

5. Diskussion

5.1 O-Methyltransferasen

5.1.1 Transformation und Generierung transgener Pflanzen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.1.2 *7omt-sense*-Pflanzen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2 Coclaurin-N-Methyltransferase - CNMT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methylnorlaudanosolin, das diese Methylgruppe nicht trägt.

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

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

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

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

5.3 Stylopin-*N*-Methyltransferase - SNMT

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

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

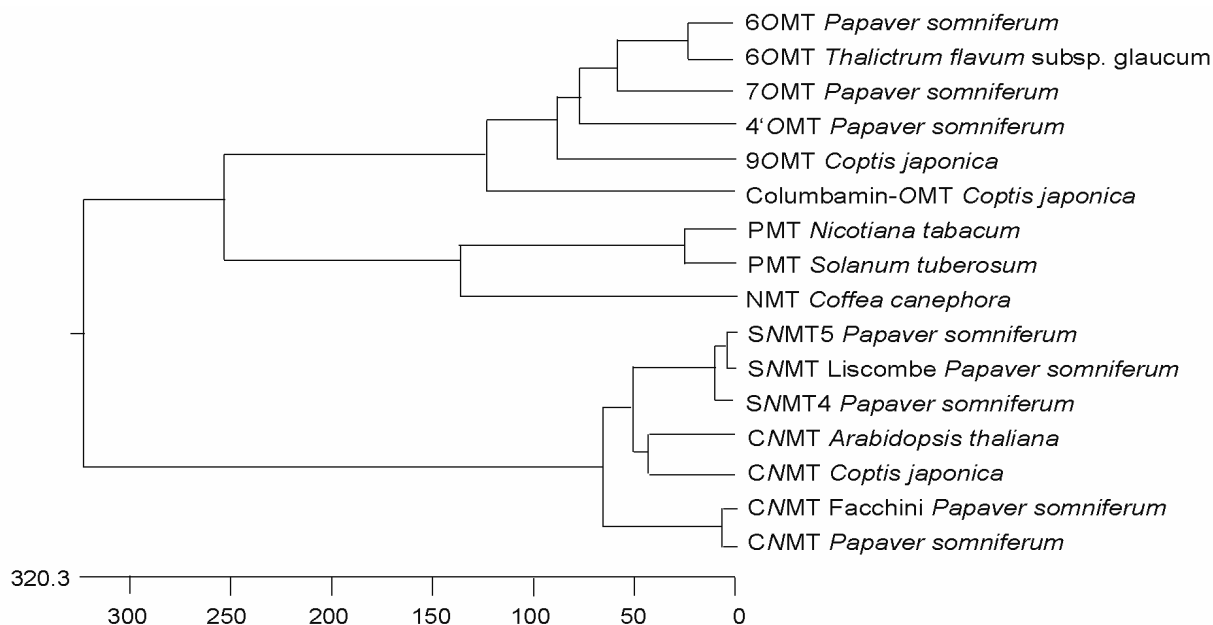


Abb. 5.1: phylogenetischer Stammbaum für den Aminosäuresequenzvergleich der Enzyme: 6OMT *P. somniferum* (AAQ01669), 6OMT *T. flavum* (AAU20765), 7OMT *P. somniferum* (AAQ01668), 4'OMT *P. somniferum* (AAP45313), 9OMT *C. japonica* (BAA06192), Columbamin-OMT *C. japonica* (BAC22084), PMT *N. tabacum*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

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

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

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

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

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

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

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

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