

Identifizierung und Charakterisierung einer neuen  
*O*-Methyltransferase aus *Papaver somniferum*

**Dissertation**

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

vorgelegt der

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

von

**Frau Diplom Biochemikerin Silke Pienkny**

geb. am 23.03.1981 in Halle (Saale)

Gutachter /in:

1. PD Dr. Wolfgang Brandt
2. Prof. D.Phil. Milton Stubbs
3. Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Halle (Saale), 31.08.2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pflanzliche Alkaloide.....	1
1.2 Tetrahydrobenzylisoquinolin-Alkaloide.....	3
1.2.1 Vorkommen.....	3
1.2.2 Biosynthese des Retikulins.....	4
1.2.3 Biosynthese des Laudanins und des Papaverins.....	6
1.2.4 Biosynthese des Morphins.....	8
1.2.5 Biosynthese der Benzophenanthridine.....	10
1.2.6 Biosynthese der Protoberberine.....	12
1.3 Nutzung von <i>Papaver somniferum</i> .....	12
1.4 Identifizierung neuer Gensequenzen aus <i>P. somniferum</i> .....	14
1.5 Methyltransferasen.....	14
1.5.1 Sequenzvergleich und konservierte Motive in Methyltransferasen.....	15
1.5.2 Isoflavon-7-O-Methyltransferase.....	16
1.6 Ziel der Arbeit.....	19
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1 Software.....	20
2.2 Geräte.....	20
2.3 Enzyme, Chemikalien und andere Materialien.....	21
2.4 Bakterienstämme.....	22
2.5 Pflanzen.....	22
2.6 Vektoren.....	22
2.7 Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	22
2.7.1 Anziehen von Bakterien.....	22
2.7.2 Glycerinkulturen.....	23
2.7.3 Herstellung kompetenter Zellen.....	23
2.7.4 Transformation.....	24
2.8 Molekularbiologische Arbeiten.....	25
2.8.1 Allgemeine Arbeiten mit DNA.....	25
2.8.2 Isolierung von Plasmid DNA.....	25
2.8.3 Polymerasekettenreaktion.....	26
2.8.4 Sequenzierung.....	27
2.8.5 Ortsgerichtete Mutagenese.....	28
2.8.6 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	29
2.8.7 Restriktion, Fällung und Fragmentreinigung.....	29
2.8.8 Ligation.....	29
2.8.9 Allgemeine Arbeiten mit RNA.....	30

2.8.10	<i>Isolation von RNA</i> .....	30
2.8.11	<i>Reverse Transkription</i> .....	31
2.8.12	<i>Quantitative real-time RT-PCR</i> .....	31
2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.9.1	<i>Herstellung von rekombinantem Protein in E.coli</i> .....	33
2.9.2	<i>Reinigung von rekombinantem Protein</i> .....	33
2.9.3	<i>Denaturierende Gelelektrophorese</i> .....	35
2.9.4	<i>Westernblot Analyse</i> .....	35
2.9.5	<i>Größenausschlusschromatografie</i> .....	37
2.9.6	<i>Bestimmung der Enzymaktivität</i> .....	37
2.9.7	<i>Scintillationsmessungen</i> .....	38
2.9.8	<i>Analytische Umkehrphasen-HPLC</i> .....	38
2.9.9	<i>LC-MS</i> .....	39
2.10	Synthese von Norcoclaurin.....	39
2.10.1	<i>Synthese von 2-(4-Hydroxyphenyl)-acetaldehyd</i> .....	40
2.10.2	<i>Synthese von Norcoclaurin</i> .....	40
2.10.3	<i>Präparative Umkehrphasen-HPLC</i> .....	41
2.11	Methoden der Computerchemie.....	41
2.11.1	<i>Erstellung von Homologie Modellen</i> .....	41
2.11.2	<i>Generierung der Datenbank potentieller Substratstrukturen</i> .....	43
2.11.3	<i>Docking</i> .....	44
2.11.4	<i>Abbildungen von Modellen</i> .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
3.1	Vergleich von ESTs in verschiedenen <i>Papaver</i> Arten.....	45
3.2	Identifizierung und Charakterisierung eines neuen <i>P. somniferum</i> Gens .....	46
3.2.1	<i>Ermitteln der Gensequenz durch Genome walking</i> .....	46
3.2.2	<i>Vergleich der Sequenz mit Datenbankeinträgen</i> .....	48
3.3	Strukturmodell der putativen OMT.....	50
3.3.1	<i>Bindung des Kofaktors</i> .....	53
3.3.2	<i>Die Dimerbildung am Modell untersucht</i> .....	54
3.3.3	<i>Docking von potentiellen Substratstrukturen</i> .....	55
3.3.4	<i>Aktives Zentrum und pka-Werte</i> .....	57
3.4	Untersuchungen am Enzym <i>in vitro</i> .....	57
3.4.1	<i>Heterologe Überexpression des neuen Gens und Reinigung des Proteins</i> .....	57
3.4.2	<i>Bestimmung des Substratspektrums</i> .....	59
3.4.3	<i>Produktidentifizierung der Umsetzung von Norretikulin</i> .....	61
3.4.4	<i>Enzymkinetische Charakterisierung der N7OMT</i> .....	63
3.4.5	<i>Bestimmung der nativen Proteingröße</i> .....	65
3.4.6	<i>Modell der Bindung des Substrates (S)-Norretikulin</i> .....	67
3.4.7	<i>Modell der Bindung von Norcoclaurin in N7OMT</i> .....	68
3.5	Vergleich von N7OMT und 6OMT.....	69
3.5.1	<i>Das aktive Zentrum</i> .....	69
3.5.2	<i>Modell der 6OMT</i> .....	70
3.5.3	<i>Modell der Bindung von Norcoclaurin</i> .....	72
3.5.4	<i>Vergleich der Substratbindungen</i> .....	73
3.6	Mutierte Enzymvarianten von N7OMT.....	74
3.6.1	<i>Herstellung der mutierten Enzyme</i> .....	75
3.6.2	<i>Katalytische Aktivität der mutierten Enzyme</i> .....	76

3.7 Expressionsanalyse.....	79
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>82</b>
4.1 Identifizierung einer neuen OMT.....	82
4.2 Dimerisierung.....	83
4.3 Expressionsanalyse.....	85
4.4 Proteinstrukturen.....	87
4.5 Substratspezifität und docking.....	89
4.6 Die Bindung von ( <i>S</i> )-Norretikulin und ( <i>S</i> )-Norcoclaurin.....	91
4.7 Biosynthese des Papaverins.....	93
4.8 Mutationen der N7OMT.....	97
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>i</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>.....</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele für pflanzliche Alkaloide.....	2
Abbildung 2: Synthese vom L-Tyrosin bis zum ( <i>S</i> )-Retikulin.....	4
Abbildung 3: Biosynthese des ( <i>R,S</i> )-Laudanins.....	5
Abbildung 4: Vorschlag der Biosynthese des Papaverins.....	6
Abbildung 5: Biosynthese des Morphins.....	7
Abbildung 6: Biosynthese des Benzophenantridines Sanguinarin.....	8
Abbildung 7: Biosynthese des Berberins.....	9
Abbildung 8: Die Medicarpin Synthese in <i>M. sativa</i> .....	13
Abbildung 9: Röntgenkristallstruktur von IF7OMT (1FP2).....	14
Abbildung 10: Ausschnitt der differentiellen Genexpressionsanalyse (Ziegler u. a. 2006).....	38
Abbildung 11: PCR-Produkte.....	39
Abbildung 12: Sequenzvergleich (BLAST).....	40
Abbildung 13: multiples Alignment von verschiedenen OMT Sequenzen.....	41
Abbildung 14: Ramachandran Plot des A21G11 Modells.....	44
Abbildung 15: PROSA Plot von A21G11 (grün) und 1FP2 (rot).....	44
Abbildung 16: Modell der A21G11.....	45
Abbildung 17: Modell der Oberfläche der A21G11.....	46
Abbildung 18: SDS-PAGE Proteinreinigung der A21G11.....	50
Abbildung 19: SDS-PAGE Proteinreinigung der A21G11 nach der Expression bei 4 °C in <i>E. coli</i> SG13009.....	51
Abbildung 20: die im Enzymassay getesteten Substrate, Teil 1.....	52
Abbildung 21: die im Enzymassay getesteten Substrate, Teil 2.....	52
Abbildung 22: RP-HPLC Chromatogramm des Umsatzes von A21G11 mit ( <i>S</i> )-Norretikulin.....	53
Abbildung 23: Massenspektrum von ( <i>S</i> )-Norretikulin.....	54
Abbildung 24: Massenspektrum von ( <i>S</i> )-Norlaudanin.....	54
Abbildung 25: Aktivität der N7OMT.....	55
Abbildung 26: Charakterisierung der Enzymeigenschaften der N7OMT.....	56
Abbildung 27: Charakterisierung der Enzymeigenschaften von N7OMT.....	57
Abbildung 28: Größenausschlusschromatografie.....	58
Abbildung 29: SDS-PAGE mit Silberfärbung der Elutionsfraktionen der Gelfiltration.....	58

Abbildung 30: Proteinkonzentrationen und der Enzymaktivitäten der Elutionsfraktionen der Gelfiltration.....	59
Abbildung 31: aktives Zentrum der N7OMT.....	60
Abbildung 32: Die Reaktionen der 6OMT und der N7OMT.....	62
Abbildung 33: Modell der 6OMT.....	62
Abbildung 34: Ramachandran Plot des 6OMT Modells.....	63
Abbildung 35: PROSA Plot der 6OMT (grün) und der 1FP2 (rot).....	63
Abbildung 36: aktives Zentrum der 6OMT.....	64
Abbildung 37: Aktives Zentrum der N7OMT (orange) und der 6OMT (rosa) übereinandergelegt.....	64
Abbildung 38: Lage des Trp 16 in N7OMT und 6OMT.....	65
Abbildung 39: SDS-Page der gereinigten Proteine des N7OMT Wildtyps und der N7OMT Mutanten.....	66
Abbildung 40: V/S-Kurven der Mutanten N7OMT S155W, S168F, S309L und S168F/S309L.....	67
Abbildung 41: RP-HPLC Chromatogramm des Umsatzes der N7OMT S155W/S168F/S309L mit Norcoclaurin.....	68
Abbildung 42: Massenspektrum des enzymatisch durch S155W/S168F/S309L N7OMT aus Norcoclaurin gebildeten Reaktionsproduktes.....	69
Abbildung 43: Vergleich der Expressionsniveaus.....	70
Abbildung 44: Einordnung der N7OMT in eine Biosynthese von Papaverin.....	81

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzähnlichkeiten zwischen den Aminosäuresequenzen der <i>O</i> -Methyltransferasen der Benzylisochinolinklasse in %.....	42
Tabelle 2: Die im docking getesteten Strukturen.....	48
Tabelle 3: pka-Werte der Aminosäuren im aktiven Zentrum.....	49
Tabelle 4: Vergleich der Aktivitäten der verschiedenen Enzymmutanten und des Wildtyps....	67

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4'OMT	3'-Hydroxyl-N-methylcoclaurin-4'-O-methyltransferase
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
6OMT	(R,S)-Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase
7OMT	(R,S)-Retikulin-7-O-Methyltransferase
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
APS	Ammoniumpersulfat
BBE	Berberinbrückenenzym
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BIA	Benzylisochinolinalkaloide
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLOSUM	Blocks Substitutions Matrix
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. japonica</i>	<i>Coptis japonica</i>
cDNA	<i>coding</i> DNA
CoA	Coenzym A
COR	Codeinon-Reduktase
CPR	NADPH:Cytochrom-P450-Reduktase
Ct	<i>cycle threshold</i>
CYP80B1	(S)-N-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase ( <i>Eschscholzia californica</i> )
CYP80B3	(S)-N-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase ( <i>Papaver somniferum</i> )
DAD	Diodenarray-Detektor
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddNTP	2'-3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. californica</i>	<i>Eschscholzia californica</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
gDNA	genomische DNA
GOLD	<i>Genetically Optimized Ligand Docking</i>
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IFOMT	Isoflavon-7-O-Methyltransferase
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	kiloDalton

L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LC-MS	Flüssigchromatografie-Massenspektroskopie
M	mol/l
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MM	Molekülmechanik
MOE	<i>molecular operation environment</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektroskopie
MT	Methyltransferase
N7OMT	(S)-Norretikulin-7-O-Methyltransferase
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Kation
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
NCS	(S)-Norcoclaurin-Synthase
NMT	(S)-Coclaurin-N-Methyltransferase
OD	optische Dichte
OMT	O-Methyltransferase
OMT	O-Methyltransferase
<i>P. som.</i>	<i>Papaver somniferum</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>reverse transcripton</i> PCR
SAH	(S)-Adenosyl-L-Homocystein
SalAT	Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase
SalR	Salutaridin-Reduktase
SAM	(S)-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>T. tuberosum</i>	<i>Talictrum tuberosum</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOFMS	Flugzeitmassenspektrometer
TRIS	Tris-hydroxyl-aminomethan
TYDC	Tyrosin-/DOPA-Decarboxylase
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactopyranosid
xg	xfache Erdbeschleunigung (Zentrifugen)

# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzliche Alkaloide

Pflanzliche Alkaloide sind basische Sekundärstoffe die von ungefähr einem Fünftel aller Pflanzen gebildet werden können. Sie sind nach den Terpenen die zahlenmäßig am stärksten vertretene Gruppe von pflanzlichen Sekundärstoffen, deren Struktur aufgeklärt ist. Es sind ungefähr 12 000 Alkaloide bekannt (De Luca und St Pierre 2000). Ihr Name leitet sich von ihren basischen Eigenschaften ab, die vom hohen pka-Wert des in allen Alkaloiden auftretenden Stickstoffs stammen. Der Stickstoff kann über decarboxylierte Aminosäuren, stickstoffhaltige organische Säuren oder Nukleotide während der Alkaloidbiosynthese eingebaut werden (Herbert 2001). Einige Alkaloidgruppen mit typischen Vertretern sollen jetzt beispielhaft vorgestellt werden (Abbildung 1).

Die Terpen-Indolalkaloide leiten sich von der Aminosäure Tryptophan und einem Terpenmolekül ab. Das erste Alkaloid in diesem Biosyntheseweg ist Strictosidin, dessen Synthese aus Tryptamin und Secologanin von der Strictosidinsynthase katalysiert wird. In *Catharanthus roseus* werden daraus z.B. das muskelrelaxierende Ajmalicin und das in der Krebstherapie eingesetzte Vinblastin gebildet (O'Connor und Maresh 2006).

Aus der Aminosäure Ornithin können über Putrescin die Tropanalkaloide synthetisiert werden. Zu ihnen gehört u. a. das von *Atropa belladonna* synthetisierte Hyoscyamin, welches in der Medizin als Spasmolytikum und als Antidot bei Vergiftungen mit Insektiziden aus organischen Phosphaten eingesetzt wird (Shonle und Bergelson 2000).

Aus Purinnukleotiden werden die sogenannten Purinalkaloide wie Koffein, Theobromin und Theophyllin synthetisiert. Sie haben eine anregenden Wirkung auf das zentrale Nervensystem und werden mit Genussmitteln wie Kaffee, Tee und Schokolade konsumiert (Ashihara und Crozier 1999).

Aus Terpenen und Derivaten der Aminosäure Tryptophan werden die Terpenoid- und Steroidalkaloide gebildet. Zu ersteren gehört das Aconitin, welches ausgehend von Farnesylpyrophosphat über Geranylgeranylpyrophosphat gebildet wird und in *Aconitum* Arten wie dem blauen Eisenhut zu finden ist. Seine giftige Wirkung beruht auf der Blockierung der tetrodotoxin-sensitiven Natriumionenkanäle in Nervenzellen, was wiederum zu Atemstillstand führt. Ein Beispiel für Steroidalkaloide ist das Solanin, welches in Nachtschattengewächsen

wie Tomaten und Kartoffeln vorkommt. In größeren Mengen führt dieses Gift zu Erbrechen, Magenkrämpfen, Durchfall und dem Tod. Seine Biosynthese erfolgt aus dem Terpenoid Squalen über das Zwischenprodukt Cholesterol, welchem durch Transaminierung ein Stickstoffatom zugefügt wird. Solanin besteht aus einem Zuckeranteil und einem Steroidanteil (Hesse 2000).

Aus Acetateinheiten wird das Piperidinalkaloid Coniin gebildet, ein zum Beispiel im gefleckten Schierling (*Conium maculata*) vorkommendes Neurotoxin. Es wird aus der Caprylsäure synthetisiert, welche aus dem Fettstoffwechsel stammt. Seinen Stickstoff erhält Coniin ebenfalls durch eine Transaminierung (Lopez u. a. 1999).

Von der Aminosäure Tyrosin sind die Tetrahydrobenzylisochinoline abgeleitet. Aus ihnen werden eine Vielzahl von Alkaloiden synthetisiert, wie zum Beispiel das antitussiv wirkende Codein, das gefäßerweiternde Papaverin und das antibakterielle Sanguinarin (Kutchan 1998). Ihre Biosynthese verläuft über das zentrale Intermediat (*S*)-Retikulin. Von (*S*)-Retikulin aus verzweigen sich die Stoffwechselwege zu weiteren Benzylisochinolinalkaloiden wie den Morphinanen, den Phthalidisochinolinalkaloiden, Protopinen, Aporphinen, Proaporphinen, Bisbenzylisochinolininen, Pavinen und den Benzophenanthridinen (Zenk u. a. 1985). Im Folgenden soll näher auf die Tetrahydrobenzylisochinolin-Alkaloide, die in *Papaver somniferum* vorkommen, eingegangen werden.

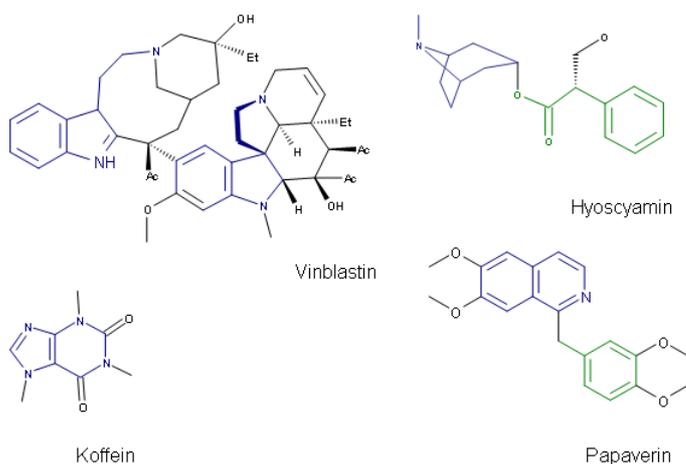


Abbildung 1: Beispiele für pflanzliche Alkaloide  
 Vinblastin mit den aus Tryptophan stammenden Teilen (blau), Hyoscyamin bestehend aus dem Tropananteil (abgeleitet von Ornithin, blau) und dem aus L-Phenylalanin abgeleiteten Teil (grün), Koffein mit dem Grundgerüst Purin (blau), Papaverin bestehend aus einem Isochinolinteil (blau) und einem Benzylteil (grün), beide Teile sind von jeweils einem Molekül L-Tyrosin abgeleitet

## 1.2 Tetrahydrobenzylisochinolin-Alkaloide

### 1.2.1 Vorkommen

Die Tetrahydrobenzylisochinolin Alkaloide und die von ihnen abgeleiteten Alkaloide konnten bislang vorwiegend in den Gattungen der Ordnung Ranunculales gefunden werden, darunter insbesondere die Familien *Papaveraceae*, *Berberidaceae* und *Ranunculaceae*. Unter den *Papaveraceae* wurden die BIAs hauptsächlich in den Gattungen *Papaver*, *Eschscholzia*, *Argemone*, *Thalictrum*, *Chelidonium* und *Sanguinaria* nachgewiesen. Unter den *Berberidaceae* trifft das auf die Gattung *Berberis* zu und bei den *Ranunculaceae* ist das die Gattung *Coptis* (Roberts und Wink 1998; Schmeller und Wink 1998). Außerdem erwähnenswert sind die ebenfalls zu den Benzylisochinolin zählenden Alkaloide in *Ipecac spec.* und *Erythrina spec.*

Durch die lange menschliche Kultivierungsphase und die natürlichen Evolutionsbedingungen sind eine Vielzahl von verschiedenen Kultivaren und Arten der Gattung *Papaver* entstanden. Die Mohnarten der Gattung *Papaver* unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch durch ihr Sekundärstoffprofil. Die Unterschiede bei den Sekundärstoffen liegen hauptsächlich in der Synthese und dem Vorkommen verschiedener Benzylisochinoline und der von ihnen abgeleiteten Alkaloide. Die genaue Einordnung der etwa 70 bekannten Mohnarten in die Sektionen der Gattung *Papaver* ist bis heute Thema von wissenschaftlichen Diskussionen (Kadereit u. a. 1997; Hammer 1981). Im Allgemeinen geht man davon aus, das *Papaver somniferum* zusammen mit *Papaver setigerum* die einzigen Morphin-bildenden Arten sind (Preininger 1986), wobei *P. setigerum* möglicherweise Vorfahre von *P. somniferum* ist (Hammer 1981). Der Klatschmohn (*Papaver rhoeas*) kann zum Beispiel Rhoeadin herstellen (Hegnauer 1990). In *Papaver bracteatum* wiederum kann der Morphinan-Biosyntheseweg vorgefunden werden, allerdings nur bis zum Thebain, denn *P. bracteatum* hat keine Thebain-demethylierende Aktivität (Brochmann-Hanssen und Wunderly 1978; Saunders u. a. 2001). Eine durch Mutageneseexperimente aus *P. somniferum* hergestellte Mutante ist *top1*, welche die Fähigkeit zur Morphinbiosynthese verloren hat und die Vorstufen Thebain und Oripavin akkumuliert (Millgate u. a. 2004). Das Hauptalkaloid in *P. orientale* ist Oripavin (Brochmann-Hanssen und Cheng 1982).

## 1.2.2 Biosynthese des Retikulins

Die Biosynthese von (*S*)-Retikulin beginnt mit zwei Molekülen der Aminosäure Tyrosin, die nach Deaminierung und Decarboxylierung zu Norcoclaurin kondensiert werden. Norcoclaurin wird durch *O*-Methylierungs-, *N*-Methylierungs- und Hydroxylierungsschritte zu Retikulin umgewandelt (Abbildung 2). Nachfolgend eine detailliertere Beschreibung der Retikulinbiosynthese:

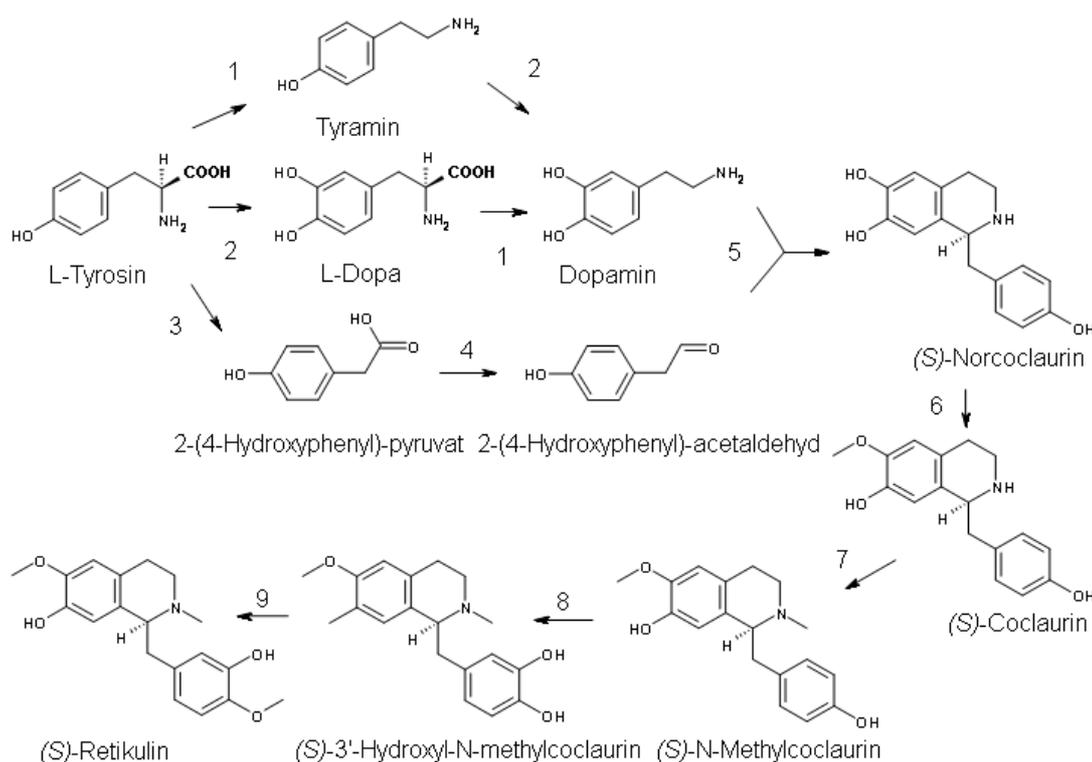


Abbildung 2: Synthese vom L-Tyrosin bis zum (*S*)-Retikulin  
beteiligte Enzyme sind:

- |   |  |                         |
|---|--|-------------------------|
| (1) TYDC,   | (2) Phenoxidase,   | (3) L-Tyr-Transaminase, |
| (4) 4-Hydroxyphenyl-pyruvat-Decarboxylase,                  | (5) ( <i>S</i> )-Norcoclaurin-synthase,                        |                         |
| (6) ( <i>R,S</i> )-Norcoclaurin-6-OMT,                      | (7) ( <i>S</i> )-Coclaurin-NMT,                                |                         |
| (8) ( <i>S</i> )- <i>N</i> -Methylcoclaurin-3'-hydroxylase, | (9) ( <i>S</i> )-3'-Hydroxyl- <i>N</i> -methylcoclaurin-4'-OMT |                         |

Ein Moleküle L-Tyrosin wird zu Dopamin umgesetzt und ein weiteres zu 2-(4-Hydroxyphenyl)-acetaldehyd. Dopamin und 2-(4-Hydroxyphenyl)-acetaldehyd werden von der (*S*)-Norcoclaurinsynthase zu Norcoclaurin kondensiert (Minami u. a. 2007; Samanani und Facchini 2001). Die Bildung des Dopamins kann über zwei Wege erfolgen: Entweder wird Tyrosin zuerst demethyliert und das entstehende L-Dopa decarboxyliert oder das Tyrosin wird zuerst zu Tyramin decarboxyliert und danach deaminiert. Die Decarboxylierungen werden dabei von Tyrosin/Dopa-Decarboxylasen (TYDC) katalysiert (Facchini und De Luca 1994). Das 2-(4-Hydroxyphenyl)-acetaldehyd wird aus Tyrosin in zwei Schritten über eine

Transaminierung zu 2-(4-Hydroxyphenyl)-pyruvat und weiter über eine Decarboxylierung gebildet (Zenk und Rueffer 1987). (*S*)-Norcoclaurin, das erste Tetrahydrobenzylisochinolin in der Biosynthese, wird von der (*R,S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT) zu (*S*)-Coclaurin methyliert. Das Enzym ist erstmals aus *Argemone platyceras* Zellkulturen partiell gereinigt und charakterisiert worden (Rueffer u. a. 1983). Aus *Thalictrum tuberosum* (Frick und Kutchan 1999), *Coptis japonica* (Morishige u. a. 2000) und *P. somniferum* (Ounaroon u. a. 2003) sind cDNAs isoliert worden, die für die 6OMT kodieren. Das von der 6OMT gebildete Coclaurin wird von der Coclaurin-*N*-Methyltransferase zu *N*-Methylcoclaurin umgesetzt. Diese NMT ist erstmals aus *Berberis koetiana*-Zellkulturen isoliert worden (Frenzel und Zenk 1990a). Von *C. japonica* (Choi u. a. 2002) und *P. somniferum* (Haase 2007) sind die cDNA Sequenzen bekannt. Der nächste Schritt ist eine Hydroxylierung und wird von der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase *N*-Methylcoclaurin-3'-hydroxylase katalysiert, wobei 3'-Hydroxyl-*N*-methylcoclaurin entsteht. Die cDNAs dieser Monooxygenase konnten aus *Eschscholzia californica* (Pauli und Kutchan 1998) und *P. somniferum* (Huang und Kutchan 2000) kloniert werden. Aus 3'-Hydroxyl-*N*-methylcoclaurin wird von der 3'-Hydroxyl-*N*-methylcoclaurin-4'-*O*-methyltransferase (4'OMT) (*S*)-Retikulin gebildet. Die 4'OMT wurde zuerst aus *Berberis koetiana* charakterisiert (Frenzel und Zenk 1990b). Die cDNAs der 4'OMT sind aus *C. japonica* (Morishige u. a. 2000) und *P. somniferum* charakterisiert worden (Ziegler u. a. 2005).

### 1.2.3 Biosynthese des Laudanins und des Papaverins

Laudanin wird in *P. somniferum* durch die (*R,S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7OMT) aus Retikulin synthetisiert (Ounaroon u. a. 2003, Abbildung 3).

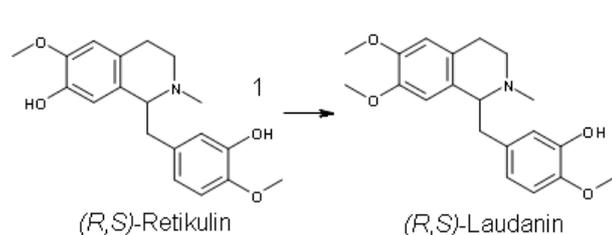


Abbildung 3: Biosynthese des (*R,S*)-Laudanins  
(1) (*R,S*)-Retikulin-7-OMT

Die Biosynthese von Papaverin wurde in Fütterungsexperimenten mit *P. somniferum* untersucht. Die Gabe von markiertem Norretikulin führte zum Einbau in Papaverin (Brochmann Hanssen u. a. 1971). Es wurde eine Biosynthese ausgehend von Norlaudanosolin

über Norretikulिन oder Nororientalin und Tetrahydropapaverin vorgeschlagen (Abbildung 4). Eine Methylierung der 6-Hydroxylgruppe nach der 7-Hydroxylgruppe in den Tetrahydrobenzylisochinolinen wurde ausgeschlossen. Eine Biosynthese von Papaverin über Norprotosinomenin und Norisoorientalin könnte es nach den Fütterungsexperimenten geben, wenn zuerst eine Oxidation des B-Rings am Tetrahydroisochinolin und danach eine Methylierung der 6-Hydroxylgruppe stattfindet (Brochmann-Hanssen u. a. 1975).

In den 70er Jahren war noch nicht bekannt, dass Norlaudanosolin zwar von *P. somniferum* umgesetzt werden kann, aber nicht die biologische Vorläuferverbindung von Norretikulिन und Papaverin ist. Erst 1990 konnte in Fütterungsexperimenten an *Berberis stolonifera* gezeigt werden, dass Norcoclaurin der biologische Vorläufer der Tetrahydrobenzylisochinoline ist (Stadler und Zenk 1990).

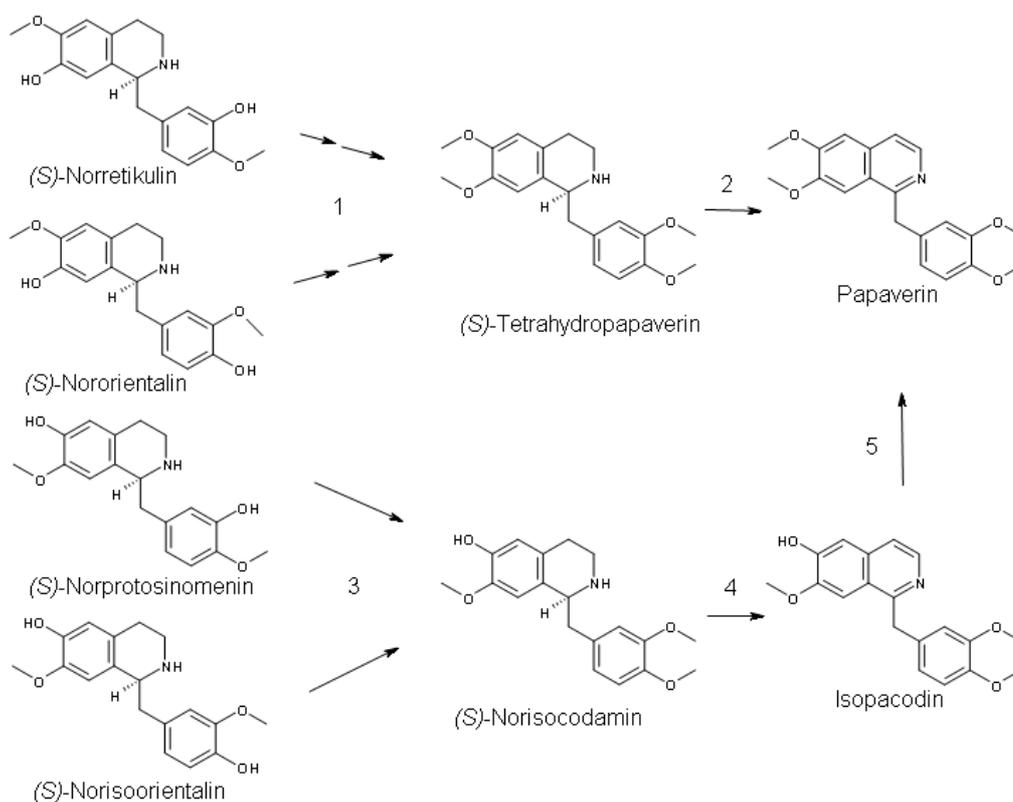


Abbildung 4: Vorschlag der Biosynthese des Papaverins nach Fütterungsexperimenten mit (S)-Norlaudanosolin in *P. somniferum*, beteiligte Enzyme: (1,3 und 5) OMTs, (2 und 4) Oxidasen

## 1.2.4 Biosynthese des Morphins

Die Biosynthese des Morphins wird durch die Änderung der Stereochemie am (*S*)-Retikulin eingeleitet (Abbildung 5). Diese erfolgt durch die Oxidation zum 1,2-Dehydroretikuliniumion aus dem das (*R*)-Retikulin durch Reduktion gebildet wird. Das (*R*)-Retikulin wird in mehreren Schritten weiter zu Thebain, Codein und Morphin umgesetzt (Kutchan 1998).

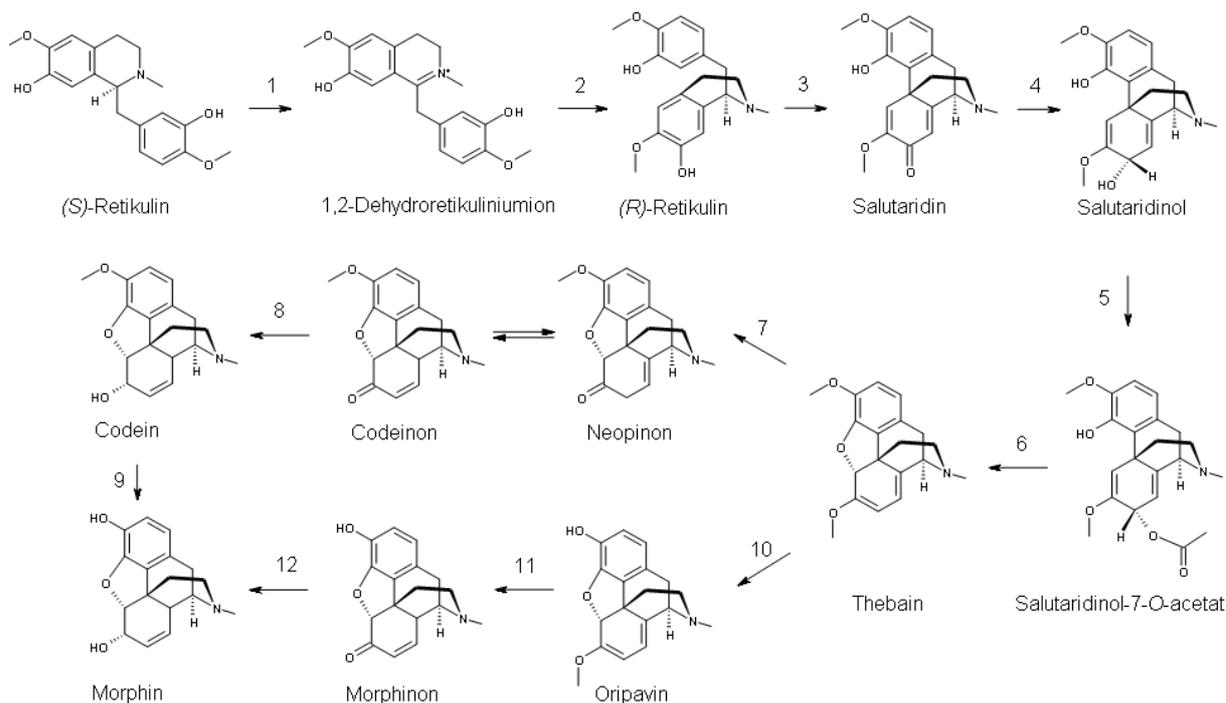


Abbildung 5: Biosynthese des Morphins

ausgehend von (*S*)-Retikulin, die beteiligten Enzyme bzw. Reaktionen sind:

- (1) 1,2-Dehydroretikuliniumion-Synthase, (2) 1,2-Dehydroretikuliniumion-Reduktase, (3) Salutaridinsynthase,  
 (4) Salutaridinreduktase, (5) Salutaridinol-7-O-acetyltransferase, (6) Thebainsynthase,  
 (7) und (11) 6-O-Demethylierung, (8) und (12) Codeinonreduktase,  
 (9) und (10) 3'-O-Demethylierung.

Die Bildung des 1,2-Dehydroretikuliniumions durch die 1,2-Dehydroretikulin-Synthase und die Reduktion zum (*R*)-Retikulin durch die 1,2-Dehydroretikuliniumion-Reduktase wurden beide an Keimlingen von *P. somniferum* untersucht (Hirata u. a. 2004; De-Eknamkul und Zenk 1992). Die Bildung des Morphinan-Grundgerüsts erfolgt durch eine oxidative Phenolkopplung, wodurch Salutaridin entsteht. Diese durch die Salutaridin-Synthase katalysierte Reaktion wurde in *P. somniferum* Pflanzen und Zellkulturen nachgewiesen (Gerardy und Zenk 1992). Die cDNA der Salutaridinsynthase konnte kürzlich ebenfalls identifiziert werden (Gesell 2008). Salutaridin wird zu 7-(*S*)-Salutaridinol von der Salutaridin-Reduktase umgesetzt und deren cDNA konnte aus *P. somniferum* isoliert werden (Gerardy

und Zenk 1993; Ziegler u. a. 2006; Grothe u. a. 2001). Das Salutaridinol wird durch die Salutaridinol-Acetyltransferase aktiviert. Das so entstandene Salutaridinol-7-*O*-Acetat wird zu Thebain, katalysiert durch die Thebainsynthase. Das dazu gehörende Enzym konnte aus der cytosolischen Milchsafftraktion von *P. somniferum* angereichert werden (Grothe u. a. 2001). Von Thebain aus verzweigt sich der Biosyntheseweg zum Morphin. Einmal führt er über eine 6-*O*-Demethylierung zum Neopinon, welches mit Codeinon im Gleichgewicht steht und über eine NADPH-abhängige Reduktion durch die Codeinon-Reduktase zum Codein wird (Lenz und Zenk 1995; Unterlinner u. a. 1999). Codein wird durch eine 3'-*O*-Demethylierung zum Morphin. Zum Anderen gibt es einen Biosyntheseweg über Oripavin und Morphinon mit einer Reduktion des Morphinons durch die Codeinonreduktase zum Morphin. Dabei sind die ersten beiden Stufen, eine 3'- und eine 6-*O*-Demethylierung, nicht auf der Proteinebene bekannt. Beide Wege der Morphinbiosynthese konnten in *P. somniferum* nachgewiesen werden, allerdings variieren die Anteile der beiden Wege an der Morphinproduktion in den verschiedenen Pflanzenvarietäten.

### 1.2.5 Biosynthese der Benzophenanthridine

Benzophenanthridine werden durch oxidativen Ringschluss aus (*S*)-Retikulिन gebildet. So wird vom Berberinbrückenenzym die Bildung von (*S*)-Scoulerin katalysiert (Abbildung 6).

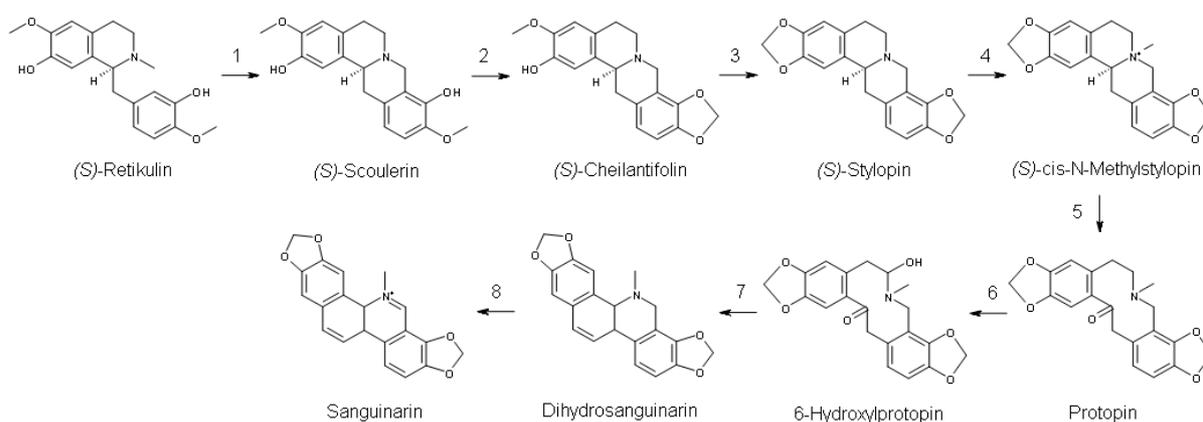


Abbildung 6: Biosynthese des Benzophenanthridines Sanguinarin

(1) Berberinbrückenenzym, (2) Cyp719A3, (3) Cyp719A2, (4) Stylopin-N-methyltransferase,  
 (5) (*S*)-cis-N-Methylstylopin-14-hydroxylase, (6) Protopin-6-hydroxylase,  
 (7) Umlagerung, (8) Dihydrobenzophenanthridin-oxidase.

Das Enzym wurde aus *Berberis beaniana*-Zellkulturen isoliert und charakterisiert (Steffens u. a. 1985). Die Sequenz des Berberinbrückenenzymes wurde in *E. californica* (Dittrich und

Kutchan 1991), *P. somniferum* (Huang und Kutchan 2000) und *Berberis stolonifera* (Chou und Kutchan 1998) identifiziert. In *P. somniferum* wird (*S*)-Scoulerin zu Sanguinarin umgesetzt. Dabei wird zunächst am Isochinolinring eine Methylendioxybrücke von einer Cytochrom-P450-abhängigen Monoxygenase gebildet. Das so entstandene (*S*)-Cheilanthifolin wird von einer weiteren Cytochrom-P450-abhängigen Monoxygenase zu (*S*)-Stylopin konvertiert. Beide Monoxygenasen, Cyp719A3 und Cyp719A2, wurden als cDNA aus *E. californica* kloniert (Ikezawa u. a. 2007). Danach wird (*S*)-Stylopin am Stickstoffs methyliert durch die Tetrahydroprotoberberin-*N*-methyltransferase zum (*S*)-cis-*N*-Methylstylopin (Liscombe und Facchini 2007). Es folgen zwei Hydroxylierungsreaktionen, zuerst am C14 von der (*S*)-cis-*N*-Methylstylopin-14-Hydroxylase und dann am C6 von der Protopin-6-Hydroxylase. Beide Enzymaktivitäten wurden in Zellkulturen detektiert (Rueffer und Zenk 1987; Tanahashi und Zenk 1990). Das entstandene 6-Hydroxylprotopin setzt sich spontan zum Dihydrosanguinarin um, welches der Dihydrobenzophenanthridin-Oxidase zum Sanguinarin reduziert wird (Arakawa u. a. 1992).

### 1.2.6 Biosynthese der Protoberberine

Das durch das Berberinbrückenenzym gebildete Scoulerin trägt auch zur Entstehung der Protoberberine bei. Als Beispiel soll die Bildung des in *Papaver* vorkommenden Beberins beschrieben werden (Abbildung 7). Die Scoulerin-9-*O*-methyltransferase katalysiert die Bildung des Tetrahydrocolumbamins, welche auf cDNA-Ebene aus *Coptis japonica* aufgeklärt worden ist (Morishige u. a. 2002). Das Tetrahydrocolumbamin wird weiter umgesetzt zu (*S*)-Canadin.

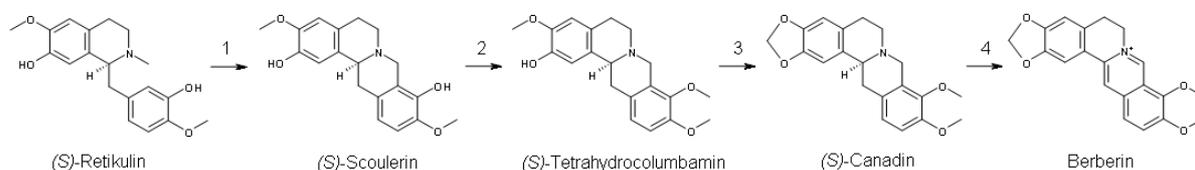


Abbildung 7: Biosynthese des Berberins

(1) Berberinbrückenenzym, (2) (*S*)-Scoulerin-9-*O*-methyltransferase, (3) CYP719A1, (4) STOX

Die dabei entstehende Methylendioxybrücke wird durch die Cytochrom-P450-abhängige Monoxygenase (Canadinsynthase, CYP719A1) gebildet, deren Enzymaktivität im Zellextrakt von *Coptis japonica* nachgewiesen (Galneder u. a. 1988) und deren cDNA aus *Coptis japonica* und *E. californica* isoliert worden ist (Ikezawa u. a. 2003, 2007). Die Reaktion zum

Berberin wird von der (*S*)-Tetrahydroprotoberberinoxidase (STOX) katalysiert, welche eine FAD-abhängige Oxygenase ist (Amann u. a. 1984). Die Sequenz der cDNA der STOX in *P. somniferum* konnte ebenfalls aufgeklärt werden (Gesell 2008).

### 1.3 Nutzung von *Papaver somniferum*

*P. somniferum* ist eine Jahrtausende alte Kulturpflanze. Sie wird wegen ihrer Ölsamen als Nahrungsmittel und Tierfutter geschätzt. Von großer Bedeutung sind die Alkaloide die im Milchsaft (Latex) der gesamten Pflanze, insbesondere der unreifen Samenkapsel gefunden werden können. Das aus dem Milchsaft durch Oxidation gewonnene Opium besteht bis zu 25% aus Alkaloiden. Der Morphinanteil liegt bei 4-21 % und weitere Verbindungen wie Codein, Thebain, Papaverin und Noscapin liegen in geringeren Anteilen vor (Dewick 1998). Morphin hat eine starke analgetische Wirkung und wird therapeutisch angewendet oder als Ausgangsstoff für die chemische Synthese von Codein (Smirnov u. a. 1972). Morphin wurde von Sertürner 1806 erstmals aus der Pflanze isoliert. Die Struktur dieser Verbindung konnte 1923 durch Gulland und Robinson aufgeklärt werden (Gulland und Robinson 1923). Wie viele der genannten Verbindungen enthält Morphin mehrere Stereozentren, hier sind es fünf, die essentiell für die biologische Wirkung sind. Diese Tatsache macht eine chemische Synthese, die beispielsweise für Morphin mit der Gates-Tschudi-Synthese über 28 Stufen verlaufen würde, unrentabel (Frackenpohl 2000). Daher wird das benötigte Morphin aus *P. somniferum* gewonnen. Thebain wird ebenfalls aus der Pflanze gewonnen und dient als Vorläuferverbindung für die chemische Synthese von Pharmaka wie dem Schmerzmittel Buprenorphin oder Naloxon, einem Antidot bei Opiatüberdosierung (Frackenpohl 2000). Das BIA Papaverin andererseits kann einfacher auf chemischem Wege hergestellt werden (Galat 1951) und wird therapeutisch als Vasodilator eingesetzt (Schmeller und Wink 1998).

Das Ziel mehrerer Forschungsprojekte war die Erzeugung von Pflanzen mit maßgeschneidertem Alkaloidprofil, die ein gewünschtes Alkaloid akkumulieren (Verpoorte u. a. 2000). Die Überexpression oder die Verminderung der Expression von *N*-Methyl-3'-hydroxylase in *P. somniferum* führte zu Veränderungen in der Gesamtmenge der produzierten Alkaloide und im Anteil von Morphin (Frick u. a. 2004). Die konstitutive Expression von Codeinonreduktase (Larkin u. a. 2007) oder die Verminderung der Expression der Codeinonreduktasen in *P. somniferum* (Allen u. a. 2004) führte ebenfalls zu Veränderungen im Alkaloidprofil sowie der gesamten Alkaloidmenge. Die dabei akkumulierenden

Verbindungen lagen zum Teil nach dem durch verstärkte Genexpression geförderten Biosyntheseschritt bzw. mehrere Stufen vor dem durch verminderte Genexpression reduzierten Biosyntheseschritt. Für die Herstellung von transgenen Pflanzen benötigt man ein umfangreiches Wissen über die Biosynthesegene und deren Regulation. Daher ist es von großem Interesse, Gensequenzen, die mit der Alkaloidbiosynthese assoziiert sind, aus *P. somniferum* zu identifizieren.

## **1.4 Identifizierung neuer Gensequenzen aus *P. somniferum***

Durch die Identifizierung von Metaboliten können Biosynthesewege postuliert werden, die diese Verbindungen miteinander in Beziehung setzen auf der Grundlage bekannter enzymatisch katalysierter Reaktionen. Solche Stoffwechselwege bieten die Grundlage zur Entdeckung von Enzymaktivitäten aus Pflanzenextrakten, so wurde zum Beispiel eine Berberin-NMT aus *Sanguinaria canadensis* identifiziert (O'Keefe und Beecher 1994). Durch Reinigung und Peptidsequenzierung können entsprechende Enzyme näher beschrieben werden. Mit diesen Sequenzinformationen können letztendlich auch Gensequenzen identifiziert werden. Um neue Gene der Biosynthese und Regulation zu finden, kann auch die Expression unbekannter *expressed sequence tags* (ESTs) verglichen werden. Dabei müssen mindestens zwei verschiedene Zustände des untersuchten Systems verglichen werden, zum Beispiel die Expressionsniveaus verschiedener ESTs vor und nach der Induktion eines Stoffwechselweges. Für *P. somniferum* Zellkulturen ist die Induktion der Sanguinarinbiosynthese durch Elicitierung mit *Botrytis* Arten bekannt (Tyler u. a. 1988), aber nicht die gezielte Elicitierung des Morphinanstoffwechsels. Aus diesem Grund wurden in einer Expressionsanalyse verschiedene verwandte *Papaver* Spezies verglichen (Ziegler u. a. 2005). Die verwendeten Arten unterscheiden sich in der Fähigkeit, bestimmte Zweige der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese durchzuführen und damit auch in ihrer Genexpression.

## **1.5 Methyltransferasen**

Methyltransferasen (MT) sind an vielen verschiedenen Stoffwechselvorgängen beteiligt. Sie können von der aktivierten Form des Methionins, dem (*S*)-Adenosyl-L-Methionin, eine Methylgruppe auf den Sauerstoff oder Stickstoff eines Substrates übertragen.

Dementsprechend werden *O*-Methyltransferasen (OMT) und *N*-Methyltransferasen (NMT) unterschieden. Es wurde eine Einteilung nach der Art ihrer Substrate vorgeschlagen: Methyltransferasen, die kleine Moleküle, Proteine, DNA oder RNA methylieren, sowie die Methyltransferasen, die nicht eingeordnet werden können (Martin und McMillan 2002). Es gibt viele Beispiele für die Vielfalt der MTs aus dem pflanzlichen Stoffwechsel. So zum Beispiel die Caffeoyl-CoA-OMTs, die am Phenylpropanoidstoffwechsel beteiligt sind und Lignine, Flavonoide und Phytoalexine methylieren (Joshi und Chiang 1998). Ein anderes Beispiel ist die Uroporphyrinogen III MT aus Mais, welche an der Synthese von Sirohäm, einer prosthetischen Gruppe der Nitritreduktase beteiligt ist (Sakakibara u. a. 1996). Die pflanzlichen OMTs lassen sich in zwei Gruppen einteilen, zum einen die OMTs der Klasse I, die zweiwertige Kationen für ihre Aktivität benötigen und zu denen hauptsächlich die Caffeoyl-CoA-OMTs, welche an der Ligninbiosynthese beteiligt sind, gehören. Außerdem gibt es OMTs, die Carboxylgruppen von aliphatischen Verbindungen methylieren. Es gibt auch einige kationenabhängige OMTs deren Substrate zu den Flavonoiden gehören (Ibdah u. a. 2003; Vogt 2004). Zum anderen die OMTs der Klasse II, die kationenunabhängig sind. Diese Gruppe katalysiert die Methylierung einer Vielzahl von verschiedenen Sekundärstoffen, darunter verschiedene Alkaloide wie die in Abschnitt 1.1. genannten oder auch Flavonoide und Isoprenoide (Lam u. a. 2007). Da diese Enzyme die gleichen Reaktionen katalysieren, gibt es einige Familienmerkmale, die sich aus der Sequenzähnlichkeiten ableiten lassen.

### 1.5.1 *Sequenzvergleich und konservierte Motive in Methyltransferasen*

Die SAM-abhängigen Methyltransferasen weisen eine ähnliche Faltung trotz hoher Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf. So weist die Proteinregion, die für die Bindung des Kofaktors SAM zuständig ist, eine geringe Konservierung der beteiligten Aminosäuren auf, sie erfolgt aber zumindest immer in derselben Region. Es ist bekannt, dass in pflanzlichen OMTs die SAM-Bindungsstelle reich an Methioninen ist. Der Aminosäure-Teil des SAMs wird durch das Motiv E/DxGxGxG erkannt und der Riboseteil durch einen *loop* aus  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix mit sauren Aminosäuren (Martin und McMillan 2002). Dieser Teil wird auch als  $\alpha/\beta$ -Rossmannfalte bezeichnet (Rao und Rossmann 1973). Die Katalyse erfolgt in pflanzlichen OMTs wie der Chalcon-OMT und der Isoflavon-OMT aus *Medicago sativa* nach einer Aktivierung des Substrates durch eine Base im aktiven Zentrum. Das aktivierte Substrat

ist dabei der nukleophile Substituent der Reaktion am Kohlenstoff der übertragenen Methylgruppe (Zubieta u. a. 2001). Die katalytische Base bedarf dabei der Aktivierung durch eine saure Aminosäure wie Glutamat oder Aspartat. Für die Erkennung des Substrates könnte auch ein konserviertes Bindemotiv vorliegen. Das wurde in umfangreichen Sequenzvergleichen von OMTs bekannter Aktivität untersucht (Ibrahim u. a. 1998; Joshi und Chiang 1998). Dabei konnte festgestellt werden, dass neben der SAM-Bindung ein Motiv für die Erkennung des Kations in den Klasse I OMTs vorhanden ist. Ein Motiv für die Bindung des Substrates konnte nicht vorhergesagt werden (Schröder u. a. 2002). Die dabei vorgeschlagenen Bereiche befinden sich zum einen im N-terminalen Bereich und zum anderem vor dem zur katalytischen Diade gehörenden Aspartat/Glutamat, zeigen jedoch fast keine Unterschiede in nahe verwandten OMTs, wie 6OMT und 4'OMT aus *C. japonica*, die aber unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Es gelang jedoch eine Eingruppierung in die richtige Substratklasse, zum Beispiel nach Phenylpropanoiden und Alkaloiden.

### 1.5.2 Isoflavon-7-O-Methyltransferase

Die Isoflavon-7-OMT (IF7OMT) aus *Medicago sativa* wurde 1998 hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Aminosäuresequenz beschrieben (He u. a. 1998). Da sie die Grundlage für die strukturelle Untersuchung der in dieser Arbeit vorgestellten OMT bildet, soll ausführlicher auf sie eingegangen werden.

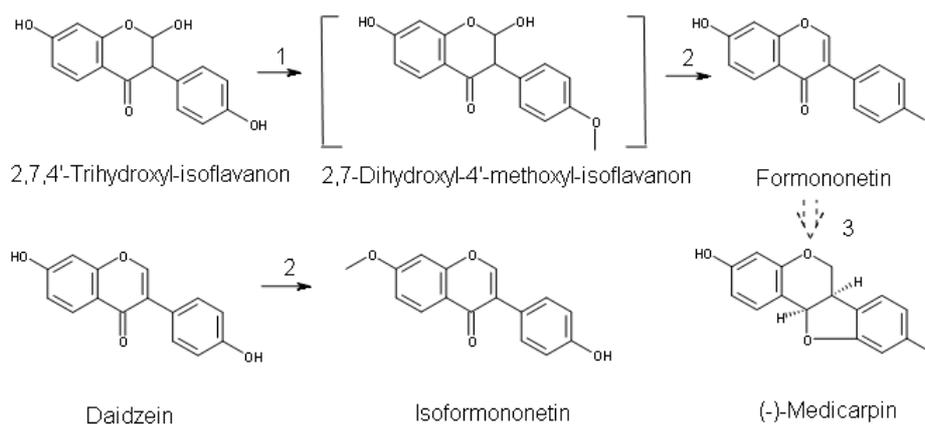


Abbildung 8: Die Medicarpin Synthese in *M. sativa* verläuft über das instabile Intermediat 2,7-Dihydroxyl-4'-methoxyl-isoflavanon, die Strukturanalyse von IF7OMT wurde mit Isoformononetin durchgeführt, da es aus dem stabileren Daidzein in vitro gebildet werden kann.

(1 und 2) IF7OMT, (3) mehrere Stufen der Biosynthese zu Medicarpin

Die IF7OMT setzt Daidzein zu Isoformononetin und außerdem *(2S,3S)*-2,7,4'-Trihydroxylisoflavanon über das Zwischenprodukt 2,7-Dihydroxyl-4'-methoxyl-isoflavanon zu Formononetin um. In *Medicago* wird letzteres zu Medicarpin umgewandelt (Abbildung 8). Das Phytoalexin Medicarpin verzögert die Samenkeimung und das Keimlingswachstum (Kessmann u. a. 1990) und wirkt zum Beispiel als Fungizid gegen *Verticillium alboatrum* (Latunde-Dada und Lucas 1985).

In einer Strukturuntersuchung konnte Isoformononetin zusammen mit *(S)*-Adenosylhomocystein im aktiven Zentrum der IF7OMT kristallisiert werden (Abbildung 9, pdb-Code:1FP2, Zubieta u. a. 2001). Die Auflösung der Struktur 1FP2 beträgt 1,4 Å und der R-Faktor 0,22. Ein Molekül der IF7OMT zeigt zwei Domänen. Die C-terminale Domäne ist die katalytisch aktive Domäne. Sie gehört zur Faltungsklasse der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteine (a/b), besteht aus 3 Schichten (a/b/a) mit einem gemischten  $\beta$ -Faltblatt mit 7 Strängen, wobei der letzte Strang parallel zu den anderen verläuft (SCOP, Murzin u. a. 1995). Der Kofaktor SAM wird durch Aminosäuren auf den  $\alpha$ -Helices 9–13 und den  $\beta$ -Faltblättern 3–9 erkannt. Die Reaktion wird durch eine Abstraktion des Protons der Hydroxylgruppe am Substrat eingeleitet. Zuständig dafür ist das Histidin 257. Ein Austausch gegen das ebenfalls basische Lysin führte zu einer Verminderung der Aktivität, das Austauschen gegen unpolare oder saure Aminosäuren führte zum Verlust der Aktivität.

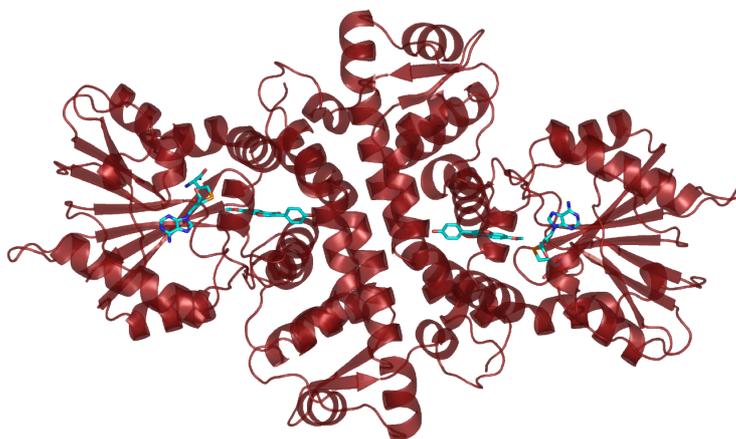


Abbildung 9: Röntgenkristallstruktur von IF7OMT (1FP2)  
Darstellung der Sekundärstrukturelemente (rot) und der Substrate (blau), kristallisiert mit *(S)*-Adenosylhomocystein und Formononetin

Die Aminosäure Histidin 257 wird vermutlich durch das daneben liegende Glutamat 318 positioniert, indem sein stickstoffgebundenes Proton eine Wasserstoffbrücke zur Carboxylgruppe ausbildet. Da die Röntgenstruktur nur von Kristallen mit Isoformononetin erhalten werden konnte, wurde die 3D Struktur von *(2S,3S)*-2,7,4'-Trihydroxylisoflavanon darüber gelegt. Das Molekül wurde entsprechend der Methylierungsstelle im *(2S,3S)*-2,7,4'-

Trihydroxyisoflavanon um 180 ° gedreht. Die IF7OMT Struktur zeigt die Verschränkung der beiden Monomere zu einem Dimer. Die daran beteiligten N-terminalen Domänen sind typisch für pflanzliche OMTs, dabei trägt Helix 1 mit dazu bei, die Substratbindetasche des jeweils anderen Monomers zu schließen (Zubieta u. a. 2001). Mit der Strukturaufklärung dieser pflanzlichen OMT sind wichtige Grundlagen gelegt worden für die Erforschung der Substratspezifität dieser Enzymklasse.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* zu gewinnen. Es sollten auf der Grundlage der vergleichenden Genexpressionsanalyse (Ziegler u. a. 2005) Sequenzen für noch unbekannte Proteine gefunden werden. Ein Auswahlkriterium waren hierbei vergleichbare Expressionsniveaus zwischen unbekanntem Gen und Genen der Alkaloidbiosynthese in den verwendeten *Papaver* Arten. Die so identifizierten Sequenzabschnitte galt es zu vervollständigen und die Funktion der durch sie kodierten Proteine zu analysieren. Durch die heterologe Expression in *E. coli* und der anschließenden Proteinreinigung ist es möglich, die Enzymaktivität *in vitro* zu bestimmen. Parallel dazu kann die Aminosäuresequenz aus der Gensequenz abgeleitet werden. Mit Hilfe des *homology modelling* können Modelle der 3D-Struktur erstellt werden. Das erlaubt eine genauere Untersuchung der Enzymeigenschaften vor allem hinsichtlich der Substratbindung. Das Verstehen der Substratbindung ist die Voraussetzung um gezielte Veränderungen der Substratspezifität durchzuführen, wie es zum Beispiel beim *enzyme engineering* getan wird. Auf der anderen Seite ist die Identifizierung von neuen Gensequenzen und die Zuordnung zu einer Funktion wichtig für das Verständnis der Stoffwechselfvorgänge in *Papaver*. Gerade die Untersuchung von Enzymen der Alkaloidbiosynthese trägt zur erfolgreichen Manipulation der Biosynthese dieser pharmakologisch nutzbaren pflanzlichen Inhaltstoffe bei.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Software

SYBYL	Molecular Modelling Programmpaket; Tripos, Inc. (1699 South Hanley Road St. Louis, MO 63144-2319 USA)
Prosa II	Protein Structure Analysis, Proteins-Faltungen-Analyse; Center Of Applied Molecular Engineering (Jakob-Haringer Str. 1, A-5020 Salzburg / AUSTRIA)
Procheck	Protein-Struktur und Geometrie Evaluierung; European Bioinformatics Institute (Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, United Kingdom)
GOLD	Genetic Optimization Ligand, Docking, Voraussage von Ligand-Protein-Bindungsverhalten; Cambridge Crystallographic Data Centre (12 Union Road Cambridge, UK)
MOE	Molecular Operating Environment, Molecular Modelling Programmpakt; Chemical Computing Group (Suite 910 - 1010 Sherbrooke St. W Montreal, Quebec, Canada H3A 2R7)

### 2.2 Geräte

- HPLC Geräte Waters 600 Controller ,Waters Delta 600, Waters PDA 2996
- HPLC Agilent System LC1100
- Mariner TOF Massenspektrometer von Applied Biosystems
- Biometra Thermocycler-Block T gradient
- Sequenzierer ABI Prism 3100 von Applied Biosystems
- Scintillationszähler Beckmann Coulter LS 6500
- Realtime PCR Gerät MX 3000P von Stratagene
- Amersham Molecular Dynamics Storm 860
- FPLC Äkta explorer von Amersham Bioscience
- Thermo Savant SPD Speedvac mit Membranvakuumpumpe von ABM
- Heizblock Eppendorf Thermomixer 5436
- Eppendorf Centrifuge 5415 C
- Eppendorf Centrifuge 5810R
- Sigma Zentrifuge 3K18
- Ultrazentrifuge Sorvall RC 26 Plus von Dupont
- Bandelin Ultraschallgeräte Sonopuls HD60 und Sonorex RK100
- Schüttler HT Infors Unitron GFL 3033
- Heizschrank WTC Binder
- Schüttler Heidolph Duomax 2030
- Wasserbad MT Lauda

- mittlere horizontale Gelelektrophorese von Biotech Fischer
- kleine horizontale Gelelektrophorese Mupid-21 von Eurogenetec
- Proteingelelektrophorese von Biorad
- Elektrophorese Stromversorgung von Biotech Fischer PHERO-stab 500
- -80 °C Schrank von New Brunswick Scientific
- Sterilbank Heraeus Instruments Hera safe
- Wasserentsalzungsanlage Millipore Milli-Q

## 2.3 Enzyme, Chemikalien und andere Materialien

- Restriktionsenzyme von Fermentas, NEB, Gibco und Invitrogen
- MLV Reverse Transkriptase von Promega
- Superscript II Transkriptase von Invitrogen
- *Pfu*Ultra TM Hotstart DNA Polymerase von Stratagene
- Long Enzyme Mix von Fermentas
- High Fidelity Mix Polymerase von Fermentas
- Chemikalien von Roth, Serva und Sigma
- BD GenomeWalker Universal Kit von BD Bioscience
- ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Applied Biosystems
- QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen
- Plant DNazol von GibcoBRL
- TRIZOL Reagenz von Invitrogen
- Hybond XI Nylon Membran von Amersham Pharmacia Biotech
- Hybridisierungspuffer Ultrahyb Oligo von Ambion
- Talon Metal Affinity Resin von Clontech
- PD-10 Säulen von GE Healthcare
- Säule Lichrospher 60 RP-select B (250 x 4 mm, 5 µm) von Merck
- Säule VP250/10 Nucleosil 100-5 C18 von Macherey und Nagel
- Säule HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade von Amersham Bioscience
- Scintillationscocktail Ultima GOLD MV von Perkin Elmer
- Primer von biomers und MWG
- Anti-His-Tag monoklonaler Antikörper aus Maus von Novagen
- Anti-Mouse IgG aus Ziege mit alkalischer Phosphatase konjugiert von Novagen

## 2.4 Bakterienstämme

### *E. coli*

- Stamm XL1 Blue Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]
- Stamm SG13009 [pREP4] von Qiagen, Phänotyp: Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Urv<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>
- Stamm M15 [pREP4] von Qiagen, Phänotyp: Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Urv<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>

## 2.5 Pflanzen

- *Papaver somniferum*
- *Papaver somniferum* Papaverin

## 2.6 Vektoren

- Klonierungsvektor pCR2.1 von Fermentas
- Expressionsvektor pQE32 von Qiagen

## 2.7 Arbeiten mit *E. coli*

Alle Arbeiten wurden in der Sterilbank mit autoklavierten oder über einen 45 µm Filter steril filtrierten Materialien und Lösungen durchgeführt.

### 2.7.1 Anziehen von Bakterien

Die Bakterien wurden in LB-Medium angezogen, dem je nach Antibiotikaresistenz Ampicillin oder Kanamycin in Endkonzentrationen von 100 bzw. 50 µg/ml zugesetzt wurden. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % Mikroagar zugesetzt. Die Anzucht erfolgte wenn nicht anders angegeben bei 37 °C im Brutschrank oder bei 37 °C und 200 rpm im Thermoschüttler. Für die Selektion von positiven Klonen mit Hilfe der Blau-Weiß-Technik wurden die Agarplatten mit 30 µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid)-Lösung und 40 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)-Lösung bestrichen, bevor die Bakterien darauf ausplattiert wurden.

#### LB-Medium

10 g	Bactotrypton
10 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt

ad 1 l dest. Wasser, pH 7,0

für Platten 1,5 % (w/v) Microagar vor dem Autoklavieren zugegeben

Antibiotika wurden in das max. 50 °C warme Medium nach dem Autoklavieren gegeben

#### X-Gal-Lösung

20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid

#### IPTG-Lösung

23,8 mg/ml IPTG

## 2.7.2 Glycerinkulturen

Zur Lagerung von *E. coli* Klonen wurden Glycerinkulturen von Flüssigkulturen hergestellt. Dazu wurden 100 µl Kultur mit 300 µl 50 % (v/v) Glycerin-Lösung versetzt, geschüttelt und in flüssigem Stickstoff gefroren und bei - 80 °C gelagert.

## 2.7.3 Herstellung kompetenter Zellen

Um *E. coli* Zellen kompetent für die Aufnahme von DNA zu machen, wurde folgendes Protokoll angewendet: Der *E. coli* Stamm wurde von einer Glycerinkultur auf LB-Agar (für XL1 Blue mit 20 µg/ ml Tetracyclin) ausplattiert und vereinzelt. Von einem Klon wurde eine Übernachtskultur mit 25 ml SOB-Medium angezogen. Die Hauptkultur in 250 ml SOB wurde durch animpfen mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt. Nach Über-Nacht-Inkubation war eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht und die Zellen wurden auf 4 °C gekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten auch gekühlt. Zuerst wurden die Zellen bei 1000 xg für 10 min pelletiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in 80 ml TFB-Puffer gewaschen, danach resuspendiert, 10 min inkubiert und wieder pelletiert. Nun wurde das Zellpellet in 20 ml TFB-Puffer aufgenommen und mit 1,5 ml DMSO versetzt und 10 min inkubiert. Jetzt konnten die Zellen portioniert, mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert werden.

### SOB-Medium

2 % (w/v)	Bactotrypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl

autoklavieren, dann Zugabe von steril filtriertem

10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>

### TFB-Puffer

10 mM	Pipes
15 mM	CaCl <sub>2</sub>
250 mM	KCl

pH auf 6,7 einstellen

55 mM	MnCl <sub>2</sub>
-------	-------------------

steril filtrieren

## 2.7.4 Transformation

Die chemokompetenten Zellen wurden mittels Hitzeschock transformiert. Je 100 µl Zellen wurden 100 ng Plasmid-DNA oder 2 µl des Ligationsansatzes eingesetzt. Die kompetenten

Zellen wurden aufgetaut und mit der DNA auf Eis für 15 min inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 50 Sekunden, gefolgt von 5 min auf Eis. Den Zellen wurden danach 400 µl SOC-Medium zugesetzt und sie wurden für 45 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden 200 µl davon auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert .

**SOC-Medium**

wie SOB-Medium, zusätzlich  
20 mM Glukose

## 2.8 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.8.1 Allgemeine Arbeiten mit DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit dem Photometer Ultrospec 3000 bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht 1 OD<sub>260 nm</sub> 50 µg/ml DNA. Verdünnt wurde dabei in 50 mM TRIS-HCl Puffer (pH 7,5).

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem horizontalen Agarosegel mit TAE-Puffer. Die Proben wurden vor dem Beladen mit Ladepuffer 1:1 vermischt.

Die Anfärbung der DNA erfolgte durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Agarosegel und detektiert wurde unter UV-Licht mit Kamera.

**1xTAE**

40 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA, pH 8,0
0,1142 % (v/v)	Eisessig

**Ladepuffer für DNA**

50 mM	TRIS-HCl pH 7,5
30 % (v/v)	Glycerin
0,025 % (w/v)	Bromphenolblau
0,025% (w/v)	Xylencyanid

**1,5 % Agarosegel**

1,5 % (w/v)	Agarose
0,25 µg/ml	Ethidiumbromid
in TAE-Puffer	

### 2.8.2 Isolierung von Plasmid DNA

Plasmid DNA aus *E. coli* wurde mittels alkalischer Lyse isoliert (Sambrook u. a. 1989). Für Plasmidisolationen wurde die Eppendorffzentrifuge 5403 mit 14000 rpm verwendet. 1,5 ml

der Bakteriensuspension wurden 10 min zentrifugiert und das Pellet wurde in 300 µl Resuspendierungspuffer vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lysepuffer wurde die Lösungen durch Kippen gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten die Zugabe von 300 µl vorgekühltem Neutralisierungspuffer, ein mehrfaches Invertieren und eine Inkubation von 15 min auf Eis. Nach 10 min Zentrifugation wurde die DNA aus dem Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Nach der Isopropanolfällung folgte eine Zentrifugation für 10 min, das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und für etwa 30 min getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl dest. Wasser gelöst.

**Resuspendierungspuffer**

50 mM TRIS-HCl, pH 8,0  
10 mM EDTA, pH 8,0

**Lysepuffer**

200 mM NaOH  
1 % SDS

**Neutralisierungspuffer**

3 M Kaliumacetat-Lösung, pH 5,5

### 2.8.3 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde im Thermocycler Biometra PCR-Block T gradient durchgeführt. Für die *Genome Walking* PCR wurde die Bibliothek aus genomischen DNA-Fragmenten von *P. somniferum* zusammen mit Adapterprimer (AP1) und genspezifischem Primer sowie der Polymerasemischung Long Enzyme Mix von Fermentas verwendet.

1 µl	Library DNA
5 µl	10x Puffer der Long Enzyme Mix Polymerase
1 µl	Adapterprimer 1
1 µl	A21G11_r1
1 µl	dNTP (je 10 mM)
1 µl	Long Enzyme Mix Polymerase

1.	25 s	94 °C
2.	3 min	72 °C, Schritte 1-2 7 mal wiederholt
3.	25 s	94 °C
4.	3 min	67 °C, Schritte 3 -4 32 mal wiederholt
5.	7 min	67 °C

Folgender Ansatz und folgendes PCR-Programm wurde zur Amplifikation des A21G11 Fragmentes aus cDNA von *P. somniferum* Stängel verwendet:

2,5 µl	cDNA
5 µl	10x Puffer der Ultra <i>Pfu</i> Polymerase
0,5 µl	A21G11_VL3 (100 µM)
0,5 µl	A21G11_VL4 (100 µM)
1 µl	dNTP (je 10 mM)
0,5 µl	<i>Ultra Pfu</i> Polymerase

1.	30 s	95 °C
2.	30 s	45 °C
3.	2 min	72 °C, Schritte 1-3 4 mal wiederholt
4.	30 s	95 °C
5.	30 s	55 °C
6.	2 min	72 °C, Schritte 4 -6 24 mal wiederholt
7.	5 min	72 °C

Für eine Kolonie-PCR mit *Taq*-Polymerase (aus *E. coli* isoliert von J. Ziegler) wurden folgende Bedingungen gewählt:

Bakterienkolonie

2,5 µl	10x Puffer der <i>Taq</i> Polymerase
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,25 µl	vorwärts Pprimer (100 µM)
0,25 µl	rückwärts Primer (100 µM)
0,5 µl	dNTP (je 10 mM)
0,17 µl	<i>Taq</i> Polymerase

1.	3 min	94 °C
2.	30 s	94 °C
3.	30 s	(Primer-Annealing-T – 3 °C)
4.	3 min	72 °C, Schritte 2 -4 25 mal wiederholt

Das Einfügen von Punktmutationen für die ortsgerichtete Mutagenese geschah durch PCR mittels Mutagenese-Primern und der High Fidelity Mix Polymerase von Fermentas. Als Matrize wurde Plasmid-DNA verwendet.

3 µl	Plasmid-DNA
5 µl	10x Puffer der High Fidelity Mix Polymerase
0,5 µl	vorwärts Primer (100 µM)
0,5 µl	rückwärts Primer (100 µM)
1 µl	dNTP (je 10 mM)
0,5 µl	High Fidelity Mix Polymerase

1.	30 s	95 °C
2.	30 s	45 °C (je nach Primer-Paar)
3.	3 min	72 °C
4.	10 min	72 °C

### 2.8.4 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurde mit dem ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing Kit von Applied Biosystems nach der Methode der Kettenabbruchsynthese durch Didesoxynukleotide durchgeführt (Sanger u. a. 1977). Die Fragmentsynthese erfolgte wie im Handbuch angegeben. Der modifizierte Sequenzieransatz sah folgendermaßen aus:

3 µl	Plasmid-DNA
0,5 µl	Big Dye
1,75 µl	5x Puffer von Big Dye
1 µl	Primer (5 µM)
3,75 µl	Wasser

Die so erhaltenen DNA-Fragmente mit Farbstoffmolekülen wurden nach einer Abtrennung des ungebundenen Farbstoffs über Größenausschlusschromatografie im 4-Kapillaren-Elektrophorese Gerät von Applied Biosystems (ABI Prism 3100 Sequencer) aufgetrennt und detektiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit der Software DNA Star Seqman.

### **2.8.5 Ortsgerichtete Mutagenese**

Zur gezielten Mutation von einzelnen Basen wurde die ortsgerichtete Mutagenese verwendet (Weiner u. a. 1994). Je Mutation wurden zwei Primer erstellt, deren Sequenzen sich teilweise überlappten und in diesem Bereich die gewünschte Änderung zur Ausgangssequenz aufwies. Wie im Absatz PCR zum Einfügen von Punktmutationen beschrieben, wurden mutierte Kopien mit Hilfe von Plasmid-DNA erzeugt, die am Ende als doppelsträngige lineare DNA-Fragmente vorlagen. Die Ausgangsplasmide konnten durch Zugabe von 1 µl Restriktionsendonuklease DpnI zur PCR-Reaktion verdaut werden. Da DpnI nur methylierte Schnittstellen erkennt, blieben die in der PCR synthetisierten mutierten Kopien erhalten. Nach einer 1:100 Verdünnung wurde dieser Ansatz in chemokompetente *E. coli* transformiert und mit Ampicillin selektiert. Zur Analyse wurde die Plasmid-DNA verschiedener Klone sequenziert. Nur so konnten Klone identifiziert werden, die das neue Plasmid mit der Mutation trugen.

### **2.8.6 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pCR2.1 verwendet. Für eine spätere heterologe Überexpression des Gens wurde umkloniert in den Vektor pQE32. Sofern nicht anders angegeben wurde Molecular Cloning (Sambrook u. a. 1989) und *Current Protocols of Molecular Biology* (Ausubel u. a. 1994) als Anleitung genutzt.

### **2.8.7 Restriktion, Fällung und Fragmentreinigung**

Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte wie vom Hersteller angegeben und im temperiertem Wasserbad über 2 h oder über Nacht. Zur Erhöhung der DNA Konzentration

oder zur Umpufferung wurde DNA mit Ethanol und Natriumacetat-Lösung gefällt. Zur Gelelution wurde der gesamte Restriktionsansatz mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ausschneiden der Banden wurde unter UV-Licht durchgeführt und die Gelelution erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen laut Herstellerprotokoll.

Restriktionsansatz	
3 µl	Plasmid-DNA
1 µl	Enzym
1,5 µl	10x Puffer
auf 15 µl mit Wasser auffüllen	
Ethanolfällung	
0,1 Volumen	3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5)
2 Volumen	Ethanol

### 2.8.8 *Ligation*

Zum Verknüpfen zweier doppelsträngigen DNA Moleküle wurde T4 DNA Ligase von Fermentas nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA Substrate wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt. Zusätzlich zum im Puffer enthaltenem ATP wurde 0,1 mM ATP zugefügt. Die Ligation erfolgte für 16 Stunden bei 12 °C.

### 2.8.9 *Allgemeine Arbeiten mit RNA*

Die Konzentration von RNA-Lösungen wurde wie unter 2.8.1 beschrieben bestimmt. Die Auftrennung und die Visualisierung der RNA Moleküle erfolgte ebenfalls analog.

### 2.8.10 *Isolation von RNA*

RNA aus fein gemörsertem gefrorenem Pflanzengewebe wurde mit Hilfe des Trizol-Reagenzes von Invitrogen isoliert. Dafür wurden 100 mg Pflanzenmaterial mit 1 ml Trizol 10 min gemischt. Die festen Bestandteile wurden abgetrennt durch Zentrifugation für 10 min bei 12 000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge. Die Proteine im Überstand wurden mit 200 µl Chloroform für 5 min extrahiert. Nach Zentrifugation bei 12 000 xg und 4 °C in der Beckmann Tischzentrifuge wurde die phenolische Phase mit 300 µl Natriumcitrat/Natriumchlorid-Lösung und 300 µl Isopropanol versetzt. Bei Raumtemperatur wurde für 10 min die RNA gefällt. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 12 000 g und 4 °C in der Beckmann Zentrifuge wurde das Pellet noch zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen.

Am Ende wurde das getrocknete RNA Pellet in 20 µl Wasser aufgenommen und mit 0,2 µl RNase Inhibitor Lösung versetzt. Um einen Abbau der RNA zu vermeiden wurden alle Puffer und Lösungen aus DEPC-behandeltem Wasser hergestellt.

DEPC-Wasser  
0,1 % (v/v) DEPC in dest. Wasser  
über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen,  
autoklavieren

Natriumcitrat/ Natriumchlorid-Lösung  
0,8 M Na-Citrat  
1,2 M NaCl

### 2.8.11 Reverse Transkription

Aus *P. somniferum* Stängel-, Kapsel-, Blatt- und Wurzelgewebe sowie aus *P. somniferum* Papaverin Stängeln wurde RNA isoliert. Diese wurde mit Hilfe von MLV Reverse Transcriptase (Amplifikation von A21G11) oder Superscript II Transkriptase von Invitrogen (*real time* PCR) und Oligo(dT)<sub>18</sub> Primern nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Zuvor wurden Verunreinigungen der RNA Präparation mit genomischer DNA durch 15 minütigen Verdau mit DNase I beseitigt. Das Programm für die Thermocycler sah folgendermaßen aus:

Nur RNA und Primer  
5 min 65 °C  
Zugabe von Puffer dNTP und reverser Transkriptase  
50 min 42 °C  
15 min 70 °C

### 2.8.12 Quantitative real-time RT-PCR

Quantitative real-time reverse transcription PCR wird zur Bestimmung der DNA-Menge einer bestimmten Sequenz verwendet. Sie basiert auf einer PCR, die spezifisch die zu messenden DNA Moleküle amplifiziert. Dabei kann durch eine Sonde (hier Sybr Green), die sich an die einzelsträngige DNA sequenzspezifisch anlagert und fluoreszenziert, die DNA-Menge während der einzelnen PCR-Zyklen gemessen werden. Im Vergleich zur Amplifikation eines Referenzgens kann man die Menge der untersuchten DNA als x-faches des Referenzgens angeben. Da hier die RNA-Menge untersucht werden sollte, wurde die RNA mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe 2.8.11) und diese quantifiziert.

Die Primersequenzen für die PCR wurden anhand eines Sequenzvergleiches der Gensequenzen der Methyltransferasen aus *P. somniferum* und mit der Primer Express

Software von Applied Biosystems ausgewählt. Wichtig war hierbei, dass die Sequenzen aus Bereichen stammen, die viele Unterschiede zu den anderen OMTs zeigten und das die Schmelztemperaturen der ca. 100 bp langen Amplifikate ungefähr bei 70 °C lagen. Nach Vorversuchen wurde der Elongationsfaktor 1 aus *P. somniferum* als Referenzgen ausgewählt, da dieses gleichmäßiger als das ebenfalls getestete SUMO in den verschiedenen Organen exprimiert wird. Die Detektion der doppelsträngigen DNA-Moleküle während der Amplifikation erfolgte durch Bindung des Farbstoffs *Sybr Green* von Applied Biosystems (Morrison u. a. 1998). Die Menge der DNA wurde durch Fluoreszenzmessung mit dem Gerät Mx 3005P QPCR System (Stratagene) bestimmt. Die Bestimmung des Ct-Wertes (cycle-threshold) erfolgte im Anfangsbereich der linearen Amplifikation. Aus der Differenz der Ct Werte (Ct des gemessenen Gens – Ct des Referenzgens) wurde die xfache Expression des Gens über die Gleichung:  $\text{relative Expression} = 2^{\Delta\text{Ct}}$  berechnet. Dabei geht man davon aus, dass jeder Zyklus der PCR zu einer Verdopplung der jeweils spezifisch amplifizierten DNA geführt hat. Jeder Wert besteht aus 2 biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten. Um die Vergleichbarkeit mit dem Referenzgen zu gewährleisten, wurden alle Gene gemeinsam auf einer 96er Platte gemessen. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung des DNase-Verdaues diente eine Probe mit RNA nach dem DNase Verdau, die aber nicht mit Transkriptase behandelt worden ist. Je Reaktion wurden 20 ng transkribierte RNA, 1 pmol je Primer und 5 µl *Sybr Green* verwendet. Folgendes Programm wurde für die Amplifikation verwendet:

Denaturierung	95 °C 10 min;
Amplifikation (40 Zyklen)	95 °C 30 s Annealing 60 °C 30 s Amplifikation 72 °C 30 s
Schmelzkurve	95 °C 1 min, Aufheizung mit 0,1 K/s. 60 °C 30 s

## 2.9 Proteinbiochemische Methoden

### 2.9.1 Herstellung von rekombinantem Protein in *E.coli*

Zur Expression des *P. somniferum* Gens wurden die entsprechenden *E.coli* Klone aus einer Glycerinkultur in LB-Medium als Über-Nacht-Kultur angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden die Hauptkulturen, 800 ml im 2 l Erlmeierkolben, im Verhältnis 1:60 angeimpft. Nach Inkubation der Hauptkulturen für 4 h bei 37 °C und 150 rpm war eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht.

Die Kulturen konnten auf 4 °C gekühlt und mit 1 mM IPTG induziert werden. Die Bakterien wurden jetzt bei 4 °C und 150 rpm geschüttelt. Nach 5 Stunden konnten die Zellen pelletiert werden. Das erfolgte bei 4 °C und 10000 rpm für 20 min in der Sorvall-Zentrifuge. Die Induktion der Proteinexpression wurde auch bei höheren Temperaturen versucht, dabei wurde aber kein aktives lösliches rekombinantes Protein erhalten. Die Ausbeute bei der Induktion bei 4 °C lag bei etwa 2 g bakterielles Pellet pro Liter Kultur. Das Pellet wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

### 2.9.2 *Reinigung von rekombinantem Protein*

Das Protein wurde über den Hexa-Histidin-tag gereinigt mit Hilfe von Metall-Affinitätschromatografie (*Immobilized metal affinity chromatography*, IMAC, (Porath u. a. 1975). Dafür wurde das System von Clontech benutzt, bei dem Cobaltionen vierfach von einem Chelator koordiniert gebunden sind, der Chelator wiederum ist kovalent an eine Agarosematrix gebunden (Talonmatrix). Diese Talonmatrix wurde mit dem Rohextrakt zusammen inkubiert um das Protein zu binden. Die Stickstoffe am Histidin müssen protoniert sein um die Cobaltionen zu komplexieren. Daher liegt der pH-Wert des Bindepuffers über dem  $pK_a$  Wert der Histidinseitenkette von 6. Die Elution erfolgt durch eine Verdrängung des Proteins aus dem Komplex mit den Cobaltionen über steigende Imidazolkonzentrationen im Puffer, da Imidazolmoleküle selbst Cobaltionen komplexieren können.

Das gefrorene Bakterienpellet (5 g) wurde mit Aufschlusspuffer (45 ml) aufgetaut und mit einem Glasstab resuspendiert. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Es folgte ein Ultraschallbehandlung für 3 x 20 Sekunden. Die Proben wurden dann bei 3300 xg 20 min zentrifugiert, der erhaltene Überstand war der Rohextrakt. Der Rohextrakt wurde mit gewaschener Talonmatrix für 1 h geschüttelt, wobei für 1 g Bakterien ca 100 µl Matrix verwendet wurden. Dabei bildet der 6 fache Histidin-Tag des rekombinanten Proteins einen Komplex mit den Cobaltionen der Matrix. Die Matrix wurde bei 700 g für 2 min abzentrifugiert und 2 mal mit 50 ml Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wurde das Pellet in 5 ml Waschpuffer mit 5 mM Imidazol aufgenommen und in eine leere Säule gefüllt. Damit wurden schwach an die Matrix gebunden Proteine entfernt. Nach dem Durchtropfen des Puffers wurde das Säulenbett mit Waschpuffer mit 200 mM Imidazol überschichtet. Je nach Bindungsstärke des Histidin-Tags an die Cobaltionen der Matrix muss mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Imidazol gearbeitet werden, damit das Protein aus dem Komplex

mit Cobalt gedrängt wird. Das A21G11 Protein konnte ab etwa 20 mM Imidazol eluiert werden. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen. Eine Entsalzung erfolgte mit PD-10-Säulen (Größenausschlußchromatografie), letztlich lag das Protein in Phosphatpuffer mit pH 7,5 und 20 % Glycerin vor. So wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Aufschlusspuffer	
50 mM	Phosphatpuffer, pH 7,0
300 mM	NaCl
20 % (v/v)	Glycerin
1 mM	2-Mercaptoethanol
1 % (v/v)	Tween 20
0,75 mg/ml	Lysozym
0,3 µl/ml	DNase I
Waschpuffer	
50 mM	Phosphatpuffer, pH 7,0
300 mM	NaCl
20 %	Glycerin

### 2.9.3 Denaturierende Gelelektrophorese

Für die Größenanalyse des denaturierten Proteins wurde eine SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli 1970). Die Proteinproben wurden 1:1 mit 2x Probenpuffer vermischt und 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Die Elektrophorese wurde für 20 min bei 15 mA pro Gel (15 x 7 cm), danach für 40 min bei 30 mA pro Gel gefahren.

Polyacrylamidgel	
Startgel (3,75 ml)	
4 % (w/v)	Acrylamid (aus Rotiphoresegel 30 %, Roth, Acrylamid:Bisacrylamid 27,5:1)
0,125 M	TRIS-HCl, pH 6,8
0,05 % (v/v)	TEMED
0,3 % (w/v)	APS-Lösung
Trenngel (5,3 ml)	
10 % (w/v)	Acrylamid (aus Rotiphoresegel 30 %, Roth, Acrylamid:Bisacrylamid 27,5:1)
0,375 M	TRIS-HCl, pH 8,8
0,05 % (v/v)	TEMED
0,3 % (w/v)	APS-Lösung
2x Proteinladepuffer	
0,250 mM	TRIS-HCl, pH 6,8
4% (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerin
10 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
0,001 % (w/v)	Bromphenolblau
Proteingelelektrophoresepuffer	
192 mM	Glycin
25 mM	TRIS, pH 8,3
0,1 % (w/v)	SDS

Das im Acrylamidgel aufgetrennte Protein wurde entweder mit Coomassie Brilliantblau oder der schnellen Silberfärbung gefärbt wie in *Current Protocols of Molecular Biology* (Ausubel u. a. 1994) beschrieben.

## 2.9.4 Westernblot Analyse

Der Westernblot wurde halbtrocken durchgeführt (Kyhse-Anderson 1984). Zum Blotten wurden Schwämme, Filterpapier, Membran und Gel in Blotpuffer eingeweicht. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Kathode, Schwamm, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Polyacrylamidgel, Filterpapier, Schwamm, Anode. Geblottet wurde 2,5 Stunden bei 50 mA. Die Anfärbung des geblotteten Proteins erfolgte durch kurzes Schwenken der Membran in Fast-Green-Lösung gefolgt von Waschen mit Wasser. Zum Blockieren wurde der Blot für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer geschüttelt. Die Detektion des His-tags erfolgte durch Inkubation mit 1:10.000 in der Blockierlösung verdünntem Anti-His-tag Antikörper (Novagen) für 4 h bei Raumtemperatur. Nach 4maligem Waschen mit TBST-Puffer erfolgte die Erkennung des primären Antikörpers mit einem 1:10.000 verdünntem Anti-Maus-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war. Der Blot wurde für 1 Stunde geschüttelt und dann 4 mal mit TBST-Puffer gewaschen. Für die Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde die Membran in TBS pH 9,5 mit 5 mM Magnesiumchlorid inkubiert. Es folgte die Zugabe von 4,5 µl NBT-Lösung und 3,5 µl BCIP-Lösung pro ml Reaktionspuffer. Unter diesen Bedingungen kann die Alkalische Phosphatase das Phosphat aus dem Substrat BCIP abspalten, welches danach mit NBT einen Indigofarbstoff bildet. Sobald die Färbung von Banden zu sehen waren, wurde mit TE-Puffer gestoppt und der Blot eingescannt.

Elektroblotpuffer, pH 9,1	
6,1 g	TRIS
28,84 g	Glycin
1,5 g	SDS
20 %	Methanol
Fast-Green-Lösung	
1 % (v/v)	Essigsäure
0,1 % (w/v)	Fast Green
TBST-Puffer	
20 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
0,05 %	Tween 20
TBS-Puffer	
20 mM	TRIS-HCl, pH 9,5
150 mM	NaCl

NBT-Lösung	
75 mg/ml	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
70 % (v/v)	Dimethylformamid
BCIP-Lösung	
50 mg/ml	5-Brom- <i>O</i> -4-chlor- <i>O</i> -3-indolylphosphat
in Dimethylformamid	
TE Puffer, pH 8,0	
1 mM	EDTA, pH 8,0
10 mM	TRIS-HCl, pH 8,0

### 2.9.5 Größenausschlusschromatografie

Zur nativen Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen wurde das FPLC System Äkta Explorer verwendet. Als Säule diente Superdex 200 von Amersham Bioscience mit einem salzhaltigem Laufpuffer von pH 7. Die Flußrate betrug 1 ml/Minute und das Totvolumen der Säule etwa 43 ml.

Zur Eichung der Säule wurden Proteinlösungen von Ferritin, Lysozym, Rinderserumalbumin und Ovalbumin verwendet. Die Detektion des eluierten Proteins erfolgte photometrisch bei 280 nm und die Konzentration wurde nachfolgend fraktionsweise mittels Bradford Test bestimmt. Zur weiteren Analyse wurde ausgewählte Fraktionen mit SDS-PAGE analysiert, die Banden wurden mit Silber gefärbt (siehe 2.9.3). Außerdem wurden die Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen der Methyltransferase mit dem radioaktiven Enzymtest bestimmt.

Laufpuffer	
50 mM	Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
300 mM	NaCl
20 %	Glycerin

### 2.9.6 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität von Methyltransferasen wurde in *stopped assays* bestimmt. Die Dauer der Reaktion wurde so ermittelt, dass etwa im *steady state* Bereich der Produkt-Zeit-Kurve gestoppt wurde. Die Detektion erfolgte entweder photometrisch nach chromatografischer Auftrennung oder durch Messung der Radioaktivität in der organischen Phase bei Verwendung eines markierten Kofaktors.

Der Enzymtest selbst wurde immer wie folgt verwendet:

Gesamtvolumen	80 µl
Enzym	4,2 µg
Substrat	12 nmol
Kofaktor	20 nmol
Phosphatpuffer	50 mM, pH 7,5
Ascorbat	100 mM, pH 9

Der Assay wurde durch Zugabe des Kofaktors gestartet. Nach exakt 180 s Inkubation bei 35 °C wurde der Test durch Zugabe von 100 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung (pH 9,3) und 200 µl Ethylacetat und sofortiges Mischen gestoppt. Die Extraktion mit Ethylacetat erfolgte für 30 s auf dem Vortex. Dadurch konnte zum einen das Protein abgetrennt werden und um zum anderen erfolgte eine Trennung von hydrophilem SAM, welches ebenfalls in der wässrigen Phase blieb und dem Substrat und seinem Produkt, welche durch die Erhöhung des pH-Wertes auf über 9 nun deprotoniert vorlagen und in die organische Phase übergingen. Die organische Phase wurde dann entweder in der HPLC eingesetzt oder im Scintillationszähler gemessen. Die Reproduzierbarkeit wurde durch zwei- oder dreifach Bestimmungen überprüft.

### 2.9.7 *Scintillationsmessungen*

Die in Ethylacetat extrahierten radioaktiv markierten Proben (100 µl) wurden mit 4 ml Scintillationscocktail Ultima GOLD MV von Perkin Elmer vermischt und für eine Minute im Beckman Coulter Scintillationszähler gemessen. Von diesen Werten wurde der aus Messungen ohne radioaktives SAM erhaltene Wert als Hintergrund abgezogen.

### 2.9.8 *Analytische Umkehrphasen-HPLC*

Die Auftrennung von Benzylisochinolinolen erfolgte durch RP-HPLC auf der Säule Lichrospher 60 RP-select B von Merck (250 x 4 mm, 5 µm). Die Detektion erfolgte bei 282 nm mittels DAD. Der Laufmittelgradient setzt sich wie folgt zusammen: Laufmittel A (Wasser/ Acetonitril, 98/2 (v/v)) und Laufmittel B (Acetonitril/Wasser, 98/2 (v/v)) enthalten 0,1 % (v/v) Ameisensäure,

Zeit in min	Laufmittel B in %
0	0
25	46
30	46
32	100
35	100
46	0

Die Benzylisochinolinalkaloid-Lösungen, die sich in der Abteilung Naturstoffbiotechnologie befanden, wurden als Standards genutzt, nachdem sie mittels LC-MS hinsichtlich ihrer Identität geprüft worden waren.

## 2.9.9 LC-MS

Die LC-MS Analysen sind von Dr. Robert Kramell (IPB, Abt. NBT) durchgeführt worden. Dabei wurde ein Mariner TOF Massenspektrometer von Applied Biosystems mit einer Turboion Spray Source (PE-Sciex) und einem LC1100 series Agilent system mit der Säule Supersphere 60 RP-Select B (125 x 2 mm, 5 µm) von Merck bei einer Flussrate von 0,2 ml pro min genutzt. Als Laufmittel wurde ein Acetonitril:Wasser-Gradient verwendet (A: 2:98 und B: 98:2, beide mit 0,2% (v/v) Ameisensäure, 0 % bis 46 % B in 25 min, auf 90 % B in 1 min, 90 % B für 7 min, 0 % B für 5 min). Das Mariner TOF Massenspektrometer wurde im positiven Ionenmodus mit einer Elektronenspray-Spannung von 5,5 kV, einer Heiztemperatur von 360 °C und einer Quadrupol-Temperatur von 140 °C betrieben. Die Düsenspannung lag bei 200 V, die Spannung des Detektors bei 1,95 kV.

## 2.10 Synthese von Norcoclaurin

Die Herstellung von Norcoclaurin wurde in 2 Schritten durchgeführt. In der ersten Synthese nach Parikh und Doering wird aus 2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol das 2-(4-Hydroxyphenyl)-acetaldehyd hergestellt (Parikh und Doering 1967). Letzteres wurde mit Dopamin unter wässrigen, sauren Bedingungen zu Norcoclaurin und Nebenprodukten umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst extrahiert und über eine präparative Umkehrphasen-Chromatografie gereinigt. Anschliessend wurde das vorgereinigte Gemisch über die analytische Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Aufgrund der geringen Menge konnte nur das Massenspektrum und die molekulare Masse durch LC-MS bestimmt werden. Die Konzentration der Norcoclaurin-Lösung wurde durch Vergleich der Absorption mit einer Norretikulin-Lösung bestimmt, unter der Annahme, dass beide Substanzen in etwa den selben Extinktionskoeffizienten haben.

### 2.10.1 Synthese von 2-(4-Hydroxyphenyl)-acetaldehyd

Die Synthese erfolgte wasserfrei in einem 100 ml Rundkolben bei Raumtemperatur unter Rühren.

1,25 g	2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol, in 20 ml DMSO gelöst
7,2 ml	Triethylamin
3,8 g	SO <sub>3</sub> -Pyridin-Komplex, in 20 ml DMSO gelöst

Nach 45 min wurde das Gemisch mit 1 N HCL auf pH 4-5 angesäuert und mit 5 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt. Als nächstes wurde es 4 mal mit 100 ml Diethylether extrahiert. Der Diethylether wurde bei 45 °C und bis 85 mbar einrotiert. Das entstandene gelbe Öl wurde für die weitere Synthese verwendet.

Zum Nachweis wurde die Verbindung mit LC-MS und Dünnschichtchromatografie analysiert. Die LC-MS-Analyse wurde von Martina Lerbs (IPB, Abt. NWC) durchgeführt. In der Dünnschichtchromatografie wurde auf einer Silicagel Platte 60 F<sub>254</sub> mit dem Laufmittel Ethylacetat-Hexan (2:1) das Produkt und das Substrat getrennt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht.

### 2.10.2 *Synthese von Norcoclaurin*

Die Herstellung von Norcoclaurin erfolgte unter Rühren bei Raumtemperatur. Folgende Verbindungen wurden für eine Stunde inkubiert:

5 ml	Wasser
5 ml	Citratpuffer, 0,5 M, pH 5,5
7 ml	Ascorbinsäure, 0,5 M
1,52 mg	Dopamin (Sigma)
3 ml	2-(4-Hydroxyphenyl)-acetaldehyd als gelbes Öl

Das Gemisch wurde mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 9 gebracht und 4 mal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde einrotiert und die Reaktionsprodukte wurden zuerst mit Dünnschichtchromatografie und dem Laufmittel Methanol:H<sub>2</sub>O:Acetat überprüft. Die Detektion erfolgte mit Ninhydrinlösung und darauf folgendem Erhitzen (Kaiser u. a. 1970).

### 2.10.3 *Präparative Umkehrphasen-HPLC*

Das Gemisch mit Norcoclaurin wurde auf der HPLC von Waters mit der Säule 250-10 Nuceosil 100-5 C18 aufgetrennt. Die verwendeten Laufmittel waren Acetonitril (B) und Wasser (A) mit je 1 % (v/v) Essigsäure. Bei einer Flußrate von 3 ml/min wurde folgender Gradient verwendet:

Zeit in min	Laufmittel B in %
0	0
40	46
50	100
55	100
56	0
60	0

Die Fraktion bei 25 min wurde aufgefangen, mit NaCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 9 gebracht und mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde einrotiert und mit der analytischen HPLC weiter aufgetrennt.

## 2.11 Methoden der Computerchemie

### 2.11.1 Erstellung von Homologie Modellen

Zur Erstellung eines Homologie Modells wurden zunächst Strukturen bekannter Proteine mit hoher Sequenzähnlichkeit in der nicht redundanten NCBI Datenbank mit blastp (Altschul u. a. 1990) gesucht. Die Sequenzen der gefundenen Strukturen wurden in MOE (*Molecular Operating Environment, Molecular Modelling* Programmpaket) mit der zu modellierenden Sequenz verglichen. Konservierte Bereiche konnten mit der Matrix BLOSUM40 (BLOcks SUBstitution Matrix, (Henikoff und Henikoff 1992)) identifiziert werden. Die Qualität des Alignments wurde durch Wiedererkennung der bereits bekannten konservierten Sequenzen im Bereich der Kofaktorbindung bewertet. Der Sequenzvergleich der *Papaver* OMTs mit der IF7OMT (pdb Code: 1FP2) wurde dann für die Erstellung des Homologie Modells in MOE verwendet. Die Röntgenstruktur von 1FP2 diente als Grundlage. Um beide Ketten des Dimers modellieren zu können, wurden die *symetry mates* aus der pdb Datei verwendet. Die erstellten Modelle wurde hinsichtlich ihrer sterischen Qualität bewertet. Neben den im Ramachandranplot dargestellten Phi- und Psi-Winkeln wurden auch Bindungslängen, Planarität von aromatischen Systemen und die Überlappung atomarer Van-der-Waals-Radien betrachtet. Nach der Auswahl eines geeigneten Modells wurde dieses optimiert. Dazu wurden entweder Bereiche des Proteins energetisch minimiert, manuelle Drehungen um Einfachbindungen oder kurze Molekül Dynamik Simulationen durchgeführt. Zur Energieminimierung wurde das Kraftfeld Amber99 (Wang u. a. 2000) und seine Partialladungen mit einem Energiegradienten bis minimal 0,01 kcal/mol im Programm MOE benutzt. Die Molekül Dynamik Simulationen wurden bei 300 K im NPT Modus mit einer Aufheiz- und Abkühlphase von 30 K mit 30 Schritten durchgeführt. Die Qualität wurde wieder anhand der oben erwähnten sterischen Parameter oder auch durch Vergleich der potentiellen Energie abgeschätzt. Als Vergleich diente die Röntgenstruktur der Modellierungsgrundlage, 1FP2, welche vorher protoniert und kurz energetische minimiert worden ist. Zusätzlich zu den in MOE enthaltenen Werkzeugen sind auch Procheck (Protein-Struktur und

Geometrie Evaluierung, (Laskowski u. a. 1993) und PROSA mit Z-score (*Protein Structure Analysis*, (Sippl 1990) verwendet worden.

Der Kofaktor (*S*)-Adenosyl-L-methionin (SAM) wurde zunächst der Röntgenstruktur von 1FP2 entnommen. Dazu wurde das Homologiemodell mit der Röntgenstruktur überlagert und der Kofaktor an die entsprechende Stelle in das Homologiemodell eingefügt. Der Kofaktor musste hinsichtlich der Stereochemie und der Bindungslängen korrigiert werden. In der Röntgenstruktur war die Kohlenstoffbindung zwischen dem Zucker- und dem Aminosäureteil von SAM sehr kurz, was zu einer Erkennung als Doppelbindung führte und damit auch das vorhandene Stereozentrum nicht wiedergeben konnte. Die Partialladungen wurden semiempirisch mit den Parametern von AM1-BCC (Jakalian u. a. 2000) aus der Software MOE berechnet, da mit den Kraftfeld-eigenen Ladungsberechnungen kein schlüssiger Wert für das Schwefelatom erzielt werden konnte. Während der Energieminimierung wurde die Neuberechnung der Partialladung deaktiviert.

### **2.11.2 Generierung der Datenbank potentieller Substratstrukturen**

Nach der Identifizierung der Enzymklasse wurde zusammen mit der Information aus dem Expressionsverhalten des Gens eine Liste mit potentiellen Substraten zusammengestellt. In der Datenbank befinden sich 96 Strukturen, unter ihnen alle methylierten und unmethylierten Derivate von Laudanosolin und Norcoclaurin, zusätzlich die Morphinan-Strukturen, die in der Morphinbiosynthese vorkommen, einige Flavonoide und Phenole (Liste im Anhang). Die Strukturen wurden in MOE generiert und in den zwei enantiomeren Formen (*R*- oder *S*-Konfiguration am C10) in einer Datenbank gespeichert. Danach erfolgte ein Energieminimierung in Sybyl (*Molecular Modelling* Programmpaket). Verwendetes Kraftfeld war Tripos (Clark u. a. 1989), die Partialladungen wurden nach Gasteiger-Hückel berechnet.

### **2.11.3 Docking**

In die Proteinmodelle wurden die Strukturen der Substratdatenbank mit dem Programm GOLD (*Genetically optimised Ligand docking*, (Jones u. a. 1995) gedockt. GOLD verwendet einen genetischen Algorithmus um die verschiedenen Konformationen der Liganden und die Position zum Protein zu generieren. Die Aminosäureseitenketten wurden nicht bewegt. GOLD wurde mit den Standardeinstellungen verwendet, die Anzahl der Konformationen pro Ligand

wurde auf 10 beschränkt und ein vorzeitiges Abbrechen der Suche bei guter Übereinstimmung der RMSD Werte nach drei Lösungen war möglich. Die Generierung und Bewertung der Konformationen erfolgte mit GOLDScore. Als geometrischer Ausgangspunkt wurde das N $\delta$  von Histidin 263 in A21G11 verwendet. Der Radius der Suchsphäre betrug 15 Å.

In einem weiteren *docking* Versuch, bei dem mehr unterschiedliche Posen generiert werden sollten, wurden die Substrate (*S*)-Norcoclaurin, (*S*)-Norretikulin und (*S*)-Retikulin verwendet. Je Ligand wurden 50 verschiedene Konformere generiert, die wieder in einer Sphäre mit dem Radius von 15 Å um das katalytisch aktive Stickstoffatom von His 263 positioniert werden konnten.

#### 2.11.4 *Abbildungen von Modellen*

Die Vermessung der Connolly Oberflächen der A21G11 wurden mit MOE vorgenommen (Connolly 1983), die logP Projektion auf eine solche Fläche wurde mit Sybyl MOLCAD (Heiden u. a. 1993) erstellt. Die übrigen Abbildungen der Strukturmodelle sind mit Pymol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA) erzeugt worden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vergleich von ESTs in verschiedenen *Papaver* Arten

Die Biosynthese von Benzylisochinolin in *P. somniferum* wird seit vielen Jahren untersucht. Neben der Identifizierung und Strukturaufklärung von Alkaloiden stehen auch die Enzyme, die diese Verbindungen synthetisieren, im Vordergrund. Es sind bereits zahlreiche Biosynthesewege mit den dazugehörigen Enzymaktivitäten und teilweise auch den Gensequenzen bekannt (Facchini et al. 2007). Durch die Analyse von Teilen exprimierter Gene (*expressed sequence tags*, ESTs) kann man Informationen über aktive Gene erhalten. ESTs ermöglichen den Vergleich der Expressionsniveaus unbekannter Gene zwischen verschiedenen Organen, Entwicklungszuständen oder Arten. Es wurden über 2000 einzigartige ESTs aus dem oberen Stängel von *P. somniferum* isoliert und sequenziert (Ziegler u. a. 2005). In dieser differenziellen Genexpressionsanalyse wurden die Expressionsniveaus der ESTs aus *P. somniferum* zwischen 16 verschiedenen *Papaver* Arten und mehreren *P. somniferum* Varietäten und Mutanten verglichen (Spalten, Abbildung 10), die sich in ihrer Fähigkeit zur Produktion von Alkaloiden stark unterscheiden. Das Expressionsniveau wurde in *Reverse Northern Blots* durch Hybridisierung der markierten *Papaver* Stängel mRNA mit den auf eine Membran aufgebrachten ESTs ermittelt. Nach Normalisierung und Logarithmierung der Werte wurden diese mit Hilfe der Pearson Korrelation gruppiert. Die Auflistung der untersuchten *Papaver* in den Spalten ist sortiert nach dem Vorkommen von Morphinanen, links morphinanhaltige *Papaver*, rechts *Papaver* ohne Morphinane. Die hier dargestellten ESTs (Zeilen, Abbildung 10) fallen in eine Gruppe, welche aufgrund der ähnlichen Expression in den verschiedenen *Papaver* gebildet worden ist. Die Gruppierungen der ESTs nach ihren Expressionsmustern wurden als Stoffwechselcluster interpretiert. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass eine ähnliche Regulierung der Expression auf die Beteiligung an einem ähnlichen Biosyntheseweg hindeutet. Das dargestellte Cluster weist eine stark erhöhte Expression in den morphinan-synthetisierenden *Papavern* *P. som.*, *P. som. Nopa*, *P. som. Noscapin*, *P. som. Papaverin*, *P. som. Fool ori* und *P. som. top1* auf. Die ESTs bekannter Benzylisochinolinbiosynthesegene (mit roten Nummern) gruppieren sich hier zusammen mit noch nicht identifizierten ESTs (schwarz und grün). Diese unbekanntesten ESTs

könnten für Enzyme oder Regulationsfaktoren der Alkaloidbiosynthese kodieren. Der in dieser Arbeit näher untersuchte EST ist A21G11 (Abbildung 10, Nr. 18).

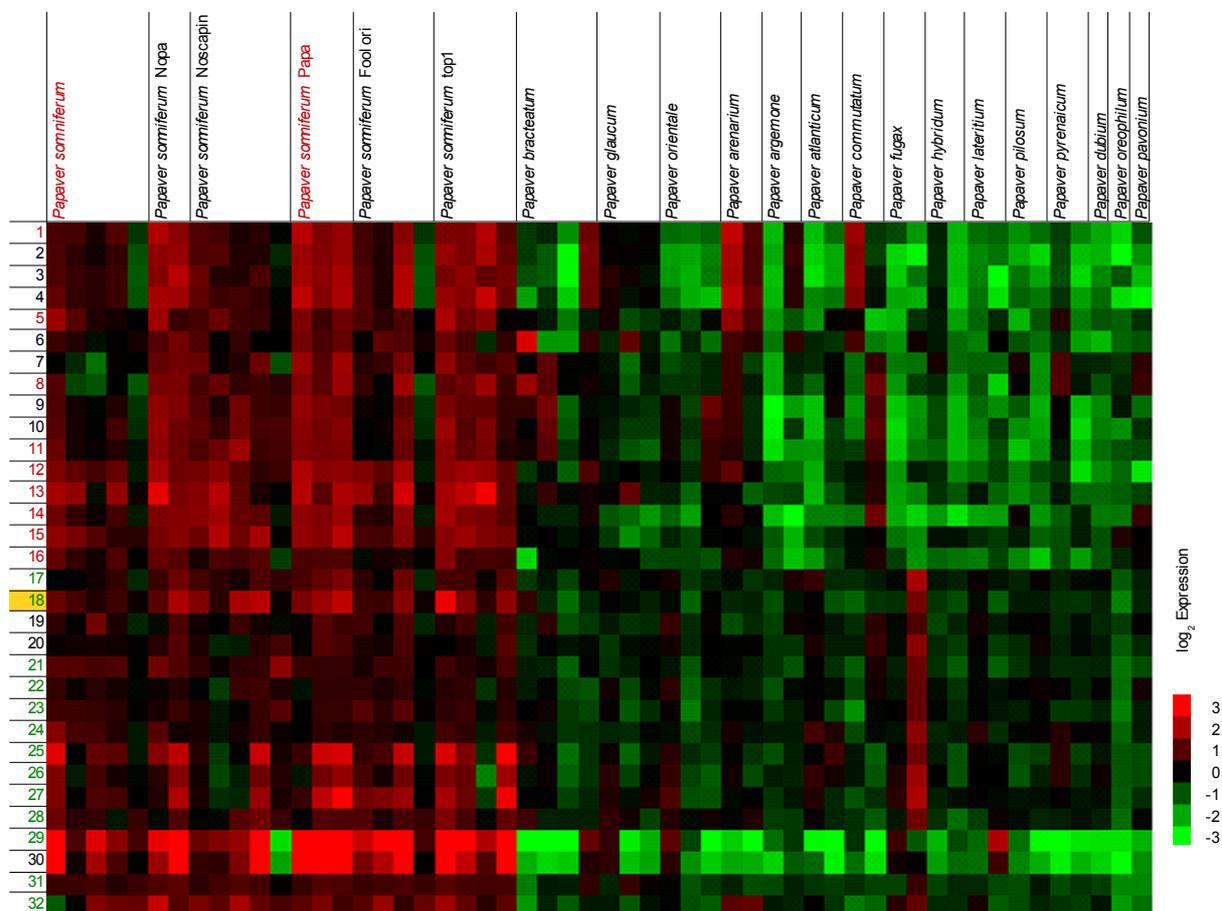


Abbildung 10: Ausschnitt der differentiellen Genexpressionsanalyse (Ziegler u. a. 2006) die die Expressionsniveaus von ESTs aus *P. s.* zwischen verschiedenen *P. s.* Varietäten und *Papaver* Arten vergleicht, hier dargestellt ein Cluster mit bekannten und unbekannt Genen, in Rot ESTs die bekannten Genen der Benzylisochinolin-Biosynthese zugeordnet sind, in Schwarz ESTs die Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen aus Datenbanken zeigen, in Grün ESTs die keine Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen zeigen, darunter der EST A21G11, hier gelb unterlegt als Nr. 18, Die Expressionsstärke wurde als Farbskala dargestellt, Rot bedeutet ein hohes und grün ein niedriges Expressionsniveau  
 1...Cyp80B3; 5...Salutaridinol-7-O-acetyltransferase; 8...Berberinbrückenenzym; 11...Cyb80B1;  
 12...Codeinonreduktase; 13...6OMT; 14...7OMT; 15 4'OMT; 16...Salutaridinreduktase

## 3.2 Identifizierung und Charakterisierung eines neuen *P. somniferum* Gens

### 3.2.1 Ermitteln der Gensequenz durch Genome walking

Der über die differentielle Expressionsanalyse ermittelte EST A21G11 hat eine Länge von 137 bp. Da eine Seite durch eine PolydT Oligomer amplifiziert wurde, handelte es sich dabei

um das 3'-Ende einer cDNA. Zur Vervollständigung der Sequenz wurde *Genome Walking* eingesetzt. Für diese Methode wurden Fragmente genomischer DNA mit Restriktionsenzymen erzeugt. Diese Fragmente wurden mit kurzen Adapteroligomeren ligiert, deren Sequenz bekannt war. Für die *P. somniferum* DNA Bibliothek sind die 4 Restriktionsenzyme *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *StuI* verwendet worden. Durch eine PCR konnten anschließend mit Hilfe nur eines genspezifischen und eines adaptorspezifischen Oligomers unbekannte Fragmente amplifiziert werden, die in direkter Nachbarschaft zu dem bekannten DNA-Stück liegen (Abbildung 11, 1).

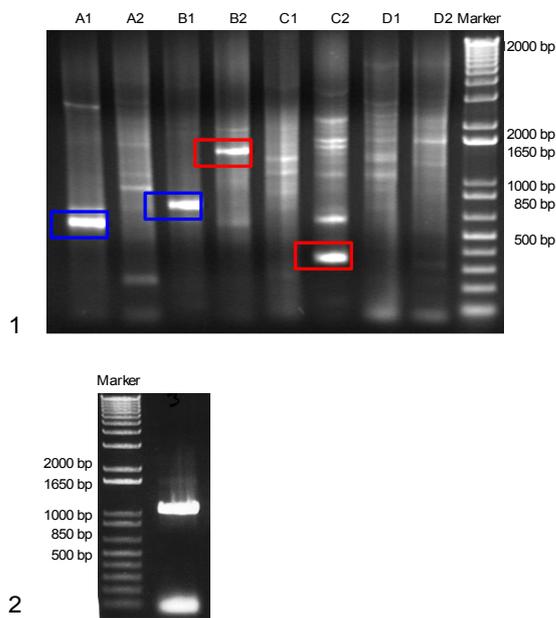


Abbildung 11: PCR-Produkte

(1) *Genome Walking* PCR mit der Bibliothek aus Fragmenten genomischer DNA, dem adaptorspezifischen Primer AP1 und einem genspezifischem Primer

(A2) *DraI* mit Primer A21G11\_GW2

(B1) *EcoRV* mit Primer A21G11\_GW1

(B2) *EcoRV* mit Primer A21G11\_GW2

(C1) *PvuII* mit Primer A21G11\_GW1

(C2) *PvuII* mit Primer A21G11\_GW2

(D1) *StuI* mit Primer A21G11\_GW1

(D2) *StuI* mit Primer A21G11\_GW2,

die Fragmente wurden kloniert und sequenziert, die blau markierten verlängerten die bekannte Sequenz in 5'-Richtung, die rot markierten in 3'-Richtung;

(2) PCR der Amplifizierung der Gesamtsequenz von A21G11 aus cDNA von *P. somniferum* mit Primern A21G11\_V1 und A21G11\_V2 und der Pfu-DNA-Polymerase, die Bande über 1000 bp ist A21G11

Durch Klonierung und Sequenzierung dieser Fragmente konnten neben den unspezifisch amplifizierten jene identifiziert werden, die die Sequenz von A21G11 enthielten und ein Teil der flankierenden Gensequenz. In einem zweiten Schritt *Genome Walking* mit einer weiteren genspezifischen Primer, abgeleitet aus der neuen Sequenz, und dem adaptorspezifischen Primer konnte wieder ein Stück der genomischen DNA Sequenz um den EST A21G11 aufgeklärt werden. Insgesamt wurden 2280 bp zusammenhängende Sequenz gefunden (siehe Anhang). Durch Vergleiche mit Datenbankeinträgen konnte der Start der kodierenden Region beim Basenpaar 145 vermutet werden. An dieser Stelle beginnend und vor dem ersten am 3' Ende vorhandenen Stoppkodon wurden Oligomere zur Amplifizierung der kodierenden Sequenz aus cDNA abgeleitet. Das Amplikon wurde kloniert und sequenziert. Es ergab sich eine Länge der kodierenden Sequenz von 1071 bp (Abbildung 11, 2), die sich auf zwei Exons von 777 und 294 bp Länge aufteilte (siehe Anhang). Der anfangs vorhandene EST befindet

sich in der 3' untranslatierten Region 85 bp abwärts des Stopkodons. Für die Klonierung in den Expressionsvektor wurde das Gen mit Primern, die Restriktionschnittstellen enthielten, amplifiziert.

### 3.2.2 Vergleich der Sequenz mit Datenbankeinträgen

Die von A21G11 erhaltene Sequenzinformation wurde mit dem BLAST Algorithmus mit den

Sequenz	Name	E-value	Score
gi 33286374 gb AAQ01669.1	(R,S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase [Papaver somniferum]	6,00E-031	138
gi 33413896 gb AAP45315.1	S-adenosyl-L-methionine:norcoclaurine 6-O-methyltransferase [Papaver somniferum]	7,00E-030	118
gi 51980202 gb AAU20765.1	(S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase; 6OMT [Thalictrum flavum]	7,00E-025	118
gi 17366954 sp Q9LEL6	(RS)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase (6-OMT) [Coptis japonica]		117
gi 51980208 gb AAU20768.1	3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase; 4'OMT [Thalictrum flavum subsp. glaucum]	7,00E-022	108
gi 17366950 sp Q9LEL5	3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase (4'-OMT) [Coptis japonica]	2,00E-021	107
gi 33413894 gb AAP45314.1	S-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase 2 [Papaver somniferum]	3,00E-018	96,7
gi 33413892 gb AAP45313.1	S-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase 1 [Papaver somniferum]	8,00E-018	95,1
gi 38047395 gb AAR09600.1	flavonoid 8-O-methyltransferase [Mentha x piperita]	8,00E-015	85,1
gi 2282586 gb AAB71213.1	methyltransferase [Prunus armeniaca]	2,00E-014	84
gi 37777782 gb AAR02422.1	putative O-methyltransferase [Catharanthus roseus]	5,00E-014	82,4
gi 38047401 gb AAR09603.1	O-methyltransferase [Mentha x piperita]	9,00E-014	81,6
gi 26891694 gb AAM97498.1	O-methyltransferase [Catharanthus roseus]	2,00E-013	80,9
gi 16903138 gb AAL30423.1	chavicol O-methyltransferase [Ocimum basilicum]	4,00E-013	79,3
gi 26891692 gb AAM97497.1	flavonoid O-methyltransferase [Catharanthus roseus]	6,00E-013	79
gi 3077640 emb CAA11131.1	O-methyltransferase [Prunus dulcis]	2,00E-012	77,4
gi 37777778 gb AAR02420.1	flavonoid 4'-O-methyltransferase [Catharanthus roseus]	3,00E-012	76,6
gi 28804594 dbj BAC58012.1	S-adenosyl-L-methionine: daidzein 7-O-methyltransferase [Glycyrrhiza echinata]	4,00E-012	76,3

Einträgen der NCBI nicht redundanten Sequenzdatenbank verglichen (Altschul u. a. 1990). Die Ergebnisse der BLAST Suche mit Standardeinstellungen sind in Abbildung 12 dargestellt. Es zeigt sich, dass die höchsten Sequenzähnlichkeiten zu *O*-Methyltransferasen auftreten. Am ähnlichsten ist A21G11 mit 68 % zur 6-*O*-Methyltransferase aus *P. somniferum*. Des weiteren befinden sich in dieser Gruppe OMTs aus *Thalictrum flavum*, *Eschscholzia californica* und *Coptis japonica*. Die ersten acht aufgelisteten Treffer sind OMTs, die Benzylisochinoline als Substrat verwenden. Der *e-value* gibt an, wie wahrscheinlich die gefundenen Sequenzähnlichkeiten zufällig auftreten und ist für die gezeigten Sequenzen mit  $6 \cdot 10^{-31}$  so klein, dass man eine ähnliche Funktion erwarten kann. Der *score* gibt an, wie groß die Sequenzabschnitte sind, in denen eine Übereinstimmung auftritt, da er mit steigender Zahl von Übereinstimmungen ebenfalls steigt.

Abbildung 12: Sequenzvergleich (BLAST) der translatierten cDNA Sequenz mit der NCBI nicht-redundanten Datenbank, die 18 besten Treffer

Ein multipler Sequenzvergleich mit den erwähnten Benzylisochinolin-OMTs wurde mit ClustalW durchgeführt (Abbildung 13, www.multiplealign.org, Corpet 1988). Dabei können typische Merkmale einer OMT an A21G11 identifiziert werden. Es zeigen sich die konservierten Bereiche für die Bindung des Kofaktors SAM. Außerdem sind die katalytische Diade, His 263 und Glu 321, und die sie umgebenden Aminosäuren konserviert. Das Fehlen eines Bindemotivs für zweiwertige Kationen lässt darauf schließen, dass es sich um eine OMT der Klasse II handelt. Zudem kann aus dem Sequenzvergleich die Existenz einer Dimerisierungsdomäne abgeleitet werden, wie sie typisch für pflanzliche OMTs der Klasse II ist.

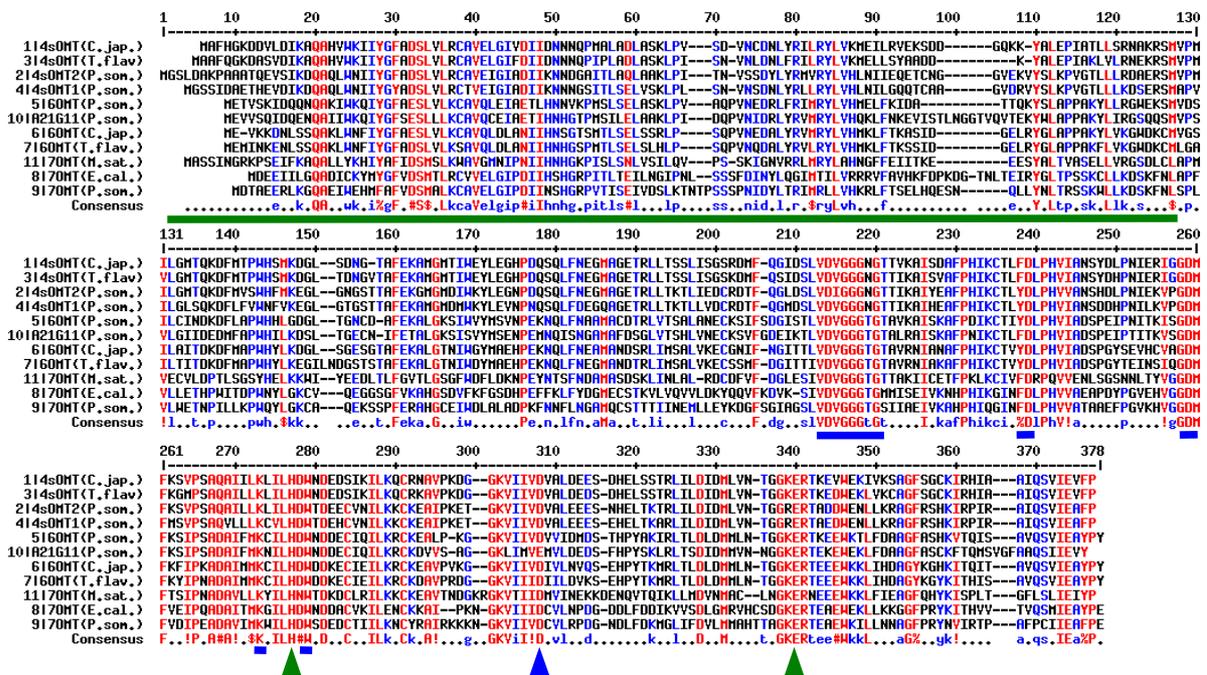


Abbildung 13: multiples Alignment von verschiedenen OMT Sequenzen aus Papaver somniferum, Coptis japonica, Talictrum flavum, Eschscholzia californica und Medicago sativa. In Rot sind Aminosäuren dargestellt, die in allen Sequenzen gleich sind oder dieselbe Funktion haben und in Blau die Aminosäuren, bei denen das für über 50 % der Sequenzen zutrifft. Das multiple Alignment wurde mit Multalign und der Substitutionsmatrix Blossum40 erstellt. Mit einer grünen Linie wurde die Dimerisierungsdomäne unterstrichen, mit Blau die Aminosäuren für die Kofaktorbindung und mit grünen Dreiecken wurden die katalytisch aktiven Aminosäuren markiert.

Die prozentualen Sequenzähnlichkeiten des multiplen Alignments (Tabelle 1) der erwähnten Methyltransferasen in einer Übersicht lassen neue Schlüsse zu. So zeigen die 6OMTs eine hohe Ähnlichkeit untereinander mit 65 bis 84 %. Auch die 4OMTs weisen untereinander eine hohe Ähnlichkeit auf, ebenso wie die beiden 7OMTs. Zu erkennen ist eine Gruppierung nach Substratspezifitäten (Gelb hervorgehoben). Es scheint also einen Zusammenhang zwischen Sequenzähnlichkeit und Substratspezifität zu geben der stärker ist als die Artzugehörigkeit. Im

Allgemeines lässt sich die genaue Substratspezifität einer OMT nicht aus der Sequenz ableiten (Schröder u. a. 2002). Es wurde aber versucht, die Klasse der umgesetzten Verbindungen aus der Sequenz abzuleiten (Joshi und Chiang 1998). Die A21G11 ordnet sich bei den 6OMTs ein und zeigt die meisten Ähnlichkeiten zur 6OMT aus *P. somniferum*. Aufgrund der Sequenz kann man sagen, dass A21G11 wahrscheinlich für eine OMT kodiert, die ein Substrat ähnlich dem Norcoclaurin umsetzen kann.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
	67,5	53,2	55,2	39,8	42,6	46,2	45,4	35,9	34,2	34,7	1	A21G11 ( <i>Papaver somniferum</i> )
		64,5	67,3	50,3	50,9	55,2	54,3	39,3	37,3	38,2	2	6OMT ( <i>Papaver somniferum</i> )
			84,3	47,1	48,6	50,9	51,4	38,9	39,4	40,3	3	6OMT ( <i>Talictum flavum</i> )
				48,5	49,6	50,4	51,3	39,8	38,3	40,1	4	6OMT ( <i>Coptis japonica</i> )
					81,4	62,1	62,4	35,9	36,2	35,6	5	4'OMT 1 ( <i>Papaver somniferum</i> )
						65,5	66,7	36,1	36,4	35,6	6	4'OMT 2 ( <i>Papaver somniferum</i> )
							88,5	37,1	39,1	35,3	7	4'OMT ( <i>Talictum flavum</i> )
								35,7	37,4	34,9	8	4'OMT ( <i>Coptis japonica</i> )
									53,5	35,5	9	7OMT ( <i>Papaver somniferum</i> )
										35,1	10	7OMT ( <i>Eschscholzia californica</i> )
											11	IFOMT ( <i>Medicago sativa</i> )

Tabelle 1: Sequenzähnlichkeiten zwischen den Aminosäuresequenzen der O-Methyltransferasen der Benzylisochinolin-Klasse in %

A21G11, 6OMT = Norcoclaurin-6-OMT, 4'OMT = 3'-Hydroxyl-N-methyl-coclaurin-4'-OMT, 7OMT = Reticulin-7-OMT, IF7OMT = Isoflavon-7-OMT.

In Gelbtönen hervorgehoben die OMTs, die dieselben Substrate umsetzen, in Grün die Ähnlichkeit zwischen A21G11 und 6OMT.

### 3.3 Strukturmodell der putativen OMT

Nach Identifizierung der Sequenz von A21G11 wurde parallel zu den anderen Experimenten versucht, die Funktion des Proteins mit Hilfe von 3D-Modellen zu bestimmen. Der Sequenzvergleich führte zu der Annahme, es handle sich um eine OMT. Weiter konnte aus den Ähnlichkeiten zu Norcoclaurin-6OMT, Reticulin-7OMT und 3'-Hydroxyl-N-methylcoclaurin-4'OMT abgeleitet werden, dass die A21G11 wahrscheinlich ein ähnliches Substrat umsetzt, welches ebenfalls zu den Tetrahydrobenzylisochinolin gehört. Die Tetrahydrobenzylisochinoline sind gekennzeichnet durch verschiedene Hydroxyl- und Methoxygruppen am Grundgerüst aus Tetrahydrosochinolinring und Benzylring. Für alle in der Biosynthese vorkommenden Stufen der O-Methylierung bis zum Reticulin sind die beteiligten Enzyme bekannt. Bei der A21G11 konnte es sich um ein redundantes Enzym

handeln oder eines, was zwar ein Benzylisochinolin methyliert, aber keines innerhalb der bekannten Stoffwechselwege. Auf der Ebene von Norcoclaurin gibt es drei methylierbare Hydroxylgruppen in Position 6, 7 und 4'. Durch eine Hydroxylierung wird eine weitere Hydroxylgruppe an Position 3' eingeführt. Damit ergeben sich in allen möglichen Kombinationen bei 4 Hydroxylgruppen und maximal 3 Methylierungen 15 verschiedene potentielle Substrate. Diese Zahl wird noch verdoppelt durch die Möglichkeit einer N-Methylierung, die in der Biosynthese von Retikulin auf der Stufe des Coclaurins durchgeführt wird. Obwohl N-Methyltransferasen bei der Suche nach ähnlichen Sequenzen nicht auf Spitzenplätzen aufgetaucht sind, soll die Möglichkeit, dass A21G11 für eine NMT kodiert, vorerst noch nicht ausgeschlossen werden. Nur 8 der 30 möglichen Substrate standen im Labor der Abteilung Naturstoffbiotechnologie zur Verfügung. Zusätzlich konnten 3 von 8 möglichen Coclaurinderivaten, die alle keine 4'-Hydroxylgruppe haben, verwendet werden. Davon abgesehen sind auch andere von Benzylisochinolin abgeleitete Verbindungen als Substrate denkbar. Insgesamt waren nicht nur 38 BIAs sondern auch noch 18 weitere Verbindungen, darunter Morphinane und Catechole, von Interesse. Um nun eine Auswahl aus diesen denkbaren Substraten zu treffen, wurde der Weg über ein Modell des Enzyms mit *docking* der Strukturen, gefolgt von einer Bewertung der Passgenauigkeit der Strukturen (*scoring*), gewählt. Zusätzlich bot die dreidimensionale Darstellung der Substratbindetasche einen unschätzbaren Vorteil für eine genauere und gerichtete Manipulation der Enzymaktivität. Die aus der Vorhersage mit den Modellen erhaltenen Ergebnisse und die Resultate der Laborexperimente beeinflussten die weitere Vorgehensweise gleichermaßen.

Das Protein von A21G11 lag nur in geringen Mengen vor, da die Expression in *E. coli* Schwierigkeiten bereitete. Für eine Röntgenstrukturanalyse wäre das problematisch gewesen. Aus diesem Grund wurde ein Homologiemodell erstellt. Dafür wurde eine sequenziell sehr ähnliche schon bekannte 3D-Struktur eines Proteins benötigt. Wenn nur Sequenzen von Proteinen mit bekannter Struktur betrachtet werden, zeigt A21G11 die größte Sequenzähnlichkeit zur Isoflavon-7-OMT aus *Medicago sativa* (PDB-Code: 1FP2) mit 34,7 %. Diese pflanzliche O-Methyltransferase katalysiert die Methylierung der 4'-Hydroxyl- und 7-Hydroxylgruppe der Isoflavone Isoformononetin bzw. (2S,3S)-2,7,4'-Trihydroxylisoflavanon. Das Homologiemodell von A21G11 wurde anhand der Röntgenkristallstruktur von 1FP2 erstellt und konnte soweit verbessert werden, dass in der sterischen Analyse mittels Ramachandranplot nur noch eine Aminosäure, Lys 320, nicht im erlaubten Bereich liegt

(Abbildung 14). Insgesamt liegen 81,2 % der Aminosäuren im bevorzugten phi/psi Winkelbereich und 17,8 % im erlaubten Bereich.

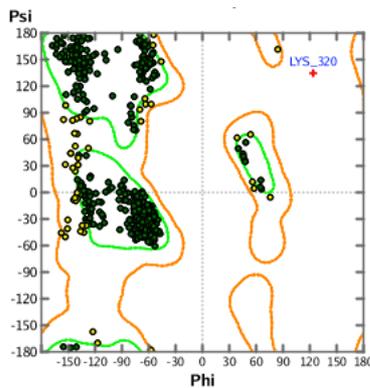


Abbildung 14: Ramachandran Plot des A21G11 Modells  
Abweichungen von den häufig in Proteinstrukturen vorkommenden Winkeln sind rot dargestellt, hier Lysin 320. Die bevorzugten Winkelkombinationen sind grün umrandet und die erlaubten orange.

Mit Hilfe der Software PROSA wurde das Modell der A21G11 auf seine Ähnlichkeit bezüglich der Proteinfaltung mit bekannten Proteinstrukturen untersucht (Sippl 1990). Der z-score beträgt -8,8 für die Oberflächenenergie, -7,3 für kombinierte Energie und -6,2 für Paarenergie und liegt damit immer im erwarteten Bereich für ein Protein mit 357 Aminosäuren. Der PROSA-Plot (Abbildung 15) zeigt die Energie des Proteinmodells für jede Aminosäure in Relation zu den umgebenden Aminosäuren.

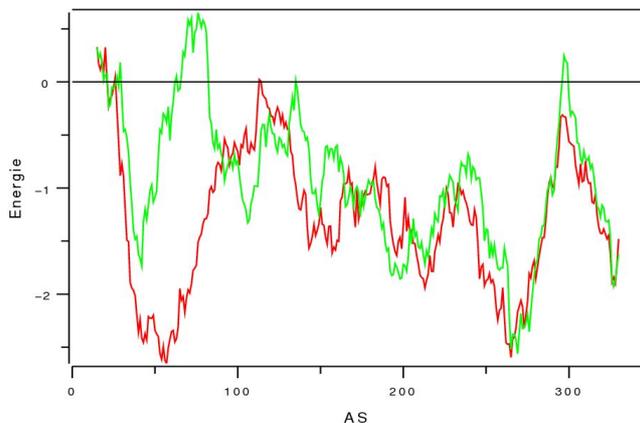


Abbildung 15: PROSA Plot von A21G11 (grün) und 1FP2 (rot)  
auf der X-Achse sind die Aminosäuren abgetragen und auf der Y-Achse ein theoretischer Energiewert, der als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Proteinfaltung dient

Für A21G11 (grün) ist ein ähnlicher Kurvenverlauf wie für 1FP2 (rot) zu sehen. Allgemein ist das A21G11 Modell etwas energiereicher, vorallem im Bereich der Aminosäuren 50 bis 90. Hier fand sich keine gute Übereinstimmung mit der Sequenz der Vorlage 1FP2, da dieser Bereich in der 1FP2 fehlt. Es wurden daher zwei  $\beta$ -Faltblätter modelliert (siehe Abbildung 16 D). In den anderen Bereichen folgt der Kurvenverlauf weitestgehend den Werten von 1FP2.

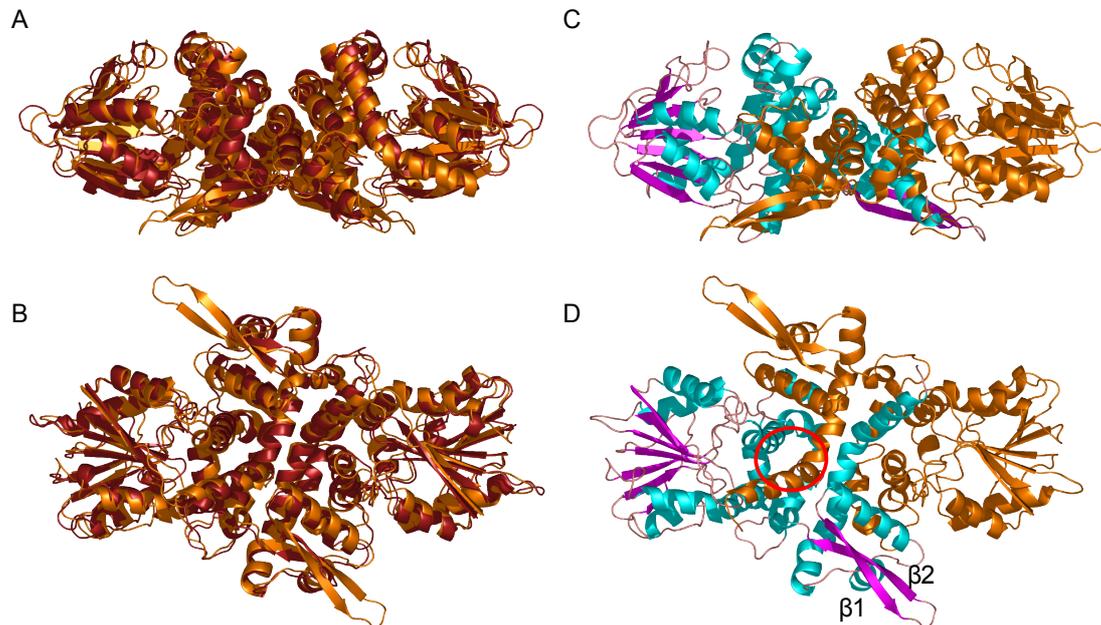


Abbildung 16: Modell der A21G11

(A) Modell A21G11 (orange) mit Kristallstruktur 1FP2 (rot) übereinander gelegt,

(B) dasselbe um 90 °C gedreht,

(C) Modell A21G11 mit einem Monomer nach den Sekundärstrukturelementen Helix (cyan),  $\beta$ -Faltblatt (lila) und loop (rosa) gefärbt, zweites Monomer durchgehend orange,

(D) dasselbe um 90 °C gedreht, mit dem roten Kreis wurde die Bindetasche des Substrats (abgeleitet aus der 1FP2) gekennzeichnet, die beiden  $\beta$ -Stränge,  $\beta 1$  und  $\beta 2$ , wurden unabhängig von 1FP2 modelliert

Der Vergleich des Proteinrückgrats der Röntgenstruktur von 1FP2 mit dem Modell der A21G11 zeigt nur eine kleine Abweichung mit einem RMSD von 0,791 Å (Abbildung 16). In Abbildung 16 C und D kann man die starke Verschränkung der beiden Untereinheiten des Homodimers gut erkennen. Die erste N-terminale Helix bildet dabei die Rückwand der Bindetasche des Substrats in der anderen Untereinheit. Es wurde auf eine gute Übereinstimmung der Konformationen im aktiven Zentrum zwischen Computermodell und Kristallstruktur geachtet, speziell was die Konformationen der Aminosäuren der katalytischen Diade, Histidin und Glutamat, angeht.

### 3.3.1 Bindung des Kofaktors

Der Kofaktor (*S*)-Adenosyl-L-Methionin (SAM) wurde aus der Röntgenstruktur von 1FP2 übernommen, dabei mussten Bindungslängen und Bindungswinkel im SAM korrigiert werden. SAM wird in der A21G11 durch Asp 200 und Gly 202 aus dem stark konserviertem Motiv DxGxGxG an seiner Aminogruppe gebunden. Die Carboxylgruppe wird durch

Wasserstoffbrücken zu Lys 259 stabilisiert. Asp 225 kann Wechselwirkungen mit den Hydroxylgruppen des Riboseteils bilden, ebenso wie Asp 245 mit der NH-Gruppe des Purinrings. Der Purinring wird außerdem über Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den über und unter dem Ringsystem angeordneten Leu 226 und Met 246 stabilisiert. Die genannten Aminosäuren sind in Abbildung 13 als SAM-Bindemotiv markiert und in den untersuchten OMTs konserviert. Eine weitere wichtige Wechselwirkung kann zwischen Asp 264 und dem positiv geladenem Schwefel im SAM ausgebildet werden. Diese Carboxylfunktion ist ebenfalls stark konserviert (blauer Pfeil in Abbildung 13).

### 3.3.2 Die Dimerbildung am Modell untersucht

Die OMT liegt in ihrer aktiven Form vermutlich als Dimer vor. Die Sequenz der ersten 114 Aminosäuren ähneln den Sequenzen von 1FP2 und 6OMT, die als Dimerisierungsdomäne beschrieben werden. Die unter 3.4.5 beschriebenen Untersuchungen des nativen Proteins in der Gelchromatografie unterstützen diese Aussagen.

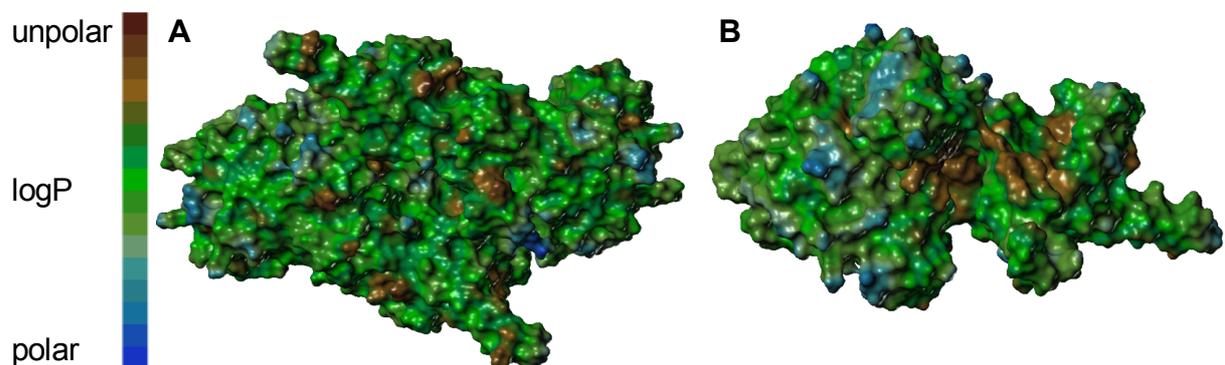


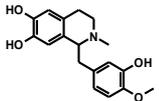
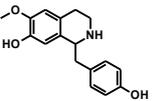
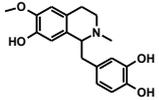
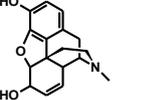
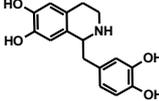
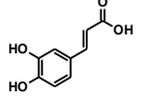
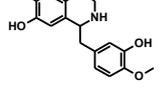
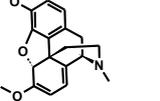
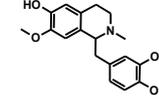
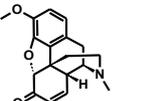
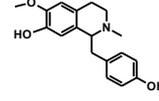
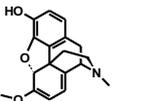
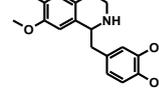
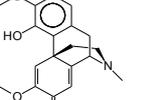
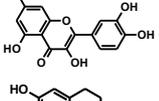
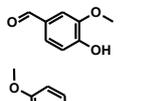
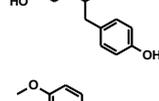
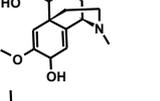
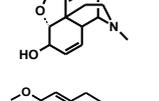
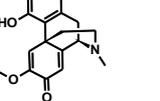
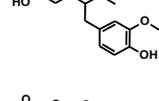
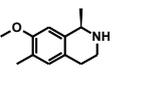
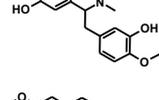
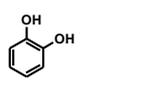
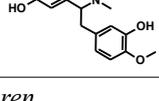
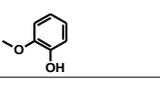
Abbildung 17: Modell der Oberfläche der A21G11 als Dimer (A) und als Monomer (B), Projektion des logP als Maß der Lipophilie auf die Oberfläche, die im Dimer abgedeckte Fläche ist in der Darstellung als Monomer stark unpolar

Die Berührungsfläche der beiden modellierten Dimere beträgt  $4532 \text{ \AA}^2$  und macht damit 32 % der Oberfläche eines Monomers aus. Die Oberflächendarstellung zeigt eine Connolly-Oberfläche mit den logP- Werten der Aminosäuren als Farbcodierung (Abbildung 17). Die Oberfläche ist meist polar. Nur im Bereich des Protein-Protein-Kontaktes befinden sich vermehrt unpolare Aminosäuren (braun). Diese Bereiche werden aber durch eine Dimerisierung abgedeckt. Somit ist das Protein als Dimer hauptsächlich hydrophil. Zusammen mit dem Fehlen eines Signalpeptids kann man schlussfolgern, dass das Enzym im Cytosol lokalisiert ist.

### 3.3.3 Docking von potentiellen Substratstrukturen

Da zu Beginn der Versuche das Substrat der neu gefundenen OMT noch unbekannt war, wurde versucht, mit Hilfe eines Proteinmodells und dem *docking* die Liste der geeigneten Substrate einzuschränken. Es wurde eine 3D-Datenbank aus 56 potentiellen Substratstrukturen erstellt (38 BIAs und 18 weitere Strukturen). Bei Strukturen mit einem chiralen Zentrum wurden die (*R*)- und die (*S*)-Enantiomere erzeugt (siehe Anhang). Insgesamt lagen 96 Strukturen vor, um sie mit dem Programm GOLD in das aktive Zentrum des Protein Modells zu docken. Für jede Struktur wurden 3-10 Konformationen mit Fitness-Score ausgegeben. Dieser Score gibt keine physikalischen Wechselwirkungsenergien wieder sondern ist ein Maß für die Summe der berechneten Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein. Je mehr Wasserstoffbrücken der Ligand mit dem Protein ausbilden kann, desto höher der Score. Die berechneten Fitness-Scores sind kein absolutes Maß, können aber untereinander verglichen werden. Tabelle 2 zeigt eine Auflistung jener 26 Strukturen, die von den 96 als Substanz im Labor vorhanden waren und damit in ihrer Wertung im *scoring* auch überprüft werden konnten. Diese Strukturen sind nach den Fitness-Scores geordnet. Die ersten 8 Verbindungen sind Tetrahydrobenzylisochinoline, an neunter Stelle kommt Quercetin, ein Flavon. Quercetin wurde in die Gruppe der möglichen Substrate aufgenommen, da für die 7OMT aus *P. som.* gezeigt wurde, dass sie *in vitro* eine sehr hohe Aktivität gegenüber Guaiacol besitzt (Ounaroon u. a. 2003). Damit sollte die Möglichkeit einer unspezifischen Methylierung einer Hydroxylgruppe an einem Benzylring getestet werden. Auffällig sind die durchweg sehr ähnlichen Score-Werte zwischen 49 und 55, die keine klare Abgrenzung einer Spitzengruppe erkennen lassen. Allerdings sind die möglichen Substrat-Strukturen auch sehr ähnlich gewählt, da ja eine Aktivität gegenüber Benzylisochinolinolinen vermutet wurde ist.

## Ergebnisse

Nr.	Fitness	Name	Struktur	Nr.	Fitness	Name	Struktur
1	55,10	4'-O-Methyl-Laudanosolin		14	46,95	Coclaurin	
2	52,30	6-O-Methyl-Laudanosolin		15	45,37	Morphin	
3	51,20	Norlaudanosolin		16	44,91	Kaffesäure	
4	50,55	Norretikulin		17	44,65	Thebain	
5	50,17	Protosinomenin		18	44,63	Neopinon	
6	49,91	N-Methyl-Coclaurin		19	42,74	Oripavin	
7	49,21	Norisoorientalin		20	42,58	Salutaridin	
8	48,97	Quercetin		21	41,97	Vanillin	
9	48,75	Norcoclaurin		22	39,83	Salutaridinol	
10	47,97	Codein		23	39,31	Salutaridin	
12	47,80	Orientalin		24	38,4	Salsolinol	
13	47,62	(R)-Retikulin		25	32,96	Catechol	
14	47,03	(S)-Retikulin		26	30,63	Guaiacol	

*Tabelle 2: Die im docking getesteten Strukturen die auch als Substanz zur Verfügung standen und im Enzymtest verwendet werden konnten. Angegeben sind der Rang und der Fitness-Wert.*

### 3.3.4 Aktives Zentrum und $pK_a$ -Werte

In der Isoflavon-OMT 1FP2 sind die katalytisch aktiven Aminosäuren ein Histidin und ein Glutamat (Zubieta u. a. 2001), im Protein von A21G11 sind das His 263 und Glu 321. Dabei liegt ein Stickstoffatom von Histidin deprotoniert vor und greift das Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe des Substrates an. Das Substrat, welches jetzt als Phenolation vorliegt, kann dann mit der aktivierten Methylgruppe des Kofaktors reagieren. Die räumliche Anordnung mit der Methylgruppe zwischen dem Schwefelatom des Kofaktors und dem Sauerstoffatom des Substrats in 1FP2 läßt auf eine Substitution nach einem  $S_N2$  Mechanismus schließen. Die Azidität am N $\epsilon$  des Imidazolrings von His 263 wird durch eine Wasserstoffbrücke des N $\delta$  mit Glu 321 erhöht. Dieses Protonenrelais wird durch den aromatischen Imidazolring ermöglicht. Die erhöhte Azidität konnte durch Berechnung des  $pK_a$ -Wertes von His 263 im Modell mit Hilfe des Programms MOE bestätigt werden. Durch die Umgebung des His 263 im Modell sinkt der  $pK_a$ -Wert von 6,5 auf 1,7. Weitere Veränderungen des  $pK_a$  von Aminosäureseitenketten, die im Bereich der Bindetasche auffallen, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Aminosäure	$pK_a$ Standard	$pK_a$ in A21G11
His263	6,5	1,7
Asp264	3,8	8,2
Glu321	4,5	7,9
Asp312	3,8	8,7
Asp175	3,8	3,6

Tabelle 3:  $pK_a$ -Werte der Aminosäuren im aktiven Zentrum berechnet mit MOE

## 3.4 Untersuchungen am Enzym *in vitro*

Neben den Untersuchungen am Proteinmodell wurde A21G11 in Bakterien exprimiert. Mit dem gereinigten Protein wurden Enzymtests durchgeführt. Außerdem wurden nach Ergebnissen aus der Analyse der Bindungstasche von A21G11 Mutanten generiert, deren Substratspezifität getestet worden ist.

### 3.4.1 Heterologe Überexpression des neuen Gens und Reinigung des Proteins

Zuerst wurde A21G11 in den Expressionsvektor pQE32 kloniert. Dieser Vektor verfügt über einen durch IPTG induzierbaren Promotor, der im Zusammenspiel mit dem Repressorplasmid Rep4 des dazugehörigen Expressionsstammes SG13009 streng reguliert ist. Vor der multiplen

Klonierungsstelle ist ein 6facher Histidintag kodiert, der eine spätere Reinigung des Proteins über Affinitätschromatografie ermöglicht. Zu Beginn wurde das Gen A21G11 aus cDNA von *P. somniferum* Stängeln mit Primern, die Restriktionsstellen enthielten (A21G11VL3 und A21G11VL4), amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen PstI und BamHI verdaut und in den entsprechend vorbereiteten Vektor ligiert. Nach erfolgreicher Transformation in *E. coli* wurde die Sequenz überprüft. Die Klone mit der korrekten Sequenz wurden für die Überexpression verwendet.

Die heterologe Überexpression erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Bakterienpellets wurden immer einmal in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren um Kontinuität zwischen verschiedenen Versuchen sicher zu stellen. Aliquots aus verschiedenen Reinigungsstufen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Gen ist nur sehr schwach exprimiert, im Rohextrakt ist praktisch kein A21G11 Protein zu sehen, erst nach der Reinigung und Konzentrierung ist es in der Coomassie-Färbung sichtbar zu machen (Abbildung 18). Die Induktion bei 37 °C und 28 °C führt zwar zu einer stärkeren Expression im Rohextrakt, allerdings lässt sich dieses Protein sehr schlecht unter den verwendeten Bedingungen lösen und ist damit unbrauchbar für weitere enzymatische Analysen. Für weitere Analysen erfolgte die Expression von A21G11 nach der Induktion mit IPTG bei 4 °C. Die Identifizierung des gereinigten Proteins wurde durch eine Westernblot Analyse der Aliquots aus den Reinigungsschritten sichergestellt (Abbildung 18).

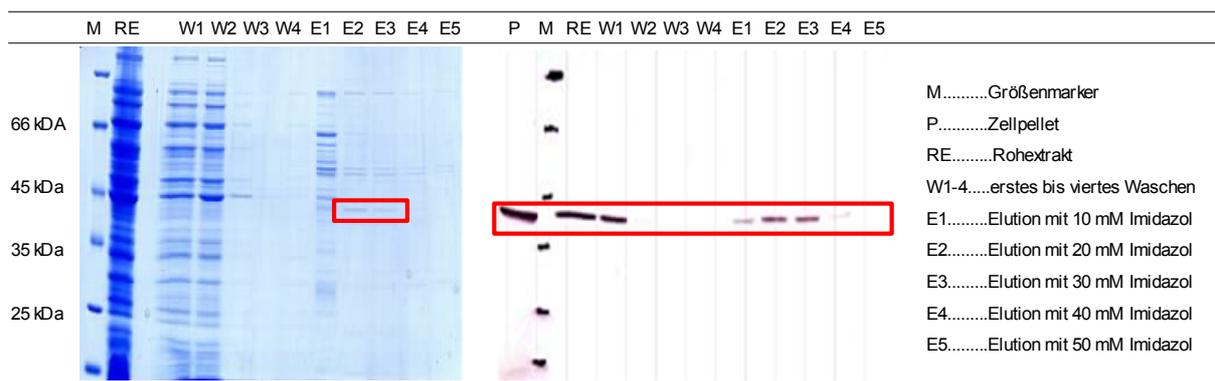


Abbildung 18: SDS-PAGE Proteinreinigung der A21G11 mit schrittweiser Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer, entsprechend rechts der Westernblot mit Immunfärbung mit alkalischer Phosphatase und Anti-His-tag-Antikörper zur Detektion der in *E. coli* exprimierten A21G11

Der verwendete primäre Antikörper richtete sich dabei gegen den His-tag. Die Größenbestimmung des denaturierten Proteins ergab etwa 40 kDa und ist damit in guter Übereinstimmung mit der aus der Sequenz berechneten Größe von 42 kDa. Das Protein bindet

nur schwach an die Cobalt-Ionen der Matrix, da es schon mit 20 mM Imidazol eluiert werden kann. Für das Waschen von unspezifisch gebundenem Protein ist daher nur 2,5 mM Imidazol zum Waschpuffer zugefügt worden. Für die Enzymtests ist A21G11 in größeren Mengen exprimiert und über Affinitätschromatografie gereinigt worden, das Protein wurde dabei mit 20 mM Imidazol im Waschpuffer eluiert (Abbildung 19). Das gewonnene Enzym wurde nochmals umgepuffert in nicht-imidazolhaltigen Puffer mit 20 % Glycerin, um die Aktivität während der Lagerung bei -80 °C zu erhalten.

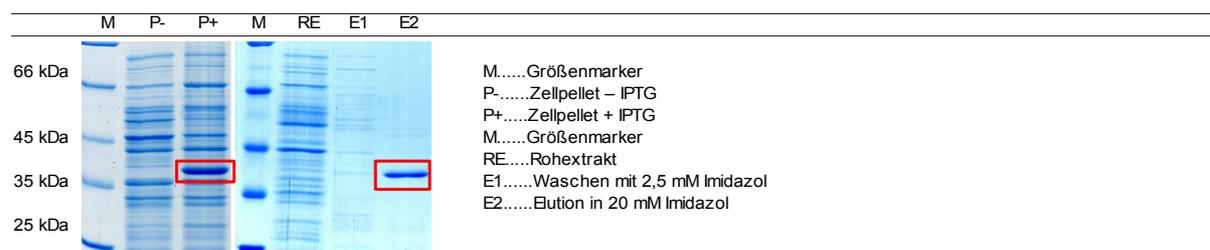


Abbildung 19: SDS-PAGE Proteinreinigung der A21G11 nach der Expression bei 4 °C in *E. coli* SG13009 bei ca. 40 kDa die Proteinbande, die A21G11 entspricht; E2 zeigt A21G11, wie es für die Enzymtests verwendet wurde

### 3.4.2 Bestimmung des Substratspektrums

Die Enzymklasse des A21G11 Proteins konnte aus der Sequenz als OMT abgeleitet werden. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zur 6OMT konnte vermutet werden, dass A21G11 ebenfalls Norcoclaurin umsetzt oder zumindest ein anderes BIA. Daher wurden *in vitro* verschiedene potentielle Substrate mit dem Enzym inkubiert. Von den am Computermodell verwendeten 96 Strukturen standen nur wenige als Verbindung zur Verfügung. In Abbildung 20 und Abbildung 21 sind die 26 in beiden Ansätzen (theoretisch und praktisch) verwendeten potentiellen Substrate dargestellt. Die im Labor zur Verfügung stehenden Substrate lagen meist in kleinen Mengen als Lösungen mit zum Teil unbekannter Konzentration vor. Sie wurden im Enzymassay eingesetzt, bei bekannter Konzentration der Stammlösung mit 150 µM, ansonsten mit dem maximal möglichen Volumen. Die Detektion erfolgte einmal radioaktiv mittels Scintillationsmessung und in einem zweiten Versuch über Absorptionmessung mittels HPLC-Analyse. In Anlehnung an den Enzymassay für BIA-OMTs von Ounaron und Diaz-Chavez (Ounaron u. a. 2003; Ziegler u. a. 2005) wurde der Assay wie unter Methoden beschrieben durchgeführt. Der pH-Wert bei der Extraktion der Substrate und Produkte richtete sich dabei nach den chemischen Eigenschaften der Verbindungsklasse.

Tetrahydrobenzylisochinoline	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
(R,S)-Norcoclaurin	H	OH	OH	H	OH
(R,S)-Norlaudanosolin	H	OH	OH	OH	OH
(R,S)-Norisoorientalin	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
(R) und (S)-Norretikulin	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
(R,S)-Laudanosolin	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OH
(R,S)-4'-O-Methylaudanosolin	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
(R,S)-6-O-Methylaudanosolin	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OH
(S)-Protosinomenin	CH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
(R) und (S)-Retikulin	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
(R,S)-Orientalin	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
(S)-N-Methylcoclaurin	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H	OH

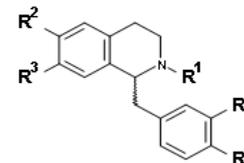


Abbildung 20: die im Enzymassay getesteten Substrate, Teil 1

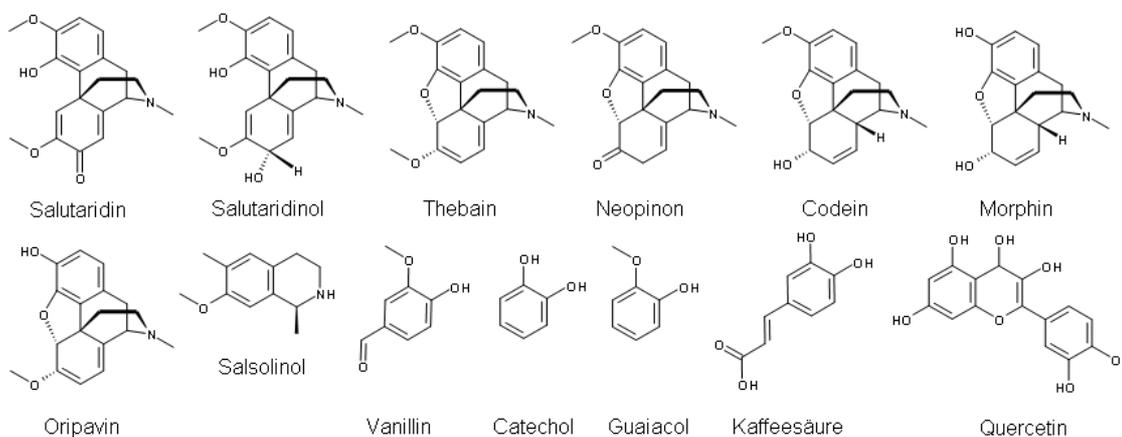


Abbildung 21: die im Enzymassay getesteten Substrate, Teil 2

So wurden BIAs unter basischen Bedingungen extrahiert, weil ihr  $pK_a$  etwa zwischen 8 und 9 liegt und nur die neutrale, nicht protonierte Form in Ethylacetat übergeht. Bei den Catecholen und Flavonoiden wurde der Assay angesäuert und dann extrahiert. Extrahiert worden ist für 30 s, da nach dieser Zeit 85 % der Substanz (bei Norretikulin) in die organische Phase übergegangen waren. Die Produktmenge wurde in einem radioaktiven Assay über cpm/Ansatz und die spezifische Aktivität der SAM-Lösung (cpm/nmol) ermittelt. In der HPLC-Analyse wurde die Umsetzung qualitativ ausgewertet, ob zum Beispiel nur ein Produkt gebildet worden ist bzw. ob überhaupt ein zusätzliches Signal aufgetreten ist.

Mit (S)-Norretikulin konnte eine Enzymaktivität gemessen werden, sowohl über die Scintillationsmessung als auch über Absorptionsmessung. In Übereinstimmung damit konnte durch das *docking* Ergebnis mit dem Homologiemodell (3.3.3) schon früh vorhergesagt

werden, dass Norretikulin sehr wahrscheinlich ein Substrat für das A21G11 Enzym ist. Die 25 anderen Verbindungen konnten *in vitro* nicht umgesetzt werden.

### 3.4.3 Produktidentifizierung der Umsetzung von Norretikulin

Der Umsatz von (*S*)-Norretikulin wurde durch RP-HPLC analysiert (Abbildung 22). Der gestoppte Enzymtest wurde mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  basisch gemacht und mit Ethylacetat extrahiert. In A ist nur (*S*)-Norretikulin aufgetragen als Standard für die Retentionszeit. In B und C sind Extraktionen von Enzymtest aufgetragen worden. Dabei ist das in B verwendete Enzym vor dem Test durch 10 min bei 95 °C denaturiert worden. Der Unterschied zwischen den Chromatogrammen B und C beruht also ausschließlich auf der Enzymaktivität des A21G11 Proteins, welche die Bildung der bei 20 min gefunden Verbindung katalysiert hat. Die im Unterschied zu Chromatogram A gefundenen zusätzlichen *peaks* bei 12, 16 und 19 min kommen sehr wahrscheinlich von den ebenfalls extrahierten Hilfskomponenten des Enzymtests wie zum Beispiel Ascorbinsäure oder dem Kofaktor SAM bzw. (*S*)-Adenosyl-Homocystein.

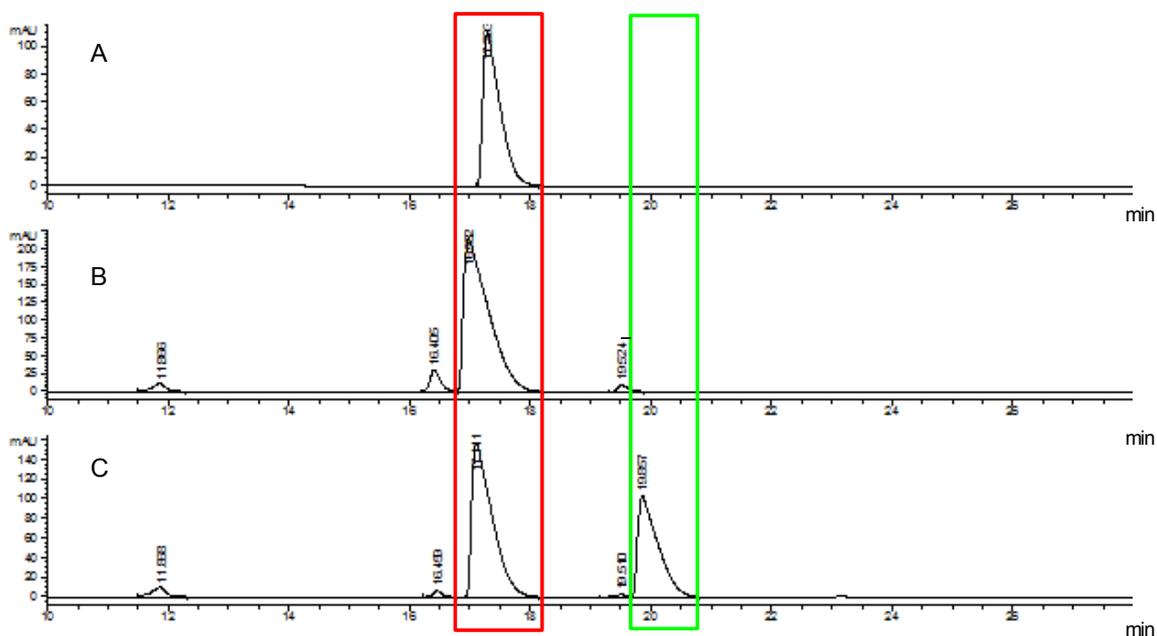


Abbildung 22: RP-HPLC Chromatogramm des Umsatzes von A21G11 mit (*S*)-Norretikulin (A) Standard Norretikulin, (B) (*S*)-Norretikulin mit A21G11 (abgekocht), (C) (*S*)-Norretikulin mit A21G11 mit Rot markiert wurde der Bereich des Substrats (*S*)-Norretikulin und mit Grün der des Produkts

Das Produkt der Umsetzung von (*S*)-Norretikulin durch A21G11 wurde über die RP-HPLC fraktioniert und mittels LC-MS analysiert (Abbildung 23 und Abbildung 24). Das LC-MS Chromatogramm von (*S*)-Norretikulin sieht folgendermaßen aus:

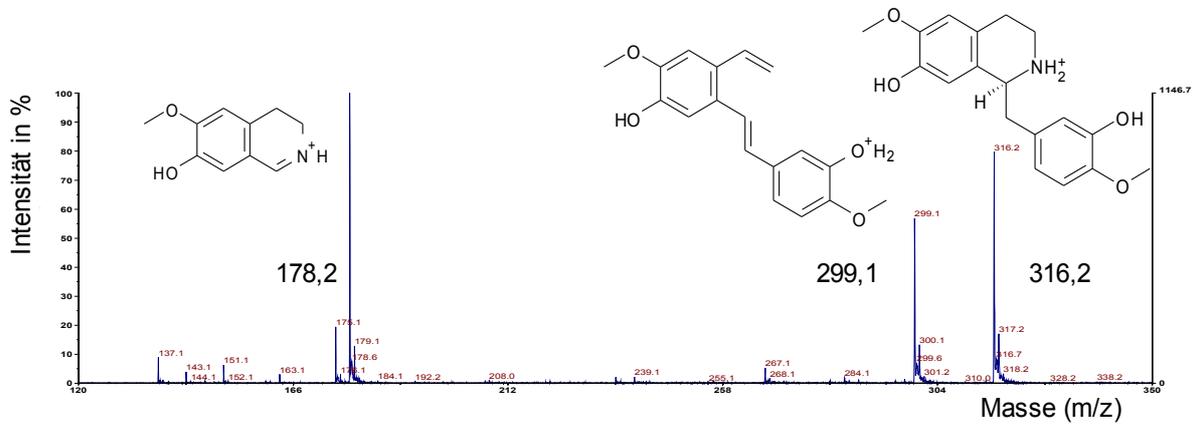


Abbildung 23: Massenspektrum von (*S*)-Norretikulin welches als Substrat in der Umsetzung mit A21G11 benutzt wurde

Die in der LC-MS entstandenen Ionen mit der Masse  $[M+H]^+$   $m/z$  316,2 repräsentieren die einfach protonierte Form des Substrates Norretikulin, ebenfalls detektierbar waren die deaminierte Form bei  $[M+H]^+$   $m/z$  299,1 sowie der Isochinolinteil von Norretikulin mit  $[M+H]^+$   $m/z$  178.

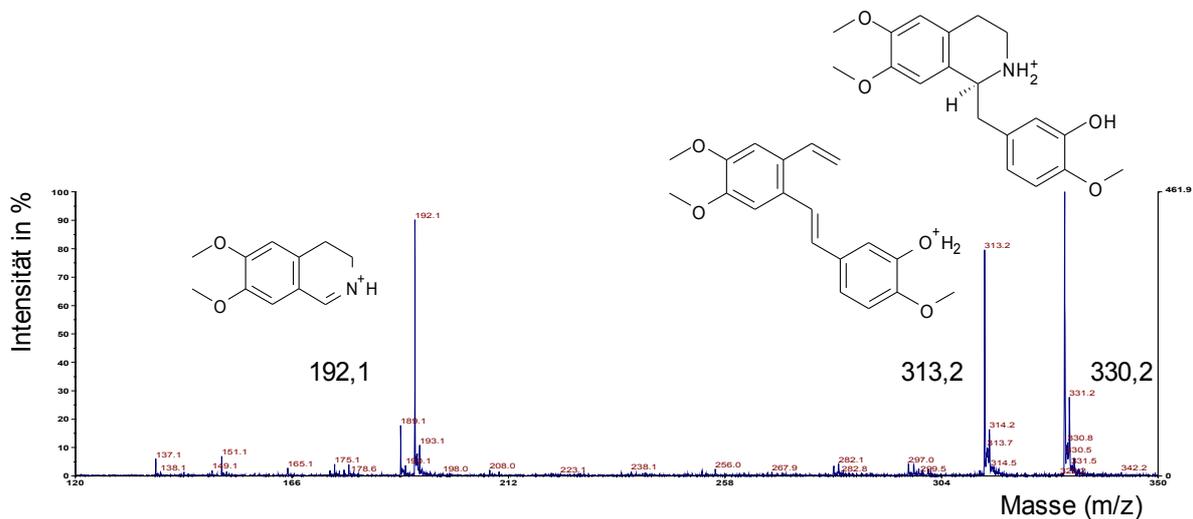


Abbildung 24: Massenspektrum von (*S*)-Norlaudinin dem Produkt der enzymatischen Umsetzung von Norretikulin mit A21G11

In der LC-MS Analyse des Produkts aus Abbildung 22 entstehen Ionen mit der Masse  $[M+H]^+$   $m/z$  330,2,  $[M+H]^+$   $m/z$  313,2 und  $[M+H]^+$   $m/z$  192,1. Das Produkt wies damit in allen drei

Molekülonen eine gegenüber dem Substrat um 14 erhöhte Masse auf, was genau einer Methylgruppe entspricht. Durch das Fragmentierungsmuster lies sich schlussfolgern, dass die Methylgruppe am 7-Hydroxylrest sein muss, da sich die um 14 erhöhten Massen nach der Abspaltung des Stickstoffs und nach der Abspaltung des Benzylringes immer noch nachweisbar waren. Die einzig mögliche Position für eine *O*-Methylgruppe ist damit die noch unmethylierte 7-Hydroxylgruppe des Norretikulins. Das Produkt der enzymatischen Umsetzung wurde als (*S*)-Norlaudandin identifiziert.

Das Enzym, das bisher immer nach dem EST als A21G11 bezeichnet worden ist, erhielt den Namen (*S*)-Norretikulin-7-*O*-Methyltransferase (N7OMT).

### 3.4.4 Enzymkinetische Charakterisierung der N7OMT

Nach der Identifizierung von (*S*)-Norretikulin als Substrat wurden die optimalen Umsatzbedingungen ermittelt und die Enzymparameter  $K_m$  und  $k_{cat}$  bestimmt. Für die Ermittlung des Fließgleichgewicht-Bereiches wurde zunächst eine

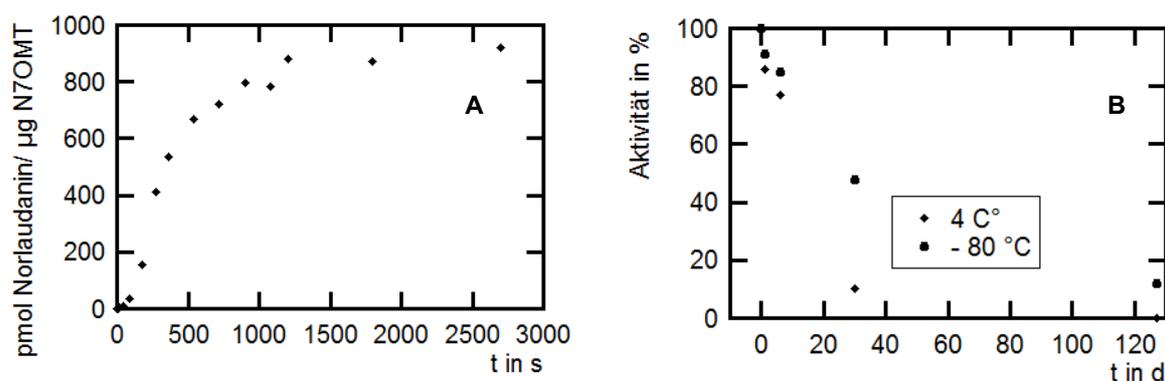


Abbildung 25: Aktivität der N7OMT

(A) Produkt-Zeit-Kurve von N7OMT zur Bestimmung des steady-state Bereiches

(B) Die Aktivität von N7OMT in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Lagerbedingungen

Produkt-Zeit-Kurve bestimmt, die durch Abstoppen der Reaktion nach mehreren Zeitintervallen und darauf folgender Konzentrationsbestimmung des Produktes erhalten worden ist. Für das Enzym wurden 13 Zeitpunkte von 0 bis 3000 s gewählt und die Konzentration des methylierten Produktes bestimmt. Aus dem Kurvenverlauf ließen sich drei Phasen erkennen (Abbildung 25 A). Zu Beginn eine Anfangs-Phase (*pre-steady-state*), gefolgt von der durch einen linearen Anstieg gekennzeichneten Umsatzphase (von 30 bis 480 s) und am Ende die Phase in der das Substrat nicht mehr im Überschuss vorlag. Die Berechnung der

Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte zu Beginn der Anstiegsphase, wenn noch Substratüberschuss herrscht, d. h. nicht mehr als 10 % des Substrates umgesetzt worden sind. Zusammen mit der Anfangs-Phase wurde eine optimale Reaktionsdauer von 3 min ermittelt. In der Berechnung wurde dabei die Anfangs-Phase abgezogen. Die Lagerfähigkeit des Enzyms wurde bei 4°C bzw. 6 °C und bei -80 °C bestimmt (Abbildung 25 B). Am längsten haltbar war das Enzym bei -80 °C, wobei hier wie auch bei 4 °C die Aktivität während der Lagerung ständig abnimmt. Der größte Unterschied wurde nach 30 Tagen gemessen, hier hat das bei -80 °C gelagerte Enzym immerhin noch die Hälfte seiner ursprünglichen Aktivität wohingegen das im Kühlschrank aufbewahrte Enzym noch ca. 10 % der ursprünglichen Aktivität aufweist. Es wurde daher das in Enzymtests verwendete Protein frisch hergestellt und nur einmal über Nacht eingefroren.

Mit dem radioaktivem Test wurde die Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Die so ermittelten  $v/S$  Charakteristiken sind in Abbildung 26 dargestellt, einmal in Abhängigkeit von Norretikulin und einmal in Abhängigkeit vom Kofaktor SAM. Die Berechnung der Kurve erfolgte unter Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik mit dem Programm Kaleidagraph nach der Formel  $v=(K_m \cdot V_{max})/v+S$ , daraus wurden die enzymkinetischen Parameter  $V_{max}$  und  $K_m$  berechnet.

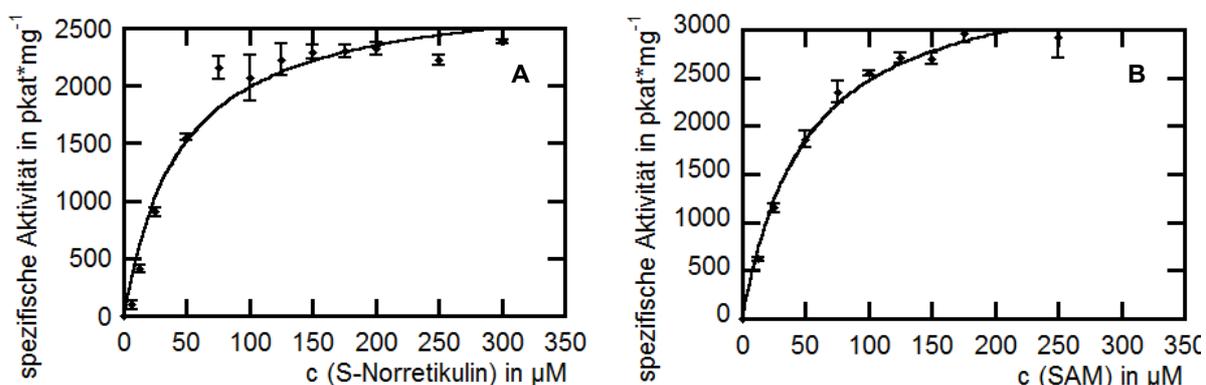


Abbildung 26: Charakterisierung der Enzymeigenschaften der N7OMT,

(A)  $v/S$ -Kurve bei 250  $\mu\text{M}$  SAM, 35 °C, pH 7,5

(B)  $v/S$ -Kurve bei 150  $\mu\text{M}$  (S)-Norretikulin, 35 °C, pH 7,5, Berechnung des Graphen unter Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Kaleidagraph

Das Temperaturoptimum für die Umsetzung von Norretikulin wurde durch Messungen zwischen 25 und 45 °C in 5° Schritten ermittelt und lag bei 35 °C (Abbildung 27). Auffällig war die steigende Instabilität des Kofaktors SAM bei zunehmenden Temperaturen, sie wurde durch die Bestimmung eines Nullwertes für jede Temperatur berücksichtigt. Das pH-

Optimum wurde bei verschiedenen pH-Werten zwischen 5,5 und 10 ermittelt und lag, je nach Puffer, zwischen 7,5 und 8.

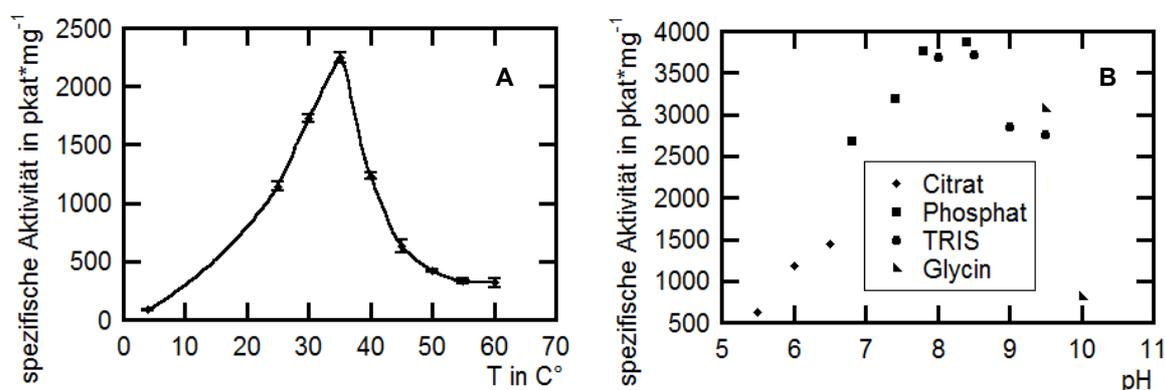


Abbildung 27: Charakterisierung der Enzymeigenschaften von N7OMT

(A) Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert bei  $150 \mu\text{M}$  SAM und  $150 \mu\text{M}$  (S)-Norretikulin

(B) Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert bei  $250 \mu\text{M}$  SAM und  $150 \mu\text{M}$  (S)-Norretikulin

### 3.4.5 Bestimmung der nativen Proteingröße

Zur Bestimmung der nativen Größe und der Anzahl der Untereinheiten wurde eine Größenausschlusschromatografie durchgeführt. Mit Hilfe einer Eichung lässt sich am Elutionszeitpunkt die Größe des Proteins abschätzen. Dabei spielt die Form des Proteins eine große Rolle, da die Korrelation von Größe mit der Elutionszeit streng genommen nur für globuläre Proteine gilt. Es konnten zwei Fraktionen von N7OMT Protein unterschieden werden (Abbildung 28).

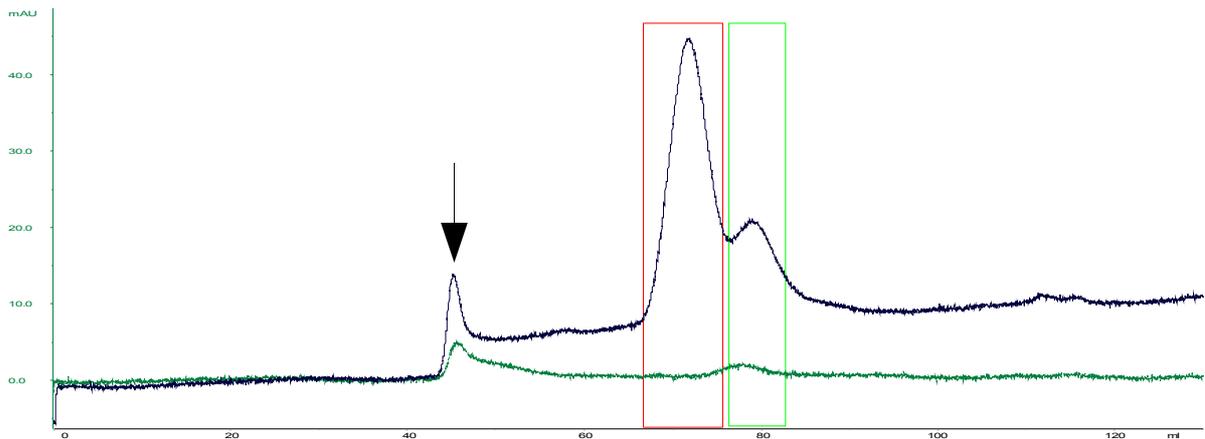


Abbildung 28: Größenausschlusschromatografie in Blau natives N7OMT Protein, 2 Proteinfraktionen können unterschieden werden (peak A von 68 – 75,5 min rotes Rechteck, peak B von 75,5- 84,5 min, grünes Rechteck), nach der Eichung mit Ferritin, BSA, Ovalbumin und Lysozym beträgt das MW von A 71,2 kDa und von B 46,4 kDa, in Grün denaturiertes N7OMT Protein der Fraktion 71-72,5 min, durch die Denaturierung verändert sich die in der Gelelution bestimmte Größe, B eluiert bei 78 min und hat ein demnach ein MW von 50,6 kDa

Das Protein aus *peak A* ist etwa 71 kDa und das aus *peak B* 46 kDa groß. Die beiden *peaks* wurden fraktioniert aufgefangen und mit einer SDS-PAGE analysiert (Abbildung 29). Das nun denaturierte N7OMT Protein mit ca. 40 kDa ist in allen Fraktionen der *peaks A* und *B* vorhanden.

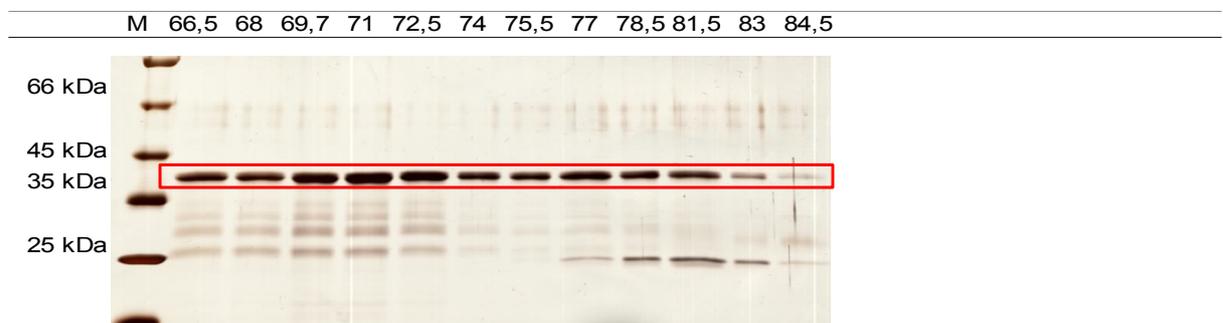


Abbildung 29: SDS-PAGE mit Silberfärbung der Elutionsfraktionen der Gelfiltration von 66,5- 84,5 min, die Bande bei ca. 40 kDa entspricht der Größe der N7OMT (mit Rot markiert)

Zusätzlich wurden die Enzymaktivitäten und die Proteinmengen der einzelnen Fraktionen bestimmt (Abbildung 30). Im Bereich von *peak A* entspricht die Enzymaktivität der Proteinmenge, im Bereich von *peak B* konnte keine entsprechende Aktivität gefunden werden.

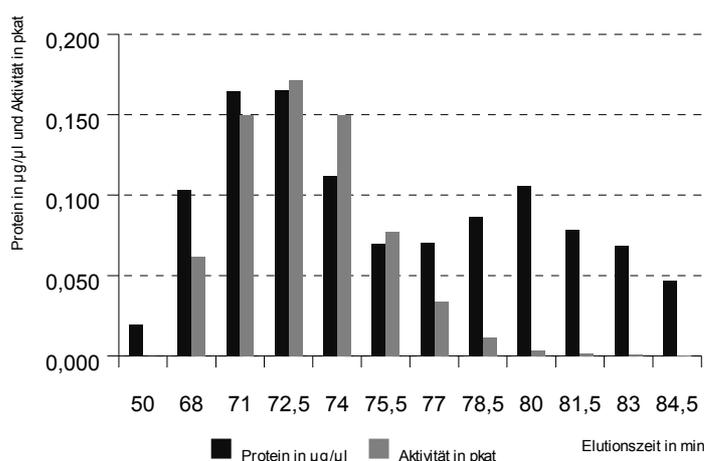


Abbildung 30: Proteinkonzentrationen und der Enzymaktivitäten der Elutionsfraktionen der Gelfiltration die Konzentration folgt dem Kurvenverlauf der Gelfiltration, Aktivität ist nur im Bereich von peak A zu messen, Fraktion 50 min diente als Negativkontrolle

Das Protein von peak A wurde durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert und erneut einer Größenausschlusschromatografie unterzogen. Die nun gemessene Größe beträgt nur noch 51 kDa (grüne Kurve, Abbildung 27). Das Protein aus *peak A* ist nativ größer als im denaturierten Zustand und zeigt Aktivität gegenüber Norretikulin. Das Protein aus *peak B* ist dagegen unter nativen Bedingungen etwa so groß wie unter denaturierenden Bedingungen und zeigt keine Aktivität.

### 3.4.6 Modell der Bindung des Substrates (S)-Norretikulin

Es wurden 26 Verbindungen aus dem *docking* im Labor getestet, dabei stellte sich heraus, dass nur (S)-Norretikulin umgesetzt werden kann (siehe 3.4.3). Damit ist A21G11 in Norretikulin-7-O-methyltransferase umbenannt worden. Das Substrat Norretikulin ist unter physiologischen Bedingungen im Cytosol (um pH 7), welche auch das pH-Optimum des *in vitro* untersuchten Enzyms darstellt, ein einfach positiv geladenes Kation. Als Kation wurde es wie auch alle anderen BIAs in den *docking*-Versuchen verwendet. Die mögliche Orientierung und Konformation von (S)-Norretikulin in der Bindetasche von N7OMT wurde durch ein automatisches *docking* mit GOLD, unter der Vorgabe 50 verschiedene Konformationen zu finden, erzeugt. Dabei wurden die Standardeinstellungen verwendet. Als Zentrum einer 30 Å messenden Sphäre, in die die Ligandenkonformationen gedockt wurden, ist das katalytische Stickstoffatom von Histidin 263 ausgewählt worden. Die beste Konformation wurde wegen der Orientierung einer Hydroxylgruppe zum aktiven Zentrum und einer möglichst großen Zahl von Interaktionen mit den Seitenketten ausgewählt. Die aus dem *docking* erhaltene Pose wurde im Programm MOE einer Energieminimierung

unterzogen, um das lokale Minimum für diese Konformation zu finden. Bei der Auswahl zwischen den Posen wurde auf die gute Erkennung des positiv geladenen Stickstoffatoms am Isochinolinring geachtet. Hier wurde vom automatischem *docking* entweder keine Erkennung, die Wasserstoffbrückenbildung zu einem Serin oder eine Wasserstoffbrücke zu einem Aspartat vorgeschlagen. Da die Bindung zwischen dem Stickstoffkation des Substrates zu einer Säure stärker ist als zu einem Alkohol, wurden die Aspartat-Wechselwirkungen bevorzugt.

Als Wechselwirkungspartner finden sich in der Enzymbindetasche drei Aspartatseitenketten, von den scheinbar nur Asp 312 in der Lage ist, (*S*)-Norretikulin am Stickstoff über eine Wasserstoffbrücke zu binden und gleichzeitig die für die Katalyse notwendige Ausrichtung der 7-Hydroxylgruppe zwischen His 263 und SAM zu ermöglichen (Abbildung 31). Wenn Norretikulin so gebunden ist, können die funktionellen Gruppen spezifische Wechselwirkungen mit Protonenakzeptoren und -donoren der Bindetasche ausbilden. So erfolgt die Erkennung von der 6-*O*-Methoxylgruppe durch eine Wasserstoffbrücke mit Gln 351, die 3'-Hydroxyl- und die 4'-*O*-Methoxylgruppe werden beide von Asn 316 erkannt. Die Erkennung der hydrophoben Molekülteile erfolgt durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen des Isochinolinrings mit Met 172 und 313 sowie durch Wechselwirkung des Benzylrestes mit Ile 123 und 167 sowie dem Met 128.

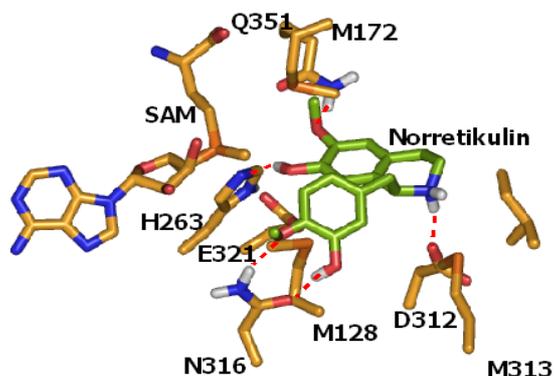


Abbildung 31: aktives Zentrum der N7OMT mit SAM (orange) und mit (*S*)-Norretikulin (hellgrün), Stickstoff in blau, Sauerstoff in rot, wichtige Wasserstoffe in weiß, Wasserstoffbrücken rot gestrichelt, Ile 123 und Ile 167 wurden wegen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt

### 3.4.7 Modell der Bindung von Norcoclaurin in N7OMT

Interessant ist die Frage, warum Norcoclaurin nicht von N7OMT umgesetzt werden kann (siehe 3.4.2). Im *docking* befand sich (*S*)-Norcoclaurin auf Platz 9 der getesteten Substrate. Eine mögliche Position für Norcoclaurin als Inhibitor ergab sich aus dem *docking* mit GOLD

in das N7OMT Modell. Hier konnte in 8 von 50 Konformationen die im folgenden beschriebene gefunden werden: Norcoclaurin wird durch drei Wasserstoffbrücken zwischen seinen Hydroxylgruppen und den Serinseitenketten 309 und 168 sowie der Aspartatseitenkette 312 gebunden. Durch diese Koordinierung wird Norcoclaurin aus dem Raum zwischen Histidin 263 und SAM herausgehoben. Das erklärt, warum Norcoclaurin nicht umgesetzt wird und weist darauf hin, dass es eventuell sogar als kompetitiver Inhibitor wirken könnte.

### 3.5 Vergleich von N7OMT und 6OMT

Der Sequenzvergleich von N7OMT mit ähnlichen OMTs ergab keine Hinweise auf die Substratbindestelle. Aus der Literatur sind die Bindemotive für den Kofaktor SAM und die katalytisch aktiven Aminosäuren bekannt. Die Identifizierung der substratbindenden Aminosäuren ist schwieriger und stützt sich auf einen Sequenzvergleich mit der 3D Struktur der Isoflavon-7-OMT. Für eine genauere Untersuchung, welche Aminosäuren zur Unterscheidung zwischen den beiden BIAs (*S*)-Norretikulin und (*S*)-Norcoclaurin beitragen, reicht ein Sequenzvergleich nicht aus. Im Bereich der aus dem N7OMT Modell bekannten Bindetasche gibt es 21 in Frage kommende Aminosäuren. Die Modellierung der 6OMT und ein anschließendes *docking* von (*S*)-Norcoclaurin ermöglichte die dreidimensionale Betrachtung beider Proteine im Vergleich. Durch ein Übereinanderlegen der Strukturen konnten entscheidende Aminosäuren, die zur Substraterkennung dienen, identifiziert werden.

#### 3.5.1 Das aktive Zentrum

Der Vergleich zwischen dem aktiven Zentrum der N7OMT und der 6OMT ist sehr interessant.

Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren sind mit hoher Wahrscheinlichkeit identisch, da dieselbe Reaktion, die Übertragung der Methylgruppe von SAM auf eine Hydroxylgruppe, katalysiert wird (Abbildung 32). Allerdings müssen sich die Aminosäuren, die an der Erkennung des Substrats beteiligt sind, unterscheiden, so wie sich auch die beiden Substrate unterscheiden.

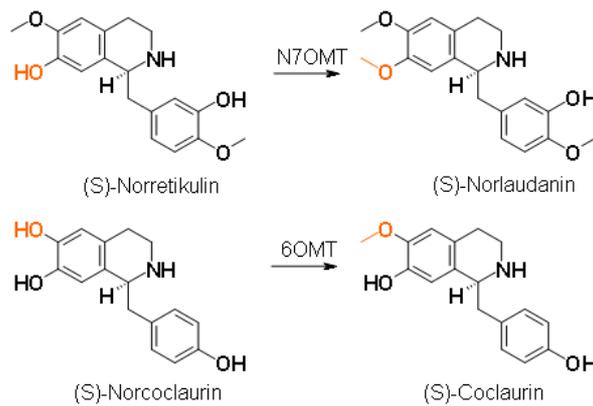


Abbildung 32: Die Reaktionen der 6OMT und der N7OMT

Die methylierten Hydroxylgruppen sind orange markiert. Der Kofaktor SAM wurde zur Verbesserung der Übersichtlichkeit weggelassen.

### 3.5.2 Modell der 6OMT

Für den Vergleich der aktiven Zentren wurde ein 3D-Modell der 6OMT benötigt. Es wurde analog zu dem der N7OMT erstellt. Eine Überlagerung der beiden Strukturen zeigt die gute Übereinstimmung der Konformationen (Abbildung 33). Die 6OMT enthält allerdings keine verlängerte  $\beta$ -Faltblattstruktur im N-terminalen Bereich und ist damit der Isoflavon-7-OMT ähnlicher als es die N7OMT ist (38 % Sequenzähnlichkeit gegenüber 35 %).

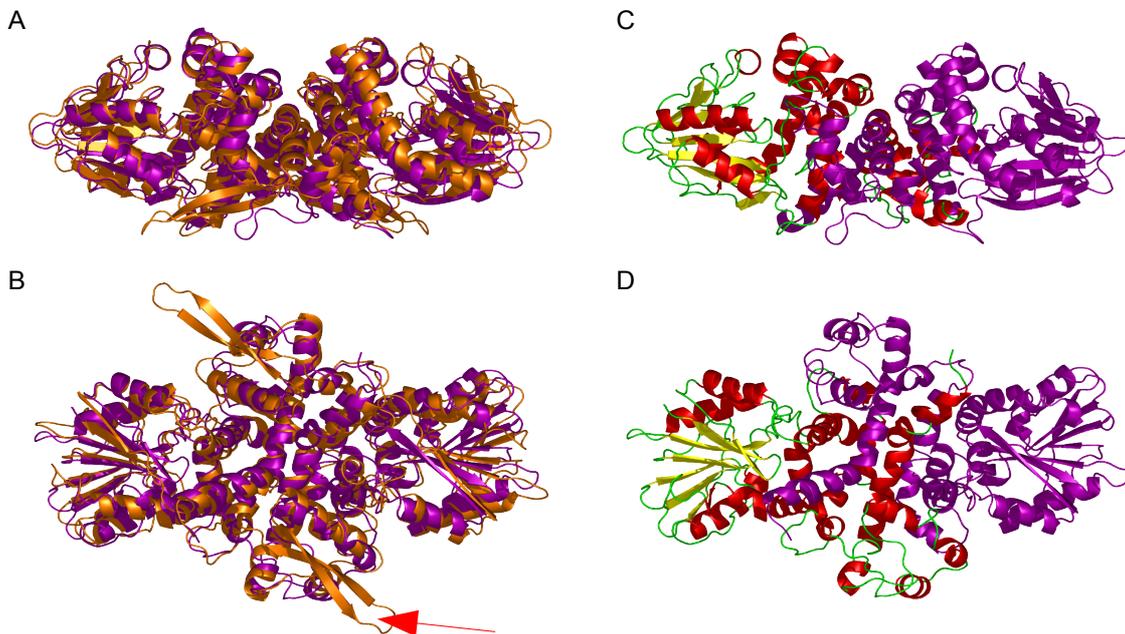


Abbildung 33: Modell der 6OMT

(A) Modell 6OMT (lila) mit Modell N7OMT (orange) übereinander gelegt, der rote Pfeil markiert die  $\beta$ -Faltblätter der N7OMT, die keine Entsprechung in der 6OMT haben

(B) dasselbe um 90 °C gedreht,

(C) Modell 6OMT mit einem Monomer nach den Sekundärstrukturelementen Helix (rot),  $\beta$ -Faltblatt (gelb) und loop (grün) gefärbt, zweites Monomer durchgehend lila,

(D) dasselbe um 90 °C gedreht

Die sterische Analyse mit Hilfe des Ramachandranplots zeigt 92,6 % der Aminosäuren im bevorzugten Bereichen und keine im nicht erlaubten Bereich (Abbildung 34). Im PROSA Plot kann man fast ausschließlich negative Energiewerte ablesen, die im Wesentlichen dem Verlauf der Kurve der Röntgenstruktur folgen (Abbildung 35). Im C-terminalen Bereich der 6OMT liegen die Werte zum Teil im positiven Bereich des PROSA Plots. Möglicherweise weicht die tatsächliche Konformation der 6OMT in diesem Bereich von der im Modell dargestellten ab.

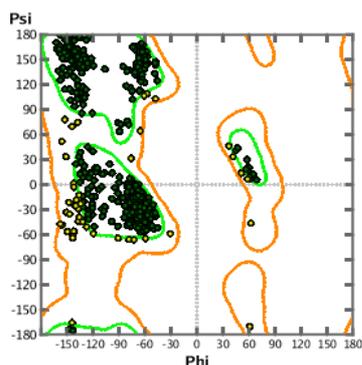


Abbildung 34: Ramachandran Plot des 6OMT Modells  
Die bevorzugten Winkelkombinationen sind grün umrandet und die erlaubten orange. Es liegen keine Aminosäuren außerhalb dieser Bereiche.

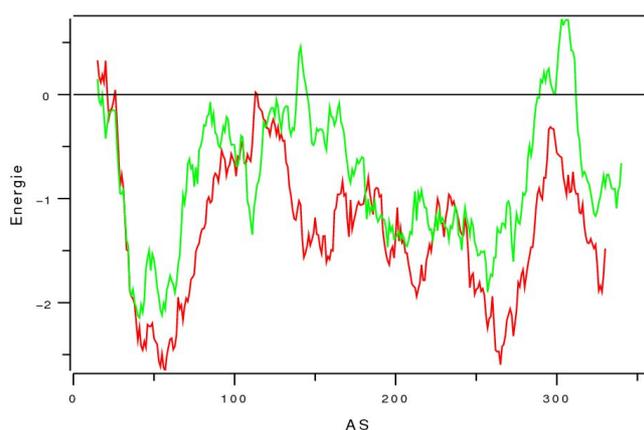


Abbildung 35: PROSA Plot der 6OMT (grün) und der IFP2 (rot)  
auf der X-Achse sind die Aminosäuren aufgetragen und auf der Y-Achse ein theoretischer Energiewert, der als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Proteinfaltung dient

### 3.5.3 Modell der Bindung von Norcoclaurin

Ein *docking* von Norcoclaurin in die 6OMT wurde entsprechend dem *docking* in der N7OMT durchgeführt. Folgende Konformation und Position von Norcoclaurin wurde damit erzeugt: Die konservierten Aminosäuren His 253 und Glu 321 bilden die katalytische Diade in der 6OMT. An der Erkennung von Norcoclaurin ist Asp 165 beteiligt, welches eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff ausbildet. Außerdem erkennt Asn 306 die Hydroxylgruppen am Benzylring. Met 162, Met 106, Ile 113 und Leu 299 stabilisieren durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen die Bindung der hydrophoben Substratteile (Abbildung 36).

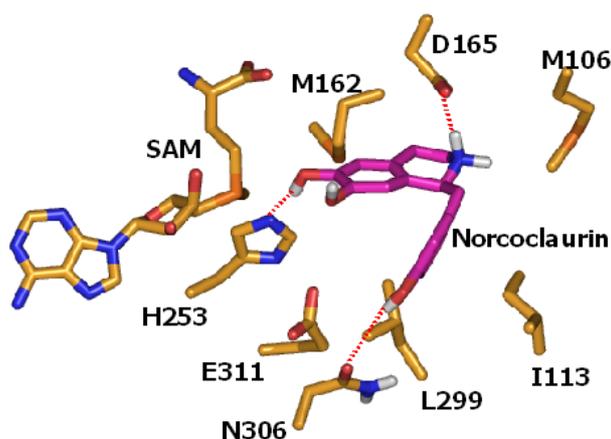


Abbildung 36: aktives Zentrum der 6OMT mit SAM (orange) und mit (S)-Norcoclaurin (lila), His 253 liegt günstig für die Katalyse zur 6-Hydroxylgruppe des Substrats, der Stickstoff des Substrats bildet eine Salzbrücke zu Asp 165, die 4'-Hydroxylgruppe bildet eine Wasserstoffbrücke mit Asn 306, Ile 113 und Met 162 bilden Van-der-Waals Wechselwirkungen mit den aromatischen Ringen des Substrats

### 3.5.4 Vergleich der Substratbindungen

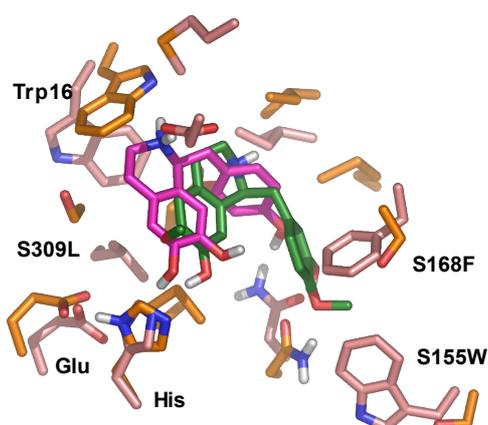


Abbildung 37: Aktives Zentrum der N7OMT (orange) und der 6OMT (rosa) übereinandergelegt Norretikulin (grün) und Norcoclaurin (lila), die für die Mutagenese ausgewählten Aminosäuren sind als S155W, S168F, S309L beschriftet, zur Orientierung wurden die katalytischen Aminosäuren Histidin und Glutamat benannt, um die Übersichtlichkeit zu erhöhen wurden die Kofaktoren weggelassen

In Abbildung 37 sind die Aminosäuren der aktiven Zentren von N7OMT und 6OMT übereinander gelegt dargestellt. Zu erkennen ist eine unterschiedliche Anordnung der Substrate Norretikulin und Norcoclaurin. Sie interagieren nicht mit denselben Aminosäuren, bis auf das His 263/His 253. Es liegen also verschiedene Bindemotive vor. Dennoch kann aus diesem Vergleich abgeleitet werden, dass die Serine 155, 168 und 309 aus der N7OMT in der 6OMT durch die größeren unpolaren Aminosäuren Tryptophan 158, Phenylalanin 145 und Leucin 299 ersetzt sind. In der 6OMT sind Phe 145 und Trp 158 zwar nicht direkt an der Substraterkennung beteiligt, sie führen aber durch das Hineinragen in die Bindetasche zu einer Verkleinerung des Platzangebotes für das Substrat. Am auffälligsten ist Leu 299,

welches anscheinend direkt zur Substraterkennung in der 6OMT nötig ist. Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden Mutationen in die N7OMT eingefügt. Wenn das Austauschen von Ser 155, 168 und 309 gegen Phe, Trp und Leu zu einer Änderung der Substratspezifität führt, wäre die Richtigkeit des Bindemotivs bestätigt. Eine Seite der Bindetasche wird vom zweiten Monomer gebildet. Im Vergleich der beiden OMTs fällt auf, dass die beiden Trp 16 diese Seite der Bindetasche formen und sehr unterschiedliche Konformationen einnehmen. Eine Insertion in der N7OMT von drei Aminosäuren am C-Terminus zwischen Ser 345 und Ala 349 führt zu einem verlängerten *loop* (Abbildung 38). Dieser *loop* beeinflusst vermutlich die Konformation von Trp 16 und damit das Platzangebot in der Bindetasche.

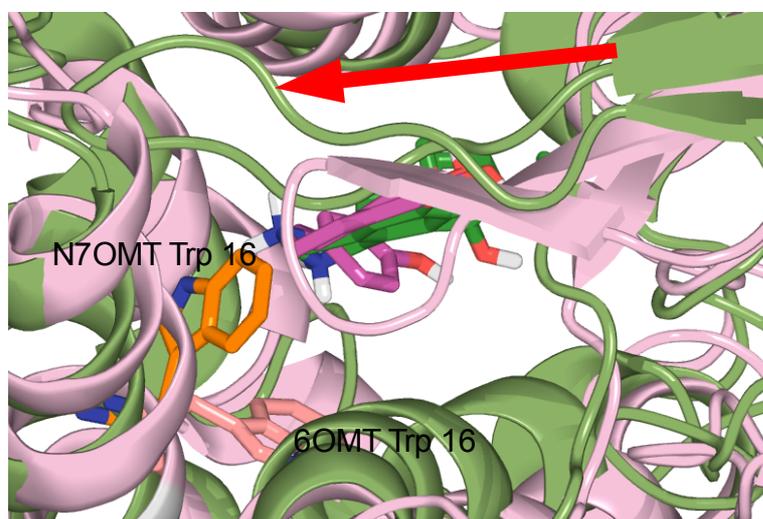


Abbildung 38: Lage des Trp 16 in N7OMT und 6OMT  
Sekundärstruktur von der N7OMT und Substrat Norretikulin in grün, 6OMT und Norcoclaurin in rosa, die beiden Trp 16 sind hervorgehoben, der rote Pfeil markiert den verlängerten loop in der N7OMT

### 3.6 Mutierte Enzymvarianten von N7OMT

Nach den Untersuchungen am Proteinmodell, insbesondere dem Vergleich zwischen den Substratbindetaschen von N7OMT und 6OMT, wurden Aminosäuren ausgewählt, die für eine spezifische Substraterkennung verantwortlich sein könnten. Am auffälligsten waren die drei Aminosäuren Serin 155, 168 und 309 deren Position in der 6OMT von den Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Leucin eingenommen wurde. Eine Austausch dieser drei Serine gegen die größeren Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Leucin in der N7OMT (S155W, S168F und S209L) könnte sehr wahrscheinlich eine Umsetzung von Norretikulin verhindern und eventuell eine Umsetzung von Norcoclaurin ermöglichen. Es wurden alle Kombinationsmöglichkeiten dieser Mutationen erzeugt bis zur Dreifachmutante S155W/S168F/S309L. Nach weiteren Versuchen und fortgeschritteneren Modellen wurde

noch zusätzlich eine D312L Mutante generiert. Der Grund dafür war ein Vergleich von der N7OMT mit der bereits gut bekannten 7OMT, welche hauptsächlich Retikulin umsetzt aber auch kleinere Verbindungen wie Guaiacol und Vanillin (Ounaroon u. a. 2003). Es sollte nun untersucht werden, ob ein Austausch des Aspartats 312 gegen Leucin zur Erkennung von Retikulin anstelle von Norretikulin führt, da die 7OMT an dieser Position ein Leucin hat. Zusätzlich wurde noch eine Deletionsmutante generiert, in der der gesamte N-terminale Bereich fehlt (von Methionin 1 bis Glutamin 114), die also keine Dimerisierungsdomäne besitzt. Hier wurde ein Verlust der Enzymaktivität erwartet.

### 3.6.1 Herstellung der mutierten Enzyme

Die mutierten N7OMT Gene wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellt. Die Deletionsmutante konnte mittels PCR mit dem DomBfor1 Primer und dem A21G11rev Primer erzeugt und in den Expressionsvektor pQE32 kloniert werden. Alle mutierten N7OMT Gene wurden wie der Wildtyp exprimiert, gereinigt und durch SDS-PAGE überprüft (Abbildung 39).

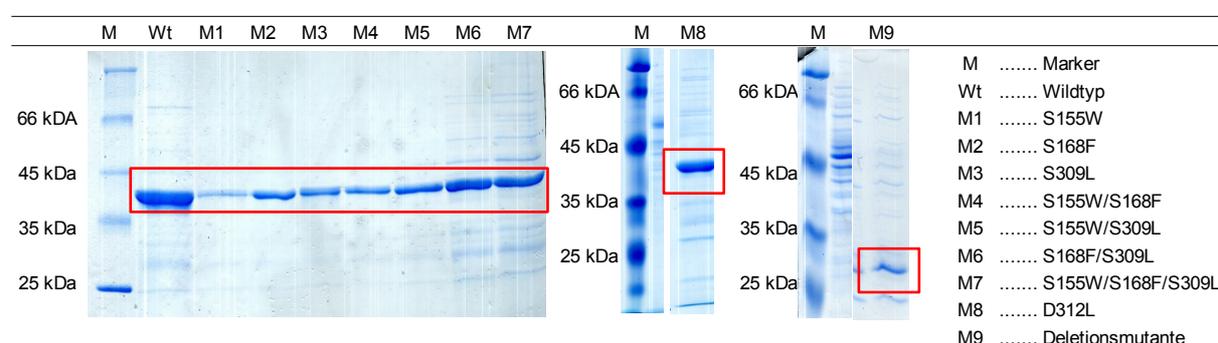


Abbildung 39: SDS-Page der gereinigten Proteine des N7OMT Wildtyps und der N7OMT Mutanten

### 3.6.2 Katalytische Aktivität der mutierten Enzyme

Im Enzymassay wurden (*S*)-Norretikulin, (*S*)-Retikulin und Norcoclaurin als Substrate getestet. Bei den Mutanten D312L, Deletionsmutante, S155W/S168F und S155W/S309L konnte keine Aktivität mit diesen Substraten gemessen werden. Dafür zeigten die Mutanten S155W, S168F und S309L Aktivität gegenüber Norretikulin. Für diese wurden wie für den Wildtyp die kinetischen Parameter mit einer  $v/S$ -Kurve bestimmt (Abbildung 40).

Die unter der Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik berechneten maximale Reaktionsgeschwindigkeiten waren für die Mutanten geringer als für den Wildtyp (Tabelle 4).

Enzym	$V_{\max, \text{spez}}$ in $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$	$K_m$ in $\mu\text{M}$	$k_{\text{cat}}$ in $\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_m$ in $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Wildtyp	$1800 \pm 50$	$44 \pm 5$	0,072	1,64
S155W	$950 \pm 30$	$71 \pm 4$	0,038	0,54
S168F	$640 \pm 12$	$12 \pm 3$	0,026	2,23
S309L	$770 \pm 40$	$51 \pm 7$	0,031	0,60
S155W/S168F	keine Aktivität			
S155W/S309L	keine Aktivität			
S168F/S309L	$890 \pm 60$	$77 \pm 22$	0,036	0,46
S155W/S168F/S309L	kaum Aktivität			
D312L	keine Aktivität			
nurKatalytischeDomäne	keine Aktivität			

Tabelle 4: Vergleich der Aktivitäten der verschiedenen Enzymmutanten und des Wildtyps gegenüber (S)-Norretikulin

Die Substratspezifität für Norretikulin, die sich in den  $K_{\text{cat}}/K_m$ -Werten ausdrückt, lagen unter dem für den Wildtyp, außer bei S168F. In der Mutante N7OMT S168F kommt es offenbar zu einer Erhöhung der Spezifität für Norretikulin, was aber mit einer Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit einhergeht.

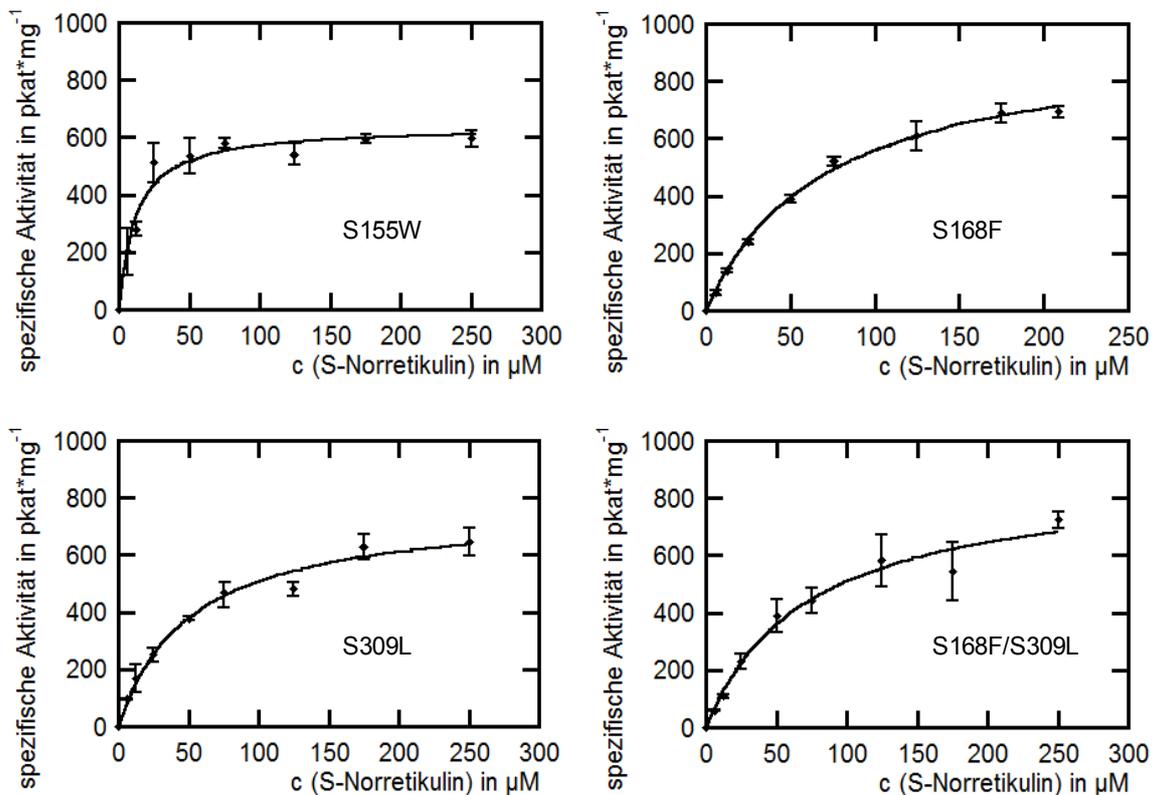


Abbildung 40: V/S-Kurven der Mutanten N7OMT S155W, S168F, S309L und S168F/S309L  
Berechnung des Graphen unter Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Kaleidagraph

Die Dreifachmutante kann kein (*S*)-Norretikulin mehr umsetzen, ist aber in der Lage Norcoclaurin zu methylieren. Über das Maß der Aktivität kann keine Aussage getroffen werden, da im Kurztest (3 min) mit radioaktiver Detektion nur sehr wenig Produkt nachgewiesen werden konnte. Bei Inkubationen über einen längeren Zeitraum (30 min) kann ein Teil des Norcoclaurins umgesetzt werden. Die Detektion erfolgte über die RP-HPLC (Abbildung 41). Das gebildete Produkt wurde aufgefangen und in der LC-MS Analyse eingesetzt (Abbildung 42).

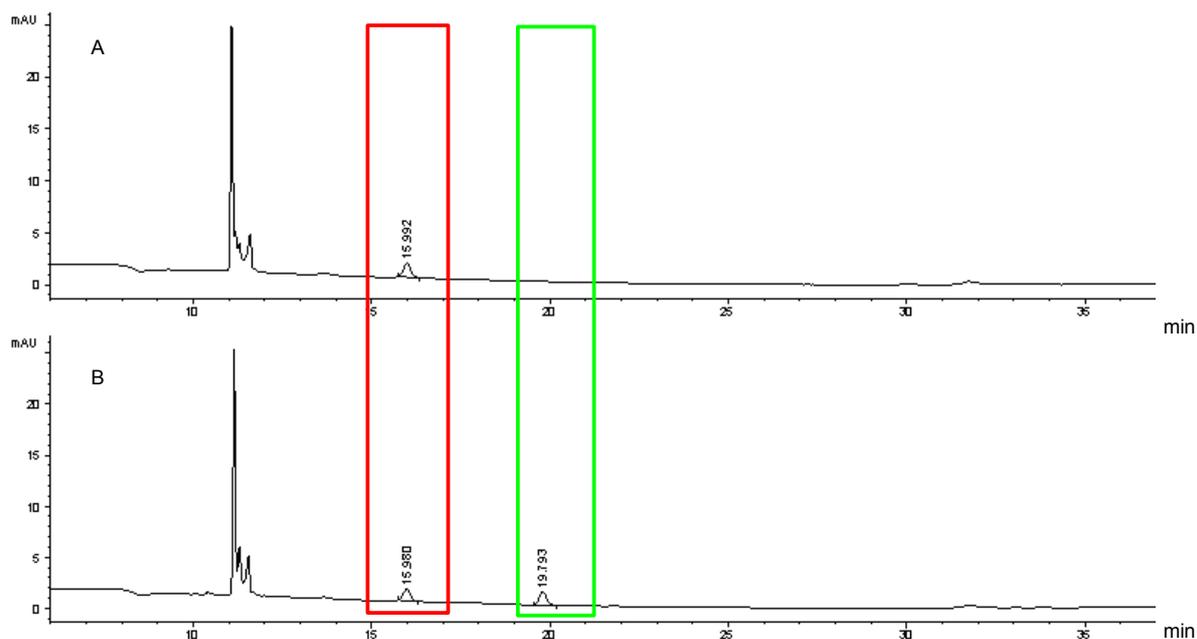


Abbildung 41: RP-HPLC Chromatogramm des Umsatzes der N7OMT S155W/S168F/S309L mit Norcoclaurin  
(A) Norcoclaurin mit N7OMT S155W/S168F/S309L (abgekocht)  
(B) Norcoclaurin mit N7OMT S155W/S168F/S309L  
mit Rot markiert das Substrat Norcoclaurin, mit Grün das methylierte Produkt

Norcoclaurin hat eine Masse von 271,1. Das Ion mit  $m/z$  286,1 entspricht der Masse des einfach methylierten und protonierten Norcoclaurins. Die  $m/z$  269,1 entstand durch eine Abspaltung der Stickstoffgruppe vom methylierten Reaktionsprodukt. Ein Ion ohne Stickstoff mit  $m/z$  175,1 leitet sich aus dem Isochinolinring ab. Hier tritt auch wieder eine Erhöhung der Masse um 14 gegenüber dem Norcoclaurin auf. Daraus folgt, dass die Methylierung nicht am Benzylrest sondern am Isochinolinrest stattgefunden hat. Es kommt allerdings keine N-Methylierung an der Stickstoffgruppe in Frage, da nach der Abspaltung dieser Gruppe immer noch eine um 14 erhöhte  $m/z$  auftritt. Das bedeutet, die Methylierung hat an der 7-Hydroxylgruppe oder der 6-Hydroxylgruppe stattgefunden. Eine genauere Unterscheidung ist mit der verwendeten LC-MS nicht möglich, da keine Fragmentierung zwischen diesen beiden Hydroxylgruppen auftritt.

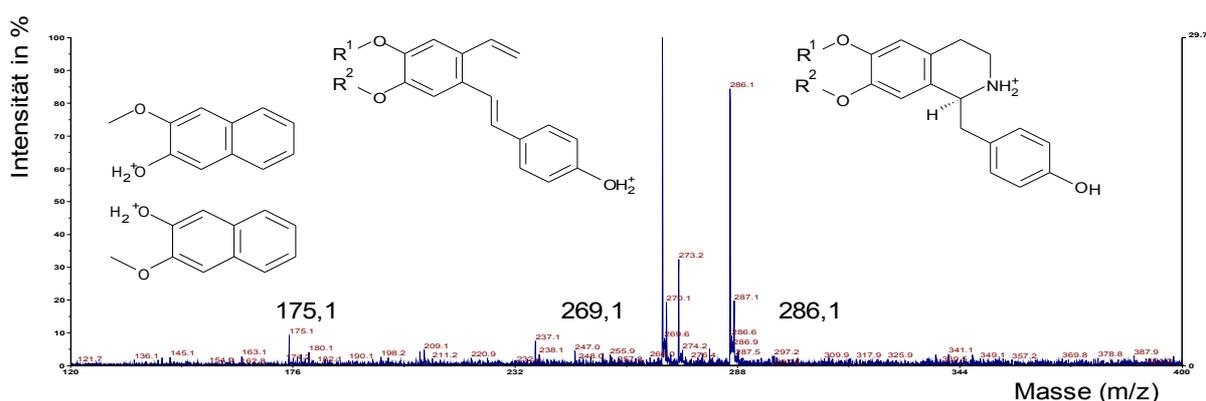


Abbildung 42: Massenspektrum des enzymatisch durch S155W/S168F/S309L N7OMT aus Norcoclaurin gebildeten Reaktionsproduktes  
das Fragmentierungsmuster lässt den Schluss zu, dass es sich um eine einfache Methylierung an der 7- oder 6-Hydroxylgruppe von Norcoclaurin handelt.

### 3.7 Expressionsanalyse

Die zeitliche und örtliche Expression eines Gens kann Aufschluss geben über die biologische Funktion. Da die Sequenzanalysen, die Werte aus der differentiellen Genexpressionsanalyse und die Aktivität gegenüber (*S*)-Norretikulin bisher auf eine Rolle von N7OMT im Benzylisochinolinstoffwechsel gedeutet haben, sollte das näher untersucht werden. Dafür wurde die Expression von N7OMT und bekannten OMTs (7OMT, 4'OMT und 6OMT) aus *P. somniferum* in den verschiedenen Organen der Pflanze kurz nach der Blüte bestimmt. Die Bildung von Norlaudalin lässt eine Beteiligung an der Papaverinbiosynthese vermuten. Daher wurde zusätzlich noch der Stängel von der Varietät *P. somniferum* Papaverin einbezogen, da die *P. somniferum* Varietät mehr Papaverin als der Wildtyp produziert und eventuell auch eine höhere Expression von N7OMT zeigt. Für die Analyse wurde zuerst ein Northernblot in Betracht gezogen. Die verwendeten Sonden stellten sich im *dot blot* Experiment als zu unspezifisch heraus. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse des Expressionsniveaus ist eine semi-quantitative *real-time* RT-PCR. Hier kann sehr viel spezifischer die relative Menge einer mRNA bestimmt werden als mit der Northernblot Analyse. Um einen geeigneten Bereich in der OMT Sequenz zu finden, der sich genügend von denen der anderen verwendeten OMTs unterscheidet, wurde ein Vergleich der Gensequenzen im Bereich des 3'-untranslatierten Bereiches durchgeführt. Hier konnten ausreichend Unterschiede festgestellt werden. Die zu amplifizierenden Bereiche wurden mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems) bestimmt. Als optimale Schmelztemperatur für das Amplikon wurde 70 °C angenommen bei

einer Länge von 120 bp. Das Referenzgen wurde der Elongationsfaktor 1 aus *P. somniferum*, da er im Vergleich zum zuerst getesteten SUMO 1 eine gleichmäßigere Expression in den verschiedenen Organen aufweist. Die Qualität der RT-PCR wurde mit Hilfe der Schmelztemperaturkurve bewertet, hier zeigte sich bei allen verwendeten Werte nur ein Maximum in der Nähe der berechneten Schmelztemperatur. Die Berechnung der relativen Unterschiede der Expressionsniveaus zeigte deutlich (Abbildung 43), dass alle untersuchten OMTs im Vergleich zum Referenzgen EF1 am stärksten im Stängel von *P. somniferum* und *P. somniferum* Papaverin exprimiert werden. Zwischen den OMTs sind die Unterschiede weniger stark ausgeprägt. Das Expressionsmuster bleibt hier in den beiden untersuchten *Papavern* im Stängel ähnlich mit der 4'-OMT als am stärksten exprimierter OMT. N7OMT ist generell schwächer exprimiert als die anderen OMTs. N7OMT wird in den selben Pflanzenteilen und auf vergleichbarem Niveau wie die anderen untersuchten benzylochinolin-spezifischen OMTs exprimiert.

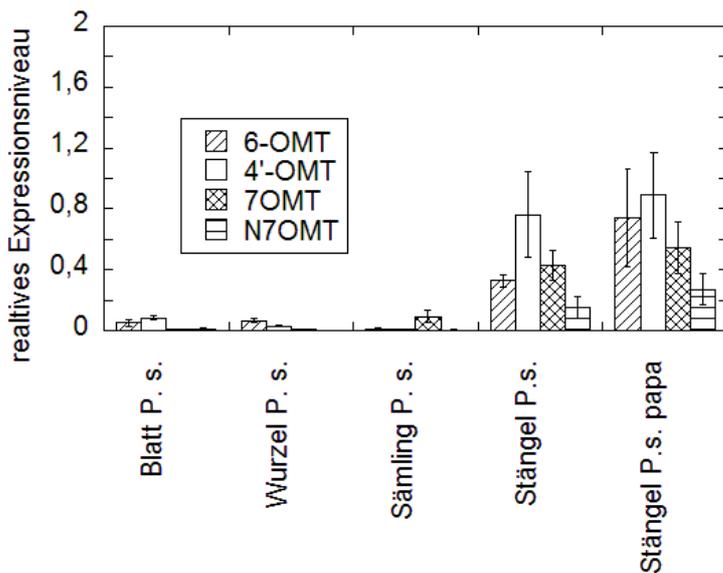


Abbildung 43: Vergleich der Expressionsniveaus von 4'OMT, 6OMT, 7OMT und N7OMT in verschiedenen Organen von *Papaver somniferum* (*P. s.*) und dem Stängel von *P. somniferum* Papaverin (*P. s. papa*) mittels reverser Transkription real time PCR; die Werte wurden auf das Expressionsniveau von Elongationsfaktor1 aus *P. s.* bezogen

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifizierung einer neuen OMT

O-Methylierungen spielen eine große Rolle bei der Entstehung der Vielfalt der pflanzlichen Sekundärstoffe. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Veröffentlichungen zu neuen pflanzlichen OMTs gemacht (Gang u. a. 2002; Nagel u. a. 2008; Kopycki u. a. 2008; Zhou u. a. 2009, 2008). In den dabei untersuchten Arten wurden aufgrund von DNA und cDNA Sequenzierungen und Sequenzvergleichen neue OMTs gefunden. Sie konnten durch die Identifizierung von konservierten Bereichen wie zum Beispiel dem Motiv für die SAM-Bindung erkannt werden. Es wurden Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen der Methyltransferasen durchgeführt, was zur Bildung von Klassen und Clustern führte (Lam u. a. 2007; Joshi und Chiang 1998). Im Groben sind zwei Klassen zu unterscheiden: die erste bestehend aus den zwei Unterklassen Caffeooyl-CoA OMTs und Carboxylsäure OMTs, welche Kationen für die Katalyse benötigen und phenolische Hydroxylgruppen von Zimtsäure-CoA Estern bzw. Hydroxylgruppen von aliphatischen Substraten methylieren. Die zweite große Klasse benötigt keine Kationen und diese OMTs bevorzugen die verschiedensten Substrate wie z. B. Hydroxylzimtsäuren, (Iso-)Flavonoide oder Alkaloide. Für die erste Klasse konnten viele konservierte Sequenzbereiche identifiziert werden, die sich sehr gut eignen, um neue OMTs einer bestimmten Unterklasse zuzuordnen. Die zweite Klasse hingegen enthält sehr viel unterschiedlichere OMTs. Diese können trotz einiger Ausnahmen nach den Substratklassen wie Hydroxylzimtsäuren, Phenylpropanoiden, Flavonoiden und Benzylisochinolinen gruppiert werden. Die aus *P. somniferum* erstmals identifizierte genomische Sequenz von A21G11 konnte der zweiten Klasse zugeordnet werden und ist den BIA-OMT Sequenzen sehr ähnlich.

Der Vergleich der neuen OMT Sequenz mit den in Datenbanken enthaltenen Sequenzen von Benzylisochinolin-OMTs zeigt die größte Ähnlichkeit mit 53- 68 % zu den Norcoclaurin-6OMTs aus *P. somniferum*, *C. japonica* und *T. flavum*. Der Sequenzvergleich der BIA-OMT Proteinsequenzen zeigt weiterhin typische Merkmale pflanzlicher OMTs der Klasse II. Die ersten 130 Aminosäuren gehören zur N-terminalen Dimerisierungsdomäne. Das Bindemotiv für den Kofaktor SAM ist in allen untersuchten OMTs konserviert, ebenso wie die

Aminosäuren der katalytischen Diade, in der N7OMT sind das His 263 und Glu 321. Die 14 Aminosäuren vor dem katalytischen Glutamat werden von Schröder u. a. als Motiv zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen Substratspezifitäten diskutiert (Schröder et al. 2002). Allerdings funktioniert das nur für die Unterscheidung zwischen verschiedenen Unterklassen, also zum Beispiel Isoflavonoid-OMTs von BIA-OMTs (Ibrahim u. a. 1998). Die von mir betrachteten OMTs gehören alle der selben Unterklasse an, und es ist kein Unterschied in diesem Bereich zu erkennen, der mit der Substratspezifität korreliert. Allein über Sequenzanalysen ist es also nicht möglich, auf die molekulare Funktion zu schließen.

## 4.2 Dimerisierung

Die Sequenzanalyse zeigte das Vorhandensein einer Dimerisierungsdomäne, wie sie typisch für viele pflanzliche OMTs ist. In der IF7OMT wird die Dimerisierung als wichtig für die Bildung der Substratbindetasche beschrieben (Zubieta u. a. 2001). Hier bilden die drei Aminosäuren Tyr 25, Phe 27 und Ile 28 des zweiten Monomers von IF7OMT die Rückwand der Bindetasche und interagieren mit dem Substratmolekül. Über ein Wassermolekül kann eine Wasserstoffbrücke zu einer Hydroxylgruppe des Substrats gebildet werden. Außerdem ist von OMTs aus *T. tuberosum* bekannt, dass sie *in vitro* Heterodimere aus Untereinheiten verschiedener OMTs bilden können, die neue Substratspezifitäten aufweisen (Frick und Kutchan 1999). Es ist also anzunehmen, dass die Unterscheidung zwischen verschiedenen Substraten auch über die Kontaktfläche zwischen den monomeren Untereinheiten erfolgt.

Der experimentelle Nachweis einer Dimerisierung der N7OMT wurde in der vorliegenden Arbeit über die Bestimmung der nativen Größe des Proteinmoleküls geführt. Für die N7OMT ließen sich zwei unterschiedlich Formen in der Gelfiltration nachweisen, die etwa 72 und 46 kDa groß sind (siehe Abbildung 28). Das 72 kDa große Protein stellt die dimere Form der N7OMT dar, die Aktivität konnte für diese Fraktion nachgewiesen werden. Das Monomer ist im denaturierten Zustand etwa 42 kDa groß, das Dimer entspricht also annähernd der doppelten Größe. Die Abweichung von einem Erwartungswert von 84 kDa liegt an der Messmethode. Die Größenbestimmung über Gelfiltration ist nur linear für globuläre Proteine (Horiike u. a. 1983). Die 3D-Struktur von N7OMT ist nicht globulär. Außerdem verschränken sich die Monomere bei der Dimerisierung ineinander, was im 3D Modell gut erkennbar ist (siehe Abbildung 16). Die zweite Proteinfraction von 46 kDa zeigt keine Aktivität, ist aber

aufgrund der Größe in der SDS-PAGE auch eine Form von N7OMT. Es könnte sich hierbei um die monomere Form der N7OMT handeln, die im Gleichgewicht mit der dimeren Form vorkommt. Eine Denaturierung der 72 kDa Fraktion führt auf jeden Fall zu einer Verkleinerung des Proteins in der Gelfiltration (ca. 51 kDa), vermutlich weil die Dimerisierung unterbunden wird. Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass eine Dimerisierung für die Enzymaktivität notwendig ist. Unterstützt wird diese Aussage durch die Deletionsmutante der N7OMT, der die Dimerisierungsdomäne fehlt und die keine Aktivität mehr zeigt (siehe 3.6.2)

### 4.3 Expressionsanalyse

Nachdem aus der Expressionsanalyse von Ziegler u. a. bekannt war, dass der EST von N7OMT auch in *P. somniferum* Papaverin stark exprimiert ist, wurde eine genauere Expressionsanalyse mittels quantitativer *real time* PCR zum Vergleich der verschiedenen BIA-OMTs durchgeführt. Verglichen wurden die Expressionen der BIA-OMTs in den verschiedenen Organen oberer Stängel, Wurzel und Blatt der Pflanze kurz nach der Blüte sowie in der gesamten Pflanze im Alter von 6 Wochen. Es war bereits bekannt, dass die 4'OMT, die 7OMT und weitere Enzyme der BIA-Biosynthese wie SalAT (Salutaridinol-7-*O*-acetyltransferase) und COR (Codeinonreduktase) im Leitgewebe des Stängels vorhanden sind (Bird u. a. 2003; Weid u. a. 2004). Von Weis u. a. sind die 4'OMT, die 7OMT und die SalAT über Immunfärbung in Nachbarzellen der Milchsaftzellen (*laticifers*) gefunden worden, die COR hingegen direkt in den Milchsaftzellen am Phloem. Die 7OMT ist ebenfalls über Immunfärbung am Rand des Leitgewebes der Wurzel nachgewiesen wurden. Auch auf RNA-Ebene wurden die 7OMT und die 4'OMT in den Nachbarzellen der Milchsaftzellen der aerialen Pflanzenteile mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Die Biosynthese der BIAs findet also vermutlich in zwei verschiedenen Zelltypen am Phloem statt: die Biosynthese bis zum Salutaridinol-7-*O*-acetat wird den genannten Nachbarzellen der Milchsaftzellen zugeordnet. Ab der *O*-Demethylierung von Thebain muss die Biosynthese in den Milchsaftzellen selbst stattfinden, da hier Thebain und die COR nachgewiesen worden sind. Ob ein Transport des Salutaridinol-7-*O*-acetats oder des Thebains in die Milchsaftzellen stattfindet, ist noch unbekannt (Weid u. a. 2004). Es gibt noch weitere Untersuchungen zur Lokalisation der Enzyme der BIA-Biosynthese und ihrer mRNAs, die den oben dargestellten Ergebnissen in einigen Punkten widersprechen. So wurden die 6OMT, die 4'OMT und die

SalAT direkt in den Siebzellen des Phloems nachgewiesen (Bird u. a. 2003; Samanani u. a. 2006). Die Identifizierung der Siebzellen erfolgte aber nicht wie bei Weid u.a. über einen Antikörper gegen die Kallose der Siebzellplatten, sondern über die Ko-Lokalisation mit einer Siebzell-spezifischen ATPase. Offenbar sind Milchsaftzellen und Siebzellen schlecht zu unterscheiden. Milchsaftzellen in *P. somniferum* sind benachbart zu den Siebzellen, stehen aber nicht mit diesen in direktem Kontakt über Poren oder Siebplatten. Das Zytoplasma der Milchsaftzellen ist mit Vesikeln verschiedener Größe gefüllt, die den Milchsaft (oder Latex) enthalten. Die Zellen selbst bilden ein verzweigtes Netzwerk parallel zum Leitgewebe in der gesamten Pflanze (Thureson-Klein 1970).

In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich eine stark erhöhte Expression aller untersuchten OMTs im Stängel. Die starke Expression der 6OMT, der 4'OMT und der 7OMT im Stängel war nach den Daten aus der Literatur zu erwarten. Die ähnliche Expression der N7OMT weist auf eine Beteiligung am Alkaloidstoffwechsel hin. Die Expression der OMTs in der jungen Pflanze ist vergleichbar mit der Expression in Blättern und Wurzeln der Pflanze nach der Blüte. Das widerspricht nicht den Werten aus der Literatur, hier ist bekannt, dass in Keimlingen von *P. bracteatum* ab dem 4. Tag Thebain nachgewiesen werden kann (Rush u. a. 1985), dem zufolge müssen auch die Gene der Alkaloidbiosynthese exprimiert worden sein.

Durch den Vergleich mit der Expression in der Varietät *P. somniferum* Papaverin sollte untersucht werden, ob N7OMT hier stärker exprimiert wird als im normalen *P. somniferum*. Da die Varietät *P. somniferum* Papaverin einen erhöhten Papaveringehalt gegenüber dem sonst verwendeten *P. somniferum* aufweist (Pienkny u. a. 2009), würde die erhöhte Expression von N7OMT auf eine Beteiligung an der Papaverinbiosynthese deuten. Zuerst fällt auf, dass sich das Verhältnis der Expressionswerte der OMTs verschoben hat (siehe Abbildung 43). Macht die 4'OMT noch fast die Hälfte (46 %) aller gemessenen OMTs in *P. somniferum* aus, so sind es in der Papaverin-Varietät nur noch 36 %. Dafür konnten hier höhere Werte für die 6OMT gemessen werden, nämlich 30 anstatt 20 %. Der Wert für die N7OMT hat sich ebenfalls erhöht, und zwar von 9 auf 11 %. Außerdem wurden relativ zum EF1, dem Referenzgen, höhere Werte in der Papaverin-Varietät gemessen. In *P. somniferum* Papaverin sind die Expressionsniveaus der Gene 4'OMT und 7OMT um 16 und 27 % erhöht gegenüber den Werten aus *P. somniferum*, die Niveaus von der 6OMT und der N7OMT sogar um 126 und 77 %. Die Erhöhung des Expressionswerts der N7OMT in der Papaverin-Varietät ist nicht

signifikant, da die Schwankungen zwischen den biologischen Proben sehr hoch waren. Eine parallele Analyse der Alkaloidgehalte zu den Expressionswerten je Pflanze hätte große Vorteile. Dann könnten erhöhte Papaveringehalte mit erhöhten Transkriptmengen von N7OMT in individuellen Pflanzen auftreten. Die Ergebnisse widersprechen nicht einer Beteiligung von N7OMT an der Papaverinbiosynthese, unterstützen diese aber auch nicht. Die starke Erhöhung der 6OMT und die Senkung der 4'OMT Werte könnte bedeuten, dass die Biosynthese der Vorläuferverbindung von Papaverin hier zwischen der 6OMT und der 4'OMT von der etablierten Biosynthese zum Retikulin abzweigt. Die genaue Lokalisation von N7OMT Transkript könnte mittels *in situ* Hybridisierungen durchgeführt werden. Eine Zugehörigkeit der N7OMT zur BIA Biosynthese sollte zu einer Zuordnung zu den Nachbarzellen der Milchsaftzellen in Stängel und Kapsel führen, wie es für die 4'OMT und die 7OMT gezeigt worden ist (Weid u. a. 2004).

#### 4.4 Proteinstrukturen

Um die Identifizierung eines möglichen Substrates der Methyltransferase zu unterstützen, wurde ein Homologiemodell von N7OMT erstellt und die Passfähigkeit möglicher Substratstrukturen untersucht. Zusätzlich wurde von der 6OMT ein Modell erstellt und das Substrat Norcoclaurin hineingesetzt. Die Modelle von N7OMT und 6OMT sind auf der Grundlage der IF7OMT erstellt worden, da die IF7OMT (1FP2) mit 35 % zur N7OMT und 38 % zur 6OMT das ähnlichste Enzym mit bekannter 3D-Struktur ist. Die Auswertungen mit Ramchandranplot, PROSA Plot und *z-score* legen nahe, dass beide Modelle den tatsächlichen 3D-Strukturen dieser Enzyme sehr nahe kommen. Im Vergleich mit den Werten der Röntgenstruktur von IF7OMT zeigen sich nur geringe Unterschiede. Nicht vergleichbar sind die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta 1$  und  $\beta 2$  von N7OMT. Sie wurden nicht auf der Basis von der IF7OMT berechnet, sondern es wurde aufgrund der Sequenz angenommen, dass diese Aminosäuren  $\beta$ -Faltblätter ausbilden könnten. Falls von der N7OMT einmal eine experimentelle Struktur bekannt sein sollte, wären Abweichungen im Bereich der  $\beta$ -Faltblätter am ehesten zu erwarten. Das Modell der N7OMT wurde in die CASPUR Homologiemodell-Datenbank gestellt.

Mit den Modellen als Grundlage wurden die Bindetaschen der beiden Enzyme N7OMT und 6OMT verglichen. Die Überlagerung der N7OMT mit der 6OMT zeigt, dass die 3 Aminosäuren Ser 155 (in 6OMT Trp), Ser 168 (Phe) und Ser 309 (Leu) für große

Unterschiede in der Bindetasche sorgen (siehe Abbildung 37). Hier ist nicht nur die funktionelle Gruppe verschieden, sondern auch die Größe der Aminosäure. Die Serine 155, 168 und 309 in der N7OMT bilden jedoch keine Wasserstoffbrücken mit dem Substrat (*S*)-Norretikulin über die Sauerstoffatome in den Hydroxyl- und Methoxylgruppen, sondern heben die räumliche Begrenzung durch Tryptophan, Phenylalanin und Leucin auf. Aus anderen Modellierungs-Studien ist ein ähnlicher Zusammenhang bekannt. Die unterschiedlichen Substratspezifitäten zwischen zwei Isoflavonoid OMTs wurden mit dem Austausch von raumfüllenden Aminosäuren in der IF7OMT (*M. sativa*) gegen kleinere Aminosäuren in der IOMT2 (*M. truncatula*) erklärt (Deavours u. a. 2006). Durch mehr Raum in der Bindetasche erhält die IOMT2 eine größere Flexibilität bei der Substratbindung und kann mehr unterschiedliche Substrate umsetzen.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den untersuchten OMTs ist die Konformation von Trp 16, welches zwar in beiden Enzymen vorkommt, aber durch die Aminosäuren der Umgebung eine ganz andere Konformation in der N7OMT im Vergleich zu 6OMT annehmen muss. So kann in der 6OMT zwischen Lys 17 und Glu 24 eine Salzbrücke ausgebildet werden, was zu einer größeren Entfernung von Trp 16 zum aktiven Zentrum beiträgt. In der N7OMT geschieht dies nicht. Außerdem befindet sich in der 6OMT der *loop* zwischen Ser 335 und Glu 338 an der Position des Trp 16 in der N7OMT. In der N7OMT ist dieser Bereich verlängert, er besteht aus den zusätzlichen drei Aminosäuren Ala 346, Val 347 und Phe 348 und musste daher anders positioniert werden. Alle anderen untersuchten OMTs fehlen diese drei Aminosäuren an dieser Stelle (siehe Abbildung 13). Daher ist in der N7OMT das Trp 16 in die Bindetasche hinein gedreht. So ist eine Positionierung von (*S*)-Norcoclaurin wie in der 6OMT unmöglich (siehe Abbildung 38).

## 4.5 Substratspezifität und *docking*

Nach dem Vergleich der gesamten N7OMT-Sequenz mit Datenbankeinträgen und der Zuordnung zu den Benzylisochinolin-OMTs stellte sich die Frage nach dem Substratspektrum der neuen OMT. Dieses würde Auskunft über die Funktion des Enzyms in der Pflanze geben. Die Versuche zur Bestimmung der Substratspezifität waren eingeschränkt durch die schlechte Verfügbarkeit der Substrate. Die zur Verfügung stehenden Substrate wurden getestet, eines davon, Norcoclaurin, vorher synthetisiert. Nur mit einem Substrat von 26 *in vitro* getesteten

Substraten konnte Aktivität gemessen werden. Das könnte zum einen an einer hohen Substratspezifität von N7OMT liegen. Zum anderen könnte das tatsächlich *in vivo* umgesetzte Substrat eine völlig andere, nicht getestete Verbindung sein. Ein passendes Substrat außerhalb BIAs zu finden ist eher unwahrscheinlich, da die Zuordnung zur Gruppe der BIA-OMTs durch die hohe Sequenzähnlichkeit und die Aktivität gegenüber Norretikulin stark unterstützt wird. Da die 3D-Struktur von N7OMT ermittelt worden ist, konnten 96 mögliche Substrate im computertheoretischen Ansatz getestet werden. Von diesen zeigten viele eine hohe Affinität zur Substratbindetasche. Neben dem tatsächlich umgesetzten (*S*)-Norretikulin hätten auch die Verbindungen (*S*)-4'-*O*-Methylnorlaudanosolin und Morphinon das Potential, ein Substrat der N7OMT zu sein, denn sie wurden im *docking* besser bewertet. Auch besser bewertet, aber in dieser Konfiguration nicht in der Pflanze nachgewiesen, wurde (*R*)-Orientalin. Die Herstellung dieser Verbindungen war allerdings im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Falls man diese Verbindungen testen könnte, wäre es wahrscheinlich, dass einige von ihnen methyliert werden oder als Inhibitor wirken. Damit möchte ich zu den Vor- und Nachteilen des *dockings* kommen.

Die *docking* Programme wurden zur Erkennung von Liganden von Rezeptorproteinen entwickelt (Blaney und Dixon 1993). Bei der Ligandenbindung kommt es nicht zu einer Reaktion und der Ligand bleibt chemisch unverändert. In dieser Arbeit wurde das *docking* genutzt, um die Anzahl von möglichen Substraten auf die zu reduzieren, die von ihrer Größe und der Lage der Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren in die Substratbindetasche des Enzyms passen würden. Da das Enzym eine höhere Affinität zum Übergangszustand des Substrates als zum Substrat oder Produkt hat, könnte ein mittels *docking* und *scoring* gefundener, sehr gut passender Ligand auch als Inhibitor wirken. Strukturen der Substrate im Übergangszustand zu verwenden, gilt daher als erfolgversprechender (Mulholland u. a. 1993; Ranaghan u. a. 2004; Mulholland 2005). Eine Aussage über die Umsetzbarkeit einer so gefundenen Verbindung kann in beiden Fällen (normales *docking* und *docking* mit Übergangszustand) aber nur durch einen Enzymtest getroffen werden. Neben der Berechnung der richtigen Konformation und Lage des Liganden in der Bindetasche stellt die Bewertung einer solchen Pose ein weitere wichtige Aufgabe des *docking* dar. Die bisher zur Verfügung stehenden *docking* Programme können von der freien Energie der Bindung lediglich den Enthalpie-Teil bewerten. Die Entropie bleibt dabei völlig unbeachtet. Zu den günstigsten Voraussetzungen gehört das Wissen über die Konformation des Proteins im Komplex mit

bekannten Liganden und welche Aminosäuren mit diesen Liganden wechselwirken. Mit solchem Wissen kann zum Beispiel das *docking* für ein bestimmtes Protein trainiert werden. Dadurch kann man für unbekannte potentielle Liganden eine Aussage treffen, mit welcher Wahrscheinlichkeit diese tatsächlich binden.

Hier war das alles nicht möglich, da die N7OMT ein völlig neues Enzym ist. Dafür hat die Platzierung von (*S*)-Norretikulin an Position 4 im *ranking* der verfügbaren Verbindungen zu einer schnellen Etablierung des Enzymtests geführt.

## 4.6 Die Bindung von (*S*)-Norretikulin und (*S*)-Norcoclaurin

Außer dem *ranking*-Ergebnis führte das *docking* zum detaillierten Verständnis für die Substratbindung und ermöglichte die Mutagenese-Studien. Der Katalysemechanismus ist bei allen OMTs derselbe, die katalytischen Aminosäuren Histidin und Glutamat sind in allen untersuchten OMT konserviert. Unterschiede sind bei der Substratbindung zu erwarten.

Die Methionine 128, 172 und 313 von der N7OMT bilden Van-der-Waals Wechselwirkungen mit dem Isochinolinring und dem Benzylring von Norretikulin. In der Literatur wird die spezifische Wechselwirkung von Thioethergruppen mit hydroxylierten Phenylringen beschrieben (Zubieta u. a. 2001), was sich auch am Beispiel der N7OMT und Norretikulin gut nachvollziehen lässt. Das Stickstoff-Kation des Substrates könnte eine Salzbrücke zum Asp 312 bilden. Die Erkennung der hydrophilen Substrateile erfolgt durch Wasserstoffbrücken zu Gln 351 und Asn 316 (siehe Abbildung 31). Beide Aminosäuren sind in allen untersuchten 4'OMTs und 6OMTs konserviert, fehlen jedoch in der 7OMT von *P. somniferum* und in der IF7OMT. In der 7OMT von *E. californica* ist das Gln aber nicht das Asn konserviert. Daraus kann man schlussfolgern, dass eher die Orientierung im aktiven Zentrum und nicht die Bindung durch ein bestimmtes Bindemotiv (Aminosäuresequenz) zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen Substraten führt.

In der 6OMT wird (*S*)-Norcoclaurin ebenfalls durch verschiedene Methionine (106, 162) und außerdem durch Ile 113 und Leu 299 erkannt. Für Wasserstoffbrücken zum Substrat kommt nur die Ketogruppe von Asn 306 in Frage. Das ist dieselbe Aminosäure wie in der N7OMT,

die Wechselwirkung entsteht zur selben Position am BIA-Grundgerüst, nur die Position im Verhältnis zu den anderen Aminosäuren ist verschieden, da die beiden Asn unterschiedliche Konformationen in den Modellen einnehmen (siehe Abbildung 37). Durch diese Verschiebung wird die Salzbrücke zum Stickstoff-Kation nicht mehr von Asp 312, welches auch in der 6OMT vorhanden wäre, sondern von Asn 165 gebildet. So kann die 6-Hydroxylgruppe zum katalytisch aktiven His 263 anstelle von der 7-Hydroxylgruppe ausgerichtet werden.

Die Änderung des Bindemodus für die Methylierung von benachbarten Hydroxylgruppen scheint nicht immer notwendig zu sein. Es konnte für eine Flavonoid-OMT aus *Triticum aestivum* eine Mehrfachmethylierung an benachbarten Hydroxylgruppen gezeigt werden (Zhou u. a. 2006). Dabei wird Tricetin nacheinander an allen drei Hydroxylgruppen des B-Ringes methyliert, ohne das Enzym zu verlassen. Dafür muss sich das Substrat in der Bindetasche drehen. Weitere Studien zeigen, dass die Substratbindung hauptsächlich durch Van-der-Waals Wechselwirkungen entsteht und nur eine Wasserstoffbrücke zwischen Substrat und Protein ausgebildet wird (Zhou u. a. 2010). Van-der-Waals Wechselwirkungen sind weniger gerichtet als Wasserstoff- und Salzbrücken und haben einen größeren Spielraum, was Winkel und Abstände betrifft. Daher kann sich das Tricetin in der Bindetasche drehen und so verschiedene Positionen einnehmen. Bei der N7OMT und der 6OMT hingegen wird die spezifische Substratbindung durch Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Aminosäuren ermöglicht.

## 4.7 Biosynthese des Papaverins

Der Umsatz von (*S*)-Norretikulin durch die neue Methyltransferase wirft die Frage nach der Einordnung der N7OMT in die Alkaloidbiosynthese auf. Die Identifizierung des Substrates einer OMT *in vitro* ist schwierig. Von vielen MTs ist bekannt, dass sie auch fremde Verbindungen, die ihnen *in vivo* gar nicht zur Verfügung stehen würden, ebenfalls methylieren können (Miranda u. a. 2004). Mit Norretikulin wurde ein Substrat identifiziert, was zwar zur Klasse der Benzylisochinoline gehört, aber bisher nicht aus der Pflanze isoliert worden ist (Stadler und Zenk 1990). Andererseits gibt es vermutlich noch sehr viele Benzylisochinoline, die noch nicht aus der Pflanze isoliert worden sind, aber aufgrund von schon bekannten Endprodukten vorhanden sein müssten. Wenn eine Zwischenverbindung nur in geringen Konzentrationen vorliegt bzw. ihr Biosynthese so stark kanalisiert ist, dass diese

Zwischenverbindung gar nicht frei vorkommt, würde man sie auch nur sehr schlecht in Pflanzenextrakten nachweisen können. N7OMT könnte an der Biosynthese von Papaverin beteiligt sein. Vermutlich wird Papaverin, wie die Tetrahydrobenzylisochinoline, von Norcocclaurin ausgehend synthetisiert. Das zentrale Intermediat der Tetrahydrobenzylisochinolinbiosynthese und aller daraus abgeleiteten Verbindungen ist (*S*)-Retikulin. Papaverin enthält jedoch keine *N*-Methylgruppe wie (*S*)-Retikulin und könnte daher aus einer unmethylierten Vorläuferverbindung gebildet werden. Um die Biosynthese von Papaverin aufzuklären, sind zahlreiche Versuche mit markierten Vorläuferverbindungen durchgeführt worden (Battersby und Harper 1962; Brochmann-Hanssen u. a. 1975; Han u. a. 2010). Aber gerade im Zusammenhang mit OMTs, die ja wie bereits erwähnt auch fremde Substrate umsetzen, wenn sie ihnen angeboten werden, kam es in der Vergangenheit bereits zu falschen Schlüssen. So wurde zum Beispiel der Ursprung der *Papaver* Alkaloidbiosynthese in Norlaudanolin vermutet, da diese Verbindung sehr gut in verschiedene Endprodukte wie Papaverin und Morphin inkorporiert werden kann (Brochmann-Hanssen 1971). Brochmann-Hanssen haben z. B. Norretikulin und Retikulin auf Mohnpflanzen appliziert. Es wurden dann die Einbauraten in Papaverin bestimmt, wobei die Markierung aus Norretikulin zu 1,47 % und die aus Retikulin zu 0,7 % gefunden worden sind. Zu diesem Zeitpunkt ging man noch davon aus, dass Norlaudanolin und Norretikulin Vorläuferverbindungen von Retikulin sind. 1990 wurde von Stadler und Zenk an *Berberis*, *Eschscholzia* und *Peumus* Arten gezeigt, dass Norcocclaurin die Vorläuferverbindung für Retikulin ist (Stadler und Zenk 1990). In der neuesten Veröffentlichung zur Biosynthese von Papaverin wird der effektive Einbau von *N*-methylierten Vorläuferverbindungen in Papaverin gezeigt (Han u. a. 2010). Der Einbau von Norlaudanin und Norlaudanolin wurde dabei nicht untersucht, da die Nor-Verbindungen (ohne *N*-methyl-Gruppe) nicht aus *Papaver* isoliert worden sind. Es ist anzunehmen, dass die Nor-Verbindungen ebenfalls in Papaverin eingebaut werden können, wie die älteren Versuche von Battersby und Brochmann-Hanssen mit Norretikulin zeigen. Für die Biosynthese von Papaverin über die *N*-methylierten Verbindungen spricht z. B., dass Laudanosidin und Laudanosin bereits aus der Pflanze bekannt sind. Allerdings wurde der Schritt zur Demethylierung noch nicht identifiziert. Die Tatsache, dass auch Verbindungen mit freiem Stickstoff eingebaut werden können, bedeutet, dass der Papaverinbiosyntheseweg auch für diese Verbindungen geeignet ist. Es besteht also immer noch Unklarheit über die Abfolge der Methylierungs-, Hydroxylierungs-, Dehydrogenierungs-, und falls vorhanden, der *N*-Demethylierung-Schritte. Die Abbildung 4 aus Kapitel 1 zeigt mögliche Biosynthesewege für

Papaverin. Eine Wichtung könnte über den Vergleich der beiden Einbauraten von bspw. Norlaudanolin und Laudanosin in Papaverin erfolgen. Vermutlich wird das natürliche Substrat zu einem größeren Teil in Papaverin eingebaut. Im Folgenden wird beschrieben, wie eine Biosynthese von Papaverin mit der Beteiligung der N7OMT aussehen könnte. Die bisher veröffentlichten Enzyme aus Mohn können diesen Biosyntheseweg nicht besetzen. Mit Norcoclaurin als Vorläufer des Papaverins fehlen eine Hydroxylase, drei OMTs und eine Dehydrogenase. Die bereits bekannte *N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase aus *P. somniferum* akzeptiert nur das *N*-methylierte BIA *N*-Methylcoclaurin (Huang und Kutchan 2000). Die aus *P. somniferum* identifizierte 4'OMT zeigt keine Aktivität gegenüber Coclaurin jedoch Nebenaktivitäten gegenüber 6-*O*-Methylnorlaudanolin und Norlaudanolin (Ziegler u. a. 2005). Weiterhin ist noch keine OMT bekannt, die die 3'-Hydroxylgruppe eines BIAs methyliert. Eine Enzymaktivität für die Dehydrogenierung des Tetrahydroisochinolin-Rings zum Isochinolin-Ring ist auch noch unbekannt. Die in dieser Arbeit gefundene N7OMT könnte die Methylierung der 7-Hydroxylgruppe in einer fünfstufigen Biosynthese zum Papaverin ausführen (Abbildung 44).

Papaverin kann nur zu knapp 1 % im Milchsaft von *P. somniferum* gefunden werden (Merck 1848). Eine Bestätigung der N7OMT Aktivität *in vivo* könnte durch RNA Interferenz erbracht

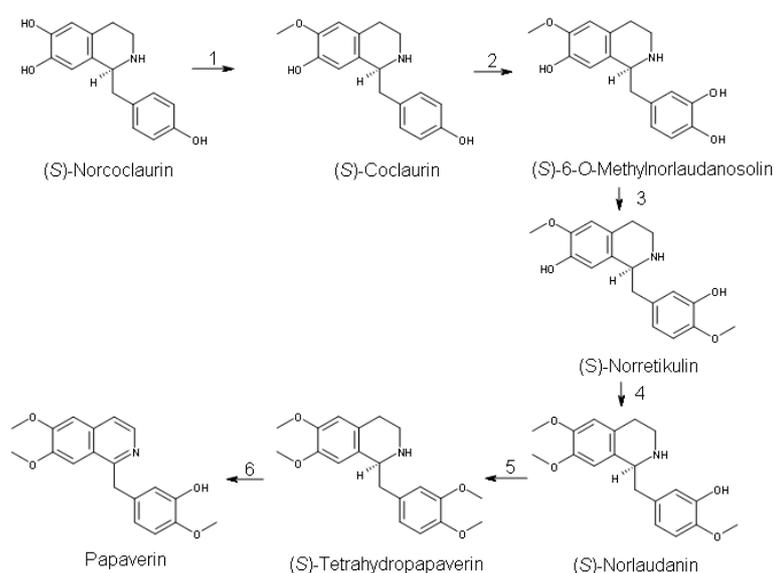


Abbildung 44: Einordnung der N7OMT in eine Biosynthese von Papaverin ausgehend von den bereits bekannten Intermediaten der Retikulinbiosynthese, Nr. 1 6OMT, Nr. 2 eine Coclaurin-3'-hydroxylase, Nr. 3 eine 6-*O*-Methylnorlaudanolin-3'-OMT, Nr. 4 N7OMT, Nr. 5 eine Norlaudanolin-4'-OMT und Nr. 6 eine Dehydrogenase

werden (Hileman u. a. 2005). Als Gedankenexperiment könnte man sich eine über *virus induced gene silencing* hergestellte Pflanze vorstellen, in der die Menge an N7OMT Protein stark verringert ist. Eine vergleichendes Alkaloidprofil von zum Beispiel Retikulin, Morphin,

Sanguinarin und Papaverin würde eventuell zeigen, in welchen Biosyntheseweg N7OMT eine Rolle spielt. Eine Senkung des Transkriptniveaus von N7OMT sollte dann zu einer Verminderung des Papaveringehaltes führen. Damit wäre die N7OMT als wichtiges Enzym der Papaverinbiosynthese bestätigt. Leider kann man nicht davon ausgehen, dass die Blockade an dieser Stelle zu einer Akkumulation von Norretikulin führen muss. Wie bereits in den Experimenten von Katja Kempe gezeigt, ist die Vernetzung der einzelnen Biosynthesewege sehr komplex und kann durchaus zu Intermediat-Anhäufungen weit vor der eigentlichen Blockadestelle bzw. zur Verstärkung von konkurrierenden Biosynthesewegen führen (Kempe 2008). Alternativ zur RNA Interferenz wird in Modellpflanzen wie *Arabidopsis* oder Tomate eine Mutante des zu untersuchenden Gens erzeugt und in der Mutante die Veränderung in der Metabolitenzusammensetzung untersucht. Die Erzeugung einer N7OMT *loss-of-function* Mutante hätte den Nachteil, dass eventuell vorhandene Isoformen der N7OMT deren Funktion übernehmen könnten. Mit RNA Interferenz hätte man zumindest die Möglichkeit, auch die Expression von Isoformen zu vermindern.

## 4.8 Mutationen der N7OMT

Nachdem herausgefunden worden ist, dass N7OMT (*S*)-Norretikulin aber nicht (*S*)-Norcoclaurin umsetzen kann, stellte sich die Frage nach der Ursache. Um beide Enzyme auf struktureller Ebene zu vergleichen, wurde ein Homologie Modell von der 6OMT aus *P. somniferum* erstellt. Im Vergleich der beiden aktiven Zentren konnten von den 21 die Bindetasche bildenden Aminosäuren drei als gravierend unterschiedlich identifiziert werden. Durch den Austausch der kleinen, polaren Serine 155, 168 und 309 in der N7OMT gegen die raumfüllenden, unpolaren Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Leucin aus der 6OMT sollte die Bindung von Norcoclaurin, dem Substrat der 6OMT, in der N7OMT ermöglicht werden. Die experimentellen Aktivitätsdaten der mutierten Proteine bestätigen die Auswahl dieser Aminosäure für die Mutagenese. Es konnte tatsächlich mit der Dreifachmutante S155W/S168F/S309L N7OMT Norcoclaurin methyliert werden. Die Identifizierung des Produktes blieb unvollständig. Die verwendete LC-MS Methode ließ eine Unterscheidung zwischen einem 7-Methoxyprodukt und einem 6-Methoxyprodukt nicht zu. Es wären erheblich größere Substanzmengen nötig gewesen, um mit z. B. mit NMR eine eindeutige Aussage zu treffen. Die geringe Aktivität der Dreifachmutante gegenüber Norcoclaurin machte die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter unmöglich. Eventuell

liegt die geringe Aktivität auch an der Verwendung von Norcoclaurin als Enantiomeren-Gemisch. Wenn eine enantiomere Form als Inhibitor wirkt, würde das natürlich den schwachen Umsatz der anderen Form erklären. Es wurden Versuche durchgeführt, das durch organische Synthese hergestellte Norcoclaurin über RP-HPLC mit chiraler Säule zu trennen, die aber leider nicht erfolgreich waren.

Durch die Erstellung der 3D-Modelle und durch das *docking* von Substraten konnten wichtige, die Substraterkennung entscheidend bestimmende Aminosäuren erkannt werden. Ein allgemeines Bindemotiv kann aber nicht abgeleitet werden, da die Bindungsmodi für die verschiedenen Substrate unterschiedlich sind.

Die Herstellung von Mutanten der N7OMT diente der Bestätigung der Proteinstruktur und der Bindeposition für das Substrat. Außerdem sollte die Art der Substratunterscheidung in den untersuchten *O*-Methyltransferasen untersucht werden. Die generelle Senkung der Enzymaktivität zeigt, dass für diese Funktion wichtige Aminosäuren ausgewählt worden sind. Wenn die Aminosäure Asp 312 gegen Leucin ausgetauscht wird, führt das zum Aktivitätsverlust. Das kann gut durch das Modell erklärt werden, da Asp 312 direkt an der Bindung von Norretikulin beteiligt ist und vermutlich die Erkennung des Isochinolin-Stickstoffs sicherstellt (siehe Abbildung 31). Die drei ausgetauschten Serine bilden ebenfalls wichtige Wasserstoffbrücken zum Substrat, die der Erkennung seiner Hydroxylgruppen dienen. Die Erhöhung der Affinität zu Norretikulin für die S168F Mutante, die sich in einem stark reduziertem  $K_m$  Wert von 12  $\mu\text{M}$  ausdrückt, könnte mit einer Stabilisierung der 4'-Methoxygruppe durch den hydrophoben Effekt erklärt werden. Allerdings zeigt diese Mutante auch eine stark reduzierte Reaktionsgeschwindigkeit. Die Mutationen S155W und S309L führen zwar zu einer Reduktion der Aktivität, aber nicht zum Verlust. Die  $K_m$  Werte für Norretikulin sind hier höher als im Wildtyp, die Bindung also schlechter. Das System ist also anscheinend flexibel genug, um einzelne Mutationen zu tolerieren, nicht jedoch Doppel- und Dreifachmutationen. Diese führen zum Aktivitätsverlust, bzw. so geringer Aktivität, dass sie nicht mehr gemessen werden konnte. Einzig die Doppelmutante S168F/S309L bildet eine Ausnahme, die hier gemessene Aktivität kann nicht mit den Daten des Modells erklärt werden. Die Änderung der Substratspezifität für die Dreifachmutante S155W/S168F/S309L ist durch den Vergleich der Bindetaschen von N7OMT und 6OMT vorhergesagt worden. Die kleinen polaren Aminosäuren in der N7OMT stehen im starken Kontrast zu den raumfüllenden unpolaren Aminosäuren der 6OMT Bindetasche. Man kann annehmen, dass die Verminderung des Raumangebotes die Positionierung von Norretikulin unmöglich macht,

hingegen das vorher nicht umgesetzte Norcoclaurin in eine für die Katalyse günstige Position gelenkt wird. Solche Änderungen der Substratspezifität durch einzelne ausgetauschte Aminosäuren wurden bereits für Chavicol OMT und Eugenol OMT gezeigt. Diese beiden in Basilikum vorkommenden Phenylpropanoid OMTs zeigen eine Sequenzübereinstimmung von 90 % und eine fast identische Substratbindetasche. Für die Unterscheidung der Substrate Chavicol und Eugenol wird der Austausch von Phe 260 gegen Ser 261 verantwortlich gemacht (Gang u. a. 2002). Ebenfalls ein einzelner Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum zwischen OMT2 (*T. aestivum*) und COMT (*M. sativa*) führt zu einer Umkehr der Substratpräferenz (Zhou u. a. 2010). OMT2 setzt bevorzugt Tricetin um, nach einer Mutation V309I, der entsprechenden Aminosäure aus der COMT, setzt das Enzym bevorzugt 5-Hydroxyl-ferulasäure um. Das kleinere Substrat 5-Hydroxyl-ferulasäure benötigt einen kleineren Abstand zur hydrophoben Aminosäure (hier Isoleucin). Zu viel Raum führt in diesem Beispiel zu einer verringerten Substrataffinität und Reaktionsgeschwindigkeit.

## 5 Zusammenfassung

Es wurden von Dr. Ziegler über 2000 ESTs (expressed sequence tags) aus *Papaver somniferum* isoliert und sequenziert. Sie repräsentieren unbekannte und bekannte Gene aus *P. somniferum*. Ein mit Hilfe der vergleichenden Expressionsanalyse gefundener EST wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Der EST stellte sich nach Identifizierung der vollständigen cDNA Sequenz als eine putative *O*-Methyltransferase (OMT) heraus. Die Ähnlichkeit (68 % auf Proteinebene) zu Norcoclaurin-6-OMT (6OMT) legte die Vermutung nahe, dass es sich um eine OMT des Alkaloidstoffwechsels handelt. Die neue OMT wurde in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung erfolgte über Metall-Affinitätschromatografie. Mit dem gereinigten OMT Protein wurden Enzymtests zur Bestimmung der Substratspezifität durchgeführt. Das in *E. coli* hergestellte Protein kann nur auf (*S*)-Norretikulin eine Methylgruppe in Position 7 übertragen, daher wurde das Enzym Norretikulin-7-OMT (N7OMT) genannt. Parallel dazu wurde die Sequenz der neuen OMT für die Erstellung eines 3D Proteinmodells verwendet. Als Grundlage für das Homologie-Modell wurde die Struktur von Isoflavon-7-OMT aus *Medicago sativa* verwendet, da sie die ähnlichste bekannte Proteinstruktur ist. In das Homologie-Modell wurden verschiedene Benzylisochinolin-Strukturen und ähnliche Strukturen mit Hilfe von *docking* Algorithmen gelegt. Um die Substratbindung näher zu untersuchen, wurde ein Homologie-Modell von der 6OMT hergestellt und das aktive Zentrum mit dem der N7OMT verglichen. Dafür wurden das natürliche Substrat der 6OMT in die Bindetasche gelegt und mit (*S*)-Norretikulin in der Bindetasche von N7OMT überlagert. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede in den Positionen. Es wurden drei Aminosäuren identifiziert, die für die Unterscheidung zwischen den Substraten Norretikulin und Norcoclaurin verantwortlich sein könnten. Um die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Substratbindung zu überprüfen, wurden *in vitro* Versuche durchgeführt. Es wurden Mutanten der N7OMT hergestellt, in denen ausgewählte Aminosäuren gegen die entsprechenden Aminosäuren der 6OMT ausgetauscht worden sind. Die Mutanten sind auf ihre Aktivität gegenüber Norcoclaurin und Norretikulin untersucht worden. Von den 7 hergestellten Mutanten haben viele keine Aktivität mehr, einige weniger Aktivität gegenüber Norretikulin und eine Mutante, die Dreifachmutante S155W/S168F/S309L, zeigt eine veränderte Aktivität. Diese Dreifachmutante ist nicht in der Lage Norretikulin umzusetzen, kann aber Norcoclaurin methylieren. Die modellgestützte

Mutagenese war erfolgreich und zeigt, dass beide Homologie-Modelle gut geeignet sind. Die unterschiedlichen Positionen der Substrate zeigen, dass es kein allgemeingültiges Motiv für die Bindung von Benzylisochinolininen gibt.

# Literaturverzeichnis

**Allen, R.S.; Millgate, A.G.; Chitty, J.A.; Thisleton, J.; Miller, J.A.C.; Fist, AJ; Gerlach, W.L.; Larkin, P.J. (2004):** „RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy“. In: *Nature Biotechnology*. 22 , S. 1559-1566.

**Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990):** „Basic local alignment search tool“. In: *J. mol. Biol.* 215 (3), S. 403-410.

**Amann, M.; Nagakura, N.; Zenk, M.H. (1984):** „(S)-Tetrahydroprotoberberine oxidase, the final enzyme in protoberberine biosynthesis“. In: *Tetrahedron letters*. 25 (9), S. 953-954.

**Arakawa, H.; Clark, W.G.; Psenak, M.; Coscia, C.J. (1992):** „Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited *Sanguinaria canadensis* cell cultures“. In: *Archives of biochemistry and biophysics (USA)*. 299 (1), S. 1-7.

**Ashihara, H.; Crozier, A. (1999):** „Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants“. In: *Advances in Botanical Research*. 30. S. 117.

**Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K (1994):** *Current protocols in molecular biology*. 4, New York: John Wiley & Sons.

**Battersby, A.R.; Harper, B.J.T. (1962):** „Alkaloid biosynthesis. Part I. The biosynthesis of papaverine.“. In: *Journal of the Chemical Society*. S. 3526.

**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“. In: *The Plant Cell*. 15 (11), S. 2626.

**Blaney, J.M.; Dixon, J.S. (1993):** „A good ligand is hard to find: Automated docking methods“. In: *Perspectives in Drug Discovery and Design*. 1 (2), S. 301-319.

**Brochmann-Hanssen, E.; Fu, C.C.; Leung, A.Y.; Zanati, G. (1971):** „Opium alkaloids X: Biosynthesis of 1 benzyloquinolines“. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60 (11), S. 1672-1676.

**Brochmann-Hanssen, E.; Chen, C.H.; Chen, C.R.; Chiang, H.C.; Leung, A.Y.; McMurtrey, K. (1975):** „Opium alkaloids. Part XVI. The biosynthesis of 1-benzyloquinolines in *Papaver somniferum*. Preferred and secondary pathways; stereochemical aspects.“. In: *Journal of the Chemical Society. Perkin transactions 1*. 16, S. 1531.

**Brochmann-Hanssen, E.; Cheng, C.Y. (1982):** „Biosynthesis of Hydrophenanthrene Alkaloids in *Papaver orientale*“. In: *Journal of Natural Products*. 45 (4), S. 434-436.

**Brochmann-Hanssen, E.; Wunderly, S.W. (1978):** „Biosynthesis of morphine alkaloids in *Papaver bracteatum* Lindl.“. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 67 (1).

- 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*“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 277 (1), S. 830-835.
- Chou, W.M.; Kutchan, T.M. (1998):** „Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids“. In: *The Plant Journal*. 15 (3), S. 289-300.
- Clark, M.; Cramer III, R.D.; Van Opdenbosch, N. (1989):** „Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field“. In: *Journal of Computational Chemistry*. 10 (9), S. 982-1012.
- Connolly, M.L. (1983):** „Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids“. In: *Science*. 221 (4612), S. 709-713.
- Corpet, F. (1988):** „Multiple sequence alignment with hierarchical clustering“. In: *Nucleic Acids Research*. 16 (22), S. 10881-10890.
- De Luca, V.; St. Pierre, B. (2000):** „The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis“. In: *Trends in plant science*. 5 (4), S. 168-173.
- Deavours, B.E.; Liu, C.J.; Naoumkina, M.A.; Tang, Y.; Farag, M.A.; Sumner, L.W.; Noel, J.P.; Dixon, R.A. (2006):** „Functional analysis of members of the isoflavone and isoflavanone *O*-methyltransferase enzyme families from the model legume *Medicago truncatula*“. In: *Plant molecular biology*. 62 (4), S. 715-733.
- De-Eknamkul, W.; Zenk, M.H. (1992):** „Purification and properties of 1,2-dehydroreticuline reductase from *Papaver somniferum* seedlings“. In: *Phytochemistry*. 31 (3), S. 813-821.
- Dewick, P.M. (1998):** „The biosynthesis of shikimate metabolites“. In: *Natural product reports*. 15 (1), S. 17-58.
- Dittrich, H.; 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“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88 (22), S. 9969-9973.
- Facchini, P.; Hagel, J.; Liscombe, D.; Loukanina, N.; MacLeod, B.; Samanani, N.; Zulak, K. (2007):** „Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory“. In: *Phytochem Rev*. S. 97-124.
- Facchini, P.J.; De Luca, V. (1994):** „Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 269 (43), S. 26684-26690.
- Frackenhohl, J. (2000):** „Morphin und Opioid-Analgetika“. In: *Chemie in unserer Zeit*. 34 (2), S. 99-112.

**Frenzel, T.; Zenk, M.H. (1990a):** „Purification and characterization of three isoforms of *S*-adenosyl-*l*-methionine:(*R*, *S*)-tetrahydrobenzylisoquinoline-*N*-methyltransferase from *Berberis koetianeana* cell cultures“. In: *Phytochemistry (United Kingdom)*.

**Frenzel, T.; Zenk, M.H. (1990b):** „*S*-adenosyl-*L*-methionine: 3'-hydroxy-*N*-methyl-(*S*)-coclaurine-4'-*O*-methyl transferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (*S*)-reticuline pathway“. In: *Phytochemistry*. 29 (11), S. 3505-3511.

**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“. In: *Transgenic Research*. 13 (6), S. 607-613.

**Frick, S.; Kutchan, T.M. (1999):** „Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis.“. In: *Plant Journal*. 17 (4), S. 329.

**Galat, A. (1951):** „Synthesis of Papaverine and Some Related Compounds“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 73 (8), S. 3654-3656.

**Galneder, E.; Rueffer, M.; Wanner, G.; Tabata, M.; Zenk, M.H. (1988):** „Alternative final steps in berberine biosynthesis in *Coptis japonica* cell cultures“. In: *Plant Cell Reports*. 7 (1), S. 1-4.

**Gang, D.R.; Lavid, N.; Zubieta, C.; Chen, F.; Beuerle, T.; Lewinsohn, E.; Noel, J.P.; Pichersky, E. (2002):** „Characterization of phenylpropene *O*-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant *O*-methyltransferase family“. In: *The Plant Cell*. 14 (2), S. 505.

**Gerardy, R.; Zenk, M.H. (1993):** „Purification and characterization of salutaridine: NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum*“. In: *Phytochemistry*. 34 (1), S. 125-132.

**Gerardy, R.; Zenk, M.H. (1992):** „Formation of salutaridine from (*R*)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*“. In: *Phytochemistry*. 32 (1), S. 79-86.

**Gesell, A. (2008):** *Identifizierung der Salutaridinsynthese CYP719B1 und einer FAD-abhängigen Oxygenase der Benzylisochinolinalkaloidbiosynthese*. Dissertation. MLU 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*“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 276 (33), S. 30717-30723.

**Gulland, J.M.; Robinson, R. (1923):** „CXII.—The morphine group. Part I. A discussion of the constitutional problem“. In: *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 123 , S. 980-998.

**Haase, S. (2007):** *Methyltransferasen aus Papaver somniferum L.: Erzeugung und Analyse transgener Pflanzen sowie Klonierung, heterologe Expression und Charakterisierung.* Dissertation, MLU Halle-Wittenberg.

**Hammer, K. (1981):** „Problems of *Papaver somniferum*-classification and some remarks on recently collected European poppy land-races“. In: *Genetic Resources and Crop Evolution*. 29 (1), S. 287-296.

**Han, X.; Lamshöft, M.; Grobe, N.; Ren, X.; Fist, A.J.; Kutchan, T.M.; Spiteller, M.; Zenk, M.H. (2010):** „The biosynthesis of papaverine proceeds via (*S*)-reticuline“. In: *Phytochemistry*. 71, S. 1305-1312.

**He, X.Z.; Reddy, J.T.; Dixon, R.A. (1998):** „Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-*O*-methyltransferase“. In: *Plant molecular biology*. 36 (1), S. 43-54.

**Hegnauer, R. (1990):** *Chemotaxonomie der Pflanzen IX.* Basel: Birkhäuser. S. 207.

**Heiden, W.; Moeckel, G.; Brickmann, J. (1993):** „A new approach to analysis and display of local lipophilicity/hydrophilicity mapped on molecular surfaces“. In: *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 7 (5), S. 503-514.

**Henikoff, S.; Henikoff, J.G. (1992):** „Amino acid substitution matrices from protein blocks“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89 (22), S. 10915-10919.

**Herbert, R.B. (2001):** „The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites“. In: *Natural product reports*. 18 (1), S. 50-65.

**Hesse, M. (2000):** *Alkaloide.* Helvetica Chimica Acta.

**Hileman, L.C.; Drea, S.; 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)“. In: *The Plant Journal*. 44 (2), S. 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“. In: *Phytochemistry*. 65 (8), S. 1039-1046.

**Horiike, K.; Tojo, H.; Yamano, T.; Nozaki, M. (1983):** „Interpretation of the stokes radius of macromolecules determined by gel filtration chromatography“. In: *Journal of biochemistry*. 93 (1), S. 99.

**Huang, F.C.; Kutchan, T.M. (2000):** „Distribution of morphinan and benzo [c] phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*“. In: *Phytochemistry*. 53 (5), S. 555-564.

**Ibdah, M.; Zhang, X.H.; Schmidt, J.; Vogt, T. (2003):** „A Novel Mg<sup>2+</sup>-dependent O-Methyltransferase in the Phenylpropanoid Metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 278 (45), S. 43961-43972.

**Ibrahim, R.K.; Bruneau, A.; Bantignies, B. (1998):** „Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification“. In: *Plant molecular biology*. 36 (1), S. 1-10.

**Ikezawa, N.; Iwasa, K.; Sato, F. (2007):** „Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*“. In: *FEBS Journal*. 274 (4), S. 1019-1035.

**Ikezawa, N.; Tanaka, M.; Nagayoshi, M.; Shinkyo, R.; Sakaki, T.; Inouye, K.; Sato, F. (2003):** „Molecular Cloning and Characterization of CYP719, a Methylenedioxy Bridge-forming Enzyme That Belongs to a Novel P450 Family, from cultured *Coptis japonica* Cells“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 278 (40), S. 38557-38565.

**Jakalian, A.; Bush, B.L.; Jack, D.B.; Bayly, C.I. (2000):** „Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method“. In: *Journal of Computational Chemistry*. 21 (2), S. 132-146.

**Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C. (1995):** „Molecular Recognition of Receptor-Sites Using A Genetic Algorithm with A Description of Desolvation“. In: *Journal of Molecular Biology*. 245 (1), S. 43-53.

**Joshi, C.P.; Chiang, V.L. (1998):** „Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases“. In: *Plant molecular biology*. 37 (4), S. 663-674.

**Kadereit, J.W.; Schwarzbach, A.E.; Jork, K.B. (1997):** „The phylogeny of *Papaver* s. l. (*Papaveraceae*): Polyphyly or monophyly?“. In: *Plant Systematics and Evolution*. 204 (1), S. 75-98.

**Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. (1970):** „Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides“. In: *Analytical biochemistry*. 34 (2), S. 595.

**Kempe, K. (2008):** Analyse der Benzylisochinolinalkaloid-Biosynthese des *Papaver somniferum* L. mit Hilfe der RNAi-Technik. Dissertation, MLU Halle-Wittenberg.

**Kessmann, H.; Edwards, R.; Geno, P.W.; Dixon, R.A. (1990):** „Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) 1 V. Constitutive and Elicitor-Induced Accumulation of Isoflavonoid Conjugates in Cell Suspension Cultures“. In: *Plant Physiology*. 94 (1), S. 227-232.

**Kopycki, J.G.; Rauh, D.; Chumanovich, A.A.; Neumann, P.; Vogt, T.; Stubbs, M.T. (2008):** „Biochemical and structural analysis of substrate promiscuity in plant Mg<sup>2+</sup>-dependent O-methyltransferases“. In: *Journal of Molecular Biology*. 378 (1), S. 154-164.

**Kutchan, T.M. (1998):** „Tetrahydrobenzylisoquinoline Alkaloids“. In: Cordell, GA (Hrsg.) *The Alkaloids*. Academic Press (San Diego). S. 257 ff.

**Kyhse-Anderson, J. (1984):** „Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer from polyacrylamide to nitrocellulose“. In: *J Biochem Biophys Methods*. 10 , S. 203-209.

**Laemmli, U.K. (1970):** „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. In: *nature*. 227 (5259), S. 680-685.

**Lam, K.C.; Ibrahim, R.K.; Behdad, B.; Dayanandan, S. (2007):** „Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases“. In: *Genome*. 50 (11), S. 1001-1013.

**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*“. In: *Plant Biotechnology Journal*. 5 (1), S. 26-37.

**Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. (1993):** „PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures“. In: *Journal of Applied Crystallography*. 26 (2), S. 283-291.

**Latunde-Dada, A.O.; Lucas, J.A.. (1985):** „Involvement of the phytoalexin medicarpin in the differential response of callus lines of lucerne (*Medicago sativa*) to infection by *Verticillium alboatrum*“. In: *Physiological plant pathology*. 26 (1), S. 31-42.

**Lenz, R.; Zenk, M.H. (1995):** „Purification and Properties of Codeinone Reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* Cell Cultures and Differentiated Plants“. In: *European Journal of Biochemistry*. 233 (1), S. 132-139.

**Liscombe, D.K.; Facchini, P.J. (2007):** „Molecular Cloning and Characterization of Tetrahydroprotoberberine cis-N-Methyltransferase, an Enzyme Involved in Alkaloid Biosynthesis in Opium Poppy “. In: *J. Biol. Chem*. 282 , S. 14741-14751.

**Lopez, T.A.; Cid, M.S.; Bianchini, M.L. (1999):** „Biochemistry of hemlock (*Conium maculatum* L.) alkaloids and their acute and chronic toxicity in livestock. A review“. In: *Toxicon*. 37 (6), S. 841-865.

**Martin, J.L.; McMillan, F.M. (2002):** „SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold“. In: *Current opinion in structural biology*. 12 (6), S. 783-793.

**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):** „Analgesia: Morphine-pathway block in top1 poppies“. In: *Nature*. 431 (7007), S. 413-414.

**Minami, H.; Dubouzet, E.; Iwasa, K.; Sato, F. (2007):** „Functional Analysis of Norcoclaurine Synthase in *Coptis japonica*“. In: *J. Biol. Chem*. 282 , S. 6274-6282.

- Miranda, T.B.; Miranda, M.; Frankel, A.; Clarke, S. (2004):** „PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 279 (22), S. 22902.
- Morishige, T.; Dubouzet, E.; Choi, K.B.; Yazaki, K.; Sato, F. (2002):** „Molecular cloning of columbamine *O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells“. In: *European Journal of Biochemistry*. 269 (22), S. 5659-5667.
- 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*“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 275 (30), S. 23398-23405.
- Morrison, T.B.; Weis, J.J.; Wittwer, C.T. (1998):** „Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR® Green I monitoring during amplification“. In: *Biotechniques*. 24 (6), S. 954-962.
- Mulholland, A.J. (2005):** „Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis“. In: *Drug discovery today*. 10 (20), S. 1393-1402.
- Mulholland, A.J.; Grant, G.H.; Richards, W.G. (1993):** „Computer modelling of enzyme catalysed reaction mechanisms“. In: *Protein Eng.* 6 (2), S. 133-147.
- Murzin, A.G.; Brenner, S.E.; Hubbard, T.; Chothia, C. (1995):** „SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures“. In: *Journal of molecular biology*. 247 (4), S. 536-540.
- Nagel, J.; Culley, L.K.; Lu, Y.; Liu, E.; Matthews, P.D.; Stevens, J.F.; Page, J.E. (2008):** „EST Analysis of Hop Glandular Trichomes Identifies an *O*-Methyltransferase That Catalyzes the Biosynthesis of Xanthohumol“. In: *Plant Cell*. 20 (1), S. 186-200.
- O'Connor, S.E.; Maresh, J.J. (2006):** „Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis“. In: *Natural Product Reports*. 23 (4), S. 532-547.
- O'Keefe, B.R.; Beecher, C.W.W. (1994):** „Isolation and Characterization of *S*-Adenosyl-*L*-Methionine: Tetrahydroberberine-*cis-N*-Methyltransferase from Suspension Cultures of *Sanguinaria canadensis* L.“. In: *Plant Physiol.* 105, S. 395-403.
- 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“. In: *The Plant Journal*. 36, S. 808-819.
- Parikh, J.R.; Doering, W.E. (1967):** „Sulfur trioxide in the oxidation of alcohols by dimethyl sulfoxide“. In: *J. Am. Chem. Soc.* 89 (21), S. 5505-5507.
- Pauli, H.H.; 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 benzyloquinoline alkaloid biosynthesis.“. In: *The Plant Journal*. 13 (6), S. 793.

**Pienkny, S.; Brandt, W.; Schmidt, J.; Kramell, R.; Ziegler, J. (2009):** „Functional characterization of a novel benzyloquinoline *O*-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L.)“. In: *The Plant Journal*. 60 (1), S. 56-67.

**Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. (1975):** „Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation“. In: *Nature*. 258, S. 598-599.

**Preininger, V. (1986):** „Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae“. In: Brossi, A; Cordell, GA (Hrsg.) *The Alkaloids*. Academic Press S. 1 ff.

**Ranaghan, K.E.; Ridder, L.; Szeftczyk, B.; Sokalski, W.A.; Hermann, J.C.; Mulholland, A.J. (2004):** „Transition state stabilization and substrate strain in enzyme catalysis: *ab initio* QM/MM modelling of the chorismate mutase reaction“. *Org Biomol Chem*. 2, S. 968-980.

**Rao, S.T.; Rossmann, M.G. (1973):** „Comparison of super-secondary structures in proteins.“. In: *Journal of molecular biology*. 76 (2), S. 241.

**Roberts, M.F.; Wink, M. (1998):** „Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications“. Kluwer Academic Publishers. S. 1 ff

**Rueffer, M.; Nagakura, N.; Zenk, M.H. (1983):** „Partial Purification and Properties of *S*-Adenosylmethionine:(*R*),(*S*)-Norlaudanosoline-6-*O*-Methyltransferase from *Argemone platyceras* Cell Cultures.“. In: *Planta Med*. 49 (11), S. 131-7.

**Rueffer, M.; Zenk, M.H. (1987):** „Enzymatic formation of protopines by a microsomal cytochrome P-450 system of *Corydalis vaginans*“. In: *Tetrahedron Lett*. 28, S. 5307-5310.

**Rush, M.D.; Kutchan, T.M.; Coscia, C.J. (1985):** „Correlation of the appearance of morphinan alkaloids and laticifer cells in germinating *Papaver bracteatum* seedlings“. In: *Plant Cell Reports*. 4 (5), S. 237-240.

**Sakakibara, H.; Takei, K.; Sugiyama, T. (1996):** „Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize uroporphyrinogen III methyltransferase, an enzyme involved in the synthesis of siroheme, which is a prosthetic group of nitrite reductase.“. In: *The Plant Journal*. 10 (5), S. 883.

**Samanani, N.; Alcantara, J.; Bourgault, R.; Zulak, K.G.; Facchini, P.J. (2006):** „The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy“. In: *The Plant Journal*. 47 (4), S. 547-563.

**Samanani, N.; Facchini, P.J. (2001):** „Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy“. In: *Planta*. 213 (6), S. 898-906.

**Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989):** *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY.

**Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977):** „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (12), S. 5463.

**Saunders, J.A.; Pedroni, M.J.; Penrose, L.D.J.; Fist, A.J. (2001):** „AFLP analysis of opium poppy“. In: *Crop Science*. 41 (5), S. 1596-1601.

**Schmeller, T.; Wink, M. (1998):** „Utilization of alkaloids in modern medicine“. In: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. New York: Plenum Press. S. 435-459.

**Schröder, G.; Wehinger, E.; Schröder, J. (2002):** „Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferases“. In: *Phytochemistry*. 59 (1), S. 1-8.

**Shonle, I.; Bergelson, J. (2000):** „Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L.(Solanaceae)“. In: *Evolution*. S. 778-788.

**Sippl, M.J. (1990):** „Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins“. In: *J. Mol. Biol.* 213 (4), S. 859-883.

**Smirnov, D.M.; Sigal, E.L.; Marechek, K.Y.; Zakharov, V.P. (1972):** „Improvement in the technology for the synthesis of codeine from morphine“. In: *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 6 (5), S. 305-306.

**Stadler, R.; Zenk, M.H. (1990):** „A revision of the generally accepted pathway for the biosynthesis of the benzyltetrahydroisoquinoline alkaloid reticuline“. In: *Liebigs Annalen der Chemie*. (6). S 555-562.

**Steffens, P.; Nagakura, N.; Zenk, M.H. (1985):** „Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures“. In: *Phytochemistry*. 24 (11), S. 2577-2583.

**Tanahashi, T.; Zenk, M.H. (1990):** „Elicitor induction and characterization of microsomal protopine-6-hydroxylase, the central enzyme in benzophenanthridine alkaloid biosynthesis“. In: *Phytochemistry*. 29 (4), S. 1113-1122.

**Thureson-Klein, A. (1970):** „Observations on the development and fine structure of the articulated laticifers of *Papaver somniferum*“. In: *Annals of Botany*. 34 (3), S. 751.

**Tyler, R.T.; Eilert, U.; Rijnders, C.O.M.; Roewer, I.A.; Kurz, W.G.W. (1988):** „Semi-continuous production of sanguinarine and dihydrosanguinarine by *Papaver somniferum* L. cell suspension cultures treated with fungal homogenate“. In: *Plant Cell Reports*. 7 (6), S. 410-413.

- 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*“. In: *The Plant Journal*. 18 , S. 465-475.
- Verpoorte, R.; Van der Heijden, R.; Memelink, J. (2000):** „Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production“. In: *Transgenic Research*. 9 (4), S. 323-343.
- Vogt, T. (2004):** „Regiospecificity and kinetic properties of a plant natural product *O*-methyltransferase are determined by its *N*-terminal domain“. In: *FEBS letters*. 561 (1-3), S. 159-162.
- Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. (2000):** „How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?“. In: *Journal of Computational Chemistry*. 21 (12), S. 1049-1074.
- 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*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101 (38), S. 13957-13962.
- Weiner, M.P.; Costa, G.L.; Schoettlin, W.; Cline, J.; Mathur, E.; Bauer, J.C. (1994):** „Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction“. In: *Gene*. 151 (1-2), S. 119-123.
- Zenk, M.H.; Rueffer, M. (1987):** „Distant precursors of benzyloisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation“. In: *Z. Naturforsch. (C: Biosci.)*, 42 , S. 319–332.
- Zenk, M.H.; Rueffer, M.; Amann, M.; Deus-Neumann, B.; Nagakura, N. (1985):** „Benzyloisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes“. In: *Journal of Natural Products*. 48 (5), S. 725-738.
- Zhou, J.M.; Gold, N.D.; Martin, V.J.J.; Wollenweber, E.; Ibrahim, R.K. (2006):** „Sequential *O*-methylation of tricetin by a single gene product in wheat“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1760 (7), S. 1115-1124.
- Zhou, J.M.; Lee, E.; Kanapathy-Sinnaiaha, F.; Park, Y.; Kornblatt, J.A.; Lim, Y.; Ibrahim, R.K. (2010):** „Structure-function relationships of wheat flavone *O*-methyltransferase: Homology modeling and site-directed mutagenesis“. In: *BMC plant biology*. 10 (1), S. 156.
- Zhou, J.M.; Fukushi, Y.; Wollenweber, E.; Ibrahim, R.K. (2008):** „Characterization of Two *O*-Methyltransferase-like Genes in Barley and Maize“. In: *Pharmaceutical Biology*. 46 (1-2), S. 26-34.
- Zhou, J.M.; Seo, Y.W.; Ibrahim, R.K. (2009):** „Biochemical characterization of a putative wheat caffeic acid *O*-methyltransferase“. In: *Plant Physiology and Biochemistry*. 47 (4), S. 322-326.
- Ziegler, J.; Diaz-Chávez, 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“. In: *Planta*. 222 (3), S. 458-471.

**Ziegler, J.; Voigtlander, 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“. In: *The Plant Journal*. 48 (2), S. 177-192.

**Zubieta, C.; He, X.Z.; Dixon, R.A.; Noel, J.P. (2001):** „Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases“. In: *Nature Structural Biology*. 8 , S. 271-279.

# Anhang

## Primer

Primer Name	Sequenz
Genome Walking	
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
A21G11r1	GTCTCGCCCTCAAATAGGCTAAACCC
A21G11r2	CGGGTTTAGCCTATTTGGAGGGCGAGAC
A21G11_gw	CGAAGCCATTGATCTAGGATACCAGCCC
A21G11_gw2	GCAAGACGAATCACAGAATCAGATACGAAGCC
Sequenzierung	
A21G11_seq2;	GATGTTCTTCATGAATATGGC
A21G11_seq1;	GAACCGTTCAAGTAACAGAG
A21G11_vl1	ATGGAAGTAGTTAGCCAGATTGATCAAG
A21G11_vl2	ATAAACCTCAATTATAGATTGAGCTGCG
A21G11_PCRseq1	GATAGTGGATTAGTTACTTCGCATTTG
A21G11_PCRseq2	GTCTTTTAGAATATGCCACGGAGC
pCR21rev1	CGCCAGTGTGCTGGAATTC
pCR21for1	CCTCTAGATGCATGCTCGAGC
Klonierung	
A21G11_vl3;	gaatggatccATGGAAGTAGTTAGCCAGATTG
A21G11_vl4;	gctactgcagTTAATAAACCTCAATTATAGATTG
Punktmutationen	
S155Wfor1;	GTTAGGAAAGAGCATTgGG
S155Wrev1;	GATTTTCACTCATATAAAACCcAAATGC
S168Ffor1;	ATCCTGAAATGAATCAAATTTTCAATGG
S168Frev1;	CCATTGCTCCATTGAAAATTTG
S309Lfor;	CATATTCAAACCTTAGACTCACACTTG
S309Lrev1;	GTAAACCATCATATCTATATCAAGTGTG
DomBfor1	TCAATGGTTCCTTCAGTTTTAGGAATAAT
D312Lfor1	CTTAGACTCACATCTGATATActTATGA
D312Lrev1	CTCCATTGTAAACCATCATAAGTA
real time PCR	
7OMTfor2;	CTGATGATGGCACATACTACAGCTG
7OMTrev2;	GGAAATGCCGGAGTTCGAAT
6OMT_paso	AACACTGGTGGAAAAGAGAGAACC
6OMT_paso	CCTCAATTACAGATTGGACAGCAG

Primer Name	Sequenz
4sOMT_paso	AGAGAGAGAACTGCAGAGGATTGG
4sOMT_paso	CTTCAATGACAGACTGAATAGCGC
N7OMT_paso	GATGCAGCAGGTTTTGCTAGTTG
N7OMT_paso	AGCTAACAAAGTCTCGCCCTCC
EF1for	AGATGATTCCAACCAAGCCCA
EF1rev	CCTTGATGACACCAACAGCAACT

## Verbindungen aus dem *docking* in N7OMT

Nr.	Name
1	(R)- Norlaudanosin
2	(S)- Norlaudanosin
3	(R)- 6-O-Methylnorlaudanosin
4	(S)- 6-O-Methylnorlaudanosin
5	(R)- 7-O-Methylnorlaudanosin
6	(S)- 7-O-Methylnorlaudanosin
7	(R)- 3'-O-Methylnorlaudanosin
8	(S)- 3'-O-Methylnorlaudanosin
9	(R)- 4'-O-Methylnorlaudanosin
10	(S)- 4'-O-Methylnorlaudanosin
11	(R)- 6,7-O-Methylnorlaudanosin
12	(S)- 6,7-O-Methylnorlaudanosin
13	(R)- Nororientalin
14	(S)- Nororientalin
15	(R)- Norretikulin
16	(S)- Norretikulin
17	(R)- Norprotosinomenin
18	(S)- Norprotosinomenin
19	(R)- 3',4'-O-Methylnorlaudanosin
20	(S)- 3',4'-O-Methylnorlaudanosin
21	(R)- Norisolaudanin
22	(S)- Norisolaudanin
23	(R)- Norlaudanin
24	(S)- Norlaudanin
25	(R)- 6,3',4'-O-Methylnorlaudanosin
26	(S)- 6,3',4'-O-Methylnorlaudanosin
27	(R)- 7,3',4'-O-Methylnorlaudanosin
28	(S)- 7,3',4'-O-Methylnorlaudanosin
29	(R)- Norisoorientalin
30	(S)- Norisoorientalin

Nr.	Name
31	(R)- Laudanosin
32	(S)- Laudanosin
33	(R)- 6-O-Methylaudanosin
34	(S)- 6-O-Methylaudanosin
35	(R)- 7-O-Methylaudanosin
36	(S)- 7-O-Methylaudanosin
37	(R)- 3'-O-Methylaudanosin
38	(S)- 3'-O-Methylaudanosin
39	(R)- 4'-O-Methylaudanosin
40	(S)- 4'-O-Methylaudanosin
41	(R)- 6,7-O-Methylaudanosin
42	(S)- 6,7-O-Methylaudanosin
43	(R)- Orientalin
44	(S)- Orientalin
45	(R)- Retikulin
46	(S)- Retikulin
47	(R)- Protosinomenin
48	(S)- Protosinomenin
49	(R)- 3',4'-O-Methylaudanosin
50	(S)- 3',4'-O-Methylaudanosin
51	(R)- Isolaudanin
52	(S)- Isolaudanin
53	(R)- Laudanin
54	(S)- Laudanin
55	(R)- 6,3',4'-O-Methylaudanosin
56	(S)- 6,3',4'-O-Methylaudanosin
57	(R)- 7,3',4'-O-Methylaudanosin
58	(S)- 7,3',4'-O-Methylaudanosin
59	(R)- Isoorientalin
60	(S)- Isoorientalin

<b>Nr.</b>	<b>Name</b>
61	Salutaridin
62	( <i>S,R,R</i> )- Salutaridinol
63	( <i>S,R,S</i> )- Salutaridinol
64	( <i>S,R,R</i> )- Salutaridin-7- <i>O</i> -acetat
65	( <i>S,R,S</i> )- Salutaridin-7- <i>O</i> -acetat
66	Thebain
67	Neopinon
68	Codeinon
69	Codein
70	Morphin
71	Morphinon
72	Oripavin
73	( <i>R</i> )- Norcoclaurin
74	( <i>S</i> )- Norcoclaurin
75	( <i>R</i> )- 7- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
76	( <i>S</i> )- 7- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
77	( <i>R</i> )- Coclaurin
78	( <i>S</i> )- Coclaurin
79	( <i>R</i> )- 4- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
80	( <i>S</i> )- 4- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
81	( <i>R</i> )- <i>N</i> -Methylnorcoclaurin
82	( <i>S</i> )- <i>N</i> -Methylnorcoclaurin
83	( <i>R</i> )- <i>N</i> -Methyl-7- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
84	( <i>S</i> )- <i>N</i> -Methyl-7- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
85	( <i>R</i> )- <i>N</i> -Methylcoclaurin
86	( <i>S</i> )- <i>N</i> -Methylcoclaurin
87	( <i>R</i> )- <i>N</i> -Methyl-4- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
88	( <i>S</i> )- <i>N</i> -Methyl-4- <i>O</i> -Methylnorcoclaurin
89	Guaiacol
90	Catechol
91	Salsolinol
92	Quercetin
93	Kaffesäure
94	Vanillin
95	Catechin
96	Daidzein

# Genomische Sequenz von N7OMT

ausgehend vom EST A21G11 ermittelt, unterstrichen wurden die für das Protein kodierenden Bereiche

```
1 AAAAGGAAAG CCCACGCTTT TTCTGTTGCC GTGGCAAAGA ATTTTGTGTC
51 TATAAAACAT ACTCCAGAAA CATGTCTTAC TCATCATCAA CAACAACAAC
101 TAAACTTTTA GTTCAGAGAG AATAAGAAAG TCCCAGAGAC AAAAATGGAA
151 GTAGTTAGCC AGATTGATCA AGAAAATCAA GCAATAATCT GGAAACAAAT
201 TTATGGTTTT TCGGAATCAT TACTTCTCAA ATGTGCAGTT CAATGTGAGA
251 TTGCTGAAAC TATTCATAAC CATGGAACAC CAATGTCTAT ATTGGAATTA
301 GCTGCTAAGC TTCCAATTGA TCAACCGGTT AATATCGACC GTTTGTACCG
351 AGTTATGCGT TACTTAGTTC ACCAGAAACT TTTCAACAAG GAAGTTATCT
401 CCACGCTTAA TGGTGGAAAC GTTCAAGTAA CAGAGAAGTA CTGGTTAGCT
451 CCACCGGCGA AATACCTAAT AAGAGGGTCT CAACAATCAA TGGTTCCTTC
501 AGTTTTAGGA ATAATTGATG AAGATATGTT TGCTCCGTGG CATATTCTAA
551 AAGACAGTTT AACTGGTGAA TGTAACATTT TTGAGACAGC GTTAGGAAAG
601 AGCATTTCGG TTTATATGAG TGAAAATCCT GAAATGAATC AAATTTCCAA
651 TGGAGCAATG GCTTTTGATA GTGGATTAGT TACTTCGCAT TTGGTTAATG
701 AATGCAAAAAG TGTTTTCGGT GATGAAATTA AAACATTAGT TGATGTTGGT
751 GGTGGTACTG GTA CTGCACT CAGAGCAATT TCGAAAGCGT TCCCAATAT
801 TAAGTGACA CTCTTGATC TTCCTCATGT TATAGCTGAT TCACCTGAAA
851 TTCCA ACTAT TACAAAAGTA TCGGGAGACA TGTTCAAGTC TATTCCAAGT
901 GCTGATGCCA TATTTATGAA GGTAATTATT TTTGCTTTTA TTATTTTAGC
951 CCACACATTT ATTA ACTATA ACCATAACCG AAAGGTTTAA GTTAAAATGA
1001 GAAACTAAAC AAGCCTTAAT GTCCTATTAA CTCATTTTTT AATCATACCT
1051 CAAATTAATT GTAAATATTC TTTTAGATAA TTAACCGTTT GTTTCATTTCG
1101 GGGATTTAGT AATTATCTTA TTATTTTGGGA CAATAAAATA ATAATTATGC
1151 AGGCAATGTG ATATGTACCT CTTTATACCA GGCAGTTAGA GTGGTTTTTAA
1201 GGTAGCTACT ACGGGTGGTT ATGAGTCTGC CTATATATAT TGTTGTGTAA
1251 GAATGTAAAG GTTATCTATG AAAATGGTGA TATCCTAGAT CAATGGCTTC
1301 GTATCTGATT CTGTGATTCT TCTTGCTTCT AATTTGATAA TCTGCTCTCT
1351 CTCTCTTATT ATTTCACTCT GATTTTATCC TGATTACTAA ATGATATGAA
1401 CATATCACAA TGTGGAATGA ATATAAAGGT CGGTTTGGTT AACATAAACC
1451 TTATTTTAAA TTGGGTTATG GTTAAGAAAT ATAGTTATAT TTTAAGAGAA
1501 GCCTTTTTTT AACTTAACGC AGTCCGTATG AAAATTTGAA TTGCCGACCT
1551 AAAGTACGAG GTTCTTTCCC TAGCAA ACTG GGATACTCTC CAGCTAAGTT
1601 GCTCAGTGTG TGTGCGCATA TGATTTTAAAC TTACTCCTCC TGTAACATT
1651 TCAGAACATC CTT CACGATT GGAACGATGA TGAATGCATT CAAATCTTAA
1701 AGCGATGCAA AGATGTAGTA TCAGCGGGAG GGAAACTTAT TATGGTTGAA
1751 ATGGTATTGG ACGAGGATTC GTTTCATCCA TATTCAAAAC TTAGACTCAC
1801 ATCTGATATA GATATGATGG TTAACAATGG AGGTAAAGAG AGAACCGAAA
1851 AAGAATGGGA AAAGCTTTTT GATGCAGCAG GTTTTGCTAG TTGCAAATTT
1901 ACTCAAATGT CAGTAGGTTT CGCAGCTCAA TCTATAATTG AGGTTTATTG
1951 ATGATAATAT ATGTTGGGGA ATCGGGTTTA GCCTATTTGG AGGGCGAGAC
2001 TTTGTTAGCT TTAGACACTA ACAAAGGTGT TCGATCCCAT TATTGGAAC
2051 TGTGTATCT TCAGTAATTT CATGGCTCCA AAAATCTGAT GTATTATGTT
2101 TGGAAATTTA CAATTTACTA GTAATAAAGT TTGTAAGGTT TAATTTAAAG
2151 CTTTATTTAA AGTTTGACAT GTAAAATTTT GAGATTTAAAT TTGTGTGTTT
2201 CTAATCTCC CCCTCTCCTC TAAACATAAA AAAGAAAAAG TCTTAGTTTC
2251 TTTTATCTTC TTGCTCTGGT CTATTTCCAG
```

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich PD Dr. Wolfgang Brandt und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Computerchemie recht herzlich danken für die Unterstützung meiner Arbeit durch viele Diskussionen und Hinweise sowie für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre. Ich habe viel bei euch gelernt.

Eva Schulze aus der AG Computerchemie möchte ich besonders danken, da sie meine Arbeit korrekturgelesen hat.

Dr. Jörg Ziegler möchte ich für die Vergabe des interessanten Themas, den guten Start in meine Promotionszeit und die konstante Unterstützung aus Kanada danken. Frau Wegener und Dr. Andreas Gesell möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre in der AG Papaver Genexpressionsanalyse danken.

Prof. D. Phil. Stubbs danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit.

Prof. Dr. Wessjohann möchte ich für meine Aufnahme in seine Abteilung, die Unterstützung meiner Arbeit und die Möglichkeit, dort meine Doktorarbeit zu beenden, danken.

Dr. Robert Kramell möchte ich für die Einweisung in das Arbeiten mit der HPLC danken sowie für das Durchführen der LC-MS Analysen.

Dr. Peter Lange möchte ich für seine Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methode der quantitativen real time PCR und die ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Frau Martina Lerbs danke ich für die Durchführung der LC-MS Analysen.

Und natürlich danke ich auch den Gutachtern für die Übernahme der Gutachten.

Ich danke der DFG für die Finanzierung der Forschungsarbeiten über das Projekt „Evolution metabolischer Diversität“ (EvoMet 1152).

## Bildungsgang

### Zur Person

Name: Silke Pienkny  
Geburtsdatum: 23.03.1981  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Familienstand: ledig

### Studium

10/1999- 09/2004 Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Thema der Diplomarbeit:  
„Jasmonatbiosynthese durch Allenoxidcyclasen in *Arabidopsis thaliana* – Unterdrückung der AOC2 Expression durch RNA Interferenz“

### Schule

1991-1999 Frieden Gymnasium, Halle (Saale)  
1987-1991 Grundschule Radewell, Halle (Saale)

### Tätigkeiten

seit 11/2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Agrochemischen Institut Piesteritz e. V.  
07/2010- 10/2010 Stipendiatin der Max-Planck-Gesellschaft, Arbeit am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie Halle, AG Computerchemie  
03/2009- 10/2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor klinische Forschung, Carl Gustav Carus Klinikum Dresden  
10/2008- 12/2008 wissenschaftliche Hilfskraft am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle; Abt. Sekundärstoffwechsel, AG Zellbiologie der Mykorrhiza  
09/2005- 09/2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, AG Papaver-Genexpressionsanalyse und AG Computerchemie, praktischer Teil der Promotion, Thema der Arbeit: “Enzyme der Alkaloidbiosynthese in *Papaver somniferum*”  
11/2004- 06/2005 wissenschaftliche Hilfskraft am Göttinger Zentrum für Molekularbiologie, Universität Göttingen, Abt. Biochemie der Pflanze  
11/2003- 09/2004 Diplomandin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abt. Naturstoffbiotechnologie, AG Jasmonatwirkungswiese

## Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

### *Artikel in Fachzeitschriften*

Pienkny, S.; Brandt, W.; Schmidt, J.; Kramell, R.; Ziegler, J. (2009): „Functional characterization of a novel benzylisoquinoline *O*-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L.)“. In: *The Plant Journal*. 60 (1), S. 56-67.

Ziegler, J.; Facchini, P.J.; Geissler, R.; Schmidt, J.; Ammer, C.; Kramell, R.; Voigtländer, S.; Gesell, A.; Pienkny, S.; Brandt, W. (2009): „Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy“. In: *Phytochemistry*. 70 (15-16), S. 1696-1707.

### *Vorträge*

Pienkny, S.; Brandt, W.; Ziegler, J. (2008, September): „Characterization and Homology Modelling of a New Plant *O*-Methyltransferase from *Papaver somniferum*“. Vortrag auf dem *Kurt-Mothes-Workshop* in Jena

Pienkny, S.; Brandt, W.; Ziegler, J. (2008, August): „Characterization and Homology Modelling of a New Plant *O*-Methyltransferase from *Papaver somniferum*“. Vortrag auf der *Banff Conference on Plant Metabolism* in Banff, Kanada

Pienkny, S.; Brandt, W.; Ziegler, J. (2007, Mai). „A New Plant *O*-Methyltransferase from *Papaver somniferum*“. Vortrag auf der *Plant Science Student conference* in Halle

### *Posterpräsentationen*

Pienkny, S.; Brandt, W.; Ziegler, J. (2007, September). „Characterization and Homology Modelling of a New Plant *O*-Methyltransferase from *Papaver somniferum*“. Poster auf der *Botanikertagung* Hamburg

Pienkny, S.; Brandt, W.; Ziegler, J. (2007, April). „Characterization and Homology Modelling of a New Plant *O*Methyltransferase from *Papaver somniferum*“. Poster auf dem *20. Darmstädter Modelling Workshop* in Erlangen

Pienkny, S.; Ziegler, J. (2006, Mai). „Morphine Biosynthesis in *Papaver somniferum*“. Poster auf der *2. IPK Student Conference* in Gatersleben

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht hat. Dies ist meine erste Bewerbung um den Doktorgrad.

Halle, 24.02.2011