

6. Zusammenfassung

O-Methyltransferasen

O-Methyltransferasen spielen im Sekundärstoffwechsel von *P. somniferum* eine wichtige Rolle in der Biosynthese der Opiumalkaloide.

P. somniferum (Kultivar CO58-34) sollte mit der (*S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT) und der (*S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7OMT) mit *sense*-Konstrukten zur Überexpression und mit RNAi-Konstrukten zum *silencing* transformiert werden.

Die entsprechenden Konstrukte wurden kloniert. Dem Protokoll von Chitty et al. (2003) folgend wurden sie zur agrobakterienvermittelten Transformation von Schlafmohnhypokotylen verwendet. Aus den entstandenen Kalluskulturen konnten durch somatische Embryogenese *7omt-sense*-Pflanzen generiert und bis in die T2-Generation untersucht werden.

In den transgenen Pflanzen wurden mittels PCR mit spezifischen Primern gegen den S4S4-Promotor und den Me13'-Terminator ein 1,2 kb-Fragment des Transgens und für die Pflanzen der T0- und T1-Generation mit genspezifischen Primern das Resistenzgen *nptII* nachgewiesen.

Die Überexpression der *7omt* konnte in Northern-Blot-Analysen für die T0- und die T1-Generation mit Blatt-RNS und für die T2-Generation mit RNS des obersten Stängelabschnittes gezeigt werden.

In Southern-Blot-Analysen der T0-Pflanzen wurde die Zahl der ins Genom integrierten Transgenkopien anhand der *nptII*-Hybridisierung auf mindestens vier bestimmt. Für die Pflanzen der T1-Generation konnte die Mindestanzahl der Kopien auf eins bis fünf festgelegt werden.

Die 7OMT setzt im Alkaloidbiosyntheseweg in Schlafmohn (*S*)-Retikulin zu (*S*)-Laudanin und (*S*)-Laudanosin um. Eine Überexpression der *7omt* ließ eine verstärkte Bildung der Syntheseprodukte erwarten.

Die Latexalkaloide wurden mittels HPLC qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Überexpression der *7omt* hatte in den Generationen T1 und T2 kaum Einfluss auf die Mengen des Substrates Retikulin und der Produkte Laudanin und Laudanosin.

In der T1-Generation waren die Anteile dieser Alkaloide bei jeweils etwa 40 % der T1-Pflanzen verändert. Etwa 66 % dieser Pflanzen zeigten die Menge an Retikulin erhöht bzw. an Laudanin und/oder Laudanosin verringert. Ein Anstieg der 7OMT-Produkte lag in 17 Pflanzen vor. Dabei war die Menge an Laudanin in neun Pflanzen und an Laudanosin in zehn Pflanzen der T1-Generation gestiegen. Ein Anstieg beider Alkaloide lag in zwei dieser Pflanzen vor.

Die Änderungen bewegten sich dabei meist in dem geringen Bereich zwischen einfacher und doppelter Standardabweichung. Steigerungen um das Doppelte der Standardabweichung des Laudanin- bzw. Laudanosingehaltes gab es in 5 T1-Pflanzen. Eine Abnahme der Mengen in der gleichen Größenordnung war dagegen in 10 Pflanzen vorhanden.

Nur für eine T1-Pflanze konnte eine Verringerung des Retikulingehaltes, verbunden mit einer Zunahme von 7OMT-Produkten, in diesem Fall Laudanin, festgestellt werden.

Die Betrachtung der Alkaloide Retikulin, Laudanin und Laudanosin in den 100 T2-Pflanzen zeigte, dass in 30 Pflanzen der Retikulingehalt gesunken war, 28 Pflanzen produzierten mehr Laudanin und 17 Pflanzen mehr Laudanosin. Nur vier Pflanzen zeigten bei geringeren Retikulinwerten erhöhte Werte für Laudanosin. In nur zwei Pflanzen ging die verminderte Retikulinmenge mit einer Erhöhung der Alkaloide Laudanin und Laudanosin einher.

In einigen Pflanzen der T1-Generation und in vielen Pflanzen der T2-Generation war die Synthese der Endmetabolite des Morphinanweges beeinflusst. Diese Pflanzen zeigten starke Veränderungen der Gehalte von Morphin, Codein, Thebain und Oripavin. Diese auffälligen Änderungen bewegten sich in Bereichen bis zu 28 % des Gesamtalkaloidgehaltes für Morphin, 22 % für Codein, 32% für Thebain und 9 % für Oripavin

Die Pflanzen zeigten dabei kein einheitliches Muster, auffallend war jedoch, dass die Verschiebung der Werte für Morphin/Codein häufig antagonistisch zur Verschiebung der Werte für Thebain/Oripavin war.

***N*-Methyltransferasen**

An der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* sind zwei *N*-Methyltransferasen beteiligt. Es handelt sich dabei um die (*S*)-Coclaurin-*N*-Methyltransferase (CNMT), die (*S*)-Coclaurin methyliert, und die (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase (SNMT), deren Substrat (*S*)-Stylopin ist.

Facchini et al. (2003) isolierten aus *P. somniferum* eine Sequenz mit großer Homologie zu der bereits aus *C. japonica* bekannten CNMT. Dadurch war es in dieser Arbeit möglich, aus dem Kultivar *München* eine cDNS zu isolieren. Die Aminosäuresequenzhomologie zu der bereits aus *C. japonica* bekannten Sequenz der CNMT betrug 62 %.

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden auf den pH-Wert 8,0 in HEPES-Puffer und eine Temperatur von 45°C bestimmt. Das Enzym ist SAM-abhängig. Die CNMT akzeptierte die Alkaloide (*R*)-Coclaurin und (*S*)-Coclaurin, (*S*)-Norretikulin, (*S*)-Nororientalin und (*R,S*)-Norlaudanosolin als Substrate. Die Aktivität des Enzyms war in Anwesenheit von divalenten Ionen (5 mM) durch Kupfer um 80 % und durch Eisen und Cobalt um etwa 20 % vermindert.

Die Methylierung der Substrate mit SAM als Methylgruppendonor wurde in LC-MS-Analysen bestätigt. Die Ionenchromatogramme zeigten eindeutige Verschiebungen der Retentionszeiten der Reaktionsprodukte gegenüber den Substraten. In den Ionenspektren wurde die Methylierung durch das Enzym bestätigt. Dabei war für die jeweiligen Produkte eine Erhöhung der Massen der Molekülonen und der Fragmentionen der Isochinolinuntereinheit um 14 Einheiten, entsprechend der angefügten Methylgruppe, zu verzeichnen. Weitere Fragmentionen, die durch Abspaltung von Ammoniak aus dem Substrat und von Methylamin aus dem Produkt entstanden waren, wiesen eindeutig auf *N*-Methylierungen hin.

Die ermittelten K_m -Werte und Maximalgeschwindigkeiten wurden für (*S*)-Coclaurin auf 20 μmol und 8 pkatal, für (*R*)-Coclaurin auf 20 μmol und 5 pkatal, für (*S*)-Norretikulin auf 41 μmol und 9 pkatal, für (*S*)-Nororientalin auf 79 μmol und 12 pkatal und für (*R,S*)-Norlaudanosolin auf 34 μmol und 9 pkatal bestimmt.

Aufgrund der Sequenzhomologien und funktionellen Übereinstimmungen mit dem bereits bekannten Enzym aus *Coptis* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die isolierte Sequenz die CNMT aus *P. somniferum* kodiert.

Ausgehend von einer 135 bp umfassenden cDNS mit Homologie zur CNMT aus *C. japonica*, gelang es, mittels RACE-PCR zwei Klone einer bisher unbekanntes cDNS mit Homologie zu bekannten Methyltransferasen zu isolieren.

Rohextraktmessungen zeigten Aktivität beider Klone bei der *N*-Methylierung von (*S*)-Stylopin. Diese Ergebnisse wurden massenspektrometrisch bestätigt. Es handelte sich um die bis *dato* noch nicht bekannte Sequenz der (*S*)-Tetrahydroprotoberberin-*cis-N*-Methyltransferase, die (*S*)-Stylopin im Benzophen[*c*]anthridinzweig der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* umsetzt.