

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

Promotionsschrift

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

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

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

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

verteidigt am 25. Mai 2007

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

John Donne

Inhalt

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

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

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

Anmerkungen zur Schreibweise

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

Abkürzungsverzeichnis

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

Antibiotika und Alkaloide

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