M EDTA durch 20 mM NaOH bei 65°C 30 min hydrolysiert. Die Markierung erfolgte mittels des Megaprime Kits von AMERSHAM CO. nach der Methode von Feinberg & Vogelstein, 1983. Die erhaltene ss cDNA wurden in 5 µl Wasser mit den Random Primern für 5 min auf 95°C erhitzt, kurz abzentrifugiert und durch Abkühlen auf Raumtemperatur hybridisiert. Danach wurden Wasser, dCTP, dGTP und dTTP, Reaktionspuffer und zuletzt  $\alpha$ [P<sup>32</sup>] dATP (für Northern Blot) bzw.  $\alpha$ [P<sup>33</sup>] dATP (für Makroarrays) sowie das Klenow Fragment hinzu gegeben. Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nicht eingebaute Nukleotide über Gelfiltrationssäulen abgetrennt. Die ProbeQuant™ G-50 Micro Säulen wurden 1 min bei 910×g zentrifugiert, der Reaktionsansatz aufgegeben und für 2 min erneut bei 910×g zentrifugiert. Das Eluat konnte direkt als Sonde für die Hybridisierung (s.III.8.2.) genutzt werden.

## 12 Amplifikation der DNA

### 12.1 DNA Amplifikation in *E. coli*

#### A) Herstellung kompetenter Zellen

---

**SOB:** 20 g/l Bacto Trypton // 5 g/l Bacto Yeast Extrakt // 10 mM NaCl // 2,5 mM KCl  
unmittelbar vor Gebrauch +10 mM MgCl<sub>2</sub> // 10 mM MgSO<sub>4</sub>

**TFB Puffer:** 10 mM Pipes // 15 mM CaCl<sub>2</sub> // 250 mM KCl // nach pH Einstellung auf pH 6,7  
Zugabe von 55 mM MnCl<sub>2</sub> nach dem Autoklavieren (sterilfiltrierte Lösung)

---

Kompetente Zellen wurden durch die CaCl<sub>2</sub>-Methode n. Inoue et al., 1990 erhalten. Dazu wurde aus einem Glycerolstock Zellen der jeweiligen Zelllinie auf antibiotikahaltigen LB - Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Zehn Kolonien wurden in 250 ml SOB Medium in 2 l Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 18°C 200 rpm angezogen. Nach Erreichen einer Zelldichte OD<sub>600</sub> von 0,45-0,75 wurden die Zellen in Zentrifugenbecher gefüllt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (10 min / 1000×g, 4°C) wurde das Medium vollständig entfernt, das verbleibende Pellet in 80 ml TFB-Puffer resuspendiert und erneut zehn Minuten auf Eis inkubiert. Der TFB Puffer wurde durch 20 ml TFB-Puffer ersetzt (Zentrifugation 10 min / 1000×g, 4°C) und DMSO bis zu einer



Endkonzentration von 7% (1,5 ml) zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen portioniert in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### *B) Transformation*

---

*SOC:* 20 g/l Bacto Trypton // 5 g/l Bacto Yeast Extrakt // 10 mM NaCl // 2,5 mM KCl  
unmittelbar vor Gebrauch + 10 mM MgCl<sub>2</sub> // 10 mM MgSO<sub>4</sub> // 20 mM Glucose

*LB (Luria-Bertani)-Agar pH 7,0:* 1,0% (w/v) Trypton // 0,5% (w/v) Hefeextrakt // 1,0% (w/v)  
NaCl // 1,5% (w/v) Agar

---

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Ligationsansatz oder einer geringen Menge Plasmid versetzt und 30 min auf Eis adaptiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 30 s bei 42°C und anschließend eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde danach direkt auf LB-Platten ausplattiert bzw. bei gering zu erwartenden Transformationsraten mit dem vierfachen Volumen an vorgewärmter SOC-Lösung (37°C) versetzt und 60 min bei 37°C geschüttelt (200 rpm). Danach wurde abzentrifugiert (2 min / 400×g, RT) und das Pellet in max. 100 µl SOC vorsichtig resuspendiert und ebenfalls auf LB-Platten ausplattiert.

#### *C) Animpfen zur Präparation*

---

*LB (Luria-Bertani)-Medium pH 7,0:* 1,0% (w/v) Trypton // 0,5% (w/v) Hefeextrakt //  
1,0% (w/v) NaCl

---

Die erhaltenen Kolonien wurden entweder in einem 20 µl PCR Ansatz auf ihren Inhalt mittels Kolonie-PCR geprüft und neu ausgestrichen oder direkt für eine Flüssigkultur wie folgt genutzt. Eine Kolonie wurde steril von der LB-Platte gepickt und in ein Kultivierungsröhrchen mit 3 ml LB-Medium und dem der zu erwartenden Resistenz entsprechenden Antibiotika gegeben. Für „low-copy“ Plasmide wurden entweder mehrere Kulturröhrchen gleichzeitig angezogen oder eine 20-50 ml Kultur genutzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht oder minimal über acht Stunden bei 37°C und 200 rpm.

## 12.2 Amplifikation von DNA durch PCR

	Taq	Pfu	RACE	AFLP
Template	1	1	3	5 (cDNA)
10xPuffer	5	5	5	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3	-	-	1,2
dNTPs (10 mM)	1	1	1	0,4
Primer1(100µM)	0,5	0,5	5	0,5-2
Primer2(100µM)	0,5	0,5	1	1
Polymerase	0,35	0,5-1	1	1
Endvolumen	50	50	50	20

*Angaben in µl*

**Tabelle 3 Reaktionsansätze für PCR**

*Puffer:* Taq (1), Pfu (2), BD Advantage 2 PCR (3)

(1) 100 mM Tris-HCl pH 9,0 // 500 mM KCl // 1% (v/v) Triton X-100

(2) 200 mM Tris-HCl pH 8,8 // 100 mM KCl // 1% (v/v) Triton X-100 // 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> //  
1 mg/ml BSA // 20 mM MgSO<sub>4</sub>

(3) 100 mM Tris-HCl pH 9,0 // 500 mM KCl // 1% (v/v) Triton X-100 // 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
35 mM MgCl<sub>2</sub>\*

*Polymerasen:*

1,25 Units Taq Polymerase

2,5 Units Pfu Polymerase von FERMENTAS

BD Advantage 2 Polymerase Mix \*\* (50x) von BD BIOSCIENCE

dNTPs (10 mM) 10 mM dATP // 10 mM dCTP // 10 mM dGTP // 10 mM dTTP

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mit Taq oder Pfu Polymerase bzw. einer Mischung zweier Polymerasen durchgeführt. Die Annealingtemperatur ( $T_m$ ) der Primer wurden vom Hersteller (MWG) erhalten bzw. auf <http://www.iit-biotech.de/iit-cgi/oligo-tm.pl> berechnet.

\* keine Herstellerangaben erhältlich, Angaben aus alternativen Protokollen

\*\* Mix aus einer Nuklease-defizienten N-terminale Deletionsmutante der Taq DNA Polymerase (BD TITANIUM™ Taq), einem Taq Antikörper (BD TaqStart™) und einer Proofreading Polymerase (bspw. Pfu)

Für die PCR wurden folgende Protokolle verwendet:

- Für cDNA-Amplifikationen wurden 30 Zyklen Denaturierung – Annealing – Elongation mit anschließender zehninütiger Polymerisation bei 72°C angewandt. Die Annealingtemperatur wurde 5°C unter der berechneten  $T_m$  gewählt.

	Taq	Pfu	
initiale Denaturierung	2' 94°C	2' 95°C	
Denaturierung	30" 94°C	30" 95°C	30x
Annealing	30" $T_m - 5^\circ\text{C}$	30" $T_m - 5^\circ\text{C}$	
Elongation	1' 72°C	2' 72°C	
terminale Elongation	10' 72°C	10' 72°C	

**Tabelle 4 Reaktionszyklen bei Pfu und Taq PCR**

- Beim AFLP wurden zur Markierung der Fragmente eine „touch down“ PCR mit einem degenerierten P450 Domänenprimer und einem Adaptorprimer durchgeführt (vgl. III.13.2/ Tab)
- Eine andere Form der „touch down“ PCR wurde für die Amplifikation von cDNA Enden genutzt (s. RACE III.13.3). Dabei wurde als Gegenprimer für den genspezifischen Primer ein Mix aus einem Primer mit einer hohen und einem Primer mit einer tieferen  $T_m$  im Verhältnis von 1:5 genutzt. Template dieser Primer ist ein Linker mit invertiert repetitiven Sequenzen (s. Abb. 6), welche die Amplifikation von cDNAs mit beidseitigen Linkersequenzen („supression PCR“; Siebert *et al.*,1995) verhindern.

RACE					AFLP			
Zyklennummer		1-5	6-10	11-27	Zyklennummer		1-13	13-35
Denaturierung	30"	94°C	94°C	94°C	Denaturierung	30"	94°C	94°C
Annealing	30"	70°C	68°C	66°C	Annealing	30"	$T_m + 6^\circ\text{C}$ $\Delta T = -0,7^\circ\text{C}$	$T_m - 3^\circ\text{C}$
Elongation	3'-4'	72°C	72°C	72°C	Elongation	1'	72°C	72°C

**Tabelle 5 Reaktionszyklen bei RACE und AFLP Experimenten**

- Bei ungenügenden Ausbeuten der ersten Amplifikation wurde eine zweite Amplifikation mit internen Primerpaar („nested PCR“) mit 1 µl oder einer 1:10 Verdünnung der ersten Amplifikation durchgeführt.

#### Smart RACE

Linker(BD Smart II A Oligonukleotid) 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'  
5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCA3' UP ml  
5' CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' RPMs

#### Genome Walker

Adaptor  
5' GTAATA**CGACT**CACTATAGGGC**ACGCGTG****GTCG**ACGGCCCGGGCTGGT 3'  
3' H2N-CCCGACCA-PO4 5'  
5' GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' AP1

farbig markierte bp: potentielle Harpin bildende Sequenzen  
Linien: potentielle „self annealing“ Sequenzen mit max. 1 „miss match“

**Abb. 6 Invertiert repetitive Sequenzen sowie Primer für „supression PCR“**

## 13 spezielle PCR Anwendungen

### 13.1 DNA Sequenzierung

---

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

POP-6™ Polymer

3100 Avant Capillary Array 36 cm und 50 cm

---

Die cDNA wurde durch eine im BigDye® 3.1. enthaltene DNA Polymerase\* abgeschrieben und wobei durch den Einbau fluoreszenzmarkierte ddNTPs die Verlängerung abgebrochen und die letzte Base markiert wurde (nach Sanger *et al.*, 1977). Nach dem Abtrennen nicht-eingebauter ddNTPs wurden in einem Avant 3000 Sequenzer (Applied Biosystems) die entstandenen Fragmente über Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Markierungen ausgelesen.

---

\* AmpliTaq™ DNA Polymerase FS, Taq Polymerase mit Punktmutationen und dadurch verminderte Exonukleaseaktivität sowie erhöhter Akzeptanz für markierte ddNTPs

#### *A) Aufreinigung von Plasmid DNA für Sequenzierung*

Plasmid DNA (s.III.4.5) wurde bei ungenügender Reinheit für die Sequenzierung aufgereinigt. Dazu wurde die Plasmid DNA mit dem fünffachen Volumen an Bindungspuffer versetzt und an QIAprep Säulen gebunden, gereinigt und eluiert (s. III.4.6 sowie Herstellerprotokoll).

#### *B) Markierungsreaktion*

In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden abweichend von den Herstellerangaben mit 0,5 µl Big Dye3.1.<sup>TM</sup> (Polymerase, dNTPs, markierte ddNTPs) und 1,75 µl des 5x Puffers (400 mM Tris-HCl pH 9,0 / 10 mM MgCl<sub>2</sub>) sowie 5 pmol des jeweiligen Primers 600 ng Plasmid sequenziert. Die DNA wurde mittels eines Mastercycler gradient von Eppendorf in 25 Zyklen je Zyklus für fünf Sekunden bei 96°C denaturiert, fünf Sekunden lang auf 5°C unter die kalkulierte Annealingtemperatur des Primers (T<sub>m</sub>) gekühlt und für vier Minuten bei 70°C abgeschrieben. Anschließend wurden die Reaktionen aufgereinigt.

#### *C) Aufreinigung der Fragmente*

Sephadex G-50 Superfine Säulen wurden in Multiscreen Column loader Wells abgemessen (Volumen 45 µl), in eine 96er Multiscreen HV Platte überführt und in 300 µl Wasser für mindestens 2 h gequollen, das Wasser abzentrifugiert (5 min / 910×g), die Proben mit 10 µl Wasser versetzt und auf die Säulen aufgetragen, danach erneut zentrifugiert (5 min / 910×g) und das erhaltene Eluat direkt weiter verwendet oder bis zu einer Woche bei 4°C gelagert.

#### *D) Auftrennen und Auslesen*

Die Auftrennung erfolgte mit einer 36 cm bzw. 50 cm Kapillare für 1 h bzw. 2 h 30 min in einem Avant 3100 Sequenzer. Am Ende der Kapillare erfolgte in einem Kapillarfenster die Anregung der Fluoreszenzmoleküle mit einem Laser. Das Gerät bestimmte die daraufhin emittierte Strahlung über eine CCD Kamera.

### **13.2 AFLP Technik zur Amplifikation von CYP450 Fragmenten**

---

ApoI Adaptor fwd   CTAATAGCACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTC

ApoI Adaptor rev   AATTGACCTGCCC-NH<sub>2</sub>

Adaptorprimer     CTCACTATAGGGCTCGAGC

*Ix TEN:*           5 mM Tris-HCl pH 7,5 // 0,5 mM EDTA // 1 M NaCl

yeast t-RNA; Dynabeads®M-280 Streptavidin

---

Die Isolierung neuer CYP450 Fragmente wurde nach dem AFLP Protokoll von Vos *et al.* 1995 durchgeführt. Dies beinhaltete die Restriktion der DNA und deren Ligation mit Adaptoroligonukleotiden, die selektive Amplifikation von Sets von P450 Fragmenten sowie die Auftrennung amplifizierter Fragmente auf Polyacrylamidgelen, die Elution, eine TA-Klonierung und schließlich die Sequenzierung von ausgewählten Fragmenten.

Aus 300-500 µg total RNA (s.III.4.1), gewonnen aus dem Zentimeter des *P. somniferum* Stängels unterhalb der Kapsel, wurde mRNA isoliert (s.III.4.3). Ein Viertel dieser mRNA wurde zur Erststrang-synthese mit folgendem Abbau des RNA-Stranges und der Synthese des zweiten Stranges benutzt (s.III.9/10). Die erhaltene cDNA wurde durch Phenol-CHCl<sub>3</sub> Extraktion (s.III.5) gereinigt und zweifach konzentriert. Zum Anhängen von Adaptoren wurde ein Drittel der cDNA verdaut (s.III.11.1), die Adaptoren hybridisiert (2 nmol je Adaptoroligomer wurden in 100 µl 3 min bei 95°C erhitzt und auf RT abgekühlt) und 5 pmol der Adaptoren mit dem gesamten Restriktionsansatz ligiert (s.III.11.2).

Zwanzig Mikroliter der Adaptor-ligierten cDNA wurden zur Präamplifikation mittels PCR eingesetzt (s.III.12.2 Programm Taq). Nach der Präamplifikation erfolgte die Markierung der cDNA durch erneute Amplifikation (s.III.12.2 Programm AFLP), in diesem Fall jedoch mit einem CYP450 Domainenprimer der radioaktiv markiert war und am 3'Ende um zwei selektive Basen verlängert war. Die markierten cDNA Fragmente wurden über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt, detektiert und isoliert (s.III.7.3). Nach Amplifikation der gereinigten Fragmente (s.III.12.2 Programm Taq) mit biotinylierten CYP450 spezifischen Domainenprimer und Adaptorprimer wurden die erhaltenen cDNAs an Streptavidin, welches kovalent gebunden paramagnetische Polystyrenkügelchen umhüllte, gebunden, gewaschen und eluiert. Dafür wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche der Kügelchen mit tRNA blockiert (10 µl „streptavidin beads“ (10 µg/µl) auf 500 µl yeast t RNA (100 µg/ml) / 30 min 4°C), in einem Magnetständer die „Beads“ 3 min gesammelt und der Überstand verworfen. Danach wurde dreimal mit 1x TEN gewaschen und in 10 µl 2x TEN aufgenommen. Das gleiche Volumen (10 µl) an PCR Produkt wurde zu den so präparierten „Beads“ zugesetzt und für 15 min unter Rotieren bei RT inkubiert, bevor die „Beads“ wiederum für 3 min im Magnetständer gesammelt wurden. Anschließend wurde zweimal mit 1xTEN und 1x mit H<sub>2</sub>O gewaschen und entweder die DNA in 15 µl Wasser bei 65°C für 30 min abgelöst, danach als Überstand abgenommen und erneut amplifiziert oder die „Beads“ direkt für die Amplifikation eingesetzt. Letztendlich erfolgte eine Klonierung in T-Überhangsvektoren (s.III.11.2/12.1) und die Sequenzierung (s.III.13.1) der isolierten Plasmide (s.III.4.5).

### 13.3 Isolierung von Volllänge-cDNAs mittels RACE bzw. Genome Walker Technik

Zur Isolierung von Volllänge cDNAs wurden nach dem SMART™- bzw. 3'RACE Protokoll oder nach dem Genome Walker™ Protokoll von BD. Bioscience™ gearbeitet.

---

BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD. BIOSCIENCE™)

BD Smart II A Oligonukleotid

5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG- 3'

Universal Primer A Mix (RPM)

Long (0.4 µM):

5' -CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT- 3'

Short (2 µM):

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Nested Universal Primer A (NUP)

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

3' CDS Primer

5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T)<sub>30</sub>VN- 3'

---

A) RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) (Zhu et al., 2001)

*5'RACE*: Durch die Umschreibung von RNA mit einer Reversen Transkriptase (s.III.9) mit terminalen Transferase Aktivität erhalten bevorzugt die 3'Enden der synthetisierten cDNAs 3-5 Nukleotide, hauptsächlich dC<sub>3-5</sub> Reste. Das zugegebene Oligonukleotid (BD Smart II A) bindet mit seinem dG<sub>3</sub> 3' Ende an die dC<sub>3-5</sub> Sequenz. Die cDNA Synthese erfolgte daraufhin bis zum Ende des Oligonukleotides unter Anbindung einer bekannten Sequenz (Linkersequenz) an die neusynthetisierte cDNA (SMART - *Switching Mechanism At the end of RNA Transcript*). Das erhaltene Produkt wurde 1:20 verdünnt. Mit einem reverskomplementären Primer der bekannten Teilsequenz des Genes und einem Mix zweier Linkerprimer (UPM) wurde anschließend amplifiziert (s.III.12.2 Programm RACE).

*3'RACE*: Die Erststrangsynthese (s.III.9) wurde mit einem Oligo dT30VN Linker Primer (3'CDS) durchgeführt. Die entstandene cDNA wurde mit einem "Sense"-Primer der bekannten Teilsequenz des Genes und dem zur Linkersequenz passenden Primer (UPM) amplifiziert (s.III.12.2 Programm RACE).

Nach der Amplifikation wurden die cDNAs in Agarosgelen aufgetrennt und eluiert (III.7.2), in T-Überhangsvektoren kloniert (III.11.2/12.1) und anschließend die isolierten Plasmide (III.4.5) sequenziert (III.13.1). Bei ungenügenden Ausbeuten wurde mit dem NUP Primer und einem weiteren genspezifischen Primer erneut amplifiziert.

#### B) Genome Walker Technik

---

##### BD GENOME WALKER™ Kit (BD. BIOSCIENCE)

BD Genome Walker Adaptor

5' -GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3'  
3' -H2N-CCCGACCA-PO4-5'

Adaptor Primer (AP1)

GTAATACGACTCACTATAGGGC

Nested Primer (AP2)

ACTATAGGGCACGCGTGGT

---

Von Dr. Ziegler zur Verfügung gestellte vollständige verdaute und adaptorligierte genomische *Papaver somniferum* DNA wurde mit adaptor- und genspezifischen Primern amplifiziert (s.III.12.2 RACE). Die erhaltenen Fragmente wurden nach der Auftrennung in Agarosegelen ausgeschnitten, kloniert und sequenziert (s.III.4.5/11.2/12.1/13.1). Bei ausbleibenden Produkten oder zu geringen Ausbeuten wurde mit einem zweiten genspezifischen Primer und dem „nested“ Primer (AP2) ein weiteres Mal amplifiziert (s.III.12.2 Programm RACE).

## 14 Datenanalyse

### 14.1 Auswertung von Sequenzierungsdaten

Für die Sequenzanalyse wurden die folgenden Software Programme verwendet:

Editseq™	Umwandlung von DNA in Proteinsequenzen
Megalign™	Alignments von DNA- & Proteinsequenzen
Seqman™	Sequenzassemblierung, Primer Walking
Mapdraw™	Restriktionskartierung

und die folgenden über das Internet zugänglichen Datenbanken & Programme genutzt:

SwissProt	<a href="http://www.expasy.org">www.expasy.org</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>



#### 14.2 Auswertung der Makroarraydaten

##### A1) Vorbereitung und Normalisierung

Die mit dem Aida Programm markierten, quantifizierten und hintergrundkorrigierten Werte der Makroarrayspots (s.III.8.2) wurden weiter mit der Origin V7.5 (MICROCAL™) Software in einem von Dr. Christian Ammer (Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie Abt. Sekundärstoffwechsel) erstellten Programm bearbeitet.

Zuerst wurden die Daten logarithmiert ( $\log_2$ ), damit Veränderungen in der Signalintensität den gleichen Zahlenwert für Induktion und Repression erhalten. Da biologisch nicht verwandte Proben analysiert wurden, erfolgte eine Normalisierung der Arrays durch „median centering“. Der Median jedes Arrays wurde auf Null gesetzt, indem von jedem logarithmierten Datenpunkt eines Arrays der Median des Arrays subtrahiert wurde. Da der Vergleich der einzelnen Gene\* unabhängig von ihren Signalintensitäten auf dem jeweiligen Arrays erfolgen sollte, wurden die Werte der einzelnen Gene analog normalisiert. Das bedeutet, dass von allen  $\log_2$  Werten des jeweiligen Genes der Median aus den Signalintensitäten dieses Genes aus den verschiedenen Experimenten (Arrays) abgezogen wurde. Dadurch erhielt auch dieser Median den Wert 0.

Das „Median Centering“ des Arrays und das „Median Centering“ der Gene wurde abwechselnd wiederholt, bis die auftretende Veränderung durch das Centering kleiner als  $<0,001$  war.

##### A2) Signifikanz

Abschließend wurde der Mittelwert aus den vier Parallelen eines Genes pro Array gebildet. Aus diesen Parallelwerten ließ sich die Signifikanz der Expressionscharakteristik der einzelnen Gene mittels t-Test berechnen.

##### A3) Distanzbestimmung und Clustering

Zum Herausfiltern von Genen mit ähnlicher Expressionscharakteristik wurde als Clusterverfahren das „Complete linkage hierarchical clustering“ mit vorausgehender Bestimmung des Abstandes der Gene (Kalkulation des Expressionstrends) durch „uncentered Pearson correlation“ des Programmes Gene Cluster v.3.0 (Eisen *et al.*, 1998, De Hoon *et al.*, 2004) genutzt. Die Visualisierung der Ergebnisse des Clusterings erfolgte durch das Programm Java TreeView (Saldanha, 2004).

---

\* Gene: Begriff wird allgemein verwendet, gemeint sind die Datenpunkte aus unterschiedlichen Hybridisierung mit derselben cDNA

## 15 Proteinexpression

### 15.1 Expression von Proteinen in *Sf-9* Zellen

---

*(Co)Transfektion* Cellfectin; BaculoGold Linearized DNA; TC-Plate 6 Well

*Transfektionspuffer A:* Grace's Medium mit 10% Fetal Calf Serum (FCS)

*Transfektionspuffer B:* 25 mM HEPES pH 7,1 // 125 mM CaCl<sub>2</sub> // 140 mM NaCl

*Expression* TC-100 Medium // Fetal Calf Serum (FCS) // Pluronic (10% Lsg.)  
25 µg/ml Hämin (SL: 100mg/ml in 50% Ethanol / 0,25 N NaOH)

*Resuspension Puffer P450:* 50 mM Tricin pH 8,0 // 10%Glycerol // 2 mM EDTA //  
10 mM β-Mercaptoethanol bzw. 5 mM TGA

*Puffer STOX:* 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5 // 3 mM β-Mercaptoethanol //  
1% (v/v) Nonidet P-40

---

*Sf-9* Zellkulturen wurden in 50 cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen im Abstand von 2-3 Tage 50 % konfluent in 5 ml TC-100 Medium inkl. 10% FCS umgesetzt und bei 27°C inkubiert. Zum Erhalt einer Suspensionskultur wurden 5 ml einer konfluenten Kultur in einem 200 ml Kolben zu 50 ml Medium (TC-100; 10%FCS, 0,1% Pluronic) gegeben und bei 175 rpm für 3 Tage geschüttelt. Die Kultur wurde danach alle 2-2½ d mit neuen Medium auf die Zelldichte von 0,5x10<sup>6</sup> eingestellt (1:2-1:3 Verdünnung). Zur Expression wurden die folgenden zwei Systeme verwendet:

#### 1) pFastBac Invitrogen

*Klonierung:* Die cDNA wurde in die MCS (Multiple Cloning Site) des pFastBac1 kloniert.

*Transposition:* Nach Amplifikation in XL-1 blue Zellen, Plasmidisolierung und Überprüfung der Klonierung durch Sequenzierung des Inserts wurde das Konstrukt in DH10 Bac Zellen transformiert. In diesen bacmidhaltigen Zellen erfolgte eine homologe Rekombination der Insert DNA in die Bacmid DNA. Das Bacmid wurde gereinigt und mittels PCR auf sein Insert getestet.

*Transfektion:* Zellen für eine Konfluenz von 50-70 % wurden in Zellkulturplatten für minimal 2 h adaptiert. Währenddessen wurde für 45 min bei Raumtemperatur ein Ansatz aus Transfektionsreagenz (6 µl Cellfectin in 100 µl TC-100 Medium) und Bacmid DNA (5 µl in 100 µl TC-100 Medium) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit TC-100 Medium gewaschen und danach mit dem auf 1 ml TC-100 Medium gebrachten Ansatz für 5 h

bei 27°C transfiziert. Nach den 5 Stunden wurde der Überstand abgenommen und zu den Zellen 2 ml Komplettmedium (TC-100 / 10% FCS) gegeben.

#### 2) BD Baculogold

*Klonierung:* In die MCS des Vektors pVL1393 wurde die cDNA kloniert.

*Cotransfektion:* In Zellkulturplatten wurden Zellen für eine Konfluenz von 50-70 % für minimal 2 h adaptiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit TC-100 Medium gewaschen und das Medium anschließend durch 1 ml des Transfektionspuffers A ersetzt.

BaculoGold Baculovirus DNA (0,05 µg) wurde mit 2 µg des pVL1393-Konstruktes unter sterilen Bedingungen gemischt und nach 5 min mit 1 ml Transfektionspuffer B versetzt. Die Mischung wurde jetzt tropfenweise unter leichtem Schütteln zu den Zellen in Puffer A gegeben, wobei der Zellüberstand leicht milchig trübe wurde. Nach 4 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 2 ml Komplettmedium (10% FCS / TC-100) versorgt.

#### *Amplifikationen*

Nach 5 d wurden 500 µl des Überstandes der Zellen zu einer neuen Kavität (*well*) mit 50 - 70% konfluenten Zellen gegeben. Während dieser zweiten Amplifikation ließen sich bei einer intakten Zellkultur erste Infektionsanzeichen, wie Wachstumsinhibition, Vergrößerung der Zellen bis hin zur Zellyse, erkennen.

Zur Gewinnung eines Virenstocks wurde die Amplifikation zweimal in 5 ml Zellkulturschalen (+ 1 ml Virenlösung) und einmal in 50 ml Suspensionskultur(+ 5 ml Virenlösung) wiederholt und der durch Zentrifugation (5 min 2500xg RT) erhaltene Kulturüberstand bei 4°C gelagert.

#### *Proteinexpression*

Eine 50 ml Suspensionskultur mit einer Zelldichte von ca.  $2 \times 10^6$  wurde abzentrifugiert (5 min / 450xg, RT) und in neuen Medium (50 ml TC-100, 10% FCS, 0,1% Pluronic; bei erwarteter Proteinsekretion ohne FCS) aufgenommen, mit 5 ml des Virusstockes versetzt und für ca. 72 h inkubiert. Bei der Expression von CYP450 Enzymen wurde nach 24 h Hämin (EK 25µg/ml) zugesetzt. Nachdem annähernd ein Drittel der Zellen lysiert war, erfolgte die Ernte nach ca. 72 h. Für fünf Minuten wurden die Zellen bei 450xg und 27°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert oder auf Eis resuspendiert.

#### *Resuspension*

Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen durch Zugabe des jeweiligen eiskalten Resuspensionspuffer (50 ml Zellen in 1,5 ml Puffer) lysiert und mittels eines Glashomogenisators homogenisiert.

#### **15.2 Expression von Proteinen in Hefe**

---

<i>SGI</i>	1 g/l Bacto Pepton // 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base // 0,02 g/l Tryptophan // 20 g/l Glukose
<i>YPGA</i>	10 g/l Hefeextrakt // 10 g/l Pepton // 20 g/l Glukose // 0,2 g/l Adenin
<i>YPGE</i>	10 g/l Hefeextrakt // 10 g/l Pepton // 15 g/l Glukose // 3% (v/v) Ethanol
<i>TE</i>	10 mM Tris-HCl pH 7,5 // 1 mM EDTA
<i>Li-TE</i>	0,1 M Lithiumacetat // 10 mM Tris-HCl pH 7,5 // 1 mM EDTA
<i>PEG/Li-TE</i>	40% PEG 4000 // 0,1 M Lithiumacetat // 10 mM Tris-HCl pH 7,5 // 1 mM EDTA
<i>TEK</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 // 1 mM EDTA // 100 mM KCl
<i>TES</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 // 1 mM EDTA // 600 mM Sorbitol
<i>TEG</i>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 // 1 mM EDTA // 30% (v/v) Glycerol

---

#### *A Hefetransformation*

Drei Tage vor der Transformation wurde eine Kolonie des Hefestammes Watt II in 50 ml Kompletmedium (YPGA) über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Kultur wurde auf eine OD<sub>700</sub> von 0,2 verdünnt und erneut bei 30°C für 5 h geschüttelt (180 rpm). Nach 4 h 30 min wurde parallel die Carrier DNA für 20 min bei 100°C denaturiert (100 mg/ml; 10 µl pro Transformation) auf Eis abgekühlt und 10 µg Plasmid DNA zugegeben. Nach 5 h wurden die Zellen mittels Zentrifugieren 10 min 12 000×g geerntet, mit einem Zehntelvolumen LiAc-TE Puffer gewaschen (10s / 12 000×g, RT), mit dem Plasmid DNA / DNA Carrier Mix versetzt und 500 µl PEG/LiAc-TE Lösung zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 30°C wurde mittels 15 min Hitzeschocks bei 42°C transformiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und die in 200 µl SGI resuspendierten Zellen auf SGI Agarplatten ausplattiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30°C waren die Kolonien sichtbar.

#### *B Expression der Proteine*

Über Nacht wurde aus einer Kolonie von der SGI Platte in 30 ml bei 30°C die Hefekultur bis zu einer OD<sub>700</sub> von 1 (= 2\*10<sup>7</sup> Zellen/ ml) angezogen. Nach Erreichen der OD wurden 100 ml Kompletmedium mit Ethanol (YPGE) zugegeben und erneut über Nacht inkubiert. Am

Nachmittag des nächsten Tages wurde bei einer OD von 0,7-0,9 einer 1:10 Verdünnung mit 10 ml Galaktose (200 g/l) induziert. Am 4.Tag wurden früh die Zellen nach Erreichen einer OD von 0,7-0,9 einer 1:20 Verdünnung geerntet. Dazu wurde 10 min bei 7500×g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit TEK Puffer gewaschen (1 ml / 0,5 g Zellen) und die Hefezellen erneut sedimentiert (s.o.). Nach Resuspension der Zellen in 1 ml TES Puffer (1/30 Volumen des Waschpuffers) wurden Glaskugeln zugegeben, 5x je 1 min stark geschüttelt und 1 min auf Eis gekühlt, der Überstand abgenommen und die Glaskugel zweimal mit 5 ml TES nachgewaschen. Die Lösungen wurden zentrifugiert (10 min / 7500×g, 4°C) und der erhaltene Überstand durch Zellstoff (Miracloth) filtriert. Zur Pelletierung des mikrosomalen Pellets wurde bei 100.000×g für 45 min bei 4°C erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit 5 ml TES und 2x mit 5 ml TEG gewaschen und in 5 ml TEG aufgenommen. Die Bestimmung von CO Spektren erfolgte danach mit einer 1:5 Verdünnung in TEG. Nicht sofort verwendetes Enzym wurden nach Einfrieren in flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert.

#### **16 Isolierung des mikrosomalen Pellets**

---

100 mM Tricin / 5 mM TGA

Glycerol

---

Zur Aufarbeitung wurden 100-150 ml Sf9 Zellen abzentrifugiert und im eiskalten Resuspensionspuffer resuspendiert (vgl. III.15.1). Die Zellen lysierten in diesem hypotonischen Puffer. Die Lösung wurde mittels eines Glashomogenisators homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren abgetrennt (20 min / 8 000×g, 4°C). Der Überstand wurde zur Gewinnung des mikrosomalen Pellets bei 105 000×g und 4°C für 65 min erneut zentrifugiert. Vor Licht geschützt wurde das Pellet in 1,5 ml 100 mM Tricin / 5 mM TGA aufgenommen und für CO Spektren direkt extrahiert oder nach Zugabe von Glycerol (EK 20%) bei -80°C gelagert.

## 17 Proteinnachweis

### 17.1 Proteinbestimmung nach Bradford

---

Bradford Reagenzes BioRad

---

Die zu bestimmende Proteinlösung wurde auf ein Volumen von 200 µl gebracht und zu 800 µl einer 1:4 Verdünnung des Bradford Reagenzes (nach Bradford 1976) pipettiert. Die Absorption der Lösung wurde bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration mittels einer mit Protein bekannter Konzentration erstellten Eichreihe bestimmt.

### 17.2 Aufnahme von CO Spektren zum Expressionsnachweis von CYP450 Enzymen

---

Emulgen 913; CO

---

Die mikrosomale Fraktion der Hefe wurde nach der Verdünnung (s.III.15.2) direkt wie weiter unten beschrieben behandelt und vermessen. Aus dem mikrosomalen Pellet von Sf9-Zellen wurde nach Zugabe von 1% Emulgen 913 für 30 min die CYP450 Enzyme bei 4°C extrahiert. Das Protein blieb im Überstand einer Zentrifugation (15 min / 15 000xg, 4°C).

Die jeweiligen Probelösungen wurden mit einer Spatelspitze Dithionit reduziert und auf zwei Küvetten verteilt, um die Basislinie mit dem Photospektrometer aufzunehmen. Danach wurde eine Küvette so mit CO für 2 min versetzt, dass jede Minute von unten eine Gasblase durch die Lösung aufstieg. Anschließend wurde das CO – Differenzspektrum mehrere Male hintereinander aufgenommen.

### 17.3 Spezifischer Nachweis von His-getaggtten Proteinen mit Antikörper

---

His•Tag® Monoclonal Antibody (1:1000 Verdünnung in Blockierlösung)

Goat anti-Mouse IgG HRP (1:5000 verdünnt Verdünnung in Blockierlösung)

*20xTBS:* 3 M NaCl // 400 mM Tris-HCl pH 7,5

*10xTBSTT:* 5 M NaCl // 200 mM Tris-HCl // 2% (v/v) Triton® X-100 // 0,5% (v/v)  
Tween®-20 pH 7.5

*Blockierlösung:* 1% alkalilösliches Casein in 1xTBS

*NBT* Nitroblau Tetrazolium 50 mg/ml in 70% Dimethylformamid

*BCIP* 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat 50 mg/ml in 70% Dimethylformamid

*10xAP-Puffer:* 150 mM NaCl // 20 mM Tris-HCl pH 9,5 // 50 mM MgCl<sub>2</sub>

---

Die wie unter III.18 beschrieben auf Nitrozellulosemembran fixierten Proteine wurden zweimal 10 min mit 15 ml 1xTBS gewaschen. Danach wurden 1 h in 27 ml Blockierlösung unspezifische Bindungsstellen für Proteine blockiert. Wiederum wurde 2x für 10 min gewaschen, diesmal jedoch mit 20 ml 1xTBSTT. Nach einem weiteren Waschschrift in 15 ml 1xTBS wurde die Membran mit 10 ml His-Tag Antikörper hybridisiert. Es wurde, wie oben beschrieben, erneut 2x mit TBSTT und 1x mit TBS gewaschen, bevor 8 ml des Zweitantikörpers (Goat anti-Mouse IgG HRP) zugegeben wurden. Nach einer Stunde Inkubation wurde 5x mit 20 ml 1xTBSST für jeweils 10 min gewaschen. Die Membran wurde kurz auf Filterpapier abgetropft und danach mit 200 µl NBT und 100 µl BCIP in 10 ml 1xAP-Puffer angefärbt. Bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser gestoppt und die Membran für die Lagerung getrocknet.

#### **17.4 Detektion von Protein in Polyacrylamidgelen**

---

Coomassie Brilliant Blue G-250

Essigsäure

---

Das Gel wurde nach Zugabe von Coomassie Blau – Färbelösung für 1h bzw. über Nacht gefärbt. Um nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen wurde mehrmals mit 7%iger Essigsäure gewaschen.

#### **17.5 Detektion von Protein auf Nitrozellulosemembranen**

---

Ponceau S

---

Nach dem Westernblot (s.III.19) wurden die Membranen mit Wasser gewaschen und mit Ponceau S Lösung für dreißig Sekunden überdeckt. Danach wurde vorsichtig mit Wasser bis zum Erscheinen von Banden gewaschen. Nach der Detektion wurde das Ponceau S vollständig mit Wasser entfernt und der Blot weiter zum spezifischen Nachweis genutzt (s.III.17.3).

## 18 Trennung von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

---

<i>Sammelgel (4%):</i>	125 mM Tris-HCl pH 6,8 // 3,75% Acrylamidlg. // 0,1% SDS // 0,08% (w/v) APS // 0,2% (v/v) TEMED
<i>Trenngel (12%):</i>	375 mM Tris-HCl pH 8,8 // 12% Acrylamidlg. // 0,1% SDS // 0,05% (w/v) APS // 0,2% (v/v) TEMED // 5% Glycerol
<i>1 x Laufpuffer:</i>	25 mM Tris // 0,2 M Glycin // 0,1% SDS
<i>1 x Probenpuffer:</i>	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 // 10% Glycerol // 0,2% SDS // 0,5 M $\beta$ -Mercaptoethanol // Spatelspitze Bromphenolblau
<i>Acrylamidlösung:</i>	Rotiphorese® Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)

---

Die denaturierende SDS-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proben (10-50  $\mu$ g Protein) wurden mit Probenpuffer (EK 1x) gemischt, 2 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Verlassen des Sammelgels bei 12 mA, anschließend bei 24 mA.

## 19 Fixierung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen – Westernblot

---

Blotpuffer: 48 mM Tris pH 9,1 // 39 mM Glycin // 20% (v/v) Methanol // 0,037% (w/v) SDS

---

Die Proteine wurden von einem Polyacrylamidgel (s.III.18) auf die Membran durch einen „Semidry-Blot“ transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Dazu wurden das Blotpapier sowie die Membran mit Blotpuffer getränkt. Der Blot bestand von der Graphitkathode aus gesehen, aus zwei Stück Blotpapier, der Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel und zwei weiteren Stück Blotpapier. Nach dem Aufsetzen der Anodenplatte wurde mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h 30 min geblottet. Das Gel und der Blot wurden gefärbt (s.III.17.5) und der Blot nach Entfärbung zum spezifischen Proteinnachweis der His-getagten Protein (s.III.17.3) genutzt.



## 20 Enzymsätze

### 20.1 Enzymsätze für Cytochrom-P450 Enzyme

---

*Reaktionsansatz:* 0,2 M Tricin-NaOH pH 8,0 // 0,5 mM NADPH // 0,1 mM Substratlösung

---

Resuspendiertes Sf9 Zellpellet (bis max. 70 µl auf 100 µl Ansatz) wurde in 200 mM Tricin mit NADPH und dem jeweiligen Substrat für 1 h bei 25 °C bzw. 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 µl 20% TCA gestoppt, zentrifugiert (2 min / 15.000×g, RT) und der Überstand mit 900 µl 80% Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer Speedvac zur Trockene einrotiert und für HPLC Messungen in 20-30 µl 80% Ethanol aufgenommen

### 20.2 Enzymsätze für die Cytochrom-P450 Reduktase

---

*Reaktionspuffer:* 267 mM Tricin-NaOH pH 7,8 // 40 µM KCN // 1 µM FAD // 1 µM FMN //  
60 µM Cytochrome c, oxidiert  
10 mM NADPH

---

Für den Aktivitätstest der Cytochrom-P450 Reduktase (CPR) wurden 40 µg des mikrosomalen Pellets mit 950 µl Reaktionspuffer versetzt und in einer Küvette, die Reaktion, nach dem Nullabgleich, mit 50 µl 10 mM NADPH (EK 0,5 mM) gestartet und kontinuierlich die Absorptionzunahme bei 550 nm gemessen.

### 20.3 Enzymsatz für die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase

---

Leupeptin SL 0,1mg/ml (Wasser)// PepstatinA SL 0,14 mg/ml (Ethanol), PMSF SL  
17 mg/ml (ml (Ethanol)  
TC-100 Medium  
0,1M Boratpuffer pH 8,9

---

Sf9-Zellen wurden in einer sechs bzw. zwölf-well Zellkulturplatte halbkonfluent ausgesät und mit dem entsprechenden Virus infiziert (s. III.15.1). Nach 24h wurde der Überstand entfernt. Das entsprechende Volumen des Papierfilter filtrierten und anschließend sterilfiltrierten

serumfreien Medium (pH 7,5-8; beim Einstellen entsteht eine weißer Niederschlag) wurde mit Proteaseinhibitoren (Leupeptin 0,5µg/ml; PepstatinA 0,7µg/ml und PMSF 85µg/ml, vgl. Gotho *et al.*, 2001) und dem jeweiligen Substrat (10-50 µg/ml) versetzt, erneut sterilfiltriert und zu den Zellen gegeben. Die Platte wurde nach weiteren 24h und 36h geöffnet und wieder verschlossen und spätestens nach 48h geerntet. Der Überstand bzw. das Zellpellet wurde mit dem gleichen Volumen (0,5 bzw. 1ml) Butanol extrahiert Die Butanolphase wurde zur Trockene eingeeengt und der Extrakt in 50-100µl 80% Ethanol aufgenommen und mit HPLC (s.III.21) und LC-MS (s.III.22) analysiert. Enzymassays mit Zellpellets bzw. Zellüberständen (s.III.15.1) wurden in 40 mM Boratpuffer pH 8,9 und 50µg/ml Substrat für 1h bei 30°C durchgeführt.

## 21 Analyse der Produkte durch HPLC

*Vorsäule:* LiChrospher 60 RP-Select B (5 µm), 4 x 4 mm

*Trennsäule:* HPLC: LiChrospher 60 RP-Select B (5 µm), 250 x 4 mm

*Flussrate:* HPLC: 1 ml/min

*Detektion:* HPLC: 210 nm

*Laufmittel:*

A: 98% (v/v) H<sub>2</sub>O, 2% (v/v) ACN, *analytisch* 0,01% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / *präparativ* 0,2% HCOOH

B: 98% (v/v) ACN, 2% (v/v) H<sub>2</sub>O *analytisch* 0,01% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / *präparativ* 0,2% HCOOH

Zeit [ min]	B[ %]	analytisch	präparativ	Zeit [ min]	B[ %]
0	0			0,00	0
25	46			7,00	0
30	60			7,01	25
35	60			17,00	25
37	0			17,01	100
40	100			21,00	100
43	0			21,01	0
46	0			24,00	0

**Tabelle 6 HPLC-Programm: Anteil Laufmittel B über die Zeit t**

Die analytische HPLC wurde nach dem Protokoll von Frick *et al.*, 2005 durchgeführt. Für die Reinigung des Salutaridins, wurde ein präparatives Protokoll mit verkürzter Laufzeit benutzt. Die verwendete Ameisensäure ergab eine ausreichende Auflösung und konnte, im Gegensatz zur Phosphorsäure, beim Einengen der Probe mittels Rotationsverdampfer entfernt werden.

## **22 Durchführung von LC-MS, LC-MS-MS und FT-MS Messungen**

---

Die ESI-TOFMS Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Robert Kramell der Abteilung Naturstoffbiotechnologie des Institutes nach Frick *et al.* 2005 durchgeführt.

Zur Identifizierung der Alkaloide wurden Probe mittels ESI-Tandem Massenspektrometrie durch Dr. Jürgen Schmidt der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des Institutes nach Schmidt *et al.* 2007 vermessen. Eine Abweichung bestand in darin, dass die ESI-MS Daten mit einem TSQ Quantum (Finnigan MAT; Elektrosprayspannung 3.0 kV; Kapillarentemperatur: 250° C) gewonnen wurden. Die Messungen der Alkaloide der Zellkulturen mittels ESI-FT-ICR Massenspektrometrie erfolgten ebenfalls dankenswerterweise durch Dr. Jürgen Schmidt (Schmidt *et al.* 2007, Ziegler *et al.* 2006).

## IV Ergebnisse

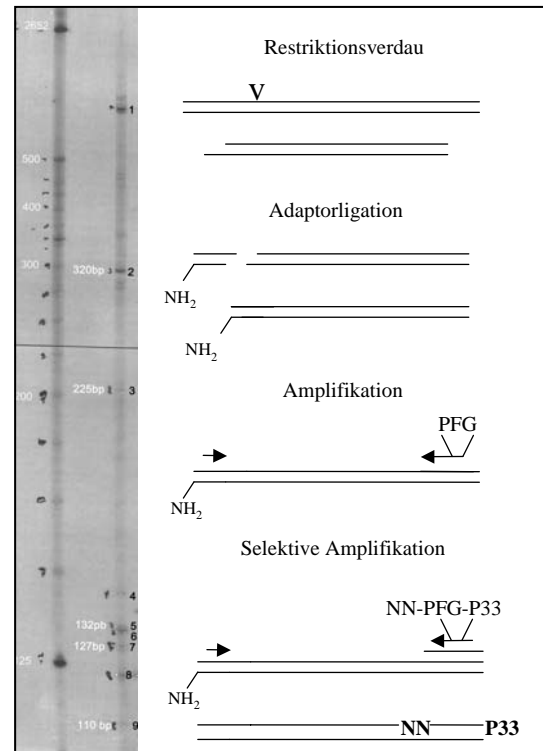
### 1. Isolierung neuer cDNAs

#### 1.1. Isolierung neuer CYP450-Sequenzen mittels AFLP und RT-PCR

Für die Isolierung neuer CYP450 Sequenzen wurde auf den AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) Ansatz von Vos *et al.*, 1995 zurückgegriffen. Dabei wurde sich eine hohe Auflösung durch das Auftrennen der CYP450 Sequenzen in mehrere Gruppen erhofft. Die Aufteilung geschah durch Amplifikation mit sogenannten selektiven Basen, d.h. zwei variablen Basen (AA, AT, AG, AC, TA usw.) wurden am 5'Ende des Primers der CYP450 Domäne angehängt und somit die amplifizierten Fragmente in sechzehn Gruppen aufgeteilt (s. Abb 7).

Das Ausgangsmaterial für die Versuche war mRNA. Diese wurde im Agarosegel auf Abwesenheit von rRNA getestet, da CYP450 ähnliche cDNAs isoliert wurden, die auf Nukleotidebene hohe Homologie mit rRNA aufweisen (Sugiura *et al.*, 1996). Desweiteren ergaben Vorversuche mit einer cDNA Bibliothek nach Amplifikation mit Primern der CYP450 PFG-Domäne 26S rRNA Sequenzen.

Die Erststrangsynthese mit genspezifischen Primern wurde untersucht. Diese erwies sich als weniger effizient, was sich in der Detektion von bakteriellen Proteinen, vermutlich aus der Taq-Polymerase, zeigte. Auch konnten Fragmente bekannter Nicht-CYP450-Sequenzen (4OMT, BBE, COR) aus der erhaltenen cDNA mit genspezifischen Primern amplifiziert werden. Dies war nicht aus der RNA, aber auch nach der Umschreibung der RNA ohne Primer möglich. Auf Verunreinigung mit genomischer DNA wurde getestet. Dafür wurde die Intronsequenz des CYP80B3 sequenziert (s. Abb. 8) und die Größe der amplifizierten CYP80B3 cDNA über den Vergleich mit einem Größenmarker bestimmt. Es konnte nur



**Abb. 7 Übersicht AFLP Technik**

cDNA aus editierter CYP80B3 mRNA detektiert werden. Auch die Verwendung von DNase führte zu keinem anderen Ergebnis. Ein Zusatz von Trehalose 0,6 M und eine dadurch mögliche Temperaturerhöhung auf 55°C während der Reversen Transkription (Carninci et al., 1998) brachte keinen Erfolg. Letztendlich wurde mit OligodT umgeschrieben (s.III.9).

```

CYP80B3_g : TGCTCATGGTAAACTCAATTTTATCCATGTGCCTACCAGTTATTCATTTA : 900
CYP80B3   : TGCTCATGG----- : 859

CYP80B3_g : CACAATTGATTTTTTGGTGTAGTTCATTTTTTTTTTTTGAACCGGTATTAAA : 950
CYP80B3   : ----- : -

CYP80B3_g : GTCTACTCGTAGACTGAATTGGTTGTTTTAACATCATTTTTATGTTTCTTG : 1050
CYP80B3   : ----- : -

CYP80B3_g : ACCAACTTAACCCAATATTCTGCTAAAGAGGCATCTGCAATTCGTATTTT : 1000
CYP80B3   : ----- : -

CYP80B3_g : GTTTTTCAGGAAATATTTGGTGCGGGAACAGAGACAAGTGCATCTACAAT : 1100
CYP80B3   : -----AAATATTTGGTGCGGGAACAGAGACAAGTGCATCTACAAT : 899

```

**Abb. 8 Intronsequenz des Klonen CYP80B3 (Länge 201 bp)**

CYP80B3: Transkriptsequenz, CYP80B3 g: genomische Sequenz

Nach der Zweitstrangsynthese wurde wie unter III.11.1 beschrieben mit einem Restriktionsenzym mit sechs Basen bzw. vier Basenerkennungsstellen verdaut. Der 4-„Basencutter“ TspI509I sollte theoretisch aller 256 bp schneiden. In der zur Verfügung stehenden EST Bibliothek ließen sich 1748 Restriktionstellen finden, was einem Schnitt aller 480 bp entspricht (2058 EST Sequenzen, durchschnittliche EST-Länge von 407 bp). Für den 5-„Basencutter“ Apo I, der theoretisch aller 1024bp schneiden sollte, ergaben sich in der EST Bibliothek Fragmentlängen von durchschnittlich 660 bp. Nach dem Restriktionsverdau der cDNA erfolgte die Adaptorligation und die Amplifikation mit einem Adaptor- und einem CYP450 Domänenprimer (Tabelle 7 & Abb. 9). Die CYP450-Domänenprimer wurden anhand eines Sequenzvergleiches der CYP450 Familien ausgewählt (Tabelle 7). Die Amplifikation mit selektiven Basen wurde mit den Basenpaaren TA und der GC getestet, die in einem Viertel bzw. in einem Prozent der verglichenen CYP450 Sequenzen vorkamen.

Um die Amplifikation von Adaptor-Adaptor-Fragmenten zu verhindern wurde das 3'Ende des zur CYP450 Domänenprimersequenz reverskomplementären Adaptoroligonukleotides durch eine NH<sub>2</sub> Gruppe blockiert. Trotz der Verwendung dieser Adaptoren ergaben die Sequenzierungen weiterhin Adaptor-Adaptor-Fragmente. Deshalb wurde ein weiterer Reinigungsschritt nach der Markierung durch Amplifikation mit radioaktiv markierten

CYP450 Domänenprimern, der Auftrennung im Polyacrylamidgel und der Detektion der radioaktiven Banden auf Fotofilmen für die isolierten Fragmente nötig.

A)	P(S)	F	G(S)	A(S/G/W)	G
<b>CYP450 (120<sup>1</sup>)</b>	81(7)	100	82(8)	41(24/6/17)	100
<b>Alkaloide (11<sup>1</sup>)</b>	91	100	63(37)	55(18/9/9)	100
<b>Mohn (17<sup>1</sup>)</b>	100	100	64(36)	45(18/18/-)	100

<sup>1</sup> Anzahl der verglichenen CYP450

B)	P(S)	F	G(S)	A(S/G/W)	G
	<b>CCN</b>	<b>TTY</b>	<b>GGN</b>	<b>GCN</b>	<b>GGN</b>
	<b>TCN</b>		TCN	TCN	
	AGY		AGY	AGY	
				GGN	
				TGG	

**Tabelle 7 Auswahl der CYP450-Primer**

- A) Vergleich des Vorkommens der Aminosäuren der PFG Domäne in den CYP450 Familien (mindestens eine Sequenz, außer CYP74 Familie), den alkaloid-metabolisierenden CYP450 und den *P. somniferum* CYP450-Homologen in [%]
- B) resultierende Möglichkeiten der kodierenden Sequenz, **hervorgehoben:** durch Primersequenz abgedeckte Basenpaarkombinationen

	Sequenz	T <sub>m</sub>	bp	Degeneration
AFLP				
PFG1 <i>rev</i>	CCTGCACCAAATGGTA	49,2	16	-
PFG2 <i>rev</i>	CCIGCICCRAAIGSTA	50,5	16	0,25
PFG3 <i>rev</i>	GCNCCRAANGSGC	45,0	13	4,9
PFG4 <i>rev</i>	CCNGCNCRAANGSTA	54,3	16	16
PFG5 <i>rev</i>	CCNGCNCRAAIGGTA	53,0	16	2
RT-PCR				
EXXR <i>fwd</i>	GARGARTTYMGNCNGARMG	59,4	20	115,2
PFG <i>rev</i>	CCIGGRCAIATIMKYTICCGCICCRAAIGG	69,5	32	1,5

**Abb. 9 CYP450-Domänenprimer kursiv: Selektive Basen**

Die aus dem Polyacrylamid eluierten Fragmente wurden dazu mit biotinylierten CYP450 Domänenprimern reamplifiziert. Dadurch war ein effektives Abtrennen noch vorhandener Banden aus Adaptor-Adaptor-Amplifikaten möglich. Dafür wurden die biotinylierten Fragmente an Streptavidinbeads gebunden. Die Streptavidinbeads wurden gewaschen und entweder direkt für die weitere Amplifikation eingesetzt oder es wurde der Überstand nach Hitzebehandlung verwendet. Nach der Klonierung der erhaltenen cDNAs wurden diese sequenziert. Das Ergebnis war die Isolierung von vier neuen CYP450 Sequenzen (s. Abb. 10 CAG 1-4).

Durch die Verwendung der in der Promotionsarbeit von Fon Chin Huang 2000 zur Isolierung des CYP73 Mohnhomologen und des CYP80B3 genutzten RT-PCR Bedingungen konnten nach Auftrennung über Polyacrylamidgele zwei weitere CYP450 Sequenzen erhalten werden ( in Abb. 10 CAG6 und CAG7 ). Insgesamt wurden sechs neue CYP450 Sequenzen isoliert, welche für vier verschiedene Proteine kodieren. Der BlastX Vergleich mit der NCBI Datenbank ergab die in Abb. 10 gezeigten Homologien zu bekannten Sequenzen.

Protein	Identität	E-Value	aa
CAG1 AAC39454.1 CYP82B1 <i>Eschscholzia californica</i>	86%	0,59	14
CAG2 NP_850337.1 CYP98A3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	87%	3e-12	32
CAG3 AY275430.1 CYP75A20 <i>Gossypium hirsutum</i>	54%	0,37	28
BAD98249.1 <b>CYP719A3</b> <i>Eschscholzia californica</i>	54%	1, 7	30
CAG4 DQ350351.1 CYP71AT2v3 <i>Nicotiana tabacum</i>	87%	3e-1	23
CAG5 Primerdimer			
CAG6 ABE81444.1 CYP71D61 <i>Medicago truncatula</i>	34%	0,96	72
CAG7 AB126257 <b>CYP719A2</b> <i>Eschscholzia californica</i>	53%	0,008	29

**Abb. 10 Homologien der isolierten Fragmente zu bekannten CYP450 Sequenzen**

aa - Länge des Alignments in Aminosäuren

```

CAG3      ATGCCAGAGAGATTCTTAAAGGATGTTAATAGTGATGGACGTTTTGGTGAT-
CAG7      GCCAGAGAGATTCTTAAAGGATGTTAATAGTGATGGACGTTTTGGTGAT-
GFC55     ATGCCAGAGAGATTCTTAAAGGATGTTAATAGTGATGGACGTTTTGGTGAT-

CAG3      ATCAACACAATGG-AAAGTTCGTTGATAACCATTTGGTGC
CAG7      ATCAACACAATGG-AAAGTTCGTTGATAACCATTTGGTGC
GFC55     ATCAACACAATGG-AAAGTTCGTTGATAACCATTTGGTGC

```

**Abb. 11 identischer Sequenzbereich zwischen den Fragmenten CAG3 & 7 und GFC55**

Das CYP450-Fragment CAG2 zeigt eine hohe Homologie zur *p*-Coumarsäure 3-Hydroxylase des Phenylpropanoidstoffwechsels, CAG3 besitzt Homologie zur Flavonoid 3',5'-Hydroxylase des Phenylpropanoid- und zu CYP719A3 des Alkaloidstoffwechsel, CAG7 weist Homologie zum CYP719A2 des Alkaloidstoffwechsels auf. Für alle weiteren Fragmente ergeben sich Homologien nur zu Enzymen unbekannter Funktion (s. Abb. 10). Der Vergleich der DNA Sequenzen des CAG-3 Fragment mit den CYP450-Sequenzen der Promotionsarbeiten von Fon Chin Huang (2000) und Wiebke Priesner (1998) ergab einen identischen Bereich von 87 bp zur Sequenz des Klonen GFC55 (s. Abb. 11). Der BlastX Abgleich der GFC55 Sequenz ergab die höchste Homologie zu CYP719A1, der (*S*)- Canadinsynthese von *Coptis japonica*, einem methylenedioxybrückenbildenden Enzym der Protoberberinbiosynthese.

## 2. Auswahl von CYP450 zur Überexpression

Für die Auswahl von CYP450 Sequenzen zur heterologen Expression wurde das Expressionsverhalten in unterschiedlichen Mohnarten verglichen, die Induktion von Transkripten in *P. somniferum* Zellsuspensionskulturen nach Elicitierung bestimmt und die Korrelation der erhaltenen Ergebnisse mit den Alkaloidgehalten untersucht.

### 2.1. Vergleich der Expressionsprofile von Mohnarten und Schlafmohnvarietäten

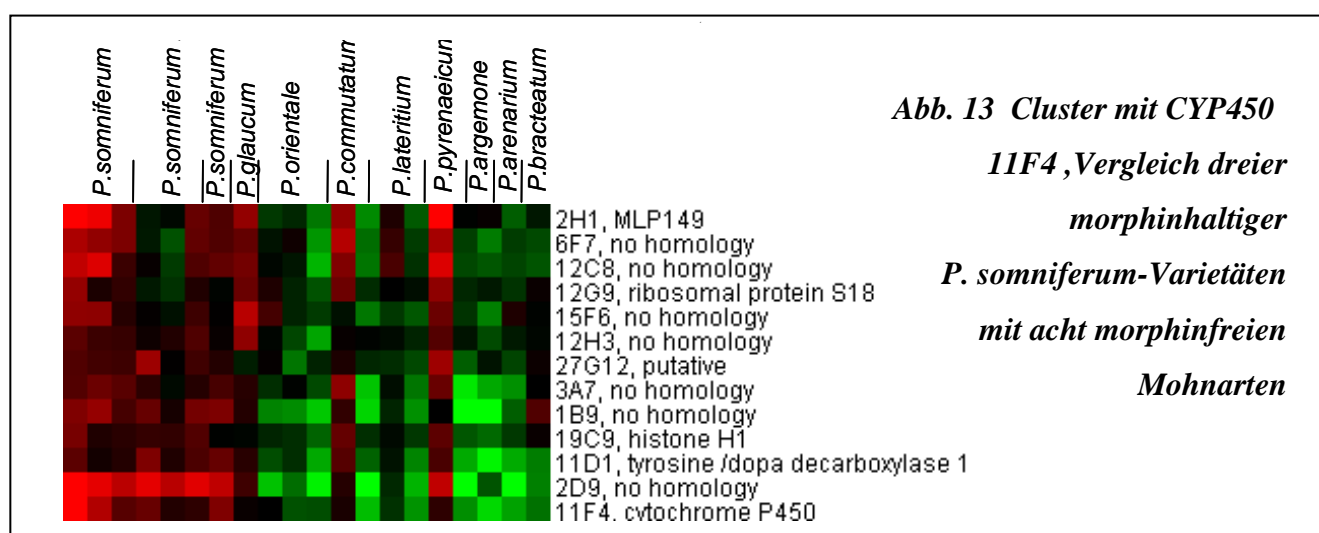
Für einen Makroarray wurden 31 *P. somniferum* CYP450-Sequenzen, davon 24 Unabhängige, amplifiziert. Diese wurden zusammen mit ca. 2000 EST's einer cDNA Bank im Rahmen der Arbeiten der Arbeitsgruppe durch Dr. Jörg Ziegler und der Technischen Assistentin Silvia Wegener auf Membranen aufgebracht und mit markierter RNA verschiedener Mohnarten hybridisiert. Untersucht wurde ob die Änderungen der Transkriptmenge mit dem Vorkommen von Morphin korreliert. Das Expressionsverhalten der CYP450-Fragmente ist in Abb. 12 zusammengefasst. Insgesamt zeigten 69 cDNAs ein erhöhtes Signal in morphinhaltigen Pflanzen (Ziegler *et.al.*, 2005 u. 2006). Darunter waren fünf CYP450, die sich in einem Cluster mit Genen der Alkaloidbiosynthese befanden. Zwei dieser CYP450 sind in ihrer Funktion als *N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (CYP80B3) bzw. Zimtsäure-4-Hydroxylase (GFC16) bekannt. Weiterhin fallen in dieses Cluster der Volllängeklon GFC55 und das mit diesen identische Fragment CAG3, wie auch eine CYP450-cDNA mit Homologie zu putativen CYP450 (GFCw13 s.Abb 14). Ein weiteres CYP450 (e11F4) mit Homologie zu CYP450 des Brassinosteroidstoffwechsels ist ebenfalls erhöht und gehört zu einem Cluster mit MLP149, einem Major Latex Protein, sowie einer Tyrosin/Dopadecarboxylase (s.Abb. 13). Nicht erhöht in morphinhaltigen Pflanzen, aber mit einem auffallenden

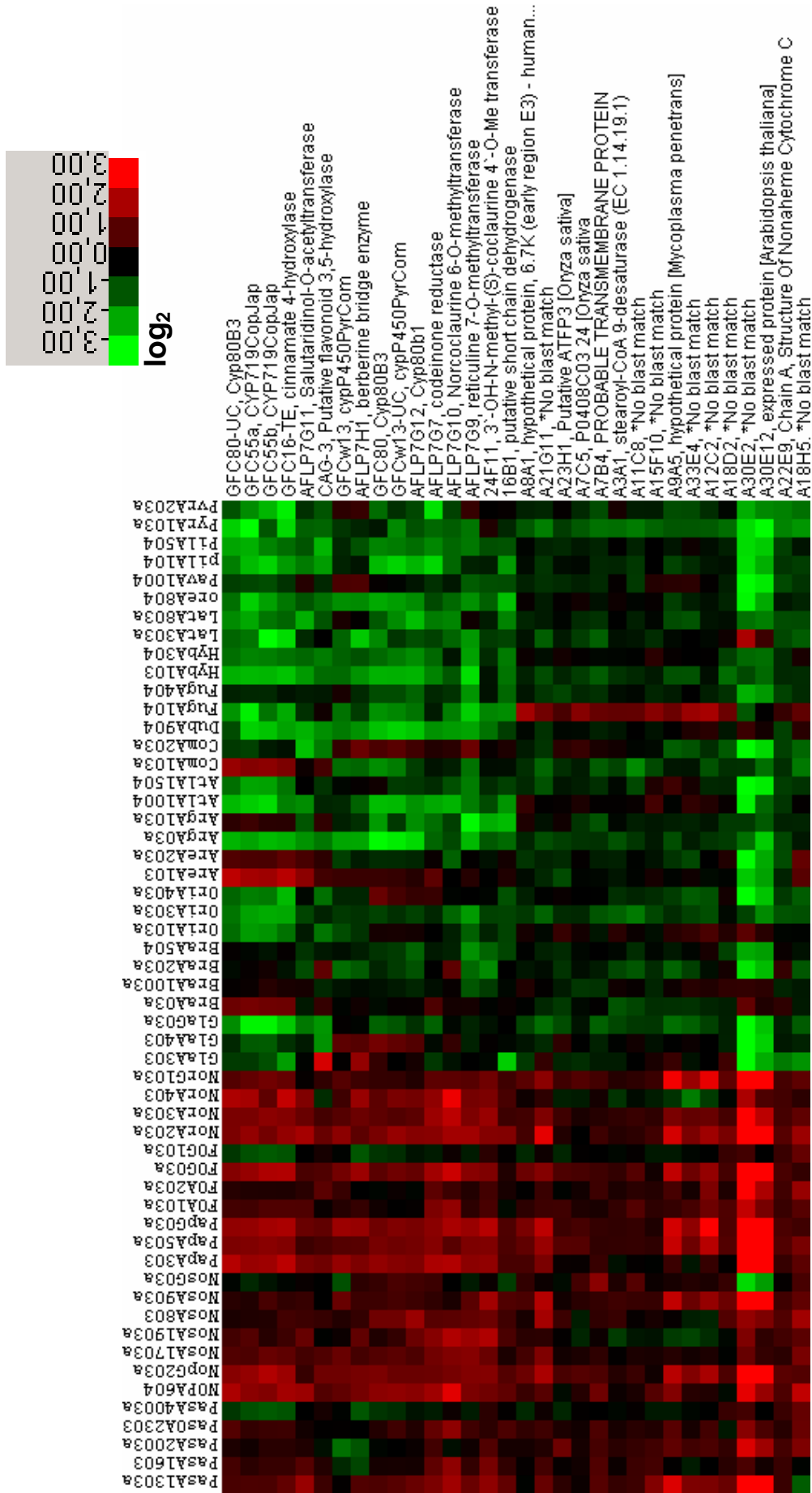


Expressionsverhalten, sind die CYP450 cDNA (GFC30), welche ein höheres Signal in *P. commutatum* und *P. argemone* hat sowie die CYP450-cDNA CYP44 mit der höchsten Transkriptakkumulation in *P. commutatum*, *P. lateritium* und *P. argemone*.

	Größe bp	Homologie	Identität (blastX)	e-Wert (blastX)
CYP80B3	1443	<b>N-Methylcoclaurin-3-Hydroxylase</b>		
GFC3		CYP89A5	56%	6e-161
GFC6		emb CAN64371.1  hypothetisches Protein	54%	2e-158
		CYP82C4	50%	1e-144
GFC8		(S)-N-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase	49%	2e-136
GFCw13	1503	emb CAN69565.1  hypothetisches Protein	50%	3e-120
		Ferulat-5-Hydroxylase	38%	1e-88
GFC16	1509	<b>Zimtsäure 4-Hydroxylase</b>		
GFC30	1419	gb ABA01477.1  CYP450 DDWF1	70%	1e-179
		Flavonoid-3'-Hydroxylase	46%	1e-106
GFC44	1592	CYP82C1	47%	2e-128
GFC48	1528	gb ABA97037.1  exprimiertes CYP450	55%	1e-151
		CYP71A9	47%	1e-125
GFC49	1521	Flavonsynthase II	51%	2e-124
GFC55	1518	(S)-Canadinsynthase	52%	5e-145
GFC77	1509	emb CAN60733.1  hypothetisches Protein	54%	2e-145
		CYP71B36	48%	2e-126
A2c3	252	Carotenoid-ε-Ringhydroxylase	85%	6e-20
A3d9	111	putative FAD-linked Oxidase	75%	3e-08
		CYP89A5	70%	3e-04
A4d4	264	Cholesterolseitenkettenspaltung	37%	2.2
A4g5	249	Carotenoid-ε-Ringhydroxylase	83%	7e-18
A12h11	97	CYP71A4	63%	0,47
A32c2	154	putative Carotenoid-ε-Ringhydroxylase	93%	3e-14
e7ex7	215	(S)-N-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase	59%	2e-020
e8f9	514	Fettsäure-Ω-Hydroxylase	36%	3e-13
e11F4	483	CYP87A2	68%	4e-28
e12b11	471	CYP71A1	61%	6e-25

Abb. 12 Untersuchte CYP450 Fragmente und Volllänge klon

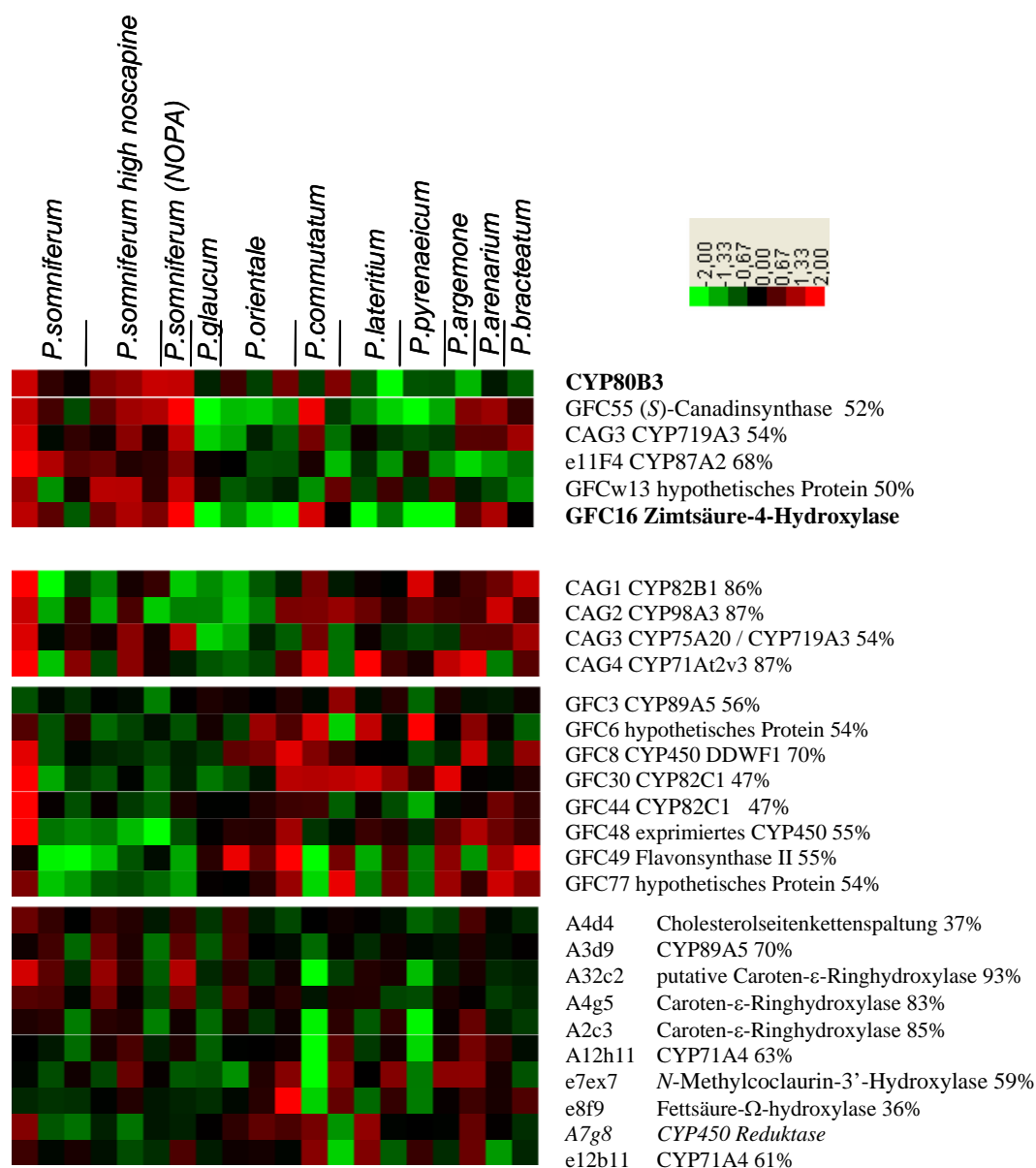




**Abb. 14 Höher exprimierte Gene in morphinhaltigen Pflanzen**

Expressionsvergleich von 6 morphinhaltigen *Papaver somniferum* Varietäten mit 14 Mohnarten

aus Ziegler *et al.*, 2006



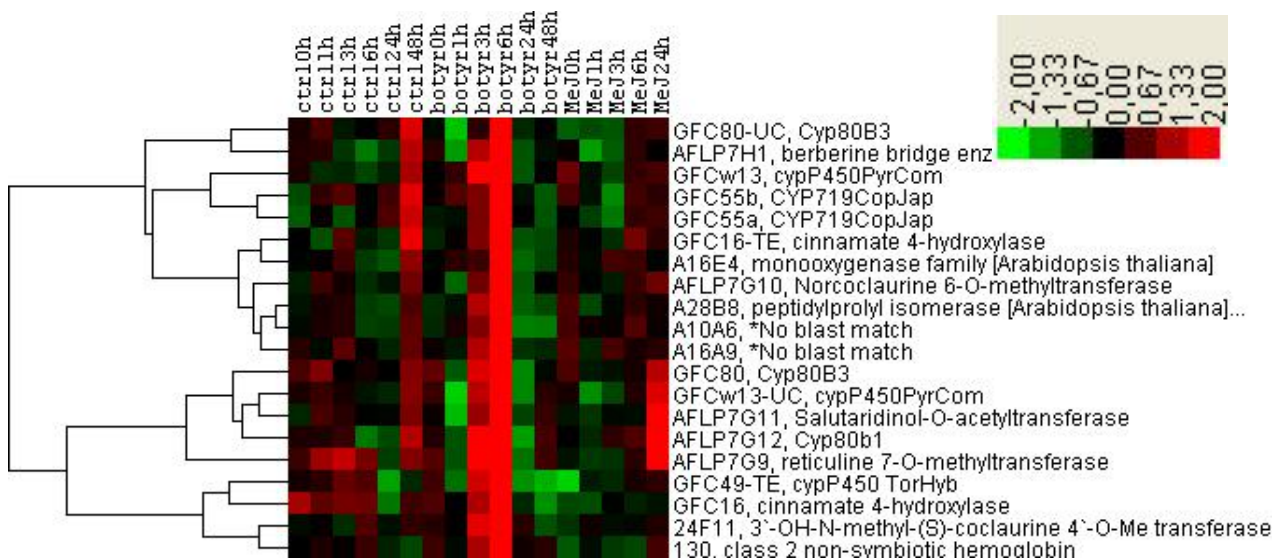
**Abb. 15 Vergleich des Expressionsverhaltens der CYP450 Fragmente in den verschiedenen Mohnarten und Schlafmohnvarietäten**

*Oberes Feld:* In morphinhaltigen Pflanzen stärker exprimierte CYP450-Transkripte

## 2.2. Induktion der Genexpression nach Behandlung von *P. somniferum* Stamm *Paris*-Zellsuspensionkulturen mit *Botrytis cinerea* und Methyljasmonat

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde die EST Bibliothek erneut auf Membranen aufgebracht und mit markierter RNA der Zellsuspensionskulturproben hybridisiert. Die Auswertung der erhaltenen Signale ergab, dass bereits 1h nach Elicitierung mit *Botrytis cinerea* 51 Transkripte induziert waren (s.Anhang 1). Die Transkripte der Alkaloidbiosynthesegene weisen, außer Codeinonreduktase, Salutaridinreduktase und Tyrosin/Dopa-Decarboxylase, eine deutlich Induktion nach 3-6 h auf (s.Abb. 16). Insgesamt geben 31

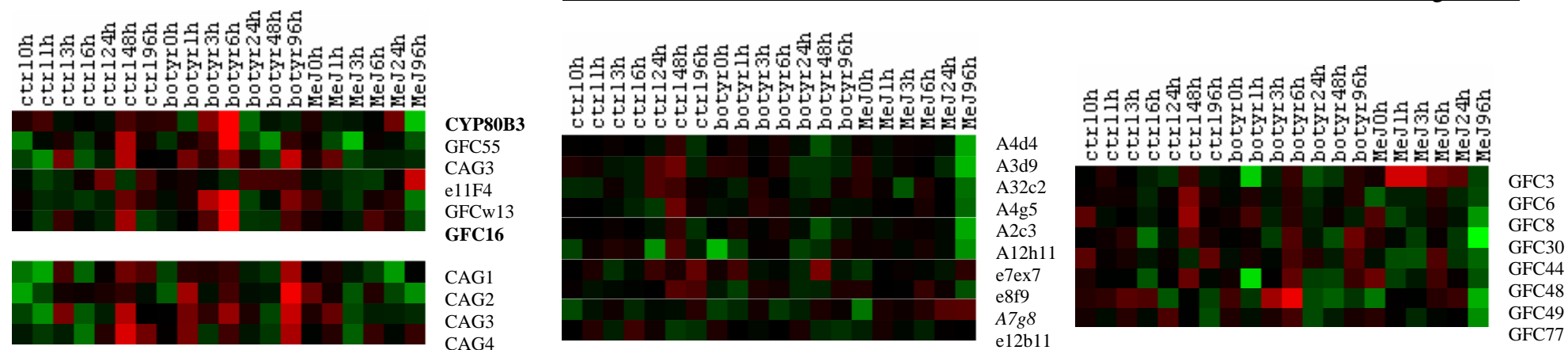
cDNAs ein erhöhtes Signal in diesem Zeitbereich. Induziert ist neben CYP80B3 das CYP450 mit Homologie zur (*S*)-Canadinsynthase, GFC55. Ebenso sind die Zimtsäure-4-Hydroxylase (GFC16) und die CYP450 cDNAs GFCw13 und GFC49 induziert. Weiterhin fallen in diese Cluster das Expressionsverhalten einer Monoxygenase mit Homologie zu FAD-bindenden Oxidoreduktasen der Ubiquinonbiosynthese (A16E11), einer Peptidylprolylisomerase (A28B8) mit möglicher Funktion in der Genregulation sowie eines „class2 non symbiotic“ Hämoglobin (130), das potentiell eine Funktion im Sauerstofftransport bzw. in der Sauerstoffbindung hat (s.Abb. 16).



**Abb. 16 Alkaloidspezifische cDNAs enthaltendes Cluster der durch *Botrytis cinerea* und Methyljasmonat nach 3 h -6h induzierten Gene** botyr – *Botrytis cinerea*, MeJ- Methyljasmonat, ctrl - Kontrolle

Nach Elicitierung mit Methyljasmonat zeigen nach einer Stunde kleine Hitzschockproteine sowie eine Glutathion-S-transferase einen deutlichen Anstieg der Expression (Daten nicht gezeigt). Auch ein CYP450 mit höchster Homologie zu CYP89A, einer Unterfamilie ohne bekannter Funktion, ist nach einer Stunde induziert. Die Induktion der alkaloidspezifischen Gene erfolgt zwischen 6 h und 24 h. Verglichen mit der Induktion durch den *B. cinerea* Elicitor ist dies schwächer und erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt. Einige Transkripte wie die der 3'-OH-N-Methylcoclaurin-4'-O-methyltransferase sind im Gegensatz zur Elicitierung mit *Botrytis cinerea* nicht induziert (s.Abb. 16).

Vergleicht man die in morphinhaltigen Pflanzen stärker exprimierte Transkripte mit denen nach Elicitierung induzierten, so zeigt sich das alkaloidspezifische Transkripte, wie CYP80B3 jeweils erhöht exprimiert sind. Auch die Menge des CYP450-Transkriptes Zimtsäure-4-Hydroxylase ist in beiden Versuchen erhöht.



GENID	NAME	ctrl0h	ctrl3h	ctrl6h	ctrl24h	botyr0h	botyr3h	botyr6h	botyr24h	MeJ0h	MeJ3h	MeJ6h	MeJ24h
<b>Alkaloidbiosynthesegene</b>													
A3G2	Coclaurin- <i>N</i> -methyltransferase	0,1	0,4	-0,4	-0,4	-0,3	0,5	1,5	-3,5	0,1	0,5	0,3	-0,1
24F11	3'-OH- <i>N</i> -methyl-( <i>S</i> )-coclaurine 4'-O-Me	0,0	-0,3	0,7	-0,9	0,3	1,8	2,5	-0,3	-0,4	0,0	-0,1	-0,1
AFLP7G	Retikulin-7- <i>O</i> -methyltransferase	0,1	1,1	0,6	-0,9	0,2	2,6	4,7	-1,6	-0,6	-0,8	-0,1	2,2
AFLP7H	Berberinbrückenenzym	0,2	-0,5	-1,0	-0,1	0,2	1,4	4,5	-0,6	0,0	-0,8	0,3	2,3
AFLP7G	Norcoclaurin-6- <i>O</i> -methyltransferase	-0,2	0,1	-0,3	-0,1	0,0	0,9	2,4	-0,7	0,4	-0,2	0,4	0,9
AFLP7G	Salutaridinol- <i>O</i> -acetyltransferase	-0,3	0,2	0,0	-0,5	0,0	1,1	3,7	-1,3	-0,2	-0,1	-0,2	1,6
16B1	Salutaridinreduktase	-0,3	-0,1	0,0	1,0	0,2	-0,1	-0,6	0,7	-0,9	-0,3	-0,4	0,0
<b>CYP450 induziert nach <i>Botrytis cinerea</i> - Behandlung</b>													
GFC80B	Cyp80B3	0,4	-0,2	0,0	-0,9	0,6	1,5	4,7	-1,3	0,4	-0,3	0,0	1,9
GFC55	( <i>S</i> )-Canadinsynthase 52%	-0,7	-0,7	0,0	-0,5	-0,2	0,9	3,7	-0,7	0,0	-0,9	0,4	0,0
CAG-3	CYP719A3 54%	-0,8	1,4	-1,1	-1,4	0,0	0,5	1,8	-1,6	0,4	-0,9	-0,4	0,2
11F4	CYP87A2 68%	-0,1	-0,3	0,1	0,9	0,1	-0,1	-0,4	0,6	-0,1	-0,4	-0,5	0,1
GFC13	hypothetisches CYP450 50%	0,1	-0,4	-0,6	1,0	-0,1	2,1	4,8	1,0	0,7	-0,6	0,3	1,0
GFC16	Zimtsäure-4-Hydroxylase	0,0	0,7	-0,1	0,6	-0,3	1,0	3,2	0,0	0,2	-0,3	0,9	0,5
GFC44	CYP82C1 47%	1,0	0,8	-0,1	-0,3	0,4	-0,5	1,1	-0,4	1,4	-0,7	-0,4	-0,5
GFC49	Flavonesynthase II 55%	0,4	1,1	0,9	-0,4	0,8	1,9	2,8	-0,6	-1,4	0,0	0,4	0,4
<b>CYP450 induziert nach MeJ - Behandlung</b>													
GFC3	cypP450 putative protein	0,0	0,0	-0,3	-0,6	-0,1	-0,4	0,6	-1,0	0,2	2,5	1,3	1,1

Abb. 17 Induktion von CYP450 Transkripten durch *Botrytis cinerea* (*botry*) und Methyljasmonat (*MeJ*), *ctrl* - Kontrolle

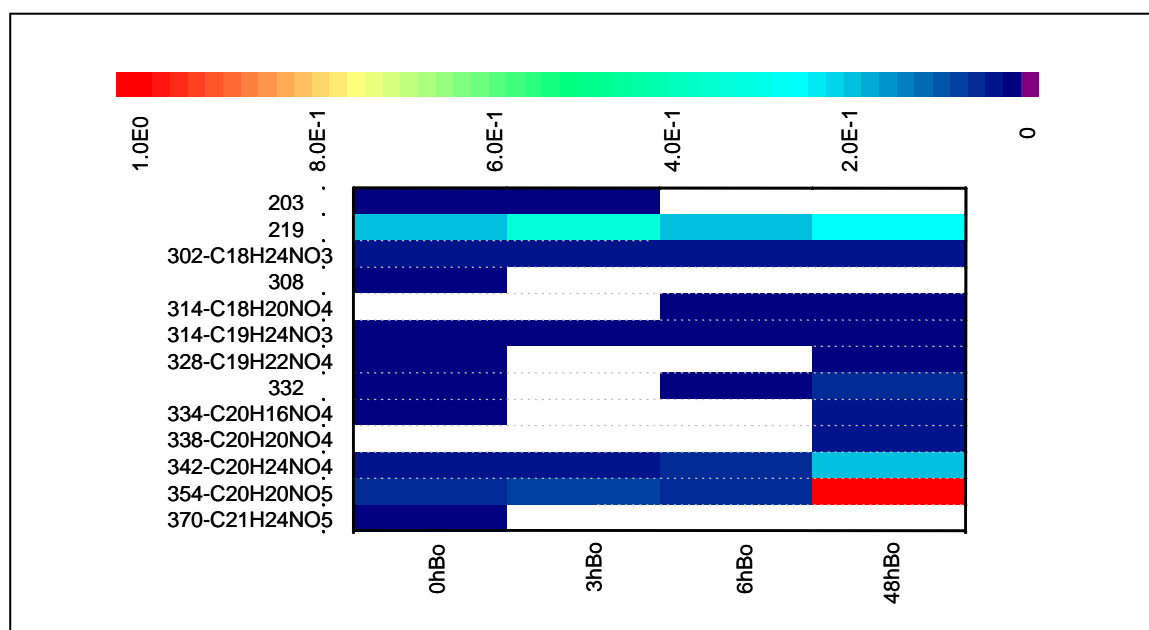
**oben** Grafische Darstellung in TreeView *Oberes Feld*: in morphinhaltigen Pflanzen stärker exprimierte CYP450 Transkripte

**unten** Vergleich der Induktion der Alkaloidbiosynthesegene mit der von induzierten CYP450, Angaben: log<sub>2</sub> Werte der x-fachen

Induktion bzw. Hemmung, nach der Normalisierung (s.III.14.2.)

Von den CYP450 Sequenzen unbekannte Funktion sind der GFC55 und der GFCw13 Klon höher exprimiert. Von den Sequenzen die nicht für CYP450 oder alkaloidmetabolisierende Proteine kodieren ist nur das Transkriptniveau einer putativen Stearoyl-CoA-9-desaturase sowohl im Elicitierungsexperiment als auch in morphinhaltigen Pflanzen erhöht. Keiner der EST's ohne Homologie bzw. mit Homologie zu hypothetischen Proteinen zeigte eine Induktion in beiden Experimenten.

### 2.3. Bestimmung der Induktion der Alkaloidproduktion in der *Papaver somniferum* Stamm *Paris* Zellkultur



**Abb. 18 Induktion der Alkaloidbiosynthese nach Elicitierung mit *Botrytis cinerea***

FT-ICMS Messungen von 80% Ethanol-extrakten; identifizierte Massen siehe Tabelle 8

FT-ICMS Messungen wurden erfolgreich zum Nachweis einzelner Alkaloide aus Extrakten und Alkaloidmischungen genutzt (Raith *et al.*, 2003, Ziegler *et al.*, 2006, Zulak *et al.*, 2006, Schmidt *et al.*, 2007). Für den Vergleich der Mohnarten- und varietäten lagen die Daten der Ziegler *et al.* Veröffentlichung 2006 vor. Für den Nachweis und die Quantifizierung der Alkaloide in der Zellkultur wurden FT-ICMS Messungen der Extrakte durch Dr. Jürgen Schmidt durchgeführt und mittels semiquantitative SRM für zwei Alkaloide, Protopin und *N*-Methylstylopin, verifiziert. Mit den Messungen konnten, neben diesen Alkaloiden, *N,N*-Dimethylcoclaurin, Protopin, *N*-Methylstylopin, 13-Hydroxystylopin, Sanguinarin sowie die bisher für die *P. somniferum* Zellkultur noch nicht beschriebenen Aporphinalkaloide Corytuberin und *N*-Methylcorytuberin (Magnoflorin), ein Alkaloid vom Berberin Typ und ein glykosyliertes Tyrosinderivat nachgewiesen werden. Bis auf die beiden Letztgenannten

konnten die in den FT-ICMS Messungen auffälligen Alkaloide durch SRM identifiziert werden. Dazu wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Massen selektioniert und auf die typischen Massenfragmente mit den angegebenen Kollisionsenergien (CE) gescannt. Durch SRM ließen sich auch *N*-Methylcoclaurin und Retikulin nachweisen, welche nicht in den identifizierten Massen der FT-ICMS Messungen auftauchten. Morphinane waren in keiner der Messungen detektierbar. Die Quantifizierung ergab, dass in den Zellkulturen zwei Tage nach der Elicitierung mit *Botrytis cinerea* ein Anstieg des Alkaloidgehaltes an Protopin sowie in geringerem Ausmaß an *N*-Methylstylopin, *N*-Methylcorytuberin, Sanguinarin und des Alkaloides vom Berberintyp (s. Abb. 18 und Tabelle 8) erfolgte.

Substanz	<i>m/z</i> ([M+H] <sup>+</sup> )	RT (min)	SRM	CE (eV)
<b>Coclaurin</b>	286	6.4	<i>m/z</i> 286 → 107	-25
<b><i>N</i>-Methylcoclaurin</b>	300	6.26	<i>m/z</i> 300 → 107	-25
<b>Dihydrocodein (Standart)</b>	302	4.06	<i>m/z</i> 302 → 199	-20
<b><i>N,N</i>-Dimethylcoclaurin</b>	314	6.11	<i>m/z</i> 314 → 107	-30
<b>Corytuberin</b>	328	4.69	<i>m/z</i> 328 → 265	-25
<b>Retikulin</b>	330	9.5	<i>m/z</i> 330 → 192	-35
<b>Sanguinarin</b>	332	21.64	<i>m/z</i> 332 → 274	-20
<b>Alkaloid vom Berberin Typ</b>	334	25.64	<i>m/z</i> 334 → 318	-25
<b>unbekannt</b>	336	16.18	<i>m/z</i> 336 → 247	-30
<b><i>N</i>-Methylstylopin</b>	338	18.55	<i>m/z</i> 338 → 190	-25
<b>13-Hydroxystylopin</b>	340	14.48	<i>m/z</i> 340 → 192	-25
<b><i>N</i>-Methylcorytuberin</b>	342	9.41	<i>m/z</i> 342 → 265	-25
<b>Protopin</b>	354	15.87	<i>m/z</i> 354 → 189	-30

**Tabelle 8 Für Identifizierung und anschließende Semiquantifizierung durch LC-MS/MS ausgewählte Massen**

Für die Überexpressionen wurde das CYP450 mit Homologie zur (*S*)-Canadinsynthase ausgewählt (GFC55), welches in beiden Experimenten erhöht vorliegt. Die cDNA des Klones 11F4, welcher beim Interspeziesvergleich in einem Cluster mit MLP149 und der Tyrosin/Dopadecarboxylase vorlag, wurde ebenfalls isoliert und das Enzym überexprimiert.

### 3. Volllänge cDNAs der CYP450 Klone 11F4 und GFC55

Mittels Genome Walkerkit wurden die Volllänge cDNA des 11F4 Fragmentes isoliert (Abb. 23). Außerdem wurde ausgehend von den Sequenzinformationen der Promotionsarbeit von Fon-Chin Huang (2000) die GFC55 cDNA durch RT-PCR reisoliert (Abb. 21). Zur

Isolierung bzw. Amplifikation wurden die in Abb. 19 aufgelisteten sequenzspezifischen

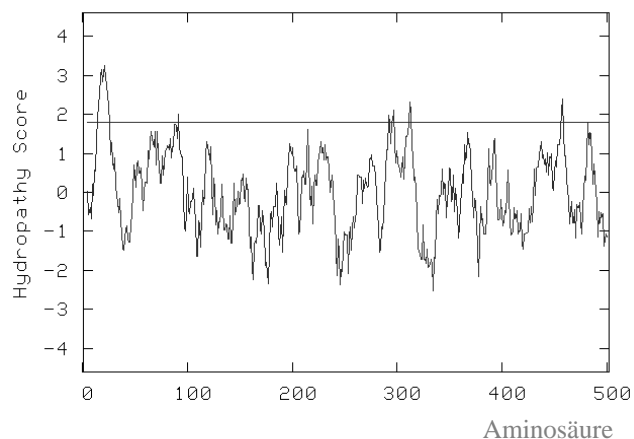
<b>Genome Walker</b>	Amplifikation der cDNA Enden
11F4 fwd	GATTTTGCCAAACTTCAGATG
11F4 rev1	ACTGCATCAGATCTTATTATAGTC
11F4 rev2	AGCCATCTGAAGTTTGGCAAATCTGTTCC
11F4 rev3	CCTCCCTTGATTGTTTTCCACCTGTACTTGTCCACCAAGTAATGAAG
<b>RT – PCR</b>	Reisolierung der cDNA
GFC55 fwd	ATGGCTCCGATTAATATAGAGG
GFC55 rev	CTACTGTCGAAAAGGTTTTGTACG
Primer verwendet.	

**Abb. 19 Primer zur Volllängeisolierung von CYP450 cDNAs**

Die reisolierete Sequenz GFC55 unterscheidet sich in den Aminosäuren D205G, K451N, G452E sowie V470L von der Ausgangssequenz. Ihr wurde von Dr. David Nelson von der Universität Tennessee der systematische Name CYP719B1 zugeordnet. Das aus 505 Aminosäuren bestehende Protein hat ein theoretisches Molekulargewicht von 55,0 kDa. Es besitzt Homologie zu einer putativen (S)-Canadinsynthase aus *Thalictrum flavum* (AAU20771; 532; 1e-149)<sup>1</sup> einem putativen CYP450 aus *Eschscholzia californica* (BAD98250; 528; 3e-148) sowie einem methylenedioxybrückenbildenden Enzym aus *Coptis japonica* (BAB68769; 525; 3e-147).

Die CYP719B1 Sequenz besitzt nach SignalP (Dyrløv Bendtsen et al., 2004)<sup>2</sup> ein Signalankerpeptid innerhalb der ersten dreißig Aminosäuren, wobei die Aminosäuren 10-29 den Membrananker darstellen. Eine weitere putative Membrandomaine wird zwischen der Aminosäure 75-94 errechnet (Krogh et al., 2001)<sup>3</sup>.

**Abb. 20 Hydropathieplot der CYP719B1 Sequenz**



<sup>1</sup> (Accession Nummer bzw. Name des CYP450, BlastX Score, BlastX E-Value)

<sup>2</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<sup>3</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>



```

1   ATG GCT CCG ATT AAT ATA GAG GGG AAT GAT TTT TGG ATG ATA GCA
1   M A P I N I E G N D F W M I A
46  TGC ACT GTC ATA ATA GTA TTT GCA TTG GTG AAG TTC ATG TTT TCC
16  C T V I I V F A L V K F M F S
91  AAA ATA TCT TTT TAT CAA TCT GCA AAT ACA ACG GAA TGG CCA GCA
31  K I S F Y Q S A N T T E W P A
136 GGT CCA AAA ACA TTA CCC ATA ATT GGA AAT CTT CAT CAG TTG GGA
46  G P K T L P I I G N L H Q L G
181 GGA GGT GTG CCC TTA CAG GTT GCT TTG GCA AAC TTA GCT AAA GTT
61  G G V P L Q V A L A N L A K V
226 TAT GGA GGT GCA TTT ACA ATT TGG ATT GGA AGC TGG GTT CCA ATG
76  Y G G A F T I W I G S W V P M
271 ATC GTC ATA AGC GAT ATC GAT AAC GCT CGG GAA GTT CTT GTT AAT
91  I V I S D I D N A R E V L V N
316 AAA TCT GCT GAT TAT TCC GCT AGA GAT GTA CCT GAT ATT CTT AAA
106 K S A D Y S A R D V P D I L K
361 ATC ATC ACA GCA AAT GGG AAG AAT ATT GCT GAT TGT GAT TCT GGT
121 I I T A N G K N I A D C D S G
406 CCA TTT TGG CAT AAT TTA AAG AAA GGT CTT CAA AGT TGT ATA AAT
136 P F W H N L K K G L Q S C I N
451 CCA TCA AAT GTT ATG TCT CTA TCT CGT TTA CAG GAA AAA GAC ATG
151 P S N V M S L S R L Q E K D M
496 CAA AAT CTC ATC AAA TCC ATG CAA GAA AGA GCG TCA CAG CAT AAT
166 Q N L I K S M Q E R A S Q H N
541 GGA ATT ATA AAA CCT CTT GAT CAT GCC AAA GAA GCG TCT ATG CGA
181 G I I K P L D H A K E A S M R
586 TTG CTG AGT AGA GTT ATA TTT GGT CAC GAc TTT TCA AAT GAG GAT
196 L L S R V I F G H D F S N E D
631 CTC GTT ATT GGT GTG AAA GAC GCC CTC GAT GAG ATG GTA CGC ATA
211 L V I G V K D A L D E M V R I
676 AGT GGG TTG GCA AGT TTA GCT GAT GCT TTT AAA ATT GCT AAA TAT
226 S G L A S L A D A F K I A K Y
721 TTA CCA AGC CAG AGA AAA AAT ATT CGG GAT ATG TAC GCC ACA AGA
241 L P S Q R K N I R D M Y A T R
766 GAC AGA GTA TAT AAT TTG ATT CAA CCA CAT ATC GTC CCT AAT CTT
256 D R V Y N L I Q P H I V P N L
811 CCT GCA AAT TCT TTC TTA TAT TTT CTT ACA TCT CAA GAT TAC AGT
271 P A N S F L Y F L T S Q D Y S
856 GAT GAA ATT ATT TAC TCA ATG GTA CTT GAA ATT TTT GGT TTG GGA
286 D E I I Y S M V L T E G I F G L G
901 GTA GAT AGT ACT GCA GCA ACG GCA GTT TGG GCA CTC TCC TTT TTA
301 V D S T A A T A V W A L S F L
946 GTC GGC GAG CAG GAA ATT CAA GAA AAA CTT TAC CGC GAA ATC AAC
316 V G E Q E I Q E K L Y R E I N
991 AAC CGG ACG GGT GGA CAA AGA CCA GTG AAA GTT GTA GAT TTG AAA
331 N R T G T G Q R P V K V V D L K
1036 GAG CTG CCA TAT CTA CAA GCC GTG ATG AAA GAA ACA TTG AGG ATG
346 E L P Y L Q A V M K E T L R M
1081 AAA CCC ATC GCA CCA CTA GCG GTC CCT CAT GTA GCA GCA AAA GAT
361 K P I A P L A V P H V A A K D
1126 ACT ACA TTC AAG GGG CGG AGA ATC GTT AAA GGT ACA AAA GTA ATG
376 T T F K G R R I V K G T K V M
1171 GTG AAT CTG TAC GCT ATC CAT CAC GAC CCT AAC GTT TTC CCT GCA
391 V N L Y A I H H D P N V F P A
1216 CCG TAT AAA TTC ATG CCA GAG AGA TTC TTA AAG GAT GTT AAT AGT
406 P Y K F M P E R F L K D V N S
1261 GAT GGA CGT TTT GGT GAT ATC AAC ACA ATG GAA AGT TCG TTG ATA
421 D G R F G D I N T M E S S L I
1306 CCA TTT GGT GCT GGT ATG AGA ATT TGT GGA GGT GTA GAA TTA GCC
436 P F G A G M R I C G G V E L A
1351 AAG CAG ATG GTA GCT TTT GCT CTT GCA AGT ATG GTC AAC GAA TTC
451 K Q M V A F A L A S M V N E F
1396 AAA TGG GAT TGT GTT TCC GAG GGG AAA TTG CCT GAT CTT AGT GAA
466 K W D C V S E G K L P D L S E
1441 GCT ATT AGC TTC ATT CTC TAC ATG AAA AAC CCA CTT GAA GCC AAA
481 A I S F I L Y M K N P L E A K
1486 ATT ACT CCT CGT ACA AAA CCT TTT CGA CAG TAG 1518
496 I T P R T K P F R Q *

```

Abb. 21

## CYP719B1

Aminosäure- und  
Nukleotidsequenz

in über 75% der  
pflanzlichen

CYP450 konserviert

hoch konservierte

Aminosäuren in

allen CYP450

absolut

konserviertes

Cytosin

graukursive Schrift

abweichende

Aminosäure von

über 75% der

pflanzlichen

CYP450

konservierte

Domaine

alternatives

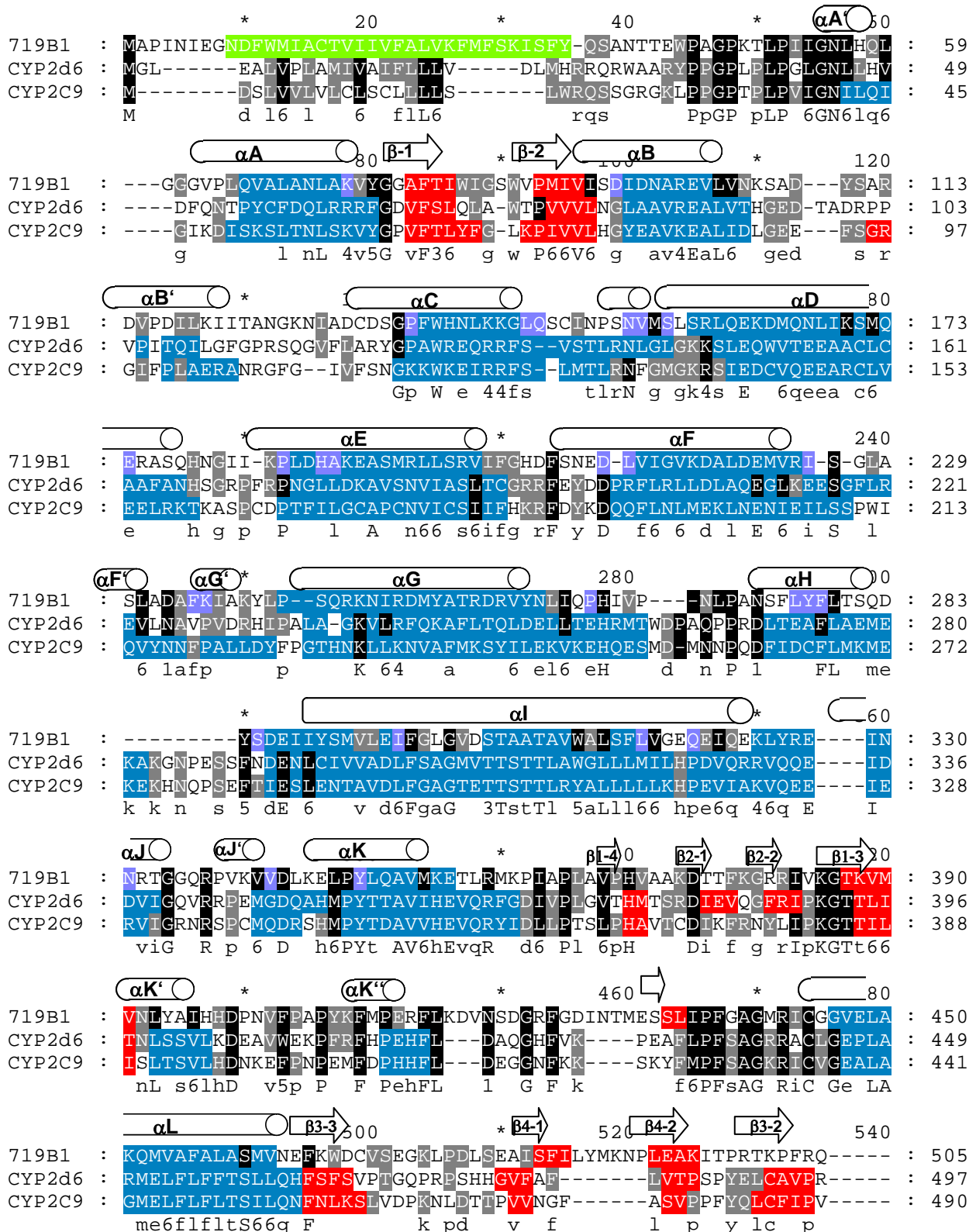
Startmethionin führt

zu fünf zusätzlichen

Aminosäuren

MHRCP (ATGCATC

GATGCCCC)



**Abb. 22** Sekundärstrukturvorhersage für die CYP719B1 Sequenz nach Rost und Sander (1993)<sup>\*</sup> im Vergleich zu den Sekundärstrukturen in den Kristallstrukturen von CYP2D6 (Rowland *et al.*, 2006) und CYP2C9 (Williams *et al.*, 2006).

<sup>\*</sup> <http://www.predictprotein.org/>

```

1   ATG TTA GTA CCT GCT AGT TTA TTC ATT GGT ACC TTA ATA ATC ATA
1   M  L  V  P  A  S  L  F  I  G  T  L  I  I  I
46  TGC ATA ACT CAC TGG GTT TAT AGA TGG AGA AAT CCC GGA TGC AAT
16  C  I  T  H  W  V  Y  R  W  R  N  P  G  C  N
91  GGA AAA CTT CCT CCC GGT TCT ATG GGC TTC CCA ATT ATT GGC GAA
31  G  K  L  P  P  G  S  M  G  F  P  I  I  G  E
136 ACT CAT CGG TTC TTT ACA CGA ACT ACT TCA TCC GAT GTC CCT CCT
46  T  H  R  F  F  T  R  T  T  S  S  D  V  P  P
181 TTC ATG AAA GAA AGA ATG GAA AGA TAC GGT CCA GTT TTT AAA ACG
61  F  M  K  E  R  M  E  R  Y  G  P  V  F  K  T
226 AGT TTG GTT GGG CAA TCC TTC ATC GTA TCA ACA GAT CCT GAA GTC
76  S  L  V  G  Q  S  F  I  V  S  T  D  P  E  V
271 AAT CAC TTG ATA ATA TCT CAA CTA GAA GGC GAA TCG TTC GTG TTT
91  N  H  L  I  I  S  Q  L  E  G  E  S  F  V  F
316 TGG TAT CCT GAT ACT TTT ACA AAG ATA TTT GGG CAA CAA GGT GTA
106 W  Y  P  D  T  F  T  K  I  F  G  Q  Q  G  V
361 CAG TCA CTA CAT GGG TCC ATT CAT AAG TAC ATA AGA AAC ATG GTT
121 Q  S  L  H  G  S  I  H  K  Y  I  R  N  M  V
406 TTG AGT CAC TTT GGT CCT GAA AGT CTG AAA CAT AAG CT T CTT CCT
136 L  S  H  F  G  P  E  S  L  K  H  K  L  L  P
451 CAT ATA GTA CAT AGG GTA CAG AGA GAT TTA TCG GTG TGG GAA AAT
151 H  I  V  H  R  V  Q  R  D  L  S  V  W  E  N
496 CAG GAT AGC GTA GAT TTG AAA GAA GCC GTT GTG AAG ATG GTA TTT
166 Q  D  S  V  D  L  K  E  A  V  V  K  M  V  F
541 GAA CTA ACT GCA AAA GAA CTC ATC TGC TAC CAA TAT AAT CCA ACC
181 E  L  T  A  K  E  L  I  C  Y  Q  Y  N  P  T
586 AAG CCC TCA GAG AAT CTT AGA gaa TGT TTT ATT GCA TTC ATG GAA
196 K  P  S  E  N  L  R  E  C  F  I  A  F  M  E
631 GGA TTG ATT TCT TTT CCG CTC GAT ATT CCT GGG ACC GCA TAC CAC
211 G  L  I  S  F  P  L  D  I  P  G  T  A  Y  H
676 AAA TGC TTA CAG GGT CGT AAG CAA GCA ATG AAG ATT TTG AAA AAT
226 K  C  L  Q  G  R  K  Q  A  M  K  I  L  K  N
721 ATG TTA CAA GAG AGA CGA ATT ACA CCT AAA AGT TGT CCA GAA GAT
241 M  L  T  Q  E  R  R  I  T  P  K  S  C  P  E  D
766 TTC TTT GAT TAT CTC TTG GAT GAA CTG AAA AAT GAA GAC ACA GTG
256 F  F  D  Y  L  L  D  E  L  K  N  E  D  T  V
811 CTA AGT GAA GCA ATT TGT TTA GAC TTA ATG TTT TTT GTT CTC TAT
271 L  S  E  A  I  C  L  D  L  M  F  F  V  L  Y
856 GGC AGC TTT GAG ACG ACT TCT ATA TCA ATA ACT TTT GCC GTT AAA
286 G  S  F  E  T  T  S  I  S  I  T  F  A  V  K
901 TTG CTT ACA GAA AAC CCT GCA GTT CTG GAG GAA TTA ACG GAA GAA
301 L  L  T  E  N  P  A  V  L  E  E  L  T  E  E
946 CAT GAA GCA CTT ATC CGT ACC AGA AAA AAC GGT GAT GCA CCA CTC
316 H  E  A  L  I  R  T  R  K  N  G  D  A  P  L
991 ACA TGG AAA GAA TAC AAA TCA ATG AAA TTC ACA AAT CAG GTT CTC
331 T  W  K  E  Y  K  S  M  K  F  T  N  Q  V  L
1036 AAT GAA GTT GTG AGA TTG GCA AAT ATT GTT CCT GGA GTT TTT AGA
346 N  E  V  V  R  L  A  N  I  V  P  G  V  F  R
1081 AAA GCA TTG AAA GAT ATA CCT ATA CAG GGT TAC ACC ATA CCA GCA
361 K  A  L  K  D  I  P  I  Q  G  Y  T  I  P  A
1126 GGG TGG GCT GTC ATG TTA TGC CTT CCA TCA GTG CAT CTG AAT CCT
376 G  W  A  V  M  L  C  L  P  S  V  H  L  N  P
1171 GTA AAG TAC AAA GAT CCC CTT GAA TTC AAT CCA CAT AGA TGG GAT
391 V  K  Y  K  D  P  L  E  F  N  P  H  R  W  D
1216 GGA GTG GAG TTA AAT GGA GGA ACA AAA GAT TTC TTG GCT TTT GGT
406 G  V  E  L  N  G  G  T  K  D  F  L  A  F  G
1261 GCT GGT CAG AGA TTT TGT GTT GGA ACA GAT TTT GCC AAA CTT CAG
421 A  G  Q  R  F  C  V  G  T  D  F  A  K  L  Q
1306 ATG GCT GTT TTT CTT CAT TAC TTG GTG ACA AAG TAC AGG TGG AAA
436 M  A  V  F  L  H  Y  L  V  T  K  Y  R  W  K
1351 ACA ATC AAA GGA GGA GAT ATT GCC CGG ATT CCT GGT TTA ACA TTT
451 T  I  K  G  D  I  A  R  I  P  G  L  T  F
1396 CCA AAT GGT TTT CAC ATT AAA ATC TCA GAA AAG AAT ACC TGA 1437
466 P  N  G  F  H  I  K  I  S  E  K  N  T  *

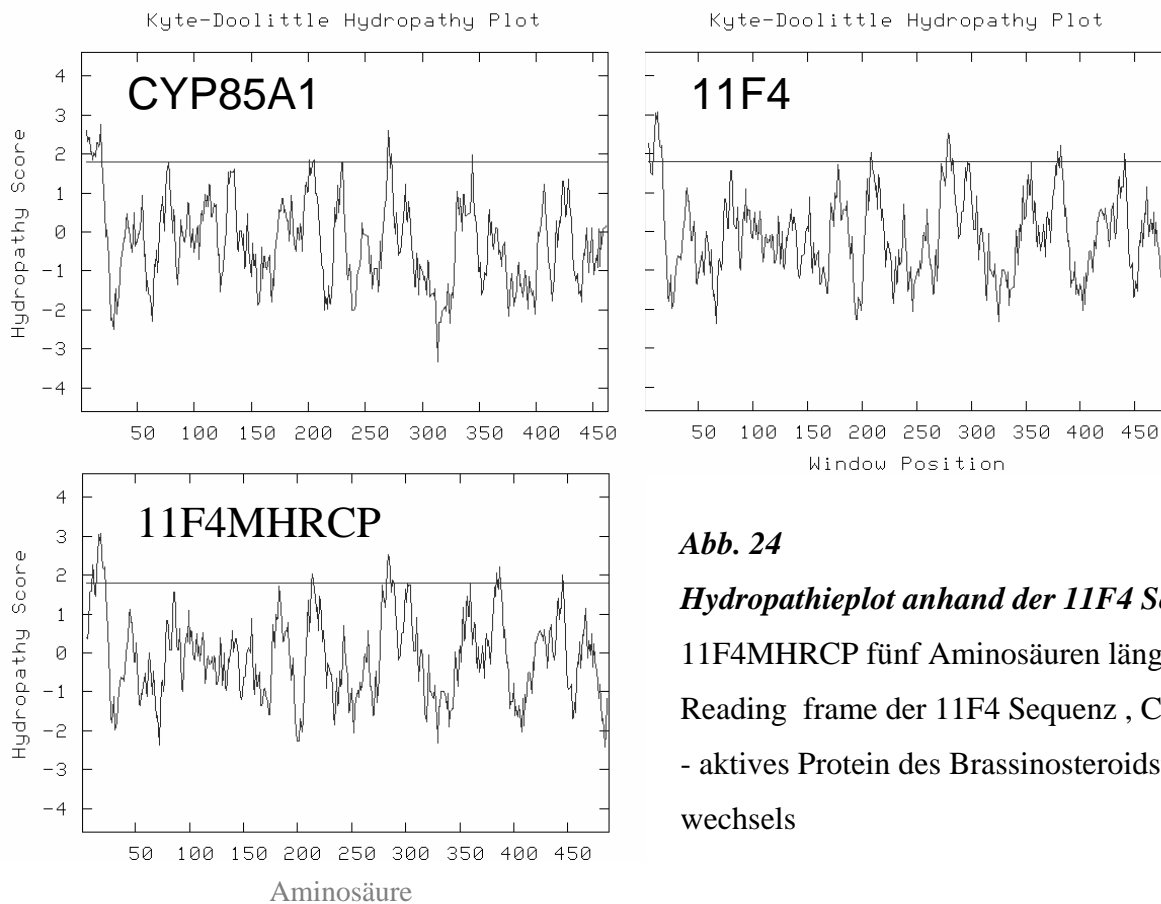
```

Abb. 23  
Nukleotide- und  
Aminosäure-  
sequenz des  
CYP450 cDNA  
Klons 11F4

X in über 75% der  
pflanzlichen  
CYP450  
konserviert  
X hoch  
konservierte  
Aminosäuren in  
allen CYP450

■ absolut  
konserviertes  
Cytosin  
graukursive Schrift  
abweichende  
Aminosäure von  
über 75% der  
pflanzlichen  
CYP450

□  
konservierte  
Domaine

**Abb. 24****Hydropathieplot anhand der 11F4 Sequenz**

11F4MHRCP fünf Aminosäuren längerer Reading frame der 11F4 Sequenz, CYP85A1 - aktives Protein des Brassinosteroidstoffwechsels

Das Protein 11F4 besitzt Homologie zu einem Protein unbekannter Funktion (CYP87A2, 612; 2e-173)\*. Für ein Protein dieser Unterfamilie (CYP87A3) ist eine Induktion durch Licht und Auxin beschrieben wurden (Chaban et al., 2003). Die Proteine mit bekannter Funktion, die die höchste Homologie zur Sequenz 11F4 aufzeigen, sind Enzyme der Steroidbiosynthese, wie die Brassinosteroid-6-Oxidasen von *Vitis vinifera* (ABB60086; 294; 7e-78) und von *Solanum lycopersicum* (CYP85A1; 293; 1e-77) die Steroid-22-alpha-Hydroxylase von *Zinnia elegans* (BAE16979.1; 289; 2e-76) und die Brassinosteroid-C-3-Oxidase von *Hordeum vulgare* (ABK30931; 273; 2e-71). Die Sequenz 11F4 zeigt am Beginn zwei mögliche Startmethionine. Das zweite Methionin wurde als Startkodon für die Überexpression des 11F4 Klones genutzt (s. Abb. 23). Das heterolog exprimierte Protein besteht aus 486 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 53,5 kDa entspricht. Nach SignalP besitzt 11F4 ein Signalankerpeptid innerhalb der ersten 18- bis 23 Aminosäuren\*\*, welches fast vollständig aus einer putative Transmembrandomaine (Aminosäuren 2-24\*\*\*) besteht.

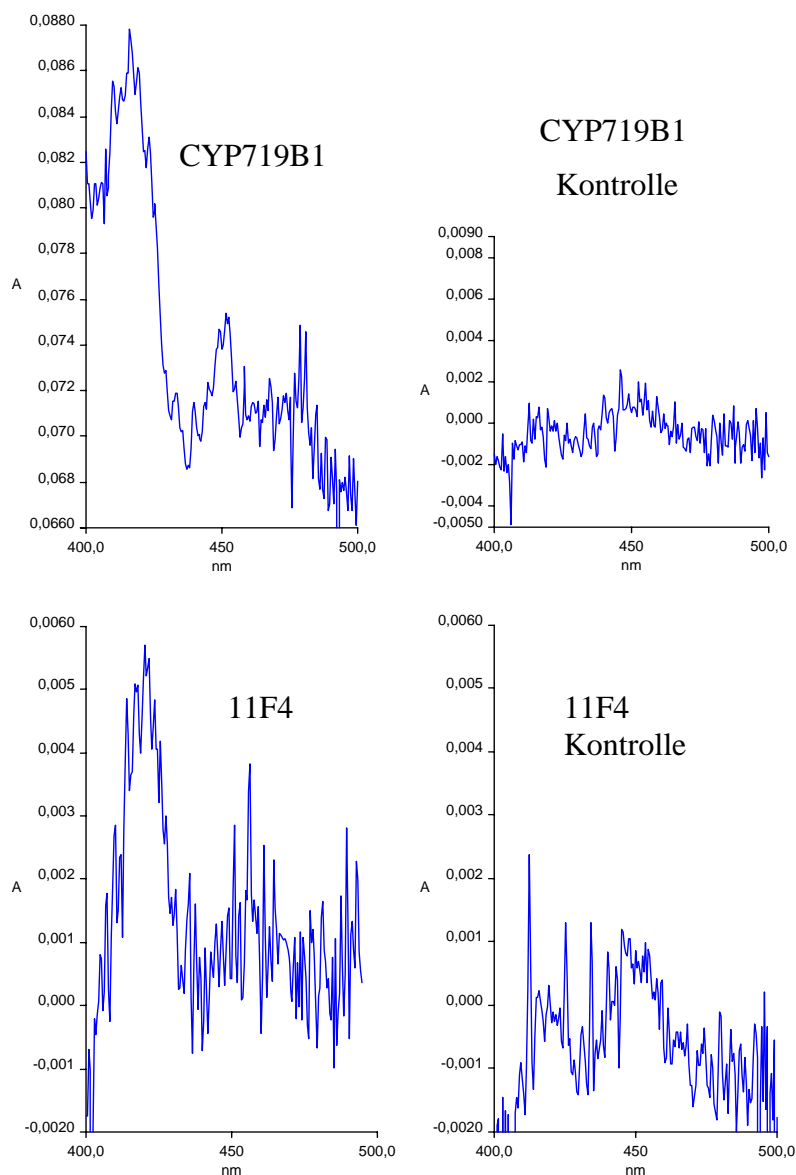
\* (Accession Nummer bzw. Name des CYP450, BlastX Score, BlastX E-Value)

\*\* <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

\*\*\* <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

#### 4. Überexpression von CYP719B1 und dem Klon 11F4

Zur Kontrolle der Überexpression wurden CO-Differenzspektren von reduzierten CYP450 nach der Methode von Omura & Sato (1962) aufgenommen. Eine Absorbtionszunahme bei 450 nm zeigte dabei die korrekte Faltung des Proteins an. Aufgrund der geringen Proteinmengen war dies der einzig mögliche Nachweis der Expression. Abbildung 25 zeigt das CYP719B1 ein deutliches CO-Spektrum aufweist. Es ließ sich ca. 1 nmol des Cyp719B1 pro Liter Zellkultur nativ extrahieren ( $k = 91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Die Absorbtionszunahme bei 450 nm des Proteins 11F4 lag nicht über der der Kontrolle. Ein größerer Peak bei 420 nm zeigte an, dass die Proteinsynthese stattfindet. Wahrscheinlich wurde ein Großteil nichtnativen Proteins extrahiert. Gestet wurde auch die Expression in Hefe. Der Versuch konnte nicht beendet werden, da es ein Start ATG in der MCS des pYEDP60 Vektors gab. Ein daraufhin konstruierter Vektor mit veränderter MCS (s. Anhang 2) wurde aufgrund der erfolgreichen Expression in Insektenzellen nicht weiter verwendet.

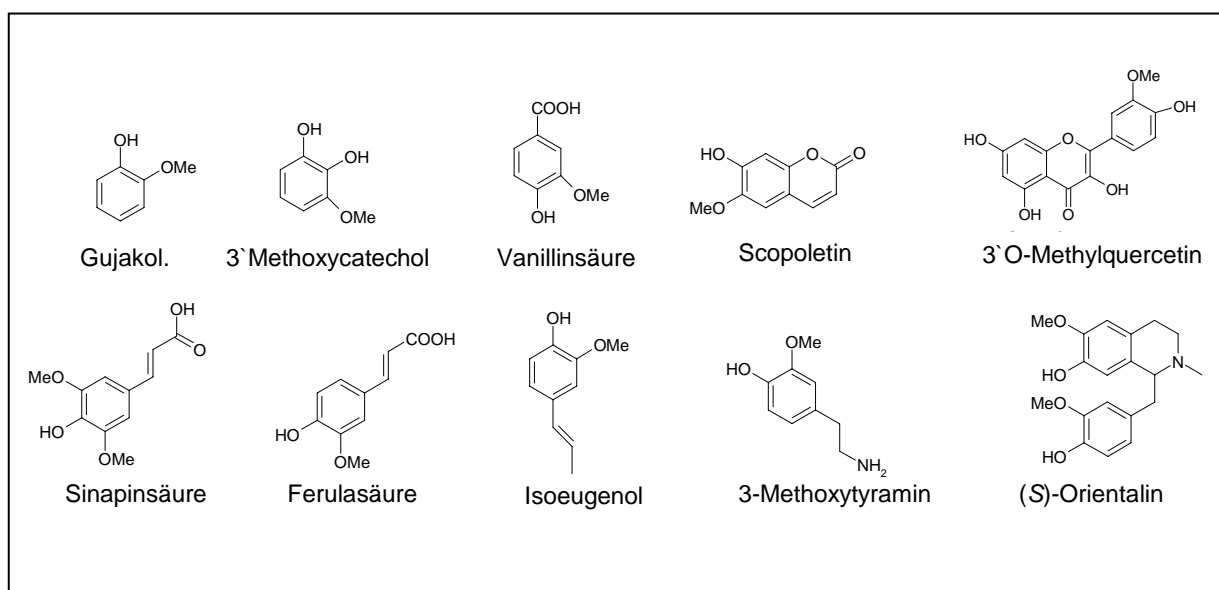


**Abb. 25 CO-Differenzspektren zum Nachweis der Expression nativer CYP450s**

## 4.1. Substratspezifität und Identifizierung des Reaktionsproduktes

	CYP719B1	11F4		CYP719B1	11F4
<b>Alkaloide</b>			<b>Phenylpropanoide /Flavanoide</b>		
Codein	-	-	Ferulasäure	-	-
Thebain	-	-	Sinapinsäure	-	-
Oripavin	-	-	Isoeugenol	-	-
(R)-Retikulin	+	-	3-O-		
(S)-N-Methylcoclaurin	-	-	Methylquercetin	-	-
(S)-Cheilanthifolin	-	-	Naringenin	-	-
(S)-Scoulerin	-	-	Scopoletin	-	-
(S)-Tetracoulumbamin	-	-			
(R) - N-Methylcoclaurin	-	n.	<b>Brassinosteroide</b>		
(S) - Norretikulin,	-	n.	Brassinolid	-	-
R,S - Laudanin,	-	n.	Catasteron	-	-
R,S - 4'-O-Methyl-			24 <i>epi</i> -Brassinolid	-	-
laudanosolin	-	n.	24- <i>epi</i> -Catasteron	-	-
R,S - 3'-Hydroxy-N-			Typhasterol	-	-
methylcoclaurin	-	n.			
R,S- Orientalin	-	n.	<b>einfache Phenole</b>		
R,S-Laudanosolin	-	n.	Gujakol	-	-
Papaverin	-	n.	3' Methoxycatechol	-	-
			Vanillinsäure	-	-
			3-Methoxytyramin	-	-

Tabelle 9 Für die Enzymtests verwendete Substrate



s.nächste Seite

Fortsetzung von Seite 71

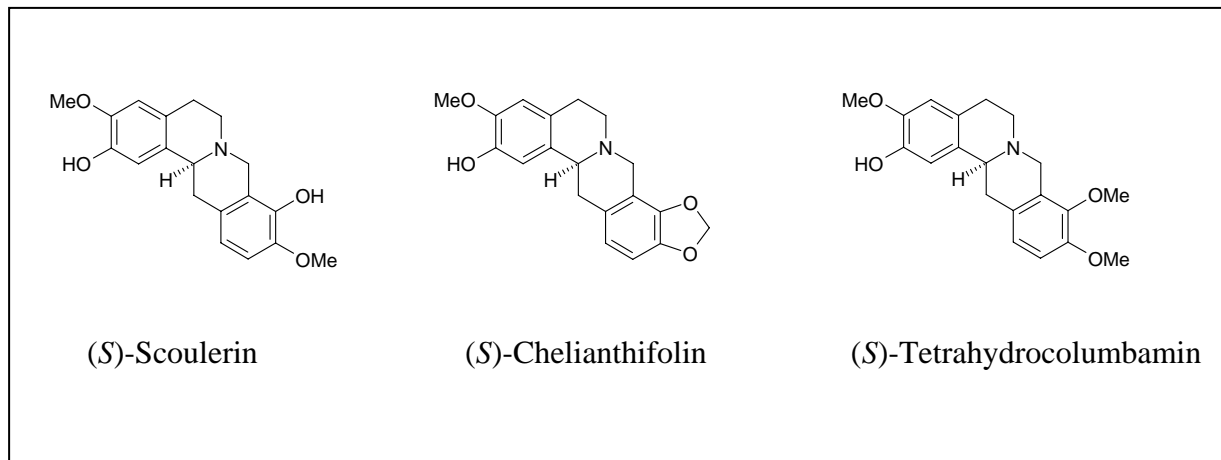


Abb. 26 Substrate für den Test auf Methylenedioxybrückenbildung

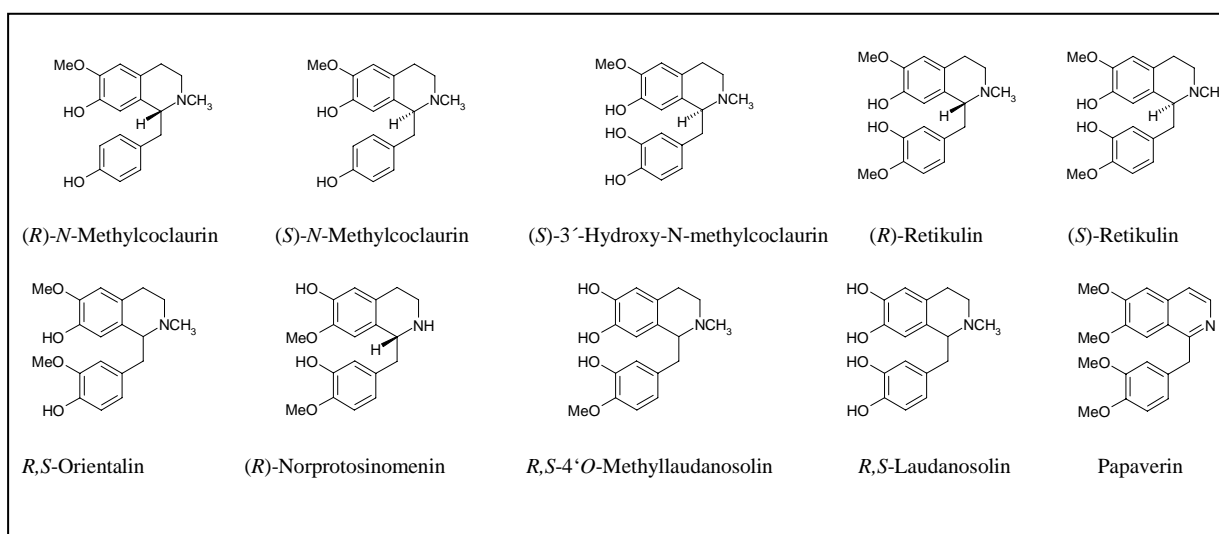
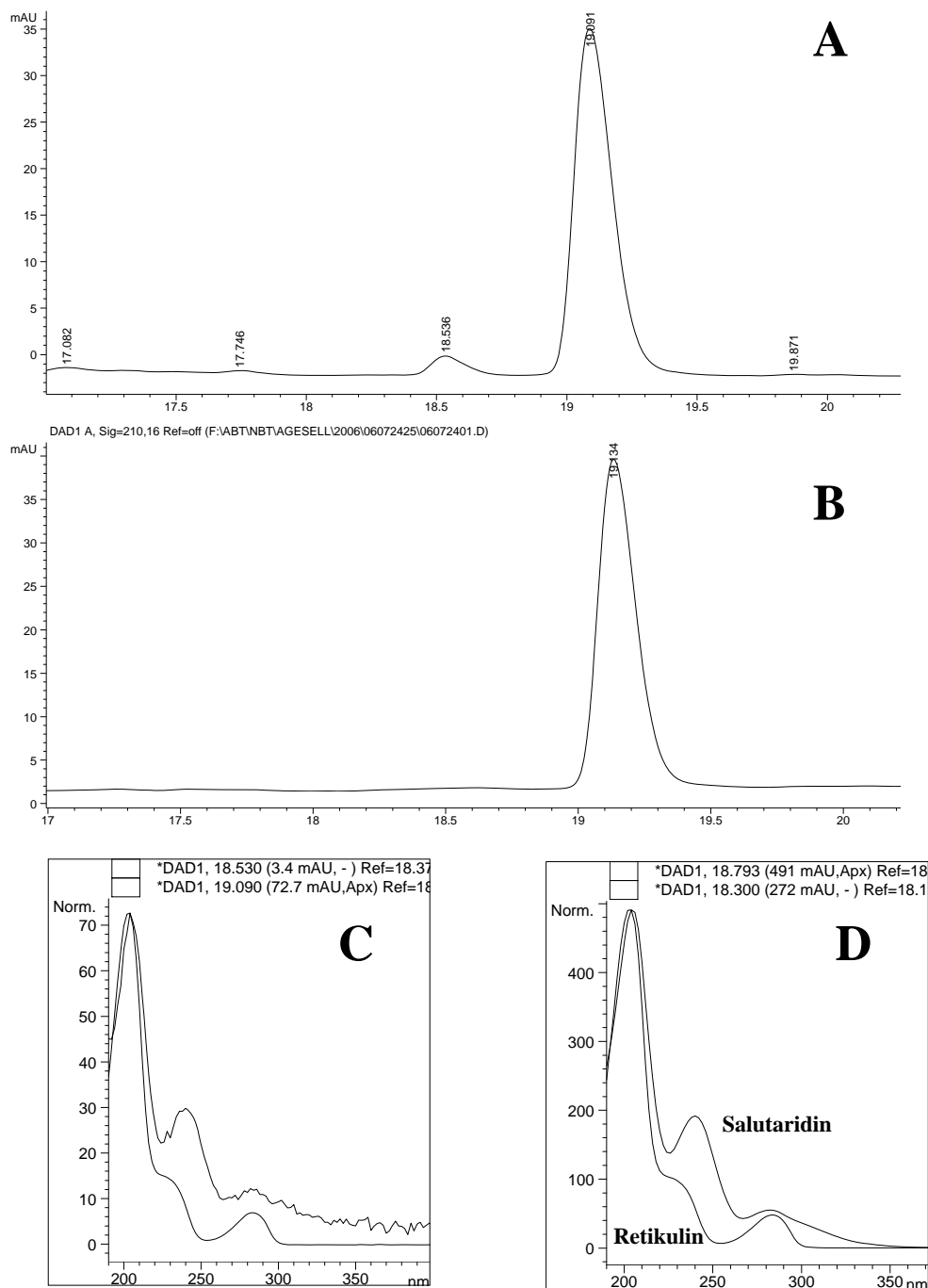


Abb. 27 Substrate für die Untersuchung der Substratspezifität von CYP719B1

Nach der Überexpression der Proteine wurde im hypotonisch aufgeschlossenem Zellpellet, mit den in Tabelle 9, Abbildung 26 und 27 gezeigten Substraten, auf Enzymaktivität getestet (s.III.20.1). Dabei konnte für das CYP719B1 ein Umsatz mit (R)-Retikulin festgestellt werden. Der neu auftretende Peak zeigte Komigration mit Salutaridin und mit diesem ein nahezu identische UV-Spektrum (Abb. 28).



**Abb. 28** (A) HPLC Chromatogramm des Enzymatses von CYP719B1, (B) von nichtinfizierter Kontrollzellen, (C) UV-Spektrum des Enzymatses, (D) UV Spektrum von Salutaridin - - - und Retikulin - - -



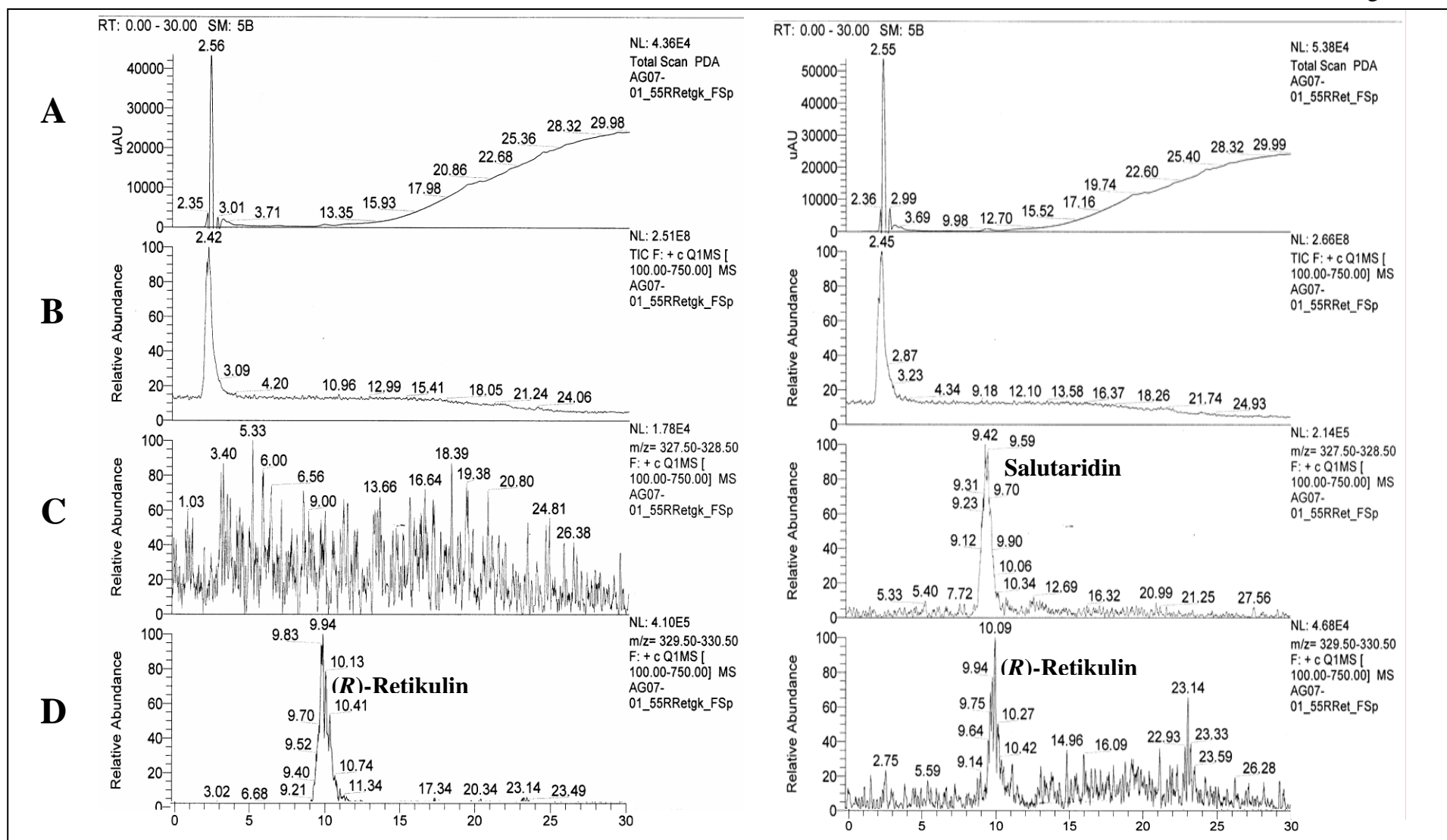
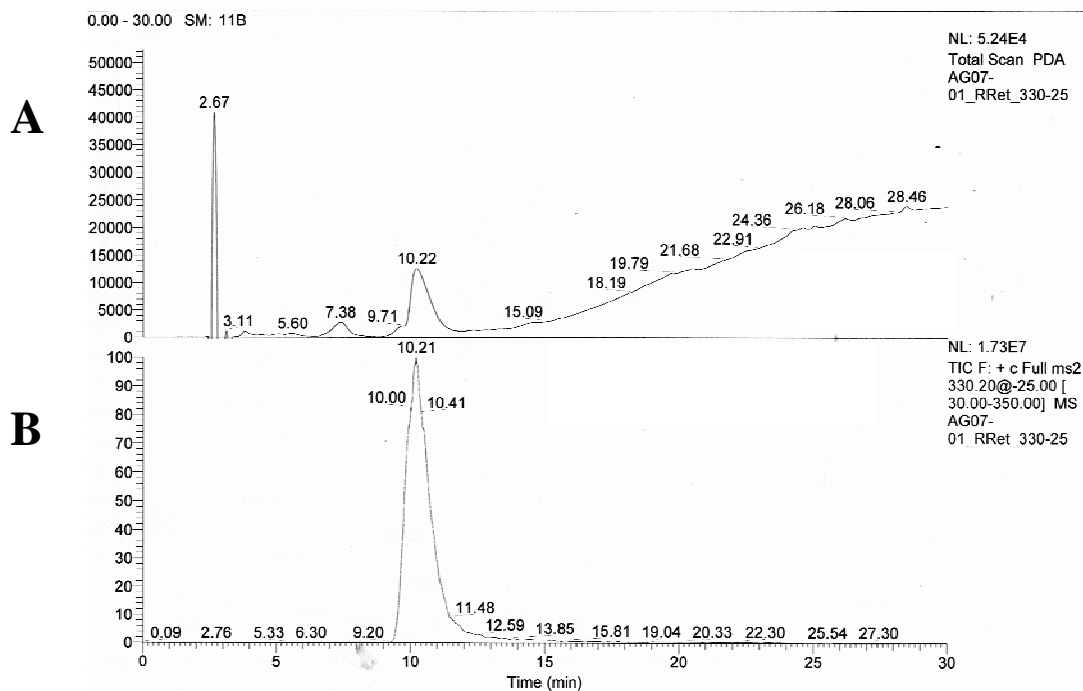
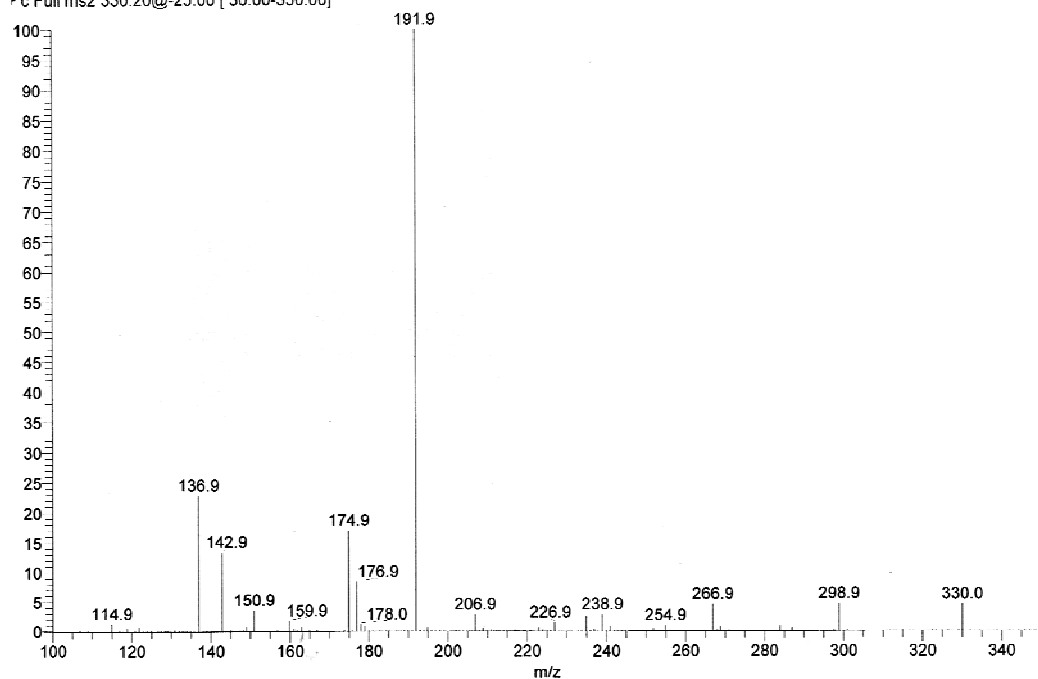


Abb. 29 LC-MS Analyse der Kontrolle (links) und des CYP719B1 Enzymsatz (rechts): (A) UV-Vis Chromatogramm, (B) Total-Ionenchromatogramm, (C) Ionenchromatogramm m/z 328 und (D) Ionenchromatogramm m/z 330

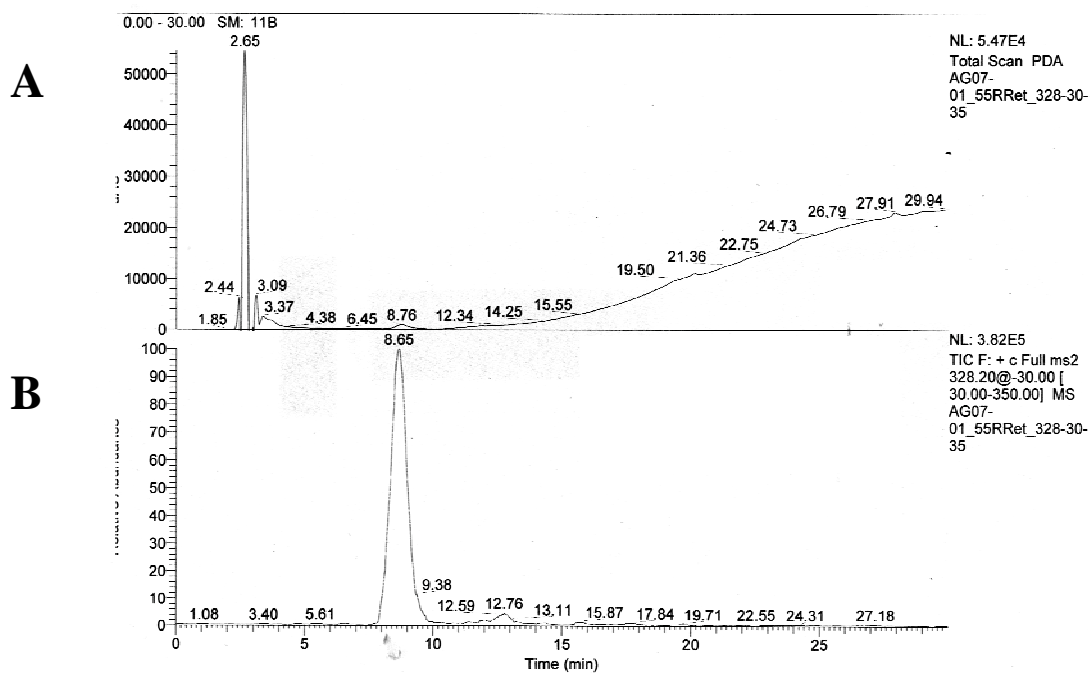
**C**

07-01\_RRet\_330-25 #575-622 RT: 9.93-10.74 AV: 48 SB: 192 7.56-8.96, 12.45-14.34 NL: 6.29E6  
+ c Full ms2 330.20@-25.00 [ 30.00-350.00]



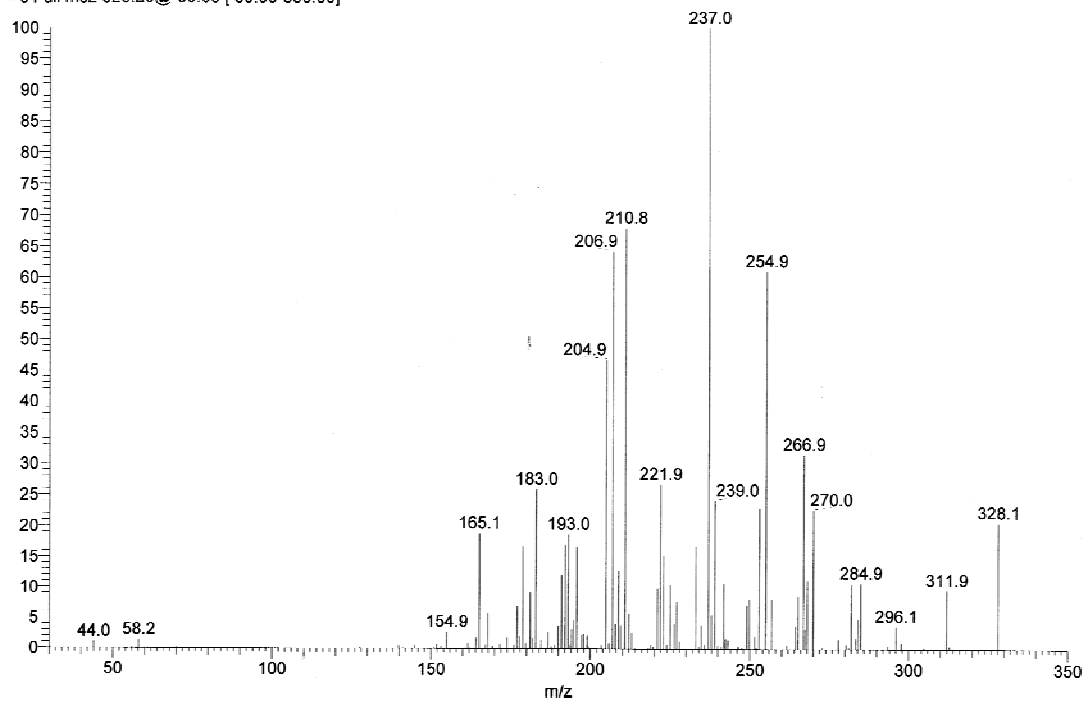
*Abb.30 LC-MS/MS Analyse des Substrates (R)-Retikulin*

**A** UV-VIS- Chromatogramm, **B** – Total-Ionenchromatogramm,  
**C** 25 eV CID Massenspektrum erhalten mit dem TSQ Quantum



**C**

07-01\_55RRet\_328-30-35 #480-522 RT: 8.30-9.00 AV: 21 SB: 26 7.27-7.56, 9.81-10.40 NL: 3.38E4  
+ c Full ms2 328.20@-30.00 [30.00-350.00]

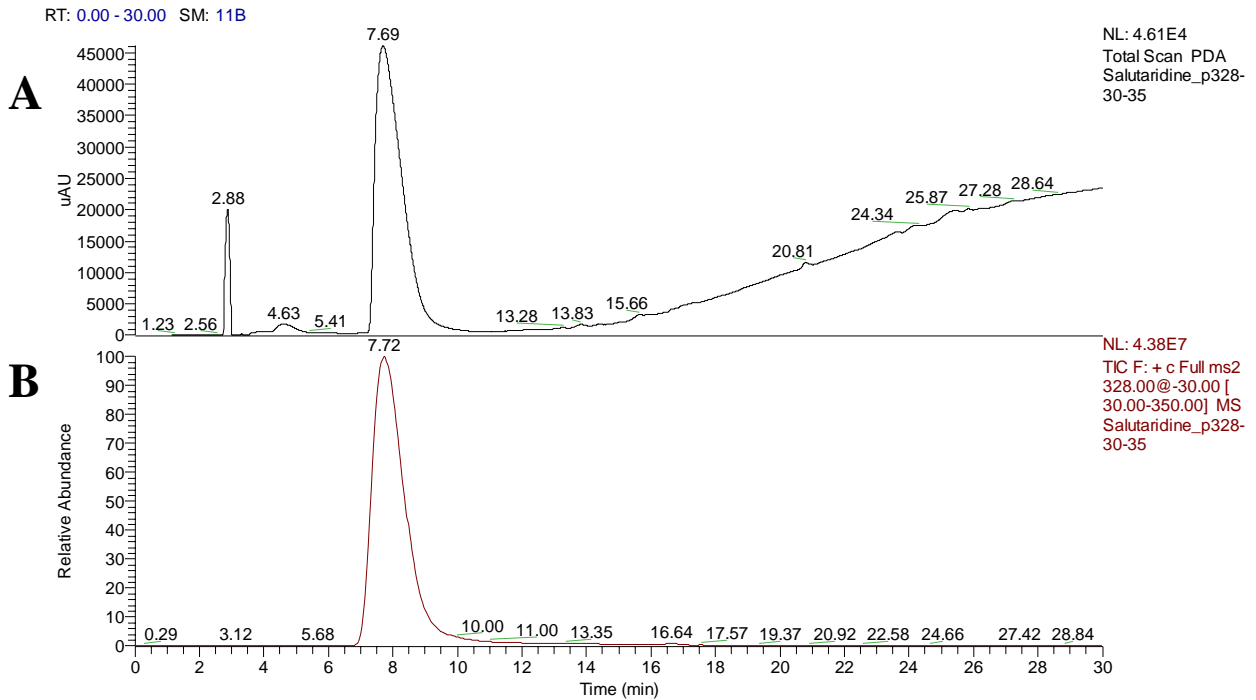


**Abb.31 LC-MS/MS Analyse des Produktes Salutaridin**

A UV-VIS- Chromatogramm, B – Total-Ionenchromatogramm,  
C- 30 eV CID Massenspektrum erhalten mit dem TSQ Quantum

E:\Gesell\Salutaridine\_p328-30-35

8/3/2006 2:16:32 PM

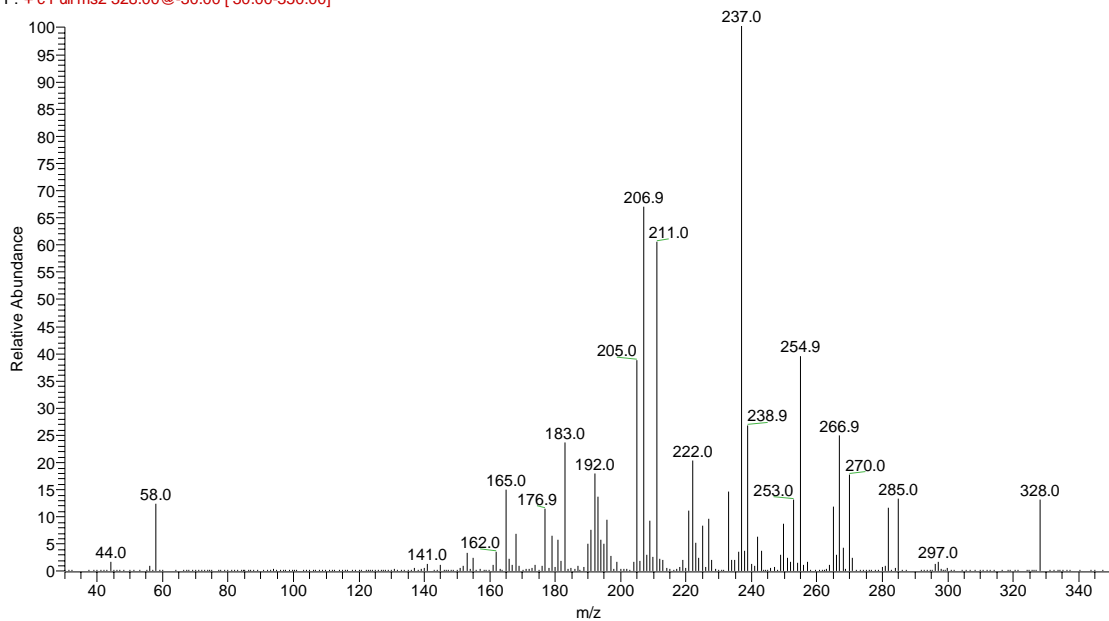


C

E:\Gesell\Salutaridine\_p328-30-35

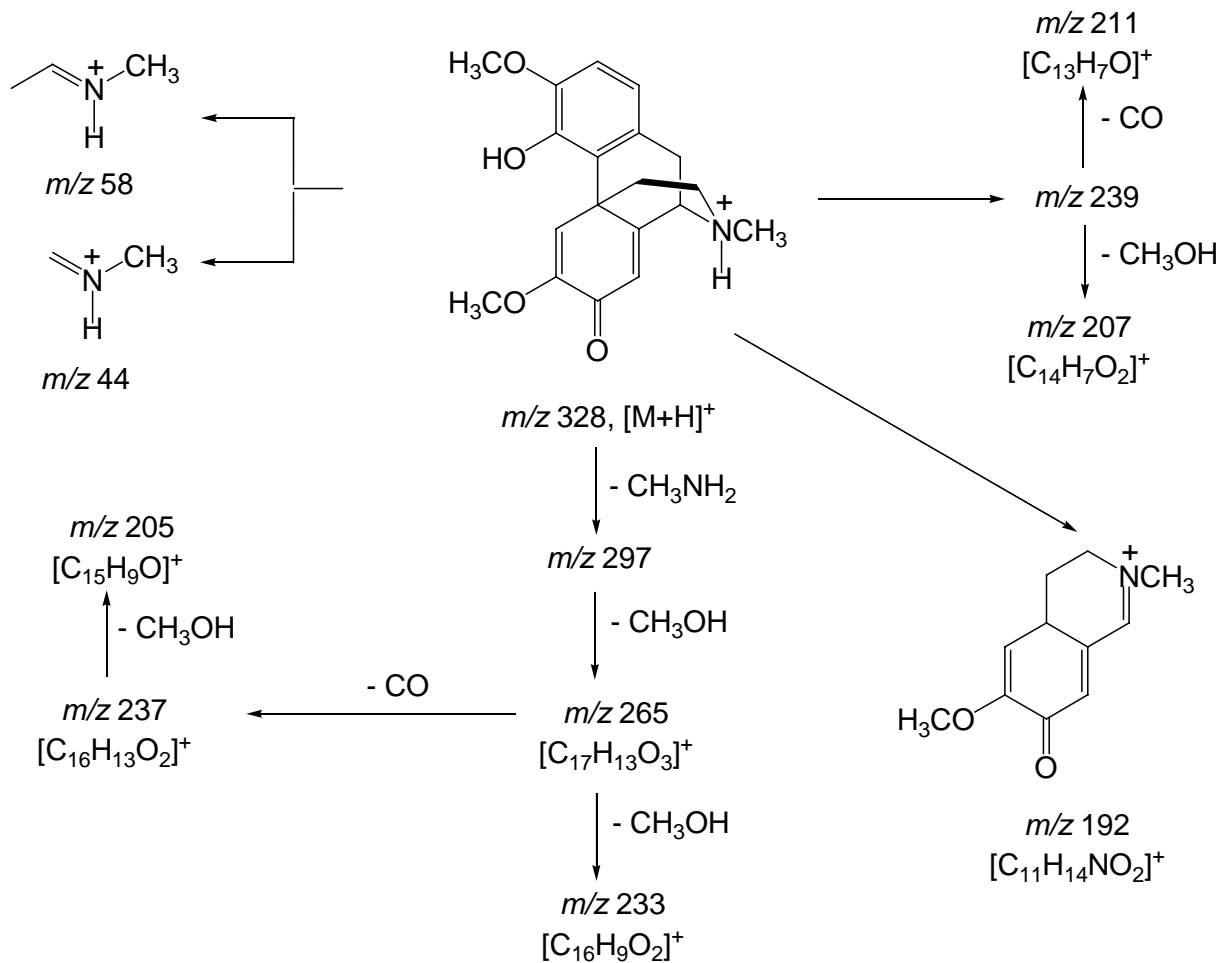
8/3/2006 2:16:32 PM

Salutaridine\_p328-30-35 #425-479 RT: 7.34-8.27 AV: 28 SB: 34 6.02-6.44 , 10.79-11.50 NL: 4.76E6  
F: + c Full ms2 328.00@-30.00 [30.00-350.00]



**Abb. 32 LC-MS/MS Analyse der Salutaridin - Kontrollsubstanz**

**A** UV-VIS- Chromatogramm, **B** – Total-Ionenchromatogramm,  
**C**- 30 eV CID Massenspektrum erhalten mit dem TSQ Quantum

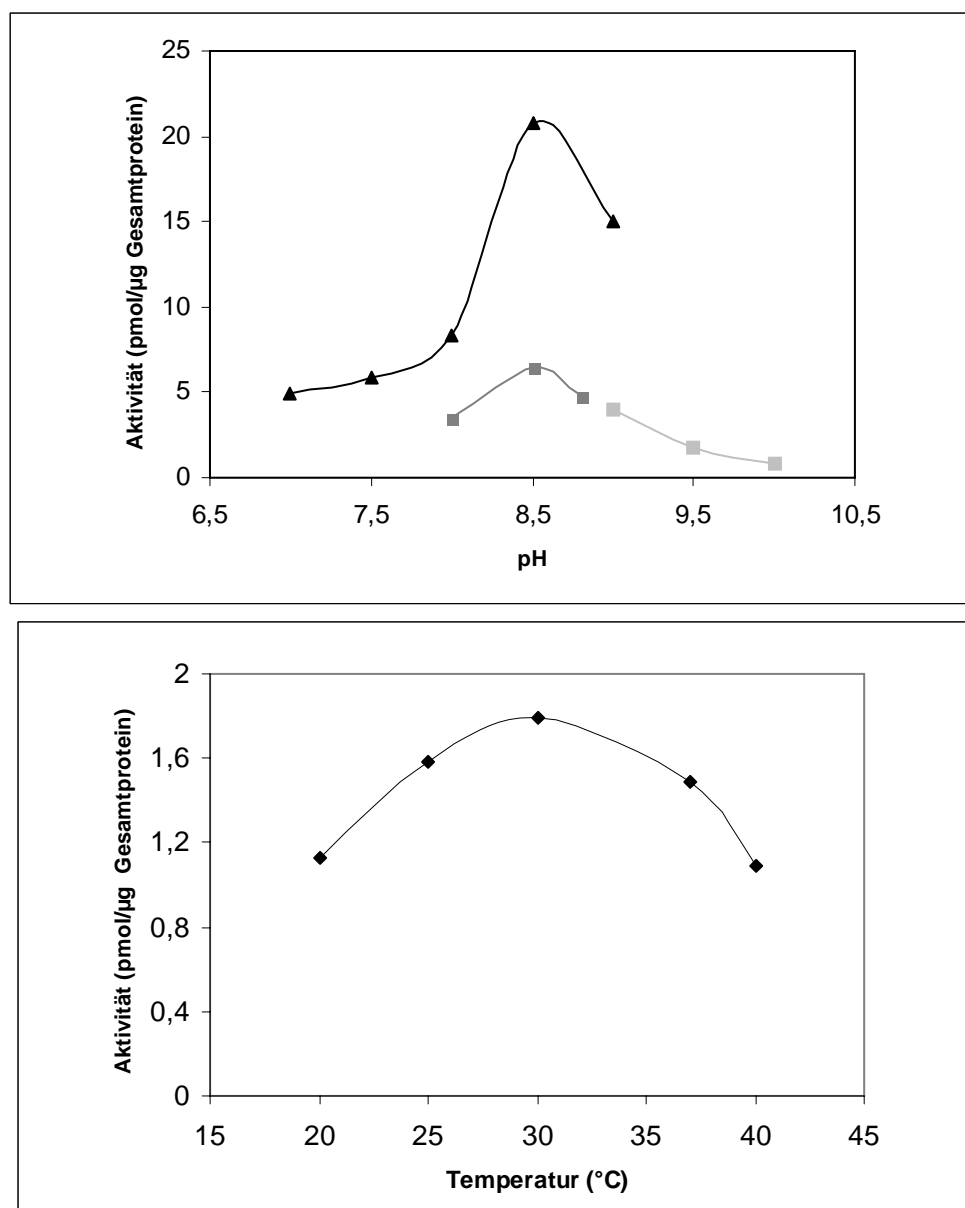


**Abb.33. Massenspektrometrische Fragmentierung von Salutaridin unter ESI-CID-Bedingungen** (nach Raith *et al.*, 2003)

Nach teilweiser Aufreinigung des Peaks mittels HPLC (s.III.21) erfolgten LC-MS/MS Messungen (s. Abb. 29, 30 und 31), welche einen Stoffumsatz im Enzymansatz zeigten. Das LC-MS/MS Fragmentierungsmuster des Produktes zeigt das protonierte Molekularion  $[M+H]^+$  von 328  $m/z$  sowie die charakteristische Hauptmasse des Fragmentations von 237  $m/z$ , was für Salutaridin als Produkt sprach (s. Abb 31). Da das Fragmentierungsmuster identisch zum Spektrum der Vergleichsubstanz Salutaridin ist (s. Abb 31 und Abb 32), kodiert CYP719B1 für das Enzym Salutaridinsynthase. Die Fragmentierung des Salutaridins weicht in den Intensitäten von den publizierten Daten ab (s. Abb 33 und Raith *et al.*, 2003). Dies ist auf Messungen mit unterschiedlichen Massenspektrometern zurückzuführen (TSQ Quantum und TSQ 7000). Es gab keine Hinweise auf mögliche Nebenprodukte wie Scoulerin, Isoboldin, Corytuberin oder Dehydroretikuliniumion, welche teilweise (Dehydroretikuliniumion und Scoulerin) als Verunreinigungen des Substrates detektiert wurden.

## 5. Charakterisierung des CYP719B1

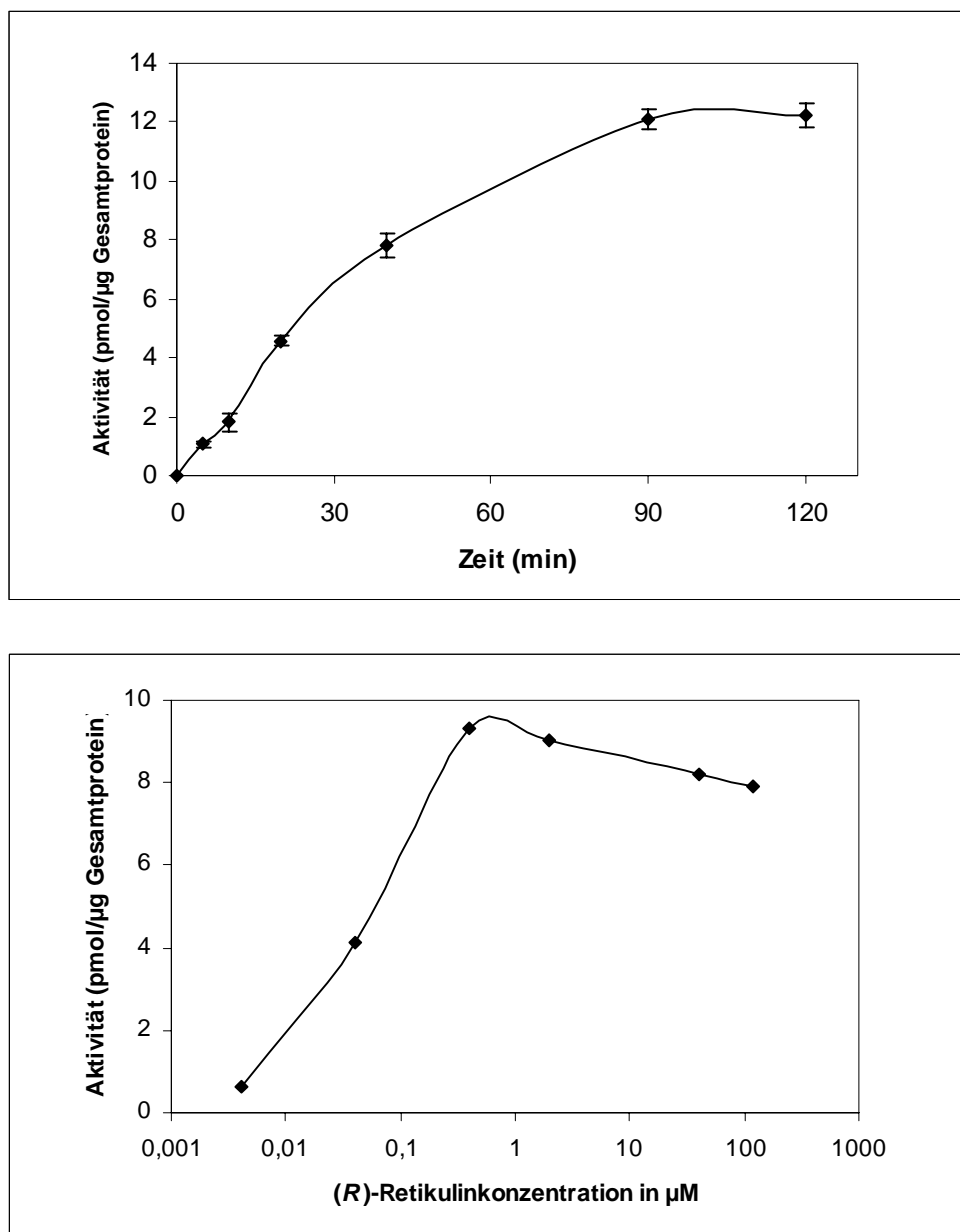
### 5.1. Temperatur, pH Optimum



**Abb. 34** pH - und Temperaturoptimum der Salutaridinsynthase

Das rekombinante Enzym zeigt ein pH Optimum von pH 8,5 sowie ein Temperaturoptimum bei einem pH von 7,5 in Tricinpuffer von 30°C (s.Abb. 34). Die Bestimmungen erfolgten nach 20 min Reaktionszeit. Verlängerte man die Inkubation auf eine Stunde, so verschob sich das Temperaturoptimum auf einen Wert zwischen 20°C und 25°C. Außerdem ergab sich ein breiteres pH Optimum zwischen pH 7 und pH 8. Dies entspricht den für die gereinigte Salutaridinsynthase bestimmten Werten (Gerardy & Zenk 1992).

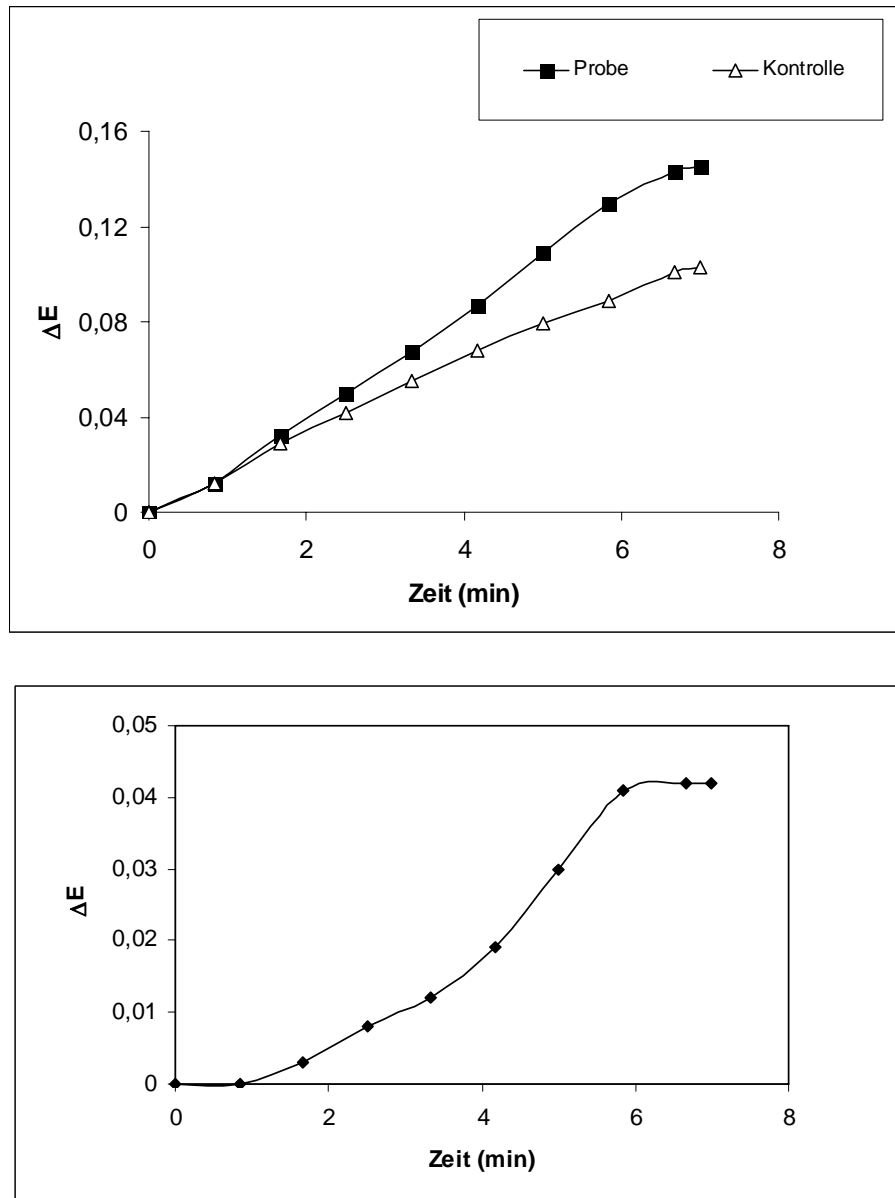
## 5.2. Zeitabhängigkeit und Substratabhängigkeit



**Abb. 35 Zeitabhängigkeit und Abhängigkeit der Reaktion von der (R)-Retikulinkonzentration**

Die halbmaximale Aktivität der Salutaridinsynthesepräparation lag bei ca. 25 min (s. Abb. 35). Der  $K_m$  Wert ist im Bereich von 100 nM zu erwarten (s. Abb. 35). Dies spricht für eine strikte Substraterkennung, ähnlich den rekombinanten methylenedioxybrückenbildenden Enzymen der CYP719 Familie (Ikezawa *et al.*, 2006, 2007). Der  $K_m$  Wert ist hingegen um ca. zwei Potenzen niedriger als der  $K_m$  Wert des gereinigten Enzyms (Gerardy & Zenk 1992).

### 5.3. Aktivität der Cytochrom-P450-Reduktase in den CYP450-Reaktionen



**Abb. 36** *Aktivität der Cytochrom-P450-Reduktase im Vergleich zur Kontrolle, untere Darstellung: hintergrundkorrigierte Kurve*

Zur Überprüfung der erfolgreichen Koexpression wurde die CPR Aktivität, wie unter III.20.2 beschrieben, bestimmt. Sie war gleichzeitig ein Nachweis für die erfolgreiche Proteinexpression in der jeweiligen *Sf-9* Charge.



## 6. (S) – Tetrahydroprotoberberinoxidase

### 6.1. cDNA Volllängeisolierung der (S) – Tetrahydroprotoberberinoxidase

Ausgehend von einer kurzen Nukleotidsequenz, die aus der Peptidsequenz des gereinigten Enzyms (Christian Böttcher, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zenk, Biozentrum Halle) durch PCR mit degenerierten Primern gewonnen wurde (Christin Richter Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kutchan), konnte über das RACE Protokoll von BD Bioscience eine Vollängesequenz mit der höchsten Homologie zur Tetrahydrocannabinoidsynthase isoliert werden. Die dafür verwendeten Primer sind in Abb. 37 gezeigt.

STOXf1	AGACAATGTCCATGAAG
STOXf2	GCCTCAGTATGCGCTCCGTAATCATCAGTCCAAAAGGAG
STOXr1	CTAAGTGATGCGTCG
STOXr2	GATCCAACTCATTTTCGATACAGTCATGGGGCTTTACTCCC
STOXr3	CTAGTTTGTTCGGAACCACCAAGGAAAAGGCC
STOXr4	GTTTGGGGGTGGTGGGTGACAGGAATACAAG

**Abb. 37 RACE Primer zur Volllängeisolierung der (S)-Tetrahydroberberinoxidase**

Im Sequenzvergleich zeigt das Protein die an der FAD Bindung in bivalent bindenden Oxygenasen beteiligten Aminosäuren Histidin (H109) und Cytosin (C171). Die cDNA kodiert für 530 Aminosäuren, somit für ein Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 59,0 kDa. Das Protein enthält ein Signalpeptid, dessen Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 23-24 liegt und damit um fünf Aminosäuren länger ist als das des Berberinbrückenzyms (BBE). Dies entspricht den Erwartungen, da sowohl BBE als auch die (S)-Tetrahydroprotoberberinoxidase (STOX) in elektronendichten Vesikeln und im Tonoplasten lokalisiert werden konnten (Bock *et al.*, 2002).

### 6.2. Überexpression und Aktivitätsnachweis der (S) - Tetrahydroprotoberberinoxidase

Ebenfalls wie für die CYP450 konnte die Expression des STOX Proteins nicht auf einem Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Ein His-getagtes Konstrukt zeigte ein schwaches Signal im Zellpellet an. Aufgrund ausbleibender Aktivität nach Zellaufschluß und des einfach farblich detektierbaren Enzymumsatzes wurde versucht, in einem *in vivo* Assay die Aktivität zu bestimmen. Dafür wurden 24 h nach Infektion der pH Wert des Zellmediums auf pH 7,5 eingestellt sowie Proteinaseinhibitoren und Substrat zugesetzt (vgl. III.20.3). Eine wiederholte Inhibitorzugabe führte zum Ausbleiben der Enzymreaktion.

- ähnliche Aminosäuren zur putativen, konservierten Zuckerbindungsstelle der Hexose-, Glukose- und Zuckeralkoholoxidasen
- davon abweichende Aminosäuren
- Aminosäuren der kovalenten FAD Bindung des Berberinbrückenzyms
- Aminosäuren bzw. Domänen, die die FAD Bindungsstelle in den Zuckeroxidasen begrenzen

```

1   ATG AGT AAA ATG GCT TCT TCA ATC TTT GCA ACA TTT TCA CTA CTT TCT TCG TTG TTG CCA ACA TCA TTG GCA TCT TCG GAT GCA AAT TAT
1   M S K M A S S I F A T F S L L S S L L P T S L A S S D A N Y
91  GAA GAC TTT CTC CAA TGC CTA GAT CTC TAT TCT CAA AAT TCC AIT CCA GTT TAC ACC CGA AAC ACT TCT TCC TAT ACA TCC ATC TTG GAG
31  E D F L Q C L D L Y S Q N S I P V Y T R N T S S Y T S I L E
81  TCG ACA ATA AAA AAC CTT GTA TTC CTG TCA CCC ACC ACC CCC AAA CCA AAC TTC AIT GTC ACA CCC ATG CAA GAA TCC CAT GTC CAA ACA
61  S T I K N L V F L S P T T P K P N F I V T P M Q E S H V Q T
271 TCT GTA AIT TGT TGC AGA ATG CAT GGA CTG CAA ATG AGA AIT CGA AGT GGA GGT CAT GAT TTC GAA GGC CTA TCT TAT GTA TCA AAT GIG
91  S V I C C R M H G L Q M R I R S G G F D F E G L S Y V S N V
361 CCA TTT GAT GTC CTT GAT TTG ATA CAT CTT AAA ACA ATA AAT GAT GAT AIT GAA GAA AAC AGT GCT TGG GAT CAA ACA GGT GCT ACA AIT
121 P F V V L D L I H L K T I N V D I E E N S A W V Q T G A T I
451 GGC GAA CTT TAT TAT AGG AIT GCT GAA AAA GTA GGG GAT CAT GCA TTT CCA GCA GGG TTG TGC CCT ACT GTA GGG GAT GGT GGG CAC ATC
151 G E L Y Y R I A E K V G V H A F P A G L C P T V G V G G H I
541 AGT GGC GCT GGA TAT GGT GTG TTG ATG CGT AAA TAC GGC GTA TCA GCT GAC CAT GTC AIT GAT GCA CGT ATA GTG AAT GAT GAT GGA GAA
181 S G A G Y G V L M R K Y G V S A D H V I D A R I V N V D G E
631 AIT CTG GAT AGA GAG TCC ATG GGT GAA GAT CTT TTT TGG GCC ATC AGA GGT GGT GGA GGG GCT AGT TTT GGA GTG ATC CTC GCA TGG AAA
211 I L D R E S M G E D L F W A I R G G G G A S F G V I L A W K
721 ATA CGA TTG GAT CCT GAT CCA CCT ACC GIG ACT ATC TTC ATA GTC CCC AAA ACC TTG GAA GAA GGT GCC ACT GCT CTT CTT CAT AAG TGG
241 I R L V P V P P T V T I F I V P K T L E E G A T A L L H K W
811 CAG TTT AIT GGA GAC AAT GTC CAT GAA GAT CTT TTC AIT GGC CTC AGT ATG CGC TCC GTA ATC ATC AGT CCA AAA GGA GAT AAA ACA ATA
271 Q F I G D N V H E D L F I E L S M R S V I I S P K G D K T I
901 CTA GTT TCA TTC ATA GGC CTT TTC CTT GGT GGT TCC GAC AAA CTA GTT CAA CAC ATG GAA CAA AGC TTT CCT GAA TTG GGA GTA AAG CCC
301 L V S F I G L F L G G S D K L V Q H M E Q S F P E L G V K P
991 CAT GAC TGT AIC GAA ATG AGT TGG ATC AAA TCC ACC GTG GAT TTT GGA GTT TTC TCC AAC GAC GCA TCA CTT AGT GTG TTA CTA GAC AGG
331 H D C I E M S W I K S T V V F G V F S N D A S L S V L L D R
1081 AAG AAC CCA TTC CCA CCA AAA AGT TAC CAC AAG GTA AAA TCT GAT TAT GTG ACA GAA CCC CTC CCA ATA TCT GTA TTG GAA GGG ATA TGC
361 K N P F P P K S Y H K V K S D Y V T E P L P I S V L E G I C
1171 CAT AGG TTT CTG AAA AAT GGA GTC AAT AAG GCT GAG AIT AIC ATG AGT CCC TAC GGT GGA AGG ATG AAT GAA AIT TCA GAG TCC GAA AIT
391 H R F L K N G V N K A E I I M S P Y G G R M N E I S E S E I
1261 GCT TTC CCA CAT AGA AAA GGA AAC CTT TAT AAG ATC AAC TAT ATA GCA GAA TGG GAA GAA GCA GGG AGC ATG GAA AAT CAT TTA AGC TGG
421 A F P H R K G N L Y K I N Y I A E W E E A G S M E N H L S W
1351 AIT AGA GAG CTA TAC AGG TAC ATG ACT CCT TAT GTA TCA AAG TCT CCG AGG TCT TCA TAT CTC AAC TTC AAG GAT ATC GAT TTG GGT CAG
451 I R E L Y R Y M T P Y V S K S P R S S Y L N F K D I D L G Q
1441 ACT AAA AAT GGC ACG GCA ACC TAC TCA CAA GCT AAG GCT TGG GGT AGT AAG TAC TTC AAG AAT AAC TTC AAA AGA TTG ATG CAA GTG AAG
481 T K N G T A T Y S Q A K A W G S K Y F K N N F K R L M Q V K
1531 ACC AAG GAT GAT CCA AAC AAT TTC TTC TGT AAT GAA CAA GGC AIT CCA CCT TTT TCA TCG TAG
511 T K V D P N N F F C N E Q G I P P F S S *

```

Abb. 38 (S) – Tetrahydroprotoberberinoxidase Vollängesequenz

Es wurden drei verschiedene Konstrukte getestet, ein STOX-Konstrukt im pVL1393Vektor, ein Konstrukt mit Exkretionssignal im pACGP67A Vektor und ein Konstrukt, dass durch das Bac-to-Bac™ System erhalten wurde und einen sechsfachen c-terminalen His-Tag enthielt (s. III 15.1). Für alle Konstrukte konnte mit Scoulerin Aktivität festgestellt werden. Sowohl der Ansatz mit dem pACGP67A Konstrukt als auch der des 6xHis Konstruktes führten zu einer Färbung des Mediums. Im Ansatz des pVL1393-Konstruktes färbte sich nicht das Medium, sondern nur leicht die Zellen. Aktivität wurde auch mit Canadin und Tetrahydropalmin gemessen. Im Gegensatz zum gereinigten Enzym konnte keine Aktivität mit Coreximim festgestellt werden. Ein Fehler im Versuchsansatz konnte ausgeschlossen werden, da in parallelen Versuche ein Umsatz von Coreximim durch ein STOX-Homologes von *Argemone mexicana* detektiert werden konnte (s. Amann *et al.*, 1988 u. unveröffentlichte Daten M.Sc. Díaz-Chávez).



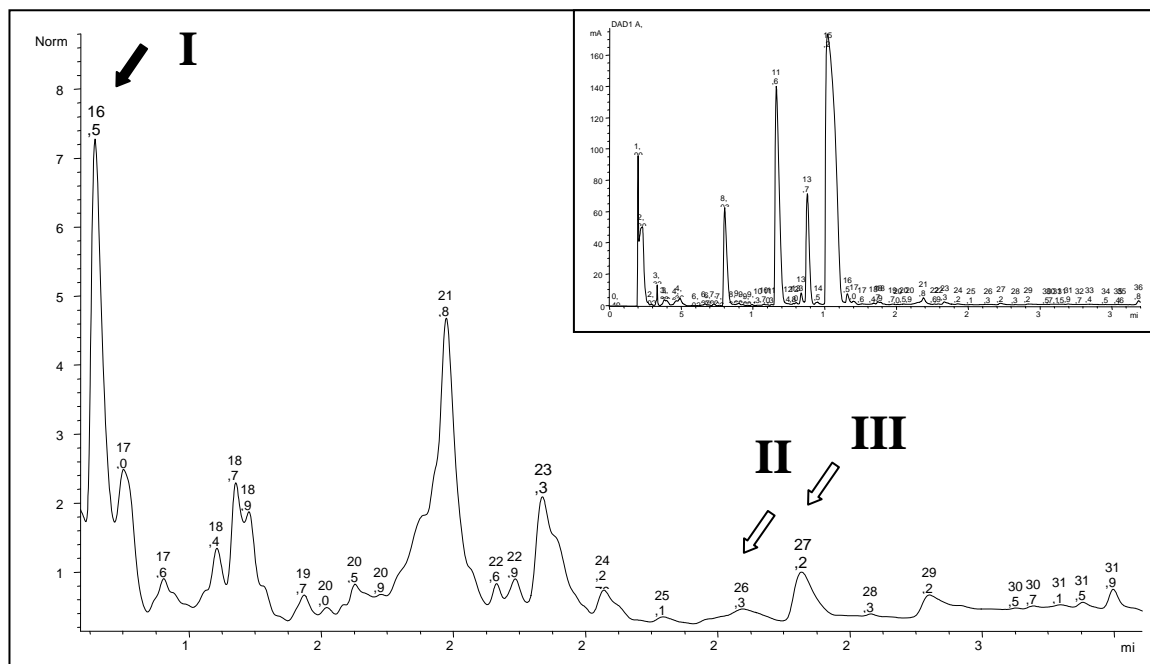
**Abb. 39 In vivo Assay für rekombinante (S)-Tetrahydroprotoberberinoxidase**

von links STOX Scoulerin-Kontrolle, Scoulerin+STOX Tetrahydropalmin+STOX,

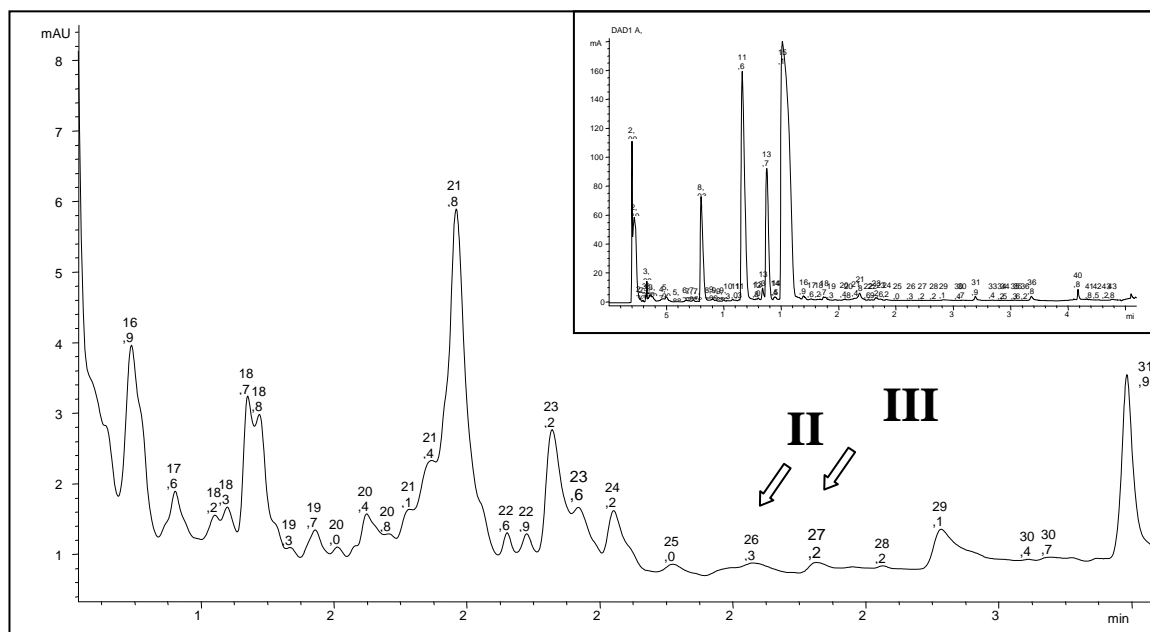
Tetrahydropalmin Kontrolle *obere Reihe*: ACGP67A Konstrukt *untere Reihe*: 6xHis Konstrukt

Die Produkte wurden mit Butanol extrahiert (s.III.20.3) und über HPLC bzw. LC-MS bestimmt (s.III.21.1 und 2). Dabei zeigte sich das die Zellen Scoulerin verstoffwechseln können. Dabei entsteht ein Tetradehydroderivate (s.Abb. 41 und 42 **II**) und ein wahrscheinlich methyliertes Dehydroderivat (s.Abb. 41 und 42 **III**). Unabhängig davon konnte ein weiteres Produkt identifiziert werden, welches nur in den Assays mit rekombinanten Protein vorkam (s.Abb. 40 bis 42 **I**). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um

ein glykosyliertes Tetradehydroscoulerin. Palmatin und Berberin konnten als Produkte der STOX-Enzymreaktion mit (*S*)-Canadin bzw. Tetrahydropalmatin mittels LC-MS und HPLC anhand von Referenzsubstanzen nachgewiesen werden (Abb. 43). Berberin entstand auch in nicht infizierten Zellen, aber in wesentlich geringerem Ausmaß (42% Umsatz gegenüber 3% Umsatz; s. Abb. 43). Die isolierte STOX-Sequenz kodiert demnach für eine (*S*)-Tetrahydroberberinoxidase.



**STOX-Enzymumsatz Scoulerin**



**Kontrolle**

**Abb. 40 UV Chromatogramme der aus Scoulerin im *in vivo* Assay entstehenden Produkte**

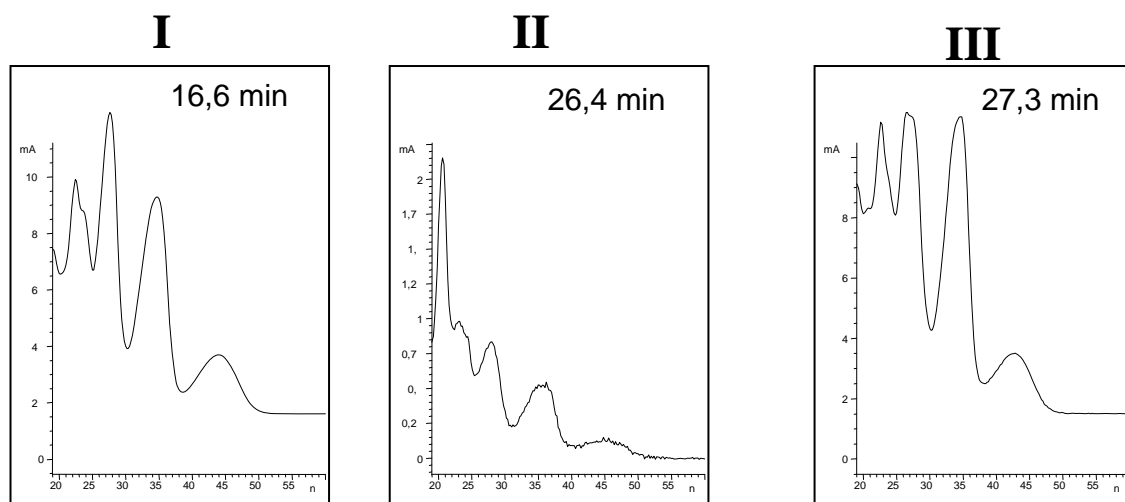


Abb. 41 UV-Spektren der Produkte (I-III) die aus Scoulerin im *in vivo* Assay entstehen

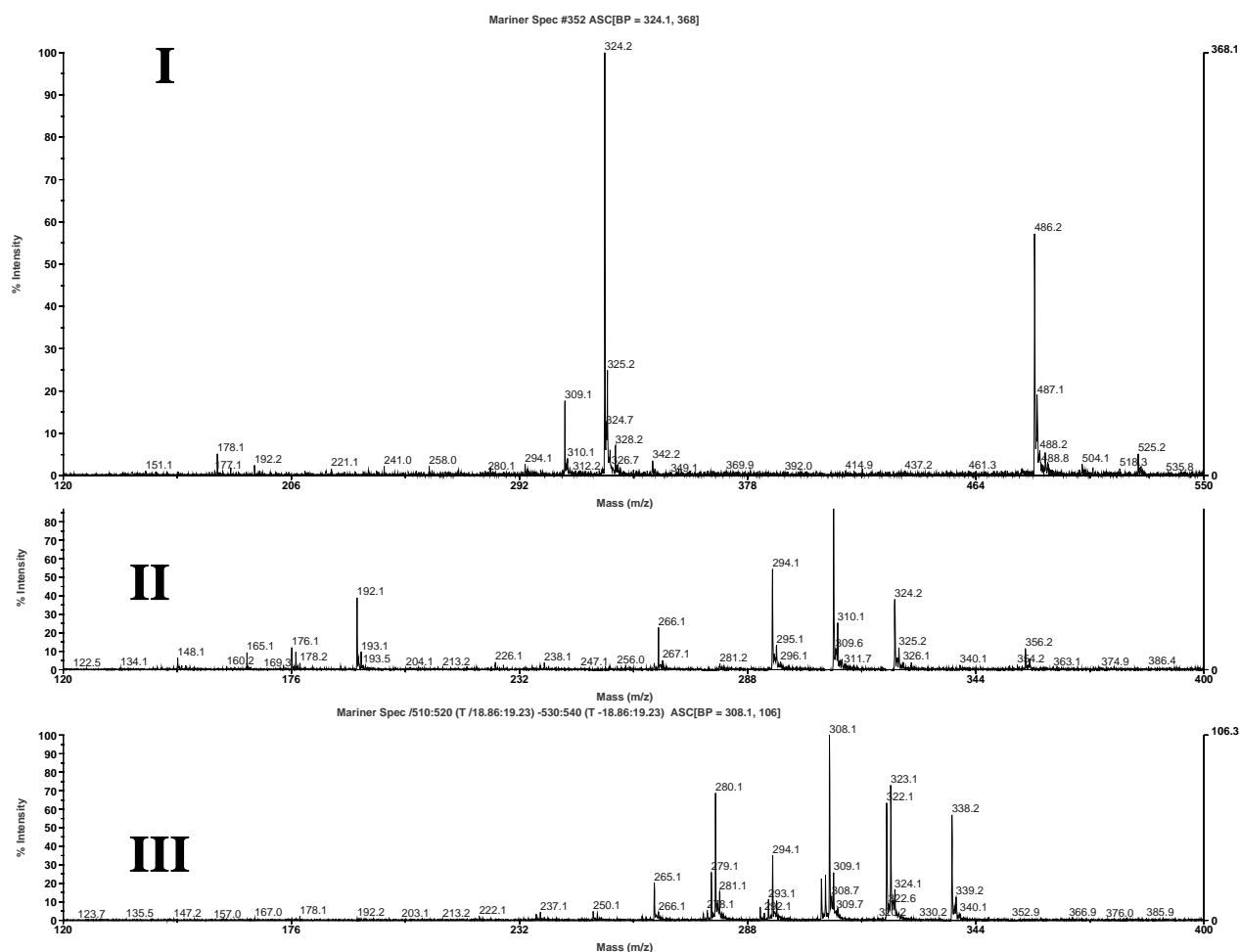
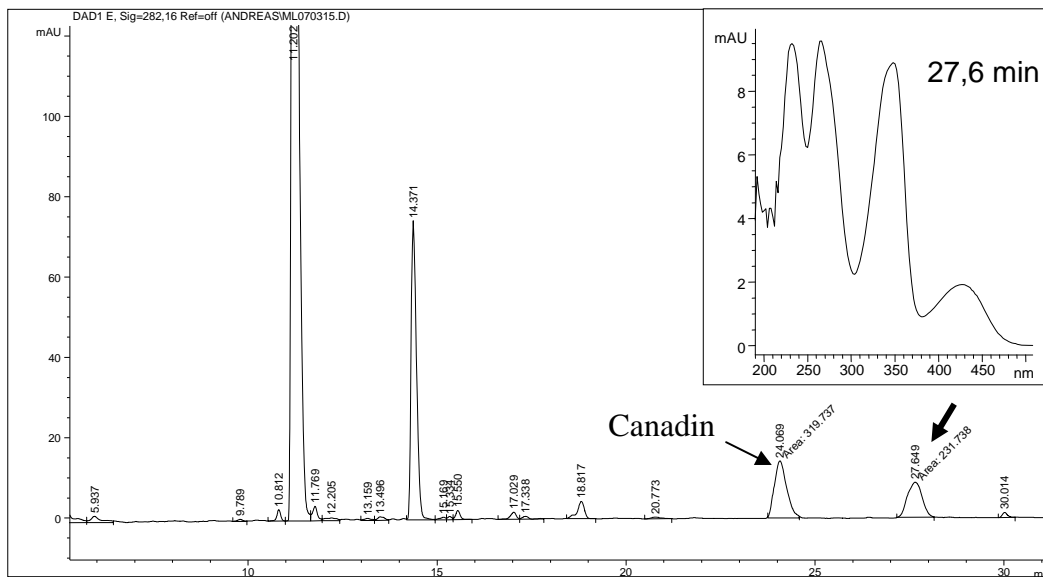
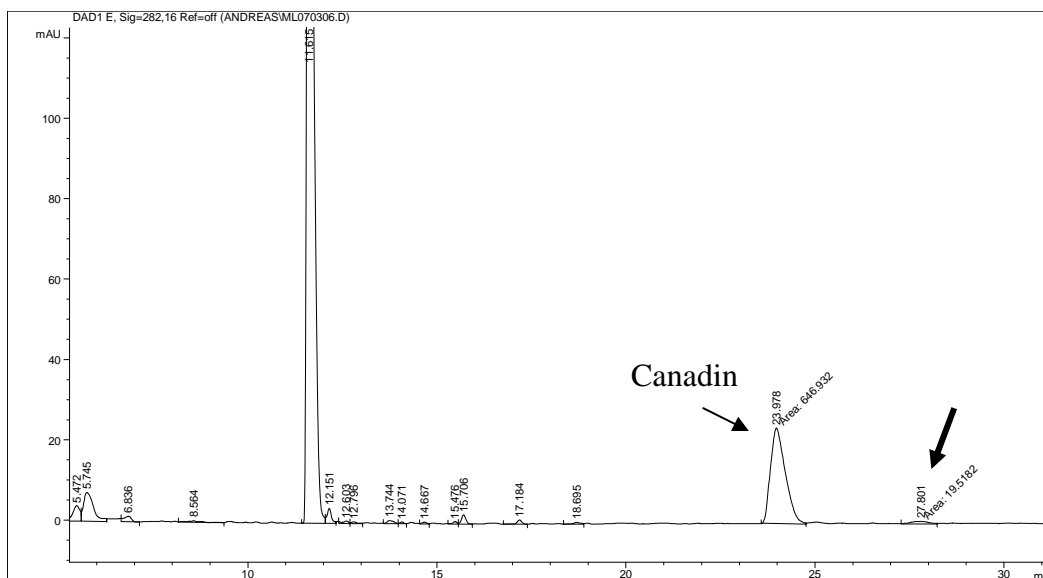


Abb. 42 LC-MS Spektren der aus Scoulerin entstehenden Dehydroderivate (I-III)

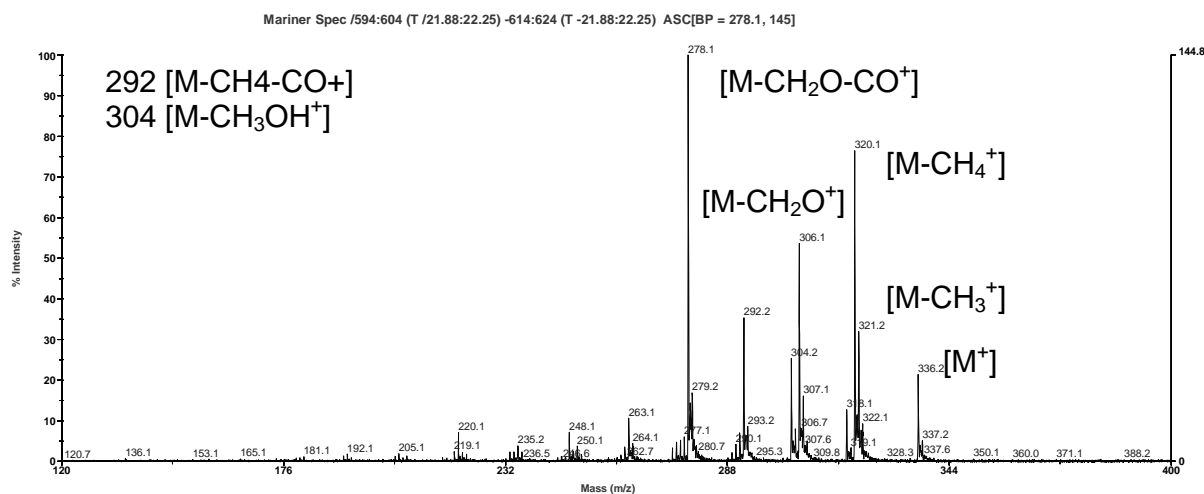
I: putativ glykosyliertes Tetradehydroscoulerin, II: Tetradehydroscoulerin, III: putativ methyliertes Dehydroscoulerin



**STOX-Enzymumsatz**



**Kontrolle**



**Abb. 43 STOX Enzymumsatz mit Canadin**

Oben: UV-Chromatogramm des STOX-Enzymumsatzes, *Insert*: UV-Spektrum des Produktes  
 Mitte: UV-Chromatogramm der Kontrolle, Unten: LC-MS-Spektrum des Produktes Berberin

## V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkript- und die Alkaloidakkumulation für *P. somniferum* untersucht um alkaloidmetabolisierenden CYP450 zu identifizieren. Bei den Versuchen zur Expression von CYP450 konnte dabei auf die EST Bibliothek der Arbeitsgruppe von Dr. Ziegler zurückgegriffen werden. Dieser EST Bibliothek wurden 24 CYP450 cDNAs bzw. cDNA Fragmente hinzugefügt. Die Plasmide resultierten aus dem EST Projekt (7), der Promotionsarbeit von Fon-Chin Huang (12) und aus der vorliegenden Arbeit (5; vgl. IV.1.1 und IV.2).

Der Expressionsvergleich verschiedener Papaverarten zeigt das die Alkaloidbiosynthesegene BBE, COR, 4'OMT, 7OMT und 6OMT in morphinhaltigen *Papaver somniferum* Varietäten höher exprimiert sind (Ziegler *et. al.*, 2006). In dasselbe Expressionscluster fallen mehrere CYP450 Enzyme wie CYP80B3, aber auch ein CYP450 des Phenylpropanoidstoffwechsels, die Zimtsäure-4-Hydroxylase sowie ein putativen CYP450 (GFC13) und das in dieser Arbeit beschriebene CYP719B1 (GFC55). Betrachtet man das Expressionsverhalten des letztgenannten CYP450, so korreliert es mit dem Vorkommen von Morphinanalkaloiden. Die Expression ist erhöht in *P. somniferum* aber auch im thebainhaltigen *Papaver bracteatum* und im *Papaver arenarium* in welchem *N*-Methylcodein nachgewiesen wurde (s. Abb. 8 und Ziegler *et. al.*, 2006). Ein weiteres Cluster von Genen mit erhöhter Expression in morphinhaltigen Papaverarten enthält das CYP450 11F4 und die Tyrosin/Dopadecarboxylase (s. Abb. 8).

Als ein weiteres Auswahlkriterium für mögliche CYP450 der Alkaloidbiosynthese wurde im Rahmen der Promotionsarbeit *P. somniferum* sp. *Paris* Suspensionszellkulturen mit *Botrytis cinerea* bzw. Methyljasmonat elicitiert und die Veränderungen im Alkaloidgehalt und auf der Transkriptionsebene bestimmt. Die Induktion der Alkaloidbiosynthesegene erfolgte drei bis sechs Stunden nach der Behandlung mit *Botrytis cinerea*. Später, nach 6h, und weniger stark ausgeprägt erfolgte die Induktion nach Methyljasmonatbehandlung. Das Expressionsprofil des CYP450s GFC55 wies nach *Botrytis cinerea* einen vergleichbare Induktion wie die Profile der Alkaloidbiosynthesegene CYP80B3, SalAT, Berberinbrückenenzym sowie der Methyltransferasen 7OMT, 6OMT sowie 4'OMT auf. Die Untersuchungen von Zulak und Mitarbeitern zeigen neben der Induktion des Alkaloidstoffwechsels weiteren Veränderungen im Sekundärstoffwechsel (Phenylpropanoidstoffwechsel) und Primärstoffwechsels (Saccharosemetabolismus) (Zulak *et al.*, 2007). Der Einfluss auf den Saccharosemetabolismus ließ sich, wahrscheinlich aufgrund der begrenzten Anzahl an zur Verfügung stehenden ESTs, nicht bestätigen. Wie in Abb. 8 zu sehen, lässt sich aber übereinstimmend mit dieser Arbeit

eine Erhöhung der Phenylpropanoidbiosynthesegene nach Elicitorbehandlung feststellen. Für die CYP450 zeigt sich dies in einer Induktion von Zimtsäure-4-Hydroxylase und Flavonsynthase.

Für *Botrytis cinerea* ist bekannt, dass dieser die Sanguinarinbiosynthese stimuliert (Eilert *et al.*, 1986). Die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Zulak *et al.*, 2007 zeigt weiterhin, dass in einer *Papaver somniferum* Suspensionszellkultur zwischen 10 und 20h nach der Elicitierung zuerst *N*-Methylcoclaurin, *N*-Methylstylopin, Dihydrosanguinarin und Papaverin akkumulieren. Zu einem späterem Zeitpunkt (40-50h) beginnt die Biosynthese von Sanguinarin, Dihydrochelirubin und Chelirubin. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *Papaver somniferum* Stamm *Paris* Zellkultur akkumulierte nach Elicitierung ebenfalls verstärkt Alkaloide, wie in Abbildung 5 gezeigt (48h Wert). Dabei handelte es sich ebenfalls um Protopin, *N*-Methylstylopin und Sanguinarin. Als weiteres Alkaloid ist das Aporphin Magnoflorin induziert, welches zu den neu identifizierten Alkaloiden gehört (s. IV.2.3).

Aufgrund des Vergleiches von Expressionsdaten und Alkaloidakkumulation wurden, unter Beachtung der Homologien zu Enzymen mit bekannter Funktion, die cDNAs GFC55 (erhöht in morphinhaltigen Papaverarten, durch Elicitor induzierbar) und 11F4 (erhöht in morphinhaltigen Papaverarten, durch Elicitor nicht induziert) zur Volllängeisolierung mit dem Ziel der funktionelle Charakterisierung ausgewählt.

### **GFC55-CYP719B1**

Die Überexpression des GFC55 Proteins führte zur Identifizierung der cDNAs der Salutaridinsynthase, des die intramolekulare C-C Kopplung des (*R*)-Retikulins zum Promorphinan Salutaridin katalysierenden Enzyms. Dies bestätigt die Vorhersage der Salutaridinsynthase als ein CYP450 durch Inhibitorstudien mit mikrosomalen Präparationen (Rüffer & Zenk 1994). Für die Überexpression des GFC55 Proteins wurde die entsprechende cDNA als Volllängeklon ausgehend von den Sequenzinformationen der Promotionsarbeit von Fon Chin Huang reisoliert. Hierzu identische Fragmente wurden durch den verwendeten AFLP Ansatz gewonnen (s. IV.1.1 und s.u.). Der reisolierten Sequenz wurde 2007 die offizielle Nomenklatur CYP719B1 durch Dr. David Nelson von der University of Tennessee, zugewiesen.

Die Enzymaktivität mit (*R*)-Retikulin konnte durch die Verwendung von *Sf9* Zellen der Arbeitsgruppe von Dr. Reimar Johne des Institutes für Virologie Leipzig erhalten werden. Die Qualität der Zellen war entscheidend für den Erfolg der Arbeit ebenso wie die Verbesserung der Assaybedingungen und der Bedingungen der Proteinexpression im Erfahrungsaustausch



mit M.sc. Díaz Chávez und Dr. Ziegler. Dies betrifft im Einzelnen das Titrieren der Virenstärken von CPR- und CYP450-Baculoviren vor der Expression, den Zellaufschluss im hypotonischen Puffer, die Einführung einer halbstündigen Inkubation bei der Extraktion der CYP450 zur CO-Differenzspektren Aufnahme. Das überexprimierte CYP719B1 setzt (*R*)-Retikulin unter den getesteten Reaktionsbedingungen stereoselektiv zu Salutaridin um. Das Temperaturoptimum des Enzyms ist bei 30°C, und dessen pH Optimum liegt bei pH 8,5. Die Reaktion ist NADPH abhängig. Die Substratabhängigkeit liegt im ähnlichen Bereich der für die Enzyme CYP719A1-3 publizierten Daten. CYP719B1 arbeitet mit halbmaximaler Geschwindigkeit im Bereich von 0,1 µM. Wie im Ergebnisteil aufgeführt liegt der zu erwartende Km Wert um zwei Potenzen niedriger als der des mikrosomalen Enzyms (Rüffer & Zenk 1994). Dieser niedrige Km Wert ist in guter Übereinstimmung mit den Km Werten von CYP719A1 für (*S*)-Tetrahydrocolumbamin (Km 0,27µM) und CYP719A2 und 3, für (*S*)-Cheilanthifolin (ca. 0,4µM) (Izekawa *et al.*, 2003 und 2007). CYP719A2 und 3 sind dabei besonders, da sie auch Scoulerin und CYP719A3 auch (*S*)-Tetrahydrocolumbamin als Substrat akzeptieren (Izekawa *et al.*, 2007).

### **CYP719B1 Sequenzinformation**

Die Sequenz des CYP719B1 zeigt 49 % Identität zur (*S*)-Canadinsynthase. Zum Vergleich: CYP80B2 und CYP80B3, die *N*-Methylcoclaurin-3-Hydroxylasen von *P. somniferum* und *Coptis japonica*, haben eine Identität von 69% auf Aminosäureebene. Die CYP719B1 besitzt die CYP450 typische Hämbindungssequenz FXXGXRXCXG. Das hydrophobe transmembrane Signalankerpeptid, welches für die Lokalisation sowie die Retention am ER erforderlich ist (Szczesna-Skorupa & Kemper 2006), lässt sich ebenfalls Vorhersagen (Abb.13). Die Struktur des CYP719B1 weißt nach einer Sekundärstrukturvorhersage (Rost & Sanders 1993<sup>1</sup>; s. Abbildung 12), die für die CYP450 Familie typische Sekundärstrukturabfolge auf. Da die Strukturen von Proteinen stärker konserviert sind als die Aminosäureabfolgen (s. Rost 1999), ist schließlich mit einer CYP450 typische α/β Struktur zu rechnen (s. Abb. 44). Mittlerweile liegen mehrere Kristallstrukturen für bakterielle sowie modifizierte tierische und menschliche CYP450 vor (Rowland *et al.*, 2006). Die Letzteren gehören zu abbauenden Enzymen, welche ein breites Substratspektrum besitzen. Darunter befindet sich das CYP2D6, welches stickstoffhaltige Substrate mit aromatischen Ring, wie die Morphinane Codein und Morphin, umsetzt (Rowland *et al.*, 2006).

---

<sup>1</sup> <http://www.predictprotein.org/>

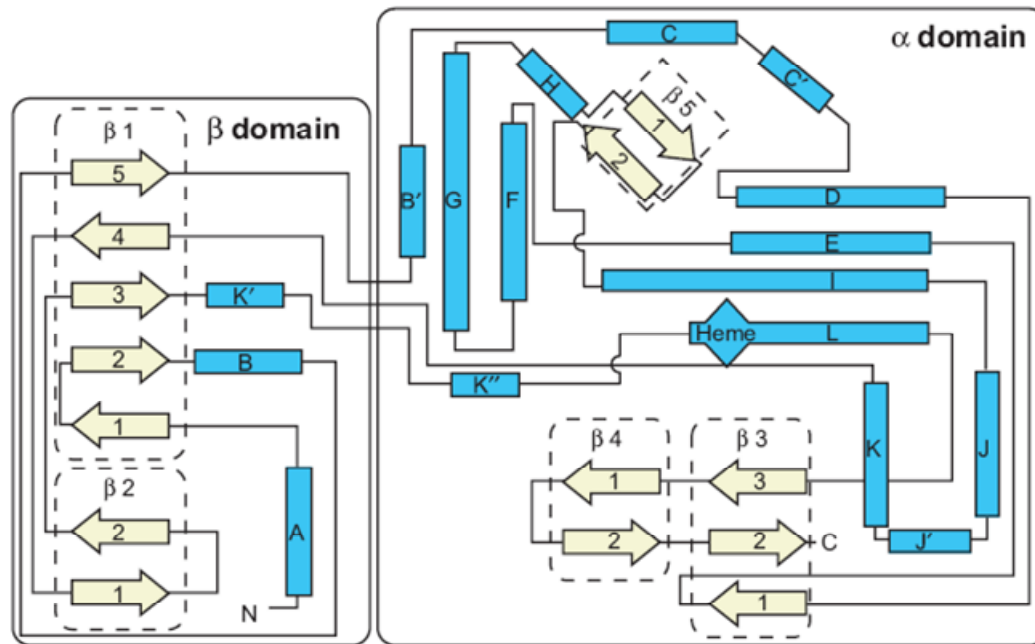
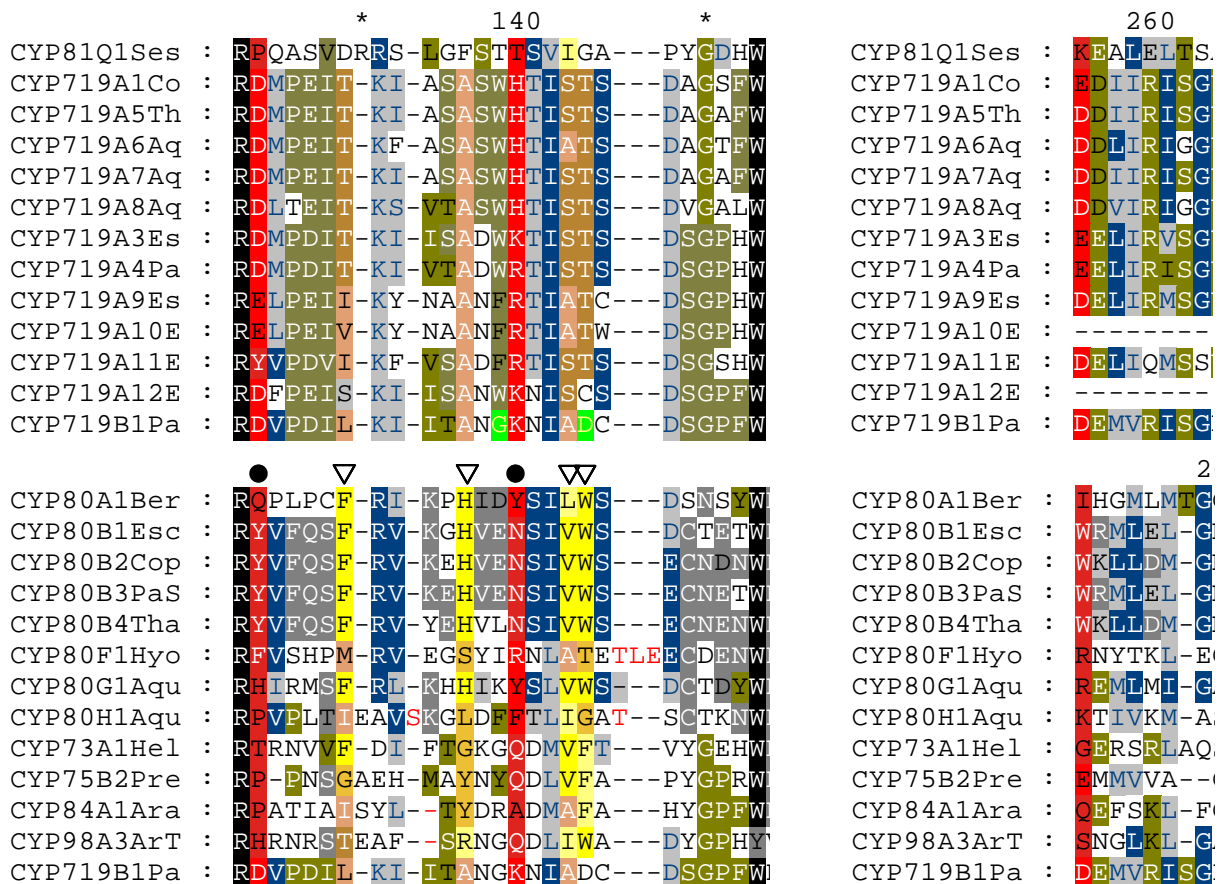


Abb. 44  $\alpha/\beta$  Struktur der CYP450 Enzyme n. Werck-Reichhart & Freyereisen 2000

Vergleicht man die CYP719B1 Sequenz und mit der CYB2D6 Aminosäureabfolge, so zeigt sich, dass die als hämbindend identifizierten Aminosäuren des CYP2D6, als Arginin 113, Tryptophan 138, Histidin 370, Arginin 442, Cystein 444 in der Sequenz des CYP719B1 konserviert bzw. durch die ähnlichen Aminosäuren Lysin 142 und Serin 303 ersetzt sind. Das häm- und substratkoordinierende Phenylalanin, F120 des CYP2D6, ist im CYP719B1 nicht konserviert. Neben den Hämbindestellen sind Regionen der Substraterkennung (SRS) der CYP450 definierbar. Die SRS der CYP450 etablierten sich ausgehend von der Arbeit von Gotoh (1992). Daten aus „homology Modelling“ und „site directed mutagenesis“ Untersuchungen an pflanzlichen CYP450s, bestätigen die Substraterkennungsstellen SRS 1, 2, 4, 5 und 6 (s. Rupasinghe & Schuler 2006) und erweitern diese um Aminosäuren außerhalb der definierten SRS (Rupasinghe *et al.*, 2007). Der Vergleich von Modellen vier verschiedener am Phenylpropanoidstoffwechsel beteiligter Enzyme zeigt drei der Substraterkennungsdomänen (SRS4, SRS5 SRS6) als stärker und zwei als weniger stark konserviert (SRS1, SRS2), und führte zur Interpretation das dies die Gemeinsamkeiten (aromatischer Ring) und Unterschiede (Seitenkette) der Substrate widerspiegelt (Rupasinghe *et al.*, 2005).

Die SRS1 liegt zwischen B und C Helix und umfasst möglicher Weise eine weitere Helix (B'). Neben den genannten Versuchen der Arbeitsgruppe von Schuler zeigt der Vergleich von Modellen der CYP51G und CYP51H Familie, dass Aminosäuren der SRS1 Region Determinanten der Größe und Form der Substratbindungsstelle sind (Qui *et al.*, 2006).



**Abb. 45** *SRS1 (l.) und SRS2 (r.) Region der CYP719 Familie, von ausgewählten Enzymen der CYP80 Familie und von CYP450 Hydroxylasen des Phenylpropanoidstoffwechsels*

- ▽ Aminosäuren in denen sich die CYP80 A, B und G von den CYP719 unterscheiden; (CYP80A F105, H110, V116, W117)
- Aminosäuren in denen sich CYP80 A, B und G sowie die CYP719 unterscheiden; (CYP80A Q100, Y113)

Dies wird auch durch Arbeiten an CYP51 Orthologen von Trypanosoma Arten mit unterschiedlichen Substratpräferenzen belegt (Lepesheva *et al.*, 2006). Demzufolge sind Aminosäuren von Interesse in denen sich CYP450 der CYP719 Familie und mögliche Benzylisochinolin-transformierende CYP80 Enzyme unterscheiden. Dazu gehört die dem am Anfang der Region stehenden hochkonservierten Arginin (CYP791B1 R113) folgende Aminosäure, Tyrosin in CYP80B Familie und CYP719A11, Aspartat oder Glutamat in allen anderen Sequenzen der CYP719 Familie, Glutamin in CYP80A1 und Histidin in CYP80G1. Weitere Auffälligkeiten der SRS1 Region sind die zwischen CYP80A, B und G konservierten Aminosäuren F105<sup>2</sup>, H110, V116, W117 sowie die Unterscheidung zwischen CYP80A, G

<sup>2</sup> Nummerierung für CYP80A1

und B Familie in einer der Aminosäuren Tyrosin in CYP80A1 (Y113) und CYP80G1 und Asparagin in der CYP80B Unterfamilie. Die Aminosäuren der CYP450 der CYP80B Familie sind im gesamten Bereich der SRS1 konserviert, während die nicht aufgeführten Aminosäuren von CYP80A1 und G1 von diesen und voneinander deutlich abweichen. In der CYP719 Familie fällt die höhere Homologie des CYP719A12 Fragmentes zum CYP719B1 als zur CYP719A Unterfamilie auf. In der CYP719B1 Sequenz ist es das Glycin 126 indem es sich von allen anderen CYP719 Sequenzen unterscheidet sowie das Aspartat 131 (grün in Abb. 45).

Die SRS2 Region ist Teil der F-Helix, für sie gibt es wenig experimentelle Daten für pflanzliche Enzyme. Modelle von Fettsäurehydroxylasens zeigen eine Beteiligung an der Substratbindung (Rupasinghe *et. al.*, 2007) Auch in der CYP2D6 Kristallstruktur ist ein Glutaminrest in dieser Region gezeigt, der an der Substratbindung und möglicherweise Katalyse beteiligt ist. Der im Sequenzvergleich entsprechende Isoleucin des CYP719B1 ist als hydrophober aliphatischer Rest in den CYP450 der CYP80 und CYP719 Familie konserviert.

```

CYP81Q1Ses : IVALIIAGTDASVVT'
CYP719A1Co : IFELYLLGVDS'TSST'
CYP719A5Th : IFELYLLGVDS'TSST'
CYP719A6Aq : VFEVYLLGVDS'TSST'
CYP719A7Aq : IFELYLLGVDS'TSST'
CYP719A8Aq : IFELYILAVDST'SSST'
CYP719A3Es : IFEAYLLGVDS'TSLT'
CYP719A4Pa : IFETYLLGVDS'TSST'
CYP719A9Es : IFEVYLLGVDS'TSST'
CYP719A10E : -----
CYP719A11E : IFEAYLLGVDI'TSST'
CYP719A12E : -----
CYP719B1Pa : VLEIFGLGVDS'TAAT.

CYP80A1Ber : FMETFGPGSDTNSNI
CYP80B1Esc : LMELFGAGTETSAST
CYP80B2Cop : LMELFGAGTETSAST
CYP80B3PaS : LMEIFGAGTETSAST
CYP80B4Tha : LMELFGAGTETTAST
CYP80F1Hyo : LMELYSAGTETTITT
CYP80G1Aqu : FLETFGPGSETSSAT
CYP80H1Aqu : LSEMFITGIDTTSTA
CYP73A1Hel : VENINVAAIETTLWS
CYP75B2Pre : LLNLFVAGTDTSSST
CYP84A1Ara : IMDVMFGGTETVASA
CYP98A3ArT : LWDMITAGMDTTAIT
CYP719B1Pa : VLEIFGLGVDS'TAAT

```

**Abb. 46 SRS 4 Region**

Ähnlich wie in der SRS1 Region ist die SRS2 in der CYP80B Unterfamilie konserviert, CYP719B1 unterscheidet sich ,ausgenommen CYP719A11, nicht von den andern CYP719 Enzymen, (s.Abb. 45). Die SRS3 Region hat sich nicht als SRS bestätigt.

Die Region SRS4, Teil der I Helix, zeigt in diesen Modellen der Phenylpropanoid-transformierenden CYP450 mehrere Reste mit Kontakt zum Substrat (Rupasinghe *et al.*, 2003). Darunter ist ein D/E T Aminosäurepaar dessen Threonin hochkonserviert ist und wahrscheinlich als Protonenüberträger fungiert (Guengerich 2001). Die Aminosäure Glutamat bzw. Aspartat dieses Paares ist auch in der SRS4 der CYP719 konserviert während das Threonin durch ein Serin ersetzt ist. Abweichungen innerhalb der SRS4 ergeben sich in der beschriebenen Alanin/Glycin Alanin/Glycin Abfolge (Rupasinghe *et al.*, 2005) im Zentrum der Domäne, so haben die

Proteine CYP80A1 und CYP80G1 ein Prolin anstelle des ersten Alanin bzw. Glycins, CYP80H1 ein Threonin. In der CYP719 Familie ist der Rest durch ein Leucin ersetzt. Das in CYP73A1 an der Substratbindung beteiligte Asparagin 302 (Schoch *et al.* 2003) ist als Aspartat bzw. Glutamatrest am N-terminalen Ende der SRS4 Domäne in den untersuchten CYP719 bzw. CYP80 Enzymen konserviert (s.Abb.46). CYP719B1 hat mit den Tetrahydrobenzyl-isochinolin-umsetzenden Enzymen der CYP80B Unterfamilie die Aminosäureabfolge Phenylalanin Glycin gemeinsam, unterscheidet sich darin von der CYP719A Unterfamilie. Auch unterscheiden sich die CYP80 Unterfamilien C, D, E welche von Pflanzen isoliert wurden, die keine Benzylisochinolinalkaloide besitzen, in dieser Position ebenso wie die Littorinmutase CYP80F1 und die Aquilegia cDNA CYP80H1, während die Abfolge Phenylalanin Glycin in der Berbamurinsynthase CYP80A1 und CYP80G1 wiederum konserviert ist.

Die SRS 5 Region, die Schleife (loop) zwischen K-Helix und  $\beta$ 1-4 sheet in der CYP2D6 Struktur, ist die am stärksten konservierte SRS-Region im Sequenzvergleich. Aus der Analyse der Phenylpropanoid-umsetzenden CYP450 geht hervor dass die SRS5 Region mit dem aromatischen Ring der Phenylpropanoide interagiert (Schoch *et al.*, 2003, Rupasinge *et al.*, 2003). Für Hydroxylasen wie die Limonen-6- Hydroxylase CYP71D15, deren F363I Mutante Limonen am C3 hydroxyliert (Schalk & Croteau, 2000), die 5-*epi*-Aristolochen-1,3-dihydroxylase CYP71D20, deren S368V Mutante verschieden hydroxylierte, aber keine 3 hydroxylierten Produkte bildet, die 2-Hydroxyisoflavanonsynthase CYP03C2 deren K375T Mutante die statt 2- Hydroxyisoflavanone 3-Hydroxyflavanone produziert, ist die SRS5 Region entscheidend für die Produktbildung (s. Rupasinge *et al.*, 2007). Bei den dabei interagierenden Resten von CYP71D15 und CYP71D20 handelt es sich um unpolare Aminosäuren, die in der CYP719 Familie und bei CYP80G1 durch Alanin ersetzt sind. Die CYP80B Familie besitzt einen Threoninrest in dieser Position wie auch die Hydroxylasen CYP75B2 und CYP98A3. Das Lysin des CYP93C2 ist durch Isoleucin (CYP719A und CYP80A), Valin (CYP719B) bzw. Leucin (CYP80B und G1) ersetzt (s.Abb.47).

Die SRS6 Region ist Teil des  $\beta$ -4 Blattes und befindet sich in einem Loop zwischen zwei Strängen. Mit Ausnahme von CYP80F1 ist in den verglichenen CYP80-SRS6 Regionen der in den Modellen CYP84A1, CYP75B1 und CYP73A5 mit den Substrat interagierende Leucinrest konserviert (Rupasinge *et al.*, 2003). Die CYP719 Familie hat einen Phenylalanin an der Position des Leucins. Der entsprechende Phenylalaninrest des CYP94A2 Proteins, ist für die Katalyse der  $\omega$ -Fettsäurehydroxylierung notwendig, wie durch gezielte

Punktmutation der Aminosäure und Charakterisierung der Enzyme gezeigt wurde (Kahn *et al.*, 2001). Dem Phenylalanin folgt bei CYP719-Enzymen ein Valin das im CYP98A3 Modell ebenfalls an der Substratbindung beteiligt scheint (Rupashinge *et al.*, 2003, s.Abb 48).

CYP81Q1Ses :	FPSVPTLVPH		
CYP719A1Co :	KPIAPLAIPH		
CYP719A5Th :	KPIAPLAIPH		
CYP719A6Aq :	KPIAPLAIPH		
CYP719A7Aq :	KPIAPLAIPH		
CYP719A8Aq :	-----		
CYP719A3Es :	KPIAPLAIPH		
CYP719A4Pa :	KPIAPLAIPH		
CYP719A9Es :	KPIAPCSIPH		
CYP719A10E :	-----		
CYP719A11E :	KPIAPLAIPH		
CYP719A12E :	-----		
CYP719B1Pa :	KPIAPLAVPH		
CYP71D15 :	HPPFPLIPRQ		
CYP71D20 :	HPPSPLLVPR		
CYP93C2 :	HPPLPVVKRK		
CYP80A1Ber :	YPPISIMIPH		
CYP80B1Esc :	HPPTPLLLPR		
CYP80B2Cop :	HPPTPLLLPR		
CYP80B3PaS :	HPATPLLLPR		
CYP80B4Tha :	HPPTPLLLPR		
CYP80F1Hyo :	HPPAPLLFPH		
CYP80G1Aqu :	HPAAPFLLPR		
CYP80H1Aqu :	HPSVAM-IPR		
CYP73A1Hel :	RMAIPLLVPH		
CYP75B2Pre :	HPSTPLSLPR		
CYP84A1Ara :	HPPIPLLL-H		
CYP98A3ArT :	HPPTPLMLPH		
CYP719B1Pa :	KPIAPLAVPH		
CYP81Q1Ses :	DLNEGSGITL		*
CYP719A1Co :	DMGEEELSFVL		
CYP719A5Th :	DMSEELSFVL		
CYP719A6Aq :	DMSEELGFVL		
CYP719A7Aq :	DMSEELSFVL		
CYP719A8Aq :	-----		
CYP719A3Es :	DMSDQLGFVL		
CYP719A4Pa :	DMSDELGFVL		
CYP719A9Es :	DMSDELGVVL		
CYP719A10E :	-----		
CYP719A11E :	-----		
CYP719A12E :	-----		
CYP719B1Pa :	DLSEATISFIL		
CYP80A1Ber :	DMEELFTLSL		
CYP80B1Esc :	IVEEKFGTLT		
CYP80B2Cop :	SMDEKFGTLT		
CYP80B3PaS :	IMEEKFGTLT		
CYP80B4Tha :	PMDEKFGLPL		
CYP80F1Hyo :	NMDDIIDVTM		
CYP80G1Aqu :	ELKEMLSLSL		
CYP80H1Aqu :	NMDAKLGLTL		
CYP73A1Hel :	EKGGQFSLHI		
CYP75B2Pre :	NMEEAYGLTL		
CYP84A1Ara :	DMNDVFGLTAT		
CYP98A3ArT :	DMSENPGLVTV		
CYP719B1Pa :	DLSEATISFIL		

**Abb. 47 SRS5 (links) und SRS6 (rechts) Region**

Hellgrün - Aminosäuren deren Mutationen zu Enzymen mit veränderter Substratspezifität führen,  
Dunkelgrün - Aminosäuren die in Modellen mit den Substrat interagieren bzw. zu diesen identisch  
sind

CYP71D15 Limonen-6-Hydroxylase, CYP71D20 5-*epi*-Aristolochen-1,3-Dihydroxylase, CYP93C2 2-Hydroxyisoflavanonsynthase

Zusammenfassend lässt sich aus der Sequenzinformation schließen, dass

- 1) die Hämbindung zwischen menschlichen CYP2D6 und pflanzliche CYP719B1 konserviert ist,
- 2) CYP80G1 aufgrund der Ähnlichkeit mit dem CYP80A1 in der SRS1 und SRS2 Region wahrscheinlich eine vergleichbare Reaktion katalysiert. Für das CYP80G1 ist als oxidative Phenolkopplung entweder der Dimerisierung von Benzylisochinolin<sup>3</sup> oder der Bildung des Aporphingrundgerüsts im Magnoflorin, dessen Biosynthese ausgehend vom (*S*)-Retikulin in Aquilegiaspezies durch Brochmann-Hanssen und Mitarbeiter nachgewiesen wurde (Brochmann-Hanssen *et al.* 1972), denkbar.
- 3) die SRS4 Region wahrscheinlich zur Vorhersage der Reaktion von Isochinolinalkaloid-metabolisierenden CYP450 genutzt werden kann. Sie besitzt eine zwischen den Tetrahydrobenzylisochinolin vom Retikulin /*N*-Methylcoclorin Typ umwandelnden CYP450 konservierte Phenylalanin/Glycin Abfolge. Auf diese folgt ein weiterer Rest, der innerhalb der CYP719 Familie (Argenin), in der CYP80B Unterfamilie (Lysin) sowie zwischen CYP80A und G (Prolin) konserviert ist
- 4) die höhere Homologie von CYP80B Unterfamilie zu CYP73A1 und CYP84A1 als zu CYP719B1 in der SRS5 Region mit der Funktion (Hydroxylierung) korreliert.

Vergleicht man die Reaktionen von der CYP80A und B Unterfamilien und der CYP719 Familie so ist ein Unterschied das erstere Reaktionen mit zwei Edukten katalysieren, während es bei der CYP719 Familie intramolekulare Reaktionen sind. Für das CYP719B1 geht Zenk *et al.* 1989 von der Verbindung zweier Radikale aus. Der Katalysemechanismus der CYP450 Reaktion kann dabei sehr unterschiedlich sein (Guengerich 2001). Durch die hohe Substratspezifität der Salutaridinsynthese erscheint ein Nachweis des Reaktions- und Katalysemechanismen schwierig. Als erster Schritt für weitere Untersuchungen ist eine höhere Enzymaktivität nötig. Dies kann durch eine Verbesserung der Überexpression, wie Optimierung der Codonnutzung, möglicherweise auch durch ein Wechsel zu einem anderen Expressionssystem (*E.coli*), erreicht werden bzw. durch die Reinigung des Proteins aus einem größeren Ansatz. .

### **Regulation der Morphinanbiosynthese – mögliche Funktion von CYP719B1**

Die Biosynthese der Morphinane wird in den Schritten zwischen der Oxidation des (*S*)-Retikulins und Salutaridinsynthese reguliert. Undifferenzierte Suspensionskulturen

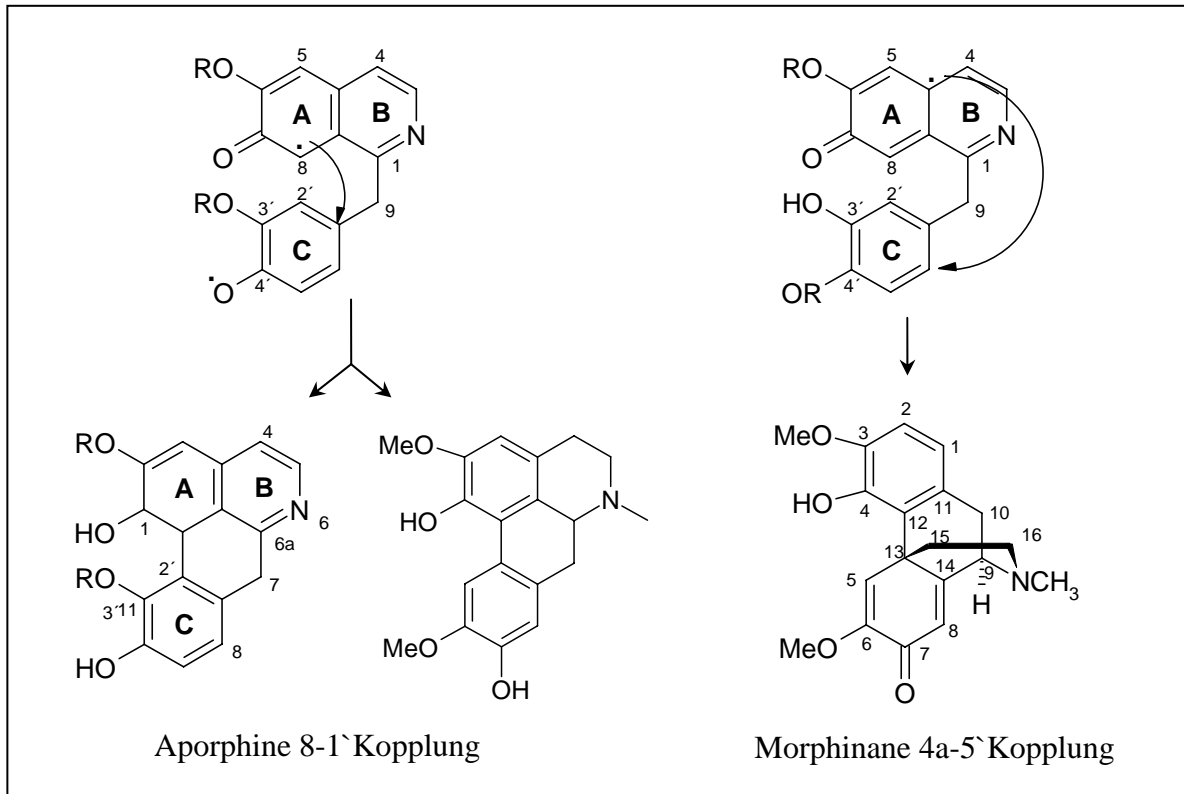
---

<sup>3</sup> Bisbenzylisochinoline sind in Aqueliaspezies soweit nicht nachgewiesen, wobei die Analytik hauptsächlich auf die Arbeit von Charles *et al.*, 1964 zurückgeht.

akkumulieren Retikulin bzw. *N*-Methylcoclaurin aber kein Salutaridin oder Salutaridinol (Zulak *et al.* 2007, s. IV.2.3). Es ist weiterhin publiziert worden, dass diese Zellkulturen zugesetztes (*R*)-Retikulin nicht als Substrat erkennen und (*S*)-Retikulin zu Scoulerin und Cheilanthifolin umsetzen (Furuya *et al.*, 1978). Ein weiterer Hinweis für eine Regulation dieser Schritte, kommt von der Untersuchung von Pflanzen mit unterdrückter COR Genexpression. Die Entscheidung ob Alkaloide vom Promorphinan / Morphinantyp oder von einfachen Tetrahydrobenzylisochinolintyp gebildet werden, hängt dabei von der Expression der Codeinonreduktase (COR) ab. COR RNAi *Papaver somniferum* Pflanzen zeigen eine Akkumulation von (*S*)-Retikulin und weiterer Tetrahydrobenzylisochinoline, bei unveränderter Transkriptmenge der Biosynthesegene 6OMT, CNMT, SalAT, CYP80B1, 4'OMT, BBE und 7OMT (Allen *et al.*, 2004). Da COR in den Milchröhren detektiert wurde, die SalAT, 4'OMT in den Phloemparenchymzellen (Weid *et al.*, 2004) bzw. Siebzellen (Samanani *et al.*, 2006) ist keine direkte Interaktion (Metabolon) für den negativen Feedback verantwortlich. Eine mögliche Erklärung wäre das die 1,2 Dehydroretikuliniumionsynthase bzw. -reduktase durch die RNA Interferenz betroffen sind. Interessant ist welche Expression zeigt das CYP719B1 in den RNAi Pflanzen. So sprechen die Induktion von SalAT und CYP719B1 nach *Botrytis cinerea* Behandlung, bei ausbleibender Akkumulation von Promorphinanen/Morphinanen für eine Regulation der Biosynthese unabhängig der Transkriptmenge (vgl. IV.2.2). Eine vergleichbare Induktion von CYP450 ohne erhöhte Alkaloidakkumulation ist nach Elicitierung von *Arabidopsis thaliana* mit Oligogalacturoniden beschrieben wurden. Diese führt nicht zur Camalexinakkumulation, aber zu Induktion von CYP71B15 (PAD3), das den letzten Schritt der Camalexinbiosynthese katalysiert (Ferri *et al.*, 2003). Die Funktion ist nicht bekannt, könnte aber in der Beteiligung des CYP450 an der Organisation von Enzymen am ER bestehen. Diese Funktion haben CYP450 der Phenylpropanoid- und Glucosinolatbiosynthese (s. Ralston & Yu 2006). Für CYP719B1 muss zuerst bestätigt werden, dass die aufgrund von Hybridisierungen gewonnenen Daten auf der Erhöhung der CYP719B1 Transkriptmenge beruhen, da die detektierte Aporphinalkaloide Corytuberin und das induzierte *N*-Methylcorytuberin (s. Abb. 48) durch ein homologes Enzym synthetisiert werden können. Interessant wäre die Untersuchung der Transkriptakkumulation in *Papaver somniferum* Gewebekulturen, da diese in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstadium Morphinane produzieren (Schuchmann & Wellmann 1983). Ein möglicher Ansatz wäre der Vergleich der Akkumulation der Alkaloide zur Änderung der Transkriptmenge während der Differenzierung. Die Aufklärung der Sequenzen von Dehydroretikuliniumsynthase und Reduktase sowie der Nachweis der Thebainsynthase



würde dabei die Voraussetzung für die Analyse der Differenzierung und für die Erklärung des Effektes in den COR RNAi Pflanzen verbessern.



**Abb. 48** Vergleich der Phenolkopplung die zu Aporphinen bzw. Morphinanen führt

### CYP450 11F4

Aus dem Vergleich der CYP450 Sequenzen von Arabidopsis und Reis ergaben sich 9 bzw. 10 verschiedene Klade sogenannten „clans“ von CYP450 (Werck-Reichhart *et. al.*, 2002; Nelson *et. al.*, 2004). Während die untersuchte CYP719 Familie wie die CYP80 Familie und viele Hydroxylase des Sekundärstoffwechsels dabei der CYP71 Klade angehören, hat die 11F4-cDNA die höchste Homologie zur CYP87A Familie und gehört damit zur CYP85 Klade. Diese Klade enthält Biosyntheseenzyme der für Landpflanzen ursprünglichen Biosynthese bzw. Modifikation der Brassinosteroide. Außerdem gehören in diese Klade Enzyme der Hormonbiosynthesen der Giberellinsäure bzw. Abscisinsäure (Nelson *et. al.*, 2006). Der 11F4 Klon zeigte kein CO-Differenzspektrum und keine Aktivität. Wahrscheinliche Ursache ist ein Methionin fünf Aminosäuren „upstream“ des verwendeten Methionins und somit die Expression eines verkürzten Konstruktes.

### Der AFLP Ansatz zur Isolierung neuer cDNAs

Die Isolierung neuer cDNAs mittels des AFLP Ansatzes, der zur Isolierung von vier neuen CYP450 Sequenzen und einer bekannten Sequenz führte, ist ein interessanter Ansatz. Bei den

durchgeführten Versuchen wurden weniger cDNAs erhalten, als in Ansätzen die auf degenerierte Primer zurückgreifen bzw. von cDNA Bibliotheken ausgehend neue Fragmente isolieren (u.a. Holton & Lester 1996, Mitzutani *et al.* 1998, Huang 2000). Im Anschluss an die durchgeführten Experimente wird das Hauptproblem im Adaptordesign und der Primerlänge gesehen. Aufgrund der Erfahrungen mit dem Genom Walker Kit™ der Firma BD Bioscience™, in Hinsicht auf Reproduzierbarkeit und Erfolgsquote, liegt es nahe sowohl die Idee der „suppression“ PCR, zusammen mit der Blockierung des 3' Endes des Antisensadaptoroligonukleotides durch eine Aminogruppe in das Adaptordesign aufzunehmen und die Technik unter Beachtung Primervorgaben umzusetzen (s.II.13.3). Der Ansatz an sich ist interessant weiterzuverfolgen besonders zum Vergleich von unterschiedlichen Expressionsstärken, z.B. im Vergleich von morphinhaltigen und morphinfreien Pflanzen.

### **(S)-Tetrahydroberberinoxidase**

Neben den CYP450 waren die bivalent FAD bindenden Oxygenasen ein weiterer Teil der Promotionsarbeit. Ausgehend von einem bekannten cDNA Fragment wurde eine Volllänge cDNA erhalten. Diese enthielt ein Signalpeptid am N-terminalen Ende, so dass auch verschiedene verkürzte Konstrukte in Hefe überexprimiert und auf Aktivität getestet wurden. Keines der Proteine zeigte Aktivität. Daneben wurde in Vektoren mit und ohne Sekretionssignal kloniert und das Protein in Insektenzellen (*Sf9*) überexprimiert. Der Test der Expression mit einem 6x C-terminal His-getaggten Protein zeigte im Westernblot ein schwaches Signal im Zellpellet. Dies entspricht der Lokalisation der heterolog in *Sf9* Zellen überexprimierten Tetrahydrocannabinoidsynthase, aber unterscheidet sich von der Lokalisation des überexprimierten BBE, welches sich im Überstand der Zellen befindet. Da sich darüberhinaus keine Proteinexpression sowie nur stark variierend und sehr wenig Aktivität nach dem Zellaufschluss nachweisen ließ, wurde der Substratumsatz im Medium der Zellkultur direkt gemessen. Dafür wurde der pH Wert des Insektenzellmediums auf pH 7,5 – 8 eingestellt und eine Mischung aus Peptidaseinhibitoren (PepstatinA und Leupeptin) zugesetzt. Die Konstrukte ohne Exkretionssignal zeigten nach drei Tagen mit Scoulerin ein leichte Rotfärbung innerhalb der Zellen. Das 6x C-terminal His-getaggte Konstrukt zeigte mit dem Protein ohne His-Tag vergleichbare Aktivität. Für diese Konstrukte konnte auch nach Butanolextraktion über HPLC und LC-MS Messungen Produkte nachgewiesen werden. Die rekombinanten Proteine setzten in diesem Assay neben Scoulerin auch Canadin und Tetrahydropalmitin um. Tetrahydrocorysamin war im Unterschied zum gereinigten Enzym kein Substrat (Amann *et al.*, 1988).

## Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit vervollständigt mit dem CYP719B1 und der (S)-Tetrahydroberberinoxidase die cDNA Informationen über die Gene der Tetrahydroberberinbiosynthese weiter und kann damit eine Grundlage zur Modifikation der Biosynthese sein. Besonders das CYP719B1 dürfte aufgrund seiner besonderen Stellung in der Biosynthese und seiner stereoselektiv bisher nicht ausreichend zu katalysierenden Reaktion ein wichtiges Enzym für weitere Untersuchungen sein. Auch ist die Suche nach Homologen aufgrund der im Sekundärstoffwechsel weitverbreiteten C-C Kopplungsreaktionen interessant. Diese sind Teil der Biosynthesen von Ligninen, Proanthocyanidinen, Bicomarinen, von Aristocholsäure sowie von Spermidin-, Tropolon- und Benzylisochinolinalkaloiden. CYP450 sind dabei neben der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese auch als Aphelandinsynthase der Spermidinalkaloidbiosynthese (Nezbedová *et al.*, 2001) und als Isoandrocymbin umsetzendes Enzym der Colchicinbiosynthese (Nasreen *et al.*, 1996) nachgewiesen wurden. Sie sind dagegen nicht involviert in der Biosynthese der Lignine und Proanthocyanidine (Lewis *et al.*, 1992, 1997 bzw. Proucel *et al.*, 2005).

Der Vergleich der Expressionslevel des CYP719B1 in den Mohnarten zeigt das Auftreten von Promorphinanen/Morphinanen mit einer erhöhten Expression des CYP719B1 einhergeht und nicht allein vom Auftreten des Morphins abhängt. Die in den Eliciterungsversuchen von Suspensionszellkulturen erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass die Entscheidung ob Promorphinane gebildet werden nicht von der Genexpression des CYP719B1 abhängt.

Der Abgleich mit in den Datenbanken vorhandenen Sequenzinformationen der einzelnen Arten, zeigt dass sich durch das *Aquilegia formosa* Sequenzierprojekt des Doe Joint Genom Institutes, des US Departments of Energy, in Walnut Creek, Kalifornien, neue Möglichkeiten für die Untersuchung des Benzylisochinolinstoffwechsel ergeben. Ausgehend von den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen, ergibt sich das der CYP80G1 Klon von *Aquilegia formosa* sehr wahrscheinlich ein Tetrahydrobenzylisochinolin umsetzendes CYP450 ist.

Der in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörg Ziegler verwendete komparative Genexpressionsvergleich von Mohnarten und -varietäten konnte verbunden mit der Bestimmung der Alkaloidgehalte zur Identifizierung des CYP450 Salutaridinsynthase genutzt werden. Weitere CYP450 mit auffallenden Expressionsmustern sind ein CYP450 mit Homologie zu einem hypothetischen Enzym erhöht in morphinhaltigen Pflanzen, ein CYP450 mit Homologie zu CYP80B3, welches eine erhöhte Transkriptmenge in morphinfreien Arten zeigt, wie auch der 11F4 Klon mit Homologie zur CYP87A Unterfamilie. Dies sind weitere Kandidaten für die funktionellen Charakterisierung.

## VI. Literaturverzeichnis

- Amann M, Nagakura N, Zenk MH** (1988) Purification and properties of (*S*)-tetrahydroberberine oxidase from suspension-cultured cells of *Berberis wilsoniae*. *Eur.J.Biochem.* **175**: 17-25.
- Battersby, A.R.** (1963) The biosynthesis of alkaloids. *Proc. Chem. Soc. London* :189-200.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. und Brunak, S.** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol.* **340**: 783-95.
- Blakemore, P.R. und White, J.D.** (2002) Morphine, the Proteus of organic molecules. *Chem. Commun.* **11**: 1159–1168.
- Bock, A., Wanner, G., Zenk, M.H.** (2002) Immunocytological localization of two enzymes involved in berberine biosynthesis. *Planta* **216**: 57-63.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brochmann-Hanssen, E., Chen, C.-H., Chiang, H.-C. und McMurtrey, K.** (1972) Biosynthesis of magnoflorine from reticuline by direct oxidative coupling. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **9** (23): 1269.
- Carninci, P., Nishiyama, Y., Westover, A., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M. und Hayashizaki, Y.** (1998) Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 520–524.
- Chaban, C., Waller, F., Furuya, M. und Nick, P.** (2003) Auxin Responsiveness of a Novel Cytochrome P450 in Rice Coleoptiles. *Plant Physiology* **133**: 2000–2009.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. und Rutter, W.J.** (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **27**: 5294-9.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**: 156-9.
- Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A.M., van der Heijden, R., Verpoorte, R. und Memelink, J.** (2001) Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett.* **508**: 215-20.
- Davin, L.B., Bedgar, D.L., Katayama, T. und Lewis, N.G.** (1992) On the stereoselective synthesis of (1)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry* **31**: 3869–3874.
- Davin, L.B., Wang, H-B, Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.M., Sarkanen, S. und Lewis, N.G.** (1997) Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**: 362–366.

- DeEknamkul, W., Zenk, M.H.** (1992) Purification and properties of 1,2-dehydroreticuline reductase from *Papaver somniferum* seedlings. *Phytochemistry* **31**: 813-821.
- De Hoon, M. J. L., Imoto, S., Nolan, J. und Miyano, S.** (2004) Open Source Clustering Software. *Bioinformatics* **20**: 1453-1454.
- DeWitt, A.M., Andersson K, Peltre G, Lidholm J.** (2006) Cloning, expression and immunological characterization of full-length timothy grass pollen allergen Phl p 4, a berberine bridge enzyme-like protein with homology to celery allergen Api g 5. *Clin Exp Allergy*. **36**: 77-86.
- Dittrich, H. and 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. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* **88**: 9969-9973.
- Ehltling, J., Provart, N.J. und Werck-Reichhart D.** (2006) Functional annotation of the Arabidopsis P450 superfamily based on large-scale co-expression analysis. *Biochemical Society Transactions* **34**: 1192-1198.
- Eilert, U., Kurz, W.G.W., and Constabel, F.** (1985). Stimulation of Sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *J. Plant Physiol.* **199**: 65-76.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. und Botstein, D.** (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* **95**: 14863-14868.
- Farmilo, C.G., Rhodes, H.L.J., Hart, H.R.L. und Taylor, H.** (1953) Detection of morphine in *Papaver setigerum* DC. *Bulletin on Narcotics, Vol.V*: 26-31.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 **132**:6-13 (Addendum. (1984) *Anal.Biochem.* **137**: 266-267.
- Frick, S., Kramell, R., Schmidt, J., Fist, A.J. und Kutchan, T.M.** (2005) Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *J Nat Prod.* **68**: 666-73.
- Furuja, T., Nakano, M. und Yoshikawa, T.** (1978) Biotransformation of (R,S)-Retikulin and Morphinan Alkaloids by Cell Cultures of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **17**: 891-893.
- Gamborg. O.L., Miller, R.A. Und Ojina, K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
- Gerardy, R., und Zenk, M.H.** (1993) Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **32**: 79-86.
- Gotoh, T., Miyazaki, Y., Sato, W., Kikuchi, K. und Bentley, W.E.** (2001) Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected *Sf-9* insect cell cultures supplemented with carboxyl and cysteine protease inhibitors. *J Biosci Bioeng.* **92**: 248-55.
- Gotoh, O.** (1992) Free Full Text Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem.* **267**: 83-90.

- Grothe, T., Lenz, R., Kutchan, T.M.** (2001) Molecular characterization of salutaridinol-7-*O*-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *J. Biol. Chem.* **276**: 30717-30723.
- Guengerich, F.P.** (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol.* **14**: 611-50.
- Hansen, B.G. und Halkier, B.A.** (2005) New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **221**:603-6.
- He, X. und de Montellano, P.R.** (2004) Radical rebound mechanism in cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation of the multifaceted radical clocks alpha- and beta-thujone. *J Biol Chem.*; **279**: 39479-84.
- Hirata, K., Poeaknapo, C., Schmidt, J., Zenk, M.H.** (2004) 1,2-Dehydroreticuline synthase, the branch point enzyme opening the morphinan biosynthetic pathway. *Phytochemistry* **65**: 1039-1046.
- Holton, T.A. und Lester, D.R.** (1996) Cloning of novel cytochrome P450 gene sequences via polymerase chain reaction amplification. *Methods Enzymol.* **272**: 275-83.
- Huang, F.C. und Kutchan, T.M.** (2000) Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **53**: 555-564.
- Huang, F.C.** (2000) Molecular cloning and heterologous expression of *Papaver somniferum* cytochrome P450 genes involved in secondary metabolism. *München, Univ., Diss.*
- Huang, C.H., Lai, W.L, Lee, M.H., Chen, C.J., Vasella, A., Tsai, Y.C. und Liaw, S.H.** ( 2005) Crystal structure of glucooligosaccharide oxidase from *Acremonium strictum*: a novel flavinylation of 6-*S*-cysteinyl, 8 alpha-*N*1-histidyl FAD. *J Biol Chem.* **280**: 38831-8.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-8.
- International Narcotics Control Board / ICNB** (2005) *United Nations Publication*  
ISBN-10: 92-1-048113-5, [http://www.incb.org/incb/en/narcotic\\_drugs\\_2006.html](http://www.incb.org/incb/en/narcotic_drugs_2006.html)
- Ikezawa, N., Tanaka, M., Nagayoshi, M., Shinkyō, R., Sakaki, T., Inouye, K., and Sato, F.** (2003). Molecular Cloning and Characterization of CYP719, a Methylenedioxy Bridge-forming Enzyme That Belongs to a Novel P450 Family, from cultures *Coptis japonica* Cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 38557-39565.
- Ikezawa N, Iwasa K, Sato F.** (2007) Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylophine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *FEBS J.* **274**: 1019-35.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A.V., Morant, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S. und Møller B.L.** (2005) Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr Opin Plant Biol.* **8**: 280-91.

- Kahn, R.A., Le Bouquin, R., Pinot, F., Benveniste, I. und Durst, F.** (2001) A conservative amino acid substitution alters the regiospecificity of CYP94A2, a fatty acid hydroxylase from the plant *Vicia sativa*. *Arch Biochem Biophys.* **391**: 180-7.
- Karimov, A.** (1993) Berberis ALKALOIDS. *Chemistry of Natural Compounds* **29**: 415-38.
- Kirby, G.W.** (1967) Biosynthesis of the morphine alkaloids. *Science* **155**: 170-3.
- Kraus, P.F. und Kutchan, T.M.** (1995) Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C--O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 2071-5.
- Kritikos P.G. und Papadaki S.P.** (1967) The history of the poppy and of opium and their expansion in antiquity in the Eastern Mediterranean area. *Bull Narc.* **19**: 5-10.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. L.** (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**: 567-580.
- Kutchan, T.M.** (1998) Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In: *The Alkaloids* Vol. **50**: 257-316.
- Kyhse-Andersen J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-9.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lepesheva, G.I., Zaitseva, N.G., Nes, W.D., Zhou, W., Arase, M., Liu, J., Hill, G.C. und Waterman, M.R.** (2006) CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 $\alpha$ -demethylase. *J Biol Chem.* **281**: 3577-85
- Li, R., Reed, D.W., Liu, E., Nowak, J., Pelcher, L.E., Page, J.E. und Covello, P.S.** (2006) Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement. *Chem Biol.* **13**: 513-20.
- Liaw, S., Lee, D.Y., Chow, L.P., Lau, G.X. und Su, S.N.** (2001) Structural characterization of the 60-kDa bermuda grass pollen isoallergens, a covalent flavoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* **280**: 738-43.
- Linsmaier, E.M. und Skoog, F.** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* **18**: 100-127.
- Lopes Cardoso, M.I., Meijer, A.H., Rueb, S., Queiroz Machado, J., Memelink, J. und Hoge, J.H.C.** (1997) A promoter region that controls basal and elicitor-inducible expression levels of the NADPH:cytochrome P450 reductase gene (*Cpr*) from *Catharanthus roseus* binds nuclear factor GT-1. *Molecular and General Genetics MGG* **256**: 674-681.
- Luckner, M.** (1991) Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals. Springer-Verlag 3.Auflage - ISBN-10: 0387502874.

- Minami, H., Dubouzet, E., Iwasa, K. und Sato, F.** (2007) Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *J Biol Chem.* **282**: 6274-82.
- Mizutani, M., Ward, E. und Ohta, D.** (1998). Cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*: isolation of cDNAs, differential expression, and RFLP mapping of multiple cytochromes P450. *Plant Mol Biol.* **37**: 39-52.
- Morishige, T., Tsujita, T., Yamada, Y., Sato, F.** (2000) Molecular characterization of the *S*-adenosyl-L-methionine 4'-*O*-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **275**: 23398-23405.
- Morishige, T., Dubouzet, E., Choi, K.B., Yazaki, K. und Sato, F.** (2002) Molecular cloning of columbamine *O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur J Biochem.* **269**: 5659-67.
- Nasreen, A., Rüffer, M. und Zenk, M. H.** (1996) Cytochrome P-450-dependent formation of isoandrocybine from autumnaline in colchicine biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **37**: 8161-64.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsaius, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R. und Waterman, M.R.** (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**: 1-11.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., und Nebert, D.W.** (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**: 1-51.
- Nelson, D.R., Schuler, M.A., Paquette, S.M., Werck-Reichhart, D. und Bak, S.** (2004) Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.* **135**: 756-72.
- Nezbedová, L., Hesse, M., Drandarov, K., Bigler, L. und Werner, C.** (2001) Phenol oxidative coupling in the biogenesis of the spermine alkaloids aphelandrine and orantine in *Aphelandra* spc. *Planta* **213**: 411-7.
- Omura, T. und Sato, R.** (1962) A new Cytochrome in Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**: 1375-1376.
- Palmiter, R.D.** (1974) Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes. Expedient techniques for the isolation of undergraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* **13**: 3606-15.
- Parker, H.I., Blaschke, G. und Rapoport, H.** (1972) Biosynthetic conversion of thebaine to codeine. *J Am Chem Soc.* **94**: 1276-8.
- Patil M.A., Piercea M.L., Phillips A.L. und Venters B.J.** (2005) Identification of genes up-regulated in bacterial-blight-resistant upland cotton in response to inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*star. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**: 319-35.



- 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 monooxygenase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J.* **13**: 793-801.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. und Urban, P.** (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* **272**: 51-64.
- Preininger, V.** (1986) Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. *The Alkaloids* **29**: 1-98.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L. und Debeaujon, I.** (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell.* **17**: 2966-80.
- Qi, X., Bakht, S., Qin, B., Leggett, M., Hemmings, M., Mellon, F., Eagles, F., Werck-Reichhart, D., Schaller, H., Lesot, A., Melton, R. und Osbourn, A.** (2006) A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. *PNAS* **103**: 18848-53.
- Raith, K., Neubert, R., Poeaknapo, C., Boettcher, C., Zenk, M.H. und Schmidt, J.** (2003) Electrospray tandem mass spectrometric investigations of morphinans. *J Am Soc Mass Spectrom.* **14**: 1262-9.
- Ralston, L. und Yu O.** (2006) Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Reviews* **5**: 459-72.
- Rink, E. und Böhm, H.** (1975) Conversion of reticuline into scoulerine by a cell free preparation from *Macleaya microcarpa* cell suspension cultures. *FEBS Lett.* **49**: 396-9.
- Robinson R.** (1947) Nobel Lecture Chemistry 1942-1962, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964.
- Rost B. und Sander C.** (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol.* **232**: 584-99.
- Rost B.** (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering* **12**: 85-94.
- Rowland, P., Blaney, F.E., Smyth, M.G., Jones, J.J., Leydon, V.R., Oxbrow, A.K., Lewis, C.J., Tennant, M.G., Modi, S., Eggleston, D.S., Chenery, R.J. und Bridges, A.M.** (2006) Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem.* **281**: 7614-22.
- Rüffer, M. und Zenk, M. H.** (1987) Distant precursors of benzoisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Z. Naturforsch.* **42c**: 319-332.
- Rüffer, M. und Zenk, M. H.** (1994) Canadine synthase from *Thalictrum tuberosum* cell cultures catalyses the formation of the methylenedioxy bridge in berberine synthesis. *Phytochemistry* **36**: 1219-23.
- Rupasinghe, S., Baudry, J. und Schuler, M.A.** (2003) Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modelling. *Protein Engineering* **16**: 721-31.

- Rupasinghe, S. und Schuler, M.A.** 2006 Homology modeling of plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Reviews* **5**: 473-505.
- Rupasinghe, S.G., Duan, H. und Schuler, M.A.** (2007) Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* **68**: 279-93.
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama K., Kobayashi, M., Agrawal, G. K., Takeda, S. und Abe, K., Miyao A., Hirochika, H., Kitano H., Ashikari, M. und Matsuoka, M.** (2004) An Overview of Gibberellin Metabolism Enzyme Genes and Their Related Mutants in Rice. *Plant Physiology* **134**: 1642–53.
- Saldanha, A.J.** (2004). Java Treeview-extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**: 3246-48.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**: 5463-5467.
- Schalk, M und Croteau, R** (2000) A single amino acid substitution (F363I) converts the regiochemistry of the spearmint (-)-limonene hydroxylase from a C6- to a C3-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 11948-53.
- Schmidt, J., Boettcher, C., Kuhnt, C., Kutchan, T.M. und Zenk, M.H.** Poppy alkaloid profiling by electrospray tandem mass spectrometry and electrospray FT-ICR mass spectrometry after [ring-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-tyramine feeding. *Phytochemistry.* **68**: 189-202.
- Schoch, G.A., Attias, R., Le Ret, M und Werck-Reichhart, D.** (2003) Key substrate recognition residues in the active site of a plant cytochrome P450, CYP73A1. Homology guided site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem.* **270**: 3684-95.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatos, A., Halkier, B.A., und Glawischnig, E.** (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol.* **141**: 1248-54.
- Schuler, M.A. und Werck-Reichhart, D.** (2003) Functional genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol.* **54**: 629-67.
- Schuchmann, R. und Wellmann, E.** (1983), Somatic Embryogenesis of Tissue Cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and Its Relationship to Alkaloid and Lipid Metabolism *Plant Cell Reports* **2**: 88-91
- Szczesna-Skorupa, E. und Kemper B.** (2006) BAP31 is involved in the retention of cytochrome P450 2C2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **281**: 4142-8.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. und Lukyanov S.A.** (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1087–8.
- Siminszky, B., Gavilano, L., Bowen, S.W. und Dewey, R.E.** (2005) Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 14919-24.

- Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y. und Taura, F.** (2004) The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Delta1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J Biol Chem.* **279**: 39767-74.
- Schröder, G., Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmidt, J., Strack, D., De Luca, V. und Schröder, J.** (1999) Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Lett.* **458**: 97-102.
- 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.
- Sugiura, M., Sakaki, T., Yabusaki, Y. und Ohkawa, H.** (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* of a novel tobacco cytochrome P-450-like cDNA. *Biochimica et Biophysica Acta* **1308**: 231-240.
- UNDOC Drogenbericht 2005, United Nations, United Nations Office on Drugs and Crime, World drug report, ISBN13: 9789211482225, [http://www.unodc.org/unodc/world\\_drug\\_report.html](http://www.unodc.org/unodc/world_drug_report.html)**
- Unterlinner, B., Lenz, R., 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**: 465-475.
- Vetter, H.P., Mangold, U., Schröder, G., Marner, F.J., Werck-Reichhart, D. und Schröder, J.** (1992) Molecular Analysis and Heterologous Expression of an Inducible Cytochrome P-450 Protein from Periwinkle (*Catharanthus roseus* L.). *Plant Physiol.* **100**: 998-1007.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, J. und Zabeau, M.** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 13957-13962.
- Wiebke Priesner** (1998) Cytochrom P450-Enzyme aus *Papaver somniferum* L. : Klonierung und heterologe Expression. *München, Univ., Diss.*
- Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinkovic, D. und Jhoti, H.** (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**: 464-8.
- Winkler, A., Hartner, F., Kutchan, T.M., Glieder, A. und Macheroux, P.** (2006) Biochemical evidence that berberine bridge enzyme belongs to a novel family of flavoproteins containing a bi-covalently attached FAD cofactor. *J Biol Chem.* **281**: 21276-85.
- Zenk, M.H., El-Shagi, H. und Ulbrich, B.** (1977) Production of rosmarinic acid by cell-suspension cultures of *Coleus blumei*. *Naturwissenschaften* **64**: 585-586.
- Zenk, M.H., Gerardy, R. und Stadler, R.** (1989) Phenol oxidative coupling of Benzylisoquinoline alkaloids is catalyzed by region-selective and stereo-selective cytochrome P-450 linked plant enzymes: Salutaridine and Berbamunine. *J Chem Soc Chem Commun.* **22**: 1725-1727.

- Zenk, M.H.** (1991) Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry*, **30**, 3861-3863.
- Zhu, Y.Y., Machleder, E.M., Chenchik, A., Li, R. und Siebert, P.M.** (2001) Reverse transcriptase template switching: A SMART™ approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* **30**: 892–897.
- Ziegler, J., Diaz-Chávez, M.L., Kramell und R., 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.* **48**: 177-92.
- Zulak, K.G., Cornish, A., Daskalchuk, T.E., Deyholos, M.K., Goodenowe, D.B., Gordon, P.M., Klassen, D., Pelcher, L.E., Sensen, C.W. und Facchini, P.J.** (2007) Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta*. **225**: 1085-106.

Identifikation	Datenbankeintrag mit der höchsten Homologie	Klassifizierung	Induktion log2
<b>Stoffwechsel und Transport</b>			
A31A4	Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR)	Aminosäuremetabolismus / Piperidinalkaloidbiosynthese	1,99
A34F7	aconitase-iron regulated protein 1	Citratcyklus	3,74
A17A12	Male sterility protein 2 homolog	Fettsäurestoffwechsel	2,53
A3A1	stearoyl-CoA 9-desaturase	Fettsäurestoffwechsel	>10
A3B1	Oxygen-evolving enhancer protein 1	Photosynthese	2,41
A8F1	60s acidic ribosomal protein	Proteinsynthese & -transport	1,81
A3H11	AT3g06720/F3E22 14	Proteinsynthese & -transport	2,37
A2F5	Erythrocyte membrane protein PFEMP3	Proteinsynthese & -transport	1,76
A22E2	chloroplast elongation factor TuB (EF-TuB)	Proteinsynthese & -transport (chloroplastidär)	4,42
A32C8	dihydroorotate dehydrogenase	Pyrimidinbiosynthese	>10
A6H6	UDP-glucose pyrophosphorylase	Zuckerstoffwechsel & Zellwandsynthese	3,55
A5E5	ABC transporter –related	Transport	2,86
<b>Pathogenabwehr / Stressantwort</b>			
A11E6	coronatine-insensitive 1 (COI1), AtFBL2	Pathogenabwehr / Stressantwort	2,02
A14F3	Ethylene inducible protein HEVER	Pathogenabwehr / Stressantwort	3,35
A3F10	F-box protein	Pathogenabwehr / Stressantwort	2,59
A29C5	seven transmembrane MLO protein (MLO6)	Pathogenabwehr / Stressantwort	1,98
A2D10	thiosulfate sulfurtransferase	Pathogenabwehr / Stressantwort	2,09
<b>Regulation der Genexpression</b>			
A3G6	leucine zipper-containing protein	Regulation der Genexpression	3,08
A21A12	sigma-related factor	Regulation der plastidären Genexpression	>10
<b>Signaltransduktion</b>			
A16G7	Ca <sup>2+</sup> -transporting ATPase-like protein	Signaltransduktion	3,17
A50P2	protein kinase CPK1	Signaltransduktion	3,26
<b>Funktion unbekannt /Zellalterung und –entwicklung</b>			
A23H3	putative senescence-associated protein	Funktion unbekannt /Zellalterung und –entwicklung	4,21
A33A10	putative senescence-associated protein	Funktion unbekannt /Zellalterung und –entwicklung	3,75
A10G7	putative senescence-associated protein	Funktion unbekannt /Zellalterung und –entwicklung	3,69
16F6	senescence associated protein	Funktion unbekannt /Zellalterung und –entwicklung	5,18

**Anhang 1 Eine Stunde nach Botrytis cinerea Behandlung induzierte Gene**

erwartete Sequenz

Restriktionstellen: BamHI SmaI KpnI SacI EcoRI

```
ACACTAAATTA-----AT-AATGAccgGATC-CCCGGTACCGAGCTCGAATTccgcgGGGGATCTCCCATGTCT
|||||
ACACTAAATTACCGGATCCATCGATGCATCGATGCCCGGGTACCGAGCTCGAATT-CGCGGGGGATCTCCCATGTCT
```

durch Sequenzierung erhaltene Sequenz

Restriktionstellen: BamHI NsiI SmaI KpnI SacI EcoRI

### *Anhang 2a Sequenzierung der „multiple cloning site“ des pYEDP60 Vektors*

1) Restriktionstellen: BamHI (NsiI) SmaI KpnI SacI EcoRI

ACACTAAATTACCGGATCCATCGATGCATCGATGCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGGGGGATCTCCCATGTCT

2) Restriktionstellen: BamHI SmaI KpnI SacI EcoRI

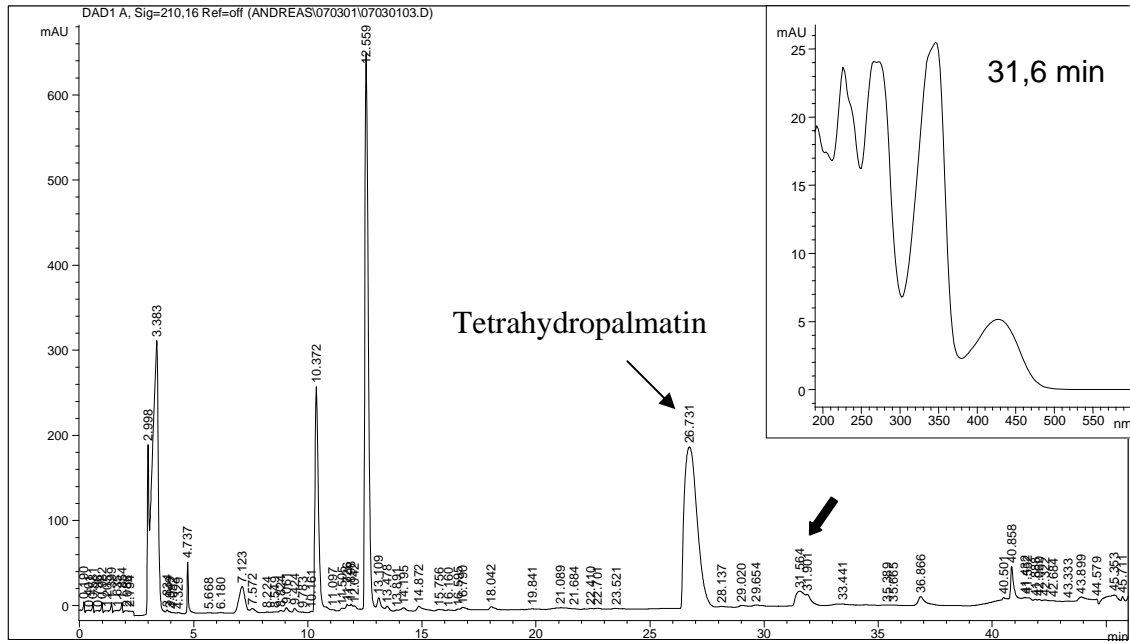
AATTACCGGATCCCCCGGTACCGAGCTCGAATTCGCGGGGGAT

3) Restriktionstellen: BamHI SmaI NotI KpnI SacI EcoRI

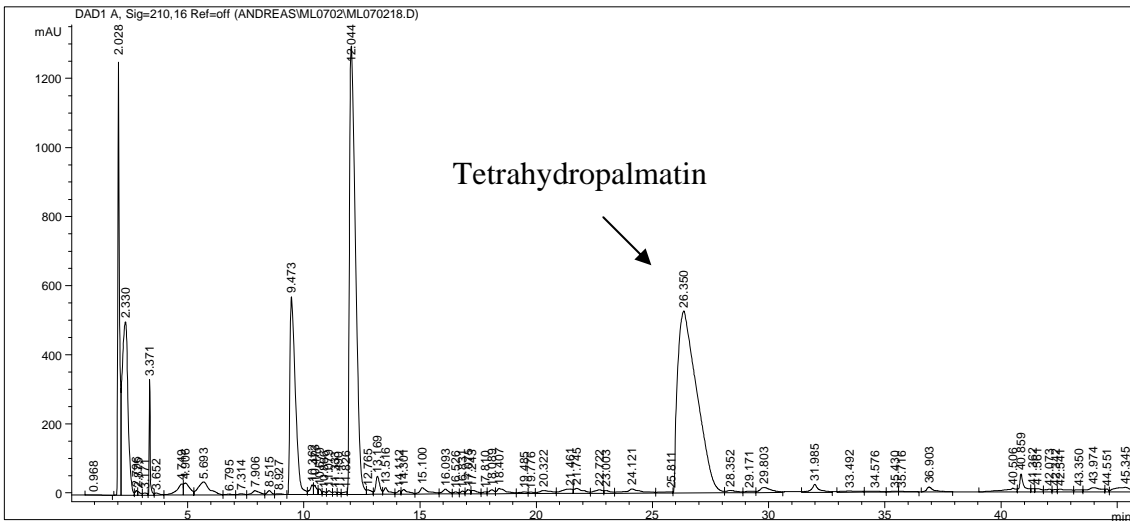
AATTCCGGatCCCCCGGTACCGGCGGCCGCTCGAG-----CGAGCTCGAATTCGCGGGGGAT

### *Anhang 2b Vorgenommene Veränderungen in der „multiple cloning site“*

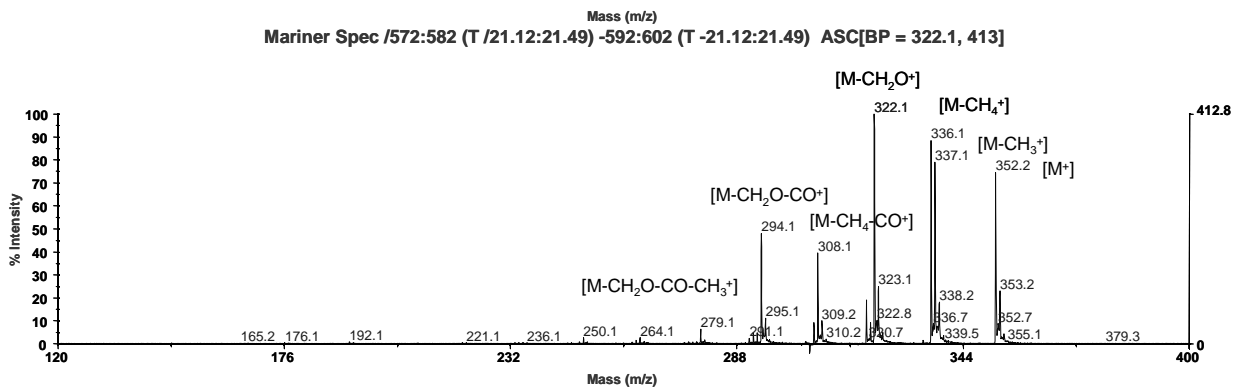
1) pYEDP60 Vektorsequenz, 2) Deletion der NsiI-Erkennungssequenz und des ATGs, 3) Deletion der NsiI-Erkennungssequenz und des ATGs, Einsetzen einer NotI-Erkennungssequenz



**STOX-Enzymumsatz**



**Kontrolle**



### Anhang 3 Enzymumsatz von rekombinanten STOX-Protein mit Tetrahydropalmitin

Oben: UV-Chromatogramm des STOX-Enzymumsatzes, Insert: UV-Spektrum des Produktes  
Mitte: UV-Chromatogramm der Kontrolle, Unten: LC-MS-Spektrum des Produktes Palmitin