

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Die Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide

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

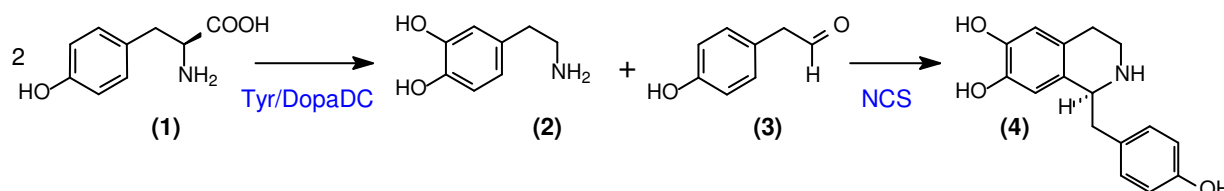


Abb. 1.2: vereinfachte Darstellung des ersten Teils der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* vom L-Tyrosin (1) zum (*S*)-Norcoclaurin (4) über Dopamin (2) und p-Hydroxyphenylacetaldehyd (3)

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

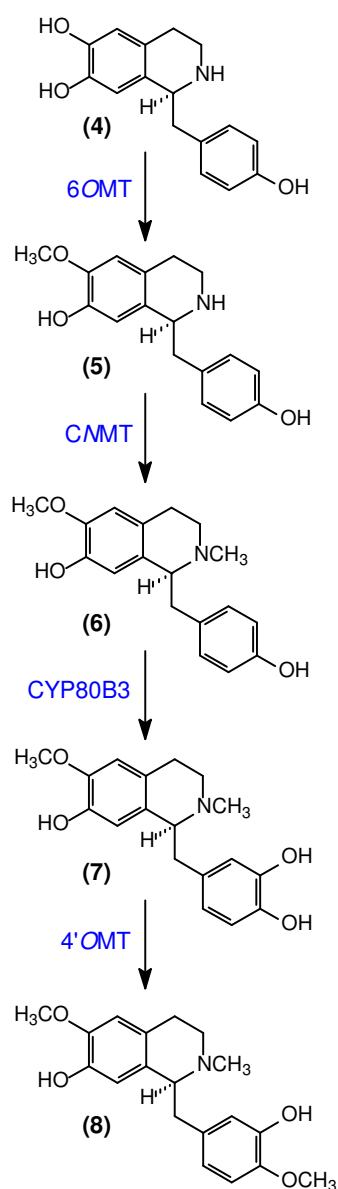


Abb. 1.3: Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* vom (*S*)-Norcoclaurin (4) zum (*S*)-Retikulin (8) über (*S*)-Coclaurin (5), (*S*)-*N*-Methylcoclaurin (6) und (*S*)-3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin (7)

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

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

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

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

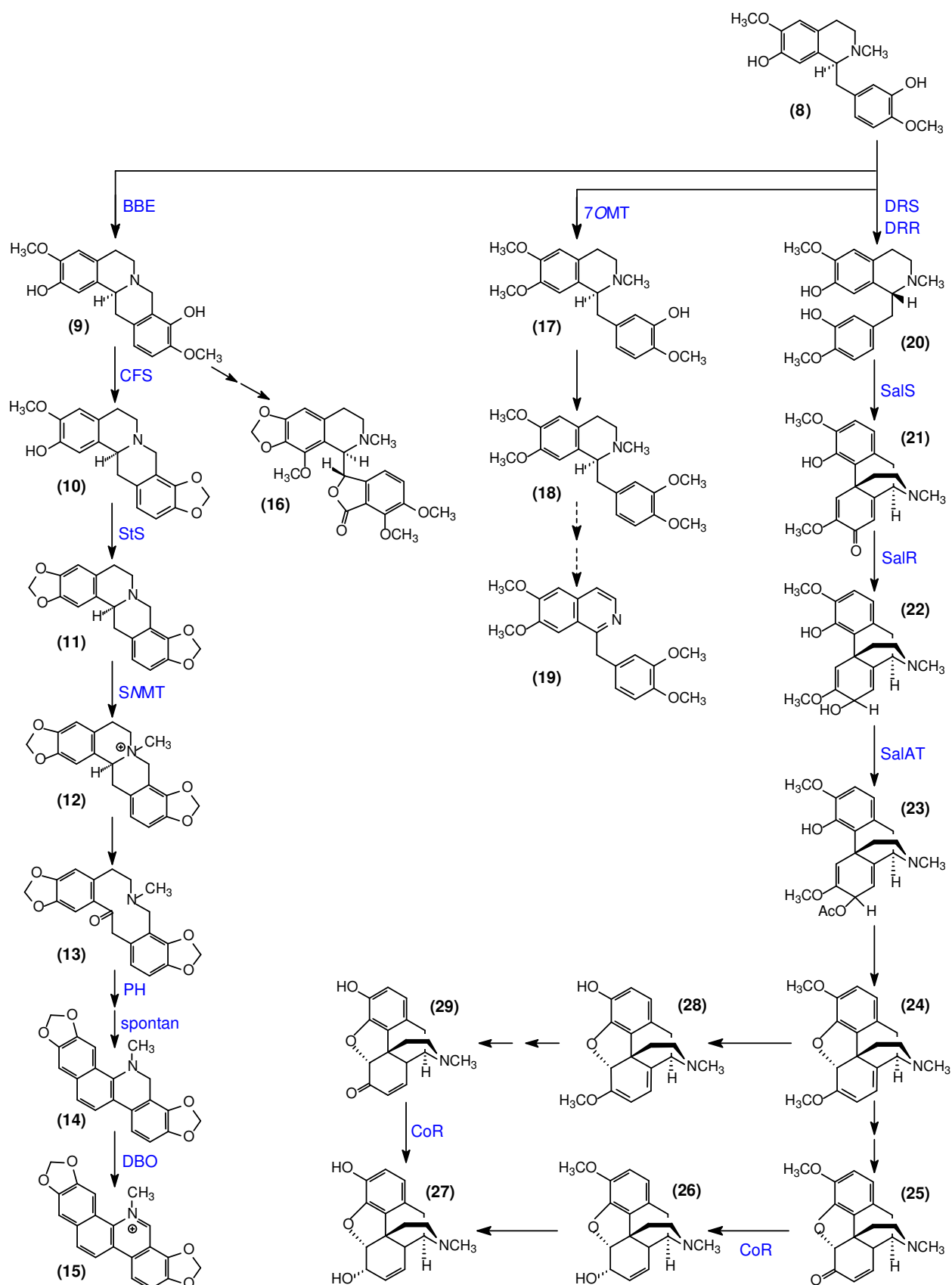


Abb. 1.4: Darstellung der Biosynthese der Benzylisochinoline in *P. somniferum* ausgehend vom (S)-Retikuline zu den Morphinanen, den Papaverinen, Protoberberinen und Benzo[c]phenanthridinen mit den Endprodukten Morphin, Papaverin, Noscapin und Sanguinarin; (S)-Scoulerin (9), (S)-Cheilanthifolin (10),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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 *Metabolic engineering* – Der Eingriff in den Stoffwechsel

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Zielsetzung der Arbeit

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

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

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

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

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

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

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

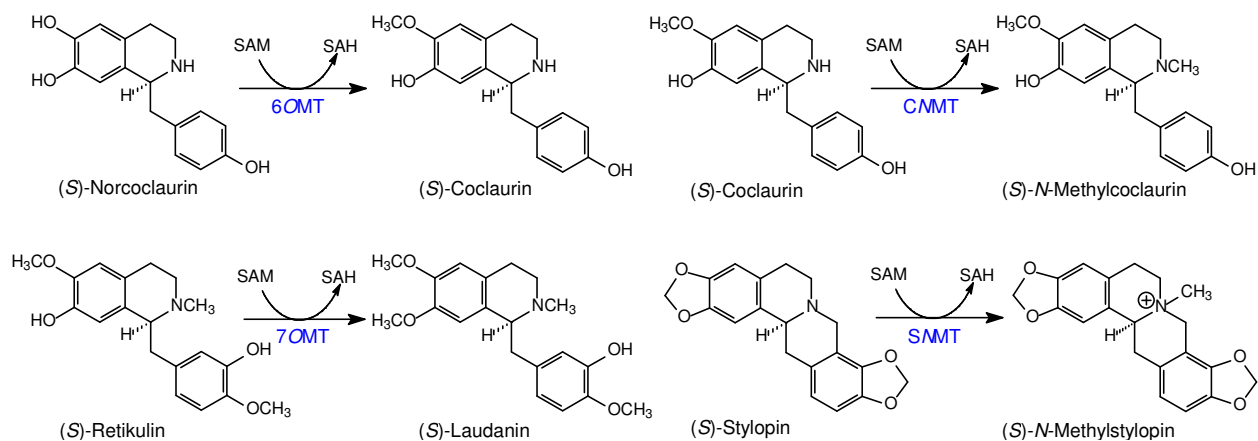


Abb. 1.5: Reaktionen der (*S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT), (*S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7OMT), (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT) und (*S*)-Stylopin-*N*-Methyltransferase (SMMT), die Methylgruppen vom SAM unter Bildung von SAH auf ihre Substrate übertragen