

**Analyse der Benzylisochinolinalkaloid-Biosynthese
des *Papaver somniferum* L.
mit Hilfe der RNAi-Technik**

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 Frau **Katja Kempe**

geb. am 04.04.1979 in Frankenberg

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Toni M. Kutchan
2. Prof. Elmar Wahle
3. Prof. Heribert Warzecha

Halle, 25. Februar 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013523

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013523>]

*Für meine Eltern
und Holger*



*Papaver
somniferum* L.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Alkaloide - Begriff, Vorkommen und Verwendung.....	1
1.2	Die Alkaloide des <i>Papaver somniferum</i> L.....	3
1.3	Die Biosynthese der Schlafmohnalkaloide.....	4
1.3.1	Die Biosynthese des (S)-Retikulin	4
1.3.2	Das zentrale Intermediat (S)-Retikulin.....	6
1.3.3	Der Morphin-spezifische Biosyntheseweg.....	7
1.4	Die Regulation der Benzyloisochinolin- und Benzo[c]phenanthridinalkaloid-Biosynthese	10
1.5	Hintergrund der vorliegenden Arbeit.....	11
1.6	Zielstellung der vorliegenden Arbeit.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Material	13
2.1.1	Pflanzliches Material.....	13
2.1.2	Bakterienstämme.....	13
2.1.3	Vektoren.....	13
2.1.4	Medien	15
2.1.5	Oligonukleotide.....	16
2.1.6	Chemikalien, Enzyme, Enzymkits und Sonstiges	17
2.1.7	Geräte.....	18
2.2	Methoden	20
2.2.1	Präparation von Nucleinsäuren	20
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	20
2.2.1.1.1	Mini-Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	20
2.2.1.1.2	Mini-Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> im 96er Format	20
2.2.1.1.3	Midi-Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	21
2.2.1.1.4	Plasmid-Präparation aus <i>A. tumefaciens</i>	21
2.2.1.2	Isolierung von Nucleinsäuren aus <i>P. somniferum</i> L.....	21
2.2.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>P. somniferum</i> L.....	22
2.2.1.4	Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration.....	22
2.2.2	Gelelektrophorese	23
2.2.2.1	Trennung von DNA über Agarose-Gele.....	23
2.2.2.2	Trennung von RNA über Agarose-Gele	23
2.2.3	Restriktionsanalyse	23
2.2.4	Transfer von Nucleinsäuren auf Nylon-Membranen und Hybridisierung	24
2.2.4.1	„Southern blot“	24
2.2.4.2	„Northern blot“	24
2.2.4.3	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	25
2.2.4.4	Hybridisierung.....	25
2.2.5	Klonierungsmethoden.....	25
2.2.5.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	25
2.2.5.2	Phosphatase-Behandlung.....	26
2.2.5.3	Ligation	26
2.2.5.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	26
2.2.5.5	Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i> AGL1 Zellen.....	26
2.2.5.6	Transformation	27
2.2.5.6.1	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Hitze-Schock	27
2.2.5.6.2	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> durch Elektroporation	27

2.2.5.6.3	Transformation von <i>P. somniferum</i> L.....	27
2.2.5.7	Blau/Weiß-Selektion	28
2.2.5.8	Bakteriendauerkultur	28
2.2.6	DNA-Amplifikation.....	29
2.2.6.1	Ableitung synthetischer Oligonukleotide	29
2.2.6.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.2.6.3	Amplifikation putativer Promotoren aus <i>P. somniferum</i> L.....	30
2.2.6.3.1	Konstruktion der „Genome Walker Libraries“	30
2.2.6.3.2	„Genome Walking“	31
2.2.6.4	Amplifikation von 5'-cDNA Enden	33
2.2.6.4.1	Dephosphorylierung, Entfernung der Cap-Struktur und Ligation des Adapters	33
2.2.6.4.2	cDNA-Synthese und Amplifikation der 5'-UTR	34
2.2.7	DNA-Sequenzierung.....	36
2.2.8	Sequenzierung unter Verwendung von Transposons	37
2.2.9	„Real Time“ RT-PCR Analyse von Transkripten aus <i>P. somniferum</i> L.	37
2.2.9.1	DNase Verdau	37
2.2.9.2	cDNA Synthese	38
2.2.9.3	„Real Time“ Aufnahme der DNA Amplifikation.....	38
2.2.9.4	Quantifizierung der „Real Time“ RT-PCR Messungen.....	39
2.2.10	Bestäubung und Samenernte von <i>P. somniferum</i> L.....	39
2.2.11	Chromatographie.....	40
2.2.11.1	Isolierung von Alkaloiden aus dem Milchsaft von <i>P. somniferum</i> L. für die Chromatographie ..	40
2.2.11.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	40
2.2.11.3	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	40
2.2.11.4	Quantifizierung der HPLC-Analysen	41
2.2.11.5	LC/ESI-MS/TOF	41
2.2.11.6	LC/ESI-MS/SRM	42
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Vektorkonstruktion und Gewinnung der <i>salAT</i> RNAi Pflanzen durch Transformation von <i>P. somniferum</i> L.....	43
3.1.1	Konstruktion der RNAi Vektoren	43
3.1.2	Transformation von <i>P. somniferum</i> L. und Regeneration von Pflanzen	43
3.1.3	Überprüfung der Transformation	45
3.2	Analyse des Wildtyps.....	46
3.2.1	Untersuchung des Genotyps mittels „Southern blot“	46
3.2.2	Untersuchungen zum Transkriptionsverhalten.....	47
3.2.3	Analyse der Latex-Alkaloide im Wildtyp	47
3.3	Analyse der T₀-Generation.....	49
3.3.1	Untersuchung des Genotyps mittels „Southern blot“	49
3.3.2	Untersuchungen zum Transkriptionsverhalten des Gens <i>salAT</i>	50
3.3.2.1	Auswahl des geeigneten Materials und der Methode	50
3.3.2.2	„Real Time“ RT-PCR Analyse der <i>salAT</i> RNAi Pflanzen	50
3.3.3	Analyse der Latex-Alkaloide in <i>salAT</i> RNAi Pflanzen.....	51
3.3.3.1	HPLC-Analyse	51
3.3.3.2	Analyse mittels LC/ESI-MS/SRM	53
3.4	Analyse der T₁-Generation.....	54
3.4.1	Untersuchungen zum Genotyp.....	55
3.4.2	Untersuchungen zum Transkriptionsverhalten.....	57
3.4.2.1	„Northern blot“-Analyse	57
3.4.2.2	„Real Time“ RT-PCR.....	58
3.4.3	Analyse der Latex-Alkaloide	60
3.5	Isolierung regulatorischer Regionen verschiedener Gene der Alkaloid-Biosynthese in <i>P. somniferum</i> L. und Datenbankvergleich.....	63
3.5.1	Isolierung regulatorischer Regionen der Gene <i>cyp80b3</i> , <i>cor</i> , <i>cpr</i> und <i>salAT</i>	63

3.5.2	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes	63
3.5.3	Vergleich der isolierten Sequenzen mit bekannten Promotoren	64
3.5.4	Sequenzanalyse mittels „blastn“ und „blastx“	65
3.5.5	Ermittlung <i>cis</i> -regulierende Elemente mit Hilfe von Datenbanken	67
3.5.5.1	Der Kernpromotor	67
3.5.5.2	Weitere <i>cis</i> -regulierende Elemente.....	67
4	DISKUSSION	70
4.1	Die Transformation von <i>P. somniferum</i> L.	71
4.2	Konstitutiver oder genspezifischer Promotor?	72
4.3	Die Analyse der T ₀ -Generation ist nicht ausreichend.....	74
4.4	Die Stilllegung von <i>SalAT</i> führt zur Akkumulation der Intermediate Salutaridin und Salutaridinol.....	74
4.5	Die Einführung des <i>salAT</i> RNAi Transgens führt nicht zur Reduktion von Morphin.....	76
5	ZUSAMMENFASSUNG	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	80
7	ANHANG	

Verwendete Abkürzungen

AcCoA	Acetyl-Coenzym A
BBE	Berberinbrückenenzym
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CaMV	Blumenkohl Mosaik Virus
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
COR	Codeinon-Reduktase
CPR	NADPH: Cytochrom-P450-Reduktase
CYP80B1	(<i>S</i>)- <i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (<i>Eschscholzia californica</i>)
CYP80B3	(<i>S</i>)- <i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (<i>Papaver somniferum</i>)
2,4 D	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	didestilliertes Wasser
ddNTP	2'-3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EST	“expressed sequence tag”
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
m	Meter
M	molar, mol/l
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ RNA, Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
N	Normalität, normal
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form
NCS	(<i>S</i>)-Norcoclaurin-Synthase
NMT	(<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase
NOS	Nopalin-Synthase
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferase II
OCS	Octopin-Synthase
OD	optische Dichte
OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
PCR	Polymerasekettenreaktion

<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pty Ltd	Proprietary limited company (Australien)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
SAH	(<i>S</i>)-Adenosyl-L-Homocystein
SalAT	Salutaridinol-7- <i>O</i> -Acetyltransferase
SalR	Salutaridin-Reduktase
SAM	(<i>S</i>)-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TOFMS	Flugzeitmassenspektrometer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TYDC	Tyrosin-/DOPA- Decarboxylase
U	„unit“ (Einheit)
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Alkaloide - Begriff, Vorkommen und Verwendung

Der Begriff Alkaloid („Alkali-ähnlich“) wurde 1819 durch den Apotheker C.F.W. Meissner geprägt. Der Name leitete sich von dem arabischen Wort „*al-qali*“, der Pflanze aus der erstmals Soda gewonnen wurde, ab und bezieht sich dabei auf die zumeist basische Natur dieser Pflanzenstoffe. Später wurden auch sauer oder neutral reagierende Verbindungen, wie Coffein, Theophyllin, Theobromin oder Ricinin mit einbezogen. Eine modernere Definition bezeichnet meist heterozyklische, organische Verbindungen, die wenigstens ein Stickstoff-Atom in negativer Oxidationsstufe enthalten und eine hohe biologische Aktivität bei geringen Konzentrationen aufweisen, als Alkaloide. Der Stickstoff wird im Allgemeinen von einer Aminosäure (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin, Lysin, Ornithin, Aspartat) auf verschiedenen Reaktionswegen in den Heterozyklus eingefügt und ist die Ursache der häufig auftretenden Basizität dieser Verbindungen. Daneben finden auch die Begriffe Proto- und Pseudoalkaloide Verwendung. Protoalkaloide sind einfache Amine, in denen die Stickstoffgruppe der Aminosäure nicht in den heterozyklischen Ring integriert ist. Pseudoalkaloide dagegen stammen nicht von Aminosäuren ab (Steroid-Alkaloide oder Purin-Alkaloide). Die Stickstoff-Heterozyklen der Grundskellette der Alkaloide können als Klassifizierungsmerkmal genutzt werden. Andererseits wird seltener auch die Aminosäure, von der das jeweilige Alkaloid abstammt, zur Klassifizierung heran gezogen.

Von den bisher über 10.000 bekannten Alkaloiden kommen die meisten in höheren Pflanzen (besonders Dicotyledoneae) vor. Alkaloide wurden jedoch auch in Bakterien (*Pseudomonas spp.*), Algen (Dinoflagellata), Moosen (*Lycopodium spp.*), Pilzen (*Claviceps spp.*) oder Tieren (*Bufo marinus*) gefunden. Nicht immer synthetisiert der Organismus, in dem das Alkaloid gefunden wird, die Verbindung selbst. So können Muscheln und einige Fischarten neurotoxische Gifte, Saxitoxine, anreichern, die beim Verzehr Mytilismus (Muschelvergiftung) verursachen. Die eigentliche Quelle der Toxine sind jedoch Dinoflagellaten (Sakamoto *et al.*, 1987). Auch das Nervengift Tetrodotoxin, ein Alkaloid aus der Imidazolin- und Pyrimidingruppe, wird vor allem bei Kugelfischen, Igelfischen und anderen Familien der Tetraodontiformes, aber auch in einigen Krebsen, Schnecken, Seesternen und sogar in einer Krakenart gefunden. Aufgrund des Auftretens in mehreren, nicht eng verwandten Arten wird spekuliert, dass die Tiere das Gift nicht selbst synthetisieren, sondern durch Bakterien aufnehmen. Bakterien, die Tetrodotoxin synthetisieren können (*Pseudomonas*, *Vibrio* oder *Pseudoalteromonas*) wurden auf der Haut von Kugelfischen gefunden (Daly, 2004). Auch Pfeilgiftfrösche nehmen die sie schützenden Gifte mit ihrer Nahrung auf und speichern sie in ihren Drüsen. Eine Analyse von Milben aus Costa Rica und Panama ergab, dass diese mehr als 80 verschiedene Alkaloide enthielten (Saporito *et al.*, 2007). 41 dieser Verbindungen wurden auch im Pfeilgiftfrosch *Oophaga pumilio* gefunden. Bekannt ist jedoch nicht, ob die Milben die Sekundärmetabolite selbst synthetisieren oder wiederum über ihre Diät von Pflanzen zu sich nehmen. Ein nicht-marines Beispiel sind Insekten (Lepidoptera, Coleoptera usw.), die Pyrrolizidinalkaloide verschiedener Pflanzen für ihre eigene Abwehr verwenden (Hartmann, 1999). So nehmen die Larven des Bärenspinners, *Utetheisa ornatrix*, die Alkaloide über ihre Hauptfutterpflanze, *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae), auf und speichern sie während ihrer Metamorphose zum Schmetterling. Die schützenden Alkaloide werden von beiden Elternteilen an ihre Brut weiter gegeben, wo sie als Appetitanreger wirken und die Larvenentwicklung verkürzen. Die Alkaloide beeinflussen sogar das Paarungsverhalten der Schmetterlinge. Campo *et al.* (2005) stellten weiterhin fest, dass die Sekundärstoffe der Pflanze das Leben der weiblichen Bärenspinner verkürzen.

Es wurde geschätzt, dass etwa 15-30 % aller Pflanzenarten Alkaloide zu produzieren vermögen (Kapoor, 1995). In etwa 40 % aller Pflanzenfamilien existiert mindestens eine Alkaloid-produzierende Pflanze (Cordell, 1981). Die Papaveraceae stellen eine Besonderheit dar, indem alle Arten dieser Familie, die bisher untersucht worden sind, Alkaloide besaßen. Häufig weisen die Mitglieder einer Pflanzenfamilie strukturell ähnliche Alkaloide auf, die von der gleichen Aminosäure abgeleitet sind. So akkumulieren Papaveraceen Benzylisochinolinalkaloide, viele Gattungen der Solanaceen Tropanalkaloide und die Mitglieder der Apocynaceen und Loganiaceen Monoterpen-Indolalkaloide.

Das anthropogene Interesse an den Alkaloiden beruht auf ihrer physiologischen Wirkung auf den menschlichen und/oder tierischen Organismus. Häufig erweisen sich Alkaloide als potente Arzneistoffe, unter anderem bei der Behandlung von Krebs. Ein Beispiel ist das in der Chemotherapie bei Ovarial-, Mamma-, Bronchial- oder Prostatakarzinomen verwendete Paclitaxel (Taxol®) (**Abb. 1-1**).

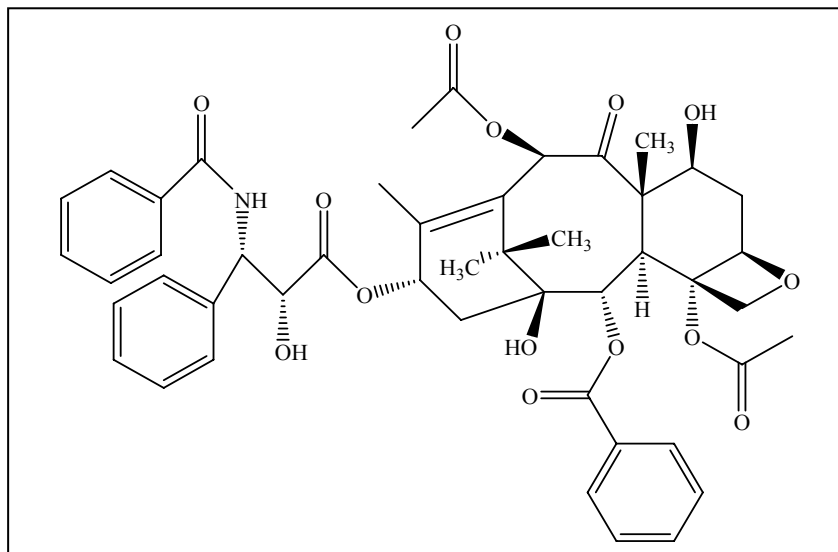


Abb. 1-1 Strukturformel des Paclitaxel (Taxol®)

Es wurde erstmals 1967 aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert (Wani *et al.*, 1971). Seine Wirkung beruht auf der Störung des Abbaus der Mikrotubuli während der Mitose. Im Gegensatz dazu hemmen die Alkaloide Demecolcin und Colchicin (**Abb. 1-2**) aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) bzw. Vinblastin und Vincristin (**Abb. 1-2**) aus *Catharanthus roseus* den Aufbau der Mikrotubuli. Ein weiteres Alkaloid, das in der Medizin als Zytostatikum eingesetzt wird, ist das Camptothecin (**Abb. 1-2**), das aus *Camptotheca acuminata* isoliert wird. Es bewirkt als Topoisomerasehemmer irreguläre, nicht behebbare DNA-Brüche und spontane Vernetzungen. Andere prominente Alkaloide wie das Koffein und das Nikotin (**Abb. 1-2**) begegnen uns täglich.

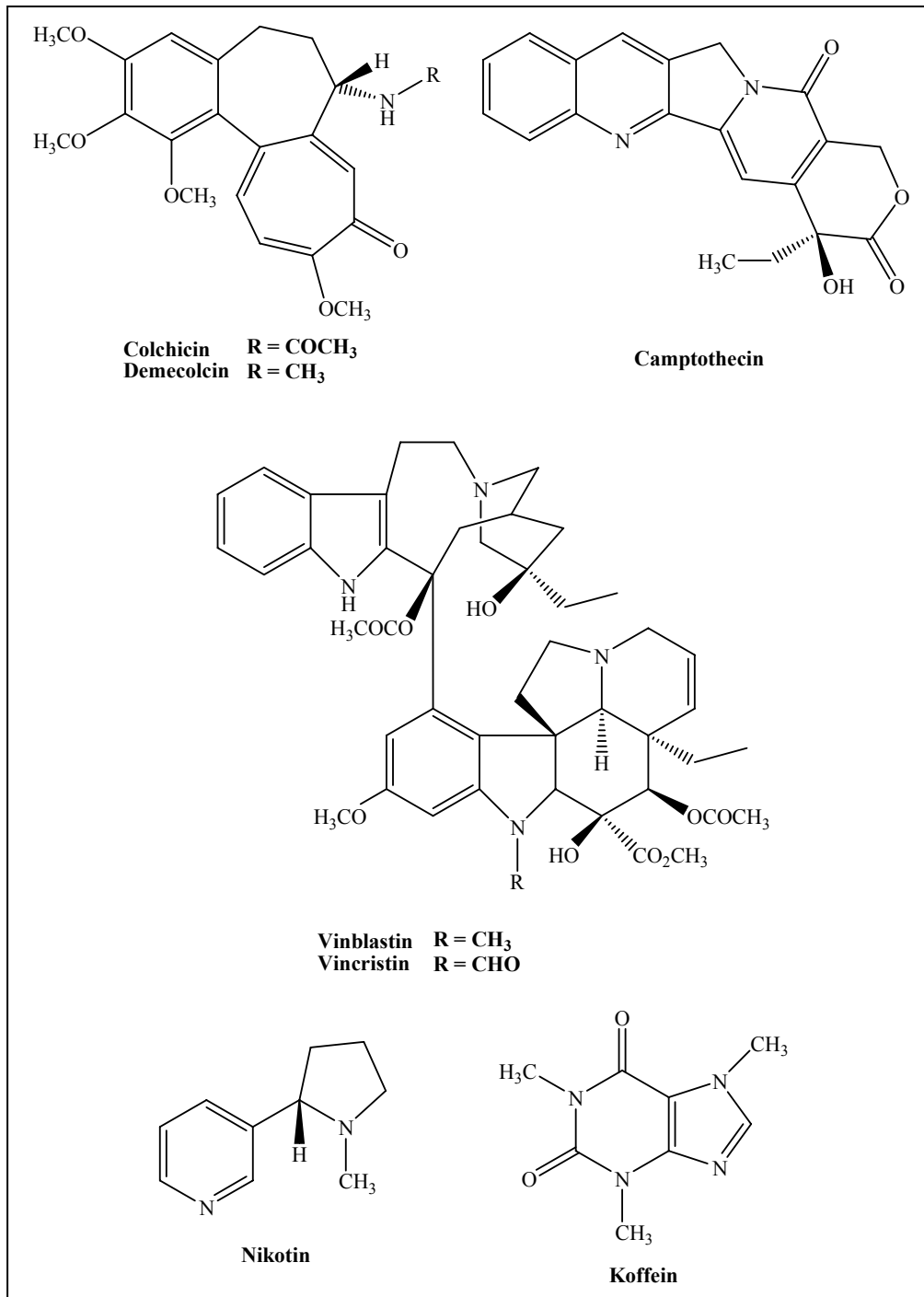


Abb. 1-2 Strukturen einiger pharmakologisch und kommerziell bedeutender Alkaloide aus Pflanzen.

1.2 Die Alkaloide des *Papaver somniferum* L.

Der Schlafmohn, eine der ältesten dem Menschen bekannten Arzneipflanzen, enthält eine Reihe verschiedener Benzylisochinolin-, Morphinan- und Benzo[*c*]phenanthridinalkaloide. Durch jahrhundert lange Kultivierung der Pflanze unterscheidet sich die Zusammensetzung der Alkaloide von Sorte zu Sorte erheblich (Frick *et al.*, 2005). Vorkommende Alkaloide sind unter anderem Morphin, Codein, Thebain, Retikulin, Noscapin und Papaverin. Morphin wurde als erstes Alkaloid 1804 durch M. A. Séguin und unabhängig davon von F. W. A.

Sertürner im Jahre 1806 aus der Pflanze isoliert. Erst mehr als 100 Jahre nach seiner Entdeckung wurde die Struktur des Morphins durch Gulland und Robinson (1923) aufgeklärt. Der definitive Beweis dieser Struktur wurde jedoch erst in den 1960er Jahren durch Röntgenkristallographie erbracht. Seinen Namen verdankt die Substanz Morpheus, dem griechischen Gott des Traumes, aufgrund seiner sedativen Wirkung. Die Bedeutung des Schlafmohns für die griechische Kultur ist bekannt. In Darstellungen von Morpheus und Hypnos, dem Gott des Schlafes, sind die Figuren häufig mit der Pflanze abgebildet. Der griechische Arzt und Anatom Galenos von Pergamon, der nahezu 400 Schriften verfasste, die bis ins 17. Jahrhundert und darüber hinaus als medizinische Lehrgrundlage dienen, empfahl die Anwendung des Schlafmohnsaftes bei Kopfschmerzen, Taubheit, Epilepsie, Asthma, Husten, Koliken, Fieber, Frauenbeschwerden und Melancholie. Auch heute noch findet Morphin als eines der stärksten bekannten Analgetika Anwendung. Es bindet an die Opiatrezeptoren im menschlichen Gehirn und unterdrückt somit das Schmerzempfinden. Das Manko dieses „Geschenktes der Götter“ ist sein starkes Suchtpotential, das jedoch bei Verabreichung unter strenger ärztlicher Kontrolle unterbunden werden kann. Auch andere Alkaloide des *P. somniferum* haben Bedeutung in der Pharmazie erlangt. So wird Codein als Analgetikum und Antitussivum und Papaverin als Spasmolytikum angewandt. Thebain wird industriell zur Synthese verschiedener Analgetika wie Oxycodon, Nalbuphin und Buprenorphin oder von Opioidantagonisten (z.B. Naloxon, Naltrexon), die im Falle lebensbedrohlicher Opiatintoxikationen verabreicht werden, verwendet.

1.3 Die Biosynthese der Schlafmohnalkaloide

Die Aufklärung der Alkaloidbiosynthese begann Ende der 1950er Jahre mit der Einführung der Tracertechnik. Inzwischen konnte die Biosynthese vieler Alkaloide des *Papaver* auf enzymatischem Niveau aufgeklärt werden (Kutchan, 1998). Zudem wurden eine Reihe der beteiligten Gene kloniert.

Der Biosyntheseweg der Benzylisochinolin-, Benzo[*c*]phenanthridin- und Morphinanalkaloide kann in zwei Teile unterteilt werden. Der erste Teil ist allen dieser Alkaloide gemein und führt zu einem Verzweigungspunkt, dem (*S*)-Retikulin. Von diesem Intermediat aus teilt sich die Biosynthese in die verschiedenen Alkaloidklassen.

1.3.1 Die Biosynthese des (*S*)-Retikulin

Als Vorstufe des (*S*)-Retikulin konnte das (*S*)-Norcoclaurin identifiziert werden (Stadler *et al.*, 1987). Es wird über eine Kondensation von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd durch die (*S*)-Norcoclaurin-Synthase (NCS) gebildet (**Abb. 1-3**). Eine cDNA aus *Thalictrum flavum* („Gelbe Wiesenraute“, Ranunculaceae) und *P. somniferum*, die eine hohe Homologie zu einem Gen der PR („pathogenesis-related“) 10 Familie aufweist und dessen Translationsprodukt die Aktivität der NCS besitzt, wurde isoliert (Samanani *et al.*, 2004; Liscombe *et al.*, 2005). Minami *et al.* (2007) fanden in *Coptis japonica* (Ranunculaceae) neben der PR10 Homologen (CjPR10A) ein zweites Enzym, das die Kondensation von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd katalysiert (CjNCS1). Die beiden Enzyme wiesen allerdings unterschiedliche Eigenschaften und Substratspezifitäten auf. CjNCS1 besitzt im Gegensatz zu CjPR10A eine Domäne, die Genen der Digoxygenase-Familie typisch ist, und eine Bindungsstelle für Eisenionen. CjPR10A akzeptiert auch Dopamin und 4-Hydroxyphenylpyruvat als Substrate für die Bildung des (*S*)-Norcoclaurins. Beide Enzyme arbeiten regiospezifisch. Zudem enthalten die PR10A Homologen aus *Coptis* und *Thalictrum* ein N-terminales Signalpeptid und sind daher vermutlich in Vesikeln lokalisiert (Samanani *et*

al., 2004). Die meisten anderen Enzyme der frühen Isochinolinbiosynthese sind dagegen zytosolisch. Daher kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei der NCS-Aktivität der isolierten cDNA aus *P. somniferum* um einen Artefakt handelt und ein weiteres Enzym die hauptsächliche NCS-Aktivität *in vivo* katalysiert.

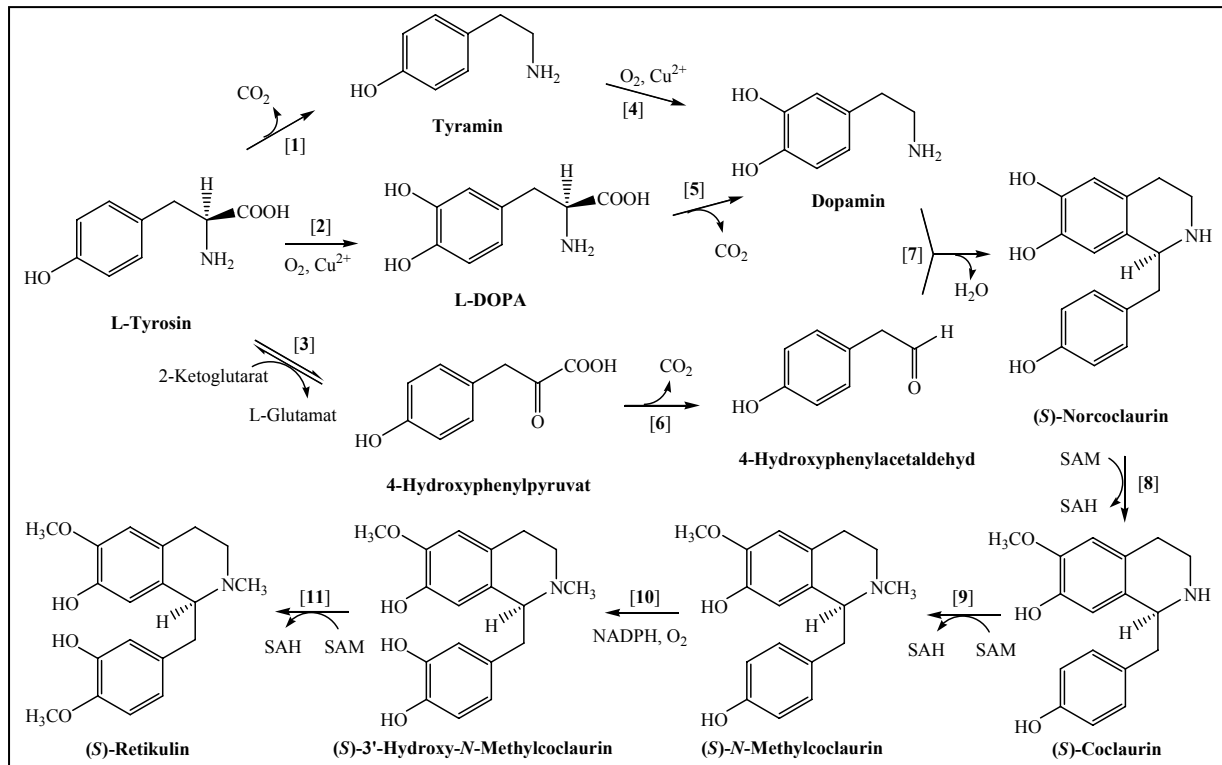


Abb. 1-3 Die Biosynthese von (*S*)-Retikulin ausgehend von L-Tyrosin.

- | | |
|---|--|
| [1] L-Tyrosin-Decarboxylase | [2] Phenoloxidase |
| [3] L-Tyrosin-Transaminase | [4] Phenoloxidase |
| [5] L-DOPA-Decarboxylase | [6] 4-Hydroxyphenylpyruvat-Decarboxylase |
| [7] (<i>S</i>)-Norcoclaurin-Synthase | [8] (<i>R,S</i>)-Norcoclaurin-6- <i>O</i> -Methyltransferase |
| [9] (<i>S</i>)-Coclaurin- <i>N</i> -Methyltransferase | [10] (<i>S</i>)- <i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase |
| [11] (<i>S</i>)-3'-Hydroxy- <i>N</i> -Methylcoclaurin-4'- <i>O</i> -Methyltransferase | |

Die Bildung des 4-Hydroxyphenylacetaldehyd verläuft über eine Transaminierung des L-Tyrosins zu 4-Hydroxyphenylpyruvat und eine anschließende Decarboxylierung (Rüffer und Zenk, 1987) (**Abb. 1-3**). Dopamin kann über zwei verschiedene Wege aus L-Tyrosin gebildet werden. Entweder erfolgt die Umsetzung über eine Decarboxylierung zu Tyramin und folgender Hydroxylierung in 3'-Position zu Dopamin oder die Hydroxylierung am Phenolring erfolgt zuerst, wobei L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) entsteht, welches danach zu Dopamin decarboxyliert wird (**Abb. 1-3**). In Schlafmohn wurden mehrere cDNAs, die für die Tyrosin-/DOPA-Decarboxylase (TYDC) kodieren, identifiziert (Facchini und DeLuca, 1994 und 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 1996). An der weiteren Synthese ausgehend von (*S*)-Norcoclaurin zu (*S*)-Retikulin sind eine Hydroxylase, zwei *O*-Methyltransferasen und eine *N*-Methyltransferase beteiligt (**Abb. 1-3**). Die (*R,S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT) konnte erstmals aus Suspensionszellen von *Argemone platyceras* („Stachelmohn“, Papaveraceae) partiell gereinigt werden (Rüffer *et al.*, 1983). Die Klonierung von cDNAs und Charakterisierung der 6OMT gelang für *Thalictrum tuberosum* (Ranunculaceae) (Frick und Kutchan, 1999), *C. japonica* (Morishige *et al.*, 2000) und *P. somniferum* (Ounaroon *et al.*, 2003). Die (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase (NMT) wurde aus *C. japonica* Zellkulturen kloniert und charakterisiert (Choi *et al.*, 2002). Die Hydroxylierung erfolgt durch eine

Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase, die erstmals aus *Eschscholzia californica* („Kalifornischer Mohn“) kloniert wurde (Pauli und Kutchan, 1998). Die cDNA der (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase aus *P. somniferum* (CYP80B3) wurde 2000 von Huang und Kutchan isoliert. Beide Enzyme hydroxylieren ausschließlich (*S*)-*N*-Methylcoclaurin. Die abschließende 4'-Methylierung wird durch die 3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'OMT) katalysiert. Dieses Enzym wurde aus *C. japonica* (Morishige *et al.*, 2000) und *P. somniferum* (Ziegler *et al.*, 2005) kloniert und charakterisiert.

1.3.2 Das zentrale Intermediat (*S*)-Retikulin

Wie bereits erwähnt ist (*S*)-Retikulin ein Verzweigungspunkt, aus dem verschiedene Biosynthesepfade unter anderem zum Morphin, Protopin, Sanguinarin, Corydalin und Noscapin resultieren. Im Milchsaft des Schlafmohns werden neben den Hauptalkaloiden auch die Benzylisochinolinalkaloide Laudanin und Laudanosin gefunden. Laudanin wird dabei aus (*R,S*)-Retikulin durch die (*R,S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7OMT) synthetisiert. Eine cDNA dieses Enzyms wurde aus Schlafmohn kloniert (Ounaroon *et al.*, 2003). Die Methylierung der 3'-Hydroxygruppe des Laudanins führt zur Bildung des Laudanosins (**Abb. 1-4**). Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert ist jedoch noch nicht isoliert worden.

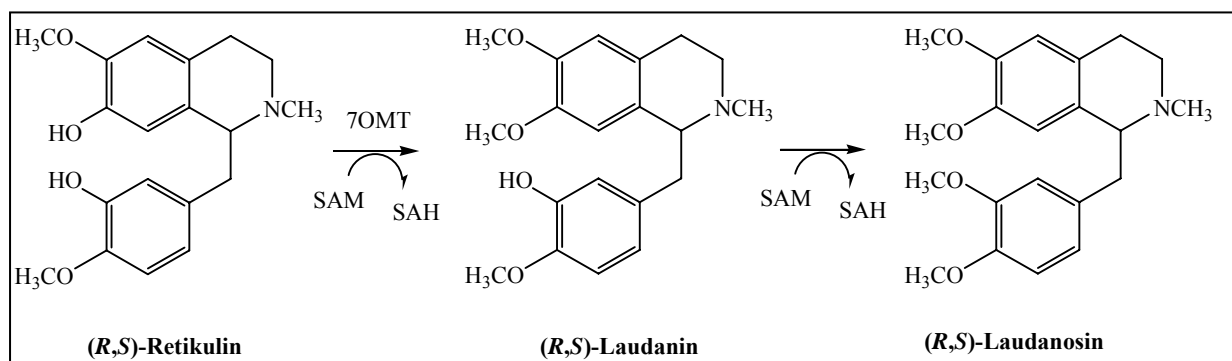


Abb. 1-4 Die Biosynthese von Laudanin und Laudanosin aus (*R,S*)-Retikulin

Das (*S*)-konfigurierte Retikulin kann durch einen intramolekularen Ringschluss zwischen der *N*-Methylgruppe und dem Kohlenstoff in 2'-Position des Phenylrings in (*S*)-Scoulerin überführt werden (**Abb. 1-5**), aus dem unter anderen die Benzo[*c*]phenanthridine, Protoberberine und Protopine gebildet werden können.

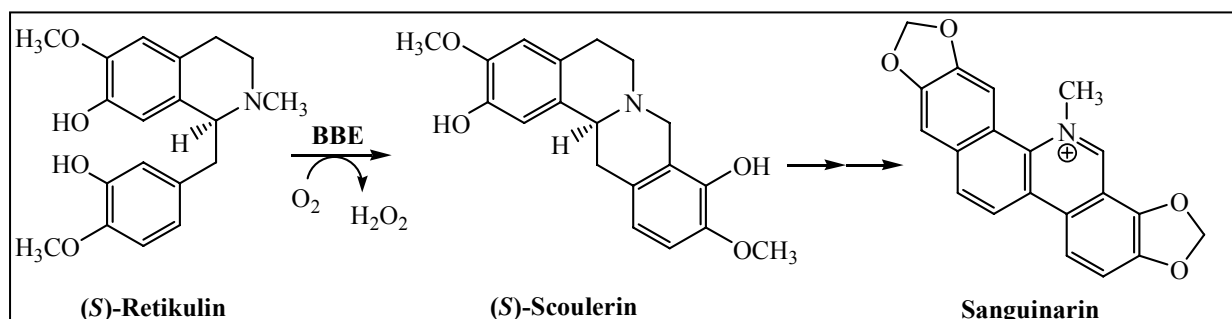


Abb. 1-5 Die Biosynthese von (*S*)-Scoulerin, einem Intermediat der Sanguinarin-Biosynthese, aus (*S*)-Retikulin.

Die Bildung dieser Brücke wird durch das Berberinbrückenenzym (BBE) katalysiert, das erstmals aus Zellkulturen von *Macleaya microcarpa* („Federmohn“, Papaveraceae)

beschrieben (Rink und Böhm, 1975) und aus Zellkulturen von *Berberis beaniana* (Berberidaceae) isoliert und charakterisiert (Steffens *et al.*, 1985) wurde. Der cDNA-Klon des Enzyms wurde zunächst aus *E. californica* (Dittrich und Kutchan, 1991) und später aus *P. somniferum* (Huang und Kutchan, 2000) und *Berberis stolonifera* (Berberidaceae) (Chou und Kutchan, 1998) isoliert. In *P. somniferum* werden neben den hauptsächlich auftretenden Benzylisochinolinalkaloiden auch (*S*)-Scoulerin im Milchsaft und das Benzo[*c*]phenanthridin Sanguinarin (Abb. 1-5) in den Wurzeln der Pflanzen gefunden. Auf die Biosynthese von Sanguinarin (Kutchan, 1998) soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

1.3.3 Der Morphin-spezifische Biosyntheseweg

Strukturell zeigt das pentazyklische Morphin eine hohe Komplexität mit einer Reihe funktioneller Gruppen (Amino-, Hydroxyl-, Olefin- und Ethergruppen). Es besitzt 5 chirale Zentren, die für die pharmakologische Wirkungsweise entscheidend sind. Für den Aufbau des Morphinan-Gerüsts ist die (*S*)-Konfiguration des Retikulins ungeeignet. Daher wird zunächst das (*R*)-Retikulin unter Ausbildung des 1,2-Dehydroretikulinium-Ions aus (*S*)-Retikulin gewonnen (Abb. 1-6). Die Oxidation des (*S*)-Retikulins zum Ion wird durch die 1,2-Dehydroretikulin-Synthase katalysiert, die aus Keimlingen des *P. somniferum* partiell gereinigt und charakterisiert werden konnte (Hirata *et al.*, 2004). Das Enzym benötigt keinen Redox-Cofaktor und akzeptiert sowohl (*S*)-Retikulin als auch (*S*)-Norretikulin als Substrate. Das intermediate Ion wird anschließend stereospezifisch durch die 1,2-Dehydroretikulinium-Ion-Reduktase zum (*R*)-Retikulin reduziert (De-Eknamkul und Zenk, 1990). In den nächsten Schritten wird das trizyklische (*R*)-Retikulin zum pentazyklischen Thebain umgewandelt (Abb. 1-6).

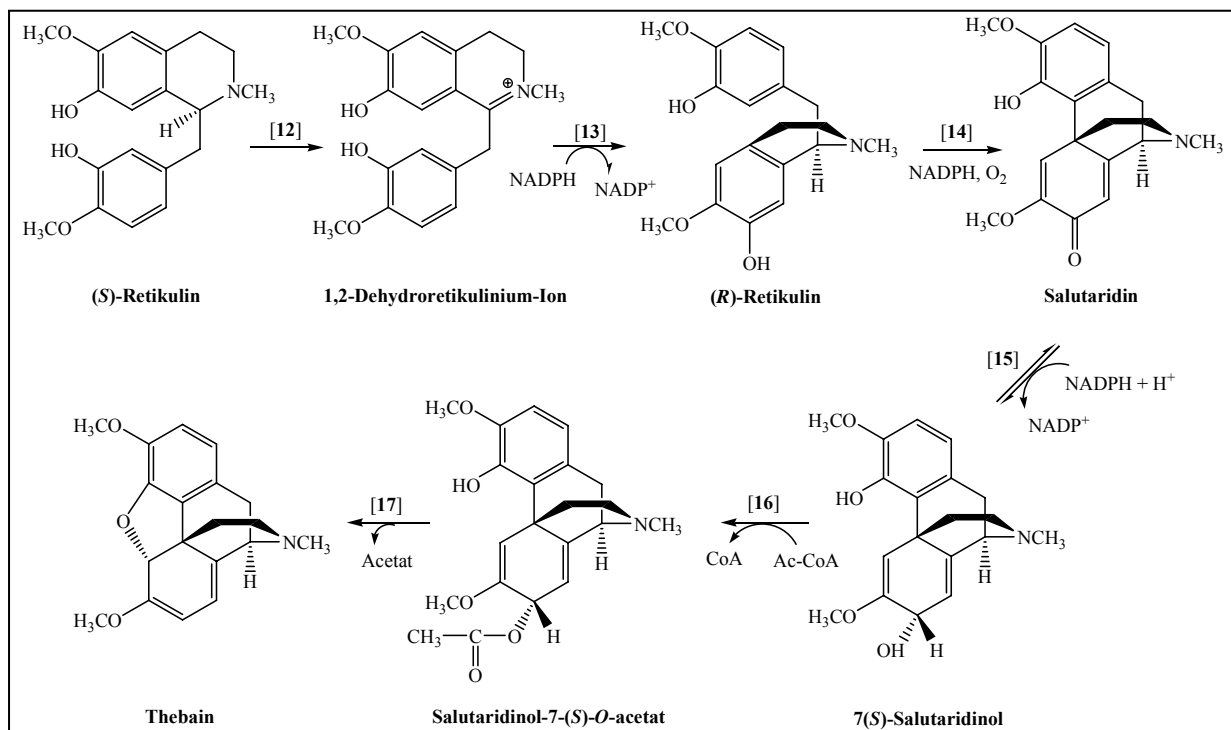


Abb. 1-6 Die Biosynthese von Thebain aus (*S*)-Retikulin.

- | | |
|---|--|
| [12] 1,2-Dehydroretikulin-Synthase | [13] 1,2-Dehydroretikulinium-Ion-Reduktase |
| [14] Salutaridin-Synthase | [15] Salutaridin-Reduktase |
| [16] Salutaridinol-7- <i>O</i> -Acetyltransferase | [17] Thebain-Synthase |

Der intramolekulare Ringschluss zwischen C12 und C13 durch eine oxidative *ortho-para*-Phenolkopplung zum tetrazyklischen Salutaridin wird durch die Salutaridin-Synthase, einer Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenase, katalysiert (Gerardy und Zenk, 1993a). Es ist dieser Schritt, der die Synthese des Morphins so problematisch macht. Salutaridin wird anschließend stereoselektiv zu 7(*S*)-Salutaridinol reduziert (Gerardy und Zenk, 1993b). Das beteiligte Enzym, die Salutaridin-Reduktase (SalR), konnte unlängst kloniert und charakterisiert werden (Ziegler *et al.*, 2006). Zur Ausbildung des letzten Ringes wird das Salutaridinol zunächst durch Acetylierung aktiviert. Dabei überträgt die Salutaridinol-7-*O*-Acetyltransferase (SalAT) eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die 7(*S*)-Hydroxylgruppe des Salutaridinols (Lenz und Zenk, 1995a; Grothe *et al.*, 2001). Das dabei entstehende Salutaridinol-7-*O*-Acetat ist eine sehr reaktive Verbindung, die sich in wässriger Lösung bei pH 7,0 spontan zu einem Dibenz[*d,f*]azonin-Alkaloid umsetzt (Lenz und Zenk, 1994). Aus dem acetylierten Intermediat wird *in vivo* unter Acetatelimination eine Etherbrücke zwischen C4 und C5 geschlossen und das Produkt Thebain gebildet. Das an dieser Reaktion beteiligte Enzym, die Thebain-Synthase, konnte aus der zytosolischen Milchsaffraktion angereichert werden (Grothe, 2002; Fisinger, 2007).

In einigen Sorten des *P. somniferum* wurde sowohl Codein als auch Oripavin gefunden. In diesen Pflanzen erfolgt die Morphinbiosynthese ausgehend von Thebain über zwei verschiedene Biosynthesepfade (**Abb. 1-7**). Der „klassische“ Biosyntheseweg (Stermitz und Rapoport, 1961) beginnt mit der 6-*O*-Demethylierung des Thebains zu Neopinon, das ohne Beteiligung eines Enzyms zu Codeinon isomerisieren kann (Gollwitzer *et al.*, 1993). Das Codeinon wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Codein reduziert (Lenz und Zenk, 1995b und 1995c). Das Enzym, das diese Reduktion katalysiert, ist die Codeinon-Reduktase (COR). Die Klonierung dieses Proteins gelang aus Zellkulturen des *P. somniferum* (Unterlinner *et al.*, 1999). Im letzten Schritt wird das Codein durch 3-*O*-Demethylierung zu Morphin umgesetzt. Im alternativen Biosyntheseweg (Brochmann-Hanssen, 1984) wird das Thebain bereits im ersten Schritt 3-*O*-demethyliert. Das Reaktionsprodukt Oripavin wird anschließend am C6 zu Morphinon demethyliert. Die abschließende Reduktion zum Morphin kann ebenso durch COR katalysiert werden (Lenz und Zenk, 1995c; Unterlinner *et al.*, 1999). Die an den *O*-Demethylierungsreaktionen beteiligten Enzyme konnten bisher noch nicht identifiziert werden.

Aus Zellsuspensionskulturen des *Papaver* konnte eine Cytochrom-P-450-Reduktase (CPR) isoliert und aus *P. somniferum* und *E. californica* kloniert werden. Eine Co-Expression der *Eschscholzia* CPR mit der Berbamin-Synthase aus *Berberis stolonifera* in Insektenzellen zeigte eine Verschiebung des Verhältnisses der Produkte Berbamin und Guattegaumerin (Rosco *et al.*, 1997). Die Co-Expression mit CYP80B1 führte zu einer mehr als 3-fachen Steigerung der Hydroxylase-Aktivität (Pauli und Kutchan, 1998).

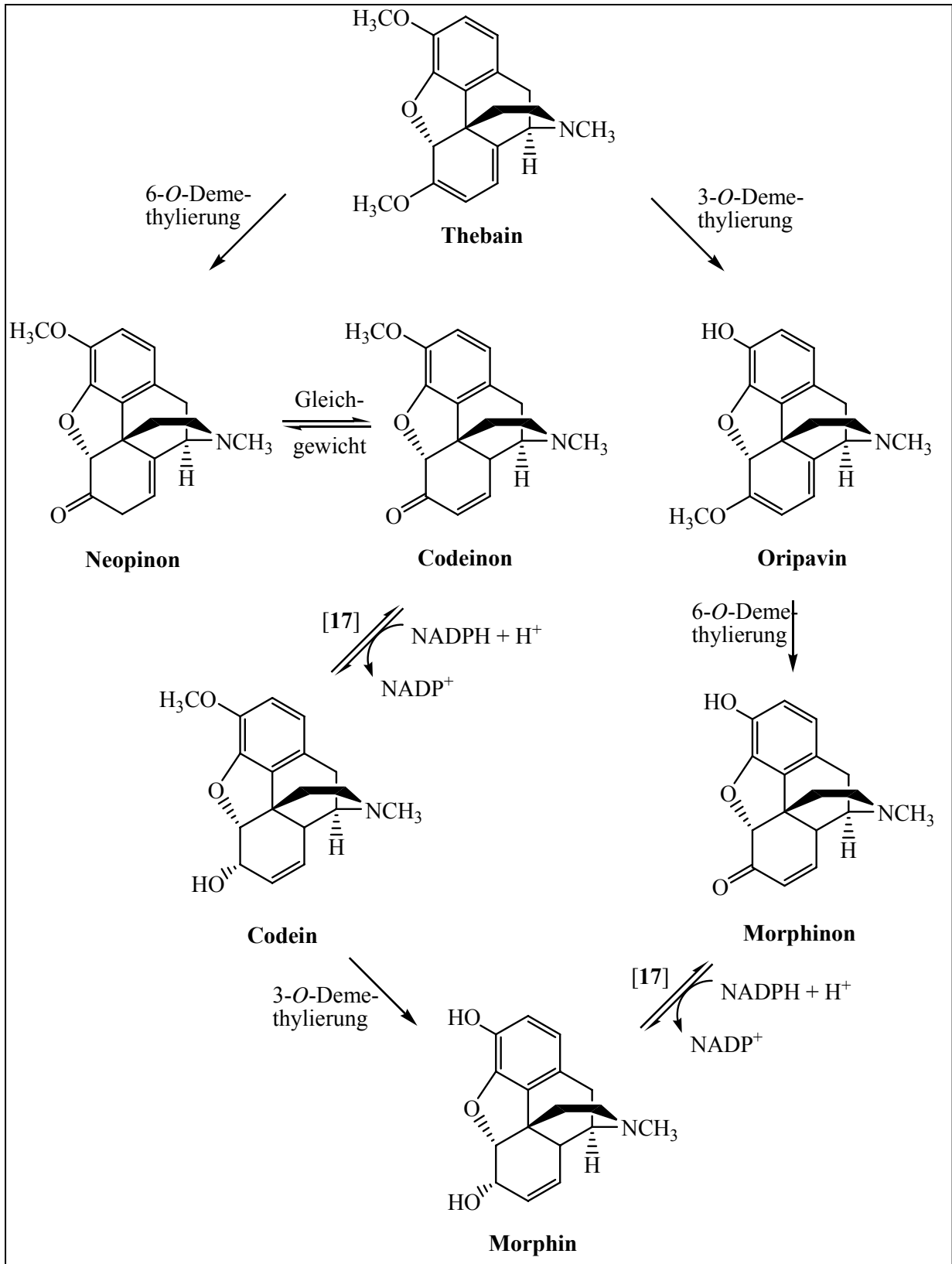


Abb. 1-7 Die Biosynthese von Morphin aus Thebain
 [17] Codeinon-Reduktase

1.4 Die Regulation der Benzylisochinolin- und Benzo[c]phenanthridin-alkaloid-Biosynthese

Über die Regulation der Benzylisochinolinalkaloid-Biosynthese ist zurzeit nur wenig bekannt. Bisherige Erkenntnisse wurden durch biotechnologische Eingriffe in die Pflanze (sogenanntes „metabolic engineering“) gewonnen. Dabei wurden zusätzliche Kopien von Genen, deren Translationsprodukte an der Biosynthese involviert sind, in die Pflanze eingeführt („sense“, Überexpression) oder die Translation entsprechender Gene unterdrückt. Die Suppression von Genen kann durch das Einschleusen eines Gens mit entgegengesetztem Leserahmen („antisense“) durchgeführt werden (Bourque, 1995). Neben der „antisense“-Technik erwies sich die „RNA Interferenz“ (RNAi) als weitaus effizientere Methode (Fire *et al.*, 1998). Inzwischen wird sie in vielen Organismen routinemäßig zur Suppression von Genen eingesetzt. Erst im letzten Jahr erhielten die Forscher Andrew Z. Fire und Craig C. Mello für die Entdeckung und Erforschung des RNAi-Prozesses den Nobelpreis. Der Mechanismus des RNAi beruht auf dem Auftreten von doppelsträngiger RNA (dsRNA) mit kodierenden Exon-Sequenzen in einem Organismus, der zu einer posttranskriptionellen Stilllegung von Genen führt (Plasterk, 2002). Die dsRNA wird dabei durch eine ATP-abhängige Ribonuklease der RNase III Familie (Dicer) zu doppelsträngigen kurzen RNA-Molekülen von 21-26 nt Länge, den siRNAs („small interfering RNAs“) abgebaut (Hamilton und Baulcombe, 1999; Voinnet, 2002). Die siRNAs werden anschließend an einen zweiten Enzymkomplex, RISC („RNA-induced silencing complex“) weiter gegeben. Dieser nutzt die Sequenz des „antisense“-Stranges, um eine komplementäre Sequenz, zum Beispiel die mRNA eines endogenen Gens, zu finden und abzubauen (Hammond *et al.*, 2000; Zamore, 2002).

Bisherige Erkenntnisse über die Regulation der Benzylisochinolin- und Benzo[c]phenanthridinalkaloid-Biosynthese

In *E. californica* wurden Zellkulturen mit „antisense“-Konstrukten der Gene *bbe* und *cyp80b1* (Park *et al.*, 2002) und Wurzelzellkulturen mit einem „sense“- und einem „antisense“-Konstrukt des Gens *bbe* aus *P. somniferum* (Park *et al.*, 2003) transformiert. Die „antisense“-Konstrukte führten in allen Fällen zu einer Reduktion der Menge an Benzo[c]phenanthridinalkaloiden. Eine Akkumulation von Intermediaten konnte nicht beobachtet werden. Die Zellkulturen zeigten zudem eine Erhöhung verschiedener Aminosäuren (Alanin, Leucin, Phenylalanin, Threonin, Valin). Die Menge an Tyrosin, der Aminosäure, von der die Biosynthese dieser Alkaloide ausgeht, war jedoch nur geringfügig erhöht. Die Wurzelkultur, in der *bbe* überexprimiert war, enthielt höhere Mengen der Alkaloide. Für beide transformierten Wurzelkulturen wurde eine Änderung der Mengen spezieller Aminosäuren festgestellt. Der Gesamtgehalt an Aminosäuren blieb gleich. Erst kürzlich wurde das Gen *bbe* in *E. californica* durch RNAi-Technik stillgelegt (Fujii *et al.*, 2007). Die Untersuchung der transgenen Zellkulturen zeigte eine reduzierte Konzentration der Endprodukte der Isochinolinbiosynthese wie Sanguinarin und die Akkumulation des Intermediates Retikulin. Zudem wurde Laudanin, das in unbehandelten Kontrollzellen kaum detektiert werden konnte, gefunden. Auch die Unterdrückung des endogenen Gens *bbe* in Schlafmohn durch „antisense“-Technik führte zu einer Erhöhung der Intermediate (*R,S*)-Retikulin, 1,2-Dehydretikulin, (*R,S*)-Laudanin, (*R,S*)-Laudanosin, Salutaridin und (*S*)-Scoulerin im Milchsaft der Pflanzen (Frick *et al.*, 2004). Die Benzo[c]phenanthridinalkaloide, die in geringen Mengen in den Wurzeln des Schlafmohns vorkommen, wurden nicht beeinflusst. In *P. somniferum* wurden auch die Auswirkungen der Überexpression bzw. der Unterdrückung des Gens *cyp80b3*, dass an der Biosynthese des Verzweigungspunktes (*S*)-

Retikulin beteiligt ist, untersucht (Frick *et al.*, 2007). Die Überexpression des Gens bewirkte eine bis zu 4,5-fache Steigerung der Alkaloidmenge im Milchsaft, die nur in einigen Fällen mit einer Änderung des Alkaloidprofils einherging. In mehreren Fällen konnte dabei eine erhöhte Transkriptmenge der Gene *cyp80b3*, *cpr*, *bbe*, *6omt*, *salat* und *cor* festgestellt werden. Die *cyp80b3*-„antisense“-Linien wiesen eine Erniedrigung von Alkaloiden im Milchsaft bis auf 16 % des Wildtyp-Niveaus auf, die mit einer Änderung des Alkaloidprofils verbunden war. Es wurde gezeigt, dass in den transgenen Pflanzen die Transkriptmengen der Gene *cyp80b3*, *cpr*, *bbe* und *cor* erniedrigt waren. Diese Daten deuten zusammen genommen auf eine koordinierte transkriptionelle Expression hin und zeigen, dass *cyp80b3* ein regulierendes Schlüsselenzym in der Alkaloidbiosynthese im Schlafmohn darstellt.

Allen *et al.* (2004) nutzten die RNAi-Technik, um die Expression des Gens *cor* in *Papaver* zu unterdrücken. Der Milchsaft der transgenen Pflanzen zeigte eine Anreicherung des zentralen Intermediates Retikulin und methylierter Derivate des Retikulins (Laudanin, Laudanosin und Codamin). Codamin konnte nicht in den Wildtypen gefunden werden. Die Alkaloide des Morphin-spezifischen Weges (Thebain, Codein, Oripavin und Morphin) waren stark reduziert. Eine Änderung von Transkriptmengen anderer Gene als *cor* konnte nicht beobachtet werden. Der Einfluss eines Gens des späten Morphinbiosyntheseweges auf die Alkaloidbiosynthese früher Zwischenprodukte war überraschend und seine Ursache konnte bisher nicht erklärt werden. Möglich sind sowohl eine Feedback-Hemmung durch das Endprodukt Morphin auf Ebene des Enzyms oder der Transkription als auch das Vorhandensein eines makromolekularen Enzymkomplexes. Die Überexpression des Gens *cor1.1* in Schlafmohn führte zu einer 15 – 30 %igen Steigerung des Morphinanalkaloidgehaltes, jedoch zu keiner Änderung des Alkaloidprofils (Larkin *et al.*, 2007).

Ein weiteres Beispiel für das „metabolic engineering“ der Benzyloisochinolinbiosynthese ist die Überexpression der (*S*)-Scoulerin-9-*O*-Methyltransferase (*smt*) in *Coptis*- und *Eschscholzia*-Zellkulturen (Sato *et al.*, 2001). Das Enzym katalysiert die 9-*O*-Methylierung von (*S*)-Scoulerin zu Tetrahydrocolumbamin in *Coptis* (Takeshita *et al.*, 1995). In *C. japonica* führte diese Überexpression zu einer moderaten Akkumulation von Berberin und Columbamin, in *E. californica* dagegen zu einer starken Anreicherung von Columbamin und einem unbekanntem Alkaloid, wobei die Menge an Sanguinarin in *E. californica* erniedrigt war.

1.5 Hintergrund der vorliegenden Arbeit

Laut statistischer Daten des „International Narcotics Control Board“ wurden im Jahr 2004 in Deutschland 8.959 kg Codein und 1.322 kg Morphin für medizinische Zwecke verbraucht. Weltweit lag 2004 der Verbrauch an Codein bei 195 Tonnen und an Morphin bei 28,8 Tonnen. Da den Alkaloiden des *P. somniferum* eine solch bedeutende Rolle zukommt, ist die effiziente und kostengünstige Produktion dieser Metabolite von großem Interesse. Trotz mehrerer bisher entwickelter chemischer Verfahren bleibt die Schlafmohn-Pflanze selbst noch immer die günstigste Quelle der Alkaloide. Daher steckt in der Anhebung der Alkaloidbiosynthese im Schlafmohn durch biotechnologische Methoden ein wirtschaftliches Potential. Für eine zielgerichtete Veränderung der Biosynthese dieser Sekundärmetabolite ist neben der Kenntnis über die enzymatischen Schritte und der Klonierung der beteiligten Enzyme jedoch auch die Aufklärung der Regulationsmechanismen entscheidend.

1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Erlangung grundlegend neuer Kenntnisse zur Regulation der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum*. Dazu sollte eine stabile Transformation dieser Art mit RNAi-Konstrukten von Genen, die an der Biosynthese involviert sind (*salAT*, *cyp80b3*), erfolgen. Die Unterdrückung der entsprechenden Gene sollte durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden. Die Auswirkung der Suppression war mittels chromatographischer Analyse des Milchsafte zu zeigen und unter Berücksichtigung des aktuellen Standes der Forschung zu diskutieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzliches Material

Zur Transformation von Keimlingen des *P. somniferum* L. wurde die Hochzuchtlinie C058-34 der Firma Tasmanian Alkaloids Pty Ltd, Westbury, Australien verwendet. Die Keimlinge sowie auch die daraus erhaltenen Kalluskulturen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Klimakammer bei 22-24 °C unter künstlichem Licht mit Bodenkühlung und einer 16-stündigen Photoperiode angezogen (Frick *et al.*, 2007).

Aus dem Transformationsprozess regenerierte Pflanzen, im Folgenden als T₀-Generation bezeichnet, wurden ab einer Größe von etwa 3 cm im Gewächshaus bis zum Abreifen der Samen gezogen. Die Folgegeneration (T₁) und Wildtyp-Pflanzen wurden im Gewächshaus herangezogen. Für die Isolierung der putativen Promotoren wurden Pflanzen des *P. somniferum* München im Gewächshaus ausgesät. Die Gewächshausbedingungen sind in Frick *et al.* (2005) publiziert.

2.1.2 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für allgemeine Klonierungsarbeiten verwendet:

<i>Escherichia coli</i> DH5α	Clontech	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>thi-1</i> , Δ(<i>lacZYA-argFV169</i>)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15Tn10(Tet ^r)]

Zur Transformation von *P. somniferum* L. wurde *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Lazo *et al.*, 1991) verwendet.

2.1.3 Vektoren

pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen)

Dieser 3,9 kb große, linearisierte Klonierungsvektor besitzt einen 3'-terminalen Thyminüberhang, an dessen Phosphatrest eine Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus kovalent gebunden ist. Dadurch können mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierte Fragmente, die aufgrund der fehlenden 3'-5' Exonukleaseaktivität (Korrekturlesen) oft einen einfachen Desoxyadenosinüberhang aufweisen, auch ohne Ligase in den Vektor kloniert werden. Der Vektor besitzt ein *lacZ*-Gen mit integrierter multipler Klonierungsstelle, einen T7 RNA-Polymerase-Promotor sowie Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgene. Neben dem T7 Standard-Primer können zudem der M13 forward (-20) und M13 reverse Primer genutzt werden.

pCR®4-TOPO® (Invitrogen)

Es handelt sich um einen ca. 4 kb großen Klonierungsvektor, der analog zum Vektor pCR®2.1-TOPO® mit Topoisomerase I linearisiert wurde. Er ermöglicht eine schnelle Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden. Der Vektor erlaubt zudem eine Selektion positiver Transformanten durch das letale *E. coli* Gen *ccdB*. Er besitzt einen T7 und T3 RNA-Polymerase-Promotor sowie Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgene. Neben den T7 und T3 Standard-Primern können der M13 forward (-20) und M13 reverse Primer genutzt werden.

pGEM®-T Easy (Promega)

Dieser Klonierungsvektor ist 3 kb groß, linearisiert durch Restriktionsverdau mit *EcoRV* und besitzt einen 3'-terminalen Thymidinüberhang. Er verfügt außerdem über ein *lacZ*-Gen mit integrierter multipler Klonierungsstelle und ein Ampicillin-Resistenzgen. Die multiple Klonierungsstelle wird von T7 und SP6 RNA-Polymerase-Promotoren flankiert.

pHannibal (CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien) (**Abb.2-1**)

Der 5,8 kb große Vektor wurde speziell zur Generation von RNAi-Plasmiden hergestellt (Wesley *et al.*, 2001; Helliwell und Waterhouse, 2003). Er besitzt neben einem Ampicillin-Resistenzgen eine Expressionskassette bestehend aus einem CaMV 35S Promotor, einem Intron des Gens Pyruvat-Orthosphosphat-Dikinase aus *Flaveria trinervia* und einem OCS Terminator. Zwischen dem Intron und dem Promotor bzw. dem Intron und dem Terminator befinden sich verschiedene Restriktionsschnittstellen, die der Ligation von Sequenzen des stillzulegenden Gens in Lese- oder Gegenrichtung dienen. Die Expressionskassette wird von zwei *NotI*-Schnittstellen flankiert.

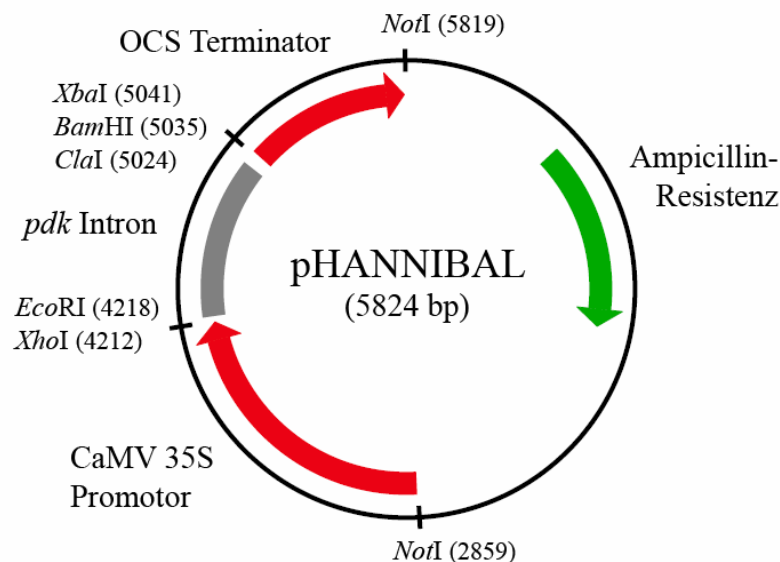


Abb. 2-1 Schema des Vektors pHANNIBAL.

pART27 (CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien) (**Abb. 2-2**)

Dieser rund 11,7 kb große binäre Vektor enthält neben dem ColE1 Replikationsstart für *E. coli* auch ein RK2 Replikon zur Vermehrung in *Agrobacterium*. Außerdem verfügt er über ein *lacZ*-Gen mit integrierter multipler Klonierungsstelle, ein Tn7 Spectinomycin/Streptomycin Resistenzgen und über die Transfer-DNA. Diese trägt ein chimäres Kanamycin-Resistenzgen (Neomycinphosphotransferase II, *nptII*), das vom Nopalinsynthase (NOS) Promotor und

Terminator reguliert wird (Gleave, 1992). Die T-DNA ist von einer rechten und einer linken Grenzsequenz flankiert, die die Integration ins pflanzliche Genom ermöglicht.

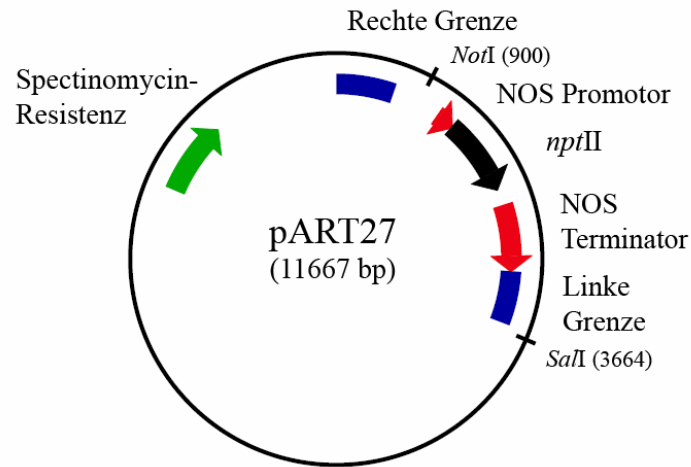


Abb. 2-2 Schema des Binärvektors pART27.

2.1.4 Medien

Falls in den Protokollen keine anderen Angaben gemacht wurden, ist zur Anzucht der Bakterien LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; Maniatis *et al.*, 1982) verwendet worden.

LB-Medium:

1 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl
pH 7,0	

Wurden Bakterien auf Agarplatten kultiviert, so sind zu dem Medium vor dem Autoklavieren zusätzlich 1,5 % (w/v) Bacto Agar zugegeben worden. Für bakterielle Transformationen wurde das an Glukose reiche SOC-Medium (Maniatis *et al.*, 1982) genutzt.

SOC-Medium:

2 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
10 mmol	NaCl
2,5 mmol	KCl
10 mmol	MgCl ₂ x 6H ₂ O
10 mmol	MgSO ₄ x 7H ₂ O
20 mmol	Glukose
pH 7,0	

Stocklösungen des Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat und der Glukose wurden getrennt steril filtriert und erst vor Gebrauch zugegeben.

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 zur Herstellung kompetenter Zellen erfolgte durch das Minimalmedium MinA (Miller, 1972) mit folgender Zusammensetzung:

MinA-Medium:

60 mM	K ₂ HPO ₄
33 mM	KH ₂ PO ₄
0,1 % (w/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,05 %	Natriumcitrat
0,02 %	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0,2 %	Glukose

Die Stocklösung der Glukose wurde auch hier getrennt steril filtriert und nach dem Autoklavieren des Mediums steril hinzu gegeben.

Keimlinge, Embryonen und Embryonen regenerierende Zellkulturen des Schlafmohns wurden auf B5O-Medium gezogen, während Zellkulturen, die lediglich der Erhaltung dienten, auf 19D-Medium vermehrt wurden. Diese beiden Nährmedien beruhen auf der Zusammensetzung der Gamborg B5-Salze (Gamborg *et al.*, 1968) und unterscheiden sich voneinander lediglich durch den Zusatz des Wachstumsregulators (Auxin) 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4 D), das die Embryonenbildung auf 19D-Medium unterdrückte. 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES) wurde zur Pufferung des bei der Kultivierung von Kalluskulturen des Schlafmohns schnell ansteigenden pH-Wertes im Medium eingesetzt (Chitty *et al.*, 2003; Larkin *et al.*, 1999; Chitty *et al.*, 2006). Die vollständige Zusammensetzung lautete wie folgt:

B5O (19D)-Medium:

150 mg/l	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0,75 mg/l	KJ
2500 mg/l	KNO ₃	37,3 mg/l	Na ₂ EDTA
134 mg/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	27,8 mg/l	FeSO ₄ x 7H ₂ O
250 mg/l	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 mg/l	Nicotinsäure
150 mg/l	CaCl ₂ x 2H ₂ O	10 mg/l	Thiamin x HCl
10 mg/l	MnSO ₄ x H ₂ O	1 mg/l	Pyridoxin x HCl
0,25 mg/l	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	100 mg/l	Inositol
3 mg/l	H ₃ BO ₃	(1 mg/l	2,4 D)
2 mg/l	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2 g/l	MES
25 µg/l	CuSO ₄ x 5H ₂ O	20 g/l	Saccharose
25 µg/l	CoCl ₂ x 6H ₂ O	pH 5,6	

Zur Verfestigung wurden 11,2 g/l Pflanzenagar (Duchefa) vor dem Autoklavieren zugegeben.

Zur Selektion wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des jeweiligen Mediums Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

100 µg/ml	Ampicillin	20 µg/ml	Rifampicin
50 µg/ml	Kanamycin	100 µg/ml	Timentin
50 µg/ml	Spectinomycin	25 µg/ml	Paromomycin
50 µg/ml	Carbenicillin		

Das Antibiotikum Timentin der Firma Duchefa bestand aus Ticarcillin und Clavulansäure im Verhältnis 15:1.

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden als Primer in Polymerasekettenreaktionen oder Sequenzierungen benötigt. Sie wurden von der Firma MWG-Biotech AG, München bezogen.

2.1.6 Chemikalien, Enzyme, Enzymkits und Sonstiges

Chemikalien wurden in der gewünschten Reinheit im Allgemeinen von den Firmen Sigma, Merck, Serva oder Roth bezogen.

Spezielle Chemikalien:

Alkaloide	Sammlung am IPB, Abt. NBT; synthetisiert in der Gruppe von Herrn Prof. Zenk (Biozentrum Universität Halle)
Antibiotika	Sigma, Duchefa
Bio-Rad-Reagenz	BioRad
5-Bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Peqlab
ExpressHyb TM Hybridization Solution	BD Clontech
GenElute TM Plasmid Midiprep Kit	Sigma
Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid (IPTG)	Peqlab
Nukleotide (dNTPs)	Peqlab
γ - ³² P-dATP	MPI
QIAprep [®] SpinMiniprep Kit	Qiagen
QIAprep [®] SpinMidiprep Kit	Qiagen
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	Roth

Längenstandards:

1 kb Plus DNA	Invitrogen
Lambda DNA/ <i>Eco</i> RI+ <i>Hind</i> III	MBI Fermentas
RNA Marker, „Low Range“	MBI Fermentas

Enzyme und Enzymkits:

BigDye Terminator Cycle Sequencing und 5x Puffer für <i>Ampli</i> Taq FS	ABI
Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	Stratagene
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Promega
Desoxyribonuklease I v.2.0 Ready Reaction“	Sigma
EZ::TN TM <KAN-2> Insertion Kit	Epicentre
GeneRacer TM Kit mit SuperScript TM III RT und pCR [®] 4-TOPO [®] blunt Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen
GenomeWalker Universal Kit	BD Clontech
Herculase [®] hotstart DNA-Polymerase	Stratagene
Megaprime TM DNA Labelling System	Amersham
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas
pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
Restriktionsenzyme	Invitrogen, z. T. New England Biolabs
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase mit Puffer	Sigma

T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
TOPO TA Cloning® Kit (mit pCR®2.1-TOPO® Vektor) mit One Shot® TOP10 Chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	Invitrogen

Sonstiges:

Filterpapier GB 005	Schleicher und Schüll
Flat-Bottom Block	Qiagen
Klebefolie für Platten	Qiagen
Multiscreen-FB Platten	Millipore
Multiscreen-HV Platten	Millipore
Multiscreen 45 µl Säulenlader	Millipore
Nylonmembran Biodyne® B	Pall
Phosphor-Imager Platten	Molecular Dynamics
Positionierahmen	Millipore
ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	Amersham
QRT-PCR tube strips und caps	BioRad
Sephadex G-50 Superfine	Pharmacia
Sterile Einmalartikel: Petrischalen, Polypropylenröhrchen, Eppendorfgefäße u. v. m.:	
Greiner, Sarstedt, VWR	

2.1.7 Geräte**Autoklaven**

Varioklav Typ 300, 400, 500 oder H+P (H+P Labortechnik)

Eismaschine

AF-10 (Scotsman)

Elektrophorese

Elektrophoresenetzgerät E455 (Consort)

Elektrophoresekammern Agagel Mini, Midi Wide, Standard bzw. Maxi (Whatman Biometra®)

Elektroporationsinstrument

Gene Pulser II System mit Pulse Controller Plus und Capacitance Extender Plus (BioRad)

Geiger-Müller-Zähler

LB 1210 B (Berthold)

Heizrührer

RCT basic (IKA®)

MR 3002 (Heidolph)

HPLC

LC 1100 series Agilent system (Agilent Technologies) mit der Säule Lichrospher 60 RP-select B (4x 250 mm, 5 µm, Merck)

Hybridisierungsöfen

7601 (GFL)

Kühlschränke / Tiefkühlschränke

Gram, Kühlanalagenbau (4 °C)

Liebherr (-20 °C)

Ultra Low Temperature Freezer (-80 °C) von New Brunswick

LC/ESI-MS/TOF

Mariner TOF Massenspektrometer 5232 (Applied Biosystems) mit Turbulon spray source (PE-Sciex) mit LC 1100 series Agilent system (Agilent Technologies) mit der Säule Superspher 60 RP-select B (2x 125 mm, 5 µm, Merck)

LC/ESI-MS/SRM

MAT TSQ 7000 Instrument (ThermoFinnigan) kombiniert mit einem Surveyor MicroLC System (ThermoFinnigan) und einer RP18-Säule (1x 100 mm, 4 µm, Ultrasep)

Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke

HERAsafe® (Heraeus®)

PCR-Geräte

GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

PRC-200 (MJ Research)

iQ5 Real Time PCR Detection System (BioRad)

pH-Meter

inoLab Labor-pH-Meter Level 1 (WTW)

Phosphorimager

Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics)

Photometer

Ultraspex 3000 mit Drucker DPU-411 (Pharmacia Biotech)

Mikroplatten-Lesegerät MRX (Dynatech Laboratories) mit Software Biolinx™
Version 2.20

Schüttler

3017 (GFL)

Sequenzierer

ABI PRISM™ 310-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) mit 36 oder 50 cm Kapillare und POP-6™ Polymer

ABI PRISM™ 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) mit 36 cm Kapillare und 3100 POP-6™ Polymer

Szintillationszähler

Beckman LS 6000 TA

Trockenschränke / Inkubatoren

Typ TS 100 (MLW)

WTC (Binder)

Ultraschallwasserbad

Sonorex RK100 (Bandelin)

UV-Transilluminator mit Drucker

GeneGenius Bio Imaging System mit Software GeneSnap und GeneTools (Syngene) und Drucker Digital Graphic Printer UP-D895 (Sony)

Vakuumkonzentrator

Bachofer

Speedvac SC100 (Savant)

Vortex-Mixer

Reax 2000 (Heidolph)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

Waagen

210-A (Omnilab)

MC1 LC2200P (Sartorius)

Wasserbäder

Julabo
C10 (Thermo Haake)

Wasserreinigungssystem

Milli-Q Synthesis A10 (Millipore)

Zellkulturschüttler

3032 und 3033 (GFL)
4000 (Innova™)

Zentrifugen

Mikrozentrifuge PicoFuge™ (Stratagene)
5415D (Eppendorf)
5810R mit Rotor A-4-62 (Eppendorf)

2.2 Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten molekularbiologischen Standardtechniken basieren überwiegend auf Protokollen nach Maniatis *et al.* (1982) bzw. seiner überarbeiteten Version (Sambrook *et al.*, 1989). Wurden Techniken daraus verändert oder Methoden anderer Herkunft angewendet, so sind diese im Methodenteil näher beschrieben.

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.1.1.1 Mini-Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Plasmid-DNA im Kleinmaßstab wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen isoliert. Dazu wurden 2-5 ml Bakterienkultur für 5 Minuten bei 8000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung der im Kit enthaltenen Puffer nach Herstellerprotokoll.

2.2.1.1.2 Mini-Plasmid-Präparation aus *E. coli* im 96er Format

Die Plasmid-Präparation aus einer hohen Anzahl verschiedener *E. coli* Kulturen erfolgte unter Verwendung von Mikrotiterplatten. Zunächst wurden je 1,1 ml 2x LB-Medium mit Antibiotika (siehe 2.1.4) in sterilen „Flat bottom“ Blöcken (Qiagen) mit einer gepickten Kolonie angeimpft und für 20-24 h bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Nach dem Anwachsen der Kulturen wurde der Block bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgekippt und der Block umgekehrt auf Papiertüchern ausgeklopft. Die Pellets wurden in 80 µl Lösung 1 resuspendiert und durch Zugabe von 80 µl Lösung 2 lysiert. Die Suspension wurde kurz gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 80 µl Lösung 3, kurzes Mischen und Inkubation für 2-5 min bei Raumtemperatur. Um die gefällten Zellbestandteile abzutrennen, wurde der Block im Anschluss bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Multiscreen FB Platte durch Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetat (pH 5,5) in jede Bohrung für die Fällung der Plasmid-DNA vorbereitet. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde zur Kaliumacetat-Lösung zugegeben, kurz gemischt und die Platte bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Platte wurde durch Zentrifugation mit 200 µl 80%igen Ethanol zweimal gewaschen und unter Vakuum

getrocknet. Die Elution der Plasmide erfolgte durch Inkubation mit 60 µl 1x TE-Puffer für 2-5 min und folgender Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min in eine frische Mikrotiterplatte, die zur Aufbewahrung mit einer Folie verklebt wurde.

2x LB-Medium:

2 % (w/v)	Trypton
1 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl
pH 7,0	

Lösung 1:

50 mM	Tris / HCl
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNase A
pH 8,0	

Lösung 2:

0,2 N	NaOH
1 % (w/v)	SDS

TE-Puffer:

10 mmol	Tris / HCl (pH 8,0)
1 mmol	EDTA (pH 8,0)

2.2.1.1.3 Midi-Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab wurde mit Hilfe des QIAprep® SpinMidiprep Kits der Firma Qiagen oder mit dem GenElute™ Plasmid Midiprep Kit von Sigma nach Herstellerprotokoll und unter Verwendung der im Kit enthaltenen Pufferlösungen isoliert.

2.2.1.1.4 Plasmid-Präparation aus *A. tumefaciens*

Zur Isolierung von Plasmiden aus *A. tumefaciens* wurden 10 ml Übernackkultur 10 min bei 8000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 200 µl GTE-Puffer resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) unter Verwendung von 300 µl 0,2 M NaOH-Lösung mit 1%igem SDS. Durch eine darauf folgende Inkubation mit 300 µl einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 4,8) und vorsichtigem Mischen für 5 min auf Eis wurden Proteine, genomische DNA (gDNA) und SDS als Kaliumsalz ausgefällt. Diese konnten anschließend abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm, Raumtemperatur) werden. Danach wurde die DNA-Lösung je einmal mit 400 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform für 30 s extrahiert. Aus der wässrigen Lösung wurde die DNA mit Isopropanol präzipitiert und abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm, Raumtemperatur). Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 0,1x TE-Puffer (siehe 2.2.1.1.2) resuspendiert.

GTE-Puffer:

50 mmol	Glukose
25 mmol	Tris / HCl (pH 8,0)
10 mmol	EDTA (pH 8,0)
20 µg/ml	RNase A

2.2.1.2 Isolierung von Nukleinsäuren aus *P. somniferum* L.

Zur Isolierung von DNA und RNA aus Schlafmohn wurden zunächst 0,5 bis 1 g Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen. Das pulverisierte Gewebe wurde in ein Zentrifugengefäß mit einer bereits vorgelegten Mischung aus 3,5 ml Extraktionspuffer und 3,5 ml Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) überführt und für 30 min unter Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur

erfolgte eine Extraktion mit 3,5 ml Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend mit 3 ml Chloroform. Die Nukleinsäuren wurden danach mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropanol für 1-2 Stunden bei -20 °C aus der wässrigen Lösung gefällt. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Zur Trennung von DNA und RNA wurde das Pellet zunächst in 300 µl TE-Puffer (siehe 2.2.1.1.2) resuspendiert und die RNA durch Zugabe von 300 µl 6 M Lithiumchlorid über Nacht bei 4 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde das Gemisch zentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4 °C). Die DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropanol für 20 min bei -20 °C gefällt und nachfolgend abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4 °C). Sowohl das Pellet der gDNA als auch das RNA-Pellet wurden im Anschluss mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert.

Extraktionspuffer:

10 mM	Tris / HCl (pH 7,5)
50 mM	NaCl
1 % (w/v)	SDS
4 % (w/v)	PVPP
1 mM	EDTA (pH 8,0)
14 mM	2-Mercaptoethanol

2.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *P. somniferum* L.

Die Präparation von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben des Schlafmohns wurde nach der von Chomczynski and Sacchi (1987) entwickelten Methode, durchgeführt. Im ersten Schritt wurden etwa 0,5 g des Gewebes unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Zehn Volumen des Extraktionspuffers wurden bereits in einem Zentrifugengefäß vorbereitet. Das pulverisierte Gewebe wurde noch vor dem Auftauen mit dem Extraktionspuffer für eine Minute kräftig gemixt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 1 min kräftig gemixt. Danach erfolgte eine einmalige Extraktion mit 0,2 Volumen Chloroform. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur wurde die RNA aus der wässrigen Phase mit Hilfe von einem Volumen Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde die präzipitierte RNA für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (siehe 2.2.1.1.2) resuspendiert.

Extraktionspuffer:

0,8 M	Guanidinthiocyanat
0,4 M	Ammoniumthiocyanat
0,1 M	Natriumacetat (pH 5,0)
5 % (v/v)	Glycerin
38 % (v/v)	Phenol

2.2.1.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde ihr Absorptionsverhalten, dass ein Maximum bei einer Wellenlänge von 260 nm aufweist, genutzt. Dabei entsprach eine Extinktion von $E = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Zur Berechnung wurde das Lambert-Beersche Gesetz herangezogen. Zur

Bestimmung der Konzentration von kurzen DNA-Fragmenten (z. B. PCR-Produkte) oder von sehr geringen DNA-Konzentrationen ($< 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde die DNA parallel zum Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Längenstandard (Fermentas) auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.2.1). Die Auswertung wurde dabei mit Hilfe der Software „GeneSnap“ über einen Flächenvergleich ermittelt.

2.2.2 Gelelektrophorese

2.2.2.1 Trennung von DNA über Agarose-Gele

Agarose-Gele, die der Bestimmung von Konzentration, Größe und/oder Reinheit von DNA dienen wurden in einer Konzentration von 1 % gegossen, während gDNA über 0,8%ige Agarose-Gele getrennt wurde. Als Elektrophorese-Puffer diente 1x TAE. Die Analyse erfolgte durch den Einsatz von $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid, das an DNA bindet und die Analyse mittels UV-Transilluminator ermöglicht. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1x Ladepuffer versetzt. Die Trennung wurde bei einer Spannung von 5-10 V/cm bzw. für „Southern blots“ (2.2.4.1) bei 1-2 V/cm (über Nacht) durchgeführt.

<u>50x TAE-Puffer:</u>		<u>10x Ladepuffer:</u>	
2 M	Tris / Essigsäure	50 % (v/v)	Glycerin
100 mM	EDTA	0,2 M	EDTA
pH 8,0		0,05 % (w/v)	Orange G

2.2.2.2 Trennung von RNA über Agarose-Gele

RNA-Proben wurden über 1,2%ige denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gele (0,66 M Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer) getrennt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 10 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ in 4 Volumenteilen Denaturierungs-Puffer erhitzt und für 5 min auf Eis abgekühlt. Als Elektrophorese-Puffer diente 1x MOPS. Die Trennung wurde bei einer Spannung von 5-8 V/cm durchgeführt.

<u>1x MOPS:</u>		<u>Denaturierungs-Puffer:</u>	
0,2 M	MOPS	130 $\mu\text{l}/\text{ml}$	10x MOPS
0,05 M	Natriumacetat	230 $\mu\text{l}/\text{ml}$	37 % Formaldehyd
0,01 M	EDTA	640 $\mu\text{l}/\text{ml}$	Formamid
pH 7,0		200 $\mu\text{l}/\text{ml}$	10x Ladepuffer

<u>10x Ladepuffer:</u>	
50 % (v/v)	Glycerin
0,1 M	EDTA
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol

2.2.3 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an spezifischen Sequenzen hydrolysieren können. Sie wurden u. a. zur Isolierung bestimmter Genfragmente und zur Identifizierung der Größe von Plasmiden verwendet. Für einen Restriktionsverdau wurde pro μg eingesetzte DNA 1 Unit Restriktionsenzym verwendet. Die Reaktionen erfolgten unter Nutzung der vom

Hersteller mitgelieferten Inkubationspuffer bei der empfohlenen Temperatur für mindestens 2 h. Das Gesamtvolumen des Ansatzes richtete sich nach der eingesetzten Menge an DNA. Bei Restriktionsansätzen mit 2 verschiedenen Enzymen wurde ein für beide Enzyme kompatibler Puffer ausgewählt.

2.2.4 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylon-Membranen und Hybridisierung

2.2.4.1 „Southern blot“

Der Transfer von DNA auf eine Membran diente dem Nachweis und der Bestimmung der Kopienzahl von Genen bzw. Transgenen. Zunächst wurden 10 µg gDNA mit einem Restriktionsenzym über Nacht verdaut (siehe 2.2.3). Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der verdauten DNA über ein natives Agarose-Gel (siehe 2.2.2.1). Die elektrophoretisch getrennte DNA wurde nach einer Methode von Southern (1975) auf eine Nylonmembran gebunden. Vor dem Transfer wurde das Gel mit einem angelegten UV-Lineal unter UV-Licht fotografiert und zur Denaturierung anschließend nacheinander 15 min in 0,2 N Salzsäure, zweimal 30 min in Denaturierungslösung und 1 h in Neutralisierungslösung geschwenkt. Für den Transfer wurde das Gel auf zwei Filterpapiere GB005 (Schleicher und Schüll) gelegt, die in 10x SSC-Puffer getränkt waren. Das untere dieser Filterpapiere stand in Kontakt mit zwei in 10x SSC enthaltenden Kammern, die als Reservoirs dienten. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine in 10x SSC getränkte Nylonmembran gelegt. Auf dieser wurden mit einem Bleistift Oberseite und die Taschen des Gels kenntlich gemacht. Zum Schluss wurden zwei weitere, getränkte Filterpapiere auf die Membran gelegt und diese wiederum mit einer Lage aus saugfähigen Papiertüchern überschichtet. Alle Bestandteile des Kapillar-„blots“ wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht. Nach dem Abbau wurde die Membran an der Luft getrocknet und die DNA durch UV-Licht (UV Stratalinker 1800) kovalent an die Nylonmembran gebunden.

Denaturierungslösung:

1,5 M	NaCl
0,5 M	NaOH

Neutralisierungslösung:

1,5 M	NaCl
1 M	Tris / HCl

20x SSC-Puffer:

0,3 M	tri-Natriumcitrat
3 M	NaCl
pH 7,0	

2.2.4.2 „Northern blot“

Als „northern blot“ bezeichnet man den Transfer von RNA auf eine Membran. Diese diente dem Nachweis und der relativen Quantifizierung einer bestimmten mRNA. Hierbei wurden 15 bis 20 µg der totalen RNA zunächst über ein denaturierendes Agarose-Gel (siehe 2.2.2.2) getrennt. Der Aufbau des „blots“ erfolgte analog zum unter 2.2.4.1 beschriebenen „Southern blot“. Auch hier wurde die Membran nach erfolgtem Transfer über Nacht getrocknet und mit UV-Licht bestrahlt.

2.2.4.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Sonden, die über PCR amplifiziert (siehe 2.2.6.2) und nach der unter 2.2.5.1 beschriebenen Methode gereinigt worden waren, wurde das MegaprimeTM DNA Labelling System von Amersham unter Anleitung des Herstellerprotokolls verwendet. Dieser Kit nutzte die von Feinberg und Vogelstein (1983 und 1984) vorgeschlagene Methode, kurze Oligonukleotide mit zufälliger Sequenz als Primer einzusetzen. In dem o. g. Kit wurden dazu nonamere Primer eingesetzt, da diese bei 37 °C sehr effizient an DNA binden und somit eine kurze Reaktionszeit ermöglichten. Für die Reaktion wurde radioaktiv markiertes [γ -³²P]-dATP (MPI) eingesetzt. Zur Aufreinigung der Sonden wurden ProbeQuantTM G-50 Mikrosäulen (Amersham) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.4.4 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung von DNA- und RNA-„blots“ (siehe 2.2.4.1 und 2.2.4.2) mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe 2.2.4.3) wurden die Membranen zunächst in Hybridisierungslösung für mindestens 30 min bei 60 °C vorhybridisiert. Als Hybridisierungslösung wurde entweder „ExpressHybTM Hybridization Solution“ (BD Clontech) oder eine selbst hergestellte Lösung verwendet. Für „northern blots“ konnten mit der kommerziell erhältlichen Variante bessere Ergebnisse erhalten werden. Danach wurde die Lösung durch eine frische Hybridisierungslösung ausgetauscht und die zuvor für 5 min bei 95 °C denaturierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht für „Southern blots“ bei 60 °C und für „northern blots“ bei 68 °C. Am folgenden Tag wurden die Membranen zweimal für 15 min bei Raumtemperatur in 2x SSC (siehe 2.2.4.1) mit 0,05 % SDS und anschließend zweimal für 30 min bei 50 °C in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS gewaschen. Nach dem Einschweißen in Folie wurden sie für 1-3 Tage auf einer Phosphorimagerplatte exponiert. Diese wurde im Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics) eingescannt. Die Membranen konnten nach zwei bis dreimaligem Waschen in heißer 0,5%iger SDS-Lösung erneut radioaktiv markiert werden.

Hybridisierungslösung:

1 ml	50x Denhardt's Lösung
12,5 ml	20x SSC
100 µg /ml	Heringssperma DNA
1,25 ml	20 % SDS
<i>ad</i> 50 ml dH ₂ O	

50x Denhardt's Lösung:

1 g	BSA
1 g	PVP 25
1 g	Ficoll 400
<i>ad</i> 100 ml dH ₂ O	

2.2.5 Klonierungsmethoden

2.2.5.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch getrennte DNA (siehe 2.2.2.1) wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.5.2 Phosphatase-Behandlung

Für Ligationen, bei denen nur ein Restriktionsenzym eingesetzt wird, besteht die Gefahr der Religation. Um dieses zu vermeiden, wurde die Phosphatgruppe am 5'-Ende des Vektors enzymatisch entfernt. Das dazu genutzte Enzym Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) der Firma Promega, ist in allen bekannten Restriktionspuffern bei 37°C aktiv. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

2.2.5.3 Ligation

Zur Klonierung von PCR-Produkten über T/A-Klonierung wurden die Klonierungsvektoren pCR®2.1-TOPO® und pGEM®-T Easy genutzt (siehe 2.1.3). Dabei wurden die im Lieferumfang enthaltenen Reagenzien nach Herstellerprotokoll verwendet. Für sonstige Klonierungen wurde der Rapid DNA Ligation Kit von Roche oder die T4 DNA Ligase der Firma MBI Fermentas nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Ligase katalysierte dabei die Veresterung der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden doppelsträngiger DNA. Der Reaktionsansatz enthielt etwa 25-100 ng Vektor-DNA, einen dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNA und 0,5-1 U T4 DNA Ligase in 1x T4 DNA Ligase-Puffer des Herstellers. Die Ligationsansätze konnten direkt für die Transformation verwendet werden.

2.2.5.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung der kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte nach der Calcium-Chlorid-Methode von Hanahan (1983) und Hanahan *et al.* (1991). Fünf 1 l Erlenmeyerkolben in denen je 200 ml LB-Medium vorgelegt worden waren, wurden mit jeweils 2 ml einer Vorkultur des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft und so lange bei 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte bei einer Absorption von 550 nm (OD_{550}) 0,280 erreicht hatte. Die Bakteriensuspension wurde 5 min (2500 rpm, 4 °C) abzentrifugiert und die Zellen in 15 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurden die kompetenten Zellen erneut abzentrifugiert (5 min, 2500 rpm, 4 °C) und das Pellet innerhalb von 45 min im Eiswasserbad vorsichtig in 1,2 ml TfbII-Puffer resuspendiert. Danach erfolgt eine Aliquotierung von je 200 µl der Zellen in mit Trockeneis gekühlte Eppendorf-Gefäße. Die kompetenten Bakterien wurden bis zum Einsatz bei -80°C aufbewahrt.

Mit dem Plasmid pUC18 wurde die Transformationseffizienz der Zellen, die 10^6 - 10^7 Kolonien je µg Plasmid betragen sollte, überprüft.

TfBI-Puffer:

30 mM	Kaliumacetat (pH 5,8)
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
100 mM	KCl
15 % (v/v)	Glycerin

TfbII-Puffer:

10 mM	MOPS/NaOH (pH 7,0)
10 mM	KCl
75 mM	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin

2.2.5.5 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* AGL1 Zellen

Die Transformation des Schlafmohns erfolgte über den *A. tumefaciens* Stamm AGL1. Zur Präparation kompetenter Agrobakterien wurden 25 ml MinA-Medium mit den Antibiotika Rifampicin und Carbenicillin (siehe 2.1.4) mit einer Vorkultur des Stammes angeimpft und

bei 28 °C für 1-2 Tage bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Je 1,5 ml wurden für 5 min bei 3000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 400 µl eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 40 µl aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.2.5.6 Transformation

2.2.5.6.1 Transformation von *E. coli* Zellen durch Hitze-Schock

Genetische Transformation ist ein Vorgang, bei dem die Zelle DNA aus der Umgebung aufnimmt. Zur Transformation der kompetenten *E. coli* Zellen (siehe 2.2.5.4) wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend zum Ligationsansatz oder zu ca. 50 ng der Plasmidlösung pipettiert. Die Zellsuspension wurde vor der Transformation 15-30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmide erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Die Lösung wurde danach für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 250 µl SOC-Medium (siehe 2.1.4) versetzt und zur Regeneration der Zellwand bzw. zum Wachstum der Kultur für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf einer LB-Platte (siehe 2.1.4) unter entsprechender Antibiotika- und ggf. einer Blau/Weiß-Selektion (siehe 2.2.5.7) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.6.2 Transformation von *A. tumefaciens* durch Elektroporation

Unmittelbar vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen (siehe 2.2.5.5) auf Eis aufgetaut. Circa 50 ng Plasmid-DNA wurde zu 40 µl Zellsuspension pipettiert und der Ansatz mit einer sterilen Pasteurpipette in eine Elektroporationsküvette gefüllt. Die Aufnahme der Plasmide erfolgte durch einen Impuls von 2,0 kV bei 50 µF und 400 Ω im Elektroporator (Gene Pulser II System von BioRad). Die Lösung wurde sofort aseptisch mit 1 ml SOC-Medium (siehe 2.1.4) versetzt und die Zellen für 2 h bei 28°C regeneriert und vermehrt. Anschließend wurde der Ansatz auf einer LB-Platte unter entsprechender Antibiotika-Selektion über Nacht bei 28°C inkubiert.

2.2.5.6.3 Transformation von *P. somniferum* L.

Zur Transformation des Schlafmohns wurde eine Methode nach Larkin *et al.* (1999) und Chitty *et al.* (2003) genutzt. Zunächst wurden Samen durch Inkubation für eine Minute in 70%igem Ethanol und anschließend für 20-30 min in 0,8%iger Chlorbleiche- Lösung unter Zusatz des Detergenz Triton-X-100 sterilisiert. Zur Entfernung des Chlors wurden die sterilen Samen in mehreren Schritten mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden sie auf Platten mit B5O-Medium (siehe 2.1.4) vereinzelt. Um eine Beeinträchtigung der Keimung zu verhindern, wurden dabei nicht mehr als 40 Samen pro Schale verteilt. Zudem wurden die Samen für einen Tag bei 4 °C inkubiert, um ein gleichmäßiges Auskeimen zu erreichen. Die Keimung erfolgte in einer Phytokammer bei 22-24 °C und einer 16-stündigen Photoperiode. Nach 5-6 Tagen wurden Wurzeln und Keimblätter der Keimlinge mit einem aseptischen Skalpell entfernt. Zur Transformation wurden die verbleibenden Stängel 10-15 min lang in einer Suspension der transformierten Agrobakterien inkubiert. Die Gewebestücke wurden anschließend auf 19D-Medium (siehe 2.1.4) eng aneinander gelegt und bei 24 °C inkubiert, wobei die Bakterien die Stängel innerhalb der nächsten 3-5 Tage vollständig

überzogen. Zur Entfernung der Bakterien wurden die transfizierten Gewebestücke mehrmals in sterilem Wasser gewaschen und auf 19D-Platten mit den Antibiotika Timentin (gegen *Agrobacterium*) und Paromomycin (zur Selektion transgener Kalli) vereinzelt. Die wachsenden Kalli (Typ I) wurden bei 22-24 °C und einer 16-stündigen Photoperiode inkubiert. Da die später entstehenden Embryonen empfindlich gegenüber hoher relativer Feuchtigkeit sind, wurde eine Bodenkühlung für die Zellkultur-Petrischalen verwendet (Maene und Debergh, 1987; Chitty *et al.*, 2003). Innerhalb der nächsten 4-6 Monate entwickelte sich der Kallus Typ II, der die Fähigkeit zur somatischen Embryogenese aufweist (Chitty *et al.*, 2003). Er wurde nach Erreichen einer Größe von etwa 8 mm im Durchmesser zur Induktion der Embryogenese auf das hormonfreie B5O-Medium überführt (Schuchmann und Wellmann, 1983). Innerhalb der folgenden 6 Monate bildeten sich Pflänzchen, die vereinzelt wurden. Nach Erreichen einer Größe von etwa 3-4 cm, wurden diese auf Erde überführt und im Gewächshaus bei 20-24 °C Tages- bzw. 18-20 °C Nachttemperatur, einer relativen Feuchtigkeit von 50-60 % und einer 16-stündigen Photoperiode zu reifen Pflanzen herangezogen. Die Nährmedien sind während der gesamten Prozedur nach je 21 Tagen erneuert worden.

2.2.5.7 Blau/Weiß-Selektion

Beim Einsatz von Vektoren, die über ein *lacZ* Gen mit multipler Klonierungsstelle verfügen, konnte die Blau/Weiß-Selektion genutzt werden. Das *lacZ* Gen ist ein Gen aus *E. coli* und kodiert für die β -Galaktosidase, die einen Teil des *lac* Operons darstellt. Das Enzym spaltet das Disaccharid Laktose in D-Galaktose und D-Glukose, kann jedoch auch das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) spalten, was zur Bildung eines blauen Indigofarbstoffs führt. Die *lac* Gene in *E. coli* werden durch das Vorhandensein des Substrates Laktose reguliert. Ist keine Laktose vorhanden, so ist das *lac* Operon durch einen konstitutiven Repressor (*lacI*) blockiert. Ein Laktosemetabolit, die Allolaktose, bindet an den Repressor und verändert dessen Form allosterisch. In den Versuchen wurde IPTG (Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid) als Laktoseanalogon genutzt, um den Repressor zu inaktivieren. IPTG hat gegenüber der Laktose den Vorteil, dass es nicht metabolisiert und somit während der Reaktion nicht verbraucht wird. *E. coli* DH5 α und XL1-Blue sind *lacZ*-Mutanten. Durch Transformation der Stämme mit einem Plasmid, das ein funktionelles *lacZ* Gen besitzt, kann die β -Galaktosidase-Aktivität komplementiert werden. Die Zugabe von X-Gal und IPTG zum Medium führt in diesem Fall zu einer Blaufärbung der Zellen. Ist das Leseraster des *lacZ* Gens des Plasmides allerdings durch den Einbau von DNA in die multiple Klonierungsstelle unterbrochen, verliert das Gen seine Funktion. Die Kolonien bleiben also farblos. Mit dieser Methode konnten transgene und nicht-transgene Kolonien voneinander unterschieden werden.

Die Nutzung der Blau/Weiß-Selektion erfolgte durch Ausplattieren von je 40 μ l einer 20 mg/ml X-Gal- und einer 100 mM IPTG-Stocklösung auf eine Petrischale mit etwa 25 ml festem LB-Medium (siehe 2.1.4). Die Schale wurde vor Gebrauch für 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.8 Bakteriendauerkultur

2-4 ml einer Übernachtskultur wurden unter sterilen Bedingungen für 5 min bei 8000 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 0,5 ml Medium resuspendiert und in ein Cryo-Gefäß, in das bereits 0,5 ml steriles Glycerin vorgelegt worden waren, überführt. Vor dem Einfrieren bei -80 °C wurde noch das entsprechende Antibiotikum (siehe 2.1.4) zugegeben.

2.2.6 DNA-Amplifikation

2.2.6.1 Ableitung synthetischer Oligonukleotide

Die Sequenzen von Primern, die als synthetische Oligonukleotide von der Firma MWG-Biotech AG gekauft wurden, sind i. d. R. mit Hilfe des unter http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi online frei verfügbaren Programms „Primer3“ entworfen worden. Falls das Programm nicht die gewünschten Ergebnisse lieferte, wurden Oligonukleotide mit gewünschter Sequenz gesucht und über die Software Primer Select (DNASTAR) bezüglich ihrer Länge, Schmelztemperatur, G/C-Gehalte, Sekundärstruktur- und Dimerbildung überprüft. Die Sequenz der Primer für „Real Time“ PCR (siehe 2.2.7) wurden mit der Primer Express® Software v2.0 (Applied Biosystems) erstellt.

Tab. 2-1 enthält für PCR oder Sequenzierung genutzte Primer. Oligonukleotide, die zum „Genome Walking“ (siehe 2.2.6.3), zur RACE-PCR (siehe 2.2.6.4) oder zur „Real Time“ PCR (siehe 2.2.8) verwendet wurden, befinden sich im entsprechenden Abschnitt.

Primer	5'→3'-Sequenz	Länge [bp]	T _m [°C]	Anwendung
SP6	CATTTAGGTGACACTATAG	19	50	Test der Transformation, Sequenzierung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20	53	
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	18	54	
RP	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGA G	25	60	Sequenzierung
pHANS*	ACAATCCCACTATCCTTCG	19	55	Test der Transformation, Sequenzierung, Herstellung von Sonden
pHAN-Intron as*	CACTTAACTATTTTATACTAAAAGG	27	52	
pHAN-Intron s*	GTCGAACATGAATAAACAAGG	21	55	
pHANas*	TACAACGTGCACAACAGAAT	20	55	
<i>nptII</i> s**	GAGGCTATTCGGCTATGACTG	21	58	Sonden, Test d. Transformation
<i>nptII</i> as**	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	21	66	
<i>cpr</i> prom 1s	CCATATAATCCAGCTTCCAC	21	54	Sequenzierung
<i>cpr</i> prom 2s	TGTGAGTTTATTGTAAGCAGTTT	23	52	
<i>cpr</i> prom 3s	CCCTAATTAATACCCACAATGTA	23	52	
<i>cpr</i> prom 1as	GCTTCTCCCTGTGCTTCTTTT	21	60	
<i>cpr</i> prom2 as	GGTATTAATTAGGGATAGTTTGG	23	51	
<i>cpr</i> prom 3as	TTTCTCCATACTTTGAACTCC	21	53	
<i>cor</i> prom 1s	GTAGTTTGCACCTAACCCTGTT	21	55	
<i>cor</i> prom 2s	GGTGGTGAATATTGTGAAAGG	21	55	
<i>cor</i> prom 1as	GGGGAGCTTACTACCTTTAAGC	23	59	
<i>cor</i> prom 2as	AATTACTATAATCATTCTAAACAG	25	48	
<i>cor</i> prom 3as	CTGATTCAAGATATCCACCAG	21	54	
<i>cor</i> prom 4as	CTGCAAGTAACGATGTGAATGA	22	55	
<i>sal</i> exRNAi s	GGCAACAATGTATAGTGCTGCTGT	24	59	<i>salAT</i> -Sonde für „northern blots“
<i>sal</i> exRNAi as	TTATCTTTGCAAATCGAACACA	23	53	

Tab. 2-1 Verwendete Primer.

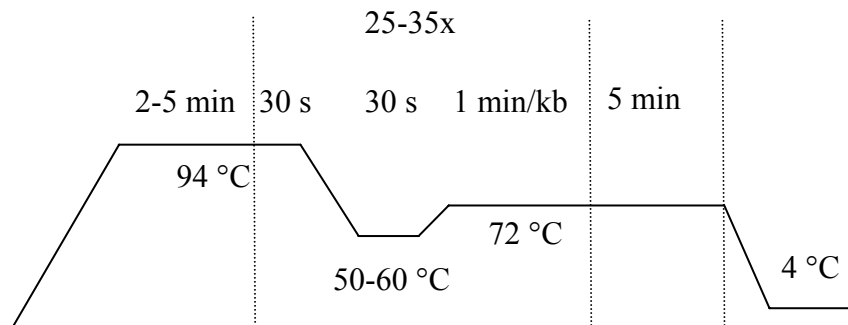
* nach Kempe (2003), ** nach Le Flem-Bonhomme *et al.* (2004)

2.2.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die in den achtziger Jahren erfundene Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987) gilt als eine der größten Innovationen in der Molekularbiologie, für die der Biochemiker Kary B. Mullis 1993 den Nobelpreis erhielt. Sie ermöglicht die Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen *in vitro* in einem einzigen Temperaturzyklus durch enzymatische Reduplikation. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Standard-Reaktionsansatz lautete:

10-100 ng	DNA
2,5 nM each	dNTP Mix
je 50 pM	„sense“ und „antisense“ Primer
5 µl	10x Puffer mit MgCl ₂
1-2 U	Polymerase
ad 50 µl	ddH ₂ O

Im Allgemeinen wurde der folgende Temperaturzyklus genutzt:



Falls für spezifische Anwendungen von diesem Protokoll abgewichen wurde, ist dies an der entsprechenden Stelle vermerkt. Die Reaktionen wurden im GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Temperaturoptimierung für Primer des GenomeWalker Universal Kits (BD Clontech) erfolgte über Gradienten PCR im Thermal Cycler PRC-200 (MJ Research), wobei verschiedene Annealing-Temperaturen gleichzeitig getestet werden konnten.

2.2.6.3 Amplifikation putativer Promotoren aus *P. somniferum* L.

Zur Isolierung der 5'-Sequenzen von Genen der Alkaloid-Biosynthese aus Schlafmohn wurde der GenomeWalker Universal Kit (BD Clontech) nach Herstellerprotokoll genutzt. Der Kit bietet eine einfache Methode zur Isolierung einer unbekanntes gDNA-Sequenz, sofern eine bekannte Sequenz in der Nähe ist (Siebert *et al.*, 1995). Das Protokoll besteht aus zwei Teilen, der Konstruktion der „Genome Walker Libraries“ und dem eigentlichen „Genome Walking“, die im Folgenden kurz beschrieben werden sollen.

2.2.6.3.1 Konstruktion der „Genome Walker Libraries“

Vor der Konstruktion der „Libraries“ wurde die nach 2.2.1.2 isolierte gDNA über ein Agarose-Gel (siehe 2.2.2.1) auf ihre Größe überprüft. Sie sollte ein hohes durchschnittliches

Molekulargewicht aufweisen. Zudem wurde die Reinheit der DNA anhand eines *DraI*-Verdau (siehe 2.2.3) getestet. Erst nachdem sich bei diesem Test die erwünschten Größen zeigten (kenntlich durch indifferente DNA-„Schmier“ im Agarosegel), wurden die „Libraries“ hergestellt. Dazu wurde die gDNA mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *StuI*) und als Positivkontrolle menschliche gDNA mit *PvuII* über Nacht bei 37 °C verdaut:

<u><i>P. somniferum</i> gDNA</u>		<u>menschliche gDNA</u>	
5 µl	gDNA (ca. 0,5 µg/µl)	25 µl	gDNA (ca. 0,1 µg/µl)
8 µl	Restriktionsenzym (10 U/ µl)	8 µl	<i>PvuII</i> (10 U/ µl)
10 µl	10x Puffer	10 µl	10x <i>PvuII</i> -Puffer
77 µl	ddH ₂ O	57 µl	ddH ₂ O.

Die verwendeten Endonukleasen, die ebenso wie die Positivkontrolle im Kit enthalten waren, erkennen eine 6 bp lange Sequenz und produzieren glatte Enden. Der Verdau wurde mittels Agarose-Gel überprüft und vor der darauf folgenden Ligation durch Phenol / Chloroform-Reinigung mit anschließender Natriumacetat-Fällung vom Enzym und den Salzen befreit. Die Ligation der DNA-Fragmente (inklusive der Kontrolle) mit dem „GenomeWalker Adaptor“, der ein glattes Ende besaß, erfolgte über eine im Kit bereit gestellte T4 DNA Ligase über Nacht bei 16 °C mit folgendem Ansatz:

4 µl	verdaute, gereinigte DNA
1,9 µl	„GenomeWalker Adaptor“ (25 µM)
1,6 µl	10x Ligationspuffer
0,5 µl	T4 DNA Ligase (6 U/ µl)

Die Reaktion wurde danach durch Inkubation für 5 min bei 70 °C abgestoppt und für die PCR-Reaktion mit 72 µl 1x TE-Puffer (siehe 2.2.1.1.2) gemischt.

„GenomeWalker Adaptor“:



2.2.6.3.2 „Genome Walking“

Da an das 5'-Ende der gDNA-Fragmente ein Adapter mit bekannter Sequenz ligiert worden ist, konnte die unbekannte Sequenz zwischen dem Adapter und dem bekannten Gen mit Hilfe von Adapter- und genspezifischen Primern (AP und GSP) amplifiziert werden. Um eine nicht-spezifische DNA-Synthese zu vermeiden weist der Adapter folgende Besonderheiten auf:

- Der Adapter, der über glatte Enden an beide Seiten der Fragmente ligiert wurde, besitzt einen 40 bp langen 5'-Überhang. Die Adapter-Primer sind zu dieser Region homolog.
- Am 3'-Ende des unteren Adapter-Stranges ist eine Aminogruppe gebunden, die eine Kettenverlängerung durch die Polymerase blockiert („vectorette PCR“, Lagerstrom *et al.*, 1991).

Die Matrize des Adapter-Primers wird daher erst durch Bindung und Kettenverlängerung des genspezifischen Primers bereitgestellt. Sollte es dennoch zu einer Verlängerung des 3'-Endes des unteren Adapter-Stranges kommen, so verhindert der Einsatz von Primern, die kürzer als der Adapter selbst sind und nahe an das 5'-Ende des Adapters binden eine weitere

exponentielle Amplifikation. Der Grund dafür ist, dass ein solches PCR-Produkt eine doppelsträngige Adapter-Sequenz an beiden Seiten aufweist. Nach Denaturierung bilden die Einzelstränge eine Haarnadel-Struktur, die stabiler als ein Primer-Templat Hybrid ist („suppression PCR“, Siebert *et al.*, 1995).

Beim Design der GSP sollten verschiedene Kriterien berücksichtigt werden. Zum einen sollte die Sequenz so nahe wie möglich am 5'-Ende des Gens liegen, aber noch genug Spielraum zur eindeutigen Identifizierung des Gens lassen. Die genutzten Primer lagen etwa 150-300 bp vom Startcodon entfernt. Die Primer sollten 26-30 Nukleotide lang sein, einen G/C-Gehalt von 40-60 % und eine Schmelztemperatur von etwa 67 °C aufweisen. Sie sollten zudem keine intramolekularen Strukturen bilden und nicht mit dem entsprechenden Adapter-Primer wechselwirken. Mehr als drei Guanidin- oder Cytosin-Reste an den letzten 6 Positionen am 3'-Ende der Primer waren zu vermeiden.

Zur PCR der unbekannt Sequenzen wurde das Enzym Herculase® hotstart DNA polymerase der Firma Stratagene genutzt. Sie erlaubt die Amplifikation langer Template, die in begrenzter Zahl vorliegen. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

5 µl	„10x Herculase® reaction buffer“
10 pM	AP1
10 pM	GSP1
2,5 nM each	dNTP Mix
2,5 U	Polymerase
1 µl	„Library“
ad 50 µl	ddH ₂ O

Als Positivkontrolle wurde eine im Kit enthaltene „GenomeWalker Human Positive Control Library“ und die unter 2.2.6.3.1 hergestellte „Library“ von menschlicher DNA eingesetzt. Für die Amplifikation dieser wurde anstelle des GSP1 der „positive control gene-specific primer“ PCP1 genutzt. Für beide Primerpaare (AP1/GSP1 und AP1/PCP1) wurden zusätzlich Negativkontrollen ohne DNA durchgeführt. Für das Temperaturprogramm wurde nach Anleitung der Herculase vorgegangen:

	94 °C	2 min
7 Zyklen	94 °C	1 s
	72 °C	12 min
37 Zyklen	94 °C	1 s
	67 °C	12 min
	67 °C	12 min
	4 °C	∞.

Da diese erste Amplifikation keine Banden, sondern nur einen Schmier ergab, wurde eine so genannte „nested“ PCR mit weiter innen liegenden Primern (AP2/GSP2 und AP2/PCP2) durchgeführt. Es wurde das gleiche Protokoll wie bei der ersten PCR nur unter Verwendung der entsprechend anderen Primer genutzt. Das Reaktionsprodukt der ersten PCR wurde dazu 1:100 verdünnt und 2 µl zur Reaktion gegeben. Das Temperaturprogramm blieb ebenfalls gleich, nur wurden anstelle von 37 nur 25 Zyklen angewendet.

Von den nach dieser PCR erhaltenen Banden wurden die größten ausgewählt, aus dem Gel isoliert (siehe 2.2.5.1), in den Vektor pGEM-T® Easy (siehe 2.1.3) ligiert (siehe 2.2.5.3) und in *E. coli* transformiert (siehe 2.2.5.6.1).

Primer	5'→3'-Sequenz	G/C-Gehalt [%]	Länge [bp]	T _m [°C]
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	45	22	59
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	58	19	71
PCP1	AGAAACCCGACCTACCACGGCTTGCTC CTT	57	30	71
PCP2	CCCTTTCCTCGCAGAGGTTTTCTCTCCA GC	57	30	71
GSP1 <i>cor</i>	GAATTCTGAAGAGCAGGGAGGACAAG A	48	27	72
GSP2 <i>cor</i>	GTAACCGACCTCTATCGCTTTCAAAAA CGC	47	30	71
GSP1 <i>cpr</i>	ATCCAGGTCAACTACTTTAACAACCTGC	41	27	62
GSP2 <i>cpr</i>	CTGCAAATGCCTTAGCAAATCCTTCAG C	48	27	72
GSP1 <i>cyp80b3</i>	CATAGCCTTACTTTCTCTAACTTCAGC	41	27	60
GSP2 <i>cyp80b3</i>	TGAAACACGTATCGACCAGAGAGAAC ACG	48	29	71
GSP1 <i>salAT</i>	CATATTAGAGAAGTAACCACCTCAACC	41	27	60
GSP1a <i>salAT</i>	ACGGCAGCAGTTGAACCCCACTACG AGA	59	29	77
GSP2 <i>salAT</i>	GGAAGAAGCTGGCTTAGTGGCACATC C	56	27	71
GSP2.2 <i>salAT</i>	GTTCACCTGAACGATCACCAGTGCTTC CT	48	29	71
GSP2.3 <i>salAT</i>	AGCGGCGGTGGCTGGGTAGAAAAGAA TGA	55	29	77
GSP2.4 <i>salAT</i>	GGAATCATTTCATTTGCGAGGAGCTGG A	46	28	73

Tab. 2-2 Verwendete Primer für das „Genome Walking“.

2.2.6.4 Amplifikation von 5'-cDNA Enden

Um die Größe der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von Genen und damit die Abgrenzung zur Promoterregion (Transkriptionsstart) feststellen zu können, wurde nach Vorschlag von Coleman *et al.* (2001) der GeneRacer™ RACE Ready cDNA Kit (Invitrogen) angewendet. Der Kit basiert auf der „oligo-capping“- (Maruyama und Sugano, 1994) und „5'-RLM-RACE“-Methode („RNA ligase-mediated rapid amplification of 5'-cDNA ends“, Schaefer, 1995; Volloch *et al.*, 1994).

2.2.6.4.1 Dephosphorylierung, Entfernung der Cap-Struktur und Ligation des Adapters

Die nach 2.2.1.3 frisch isolierte totale RNA aus Blättern von 2 verschiedenen Pflanzen des *P. somniferum* München wurde auf einem Agarose-Gel (siehe 2.2.2.2) auf ihre Reinheit und Qualität überprüft. Alle folgenden Reaktionen wurden mit diesen 2 RNAs, also stets doppelt

durchgeführt. Zudem ist im Kit als Positivkontrolle für alle Schritte totale RNA aus HeLa Zellen enthalten.

Zunächst wurde die RNA mit einer im Kit enthaltenen Phosphatase behandelt, um das 5'-Phosphat von teilweise abgebauter RNA und nicht-RNA zu entfernen. Die Dephosphorylierung erfolgt nach folgendem Ansatz:

ca. 4 µg	totale RNA
1 µl	10x Phosphatase-Puffer
40 U	RNaseOut™
10 U	CIP
<i>ad</i> 10 µl DEPC Wasser.	

Der Ansatz wurde bei 50 °C für 1 h inkubiert und anschließend einer Phenol / Chloroform-Reinigung unterzogen. Vor der folgenden Pyrophosphatase-Behandlung wurde die Qualität der dephosphorylierten RNA mit einem Agarose-Gel überprüft. Das enzymatische Entfernen der Cap-Struktur mittels „tobacco acid pyrophosphatase“ (TAP, im Kit enthalten) erfolgte nach folgendem Ansatz:

7 µl	dephosphorylierte RNA
1 µl	10x TAP-Puffer
40 U	RNaseOut™
0,5 U	TAP

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 1 h. Der Ansatz wurde durch Phenol / Chloroform-Reinigung für die Ligation des GeneRacer™ RNA Oligo vorbereitet und die Qualität erneut über ein Agarose-Gel getestet. Der Adapter wurde im folgenden Reaktionsansatz an das 5'-Ende der mRNA, deren Cap-Struktur im vorher gehenden Schritt entfernt worden war, ligiert:

7 µl	dephosphorylierte RNA ohne Cap
0,25 µg	GeneRacer™ RNA Oligo
1 µl	10x Ligase-Puffer
10 mM	ATP
40 U	RNaseOUT™
5 U	T4 RNA Ligase.

Die RNA und der Adapter wurden dabei vor Zugabe der Ligase für 5 min bei 65 °C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Die Ligation erfolgte für 1 h bei 37 °C. Der Ansatz wurde im Anschluss gereinigt und die RNA auf ihre Qualität geprüft.

GeneRacer™ RNA Oligo Sequenz:

5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3' (44 bp)

2.2.6.4.2 cDNA-Synthese und Amplifikation der 5'-UTR

Die reverse Transkription (RT) der mRNA erfolgte nach folgendem Ansatz unter Verwendung der im Kit enthaltenen Reagenzien und Enzyme, wobei die RNA mit den Primern und dNTPs zur Beseitigung von Sekundärstrukturen zunächst bei 65 °C für 5 min erhitzt und kurz abgekühlt wurde:

10 µl	ligierte RNA
50 pM	Oligo dT Primer
10 nM each	dNTP Mix
1 µl	ddH ₂ O
4 µl	5x RT-Puffer
1 µl	0,1 M DTT
40 U	RNaseOut™
200 U	SuperScript™ III RT.

Die cDNA-Synthese wurde für 30-60 min bei 50 °C durchgeführt. Anschließend wurde die RT für 15 min bei 70 °C inaktiviert und die RNA durch Inkubation mit 2 U RNase H bei 37 °C für 20 min abgebaut.

Die Amplifizierung der 5'-UTR wurde mit *Pfu*-oder *Taq*-Polymerase vorgenommen. Bei Nutzung des letzteren Enzyms, wurden aufgrund der höheren Fehlerrate nach Klonierung und Transformation der RACE-Produkte in *E. coli* mindestens 3 Klone analysiert und miteinander verglichen. Da für die genspezifischen Primer (GSP) ähnliche Anforderungen wie für diejenigen für das „Genome Walking“ (siehe 2.2.6.3.2) gestellt wurden, konnten die gleichen Primer wie in der **Tab. 2-2** aufgeführt genutzt werden. Es wurden lediglich Wechselwirkungen mit den GeneRacer™ 5' Primer bzw. dem entsprechenden „nested“ Primer kontrolliert. Für die Positivkontrolle (HeLa) wurde ein Primer (Kontroll Primer B.1), der an das 5'-Ende der β-Aktin cDNA bindet, eingesetzt. Es wurde der PCR-Ansatz:

5 µl	10x Puffer mit Mg ²⁺
2,5 nM each	dNTP Mix
10 pM	GeneRacer 5'-Primer
10 pM	GSP
1-2 U	Polymerase
1 µl	RT-Templat
ad 50 µl ddH ₂ O	

unter Nutzung des Temperaturprogrammes:

	94 °C	2 min
5 Zyklen	94 °C	30 s
	72 °C	2 min
5 Zyklen	94 °C	30 s
	70 °C	2 min
25 Zyklen	94 °C	30 s
	67 °C	2 min
	67 °C	10 min
	4 °C	∞

verwendet. Wenn noch keine Bande aus dieser Reaktion erhalten werden konnte, wurde eine „nested“ PCR mit den entsprechenden „nested“ Primern und 1 µl PCR-Produkt unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Für die Positivkontrolle wurde auch für diese PCR der Kontroll Primer B.1 eingesetzt.

Die *Pfu*-amplifizierten Banden wurden aus einem Agarose-Gel isoliert (siehe 2.2.5.1), in den Vektor pCR®4-TOPO® (siehe 2.1.3) ligiert (siehe 2.2.5.3) und in *E. coli* transformiert (siehe 2.2.5.6.1). Für *Taq*-amplifizierte Produkte wurde das Vektorsystem pCR®2.1-TOPO® (siehe 2.1.3) verwendet.

Primer	5'→3'-Sequenz	Länge [bp]	T _m [°C]
Oligo dT Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTACGGCAT GACAGTG(T) ₂₄ -3'	60	
Kontroll Primer B.1	GACCTGGCCGTCAGGCAGCTCG	22	76
GeneRacer™ 5' Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	23	74
GeneRacer™ 5' Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	26	78

Tab. 2-3 Verwendete Primer für die „5'-RLM-RACE“.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung von unbekanntem Nukleotidsequenzen und zur Überprüfung von klonierten Plasmiden wurde die DNA sequenziert. Dazu wurde der BigDye Terminator Cycle Sequencing v.2.0 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), der eine thermostabile *AmpliTaq*®-DNA-Polymerase beinhaltet, genutzt. Das System beruht auf der Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide (ddNTPs) nach Sanger *et al.* (1977). Allerdings sind die 5'-Enden der ddNTPs nicht radioaktiv, sondern mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die gleichzeitig über eine CCD-Kamera analysiert wurden. Die Polymerase ist eine Doppelmutante, die keine 5'-3'-Nuklease-Aktivität und eine erhöhte Akzeptanz gegenüber ddNTPs besitzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach folgendem Ansatz:

4 µl	BigDye Mix
1 µl (3-10 pM)	Primer
1-5 µl (600 ng)	Plasmid-DNA
ad 10 µl	ddH ₂ O

Der BigDye Mix bestand dabei aus 2 Einheiten BigDye Terminatoren, 1 Einheit 5x Lösungspuffer und 1 Einheit ddH₂O. Die Reaktion wurde im Thermal Cycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: Vorheizen auf 96 °C, 25 Zyklen mit 10 s bei 96 °C, 5 s bei 50-60 °C und 4 min bei 60 °C. Im Anschluss wurde die Reaktion auf 4 °C abgekühlt, mit 10 µl ddH₂O versetzt und über Gelfiltration gereinigt. Die dazu verwendeten Säulen bestanden aus mit 300 µl ddH₂O für mindestens 2 h gequollenem Sephadex G-50 Superfine (Pharmacia), das vor dem Quellen mit Hilfe eines Multiscreen 45 µl column loaders (Millipore) in Multiscreen-HV Platten (Millipore) verteilt worden war. Die Säulen wurden zunächst durch Zentrifugation (5 min, 2300 rpm) vorbereitet. Danach wurde die Reaktion geladen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden durch Kapillarelektrophorese im Sequenzierer ABI PRISM™ 310- oder 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) getrennt und detektiert.

2.2.8 Sequenzierung unter Verwendung von Transposons

Zur Sequenzierung des etwa 3,5 kb langen putativen Promotors der (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-hydroxylase wurde der EZ::TN^{ZM} <KAN-2> Insertion Kit (Epicentre) genutzt. Dabei wurde in einer *in vitro* Reaktion ein einzelnes EZ::TNTM Transposon, das einen Selektionsmarker für Kanamycin enthielt, an einer zufälligen Position in das Plasmid pGEM-T® Easy mit der Promotorsequenz inseriert. Der Reaktionsansatz lautete:

0,2 µg	Plasmid
molares Äquivalent	Transposon
1 µl	10x Transposase-Puffer
1 U	Transposase
<i>ad</i> 10 µl dH ₂ O	

Als Positivkontrolle diente das Plasmid pUC19. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 2h. Anschließend wurde 1 µl des Ansatzes einer Hitze-Schock-Transformation (siehe 2.2.5.6.1) in *E. coli* unterzogen. Die Zellen wurden danach auf LB mit Ampicillin ausplattiert. Daher sind Bakterien, bei denen das Transposon die Sequenz des Ampicillin-Gens von pGEM-T® Easy unterbrochen hatte, ausgeschlossen. 96 Kolonien wurden gepickt und die Plasmide nach 2.2.1.1.2 präpariert. Ein Restriktionstest (siehe 2.2.3) mit *SalI* wurde mit 12 Plasmiden durchgeführt. Zur Sequenzierung (siehe 2.2.7) wurden die im Kit enthaltenen T7 und RP Primer (siehe 2.2.6.1) verwendet. Die Sequenzen wurden danach mit der Software Seqman (DNASTAR) untereinander verglichen und zu einer Sequenz vereint.

2.2.9 „Real Time“ RT-PCR Analyse von Transkripten aus *P. somniferum* L.

Zur Analyse der Transkriptionslevel verschiedener Gene in transgenen Pflanzen im Vergleich zu Wildtypen wurde die „Real Time“ RT-PCR - Methode genutzt. Dabei wird die mRNA zunächst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Nutzung genspezifischer Primer und des SYBR® Green Farbstoffes erlaubt eine Echtzeit-Analyse einer spezifischen DNA-Amplifikation. SYBR® Green I bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA. Seine Affinität zu einzelsträngiger DNA ist weitaus geringer. Der resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 498 nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 522 nm. Im ungebundenen Zustand fluoresziert der Farbstoff kaum (Zipper *et al.*, 2004).

2.2.9.1 DNase Verdau

Um die in der RNA-Lösung vorkommenden Spuren von gDNA, die die quantitative Auswertung der Amplifikation stören würden, zu eliminieren wurde die totale RNA zunächst einer Behandlung mit Desoxyribonuklease I (Sigma) unterzogen. Der Reaktionsansatz bestand aus:

5-10 µg	totale RNA
1 µl	10x DNase I-Puffer
1 U	DNase I
<i>ad</i> 10 µl ddH ₂ O.	

Die Reaktion erfolgte 15 min bei Raumtemperatur und wurde durch Zugabe von 1 µl Stopp-Lösung (50 mM EDTA) und Inkubation bei 70 °C für 10 min abgestoppt. Der Erfolg des DNA-Abbaus wurde durch „Real Time“-PCR überprüft (siehe 2.2.9.3).

2.2.9.2 cDNA Synthese

Zur reversen Transkription der mRNA wurde das SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) genutzt. Dazu wurden zunächst

3-5 µg	DNase I verdaute RNA
50 pM	Oligo dT Primer
2,5 nM each	dNTP
<i>ad</i> 10 µl DEPC Wasser	

gemischt und für 5 min bei 65 °C zur Entfernung von Sekundärstrukturen der RNA inkubiert. Anschließend wurden

2 µl	10x RT-Puffer
100 nM	MgCl ₂
0,2 µM	DTT
40 U	RNaseOut™
200 U	SuperScript™ III RT
<i>ad</i> 10 µl DEPC Wasser	

gemischt und zu dem Gemisch aus RNA und Primern gegeben. Die cDNA-Synthese wurde bei 50 °C für 50 min durchgeführt und im Anschluss für 5 min bei 85 °C gestoppt. Durch Zugabe von 2 U RNase H und Inkubation für 20 min bei 37 °C wurde die RNA vor der weiteren Verwendung abgebaut. Die cDNA wurde für die „Real Time“ PCR 1:10 mit ddH₂O verdünnt und der Rest bei -80 °C eingefroren.

2.2.9.3 „Real Time“ Aufnahme der DNA Amplifikation

Die „Real Time“ PCR wurde unter Nutzung des Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) und genspezifischer Primer durchgeführt. Der „Master Mix“ enthält die SureStart® *Taq* DNA Polymerase, die erst durch Inkubation für 9-12 min bei 92-95 °C aktiviert wird. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Primer Express® Software v2.0 (Applied Biosystems) entworfen. Anforderungen an die Primer waren:

- nicht mehr als 2 Guanin oder Cytosin in den letzten 5 Basen am 3'-Ende des Primers,
- eine optimale Schmelztemperatur von 59 °C,
- ein G/C-Gehalt von 30-80 %,
- eine optimale Länge der Primer von 20 bp und
- eine Amplikon-Länge von 50 bis maximal 150 bp.

Mit diesen Voraussetzungen ist eine PCR mit nahezu 100%iger Effizienz möglich. Der Reaktionsansatz (25 µl) lautete:

12,5 µl	2x „Master Mix“
10 µl	Primer-Mix (entspricht je 0,1 pM)
2,5 µl	cDNA (entspricht 20-25 ng).

Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die Aufnahme der Amplifikationskurve erfolgte mit dem iQ5 Real Time PCR Detection System (BioRad) unter Nutzung des folgenden Temperaturprogrammes: Denaturierung für 10 min bei 95 °C, 40 Zyklen mit 30 s bei 95 °C, 1 min bei 60 °C und 1 min bei 72 °C. Dabei wurden in jedem Zyklus während der Kettenverlängerung Fluoreszenz-Daten gesammelt. Im Anschluss wurde zur qualitativen Kontrolle der Primer eine Schmelzkurve aufgenommen. Dazu wurde die DNA erneut für 1 min bei 95 °C denaturiert und die Temperatur anschließend alle 10 s beginnend bei 55 °C in 0,5 °C Inkrementen auf 95 °C erhöht. Nach jedem zweiten Zyklus wurden die Daten erfasst.

Primer	5'→3'-Sequenz	Länge [bp]	T _m [°C]
Tubulin fp	GCCGATGCAGCTACAATGAGTA	22	59
Tubulin rp	CCGAGTCGAAAGAAGGAATCAA	22	59
<i>salAT</i> fp	CTTGAGGTTTGACGGAGCCAT	21	59
<i>salAT</i> rp	ACGACGAGAGCATGAAGTGGA	21	59
<i>salR</i> fp	TCAACTTGATGTTACGGATCCAA	23	58
<i>salR</i> rp	CCCCAGCATTGTTTACCAAGA	21	59
<i>cor1</i> fp	TCACTCTCAGTCCGGCATTTC	21	59
<i>cor1</i> rp	CGCTTTCAAAAACGCCAATT	20	59

Tab. 2-4 Verwendete Primer für die „Real Time“ RT-PCR.

2.2.9.4 Quantifizierung der „Real Time“ RT-PCR Messungen

PCR ist eine sequenzspezifische, exponentielle Amplifizierung einer DNA Population mit einer Anfangsmenge (N_0). Wenn zu jedem PCR-Zyklus die Populationsgröße verdoppelt würde, die PCR also mit 100 % Effizienz arbeitet, dann wäre die Populationsgröße im Zyklus n (N_n) doppelt so groß wie zum Zyklus $n-1$. Es kann also die Formel $N_0 = 2^{-n} N_n$ abgeleitet werden. Zur Auswertung der Daten wurde der sogenannte „threshold cycle“ (Schwellenwert-Zyklus, Ct-Wert) herangezogen. Er ist definiert als der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig statistisch-signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Durch Verwendung dieses Wertes wird die Transkriptmenge stets am Anfang der exponentiellen und damit quantifizierbaren Phase der Amplifikation gemessen. Die Proben sind in Triplikaten gemessen worden, wobei der Ct-Wert der 3 Messungen eine Standardabweichung von 0,5 nicht überschreiten durfte. Es wurde eine relative Quantifizierung mit Hilfe der delta-delta-Ct-Methode angewendet. Dabei wurden zunächst die gemittelten Ct-Werte der Amplifikation des Referenzgens, Tubulin, jeder Probe von denen der Amplifikation des zu untersuchenden Gens der gleichen Probe abgezogen (entspricht delta-Ct). Danach wurde der delta-Ct-Wert der transgenen Pflanzen vom gemittelten delta-Ct-Wert von 6 nicht-transgenen Kontroll-Pflanzen abgezogen (delta-delta-Ct). Die relative Menge an Transkript (R) einer Probe wurden demnach über die Beziehung

$$R = 2^{-(\Delta Ct \text{ Kontrolle} - \Delta Ct \text{ Probe})}$$

berechnet (Pfaffl, 2004).

2.2.10 Bestäubung und Samenernte von *P. somniferum* L.

Die Blüte der Schlafmohn-Pflanze besteht in der Regel nur für einen Tag, bevor die Blütenblätter abfallen und die Kapsel augenscheinlich wird. Zur Selbstbestäubung wurde der Pollen der Staubblätter mit den Fingern über die Narbe der Kapsel gezogen.

Für die Samenernte mussten die Schlafmohn-Pflanzen bei reduzierter Lichtmenge und falls möglich leicht erniedrigter Temperatur im Gewächshaus abreifen. Sie wurden zudem mit weniger Wasser versorgt. Der Prozess des Abreifens dauerte etwa 1-2 Monate.

2.2.11 Chromatographie

2.2.11.1 Isolierung von Alkaloiden aus dem Milchsaft von *P. somniferum* L. für die Chromatographie

Zwei Tage nach dem Abfallen der Blütenblätter wurden die Kapseln mit einem Skalpell angeritzt. Der austretende Latex, der an der Luft schnell oxidiert, wurde zügig mit einer Pipette in 200 µl Sammelpuffer (0,1 M Natriumphosphat, 0,5 M Mannitol, 23 mM Ascorbinsäure) (Roberts *et al.*, 1983) überführt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die Alkaloide wurden sowohl aus dem Zytosol als auch aus den Vesikeln isoliert und analysiert. Die angewandte Methode ist in Frick *et al.* (2005) beschrieben. Eine Dihydrocodeinhydrogentartrat-Lösung (Konzentration: 1 g/l, 30 µl entsprechen 20,05 µg Dihydrocodein) diente als interner Standard zur Quantifizierung.

2.2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen der zytosolischen Fraktion erfolgte nach der von Bradford (1976) entwickelten Methode. Sie beruht auf der Absorptionsverschiebung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm durch Bindung von Proteinen. Die Konzentration wurde dabei anhand einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve ermittelt. Es wurde das Bio-Rad-Reagenz (BioRad) nach Anleitung des Herstellers genutzt. Die Durchführung der Dreifach-Messungen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte im Mikroplatten-Lesegerät MRX (Dynatech Laboratories).

2.2.11.3 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Analyse der Latex-Alkaloide isoliert nach 2.2.10.1 wurde mit Hilfe des LC 1100 series Agilent systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) unter Nutzung der „reversed phase“-Säule Lichrospher 60 RP-select B (Länge: 250 mm, Innendurchmesser: 2mm, Partikelgröße: 5 µm, Merck) und UV-Detektion bei 210 nm, 282 nm und 490 nm durchgeführt. Die Lösungsmittel A [Acetonitril:Wasser (2:98; v/v)] und B [Acetonitril:Wasser (98:2; v/v)] wurden verwendet. Beide Lösungsmittel enthielten jeweils 0,01 % (v/v) Phosphorsäure. Der genutzte Gradient war: innerhalb von 25 min von 0 % auf 46 % B, innerhalb von 1 min auf 100 % B, während 7 min isokratisch und innerhalb von 2 min auf 0 % B. Nach jeder Probenmessung wurde die Säule für 5 min mit Lösungsmittel A äquibriert. Es wurde eine Flussrate von 1 ml/min und ein Injektionsvolumen von 5 µl genutzt. Die Prozedur ist in Frick *et al.*, 2005 beschrieben. Vor jeder Probenreihe wurden zum Vergleich der Retentionszeiten Standards der Alkaloide vermessen. Außerdem wurden die UV-Spektren der Alkaloide kontrolliert. Ausgewählte Proben wurden mittels LC-ESI-MS/TOF analysiert.

2.2.11.4 Quantifizierung der HPLC-Analysen

Die Viskosität des Milchsafte unterscheidet sich aufgrund äußerer Bedingungen (z.B. Zeitpunkt der letzten Versorgung mit Wasser) von Pflanze zu Pflanze teils erheblich. Daher war die Nutzung der Menge (Volumen) oder Masse an Latex als Bezugspunkt zur Quantifizierung der Alkaloide ungeeignet. Aus diesem Grund wurde die Menge an Protein im Zentrifugationsüberstand des Milchsafte (12.000 rpm), somit also die Menge an löslichem Protein, bestimmt. Die Alkaloidkonzentration wurde dann auf 100 µg lösliches Protein bezogen. Als interner Standard wurde Dihydrocodein verwendet. Um das unterschiedliche Absorptionsverhalten von Dihydrocodein im Vergleich zu den im Latex auftretenden Alkaloiden für die Berechnung auszugleichen, wurde ein Faktor F eingeführt. Die Berechnung erfolgte über die folgenden Zusammenhänge:

$$\begin{aligned} \text{Vesikel:} & \quad c_v = 100 \mu\text{g } A_v n_{\text{dhc}} F / A_{\text{dhc}} n_{\text{Pr}} \\ \text{Zytosol:} & \quad c_z = 100 \mu\text{g } A_z n_{\text{dhc}} F V_G / A_{\text{dhc}} n_{\text{Pr}} V \\ \text{Gesamt:} & \quad c = c_v + c_z \end{aligned}$$

wobei

- c_v, c_z – Alkaloidkonzentration der Vesikel- (V) bzw. zytosolischen Fraktion (Z) [$\mu\text{g} / 100 \mu\text{g}$ lösliches Protein]
- A_v, A_z – Fläche des untersuchten Alkaloids im Chromatogramm der Vesikel- (V) bzw. zytosolischen Fraktion (Z)
- n_{dhc} – eingesetzte Menge an Dihydrocodein [μg]
- A_{dhc} – Fläche des Dihydrocodein im Chromatogramm
- n_{Pr} – Menge an löslichem Protein in der zytosolischen Fraktion [μg]
- V_G – Gesamtvolumen der zytosolischen Fraktion [μl]
- V – eingesetztes Volumen der zytosolischen Fraktion [μl]
- c – Gesamtalkaloidkonzentration [$\mu\text{g} / 100 \mu\text{g}$ lösliches Protein]

entsprachen. Die experimentell ermittelten Faktoren sind Morphin – 0,49; Codein – 0,83; Thebain – 0,92; Salutaridinol – 1; Oripavin – 0,8; (R,S)-Retikulin – 0,68; (S)-Scoulerin – 1,54; Salutaridin – 0,95; Laudanin – 1,25 und (R,S)-Laudanosin – 1,28 (Dr. Kramell, IPB, Halle).

2.2.11.5 LC/ESI-MS/TOF

Die Anfertigung der LC-MS Daten erfolgte mit Hilfe eines Massenspektrometers des Typs Mariner (Applied Biosystems, Lincoln, USA) ausgerüstet mit einer Turbulon Spray Ionenquelle (PE-Sciex, Concord, ON, Kanada) in Kombination mit einem HPLC System der Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) adaptiert für Flussraten von 0,2 ml/min. Die Massenspektren wurden mittels Electro-Spray-Ionisierung (ESI) und einem Time-of-Flight (TOF) Detektor generiert. Es wurde eine „reversed-phase“ Matrix des Typs Superspher 60 RP- select B (Länge: 125 mm, Innendurchmesser: 2mm, Partikelgröße: 5µm, Merck) verwendet. Das Probeninjektionsvolumen betrug jeweils 2 µl. Folgende Lösungsmittel wurden verwendet: A [Acetonitril:Wasser (2:98; v/v)] und B [Acetonitril:Wasser (98:2; v/v)], wobei beide Lösungsmittel jeweils 0,2 % (v/v) Ameisensäure enthielten. Der Gradient war wie folgt: innerhalb von 25 min von 0 % auf 46 % B, anschließend innerhalb von 1 min auf 90 % B und bei dieser Konzentration für 7 min zum Regenerieren der HPLC-Matrix gehalten. Die Chromatographie-Säule wurde dann mit 0 % B wieder re-äquilibriert.

Das Massenspektrometer arbeitete im Positiv-Ionen Modus mit den Gas-Parametern N₂-Schutzgas: Flussrate von 1,5 l/min, N₂-Spraygas: Flussrate von 0,5 l/min und N₂-Heizgas:

Flussrate von 7 l/min. Die Potentiale betragen für die Ionenequelle 5,5 kV, für die Einlass-Spannung 180 V und für die Detektorspannung 1,95 kV. Die Temperaturen waren 140 °C für den Quadrupole und 350 °C für das Heizgas der Turbulon Spray Quelle.

2.2.11.6 LC/ESI-MS/SRM

Die positiven Elektronenspray „selected reaction monitoring“ (SRM) Daten wurden mit einem ThermoFinnigan MAT TSQ 7000 Instrument (ESI Spannung 4,5 kV; APICID Spannung 10 V, Kapillartemperatur 220 °C; Schutzgas: Stickstoff) kombiniert mit einem Surveyor MicroLC System (ThermoFinnigan) und einer RP18-Säule (Länge: 100 mm, Innendurchmesser 1 mm, Partikelgröße 4 µm, Ultrasep) aufgenommen. Für die HPLC wurde ein Gradienten System beginnend bei Wasser:Acetonitril, 85:15 (mit 0,2 % (v/v) Essigsäure) auf 5:95 innerhalb von 30 min und gefolgt von einer 10-minütigen isokratischen Periode bei einer Flussrate von 70 µl/min genutzt.

Die SRM Reaktionen (Niessen, 1999) basierten auf der Bildung des intensivsten Ions im entsprechenden Elektrospray CID („collision-induced dissociation“) Massenspektrum. Diese Signale wurden sowohl zur Identifikation als auch zur Quantifizierung genutzt. In **Tab. 2-5** sind die zur Aufnahme und Analyse der positiven Elektronenspray CID Massenspektren der Alkaloide 1,2-Dehydroretikulin, Salutaridin und Scoulerin verwendeten Parameter aufgelistet. Die vollständigen Daten der Alkaloide sind in Raith *et al.* (2003) publiziert.

Verbindung	RT _{LCMS} [min]	SRM	Kollisionsenergie [eV]
1,2-Dehydroretikulin	6.62	m/z 328 → m/z 312	40
Salutaridin	6.82	m/z 328 → m/z 237	30
Scoulerin	8.42	m/z 328 → m/z 178	30

Tab. 2-5 SRM Daten der Alkaloide 1,2-Dehydroretikulin, Salutaridin und Scoulerin.

Positive ESI-CIDMS, m/z (relative Intensität [%]): Dehydroretikulin 328 ($[M]^+$, 11), 312 ($[M-CH_3-H]^+$, 100); Salutaridin: 328 ($[M+H]^+$, 37), 237 (100) und Scoulerin: 328 ($[M+H]^+$, 40), 178 (100).

3 Ergebnisse

3.1 Vektorkonstruktion und Gewinnung der *salAT* RNAi Pflanzen durch Transformation von *P. somniferum* L.

3.1.1 Konstruktion der RNAi Vektoren

Gegenstand meiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Naturstoffbiotechnologie am Institut für Pflanzenbiotechnologie (IPB) in Halle war die Konstruktion von Vektoren zum Zwecke der Stilllegung von Genen aus der Alkaloid-Biosynthese in Schlafmohn (Kempe, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch der *salAT* RNAi und *cyp80b3* RNAi Vektor kloniert. Zum Einsatz kamen dabei die beiden Plasmide pHANNIBAL und pART27 (siehe 2.1.3). Zunächst wurde je ein 656 bp langes Fragment der *salAT* cDNA (Grothe *et al.*, 2001) bzw. je ein 706 bp großes Fragment der *cyp80b3* cDNA (Huang und Kutchan, 2000) aus *P. somniferum* über Restriktionsschnittstellen in Lese- („sense“) und Gegenrichtung („antisense“) in das Plasmid pHANNIBAL ligiert. Die Länge des entsprechenden Fragments entsprach dabei der von Wesley *et al.* (2001) empfohlenen Größe zwischen 400 und 800 bp. Die dadurch erhaltene Expressionskassette bestehend aus CaMV 35S Promotor, Genfragment in Leserichtung, Intron, Genfragment in Gegenrichtung und OCS Terminator (Abb. 3-1) wurde anschließend über *NotI* Schnittstellen in den Binärvektor pART27 ligiert.

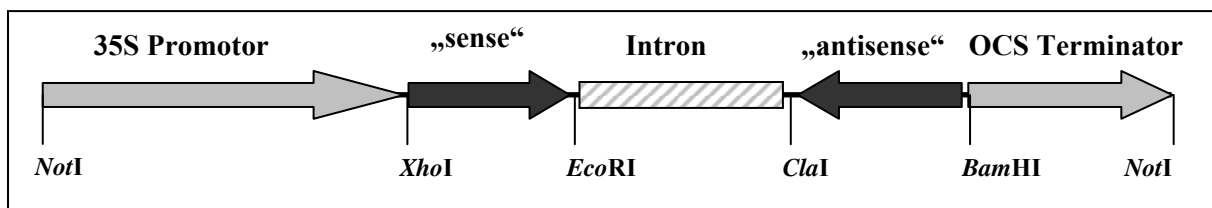


Abb. 3-1 Expressionskassette nach Kempe (2003).

Fragmente der Gene *cyp80b3* und *salAT* wurden in Lese- („sense“) und Gegenrichtung („antisense“) über die angegebenen Restriktionsschnittstellen in die Kassette des Vektors pHANNIBAL ligiert. Die entstandene Expressionskassette wurde über *NotI* in den binären Vektor pART27 ligiert.

3.1.2 Transformation von *P. somniferum* L. und Regeneration von Pflanzen

Zu Beginn der Dissertation wurden die erhaltenen Vektoren über Elektroporation in *A. tumefaciens* AGL1 transformiert (siehe 2.2.5.6.2). Die Bakterienstämme konnten danach zur Transformation von *P. somniferum* C058-34 unter Nutzung des unter 2.2.5.6.3 beschriebenen Protokolls verwendet werden. Aus den Explantaten sind innerhalb von etwa 5 Monaten 125 *salAT* RNAi und 120 *cyp80b3* RNAi Zelllinien hervorgegangen, die auf 19D-Medium (siehe 2.1.4) vermehrt wurden. Zur Induktion der Embryogenese sind aus diesen Zelllinien während der folgenden 4 Monate jeweils 2 bis 3 Zellkulturen isoliert und auf dem hormonfreien B50-Medium (siehe 2.1.4) angezogen worden. Innerhalb von 3 bis 6 Monaten konnten daraus Embryonen erhalten werden. Diese wiesen jedoch in der Regel keine Wurzeln auf und sind bereits nach dem ersten Umsetzen auf frisches Medium eingegangen. Daher wurde das Protokoll nach 4 Monaten leicht verändert. Die folgenden Embryonen wurden auf Medium ohne Selektion herangezogen. Auf diese Weise konnten 104 Pflanzen aus der *salAT* RNAi und 62 Pflanzen aus der *cyp80b3* RNAi Transformation im Gewächshaus aufgezogen werden. Abb. 3-2 zeigt einzelne Schritte und den zeitlichen Verlauf der Transformation.

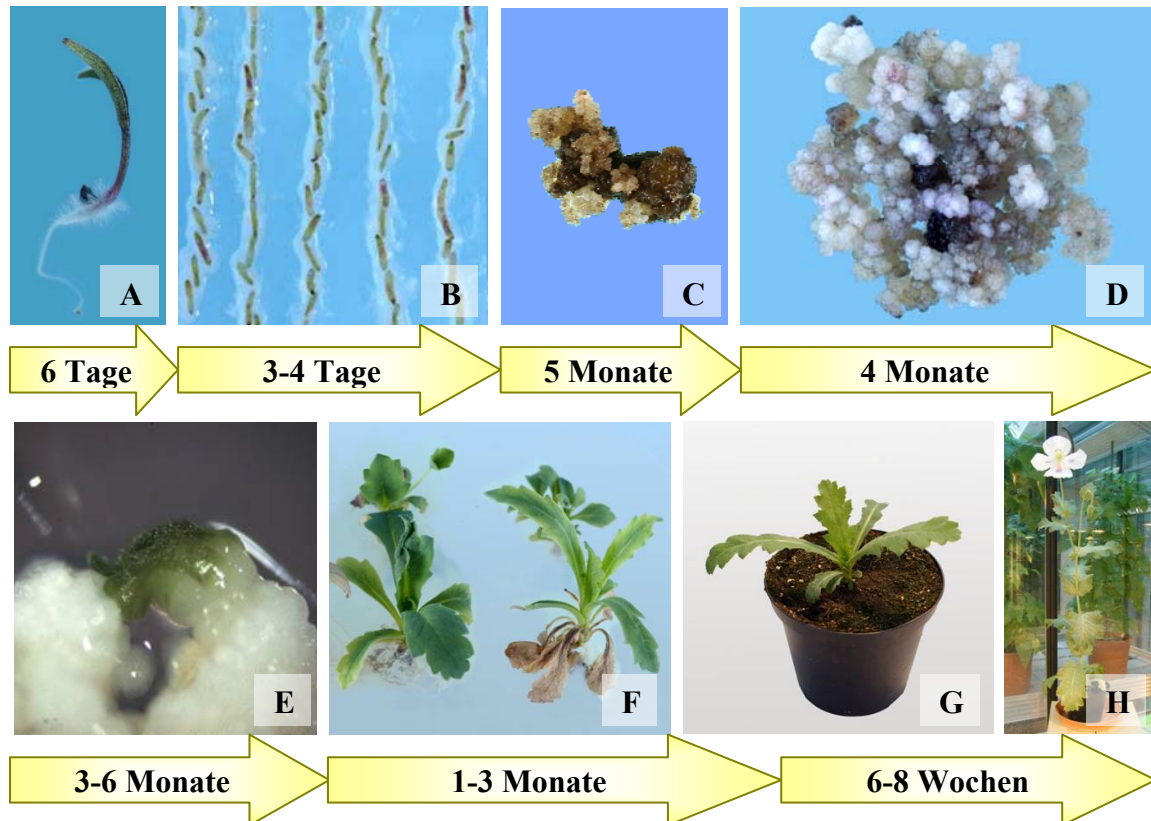


Abb. 3-2 Zeitlicher Verlauf der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation des *P. somniferum*.

- A – 1 Woche alter Keimling des *P. somniferum*, Größe: ca. 1-1,5 cm ohne Wurzel
- B – Co-Kultivierung der Schlafmohn-Explantate (Stängel) mit *A. tumefaciens* nach 4 Tagen
- C – Circa 4 Monate alter Kallus Typ I (auf 19D-Medium vermehrt), Größe: ca. 1 cm lang
- D – frisch isolierter Kallus Typ II (auf B5O-Medium vermehrt), Größe: ca. 1,5 cm im Durchmesser
- E – sich entwickelnder Embryo, Größe: ca. 1-2 mm
- F – 6 - 10 Wochen alte Pflänzchen, Größe: ca. 3-4 cm
- G – auf Erde ausgebrachte Pflanze
- H – regenerierte Pflanze

Zudem wurde der Schlafmohn zur Kontrolle auch mit dem Vektor pART27 (Vektorkontrolle) und mit einem *A. tumefaciens* Stamm ohne Binärplasmid (Nullkontrolle) behandelt. Bei der Regeneration von Pflanzen der Vektorkontrolle traten dabei die gleichen Probleme wie für die Zelllinien *salAT* und *cyp80b3 RNAi* auf. Daher wurden auch diese auf Medium ohne Selektion aufgezogen. Embryonen der Nullkontrolle wurden aufgrund des fehlenden Binärvektors ohnehin nicht auf Selektionsmedium gezogen. Aus 62 Zelllinien der Vektorkontrolle sind 62 Pflanzen und aus 30 Kulturen der Nullkontrolle sind 21 Pflanzen hervorgegangen. Embryonen der Nullkontrolle konnten im Allgemeinen schneller zu vollständigen Pflanzen herangezogen werden. Die Bildung des Kallus Typ II und der Embryonen verlief jedoch im gleichen Zeitrahmen.

Einige der regenerierten Pflanzen sowohl der Zelllinien *salAT* und *cyp80b3 RNAi* als auch der Kontrollen wiesen Missbildungen auf. Häufig war eine veränderte Anzahl an Blütenblättern zu beobachten (**Abb. 3-3A-C**). Vereinzelt traten auch Missbildungen von Stängeln, Blättern oder Kapseln auf (**Abb. 3-3D-G**). Andere Pflanzen waren phänotypisch von Wildtypen nicht zu unterscheiden.

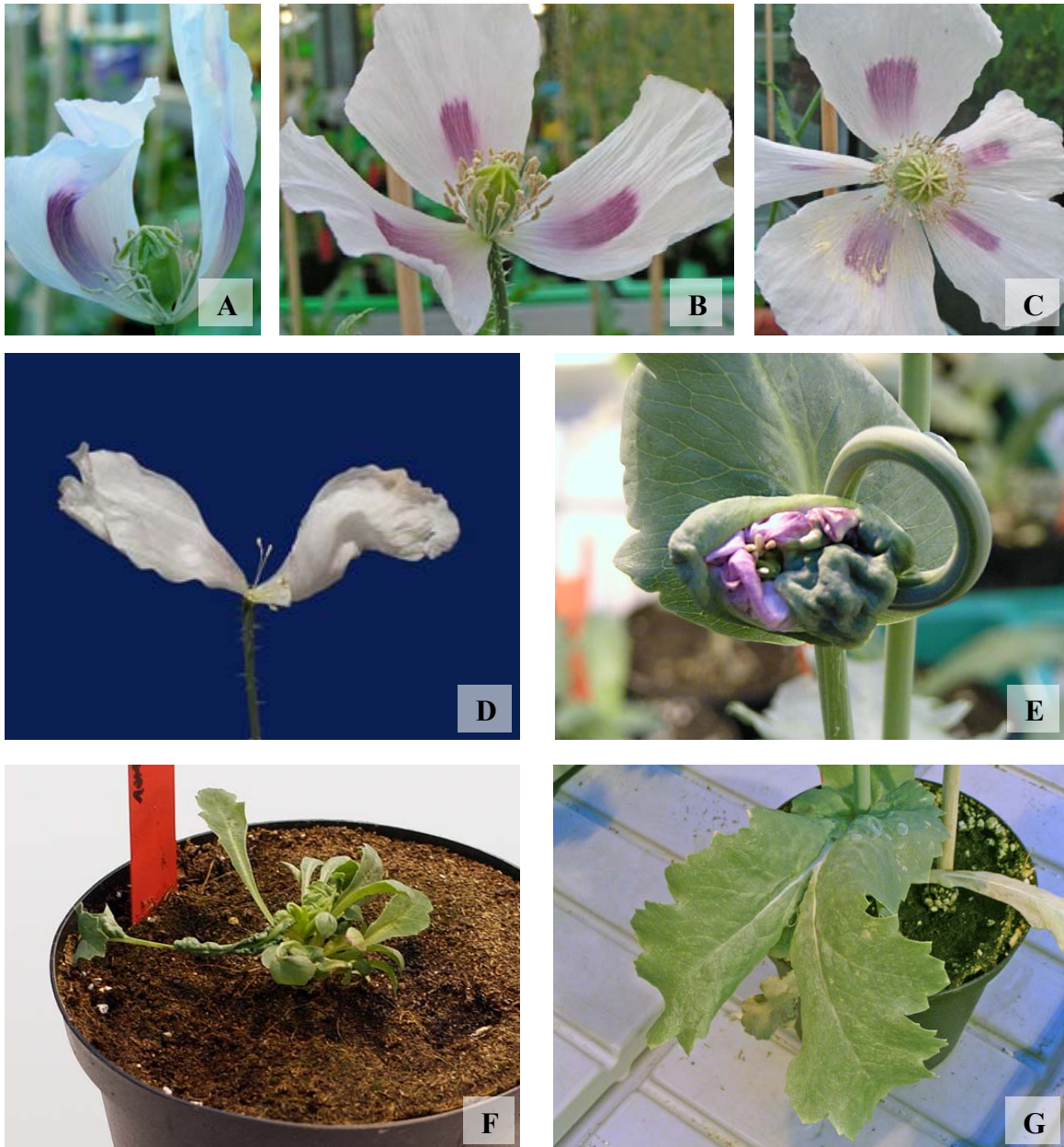


Abb. 3-3 Auswahl aufgetretener Missbildung einiger regenerierter Pflanzen.

- A - D – veränderte Anzahl an Blütenblättern
- D – fehlende Kapsel
- E – Missbildung der Knospe
- F - G – Missbildung der Blätter

3.1.3 Überprüfung der Transformation

Die regenerierten Pflanzen der beiden RNAi Zelllinien wurden mittels PCR (siehe 2.2.6.2) unter Verwendung der Primerpaare pHANS / pHAN-Intron as oder pHAN-Intron s / pHANas auf das Vorhandensein der Expressionskassette und unter Nutzung der Primer *nptII* s und *nptII* as auf die Präsenz des Selektionsgens *nptII* hin überprüft (siehe **Tab. 2-2**). Dabei stellte sich heraus, dass von 104 *salAT* RNAi Pflanzen 16 und von 62 Pflanzen der *cyp80b3* RNAi Zelllinie keine transgen waren.

Die 62 Pflanzen, die aus der Vektorkontrolle regeneriert worden waren, wurden ebenfalls auf die Anwesenheit der Selektionskassette hin getestet. Das Ergebnis zeigte, dass keine transgene Pflanze der Vektorkontrolle regeneriert werden konnte.

3.2 Analyse des Wildtyps

3.2.1 Untersuchung des Genotyps mittels „Southern blot“

Zur Abschätzung der Anzahl der *salAT*-Gene im Genom der Schlafmohnsorte C058-34 wurde dessen gDNA mit den 3 Restriktionsendonukleasen *EcoRV*, *EcoRI* und *HindIII* hydrolytisch geschnitten (siehe 2.2.3), elektrophoretisch getrennt (siehe 2.2.2.1), auf eine Nylonmembran übertragen (siehe 2.2.4.1) und mit einer zum Gen *salAT* homologen Sonde radioaktiv hybridisiert (siehe 2.2.4.4) (**Abb. 3-4**). Die Enzyme *EcoRV* und *EcoRI* schneiden die cDNA von *salAT* nicht, dennoch sind 6 bzw. 5 Banden im Blot zu erkennen. Das spricht dafür, dass mehrere, zu *salAT* homologe Sequenzen in der Schlafmohnsorte C058-34 auftreten. Auch *HindIII* schneidet den Leserahmen des Gens nicht. Im Gegensatz zu der mit *EcoRV* und *EcoRI* geschnittenen DNA sind aber nur 3 Banden sichtbar. Die verminderte Zahl könnte durch Überlagerung von Banden oder durch das Vorhandensein von Introns, die Erkennungssequenzen für die Endonukleasen *EcoRV* und *EcoRI* aufweisen, erklärt werden. Eventuell sind auch kleine Fragmente entstanden, die nicht mehr nachweisbar waren. Allerdings zeigte auch die Nutzung von *HindIII*, dass mindestens 3 Kopien von *salAT* im Genom der zur Transformation verwendeten Sorte des *P. somniferum* vorkommen.

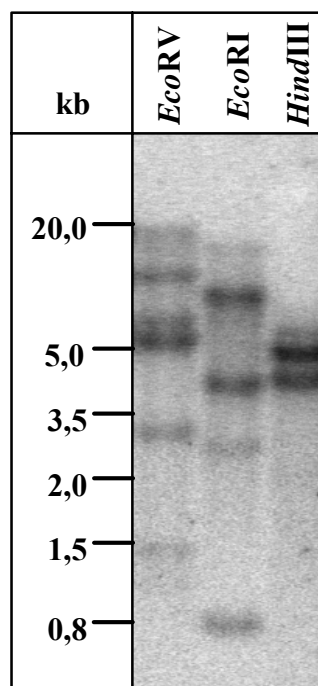


Abb. 3-4 „Southern blot“ der *P. somniferum* Sorte C058-34.

Für die Analyse wurden 10 µg gDNA mit den oben benannten Enzymen verdaut. Der Blot wurde mit einer *salAT*-Sonde hybridisiert. Die Skala gibt die Größe der DNA-Fragmente in kb an.

3.2.2 Untersuchungen zum Transkriptionsverhalten

Um festzustellen, wie hoch die Menge an *salAT*-Transkript in verschiedenen Geweben der Schlafmohnsorte C058-34 ist, wurde ein „northern blot“ angefertigt (siehe 2.2.4.2) (**Abb. 3-5**). Die Ernte von Blattmaterial erfolgte 2 Tage, die der Kapsel 7 Tage nach dem Abfallen der Blütenblätter.

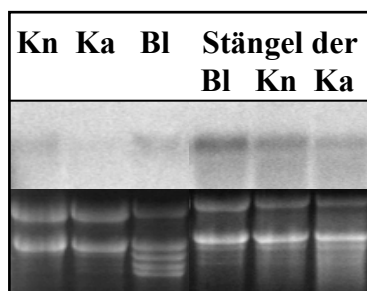


Abb. 3-5 „Northern blot“ der Schlafmohnsorte C058-34 von verschiedenen Geweben (oben) mit Ladekontrolle (unten).

Für die Analyse wurden 15 µg totale RNA des entsprechenden Gewebes verwendet. Der Blot wurde mit einer *salAT*-Sonde hybridisiert. Legende: Kn – Knospe, Ka – Kapsel, Bl – Blüte.

Die Analyse zeigte, dass die Expression von *salAT* im Knospen-Stadium etwas höher war als mehrere Tage nach der Blütenphase. Eine mit der in der Knospe vergleichbare Menge an Transkript wurde im Blatt, das 2 Tage nach dem Abfallen der Blütenblätter geerntet worden war, gefunden. Die höchste Expression konnte jedoch im Stängel während dieser Zeit nachgewiesen werden. Grothe *et al.* (2001) fand eine geringe, aber gleichmäßige Expression des Gens in Kapsel, Stängel, Blatt und Wurzel. Allerdings wurde für diese Studie eine andere Schlafmohnsorte verwendet. Facchini und Park (2003) fanden in der *P. somniferum* Sorte Marianne eine hohe Akkumulation des *salAT* Transkripts in Stängel und Knospe, eine geringere Menge in Wurzel und nur wenig Transkript im Blatt. Die geringen Unterschiede in diesen 3 Studien können durch die unterschiedlichen Schlafmohnsorten, durch natürliche Variationen einzelner Pflanzen oder durch eine Ernte in unterschiedlichen Entwicklungsstadien bedingt sein.

3.2.3 Analyse der Latex-Alkaloide im Wildtyp

Zur Analyse der Alkaloide im Latex wurden 18 Pflanzen des *P. somniferum* C058-34 im Gewächshaus angebaut. Der Latex wurde 2 Tage nach dem Abfallen der Blütenblätter geerntet, die Alkaloide extrahiert und von Dr. Kramell (IPB, Halle) über HPLC analysiert (siehe 2.2.10). Die Messung der 18 Pflanzen zeigte, dass die Hauptalkaloide der narkotischen Schlafmohnsorte C058-34 Thebain mit 229 ± 102 µg pro 100 µg lösliches Protein, Morphin mit 281 ± 88 µg pro 100 µg lösliches Protein und Codein mit 98 ± 39 µg pro 100 µg lösliches Protein waren (**Abb. 3-6**). Es wurden aber auch Laudanin (14 ± 6 µg / 100 µg lösliches Protein), (*R,S*)-Laudanosin (9 ± 3 µg / 100 µg lösliches Protein), (*S*)-Scoulerin (11 ± 6 µg / 100 µg lösliches Protein), (*R,S*)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin (4 ± 2 µg / 100 µg lösliches Protein) und Oripavin (25 ± 11 µg / 100 µg lösliches Protein) gefunden (**Abb. 3-6**). Die Retentionszeiten der Alkaloide (*S*)-Retikulin, (*R*)-Retikulin und 1,2-Dehydroretikulin überlagerten sich so stark, dass eine Auflösung dieser drei Alkaloide nicht möglich war. Obwohl die einzelnen Pflanzen bezüglich der Gesamtmenge an Alkaloid stark variierten (671 ± 246 µg Alkaloid / 100 µg lösliches Protein) (**Abb. 3-6**), zeigte sich bei Betrachtung der

relativen Werte jedoch ein homogenes Schema der einzelnen Alkaloide untereinander (Abb. 3-7).

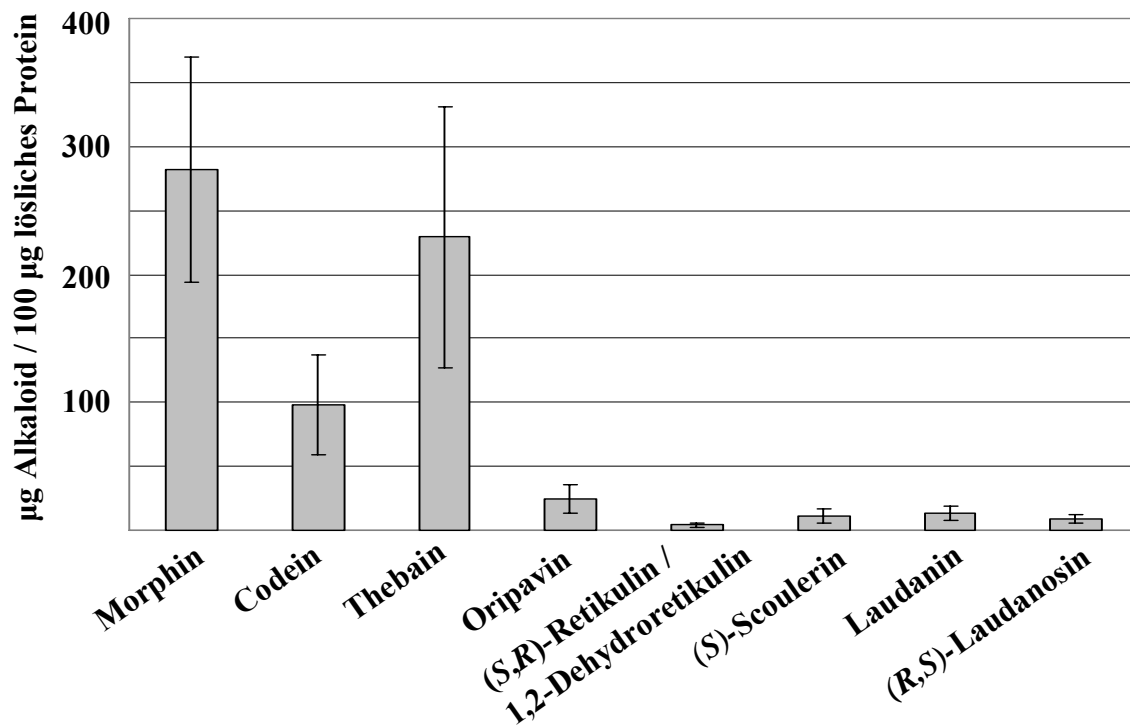


Abb. 3-6 HPLC Analyse der Latexalkaloide von 18 Pflanzen der Schlafmohnsorte C058-34. Für die Analyse wurde der Milchsafte von 18 Pflanzen gesammelt und getrennt analysiert. Die Alkaloidmengen in µg sind auf 100 µg lösliches Protein bezogen. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

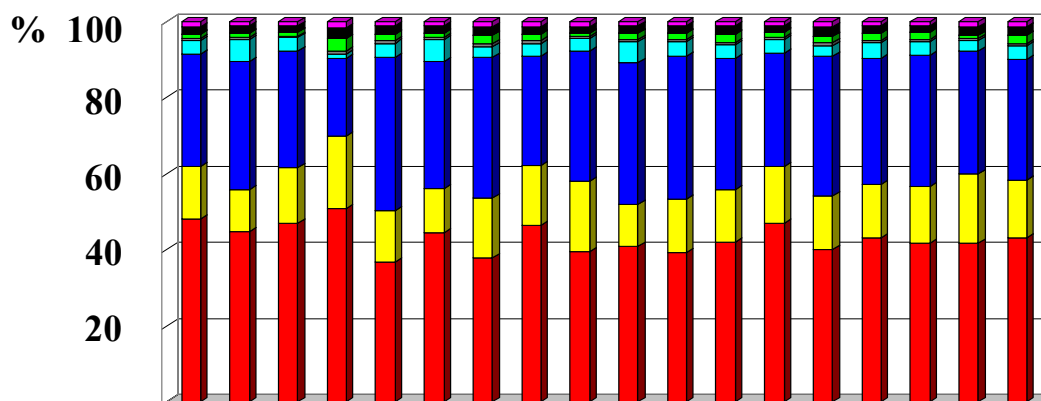


Abb. 3-7 Relative Alkaloidgehalte im Latex von 18 Pflanzen der Schlafmohnsorte C058-34. Legende: Rot – Morphin, Gelb – Codein, Dunkelblau – Thebain, Hellblau – Oripavin, Grau – (R,S)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin, Grün – Scoulerin, Schwarz – Laudamin und Magenta – (R,S)-Laudanosin.

3.3 Analyse der T₀-Generation

3.3.1 Untersuchung des Genotyps mittels „Southern blot“

Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse (siehe 3.1.3) und zur Abschätzung der Kopienzahl der RNAi-Konstrukte, die durch *A. tumefaciens* in das Pflanzengenom eingeschleust worden waren, wurde mit den 16 T₀-Pflanzen eine „Southern“-Analyse (siehe 2.2.4.1) durchgeführt. Dazu eigneten sich besonders Restriktionsendonukleasen, die die Sequenz des insertierten Genfragments von *salAT* und die des Resistenzgens *nptII* nicht schneiden. Zudem sollten die restlichen Sequenzabschnitte der Vektoren pHANNIBAL und pART27 (siehe 2.1.3), die ebenso in das Genom der Pflanze eingefügt worden waren möglichst nur einmal oder nicht geschnitten werden. Ein Problem war, dass die exakte Sequenz des Vektors pART27 nicht publiziert ist. Es waren jedoch Enzyme bekannt, die den Vektor nur einmal schneiden (Gleave, 1992). Aus diesen wurde *EcoRV* gewählt, da für dieses Enzym keine Schnittstelle im Vektor pHANNIBAL existiert. Die einzige Erkennungssequenz für die Endonuklease *EcoRV* im insertierten *salAT* RNAi Konstrukt befindet sich zwischen der Selektions- und Expressionskassette.

Die Ergebnisse der Hybridisierungen mit Sonden gegen *salAT* oder *nptII* (siehe 2.2.4.4) sind in **Abb. 3-8** wiedergegeben. Die transgenen Pflanzen zeigten im *salAT* markierten Blot jeweils zwei zusätzliche Banden, wobei das Bandenmuster der Zelllinien 77a und 99a gleich war (**Abb. 3-8** unten). Aufgrund der hohen Anzahl an *salAT*-Genen, die bereits im Wildtyp vorkommen, war eine Abschätzung der Kopienzahl über diese Markierung nicht möglich. Theoretisch sind jedoch während der Transformation ebenso viele Selektionsgene wie RNAi-Konstrukte in das Genom insertiert worden, da sich beide innerhalb der übertragenen rechten und linken Grenzsequenzen des Binärvektors pART27 befanden. Daher konnte die Kopienzahl anhand der *nptII* Markierung bestimmt werden (**Abb. 3-8** oben). Die mit der *nptII*-Sonde hybridisierten Blots zeigten für die Zelllinien 77a und 99a mit Ausnahme der Pflanze 77a33 ein gleichmäßiges Bandenmuster mit 4 Banden. Bei der Pflanze 77a33 traten jedoch nur 2 Banden auf, die in ihrer Größe den beiden obersten Banden der übrigen Pflanzen entsprachen. Die Zelllinie 34b wies 3 (34b19), 4 (34b22, 26 und 35) oder 6 (34b23 und 31) Banden auf, wobei 3 der Markierung gleich groß waren. Die beiden kleinsten Banden aller 34b-Pflanzen entsprachen mit Ausnahme der Pflanze 77a33 (siehe oben) in ihrer Größe den kleinsten Banden der Zelllinien 77a und 99a.

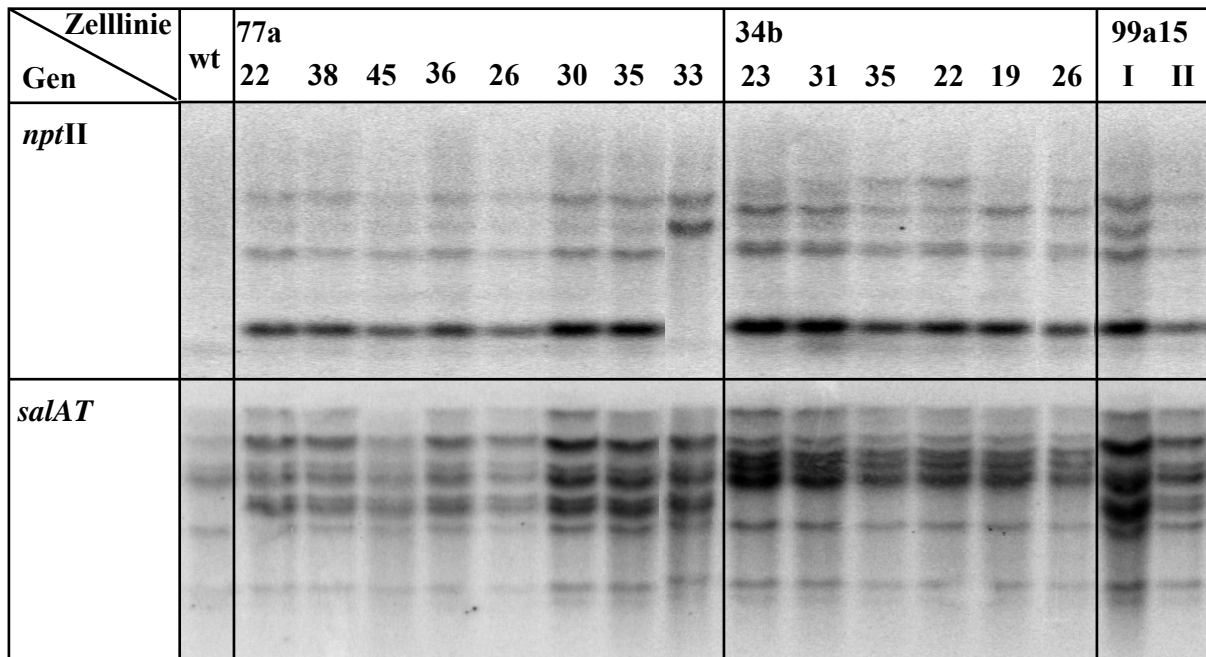


Abb. 3-8 „Southern blot“ der 16 regenerierten *salAT* RNAi Pflanzen.

Für die Analyse wurden 10 µg gDNA der oben bezeichneten Pflanze mit *EcoRV* verdaut. Die Blots wurden mit einer Sonde gegen *nptII* (oberer Blot) oder *salAT* (unterer Blot) hybridisiert.

Als Ergebnis der Transformation sind 16 transgene Pflanzen mit insgesamt 5 unabhängigen Transformationsereignissen regeneriert worden. Die Berechnung der Transformationsfrequenz (Anzahl unabhängiger Transformanten / Anzahl aller Zelllinien) ergab somit einen Wert von 0,04.

3.3.2 Untersuchungen zum Transkriptionsverhalten des Gens *salAT*

3.3.2.1 Auswahl des geeigneten Materials und der Methode

Da von den transgenen Pflanzen nicht nur Latex-, DNA- und RNA-Proben sondern auch Samen geerntet werden mussten, sollten die Pflanzen einschließlich der Kapseln nach der Isolierung von Probenmaterial noch bis zum Reifen der Samen erhalten bleiben. In diesem Stadium der Seneszenz war das Pflanzenmaterial für DNA und RNA Analysen jedoch nicht mehr brauchbar. Aus diesem Grund waren frische Blätter das bevorzugte Probenmaterial. Sie sind im Gegensatz zu Wurzel, Stängel und Knospe bzw. Kapsel uneingeschränkt verfügbar. Da jedoch im Blatt mittels „northern blot“-Analyse nur wenig *salAT* Transkript zu identifizieren war (siehe 3.2.2), musste eine sensitivere Methode als die „northern“-Analyse verwendet werden. Es wurde daher die „Real Time“ RT-PCR eingesetzt.

3.3.2.2 „Real Time“ RT-PCR Analyse der *salAT* RNAi Pflanzen

Um entwicklungsbedingte Schwankungen der Transkriptmenge zu verringern, wurden die Blätter, aus denen anschließend die totale RNA gewonnen wurde (siehe 2.2.1.2), stets zum gleichen Zeitpunkt 2 Tage nach dem Abfallen der Blütenblätter geerntet. Zusätzlich wurde ein interner Standard eingesetzt. Es handelte sich dabei um das Gen Tubulin aus *P. somniferum*, dessen Sequenz aus dem EST-Projekt von Dr. Jörg Ziegler (Ziegler *et al.*, 2005 und 2006) stammte. Vor der cDNA-Synthese wurde die Qualität der RNA auf einem Agarose-Gel

überprüft und Verunreinigungen von DNA entfernt. Der DNase Verdau wurde mittels „Real Time“ PCR (siehe 2.2.9) kontrolliert. Erst wenn diese Analyse ergab, dass keine oder nur geringe Mengen an DNA amplifiziert worden waren, wurde die reverse Transkription und im Anschluss daran die „Real Time“ PCR durchgeführt. Das Protokoll der Durchführung und die Berechnungsgrundlage zur Auswertung der erhaltenen Ct-Werte sind unter 2.2.9 aufgeführt. Die Ergebnisse der „Real Time“ RT-PCR für die 16 *salAT* RNAi Pflanzen sind in **Abb. 3-9** dargestellt. Die Analyse zeigte, dass die Transkriptmenge in allen 16 *salAT* RNAi Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp um ein Drittel oder mehr reduziert war. Die Werte lagen zwischen 31 % (34b31) und 3 % (77a36).

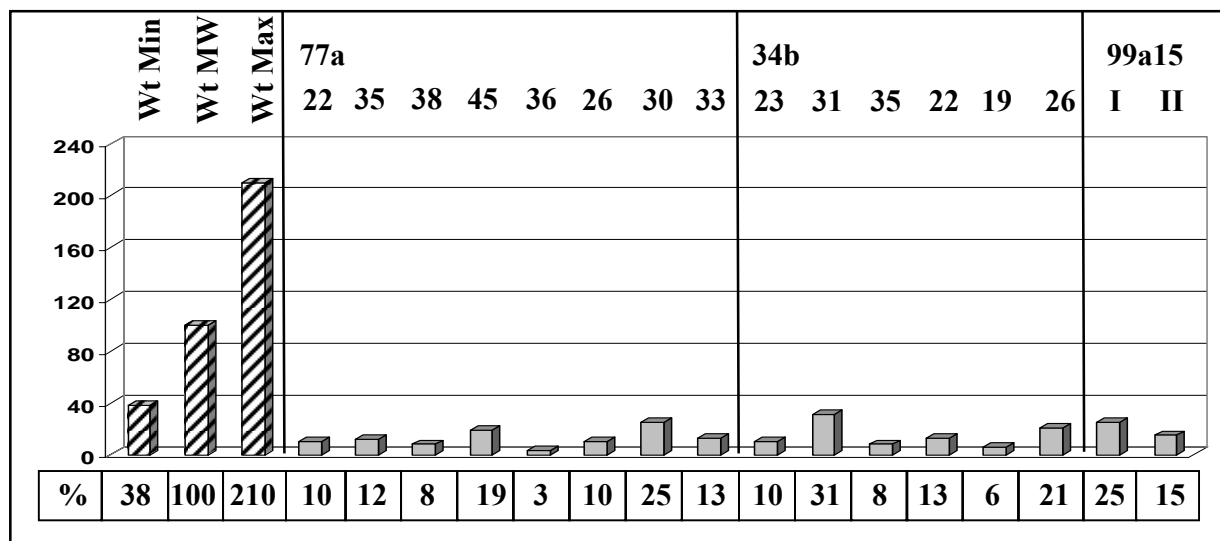


Abb. 3-9 Vergleich der Mengen an *salAT* Transkript in Wildtyp (Wt) und *salAT* RNAi Pflanzen.

Die relativen Transkriptmengen von 6 nicht-transgenen Pflanzen der Schlafmohnsorte C058-34 wurden gemittelt und zum Vergleich mit den transgenen Pflanzen gleich 100 % gesetzt. Daneben wurde der von diesen Wildtypen niedrigste (38 %) und höchste Wert (210 %) angegeben.

3.3.3 Analyse der Latex-Alkaloide in *salAT* RNAi Pflanzen

3.3.3.1 HPLC-Analyse

Die HPLC Analyse der Alkaloide im Milchsaft der *salAT* RNAi T₀-Generation ist in **Abb. 3-10** zusammenfassend und in **Anhang A** detailliert in Form von Tortendiagrammen dargestellt. Es zeigten sich im Vergleich zu den Wildtypen C058-34 (**Abb. 3-6** und **3-7**) zwei Unterschiede: Zum einen enthielt jede Probe mit Ausnahme des Latex der Pflanze 77a35 Salutaridin und Salutaridinol. Die Werte variierten dabei für Salutaridin von 3,3 – 21,7 % und für Salutaridinol von 0,7 – 3,4 %. Die Pflanzen 77a38 und 77a30 besaßen von allen die höchste relative Menge an Salutaridin (77a38: 21,7 %, 77a30: 19,5 %) und Salutaridinol (77a38: 3,4 %, 77a30: 2,5 %) (**Abb. A-2, Tab. A-2**). Zudem fanden sich in allen Pflanzen außer 77a38 (16,7 % Thebain) erhöhte Gehalte an Thebain (40,6 – 83,1 % Thebain). Diese traten jedoch auch in regenerierten nicht transgenen Pflanzen auf. Die Analyse von 14 solcher Pflanzen ergab einen durchschnittlichen relativen Thebain-Gehalt von 46,8 % (30,6-81,5 % Thebain) (**Abb. 3-11**). Im Milchsaft der 18 analysierten Wildtypen waren im Mittel nur 29,7 % der Alkaloide Thebain (20,6-40,3 %). Der Milchsaft der Pflanze 99a15 I enthielt einen ungewöhnlich hohen Anteil an (S)-Scoulerin (14,5 %) (**Abb. A-3**).

Die Gesamtmenge aller Alkaloide im Latex (**Abb. 3-10**) variierte in den transgenen Pflanzen sehr stark von 633 μg Alkaloid / 100 μg lösliches Protein der Pflanze 99a15 I bis 6251 μg Alkaloid / 100 μg lösliches Protein der Pflanze 77a30. In den Wildtypen lag die Spanne an Gesamtalkaloid zwischen 360 – 1114 μg Alkaloid / 100 μg lösliches Protein. Demnach ist die Alkaloidmenge gegenüber dem Wildtyp ebenso erhöht.

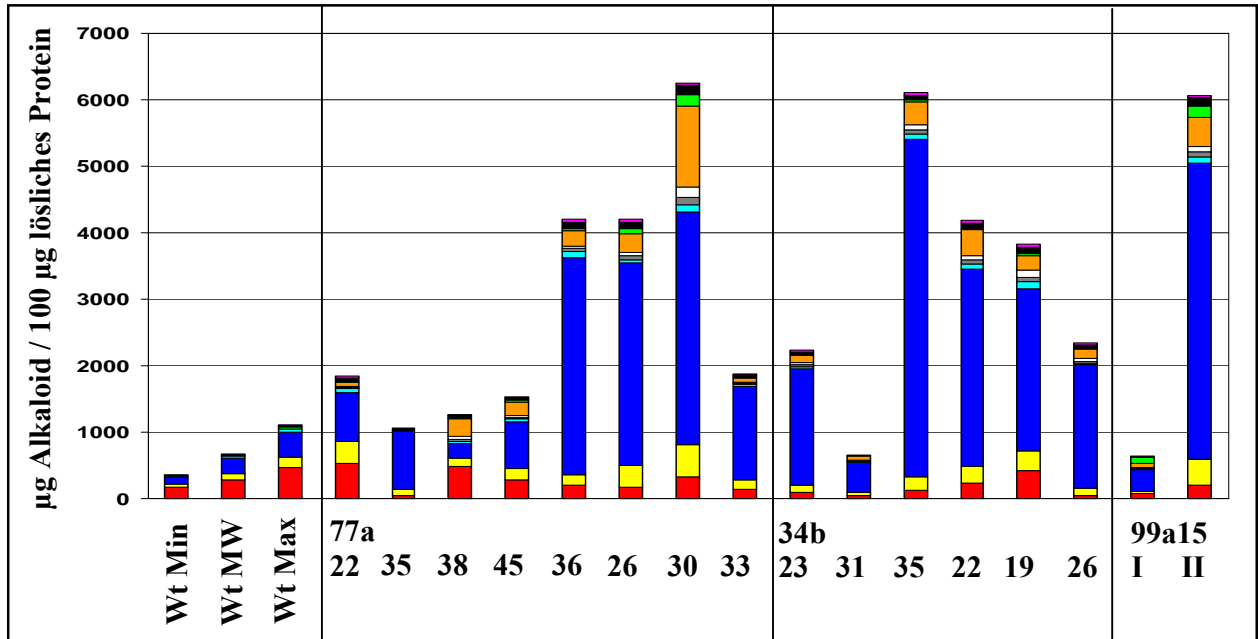


Abb. 3-10 HPLC Analyse der Latex-Alkaloide der *salAT* RNAi T₀-Generation.

Legende: Rot – Morphin, Gelb – Codein, Dunkelblau – Thebain, Hellblau – Oripavin, Grau – (R)-, (S)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin, Weiss – Salutaridinol, Orange – Salutaridin, Grün – (S)-Scoulerin, Schwarz – Laudanin und Magenta – (R,S)-Laudanosin.

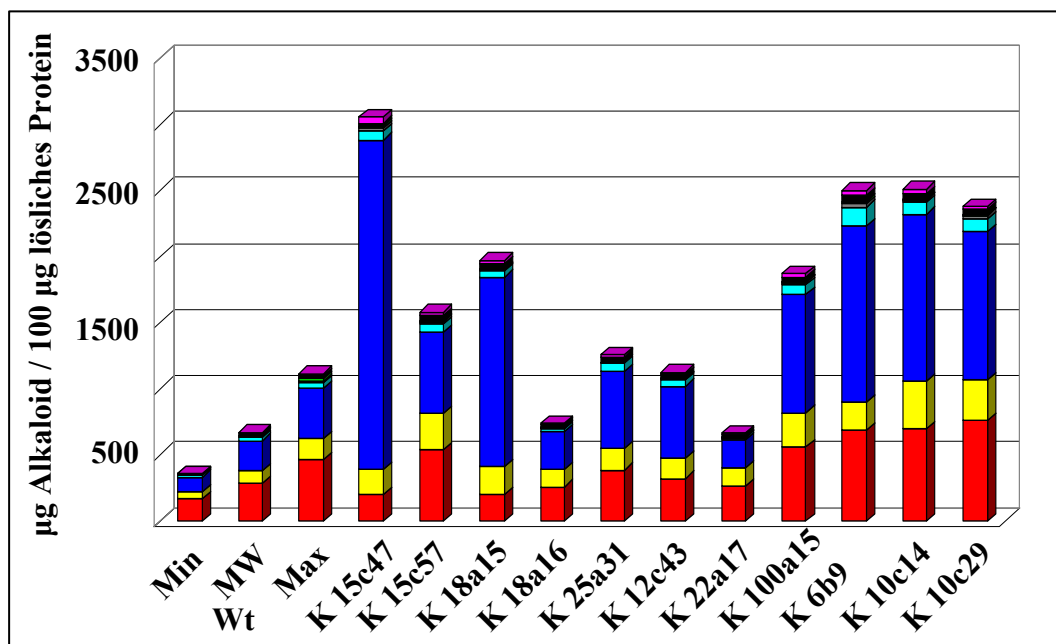


Abb. 3-11 HPLC-Analysen des Milchsafte 14 regenerierter, nicht transgener Pflanzen.

Legende: Rot – Morphin, Gelb – Codein, Dunkelblau – Thebain, Hellblau – Oripavin, Grau – (R)-, (S)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin, Grün – (S)-Scoulerin, Schwarz – Laudanin und Magenta – (R,S)-Laudanosin.

3.3.3.2 Analyse mittels LC/ESI-MS/SRM

Über LC/ESI-MS/SRM (siehe 2.2.11.6) wurde zusätzlich eine relative Quantifizierung der Alkaloide mit der molaren Masse von 328, (*S*)-Scoulerin, 1,2-Dehydroretikulin und Salutaridin, untereinander vorgenommen (**Abb. 3-12**). Im Milchsaft des Wildtypen C058-34 konnten über HPLC 1,5-7,5 µg (*R,S*)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin pro 100 µg lösliches Protein und 3,7-23,0 µg (*S*)-Scoulerin pro 100 µg lösliches Protein, jedoch kein Salutaridin detektiert werden (siehe 3.2.3). Die Analyse über LC-MS zeigte ein relatives Verhältnis der Alkaloide [(*S*)-Scoulerin : 1,2-Dehydroretikulin : Salutaridin] von [1 : 1 : 1,9] gemittelt über 6 Pflanzen des Wildtyps.

15 der 16 *salAT* RNAi Pflanzen ergaben in der HPLC Analyse des Latex hohe Mengen an Salutaridin (54 - 1220 µg / 100 µg lösliches Protein, siehe 3.3.3.1). Die Werte für (*R,S*)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin (7,9 – 105 µg / 100 µg lösliches Protein) und (*S*)-Scoulerin (7,5 – 176 µg / 100 µg lösliches Protein) waren im Vergleich zum Wildtypen nur leicht erhöht. Das relative Verhältnis der Alkaloide zueinander, das mittels LC/ESI-MS/SRM (**Abb. 3-12**) bestimmt worden war, bestätigte die HPLC Analysen bezüglich des stark erhöhten Anteils an Salutaridin. Zudem zeigten die transgenen Pflanzen der Zelllinie 77a eine leichte und die der Linie 99a eine stärkere Verschiebung des Verhältnisses 1,2-Dehydroretikulin zu (*S*)-Scoulerin zugunsten des letztgenannten Alkaloids. Dies traf jedoch für keine Pflanze der Zelllinie 34b zu. Die Pflanze 77a35 war eine Ausnahme. Hier wurden keine erhöhten Mengen an Salutaridin (0,3 µg Salutaridin / 100 µg lösliches Protein) gemessen. Die Werte für (*R,S*)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin waren im Vergleich zum Wildtypen nicht, der Gehalt an (*S*)-Scoulerin stark erhöht.

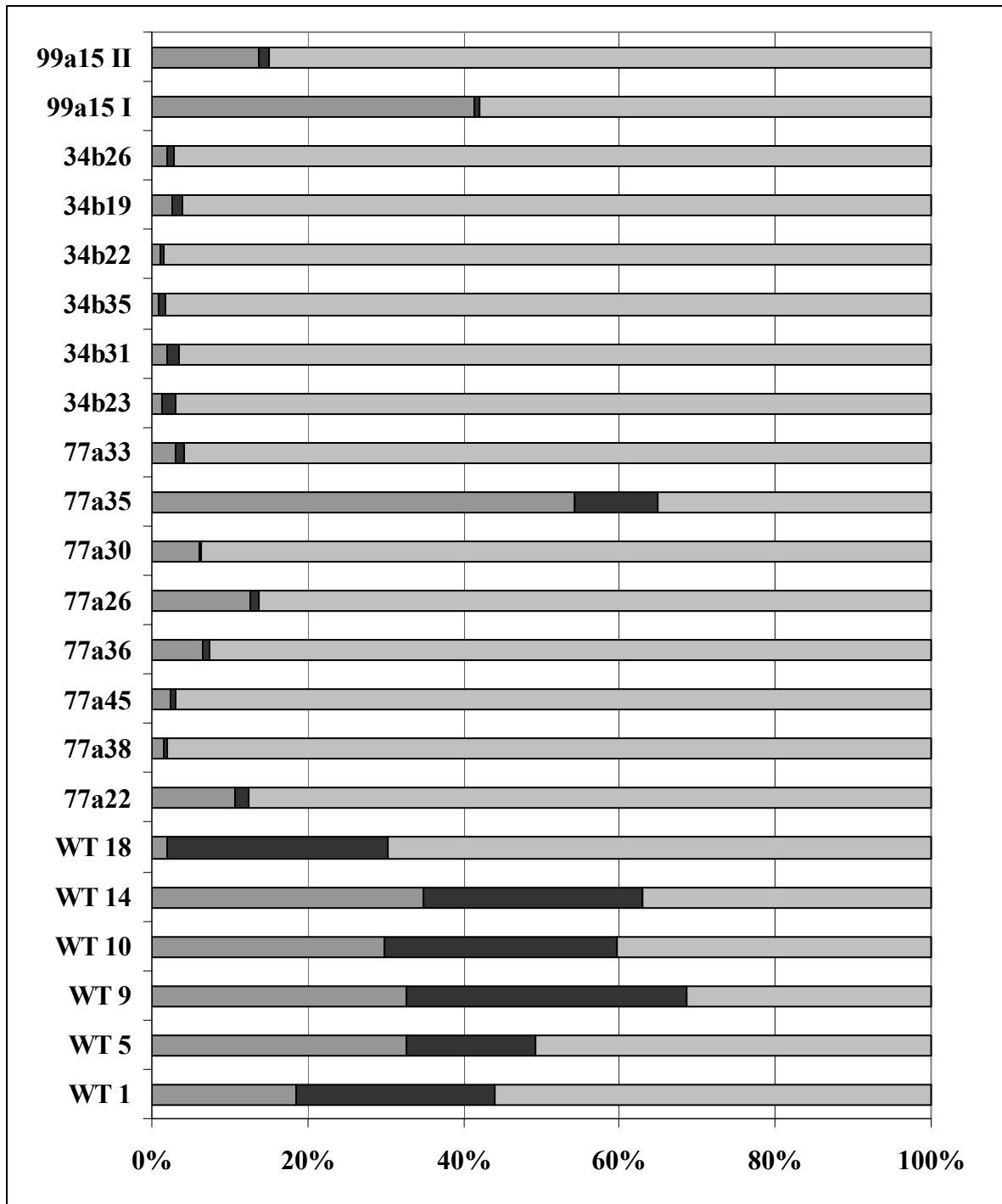


Abb. 3-12 LC/ESI-MS/SRM Daten der Schlafmohnsorte C058-34 (Wildtyp WT) und der *salAT* RNAi Pflanzen.

Legende: – (S)-Scoulerin, – Dehydroretikulin, – Salutaridin

3.4 Analyse der T₁-Generation

Die transgenen Pflanzen wurden selbst bestäubt und der Samen nach dem Abreifen geerntet. Von mehreren T₀-Pflanzen (34b31 und 35, 77a22, 26, 30, 33 und 38, 99a15 I und II) wurde die T₁-Generation ausgesät und die Alkaloide im Milchsaft analysiert. Aufgrund des Umfangs der Daten sollen im Folgenden die Ergebnisse für die T₁-Generation der Pflanzen 34b31,

77a26, 77a30, 77a38 und 99a15 II exemplarisch dargestellt werden. Die Analysen der Pflanzen, die nicht in der vorliegenden Arbeit erwähnt sind, zeigten ähnliche Ergebnisse.

3.4.1 Untersuchungen zum Genotyp

Die T₁-Generation wurde wie unter 3.1.3 beschrieben mittels PCR überprüft. Die Abkömmlinge spalteten sich in transgene und nicht-transgene Pflanzen auf, jedoch nicht immer nach dem 2. Mendelschen Gesetz, nach dem 75 % der Pflanzen transgen sein müssten (**Tab. 3-1**). Dies galt insbesondere für die Pflanzen 77a38 und 99a15 I, bei denen fast alle Nachkommen das Transgen trugen. Eine Änderung des Verhältnisses wurde durch die Menge von 3-4 Kopien des *salAT* RNAi Konstruktes, die nicht alle auf ein und demselben Chromosom lokalisiert sein müssen, verursacht. Zur Verifizierung der PCR-Ergebnisse wurden „Southern blots“ (siehe 2.2.4.1) angefertigt (**Abb. 3-13**).

Pflanze	Anzahl aller Pflanzen	Anzahl transgener Pflanzen	Anzahl nicht-transgener Pflanzen	Verhältnis (nicht-transgen : transgen)
34b31	14	10	4	1 : 2,5
77a26	15	13	2	1 : 6,5
77a30	21	13	8	1 : 1,6
77a38	34	31	3	1 : 10
99a15 I	18	17	1	1 : 17

Tab. 3-1 Aufspaltung der T₁-Generation verschiedener *salAT* RNAi T₀-Pflanzen.

Die mit einer radioaktiven Sonde komplementär zu *salAT* hybridisierten Blots (**Abb. 3-13** rechts) wiesen das gleiche Muster wie die Blots der jeweiligen Elterpflanze (**Abb. 3-8**) auf. Die Hybridisierung mit der *nptII* markierten Sonde zeigte eine gleiche oder geringere Anzahl an Selektionskassetten im Vergleich zur jeweiligen Elterpflanze. So sind von den 6 Banden der T₀-Pflanze 34b31 drei bis sechs bei ihren Nachkommen sichtbar. Es sind in keinem Fall neue Markierungen hinzugekommen.

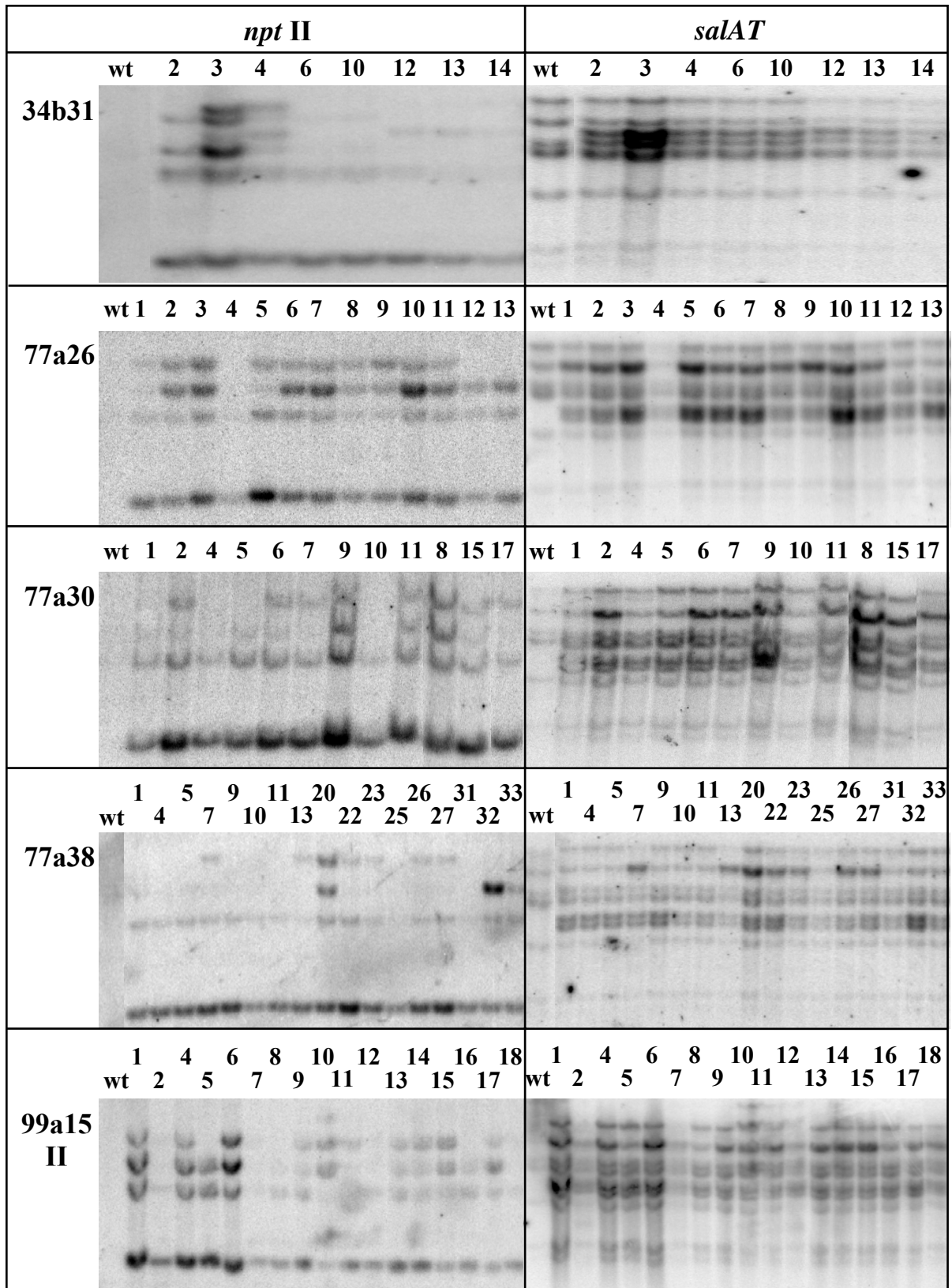


Abb. 3-13 „Southern blot“-Analyse von Pflanzen der T₁-Generation.

Jeweils 10 µg gDNA wurden mit *EcoRV* verdaut und mit einer *nptII*-Sonde (links) bzw. einer *salAT*-Sonde (rechts) markiert. Die Analyse einer Kontrollpflanze befindet sich stets auf der linken Seite.

3.4.2 Untersuchungen zum Transkriptionsverhalten

3.4.2.1 „Northern blot“-Analyse

Da Blattmaterial wie unter 3.2.2 gezeigt nur wenig *salAT* Transkript aufweist, konnte dieses Material nicht für eine „northern“-Analyse herangezogen werden. Die höchste Expression des Gens wurde in Stängeln nachgewiesen (**Abb. 3-5**). Daher wurde von Pflanzen der T₁-Generation von der jeweils sich als zweites entwickelnden Knospe Stängel isoliert. Die Hauptkapsel musste für die Ernte von Samen aufbewahrt werden. Da jedoch nicht alle Pflanzen eine zweite Blüte entwickelten und in einigen Fällen die erste Blüte steril gewesen war, konnte nicht von jeder Pflanze Probenmaterial für die „northern“-Analyse isoliert werden.

In **Abb. 3-14** sind die Ergebnisse der Analyse einiger Nachkommen der Pflanzen 77a26, 77a30, 77a38 und 99a15 II dargestellt. Die Abkömmlinge der Pflanze 77a26 wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine nur geringfügig reduzierte Menge *salAT* Transkript auf. Besonders das Individuum 77a26-10 ließ eine dem Wildtyp vergleichbare Anzahl an *salAT* mRNA vermuten. Für die T₁-Generation von 77a30, 77a38 und 99a15 II konnte eine starke Reduzierung der Expression des Gens nachgewiesen werden.

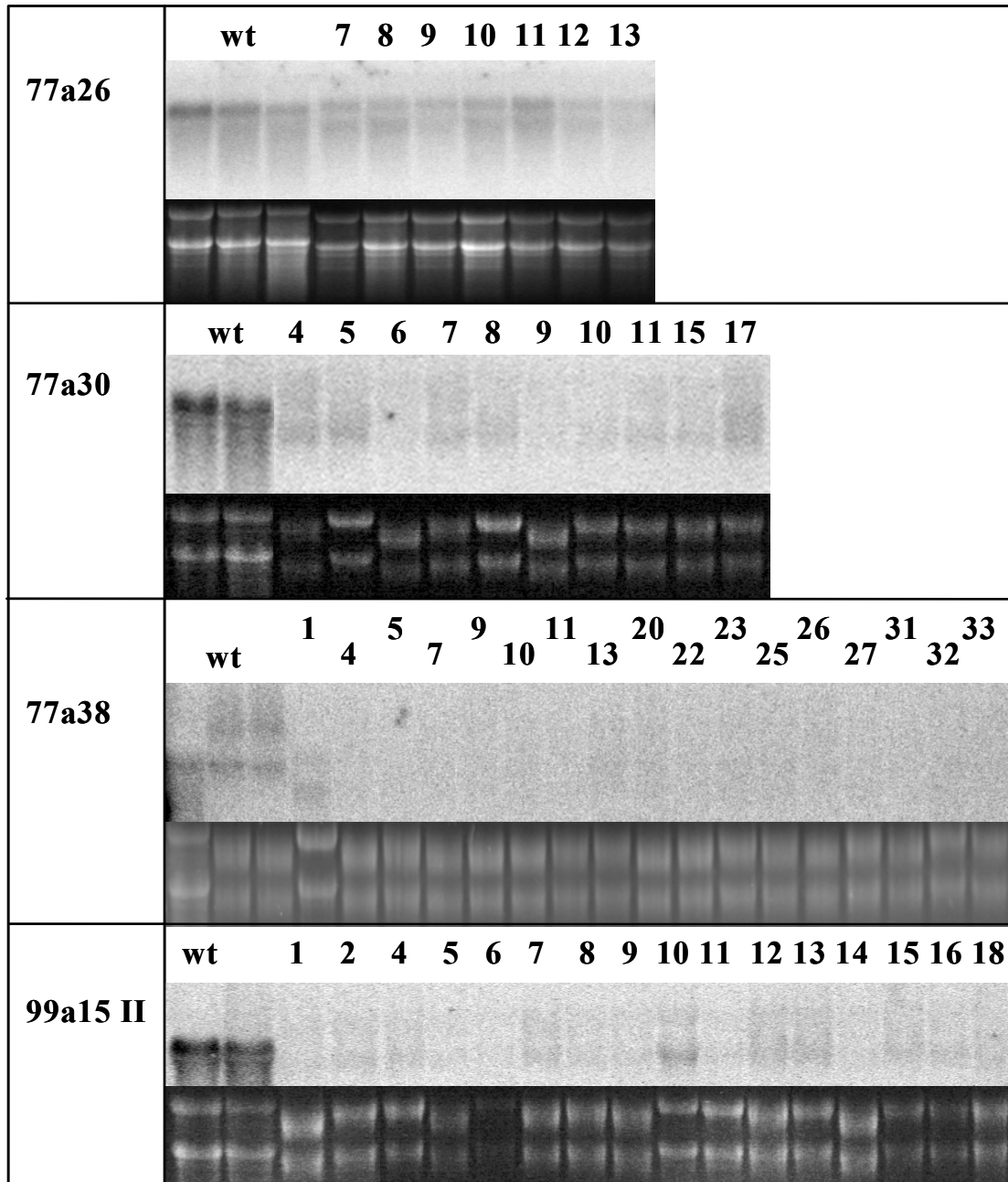


Abb. 3-14 „Northern blot“-Analysen (oben) mit Ladekontrollen (unten) einiger Pflanzen der T₁-Generation.

Jeweils 10 µg totale RNA aus Stengeln wurden auf das Gel aufgetragen und mit einer *salAT*-Sonde hybridisiert. „Northern“-Analysen von 2 – 3 Kontrollpflanzen befinden sich jeweils auf der linken Seite der Blots.

3.4.2.2 „Real Time“ RT-PCR

Wie für die regenerierten T₀-Pflanzen wurden auch für ihre Nachkommen die Mengen an *salAT* Transkript in Blattmaterial über „Real Time“ RT-PCR (siehe 2.2.9) abgeschätzt und mit denen des Wildtypen verglichen (**Abb. 3-15**). Die Abkömmlinge der Pflanze 77a26 besaßen von allen untersuchten Individuen der T₁-Generation die höchste Menge an *salAT* Boten-RNA. Die Werte lagen nur leicht unter dem Mittelwert von 6 verschiedenen Wildtypen

(10-69 %) oder für die Pflanzen 77a26-5 (129 %) und 77a26-6 (138 %) sogar über diesem Wert. Das *salAT* Transkript Level der Nachkommen von 99a15 II war ebenfalls nur leicht reduziert (9-91 % des Mittelwertes der Wildtypen). Eine stärkere Reduktion wurde in der T₁-Generation der Pflanze 34b31 gefunden. Lediglich 5-49 % der mRNA des Gens *salAT* des Mittelwertes des Wildtypen wurden detektiert. In den Nachkommen von 77a38 war das Transkript Level um wenigstens ein fünftel reduziert (1-18 % des Mittelwertes der Wildtypen). Diese Daten stimmen mit denen der „northern“-Analysen (siehe 3.4.2.1) überein und bieten zudem einen detaillierten Einblick in das Transkriptionsverhalten der Pflanzen.

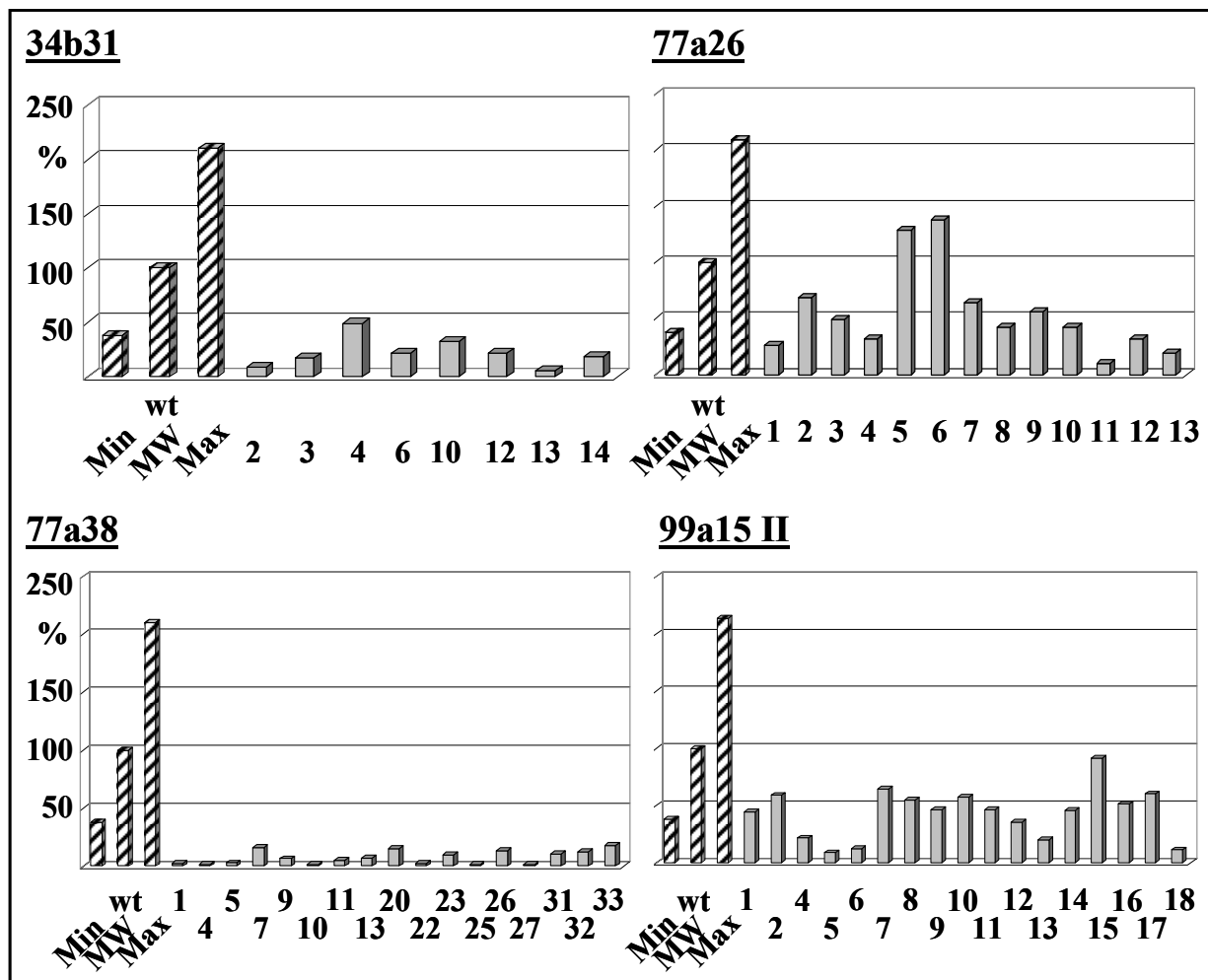


Abb. 3-15 Relative *salAT* Transkriptgehalte verschiedener Pflanzen der T₁-Generation ermittelt über „Real Time“ RT-PCR.

Die relativen Transkriptmengen von 6 Pflanzen der Schlafmohnsorte C058-34 wurden gemittelt und zum Vergleich mit den transgenen Pflanzen gleich 100 % gesetzt. Daneben wurde der von diesen Wildtypen niedrigste (38 %) und höchste Wert (210 %) angegeben.

Um einen Einfluss des *salAT* RNAi Transgens auf die Expression anderer Enzyme, die an der Alkaloidbiosynthese beteiligt sind, festzustellen, wurde die „Real Time“ RT-PCR Technik zudem zur Analyse der Expressionslevel der Gene *salR* und *cor1.1* eingesetzt. Diese Gene wurden ausgewählt, da sie Reaktionen katalysieren, die vor oder nach der Umsetzung von 7(S)-Salutaridinol zu Salutaridinol-7-(S)-O-Acetat erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die Nachkommen der regenerierten Pflanze mit den geringsten (77a38) und einer Pflanze mit vergleichsweise hohem *salAT* Transkript Gehalt (99a15 II) getestet. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3-16** festgehalten. In beiden Pflanzenlinien zeigten sich starke Schwankungen in den

Transkriptmengen für beide Gene. Diese waren zwar stärker ausgeprägt als in den 6 gemessenen Wildtypen, blieben aber für beide Pflanzenlinien in einem ähnlichen Rahmen. Es gibt für beide Linien Pflanzen, die einen geringeren Gehalt an *salR* und *cor1.1* Transkript als die Wildtypen aufweisen und ebenso Pflanzen mit einem höheren Gehalt.

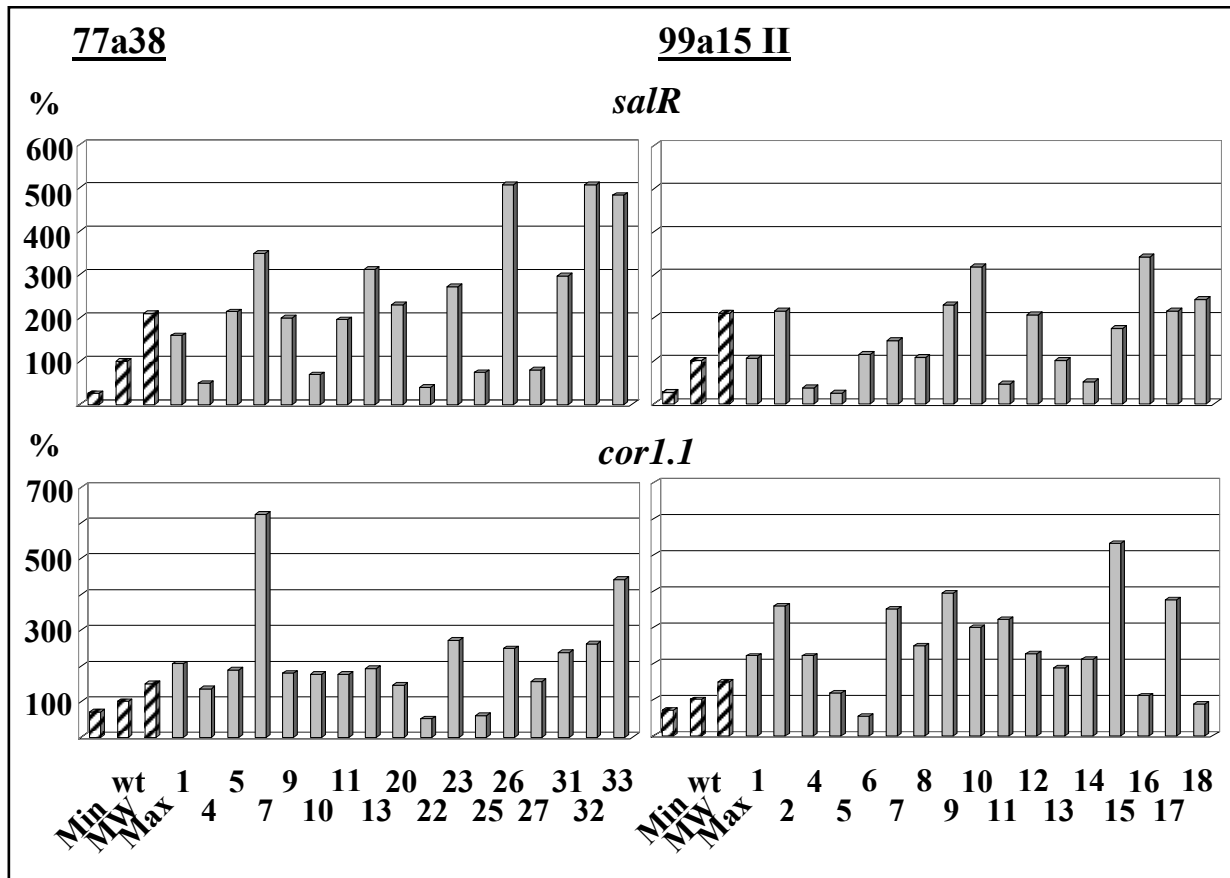


Abb. 3-16 Relative *salR* (oben) und *cor1.1* (unten) Transkriptgehalte der Nachkommen der T₀-Pflanzen 77a38 (links) und 99a15 II (rechts) ermittelt über „Real Time“ RT-PCR. Die relativen Transkriptmengen von 6 Pflanzen der Schlafmohnsorte C058-34 wurden gemittelt und zum Vergleich mit den transgenen Pflanzen gleich 100 % gesetzt. Daneben wurde der von diesen Wildtypen niedrigste (26 % für *salR*, 71 % für *cor*) und höchste Wert (210 für *salR*, 149 % für *cor*) angegeben.

3.4.3 Analyse der Latex-Alkaloide

Der Milchsafte transgener Pflanzen der T₁-Generation wurde ebenso wie der der Elterpflanzen mittels HPLC analysiert (siehe 2.2.11.3). In **Abb. 3-17** sind Ergebnisse der Untersuchungen für die Nachkommen der Pflanzen 34b31, 77a26, 77a30, 77a38 und 99a15 II dargestellt.

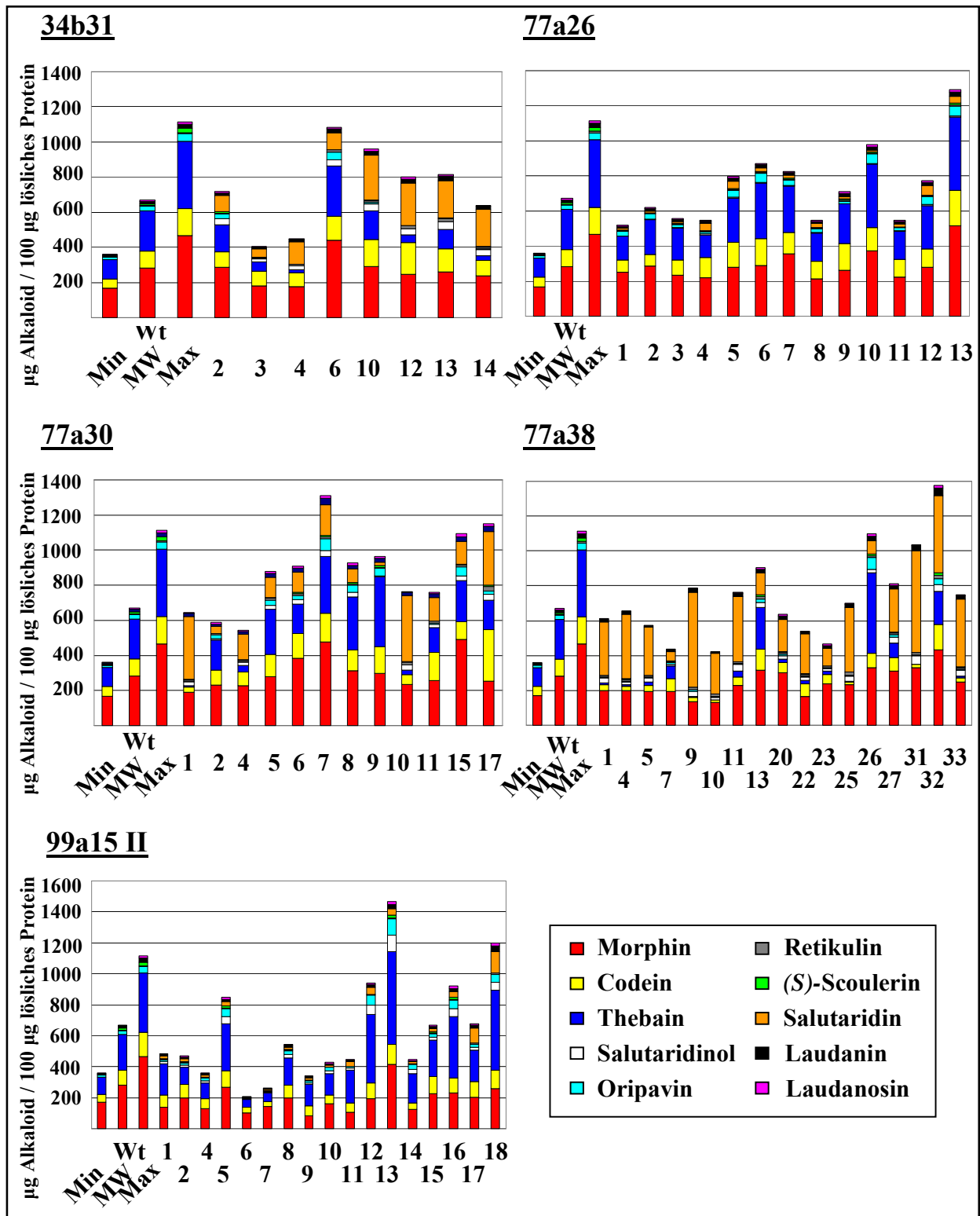


Abb. 3-17 HPLC Analyse der Latex-Alkaloide der *salAT* RNAi T₁-Generation.

Die Alkaloide (*R,S*)-Retikulin bzw. 1,2-Dehydroretikulin sind zur Vereinfachung unter dem Begriff Retikulin zusammen gefasst.

Der in den Elterlinien mit Ausnahme von 77a38 und nicht-transgenen Pflanzen vorkommende erhöhte Anteil an Thebain (siehe 3.3.3.1) konnte in der Nachfolgegeneration nicht beobachtet werden. Die relativen Thebaingehalte der T₁-Generation waren für 34b31 3,6-26,5 %, für 77a26 26,1-37,1 %, für 77a30 1,1-52,5 %, für 77a38 0,3-41,9 % und für 99a15 II 20,4-50 % des Gesamtalkaloides im Latex. Der Anteil des Thebains im Milchsaft der Wildtypen schwankte zwischen 20,6 und 40,3 %. Die Gehalte waren somit für die Abkömmlinge der T₀-Pflanzen 34b31, 77a30 und 77a38 sogar erniedrigt. Auch der in der Pflanze 99a15 I auftretende erhöhte Anteil an (*S*)-Scoulerin (14,5 %) (**Anhang A, Abb. A-3**) war nicht vererbbar. Der Gehalt an (*S*)-Scoulerin in der T₁-Generation dieser Pflanze lag im Bereich von 0,7 – 2,9 %. Alle transgenen Abkömmlinge der 5 untersuchten T₀-Pflanzen wiesen jedoch Salutaridin auf (34b31: 9,1-33,0 %, 77a26: 1,0-7,6 %, 77a30: 1,4-55,6 %, 77a38: 7,2-21,7 % und 99a15 II: 1,1-14,2 %). Zudem wurden wie bereits in der T₀-Generation in den T₁-Pflanzen mit einer Ausnahme (77a26-9) geringe Mengen an Salutaridinol gefunden (34b31: 3,1-5,5 %, 77a26: 0-1,3 %, 77a30: 0,1-3,9 %, 77a38: 1,9-4,8 % und 99a15 II: 0,1-2,1 %).

Die Gesamtmenge an Alkaloid im Milchsaft, die in der T₀-Generation erhöht war (**Abb. 3-10**), liegt in der T₁-Generation zwischen 424 und 1376 µg Alkaloid / 100 µg lösliches Protein und war somit mit den Alkaloidmengen im Wildtyp (360 – 1114 µg Alkaloid / 100 µg lösliches Protein) vergleichbar.

Bei der Analyse des Milchsaftes transgener T₁-Pflanzen fiel auf, dass diejenigen mit den höchsten Gehalten an Salutaridin und Salutaridinol weniger Thebain aufwiesen. Da die Nachkommen der T₀-Pflanze 77a38 den stärksten Salutaridin / Salutaridinol-Chemotyp zeigten, wurde die Beobachtung mit diesen Pflanzen weiter fortgesetzt.

Insgesamt zeigten die Pflanzen einen sehr niedrigen Gehalt an Thebain, während die Alkaloide Morphin, Codein und Oripavin in zum Wildtypen vergleichbaren Mengen akkumulierten. Daher wurde eine lineare Korrelation zwischen den Mengen an Salutaridin mit der kumulativen Menge an Morphin, Thebain, Codein und Oripavin durchgeführt. Dabei wurde eine indirekte Relation mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0,998$ (Anstieg $a = -1,005$) (**Tab. 3-2**) ermittelt.

r ²	Thebain	Codein	Oripavin	Morphin	Σ (T, C)	Σ (T, C, M, O)
Salutaridin	0,6596	0,6109	0,3680	0,3631	0,8220	0,9980
Salutaridinol	0,3760	0,1538	0,3652	0,0342	0,3850	0,3614
Σ (S, Sol)	0,6689	0,6053	0,3814	0,3533	0,8283	0,9981

Tab. 3-2 Berechnete Regressionskoeffizienten, r^2 , zur Ermittlung von Beziehungen zwischen verschiedenen Alkaloiden der Morphin Biosynthese in den Nachkommen der Pflanze 77a38.

Verwendete Abkürzungen: T - Thebain, C - Codein, M - Morphin, O - Oripavin, S – Salutaridin, Sol - Salutaridinol.

In **Tab. 3-2** sind auch berechnete Regressionskoeffizienten von Korrelationen der einzelnen Alkaloide (Thebain, Codein, Oripavin und Morphin) mit Salutaridin und / oder Salutaridinol aufgeführt. Aus diesen Werten zeigte sich, dass die Menge an Salutaridin indirekt proportional zur Menge der Alkaloide ist, deren Synthese erst nach dem Enzym SalAT erfolgt. Dabei hatten Thebain und Codein den stärksten Einfluss auf diese Korrelation. Die Beziehungen zwischen Salutaridinol mit diesen Alkaloiden waren weitaus schwächer.

Ein weiterer Hinweis auf die veränderte Regulation der Alkaloidbiosynthese zeigte sich, wenn man die Beziehungen der drei Hauptalkaloide des Schlafmohns C058-34, Thebain, Codein und Morphin, untereinander betrachtet. In **Tab. 3-3** sind die Regressionskoeffizienten des Wildtypen und die der Abkömmlinge der T₀-Pflanze 77a38 aufgeführt. In Pflanzen des Wildtyps sind die Mengen dieser Alkaloide direkt proportional zueinander (r^2 0,762-0,8866).

In den T₁-Pflanzen der Linie 77a38 verschwinden die Zusammenhänge fast völlig (r^2 0,0034-0,2602).

r^2 Wildtyp / r^2 T ₁ 77a38	Morphin	Thebain	Codein
Morphin		0,8866 / 0,0034	0,8134 / 0,2602
Thebain			0,7260 / 0,2255
Codein			

Tab. 3-3 Berechnete Regressionskoeffizienten, r^2 , der Regression zwischen den Alkaloiden Morphin, Thebain und Codein im Wildtyp C058-34 und in den Nachkommen der T₁-Pflanze 77a38.

3.5 Isolierung regulatorischer Regionen verschiedener Gene der Alkaloid-Biosynthese in *P. somniferum* L. und Datenbankvergleich

3.5.1 Isolierung regulatorischer Regionen der Gene *cyp80b3*, *cor*, *cpr* und *salAT*

Die 5'-Sequenzen der Gene *cyp80b3*, *cor*, *cpr* und *salAT* wurden aus gDNA der *P. somniferum* Sorte München mittels dem GenomeWalker Universal Kit der Firm BD Clontech und der in **Tab. 2-2** aufgeführten Oligonukleotide isoliert (siehe 2.2.6.3). Aus der *DraI*-„Library“ konnte dabei eine 3517 bp lange putative Promotorsequenz von *cyp80b3* erhalten werden. Bei der cDNA des *cyp80b3*-Klons aus *P. somniferum*, die von Huang und Kutchan (2000) publiziert worden ist, fehlten die ersten 6 Aminosäuren. Diese wurden für heterologe Expressionen durch die entsprechende Sequenz der cDNA des *E. californica*-Klons ersetzt. Die beiden cDNAs sind zu 77 % identisch. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich die cDNA des *P. somniferum cyp80b3*-Gens von der des *E. californica* Gens in 2 Basenpaaren unterschied. Die Basenfolge der ersten 18 Nukleotide für *cyp80b3* aus *Papaver* lautete: ATG GAG ATC GTC ACA GTA. Die abweichenden Basen sind unterstrichen. Daraus resultierte der Austausch der Aminosäure Valin gegen Isoleucin.

Mit Hilfe der *StuI*-„Library“ wurde eine 2956 bp lange 5'-Sequenz des Gens *cor* amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer waren dabei komplementär zu den vier bekannten Allelen der Codeinon-Reduktase aus *P. somniferum* (*cor1.1* bis *cor1.4*), wiesen jedoch ein (GSP1 *cor*) bzw. vier (GSP2 *cor*) unterschiedliche Basenpaare im Vergleich zur Sequenz des putativen Gens *cor2.1* auf. Da zusammen mit der 5'-Sequenz auch die ersten 146 bp des Leserahmens der Codeinon-Reduktase isoliert worden waren, konnte die erhaltene Sequenz als regulatorische Region der Allele *cor1.1*, *cor1.3* und / oder *cor1.4* weiter eingegrenzt werden. Eine weitere Differenzierung war jedoch nicht möglich. Im Vergleich zum Allel *cor1.2* sind 4 Basenpaare und zum putativen Gen *cor2.1* 32 bp unterschiedlich. Die Isolierung einer 2332 bp langen Sequenz des putativen *cpr*-Promotors gelang mit Hilfe der *PvuII*-„Library“. Für das Gen von *salAT* konnte jedoch auch nach Wiederholung und unter Verwendung 4 weiterer „Libraries“ (*NruI*, *SnaBI*, *ScaI* und *HpaI*) lediglich eine kurze 5'-Sequenz von 407 bp (*PvuII*) erhalten werden. Die Sequenzen sind im **Anhang B (Abb. B-1 bis B-4)** zu finden.

3.5.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

Der Transkriptionsstartpunkt eines Gens ist die Position, an der die Transkription dieses Gens initiiert wird und stellt damit ein wichtiges Charakteristikum dar. Zur Identifizierung des Transkriptionsstarts wurde der GeneRacer™ RACE Ready cDNA Kit (Invitrogen) verwendet

(siehe 2.2.6.4). Im Vergleich zu anderen Methoden zur Identifizierung des Transkriptionsstarts, wie „primer extension“, „nuclease protection assays“ oder der traditionellen 5'-RACE, hat sie den Vorteil, dass nur diejenigen mRNAs detektiert werden, die eine 5'-Cap-Struktur aufweisen. Die Cap-Struktur hat neben seiner Rolle in der Translation noch die Aufgabe die mRNA vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen. Durch diese Methode werden also nur vollständige mRNAs detektiert.

Die Amplifizierung der 5'-Sequenz des Gens *cor* konnte mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase vorgenommen werden. Zwei unabhängige Ansätze der Reversen Transkription ergaben dabei den gleichen Transkriptionsstart 25 bp vor dem Startcodon (**Abb. B-2**). Die 5'-RACE des Gens *cyp80b3* wurde ebenso mittels *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert, es wurde jedoch nicht die gleiche Länge für die 5'-untranslatierte Region (UTR) erhalten. Eine Sequenz zeigte den Transkriptionsstart direkt vor dem Startcodon, während die andere eine UTR von 5 bp ergab. Aus diesem Grund wurden weitere Amplifizierungen mittels *Taq*-DNA-Polymerase mit den beiden cDNAs durchgeführt. Die Ergebnisse variierten zwischen 0-6 bp vor dem Startcodon. In **Anhang B** wurde die längste UTR genutzt (**Abb. B-1**). Für die Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte von *cpr* und *salAT* wurden fünf Ansätze, amplifiziert mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase, verwendet. Das Gen *cpr* wies einen eindeutigen Transkriptionsstart 145 bp vor dem Startcodon auf (**Abb. B-3**). Für *salAT* war die Analyse nicht eindeutig. Die Sequenzlängen variierten zwischen 160-219 bp. In **Anhang B** wurde auch hier die längste UTR verwendet (**Abb. B-4**).

3.5.3 Vergleich der isolierten Sequenzen mit bekannten Promotoren

Regulierende Regionen des Enzyms CYP80B1 aus *E. californica* und der Enzyme 7OMT, 4'OMT, SalAT und eines putativen Klons *cor2.1* aus *P. somniferum* sind von Apuya und Lu (2006) patentiert worden. Für das Gen *salAT* lagen daher 3 unterschiedliche 5'-Sequenzen vor: [1] die Sequenzen der in dieser Arbeit isolierten 5'-Region, [2] die in dem Patent veröffentlichte Sequenz und [3] die untranslatierte Region, die von Grothe *et al.* (2001) gefunden worden war. Diese 3 regulierenden Regionen wurden unter Verwendung des ClustalW-Algorithmus miteinander verglichen (**Abb. 3-18**). Die ersten 185 Basenpaare der drei Sequenzen stimmten gut überein. In der in dieser Arbeit isolierten 5'-Sequenz fanden sich jedoch ein fehlendes und fünf ausgetauschte Basenpaare. Die regulierenden Regionen, die sich an die UTR anschließen, wichen stark voneinander ab. So fehlte ein etwa 60 bp langes Fragment, das in der vorliegenden Studie gefunden wurde, in der Sequenz des Patentes und zwei kurze Fragmente, die in der patentierten Sequenz vorlagen, waren in der hier isolierten Sequenz wiederum nicht vorhanden. Zudem waren in den ähnlichen Regionen mehrere Basenpaare ausgetauscht.

Apuya und Lu (2006) patentierten zwei unterschiedliche regulierende Sequenzen für die putative Codeinon-Reduktase *cor2.1* mit einer Länge von 968 bzw. 930 bp. Ein Vergleich dieser Sequenzen untereinander und mit der in dieser Arbeit isolierten 5'-Sequenz mittels ClustalW-Algorithmus ergab eine Identität von weniger als 50 % untereinander.

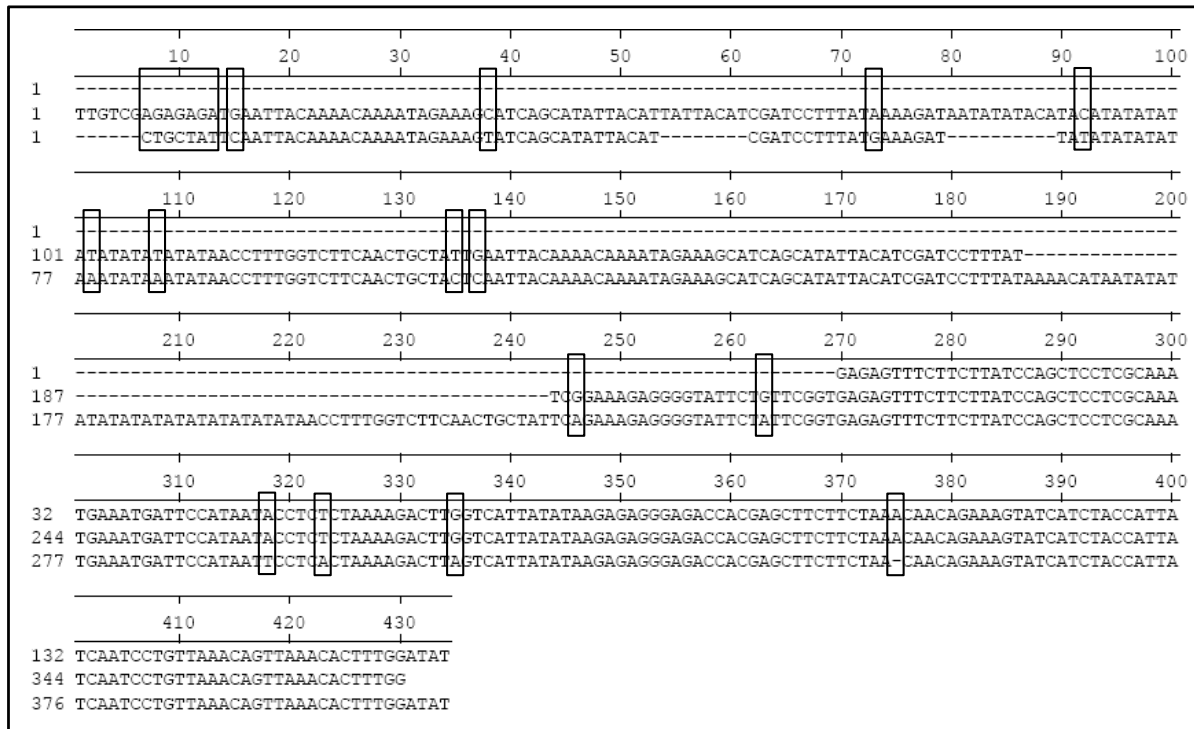


Abb. 3-18 Vergleich der unabhängig voneinander identifizierten regulatorischen und untranslatierten Regionen des Gens *salAT*.

Die erste Sequenz entspricht der UTR von Grothe *et al.* (2001), die zweite der regulierenden Region aus dem Patent von Apuya und Lu (2006) und die untere der in dieser Arbeit isolierten 5'-Region des Gens *salAT*. Abweichende Basenpaare sind durch schwarze Kästchen kenntlich gemacht.

3.5.4 Sequenzanalyse mittels „blastn“ und „blastx“

Mit den vier 5'-Sequenzen wurde eine „blastn“- (Nukleotid *versus* Nukleotiddatenbank) und „blastx“- (translatiertes Nukleotid *versus* Proteindatenbank) Suche durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Für den putativen *cyp80b3*-Promotor ergab der Sequenzvergleich mit der Proteindatenbank innerhalb der ersten 2675 bp mehrere Treffer u.a. mit einer „membrane attack complex component / perforin / complement C9“ (Aminosäuresequenz 302-618) aus *Medicago truncatula* („Gestutzter Schneckenklee“, Faboideae) (ABE92593). Die Aminosäuresequenz dieses Proteins wurde dabei in drei Fragmente unterteilt, wobei sich der Teil mit der höchsten Sequenzhomologie (289 bits, E-Wert 7^{-76}) zwischen 1992-2675 bp befand (**Abb. 3-19**). Es könnte sich dabei um eine Intron-Exon-Struktur handeln. Des Weiteren zeigten auch zwei hypothetische Proteine (OsI_007061 und OsJ_006503) und ein unbekanntes Protein (BAD73817.1) aus *Oryza sativa* (Poaceae) Ähnlichkeit zum gleichen Sequenzabschnitt wie das oben genannte Protein aus *Medicago*. Auch sie wiesen die gezeigte Intron-Exon-Struktur auf. Es liegt daher nahe, dass die gefundene 5'-Sequenz von *cyp80b3* aus *P. somniferum* zwischen 1-2675 bp ein Protein codiert.

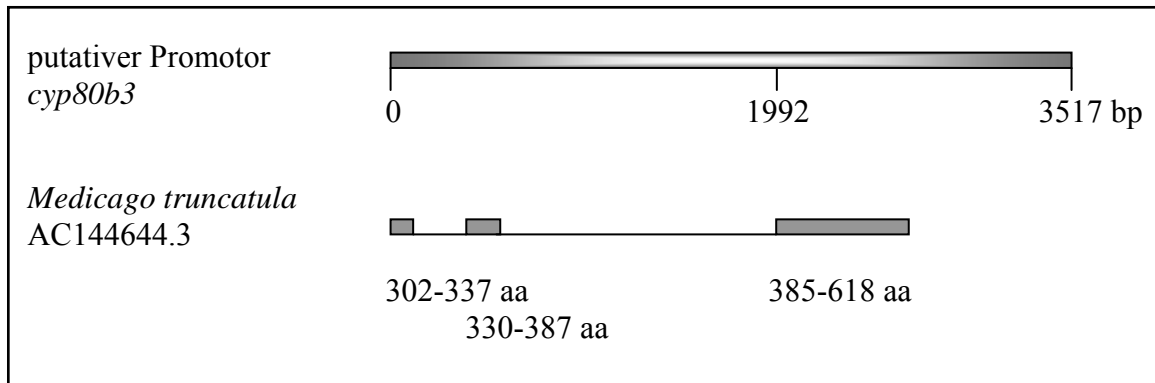


Abb. 3-19 Ergebnis der „blastn“-Suche der 5'-Sequenz des Gens *cyp80b3* aus *P. somniferum*.

Die „blastn“-Suche der putativen *cyp80b3* Promotorsequenz lieferte für eine relativ kurze Sequenz zwischen 2698-2781 bp mehrere Treffer entsprechend des 16S rRNA Gens aus Chloroplasten mehrerer Pflanzen unterschiedlicher Pflanzenfamilien. Die höchste Homologie (113 bits, E-Wert 5^{-21}) wiesen *Drimys granadensis* (Winteraceae), *Nandina domestica* („Himmelsbambus“, Berberidaceae), *Platanus occidentalis* („Amerikanische Platane“, Platanaceae), *Liriodendron tulipifera* („Tulpenbaum“, Magnoliaceae), *Calycanthus fertilis* („Gewürzstrauch“, Calycanthaceae) und *E. californica* („Kalifornischer Mohn“, Papaveraceae) auf. Für den putativen Promotor der Codeinonreduktase konnten nur Treffer mit sehr geringer Sequenzhomologie gefunden werden. Beim Vergleich der translatierten *cpr* 5'-Sequenz gegen die Proteindatenbank („blastx“) wurden mehrere Sequenzen gefunden, die Ähnlichkeit mit dem Bereich zwischen 2-1594 bp aufwiesen. Die zwei höchsten Treffer entsprachen zwei hypothetischen Proteinen aus *O. sativa* (OsI_027235 und OsJ_024128). Die Ergebnisse sind in **Tab. 3-4** zusammengefasst. Die Ähnlichkeit der beiden hypothetischen Proteine mit der putativen *cpr* Promotorsequenz war nicht so hoch wie das Ergebnis im Falle der (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-hydroxylase. Zudem ist die Leserichtung der verglichenen Proteine entgegengesetzt. Es kann demnach nicht geschlussfolgert werden, dass es sich innerhalb der isolierten 5'-Sequenz der Cytochrom-P450-reduktase um einen kodierenden Bereich handelt.

Protein	Länge [aa]	5' Sequenzbereich <i>cpr</i> [bp]	Entsprechende Sequenz [aa]	Richtung	Score [bits]	E-Wert
OsI_027235	2028	32-853	1904-1625	+/-	84	3^{-20}
		886-1071	1614-1553	+/-	40,8	3^{-20}
		1146-1319	1314-1371	+/+	45,8	0,011
OsJ_024128	560	32-865	474-210	+/-	89,7	1^{-19}
		859-1074	211-140	+/-	33,1	1^{-19}
		1388-1588	284-348	+/+	40	0,61

Tab. 3-4 Ergebnis der „blastx“-Suche der 5'-Sequenz des Gens *cpr* aus *P. somniferum*.

Bei der Nukleotid *versus* Nukleotiddatenbank Suche der regulierenden Sequenz des Gens *salAT* fanden sich verschiedene Treffer innerhalb der ersten 50 bp der UTR des Gens. Die höchste Ähnlichkeit wies dabei ein Fragment aus der genomischen Sequenz der Weinrebe, *Vitis vinifera*, (AM462816.1) mit einem „Score“ von 77,8 bits und einem E-Wert von 3^{-11} auf. Das Fragment konnte aufgrund der weiteren Treffer, die eine nur wenig verminderte Ähnlichkeit aufwiesen, als eine putative Intronsequenz des ribosomalen Proteins L16 aus Chloroplasten identifiziert werden.

3.5.5 Ermittlung *cis*-regulierende Elemente mit Hilfe von Datenbanken

3.5.5.1 Der Kernpromotor

Zunächst wurden die Promotoren auf das Vorhandensein der TATA-Box, einer der wichtigsten Kernpromotorelemente für regulierte Gene, hin untersucht. Diese liegt bei Eukaryonten zumeist 25-30 bp vom Transkriptionsstart entfernt und besitzt eine Consensussequenz von TATA(A/T)AA(G/A) (vereinfachte Darstellung nach Smale und Kadonaga, 2003). In allen vier 5'-Sequenzen konnten in einem Abstand von 31-37 bp vor dem jeweiligen Transkriptionsstart TATA-Elemente gefunden werden (**Abb. B-1** bis **B-4**), die der Consensussequenz entsprechen (*cyp80b3*) oder in 1-2 bp von ihr abweichen. Sie stimmten jedoch alle mit der allgemeiner formulierten Sequenz (T>>c>a≅g / A>>t / T>>a≅c / A>>t / T>>a / A>>g>c≅t / A≅T>g>c / G≅A>c≅t) nach Bucher (1990) und Patikoglou *et al.* (1999) überein und könnten somit als potentielle TATA-Elemente fungieren.

In Genen von Säugern bzw. *Drosophila* wurde zudem das Initiator-Element (Inr) gefunden, das ähnlich der TATA-Box fähig ist, an den Prä-Initiationskomplex für die Transkription zu binden. Es scheint besonders in TATA-losen Promotoren eine Rolle zu spielen, kommt jedoch auch in Promotoren mit TATA-Element vor und wirkt dabei mit dieser synergetisch (Smale und Kadonaga, 2003). Die Sequenzen von *cor* (**Abb. B-2**) und *cpr* (**Abb. B-3**) um den Transkriptionsstart stimmen bis auf ein Basenpaar mit der in *Drosophila* gefundenen Consensussequenz für den Inr T C A(+1) G/T T Py (Kutach und Kadonaga, 2000; Ohler *et al.*, 2002) überein und könnten somit die Bildung des Prä-Initiationskomplex zusätzlich unterstützen.

Ein weiteres in eukaryontischen Genen häufig vorkommendes Element ist die so genannte CAAT-Box. Ihre Consensussequenz wird als GGNCAATCT beschrieben (Voet und Voet, 2002) und befindet sich zumeist zwischen -40 und -150. In der isolierten 5'-Sequenz von *cyp80b3* konnte in Position -109 eine Sequenz TGACAATCC gefunden werden (**Abb. B-1**), die sich in 2 Stellen von der Consensussequenz unterscheidet. Die 5'-Region von *cor* enthielt an Position -118 eine Sequenz GTTCAATAG (**Abb. B-2**) und die von *salAT* an der Position -78 die Basenfolge ACTCAATTA (**Abb. B-4**). Beide weichen in 3 bzw. 4 Stellen vom CAAT-Consens ab, jedoch nicht in der Kernsequenz CAAT. Die putative Promotorsequenz von *cpr* wies innerhalb von 150 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts keine entsprechende Sequenz auf.

In den Sequenzen der putativen Promotoren in **Anhang B** (**Abb. B-1** bis **B-4**) ist die Lage der putativen *cis*-regulierenden Elemente gekennzeichnet.

3.5.5.2 Weitere *cis*-regulierende Elemente

Zur Ermittlung weiterer putativer Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren oder anderer *cis*-regulierende Elemente, wurde das Programm PlantCARE genutzt (Lescot *et al.*, 2002) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Da es sich bei diesen Elementen um kurze, konservierte Sequenzen von etwa 5-20 Nukleotiden handelt, kann ihr Auftreten zufällig innerhalb von einigen hundert Basenpaaren statistisch erwartet werden. Die über einen Basenvergleich ermittelten Bindungsstellen müssen daher nicht zwingend korrekt sein. In **Anhang B** sind die Ergebnisse der PlantCARE Analyse wiedergegeben. Dabei wurden mit wenigen Ausnahmen nur Bindungsstellen mit ausgewiesener Funktion berücksichtigt. An dieser Stelle sollen nur einige interessante oder häufig auftretende Elemente genannt werden.

In allen vier 5'-Sequenzen fanden sich eine oder mehrere putative Bindungsstellen für das Element Skn-1, das an der Endosperm-spezifischen Expression des Speicherproteins Glutelin

beteiligt ist (Takaiwa *et al.*, 1991) und jeweils ein MBS-Element, involviert an der Respons auf Trockenstress in *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993). Die Consensussequenz für Skn-1 besteht jedoch nur aus 5 Nukleotiden, woraus eine vergleichsweise hohe Fehlerrate resultiert. Ebenso wurden in allen vier putativen Promotoren Sequenzabschnitte gefunden, die Elementen, die an der lichtabhängigen Regulation von Genen beteiligt sind, ähnelten. Am häufigsten waren dabei die Elemente TCT des Promotors der Untereinheit B der Chloroplasten Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Arabidopsis* (Kwon *et al.*, 1994), Box I aus dem Promotor der Ribulosebisphosphat-carboxylase (Rubisco) aus *Pisum* (Kuhlemeier *et al.*, 1988) und GA aus dem Promotor der Rubisco aus *Glycine max* (Grandbastien *et al.*, 1986). Sie kamen in allen isolierten regulatorischen Sequenzen mit Ausnahme von *salAT* vor. Auch in der Terpenoidindol-alkaloid-Biosynthese wurden Elemente gefunden, die der Regulation durch Licht dienen. So wurde für die Promotoren der Tyrosindecaboxylase (*tdc*), NADPH:cytochrom-P450-Reduktase (*cpr*) und der Striktosidinsynthese (*str*) aus *Catharanthus roseus* die Bindung des Transkriptionsfaktors GT-1 und für *tdc* ebenso des Faktors 3AF1 gezeigt (Cardoso *et al.*, 1997; Ouwerkerk *et al.*, 1999; Pasquali *et al.*, 1999). Die Consensussequenz für den in *Catharanthus* gefundenen Faktor GT-1, der in der UV-Licht induzierten Expression involviert ist, unterscheidet sich geringfügig von der in PlantCARE vorhandenen GT1-Box aus *Arabidopsis*. Die 6 bp lange Kernsequenz stimmt dabei überein. Die *Catharanthus* Consensussequenz umfasst jedoch weitere Nukleotide. Ein Vergleich der durch das Programm ermittelten GT1-Elemente mit dem *C. roseus* Consensus ergab, dass die Elemente in einem Nukleotid von der *Catharanthus* GT-1 Sequenz abweichen. Die 5'-Sequenzen wurden zudem manuell auf das Vorhandensein weiterer GT-1-Elemente durchsucht. Dabei konnte in den putativen Promotoren von *salAT* und *cpr* ein weiteres solches *cis*-aktives Element gefunden werden, das sich jedoch an einer Stelle von dem *C. roseus* Consensus unterscheidet. In der putativen regulatorischen Sequenz der Codeinon-Reduktase konnten 3 Elemente ohne jegliche Abweichungen und ein weiteres, das an einer Stelle abweicht, gefunden werden. Die GT-1 Elemente sind in den 5'-Sequenzen in **Anhang B** vermerkt (**Abb. B-1** bis **B-4** und **Tab. B-1**). Es zeigte sich, dass sich das GT-1 Element an der Position -534 der *cor* Sequenz mit dem MBSII Element unbekannter Funktion, das in regulatorischen Regionen der Chalcone-Synthase in *Petunia hybrida* gefunden wurde (Koes *et al.*, 1989), überschneidet. Das GT-1 Motiv von *salAT* überlagerte mit einem MBS Element des Gens „Responsive to desiccation“ aus *A. thaliana* (siehe oben) (**Abb. B-4**). Ein zur 3AF-1 Bindestelle ähnliche Sequenz konnte ebenso in den putativen Promotoren von *cor* (**Abb. B-2**) und *salAT* (**Abb. B-4**) gefunden werden.

In der isolierten 5'-Sequenz von *cor* (**Abb. B-2**) wurde eine P-Box ähnliche Sequenz der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *Petroselinum crispum* (da Costa e Silva *et al.*, 1993) gefunden, die an der durch Gibberellin induzierten Genexpression beteiligt ist. In *C. roseus* wurde ein MYB-ähnlicher Transkriptionsfaktor isoliert, der homolog zum Faktor BPF-1 (Box P-Bindefaktor-1) aus *Petroselinum* war (van der Fits *et al.*, 2000). In dieser Studie zeigte sich jedoch, dass die zuvor beschriebene Bindungsstelle sowohl für BPF-1 als auch für den in *Catharanthus* vorkommenden Faktor nicht optimal war. Eine Elicitor-responsive Region des *str*-Promotors, die nur eine geringe Ähnlichkeit mit der P-Box aufwies, wurde als neue Erkennungssequenz identifiziert. Im putativen Promotor von *cor* wurde zudem eine Wiederholungssequenz von 26 bp bei -2319 und -2249 gefunden, die jeweils eine P-Box, ähnlich der des Glutelin-Promotors aus *O. sativa* (Takaiwa *et al.*, 1991), einschloss. Dieses 7 Nukleotide lange Element stimmte in 6 Positionen mit der in *Catharanthus* identifizierten Bindungsstelle des Faktors BPF-1 überein. Die restliche Sequenz, an die CrBPF-1 bindet, unterschied sich jedoch erheblich von der in *cor* auftretenden 5'-Wiederholungssequenz.

Die Expression der Gene *cyp80b3* und *bbe* in Suspensionskulturen von *P. somniferum* ist im Gegensatz zur Expression von *cor* durch Methyljasmonat induzierbar (Huang und Kutchan,

2000). Daher sind *cis*-regulierende Elemente, die an der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt sind von Interesse. Mit Ausnahme des Promotors von *salAT*, in dem nur drei MBS-ähnliche Sequenzen gefunden wurden, konnten in allen 5'-Sequenzen mehrere solcher Elemente zugeordnet werden. Darunter waren eine Hitzestress-aktive Sequenz einer Rezeptorähnlichen Kinase aus *Brassica* (Pastuglia *et al.*, 1997), Salicylsäure responsive Elemente des gleichen Gens oder der β -1,3-Glucanase aus *N. tabacum* (Hennig *et al.*, 1993) und ein an Abwehr- und Stressantwort beteiligtes Element der Anionischen Peroxidase ebenfalls aus *Nicotiana* (Diaz-De-Leon *et al.*, 1993). Die putativen Promotoren von *cyp80b3* (**Abb. B-1**) und *cor* (**Abb. B-2**) enthielten außerdem zu Elicitor-aktiven Elementen ähnliche Bereiche (Hennig *et al.*, 1993; Pastuglia *et al.*, 1997). Jeweils ein Element mit Ähnlichkeit zu einer Sequenz, die in *Petroselinum* an der Abwehr gegen Pilze beteiligt ist (Rushton *et al.*, 1996), wurde in den 5'-Sequenzen von *cor* (**Abb. B-2**) und *cpr* (**Abb. B-3**) gefunden.

4 Diskussion

Aufgrund ihrer herausragenden pharmakologischen Bedeutung sind die Alkaloide Codein und Morphin besonders attraktive Syntheseeziele. Dem entgegen steht die komplexe Struktur dieser Verbindungen bestehend aus fünf Ringen mit fünf Stereozentren. Dennoch gelang das „Meisterstück der organischen Chemie“, die Totalsynthese von Morphin, Gates und Tschudi (1952 und 1956). Die Ausbeute der Synthese war jedoch gering und als Ausgangsmaterial wurden Verbindungen genutzt, deren natürliches Vorkommen seltener ist als das von Morphin selbst. Seitdem wurden mehrere unterschiedliche Syntheseprozesse für Morphin veröffentlicht (Novak *et al.*, 2000), von denen die effizienteste Methode mit einer Ausbeute von 29 % von Rice (1980) publiziert wurde. Dennoch kann keine der bisher bekannten Synthesen mit der Gewinnung von stereochemisch reinem Morphin und anderer medizinisch bedeutender Alkaloide aus *P. somniferum* konkurrieren.

Die Isolierung der Sekundärmetabolite aus pflanzlichen Zellkulturen im quantitativen Maßstab wie Berberin aus *C. japonica*- (Sato und Yamada, 1984) oder Taxol® aus *Taxus*-Zellkulturen (Tabata, 2006) ist in *Papaver* nicht sinnvoll. Zwar konnten Thebain und Codein in *P. somniferum*-Kulturen nachgewiesen werden (Kamo und Mahlberg, 1988), die enthaltenen Mengen waren jedoch zur kommerziellen Gewinnung zu gering. Das geringe oder fehlende Auftreten von Alkaloiden in undifferenzierten Suspensionszellen kann durch die gewebsspezifische Expression der an der Alkaloidbiosynthese beteiligten Gene erklärt werden (Bird *et al.*, 2003; Weid *et al.*, 2004). Ein ähnliches Problem tritt auch bei Terpenoidindol-Alkaloiden aus *C. roeus* auf. Auch diese werden in spezifischen Geweben (Murata und De Luca, 2005), jedoch nicht *in vitro* durch undifferenzierte Suspensionszellen biosynthetisiert (Constabel *et al.*, 1982). Erst kürzlich gelang dennoch die Produktion von Ajmalicin, einem Monoterpenoid-Alkaloid, das in einigen Ländern bei Kreislaufstörungen verabreicht wird und in Wurzeln der Pflanze akkumuliert, in transgenen *Catharanthus*-Zellsuspensionen (Montiel *et al.*, 2007). Die Zellen exprimierten dabei den wurzelspezifischen MADS-Box Transkriptionsfaktor „Agamous-like 12“ (Ag12) aus *A. thaliana* (Rounsley *et al.*, 1995), der die Bildung von Parenchyma ähnlichen Zellaggregaten förderte. Eine Differenzierung der Zellen in Wurzelgewebe konnte dadurch nicht induziert werden. In dieser Studie wurde eine Erhöhung der Expression von Genen, die für Enzyme der Biosynthese von Terpenvorstufen der Alkaloide codieren, beobachtet. Ob eine durch Transkriptionsfaktoren erhöhte Produktion von Morphinanen in Suspensionszellen des *P. somniferum* möglich ist und als Alternative zur Isolierung der Alkaloide aus Pflanzen dienen kann, müsste überprüft werden.

Eine weitere attraktive Strategie ist das Einbauen von Metabolismen zur Synthese pflanzlicher Naturstoffe oder ihrer Vorstufen in einen mikrobiellen Wirtsorganismus („metabolic engineering“). So gelang es der Gruppe um Croteau Taxadien, ein Diterpen und Intermediat in der Biosynthese von Taxol®, in gentechnisch veränderten *E. coli* herzustellen (Huang *et al.*, 2001). Dabei wurden die Enzyme Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus *Schizosaccharomyces pombe* (Hahn und Poulter, 1995), die Geranylgeranylidiphosphat-Synthase aus *Erwinia herbicola* (Math *et al.*, 1992) und die Taxadien-Synthase aus *Taxus brevifolia* (Wildung und Croteau, 1996) in den Bakterienstamm transformiert. Inzwischen wurden weitere an der Taxol Biosynthese beteiligte Enzyme gefunden und acht der beteiligten Gene konnten funktionell in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden (Frense, 2007). Fünf aufeinander folgende Biosynthesestufen beginnend mit dem primären Isoprenoid-metabolismus bis zum Intermediat Taxadien-5 α -acetoxy-10 β -ol wurden in einen Hefestamm kloniert (Dejong *et al.*, 2006). Die Hefezellen waren fähig Taxadien zu synthetisieren. Die erste Cytochrom-P450-Hydroxylierung limitierte jedoch nachfolgende Reaktionsschritte. Die Isolierung weiterer Gene dieses Metabolismus zusammen mit einer weiterführenden Entwicklung des *S. cerevisiae*-Systems könnte in Zukunft zu einer rentablen Produktion des

zur Semisyntese genutzten Baccatin III oder des Taxol® selbst in Hefe führen. Ein Beispiel für das „metabolic engineering“ der Alkaloidbiosynthese stammt von Geerlings *et al.* (2001). In dieser Studie gelang die Produktion der Indolalkaloide Strictosidin und Cathenamin in *S. cerevisiae* Kulturen, die mit cDNAs der Strictosidin-Synthase (Kutchan *et al.*, 1988) und Strictosidin- β -Glucosidase (Geerlings *et al.*, 2000) aus *C. roseus* transformiert wurden, durch Fütterung der Vorstufen Tryptamin und Secologanin. Beide Alkaloide sind Intermediate in der Biosynthese von Ajmalicin. Für die pharmazeutisch wirksamen Benzylochinolinalkaloide ist das „metabolic engineering“ in Mikroorganismen ebenfalls als Alternative zur bisherigen Gewinnung aus Pflanzen denkbar. Voraussetzung dafür ist jedoch die Kenntnis über die cDNAs aller an der Synthese beteiligten Enzyme und das Auffinden eines geeigneten Expressionssystems. Viele dieser Proteine lassen sich in funktioneller Form nur schwer oder gar nicht in *E. coli* oder Hefezellen exprimieren (Frick und Kutchan, 1999; Grothe *et al.*, 2001; Ounaron *et al.*, 2003; Huang und Kutchan, 2000). In diesen Fällen wurde die Expression in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda* Sf9 Zellen) bevorzugt. Die Kultivierung dieser Zellen ist jedoch weitaus aufwendiger als die der Bakterien oder Hefen. Das Enzym BBE wird auch in Insektenzellen nur in geringen Mengen exprimiert (4 mg/l) (Dittrich und Kutchan, 1991; Kutchan *et al.*, 1994). Schwierigkeiten bereiten dabei das N-terminale Signalpeptid (Dittrich und Kutchan, 1991) und eine Sequenz, die das Enzym in die Vakuole dirigiert („vacuolar sorting determinant“) (Bird und Facchini, 2001). Außerdem ist BBE N-glycosyliert und ein bi-kovalent gebundenes FAD, welches das Redoxpotential der Ringschlussreaktion erheblich erhöht, wird für die Funktion des Enzyms benötigt (Kutchan und Dittrich, 1995; Winkler *et al.*, 2006 und 2007). Winkler *et al.* (2006) gelang durch Verwendung eines Expressionssystems der Firma Invitrogen, das die methylotherme Hefe *Pichia pastoris* nutzt, eine um das 30-fache erhöhte Produktion des Proteins. Möglicherweise bietet dieses System einen Ansatz für das „metabolic engineering“ der Enzyme der Benzylochinolinalkaloid-Biosynthese des Schlafmohns.

Auch der bisher effektivsten Methode, der Gewinnung der Alkaloide aus Schlafmohn-Pflanzen, sind Grenzen gesetzt. Eine Rolle spielt dabei neben den Kultivierungs- und Erntebedingungen die angebaute Schlafmohnsorte. Durch Züchtungen dieser alten Kulturpflanze konnten bereits Sorten mit besonders hohen Gehalten an Alkaloiden erhalten werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *Papaver*-Sorte C058-34 und ein Abkömmling dieser, C048-6-14-64 (Frick *et al.*, 2005), der Firma Tasmanian Alkaloids Pty Ltd, Westbury, Australien sind Beispiele dieser kommerziell relevanten Züchtungen. Als Hauptalkaloide wurden in beiden Pflanzen Morphin, Codein und Thebain ermittelt. Seit 1996/97 wird von derselben Firma auch ein Thebain-Schlafmohn kommerziell angebaut (Fist, 2001). In diesem durch Mutagenese erzeugten Mohn endet die Alkaloid-Biosynthese aus bisher noch ungeklärten Gründen bei Thebain und Oripavin. Morphin und Codein werden nicht gebildet (Millgate *et al.*, 2004). Für eine gezielte Veränderung der Alkaloidbiosynthese des Schlafmohns ist neben der Kenntnis über die enzymatischen Schritte und der beteiligten Gene auch die Aufklärung von Regulationsmechanismen von Bedeutung. Die Gewinnung von Erkenntnissen über die Regulation durch gentechnologische Veränderung des Alkaloidspektrums war Gegenstand dieser Arbeit.

4.1 Die Transformation von *P. somniferum* L.

Zur Transformation der Schlafmohnpflanze gab es zu Beginn dieser Arbeit bereits verschiedene Ansätze. *Agrobacterium rhizogenes* vermittelte Transformationsprotokolle wurden von Park und Facchini (2000a) und von Le Flem-Bonhomme *et al.* (2004) publiziert. Durch diese Verfahren werden jedoch lediglich transgene Wurzelkulturen gebildet. Da

Benzylochinolin-Alkaloide überwiegen in oberirdischen Teilen der Pflanze, besonders im Milchsaft gefunden werden, sollte eine Ganzpflanzentransformation genutzt werden. Das von Park und Facchini (2000b) entwickelte Protokoll zur Transformation von Schlafmohn über Sprossentwicklung konnte in eigenen Versuchen nicht erfolgreich reproduziert werden. Dabei trat das grundlegende Problem auf, dass sich aus den Keimblättern keine Sprosse entwickelten. Dies war möglicherweise auf die Verwendung einer unterschiedlichen *Papaver*-Sorte zurückzuführen. Parallel dazu wurde die durch Chitty *et al.* (2003) beschriebene Methode verwendet. Diese ist zwar aufwendiger und langwieriger, aber es konnten bereits erfolgreich transgene Pflanzen des *P. somniferum* C048-6-14-64 regeneriert werden (Frick *et al.*, 2004; Frick *et al.*, 2007). Da Zellkulturen der Sorte C058-34 schneller Kallus Typ II entwickelten (interne Informationen), wurde diese für die Transformation der RNAi Vektoren genutzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieser zeitliche Vorteil durch das spätere Einsetzen der Embryonenbildung wieder verloren ging. Von der *cyp80b3* RNAi Zelllinie konnte keine transgene Pflanze regeneriert werden. Frick *et al.* (2007) schlussfolgerten aus Analysen von Schlafmohnpflanzen, die ein *cyp80b3* Gen mit entgegen gesetztem Leserahmen enthielten oder das Gen überexprimierten, dass es sich hierbei um einen Biosyntheseschritt handelt, der einen starken Einfluss auf die Regulation der gesamten Alkaloidbiosynthese hat. Es ist daher möglich, dass das Einschleusen des *cyp80b3* RNAi Vektors nachteilig für die Fitness der Pflanzen war. Die Effizienz der *salAT* RNAi Transformation war mit 0,04 zwar gering, dennoch konnten insgesamt 16 transgene Pflanzen regeneriert werden.

Erst kürzlich wurde von Hileman *et al.* (2005) die Methode der Virus-induzierten Genunterdrückung (VIGS) mit Hilfe von Sequenzen des Tabakrattle-Virus (TRV) für Schlafmohn vorgestellt. Die Transkriptmenge des dabei verwendeten endogenen Gens, Phytoen-Desaturase (PDS), wurde 3,2 bis 7,5-fach reduziert. In 4,8-23,8 % der behandelten Pflanzen konnte 14-17 Tage nach Vakuuminfiltration der gebleichte Phänotyp in den neu gebildeten Blättern festgestellt werden. Ob diese Methode für die Untersuchung von gentechnisch erzeugten Veränderungen des Gehaltes und der Zusammensetzung der Alkaloide im Milchsaft geeignet ist, muss noch festgestellt werden. Dazu müsste zunächst geklärt werden, ob der Milchsaft durch diese Methode überhaupt verändert werden kann. In den zur Infiltration verwendeten Pflanzen ist das Milchröhrensystem, in dem sich der Hauptanteil der Alkaloide befindet, bereits ausgebildet. Zudem ist zu berücksichtigen, dass besonders Benzo[*c*]phenanthridin-Alkaloide durch Stress, wie er z.B. bei der Vakuuminfiltration ausgelöst werden kann, induzierbar sind. Wenn sich das VIGS für die Analyse des Sekundärmetabolismus dieser Pflanze als brauchbar erweist, stehen der Erforschung der Funktion neuer Gene und der Aufklärung über Regulationsprozesse der Alkaloidbiosynthese neue Möglichkeiten offen. Die aufwendige und langwierige Arbeit mit Zellkulturen könnte umgangen werden.

4.2 Konstitutiver oder genspezifischer Promotor?

Wenn, wie im vorliegenden Fall, ein genspezifischer Promotor nicht bekannt ist, eignet sich zur Expression eines Transgens ein konstitutiver Promotor. Der Promotor der 35S RNA des Blumenkohl Mosaik Virus (CaMV 35S) (Odell *et al.*, 1985) konnte bereits in einer Reihe von Organismen erfolgreich eingesetzt werden (z.B. Holtorf *et al.*, 1995; Mitsuahara *et al.*, 1996; Wilmink *et al.*, 1995). Obwohl er im Allgemeinen als konstitutiv eingeschätzt wird, zeigten einige Studien, dass durch diesen Promotor Gene nicht in allen Geweben gleich exprimiert werden. So zeigten Williamson *et al.* (1989), dass Tabakpflanzen, die mit einem Konstrukt bestehend aus CaMV 35S Promotor und Zein-Gen transformiert worden sind, in jüngeren Blatt-, Stängel-, Blüten- und Wurzelgeweben höhere Mengen Zein-Transkript aufwiesen als in älteren Geweben. Auch in der Baumwolle konnte eine entwicklungsabhängige Expression

dieses Promotors festgestellt werden (Sunilkumar *et al.*, 2002). In Reis wurde eine geringere Aktivität des Promotors in der Wurzelepidermis als in anderen Geweben festgestellt (Battraw und Hall, 1990). Dabei trat die erste Expression etwa 13 Tage nach der Anthese in einer kleinen Region am Schnittpunkt des Hypokotyls und der Keimblätter auf. Zudem ist die Expression durch den CaMV 35S Promotor nicht in allen Organismen gleich stark (Mitsuhara *et al.*, 1996; Battraw und Hall, 1990). Auch in *P. somniferum* ist bisher noch nicht bekannt, in welchem Gewebe der Promotor aktiv und wie stark er ist. *In situ*-Hybridisierungen ermittelten die Transkripte an der Alkaloidbiosynthese beteiligter Enzyme in Zellen des Leitbündels (Bird *et al.*, 2003; Weid *et al.*, 2004). Diese strikt gewebspezifische Expression weist darauf hin, dass die Verwendung genspezifischer Promotoren für die RNA Interferenz von Vorteil sein könnte. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die 5'-Sequenzen der Gene *cor*, *cyp80b3*, *cpr* und *salAT* isoliert.

Für alle diese putativ regulierenden Sequenzen wurde der Transkriptionsstart ermittelt. Dadurch war die Identifizierung des bisher am besten untersuchten *cis*-regulierenden Elementes, der TATA-Box, aufgrund ihrer definierten Position in Bezug zum Startpunkt der Transkription möglich. In allen 4 putativen Promotorsequenzen wurde eine TATA-Box gefunden. Dies konnte vor allem für das induzierbare Gen *cyp80b3* erwartet werden und auch die starke Regulierung der Alkaloidbiosynthese legte diese Vermutung nahe. Für die Gene *cor* und *cpr* könnte zudem ein Initiator-Element die Transkription unterstützen. Die Erkennung weiterer *cis*-regulierender Elemente, wie „enhancer“, ist ungleich schwieriger. Dies liegt zum einen daran, dass für diese Elemente keine bestimmte Position und auch Richtung festgelegt werden kann. Zum anderen fehlen für die in den Vorhersageprogrammen gesammelten Elemente zumeist genauere Untersuchungen. So sind die meisten der in **Tab. B-1** angegebenen Elemente, die über das Programm PlantCARE ermittelt wurden, lediglich durch Sequenzvergleiche gefunden worden. Zwar gibt es Programme, die für die Voraussage von *cis*-regulierenden Elementen akzeptable Ergebnisse liefern können (PromoterInspector, McPromoter), diese müssten jedoch noch für Pflanzen optimiert werden (Mathé *et al.*, 2002; Rombauts *et al.*, 2003). Die in **Tab. B-1** aufgelisteten Elemente können daher nur als Indiz für eine eventuell existierende regulierende Region dienen. Um jedoch eine tatsächliche Beteiligung an der Regulation des Gens nachzuweisen sind *in vitro*-Untersuchungen wie DNaseI „Footprinting“ oder „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) nötig.

Bevor die isolierten putativen Promotorsequenzen für die Transformation verwendet werden, sollten Untersuchungen zu ihrer Funktionalität erfolgen. Obwohl sich die Promotorsequenz gewöhnlich am 5'-Ende des Transkriptionsstarts befindet, können regulierende Sequenzen auch in der 3'-Region (Dorsett, 1999) oder innerhalb von Introns (Gidekel *et al.*, 1996) gefunden werden. Auch wäre zu klären, wie lang die Sequenz ist, die für eine minimale Expression benötigt wird (Kernpromotor), und ob innerhalb der isolierten Sequenzen „Enhancer“-Elemente vorliegen, die die Expression verstärken könnten. Dazu kann ein Reportergen, das unter der Kontrolle eines der putativen Promotoren steht, mit Hilfe eines schnellen, transienten Transformationssystems auf Schlafmohn oder einen anderen Organismus übertragen werden. Der *bbe*-Promotor aus *E. californica* wurde von Hauschild *et al.* (1998) sowohl durch Elektroporation von Protoplasten von *Daucus carotta* und *E. californica* als auch durch Partikelbombardment verschiedener Suspensionszellen getestet. Dabei stellte sich heraus, dass dieser Promotor sehr spezifisch für *E. californica* war. Nur in *Thalictrum bulgaricum* (Ranunculaceae) konnte eine geringe Aktivität nachgewiesen werden. Für die Promotoren der Gene *bbe* und *tydc* aus *P. somniferum* wurden von Park *et al.* (1999) ballistische Verfahren angewendet.

4.3 Die Analyse der T₀-Generation ist nicht ausreichend

Die Analyse des *salAT* Transkripts zeigte in den regenerierten *salAT* RNAi T₀-Pflanzen eine starke Reduktion um ein Drittel oder mehr. Trotz dieser Stilllegung auf Ebene des Transkripts wiesen die Pflanzen alle Alkaloide auf, die im Wildtyp vorkommen. Die erwartete Erniedrigung der relativen Gehalte an Morphin, Codein und Thebain trat nicht ein. Der relative Anteil an Thebain überschritt sogar die durchschnittlichen Werte des Wildtypen. Zudem war eine Erhöhung der Mengen aller Alkaloide festzustellen. Die gesteigerte Produktion von Alkaloiden und Thebain im Speziellen konnte jedoch auch in nicht transgenen, regenerierten Pflanzen beobachtet werden. Daher handelte es sich hierbei um ein Phänomen, das durch den Stress der Regeneration verursacht wurde. Bestätigt wird dies durch die Analyse der T₁-Generation. Es zeigte sich, dass die transgenen Nachkommen im Milchsaft eine der Wildtypen vergleichbare Menge an Alkaloiden aufwiesen. Die relativen Thebain-Gehalte in dieser Generation waren für Linien, deren Pflanzen besonders niedrige Mengen an *salAT* Transkript besaßen wie 77a38 und 34b31, sogar niedriger als im Wildtyp. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass von allen transgenen, regenerierten T₀-Pflanzen nur 77a38, für deren Nachkommen die niedrigsten *salAT* mRNA Mengen ermittelt wurden, keinen erhöhten Gehalt an Thebain aufwies. Dieser war im Vergleich zum Wildtyp sogar erniedrigt. In Hinsicht auf die in der T₁-Generation auftretende Reduktion des Thebain-Gehaltes weiterer Linien, könnte dies ein Hinweis auf den starken RNAi-Effekt in dieser Pflanze sein.

4.4 Die Stilllegung von SalAT führt zur Akkumulation der Intermediate Salutaridin und Salutaridinol

Mit Ausnahme von 77a35 wurden in allen untersuchten transgenen Pflanzen der T₀- sowie der T₁-Generation die Intermediate Salutaridin und Salutaridinol nachgewiesen. Diese Alkaloide konnten über HPLC nicht in Wildtypen oder in nicht transgenen Pflanzen gefunden werden. Es handelt sich daher um einen Effekt, der in direktem Zusammenhang mit dem eingeführten Transgen steht. Durch die Stilllegung von SalAT könnte eine Anhäufung des Substrats dieses Enzyms, also Salutaridinol, erwartet werden. Die Pflanzen akkumulierten jedoch nur geringe Mengen an Salutaridinol und vergleichsweise hohe Mengen Salutaridin. Die Reduktion von Salutaridin zu Salutaridinol erfolgt direkt vor der Acetylierung des Salutaridinols durch SalAT und wird durch das Enzym Salutaridin-Reduktase (SalR) katalysiert (**Abb. 4-1**).

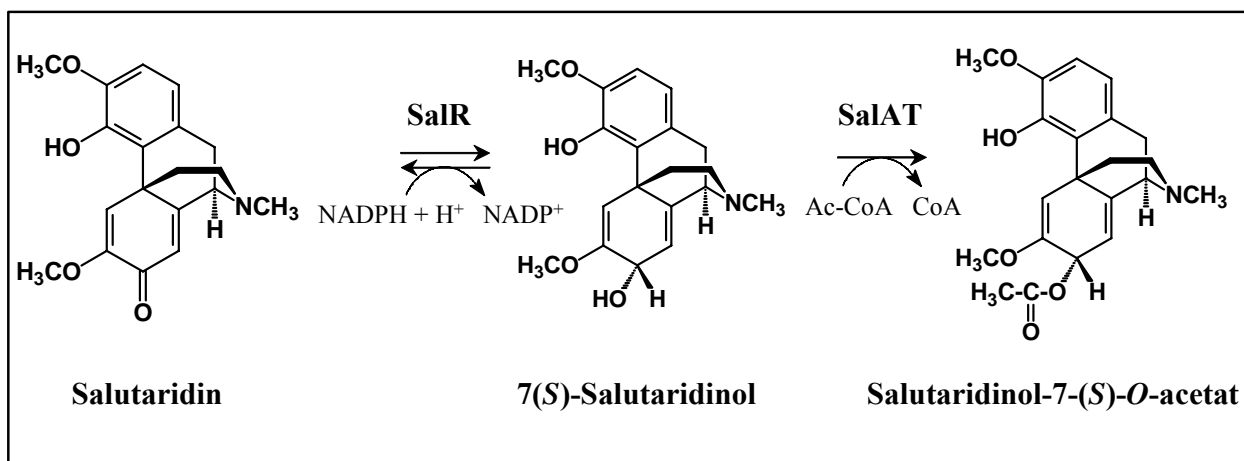


Abb. 4-1 *In vivo* katalysierte Reaktionen der Enzyme SalR und SalAT.

Um zu klären, ob die Expression von *salR* durch die post-transkriptionelle Stilllegung des Enzyms SalAT aktiviert wird, wurde die relative Menge an *salR* Transkript über „Real Time“ RT-PCR bestimmt. Dabei konnte keine eindeutig erhöhte Menge an *salR* mRNA im Vergleich zum Wildtypen gefunden werden. Die erhöhte Menge von Salutaridin kann daher nicht durch eine Regulation auf transkriptioneller Ebene erklärt werden.

Die Reduktion von Salutaridin zu Salutaridinol durch SalR wurde als reversibel beschrieben (Gerardy und Zenk, 1993b; Ziegler *et al.*, 2006). Der v_{Max}/K_m -Wert des rekombinanten Enzyms SalR war 0,18 für Salutaridin und 0,46 für Salutaridinol (Ziegler *et al.*, 2006). Das heißt, dass unter den jeweiligen optimalen Reaktionsbedingungen die physiologische Rückreaktion, also die Oxidation von Salutaridinol zu Salutaridin, bevorzugt ist. Es wäre somit möglich, dass das durch die Stilllegung des Gens *salAT* angestaute Salutaridinol in den Pflanzen effizient von SalR zu Salutaridin umgesetzt wurde. Die Bildung von Salutaridin aus (*R*)-Retikulin ist eine C-C-Kopplungsreaktion, die von einem Cytochrom-P450 Enzym katalysiert wird und unter physiologischen Bedingungen nicht reversibel ist (Gerardy und Zenk, 1993a). Dadurch könnte die beobachtete Akkumulation von Salutaridin anstelle des Salutaridinols erfolgt sein.

Der beobachtete Chemotyp könnte jedoch auch durch eine physische Wechselwirkung der Enzyme SalAT und SalR erklärt werden. Ein Hefe-Zwei-Hybrid-System, das Wechselwirkungen zwischen zytosolischen Proteinen detektieren kann („CytoTrapTM XR Library Construction Kit“ von Stratagene), bekräftigte diese Vermutung (Sabarna, 2006). Das dabei eingesetzte System nutzte das Enzym SalAT als Köder- und SalR als Zielprotein. Durch diese Technik konnte gezeigt werden, dass die beiden Enzyme miteinander Wechselwirken. Um auszuschließen, dass es sich dabei um ein falsch positives Ergebnis handelte, muss dieses noch z.B. durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET), Immunopräzipitation oder Tandem-Affinitätschromatographie bestätigt werden. Dennoch wäre die Anordnung der beiden Enzyme in einem Enzymkomplex eine Erklärung für die beobachtete Begünstigung der physiologischen Rückreaktion von SalR. Es besteht die Möglichkeit, dass sich durch die Wechselwirkung der beiden Enzyme und das damit verbundene, schnelle Abgeben des Salutaridinols von SalR zu SalAT das Salutaridin/Salutaridinol-Gleichgewicht in Richtung des Salutaridinols verschiebt (Kanaleffekt). Eine andere Möglichkeit besteht in der Erhöhung der Aktivität des Enzyms SalR für die physiologische Vorwärtsreaktion bzw. eine Erniedrigung der Aktivität von SalR für die Rückreaktion durch die Ausbildung des Komplexes. Eine solche regulierende Funktion eines Enzymkomplexes wurde beispielsweise für die Serinacetyltransferase und die *O*-Acetylserin(thiol)-Lyase in *Arabidopsis* gefunden (Droux *et al.*, 1998). Eingehende kinetische Untersuchungen wären im Falle der Bestätigung des Komplexes nötig.

Das Auftreten eines Enzymkomplexes im Morphin-spezifischen Teil der Benzylisochinolin-Biosynthese des *P. somniferum* wurde bereits von Allen *et al.* (2004) vermutet. Schlafmohnpflanzen, die mit einem chimären RNAi Vektor bestehend aus dem Gen *cor1* und dem putativen Gen *cor2.1* stabil transformiert worden waren, zeigten eine Akkumulation des zentralen Intermediats Retikulin und methylierter Derivate des Retikulins. Die Mengen an sowohl dem Produkt von *cor1* (Morphin) als auch seiner Substrate (Codein und Oripavin) bzw. der Vorstufe Thebain waren in den Pflanzen reduziert. Drei mögliche Erklärungen wurden diskutiert: das Auftreten einer Feedback-Hemmung durch das Endprodukt Morphin auf Ebene des Enzyms (1) oder der Transkription (2) und dem Vorhandensein eines makromolekularen Enzymkomplexes (3). Letzteres kann durch die Ergebnisse der *salAT* RNAi Transformation nicht unterstützt werden, da ein solcher Enzymkomplex auch in diesem Falle zu einer Akkumulation von Retikulin anstelle von Salutaridin und Salutaridinol hätte führen müssen.

Auch die Biosynthese des Sekundärmetabolits Dhurrin in *S. bicolor* findet über einen Enzymkomplex statt. Dhurrin ist ein Mitglied der Klasse der cyanogenen Glycoside, die von

einer Reihe verschiedener Pflanzenarten (z.B. *Sorghum*, *Cassava* und *Prunus*) zum Schutz gegen Herbivoren synthetisiert werden (Gleadow und Woodrow, 2002). Bei Abwehr wird toxisches Cyanid durch den Abbau des Glycosids über Enzyme erzeugt, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten gespeichert und beim Verletzen des Gewebes zusammengebracht werden. Die Verbindungen dienen jedoch auch als N₂-Speicher und bei der Kontrolle der Keimung. Durch die Labilität und Toxizität der Zwischenprodukte ist das „metabolic channeling“ dieser Verbindungen mit einer physischen Nähe der aktiven Zentren der Enzyme zueinander für die Pflanzen von Vorteil. Tatsächlich sind *in planta* weder *p*-Hydroxymandelonitril noch seine Abbauprodukte detektierbar (Moller und Conn, 1980). Diese Beobachtung konnte durch Metabolom- und Transkriptomanalysen von transgenen Arabidopsis-Pflanzen, die den gesamten Dhurrin-Metabolismus exprimieren (Jorgensen *et al.*, 2005; Kristensen *et al.*, 2005), und durch Konfokalmikroskopie (Nielsen und Moller, 2005) untermauert werden. Dabei sind nur CYP79A1 (Koch *et al.*, 1995) und CYP71E1 (Kahn *et al.*, 1997) fest in den Komplex eingebunden, die lösliche UDPG-Glucosyltransferase UGT85B1 (Jones *et al.*, 1999) wird an bestimmte Domänen des endoplasmatischen Retikulums dirigiert, wenn beide Cytochrom-P450 Enzyme vorhanden sind.

Auch im Phenylpropanoid-Metabolismus der Pflanzen wurde die Existenz von Metabolons nachgewiesen. Eine Wechselwirkung der Enzyme Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) und dem Cytochrom-P450 Enzym Cinnamat-4-hydroxylase (C4H), den Ausgangspunkten dieses Metabolismus, wurde bereits 1977 von Czichi und Kindl nachgewiesen und durch neue Studien unterstützt (Rasmussen und Dixon, 1999). Die Organisation von Enzymen in Komplexen wird auch im Isoflavonoidzweig in Leguminosen vermutet (He und Dixon, 2000). Außerdem gibt es neue Beweise für die Co-Lokalisierung der ersten zwei Enzyme des Flavonoidzweiges in *A. thaliana* (Saslowky *et al.*, 2001).

4.5 Die Einführung des *salAT* RNAi Transgens führt nicht zur Reduktion von Morphin

Auffallend war zum einen, dass besonders die Pflanzen mit den geringsten Mengen an *salAT* mRNA hohe Gehalte an Salutaridin und Salutaridinol aufwiesen (Nachkommen von 77a38 und 34b31). Das spricht dafür, dass die Akkumulation dieser Zwischenprodukte tatsächlich auf das eingeführte RNAi-Konstrukt zurückzuführen ist. Zum anderen besaßen Pflanzen mit einem hohen Gehalt an Salutaridin geringere relative Gehalte an Thebain. Dies konnte insbesondere für die Nachkommen der T₀-Pflanze 77a38 aufgrund des in diesen Pflanzen stark ausgeprägten RNAi-Effektes über lineare Korrelation gezeigt werden. Dabei konnte ebenso festgestellt werden, dass diese Relation auch für Codein, jedoch nicht für Morphin zutrifft. Das heißt also, dass durch die Stilllegung von *salAT* Salutaridin auf Kosten der in nachfolgenden enzymatischen Schritten gebildeten Alkaloide Thebain und Codein akkumuliert bzw. gebildet wird. Warum trifft dies aber nicht für Morphin, dem Endprodukt dieses Metabolismus zu? Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Mengen an *cor*-Transkript, dem bisher einzigen klonierten Gen des unteren Morphinbiosyntheszweiges, der transgenen Nachkommen von 77a38 und 99a15II untersucht. Diese zwei Pflanzenlinien wurden ausgewählt, da die Nachkommen der T₀-Pflanze 77a38 einen besonders starken und die der Pflanze 99a15II einen schwachen RNAi-Effekt zeigten. Wenn ein Einfluss der induzierten Stilllegung von *salAT* auf die Transkriptmenge von *cor* gegeben sein sollte, dann müsste dieser demzufolge in den beiden Pflanzenlinien unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Es wurden jedoch in beiden Linien Pflanzen mit im Vergleich zum Wildtyp erhöhten und erniedrigten Mengen *cor* mRNA gefunden. Es kann daher nicht gefolgert werden, dass solch ein Einfluss existiert. Damit scheint eine Regulation des unteren Abschnittes der Morphinbiosynthese auf Ebene der Transkripte eher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse der

von Weid *et al.* (2004) durchgeführten Fluoreszenz-immunozytologischen Arbeiten, die die Enzyme COR in Milchröhren und SalAT in parenchymatischen Zellen des Phloems lokalisierten, weisen auf eine andere Möglichkeit hin. Wenn mehr als ein Zelltyp an der Morphinbiosynthese beteiligt ist, so ist ein Transport der Zwischenprodukte, in diesem Falle Salutaridinol-7-*O*-acetat oder Thebain unabdingbar. Daher könnte die Aktivierung eines solchen Transportmechanismus an der Akkumulation von Morphin trotz Stilllegung von *salAT* beteiligt sein. Ein ABC-Transporter, der am Transport des Alkaloids Berberin beteiligt ist, wurde in *C. japonica* (Yazaki *et al.*, 2001; Shitan *et al.*, 2003) und *Thalictrum minus* (Terasaka *et al.*, 2003) identifiziert und kloniert, ebenso wie ein ähnliches Protein aus *Catharanthus* (Jin *et al.*, 2007).

Die Bildung von Morphin in Mengen, die mit denen des Wildtypen vergleichbar sind, auf Kosten der Vorstufen Thebain und Codein trotz Stilllegung eines Gens aus dem frühen Biosyntheseabschnitt, ist auch grundsätzlich hinsichtlich der Funktion dieses Alkaloids für den Schlafmohn von Interesse. Warum wird die Biosynthese von gerade diesem Sekundärmetabolit sichergestellt? Bisher ist noch keine eindeutige Funktion von Morphin für die Pflanze gefunden worden. In zwei Publikationen wurde eine mögliche Erklärung untersucht (Morimoto *et al.*, 2001 und 2003). Morphin wird besonders in Kapseln, aber auch in Blättern durch den Einfluss von Stress schnell zu Bismorphin umgesetzt. Bismorphin besteht aus zwei Morphin-Untereinheiten, die über C-1 kovalent aneinander gebunden sind. Es bindet ionisch an Galakturonsäure-Reste des Pektins und somit an die Zellwand. Da beide Aminogruppen des Bismorphins beteiligt sind, führt dies zur Vernetzung der Polysaccharide, die noch stärker ist als durch Ca^{2+} -Ionen. Aus diesen Studien wurde für Morphin eine Resistenz gegen Hydrolyse durch Pektinasen postuliert. Eine andere Funktion des Morphins für die Pflanze könnte der Schutz vor Fraßfeinden sein. Das schnell härtende Opium verklebt die Fresswerkzeuge von Insekten und kann zu Vergiftungen von Tieren führen (Behr, 1980).

Mit der Regeneration von Pflanzen des *P. somniferum* L., die die Expression des Gens *salAT* unterdrücken, und der Analyse der Auswirkung dieses Eingriffs konnte dem noch größtenteils unbekanntem Bild über die Regulation der Alkaloidbiosynthese im Schlafmohn ein weiteres Puzzleteil hinzugefügt werden. Es zeigt, dass die Anwendung der RNAi-Technik ein effizientes Werkzeug darstellt, um das bekannte Wissen zu vertiefen. Darüber hinaus bietet sie das Potential, die Alkaloidbiosynthese gezielt zu verändern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren in besonderer Weise, dass zum Verständnis der Regulation der Alkaloidbiosynthese in Schlafmohn verschiedene Parameter wie die beteiligten Gene, Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Transportmechanismen betrachtet werden müssen. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Promotoren könnten dabei nicht nur für zukünftige Transformationen, sondern auch als Grundlage für die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren dienen.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Analyse der Regulation der Benzylisochinolinalkaloid-Biosynthese des Schlafmohns. Zu diesem Zweck sollte diese Art mit RNAi-Konstrukten der Gene (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (*cyp80b3*) und Salutaridinol-7-*O*-Acetyltransferase (*salAT*) transformiert werden. Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:

1. RNAi-Konstrukte der Gene *cyp80b3* und *salAT*, basierend auf dem Vektor pHANNIBAL, wurden getrennt in *P. somniferum* der Sorte C058-34 durch *Agrobacterium*-gestützte Transformation eingeführt. Zellkulturen wurden angelegt und Pflanzen regeneriert.
2. Der Nachweis des Transgens erfolgte über Polymerasekettenreaktion (PCR) und „Southern-blot“ Analyse. Es konnte keine transgene Pflanze der *cyp80b3* RNAi Transformation, aber 16 transgene *salAT* RNAi Pflanzen mit insgesamt 5 unabhängigen Transformationsereignissen regeneriert werden. Die Pflanzen trugen 2 – 5 Kopien des Transgens. Die Transformationsfrequenz betrug 0,04.
3. Der Nachweis des Gehaltes an *salAT* Transkript erfolgte durch „Real Time“ Reverse Transkriptase (RT)-PCR. Als Referenz wurde das Gen des Tubulins aus Schlafmohn genutzt. Die Analyse zeigte, dass die Transkriptmenge in allen 16 *salAT* RNAi Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp um ein Drittel oder mehr reduziert war.
4. Die Analyse der Alkaloide im Milchsaft der *salAT* RNAi Pflanzen wurde mittels HPLC durchgeführt. Mit einer Ausnahme enthielt der Milchsaft der transgenen Pflanzen die Alkaloide Salutaridin und Salutaridinol, die mittels HPLC nicht in Kontrollpflanzen nachgewiesen werden konnten. Die Werte variierten dabei für Salutaridin von 3,3 – 21,7 % und für Salutaridinol von 0,7 – 3,4 %. Zudem fanden sich in den meisten Pflanzen erhöhte Gehalte an Thebain. Der Milchsaft einer transgenen Pflanze wies einen ungewöhnlich hohen Anteil an (*S*)-Scoulerin auf. Die Gesamtmenge an Alkaloid im Milchsaft variierte stark und war im Vergleich zu den Kontrollpflanzen erhöht.
5. Über LC/ESI-MS/SRM wurde zusätzlich eine relative Quantifizierung der Alkaloide mit der molaren Masse von 328 [(*S*)-Scoulerin, 1,2-Dehydroretikulin und Salutaridin] untereinander vorgenommen. Dabei zeigte sich eine Verschiebung des relativen Verhältnisses dieser Alkaloide. Besonders der Anteil an Salutaridin war stark erhöht. In zwei Zelllinien trat zudem eine leichte Verschiebung des Verhältnisses 1,2-Dehydroretikulin zu (*S*)-Scoulerin in Richtung des letzteren auf.
6. Die transgenen Pflanzen wurden selbst bestäubt. Der Samen aller transgenen Pflanzen wurde nach dem Abreifen geerntet. Anhand der bisherigen Ergebnisse wurden Pflanzen ausgewählt, die ausgesät werden sollten. Für die Auswahl waren sowohl die Menge an *salAT*-Transkript als auch das Alkaloidprofil entscheidend.
7. Der Nachweis des Gehaltes an *salAT* Transkript erfolgte analog zu den Elternpflanzen mittels „Real Time“ RT-PCR und zusätzlich für einige Pflanzen mit „northern-blot“ Analyse. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Nachkommen verschiedener T₀-Pflanzen. Die Abkömmlinge von einigen regenerierten Pflanzen

wiesen ähnliche Mengen an *salAT* mRNA auf wie nicht-transgene Pflanzen, während andere eine deutliche Reduktion zeigten. Die Daten der beiden unterschiedlichen Nachweismethoden lagen dabei in guter Übereinstimmung.

8. Die „Real Time“ RT-PCR Technik wurde zudem zur Analyse der Expressionslevel der Gene der Salutaridin-Reduktase (*salR*) und der Codeinon-Reduktase (*cor1.1*) eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden die Nachkommen der regenerierten Pflanze mit den geringsten und einer Pflanze mit vergleichsweise hohem *salAT* Transkriptgehalt getestet. Für die Abkömmlinge beider T₀-Pflanzen traten Individuen mit einem geringeren oder höheren Gehalt an *salR* und *cor1.1* im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf. Ein Einfluss des *salAT* RNAi Transgens auf diese beiden Gene konnte daher nicht festgestellt werden.
9. Die Analyse der Alkaloide im Milchsaft der *salAT* RNAi T₁-Pflanzen wurde mittels HPLC durchgeführt. Der in den Elterpflanzen aufgetretene erhöhte Anteil an Thebain konnte in der Nachfolgegeneration nicht beobachtet werden. In den Nachkommen einiger T₀-Pflanzen waren die Thebain-Gehalte sogar erniedrigt. Auch der in einer Pflanze auftretende erhöhte Gehalt an (S)-Scoulerin wurde nicht an die Abkömmlinge dieser vererbt. Alle untersuchten transgenen Pflanzen der T₁-Generation wiesen wie bereits ihre Elterpflanze Salutaridin und geringe Mengen an Salutaridinol auf. Eine direkte Korrelation zwischen den Mengen an Thebain / Codein und Salutaridin konnte gezeigt werden.
10. Die Gesamtmenge an Alkaloid im Milchsaft, die in der T₀-Generation erhöht gewesen war, war in der T₁-Generation mit den Alkaloidmengen im Wildtyp vergleichbar.
11. Die unerwartete Akkumulation des Alkaloids Salutaridin im Milchsaft der *salAT* RNAi Pflanzen könnte zum einen durch Fähigkeit des Enzyms SalR zur Katalyse der physiologischen Rückreaktion oder durch eine Interaktion der Enzyme SalR und SalAT *in vivo* erfolgt sein. Der Nachweis solch einer Interaktion müsste jedoch noch zweifelsfrei erbracht werden.
12. 5'-Sequenzen der Gene *cyp80b3* (3517 bp Länge), *cor* (2956 bp), *cpr* (2332 bp, Cytochrom-P450-Reduktase) und *salAT* (407 bp) wurden mittels „genome walking“ aus Schlafmohn isoliert, kloniert und sequenziert. Der jeweilige Transkriptionsstart der Gene wurde unter Verwendung der „RACE“-Technik („rapid amplification of cDNA ends“) bestimmt.

6 Literaturverzeichnis

- Apuya, N. und Lu, Y. (2006).** Regulatory regions from *Papaveraceae*. United States Application 20060265777.
- Allen, R.S.; Millgate, A.G.; Chitty, J.A.; Thisleton, J.; Miller, J.A.C.; Fist, A.J.; Gerlach, W.L.; Larkin, P.J. (2004).** RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nature Biotech.* **22**, 1559-1566.
- Battraw, M.J. und Hall, T.C. (1990).** Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol. Biol.* **15**, 527-538.
- Behr, H.-G. (1980).** Weltmacht Droge. Econ Verlag, Wien-Düsseldorf.
- Bird, D.A. und Facchini, P.J. (2001).** Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar sorting determinant. *Planta* **213**, 888-897.
- Bird, D.A.; Franceschi, V.R.; Facchini, P.J. (2003).** A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* **15**, 2626-2635.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513 – 1523.
- Bourque, J.E. (1995).** Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Science* **105**, 125-149.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brochmann-Hanssen, E. (1984).** A second pathway for the terminal steps in the biosynthesis of morphine. *Planta Med.* **50**, 343-345.
- Bucher P. (1990).** Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* **212**, 563-578.
- Chitty, J.A.; Allen, R.S.; Fist, A.J.; Larkin, P.J. (2003).** Genetic transformation in commercial Tasmanian cultivars of opium poppy, *Papaver somniferum*, and movement of transgenic pollen in the field. *Funct. Plant Biol.* **30**, 1045-1058.
- Chitty, J.A.; Allen, R.S.; Larkin, P.J. (2006).** Opium Poppy (*Papaver somniferum*). *Methods Mol. Biol.* **344**, 383-392.
- Choi, K.B.; Morishige, T.; Shitan, N.; Yazaki, K.; Sato, F. (2002).** Molecular cloning and characterization of coclaurine *N*-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **277**, 830-835.
- Chou, W.M. und Kutchan, T.M. (1998).** Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. *Plant J.* **15**, 289-300.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Coleman, J.; Hawkinson, M.; Miskimins, R.; Miskimins, W.K. (2001).** The major transcription initiation site of the p27Kip1 gene is conserved in human and mouse and produces a long 5'-UTR. *BMC Mol. Biol.* **2**, 12-19.
- Constabel, F.; Gaudet-LaPrairie, P.; Kurz, W.G.W.; Kutney, J.P. (1982).** Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell Reports* **1**, 139-142.
- Cordell, G.A. (1981).** Introduction to alkaloids. John Wiley and Sons, New York.
- Da Costa e Silva, O.; Klein, L.; Schmelzer, E.; Trezzini, G.F.; Hahlbrock, K. (1993).** BPF-1, a pathogen-induced DNA-binding protein involved in the plant defence response. *Plant J.* **4**, 125-135.
- Daly, J.W. (2004).** Marine toxins and nonmarine toxins: convergence or symbiotic organisms? *J. Nat. Prod.* **67**, 1211-1215.

- De-Eknamkul, W. und Zenk, M.H. (1990).** Enzymatic formation of (*R*)-reticuline from 1,2-dehydroreticuline in the opium poppy plant. *Tetrahedron Lett.* **31**, 4855-4858.
- Dejong, J.M.; Liu, Y.; Bollon, A.P.; Long, R.M.; Jennewein, S.; Williams, D.; Croteau, R.B. (2006).** Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 212-224.
- Del Campo, M.L.; Smedley, S.R.; Eisner, T. (2005).** Reproductive benefits derived from defensive plant alkaloid possession in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13508-13512.
- Diaz-De-Leon, F.; Klotz, K.L.; Lagrimini, M. (1993).** Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. *Plant Phys.* **101**, 1117-1118.
- Dittrich, H. und Kutchan, T.M. (1991).** Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9969-9973.
- Dorsett, D. (1999).** Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Corr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 505-514.
- Droux, M.; Ruffet, M.L.; Douce, R.; Job, D. (1998).** Interactions between serine acetyltransferase and *O*-acetylserine (thiol) lyase in higher plants. Structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *Eur. J. Biochem.* **255**, 235-245.
- Emami, K.H.; Jain, A.; Smale, S.T. (1997).** Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. *Genes Dev.* **11**, 3007-3019.
- Facchini, P.J. und De Luca, V. (1994).** Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *J. Biol. Chem.* **269**, 26684-26690.
- Facchini, P.J. und De Luca, V. (1995).** Expression in *Escherichia coli* and partial characterization of two tyrosine/dopa decarboxylases from opium poppy. *Phytochemistry* **38**, 1119-1126.
- Facchini, P.J. und Park, S.U. (2003).** Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* **64**, 177-186.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1984).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806 – 811.
- Fisinger, U.; Grobe, N.; Zenk, M.H. (2007).** Thebaine synthase: a new enzyme in the morphine pathway in *Papaver somniferum*. *Nat. Prod. Comm.* **2**, 249-253.
- Fist, A.J. (2001).** The Tasmanian Poppy Industry: A Case Study of the Application of Science and Technology. Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference 2001. The Australian Society of Agronomy.
- Frense, D. (2007).** Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1233-1240.
- Frick, S.; Chitty, J.A.; Kramell, R.; Schmidt, J.; Allen, R.S.; Larkin, P.J.; Kutchan, T.M. (2004).** Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with antisense berberine bridge enzyme gene (*anti-bbe*) via somatic embryogenesis results in an altered ratio of alkaloids in latex but not in roots. *Transgenic Res.* **13**, 607-613.
- Frick, S.; Kramell, R.; Schmidt, J.; Fist, A.J.; Kutchan, T.M. (2005).** Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *J. Nat. Prod.* **68**, 666-673.

- Frick, S.; Kramell, R.; Kutchan, T.M. (2007).** Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding. *Metab. Eng.* **9**, 169-176.
- Frick, S.; Kramell, R.; Schmidt, J.; Fist, A.J.; Kutchan, T.M. (2005).** Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *J. Nat. Prod.* **68**, 666-673.
- Frick, S. und Kutchan, T.M. (1999).** Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* **17**, 329-339.
- Fujii, N.; Inui, T.; Iwasa, K.; Morishige, T.; Sato, F. (2007).** Knockdown of berberine bridge enzyme by RNAi accumulates (*S*)-reticuline and activates a silent pathway in cultured California poppy cells. *Transgenic Res.* **16**, 363-375.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158.
- Gates, M. und Tschudi, G. (1952).** The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1109-1110.
- Gates, M. und Tschudi, G. (1956).** The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1380-1393.
- Geerlings, A.; Martinez-Lozano Ibanez, M.; Memelink, J.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. (2000).** Molecular cloning and analysis of strictosidine β -glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 3051-3056.
- Geerlings, A.; Redondo, F.J.; Contin, A.; Memelink, J.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. (2001).** Biotransformation of tryptamine and secologanin into plant terpenoid indole alkaloids by transgenic yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 420-424.
- Gerardy, R. und Zenk, M.H. (1993a).** Formation of salutaridine from (*R*)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **32**, 79-86.
- Gerardy, R. und Zenk, M.H. (1993b).** Purification and characterization of salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **34**, 125-132.
- Gidekel, M.; Jimenez, B.; Herrera-Estrella, L. (1996).** The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1 β contains an enhancer-like element. *Gene* **170**, 201-206.
- Gleadow, R.M. und Woodrow, I.E. (2002).** Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. *J. Chem. Ecol.* **28**, 1301-1313.
- Gleave, A.P. (1992).** A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1203 – 1207.
- Gollwitzer, J.; Lenz, R.; Hampp, N.; Zenk, M.H. (1993).** The transformation of neopinone to codeinone in morphine biosynthesis proceeds non-enzymatically. *Tetrahedron Lett.* **34**, 5703-5706.
- Grandbastien, M.A.; Berry-Lowe, S.; Shirley, B.W.; Meagher R.B. (1986).** Two soybean ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit genes share extensive homology even in distant flanking sequences. *Plant Mol. Biol.* **7**, 451-465.
- Grothe, T. (2002).** Untersuchungen zur Morphinbiosynthese im Schlafmohn: Klonierung, heterologe Expression und Charakterisierung der Salutaridinol-7-*O*-Acetyltransferase sowie Reinigung der Thebain-Synthase aus dem Milchsaft von *Papaver somniferum* L. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Grothe, T.; Lenz, R.; Kutchan, T.M. (2001).** Molecular characterization of the salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *J. Biol. Chem.* **276**, 30717-30723.

- Gulland, J.M. und Tobinson, R.J. (1923).** Morphine group I. Discussion of the constitutional formula. *Chem. Soc.* **123**, 980.
- Hahn, F.M. und Poulter, C.D. (1995).** Isolation of *Schizosaccharomyces pombe* isopentenyl diphosphate isomerase cDNA clones by complementation and synthesis of the enzyme in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 11298-11303.
- Hamilton, A.J. und Baulcombe, D.C. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- Hammond, S.M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G.J. (2000).** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D.; Jessee, J.; Bloom, F.R. (1991).** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**, 63-113.
- Hartmann, T (1999).** Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* **207**, 483-495.
- Hauschild, K.; Pauli, H.H.; Kutchan, T.M. (1998).** Isolation and analysis of a gene *bbel* encoding the berberine bridge enzyme from the California poppy *Eschscholzia californica*. *Plant Mol. Biol.* **36**, 473-478.
- He, X.-Z. und Dixon, A. (2000).** Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *Am. Soc. Plant Phys.* **12**, 1689-1702.
- Helliwell, C. und Waterhouse, P. (2003).** Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* **30**, 289-295.
- Hennig, J.; Dewey, R.E.; Cutt, J.R., Klessig, D.F. (1993).** Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a beta-1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **4**, 481-493.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993).** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026-1030.
- Hileman, L.C.; Drea, S.; de Martino, G.; Litt, A.; Irish, V.F. (2005).** Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant J.* **44**, 334-341.
- 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.
- Holtorf, S.; Apel, K.; Bohlmann, H. (1995).** Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 637-646.
- Huang, F.C. und Kutchan, T.M. (2000).** Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* **53**, 555-64.
- Huang, Q.; Roessner, C.A. ; Croteau, R. ; Scott, A.I. (2001).** Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 2237-2242
- Jin, H.; Liu, D.; Zuo, K.; Gong, Y.; Miao, Z.; Chen, Y.; Ren, W.; Sun, X.; Tang, K. (2007).** Molecular cloning and characterization of Crmdr1, a novel MDR-type ABC transporter gene from *Catharanthus roseus*. *DNA Seq.* **18**, 316-325.
- Jones, P.R.; Møller, B.L.; Høj, P.B. (1999).** The UDP-glucose:*p*-hydroxymandelonitrile-*O*-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **274**, 35483–35491.

- Jørgensen, K.; Rasmussen, A.V.; Morant, M.; Nielsen, A.H.; Bjarnholt, N.; Zagrobelny, M.; Bak, S.; Møller, B.L. (2005).** Metabolon formation and metabolic channelling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 280-291.
- Kahn, R.A.; Bak, S.; Svendsen, I.; Halkier, B.A.; Møller, B.L. (1997).** Isolation and reconstitution of cytochrome P450ox and *in vitro* reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from *Sorghum*. *Plant Phys.* **115**, 1661-1670.
- Kamo, K.K. und Mahlberg, P.G. (1988).** Morphinan alkaloids: biosynthesis in plant (*Papaver* sp.) tissue cultures. *Biotechnol. Agr. Forest.* **4**, 251-263.
- Kapoor, L.D. (1995).** Opium poppy: Botany, chemistry, and pharmacology. Haworth Press, Inc., New York.
- Kempe, K. (2003).** Herstellung von Vektoren zur „RNA interference“ für Gene der Benzylisochinolin-Biosynthese aus *Papaver somniferum* L. Diplomarbeit, Technische Universität Bergakademie Freiberg.
- Koch, B.M.; Sibbesen, O.; Halkier, B.A.; Svendsen, I.; Møller, B.L. (1995).** The primary sequence of cytochrome P450_{tyr}, the multifunctional N-hydroxylase catalyzing the conversion of L-tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glycoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 177-186.
- Koes, R.E.; Spelt, C.E.; van den Elzen, P.J.M.; Mol, J.N.M. (1989).** Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene* **81**, 245-257.
- Kutach, A.K. und Kadonaga, J.T. (2000).** The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4754-4764.
- Kutchan, T.M. (1998).** Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In: The Alkaloids - Chemistry and Biology. Cordell, G.A., Academic Press, San Diego, **50**, 267-316.
- Kutchan, T.M.; Bock, A.; Dittrich, H. (1994).** Heterologous expression of the plant proteins strictosidine synthase and berberine bridge enzyme in insect cell culture. *Phytochemistry* **35**, 353-360.
- Kutchan, T.M. und Dittrich, H. (1995).** Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **270**, 24475-24481.
- Kutchan, T.M.; Hampp, N.; Lottspeich, F.; Beyreuther, K.; Zenk, M.H. (1988).** The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **237**, 40-44.
- Kristensen, C.; Morant, M.; Olsen, C.E.; Ekstrøm, C.T.; Galbraith, D.W.; Møller, B.L.; Bak, S. (2005).** Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1779-1784.
- Kwon, H.-B.; Park, S.-C.; Peng, H.-P.; Goodman, H.M.; Dewdney, J.; Shih, M.-C. (1994).** Identification of a light-responsive region of the nuclear gene encoding the B subunit of chloroplast glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **105**, 357-367.
- Lagerstrom, M.; Parik, J.; Malmgren, H.; Stewart, J.; Pettersson, U.; Landegren, U. (1991).** Capture PCR: efficient amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and YAC DNA. *PCR Methods Appl.* **1**, 111-119.
- Larkin, P.J.; Chitty, J.A.; Brettell, R.I.S. (1999).** Methods for plant transformation and regeneration. International patent publication number WO 99/34663.
- Larkin, P.J.; Miller, J.A.C.; Allen, R.S.; Chitty, J.A.; Gerlach, W.L.; Frick, S.; Kutchan, T.M.; Fist, A.J. (2007).** Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotech. J.* **5**, 26-37.

- Lazo, G.R.; Stein, P.A.; Ludwig, R.A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotech.* **9**, 963-967.
- Le Flem-Bohomme, V.; Laurain-Mattar, D.; Fliniaux, M.A. (2004). Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402. *Planta* **218**, 890-893.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1994). Closure of the oxide bridge in morphine biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **35**, 3897-3900.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1995a). Acetyl coenzyme A:salutaridinol 7-O-acetyltransferase from *Papaver somniferum* plant cell cultures. *J. Biol. Chem.* **270**, 31091-31096.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1995b). Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *Eur. J. Biochem.* **233**, 132-139.
- Lenz, R. und Zenk, M.H. (1995c). Stereoselective reduction of codeinone, the penultimate enzymatic step during morphine biosynthesis in *Papaver somniferum*. *Tetrahedron Lett.* **36**, 2449-2452.
- Lescot, M.; Déhais, P.; Moreau, Y.; De Moor, B.; Rouzé, P.; Rombauts, S. (2002). PlantCARE: a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **30**, 325-327.
- Liscombe, D.K.; MacLeod, B.P.; Loukanina, N.; Nandi, O.I.; Facchini, P.J. (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* **66**, 2501-2520.
- Lopes Cardoso, M.I.; Meijer, A.H.; Rueb, S.; Queiroz Machado, J.; Memelink, J.; 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. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 674-681.
- Maene, L.J. und Debergh, P.C. (1987). Optimisation of the transfer of tissue cultured shoots to *in vivo* conditions. *Acta Hort.* **212**, 335-348.
- Maldonado-Mendoza, I.E.; López-Meyer, M.; Galef, J.R.; Burnett, R.J.; Nessler, C.L. (1996). Molecular analysis of a new member of the opium poppy tyrosine/3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase gene family. *Plant Physiol.* **110**, 43-49.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Martin, V.J.; Pitera, D.J.; Withers, S.T.; Newman, J.D.; Keasling, J.D. (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1796-1802.
- Maruyama, K. und Sugano, S. (1994). Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**, 171-174.
- Math, S.K.; Hearst, J.E.; Poulter, C.D. (1992). The *crtE* gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6761-6764.
- Mathé, C.; Sagot, M.-F.; Schiex, T.; Rouzé, P. (2002). Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4103-4117.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Millgate, A.G.; Pogson, B.J.; Wilson, I.W.; Kutchan, T.M.; Zenk, M.H.; Gerlach, W.L.; Fist, A.J.; Larkin, P.J. (2004). Morphine-pathway block in *top1* poppies. *Nature* **431**, 413-414.
- Minami, H.; Dubouzet, E.; Iwasa, K.; Sato, F. (2007). Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **282**, 6274-6282.
- Mitsuhara, I.; Ugaki, M.; Hirochika, H.; Ohshima, M.; Murakami, T.; Gotoh, Y.; Katayose, Y.; Nakamura, S.; Honkura, R.; Nishimiya, S.; Ueno, K.; Mochizuki, A.; Tanimoto, H.; Tsugawa, H.; Otsuki, Y.; Ohashi, Y. (1996). Efficient promoter cassettes

- for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* **37**, 49-59.
- Montiel, G.; Breton, C.; Thiersault, M.; Burlat, V.; Jay-Allemand, C.; Gantet, P. (2007).** Transcription factor agamous-like 12 from *Arabidopsis* promotes tissue-like organization and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Metab. Eng.* **9**, 125-132.
- Møller, B.L. und Conn, E.E. (1980).** The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (linn) Moench. *J. Biol. Chem.* **255**, 3049–3056.
- Morimoto, S.; Suemori, K.; Moriwaki, J.; Taura, F.; Tanaka, H.; Aso, M.; Tanaka, M.; Suemune, H.; Shimohigashi, Y.; Shoyama, Y. (2001).** Morphine metabolism in the opium poppy and its possible physiological function. *J. Biol. Chem.* **276**, 38179-38184.
- Morimoto, S.; Suemori, K.; Taura, F.; Shoyama, Y. (2003).** New dimeric morphine from opium poppy (*Papaver somniferum*) and its physiological function. *J. Nat. Prod.* **66**, 987-989.
- Morishige, T.; Tsujita, T.; Yamada, Y.; Sato, F. (2000).** Molecular characterization of the *S*-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-*O*-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **275**, 23398-23405.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Murata, J. und De Luca, V. (2005).** Localization of tabersonine 16-hydroxylase and 16-OH tabersonine-16-*O*-methyltransferase to leaf epidermal cells defines them as a major site of precursor biosynthesis in the vindoline pathway in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* **44**, 581-594.
- Nielsen, K.A. und Møller, B.L. (2005).** Cytochrome P450s in plants. In: Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, 3rd ed. Ortiz de Montellano, P.R., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 553–583.
- Niessen, W. M. A. (1999).** Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Chapter 2. In: Introduction to Mass Spectrometry, 2nd ed. Dekker, M., New York, 67-69.
- Novak, B.H.; Hudlicky, T.; Reed, J.W.; Mulzer, J.; Trauner D. (2000).** Morphine synthesis and biosynthesis – an update. *Curr. Org. Chem.* **4**, 343-362.
- Odell, J.T.; Nagy, F.; Chua, N.-H. (1985).** Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.
- Ohler, U.; Liao, G.C.; Niemann, H.; Rubin, G.M. (2002).** Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0087.
- O'Shea-Greenfield, A. und Smale, S.T. (1992).** Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* **267**, 6450.
- Ounaroon, A.; Decker, G.; Schmidt, J.; Lottspeich, F.; Kutchan T.M. (2003).** (*R,S*)-Reticuline 7-*O*-methyltransferase and (*R,S*)-norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase of *Papaver somniferum* - cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant J.* **36**, 808-819.
- Ouwerkerk, P.B.F.; Trimborn, T.O.; Hilliou, F.; Memelink, J. (1999).** Nuclear factors GT-1 and 3AF1 interact with multiple sequences within the promoter of the *Tdc* gene from Madagascar periwinkle: GT-1 is involved in UV light-induced expression. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 610-622.
- Park, S.U. und Facchini, P.J. (2000a).** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* cham., root cultures. *J. Exp. Bot.* **51**, 1005-1016.

- Park, S.U. und Facchini, P.J. (2000b).** *Agrobacterium*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum*, via shoot organogenesis. *J. Plant Physiol.* **157**, 207-214.
- Park, S.-U.; Johnson, A.G.; Penzes-Yost, C.; Facchini, P.J. (1999).** Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberine bridge enzyme genes involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Mol. Biol.* **40**, 121-131.
- Park, S.-U.; Yu, M.; Facchini, P.J. (2002).** Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Phys.* **128**, 696-706.
- Park, S.-U.; Yu, M.; Facchini, P.J. (2003).** Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* **51**, 153-164.
- Pasquali, G.; Erven, A.S.W.; Ouwerkerk, P.B.F.; Menke, F.L.H.; Memelink, J. (1999).** The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol. Biol.* **39**, 1299-1310.
- Pastuglia, M.; Roby, D.; Dumas, C.; Cock, J.M. (1997).** Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* **9**, 1-13.
- Patikoglou, G.A.; Kim, J.L.; Sun, L.; Yang, S.H.; Kodadek, T.; Burley, S.K. (1999).** TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev.* **13**, 3217-3230.
- Pauli, H.H. und Kutchan, T.M. (1998).** Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (*S*)-*N*-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J.* **13**, 793-801.
- Pfaffl, M.W. (2004).** Quantification strategies in real-time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR. Bustin S.A., International University Line, La Jolla, 87-120.
- Plasterk, R.H.A. (2002).** RNA Silencing: The Genome's Immune System. *Science* **296**, 1263-1265.
- Raith, K.; Neubert, R.; Poeknapo, C.; Boettcher, C.; Zenk, M.H.; Schmidt, J. (2003).** Electrospray tandem mass spectrometric investigations of morphinans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 1262-1269.
- Rasmussen, S. und Dixon, R.A. (1999).** Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **11**, 1537-1551.
- 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**, 396-399.
- Rice, K.C. (1980).** Synthetic opium alkaloids and derivatives. A short total synthesis of (\pm)-dihydrothebainone, (\pm)-dihydrocodeinone, and (\pm)-nordihydrocodeinone as an approach to a practical synthesis of morphine, codeine, and congeners. *J. Org. Chem.* **45**, 3135-3137.
- Roberts, M.F.; McCarthy, D.; Kutchan, T.M.; Coscia, C.J. (1983).** Localization of enzymes and alkaloidal metabolites in *Papaver* Latex. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 599-609.
- Rombauts, S.; Florquin, K.; Lescot, M.; Marchal, K.; Rouzé, P; van de Peer, Y. (2003).** Computational approaches to identify promoters and *cis*-regulatory elements in plant genomes. *Plant Phys.* **132**, 1162-1176.
- Rosco, A.; Pauli, H.H.; Priesner, W.; Kutchan, T.M. (1997).** Cloning and heterologous expression of NADPH-cytochrome P450 reductases from the Papaveraceae. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**, 369-377.

- Rounsley, S.D.; Ditta, G.S.; Yanofsky, M.F. (1995). Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **7**, 1259-1269.
- Roy, A.L.; Malik, S.; Meisterernst, M.; Roeder, R.G. (1993). An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature* **365**, 355-359.
- Rüffer, M. und Zenk, M.H. (1983). Partial purification and properties of S-adenosylmethionine: (R,S)-norlaudanoline 6-O-methyltransferase from *Argemone platyceras* cell cultures. *Planta Med.* **49**, 131-137.
- Rüffer, M. und Zenk, M.H. (1987). Distant precursors of benzylisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Z. Naturforsch.* **42c**, 319-332.
- Rushton, P.J.; Torres, J.T.; Parniske, M.; Wernert, P.; Hahlbrock, K.; Somssich, I.E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* **15**, 5690-5700.
- Sabarna, K. (2006). Approaches to isolating a cDNA encoding thebaine synthase of morphine biosynthesis from opium poppy *Papaver somniferum* L. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Sakamoto, Y.; Lockey, R.F.; Krzanowski, J.J. (1987). Shellfish and fish poisoning related to the toxic dinoflagellates. *South. Med. J.* **80**, 866-872.
- Samanani, N.; Liscombe, D.K.; Facchini, P.J. (2004). Molecular cloning and characterization of norcochlorogenic synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J.* **40**, 302-313.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Saslowsky, D. und Winkel-Shirley, B. (2001). Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* **27**, 37-48.
- Sato, F.; Hashimoto, T.; Hachiya, A.; Tamura, K.-I.; Choi, K.-B.; Morishige, T.; Fujimoto, H.; Yamada, Y. (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 367-372.
- Schaefer, B.C. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem.* **227**, 255-273.
- 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 Rep.* **2**, 88-91.
- Seto, E.; Shi, Y.; Shenk, T. (1991). YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription *in vitro*. *Nature* **354**, 241-245.
- Shitan, N.; Bazin, I.; Dan, K.; Obata, K.; Kigawa, K.; Ueda, K.; Sato, F.; Forestier, C.; Yazaki, K. (2003). Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Plant Nat. Acad. Soc. USA* **100**, 751-756.
- Siebert, P.D.; Chenchik, A.; Kellogg, D.E.; Lukyanov, K.A.; Lukyanov, S.A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1087-1088.
- Smale, S.T. und Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 449-479.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stadler, R.; Kuchan, T.M.; Löffler, S.; Nagakura, N.; Cassels, B.K.; Zenk, M.H. (1987). Revisions of the early steps of reticuline biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **28**, 1251-1254.

- Steffens, P.; Nagakura, N.; Zenk, M.H. (1985).** Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry* **24**, 2577-2583.
- Stermitz, F.R. und Rapoport, H. (1961).** The biosynthesis of opium alkaloids. Alkaloid interconversions in *Papaver somniferum* und *P. orientale*. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4045-4050.
- Sunilkumar, G.; Mohr, L.; Lopata-Finch, E.; Emani, C.; Rathore, K.S. (2002).** Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol. Biol.* **50**, 463-474.
- Tabata, H. (2006).** Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Curr. Drug Targets* **7**, 453-461.
- Takaiwa, F.; Oono, K.; Wing, D.; Kato, A (1991).** Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice. *Plant Mol. Biol.* **17**, 875-885.
- Takeshita, N.; Fujiwara, H.; Mimura, H.; Fitchen, J.H.; Yamada, Y.; Sato, F. (1995).** Molecular cloning and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-*O*-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol.* **36**, 29-36.
- Terasaka, K.; Shitan, N.; Sato, F.; Maniwa, F.; Ueda, K.; Yazaki, K. (2003).** Application of vanadate-induced nucleotide trapping to plant cells for detection of ABC proteins. *Plant Cell Physiol.* **44**, 198-200.
- 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.
- Van der Fits, L.; Zhang, H.; Menke, F.L.H.; Deneka, M.; Memelink, J. (2000).** A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a JA-independent signal transduction pathway. *Plant Mol. Biol.* **44**, 675-685.
- Voet, D. und Voet, J.G. (2002).** Biochemie. Wiley-VCH, Weinheim.
- Voinnet, O. (2002).** RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 444-451.
- Volloch, V.; Schweitzer, B.; Rits, S. (1994).** Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2507-2511.
- Wani, M.C.; Taylor, H.L.; Wall, M.E.; Loggion, P.; McPhail, A.T. (1971).** Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2327.
- Weid, M.; Ziegler, J.; 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. USA* **101**, 13957-13962.
- Wesley, S.V.; Helliwell, C.A.; Smith, N.A.; Wang, M.B.; Rouse, D.T.; Liu, Q.; Gooding, P.S.; Singh, S.P.; Abbott, D.; Stoutjesdijk, P.A.; Robinson, S.P.; Gleave, A.P.; Green, A.G.; Waterhouse, P.M. (2001).** Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**, 581 – 590.
- Wildung, M.R. und Croteau, R. (1996).** A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 9201-9204.
- Williamson, J.D.; Hirsch-Wyncott, M.E.; Larkins, B.A.; Gelvin, S.B. (1989).** Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **90**, 1570-1576.
- Wilmink, A.; van de Ven, B.C.E.; Dons, J.J.M. (1995).** Activity of constitutive promoters in various species from the Liliaceae. *Plant Mol. Biol.* **28**, 949-955.

- Winkler, A.; Hartner, F.; Kutchan, T.M.; Glieder, A.; 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**, 21276-21285.
- Winkler, A.; Kutchan, T.M.; Macheroux, P. (2007).** 6-S-cysteinylation of bi-covalently attached FAD in berberine bridge enzyme tunes the redox potential for optimal activity. *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki K. (1993).** *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. *Plant Physiol.* **101**, 1119-1120.
- Wong, J.M. und Bateman, E. (1994).** TBP-DNA interactions in the minor groove discriminate between A:T and T:A base pairs. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1890-1896.
- Yang, C.; Bolotin, E.; Jiang, T.; Sladek, F.M.; Martinez, E. (2007).** Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* **389**, 52-65.
- Yazaki, K.; Shitan, N.; Takamatsu, H.; Ueda, K.; Sato, F. (2001).** A novel *Coptis japonica* multidrug-resistant protein preferentially expressed in the alkaloid-accumulating rhizome. *J. Exp. Bot.* **52**, 877-879.
- Zamore, P.D.; Tuschl, T.; Sharp, P.A.; Bartel, D.P. (2000).** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zhao, X. und Herr, W. (2002).** A regulated two-step mechanism of TBP binding to DNA: a solvent-exposed surface of TBP inhibits TATA box recognition. *Cell* **108**, 615-627.
- Ziegler, J., Diaz-Chavez, M.L.; Kramell, R.; Ammer, C.; 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**, 458-471.
- Ziegler, J.; Voigtländer, S.; Schmidt, J.; Kramell, R.; Miersch, O.; Ammer, C.; Gesell, A.; 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**, 177-192.
- Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F. (2004).** Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* **32**, 103.

7 Anhang

Anhang A

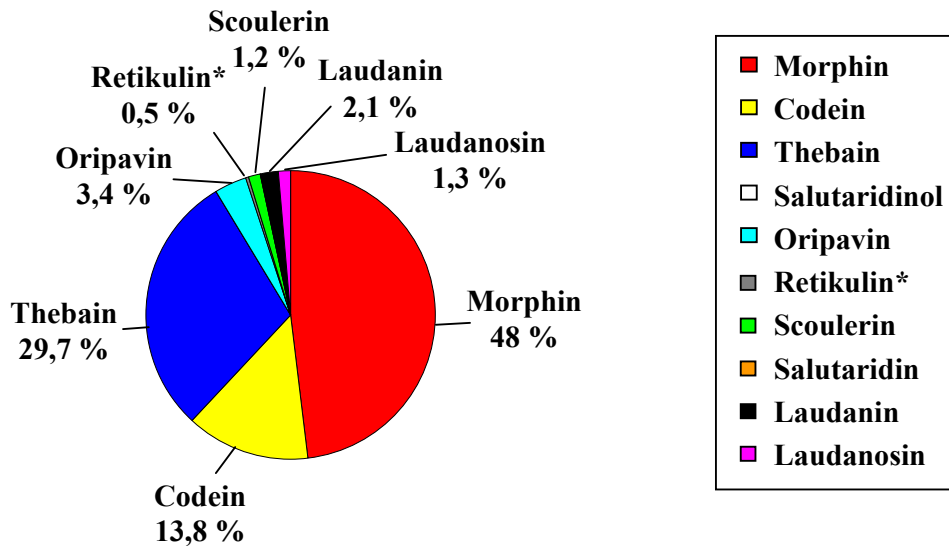
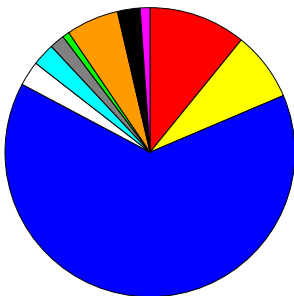
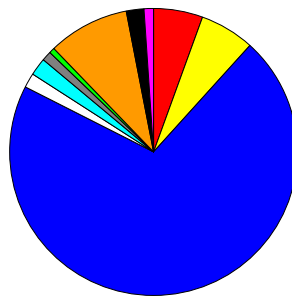
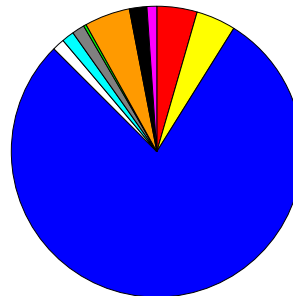
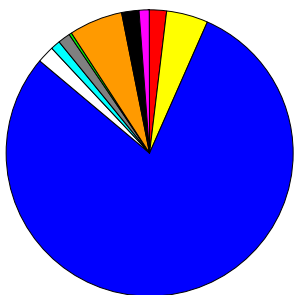
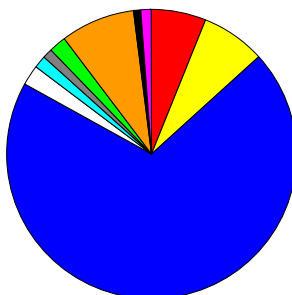
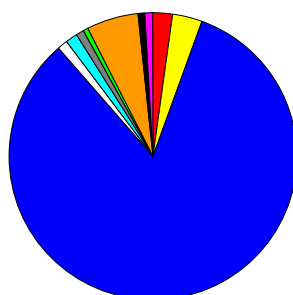
Wildtyp34b1934b2234b2334b2634b3134b35

Abb. A-1 Darstellung der Latex-Alkaloide des Wildtypen und von allen 6 *salAT* RNAi T₀-Pflanzen der Zelllinie 34b.

Die Prozentwerte für die Zelllinie 34b sind in **Tab. A-1** festgehalten. *Zur Vereinfachung wurden die Alkaloide (*R,S*)-Retikulin und 1,2-Dehydroretikulin als Retikulin zusammen gefasst.

Anhang

Alkaloid [%]	34b19	34b22	34b23	34b26	34b31	34b35
Morphin	11,0	5,6	4,4	1,9	6,1	2,1
Codein	7,7	5,9	4,5	4,6	7,2	3,3
Thebain	64,0	71,0	78,5	79,5	69,9	83,1
Salutaridinol	2,9	1,6	1,5	1,9	2,1	1,3
Oripavin	2,6	1,9	1,5	1,1	1,4	1,3
Retikulin*	1,6	1,3	1,3	1,4	1,2	1,0
(S)-Scoulerin	0,7	0,4	0,3	0,3	1,9	0,5
Salutardin	5,9	9,2	4,9	6,0	8,4	5,7
Laudanin	2,4	2,0	2,1	2,1	0,9	0,9
Laudanosin	1,2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,9

Tab. A-1 Prozentuale Aufspaltung der Alkaloide des Milchsaftes aller 6 *salAT* RNAi T₀-Pflanzen der Zelllinie 34b.

*Zur Vereinfachung wurden die Alkaloide (*R,S*)-Retikulin und 1,2-Dehydroretikulin als Retikulin zusammen gefasst.

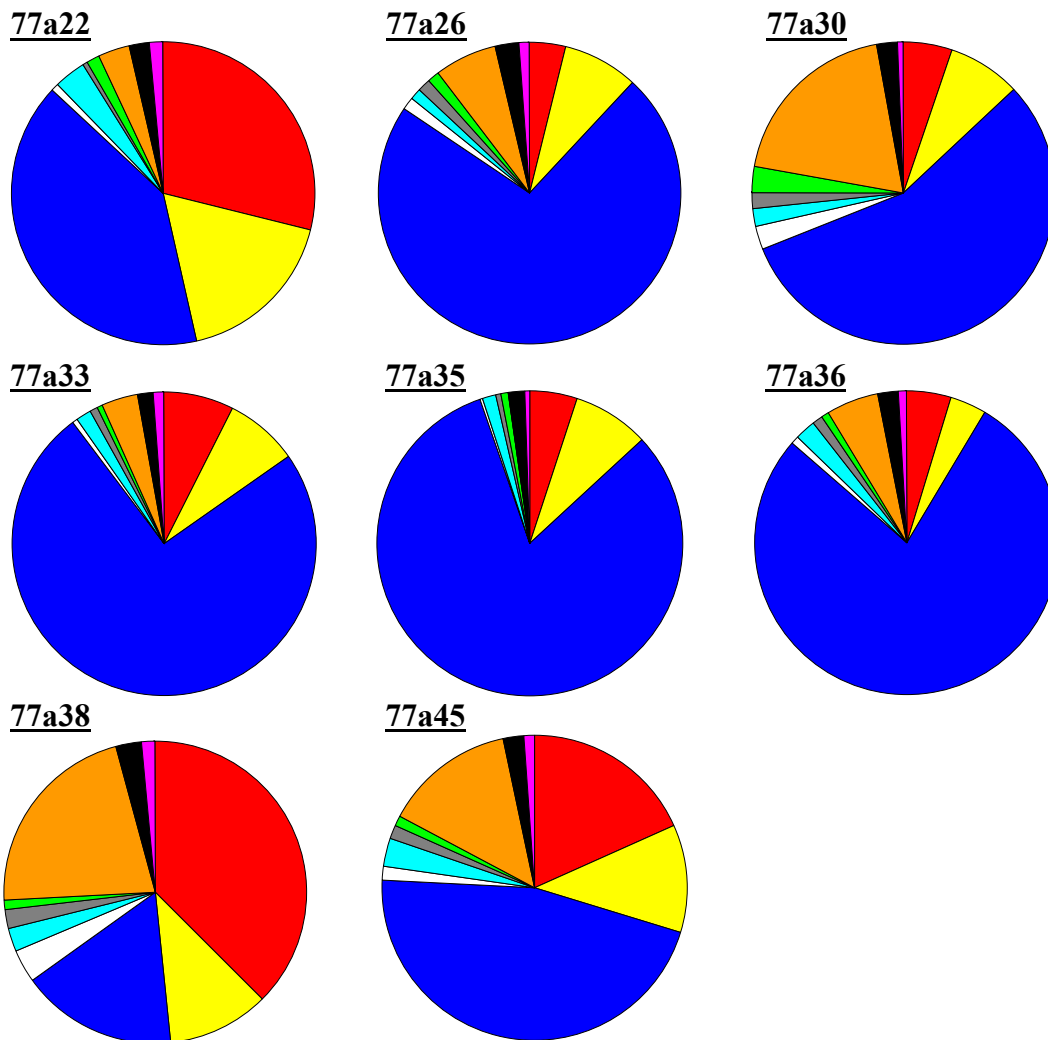
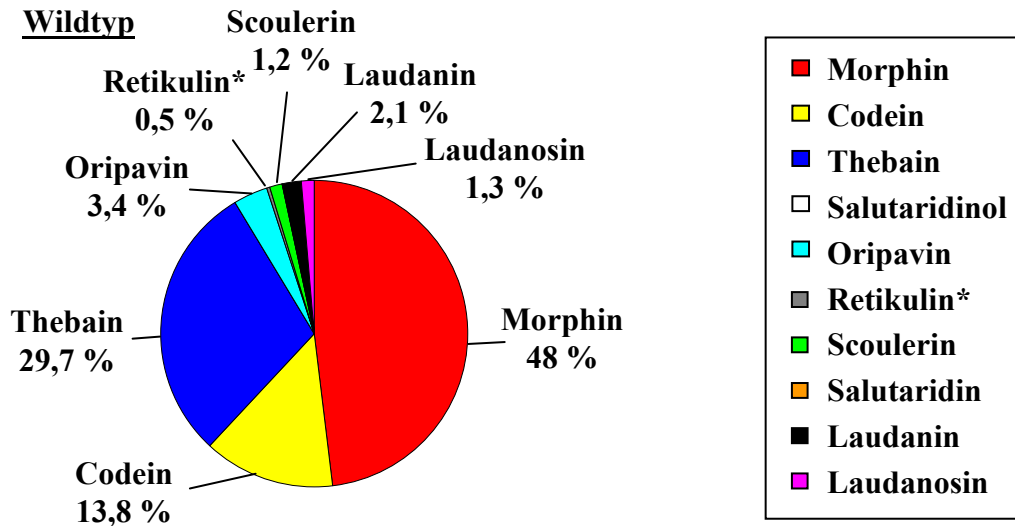


Abb. A-2 Darstellung der Latex-Alkaloide des Wildtypen und von allen 8 *salAT* RNAi T₀-Pflanzen der Zelllinie 77a.

Die Prozentwerte für die Zelllinie 77a sind in **Tab. A-2** festgehalten. *Zur Vereinfachung wurden die Alkaloide (*R,S*)-Retikulin und 1,2-Dehydroretikulin als Retikulin zusammen gefasst.

Anhang

Alkaloid [%]	77a22	77a26	77a30	77a33	77a35	77a36	77a38	77a45
Morphin	28,9	4,0	5,3	7,5	5,1	4,7	37,5	18,3
Codein	17,5	8,0	7,7	7,8	7,9	3,9	10,8	11,4
Thebain	40,6	72,4	55,9	74,4	81,9	77,8	16,7	45,9
Salutaridinol	0,7	1,4	2,5	0,7	0,1	0,8	3,4	1,6
Oripavin	3,4	1,2	1,8	1,7	1,4	2,3	2,7	3,1
Retikulin*	0,7	1,3	1,7	0,6	0,6	0,9	1,9	1,3
(S)-Scoulerin	1,3	1,6	2,8	0,7	0,7	1,0	1,1	1,1
Salutardin	3,3	6,7	19,5	3,9	0,0	5,5	21,7	13,8
Laudanin	2,3	2,5	2,2	1,8	1,7	2,1	2,8	2,4
Laudanosin	1,4	1,0	0,6	1,0	0,6	0,9	1,4	1,0

Tab. A-2 Prozentuale Aufspaltung der Alkaloide des Milchsaftes aller 8 *salAT* RNAi T₀-Pflanzen der Zelllinie 77a.

*Zur Vereinfachung wurden die Alkaloide (*R,S*)-Retikulin und 1,2-Dehydroretikulin als Retikulin zusammen gefasst.

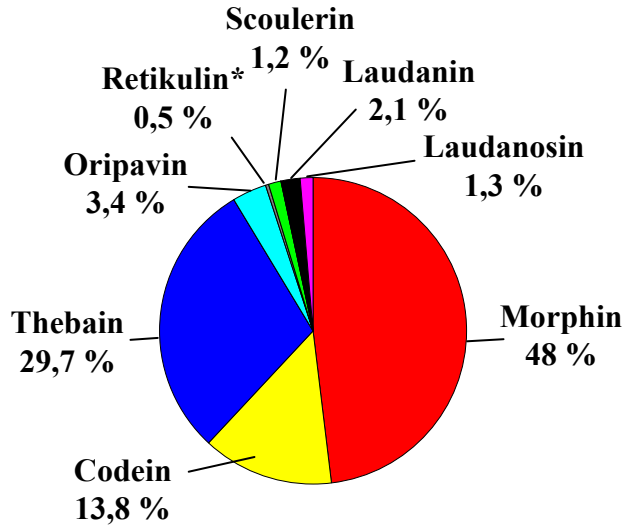
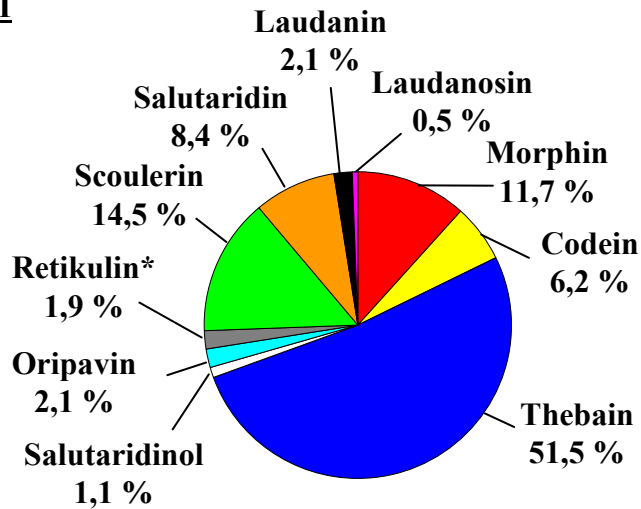
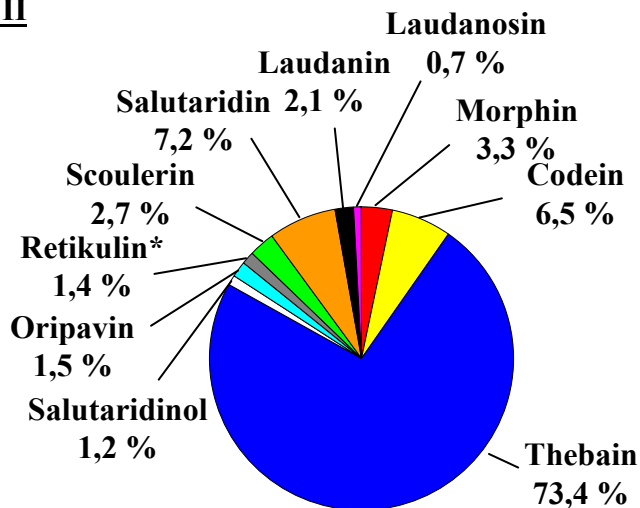
Wildtyp**99a15 I****99a15 II**

Abb. A-3 Darstellung der Latex-Alkaloide des Wildtypen und der beiden *salAT* RNAi T₀-Pflanzen der Zelllinie 99a.

*Zur Vereinfachung wurden die Alkaloide (*R,S*)-Retikulin und 1,2-Dehydroretikulin als Retikulin zusammen gefasst.

Anhang B**Abb. B-1**
Putativer Promotor von *cyp80b3* (Länge: 3517 bp)

-3512 AAATTTGTACCT
-3500 ATTACGTCTCTTCTTTCTGGTATAACCAGGCAGTGGCTATCTTAGTCATGC
-3450 GATTAACCTTGTACCTCCGCTGTAAGTTCTTTACTGTGGATTTGAAACGAA
-3400 TTAAAACTACTTTATGTCTATCCGTTCTTCCATGCTTAAATTATATTCT
-3350 CCTCGGACTCAATTGAGCTGCTCATCAACATGTTTATTATTTGACAATGC
-3300 AAACCGATTCAAACCTAGTATTCTCCACTACCACTTGTAGCATGACTCATT
-3250 TTCTGGATGTATCGATCTCTGAATGTTTATTATTCATGAGAAGTGCA
-3200 TTGTGTCTTCTTTTCTCTTTTGGCTATTAATATTCTAAATCATATTTGGC
-3150 CGTTAGATAAACCTGATCCAAAGGATTTGCAATACTTCTGGAGTTCCAA
-3100 GTTCCAAGGCAGTGGGCACCTATGTTTAATGAGCTGCCTCTTGGGCACCA
-3050 AAGGAGGGCCTCTTGTCTTCTTTGCAGTTCAGTTTCATGGGATCAAAGC
-3000 TTCATGTCAACTCTACGCAGGTACACTCTATTTATTCTTGGATATATCTT
-2950 ATTTTTACCAAATACTCTTGGTTGTGCTGTACTACTGTCTAAAACAATC
-2900 CTGGTTGTTTAGTTGTGTTTTACTTAAGCGAGGTCTTATGAAGAGTTCCA
-2850 AACAGAGTTTAGGCTCGAATAGAAGATCCAAAAACAATAGATTAGAAAAG
-2800 GTGAACTAGGATATAGTAGTTTTTGGGTATATCATTTCGTTTTTTCATAG
-2750 AACACTGAGAGATTGGTAGAAGACTGTCTCAACGCGACCTTAACATGCTT
-2700 GTATAACCTGGCTCAGAGCTTGCTTTATATTAACCTGCTTGTGAGTTTC
-2650 AAACCTTAGTCCTGTGTGCTTTCACGGCACCTGAAACCTATAATAATTGT
-2600 TCTGAAACAAAATAATGTTAATACTTGTACAAATACTGAGGCTAACATTA
-2550 AGTAAATTTGTTATGTTTTGAGCATATTATTTAACAAGGGGTTAGCAGAG
-2500 ATAGATTGGAGAAAATAGGCTTGATCATATGGGTAAGAGTTAGGTTGATT
-2450 CATCTTAACCTGTCTACATTATCTCCTAGCCAATGCATATAAGAAAAAAG
-2400 GATCAAATCGTAATTGATTTACTCCATATTTCAAATAATGGTTAAACCGA
-2350 CAGAACATAAGGTTTTTATAAAGGTGGTTTGCCCTTCTAAATCCTGCTCCC
-2300 ATAGATAAAGCTTTAAGTACAAATACCGTTTTGTTAATAAAAATATAGTAA
-2250 TAATTTGTTTTTTTTGCTAAACTGATGCTTTTAGCATGCTTCAGAAGGCAG
-2200 GCTATTCTAAAATGATTTTAGCATGCTTCTTAAAGCAGGCTGTTAATATT
-2150 TGAAGCTTCTTAAAGCATTGATGCCATCATAATAAAAGAGGGAGGTCCCA
-2100 TTGACATTGTTAAATTTATACTATCGACATTTTTTTATGCTGAAGTTTTTT
-2050 TAATATTCAAGTGAAAATAGTCGGAAGCTTACTGTTTCATATTTAACAATC

Anhang

-2000 TTCTTGATGTGGTACACTCTCGCAAAAAATTAGCGCATTTTCATGACTTGT
-1950 ACCCTAACTTTTTACCAGTTTGAACTCAACTGTTTGTAGCAACAATTG
-1900 AAATCAAACCAGTAAATGATGGATACATACTACGAAATGCACTAATTTT
-1850 TGGTGGGAGTGGAGTGCATAATGAGAAGAGCATCATACTAAAGAATTAG
-1800 ATTATAACTAGTTTTTTATTTGAACCGCATAAAAAAACTAGGGTTCGAATGT
-1750 GTAAGATAGTGTCAATTTAACAATGTCAACGGAACCTCTTTCATATGTAA
-1700 AGTATCATCACATGATAAGCAAAACATATATATGACTTCCGGAGCCTCAG
-1650 TAGGATCAATGTAGTTATTACCAATTTCAATTACATTACCTGGTAGGATC
-1600 ACAATCATTAAATATTTTAGGTTAAGAGCAGAATTTGTCGTGTATGACTTG
-1550 TATTAATAAATTTTTGGCGTCAATTCTAGGTCTCAAGTGGCAGGACTCCT
-1500 GTGGTAGGTCTTCGTCTTTACCTAGAAGGGAAGGCATGCAACCGCTTGGC
-1450 CATACATGTACAGCACCTCTCGAACCTTCCAAGGTTACTTGAATCTTCAT
-1400 GGGCTGACCCCACTACGCTGAAACAATGTCAATGGCGAGGGTCTGATGAA
-1350 TCCAGTGTCCCATACTTAGAACCCATAAAATGGAAAAGATACTCCAACAT
-1300 TTGCACATCAGTCGTAAAACATGATCCAGGTTGGTTGCATGGAGAATCAC
-1250 CAGGTGTATTCATTGTCACTGGAGCTCAACTCATGACCAAGGGGAAATGG
-1200 CCAAACACATTCTTCACCTTCGTTTACTCTACACACATATTCCTGGTTT
-1150 CAGCATCCAGAAAACAGAATGGGCAGTTGCACCAGCATCTTCACAAAAT
-1100 CAAGTTTCCTCGCCAATTTAGCACAACCTTTCACGACTTCAGGTCCTTCA
-1050 AAGGCAGTCTCTGTGGTAGCTATAAATTCGGAGTGTATTCTGATGGCCC
-1000 TCCAAGACCAGTTCCTCTCAAAGCTTCTTAAATATGTTGAGACGTCAG
-950 AAATAGTCCGGGGGCCACACGATATTCCCGGACACTGGATGGTAATTGCT
-900 GCTAAGCTAGTTACAGAAGGTGGCAAGATTGGTTTACTTGTAAAATTTGC
-850 ATTGCTTGATTATTCAGTCCCACGAGTGAGTAGAAGAAAGTTTGATCCA
-800 CATGGATCTCACCTAAATCTCCCCATCTATCCTCCTGAAGAGAAGTTTG
Box I
-750 TTTCAAACTCCGTTTCGAAGAATACCCCATGCTAATGTAATGTAAGTATT
EIRE
-700 ATAATGGATCCGTAGTTATTGAAGTTTTTCGACCAACTCTACTTTGTCGC
TCT **TC-rich repeat**
-650 TGGGGATAGTTACTATAAAGCTTTAGAAGTAAGAAACCGTGTACAGAAAT
GA **TCA** **Pyr-rich stretch**
-600 CTCAAGGCCTCCCCCTCTTCCTTTTTCTTTTTTTTCTTTCTCTCATTAA
ATCT **ARE**
-550 AATTTAATCTGTATGTAAATTGAGAAGTTATAGAGTTTGGTTGGTGGTTT
Box I **GAG**
-500 CAAATAAATGTATTTTCATTTAAGCTTATTATGATTATATCATCTCTGAGT
MBS **Skn-1**
-450 ATCAATTCACCTTGACTCTTAACTGTGAAATCAGAACATGACATATGGGT

Anhang

-400 GCCTTGAAAGGTTATTCATATCCTGGGACTTCTTGTACATGTAAGTTGAA
-350 AACATCAACTTCATTCAAAGAAATTATTAGAAAAACCTTCCAACAGTCT
ATCT
-300 ATCTGGATTAGATTCCATGTTGAATCAACCACTATTTTGTACACCTACAG
-250 GCAGGCTACTGTTCCATATGTTAGCATGTGGATATGCACAATTTGACAAG
ARE HSE
-200 TTTTGTCTGTTAAACCAAAAATTATTCAAAAAAGTTCTCCCACGCACCCC
CAAT
-150 CTTAAAAAATGCCCACATGCATCTCGTGTGTAGCACTTGACAATCCACG
-100 AGTGCCATCCAAATTGAATTTCCCTACAAGATTCTGGACATACTTGCTCT
TATA Pc-CMA2a
-50 ATGAACTTAACTTCTTTATATAAA CAACCAAAGAAAAATACATTGAGAG
+1 AAAAT

Abb. B-1 Isolierte 5'-Sequenz des Gens *cyp80b3* aus *P. somniferum*. Die über PlantCARE ermittelten putativen *cis*-regulierenden Elemente sind hervorgehoben und in **Tab. B-1** erläutert.

Abb. B-2

Putativer Promotor von *cor* (Länge: 2956 bp)

-2932 CCTACGAAGGTACCCGTATCGATGGAACAAGA
CATT

-2900 ACAACAAGCCGAGGAAGCGAATGCCACGCCTAGAGTCGATGTAGCGGAGG
ELI-Box3

-2850 TTACAAAGAAAAGGGGTAGGCCTGGAGTAGAGTGAAATTCCCGATAAATT
ARE **GAG CGTCA Skn-1**

-2800 GGTTCCTAACCTCCTTAGAGGCCCTTCTCATCTCCGTCATAAAATGTTCC
CCAAT

-2750 ATTACCACGCTGCCCCAATAATATTTATAGACGTCTTCCAACGGATCCAA

-2700 GTATTGAAGGTAGTTTGCACCTAACCTGTTGCCACTAGTGTCCGTACCCT

-2650 AGTGTCCAAGATGAATAATAGGTATGCAGCGGCTGTATAACGAATCTGTG
Box I

-2600 TGGGGTCCCATCCATCCTTCAAACCTTCTTTCCCTTCGTGTTTTCAAAGGTC
ARE

-2550 TTCTTAAGTAGTGTGACGCTTGATGGTTTTTGTCTACTAACCTTAGATAC

-2500 ATAGAAGCTGTCCATAGAAGTTTTGTAGTACCAACCGTAGATGTTTTCTC
GA **Box III**

-2450 GAACATTCATTATTGAAATTGAAAGGAAATTATAGATAAAGTGAAAATTA
Skn-1

-2400 TAAAGTCTGCAAAGGTGGTGAATATTGTGAAAGGTATGACAAAACCGGAT
as-2 **P-Box**

-2350 AATGGTGTATATAGCATAATGGTGTATATAGCAAAGGCCAATTTGGAAT
G-Box

-2300 TGTGCTCAATACACAAGGCCAATTTATTCTTGGCATAATGGTGTATATA
P-Box **Skn-1**

-2250 **GCAAAGGC**AAAAACATACTTTTATGAAAAATGGTTAGAAGCATGATGGG
RY

-2200 TCAATGCATGTATGTGAATGTATGTTCTTTCTACAATTGTGTAATTTAAAT
Box I **GA**

-2150 AGATTTCCGAGTAAAGCAGTTTCAAAGATACACTTTGGACTTGAAAAGAT

-2100 GAAAACCTAGTTTAAATTAAATCACCTTTAAGTTATGGTTGTTTCAGTTGG

-2050 ATGTGAAACCTTACATTCCCAAGTATGAAATAACGTTGGTACTTGGAAT
Box-W1

-2000 AACGTTGACCCGGGTTGACTTAGTTATTTCTTGACTTCCGGTTAATAAAT

-1950 ATTTAATAAATCAAATAAAATCTATTTAAGAAACGAGTTTATCATAATAC
GT-1

-1900 CCTTTACTTTAATAATATTTACATAATAGCCTTTTACTGTGCATACACTC

-1850 TTGAATACTTCTCTTGTACTTGTGTCGCCCAACATCATAACAGCCACCCC

Anhang

3-AF1

-1800 TACTAAACAGGGCAAGACAAAATACCACCATCTATGATTTGGAAAAATAT

-1750 CTCATTTAATTTAAAATTCTCCCATGTCCAACCAACCATTTTCCTAATCA
TC-rich repeat

-1700 ACCCACTTCCAACACCTGGGATGAAGAAATTAGTTCTCATTGTGAAGCA
P-Box

-1650 AAAACTTCCATTGAAGCAACAAATCCCTTGCTTTCCAATTTTTTTTTTTT

-1600 TTTTTAAATTAATTTGTGAAAAGCGTTAGTGGTAGTGGTGATGCCGGAA

-1550 GAGGTGGAGTTTTGGTAGTGCTGGTGGATCGATATCGGATGATAACAATA
TCA

-1500 ACGAAGAGGAATCACTACCGTCGGCTGATCCATCTTTTGATTTTGTCTAT

-1450 GGGTTTATTCAATTTTTGCCCAAATTA AAAATTAGGGTTCCAATTTAAGT

-1400 TTACTGCGAATTACTTTCATATTGATTGGGAGACTGTTCTTTGTACTATA
Py-rich stretch

-1350 TACTTCAATTTCTTCTCAAATGATCCTGAATCATAAATTTCTTCTAAAGC
Box 4 Py-rich stretch

-1300 TTATCATTCACATCGTTACTTGCAGTATTAATAAAAAGCCCCCTTTCTTCT
TC-rich repeat TCA

-1250 TCATTTCTTGAACACCCACAGCAACCATACAACTTAAGATAAATCTCTT

-1200 AATACTACTACTTCTATAATATTATTATTATTATTTGAAGATGGAGATCC

-1150 ATTAACATCGGGTGATGAAGATCTAGAATATAAACTAATATTTTAATTTA
Py-rich stretch

-1100 CAGCTGTTAATCTAACCATTACTACTTCTTCTCTTTGAGTATGCTTAATG
Box 4 CCAAT

-1050 TTCCTGATATTCGAATTAATTTTATGTTTAGTGGGTTCATCAACGGAGTT

-1000 GCAGAGTGGTGGAGGCGGAAGAAGATGGGTTTCATCAACGAGGTTACCTGC
circadian

-950 AGAGTAGTGGTGTCTGCTGGTGGATATCTTGAATCAGGGATATATTTGTAAA
Box 4

-900 CTCAAAAATTA AAATTAATTA AAATCTGGTCAGTAACAATGATGATCAA

-850 CGTTAATTTCAAGTACCATCCACTGAATTGGAAAAATGTCAGACCAACA
Box 4 TC-rich repeat GT1

-800 TTAATGTTGGACAAAATGTGAGTACTAAACACCAATTAACCCAAAATAAT

-750 AACAAATCTGATCCTGAGGTGTACATATGTGTACCCAAATTATAACTAA
GT-1

-700 TTTCTACAATCAAGAAACTCATTTAAAAATCATGGAGTTAAAAAGGAACA

-650 CTTTTGATATTACTGTAGGTTTTGCTTATCTAGTTTAGATAAGTATTTAAA
Box 4 TCT

-600 CTCATGATTAATTTTTCCAATCTTACTAATTATTTTTTCTTAAAATTTAC
MBSII GT-1

-550 ATATGATTTGATTTTAAATTAACTTTTTCCCCCTGTTTAGGAATGATTA

Anhang

Box 4

-500 TAGTAATTTAGATACTAACTAATTATCCAAATCCATTAATACCAGTTCTTT
MBS

-450 AAAAGTGAAGAGTTGGTACTTAAACACAACTGTTTGTTTCCAAGCAGATTTT

GT1

-400 TATCATCTAGCTTTGAATATATTCCTCAGAATGGCACTTTAACCTTATGAA

-350 CATTAGGGTGTGGCAACTAACAGTCACGAGAGTCTTCATCAAAGAACTGC

-300 TACACTCTTTTTTCCTTTTCAACTAACGAAACAAACAACCACTTTGATTAC

-250 AAATTAGTGGCAGTAGTGAATTAGTTGAAATAGCGTAGTACTCTAACAG

-200 TGGATGTGATTTTAGTGGAGAGAAATCAAATAATTGCTGCTTTTTTTTCT

CAAT **HSE**

-150 CCACTAAAATCACACACACTTTAGACAAAGTTCAATAGTATAAAATTTCG
GT-1

-100 CTTAAAGGTAGTAAAGCTCCCCATTTTTTAACTTAGCTTTTATCAACTTT

TATA **Inr**

-50 AGGTGTATCCAACTATATATAGAGAGAGATAGAGACGACGATCAGCAGTT

+1 AGTCTCCGAGAAATAGAAAGAAAA

Abb. B-2 Isolierte 5'-Sequenz des Gens *cor* aus *P. somniferum*.

Die über PlantCARE ermittelten putativen *cis*-regulierenden Elemente sind hervorgehoben und in **Tab. B-1** erläutert. Die kursive, fett gedruckte Sequenz entspricht einer Wiederholungssequenz mit einer Länge von 26 bp.

Abb. B-3 Isolierte 5'-Sequenz des Gens *cpr* aus *P. somniferum*. (folgende Seiten)

Die über PlantCARE ermittelten putativen *cis*-regulierenden Elemente sind hervorgehoben und in **Tab. B-1** erläutert. * Innerhalb dieser kursiv und fett gedruckten Sequenz wurden putative Bindungsstellen für 5 verschiedene Transkriptionsfaktoren gefunden. Diese sind Skn-1, GA, TCA, TC-rich repeat und Py-rich stretch.

Anhang

Putativer Promotor von *cpr*

Länge: 2332 bp

-2188 CTGCATAGGATCCTTTGAAGCCAACCTCTTGCACCTGAA
Box W1

-2150 GTGTTATACAACACAATGCCATAGCCACACTCATTAGTATCAGGGTCAA
Box W1

-2100 AGATGTATCAACAAAGAATTTAAAAACAACAAATTCATCTATAATATCTT
Skn-1 Box 4

-2050 GCAAGCATAATGAGCTGTTAGAGTGAGAGTCATATTGAGCAGAATTAATT
GATA

-2000 TGTGGATAGGAATTTGAACTGTCTTGAGTGCAGGCAGTGTAGCTATTCAA
Skn-1 I-Box

-1950 CGAAAACCTGAATTCTGGTGACTGTGGTCATAGGATTCAGCTTCTTATCTT
I-Box

-1900 GAAAGACACAATCACATCTTTCCTTCCATATAATCCAGCTTTCACCATT
CATT

-1850 AACAACTTCTCAAGTTGTTGATTTCTTACTTCCAGCATTCCTGAACATC
CATT

-1800 ACTGAACCATGAGATAATCCATCTTTTACAGACTGGCATTGAGAGATAA
CATT

-1750 TCTAGTCAATATTGATATTAAGAAAGCGCCATAATGCTTTAGCATGTGAA
GA

-1700 TAACTAATAAGAATGTGGAAAGGTGTTTCTTCATCTTCCCTTGCAGATCTC
I-Box O2

-1650 ACAATGTGTTTCCATATCATGCATAGCTTGAGATAATCTAACTCTTGTAG
ATGCAAAT

-1600 GGACTATATTTTTCAGACACTTCCATACAAATAATAGAACACGATGTGGA
ATGCAAAT

-1550 AGCTTCATTTTCCAAAGAGCTTTCCAAACCTGATGTTGGAACATCACTTAA
ATGCAAAT

-1500 AGCAATCTGATTCTGAACTTTGGCTTTTGTGAGTTTATTGTAAGCAGTTT
ATGCAAAT

-1450 TAACAGAAAAACACCATCTTTAGAAGGAGCCCATCTAACTATGTCTTGT
ATGCAAAT

-1400 TCTTCATGAGAGAGATGCATTTTTTTGATTCCATCAACAATATCTGGACT
MBS

-1350 GAAAAGATCATTGAGGAGAGAATATTCAGTTGTTAGGCTAAGGCAGAAT
O2

-1300 TATCTCACTGACAACTTATATTGTAGGTGATGAGGATGAAGTGGCACAA
O2

-1250 CTCTGATGTCAAGCCCTATGATCTACCTGTCAGCCCAGATTTTAGTATTC
O2

-1200 TTGCCATTGTAACTTCCATGATGTAGTGTGTTGAAGAATAGAGAGACC
O2

-1150 AGGTTCAACCCCTTTCAGGTCCAAGATGAATTGCTCTTTTCTCCTTCAA
O2

-1100 GATGTAGAACTCTTCTTTCTTAAAGAACTCTTATAGAAGCTCATACTTC
O2

Anhang

circadian **MBS** **TCT**
-1050 CAAAGTTATCAAAGGTATTTTCAGTTGTAAGAGGAGCACCACCTATAAATC
Box III **GT-1** **GCN4** **GT1**
-1000 ATTTTCATTTTGCTGATGATTGTCTCAATTTTACTCAAGCCAATTTAACC
TC-rich repeat
-950 AGTGTGAATAATCTTCTTCAAGTCTTGAAGGATTTTAGTTTACAATCTGG
Skn-1 **Box 4** **GARE**
-900 TCAGGTCATTAATTTTGACAAGTCTTCTGTTTTTTTATAGTAACAACATG
-850 GATCCATTTGTGTGCAATGCTCTCAGTAGCATTGTTGGGAGTTCAAAGTAT
TC-rich repeat
-800 GGAGAAAAATGAGAAATATCTGGGCTCAGCATTTCATCTAAAGATTTGC
-750 TTTTTTCTATTGGCACTTGCTGACAACAGTCTTCCGACAAAGGATATGTT
-700 AACAAAGGAAAGGAATTGAAGTAGATCAAAAATGCCTATTTTGCTCTCGTA
Box 4 * **HSE**
-650 ATTAATCTGTAAAGT**GCATCTTTTTCTTCACT**GTGATTTTGCAGATAAAATT
-600 CGGAGATAGTTTAAGGGTAAGCTGACTGGAGGTTTACATGCGCGTTTCTA
circadian **Box I** **circadian** **GARE**
-550 GAGATATCTTTTCAAAAATATCTACTCAAGGGATGGCCACCTTCTGTTTT
-500 CAGTAGCCAATACATGTTGTTTTTTTTTTAATTATTATTATTGTTAATA
ARE
-450 CCGATACACAGTAAACCAATGCATTGAAAAAAAATAGATGCGCCTAGAAA
Box 4
-400 ACTAAGTCTGCCAATTATCCAACTATCCCTAATTAATACCCACAATGTA
GARE
-350 TACTCATGAAAATATTTTAAAGTGGCAAAATAGGAAACAGAATATGCAGC
-300 TTCAACTAACCATAGTTGGCTTTATATAATAGAATAGATATATTCTTGAA
-250 ATTGTCCTTGTGCAAATGCAGGCACACGGTTCTTTTGCTACAAGGTTTCGT
-200 TAGTGCGTTATTGTTAGGGTAGATGTGAGTTTCCTTCTGTCACCACCTGA
-150 AAATATACATCGACAGACTGGAAATTAATGATACATTAATACTAAATA
Py-rich stretch **TGACG** **TGA**
-100 GTCCTAATTTTCTTCTTTATTTGACGCTTAAACATAGAATTCAGTCAACG
TATA **Inr**
-50 ACCCCACTCGGAAAGGGCTTTAAAGA CCGAGTTTTCGTATCTTCTGTTC
ARE LAMP
+1 CTTTCCGTTCTGGTTTTGGGAATTTAGTCCCTTGTTAGTATCTTCTAGGG
Box I **TCCC**
+50 TTTGAAAAGAAGCACAGGGAGAAGCAAAAGTCAATCTACTTGAAATACA
GARE
+100 TTCGATTGCTTCTCTCTGTTTAAAGCTTCAGAGTCTCTGCTAATT

Abb. B-4

Putativer Promotor von *salAT* (Länge: 407 bp)

```

-190          CTGCTATTCAATTACAAAACAAAATAGAAAGTATCAGCAT
-150  ATTACATCGATCCTTTATGAAAGATTATATATATATAAAATATAAAATATAA
          MBS          CAAT
-100  CCTTTGGTCTTCAACTGCTACTCAATTACAAAACAAAATAGAAAGCATCA
          TATA
-50   GCATATTACATCGATCCTTTATAAAACATAATATATATATATATATATATAT
          MBS
+1    ATATATAACCTTTGGTCTTCAACTGCTATTTCAGAAAGAGGGGTATTCTAT
+50   TCGGTGAGAGTTTCTTCTTATCCAGCTCCTCGCAAATGAAATGATTCCAT
          Skn-1      3-AF1      TCCC
+100  AATTCCTCACTAAAAGACTTAGTCATTATATAAGAGAGGGGAGACCACGAG
          GARE          GT-1
+150  CTTCTTCTAACAAACAGAAAGTATCATCTACCATTATCAATCCTGTTAAAC
          MBS
+200  AGTTAAACACTTTGGATAT
  
```

Abb. B-4 Isolierte 5'-Sequenz des Gens *salAT* aus *P. somniferum*.

Die über PlantCARE ermittelten putativen *cis*-regulierenden Elemente sind hervorgehoben und in **Tab. B-1** erläutert.

Anhang

Name der Box	Organismus	Enzym	Sequenz	Funktion
3-AF1	<i>Solanum tuberosum</i>	Chlorophyll-a/b-Bindeprotein	AAGAGATATTT/ TAAGAGAGGAA	Lichtrespons
ARE	<i>Zea mays</i>	Alkohol-Dehydrogenase	TGGTTT	Anaerobe Induktion
As-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Anionische Peroxidase	GATAatGATG	Sprossentwicklung / Lichtrespons
ATCT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Chloroplast)	AATCTAATCT	Lichtrespons
ATGCA AAT	<i>Oryza sativa</i>	Glutelin	ATACAAAT	unbekannt
Box I	<i>Pisum sativum</i>	Rubisco	TTTCAA	Lichtrespons
Box III	<i>P. sativum</i>	Rubisco	atCATTTTCACT	unbekannt
Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	ATTAAT	Lichtrespons
Box-W1	<i>P. crispum</i>	„Pathogen-relatet“ Protein	TTGACC	Pilz-Abwehr
CATT	<i>Z. mays</i>	Pyruvat- Orthophosphat-Dikinase (Chloroplast)	GCATTC	Lichtrespons
CCAAT	<i>Hordeum vulgare</i>	Chalcon-Synthase	CAACGG	MYBHv1 Bindungssequenz
circadian	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Chlorophyll-a/b-Bindeprotein	CAAAGATATC	„circadian control“
EIRE	<i>N. tabacum</i>	β -1,3-Glucanase	TTCGACC	Elicitor-aktives Element
ELI-Box3	<i>Brassica oleracea</i>	Rezeptorähnliche Kinase	AAACCAATT	Elicitor-aktives Element
GA	<i>Glycine max</i>	Rubisco	AAGGAAGA	Lichtrespons
	<i>Helianthus annuus</i>	Rubisco	AAGGAAGA	
GAG	<i>Spinacia oleracea</i>	Rubisco	AGAGATG/ GGAGATC	Lichtrespons
GARE	<i>B. oleracea</i>	Rezeptorähnliche Kinase	AAACAGA/ TCTGTTG	Gibberellinrespons
GATA	<i>A. thaliana</i>	Pre-Ferredoxin (Chloroplast)	GATAGGA	Lichtrespons
G-Box	<i>H. vulgare</i>	„late embryogenesis abundant“	GCCTTGTGTAG	Lichtrespons
GCN4	<i>O. sativa</i>	Glutelin	CAAGCCA	Expression im Endosperm
GT1	<i>A. thaliana</i>	Dihydrodipicolinat-Synthase	GGTTAA	Lichtrespons

Tab. B-1 Erläuterungen zu den *cis*-regulierenden Elementen.

Anhang

Name der Box	Organismus	Enzym	Sequenz	Funktion
GT-1	<i>C. roseus</i>	Tyrosindecaboxylase, Strictosidin-Synthase	(G/A)NNN(G/A)G T(A/T)AA(A/T)(A/T)	UV-Lichtrespons
HSE	<i>B. oleracea</i>	Rezeptorähnliche Kinase	AAAAAATTTTC/ AGAAAATTCG	Hitzestress
I-Box	<i>Flaveria trinervia</i>	Pyruvat- Ortho-phosphat-Dikinase (Chloroplast)	GATATGG	Lichtrespons
	<i>Triticum aestivum</i>	Pre-Ferredoxin (Chloroplast)	aAGATAAGA	
LAMP	<i>S. oleracea</i>	ATP-Synthase	CCAAAACCA	Lichtrespons
MBS	<i>A. thaliana</i>	„Responsive to desiccation“ (RD)	TAACTG / CAACTG	Trockenstress
MBSII	<i>Petunia hybrida</i>	Chalcon-Synthase	AAAAGTTAGTT A	Flavonoid Biosynthese
O2	<i>Z. mays</i>	putativer TF des Zeinmetabolismus b-32 (Endosperm)	GATGATATGG/ GATGATGTGG	Zeinmetabolismus
P-Box	<i>P. crispum</i>	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	CAACAAACCCC TT	Gibberellin-Respons
	<i>O. sativa</i>	Glutelin	CCTTTTG	
Pc-CMA2a	<i>S. oleracea</i>	Plastocyanin	CAACCAATGAA AA	Lichtrespons
Py-rich strech	<i>L. esculentum</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Co-A-Reduktase	TTTCTTCTCT	hohe Transkriptionslevel
RY	<i>H. annuus</i>	„late embryogenesis abundant“	CATGCATG	Lichtrespons
Skn-1	<i>O. sativa</i>	Glutelin	GTCAT	Expression im Endosperm
TA-rich region	<i>N. tabacum</i>	Anionische Peroxidase	(TA)x11	„enhancer“
TCA	<i>B. oleracea</i>	Rezeptorähnliche Kinase	GAGAAGAATA/ CCATCTTTTT	Salicylsäurerespons
	<i>N. tabacum</i>	β-1,3-Glucanase	CCATCTTTTT	
TCCC	<i>S. oleracea</i>	ATP-Synthase	TCTCCCT	Lichtrespons
TC-rich repeat	<i>N. tabacum</i>	Anionische Peroxidase	GTTTTCTTAC/ ATTTTCTCCA	Abwehr und Stressantwort
TCT	<i>A. thaliana</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Chloroplast)	TCTTAC	Lichtrespons
TGA	<i>B. oleracea</i>	Rezeptorähnliche Kinase	AACGAC	Auxinrespons
TGACG	<i>H. vulgare</i>	Lipoxygenase	TGACG	Methyl-Jasmonatrespons

Tab. B-1 Fortsetzung Erläuterungen zu den *cis*-regulierenden Elementen.

Danksagung

Prof. Dr. Toni M. Kutchan danke ich sehr herzlich für die Überlassung des überaus interessanten Themas, ihrer wissenschaftlichen Unterstützung, sowie für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen sowohl in Halle als auch in St. Louis.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Susanne Frick für ihre wissenschaftliche und persönliche Betreuung, ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, ihre Geduld und ihren unermüdlichen Optimismus. Ihre fachliche und persönliche Unterstützung hat zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Bei Herrn Dr. Robert Kramell möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der HPLC und seiner moralischen Unterstützung bedanken. Herrn Dr. Jürgen Schmidt aus der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie danke ich für die Durchführung der LC/ESI-MS/TOF Analysen.

Frau Dr. Gabrielle Herrmann und Domenika Arndt danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Suspensionszellkulturen.

Bei Herrn Dr. Peter Lange möchte ich mich für die vielen fachlichen Ratschläge bei den „Real Time“ RT-PCR Messungen bedanken.

Allen Mitarbeitern der institutsinternen Gewächshäuser und Phytokammern möchte ich für die liebevolle Betreuung der Pflanzen und Pflanzenkulturen danken.

Nicht zuletzt danke ich allen Kollegen im Labor für die gute und harmonische Zusammenarbeit und für die zahlreichen wertvollen Anregungen. Ein besonderes Dankeschön an die Kollegen der Schlafmohn-Transformations-Gruppe.

Schließlich gilt mein ganz persönlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden. Dabei bedanke ich mich vor allem bei Holger, der stets viel Geduld und Verständnis für mich aufgebracht hat.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Katja Kempe
Geburtsdatum	04. April 1979
Geburtsort	Frankenberg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1986 – 1992	Mittelschule, Flöha
1992 – 1997	Gymnasium, Flöha
12. Juli 1997	Abitur

Studium

1997 – 2003	Studium der Angewandten Naturwissenschaft an der Technischen Universität Bergakademie Freiberg
2002 – 2003	Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle: „Herstellung von Vektoren zur „RNA <i>interference</i> “ für Gene der Benzylisochinolin-Biosynthese aus <i>Papaver somniferum</i> L.“
18. Februar 2003	Diplom-Naturwissenschaftlerin

Tätigkeiten

Juli – September 2000	BioPlanta GmbH, Delitzsch, Industriepraktikum
Dezember – März 2001	TU BA-Freiberg, Institut für Anorganische Chemie, studentische Hilfskraft
April – Mai 2001	TU BA-Freiberg, Institut für Anorganische Chemie, Studienarbeit
April 2003 – Juli 2007	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Abteilung Naturstoffbiotechnologie, Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit
April – November 2006	Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis (MO, USA), Auslandsaufenthalt

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Halle, 13. Juli 2007