

Gewebe- und zellspezifische Lokalisation der Alkaloidbiosynthese in *Papaver somniferum* L.

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Marion Weid

geb. am 4.1.1968 in Heidenheim-Mergelstetten

Gutachter:

1. Prof. Dr. T.M. Kutchan
2. Prof. Dr. J. Stöckigt
3. Prof. Dr. B. Dräger

verteidigt am 15.9.04 in Halle (Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000007988

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007988>]

Meinem Mann
und meinen Söhnen Jannik,
Tobias und Maximilian

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1. Alkaloide	3
1.2. Alkaloide aus <i>Papaver somniferum</i> und deren Biosynthese	5
1.3. Die Bedeutung der Milchröhren im Schlafmohn für die Alkaloidbiosynthese	12
1.4. Phloem	13
1.6. Lokalisationsstudien von Alkaloidbiosynthesen	14
1.7. Zielstellung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Pflanzen	19
2.1.2. Bakterienstämme	19
2.1.3. Medien	19
2.1.4. Vektoren	20
2.1.5. Oligonukleotide	20
2.1.6. Chemikalien und Enzyme	21
2.1.7. Spezielle Chemikalien für die Zytologie	21
2.1.7.1. Farbstoffe	21
2.1.8. Antikörper	21
2.1.8.1. Primäre Antikörper	21
2.1.8.2. Sekundäre Antikörper	21
2.1.9. Geräte	22
2.1.9.1. Zentrifugen	22
2.1.9.2. Mikroskope, Kameras und Microtom	22
2.1.9.3. PCR-Geräte	22
2.1.9.4. Sonstige Geräte	23
2.2. Methoden	23
2.2.1. DNA	23
2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.2.1.2. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	23
2.2.1.3. Ligation von DNA	23
2.2.1.4. Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	24
2.2.1.5. Gelelektrophorese von DNA	24
2.2.1.6. Fragmentisolierung aus Agarosegelen	24
2.2.1.7. Polymerasekettenreaktion	24
2.2.1.8. Sequenzierung	25
2.2.2. RNA	25
2.2.2.1. RNA Gele	25
2.2.3. Proteine	26
2.2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung	26
2.2.3.2. Proteinexpression in Bakterien	26
2.2.3.3. Herstellung von Antikörpern	27
2.2.3.4. Extraktion von Proteinen aus Mohngewebe	28
2.2.3.5. Trennung von Proteinen über Polyacrylamidgele	28
2.2.3.6. Elektroblothing von SDS-Gelen	29
2.2.3.7. Western Blot	30
2.2.4. Zytologische Methoden – Lokalisation von Proteinen	30
2.2.4.1. Einbettung in Polyethylenglykol	30
2.2.4.2. Einbettung in Paraffin	32
2.2.4.3. Poly-L-Lysinbeschichtung von Objektträgern	32
2.2.4.4. Immunmarkierung von Polyethylenglykolschnitten	33
2.2.4.5. Immunmarkierung von Paraplastschnitten	33
2.2.4.6. Färbungen	34
2.2.5. Zytologische Methoden – Lokalisation von mRNA	34
2.2.5.1. RNA Markierung durch <i>in vitro</i> -Transkription	34
2.2.5.2. Dot Blot zur Quantifizierung von Digoxigenin markierten RNA Sonden	35

2.2.5.3. Quantifizierung der Fluorescein-markierten RNA-Sonde	36
2.2.5.4. <i>In situ</i> -Hybridisierung	36
3. Ergebnisse	38
3.1. Anatomie der <i>Papaver somniferum</i> –Leitbündel	38
3.2. Major Latex Protein	41
3.2.1. Sequenzierung des Major Latex Proteins und Sequenzvergleich	41
3.2.2. Klonierung und heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	43
3.2.3. Western Blot	44
3.2.4. Lokalisation der Milchröhren in der Kapsel	45
3.2.5. Lokalisation der Milchröhren im Stängel	46
3.3. 3'-Hydroxy-N-Methylcoclaurin-4'-O-Methyltransferase	47
3.3.1. Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	48
3.3.2. Western Blot	48
3.3.3. Lokalisation in der Kapsel und im Stängel	49
3.4. Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase	52
3.4.1. Klonierung und heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	52
3.4.2. Western Blot	53
3.4.3. Lokalisation der Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase in der Kapsel und im Stängel	54
3.4.4. Vergleich der Lokalisation von 4'OMT und SalAT	57
3.4.5. Lokalisation der Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase in der Wurzel	57
3.5. Codeinon-Reduktase	58
3.5.1. Klonierung und heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	58
3.5.2. Western Blot	59
3.5.3. Lokalisation der Codeinon-Reduktase in der Kapsel und im Stängel	60
3.5.4. Lokalisation der Codeinon-Reduktase in der Wurzel	63
3.5.5. Lokalisation der Codeinon-Reduktase-mRNA durch <i>in situ</i> -Hybridisierung	63
3.6. (R,S)-Retikulin 7-O-Methyltransferase	65
3.6.1. Klonierung und heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	65
3.6.2. Western Blot	65
3.6.3. Lokalisation der (R,S)-Retikulin-7-O-Methyltransferase in der Kapsel und im Stängel	66
3.6.4. Lokalisation in der Wurzel	69
3.6.5. Lokalisierung der 7OMT-mRNA durch <i>in situ</i> -Hybridisierung	69
3.7. Berberinbrückenenzym	70
3.7.1. Western Blot	71
3.7.2. Lokalisation in der Wurzel	71
4. Diskussion	73
4.1. Alkaloide – biotechnologischer Zugang	73
4.2. Ergebnisse der Lokalisation im Vergleich zu bisherigen Ergebnissen	75
4.2.1. Untersuchung der Milchröhren	75
4.2.2. Lokalisation der 3'-Hydroxy-N-Methylcoclaurin-4'-O-Methyltransferase	76
4.2.4. Lokalisation der Codeinon-Reduktase	77
4.2.5. Lokalisation der (R,S)-Retikulin-7-O-Methyltransferase	78
4.2.6. Lokalisation des Berberinbrückenenzym	79
4.4. Bedeutung der räumlichen Aufteilung der Alkaloidbiosynthese	83
4.5. Weiterführende Arbeiten	85
5. Zusammenfassung	86
6. Literaturverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
BBE	Berberinbrückenenzym
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin, Cytidin
° C	Grad Celsius
CaMV	Calciummosaikvirus
cDNA	komplementäre DNA
CjMDR1	<i>Coptis japonica</i> Multidrug-resistance-type Protein
COR	Codeinon-Reduktase
cv	Cultivar
CYP80B1	(<i>S</i>)- <i>N</i> -Methyl-Coclaurin-3'-Hydroxylase
DHS	Desoxyhypusin- Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence tag
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin, Guanosin
H6H	Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase
His	Histidin
HS	Homospermidin-Synthase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
M	Mol
MLP	Major Latex Protein
MOPS	3-[<i>N</i> -morpholino]propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazolium
4'OMT	(<i>R,S</i>)-3'-Hydroxy- <i>N</i> -Methylcoclaurin-4'- <i>O</i> -Methyltransferase
6OMT	(<i>S</i>)-Norcoclaurin-6- <i>O</i> -Methyltransferase
7OMT	(<i>R,S</i>)-Retikulin-7- <i>O</i> -Methyltransferase
9OMT	(<i>S</i>)-Scoulerin-9- <i>O</i> -Methyltransferase
ORCA	Octadecanoid-Responsive Catharanthus AP2
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMT	Putrescin- <i>N</i> -Methyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase

SalAT	Salutaridinol-7- <i>O</i> -Acetyltransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
STR	Strictosidin-Synthase
T	Thymin, Thymidin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TDC	Tryptophan-Decarboxylase
TDC	Tryptophan-Decarboxylase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TYDC	Tyrosin/Dopa-Decarboxylase
U	Units
UTP	Uridintriphosphat
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Alkaloide

Alkaloide sind niedermolekulare Verbindungen, an deren Aufbau Stickstoff beteiligt ist. Diese überwiegend pflanzlichen Sekundärstoffe besitzen charakteristische toxische und pharmakologische Eigenschaften. Charakteristisch für diese Sekundärstoffe ist deren physiologische Wirkung auf den menschlichen und tierischen Organismus, insbesondere auf das Nervensystem.

Die Bezeichnung „Alkaloid“ leitet sich vom arabischen Wort „*al-qali*“ ab, der Name der Pflanze, aus der erstmals Soda gewonnen wurde (Kutchan 1995). Dies deutet auf die basischen Eigenschaften aller Alkaloide hin, die durch das freie Elektronenpaar am Stickstoff zustande kommen.

Alkaloide sind unter den Pflanzen weit verbreitete Sekundärstoffe, ungefähr 20% aller Pflanzen akkumulieren Alkaloide. Die Anzahl der bis heute beschriebenen Verbindungen liegt bei über 12 000. Neben den Terpenen bilden sie damit die zweitstärkste Gruppe aller pflanzlichen Sekundärmetaboliten, deren chemischer Aufbau aufgeklärt ist (De Luca & St-Pierre 2000).

Ausgangsverbindungen der meisten Alkaloide bilden Amine, die durch Decarboxylierung aus den jeweiligen Aminosäuren hervorgehen und für die Einführung des Stickstoffs in den entstehenden Heterozyklus sorgen. Beispiele dieser Aminosäuren sind Tryptophan, Ornithin, Lysin, Tyrosin und Histidin.

Neben diesen Aminosäuren werden weitere stickstoffhaltige Biomoleküle als Ausgangsverbindungen für komplexe Alkaloide genutzt, beispielsweise Nukleotide oder stickstoffhaltige organische Säuren.

So leitet sich die Gruppe der Purinalkaloide von Nukleotiden ab. Bekanntester Vertreter der Purinalkaloide ist das Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin, Abb. 1), das für die anregende Wirkung von Kaffee und Schwarzem Tee verantwortlich ist (Baltes 1989).

Wie bereits erwähnt, können auch stickstoffhaltige organische Säuren als Ausgangsverbindungen von Alkaloiden dienen. Zum Beispiel bildet die stickstoffhaltige Anthranilsäure die Ausgangsverbindung der Acridonalkaloide. In Pflanzen ist diese Säure ebenso ein Vorläufer der Aminosäure Tryptophan. Von der Gruppe der Acridonalkaloide sind zurzeit etwa 100 bekannt. Sie kommen ausschließlich in der Familie der Rutaceae vor, haben bisher aber keine pharmazeutische Anwendung gefunden (Kutchan 1998). Ein Beispiel der Acridonalkaloide ist das in Abbildung 1 gezeigte Acronycin.

Als Ausgangsverbindungen von Alkaloiden haben jedoch die erwähnten Aminosäuren die größte Bedeutung.

Beispielsweise geht die Biosynthese der Monoterpen-Indolalkaloide von der Aminosäure L-Tryptophan aus, deren Indoleinheit durch das entsprechende Amin, Tryptamin, gebildet wird. Die Kondensation von Tryptamin und der Terpeneinheit Secologanin katalysiert durch die Strictosidin-Synthase (STR), führt zu dem zentralen Intermediat der Monoterpen-Indolalkaloide 3 α (S)-Strictosidin (Stöckigt & Zenk 1977; Kutchan *et al.* 1986; St-Pierre *et al.* 1999).

Diese zentralen Intermediate sind ein Charakteristikum vieler Alkaloidbiosynthesen. Sie zeigen die Fähigkeit der Pflanze, die aus den Aminosäuren entstandenen Amine an verschiedene chemische Verbindungen zu koppeln und damit eine begrenzte Anzahl an Zwischenprodukten zu erzeugen. Diese zentralen Intermediate bilden sozusagen Verzweigungspunkte in den Biosynthesewegen, hier trennen sich anfänglich gemeinsame Synthesewege und führen zu einer Vielzahl an Alkaloiden (De Luca & Laflamme 2001). In *Catharanthus roseus*, der wichtigsten monoterpen-Indolalkaloidhaltigen Pflanze leiten sich

von dem zentralen Intermediat 3 α (S)-Strictosidin mehr als einhundert dieser Alkaloide ab (Vasquez-Flota *et al.* 2000). Die größte Bedeutung davon haben die beiden Alkaloide Vinblastin und Vincristin erlangt (Abb. 1), sie finden als Chemotherapeutika Verwendung.

Auch weitere Monoterpen-Indolalkaloide haben pharmazeutische Anwendungen. Darunter sind das als Antimalariamittel verwendete Chinin aus *Cinchona officinalis*, das als Vasodilatator verwendete Vincamin aus *Vinca minor* und das blutdrucksenkende Ajmaline aus *Rauwolfia serpentina* zu finden. Lediglich Vincamin lässt sich unter vertretbarem Aufwand chemisch synthetisieren, alle anderen therapeutisch wichtigen Monoterpen-Indolalkaloide werden aus den jeweiligen Pflanzen gewonnen (Kutchan 1998).

Verschiedener Klassen von Alkaloiden gehen auf die Aminosäure L-Ornithin zurück.

Die Biosynthese der Tropanalkaloide, ebenso wie die der Nikotinalkaloide und der Pyrrolizidinalkaloide nützt diese Aminosäure als Ausgangsverbindung.

Das Tropanringsystem wird über das Diamin Putrescin aufgebaut, jedoch sind noch nicht alle Schritte dieser Biosynthese auf enzymatischer Ebene aufgeklärt (Nakajima & Hashimoto 1999).

Tropanalkaloide kommen hauptsächlich in der Familie der Solanaceae vor (Leete 1990). Wichtige Vertreter diese Alkaloide sind die Cholinantagonisten (S)-Hyoscyamin und (S)-Scopolamin aus *Hyoscyamus niger* und *Atropa belladonna* (Abb. 1). Diese Alkaloide können aufgrund ihrer komplexen Stereochemie ebenfalls nicht chemisch synthetisiert werden. Sie werden aus *Duboisia* Pflanzen isoliert (Kutchan 1998).

In *Nicotiana tabacum* wird Putrescin zu Nikotin (Abb. 1) metabolisiert. Nikotin ist bekanntermaßen das Hauptalkaloid des Tabaks, dessen Gehalt an Nikotin im Mittel etwa 1,5% beträgt (Baltes 1989).

Ebenso auf die Aminosäure L-Ornithin geht der als „Necin-Base“ bezeichnete Anteil der Pyrrolizidinalkaloide zurück. Das zentrale Intermediat der Biosynthese der Necin-Base, Homospermidin, wird aus Putrescin und Spermidin gebildet. Der als „Necin-Säure“ bezeichnete Anteil der Pyrrolizidinalkaloide hat die Aminosäure Isoleucin als Ausgangsverbindung (Hartmann *et al.* 1989). Ein Beispiel dieser Alkaloidklasse ist das in Abbildung 1 aufgeführte Senecionin.

Pyrrolizidinalkaloide kommen in mehreren Pflanzenfamilien vor, hauptsächlich jedoch in den 4 Familien *Asteraceae*, *Borangiaceae*, *Fabaceae* und *Orchidaceae*. Sie akkumulieren in allen Pflanzenorganen und bilden aufgrund ihrer Toxizität ein effizientes Abwehrsystem gegen Herbivoren (Hartmann 1999, Ober & Hartmann 2000, Moll *et al.* 2002). Sie sind für Vertebraten lebertoxisch und wirken auf Insekten mutagen (Hartmann 1999). Einige Insektenarten haben sich jedoch an pyrrolizidinalkaloidhaltige Pflanzen adaptiert. Sie sind in der Lage, diese Alkaloide als nicht-toxische N-Oxide zu erhalten und schützen sich damit ihrerseits gegen Fraßfeinde (Ober & Hartmann 2000, Hartmann 1999, Boppré 1986).

Die Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide nutzt die Aminosäure L-Tyrosin als Ausgangsverbindung. In dieser Klasse finden sich pharmazeutisch sehr bedeutsame Alkaloide. Das analgetisch wirkende Morphin und das antitussiv wirkende Codein aus *Papaver somniferum* oder das antibakteriell wirkende Sanguinarin aus *Sanguinaria canadensis* sind einige Beispiele pharmazeutischer Anwendungen (Kutchan 1998). Da Untersuchungen zur Lokalisation der Biosynthese dieser Alkaloide Gegenstand dieser Arbeit ist, wird sie im nächsten Abschnitt ausführlich erläutert.

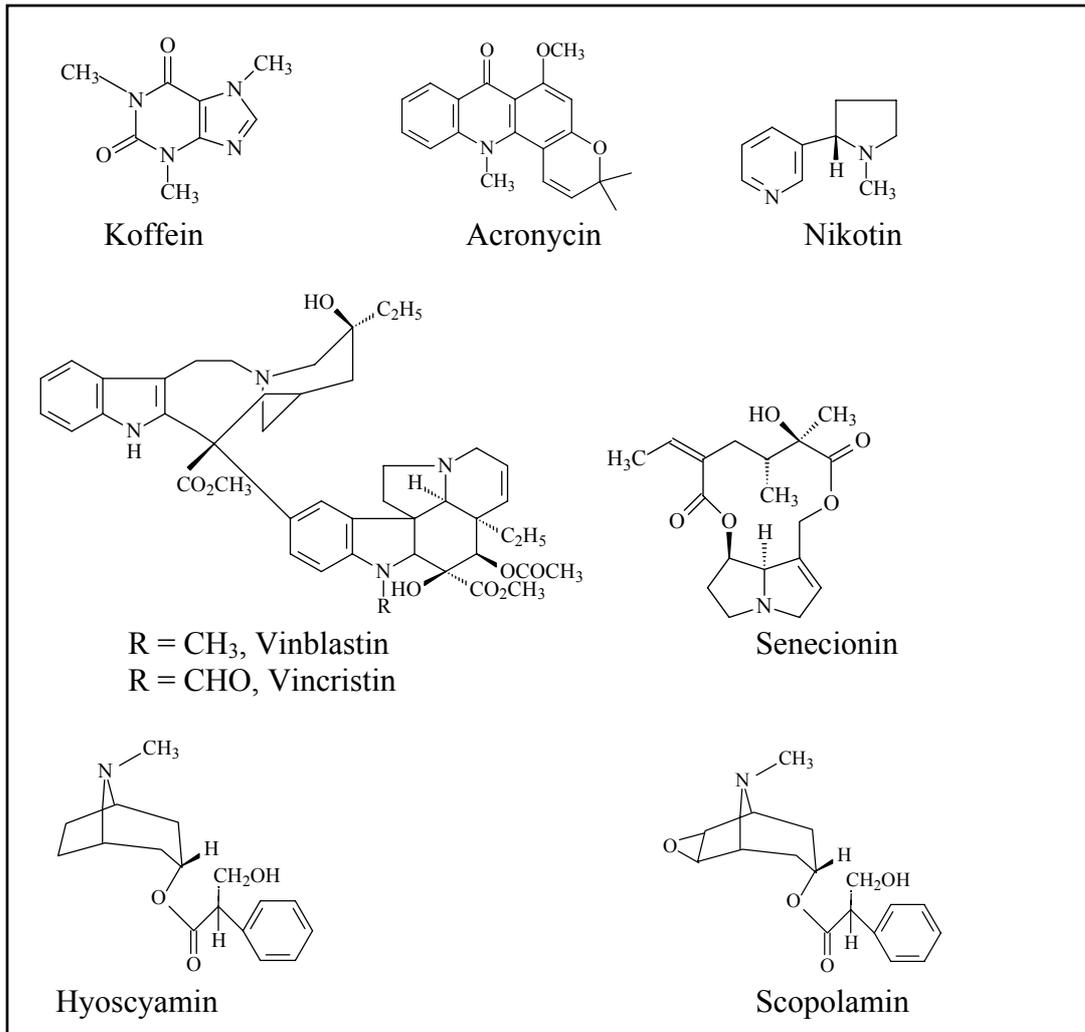


Abb. 1: Strukturen einiger ausgewählter pflanzlicher Alkaloide.

1.2. Alkaloide aus *Papaver somniferum* und deren Biosynthese

Als erstes Alkaloid isolierte und analysierte Friedrich Wilhelm Sertürner 1806 Morphin aus Opium, dem getrockneten Milchsaft der Schlafmohnpflanze. Die Bezeichnung Morphin leitete Sertürner von Morpheus, dem griechischen Gott des Schlafes ab, was auf die sedierenden und beruhigenden Eigenschaften des Alkaloids hindeutet (Kohl 1998). Opium besteht bis zu 25% aus Alkaloiden. Dabei ist Morphin das mengenmäßig am höchsten vertretene Alkaloid (4-21%), gefolgt von Codein, Thebain, Papaverin und Noscapin (Dewick 1998) (Abb. 2).

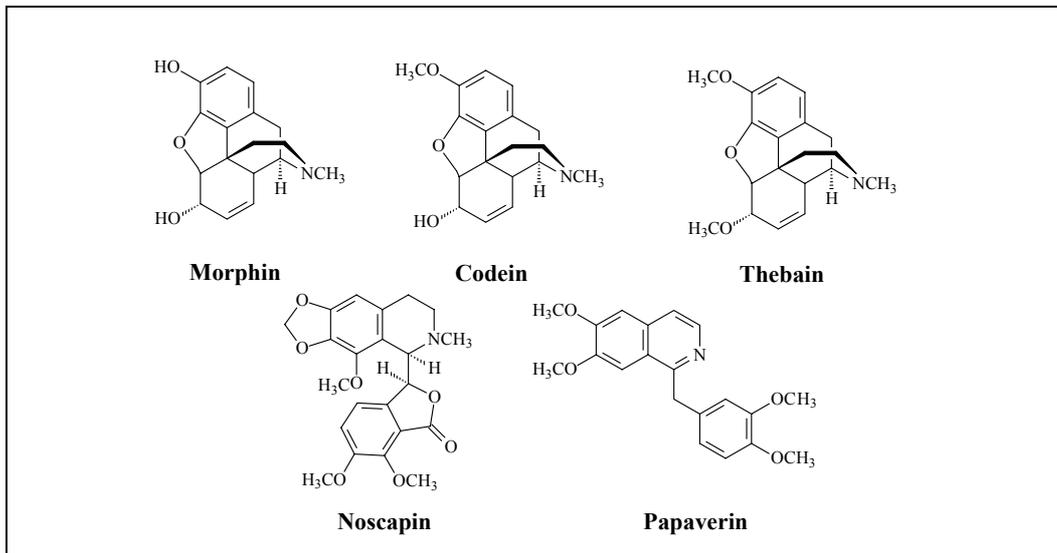


Abb. 2: Strukturformeln der Hauptalkaloide von Opium.

Die medizinische Anwendung von Opium reicht 4000 oder mehr Jahre zurück. Die einzelnen Alkaloide des Schlafmohns werden auch heute noch für pharmazeutische Anwendungen aus der Pflanze gewonnen. Pro Jahr werden 90-95% der ungefähr 160 Tonnen gereinigten Morphins zu Codein methyliert, das entweder direkt oder in Form seiner Derivate Anwendung findet (Unterlinner *et al.* 1999; Kutchan 1998).

Allerdings übersteigt die Gewinnung von Opium zu illegalen Zwecken bei weitem die legale Produktion. Für den illegalen Markt wird Morphin zu dem Diacetylderivat Heroin umgesetzt. Heroin wurde erstmals 1898 synthetisiert und aufgrund seiner antitussiven Eigenschaften gegen die damalige Volksseuche Tuberkulose eingesetzt (Zenk 1994). Erst später wurde man auf das Suchtpotential von Heroin aufmerksam.

Im UN-Drogenbericht 2003 wird die Zahl der Heroin- und Opiumabhängigen auf 15 Millionen Menschen weltweit geschätzt. Die Produktion an Heroin betrug im Jahr 2002 4500 Tonnen (UN-Drogenbericht 2003, www.unodoc.org). Um den Anbau morphinreicher Schlafmohnvarietäten einzugrenzen, wären daher alternative Wege zur Gewinnung der Alkaloide wünschenswert. Da chemische Synthesen keine wirtschaftlichen Ausbeuten ermöglichen, könnte der biotechnologische Zugang zu den Morphinalkaloiden in Zukunft von Bedeutung sein. Dies setzt allerdings eine detaillierte Kenntnis des Biosyntheseweges und dessen Regulation voraus.

In den letzten zwanzig Jahren der Forschung wurden entscheidende Fortschritte in der Aufklärung der Alkaloidbiosynthesen geleistet. Die Entwicklung von Zellsuspensionskulturen, die bis zu mehreren hundert Milligramm pro Liter der gewünschten Alkaloide produzierten, erleichterte die Isolierung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme wesentlich (Zenk 1991). Zeitgleich wurden die Methoden der Proteinanreicherung und Reinigung verbessert. Weitere große Fortschritte brachte die Entwicklung molekularbiologischer Methoden.

Inzwischen ist auch die Morphin- und Benzophenantridin-Biosynthese auf enzymatischer Ebene weitgehend aufgeklärt und wurde von Kutchan (1998) zusammengefasst dargestellt.

Die Biosynthese verschiedener Alkaloidklassen beginnt mit der Kondensation von 4-Hydroxyphenylacetaldehyd und Dopamin zu (*S*)-Norcoclaurin, dem ersten Tetrahydrobenzylisochinolinalkaloid (Abb. 3) (Stadler *et al.* 1987). Sowohl 4-Hydroxyphenylacetaldehyd als auch Dopamin werden aus der Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert. Für die Bildung von Dopamin aus L-Tyrosin stehen zwei Wege zur Verfügung. Zum einen über die Decarboxylierung zu Tyramin und anschließender Hydroxylierung zu Dopamin oder beginnend mit der Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-

Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) und nachfolgender Decarboxylierung zu Dopamin. Welcher Weg bevorzugt wird, lässt sich nicht entscheiden, da alle beteiligten Enzymaktivitäten in Proteinextrakten nachgewiesen wurden (Rüffer & Zenk 1987). Die Benzyleinheit von Norcoclaurin wird durch Transaminierung von L-Tyrosin zu Tyramin und anschließender Decarboxylierung zu 4-Hydroxyphenylacetaldehyd gebildet (Abb. 3) (Rüffer & Zenk 1987; Kutchan 1998). Aus dem Genom von *P. somniferum* konnten cDNAs isoliert werden, die für Tyrosin-/Dopa Decarboxylasen kodieren. Sie können in zwei Genfamilien eingeteilt werden, die differenziell exprimiert werden (Facchini & DeLuca 1994 und 1995; Maldonado-Mendoza 1996).

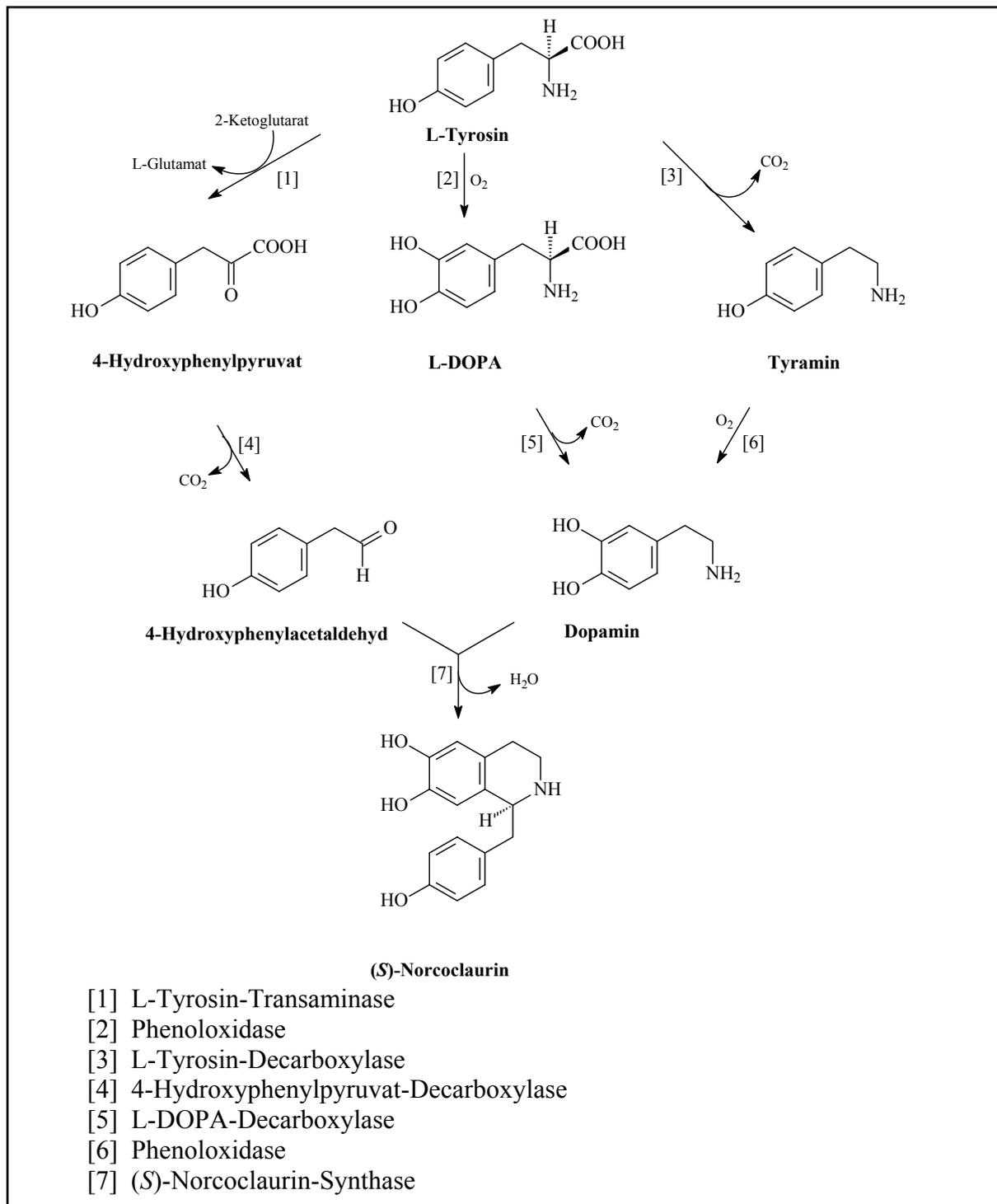


Abb. 3: Biosynthese von (S)-Norcoclaurin.

Die Kondensation von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu (*S*)-Norcoclaurin wird durch die (*S*)-Norcoclaurin-Synthase katalysiert (Stadler *et al.* 1987, Stadler & Zenk 1990). Eine partielle Charakterisierung dieses Enzyms wurde nach Extraktion aus *P. somniferum*-Zellsuspensionskulturen durchgeführt (Samanani & Facchini 2001) (Abb. 3).

Die Umsetzung von (*S*)-Norcoclaurin zu (*S*)-Retikulin ist auf enzymatischer und molekularbiologischer Ebene aufgeklärt (Abb. 4). (*S*)-Norcoclaurin wird durch die (*S*)-Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase (6OMT) in 6-Position zu (*S*)-Coclaurin methyliert. Dieses Enzym wurde erstmals aus *Argemone platyceras*-Zellkulturen partiell gereinigt und charakterisiert. Weitere cDNAs, die für die 6OMT kodieren, sind aus *Thalictrum tuberosum* (Frick & Kutchan 1999), *Coptis japonica* (Morishige *et al.* 2000) und *P. somniferum* (Ounaroon *et al.* 2003) bekannt. (*S*)-Coclaurin wird N-methyliert durch die (*S*)-Coclaurin-N-Methyltransferase zu (*S*)-*N*-Methylcoclaurin. Dieses Enzym wurde erstmals aus *Berberis koetiana*-Zellkulturen gereinigt und charakterisiert (Frenzel & Zenk 1990a). Die Klonierung einer cDNA gelang aus *C. japonica* (Choi *et al.* 2002) und aus *P. somniferum* (Haase *et al.* unveröffentlicht).

Die Hydroxylierung von (*S*)-*N*-Methylcoclaurin zu (*S*)-3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin erfolgt durch eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase. cDNAs, die für die (*S*)-*N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (CYP80B1) kodieren konnten aus *Eschscholzia californica* (Pauli & Kutchan 1998) und *P. somniferum* (Huang & Kutchan 2000) kloniert werden.

Als letzter Schritt der Retikulin-Biosynthese erfolgt die *O*-Methylierung in 4'-Position durch die (*R,S*)-3'-Hydroxy-*N*-Methylcoclaurin-4'-*O*-Methyltransferase (4'OMT) (Frenzel & Zenk 1990b). Die cDNAs der 4'OMT wurden aus *C. japonica* (Morishige *et al.* 2000) und *P. somniferum* isoliert (Ziegler *et al.* unveröffentlicht).

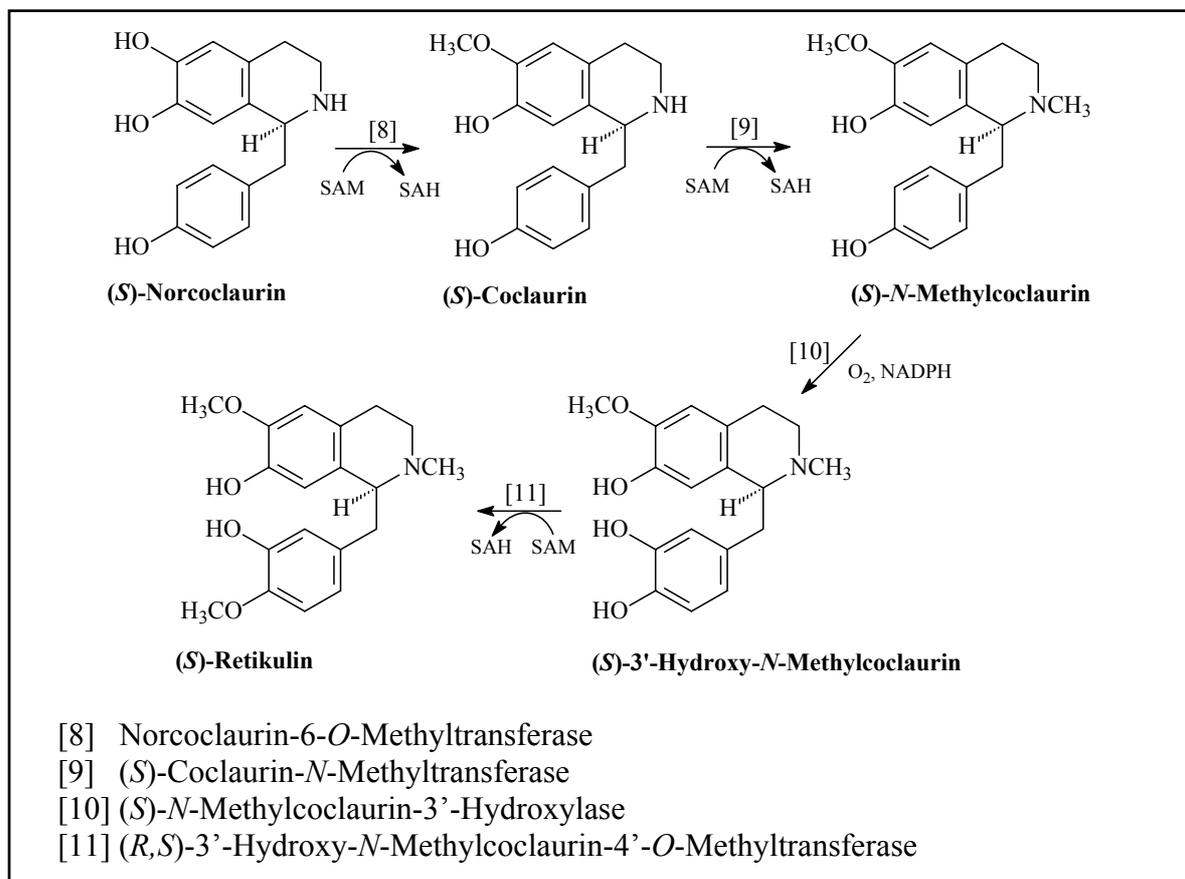


Abb. 4: Biosynthese von (*S*)-Norcoclaurin zu (*S*)-Retikulin.

(*S*)-Retikulin ist das zentrale Intermediat der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum*. Von diesem Zwischenprodukt leiten sich viele verschiedene Alkaloid-Strukturen ab. Dazu gehören das Phthalidisoquinolinalkaloid Noscapin, das Benzophenanthridinalkaloid Sanguinarin und die Benzylisoquinolinalkaloide Papaverin, Codein und Morphin.

In *P. somniferum* kann (*R,S*)-Retikulin durch die (*R,S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase (7OMT) zu Laudanin methyliert werden. Eine cDNA dieses Enzyms wurde aus Schlafmohn kloniert (Ounaroon *et al.* 2003) (Abb. 5). Möglicherweise beginnt mit diesem Schritt die Biosynthese von Noscapin (Ounaroon 2002). Diese Annahme ist jedoch auf enzymatischer Ebene nicht geklärt.

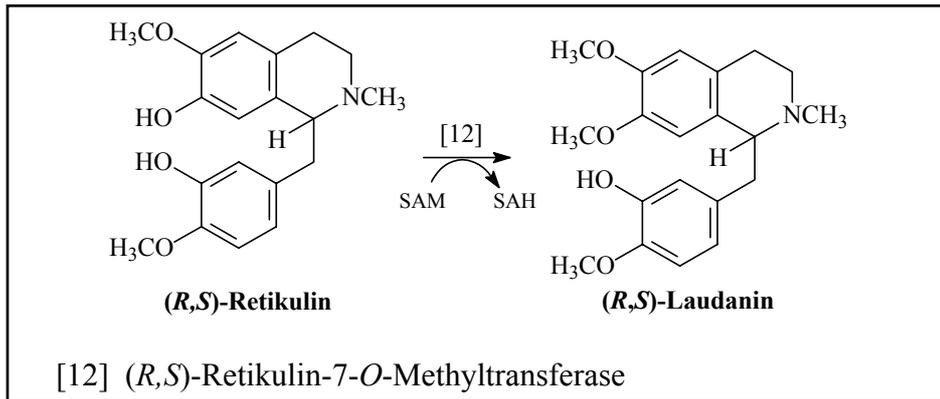


Abb. 5: Biosynthese von Laudanin.

Ausgehend von der *N*-Methylgruppe des (*S*)-Retikulin kann oxidativ ein Ringschluss durch das Berberinbrückenenzym über den C-8-Kohlenstoff zu (*S*)-Scoulerin erfolgen (Abb. 6).

Das Berberinbrückenenzym (BBE) wurde erstmals aus *Macleaya microcarpa*-Zellsuspensionskulturen beschrieben (Rink & Böhm 1975) und aus *Berberis beaniana*-Zellkulturen isoliert und charakterisiert (Steffens *et al.* 1985). Die entsprechenden cDNAs wurden aus *E. californica* (Dittrich & Kutchan 1991), *P. somniferum* (Huang & Kutchan 2000) und *Berberis stolonifera* (Chou & Kutchan, 1998) isoliert.

In *P. somniferum* wird (*S*)-Scoulerin zu den antimikrobiell wirkenden Benzophenanthridinalkaloiden, wie zum Beispiel dem Sanguinarin umgesetzt.

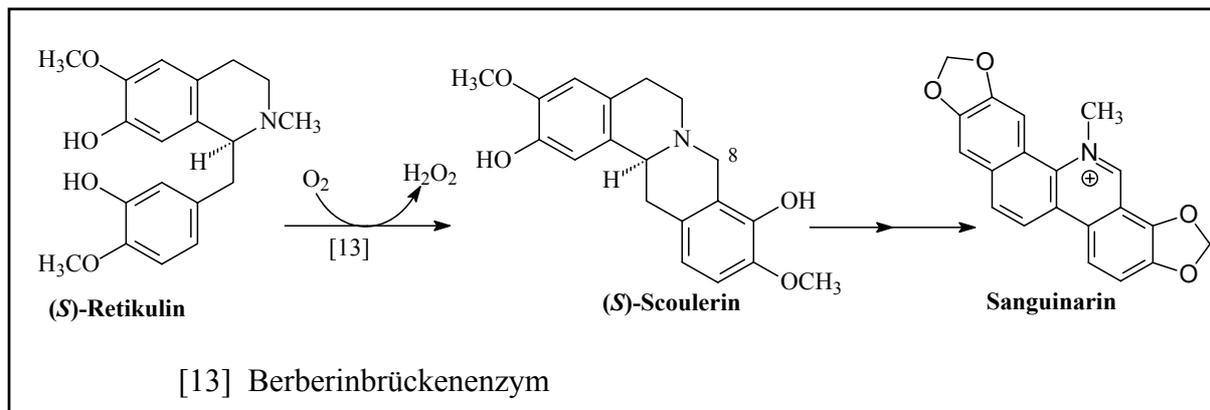


Abb. 6: Biosynthesen von (*S*)-Scoulerin; Strukturformel von Sanguinarin.

Die Morphinbiosynthese wird durch eine enzymkatalysierte Konformationsänderung fortgesetzt (Abb. 7). Dazu wird zunächst das (*S*)-Retikulin zum 1,2-Dehydroretikulinium-Ion reduziert. Diese Reaktion wird durch die 1,2-Dehydroretikulin-Synthase katalysiert, die

unlängst aus *P. somniferum*-Keimlingen partiell gereinigt und charakterisiert werden konnte (Hirata *et al.* 2004). Die dabei entstehende Zwischenstufe, das 1,2-Dehydroretikulinium-Ion wird durch die 1,2-Dehydroretikulinium-Ion-Reduktase stereospezifisch zu (*R*)-Retikulin reduziert (De-Eknamul & Zenk 1990).

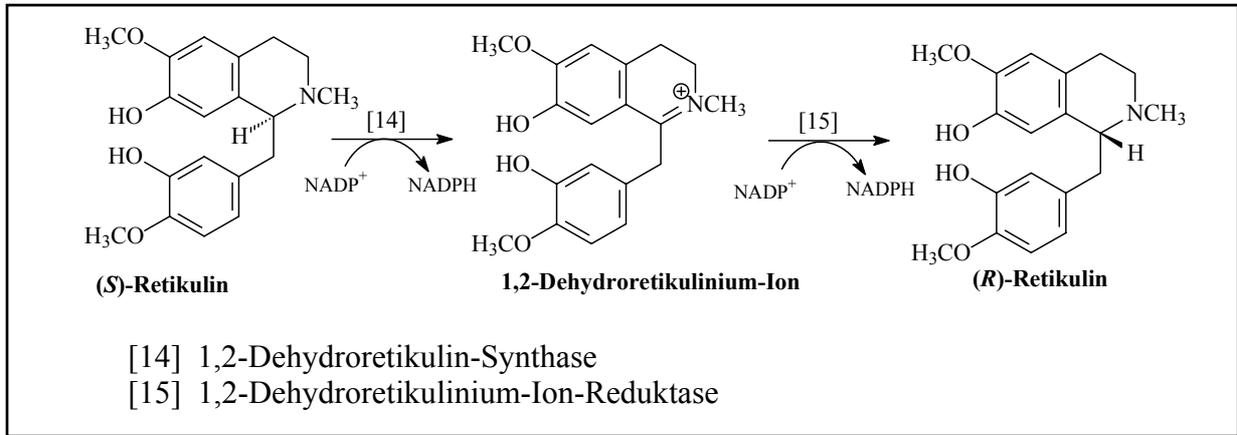


Abb. 7: Konformationsänderung von (*S*)-Retikulin zum (*R*)-Retikulin.

Der oxidative Ringschluss zwischen C12- und C13 durch stereospezifische Phenolkopplung zum Salutaridin (Abb. 8) wird durch die Cytochrom-P450-abhängige Salutaridin-Synthase katalysiert (Gerardy & Zenk 1993a). Salutaridin wird anschließend durch die NADPH-abhängige Salutaridin-Reduktase zu Salutaridinol reduziert (Gerardy & Zenk 1993b).

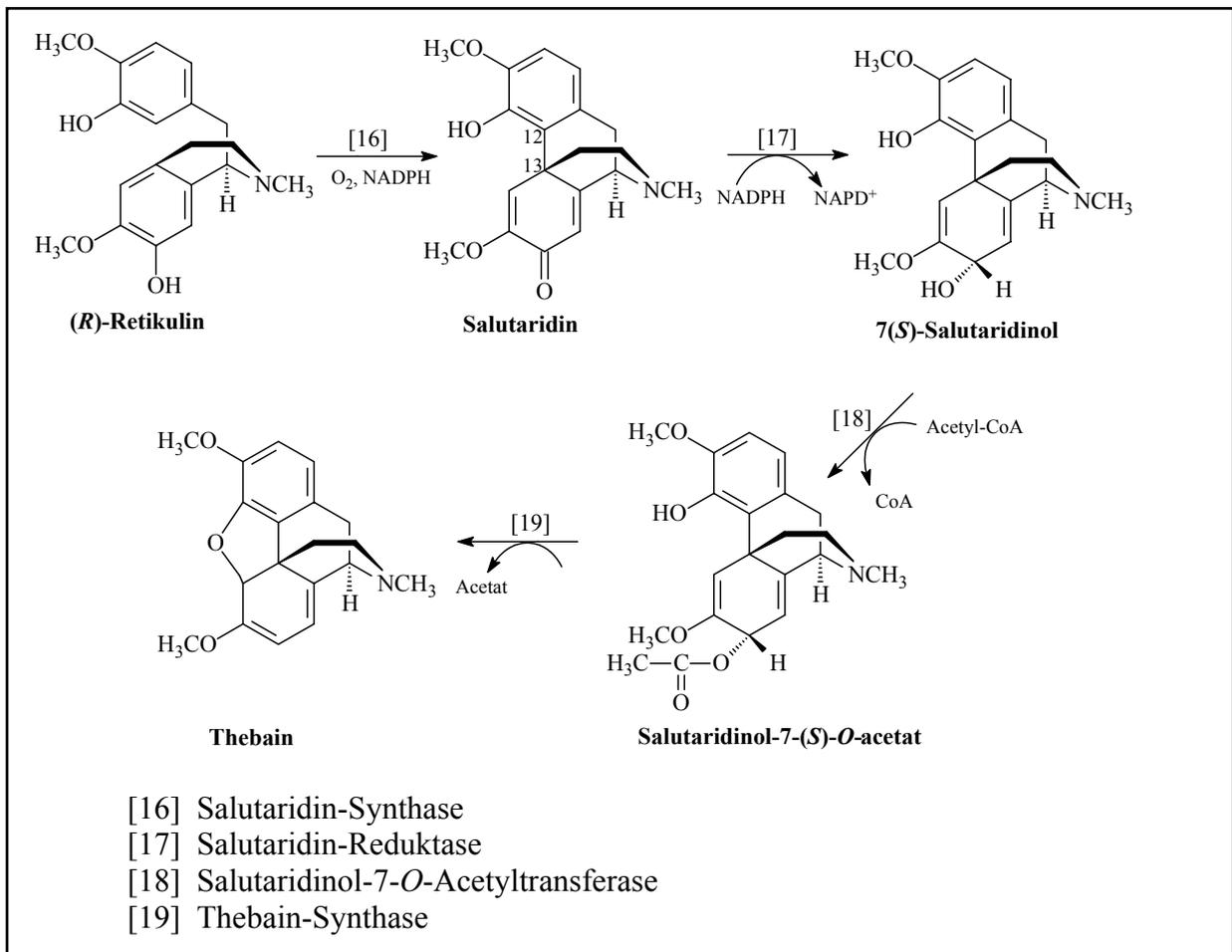


Abb. 8: Thebainbiosynthese

Die Aktivierung des Salutaridinol durch Einführung einer Acetylgruppe an der 7-Hydroxylgruppe erfolgt durch die Acetyl-CoA-abhängige Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase (SalAT) (Lenz & Zenk 1995a; Grothe *et al.* 2001). Die Schließung der Etherbrücke zwischen C4 und C5 zu Thebain, dem ersten Morphinanalkaloid in dieser Biosynthese, könnte unterstützt durch den -I-Effekt der Acetylgruppe spontan erfolgen (Lenz & Zenk 1994) (Abb. 8). Dies setzt allerdings einen pH-Wert von 8-9 voraus. Diese Bedingungen können nur durch eine Kompartimentierung gewährleistet werden, die jedoch bei *P. somniferum* nicht nachgewiesen werden konnte (Fisinger 1998). Mittlerweile gelang die Etablierung eines Enzymtests für die Thebain-Synthese und deren Anreicherung aus der zytosolischen Milchsaffraktion. Eine Reinigung bis zur Homogenität und eine Sequenzierung der Aminosäuresequenz gelang jedoch nicht (Grothe 2002).

Im nächsten Schritt der Biosynthese erfolgt die Demethylierung von Thebain zu Neopinon (Abb. 9), das im Gleichgewicht zu Codeinon steht. Dieses Gleichgewicht wird durch die Reduktion von Codeinon zu Codein durch die Aktivität der Codeinon-Reduktase (COR) auf die Seite von Codeinon verschoben. COR konnte aus *P. somniferum*-Zellkulturen gereinigt und charakterisiert werden (Lenz & Zenk 1995b und 1995c). Im *P. somniferum*-Genom sind mindestens sechs Isoformen dieses NADPH-abhängigen Enzyms vorhanden. Vier davon konnten isoliert und in *E. coli* funktionell exprimiert werden (Unterlinner *et al.* 1999).

Als letzten Schritt der Morphinbiosynthese wird Codein zu Morphin 3-O-demethyliert. Zu den letzten 4 Schritten der Biosynthese wurde ein alternativer Syntheseweg vorgeschlagen. Dabei wird Thebain zunächst in 3-Position zu Oripavin demethyliert, das anschließend in 6-Position zu Morphinon demethyliert wird. Morphinon wird durch die COR zu Morphin reduziert. Da sowohl Oripavin als auch Codeinon im Schlafmohn akkumulieren, sind beide Synthesewege möglich (Brochmann-Hanssen 1984). Die beiden Demethylierungsschritte sind auf enzymatischer Ebene noch nicht aufgeklärt.

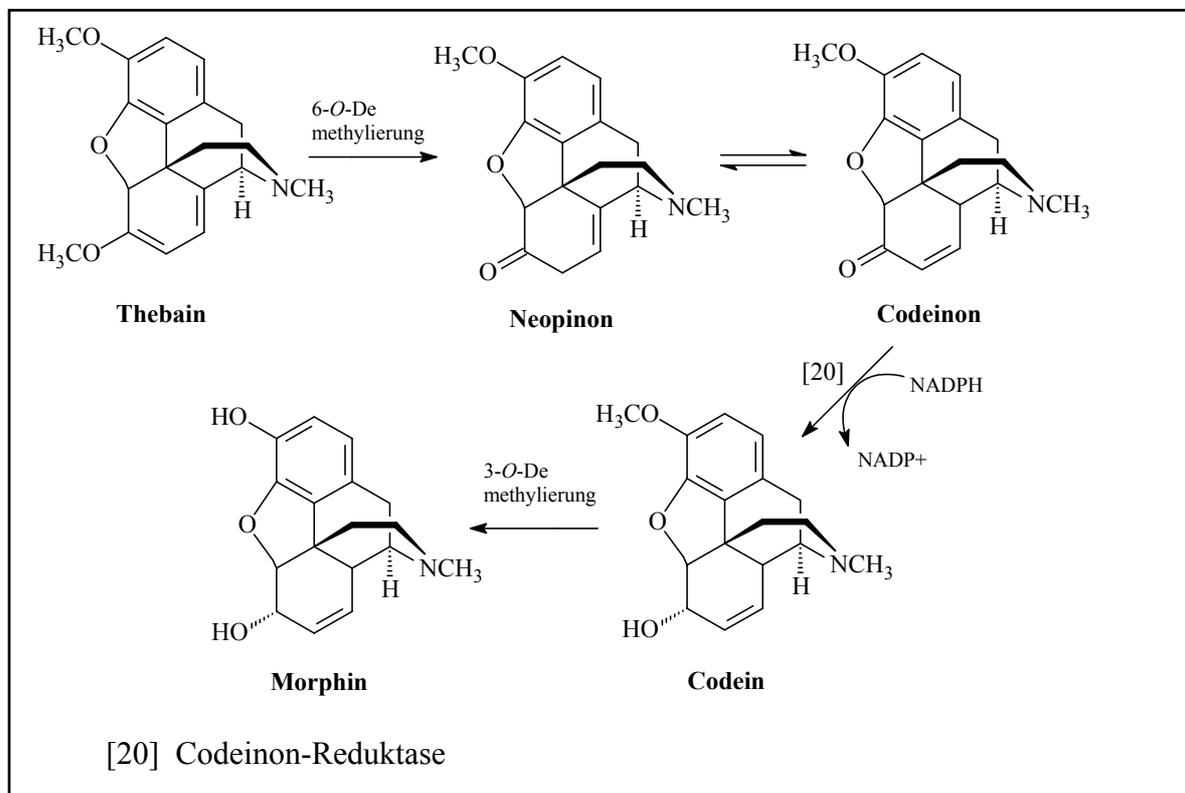


Abb. 9: Biosyntheseweg von Thebain zu Morphin.

1.3. Die Bedeutung der Milchröhren im Schlafmohn für die Alkaloidbiosynthese

Die Milchröhren in *P. somniferum* gehören zum Typ der gegliederten, anastomosierenden (d.h. durch Auflösung von Querwänden fusionierende) Milchröhren (Esau 1965). An der Auflösung von Querwänden beteiligte Enzyme konnten im Milchsaft nachgewiesen werden (Pilatzke-Wunderlich & Nessler, 2001). Milchröhren sind mit dem Phloem assoziiert und finden sich in allen oberirdischen Teilen der Pflanze. In der Wurzel kommen einzelne, latexgefüllte Zellen vor, die als Milchröhrenglieder bezeichnet werden. Die Entwicklung der Milchröhren wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Danach setzt die Milchröhrendifferenzierung 18-30 Stunden nach der Keimung ein (Thureson-Klein 1970; Nessler & Mahlberg 1977). Bock (1996) konnte im Rahmen seiner Dissertation das Auftreten von Milchröhren drei Tage nach dem Auskeimen feststellen. Die Bildung von Milchröhren korreliert mit dem ersten Auftreten von Alkaloidmetaboliten im drei Tage alten Keimling (Nessler & Mahlberg 1977; Roberts *et al.* 1983; Rush *et al.* 1985; Kutchan *et al.* 1986; Wiczorek *et al.* 1986).

Der Zellinhalt der Milchröhren ist mit Latex ausgefüllt. Beim Anritzen der Kapsel tritt dieser Milchsaft aus, polymerisiert rasch an der Luft und bildet das Opium.

Der Milchsaft besteht aus Vesikeln und dem Zytosol.

Die Vesikel dienen nach dem heutigen Kenntnisstand als Speicherort für die Alkaloide. Sie können aus isoliertem Latex durch Zentrifugation bei 1000 x g vom Zytosol getrennt werden. Im resultierenden Pellet findet sich die Hauptmenge der Alkaloide (Fairbairn *et al.* 1974; Decker *et al.* 2000). Bei *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Vesikel Alkaloide aufnehmen können (Roberts *et al.* 1991) (Deus-Neumann & Zenk 1986).

Über die Entstehung der Vesikel gibt es unterschiedliche Theorien. Zum einen sollen sie sich aus der Hauptvakuole der Milchröhreninitialen ableiten (Griffing & Nessler 1989) zum anderen wird ihre Entwicklung ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum (ER) diskutiert (Nessler & Mahlberg 1977). Die Entwicklung aus dem ER konnte durch elektronenmikroskopische Studien belegt werden (Bock 1996). Unterstützt wird diese Theorie ebenso durch den Nachweis von Proteinen in der Vesikelfraktion, die Mitochondrien, Plastiden und dem ER zugeordnet werden (Decker 2001). An der Morphinbiosynthese beteiligte Enzyme konnten bisher in Latexvesikeln nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Vesikeln enthält das Zytosol die Hauptmenge der Latexproteine. Durch zweidimensionale Gelelektrophorese kombiniert mit Mikrosequenzierung konnte ein Teil dieser Proteine dem Primärstoffwechsel, Schutz- und regulatorischen Proteinen zugeordnet werden (Decker 2001).

Ob die Alkaloidbiosynthese im Latex stattfindet, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Frühe Studien zeigten, dass Tyrosin und L-DOPA durch Schlafmohn-Latex in Morphin eingebaut werden (Fairbairn *et al.* 1968; Fairbairn & Steele 1981). Andere Studien wiederum belegten, dass Latex zwar in der Lage ist, Tyrosin in Morphin einzubauen, jedoch nicht der Hauptsyntheseort der Alkaloide ist (Böhm *et al.* 1972).

Der Nachweis einzelner Enzyme der Alkaloidbiosynthese gelang erst in den letzten Jahren. Im Rahmen ihrer analytischen Studien von Latex charakterisierte Decker 76 stark exprimierte Proteine im Latexzytosol und konnte unter diesen die COR nachweisen (Decker *et al.* 2000). Außerdem konnte Decker eine pflanzliche *O*-Methyltransferase im Latex-Zytosol identifizieren, die später von Ounaroon als 7OMT charakterisiert wurde (Ounaroon *et al.* 2003). Die Thebain-Synthase, ein weiteres, für die Morphinsynthese spezifisches Enzym konnte durch einen Enzymtest im Latex nachgewiesen werden (Fisinger 1998). Grothe gelang dann im Rahmen seiner Dissertation eine partielle Reinigung und Anreicherung dieses Enzyms aus Latex (Grothe 2002). Diese Daten weisen zwar darauf hin, dass zum mindesten die letzten Schritten der Morphinbiosynthese im Latex selbst stattfinden, ob allerdings die

Anfangsabschnitte der Biosynthese oder die von (S)-Retikulin ausgehenden weiteren Biosynthesewege im umliegenden Gewebe oder im Latex stattfinden, geht aus den bisherigen Ergebnissen nicht hervor.

Latex enthält daneben eine Gruppe von sehr stark exprimierten Proteinen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 20 kDa. Sie stellen den Hauptanteil der Latexproteine und werden als „Major Latex Proteins“ (MLPs) bezeichnet (Nessler *et al.* 1985). Das Latex-spezifische Vorkommen dieser Proteine wurde durch RNA-Blots untersucht. Demnach zeigen MLPs die stärkste Expression in Latex gefolgt von Latex-reichem Gewebe. In Kalluskulturen und Zellsuspensionskulturen, die beide keinen Latex enthalten, konnte auch keine MLP-RNA Expression nachgewiesen werden (Nessler & Von der Haar 1990). MLPs basieren auf einer Genfamilie, die wiederum in zwei Subfamilien unterteilt werden kann (MLP15 und MLP22) (Nessler 1994).

Die Funktion der MLPs im Milchsaft ist unklar. Es wird eine Rolle in der Polymerisation und Agglutination des Milchsaftes vermutet (Nessler 1988). Außerdem wird aufgrund von Sequenzhomologien eine Zugehörigkeit zu der Gruppe der IPR-Proteine (intracellular pathogenesis-related proteins) vorgeschlagen (Osmark *et al.* 1998).

Junge, sich entwickelnde Milchröhren enthalten die gleiche Organellenausstattung wie die übrigen Zellen. Im Verlauf der Entwicklung werden diese Organellen abgebaut. Je nach Entwicklungsstand unterliegt die Organellenausstattung der Milchröhren starken Schwankungen (Dickenson & Fairbairn 1975). Ausdifferenzierte Milchröhren sind lückenlos mit Vesikeln angefüllt, das Zytoplasma ist auf kleine Randbereiche beschränkt (Bock 1996). Ob die Zellen daher noch in vollem Umfang enzymatisch aktiv sind, erscheint eher zweifelhaft.

Wie sich aus den bisherigen Ergebnissen zeigte, spielen in der Lokalisation der Biosynthese nicht nur die Milchröhren, sondern auch das die Milchröhren umgebende Phloem eine wichtige Rolle. Daher soll hier auf die verschiedenen Zelltypen und die Organisation des Phloems eingegangen werden.

1.4. Phloem

Im Phloem erfolgt der Massentransport vieler verschiedene Stoffwechselkomponenten über weitere Distanzen in der Pflanze. So werden im Phloem neben Assimilaten, Aminosäuren und Mineralstoffen auch Signalstoffe und Sekundärstoffe transportiert, die teilweise an der Abwehr von Schädlingen beteiligt sind (van Bel 2003; Dannenhoffer *et al.* 2001). Unter den Sekundärstoffen finden sich einige Alkaloide, die mit dem Phloem transportiert werden. Dazu gehören z.B. Aconitin und die Pyrrolizidinalkaloide (De Luca & St-Pierre 2000; Hartmann 1999). Allerdings werden auch Mikroorganismen transportiert. Vor allem Pflanzenviren haben sich an das Phloem-System der Pflanze angepasst und nutzen es zu ihrer Verbreitung (Nelson & van Bel 1998).

Dieser Transport wird von differenzierten Zellen, den Siebröhren übernommen. Diese Siebröhren gehen mit ihren Geleitzellen aus einer Siebröhrenmutterzelle durch inäquale Teilung hervor. Die größere Zelle differenziert sich zu einer Siebröhre. Die kleinere Zelle kann sich noch ein oder mehrmals zu den Geleitzellen teilen. Die Geleitzellen besitzen ein dichtes Zytoplasma mit zahlreichen Mitochondrien und sind ausgeprägt stoffwechselaktiv (Nultsch 1986; van Bel 1993; van Bel 2003). Siebelemente und Geleitzellen bilden dabei eine interaktive Einheit, die eine extreme Arbeitsteilung aufweist. Sie sind durch zahlreiche Plasmodesmata miteinander verbunden (van Bel & Knoblauch 2003).

Die Querwände zwischen den einzelnen Siebelementen sind durch Poren durchbrochen. Diese Querwände werden als Siebplatten bezeichnet, durch nachfolgendes Längenwachstum der Zellen stehen sie meist schräg. Sie werden durch ein spezielles Kohlenhydrat verstärkt, der Kallose. Dieser Kallosebelag kann durch Färbungen in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (siehe Kap. 2.2.4.6.).

Das Zytoplasma der Siebelemente erfährt im Laufe der Entwicklung eine starke Veränderung. In reifen Siebelementen ist nur noch ein schmales, wandständiges Plasma vorhanden. Der Zellkern und die üblichen Plastiden haben sich aufgelöst, Ribosomen sind nicht mehr vorhanden. Die Zahl der Mitochondrien hat abgenommen, außerdem sind sie verformt. Das Zytoplasma der Siebelemente weist noch ein endoplasmatisches Retikulum und phloem-spezifische Plastiden auf. Die zentrale Vakuole der Siebelemente füllt fast die gesamte Zelle aus (van Bel & Knoblauch 2003).

Die Transportrichtung des Phloems geht von Source- zu Sinkgeweben, also von stoffwechselaktivem Gewebe (zum Beispiel Blättern) zu Speichergeweben oder Geweben, die Stoffwechselprodukte benötigen (Wurzeln, Knospen und Samenanlagen). Daher kann der Transport nicht vom Transpirationsstrom profitieren, sondern muss durch eine Turgordifferenz ermöglicht werden. Aus diesem Grund verfügen Siebelemente über einen Rest an Zytoplasma und einer Zytoplasmamembran, die das Aufrechterhalten entsprechender osmotischer Bedingungen durch geeignete Pumpen, Kanäle und Transporter ermöglicht (van Bel *et al.* 2002).

Um bei Verwundung oder Schädlingsbefall einen größeren Verlust an Phloemsaft zu vermeiden, besitzen Siebelemente ein effektives System zum Verschluss der Siebplatten. Bei einem Druckabfall in der Siebzelle lösen sich die P-Proteine von der Siebröhrenwand und bleiben in den Siebporen hängen. Bei einem weiteren Druckabfall platzen die Plastiden und ihr Inhalt verschließt die Siebporen effektiv. Dies konnte durch *in vivo*-Studien mit einem Konfokalmikroskop gezeigt werden (Knoblauch & van Bel 1998). Ein endgültiger Verschluss der Siebporen erfolgt durch die Synthese von Kallose (Roberts & Oparka 2003). Dieser Verschlussmechanismus dient auch als effektive Barriere gegen eindringende Bakterien, Viren und Pilze (van Bel 2003).

Neben Siebröhren und Geleitzellen finden sich im Phloem auch parenchymatische Zellen. Üblicherweise sind Milchröhren neben parenchymatischen Zellen zu finden. Direkt neben Siebröhren konnten keine Milchröhren gefunden werden.

In elektronenmikroskopischen Studien konnte Bock keine Plasmodesmata von Milchröhren zu benachbarten Phloemzellen beobachten (Bock 1996). Eine symplastische Verbindung von Milchröhren zu Phloemzellen besteht daher vermutlich nicht.

1.6. Lokalisationsstudien von Alkaloidbiosynthesen

Wie in Kapitel 1.1 und 1.2. erwähnt, sind viele Alkaloide von großem pharmazeutischem Interesse. Die meisten von ihnen werden nach wie vor durch Extraktion aus der Pflanze gewonnen. Aufgrund ihrer meist komplizierten Stereochemie können nur wenige Alkaloide unter vertretbarem wirtschaftlichem Aufwand chemisch synthetisiert werden. Dazu gehört zum Beispiel das Papaverin (Kutchan 1998).

Einige der für die pharmazeutische Industrie wichtigsten Alkaloide werden nicht in Zellkulturen hergestellt.

Dazu gehören unter anderen die Benzylisochinolinalkaloide aus *P. somniferum*. Zwar konnten alle an der Morphinbiosynthese beteiligten Enzyme, für die ein Enzymtest etabliert wurde, in der Zellkultur nachgewiesen werden (Gerardy & Zenk 1993b; Lenz & Zenk 1995a und b; Wilhelm & Zenk 1997). Trotzdem akkumulieren diese Kulturen weder Morphin noch Codein (Kutchan 1998). Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Isolation der

COR aus Zellkulturen (Lenz & Zenk 1995b), da dieses Enzym den vorletzten Schritt der Morphinbiosynthese katalysiert.

So scheint die fehlende Morphin- und Codeinakkumulation nicht auf die Abwesenheit biosynthetischer Enzyme, sondern auf das Fehlen bestimmter zellulärer Strukturen zurückzugehen.

Weiter werden auch die Monoterpen-Indolalkaloide Vincristin und Vinblastin nicht in der Zellkultur synthetisiert (van der Heijden *et al.* 1989). Zellkulturen von *C. roseus* können zwar Catharanthin und Tabersonin akkumulieren, jedoch fehlt ihnen die Fähigkeit Vindolin zu bilden (De Luca *et al.* 1985). Catharanthin und Vindolin bilden die beiden Monomere der Dimere Vincristin und Vinblastin. Die Unfähigkeit von Zellkulturen, Vindolin herzustellen wird auf die Abwesenheit differenzierter Zelltypen in einer Suspensionskultur zurückgeführt. Allerdings fehlen auch mindestens drei biosynthetische Enzyme in der *C. roseus*-Zellkultur (De Luca *et al.* 1985; De Luca *et al.* 1987; Fahn *et al.* 1985; De Carolis *et al.* 1993).

Um die zellulären Voraussetzungen für die Alkaloidbiosynthese in der Pflanze näher abzuklären, wurden in letzter Zeit Lokalisationsstudien durchgeführt. Diese belegen häufig eine komplexe Kompartimentierung dieser Stoffwechselwege. Die Ergebnisse dieser Studien sollen kurz dargestellt werden.

Für die Biosynthese der Monoterpen-Indolalkaloide in *C. roseus* ergibt sich aus verschiedenen Studien eine Beteiligung mehrerer Gewebe.

Die Terpeneinheit der Monoterpen-Indolalkaloide, das Secologanin, wird durch den plastidären Methyl-Erithrol-Phosphat-Weg (MEP-Weg) gebildet (Contin *et al.* 1998; Veau *et al.* 2000). Burlat *et al.* (2004) konnte durch *in situ*-Hybridisierung zeigen, dass die Gene dreier Enzyme des MEP-Weges in *C. roseus* im internen Phloemparenchym überirdischer Pflanzenteile exprimiert werden. Ebenso konnte er das Transkript der Geraniol-10-Hydroxylase, einem Enzym auf dem Weg zu Secologanin im selben Gewebe nachweisen. Das Transkript der Secologaninsynthase, die den letzten Schritt der Secologaninsynthese katalysiert, konnte dagegen in der Epidermis sich entwickelnder Blätter lokalisiert werden. Immunlokalisationsstudien des Enzyms bestätigten dieses Ergebnis (Irmeler *et al.* 2000).

Diese Ergebnisse erfordern einen Transport eines Intermediats der Secologaninsynthese vom internen Phloem zur Epidermis.

Die Indoleinheit dieser Alkaloide wird, wie bereits erwähnt, durch Decarboxylierung der Aminosäure Tryptophan gebildet. Durch Immunlokalisation konnten die beiden Enzyme Tryptophan-Decarboxylase (TDC) und STR, die zu Strictosidin, dem zentralen Intermediat der Monoterpen-Indolalkaloidbiosynthese führen, in Epidermiszellen des Stängels, der Blätter und der Blütenknospe lokalisiert werden. In der Wurzel konnten beide Enzyme im Apikalmeristem der Wurzelspitze nachgewiesen werden

Die beiden Alkaloide Vindolin und Catharanthin bilden die Monomere der dimeren Monoterpen-Indolalkaloide Vincristin und Vinblastin. Vindolin, Vincristin und Vinblastin konnten in *C. roseus* im Stängel und in Blättern nachgewiesen werden, sie akkumulieren in speziellen, latex-gefüllten Zellen, sogenannten Idioblasten. Dagegen kommt Catharanthin in der gesamten Pflanze vor (Westekemper *et al.* 1980; Deus-Neumann *et al.* 1987).

Zwei Enzyme, die an den letzten Schritten der Vindolinbiosynthese beteiligt sind, Desacetoxyvindolin-4-Hydroxylase und Desacetylvindolin-4-O-Acetyltransferase, konnten nur in Milchröhrengliedern und Idioblasten im Stängel, in Blättern und in der Knospe lokalisiert werden. Durch *in situ*-Hybridisierungen konnte die Expression der mRNAs in denselben Zellen bestätigt werden (St-Pierre *et al.* 1999).

Zusammengefasst machen die einzelnen Ergebnisse deutlich, dass die Kompartimentierung der Vindolinbiosynthese einen Transport mehrerer Intermediate erfordert. Nach diesen Ergebnissen findet die Synthese der Terpeneinheit zunächst im internen Phloem, weitere

Schritte in der Epidermis oberirdischer Pflanzenteile statt. Die Kondensation der Terpen- und Indoleinheit ist auf die Epidermis beschränkt, während die letzten Schritte der Vindolinbiosynthese bereits in den Idioblasten, dem Akkumulationsort der Monoterpen-Indolalkaloide, stattfinden.

Weitere Lokalisationsstudien wurden für die Biosynthese der Tropanalkaloide und der damit verwandten Nikotinbiosynthese durchgeführt. Wie durch Pfropfexperimente gezeigt werden konnte, werden die Tropanalkaloide und Nikotin in der Wurzel synthetisiert und anschließend in die überirdischen Teile der Pflanze transportiert (Hashimoto *et al.* 1991).

Für die Tropanalkaloidbiosynthese in *H. niger* liegen verschieden Lokalisationsstudien vor, die ebenfalls eine Kompartimentierung der Biosynthese belegen. Für die Putrescin-*N*-Methyltransferase (PMT), am Beginn der Biosynthese, gibt es allerdings nur Studien mit *A. belladonna*. So konnte durch Promotor-GUS Fusion die Aktivität des Putrescin-*N*-Methyltransferase (PMT)-Promotors im Perizykel der Wurzeln dieser Pflanze nachgewiesen werden (Suzuki *et al.* 1999). Ob die Aktivität dieses Promotors Spezies-spezifisch ist, oder ob sich das Ergebnis auf *H. niger* übertragen lässt, ist nicht geklärt.

Tropinonreduktase I und Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase (H6H), die an der Scopolaminbiosynthese beteiligt sind, sowie Tropinonreduktase II, die an der Biosynthese von Calistegin beteiligt ist, wurden in *H. niger*-Wurzeln durch Immunlokalisation nachgewiesen (Hashimoto *et al.* 1991; Nakajima & Hashimoto 1999). Dabei wurde gezeigt, dass die beiden Tropinonreduktasen in der Endodermis und in der äußeren Rinde lokalisiert sind, während die H6H im Perizykel nachgewiesen wurde.

Diese Ergebnisse lassen auf einen Transport von Intermediaten von der Endodermis ins Perizykel schließen. Wird die Lokalisation des PMT-Promotors aus *A. belladonna* mit einbezogen, wäre ein weiterer Transport zwischen Perizykel und Endodermis erforderlich.

Zwei wahrscheinlich an der Nikotinbiosynthese beteiligten Gene, die für Isoflavononreduktase-ähnliche Enzyme kodieren, werden in der Endodermis und Rindenzellen der Wurzelspitzen von Tabakpflanzen exprimiert, ebenso das Gen der Putrescin-*N*-Methyltransferase. Bei differenzierten Wurzeln verschob sich dieses Expressionsmuster hin zu äußeren Rindenzellen und dem Xylemparenchym (Shoji *et al.* 2000; Shoji *et al.* 2002). In *N. sylvestris* verschiebt sich demnach die gewebespezifische Lokalisation der Nikotinbiosynthese im Laufe der Entwicklung

Eine weitere Enzymlokalisation liegt für die Pyrrolizidinalkaloidbiosynthese vor. Durch Studien mit radioaktiv-markierten Ausgangsverbindungen der Pyrrolizidinalkaloide in *Senecio* spp. konnte gezeigt werden, dass diese in der Wurzel synthetisiert werden und über das Phloem in die oberirdischen Teile der Pflanze transportiert werden (Hartmann *et al.* 1989). Das erste Enzym dieser Biosynthese in *Senecio*, Homospermidinsynthase, konnte in Endodermiszellen und angrenzenden parenchymatischen Rindenzellen, die gegenüber von Phloemgewebe der Wurzel liegen, immunologisch lokalisiert werden (Moll *et al.* 2002).

Auch für die Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* gibt es Anhaltspunkte einer Kompartimentierung. Darauf weisen Ergebnisse der Alkaloidmessungen und Enzymaktivitätsbestimmungen hin.

Morphinalkaloide akkumulieren wie bereits erwähnt in Latexvesikeln. Jedoch gelang nicht für alle an der Biosynthese beteiligten und bekannten Enzyme ein Nachweis der Enzymaktivität im Latex. So konnte eine Aktivität der 4'OMT, der Salutaridin-Synthase und der Salutaridin-Reduktase im Latex nicht nachgewiesen werden (Fisinger 1998; Gerardy & Zenk 1993a und b). Ebenso konnte die SalAT bei den Proteinanalysen von Latexserum- und Vesikeln nicht detektiert werden (Decker 2001). Dagegen wurden erste Sequenzinformationen der 7OMT

durch Analyse des Latex gewonnen. Außerdem war die teilweise Anreicherung der Thebain-Synthase aus dem Latexserum möglich (Grothe 2002). Die COR, die den vorletzten Schritt der Morphinbiosynthese katalysiert, wurde ebenfalls im Latexserum nachgewiesen (Decker *et al.* 2000).

Die Ergebnisse lassen auf eine Aufteilung der Biosynthese zwischen umliegendem Phloemgewebe und den Milchröhren schließen. Enzyme zu Beginn der Biosynthese können in der Mehrheit nicht im Latex nachgewiesen werden, dagegen konnten Enzyme der letzten Schritte der Morphinbiosynthese im Latex detektiert werden.

Ergänzt wird die Vermutung, dass die Biosynthese zwischen umliegendem Phloem und Milchröhren aufgeteilt ist durch RNA-Blot-Analysen. Danach konnte *cyp80b1*-Transkript vor allem in Wurzeln und im Stängel, weniger in der Kapsel und Knospe nachgewiesen werden. Dagegen ist die Expression des *cor*-Transkripts in der Kapsel wesentlich höher als in der Wurzel (Huang & Kutchan 2000). Die Expression der *cor*-Transkripts korreliert mit Latexreichem Gewebe. Dieser Zusammenhang existiert nicht für *cyp80b1*, das für ein Enzym am Anfang der Biosynthese kodiert.

Lokalisationsstudien liegen bisher nur für die Tyrosin/Dopa-Decarboxylase (TYDC) vor. In *P. somniferum* wird dieses Enzym durch eine Genfamilie kodiert, die in zwei Gruppen eingeteilt werden kann: *tydc1* und *tydc2* (Facchini & De Luca 1994). Durch RNA-Blots konnte gezeigt werden, dass das *tydc1*-Transkript vor allem in Wurzeln und das *tydc2*-Transkript vor allem im Stängel und in der Wurzel vorkommt (Facchini & De Luca 1995). Durch *in situ*-Hybridisierung konnte das *tydc*-Transkript im Metaphloem und Protoxylem der Leitbündel in den oberirdischen Teilen der Pflanze lokalisiert werden. Obwohl die Produkte der Tyrosin/Dopa-Decarboxylase Tyramin bzw. Dopamin nicht ausschließlich in die Alkaloidbiosynthese eingehen, deckt sich das Expressionsmuster mit dem Auftreten der Biosynthese in Leitgeweben.

Für die Benzophenanthridinalkaloid-Biosynthese gibt es ebenfalls Hinweise einer gewebespezifischen Lokalisation.

So konnte Sanguinarin in *P. somniferum* im ganzen Keimling nachgewiesen werden, während es in ausgereiften Pflanzen in Wurzeln akkumuliert (Facchini *et al.* 1996). Im Latex dagegen finden sich keine Benzophenanthridine (Cline & Coscia 1989). Die Tatsache, dass differenzierte Milchröhren für die Benzophenanthridinalkaloid-Biosynthese keine Rolle spielen, zeigt sich auch darin, dass Sanguinarin in der Zellsuspensionskultur akkumuliert und durch Zugabe von Elicitoren induziert werden kann (Eilert *et al.* 1985).

Detailliertere Untersuchungen liegen auch für das Berberinbrückenenzym, dem ersten Enzym auf dem Biosyntheseweg von (*S*)-Retikulin zu Sanguinarin vor. Das *bbe*-Transkript konnte in Wurzeln und im Stängel, sowie der Blattmittelrippe nachgewiesen werden (Facchini *et al.* 1996; Huang & Kutchan 2000). Es akkumuliert in subzellulären Partikeln mit einer Dichte von $\rho = 1,14$ g/ml (Amann *et al.* 1986). Bock konnte durch Immunogoldmarkierung dieses Enzym in globulären Partikeln entlang des Tonoplasten in Zellen des Rindenparenchyms und der Epidermis von jungen Sprossabschnitten und dem Hypokotyl nachweisen (Bock *et al.* 2002). Dies zeigt, dass Benzophenanthridine in anderen Zellen wie Morphinalkaloide synthetisiert und gespeichert werden.

1.7. Zielstellung der Arbeit

Mit den Hinweisen auf eine mögliche Kompartimentierung der Morphinbiosynthese im Schlafmohn stellte sich die Aufgabe, die zell- und gewebespezifische Lokalisation der Biosynthese aufzuklären. Im Rahmen früherer Forschungsarbeiten waren Gene von biosynthetischen Enzymen entlang der Alkaloidbiosynthese kloniert worden.

Durch die Entwicklung von His-Tag-Vektoren und der damit verbundenen einfachen Aufreinigung heterolog exprimierter Enzyme standen molekularbiologische Techniken zur Verfügung, die die relativ einfache Herstellung von Proteinen im Milligramm-Maßstab möglich machten.

Diese Techniken sollten für die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen die bekannten biosynthetischen Enzyme genutzt werden. Mit diesen Antikörpern sollte durch Immunofluoreszenz-Mikroskopie ein Überblick über die Lokalisation der Alkaloidbiosynthese im Schlafmohn entstehen.

Als weiterer Teil dieser Arbeit sollte die Lokalisation dieser Enzyme mit der Expression ihrer mRNA im Gewebe verglichen werden. Dazu musste die *in situ*-Hybridisierung für Mohnngewebe modifiziert und mit den bekannten biosynthetischen Genen durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzen

P. somniferum L. wurde auf dem institutseigenen Freilandbeet angebaut. Die Aussaat erfolgte in 14tägigen Abständen ab April. Da die Witterung in den Sommern 2002 bzw. 2003 jedoch sehr heiß war, konnte beim Blühzeitpunkt im Juni bis Anfang Juli nur wenig zeitliche Versetzung erreicht werden. So stand ab etwa Mitte Juni bis Mitte/Ende Juli blühendes Pflanzenmaterial zu Verfügung. Ganzjährig wurden Pflanzen im Gewächshaus bei 24 °C und 50% Luftfeuchtigkeit angezogen. Die Belichtungsdauer betrug 18 h täglich. Für die Einbettungen und Immunmarkierungen wurden jedoch ausschließlich Freilandpflanzen verwendet.

2.1.2. Bakterienstämme

Im Folgenden sind die verwendeten *E. coli* Bakterienstämme aufgelistet:

Stämme für allgemeine Klonierungsarbeiten

<i>E. coli</i> DH5α	Clontech	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>thi-1</i> , Δ(<i>lacZYA-argFV169</i>)
<i>E. coli</i> Top 10 F [']	Invitrogen	<i>mcrA</i> , Δ(<i>mcrBC-hsdRMS-mrr</i>), <i>end A1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>araD139</i> , F(<i>lacI^q</i> , Tn10(Tet ^r)), <i>galU</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galK</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697
<i>E. coli</i> XL1 MRF ['] Blue	Stratagene	Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsc</i> (SMR- <i>mrr</i>)173, <i>end(A)</i> , <i>supE44 thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ['] <i>proAB</i> , <i>lacI^qZ</i> ΔM15Tn10(Kan ^r)]

Expressionsstämme

<i>E. coli</i> B121(DE3)	Stratagene	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> λ(DE3)
<i>E. coli</i> B121(DE3) LysS	Stratagene	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> λ(DE3), [pLysS Cam ^r]
<i>E. coli</i> M 15	Qiagen	<i>nal^S</i> , <i>str^S</i> , <i>rif^S</i> , <i>thi⁻</i> , <i>lac⁻</i> , <i>ara⁺</i> , <i>gal⁺</i> , <i>mtl⁻</i> , <i>recA⁺</i> , <i>uvr⁺</i> , <i>lon⁺</i>

2.1.3. Medien

Flüssigmedien: Luria-Bertani Medium, SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989). Agarplatten wurden unter Verwendung von 1,4% Bacto Agar hergestellt.

Damit auf Antibiotikaresistenz selektiert werden konnte, wurde den Medien nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Antibiotikallösungen bis zu einer Endkonzentration von 50 mg/l zugesetzt. Je nach Resistenzgen der Plasmide wurden Ampicillin bzw. Kanamycin verwendet, beides von Sigma.

2.1.4. Vektoren

pGEM-T-easy: (Promega)	linearisierter Klonierungsvektor 3,0 kb 3'-terminaler Thymidinüberhang für Taq DNA-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente, Ampicillin-Resistenzgen T7, SP6 RNA-Polymerase-Promotoren
pCRT7/NT-TOPO: (Invitrogen)	Expressionsvektor 2,8 kb 3'-terminaler Thymidinüberhang mit kovalent gebundener Topoisomerase T7 Promotor N-terminaler His-Tag
pHIS8-3: (Jez <i>et al.</i> 2000)	Expressionsvektor; modifizierter pET 28a-Vektor N-terminaler His-Tag T7 Promotor Kanamycinresistenz
pZ11: (invitrogen)	Klonierungsvektor 4,3 kb T7, SP6 Promotor Ampicillinresistenz
pSE280: (Invitrogen)	Klonierungsvektor 3,9 kb trc-Promotor Ampicillinresistenz
pQE 31: (Qiagen)	Expressionsvektor 3,4 kb T5 Promotor Ampicillinresistenz
pPOP 22: (= pPLEX X002)	binärer Vektor S4S4 Promotor (Frick <i>et al.</i> im Druck)

2.1.5. Oligonukleotide

Oligonukleotide, die als Primer für die Polymerasekettenreaktion eingesetzt wurden, wurden von der Fa. MWG Biotech synthetisiert.

2.1.6. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden in der gewünschten Reinheit von den Firmen Roth, Sigma, Fluka und Merck bezogen.

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden von den Firmen Life Technologies, Promega und New England Biolabs bezogen.

DNA-Längenstandards

1 kb Marker

New England Biolabs

100 bp Marker

Life Technologies und New England Biolabs

Proteinstandards

14-116 kDa

Fermentas

19-119 kDa, prestained

Fermentas

2.1.7. Spezielle Chemikalien für die Zytologie

PEG 1500

Merck

PEG 4000

Merck

PEG 6000

Merck

Rotihistol zum Entwachsen

Roth

Roticlear zum Deparaffinisieren der Schnitte

Roth

Paraplast (Paraffin)

Sigma

Poly-L-Lysinlösung

Sigma

Paraformaldehyd

Sigma

Glutaraldehyd

Sigma

Citifluor/Glycerin bzw. /PBS

Plano

2.1.7.1. Farbstoffe

Anillinblau

Riedel de Haën

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)

Molecular Probes

2.1.8. Antikörper

2.1.8.1. Primäre Antikörper

Antikörper gegen die durch Überexpression hergestellten Proteine wurden von der Fa. Biogenes (Berlin) nach deren Protokoll hergestellt (siehe Methoden).

Als weiterer primärer Antikörper wurde ein monoklonarer Antikörper gegen (1→3)- β -Glucan (Callose) der Fa. Biosupplies (Australien) verwendet (Meikle *et al.* 1994 und Bird *et al.* 2003).

2.1.8.2. Sekundäre Antikörper

Gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase

Goat anti-rabbit IgG (whole molecule)

Sigma

Goat anti-guinea-pig IgG (whole molecule)	Sigma
Anti-Digoxigenin Fab-fragment	Roche
Anti-Fluorescein Fab-fragment	Roche
Gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoffen	
Alexa Fluor® 350 Ziege gegen Maus-IgG Abs. 347 nm; Fluoreszenz 440 nm	Molecular Probes
Alexa Fluor® 568 Ziege gegen Meerschweinchen-IgG Abs. 578 nm; Fluoreszenz 603 nm	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488 Ziege gegen Kaninchen-IgG Abs. 495 nm; Fluoreszenz 519 nm	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488 Ziege gegen Meerschweinchen-IgG Abs. 495 nm; Fluoreszenz 519 nm	Molecular Probes

2.1.9. Geräte

2.1.9.1. Zentrifugen

Sorvall RC-26 Plus	Du Pont
Sorvall RC-28S	Du Pont
Zent. 4K18	Sigma
Zent. 5810R	Eppendorf
Zent. 5414D	Eppendorf

2.1.9.2. Mikroskope, Kameras und Microtom

Mikroskop: Axioskop	Zeiss, Jena
Kameras: Fluoreszenz: CCD-Kamera	Sony
Hellfeld: Videokamera HZ-300	Fuji, Japan
Microtom:	Leica, Wetzlar

2.1.9.3. PCR-Geräte

Gene Amp PCR System 9700	PE Applied Biosystems
PTC-200 MJ research	Peltier

2.1.9.4. Sonstige Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer
 Spectralphotometer Ultrospec 3000
 pH-Meter inoLab pH
 Gel Doc 1000

Applied Biosystems
 Amersham Pharmacia Biotech
 Wissenschaftl. Techn. Werkstätte

2.2. Methoden

2.2.1. DNA

2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit einem Kit der Fa. Qiagen. Dazu wurden die im QIAprep® SpinMiniprep Kit enthaltenen Puffer verwendet. Im Prinzip erfolgt dabei eine alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender Bindung an eine Silikatmembran in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Nach zwei Waschschrritten wird die DNA von der Membran eluiert.

2.2.1.2. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Um DNA an geeigneten Schnittstellen mit Restriktionsenzymen zu schneiden, wurde pro µg DNA ca. 1 Unit Restriktionsenzym verwendet. Um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen, wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet und die Reaktion bei den für das jeweilige Enzym angegebenen Bedingungen 1-12 Stunden inkubiert.

2.2.1.3. Ligation von DNA

Mit Ligase:

Die T4-DNA-Ligase katalysiert in doppelsträngigen DNA-Molekülen die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyenden. Das Enzym wurde von Promega bezogen.

In einem Standard-Ligationansatz betrug das molare Verhältnis Vektor:Insert 1:3 und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} \times \text{molares Verhältnis Insert : Vektor} = \text{ng Insert}$$

Der Reaktionsansatz wurde in der Regel über Nacht bei 16°C inkubiert. Die erhaltenen Plasmide wurden anschließend in kompetente Zellen (2.2.1.4) transformiert.

Vektor mit Topoisomerase:

Der pCR T7/NT-TopoVektor nutzt die Ligase-Aktivität einer Topoisomerase I. Topoisomerasen katalysieren die Überführung von DNA-Topoisomeren ineinander, wobei sie während der Reaktion kovalent am 5'-Phosphatende gebunden werden. Der Ringschluss findet dann durch nukleophilen Angriff des 3'-OH-Endes statt.

Der Topoisomerase-Vektor besteht aus einem Vektor-Topoisomerase-Komplex mit einem Thymidinüberhang am 3' Ende zur Klonierung von *Taq*-amplifizierten PCR-Produkten.

Die PCR besteht aus drei sich wiederholenden Einzelschritten: Hitzedenaturierung bei 94 °C (30 sec), Anlagerung der Primer bei 45-60 °C (30 sec) und Synthese der DNA bei 72 °C (1-2 min). Den sich wiederholenden Schritten ging eine einmalige Denaturierung der Matrizen-DNA von 3 min bei 94 °C voraus. Abgeschlossen wurde die PCR durch eine DNA-Polymerisation von 5 min bei 72 °C.

Eine Kontrolle der PCR-Ansätze enthielt steriles Wasser anstelle der DNA.

2.2.1.8. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit dem von Applied Biosystems entwickelten BigDye[®] cycle sequencing system. Dieses beruht auf der Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide (Sanger *et al.* 1977). Die 5'-Enden der Didesoxynukleotide sind jedoch nicht radioaktiv, sondern mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies ermöglicht eine Sequenzierung in einem Ansatz. Nach der Amplifizierung werden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente durch Kapillarelektrophorese getrennt. Die Detektion erfolgt nach Aktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser, und anhand der Farben des emittierten Lichts wird die Nukleotidsequenz festgelegt. Mit diesem System sind Sequenzierungen bis 400 bp möglich.

2.2.2. RNA

2.2.2.1. RNA Gele

Zur Analyse von RNA-Proben wurden 1,2%ige Formaldehyd-Agarosegele verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem RNeasy Midi/Maxi Handbook 06/2001 von Qiagen. Diese Vorschrift beruht auf dem herkömmlichen Protokoll von Sambrook *et al.* (1989), verwendet jedoch einen konzentrierten Ladepuffer.

10x FA Gel-Puffer:	200 mM 3-[<i>N</i> -morpholino]propansulfonsäure (MOPS) 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH
1x FA Gellaufpuffer:	100 ml 10x FA Gel-Puffer 20 ml 37% Formaldehyd 880 ml RNase-freies Wasser
5x RNA Ladepuffer:	16 µl gesättigte wässrige Bromphenolblaulösung 80 µl 500 mM EDTA, pH 8,0 720 µl 37% Formaldehyd 2 ml Glyzerin 3084 µl Formamid 4 ml 10x FA Gel Puffer Mit RNase-freiem Wasser ad 10 ml

2.2.3. Proteine

2.2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Diese Methode beruht auf einer durch Proteinbindung bewirkten Absorptionsverschiebung der Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit Rinderserumalbumin (Fraktion V, Roth) erstellten Eichkurve ermittelt.

2.2.3.2. Proteinexpression in Bakterien

Die Gene der gewünschten Proteine wurden in verschiedene kommerziell erhältliche Expressionsvektoren kloniert. Allen gemeinsam war, dass sie eine Sequenz für sechs bzw. acht (pHIS8) Histidine enthielten, die *N*-terminal an das Protein angehängt wurden. Dies ermöglichte die Reinigung der Proteine mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Porath *et al.* 1975). Dazu wurde Talon-Harz (Clontech) verwendet, das einen Kobalt-Chelatkomplex trägt.

Zur Proteinexpression wurde 1 Liter LB-Medium (mit Antibiotika, je nach Resistenzgen des Vektors), mit einer 100 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C mit 180 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm, wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 1 mmol/l IPTG (Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid) gestartet. Die Kulturen wurden bei 28 °C mindestens 4 Stunden, jedoch meist über Nacht, geschüttelt und anschließend durch Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 6000 g) vom Medium getrennt. Die Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen (2x 30 sec, 70% Intensität im Pulsmodus). Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert (15 min, 5 °C, 10000 g). Der Überstand wurde mit dem in Bindepuffer äquilibrierten Talon-Harz versetzt und 20 min bei 4°C geschüttelt. Die ungebundenen Proteine wurden durch Zentrifugieren (5 min, 4 °C, 700 g) entfernt und das Talon-Harz zweimal mit Bindepuffer gewaschen. Daraufhin wurde das Harz in eine Einwegsäule (Clontech) überführt und mit 5 Säulenvolumina Bindepuffer gewaschen. Ein weiterer Waschschrift wurde mit 10 mM Imidazol im Bindepuffer durchgeführt. Das rekombinante Protein wurde mit Elutionspuffer in 2 ml-Fractionen von der Säule eluiert. Bei problematischen Reinigungen wurde die Imidazolkonzentration von einer Fraktion zur nächsten in 50 mmol-Schritten von 50 bis 250 mmol/l erhöht.

Lysepuffer: wie Bindepuffer
+1% (v/v) Tween 20
+750 mg/ml Lysozym

Bindepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,0
500 mM NaCl
2,5 mM Imidazol
10% (v/v) Glycerin
10 mM 2-Mercaptoethanol

Elutionspuffer: Bindepuffer
statt 2,5 mM, 250 mM Imidazol

Gelladepuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM 2-Mercaptoethanol 5 mM EDTA 10% (v/v) Glyzerin 1% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Elektodenpuffer:	500 mM Glycin 50 mM Tris 0,1% (w/v) SDS
Coomassie -Färbelösung:	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250 Gelöst in
Entfärbelösung:	300 ml Methanol 100 ml Essigsäure 700 ml Wasser

2.2.3.6. ElektrobloTTing von SDS-Gelen

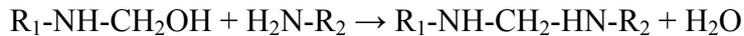
Der Transfer der im SDS-Gel getrennten Proteine auf eine Membran erfolgte über einen „Semidry-Blot“. Dieses Verfahren wurde zuerst von Kyhse-Andersen (1984) beschrieben und nutzt als Pufferreservoir lediglich die in getränkten Filterpapieren vorhandene Flüssigkeitsmenge.

Zunächst wurden zwei dicke Filterpapierstücke, die um einige Millimeter größer waren als das Polyacrylamidgel, in Blottingpuffer getränkt und blasenfrei auf die Graphitkathode aufgelegt. Es folgte die in Blottingpuffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran (Sartorius). Danach wurde das Polyacrylamidgel blasenfrei aufgelegt und wiederum mit zwei getränkten Filterpapierstücken bedeckt. Überschüssiger Puffer wurde an den Rändern abgewischt und die Anordnungen mit der Anodenplatte bedeckt. Die Apparatur wurde an die Stromquelle angeschlossen und 1h 35 min mit 0,8 mA/cm² geblottet. Um die benötigte Transferzeit genau zu bestimmen, wurden die SDS-Gele nach dem Blotten mit Coomassie gefärbt um eventuell noch vorhandene Proteine im Gel festzustellen.

Als günstig erwies sich auch die Verwendung eines vorgefärbten Markers (Fermentas). Wurde ein nicht gefärbter Marker mitgeführt, wurde der Proteinblot anschließend mit FastGreen 5 min gefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Markerbanden wurden mit Bleistift markiert.

Blottingpuffer:	48 mM Tris 39 mM Glycin 20% (v/v) Methanol 0,037% (w/v) SDS pH 9,1
FastGreen-Färbelösung:	1% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) FastGreen

Weitere Vernetzung:
Kondensation:



(Reaktionsschema nach Nagl 1981)

Für die Immunolokalisation wurde meist Paraformaldehyd verwendet, das in Lösung zu Formaldehyd zerfällt. Zur besseren Fixierung von Latex in den Milchröhren wurde teilweise noch zusätzlich Glutaraldehyd (0,3%) verwendet. Dieses Dialdehyd führt zu einer stärkeren Quervernetzung und damit einer stärkeren Fixierung. Eine stärkere Fixierung führt aber auch zu einem steigenden Verlust der Antigenizität der fixierten Proteine. Daher wurde meist auf die stärkere Fixierung verzichtet. Dadurch sind in den meisten Milchröhren nur noch Reste von Latex zu sehen.

Die Fixierung wurde wie folgt durchgeführt:

Frisches Pflanzenmaterial wurde in ca. 2x3 mm große Stücke geteilt und sofort in kleine Deckelgläschen mit Fixierungslösung gegeben. (3% Paraformaldehyd in PBS + 0,1% (v/v) Triton X-100). Die Fixierung erfolgt zunächst ½ Stunde bei vermindertem Druck, um in Interzellularen befindliche Luft zum Entweichen zu bringen, und wird anschließend 1 ½ -2 Stunden bei normalem Druck und Raumtemperatur fortgesetzt.

Danach wurden die Stücke 2x15 min mit PBS gewaschen und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (je 30 min 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, und 100% Ethanol in PBS). Der 100%ige Ethanol wurde noch einmal gewechselt und 30 min bei 55 °C im Trockenschrank inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 55°C durchgeführt.

Infiltration mit Polyethylenglykol:

Die einzubettenden Gewebestücke wurden nun nach und nach mit steigenden Konzentrationen an Polyethylenglykol (PEG) versetzt. PEG ist in diesem Fall ein Gemisch von PEG 1500 und PEG 4000 im Verhältnis 2:1. Dieses wird vor Gebrauch erwärmt und gründlich gemischt.

PEG : Ethanol = 1:3	1 h bei 55 °C
PEG : Ethanol = 1:1	1 h bei 55 °C
PEG : Ethanol = 3:1	1 ½ h bei 55 °C
Reines PEG	2 h bei 55 °C

Danach werden die Gewebestücke in Einbettungsformen überführt und in PEG eingebettet. Dazu muss das PEG-Gemisch zunächst erwärmt und beim Abkühlen gut gerührt werden. Erst kurz vor dem Wiedererstarren sollte es zur Einbettung verwendet werden, da sich die beiden PEG-Arten sonst beim Festwerden in den Einbettungsformen trennen und vorgegebene Bruchstellen ergeben, die beim Schneiden Schwierigkeiten bereiten.

Die abgekühlten Blöckchen wurden aus den Einbettungsformen gelöst und in beschriftete Plastiktütchen mit Verschluss verpackt. Sie sind im Kühlschrank längere Zeit haltbar, müssen aber sehr sorgfältig vor Feuchtigkeit geschützt werden, da PEG Feuchtigkeit zieht.

Da feine Wurzeln und vergleichbar feines Gewebe nach der Einbettung im PEG-Blöckchen schlecht wieder aufzufinden sind, wurden diese Gewebestückchen mit Eosin orange-rosa angefärbt werden. Dazu wurde in der Alkoholreihe an entsprechender Stelle ein Färbeschritt mit 0,1% Eosin in 90% Ethanol 30 min lang durchgeführt.

Phosphate buffered saline (PBS):	135 mM NaCl
	3 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	pH 7,0-7,2

2.2.4.2. Einbettung in Paraffin

Für die Einbettung in Paraffin (Paraplast, Sigma) konnten etwas größere Gewebestücke (3x3 mm) gewählt werden. Nach der Fixierung (siehe oben) wurde ebenfalls mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, jedoch in einstündigen Schritten.

Danach wurden die Gewebestücke in Rotihistol (Lösungsmittel mit Orangerterpenen als Ersatz für Xylol) überführt:

Ethanol:Rotihistol = 3:1	60 min
Ethanol:Rotihistol = 1:1	60 min
Ethanol:Rotihistol = 1:3	60 min
Reines Rotihistol	30 min
Reines Rotihistol	30 min bei 60 °C

Danach erfolgt die langsame Infiltration von Paraplast bei 60 °C. Dazu wurde der Füllstand in den Gläschen markiert und alle 15 min Paraplast zugetropft. Beginnend mit einem Tropfen, wurde die Anzahl der Tropfen jeweils um einen Tropfen gesteigert, bis sich der Füllstand im Gläschen verdoppelt hatte. Dann wurde die Flüssigkeit bis zur Markierung wieder abgenommen und der Vorgang wiederholt.

Nachdem das doppelte Flüssigkeitsvolumen wieder erreicht worden war, wurde die gesamte Flüssigkeit abgenommen und durch Paraplast ersetzt. Innerhalb der folgenden 24h wurde das Paraplast noch zweimal ersetzt. Die Gläschen wurden offen gelassen, um den Rest Rotihistol zu verdampfen.

Danach wurden die Gewebestückchen in die Einbettungsformen überführt und in Paraplast eingebettet. Die erkalteten Einbettungen konnten bei 4 °C gelagert werden.

2.2.4.3. Poly-L-Lysinbeschichtung von Objektträgern

Um eine bessere Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu erreichen, wurden diese mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dabei wird die Oberfläche der Objektträger durch die kationischen Polylysinmoleküle positiv aufgeladen. Dies führt zu einer verbesserten Haftung der zumeist negativ geladenen, proteinreichen Schnittflächen (Mazia *et al.* 1975).

Zunächst wurden die Objektträger mit einem Glasstift nummeriert und die Oberseite eindeutig markiert. Danach wurden sie zur Reinigung 30 min in 96% Ethanol gestellt und anschließend vorsichtig mit einem Zellstofftuch getrocknet. 60 µl Poly-L-Lysinlösung (Sigma) werden auf einen Objektträger pipettiert und ein zweiter umgekehrt so auf dem ersten platziert, dass sich die Poly-L-Lysinlösung blasenfrei zwischen den beiden Oberseiten der Objektträger befindet. Die beschrifteten Bereiche bleiben dabei frei. Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer 30 min inkubiert und anschließend in einer Petrischale mit destilliertem Wasser vorsichtig voneinander getrennt. Sie werden noch 3 x 5 min mit destilliertem Wasser gespült und danach mindestens 2 h an der Luft getrocknet.

Bei Raumtemperatur sind beschichtete Objektträger 2 Tage haltbar, bei – 20 °C mindestens 2 Monate. Vor der Verwendung sollten sie dann aber 30 min bei 40 °C getrocknet werden.

2.2.4.4. Immunmarkierung von Polyethylenglykolschnitten

Die Methode der Immunmarkierung in zwei Schritten mit primärem und sekundärem Antikörper auf Mikroskopschnitten wird beschrieben bei Schooneveld & Veenstra (1988). Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern wird seit dem Beginn der Immunocytochemie beschrieben (Coons & Kaplan 1950).

Durchführung:

Polyethylenglykoleinbettungen wurden mit dem Rotationsmikrotom mit einer Schnittstärke von 2-3 μm geschnitten. Dabei war zu beachten, dass sich PEG-Einbettungen am besten in feucht-warmer Umgebung schneiden lassen. Dazu wurde meist die Auffangschale der Microtoms mit heißem Wasser gefüllt und ein heißes Wasserbad neben dem Arbeitsplatz aufgestellt. Auch der Versuch, die Zimmertemperatur mit einer Rotlichtlampe zu erhöhen brachte gewisse Erfolge. Nichts desto Trotz entstanden die besten Längsschnitte bei hochsommerlicher Gewitterstimmung.

Die entstehenden Schnittbänder wurden in kleine Stücke geteilt und mit einem an einer Metallöse hängenden PEG -Tropfen (40% PEG 6000 in PBS) aufgenommen. Dieser Tropfen wurde dann auf einen beschichteten Objektträger aufgetupft. Genügend belegte Objektträger wurden 10 min in PBS gestellt, um das PEG aus den Schnitten zu lösen. Anschließend wurden Aldehydgruppen 5 min mit NH_4Cl blockiert und die Objektträger 5 min mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 2-5% Bovine serum albumin (BSA, Roth) in PBS 30 min blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Dabei wurden pro Objektträger 100 μl Antikörperlösung aufgegeben und mit einem Deckglas mit Spacer bedeckt. Die Antikörperverdünnung musste dabei für jeden Antikörper empirisch festgestellt werden, in der Regel betrug sie 1:500- 1:1000 in 3-5% BSA in PBS. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit 0,3-0,5% BSA in PBS viermal 10 min gewaschen und mit dem sekundären Antikörper inkubiert (fluoreszenzmarkierte Antikörper: 1:500 in 3-5% BSA/PBS, 1h, 37 °C). Alle weiteren Schritte mussten bei Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einer dunklen Küvette durchgeführt werden. Nun wurden die Objektträger viermal 10 min im PBS gewaschen und, sofern keine weitere Färbung nötig war, in Citifluor/PBS eingeschlossen.

2.2.4.5. Immunmarkierung von Paraplastschnitten

Im Gegensatz zu Polyethylenglykol wurde Paraffin 5-10 μm dick geschnitten. Paraffin lässt sich im Gegensatz zu PEG-Einbettungen am besten an einem relativ kühlen Arbeitsplatz schneiden. Bei höheren Zimmertemperaturen neigen Paraffinschnitte dazu, sich so stark zu falten, dass sie sich anschließend nicht strecken lassen. War die Umgebungstemperatur zu hoch, mussten die Blöckchen vor dem Schneiden im Kühlschrank abgekühlt werden.

Die Schnitte wurden auf Wassertropfen gelegt (beschichtete Objektträger) und bei 41 °C gestreckt. Nach dem Eintrocknen des Tropfens wurden die Schnitte bei 41°C mindestens 30 min, jedoch besser über Nacht aufbacken. Die Deparaffinisierung der Schnitte wurde wie folgt durchgeführt:

2 x Roticlear (Alkangemisch, Roth)	10 min
Roticlear : Propanol = 1:1	5 min
Propanol	5 min
Propanol : Ethanol = 1:1	5 min
96% Ethanol	5 min

70% Ethanol	5 min
50% Ethanol	5 min
30% Ethanol	5 min
10% Ethanol	5 min
2 x PBS	10 min

Nach dem Überführen der Schnitte in PBS wurde die Immunmarkierung wie unter 2.2.4.4. durchgeführt.

2.2.4.6. Färbungen

Anilinblau

Die Färbung erfolgte zum Nachweis der Callose in Siebplatten. Sie fluoreszieren nach Anregung durch UV-Licht gelbgrün. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Färbung bis zu einer Schnittdicke von ca. 7-8 μm bei *P. somniferum* kein Ergebnis lieferte. Daher musste bei dünneren Paraffinschnitten und PEG-Schnitten auf den Callose-Antikörper (Applied Biosystems) zurückgegriffen werden.

Die Anilinblaufärbung erfolgte nach Gerlach (1984). Dazu werden 5 mg Anilinblau in 100 ml Leitungswasser gelöst. Durch Zugabe einer Spur (!) Na_2CO_3 wird die Lösung auf einen pH-Wert zwischen 8 und 9 gebracht. Die Lösung ist zunächst dunkelblau und kann erst verwendet werden, wenn sie eine blassblaue Farbe angenommen hat (2-3 h). Die immunmarkierten Objektträger werden 30 min in die Lösung gestellt und vor dem Einschließen 3 x 10 min in PBS gewaschen.

DAPI

4'6-Diamino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes) ist ein DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der zum Nachweis von Zellkernen dient.

Stammlösung: 1mg/ml DAPI in PBS

Die Stammlösung muss vor Verwendung 1:1000 verdünnt werden. Die Inkubationszeit beträgt 10-30 min. Vor dem Einschließen der Schnitte wird 3 x 10 min mit PBS gewaschen

2.2.5. Zytologische Methoden – Lokalisation von mRNA

2.2.5.1. RNA Markierung durch *in vitro*-Transkription

Zur Markierung von RNA, wurde die entsprechende DNA in Vektoren kloniert, die eine Erkennungsstelle für eine RNA-Polymerase besitzen (z.B. pGEM-T-easy). Diese Plasmide wurden zunächst mit einem geeigneten Enzym linearisiert und im Agarosegel aufgereinigt (2.2.1.6.).

Zur Markierung wurde entweder Digoxigenin oder Fluorescein verwendet. Digoxigenin ist ein pflanzliches Steroid *Digitalis lanata*.

Der Reaktionsansatz zur Markierung durch *in vitro*-Transkription setzte sich wie folgt zusammen:

Ca.2 μg Template-DNA
 4 μl Transkriptionspuffer (mit RNA-Polymerase geliefert)
 1 μl RNase-Inhibitor (40 U)

4 µl NTP-Gemisch: DIG RNA Labeling Mix (Roche) oder
Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche)
4 µl RNA-Polymerase: SP6 (Roche)
T7 (Promega)
Ad 40 µl mit RNase-freiem Wasser

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C 2-3 h inkubiert und die Template-DNA anschließend mit DNase I 15 min bei 37 °C verdaut. Danach wurde die RNA durch Zugabe von 2,2 µl 3 M Na-acetatlösung und 65 µl Ethanol 8 Stunden bei -70 °C gefällt. Nach Zentrifugation 15 min bei 14 000 g (4 °C) wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl Wasser gelöst.

Alkalische Hydrolyse:

Um das Eindringen der Sonden in das Gewebe zu erleichtern, wurden diese auf eine Fragmentlänge von 300-400 bp gekürzt. Die Hydrolysezeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k \times L_0 \times L_f}$$

dabei sind: k = Hydrolysekonstante 0,11 kb/min
L₀ = Anfangsfragmentlänge in kb
L_f = Endfragmentlänge in kb

Die RNA-Lösung wird mit 100 µl Hydrolysepuffer (80 mM NaHCO₃, 120 mM Na₂CO₃) versetzt und bei 65 °C die berechnete Zeitspanne hydrolysiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 22 µl Neutralisationpuffer (3 M -Na-acetat, 4,5% Essigsäure) abgestoppt. Nach Zugabe von 1,1 µl tRNA-Lösung (20 µg/µl) (Invitrogen) wird mit 600 µl Ethanol gefällt und die RNA in 50 µl Wasser gelöst.

2.2.5.2. Dot Blot zur Quantifizierung von Digoxigenin markierten RNA Sonden

Zur Konzentrationsbestimmung DIG-markierter RNA-Sonden wurde ein Dot-Blot wie im „DIG Application Manual for nonradioactive *in situ* hybridization“ der Fa. Roche durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen der Sonde und einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Roche) hergestellt und zum Vergleich nebeneinander auf eine Nylonmembran aufgetropft. Dabei wurden entgegen der Vorschrift von Roche auch die ersten drei Verdünnungen mit aufgetragen. Die Membran wurde zur Fixierung 30 min bei 120 °C gebacken und die freien Bindungsstellen mit Blocking solution geblockt. Der Nachweis der markierten RNA erfolgte über die Behandlung mit einem an alkalische Phosphatase gekoppelten DIG-Antikörper und der nachfolgenden Farbreaktion mit NBT/BCIP. Die Farbtintensität der Punkte wurde mit der Farbtintensität der Kontroll-RNA-Punkte verglichen und somit auf die Konzentration der RNA-Sonde geschlossen.

2.2.5.3. Quantifizierung der Fluorescein-markierten RNA-Sonde

Da für Fluorescein-markierte RNA keine Kontroll-RNA zu erhalten war, konnte kein Dot Blot angewendet werden. Hier wurden die Sonden-RNA-Verdünnungen neben den Kontroll-RNA-Verdünnungen auf ein mit Ethidiumbromid versetzte Agarose-Platte getropft und die Intensität der Fluoreszenz im UV-Licht verglichen.

2.2.5.4. *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung zum Nachweis von messenger RNA (mRNA) in fixierten Zellpräparationen mit cDNA-Sonden wurde zuerst von Harrison *et al.* (1974) beschrieben. Cox *et al.* (1983) verwendete für die Lokalisation von mRNA im Gewebe RNA-Sonden. Später wurde diese Methode auch für den Nachweis von mRNA in pflanzliches Gewebe übertragen (z.B. Coen *et al.* 1990).

Durchführung:

Zur Durchführung wurde ein in der Literatur veröffentlichtes Protokoll für *P. somniferum* verwendet und geringfügig abgewandelt (Bird *et al.* 2003; St-Pierre *et al.* 1999).

Dazu wurden zunächst 10 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und wie unter 2.2.4.5. beschrieben deparaffinisiert. Um eine bessere Zugänglichkeit des Gewebes für die Sonden zu gewährleisten, wurde mit Proteinase K (5 µg/ml in Pronase-Puffer) 30 min bei 37 °C verdaut und die Reaktion anschließend mit 2 mg/ml Glycin in TBS gestoppt. Nach zwei Waschschritten (2 x 5 min TBS) wurde das Gewebe nachfixiert (3,7% Formaldehyd in PBS-Puffer).

Zur Neutralisierung positiv geladener Moleküle, wie basische Proteine, wurde ein Acetylierungsschritt durchgeführt. Dies verhindert auch die Bindung der Sonden-RNA an die Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträgeroberfläche. Dazu wurden die Objektträger in eine Küvette gestellt, in der mit einem Magnetrührer gerührt werden konnte, und mit 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 versetzt. Nach 2 min wurde 0,25% Acetanhydrid gegeben und 10 min gerührt. Es folgte ein Waschschritt mit TBS (5 min) und eine aufsteigende Ethanolreihe zur Entwässerung. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und sofort zur Hybridisierung verwendet.

Pro Objektträger wurden für die Hybridisierung 200 µl Hybridisierungslösung mit je 100 ng Fluorescein-markierter bzw. 200 ng Digoxigenin-markierter Sonde verwendet. Die Sonde wurde zuvor bei 80 °C 2 min lang denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50 °C in einer feuchten Kammer, die mit 50% Formamid in 2 x SSC-Puffer ausgelegt war. Die Deckgläschen wurden am nächsten Tag in warmem 1 x SSC-Puffer abgelöst. Um einzelsträngige, nicht hybridisierte Sonden zu entfernen, wurde eine RNase A- Behandlung durchgeführt. Dieses Enzym greift Doppelstränge nicht an, reduziert aber das Hintergrundsignal (Leitch *et al.* 1994). Dazu wurde mit 50 µg/ml RNase A in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 M NaCl bei 37 °C 30 min lang verdaut.

Die folgenden Waschschritte nach der Hybridisierung dienen zum Entfernen unspezifisch gebundener Sonden und werden unter etwas stringenteren Bedingungen wie die Hybridisierung durchgeführt.

Waschschritte:

2 x SSC	30 min bei Raumtemperatur
1 x SSC	60 min bei Raumtemperatur
0,1 x SSC	60 min bei 65 °C

Anschließend wurde 2 x mit TBST (5 min) gewaschen.

Für den Nachweis mit einem Antikörper wurden die Schnitte mit 1% blocking reagent (Roche) in TBS blockiert (mind.1 h, besser bei 4 °C über Nacht). Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte 2 h bei Raumtemperatur (1:1000 in 1% blocking reagent/ 1% acetyliertes BSA (Biotrend) in TBS). Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit 2 x TBS entfernt und 2 x 10 min mit Detektionspuffer behandelt. Für die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase wurden 120 µl Substratlösung (4,5 µl NBT / 3,5 µl BCIP in 1 ml Detektionspuffer) pro Objektträger verwendet und bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion mit TE-Puffer gestoppt.

Pronase-Puffer	0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 5 mM EDTA
PBS-Puffer:	100 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2 140 mM NaCl
Hybridisierungslösung:	40% Formamid 10% Dextransulfat 200 µg/ml tRNA 0,3 M NaCl 0,01 M Tris-HCl, pH 6,8 40 U/ml RNase- Inhibitor 0,5% blocking reagent (Roche)
TBS (Tris-buffered saline):	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBST:	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,3% Triton X-100
Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

Zur Auffindung von Siebplatten konnte noch eine Anilinblaufärbung (2.2.4.6.) angeschlossen werden. Daraufhin wurden die Schnitte in Glycerin/PBS eingeschlossen.

3. Ergebnisse

3.1. Anatomie der *Papaver somniferum* –Leitbündel

Da in *P. somniferum* verschiedene Leitbündel vorkommen, soll zu Beginn des Ergebnisteils beschrieben werden, wo sich die verschiedenen Leitbündeltypen befinden und wie sie aufgebaut sind:

Kapsel

In der Kapsel sind zwei verschiedene Typen von Leitbündeln anzutreffen.

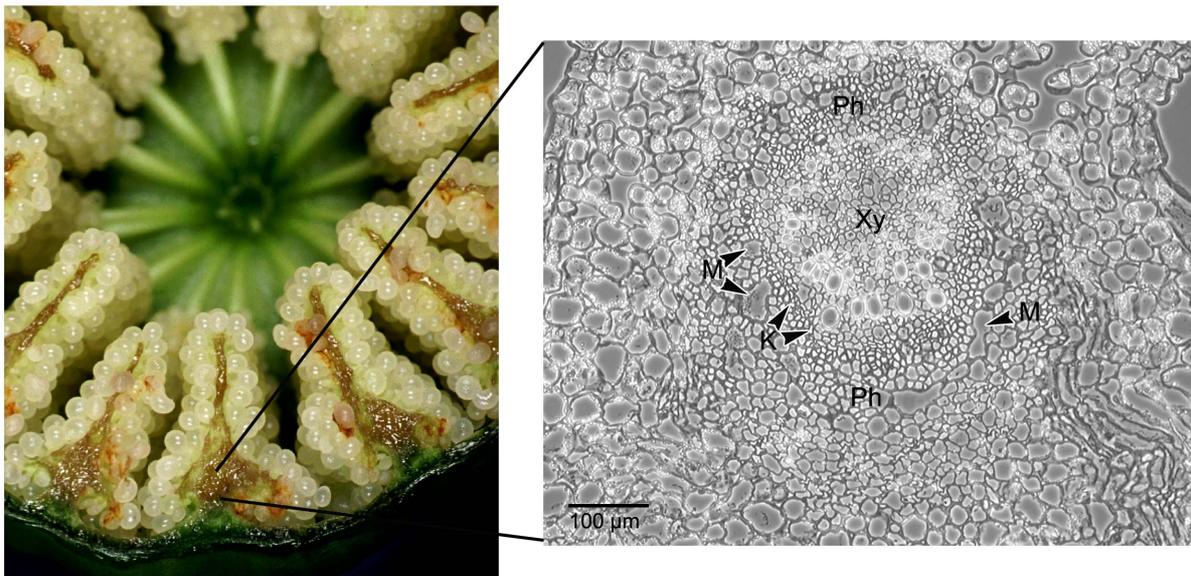


Abb. 10: Aufgeschnittene Kapsel von Schlafmohn; Lage des konzentrischen Leitbündels im Plazentagewebe der Kapsel und Phasenkontrastbild des Leitbündels.
Ph = Phloem, M = Milchröhre, Xy = Xylem; K = Kambium.

Abb. 10 zeigt eine aufgeschnittene Kapsel. Deutlich zu erkennen sind die Samenanlagen, die zahlreich an einzelnen Gewebestreifen sitzen, die halbwegs bis zur Kapselmitte reichen. Diese Streifen werden von Kapoor (2002) als „Plazentaplatten“ bezeichnet.

An der Basis dieser Platten befindet sich ein großes, konzentrisches Leitbündel. Nach Kapoor (2002) entsteht es durch 4-5 Leitbündel, die sich vom Stängel herkommend an der Basis der Kapsel zu einem großen Leitbündel vereinigen. Die Lage dieses Leitbündels ist in Abb. 10 gekennzeichnet. Das Phasenkontrastbild zeigt eine Übersicht über dieses Leitbündel in der gleichen Ausrichtung wie auf der Fotografie des Kapselquerschnittes. Diese Ausrichtung (oberer Bildrand zeigt zur Kapselmitte) wurde für alle weiteren mikroskopischen Aufnahmen der Kapsel beibehalten.

Der Aufbau dieses Leitbündels ist konzentrisch und unterscheidet sich damit deutlich von den in der Kapselwand liegenden weiteren Leitbündeln. Ein innen liegendes Xylem ist von einem Phloemring umgeben, der sich zur Kapselmitte hin etwas öffnet. Im Phloem liegen zahlreiche, große Milchröhren, die noch teilweise mit optisch dichtem Latex gefüllt sind, wie auf dem Phasenkontrastbild des Leitbündels zu erkennen ist. (Abb. 10, Phasenkontrastbild)

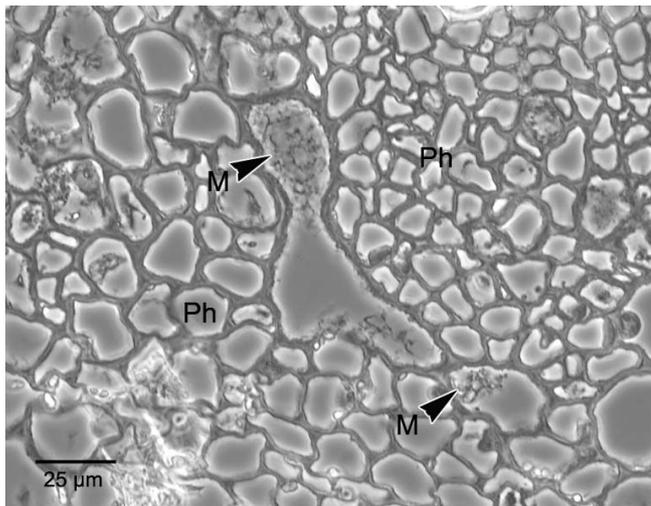


Abb. 11: Detailansicht des Phloems mit Milchröhren; Ph = Phloem, M = Milchröhre.

Die Vergrößerung zeigt zwei Milchröhren, beide mit etwas Latex gefüllt. Bei der größeren Milchröhre ist die Fusion aus mehreren Zellen deutlich zu erkennen (Abb. 11).

Die weiteren Leitbündel in der Kapselwand sind vom Aufbau her offene, kollaterale Leitbündel, deren Phloem von zahlreichen, großen Milchröhren durchzogen ist.

Stängel

Im Stängel zeigen die Leitbündel ebenfalls einen offenen, kollateralen Aufbau. Deutlich zu erkennen ist ein Kambium zwischen Xylem und Phloem. Teilweise findet man auch sklerenchymatische Zellen am Rand des Phloems, sogenannte Phloemfasern. Sie konnten jedoch nur bei vereinzelt Leitbündeln gefunden werden.

Die Anordnung der Leitbündel im Stängel folgt einem bestimmten Muster. Dabei liegen auf einem äußeren Ring kleinere Leitbündel und auf einem inneren Ring größere Leitbündel. Jeweils 2-3 kleinere wechseln sich mit einem größeren ab.

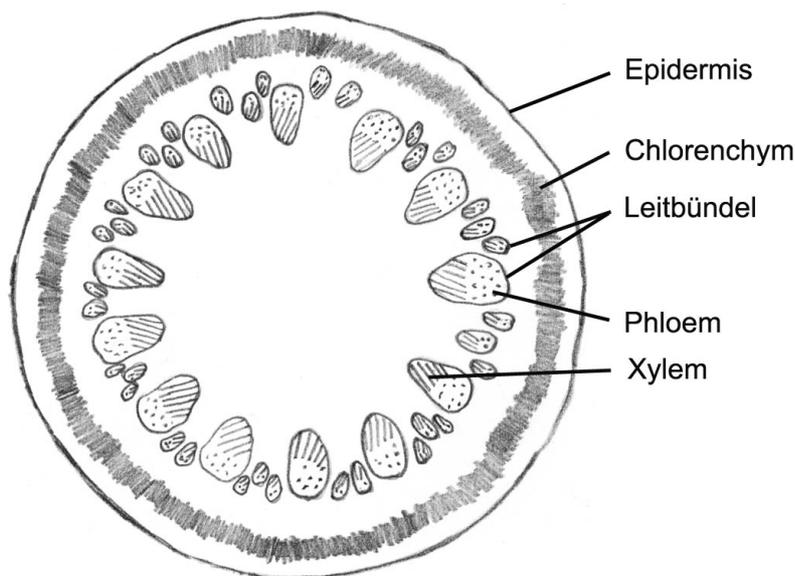


Abb. 12: Schemazeichnung eines Stängelquerschnittes nach Kapoor (2002).

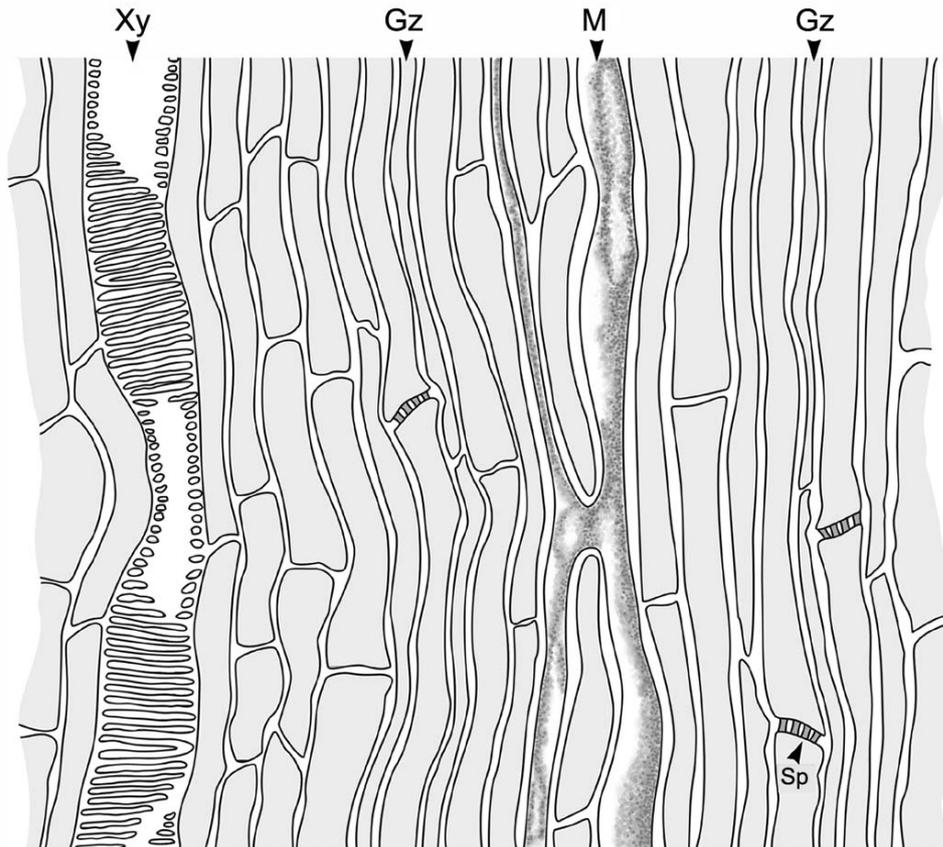


Abb. 13: Schemazeichnung eines Stängelleitbündels im Längsschnitt;
Sp = Siebplatte, Gz = Geleitzelle, M = Milchröhre, Xy = Xylemgefäß.

Abb. 13 zeigt eine Schemazeichnung, die nach einem Mikroschnitt angefertigt wurde und den Aufbau eines Leitbündels im Schlafmohnstängel verdeutlicht.

Das Phloem besteht aus drei unterschiedlichen Zelltypen. Die Siebröhren und die Geleitzellen gehen aus einer Siebröhrenmutterzelle durch inäquale Teilung hervor. Die Querwände der Siebröhren, die Siebplatten, stehen auch beim Schlafmohn meist schräg und sind durch einen Kallosebelag charakterisiert. Aus der kleineren Zelle, die sich noch querteilen kann, entstehen die Geleitzellen, die mit den Siebröhren durch zahlreiche Plasmodesmata verbunden sind (Nultsch, 1986) (s. Einleitung Kap. 1.4.). Außer den Siebröhren und Geleitzellen finden sich im Phloem noch parenchymatische Zellen.

Im Phloem befinden sich auch die Milchröhren. Sie sind im Stängel weniger zahlreich als in der Kapsel und unterscheiden sich in ihrem Durchmesser nicht von den anderen Phloemzellen. Sie liegen in der Regel nicht direkt neben Siebelementen, sondern sind von diesen durch Geleitzellen bzw. parenchymatischen Zellen getrennt. Zwischen Phloem und Xylem befindet sich meristematisches Gewebe. Eindeutig im Längsschnitt auszumachen sind die verstärkten Xylemgefäße.

Wurzel:

In der Wurzel findet man das für höhere Pflanzen typische radiale Leitsystem. Das Phasenkontrastbild in Abb. 14 zeigt eine Wurzelspitze am Beginn der Differenzierungszone. Der Erhalt der dünnwandigen Rindenzellen durch die Einbettung und das anschließende Schneiden stellte sich als schwierig heraus, daher sind nur Teile der Rhizodermis als Abschlussgewebe erhalten. Der Zentralzylinder mit den bereits verstärkten Xylemgefäßen ist gut zu erkennen. Zwischen den Xylemstrahlen bildet sich das Phloem. Der Zentralzylinder ist

von einem Kambium, dem Perizykel, umgeben, dem eine einschichtige Endodermis als Abschluss zur Rinde folgt.

Erst in dickeren Wurzeln finden sich einzelne, mit Latex gefüllte Zellen, die in der Wurzel jedoch noch nicht fusionieren.

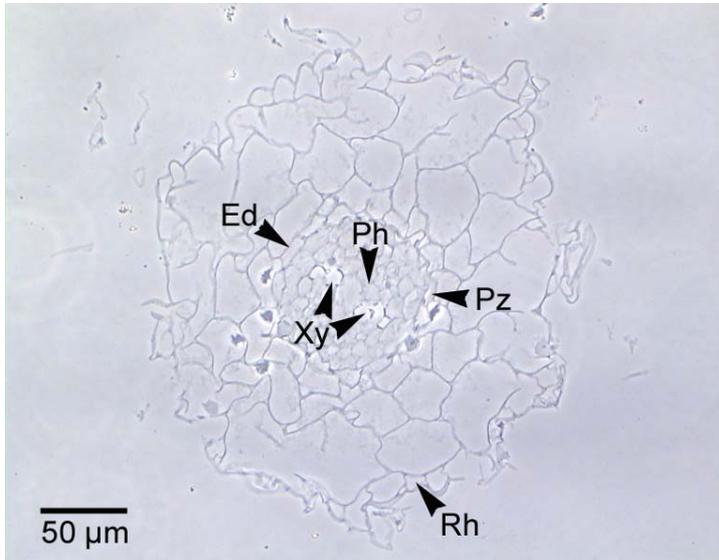


Abb. 14: Phasenkontrastbild einer Haarwurzel am Beginn der Differenzierungszone;
Rh = Rhizodermis
Ed = Endodermis
Pz = Perizykel
Ph = Phloem
Xy = Xylem.

3.2. Major Latex Protein

3.2.1. Sequenzierung des Major Latex Proteins und Sequenzvergleich

Hinsichtlich der geplanten Immunlokalisationen der einzelnen biosynthetischen Enzyme, stellte sich das Problem, dass die Milchröhren in verschiedenen Geweben von *P. somniferum* im mikroskopischen Präparat schlecht zu erkennen sind. Im ausdifferenzierten Kapselgewebe sind die meisten Milchröhren an ihrer Größe und an deutlich erkennbaren Zellfusionen gut zu erkennen. Es gibt jedoch auch in der Kapsel kleinere Milchröhren, die leicht übersehen werden. Im Stängel unterscheiden sich die Milchröhren in ihrer Größe nicht von den übrigen Phloemzellen und Zellfusionen sind nur im Längsschnitt zu erkennen.

Durch das notwendige Zerkleinern des Gewebes vor der Fixierung trat der unter hohem Turgordruck stehende Latex aus dem Gewebe aus. Darüber hinaus wurde zum Erhalt der Antigenität auf eine stärkere chemische Fixierung verzichtet (siehe 2.2.4.1.). Dies führte meist dazu, dass Latex nur noch als Saum am Rand der Milchröhren erhalten blieb und somit nicht mehr an seiner hohen optischen Dichte erkannt werden konnte. Eine Fixierung mit einem Gemisch aus Paraformaldehyd (3%) und Glutaraldehyd (0,2%) führte nur zu einer geringfügig höheren Anzahl an gefüllten Milchröhren, dadurch konnten nicht alle erkannt werden.

Daher bot sich eine Immunmarkierung eines Latex-spezifischen Proteins an. Nach Nessler *et al.* (1985) und Nessler & Burnett (1992) sind Major Latex Proteine (MLP) für Latex spezifisch und wurden bis zu dem damaligen Stand der Arbeit auch mehrfach als Marker für Milchröhren verwendet (Griffing & Nessler 1989, sowie Bock 1996). Bock verwendete Antikörper gegen das MLP-22 aus Kaninchen zu elektronenmikroskopischen Studien zur Entstehung der Milchröhren in verschiedenen Entwicklungsstadien des Schlafmohns.

Da der Antikörper gegen MLP zur Co-Lokalisation mit den Antikörpern aus Kaninchen verwendet werden sollte, wurde die Immunisierung einer weiteren Tierspezies angestrebt. Eine Immunisierung von Meerschweinchen erschien günstig, da die bisher beauftragte Fa.

Biogenes mit dieser Tierart gute Erfahrungen hatte und auch sekundäre Antikörper kommerziell erhältlich waren.

Aus dem EST-Programm von Jörg Ziegler (IPB Halle) war ein Klon vorhanden, der beim Ansequenzieren eine Übereinstimmung mit einem MLP der MLP15-Familie der NCBI – Gendatenbank aufwies.

Der MLP-Klon in pZL1 wurde zunächst mit dem T7 bzw. SP6-Primer, dann mit zwei genspezifischen Primern sequenziert. Aus der Kombination der Einzelsequenzen konnte die Sequenz MLP.seq bestimmt werden, die in der folgenden Abbildung mit der MLP 146-Sequenz aus der NCBI-Datenbank verglichen wird:

```

*           20           *           40           *           60
MLP149.seq : ATGGCTCATACTCGTGGTATTTTCAGGTCTAGTTGGGAAACTTGTATGGAACCGGAGGTT : 60
MLP.seq    : ATGGCTCAACATCATACCATTTTCAGGTCTATTGGGAAGCTTGTGACCGAATCAGAAGTT : 60
            ATGGCTCA  TC T  ATTTTCAGGTCT  TTGGGAA CTTGT A  GAA C GA GTT

*           80           *           100          *           120
MLP149.seq : AACTGCAACGCTGACAAGTATTACCAAATATATAAGCACCATGAAGATCTTCCAAGCGCA : 120
MLP.seq    : AATTGCGATGCTGAAAAATATTACAAAATAATTAAGCACCAACGAAGATGTACCTAATGCA : 120
            AA TGC A GCTGA AA TATTAC AAATA  TAAGCACCA GAAGAT T CC A  GCA

*           140          *           160          *           180
MLP149.seq : ATCCCTCATATTGTCACTAGCGCCAAAGCTGTGAGGGACATGGAACACTTCTCGTTGTC : 180
MLP.seq    : ACCCCTTATGTTTCCGAT---GTCAAAGTTACTGAAGGACATGGTACCACTTCGGTTGT : 177
            A CCCT AT TT  C  T   G CAAAG T  TGA GGACATGG AC ACTTC GGTTG

*           200          *           220          *           240
MLP149.seq : GTCAAGGAGTGGGGCTATATGCATGAGGGT-AAAACACTTACTTGCAAGGAGAAAACTAC : 239
MLP.seq    : GTCAAGCAATGGAACCTTTGTTGTTGCGGGTCAAAACGAATATGTCCTTGAA-AAAACAAC : 236
            GTCAAG A TGG  CT T T   TG GGGT  AAAC  TA  T C  G A AAAAC AC

*           260          *           280          *           300
MLP149.seq : CTATAACGATGAAACAAGGACGATATGTCATAGCATATCTGAAGGAGACTTGATGAATGA : 299
MLP.seq    : ATACAATGATGAAACAAGGACAATATGTCACAGTGACTTTGAAGGAGACCTGATGAAGAA : 296
            TA AA GATGAAACAAGGAC ATATGTCA AG   T TGAAGGAGAC TGATGAA  A

*           320          *           340          *           360
MLP149.seq : TTACAAGAAGTTCGATGCAACACTTGTGTTGATCCAAAGGATAATGGACATGGAAGCAT : 359
MLP.seq    : ATACAAGAAGTTTGATGCAATCCTTGTAGTTAAGCCAAAGGATAATGGACATGGTAGTAA : 356
            TACAAGAAGTT GATGCAA  CTTGT GTT A  CCAAAGGATAATGGACATGG AG A

*           380          *           400          *           420
MLP149.seq : TGTGAAGTATATTTTAGATTATGAGAAGATAAATGAGGATTCTCCGGTTCCTATTCATTA : 419
MLP.seq    : TGTGAGATGGACTATTGAACATGAGAAGAATAACGAGGATTCTCCGGTTCCTAATTGATTA : 416
            TGTGA  T  A T T  GA  ATGAGAAGA  AA GAGGATTCTCCGGTTCCT ATT ATTA

*           440          *           460          *           480
MLP149.seq : TCTAGCTCTGTGCAATCAAGCCACCGAAGACTTGAACACTTACCTTTGTGCTTCTGTCTA : 479
MLP.seq    : TCTAGGTTTCTTCCAATCGTTAATCGATGACTTGAACCTCATCTTTGCTCCTCT---TA : 473
            TCTAG T T T C A           A CGA GACTTGAAC CT A CTTTG  C TCT  TA

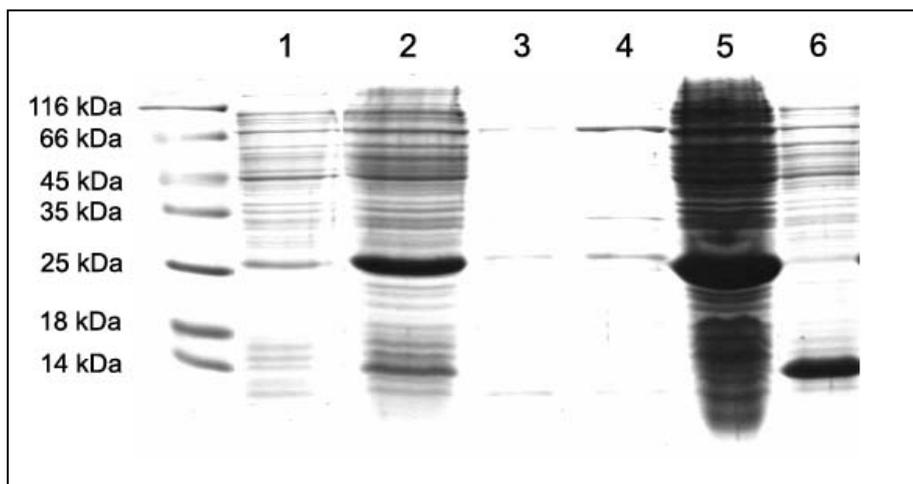
MLP149.seq : A : 480
MLP.seq    : A : 474
            A
    
```

Diese Sequenz ergab eine Übereinstimmung mit der Datenbanksequenz für ein Gen der MLP 15-Familie von 65% auf Aminosäureebene. MLP 149 gehört nach Nessler *et al.* (1994) zur Subfamilie MLP-15, der auch das MLP146 angehört.

3.2.2. Klonierung und heterologe Expression in *Escherichia coli*

Nach der Sequenzierung wurde das MLP 15 mit den Restriktionsenzymen *Sal* I / *Not* I nach 2.2.1.2. ausgeschnitten und nach 2.2.1.3. in den Vektor pHIS 8 ligiert und anschließend in *E. coli* XL1'MRF Blue nach 2.2.1.4. transformiert. Die erhaltenen Bakterienkulturen wurden als flüssige Übernachtskultur angezogen und Plasmidpreps hergestellt. Die Plasmide wurden verdaut und der Verdau auf einem Agarosegel kontrolliert. Von 4 positiven Klonen wurden Glycerinkulturen angelegt. Die Inserts der Plasmide wurden sequenziert um die korrekte Ligation im Leserahmen zu überprüfen. Anschließend wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21DE3 mit einem der positiven Plasmide transformiert.

Die Expression wurde nach dem in 2.2.3.2. beschriebenen Protokoll durchgeführt. Ein SDS-Gel zur Kontrolle der Expression zeigt Abbildung 14:



- 1 = Bakterienkultur vor Induktion
- 2 = Bakterienkultur nach Induktion
- 3 = Fraktion 2 der Talonaufarbeitung
- 4 = Fraktion 1 der Talonaufarbeitung
- 5 = Harnstoffextrakt der Bakterienpellets
- 6 = Überstand nach Abzentrifugieren der lysierten Bakterien

Abb. 15: Expression von MLP 15 in pHIS8-3 in BL21DE3 und Aufarbeitung unter nicht denaturierenden Bedingungen.

Das Proteingel zeigt die Bildung eines Proteins bei ca. 25 kDa, was der errechneten Größe von 23 kDa von MLP15 + His-Tag in etwa entspricht. Das Protein erwies sich jedoch als unlöslich und befand sich nach der Bakterienlyse im abzentrifugierten Rückstand. Da bereits eine Unlöslichkeit des Proteins vermutet wurde, wurde dieses Pellet mit 8M Harnstofflösung behandelt und die Lösung erneut abzentrifugiert. Auf dem Proteingel ist deutlich zu erkennen, dass sich das gewünschte MLP-Protein in diesem Extrakt befindet. Daher wurde eine Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen nach 2.2.3.2. durchgeführt, die auch zur Aufreinigung des MLP-Proteins führte. Die Ausbeute an Protein betrug dabei 2,6 mg/l Kultur.

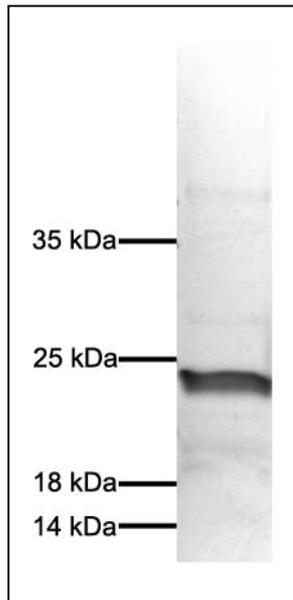


Abb. 16: SDS-Page der Guanidinfraction mit MLP-Protein, umgepuffert in 20 mM Tris-HCl, pH 7,7.

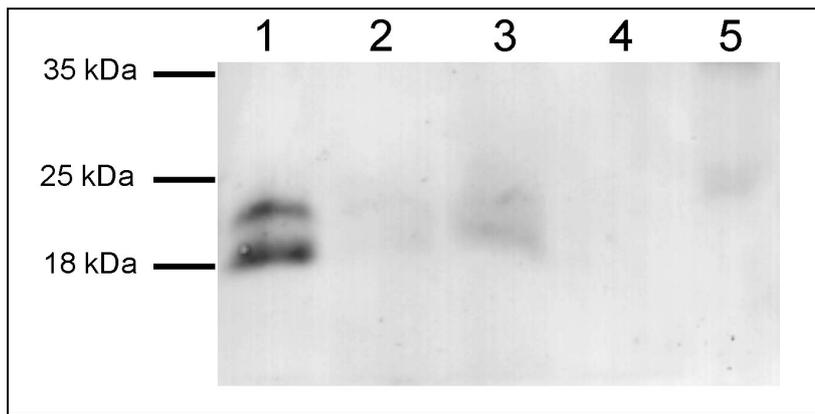
1 mg MLP-Protein wurden gesammelt und in Tris-Puffer an die Fa. Biogenes gesandt und nach 2.2.4.2. wurden 2 Meerschweinchen immunisiert.

3.2.3. Western Blot

Die von beiden Meerschweinchen erhaltenen Antiseren wurden auf einem Western Blot getestet. Dazu wurden Proteinextrakte nach 2.2.3.3 aus verschiedenen Mohngeweben hergestellt, mittels SDS-Page getrennt und nach 2.2.3.6. geblottet.

Erste Blots ergaben, dass nur das von der Firma als „ms 1“ bezeichnete Tier geeignete Antikörper produziert hatte. Das zweite Antiserum zeigte nur bei reinem Latex eine Antikörperreaktion. Dieses Serum wurde daher nicht weiter verwendet.

Der Western Blot wurde nach dem im Methodenteil unter 2.2.3.7. beschriebenen Protokoll durchgeführt. Für die Blockierung der freien Bindungsstellen wurde 4% Milchpulver in TBST verwendet. Das primäre Antiserum in einer Verdünnung von 1:200 in 4% Milchpulver/TBST. Das Präimmuns serum zeigte keine Immunreaktion im Western Blot.



- 1 = Kapsel
- 2 = Stängel, erste 4 cm unterhalb der Kapsel
- 3 = Stängel, weitere 4 cm unterhalb der Kapsel
- 4 = Blatt
- 5 = Wurzel

Abb. 17: Western Blot mit MLP-Antikörper; jeweils 10 μ g Gesamtprotein wurden pro Spur aufgetragen.

Die Aminosäuresequenz des MLP-Proteins zeigt eine hohe Übereinstimmung zu anderen MLP-Proteinen der MLP 15-Familie. So beträgt die Übereinstimmung auf Aminosäureebene zu MLP 146 79% und zu MLP 149 77%. Daher ist es erklärbar, dass der Antikörper gegen MLP 15 noch weitere MLP-Proteine dieser Genfamilie erkennt und im Western Blot eine Doppelbande erscheint. Da jedoch alle MLP-Proteine für Latex spezifisch sind, hat dies auf die Funktion des Antikörpers als Marker für Latex keinen Einfluss.

3.2.4. Lokalisation der Milchröhren in der Kapsel

Da die Milchröhren in der Kapsel auch ohne Färbung gut zu erkennen sind, wurden zunächst Kapselschnitte für die Immunmarkierung mit dem MLP-Antikörper verwendet.

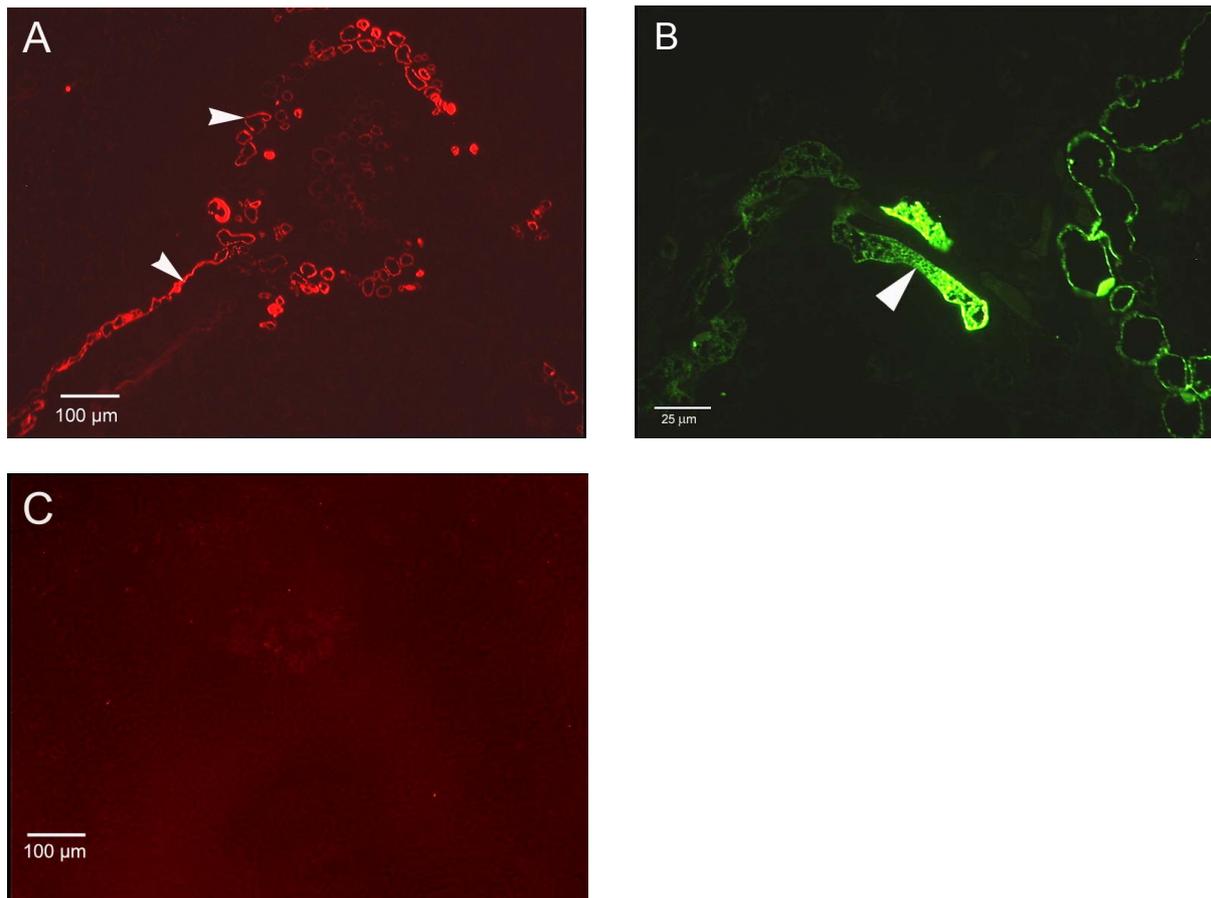


Abb. 18: Milchröhren in der Kapsel;

- A: Querschnitt durch das konzentrische Kapselleitbündel; prim. Antikörper Anti-MLP, sek. Antikörper Alexa 568 Ziege gegen Meerschweinchen-IgG
- B: Detailansicht eines Querschnittes durch ein Kapselleitbündel; sek. Antikörper: Alexa 488 Ziege gegen Meerschweinchen-IgG; weiße Pfeile bezeichnen Milchröhren.
- C: Querschnitt durch das konzentrische Kapselleitbündel; Präimmunserum Anti-MLP; sek. Antikörper: Alexa 568 Ziege gegen Meerschweinchen-IgG.

Da die Milchröhren in der Kapsel ein Netzwerk bilden, findet man auch längs verlaufende Milchröhren im Querschnitt, wie in Abb. 18 A erkennbar (weißer Pfeil).

3.2.5. Lokalisation der Milchröhren im Stängel

Im Stängel sind Milchröhren nicht größer als andere Phloemzellen und waren daher nur durch die Markierung mit dem MLP-Antikörper zu erkennen.

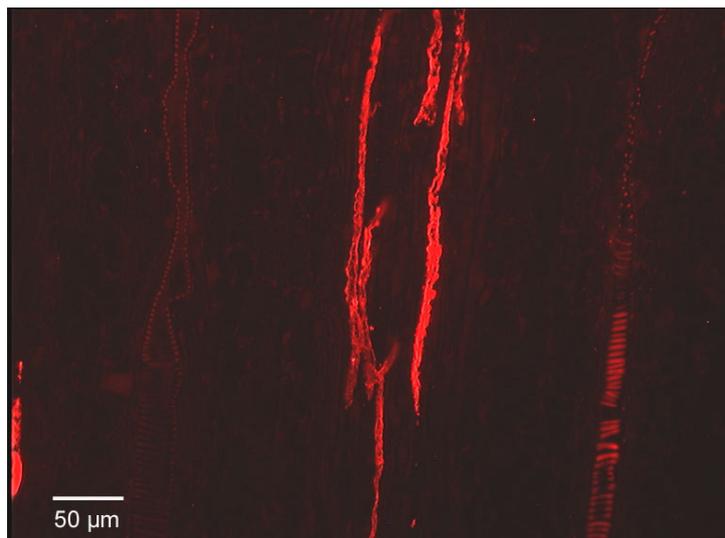


Abb. 19: Längsschnitt durch einen Stängel; prim. Antikörper Anti-MLP, sek. Antikörper: Alexa 568 Ziege gegen Meerschweinchen-IgG.

Abb. 19 zeigt einen Längsschnitt durch ein Stängelleitbündel. In der Mitte liegt das Phloem mit stark verzweigten Milchröhren, die mit dem MLP-Antikörper markiert sind. Solche stark verzweigten Milchröhren waren im Stängel selten zu beobachten. Rechts davon liegt das Xylem. Ein Xylemgefäß ist durch die Autofluoreszenz der lignifizierten Wandverstärkung gut zu erkennen.

3.3. 3'-Hydroxy-N-Methylcoclaurin-4'-O-Methyltransferase

Um einen detaillierten Überblick über die Lokalisation der Morphinbiosynthese zu erhalten, war es wichtig, einen Antikörper gegen ein Enzym aus dem ersten Abschnitt des Biosyntheseweges herzustellen. Zu Beginn dieser Arbeit standen im Arbeitskreis Klone der *N*-Methylcoclaurin-3'-Hydroxylase (CYP80B1) von Huang & Kutchan (2000) und der Norcoclaurin-6-*O*-Methyltransferase, veröffentlicht von Ounaroon *et al.* (2003) zu Verfügung. CYP80B1 wurde in *E. coli* zwar gebildet, da es sich jedoch um ein membran-gebundenes Cytochrom P450-Enzym handelt, erwies es sich als unlöslich. Selbst mit 8M Harnstoff oder 6M Guanidinlösung konnte das Protein nicht in Lösung gebracht werden. Daraufhin wurden 700 bp des *N*-terminalen Ende des Proteins amplifiziert und in den TOPO-Vektor kloniert. Auf diese Weise erhielt man durch Überexpression ein löslicheres Protein, das gereinigt und für die Antikörperproduktion verwendet werden konnte. Leider erwiesen sich die resultierenden Antikörper im Western Blot als nicht funktionsfähig. Möglicherweise ist die Faltung des Teilstückes der CYP80B1 so verschieden von der korrekten Faltung des Gesamtproteins, dass ein Antikörper gegen das Teilstück nicht das Gesamtprotein erkennt. Denkbar wären auch andere Gründe, wie z.B. eine nicht ausreichende Immunreaktion der Tiere oder die Instabilität des eingesandten Proteins.

Die 6OMT wurde ebenfalls in einen geeigneten Vektor ligiert und in *E. coli* überexprimiert. Hier konnte jedoch keine Bildung des Proteins festgestellt werden.

Mittlerweile stand der Klon der 4'OMT aus dem EST-Projekt von Jörg Ziegler (IPB-Halle) zur Verfügung. Er war im Rahmen seines Projektes bereits in den Expressionsvektor pQE kloniert worden und konnte in *E. coli* M15 überexprimiert werden.

3.3.1. Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Die Ausbeute an heterolog exprimiertem und gereinigtem Protein betrug 3,9 mg/l Kultur. Das Protein wurde in 20mM Tris-HCl, pH 7,0, umgepuffert, gefriergetrocknet und zur Immunisierung von zwei Kaninchen an die Firma Biogenes gesandt.

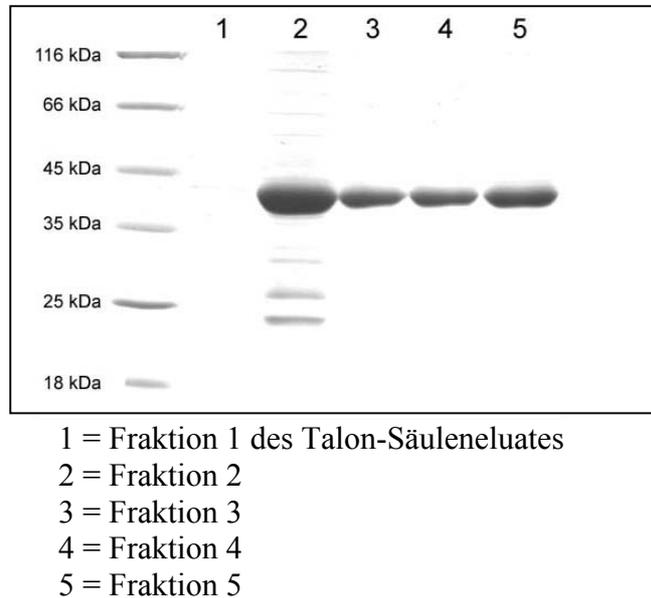


Abb. 20: SDS-Page der Aufreinigung der 4'OMT an Talon-Harz.

3.3.2. Western Blot

Die erhaltenen Antiseren wurden im Western Blot getestet. Da das Antiserum mit der Nummer 5325 bessere Ergebnisse lieferte, wurde es für die weiteren Arbeiten verwendet. Die Präimmunsereen zeigten keine Immunreaktion. Freien Bindungsstellen wurden mit 3% Milchpulver in TBST blockiert. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:500 in 3% Milchpulver in TBST verwendet. Aufgetragen wurden je 10 µg Protein pro Spur.

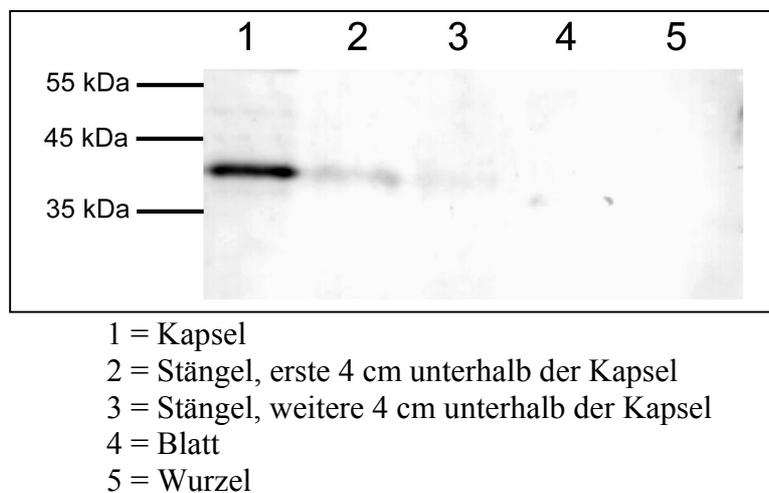


Abb. 21: Western Blot mit 4'OMT-Antikörper.

Der Western Blot zeigt eine Spezifität der Antikörper zur 4'OMT: nur eine einzelne Bande bei ungefähr 40 kDa ist detektierbar. Da auf jeder Spur die gleiche Menge (10 µg) Protein aufgetragen wurden, lassen sich auch quantitative Aussagen machen. Demnach ist die Menge an 4'OMT-Protein in der Kapsel und im oberen Stängelbereich am größten.

3.3.3. Lokalisation in der Kapsel und im Stängel

Da in der Kapsel die höchste Proteinmenge nach dem Western Blot zu erwarten war, wurde die Immunolokalisation mit Kapselgewebe begonnen. Dazu wurden PEG-Einbettungen der Kapsel verwendet und nach 2.2.4.4. immunmarkiert. Um die Milchröhren differenzieren zu können, wurde eine Co-Lokalisation mit Anti-MLP durchgeführt. Beide primäre Antikörper wurden in der Verdünnung 1:500 verwendet. Derselbe Ausschnitt auf einem Schnitt wurde mit Grün- bzw. Blauanregung photographiert und die beiden dadurch entstandenen Bilder durch eine Bildbearbeitungssoftware (Adobe[®] Photoshop[®] 7,0) zu einem Bild addiert.

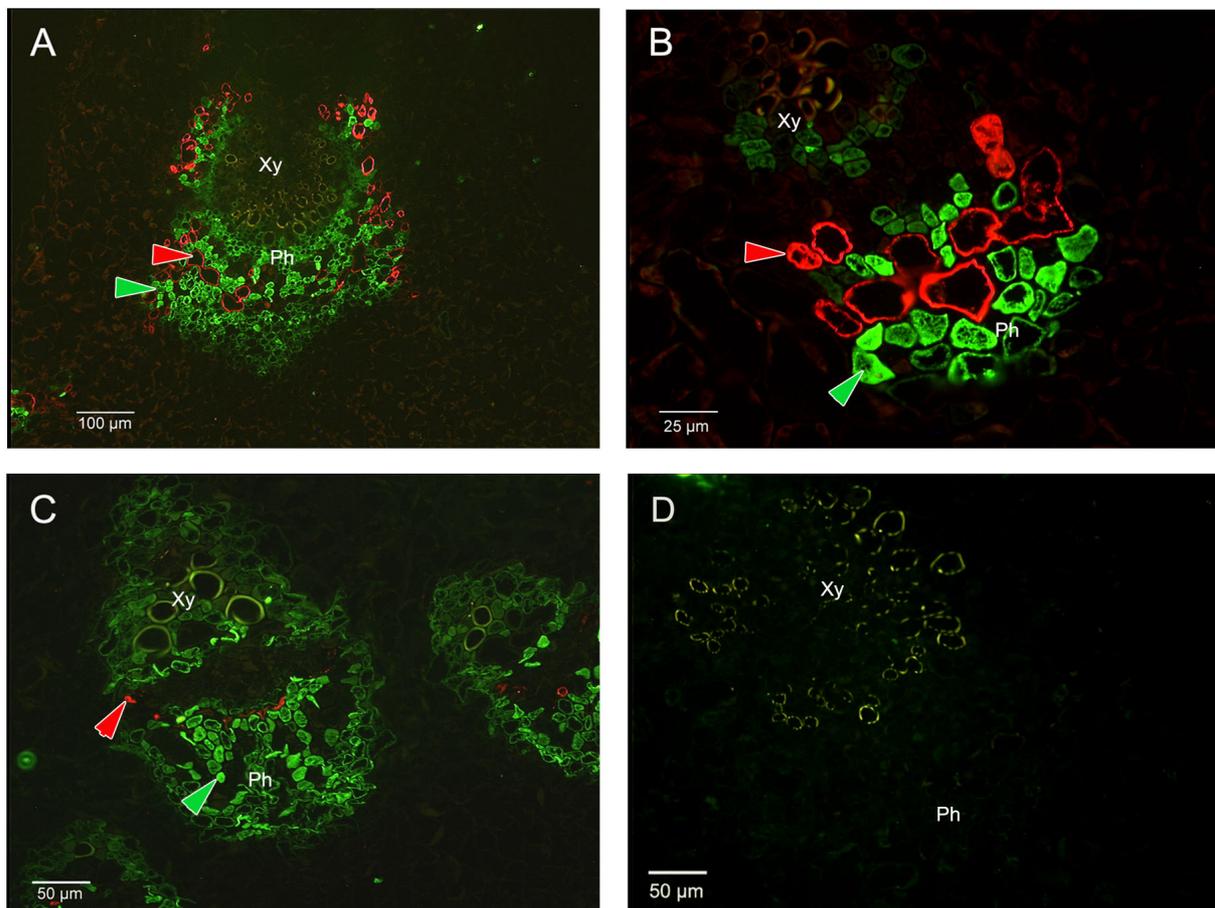


Abb. 22: Co-Lokalisation von MLP und 4'OMT; Schnittdicke 2 µm; PEG-Einbettungen
 Rote Pfeile: Milchröhren, grüne Pfeile: Lokalisation der 4'OMT
 Ph = Phloem, Xy = Xylem
 A: Querschnitt durch ein großes Leitbündel der Kapsel
 B: Querschnitt durch ein kleines Leitbündel der Kapsel
 C: Querschnitt durch ein Leitbündel im Stängel
 D: Präimmunserum; Querschnitt durch ein großes Leitbündel der Kapsel.

Die Abb. 22 A zeigt das große, aus mehreren Stängelleitbündeln fusionierte Leitbündel der Kapsel (in Kap. 3.1. beschrieben).

In der Mitte liegt das Xylem, deutlich an der Autofluoreszenz einzelner lignifizierter Gefäße zu erkennen. Darum bildet das Phloem einen Ring, der von rot markierten Milchröhren durchzogen ist. Die Immunmarkierung der 4'OMT zeigt das Protein im Phloem um die Milchröhren. Einzelne Zellen im Phloem bleiben ungefärbt, ebenso die noch undifferenzierten Zellen des Meristems zwischen Xylem und Phloem.

Eine ähnliche Verteilung der 4'OMT ist auch in einem kleineren Leitbündel der Kapsel zu sehen. (Abb. 22 B). Deutlich rot gefärbte und große Milchröhren durchziehen das Phloem. Die 4'OMT ist in den Phloemzellen, die benachbart zu den Milchröhren liegen, lokalisiert. Eine etwas schwächere Fluoreszenz ist in parenchymatischen Xylemzellen zu beobachten, jedoch nicht im Meristem.

Abb. 22 C zeigt ein Leitbündel des Stängels im Querschnitt. Deutlich markiert sind die Milchröhren, die im Stängel weniger zahlreich und außerdem kleiner sind als in der Kapsel. Die 4'OMT ist im Phloem lokalisiert, wobei im Phloem weniger Zellen markiert sind wie in der Kapsel. Ebenfalls nicht markiert sind die noch undifferenzierten Zellen des Meristems zwischen Xylem und Phloem. Stärker markiert im Vergleich zur Kapsel erscheinen parenchymatische Zellen des Xylem. Allerdings muss man mit quantitativen Aussagen, die auf eine Proteinmenge schließen, vorsichtig sein. Dazu ist die Methode der Immunmarkierung nicht geeignet, da bei verschiedenen Markierungen die Versuchsbedingungen nicht konstant gehalten werden können. Insbesondere haben sich PEG-Schnitte bei Mohnstängeln als schwierig erwiesen und wurden je nach Schneidbarkeit des Blöckchens mit 1-3 µm Dicke geschnitten, was natürlich ebenfalls Auswirkungen auf die Signalintensität zeigt.

Abbildung 22 D zeigt die als Kontrolle mitgeführte Immunmarkierung mit dem Präimmunserum. Da hier keine Fluoreszenz zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass die Immunmarkierung für 4'OMT spezifisch ist.

Eine Immunlokalisation der 4'OMT in der feineren Wurzeln wurde durchgeführt. Ein Nachweis der 4'OMT gelang jedoch nicht.

Mit den Leitbündelquerschnitten aus Abb. 22 konnte gezeigt werden, dass die 4'OMT im Phloem lokalisiert ist. Wie bereits in Kapitel 1.4. gezeigt, besteht das Phloem aus drei unterschiedlichen Zelltypen, den Siebröhren oder Siebelementen, den Geleitzellen und den parenchymatischen Zellen. Im Querschnitt können nur die Milchröhren durch Immunmarkierung von MLP eindeutig identifiziert werden. Da sich die anderen Zelltypen in ihrem Durchmesser nicht unterscheiden, sind sie nur im Längsschnitt eindeutig zu identifizieren.

Die Anfertigung von PEG-Längsschnitten erwies sich mit Schlafmohnstängeln als äußerst schwierig. Häufig lösten sie sich während der Markierungsprozedur von den Objektträgern ab. Ein weiteres Problem der PEG-Schnitte war die Nachweisbarkeit der Kallose. Kallose lässt sich im Schlafmohn durch Anilinblaufärbung erst ab einer Schnittdicke von ca. 10 µm anfärben. Bei den 2 µm dicken PEG-Schnitten findet sich keine typische gelbgrüne Fluoreszenz. So wurden zunächst 10 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Im Längsschnitt besteht bei 10 µm dicken Schnitten jedoch das Problem, dass mehrere Zellschichten sich überlagern und Bilder mit guter Auflösung schwierig zu erhalten sind. Die besten Bilder waren schließlich mit 5-6 µm dicken Paraffinschnitten in Verbindung mit einem Antikörper gegen Kallose möglich. Dieser Antikörper macht eine Immunmarkierung von Kallose auch bei dünnen Schnitten möglich.

Abb. 23 zeigt eine Co-Lokalisation von MLP, 4'OMT und Kallose auf einem 6 µm dicken Paraffinschnitt. Allen drei Bildern liegt derselbe Schnitt zu Grunde, jedoch mit

unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommen. Daher kann auf die Lage von Siebröhren und Milchröhren in Abbildung A aus den beiden Aufnahmen B und C geschlossen werden. Deutlich zu lokalisieren sind zwei Siebröhren durch deren blau fluoreszierende Siebplatten (Bild B). Ebenso lässt sich eine Milchröhre lokalisieren, da der Latex durch die Markierung mit MLP-Antikörpern bei Grünanregung eine rote Fluoreszenz in Bild C zeigt. Die für 4'OMT spezifische grüne Fluoreszenz findet sich in drei Zellen neben der Milchröhre. Eine davon enthält auch gut sichtbar einen Zellkern (weißer Pfeil). Damit handelt es sich bei diesen Zellen mit Sicherheit nicht um Siebröhren. Ob es sich um Geleitzellen oder parenchymatische Zellen handelt, lässt sich an diesem Längsschnitt nicht mit Sicherheit sagen. Die Zelle mit Zellkern lässt jedoch aufgrund ihrer schmalen Form und dem geschnittenen Kern auf eine Geleitzelle schließen.

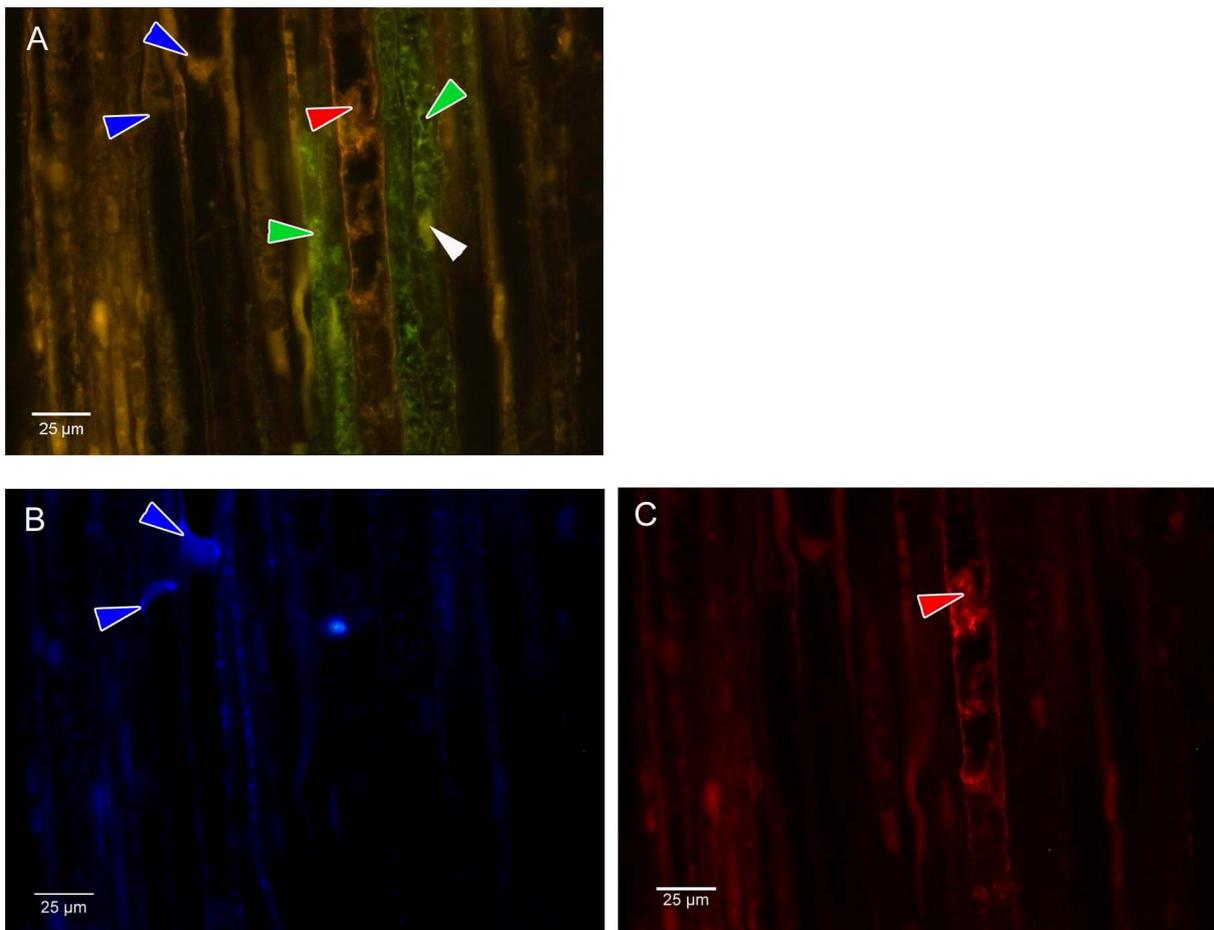


Abb. 23: Längsschnitt durch ein Leitbündel im Stängel, aufgenommen mit drei unterschiedlichen Anregungswellenlängen; Schnittdicke 6µm, Paraffineinbettung.

A: prim. Antikörper gegen 4'OMT, sek. Antikörper: Ziege gegen Kaninchen IgG konjugiert mit Alexa 488; grüne Pfeile bezeichnen Lokalisation der 4'OMT, der rote Pfeil eine Milchröhre, blaue Pfeile bezeichnen zwei Siebplatten, der weiße Pfeil einen Zellkern.

B: prim. Antikörper: monoklonaler Antikörper gegen Kallose (Maus), sek. Antikörper: Ziege gegen Maus-IgG konjugiert mit Alexa 350; blaue Pfeile zeigen zwei Siebplatten.

C: prim. Antikörper gegen MLP-15 (Meerschweinchen), sek. Antikörper: Ziege gegen Meerschweinchen-IgG konjugiert mit Alexa 568; der rote Pfeil zeigt eine Milchröhre.

3.4. Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase

Im Rahmen seiner Doktorarbeit wurde die SalAT von Torsten Grothe kloniert (Grothe *et al.* 2001). Für die heterologe Expression stellte mir Torsten Grothe das Plasmid SalAT in pGEM-T-easy freundlicherweise zur Verfügung.

3.4.1. Klonierung und heterologe Expression in *Escherichia coli*

Für die Überexpression in *E. coli* musste die SalAT in einen geeigneten Vektor kloniert werden. Dazu wurde sie durch PCR mit genspezifischen Primern amplifiziert und in den pCRT7/NT-TOPO-Vektor nach 2.2.1.3. ligiert. Dieser Vektor fügt einen *N*-terminalen His-Tag ein und ermöglicht eine Reinigung an Talon-Harz wie bereits beschrieben. Zur Überexpression wurde der Stamm *E. coli* BL21DE3 verwendet.

Die heterologe Expression in diesem Stamm und anschließende Reinigung an Talon ergab zwar eine Ausbeute an rekombinantem Protein von ca. 1,6 mg/l Kultur, die Aufreinigung an Talon (nach 2.2.3.2.) war jedoch nicht zufriedenstellend.

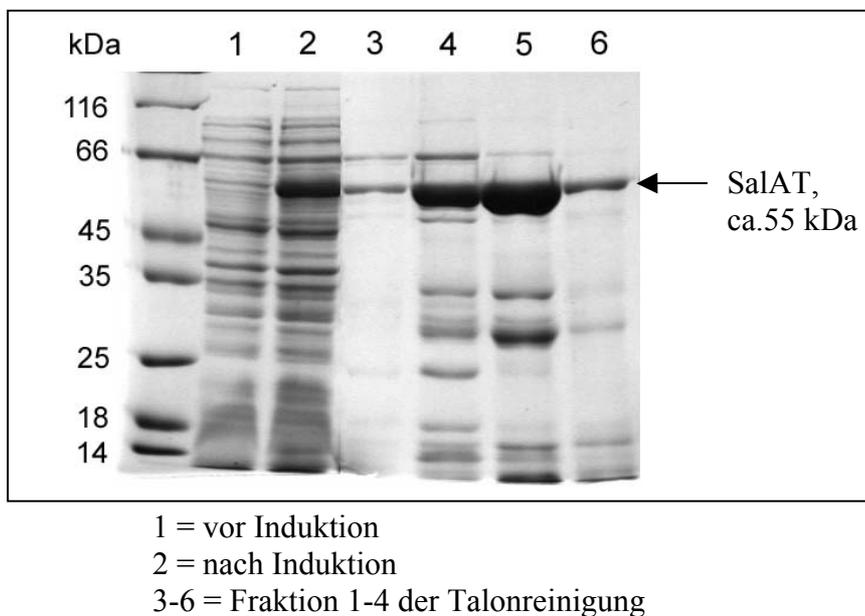
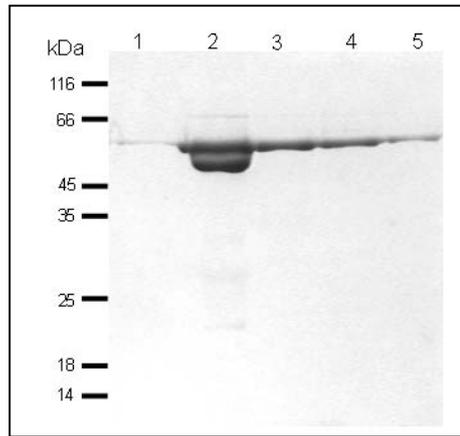


Abb. 24: SDS-Page der SalAT-Expression und Aufreinigung an Talon.

Daher wurde eine weitere Aufreinigung an einem nickelhaltigem Harz vorgenommen (Ni-NTA, nach 2.2.3.2.).



1-5 = Fraktion 1-5 der Ni-NTA Aufreinigung

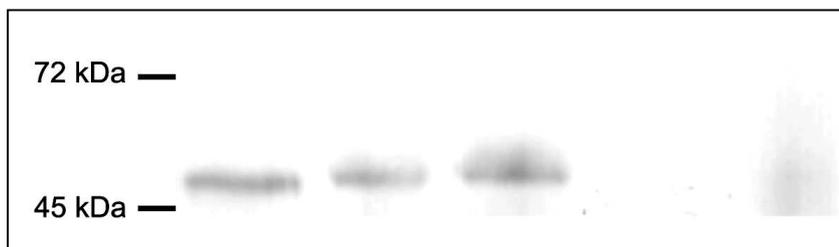
Abb. 25: Aufreinigung der SalAT an Ni-NTA, anschließend an die Aufreinigung an Talon.

Der Verlust an Protein betrug durch die zweite Aufreinigung 58%. Um 1 mg so gereinigtes rekombinantes Protein zu erhalten, mussten daher ca. 4 Liter Expressionskultur aufgereinigt werden. Dieses wurde in 20 mM Tris-HCl pH 7,0 umgepuffert und an Biogenes, Berlin, zur Antikörperherstellung in Kaninchen geschickt.

3.4.2. Western Blot

Die erhaltenen Antiseren wurden im Western Blot auf ihre Spezifität gegenüber SalAT getestet. Da das Antiserum mit der Nummer 3919 spezifischer war, wurde es für die weiteren Arbeiten verwendet.

Freie Bindungsstellen im Western Blot wurden mit 3% Milchpulver in TBST blockiert. Ein Western Blot mit dem Präimmunsereum zeigte kein Signal.



- 1 = Kapselextrakt
- 2 = Stängelextrakt, erste 4 cm unterhalb der Kapsel
- 3 = Stängelextrakt, nächste 4 cm
- 4 = Blattextrakt
- 5 = Wurzelextrakt

Abb. 26: Western Blot mit SalAT-Antikörper; jeweils 10 µg Gesamtprotein pro Spur wurden aufgetragen.

Die erwartete Molekülgröße beträgt 53 kDa, was durch den Western Blot bestätigt wurde. (Grothe *et al.* 2001). Die höchsten Proteinkonzentrationen bezogen auf das Gesamtprotein im jeweiligen Gewebe finden sich in der Kapsel und im oberen Stängel. Im Blatt kann kein SalAT-Protein nachgewiesen werden. In Wurzelextrakten kann das SalAT-Protein ebenfalls nicht eindeutig nachgewiesen werden.

3.4.3. Lokalisation der Salutaridinol-7-*O*-Acetyltransferase in der Kapsel und im Stängel

Die Immunlokalisation der SalAT wurde ebenfalls in der Kapsel begonnen. In Abb. 27 werden ähnliche Leitbündel dargestellt. Abb. 27 A zeigt die Co-Lokalisation von MLP und SalAT im großen Leitbündel der Kapsel. Die SalAT ist wie die 4'OMT im Phloem lokalisiert. Versuche mit dem Präimmunserum von SalAT zeigten keine Markierung (Abb. 27 C)

Abb. 27 B zeigt ein kleineres Leitbündel aus der Kapselwand. Hier wurden die in der Kapsel netzartig verlaufenden Milchröhren zum Teil längs getroffen. Dieser Schnitt zeigt, dass die SalAT im Phloem, jedoch nicht in den Milchröhren lokalisiert ist.

Abb. 27 C zeigt einen Querschnitt durch ein Stängelleitbündel. Hier sind weniger Zellen im Phloem markiert. Außerdem zeigen auch parenchymatische Xylemzellen eine schwache Fluoreszenz.

Verglichen mit der Lokalisation der 4'OMT zeigt die Lokalisation der SalAT kaum Unterschiede im Querschnitt. Beide Enzyme befinden sich im Phloem um die Milchröhren. Beide kommen offensichtlich nur in bestimmten Phloemzellen vor, beide finden sich nicht in jungen meristematischen Zellen.

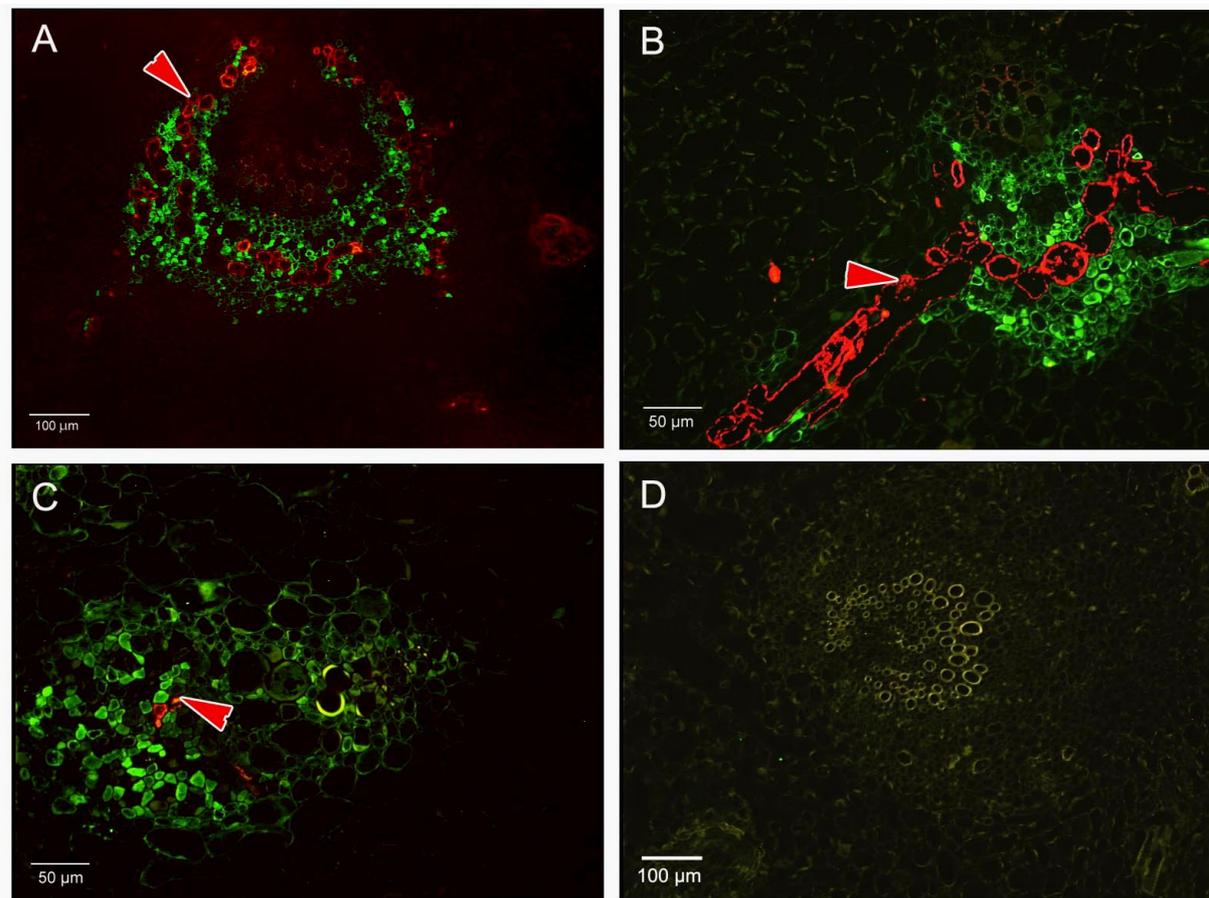


Abb. 27: Co-Lokalisation von MLP und SalAT (rote Pfeile: Milchröhren);
 A-C PEG-Einbettungen, 2 μm Schnittdicke; D Paraffineinbettung, 10 μm Schnittdicke;
 A: Querschnitt durch ein großes Leitbündel in der Kapsel
 B: Querschnitt durch ein kleines Leitbündel in der Kapselwand
 C: Querschnitt durch ein Stängelleitbündel
 D: Präimmunserum; Querschnitt durch ein Stängelleitbündel.

Um die Zelltypen im Phloem näher zu bestimmen waren jedoch wieder Stängellängsschnitte nötig. Abb. 29 zeigt zwei repräsentative Schnitte. Beide Schnitte sind 6 µm dicke Paraffinschnitte. Die Bilder A-C zeigen den ersten Schnitt mit den drei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Deutlich markiert sind die Milchröhre (roter Pfeil) und die Siebplatte (blauer Pfeil). Die SalAT ist in einer Zelle neben der Siebröhre lokalisiert (A, grüner Pfeil).

Abb. 29 D+E zeigen einen anderen Schnitt. Da sich in dem Ausschnitt keine Milchröhre befindet, erübrigt sich ein rotes Fluoreszenzbild. Auf Bild D ist deutlich zu erkennen, dass die SalAT in einer Geleitzelle lokalisiert ist. Die grün fluoreszierende, schmale Zelle mit einem geschnittenen Zellkern, die direkt neben einer Siebröhre liegt, ist eine Geleitzelle (grüner Pfeil in Bild D) (Abbildung nächste Seite).

Nach Grothe (2002) enthält die SalAT keine erkennbaren Signalsequenzen für den Transport in Zellorganellen oder für die Verankerung in Membranen. Eine subzelluläre Lokalisation der SalAT im Cytosol lässt sich an den in Abb. 29 gezeigten Längsschnitten gut erkennen. Deutlicher wird die Lokalisation in Paraffinschnitten der Kapsel mit höherer Vergrößerung.

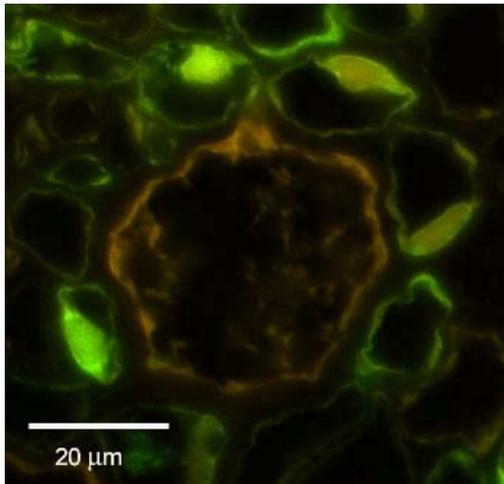


Abb. 28: Querschnitt durch SalAT-markierte Zellen, die um eine Milchröhre lokalisiert sind. Deutlich zu erkennen ist der fluoreszierende Cytoplasmasaum.

Latex zeigt in dickeren Paraffinschnitten eine orange-braune Autofluoreszenz.

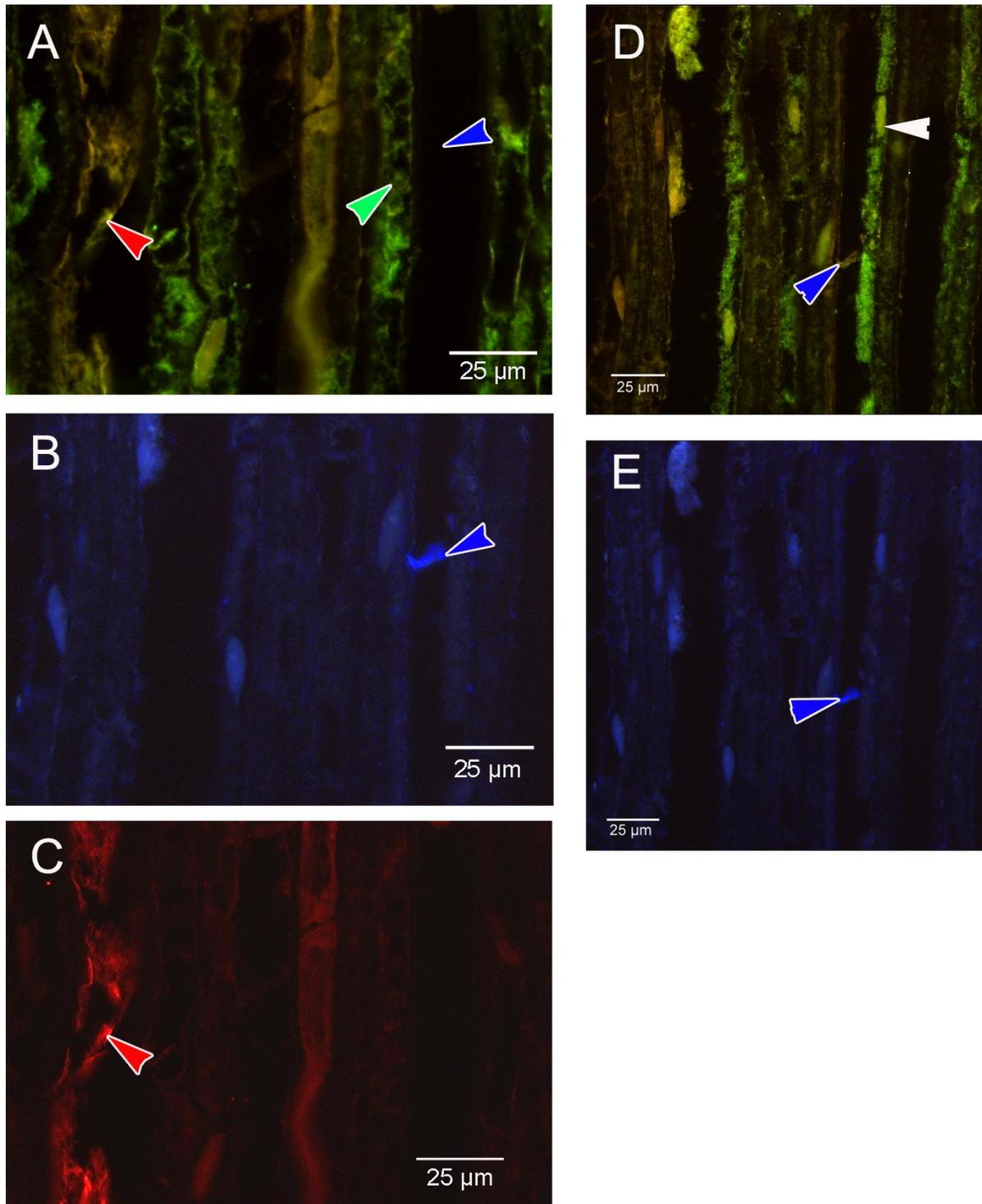


Abb. 29: Längsschnitt durch ein Stängelleitbündel; Paraffineinbettung, Schnittdicke 6 μm ;
 A-C: Colokalisation von SalAT (A), sek. Antikörper Alexa 488; Kallose (B), sek. Antikörper Alexa 350; und MLP (C), sek. Antikörper Alexa 568;
 D+E: Colokalisation von SalAT (D) und Kallose (E) auf einem weiteren Stängellängsschnitt
 Blaue Pfeile bezeichnen Siebplatten, rote Pfeile Milchröhren und grüne Pfeile auf SalAT-markierte Zellen

3.4.4. Vergleich der Lokalisation von 4'OMT und SalAT

Wie die Stängel- und Kapselschnitte zeigen, sind die beiden Enzyme in den gleichen Geweben lokalisiert. Um zu überprüfen, ob es sich dabei genau um dieselben Zellen handelt, wurden Parallelschnitte eines Stängelleitbündels angefertigt und mit Anti-SalAT bzw. Anti-4'OMT immunmarkiert.

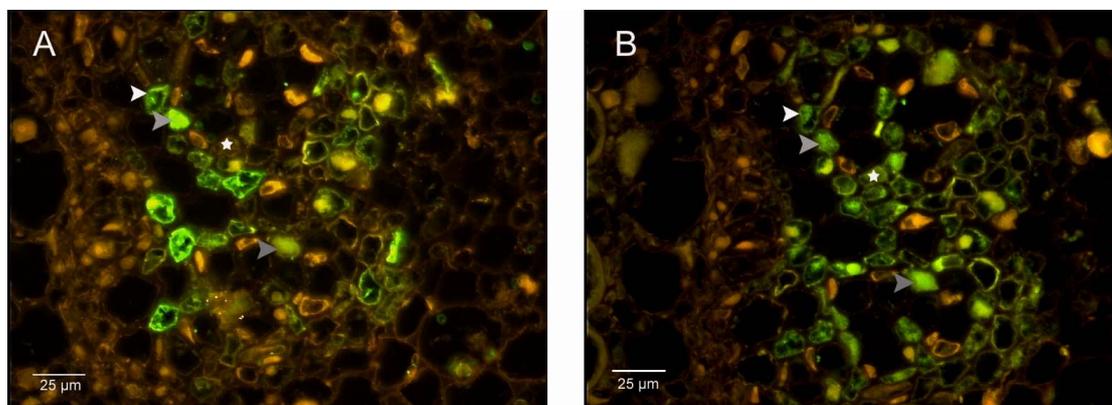


Abb. 30: A: Immunmarkierung mit Anti-4'OMT
 B: Immunmarkierung mit Anti-SalAT
 Weiß bis graue Pfeile zeigen auf gleiche, markierte Zellen
 Mit einem Stern bezeichnet ist eine Zelle, die nur mit Anti-SalAT markiert ist

Wie aus den Parallelschnitten ersichtlich, handelt es sich um die gleichen Zellen, die sowohl mit Anti-SalAT und Anti-4'OMT markiert werden. In einigen zusätzlichen Zellen ist nur die SalAT lokalisiert.

3.4.5. Lokalisation der Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase in der Wurzel

Die Wurzel des Schlafmohns erwies sich als ein schwierig zu schneidendes Gewebe. Außerdem hafteten die Schnitte nur schlecht auf den Objektträgern und lösten sich während des Markierungsprozesses häufig ab.

In Wurzelspitzen vor der Differenzierung in Zentralzylinder und Rinde war keine SalAT nachzuweisen.

Mit der Differenzierung in Zentralzylinder und Rinde entsteht auch das Perizykel, ein einschichtiges Gewebe zwischen Rinde und Zentralzylinder. In diesem Stadium der Differenzierung war die SalAT im Perizykel lokalisiert (Abb. 31 A).

Im Laufe der Wurzelentwicklung verschob sich die Lokalisation der SalAT. In älteren Wurzeln bilden sich Zellen, die mit Latex gefüllt sind, jedoch nicht zu einem Milchröhrensystem fusionieren. Diese Latex-enthaltenden Idioblasten werden im Folgenden als Milchröhrenglieder bezeichnet und bilden sich im sekundären Phloem. Die SalAT ist in diesem Stadium der Wurzelentwicklung in Zellen lokalisiert, die neben den Milchröhrengliedern liegen (Abb. 31 B).

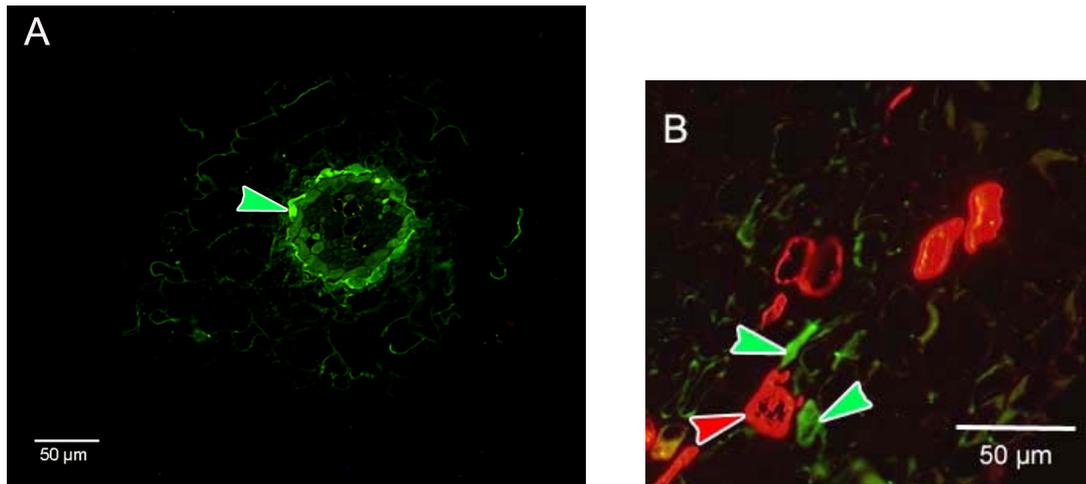


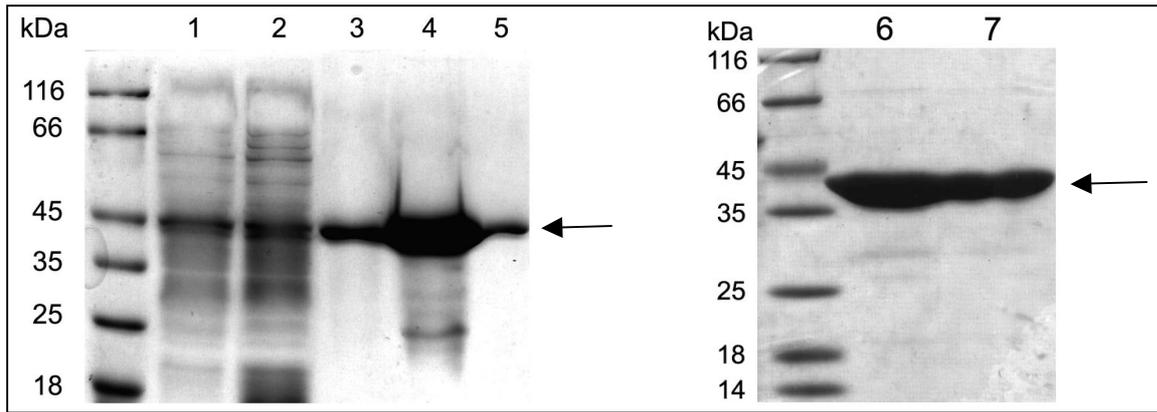
Abb. 31: A: Junge Wurzel am Anfang der Differenzierungszone, markiert mit SalAT-Antikörper; grüner Pfeil: Perizykel.
 B: Co-Lokalisation von MLP und SalAT auf einer älteren Wurzel
 Grüne Pfeile: mit SalAT markierte Zellen; rote Pfeile: Milchröhrenglieder.

3.5. Codeinon-Reduktase

3.5.1. Klonierung und heterologe Expression in *Escherichia coli*

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde mir die COR 1.1 in pPOP-Vektor von Susanne Frick zur Verfügung gestellt. Da die weiteren Isoformen zur Cor 1.1 eine Übereinstimmung auf Aminosäureebene von 95% (Cor 1.2) bzw. 96% (Cor 1.3-1.4) zeigen, ist anzunehmen, dass Antikörper gegen Cor 1.1 auch diese weiteren Isoformen erkennen.

Cor 1.1 wurde mit genspezifischen Primern durch PCR amplifiziert und in den pCRT7/NT-TOPO-Vektor nach 2.2.1.3 ligiert. Das entstandene Konstrukt wurde zur Kontrolle sequenziert und anschließend der Expressionsstamm *E. coli* BL21DE3 damit transformiert. Die heterologe Expression und anschließende Reinigung an Talon-Harz wurde nach 2.2.3.2. durchgeführt. Die Ausbeute an rekombinantem Protein betrug etwa 2 mg/l Kultur. Die Fraktionen 1-2 wurden vereinigt und über eine PD10-Säule in 20 mM Tris-HCl pH 7,0 umgepuffert. Die erhaltenen Extrakte wurden auf einem SDS-Gel überprüft (Abb. 32, Spur 6+7).

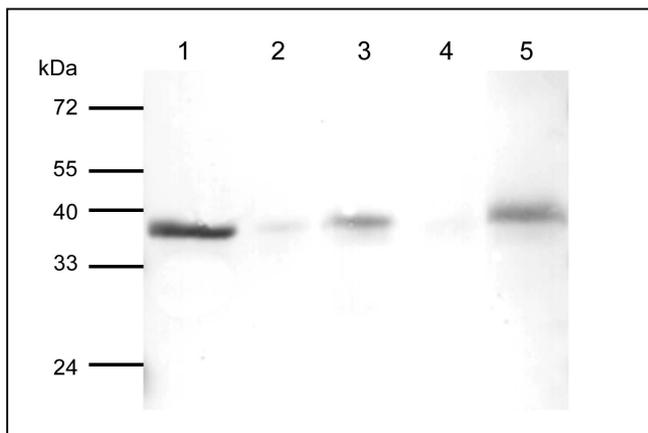


- 1 = vor Induktion
- 2 = nach Induktion
- 3 = Fraktion 1 der Talonaufarbeitung
- 4 = Fraktion 2 der Talonaufarbeitung
- 5 = Fraktion 3 der Talonaufarbeitung
- 6+7 = für die Antikörperherstellung verwendeten vereinigten und in 20 mM Tris-HCl pH 7,0 umgepufferte COR 1.1 Fraktionen.

Abb. 32: SDS-Page der Aufarbeitung von COR 1.1 in pCRT7/NT-TOPO in B121DE3.

3.5.2. Western Blot

Die erhaltenen Antiseren wurden durch Western Blots auf ihre Spezifität getestet. Der unten gezeigte Western Blot wurde nach 2.2.3.7. durchgeführt. Freie Bindungsstellen mit 3% Milchpulver in TBST geblockt und der erste Antikörper in der Verdünnung 1:500 verwendet. Da sich das Serum mit der Tiernummer 4283 als spezifischer erwies, wurde es für alle weiteren Arbeiten verwendet. Mit Präimmunserum erhielt man im Western Blot kein Signal.



- 1 = Kapselextrakt
- 2 = Stängelextrakt, erste 4 cm unterhalb der Kapsel
- 3 = Stängelextrakt, nächste 4 cm
- 4 = Blattextrakt
- 5 = Wurzelextrakt

Abb. 33: Western Blot mit COR-Antikörper, jeweils 10 µg Gesamtprotein pro Spur wurden aufgetragen.

Die Molekülgröße der COR im Western Blot entspricht den errechneten 35 kDa. Der Antikörper ist spezifisch und zeigt keine Kreuzreaktionen. Die höchste Menge der Codeinon-Reduktase ist in der Kapsel zu finden, danach folgt die Konzentration in Stängel und Wurzel. Selbst im Blatt lässt sich die COR nachweisen. Damit unterscheidet sie sich geringfügig von der 4'OMT und SalAT, deren Banden in Kapsel und Stängel ungefähr gleich stark waren und die in der Wurzel kaum, im Blatt nicht nachweisbar waren.

3.5.3. Lokalisation der Codeinon-Reduktase in der Kapsel und im Stängel

Um einen Vergleich mit den beiden vorangegangenen Enzymen 4'OMT und SalAT zu ermöglichen, wurden für die Immunlokalisation der COR wieder ähnliche Leitbündel herangezogen und sowohl mit MLP-Antikörpern und COR-Antikörpern behandelt.

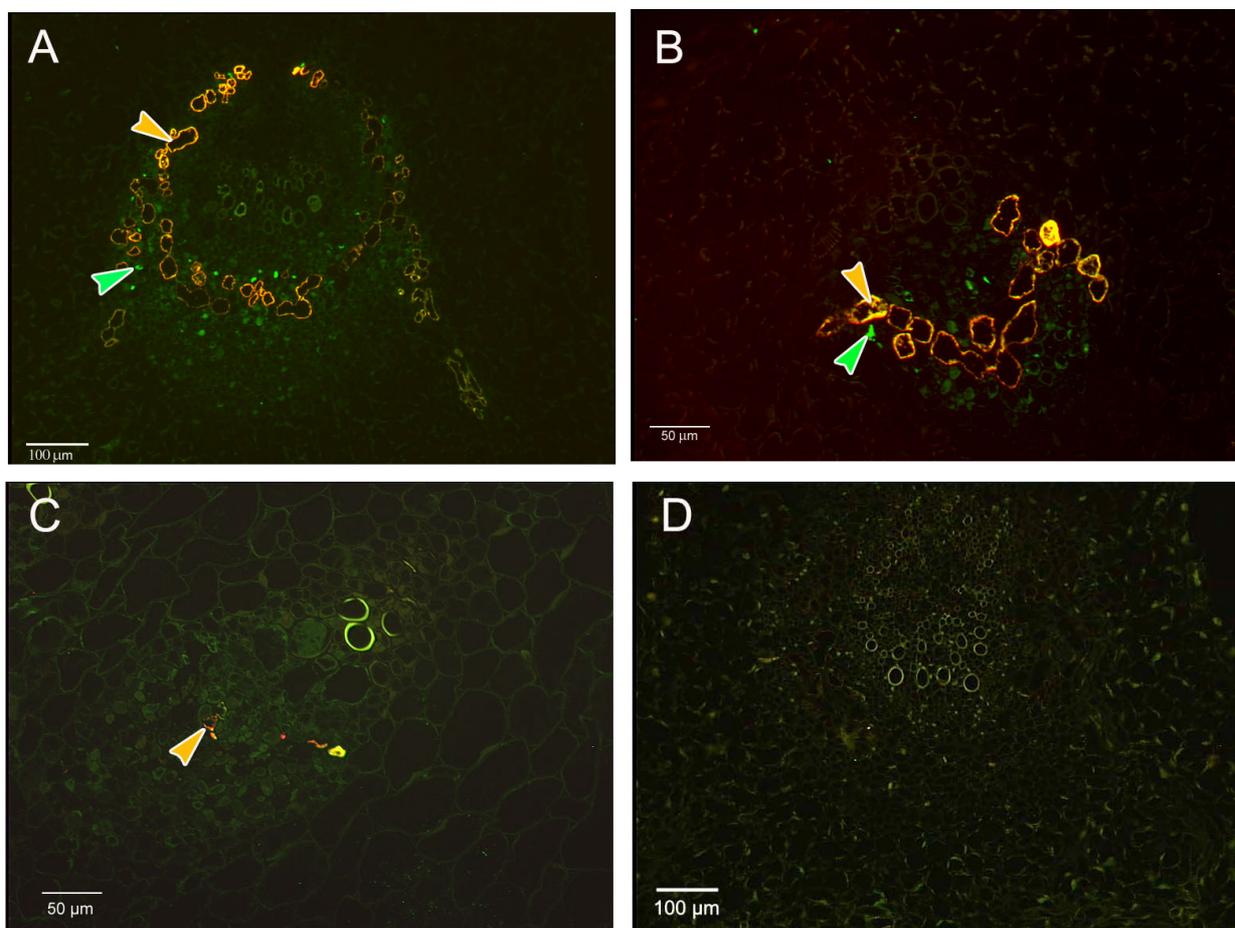


Abb. 34: Co-Lokalisation von MLP und COR, A-C PEG-Schnitte, Schnittdicke 2 µm, D Paraffinschnitt, Schnittdicke 10 µm; orangefarbene Pfeile bezeichnen Zellen mit COR- und MLP-Markierung, grüne Pfeile zeigen COR-Markierung.
 A: Querschnitt durch ein großes Leitbündel in der Kapsel.
 B: Querschnitt durch ein kleines Leitbündel in der Kapselwand.
 C: Querschnitt durch ein Stängelleitbündel.
 D: Präimmunserum; Querschnitt durch ein großes Kapselleitbündel.

Abb. 34 A zeigt ein großes, konzentrisches Leitbündel der Kapsel. Bei dieser Abbildung wurden wieder die Bilder mit roter und grüner Fluoreszenz übereinander gelegt. Da die Milchröhren sowohl durch den MLP-Antikörper rot fluoreszieren, als auch grün durch den COR-Antikörper, entsteht durch Addition der beiden Bilder eine orangefarbene Fluoreszenz. Auch bei Abbildung B und C entsteht die orangefarbene Fluoreszenz durch Überlagerung. Alle drei Abbildungen zeigen deutlich, dass die COR in den Milchröhren lokalisiert ist. Abb. 34 D zeigt die Kontrolle der Markierung mit dem Präimmunserum der COR-Antikörper. Das Präimmunserum zeigt keine unspezifischen Bindungen. In den beiden Kapselleitbündeln (Abb. 34 A und B) sind einige wenige weitere Zellen im Phloem mit dem COR-Antikörper markiert (grüne Pfeile). Zur Verdeutlichung wird in Abb. 35 eine Detailansicht aus der Kapsel in größerer Vergrößerung gezeigt. Am Beispiel dieser Vergrößerung wird gezeigt, dass die orangefarbene Fluoreszenz durch Addition der beiden Einzelbilder entsteht. Bild A und B wurden zu Bild C addiert. A zeigt die rote Fluoreszenz, die durch Markierung mit dem MLP-Antikörper entsteht, B zeigt die grüne Fluoreszenz, die durch Markierung mit dem COR-Antikörper entsteht. Dagegen ist die COR im Stängel ausschließlich in den Milchröhren lokalisiert. Dies wurde auch durch später folgende Längsschnitte bestätigt, bei denen im Stängel neben den Milchröhren keine weiteren Zellen markiert wurden (Abb. 36).

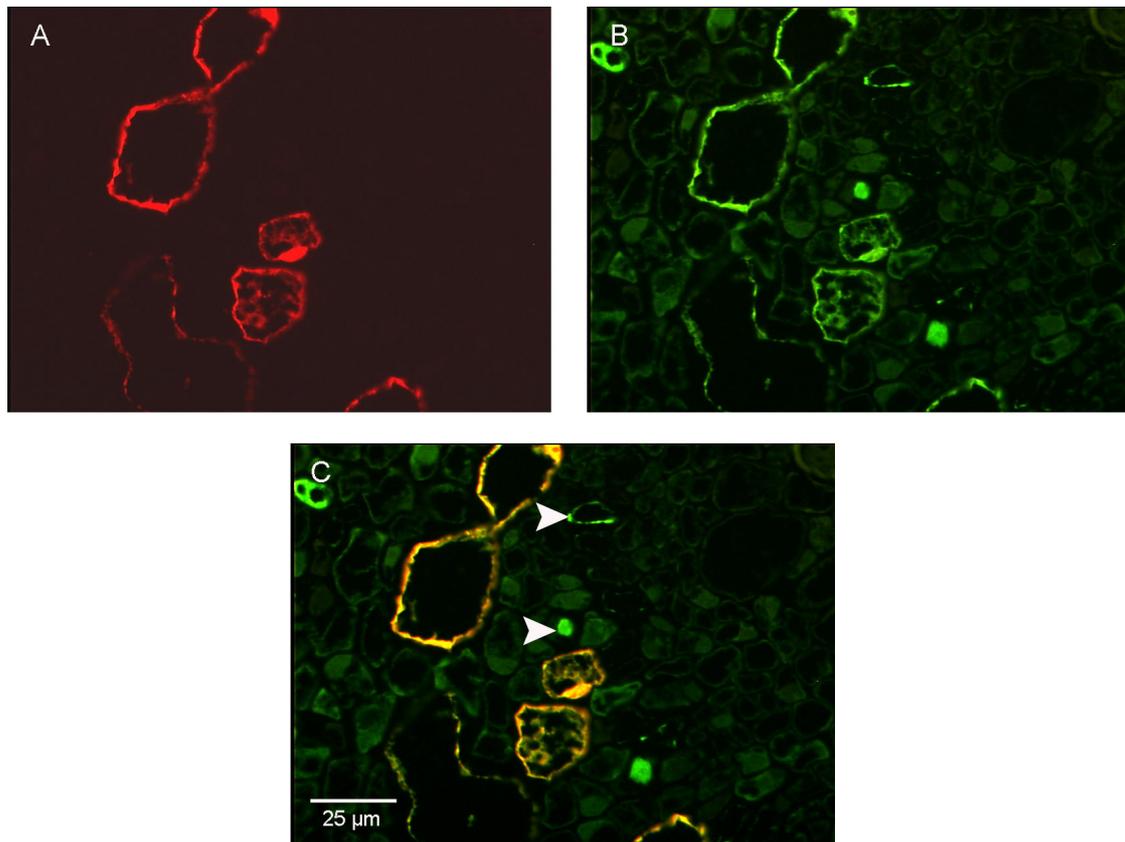


Abb. 35: Detailansicht von Phloemgewebe aus der Kapsel; PEG-Schnitt, 2µm;
 A: Immunmarkierung mit MLP-Antikörpern, sek. Antikörper: Alexa 568 Ziege gegen Meerschweinchen; Milchröhren erscheinen mit roter Fluoreszenz.
 B: Immunmarkierung desselben Schnittes mit COR-Antikörper, sek. Antikörper: Alexa 488 Ziege gegen Kaninchen.
 C: Überlagerung der beiden Bilder A und B; grüne und rote Fluoreszenz addiert sich zu oranger Fluoreszenzfarbe; weiße Pfeile bezeichnen zwei nur mit COR-Antikörpern markierte Zellen.

Obwohl bei der Lokalisation der COR in den Querschnitten bereits klar gezeigt werden konnte, dass es sich bei den markierten Zellen im Stängel und in der Kapsel hauptsächlich um Milchröhren handelt, wurden ebenso wie für die beiden vorangegangenen Enzyme Stängellängsschnitte aufgenommen (Abb. 36).

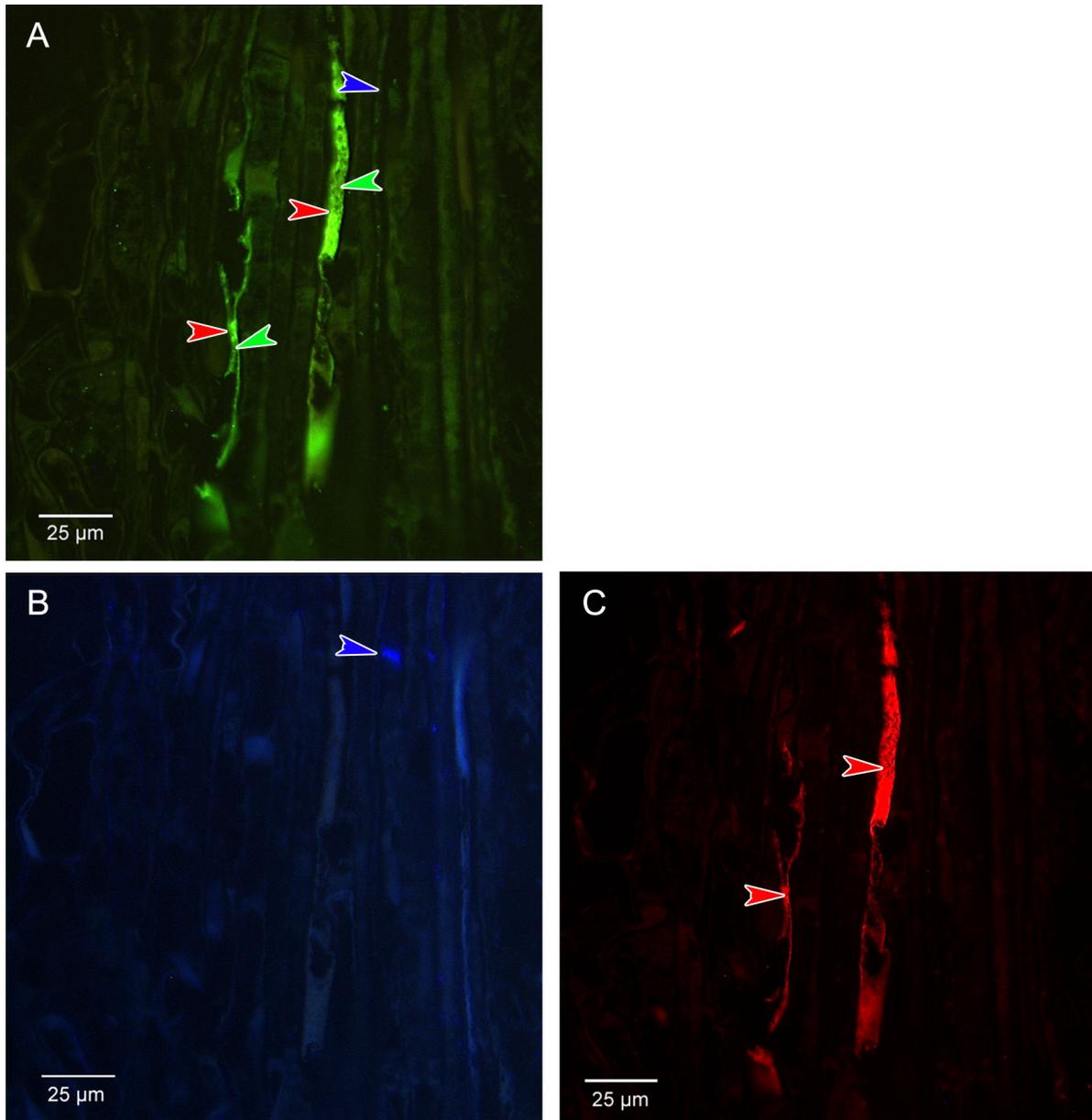


Abb. 36: Längsschnitt durch ein Leitbündel im Stängel, aufgenommen mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzwellenlängen; Paraffineinbettung; Schnittdicke 6 µm.

- A: prim. Antikörper gegen COR, sek. Antikörper: Ziege gegen Kaninchen IgG konjugiert mit Alexa 488; grüne Pfeile bezeichnen Lokalisation der COR, der blaue Pfeil bezeichnet eine Siebplatte, rote Pfeile zwei Milchröhren
- B: prim. Antikörper: monoklonaler Antikörper gegen Kallose (Maus), sek. Antikörper: Ziege gegen Maus konjugiert mit Alexa 350; blauer Pfeil zeigt eine Siebplatte.
- C: prim. Antikörper gegen MLP-15 (Meerschweinchen), sek. Antikörper: Ziege gegen Meerschweinchen IgG konjugiert mit Alexa 568; rote Pfeile bezeichnen zwei Milchröhren.

Da es sich bei diesen drei Aufnahmen um denselben Schnitt handelt, lassen sich mit den verschiedenen Antikörpern die Siebröhren und die Milchröhren lokalisieren. Wie aus Abb. 36 A ersichtlich, ist die COR ausschließlich in Milchröhren lokalisiert. In Siebröhren oder Geleitzellen konnte keine COR nachgewiesen werden.

3.5.4. Lokalisation der Codeinon-Reduktase in der Wurzel

Zur Lokalisation von COR wurden ebenfalls Immunmarkierungen von verschiedenen Wurzelstadien ausgeführt. Dabei zeigte sich, dass Wurzelspitzen und dünnere Wurzeln noch keine Zellen enthielten, die sich mit MLP-Antikörpern markieren ließen. Das Auftreten von Milchröhrengliedern ist erst bei dickeren Wurzeln zu beobachten. Diese Zellen lassen sich ebenso mit COR-Antikörpern markieren (Abb. 37) und liegen im sekundären Phloem, zumeist an der Grenze zur Rinde. Der Nachweis von Codeinon-Reduktase in den Wurzeln ist an das Auftreten dieser Milchröhrenglieder gebunden.

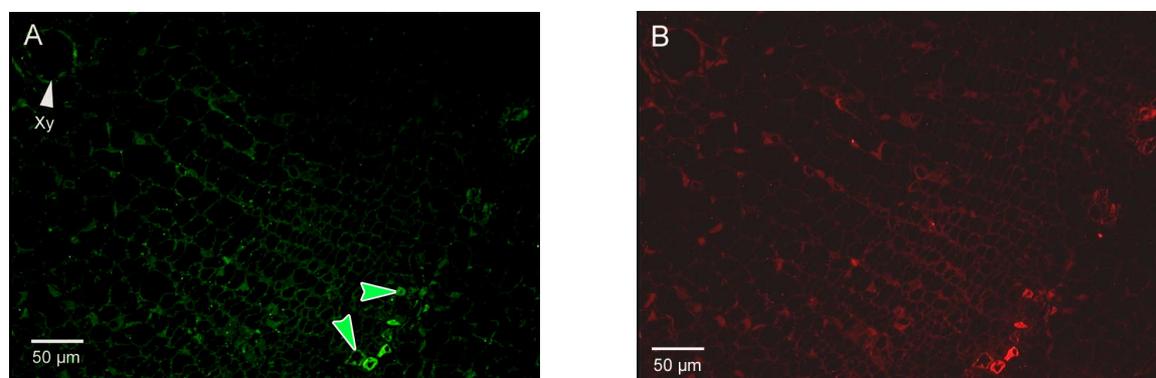


Abb. 37: Co-Lokalisation von COR und MLP in einer ausdifferenzierten, dicken Wurzel; die Abbildung zeigt einen Ausschnitt, in der oberen linken Ecke sind Xylemgefäße zu erkennen, am rechten Rand liegt das Rindenparenchym; PEG-Einbettung, Schnittdicke 2 µm.

A: Lokalisation von COR in einzelnen, im Phloem liegenden Zellen (grüne Pfeile); Xy = Xylem.

B: Lokalisation von MLP in denselben Zellen.

3.5.5. Lokalisation der Codeinon-Reduktase-mRNA durch *in situ*-Hybridisierung

Die Immunlokalisation der COR zeigte, dass das Enzym fast ausschließlich im Milchröhren vorkommt. Es stellt sich die Frage, ob die COR in den umliegenden Zellen gebildet wird und in die Milchröhren transportiert wird, oder ob die Synthese der COR in Milchröhren stattfindet. Zur Klärung dieser Fragen sollte die *cor*-mRNA im Gewebe lokalisiert werden.

Dies ist durch eine *in situ*-Hybridisierung möglich. Diese Methode dient dem Nachweis der mRNA im Gewebe, also „*in situ*“. Leider handelt es sich bei dieser Methode um keine Routinemethode. Für jede Versuchsanordnung müssen die verschiedenen Bedingungen neu ausgetestet werden. Im Schlafmohn erwies sich der Farbnachweis mit NBT/BCIP als schwierig. Häufig verlief der Farbnachweis in antisense und sense-Probe gleich schnell, was auf endogene Phosphatasen schließen lässt. Da es sich um eine zeitaufwändige Methode handelt, konnten zwar nach einigen Durchführungen erste Ergebnisse erhalten werden, zu einer weiteren Optimierung der Methode war jedoch nicht mehr genügend Zeit vorhanden. Insbesondere das Hintergrundsignal müsste noch weiter unterdrückt werden.

Zur Herstellung der Sonden wurde eine 800 bp–Teilsequenz der COR in pGem-T-easy verwendet. Durch *in vitro*–Transkription mit den entsprechenden RNA-Polymerasen in Gegenwart von Fluorescein-markierten Nukleotiden wurden markierte sense- und antisense RNA-Sonden hergestellt (nach 2.2.2.2.) und durch alkalische Hydrolyse auf ca. 400 bp abgebaut. Die Sonden wurden nach 2.2.5.3. quantifiziert und zur Hybridisierung 100 ng Sonde pro Objektträger verwendet.

Die Hybridisierung wurde nach 2.2.5.4. durchgeführt, die BCIP/NBT-Färbung wurde nach 2–3 h abgestoppt.

Das in Abb. 38 gezeigte Ergebnis deutet auf eine Expression der *cor*-RNA in Geleitzellen hin. Sie befinden sich im Phloem und sind ihrer Form nach schmale Zellen, die um eine Siebröhre herum angeordnet sind (violette Pfeile). Der schwarze Pfeil in Abb. 38 A zeigt eine Milchröhre, die ebenfalls eine violette Färbung aufweist. Ob auch mRNA im Latex nachzuweisen ist, ist aufgrund dieser Ergebnisse schwer zu entscheiden. Latex ist selbst optisch dicht und erscheint in lichtmikroskopischen Aufnahmen bräunlich gefärbt. Zwar erscheint er im antisense-Bild etwas violetter, was auf eine NBT/BCIP-Färbung hinweist, dieser geringe Farbunterschied ist jedoch schwer zu beurteilen. Um die Anwesenheit von *cor*-mRNA im Latex zweifelsfrei nachzuweisen, müsste man auf ein anderes Detektionssystem ausweichen. Erste Versuche, die Fluorescein-markierten Sonden im Fluoreszenzlicht direkt zu detektieren waren erfolglos. Möglicherweise muss man bei diesem System höhere Sondenkonzentrationen und andere Hybridisierungsbedingungen wählen. Ein weiteres Problem dieses Systems könnte darin bestehen, dass die Menge an vorhandener RNA für eine Detektion nicht ausreicht, da die Signalverstärkung durch den Antikörper gegen das Markermolekül entfällt.

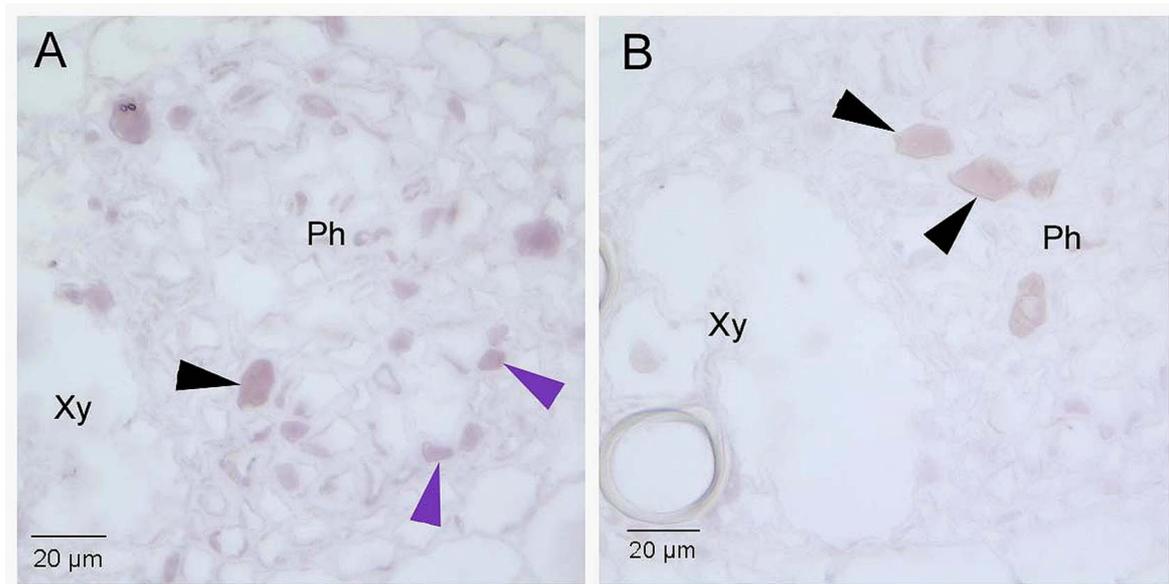


Abb. 38: *In situ*-Hybridisierung mit *cor*-sense und antisense Sonden

Xy = Xylem, Ph = Phloem.

A: antisense-Sonde; Milchröhren, die mit Latex gefüllt sind, zeigen eine violette Färbung (schwarzer Pfeil); Geleitzellen sind ebenfalls violett gefärbt (violette Pfeile).

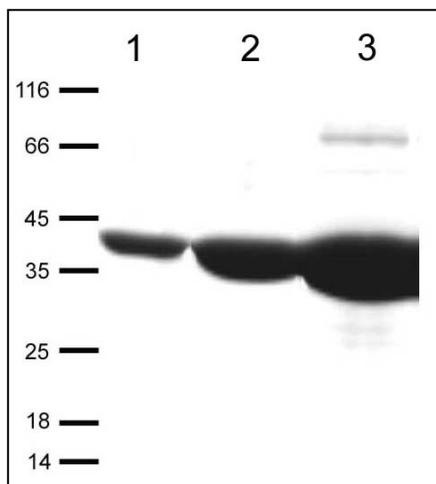
B: sense-Sonde (Negativkontrolle); die mit Latex gefüllten Milchröhren zeigen eine deutliche Färbung, die aber bräunlicher erscheint wie bei der antisense – Sonde. Die bräunliche Farbe entspricht der Eigenfärbung des Latex (schwarze Pfeile).

3.6. (R,S)-Retikulin-7-O-Methyltransferase

3.6.1. Klonierung und heterologe Expression in *Escherichia coli*

Das *7omt*-Gen wurde bereits in dem Expressionsvektor pHIS8 zur Verfügung gestellt. Dieser Vektor fügt dem Protein *N*-terminal acht Histidin an. Dies führt zu einer höheren Affinität an Talon-Harz als Proteine mit dem sonst üblichen 6 x His-Tag. Eine höhere Affinität würde stringenteren Waschschritte erlauben und die Reinheit des exprimierten Proteins erhöhen. Davon wurde jedoch im vorliegenden Fall kein Gebrauch gemacht.

Für die heterologe Expression der 7OMT wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21DE3 gewählt und die Überexpression nach 2.2.3.2. durchgeführt. Die Induktion erfolgte über Nacht bei 28 °C. Die Ausbeute an 7OMT-Protein war hoch und betrug bis zu 4 mg/l Kultur.

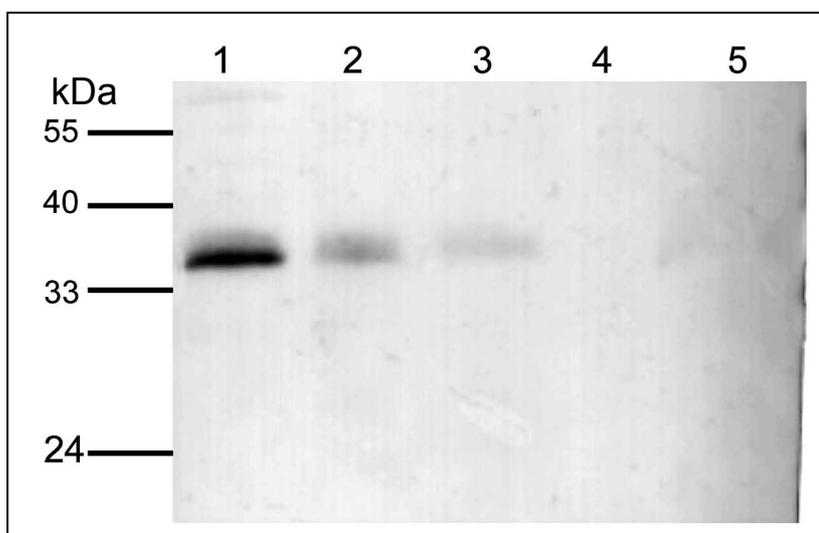


1 = Fraktion 1 der Talonreinigung
2 = Fraktion 2 der Talonreinigung
3 = Fraktion 3 der Talonreinigung

Abb. 39: SDS-Page der heterologen Expression der 7OMT in *E. coli*

3.6.2. Western Blot

Die erhaltenen Antiseren wurden wiederum durch Western Blots getestet. Dabei stellte sich heraus, dass das Immuneserum mit der Tiernummer 4507 eine bessere Immunreaktion zeigte. Es wurde daher für die weiteren Arbeiten verwendet. Die Durchführung des Western Blots erfolgte nach 2.2.3.7.. Dabei wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit 4% Milchpulver in TBST-Puffer geblockt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:500 in 4% Milchpulver/TBST verwendet. Ein Western Blot mit Präimmuneserum zeigte keine Banden.



- 1 = Kapselextrakt
- 2 = Stängelextrakt, erste 4 cm unterhalb der Kapsel
- 3 = Stängelextrakt, weitere 4 cm
- 4 = Blattextrakt
- 5 = Wurzelextrakt

Abb. 40: Western Blot mit 7OMT-Antikörper; 10 µg Gesamtprotein pro Spur wurden aufgetragen

Die erwartete Molekülgröße beträgt 39 kDa. Dies entspricht in etwa der beobachteten Molekülgröße im Western Blot.

Das stärkste Signal im Western Blot ist in der Kapsel zu beobachten. Schwächere Banden zeigen sich in den Stängelextrakten, dabei nimmt die Intensität der Banden von oben nach unten im Stängel ab. Im Blatt kann kein Protein detektiert werden. Hier ist aber zu bedenken, dass Proteinextrakte der Blätter sehr hohe Mengen an Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase) enthalten und daher die Konzentration weiterer Proteine gering ist. Eine sehr schwache Bande ist im Wurzelextrakt zu beobachten.

3.6.3. Lokalisation der (*R,S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase in der Kapsel und im Stängel

Um einen Vergleich mit der Lokalisation der anderen biosynthetischen Enzyme zu ermöglichen wurden Querschnitte von ähnlichen Leitbündeln in der Kapsel und im Stängel angelegt. Wie Abb. 41 A-C zeigt, ist die 7OMT ebenfalls im Phloem lokalisiert. In den Milchröhren ist keine Markierung nachzuweisen, sie erscheinen durch die Markierung mit MLP-Antikörper rot (rote Pfeile).

Das große Leitbündel der Kapsel wurde, wie in den vorangegangenen Abbildungen so fotografiert, dass das Innere der Kapsel zur Oberkante des Bildes orientiert ist. Damit zeigt sich, dass die Markierung der 7OMT im nach außen liegenden Phloem liegt, außerhalb des Halbkreises, auf dem die Milchröhren liegen (A, grüner Pfeil). Dieselbe distale Anordnung der Lokalisation findet sich in einem Leitbündel der Kapselwand.

Allerdings kann man eine solche Anordnung im Stängel nicht beobachten. Hier gleicht das Lokalisationsmuster den beiden Enzymen 4'OMT und SalAT. Alle drei Enzyme finden sich in bestimmten Zellen des Phloems. Milchröhren sind im Stängel eher im Phloem verstreut und weniger häufig (Abb. 41 C).

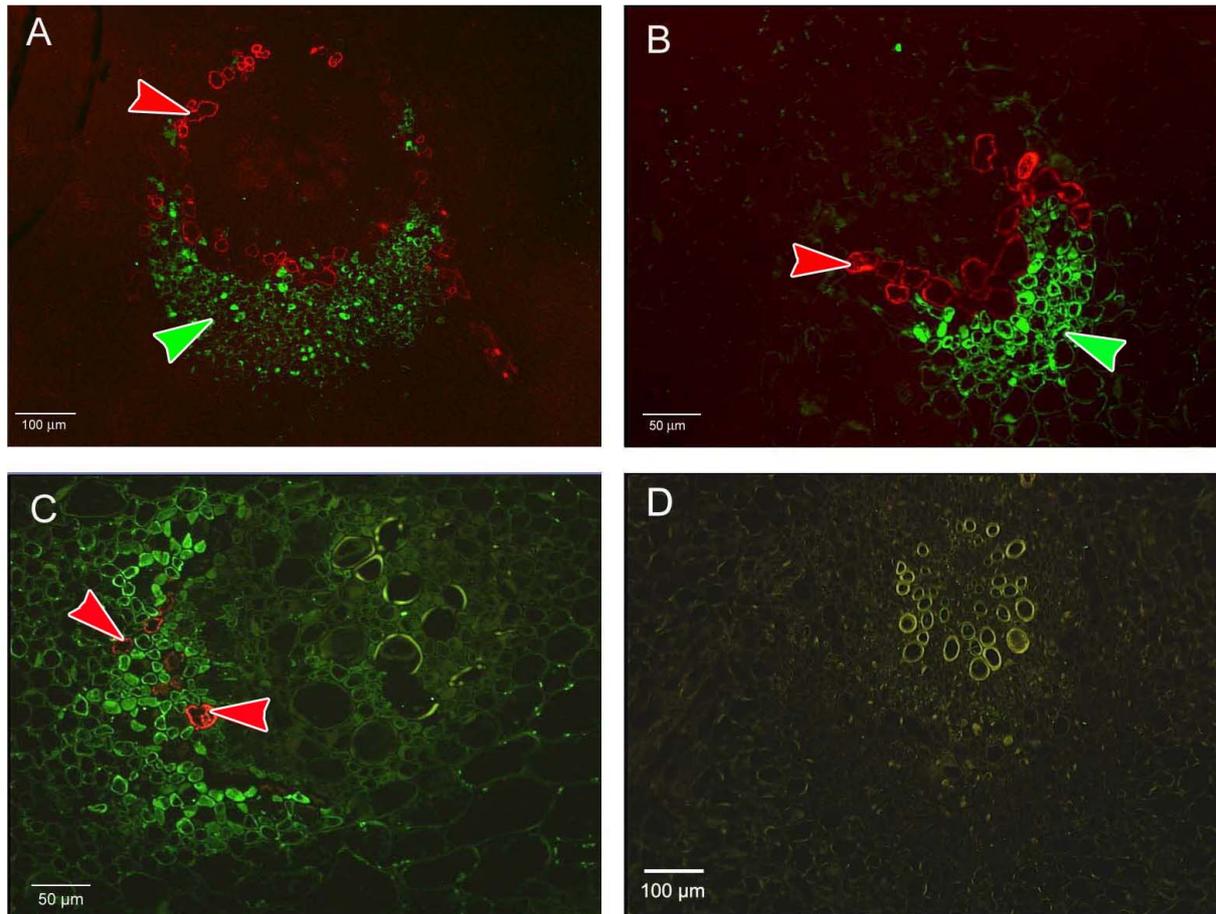


Abb. 41: PEG-Schnitte, Schnittdicke $2\mu\text{m}$ durch Kapsel- und Stängelleitbündel;
 A-C: Markierung mit MLP-Antikörper, sek. Antikörper Alexa 568 (rote Fluoreszenz, rote Pfeile), Markierung mit 7OMT-Antikörper, sek. Antikörper Alexa 488 (grüne Fluoreszenz, grüne Pfeile).
 A: Querschnitt durch ein konzentrisches Leitbündel der Kapsel.
 B: Querschnitt durch ein kleines Leitbündel der Kapselwand.
 C: Querschnitt durch ein Stängelleitbündel.
 D: Markierung mit Präimmenserum, sek. Antikörper: Alexa 488; Querschnitt durch ein großes Kapselleitbündel, Paraffinschnitt, Schnittdicke $10\mu\text{m}$.

Um die markierten Zellen näher zu charakterisieren, wurden Längsschnitte des Stängelleitbündels angefertigt. Bei der folgenden Abb. 42 handelt es sich um PEG-Längsschnitte.

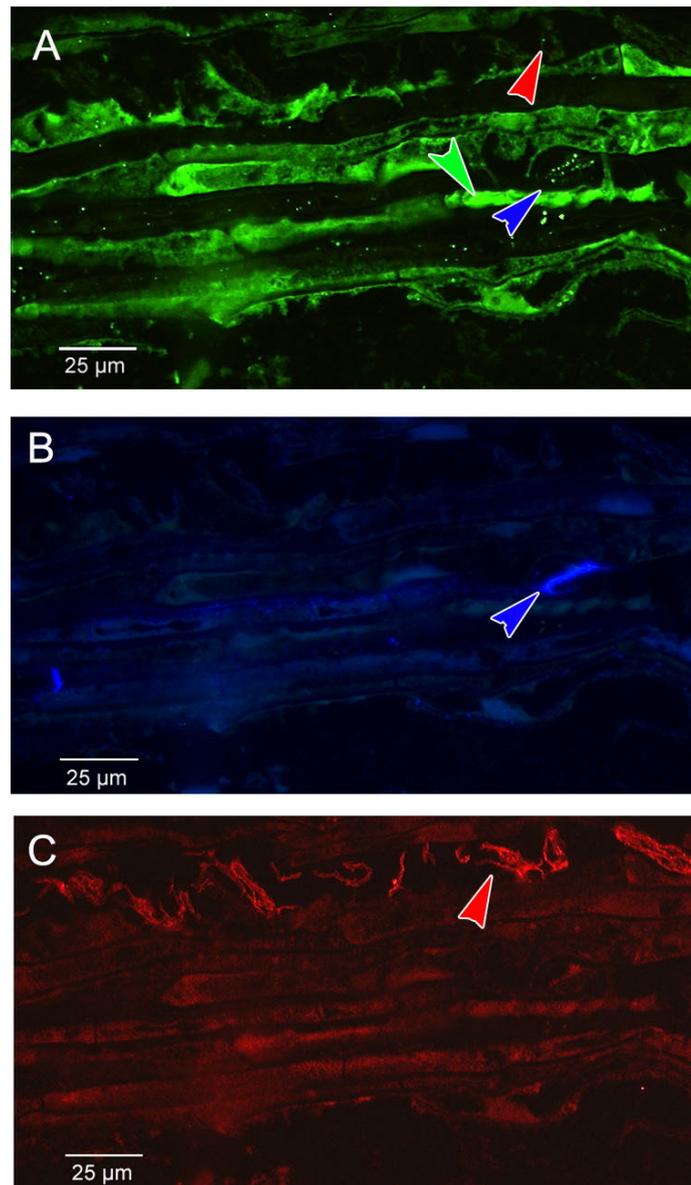


Abb. 42: Längsschnitt durch ein Stängelleitbündel; alle drei Abbildungen wurden mit drei unterschiedlichen Anregungswellenlängen fotografiert. Grüner Pfeil: 7OMT, roter Pfeil: Milchröhre, blauer Pfeil: Siebplatte.

A: prim. Antikörper: 7OMT-Antikörper, sek. Antikörper Alexa 488 Ziege gegen Kaninchen-IgG.

B: prim. Antikörper: Kallose-Antikörper; sek. Antikörper: Alexa 350 Ziege gegen Maus-IgG.

C: prim. Antikörper: MLP-Antikörper; sek. Antikörper: Alexa 568 Ziege gegen Meerschweinchen-IgG.

Da es sich bei den drei Bildern in Abb. 42 um denselben Schnitt handelt, lassen sich Siebplatte und Milchröhren in Bild A genau lokalisieren (blauer und roter Pfeil). Die grüne Markierung für die 7OMT ist in den Geleitzellen neben den Siebröhren lokalisiert. An der Siebplatte und geringfügig in der Milchröhre findet sich ebenfalls eine körnige Fluoreszenz. Dies dürfte sich jedoch um ein Artefakt handeln, da Antikörper häufig unspezifisch an Kallose binden. Da die 7OMT ein cytosolisches Protein ist, kann sie nicht in den Plastiden vorkommen. Nur eine Lokalisation in den Plastiden würde jedoch zu dieser punktförmigen Fluoreszenz führen.

3.6.4. Lokalisation in der Wurzel

Markierungen mit dem Antikörper gegen 7OMT sind erst nach der Differenzierung in Zentralzylinder und Rinde nachzuweisen. In der Wurzelspitze findet sich keine Markierung. Nach Beginn der Differenzierung ist die 7OMT im Perizykel und teilweise in der den Zentralzylinder nach außen abschließenden Endodermis zu finden (Abb. 43 A; grüner Pfeil). In älteren Wurzeln ist die 7OMT in den Phloemsträngen zwischen den radialen Xylemstrahlen lokalisiert. Dort wiederum in Zellen, die neben den Milchröhrengliedern liegen (Abb. 43 B; grüne Pfeile).

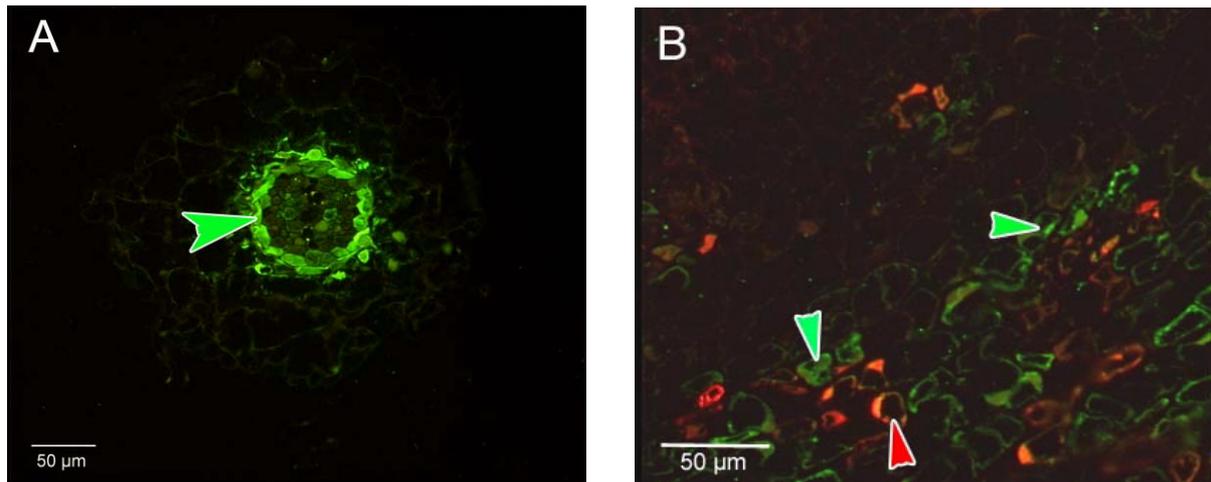


Abb. 43: A: Junge Wurzel am Beginn der Differenzierung in Rinde und Zentralzylinder. Markiert mit 7OMT-Antikörper (grüner Pfeil).
 B: Co-Lokalisation von 7OMT und MLP auf einem Querschnitt einer älteren Wurzel; grüne Pfeile: 7OMT-Markierung; roter Pfeil: Milchröhrenglied

3.6.5. Lokalisierung der *7omt*-mRNA durch *in situ*-Hybridisierung

Um die Genexpression im Gewebe näher zu klären, wurde eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid *7omt* in pGem-T-easy durch *in vitro*-Transkription in Gegenwart von Digoxigenin-UTP markiert. Durch Auswahl der beiden RNA-Polymerasen die in sense- bzw. antisense-Richtung ablesen, wurden die entsprechenden Sonden hergestellt. Die Sonde wurde nach 2.2.5.2. quantifiziert, die Hybridisierung wurde nach 2.2.5.4. durchgeführt.

Die in Abb. 44 gezeigten Hellfeldbilder zeigen einen Ausschnitt aus dem Phloem eines Stängelleitbündels. Abb. 44 A zeigt die Hybridisierung mit der antisense RNA-Sonde. Bei diesem Bild wurde eine Siebplatte im Querschnitt getroffen (hellroter Pfeil, Sp). Da sie etwas außerhalb der bei dieser Vergrößerung sehr geringen Tiefenschärfe liegt, erscheint sie unscharf. Beim Durchfokussieren im Mikroskop waren eindeutig Siebporen zu erkennen. Die daneben liegenden Geleitzellen zeigen die violette NBT/BCIP-Färbung mit der die Hybridisierung der Antisense-Sonde nachgewiesen wird. Abb. 44 B zeigt die Hybridisierung mit der Sense-Sonde. Hier ließen sich keine Hybride nachweisen (Negativkontrolle).

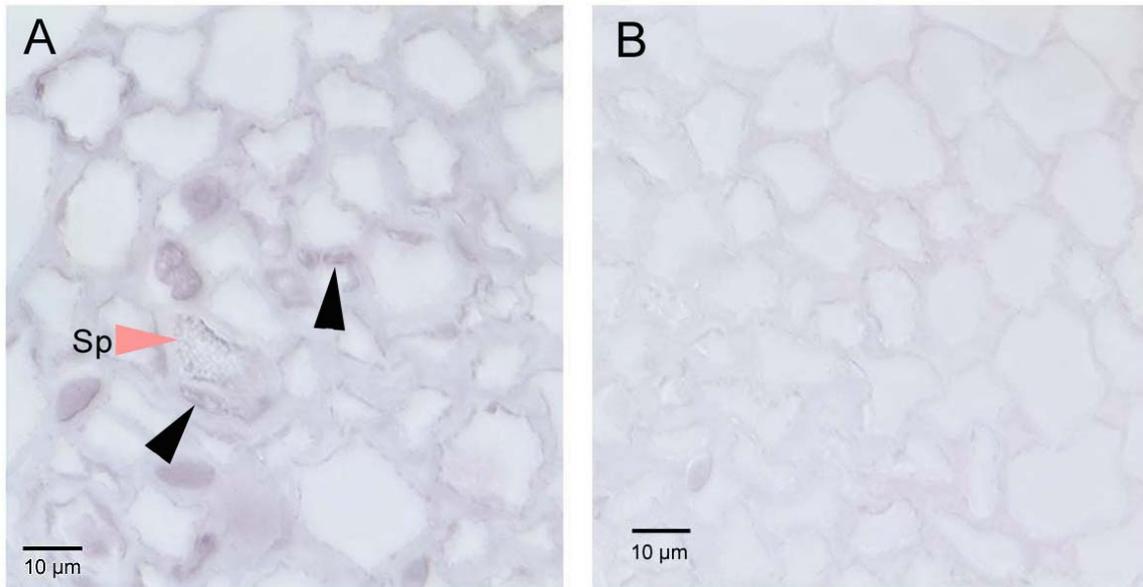


Abb. 44: *In situ*-Hybridisierung auf einem Querschnitt durch ein Stängelleitbündel; Paraffineinbettung; Schnittdicke 10 µm;
 A: Hybridisierung mit der Antisense-Sonde; Sp = Siebplatte; schwarze Pfeile: Zellen mit *7omt*-mRNA;
 B: Hybridisierung mit der Sense-Sonde (Negativkontrolle)

3.7. Berberinbrückenenzym

Zu Beginn der Arbeit stand ein Klon des aus *P. somniferum* stammenden Berberinbrückenenzym in dem Vektor pFASTBAC zur Verfügung (Huang & Kutchan 2000). Dieses Gen wurde in den Expressionsvektor pHIS8 kloniert. Die Überexpression in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21DE3 war jedoch erfolglos. Es wurde kein Berberinbrückenenzym von den Bakterien gebildet. Auch der Versuch mit den weiteren Expressionsstämmen *E. coli* BL21DE3pLysS und *E. coli* BL21DE3 RIL die speziell für schwierige Expressionen modifiziert wurden, brachte keinen Erfolg. Im SDS-Gel konnte auch nach verschiedenen langen Induktionszeiten keine Bildung des Berberinbrückenenzym nachgewiesen werden.

Eine heterologe Expression des Berberinbrückenenzym ist vermutlich nur in einem Insektenzellensystem möglich. Dieses System ist für das BBE aus *E. californica* bereits im Arbeitskreis etabliert (Kutchan *et al.* 1994 und Bock 1996). Da die Überexpression in Insektenzellen jedoch sehr zeitaufwändig ist, sollte sie im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Daher wurde zur Produktion von Antikörpern in Kaninchen aus der Arbeit von Armin Bock (Bock 1996) noch vorhandenes Berberinbrückenenzym aus *E. californica* überprüft und verwendet. Dieses Protein war durch Überexpression in Insektenzellen hergestellt worden und aus dem Insektenzellmedium durch drei chromatographische Schritte zur Homogenität gereinigt worden (Kutchan *et al.* 1994). Da das Berberinbrückenenzym zu 88% auf Aminosäureebene mit dem Berberinbrückenenzym aus *E. californica* übereinstimmt (Facchini *et al.* 1996) war eine Kreuzreaktivität der resultierenden Antikörpers zu erwarten. Die Kreuzreaktivität eines Antikörpers gegen das *Eschscholzia*-Protein war schon von Armin Bock für seine elektronenmikroskopischen Studien genutzt worden (Bock 1996).

Ausreichende Mengen des *Eschscholzia*-BBE Proteins wurden an die Firma Biogenes (Berlin) gesandt. Zwei Kaninchen wurden nach dem Standardprotokoll der Firma immunisiert (2.2.3.3.).

3.7.1. Western Blot

Die erhaltenen Antiseren wurden durch Western Blots auf ihre Spezifität hin überprüft. Die Durchführung erfolgte nach 2.2.3.7.. Dabei wurden 25 µg Protein je Spur im SDS-Gel aufgetragen und die getrennten Proteine durch Elektroblothing nach 2.2.3.6. auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Freie Bindungsstellen wurden mit 5% Milchpulver in TBST-Puffer geblockt und die BBE-Antiseren bzw. Präimmenser in der Verdünnung 1:500 in 5% Milchpulver/TBST verwendet. Das Präimmenserum zeigte kein Signal im Western Blot.

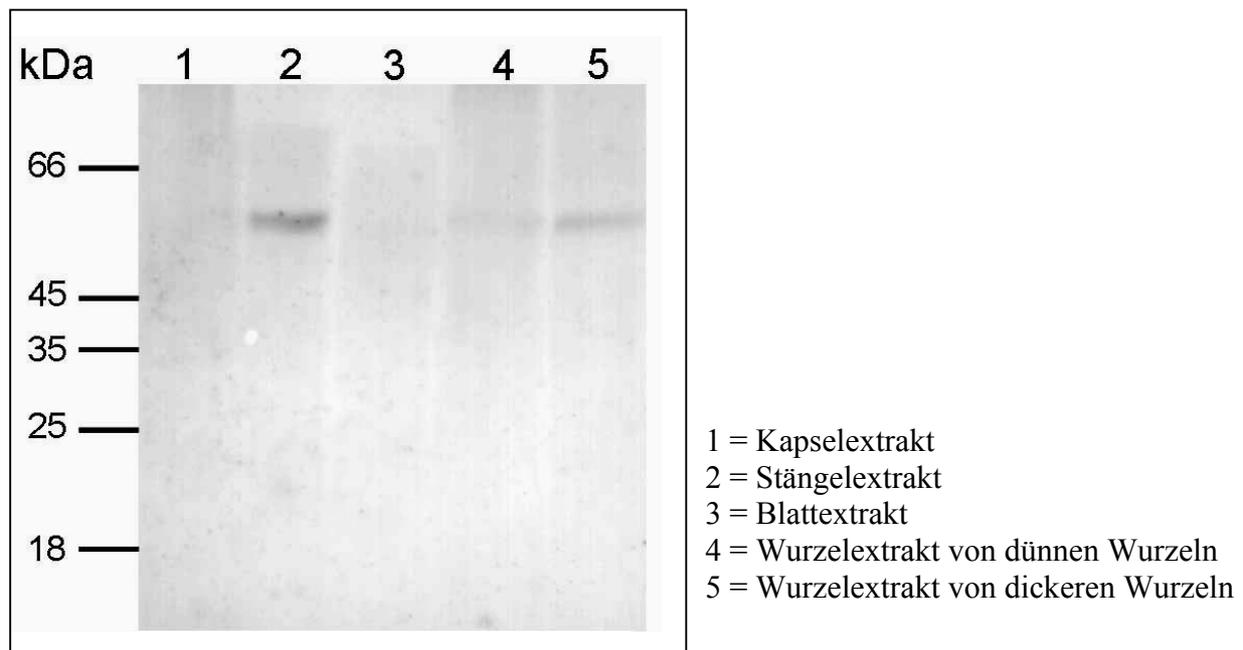


Abb. 45: Western Blot mit BBE-Antikörper; pro Spur wurden 25 µg Proteinextrakt aufgetragen

Die Molekülgröße im Western Blot entspricht der erwarteten Größe von BBE-Protein von 57 kDa (Facchini *et al.* 1996).

Wie in Abb. 45 zu erkennen ist, zeigt der Antikörper deutliche Banden im Stängelsextrakt und im Extrakt der dickeren Wurzeln. Ein schwaches Signal ist im Extrakt von dünneren Wurzeln erkennbar. BBE-Protein lässt sich nicht in der Kapsel- und im Blattextrakt nachweisen.

3.7.2. Lokalisation in der Wurzel

Obwohl im Western Blot eindeutig BBE-Protein im Stängel nachgewiesen wurde, war eine Immunmarkierung von Stängelschnitten nicht erfolgreich. Es zeigte sich sowohl bei Längs- als auch bei Querschnitten keine Markierung. Möglicherweise waren die vorhandenen Proteinmengen für einen direkten Nachweis im Gewebe zu gering.

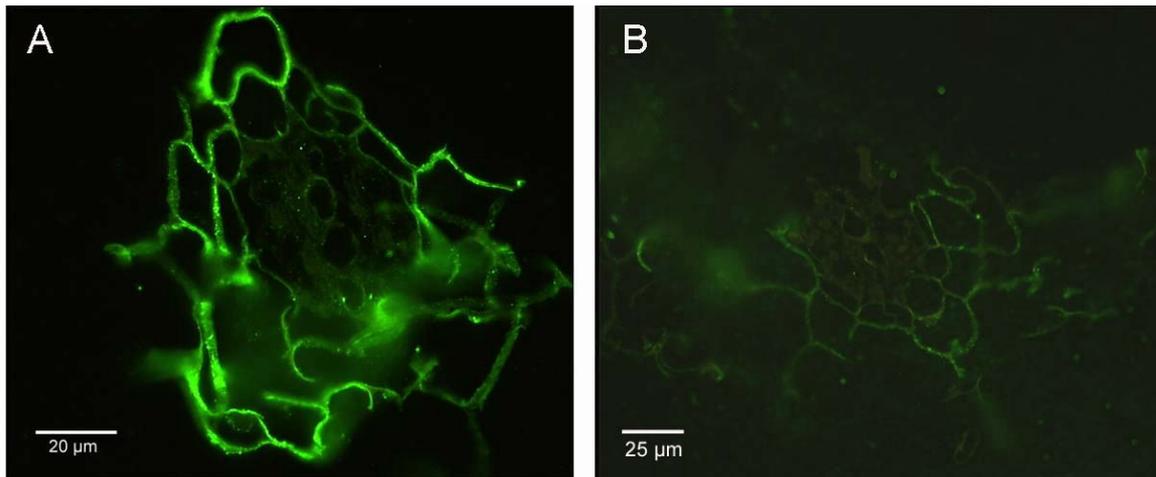


Abb. 46: Immunmarkierung von Wurzelspitzen in der Differenzierungszone.

A: prim. Antikörper: Anti-BBE, sek. Antikörper Alexa 488 Ziege gegen Kaninchen-IgG.

B: Präimmunsereum.

Abb. 46 zeigt zwei Querschnitte durch die Wurzelspitze nach der beginnenden Differenzierung in Rinde und Zentralzylinder. In Abb. 46 A ist im Zentralzylinder ein lignifiziertes Xylemgefäß durch eine schwache Autofluoreszenz zu erkennen. Im Gegensatz zum Präimmunsereum zeigt sich in diesem Stadium der Wurzeldifferenzierung eine Fluoreszenz im Rindenparenchym. Diese scheint jedoch an den Zellwänden zu haften. Da die Haftung von Wurzelschnitten auf dem Objektträger nicht besonders gut war, haben sich Teile des Rindenparenchyms abgelöst. Möglicherweise ist daher nur noch ein schmaler Zytoplasmasaum vorhanden.

Im Zentralzylinder konnte kein BBE-Protein nachgewiesen werden.

Schnitte durch ältere Wurzeln ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Da die Biosynthese von BBE induzierbar ist, stellt sich auch die Frage, ob in jedem Schnitt wirklich ausreichende Mengen an BBE-Protein vorhanden waren, oder ob ein Nachweis nicht nur nach vorheriger Induktion der Biosynthese möglich ist.

4. Diskussion

4.1. Alkaloide – biotechnologischer Zugang

Die Schlafmohnpflanze stellt bis heute die einzige Quelle zur Gewinnung der pharmazeutisch wichtigen Morphinalkaloide dar. Zwar sind chemische Totalsynthesen bekannt (Gates & Tschudi 1952; 1956), sie zur Herstellung von Morphin zu verwenden ist wirtschaftlich jedoch nicht interessant. Auch die Zellkulturen, die aus *P. somniferum*-Zellen angelegt wurden, akkumulieren keine Morphinalkaloide.

Diese Problematik trifft auch auf zahlreiche andere, pharmazeutisch wichtige Alkaloide wie zum Beispiel Vinblastin und Vincristin zu. Die Produktion mancher pharmazeutisch wichtiger Alkaloide funktioniert zwar in Zell- oder hairy root-Kulturen im Labormaßstab, deren Produktivität ist für die pharmazeutische Industrie jedoch nicht ausreichend.

Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse am „Metabolic engineering“ pharmazeutisch wichtiger Pflanzen. Gemeint ist damit die Herstellung transgener Pflanzen oder Zellkulturen mit dem Ziel, die Produktion gewünschter Komponenten zu erhöhen oder erst einzuführen bzw. unerwünschter schneller abzubauen. Dies kann durch die Veränderung oder Neueinführung einer oder mehrerer enzymatischer Reaktionen in der Biosynthese erfolgen (DellaPenna 2001).

Beispiele, den Alkaloidgehalt in den entsprechenden Pflanzen biotechnologisch zu verändern, sind in der Literatur beschrieben worden. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von geeigneten Transformationssystemen für die jeweilige Pflanze. Gerade für pharmazeutisch sehr wichtige Alkaloide bestehen dabei noch Probleme.

So können *C. roseus*-Zellkulturen zwar transformiert werden, es wurde bisher jedoch keine Möglichkeit beschrieben, bewurzelte Pflanzen zu regenerieren. Für diese Pflanze gibt es bis jetzt nur Ansätze, die Zellkultur zu transformieren.

Ebenso stellt sich eine Veränderung des Alkaloidgehaltes von Schlafmohn als schwierig dar. Transformationsprotokolle mit anschließender Pflanzenregeneration sind aufwändig und beanspruchen viel Zeit.

Dennoch gibt es für einige alkaloidakkumulierende Pflanzen und Zellkulturen erfolgreiche Transformationsansätze.

Beispiele für eine Steigerung der Alkaloidakkumulation in transgenen Pflanzen ist die Einführung des Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase-Gens (*h6h*) in *A. belladonna*. Dies führte zu einem höheren Gehalt an Scopolamin in den transgenen Pflanzen (Yun *et al.* 1992).

Ebenso konnte der Gehalt an Nikotin in den Blättern von *N. sylvestris* um 40% durch die Überexpression des Tabak *Putrescin-Methyltransferase*-Gens gesteigert werden (Sato *et al.* 2001).

Zu einer Steigerung der Alkaloidakkumulation führte auch die Transformation von *C. japonica*-Zellkulturen mit dem (*S*)-*Scoulerin-9-O-Methyltransferase*-Gen (*9omt*) vermittelt durch *A. tumefaciens*. Dadurch stieg der Gehalt an Berberin und Columbamin um 15%. Die Überexpression desselben Konstrukts in *E. californica* führte zu einer Akkumulation von Columbamin und zu einer Reduzierung der Sanguinaringehaltes. Da *E. californica*-Zellkulturen normalerweise nur Benzophenanthridinalkaloide und keine Protoberberinalkaloide produzieren, wird durch die Expression der *9-omt* der Stoffwechselweg zu Columbamin aktiviert und Stoffwechselzwischenprodukte umgeleitet (Sato *et al.* 2001). Dieses Beispiel zeigt, dass prinzipiell eine Umleitung von Stoffwechselzwischenprodukten in gewünschte Richtungen möglich ist und dadurch auf die Bedürfnisse zugeschnittene Alkaloidprofile erzeugt werden können.

Dennoch zeigen viele Transformationsversuche nicht die erwarteten Ergebnisse.

Ein Beispiel dafür ist die Einführung des *str1* und *tdc*-Genes unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in der Zellkultur von *C. roseus* durch *Agrobacterium tumefaciens* (Canel *et al.* 1998). Dabei stellte sich heraus, dass für die Steigerung der Akkumulation von Monoterpen-Indolalkaloide weder ein höherer Gehalt an Tryptamin, noch eine Überexpression der *str*-Genes förderlich war. Als einschränkend stellte sich die Biosynthese des Terpenanteils Secologanin heraus (Whitmer *et al.* 1998; Morgan & Shanks, 2000).

Auch ein weiterer Versuch den Alkaloidgehalt dieser Zellkultur zu steigern war nicht erfolgreich. Dazu wurden nicht einzelne biosynthetische Gene eingeführt, sondern ein für die Alkaloidbiosynthese spezifischer Transkriptionsfaktors *ORCA3* in der *C. roseus*-Zellkultur exprimiert. *ORCA3* war durch T-DNA activation tagging in *C. roseus*-Zellkulturen entdeckt worden (Van der Fits & Memelink 2000; 2001). Dies führte zwar zu einem Anstieg der Expression einiger biosynthetischer Gene, jedoch nicht zu einer Steigerung der Alkaloidakkumulation. Dieses Ergebnis deutet auf weitere Regulationsfaktoren hin (Gantet & Memelink 2002).

Auch erste Transformationsergebnisse in *P. somniferum* zeigen, dass die beobachteten Veränderungen im Alkaloidprofil nicht unbedingt vorhersagbar sind.

Unlängst wurde eine erste Transformationslinie mit *bbe1-antisense* Pflanzen unter der Kontrolle des S4S4-Promotors (führt zu einer konstitutiven Expression) ausgewertet. Die Transformation mit dem *antisense*-Konstrukt sollte den Fluss in die Sanguinarinsynthese vermindern und damit eventuell eine gesteigerte Morphinsynthese ermöglichen. Zwar zeigten sich Veränderungen bei verschiedenen Intermediaten der Biosynthese, eine Erhöhung des Morphingehaltes bzw. die Reduktion von Sanguinarin war jedoch nicht zu beobachten (Frick *et al.* 2004, im Druck).

Diese erfolglosen Versuche, den Alkaloidgehalt in der gewünschten Richtung zu verändern, zeigen, dass meist zu wenig über die komplizierte Regulation von Stoffwechselwegen bekannt ist. Detaillierte Kenntnisse über Regulationsmechanismen sind jedoch erforderlich, um genau vorhersagen zu können, welche Effekte durch die jeweilige gentechnische Veränderung von einzelnen Enzymen oder Transkriptionsfaktoren erzielt werden. Hier besteht noch erheblicher Forschungsbedarf.

Auch könnte wesentlich zielgerichteter vorgegangen werden, wenn die zelluläre Lokalisation der einzelnen Biosyntheseschritte bekannt wäre. Die entsprechenden Promotoren der lokalisierten Biosynthesegene könnten analysiert werden und wiederum gezielt für die Herstellung von Konstrukten für die gentechnische Veränderung von Stoffwechselwegen verwendet werden. Bisher wurden meist Promotoren verwendet, die zu einer konstitutiven Expression in allen Geweben führen. Spezifische Promotoren könnten zu einer ausschließlichen Expression des Konstrukts in den tatsächlich an der Biosynthese von Alkaloiden beteiligten Gewebe führen.

Zur Verdeutlichung sei ein Beispiel aus der gentechnischen Veränderung eines Primärstoffwechselweges genannt. So sollte der Stärkegehalt in der Kartoffel durch Einführung eines *E. coli*-Enzyms, das an der Glycogen-Synthese beteiligt ist, erhöht werden. Die Transformation mit der ADP-Glc Pyrophosphorylase (ADPGPP) aus einer *E. coli*-Mutante führte zu einer 60%igen Erhöhung des Stärkegehaltes. Dieser Effekt konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn das Gen eine Signalsequenz für Chloroplasten enthielt und unter der Kontrolle eines Knollen-spezifischen Promotors stand. Eine konstitutive Expression des Gens war letal (Stark *et al.* 1992).

Dies unterstreicht auch für den Sekundärstoffwechsel die Bedeutung von Lokalisationsstudien. Mit den bekannten Genen der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* konnte ein Einblick über die Lokalisation der Morphinbiosynthese erhalten werden.

4.2. Ergebnisse der Lokalisation im Vergleich zu bisherigen Ergebnissen

4.2.1. Untersuchung der Milchröhren

Die Untersuchung der Milchröhren in der Kapsel zeigte, dass die Milchröhren in diesem Gewebe ein reich verzweigtes System bilden. So konnten im Querschnitt teils längs-, teils querschnittene Milchröhren getroffen werden (Kap. 3.2.4.; Abb. 18 A). Im Querschnitt zeigten sich häufig fusionierte Zellen, deren Einzelzellen noch erkennbar waren (Abb. 18 A). Der Einblick in dieses reich verzweigte System verdeutlicht, warum beim Anritzen der Kapsel der Milchsaft schnell austritt. Bei Längs- oder Querschnitten werden auf alle Fälle genügend Milchröhren getroffen, deren Zellinhalt unter Druck steht und deren Milchsaft ausfließt. Da die Milchröhren ein verzweigtes System bilden, kann der Latex vollständig ausfließen. Da die Milchröhren in der Kapsel genauso wie im Stängel innerhalb der Phloems liegen, stellt sich die Frage, ob beim Anritzen der Kapsel der Milchsaft mit Zellinhalt der umliegenden Phloemzellen kontaminiert wird.

Eine stärkere Kontamination mit Phloem selbst kann aber ausgeschlossen werden. Das Phloem steht zwar ebenfalls unter positivem Turgordruck, jedoch verfügen Siebröhren über ein effektives System, Siebplatten bei einem Druckabfall zu verschließen und ein Austreten von größeren Mengen an Phloem zu vermeiden (Knoblauch & van Bel 1998). Dies wäre für die Pflanze mit einem Verlust an Assimilaten verbunden.

In isoliertem Latex, der durch Anritzen der Kapsel gewonnen wurde, konnten elektronenmikroskopisch einzelne Zellkerne nachgewiesen werden. Da bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen ausdifferenzierter Milchröhren außer lipidbody-ähnlichen Strukturen keine weiteren Organellen nachgewiesen werden konnten, schließt Bock (1996) auf eine Herkunft der Kerne aus umliegendem Gewebe. Eine gewisse Kontamination von isoliertem Latex mit dem Zellinhalt verletzter Zellen ist selbstverständlich anzunehmen. Sie dürfte zwar im Vergleich zur Menge an austretendem Latex sehr gering sein, könnte jedoch trotzdem bei Anwendung empfindlicher molekularbiologischer Methoden zu abweichenden Ergebnissen führen.

Es stellt sich die Frage, ob das Ausfließen des Milchsaftes bei Verletzungen der Pflanze bei der Abwehr von Schädlingen eine Rolle spielt. In Indien konnte beobachtet werden, dass Heuschreckenschwärme, die ein Schlafmohnfeld überfallen durch den austretenden Milchsaft vergiftet werden. Außerdem verkleben ihre Fresswerkzeuge durch das sich härtende Opium (Zenk 1994).

Gegen die Theorie der Schädlingsabwehr spricht jedoch, dass die Morphinbiosynthese nicht induzierbar ist. Eine Induktion der Biosynthese als Abwehrreaktion lässt sich in Zellkulturen durch Zugabe von Jasmonaten nachweisen. Jasmonate sind pflanzliche Stresshormone, die als Regulatoren der pflanzlichen Abwehr fungieren (Gundlach *et al.* 1992).

Zellkulturen von *P. somniferum* produzieren bei der Zugabe von Methyljasmonat keine erhöhten Mengen an Morphin, aber erhöhte Mengen von Benzophenanthridinalkaloiden. Diese sind im Latex jedoch nicht nachweisbar.

4.2.2. Lokalisation der 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin-4'-O-Methyltransferase

Die im Western Blot erhaltenen Ergebnisse zeigten eine Akkumulation des 4'OMT-Proteins in der Kapsel (Kap. 3.3.2.; Abb. 21) und im oberen Stängelbereich (Abb. 21). In den Blättern und der Wurzel konnte im Western Blot kein Protein nachgewiesen werden (Abb. 21). Enzymaktivitätsmessungen in einzelnen Geweben liegen für die 4'OMT noch nicht vor. Im Rahmen einer Veröffentlichung zur Akkumulation acht verschiedener Transkripte von Enzymen der Alkaloidbiosynthese in Schlafmohn wurde das Transkript vor allem in der Blütenknospe und im Stängel nachgewiesen. In den Blättern und der Wurzel konnte nur eine schwache Expression des *4'omt*-Genes gefunden werden (Facchini & Park 2003). Diese Ergebnisse decken sich mit der Akkumulation des 4'OMT-Proteins in den oberen Teilen der Pflanze.

Die Immunlokalisation zeigte das Protein vor allem in Zellen des Phloems sowohl in der Kapsel, als auch im Stängel (Kap. 3.3.3.; Abb. 22). Auch in parenchymatischen Zellen des Xylems ließ sich das 4'OMT-Protein detektieren (Abb. 22). Deutlich ungefärbt blieb in den Kapsel- und Stängelquerschnitten das Meristem. Offensichtlich muss eine gewisse Zelldifferenzierung stattfinden, bevor die Enzymsynthese beginnt. Allerdings bleibt die Funktion der 4'OMT in parenchymatischem Xylemgewebe unklar. Weder Benzophenanthridin-alkaloide noch Tetrahydrobenzylisochinolinalkaloide werden im Xylem transportiert. Jedoch konnte auch das Transkript der Tyrosin/Dopa-Decarboxylase durch *in situ*-Hybridisierung in Xylemzellen detektiert werden. Dieses Enzym liegt noch vor der 4'OMT am Beginn der Tetrahydrobenzylisochinolinalkaloid-Biosynthese (Facchini & De Luca 1995).

Die Frage, in welchen Zelltypen im Phloem die 4'OMT lokalisiert ist, sollte durch Längsschnitte des Stängelleitbündels geklärt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die 4'OMT in Zellen um die Milchröhren lokalisiert ist (Kap. 3.3.3.; Abb. 23). Diese Zellen sind länglich und gelegentlich wurde ein Zellkern im Längsschnitt getroffen. In Siebzellen konnte keine 4'OMT nachgewiesen werden (Abb. 23). Ob es sich bei den immunmarkierten Zellen um parenchymatische Zellen oder auch Geleitzellen handelt, ist in diesem Längsschnitt nicht genau auszumachen. Da durch ihre schmale Form beim Längsschnitt von Geleitzellen meist ein Kern getroffen wird, ist die 4'OMT wahrscheinlich auch in Geleitzellen lokalisiert.

In der Wurzel konnte das 4'OMT-Protein weder durch Immunlokalisation noch im Western Blot nachgewiesen werden. Northern Blots von verschiedenen Entwicklungsstufen des Schlafmohn-Keimlings zeigen, dass das *4'omt*-Transkript am 4. und 7. Tag nach der Keimung deutlich nachweisbar ist, danach die Menge des Transkripts wieder sinkt (Facchini & Park 2003). Dies deutet auf eine zeitliche Regulation der Genexpression hin. Möglicherweise lässt sich daher das 4'OMT-Protein nicht in allen Entwicklungsstufen der Wurzel detektieren. Allerdings konnte auch in jungen Wurzeln und Wurzelspitzen kein Protein nachgewiesen werden.

Eine völlige Abwesenheit der 4'OMT in der Wurzel ist eher unwahrscheinlich, da nachfolgende Enzyme der Biosynthese in der Wurzel lokalisiert werden konnten. Ferner wurde das Transkript der *cyp80b1* durch Northern Blot in der Wurzel nachgewiesen. Dieses Enzym katalysiert den unmittelbar vorangehenden Biosyntheseschritt. Möglicherweise reicht die Enzymmenge der 4'OMT für einen Nachweis mit Antikörper in der Wurzel nicht aus.

4.2.3. Lokalisation der Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase

Die Ergebnisse des Western Blots zeigten eine Akkumulation des SalAT-Proteins in der Kapsel und in den oberen Stängelabschnitten (Kap. 3.4.2.; Abb. 26).

Dagegen zeigen Northern Blots in allen Geweben gleiche Mengen an *salat*-mRNA. Die Enzymaktivität der SalAT war jedoch in Kapsel und Stängel ungefähr doppelt so hoch wie in Blatt und Wurzel (Grothe, 2002). Diese höhere gemessene Enzymaktivität deckt sich mit den im Western Blot nachgewiesenen größeren Enzymmengen in Kapsel und Stängel (Abb. 26).

Allerdings müssen Enzymmenge und Enzymaktivität nicht notwendigerweise übereinstimmen, da auch posttranskriptionale und posttranslationale Prozesse zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten in den einzelnen Geweben führen können.

Die Immunlokalisation zeigte ein ähnliches Bild wie die Lokalisation der 4'OMT (Kap. 3.4.3.; Abb. 27). Auch ein direkter Vergleich beider Enzyme in Parallelschnitten zeigte die annähernd gleiche Lokalisation beider Enzyme (Kap. 3.4.4.; Abb. 30).

Im Längsschnitt von Stängelleitgewebe konnte in Abb. 29 Bild D gezeigt werden, dass die SalAT auch in Geleitzellen lokalisiert ist. In dieser Abbildung ist eine längliche schmale Zelle direkt neben einer Siebzelle markiert.

In jüngeren Wurzeln war die SalAT im Perizykel lokalisiert. In noch undifferenzierten Wurzelspitzen konnte keine SalAT nachgewiesen werden. Auch in anderen Alkaloidbiosynthesen spielt das Perizykel der Wurzel eine wichtige Rolle. So konnte das Transkript der H6H, die den letzten Schritt der Scopolaminbiosynthese katalysiert, durch *in situ*-Hybridisierung im Perizykel nachgewiesen werden (Suzuki *et al.* 1999). In älteren Wurzeln war die SalAT allerdings in Zellen um die Milchröhrenglieder lokalisiert. Diese bilden sich im sekundären Phloem.

4.2.4. Lokalisation der Codeinon-Reduktase

Im Western Blot ließ sich die Codeinon-Reduktase in fast allen Geweben nachweisen. Dabei war die Proteinmenge in der Kapsel am größten.

Die Auswertung eines Northern Blots, durchgeführt von Unterlinner *et al.* (1999) zeigte, dass die Expression der *cor*-mRNA in den drei getesteten Organen Blatt, Stängel und Wurzel gleich hoch war. Kapselgewebe wurde von Unterlinner im Northern Blot nicht untersucht. Die höchste Enzymaktivität bezogen auf das Trockengewicht maß er jedoch in der Kapsel, gefolgt von Stängel- und Wurzelgewebe. Die gemessenen Enzymaktivitäten korrelieren somit mit den im Western Blot detektierten Proteinmengen (Kap. 3.5.2.; Abb. 33).

Ein Zusammenhang zwischen COR-Akkumulation und Latex-reichem Gewebe ist im Western Blot ebenfalls gegeben.

Mit der Immunlokalisation konnte das COR-Protein in den untersuchten Organen vor allem im Latex lokalisiert werden. In der Kapsel waren auch wenige Phloemzellen, die neben den Milchröhren liegen, markiert (Kap. 3.5.3.; Abb. 35). In der Wurzel war der immunologische Nachweis von COR an das Auftreten von Milchröhrengliedern gebunden. In jüngeren Wurzeln, in denen noch keine Milchröhrenglieder gebildet wurden, war deshalb kein COR-Protein nachzuweisen.

Eine Lokalisation des COR-Proteins im Latex deckt sich mit dem Proteinnachweis von Decker. Unter den aus der zytosolischen Latexfraktion isolierten und sequenzierten Proteinen findet sich auch die Codeinon-Reduktase (Decker *et al.* 2000).

Allerdings wird die Codeinon-Reduktase in der Zellsuspensionskultur gebildet, obwohl die Zellen nicht differenziert sind. In der Kapsel wird die Codeinon-Reduktase zusätzlich zu Milchröhren auch in parenchymatischen Zellen synthetisiert. Beide Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Promotor des *cor*-Genes zwar bevorzugt in den Milchröhren aktiviert wird, aber doch auch in wenigen zusätzlichen Zellen des Phloems.

Die Codeinon-Reduktase kommt in mindestens vier Isoformen in *P. somniferum* vor (Unterlinner *et al.* 1999). Der für die Immunolokalisation verwendete Antikörper war zwar gegen das COR 1.1-Allel gerichtet, erkennt aber aufgrund der hohen Ähnlichkeit (95 bzw. 96% auf Aminosäureebene) wahrscheinlich alle vier Isoformen. Möglicherweise besitzen die einzelnen COR-Gene auch unterschiedliche Promotoren und werden mit demselben Antikörper in unterschiedlichen Zellen nachgewiesen.

Die *in situ*-Hybridisierung zeigte, dass *cor*-mRNA in Geleitzellen exprimiert wird (Kap. 3.5.5.; Abb. 38). Ob auch *cor*-mRNA im Latex exprimiert wird, lässt sich aufgrund der bräunlichen Eigenfärbung des Milchsaftes in den dickeren Paraffinschnitten nicht eindeutig sagen. Eine RT-PCR mit Latex-mRNA weist diese jedoch im Latex nach (J. Ziegler, unveröffentlichtes Ergebnis). Wie bereits oben erwähnt, ist bei der Gewinnung von Latex durch Anritzen der Kapsel auch eine Kontamination der Latexes mit Zytosol aus umliegenden Zellen zu rechnen. Möglicherweise wird bei dieser empfindlichen Methode ebenfalls *cor*-mRNA aus den im Phloem liegenden Geleitzellen nachgewiesen.

Der Nachweis der *cor*-mRNA in den Geleitzellen deckt sich mit dem Ergebnis von Bird *et al.* (2003). Aufgrund der Abbildung in der Veröffentlichung lässt sich eine Expression von *cor*-mRNA in Milchröhren nicht ausschließen, im Text wird jedoch nur die Expression in den Geleitzellen erwähnt.

4.2.5. Lokalisation der (*R,S*)-Retikulin-7-*O*-Methyltransferase

Der Western Blot der 7OMT zeigte die höchsten Proteinmengen in der Kapsel, gefolgt von Stängel und Wurzel. In Blättern war die 7OMT nicht nachweisbar (Kap. 3.6.2.; Abb. 40). Die Ergebnisse des Western Blots korrelieren nicht vollständig mit den Ergebnissen der von Ounaroon durchgeführten RNA-Blots (Ounaroon *et al.* 2003). Die höchste Expression war hier im Stängel und in der Knospe detektiert worden, während in der Kapsel eine geringere Genexpression nachgewiesen worden war. In der Wurzel war keine *7omt*-mRNA zu detektieren. Allerdings muss das Auftreten der mRNA nicht notwendigerweise mit den nachgewiesenen Proteinmengen übereinstimmen. Zum einen können Proteine nach deren Synthese durchaus in andere Gewebe transportiert werden. Zum anderen kann auch das Protein stabiler sein und noch länger nachgewiesen werden als die entsprechende mRNA. Ein Beispiel dafür ist der Nachweis zweier Enzyme der Jasmonatbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Allenoxidsynthase und Allenoxidcyclase waren noch nach 14 Wochen in ansteigender Konzentration nachweisbar, während die entsprechenden mRNAs bereits nach 12 Wochen kaum noch exprimiert wurden (Hause *et al.* 2003b).

Die Ergebnisse der Immunolokalisation zeigen die 7OMT im Phloem der Leitbündel von Kapsel und Stängel (Kap. 2.6.3; Abb. 41). Im Vergleich zu 4'OMT und SalAT war die 7OMT jedoch außerhalb des Bereiches, in dem die Milchröhren zu finden sind, lokalisiert (Abb. 41). Das Produkt der 7-*O*-Methylierung von Retikulin ist Laudanin. In Fütterungsversuchen wurde gezeigt, dass radioaktives Laudanin in Noscapin eingebaut wird (Ounaroon 2002). Möglicherweise beginnt daher mit der 7OMT der Biosyntheseweg zu Noscapin. Auf enzymatischer Ebene ist diese Annahme jedoch nicht geklärt.

Laudanin lässt sich im Latex nachweisen. Daher muss das Produkt der Reaktion der 7OMT in den Latex transportiert werden. Da keine Plasmodesmen zwischen Milchröhren und umliegendem Gewebe nachgewiesen werden konnten (Bock 1996), kann kein symplastischer Transport erfolgen. Wie der Transport über den Apoplasten erfolgt, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Auf zellulärer Ebene war die 7OMT in Phloemzellen lokalisiert, jedoch nicht in Siebröhren oder Milchröhren (Kap. 3.6.3.; Abb. 42).

In der Wurzel war die 7OMT ebenfalls im Perizykel lokalisiert (Kap. 3.6.4.; Abb. 43). Hier unterscheidet sich die Lokalisation nicht von der der SalAT. In noch undifferenzierten Wurzelspitzen lässt sich keine 7OMT nachweisen, während in älteren Wurzeln die 7OMT um die entstehenden Milchröhrenglieder lokalisiert ist.

Das Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung bestätigte die Ergebnisse der Immunlokalisation. Die Expression *7omt*-mRNA konnte in Geleitzellen im Phloem des Stängelleitbündels nachgewiesen werden, also vermutlich in den gleichen Zellen, in denen auch das Protein lokalisiert ist (Kap. 3.6.5; Abb. 44). Dem widerspricht allerdings die RT-PCR von Ziegler (unveröffentlicht), der *7omt*-mRNA im Latex detektieren konnte. Wie bereits diskutiert, ist diese Methode jedoch so empfindlich, dass mRNA aus umliegendem Gewebe, eben auch aus den Geleitzellen, nachgewiesen werden könnte.

4.2.6. Lokalisation des Berberinbrückenenzym

Das Berberinbrückenenzym ist ein induzierbares Enzym. In der Suspensionskultur steigt die Menge von *bbe*-Transkript nach Zugabe von Elicitoren oder Jasmonaten an (Eilert *et al.* 1985; Cline & Coscia 1988). Dieser Zusammenhang wurde auch nach Verwundung in der Pflanze beobachtet (Facchini & Park 2003).

Der Western Blot des BBE zeigte die höchste Proteinmenge im Stängel, gefolgt von Wurzeln (Kap. 3.7.1.; Abb. 45). In Blättern und in der Kapsel konnte kein BBE-Protein detektiert werden. Die Ergebnisse von RNA-Blots zeigen eine etwas andere Verteilung der mRNA. So war die Menge an *bbe*-mRNA in der Blattmittelrippe am höchsten, gefolgt von Stängel und Wurzel (Huang & Kutchan 2000). Allerdings war die Menge an *bbe*-Transkript in der Blattspreite geringer als in der Wurzel. Dem steht die Verteilung des Benzophenanthridinalkaloids Sanguinarin gegenüber. Sanguinarin akkumuliert im Schlafmohn vor allem in der Wurzel. Latex enthält kein Sanguinarin (Facchini & De Luca 1995). Übereinstimmend zeigen die Ergebnisse aus Western Blot, RNA-Blot und Alkaloidmessung die Biosynthese der Benzophenanthridinalkaloide in der Wurzel. Ob auch oberirdische Teile der Pflanze wie Stängel und Blattmittelrippe diese Alkaloide produzieren, ist mit den bisherigen Ergebnissen nicht zu klären.

Eine Immunlokalisation des BBE-Proteins im Stängel war nicht erfolgreich. Versuche mit verschiedenen Bedingungen zeigten in keinem Fall eine Fluoreszenz, die sich vom Präimmenserum unterschied. Möglicherweise ist die Proteinmenge in diesem Gewebe für einen immunologischen Nachweis für die Lichtmikroskopie zu gering. Dagegen wies Bock BBE durch die Immunogoldmethode im Stängel nach. Er konnte BBE in Vesikeln, die im Rindenparenchym und der Epidermis entlang des Tonoplasten zu finden sind, lokalisieren (siehe Einleitung) (Bock *et al.* 2002).

Dagegen konnte BBE in Rindenzellen der Wurzelspitze nach Beginn der Differenzierungszone nachgewiesen werden (Kap. 3.7.2.; Abb. 46). Da Benzophenanthridinalkaloide

antimikrobiell wirken und in der Abwehr der Pflanze von Schädlingen eine Rolle spielen, macht eine Akkumulation dieser Alkaloide in äußeren Teilen der Wurzel Sinn.

4.3. Lokalisation der Alkaloidbiosynthese

Nach den Ergebnissen der Immunlokalisation und aus der Literatur lässt sich folgende Hypothese für die Lokalisation der Morphinbiosynthese im Schlafmohn erstellen:

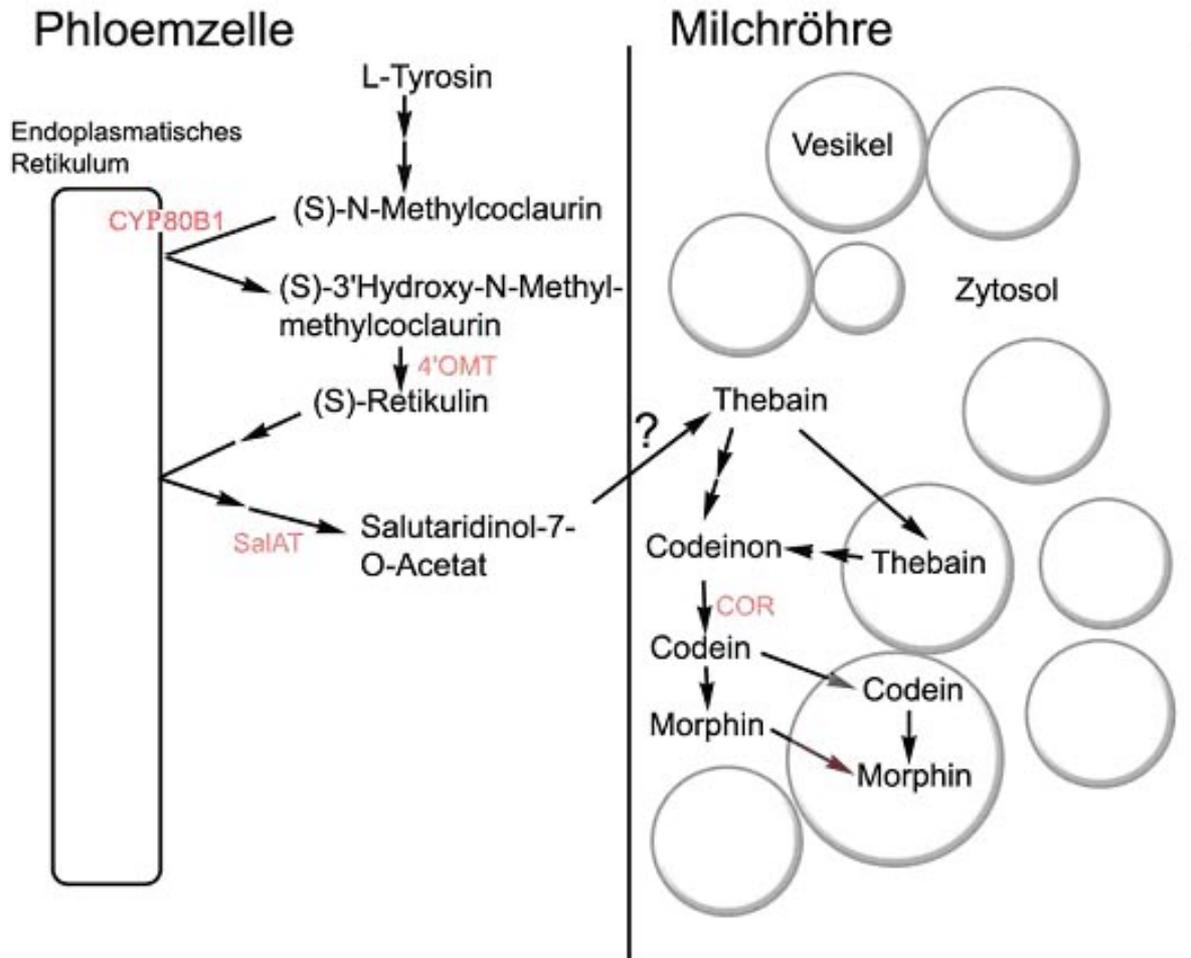


Abb. 47: Hypothetische Lokalisation der Morphinbiosynthese, basierend auf Ergebnissen der Immunlokalisation und der aktuellen Literatur

Demnach sind die ersten Schritte der Morphinbiosynthese in Zellen des Phloems lokalisiert, die die Milchröhre umgeben. Da CYP80B1 ein membrangebundenes Cytochrom P450-Enzym ist, ist anzunehmen, dass dieses Enzym an das Endoplasmatische Retikulum der Phloemzelle gebunden ist. Die 4'OMT ist ein cytosolisches Protein, dass durch Immunlokalisation in Phloemzellen lokalisiert wurde. Ebenso verhält sich die SalAT, die den Schritt zum Salutaridinol-7-O-Acetat katalysiert. Bis zu diesem Zwischenprodukt konnte die Biosynthese in Phloemzellen lokalisiert werden.

Verglichen mit der bereits oben erwähnten RT-PCR von Ziegler (unveröffentlicht) ergibt sich ein etwas widersprüchliches Bild. Er konnte mit dieser Methode die *cyp80b1*, die *cyt P450 Reduktase* und die *6omt* nicht im Latex nachweisen, dagegen war die *salat* im Latex detektierbar.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es mehrere Anhaltspunkte für eine Lokalisation der letzten Schritte der Morphinbiosynthese in Latex. So konnten Thebain, Codein und Morphin im Latex nachgewiesen werden (Wieczorek *et al.* 1986).

Von den an den letzten Schritten der Morphinbiosynthese beteiligten Enzymen konnte bisher nur die Codeinon-Reduktase gereinigt bzw. kloniert werden. Dieses Enzym wurde von Decker (2000) in der zytosolischen Milchsaffraktion nachgewiesen. Die Ergebnisse der Immunolokalisation zeigen die Codeinon-Reduktase ebenfalls eindeutig im Latex lokalisiert.

Dadurch stellt sich die Frage, welches Intermediat der Biosynthese von dem umliegenden Phloemgewebe in die Milchröhren transportiert wird.

Grothe konnte für die Thebain-Synthase einen Enzymtest entwickeln. Mit Hilfe des Enzymtests konnte er zeigen, dass die spezifische Enzymaktivität der Thebain-Synthase im Latexserum höher ist als im Kapselgewebe. Eine partielle Reinigung des Enzyms aus Latexserum war möglich (Grothe 2002). Beides spricht für eine Lokalisation der Thebain-Synthase im Latexserum.

Die SalAT ist dagegen im umliegenden Phloemgewebe lokalisiert. Diese Ergebnisse sprechen für einen Transport von Salutaridinol-7-*O*-Acetat vom Phloem in die Milchröhren. Allerdings ist Salutaridinol-7-*O*-Acetat ein instabiles Intermediat, das bei neutralem oder saurem pH-Wert zu einem Iminiumion mit Dibenzazoninstruktur weiterreagiert. Daher erscheint ein Transport von Salutaridinol-7-*O*-Acetat bei einem pH-Wert des Latexserums von 6,3 unwahrscheinlich (Grothe 2002).

Ferner konnte Grothe nachweisen, dass die SalAT in Gegenwart der Thebain-Synthase eine höhere Aktivität zeigt. Die ermittelte Substrataffinität der Thebain-Synthase ist dagegen gering (Fisinger 1998). Beides spricht für eine Interaktion der beiden Enzyme (Grothe 2002). Denkbar wäre also ein an die enzymatische Umsetzung von Salutaridinol-7-*O*-Acetat zu Thebain gekoppelter Transport von der Phloemzelle in die Milchröhre. Möglicherweise handelt es sich bei dem erwähnten Enzymkomplex beider Enzyme um einen Transmembrankomplex.

Eine weitere Frage ist die Lokalisation der letzten Biosyntheseschritte in Latexserum- oder zytosol.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bilden die Latexvesikel den Speicherort der Morphinalkaloide. Decker konnte durch Analysen des Latexserums und des Vesikelzytosols von jüngeren und älteren Kapseln zeigen, dass in jüngerem Latex der Gehalt an Alkaloiden im Serum noch höher ist als in den Vesikeln. Erst in 8-10 Tage alten Kapseln (nach Blütenöffnung) wurde der Hauptanteil der Alkaloide im Vesikelzytosol gefunden (Decker 2002). Da die beiden Enzyme Thebain-Synthase und COR ebenfalls im Zytosol nachgewiesen wurden, spricht diese Beobachtung für eine Biosynthese im Zytosol und einem anschließenden Transport der Alkaloide in die Vesikel, die als reiner Speicherort derselben dienen.

Um diese Annahme zu untermauern, wäre eine Verwendung der COR-Antikörper für die Immunogoldmethode und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Milchröhren interessant.

Die beiden Enzyme der 3- und 6-*O*-Demethylierung sind noch nicht bekannt. Mit deren Isolation und anschließender Klonierung wären weitere Lokalisationsstudien möglich. Diese wären für die Abklärung der Lokalisation der letzten Teile der Morphinbiosynthese interessant.

Für die Aufstellung der Lokalisierungshypothese wurden die Ergebnisse der Bird-Studie nicht mit einbezogen (Bird *et al.* 2003). In dieser Studie wurden Antikörper gegen die Enzyme BBE, CYP80B1 und COR für die Immunolokalisation verwendet. Durch Serienschnitte wies

Bird alle drei Enzyme in den gleichen Zellen im Phloem von Wurzeln, Stängeln, Blättern und Fruchtblättern nach. Milchröhren wurden ebenfalls mit einem MLP-Antikörper markiert, sie lagen angrenzend zu diesen Zellen. Durch eine Colokalisation von MLP-, Kallose und COR auf einem Längsschnitt einer Wurzel wurden diese Zellen als Siebelemente identifiziert.

Die jeweiligen Transkripte der biosynthetischen Enzyme wurden durch *in situ*-Hybridisierung kombiniert mit einer Anilinblaufärbung der Siebplatten in den Geleitzellen nachgewiesen.

Aus diesen Ergebnissen zieht Bird den Schluss, dass die mRNAs der biosynthetischen Enzyme in den Geleitzellen exprimiert werden und das Protein anschließend in die Siebröhren transportiert wird. Dort sollten sie dann im wandständigen Zytoplasma verankert sein, möglicherweise durch das Siebelement-ER. Dadurch sollte eine Verlagerung der Enzyme durch den Phloemstrom verhindert werden.

Die in der Bird-Studie gefundene Lokalisation der biosynthetischen Enzyme widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In keinem Längsschnitt konnte eines der lokalisierten Enzyme in einer Siebzelle nachgewiesen werden. Ebenso füllt in eigenen Querschnitten die Markierung das gesamte Zytoplasma aus und ist nicht auf eine schmale Schicht an der Zellwand begrenzt. Außerdem wurden in den markierten Zellen gelegentlich Zellkerne geschnitten, die in Siebelementen nicht mehr vorhanden wären (Kap. 3.4.3., Abb. 28).

Die in der Veröffentlichung gezeigten Bilder der Immunlokalisation zeigen nur sehr kleine Zellausschnitte. Eine Zuordnung zu verschiedenen Zelltypen erscheint daher schwierig. Außerdem schließt Bird von einer Co-Lokalisation von COR und Kallose auf alle anderen Schnitte. Seine Lokalisationsbilder zeigen Siebelemente in unmittelbarer Nachbarschaft von Milchröhren. Wie bereits in Kap. 3.1. Abb. 13 im Ergebnisteil gezeigt, sind diese in der Regel durch mehrere parenchymatische Zellen voneinander getrennt und liegen nicht direkt aneinander. Aus diesen Gründen kann an der korrekten Zuordnung der Zelltypen gezweifelt werden.

Generell werden die gewählten beiden membrangebundenen Enzyme CYP80B1 und BBE nur auf niedrigem Niveau exprimiert. Dazu kommt, dass die in der Lokalisationsstudie gewählte Schlafmohn Varietät (cv Marianne) ohnehin wenig Morphin und Codein produziert (Kramell, unveröffentlichtes Ergebnis). In eigenen Versuchen mit einer alkaloidreicheren Varietät konnte BBE im Stängel nicht lokalisiert werden. Daher kann an der Bedeutung dieser schwachen randständigen Fluoreszenz als Nachweis für die Lokalisation von BBE und CYP80B1 gezweifelt werden. Außerdem führen die durch die Fixierung und Einbettung ausgelösten Verschlussmechanismen in Siebröhren zu einer Anreicherung des Siebröhrenzytoplasmas mit dem proteinreichen Inhalt der durch den Druckabfall geplatzen Plastiden (s. Einleitung). Möglicherweise könnte daher die Markierung auf Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit den Proteinen des Siebröhrenzytoplasmas zurückzuführen sein.

Die in der Diskussion von Bird aufgestellten Hypothesen zeigen einige Schwachstellen und sollen im Folgenden diskutiert werden.

So stellt Bird die Hypothese auf, dass die in den Geleitzellen synthetisierten Enzyme durch Plasmodesmata in die Siebröhren transportiert werden. Solche Systeme sind durchaus in der Literatur bekannt. Ein Enzym der Jasmonatbiosynthese in Tomate zeigt zum Beispiel ein ähnliches Verhalten. So konnte die mRNA der Allenoxydicyclase durch *in situ*-Hybridisierung in Geleitzellen, das Protein durch Immunlokalisation in Siebelementen nachgewiesen werden (Hause *et al.* 2003a). Allerdings werden Jasmonate vermutlich über das Phloem transportiert und sorgen für die systemische Abwehrreaktion der Pflanze. Da Morphinalkaloide jedoch nicht über das Phloem transportiert werden, erscheint die Lokalisation der Enzyme im Zytoplasmasaum der Siebelemente nicht logisch.

Allgemein haben Siebelemente nur noch eine sehr eingeschränkte Ausstattung an Organellen und gelten als kernlos (s. Einleitung; Kap. 1.4.). Proteine, die in Geleitzellen synthetisiert werden, können in die Siebelemente transportiert werden (Oparka & Turgeon 1999). Studien solcher Transportsysteme zeigen jedoch, dass das sogenannte „size exclusion limit“ der Plasmodesmata, also die Grenze der Molekülgröße bis zu der ein Transport durch die Plasmodesmen möglich ist, bei maximal 50 kDa liegt (Oparka *et al.* 1999). Die Molekülgröße von CYP80B1 liegt mit ca. 54 kDa und die von BBE mit 57 kDa knapp über dieser Grenze. Nur die Codeinon-Reduktase hätte eine Molekülgröße unter dem „size exclusion limit“ (35 kDa). Die Hydroxylase CYP80B1 ist außerdem ein membrangebundenes Cytochrom P450-Enzym. Um aktiv zu sein, benötigt dieses Enzym eine an Mikrosomenmembranen gebundene Cytochrom P450-Reduktase (Pauli & Kutchan 1998). Diese Reduktase hat ein Molekulargewicht von 79 kDa und kann daher nicht durch Plasmodesmata transportiert werden. Eine Translation in der Siebröhre selbst ist aufgrund der eingeschränkten Organellenausstattung wahrscheinlich nicht möglich. Die Fähigkeit von Siebröhrenplasma, Proteine zu synthetisieren, wird von Bird selbst in der Diskussion seiner Ergebnisse ausgeschlossen.

Desweiteren ist das Berberinbrückenenzym in der Pflanze in Vesikeln lokalisiert. Dieses Enzym hat ein pH-Optimum von 9-10, bei neutralem oder saurem pH-Wert ist es völlig inaktiv (Steffens *et al.* 1985; Bock *et al.* 2002). Daher ist eine in der Bird-Studie vorgeschlagene Lokalisation im Zytoplasma von Siebelementen ausgeschlossen. Das Zytoplasma von Siebelementen enthält zwar noch endoplasmatisches Retikulum, dieses ist jedoch an der Zellwand assoziiert (van Bel & Knoblauch 2000). Über das Vorhandensein von Vesikeln wird nichts berichtet.

Zu Bedenken ist auch, dass die Transportgeschwindigkeit des Phloems leicht 40 cm/h erreichen kann (Oparka & Turgeon 1999). Selbst wenn die biosynthetischen Enzyme verankert sein sollten, können die synthetisierten Morphinalkaloide in diesem Strom mitgerissen werden. Da diese Alkaloide in den Latexvesikeln der Milchrohren akkumulieren, müssten sie ja noch von den Siebröhren in die Milchrohren transportiert werden.

Aus diesen Gründen kann die von Bird aufgestellt Lokalisierungshypothese nicht mit bisher gewonnenem Wissen über die Alkaloidbiosynthese und dem Siebröhren / Geleitzellensystem in Einklang gebracht werden. Dagegen korrelieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie unter 4.2. diskutiert, mit bereits vorhandenen Ergebnissen.

4.4. Bedeutung der räumlichen Aufteilung der Alkaloidbiosynthese

Für viele Alkaloidbiosynthesen zeigt sich eine komplexe räumliche Trennung einzelner Biosyntheseschritte. Über die Entstehung und die Bedeutung dieser räumlichen Trennung gibt es in der Literatur verschiedene Ansichten.

Die Lokalisation einzelner Alkaloide in bestimmten Geweben oder Zellen bringen der Pflanze deutliche Vorteile. So akkumulieren Alkaloide, die an der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind, in besonders gefährdeten Geweben, wie zum Beispiel der Wurzel. Im Falle von Sanguinarin im Schlafmohn werden sie auch dort synthetisiert. Eine Lokalisation der Sanguinarinbiosynthese in Wurzeln ließe sich damit erklären.

Ein weiterer Grund für eine räumliche Trennung könnte die Toxizität der Alkaloide auch für die Pflanze selbst sein. So ist für die Dimere Vinblastin und Vincristin bekannt, dass sie toxisch auf die Suspensionskultur wirken. Eine Speicherung dieser Monoterpen-Indolalkaloide in Idioblasten in den Blättern der Pflanze scheint daher dem Schutz des umliegenden Gewebes zu dienen (St-Pierre *et al.* 1999).

In den meisten Fällen, bei denen eine räumliche Aufteilung der Biosynthese beschrieben wurde, ist eine so offensichtliche Bedeutung jedoch nicht erkennbar, obwohl diese Trennung ein gemeinsames Charakteristika für viele Alkaloidbiosynthesen in Pflanzen darstellt.

Die Pflanze nutzt die räumliche Trennung und den kontrollierten Transport von Intermediaten sicherlich zur Regulation dieser Stoffwechselwege (St-Pierre *et al.* 1999; Kutchan *et al.* 2004). Durch eine räumliche Trennung kann der Fluss der Ausgangsprodukte in die Alkaloidbiosynthese beschränkt werden, wenn Alkaloidbiosynthesen Vorstufen aus dem Primärmetabolismus nutzen. Dies gilt ebenso für die Verzweigung von Stoffwechselwegen und der sich daraus ergebenden notwendigen Regulation.

Ein solcher Verzweigungspunkt in der Alkaloidbiosynthese bildet das (*S*)-Retikulin. Von diesem Zwischenprodukt nehmen mehrere Stoffwechselwege ihren Ausgang. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die von (*S*)-Retikulin ausgehende Synthese des Laudanins in distalen Phloemzellen und damit räumlich etwas getrennt von der Morphinbiosynthese stattfindet.

Ein weiterer Punkt, den es bei der Auswertung von Lokalisationsstudien zu bedenken gilt, ist die zeitliche Regulation von Alkaloidbiosynthesen. So zeigen diese Synthesen manchmal nicht in allen Entwicklungsstufen die gleiche Lokalisation. Einige Alkaloidbiosynthesen sind auf bestimmte Entwicklungsstufen beschränkt. So wurde für Enzyme der Nikotinbiosynthese in der Wurzelspitze ein anderes Lokalisationsmuster gefunden wie in älteren Wurzeln (Shoji *et al.* 2000; Shoji *et al.* 2002). Ebenso wird die Monoterpen-Indolalkaloidbiosynthese in *C. roseus* in jungen, schnell teilenden Zellen aktiviert, während sie in älterem Gewebe reduziert wird (St-Pierre *et al.* 1999; De Luca & St-Pierre 2000).

Ein mögliches entwicklungsbedingtes Lokalisationsmuster ist daher auch bei der Lokalisation der Morphinbiosynthese zu bedenken. Die 7OMT und die SalAT konnte in der Wurzelspitze im Perizykel lokalisiert werden, während in älteren Wurzeln beide Enzyme um die entstehenden Milchröhrenglieder lokalisiert waren. Auch in *P. somniferum* scheint sich somit das Lokalisationsmuster in der Wurzel mit dem Entwicklungsstand zu ändern. Um dies genauer abzuklären, müssten noch weitere Enzyme der Biosynthese lokalisiert werden.

Als Grund für eine räumliche Aufteilung der Alkaloidbiosynthese wird in der Literatur auch die Evolution einzelner Gene der Biosynthese aus dem Primärmetabolismus diskutiert. Möglicherweise sind die Enzyme des Primärstoffwechsels, aus denen sich die Enzyme des Sekundärstoffwechsels entwickelten, bereits räumlich lokalisiert.

So könnte sich die PMT, das erste Enzym der Nikotinbiosynthese aus der Spermidin Synthase entwickelt haben (Hibi *et al.* 1994). Ebenso wird eine Entwicklung der Homospermidin-Synthase (HS), einem Enzym der Pyrrolizidinalkaloidsynthese, aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS) diskutiert. Dieses Enzym katalysiert die Aktivierung der Translationsinitiationsfaktors 5A (Ober & Hartmann 1999). Möglicherweise wurden bei Anpassung dieser Gene an neue Funktionen im Sekundärstoffwechsel deren Promotoren übernommen. Die Entwicklung von Transportern wäre dann eine Anpassung an die resultierende zellspezifische Genexpression (Pichersky & Gang 2000; De Luca & St-Pierre 2000).

Eine unveränderte Übernahme des Promotors bei der Evolution der HS aus der DHS konnte in *Senecio vernalis* durch Lokalisationsstudien beider Enzyme allerdings nicht bestätigt werden. Die beiden Enzyme zeigten ein deutliches voneinander verschiedenes Lokalisationsmuster (Moll *et al.* 2002).

4.5. Weiterführende Arbeiten

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Ansätze zu weiterführenden Untersuchungen. So könnten durch die Lokalisation weiterer biosynthetischer Gene Transportschritte näher eingegrenzt werden. Insbesondere eine Klonierung und Lokalisation der Thebain-Synthase ist hervorzuheben. Ebenso könnte die Immunogoldmethode in der Elektronenmikroskopie Aufschlüsse über die Lokalisation der letzten Schritte der Morphinbiosynthese im Latex liefern.

Außerdem stellt sich die Frage nach Aufklärung der Transportsysteme für die Zwischen- oder Endprodukte der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum*.

Aus *C. japonica*-Zellkulturen konnte ein „multidrug-resistance-type (MDR) ATP-binding cassette“ Transporter (ABC-Transporter) isoliert und charakterisiert werden. Dieser Transporter wird im Rhizom von *C. japonica* exprimiert. Das Rhizom ist der Speicherort für Berberin. Synthetisiert wird dieses Benzophenanthridinalkaloid jedoch in der Wurzel. Es konnte gezeigt werden, dass CjMDR1 in der Plasmamembran lokalisiert ist und für den Transport von Berberin in das Rhizomgewebe und dessen Akkumulation in diesem Gewebe verantwortlich ist (Shitan *et al.* 2003).

Die Aufklärung von spezifischen Transportern in der Alkaloidbiosynthese von *P. somniferum* steht noch aus. Diese Transporter bieten auch ein interessantes Ziel für die gentechnische Veränderung der pflanzlichen Alkaloidbiosynthese. Durch die Überexpression von Transportern könnte der Fluss von Zwischenprodukten zu den weiteren Stoffwechselwegen erhöht werden oder größere Mengen an Endprodukten zu ihrem Akkumulationsort transportiert werden (Hashimoto & Yamada 2003). Beides könnte zu einer erhöhten Produktion von gewünschten Alkaloiden führen. Ebenso könnte die Überexpression von Transportern in der Zellsuspensionskultur zu einer erhöhten Alkaloidproduktion führen, da einige Alkaloide toxisch auf die Zellen wirken und ihr Transport ins Medium durch ABC-Transporter dem Schutz der Zellen dient (Goossens *et al.* 2003).

Insgesamt konnten durch die vorliegende Arbeit neue Kenntnisse über die zelluläre- und gewebespezifische Organisation der Alkaloidbiosynthese in *P. somniferum* gewonnen werden. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Regulation dieser Biosynthese bei. Besonders im Hinblick auf einen zukünftigen biotechnologischen Zugang zur Morphinproduktion, aber auch für molekularbiologische Forschungen auf diesem Gebiet, bilden genaue Kenntnisse über die räumliche Regulation der Biosynthese wichtige Grundlagen.

5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die gewebespezifische Lokalisation verschiedener biosynthetischer Enzyme der Alkaloidbiosynthese im Schlafmohn (*P. somniferum*) mittels Immunofluoreszenzmikroskopie. Darüber hinaus sollten die Transkripte der jeweiligen Enzyme mittels *in situ*-Hybridisierung lokalisiert werden. Durch geeignete Auswahl der lokalisierten Enzyme sollte so ein Überblick über die Kompartimentierung der Benzylisochinolin- und Benzophenanthridinalkaloid-Biosynthese gewonnen werden.

1. Im ersten Abschnitt der Biosynthese von L-Tyrosin bis zu dem zentralen Intermediat (*S*)-Retikulin wurde die 4'OMT ausgewählt. Ausgehend von (*S*)-Retikulin standen die 7OMT, die zu Laudanin führt, sowie das BBE, das am Beginn der Benzophenanthridinalkaloid-Synthese steht, zur Verfügung. Spezifisch für den Morphinbiosyntheseweg wurden die SalAT und die COR verwendet.

Die Enzyme 4'OMT, 7OMT, SalAT und COR konnten in *E. coli* heterolog exprimiert und gereinigt werden. Die Herstellung von Antikörper in Kaninchen wurde von einer darauf spezialisierten Firma übernommen.

Die heterologe Expression des Berberinbrückenenzym aus *P. somniferum* in *E. coli* war nicht erfolgreich. Zur Antikörperherstellung wurde in ausreichender Menge vorhandenes Protein, das in Insektenzellen exprimiert worden war, herangezogen. Der dafür verwendete Klon stammte aus *E. californica*.

2. Zur Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen im Schlafmohngewebe wurde Marker für Milchröhren benötigt. Dazu wurde ein Major Latex Protein (MLP 15) in *E. coli* überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Das gereinigte Protein wurde zur Antikörperherstellung ebenfalls der erwähnten Firma übersendet. Um Co-Lokalisationen zu ermöglichen wurde die Antikörpergewinnung mit Meerschweinchen durchgeführt.

Für die Markierung von Siebröhren wurde ein käuflich erworbener monoklonaler Antikörper (aus Mäusen) verwendet.

3. Mit den Antikörpern wurden zunächst Western Blots durchgeführt. Dafür wurden Proteinextrakte mit gleichen Proteinkonzentrationen verwendet. Dadurch konnte die Verteilung der einzelnen Enzyme in verschiedenen Organen der Pflanze dargestellt werden.

Für die Enzyme 4'OMT, 7OMT, SalAT und COR wurden die höchsten Proteinmengen in oberirdischen Teilen, meist in den Kapselextrakten, gefolgt von oberen Stängelabschnitten festgestellt. BBE konnte ausschließlich in Stängel- und Wurzelextrakten detektiert werden.

4. Die Immunolokalisation zeigte in den oberirdischen Teilen der Schlafmohnpflanze folgende Ergebnisse:

Die Enzyme 4'OMT, SalAT und 7OMT konnten im Phloem der Leitbündel sowohl in der Kapsel, als auch im Stängel lokalisiert werden. Dabei zeigte sich zwischen der Lokalisation der 4'OMT und der SalAT kein Unterschied, während die 7OMT in distalen Bereichen des Phloems des Kapselleitbündels lokalisiert war.

Eine Zuordnung der Lokalisation zu den einzelnen Zelltypen des Phloems war durch geeignete Stängellängsschnitte möglich. Dadurch konnte gezeigt werden, dass alle drei Enzyme in parenchymatischen Zellen des Phloems lokalisiert waren. In den Siebröhren war keine Markierung zu beobachten.

Die Codeinon-Reduktase, die den vorletzten Schritt der Morphinbiosynthese katalysiert, konnte überwiegend in den Milchröhren lokalisiert werden. Im Kapselleitbündel zeigten einige wenige Phloemzellen ebenfalls eine Markierung für Codeinon-Reduktase.

Das Berberinbrückenzym konnte durch Immunolokalisation in oberirdischen Teilen der Schlafmohnpflanze nicht nachgewiesen werden.

5. In jüngeren Wurzeln kurz nach der Differenzierungszone konnten die beiden Enzyme SalAT und 7OMT im Perizykel lokalisiert werden. In älteren Wurzeln verschob sich die Lokalisation beider Enzyme in Zellen des sekundären Phloems, die unmittelbar benachbart zu den dort entstehenden Milchröhrengliedern lagen.
Die 4'OMT konnte in der Wurzel nicht lokalisiert werden.
Das Berberinbrückenzym wurde in jüngeren Wurzeln in Rindenzellen nachgewiesen.
6. In der Wurzel scheint die Lokalisation der 7OMT und der SalAT entwicklungsabhängig zu sein.
Die Synthese von Morphin ist an das Auftreten von Milchröhrengliedern gebunden, da die COR erst in diesem Stadium der Wurzeldifferenzierung in diesen Milchröhrengliedern lokalisiert werden konnte.
7. Die Lokalisation der Transkripte durch *in situ*-Hybridisierung konnte für die *7omt*- und die *cor*-mRNA durchgeführt werden. Beide Transkripte waren in Geleitzellen des Phloems im Stängelleitbündel lokalisiert.
Ob darüber hinaus *cor*-Gene in Milchröhren exprimiert werden, konnte wegen der Eigenfärbung des Milchsafte nicht zweifelsfrei geklärt werden.
8. Ausgehend von den Ergebnissen der Immunolokalisation wird in oberirdischen Teilen des Schlafmohns ein Transport mindestens eines Intermediates der Morphinbiosynthese von Phloemzellen in die Milchröhren erforderlich. Da die SalAT noch in umliegenden Phloemzellen, die COR jedoch überwiegend in Milchröhren lokalisiert wurde, erfolgt ein Transport zwischen beiden enzymatischen Umsetzungen. Frühere Ergebnisse sprechen bereits für eine Lokalisation der Thebain-Synthase in Milchröhren oder als Transmembrankomplex zwischen Milchröhren und Phloemzellen.
9. Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich Ansätze für weiterführende Untersuchungen. Nach einer möglichen Klonierung der Thebain-Synthase könnte dieses Enzym ebenfalls lokalisiert werden. Dadurch könnte der mögliche Transport von Salutaridinol-7-*O*-Acetat oder Thebain genau festgelegt werden.
Außerdem stellt sich die Frage nach gewebespezifischen Promotoren der Alkaloidbiosynthese und nach möglichen Transportern. Die Verwendung spezifischer Promotoren in Konstrukten für die Transformation von *P. somniferum*-Pflanzen würden ein gezielteres Eingreifen in Stoffwechselwege mit dem Ziel der Anpassung von Alkaloidprofilen an die Erfordernisse der pharmazeutischen Industrie ermöglichen. Ebenso bieten Transporter ein interessantes Ziel für dieses „Metabolic engineering“ in der Pflanze oder Zellkultur.

6. Literaturverzeichnis

Amann, M.; Wanner, G.; Zenk, M. (1986): Intracellular compartmentation of two enzymes of berberine biosynthesis in plant cell culture *Planta* **167**, 310-320.

Baltes, W. (1989) Lebensmittelchemie. Springer-Lehrbuch Berlin, Heidelberg, New York (Springer).

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. *Plant Cell*, **15**(11), 2626-2635.

Bock, A. (1996): Immunocytoologische Untersuchungen zur Kompartimentierung der Alkaloidbiosynthese bei Vertretern der *Papaveraceae*. Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bock, A.; Wanner, G.; Zenk, M. (2002): Immunological localization of two enzymes involved in berberine biosynthesis. *Planta*, **216**, 57-63.

Böhm, H.; Olesch, B.; Schulze, C.H. (1972): Further Investigations on the Biosynthesis of Alkaloids in isolated Latex from Opium Poppy, *Papaver somniferum* L.. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **163**, 126-136.

Boppre, M. (1986): Insect pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften*, **73**, 17-26.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

Brochmann-Hanssen, E. (1984): A second pathway for the terminal steps in the biosynthesis of morphine. *Planta Med.*, **50**, 343-345.

Burlat, V.; Oudin, A.; Courtois, M.; Rideau, M.; St-Pierre, B. (2004): Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolite. *Plant J.*, **38**(1), 131-141.

Canel, C.; Lopes-Cardoso, M.I.; Whitmer, S.; Van der Fits, L. Pasquali, G.; van der Heijden, R.; Hoge, J.H.C.; Verpoorte, R. (1998): Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta*, **205**, 414-419.

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*. *J. Biol. Chem.*, **277**, (1), 830-835.

Chou, W.M.; Kutchan, T.M. (1998): Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. *Plant J.*, **15** (3), 289-300.

Cline, S.D.; Coscia, C.J. (1988): Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiol.*, **86**, 161-165.

Cline, S.D.; Coscia, C.J. (1989): Ultrastructural changes associated with the accumulation and secretion of sanguinarine in *Papaver bracteatum* suspension cultures treated with fungal elicitor. *Planta*, **178**, 303-314.

Coen, E.S.; Romero, J.M.; Doyle, S.; Elliot, R.; Murphy, G.; Carpenter, R. (1990): Floricaula: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell*, **63**, 1311-1322.

Contin, A.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R.; Memelink, J. (1998): The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in *Catharanthus* cell culture. *FEBS Lett.*, **434**, 413-416.

Coons, A.H.; Kaplan, M.H. (1950): Localization of antigens in tissue cell II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibodies. *J. Exp. Med.*, **91**, 1-13.

Cox, K.H.; DeLeon, D.V.; Angerer, L.M.; Angerer, R.C. (1983): Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probe. *Dev. Biol.*, **101**, 485-502.

Dannenhoffer, J.M.; Suhr, R.C.; Thompson, G.A. (2001): Phloem-specific expression of the pumpkin fruit trypsin inhibitor. *Planta*, **212**, 155-162.

De Carolis, E.; De Luca, V. (1993): Purification, characterization, and kinetic analysis of an 2-oxoglutarat-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis of *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 5504-5511.

De Luca, V.; Balsevich, J.; Kurz, W.G.W. (1985): Acetyl coenzyme A-deacetylvindoline O-acetyltransferase, a novel enzyme from *Catharanthus*. *J. Plant Physiol.*, **121**, 417.

De Luca, V.; Balsevich, J.; Tyler, R.T.; Kurz, W.G.W. (1987): Characterization of a novel *N*-methyltransferase (NMT) from *Catharanthus roseus* plants. Detection of NMT and other enzymes of indole alkaloid biosynthetic pathway in different cell suspension culture systems. *Plant Cell Rep.*, **6**, 458-461.

De Luca, V.; St-Pierre, B. (2000): The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci.*, **5**, (4), 1360-1385.

De Luca, V.; Laflamme, P. (2001): The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Curr. Op. in. Plant Biol.*, **4**, 225-233.

De-Eknamkul, W.; Zenk, M. (1990): Enzymatic formation of (R)-reticuline from 1,2-dehydroreticuline in the opium poppy plant. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 4855-4858.

Decker, G.; Wanner, G.; Zenk, M.; Lottspeich, F. (2000): Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*, **21**, 3500-3516.

- Decker, G. (2001):** Der Milchsafte von *Papaver somniferum*; Die Proteinanalyse als Ansatz zur Funktionsanalyse, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- DellaPenna, D. (2001):** Plant metabolic engineering. *Plant Physiol.*, **125**, 160-163.
- Deus-Neumann, B.; Zenk, M. (1986):** Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism. *Planta*, **167**, 44-53.
- Deus-Neumann, B.; Stöckigt, J.; Zenk, M. (1987):** Radioimmunoassay for the quantitative determination of catharanthine. *Planta Med.*, **53**, 184-188.
- Dewick, P.M. (1998):** Medical Natural Product: A Biosynthetic Approach. Weinheim (Wiley-VCH).
- Dickenson, P.D.; Fairbairn, J.W. (1975):** The Ultrastructure of the Alkaloidal Vesicles of *Papaver somniferum* latex. *Ann. Bot.*, **39**, 702-712.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9969-9973.
- Eilert, U.; Kurz, W.G.W.; Constabel, F. (1985):** Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *J. Plant Physiol.*, **119**, 65-76.
- Esau, K. (1965):** Plant Anatomy 2nd edition New York (John Wiley and Sons, Inc.).
- Facchini, P.J.; De Luca, V. (1994):** Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26684-26690.
- Facchini, P.J.; De Luca, V. (1995):** Phoen-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell*, **7**, 1811-1821.
- Facchini, P.J.; Penzes, Ch.; Johnson, A.G.; Bull, D. (1996):** Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiol.*, **112**, 1669-1677.
- Facchini, P.J.; Park, S.-U. (2003):** Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, **64**, 117-186.
- Fahn, W.; Gundlach, S.; Deus-Neumann, B.; Stöckigt, J. (1985):** Late enzymes of vindoline biosynthesis. Acetyl-CoA: 17-O-deacetylvindoline 17-O-acetyltransferase. *Plant Cell Rep.*, **4**, 333-336.
- Fairbairn J.W.; Djote, M.; Paterson, A. (1968):** The alkaloids of *Papaver somniferum* L. Biosynthetic activity of the isolated latex. *Phytochemistry*, **7**, 2111-2116.
- Fairbairn, J.W.; Hakim, F.; Kheir, Y.E. (1974):** Alkaloidal storage, metabolism and translocation in the vesicles of *Papaver somniferum* Latex. *Phytochemistry*, **13**, 1133-1139.
- Fairbairn, J. W.; Steele, M. J. (1981):** Biosynthetic and metabolic of some organelles in *Papaver somniferum* latex. *Phytochemistry*, **20** (5), 1031-1036.

- Fisinger, U. (1998):** Untersuchungen zur Morphinbiosynthese in der Ratte *Rattus rattus* L. und im Schlafmohn *Papaver somniferum* L. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Frenzel, T.; Zenk, M.H. (1990a):** Purification and Characterization of three Isoforms of S-Adenosyl-L-methionin: (R,S)-Tetrahydrobenzylisoquinoline-N-methyltransferase from *Berberis koetiana* Cell cultures. *Phytochemistry*, **29**, 3491-3497.
- Frenzel, T.; Zenk, M.H. (1990b):** S-adenosyl-L-methionine:3'hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (S)-reticuline pathway. *Phytochemistry*, **29**, 3505-3511.
- Frick, S.; Kutchan, T.M. (1999):** Molecular cloning and functional expression of O-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.*, **17**, 329-339.
- 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. *Transgenic research*, im Druck.
- Gantet, P.; Memelink, J. (2002):** Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharm. Sci.*, **23**. (12), 563-569.
- Gates, M.; Tschudi, G. (1952):** The Synthesis of Morphine. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1109-1110.
- Gates, M.; Tschudi, G. (1956):** The Synthesis of Morphine. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1380-1393.
- Gerardy, R.; Zenk, M.H. (1993a):** Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrom P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, **32**, 79-86.
- Gerardy, R.; Zenk, M.H. (1993b):** Purification and characterization of salutaridine:NADPH 7-oxidoreductase from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, **34**, 125-132.
- Gerlach, D. (1984):** Botanische Mikrotechnik Stuttgart (Thieme Verlag).
- Gershoni, J.M.; Palade, G.E. (1983):** Protein Blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.*, **131**, 1-15.
- Goossens, A.; Häkkinen, S.T.; Laasko, I.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Inze, D. (2003):** Secretion of Secondary Metabolites by ATP-Binding Cassette Transporter in Plant Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol.*, **131**, 1161-1164.
- Griffing, L.P.; Nessler, C.L. (1989):** Immunolocalization of the major latex proteins in developing laticifers of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *J. Plant Physiol.*, **134**, 357-363.
- 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*. *J. Biol. Chem.*, **276**(33), 30717-30723.

Grothe, T. (2002): Untersuchungen zur Morphinbiosynthese im Schlafmohn: Klonierung, heterologe Expression und Charakterisierung der Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase sowie Reinigung der Thebain-Synthase aus dem Milchsaft von *Papaver somniferum* L. Halle, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Gundlach, H.; Müller, M.J.; Kutchan, T.M.; Zenk, M.H. (1992): Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2389-2393.

Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.

Hanahan, D.; Jessee, J.; Bloom, F.R. (1991): Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Met Enzym.*, **204**, 63-113.

Harrison, P.R.; Conkie, D.; Affara, N.; Paul, J. (1974): In situ localization of globin messenger RNA formation. *J. Cell Biol.*, **63**, 402-413.

Hartmann, T.; Ehmke, A.; Eilert, U.; von Borstel, K.; Theuring, C. (1989): Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxide in *Senecio vulgaris*. *Planta*, **177**, 98-107.

Hartmann, T. (1999): Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, **207**, 483-495.

Hashimoto, T.; Hayashi, A.; Amano, Y.; Kohno, J.; Iwananri, H.; Usuda, S.; Yamada, Y. (1991): Hyoscyamine 6- β -hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized to the pericycle of the root. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4648-4653.

Hashimoto, T.; Yamada, Y. (2003): New genes in alkaloid metabolism and transport. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **14**, 163-168.

Hause, B.; Hause, G.; Kutter, C.; Miersch, O.; Wasternack, C. (2003a): Enzymes of Jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant Cell Physiol.*, **44**(6), 643-648.

Hause, B.; Stenzel, I.; Miersch, O.; Wasternack, C. (2003b): Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **64**, 971-980.

Hibi, N.; Higashiguchi, S.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. (1994): Gene expression in tobacco low nicotine mutants. *Plant Cell*, **6**, 723-735.

Hirata, K.; Poeaknapo, C.; Schmidt, J.; Zenk, M.H. (2004): 1,2-Dehydroreticuline synthase, the branch point enzyme opening the morphinan biosynthetic pathway. *Phytochemistry*, **65**, 1039-1046.

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

Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**(1), 23-28.

Irmeler, S.; Schröder, G.; St-Pierre, B.; Crouch, N.P.; Hotze, M.; Schmidt, J.; Strack, D.; Matern, U.; Schröder, J. (2000): Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new

enzyme activities and identification of cytochrom P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.*, **24**, 797-804.

Jez, J.M.; Ferrer, J.L. (2000): Dissection of Malonyl-coenzyme A decarboxylation from Polyketide Formation in the Reaction Mechanism of a Plant Polyketide Synthase. *Biochem.*, **39**(5), 890-902.

Kapoor, L.D. (2002): Opium Poppy Botany, Chemistry and Pharmacology. New York, London (Food Products Press; Haworth Press Inc).

Knoblauch, M.; van Bel, A.J.E. (1998): Sieve tubes in action. *Plant Cell*, **10**, 35-50.

Kohl, F. (1998): Fundgrube Opium: von Morphium bis Papaverin. *Pharmazeutische Zeitung*, **45**, 50-53.

Kutchan, T.M.; Ayabe, S.; Coscia, C.J. (1986): Subcellular localization of alkaloids and dopamine in different vacuolar compartments of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiol.*, **81**, 161-166.

Kutchan, T.M.; Hampp, N.; Lottspeich, F.; Beyreuther, K.; Zenk, M.H. (1988): The cDNA for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*: DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **237**, 40-44.

Kutchan, T.M.; Bock, A.; Dittrich, H. (1994): Heterologous expression of the plant proteins strictosidine synthase and berberine bridge enzyme in insect cell culture. *Phytochemistry*, **35**(2), 353-360.

Kutchan, T.M. (1995): Alkaloid biosynthesis-The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, **7**(7), 1059-1070.

Kutchan, T.M. (1998): Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. The Alkaloids-Chemistry and Biology Vol. 50. SanDiego (Academic press).

Kutchan, T.M.; Frick, S.; Weid, M. (2004): Engineering plant alkaloid biosynthetic pathways-Progress and prospects. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*; Vol. 1. Bioengineering an Molecular Biology of Plant Pathways (Bohnert, H.J.; Nguyen, H.T.; eds.). Oxford (Elsevier Science Ltd.); im Druck.

Kyhse-Andersen, J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a single apparatus without buffer tank for rapid tranfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophy Met*, **10**, 203-209.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 189-198.

Leete, E. (1990): Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids. *Planta Med.*, **56**, 339-352.

Leitch, A.R.; Schwarzacher, T.; Jackson, D.; Leitch, I.J. (1994): *In situ*-Hybridisierung. Labor im Fokus.Heidelberg, Berlin, Oxford (Spektrum Verlag).

Lenz, R.; Zenk, M.H. (1994): Closure of the Oxide Bridge in Morphine Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3897-3900.

Lenz, R.; Zenk, M.H. (1995a): Acetyl coenzyme A: Salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase from *papaver somniferum* plant cell cultures. *J. Biol. Chem.*, **270** (52), 31091-31096.

Lenz, R.; Zenk, M.H. (1995b): Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 132-139.

Lenz, R.; Zenk, M.H. (1995c): Stereoselective reduction of codeinone, the penultimate enzymatic step during morphine biosynthesis in *papaver somniferum*. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 2449-2452.

Maldonado-Mendoza, I.E.; Lopez-Meyer, M.; Galef, J.R.; Burnett, R.J.; Nessler, C.L. (1996): Molecular analysis of a new member of the opium poppy tyrosine/3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase gene family. *Plant Physiol.*, **110**, 43-49.

Mazia, D.; Schatten, G.; Sale, W. (1975): Adhesion of cells to surfaces coated with Polylysine Application to electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **66**, 198-200.

Meikle, P.J.; Hoogenraad, N.J.; Bonig, I.; Clarke, A.E.; Stone, B.A. (1994): A (1-3,1-4)-beta-glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1-3,1-4)-beta-glucans. *Plant J.*, **5**(1), 1-9.

Moll, S.; Anke, S.; Kahmann, U.; Hänsch, R.; Hartmann, T.; Ober, D. (2002): Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vulgaris*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase. *Plant Physiol.*, Vol. **130**, 47-57.

Morgan, J.A.; Shanks, J.V. (2000): Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *J. Biotechnol.*, **79**, 137-145.

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*. *J. Biol. Chem.*, **275**(30), 233987-23405.

Mullis, K.B.; Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Met Enzym.*, **155**, 335-350.

Nagl, W. (1981): Elektronenmikroskopische Laborpraxis Berlin, Heidelberg, New York (Springer)

Nakajima, K.; Hashimoto, T. (1999): Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific pattern. *Plant Cell Physiol.*, **40**(11), 1099-1107.

Nelson, R.S.; van Bel, A.J.E. (1998): The mystery of virus trafficking into, through and out of the vascular bundles. *Progress in Bot.*, **59**, 476-533.

Nessler, C.L.; Mahlberg, P.G. (1977): Ontogeny and cytochemistry of alkaloidal vesicles in laticifers of *Papaver somniferum* L.. *Amer. J. Bot.*, **64**, 541-491.

Nessler, C.L.; Allen, R.D.; Galewsky, S. (1985): Identification and Charakterization of Latex-specific Proteins from Opium Poppy. *Plant Physiol.*, **132**, 588-592.

Nessler, C.L. (1988): Comparative analysis of the major latex proteins from opium poppy. *J. Plant Physiol.*, **132**, 588-592.

Nessler, C.L.; Von der Haar, R.A. (1990): Cloning and expression analysis of DNA sequences for the major latex proteins of opium poppy. *Planta*, **180**, 487-491.

Nessler, C.L.; Burnett, R.J. (1992): Organization of the major latex protein gene family in opium poppy. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 749-752.

Nessler, C.L. (1994): Sequence analysis of two new members of the major latex protein gene family supports the triploid origin of the opium poppy. *Gene*, **139**(2), 207-209.

Nultsch, W. (1986): Allgemeine Botanik Stuttgart, New York (Georg Thieme Verlag).

Ober, D.; Hartmann, T. (1999): Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(26), 14777-14782.

Ober, D.; Hartmann, T. (2000): Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Mol. Biol.*, **44**, 445-450.

Oparka, K.J.; Turgeon, R. (1999): Sieve elements and companion cells - traffic control center of the phloem. *Plant Cell*, **11**, 739-750.

Oparka, K.J.; Roberts, A.G.; Boevink, P.; Santa Cruz, S.; Roberts, I.; Pradel, K.S.; Imlau, A.; Kotlizky, G.; Sauer, N.; Epel, B. (1999): Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspezific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*, **97**, 743-754.

Osmark, P.; Boyle, B.; Brisson, N. (1998): Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. *Plant Mol. Biol.*, **38**, 1243-1346.

Ounaroon, A. (2002): Molecular cloning and functional expression of three *O*-methyltransferases from *Papaver somniferum* L., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

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 of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant J.*, **36**, 808-819.

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. *Plant J.*, **13**(6), 793-801.

- Pichersky, E.; Gang, D.R. (2000):** Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.*, **5**(10), 1360-1385.
- Pilatzke-Wunderlich, I.; Nessler, C.L. (2001):** Expression and activity of cell-wall-degrading enzymes in the latex of opium poppy, *papaver somniferum* L.. *Plant Mol. Biol.*, **45**, 567-576.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. (1975):** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionating. *Nature*, **258**, 598-599.
- Rink, E.; Böhm, H. (1975):** Conversion of reticuline into scoulerine by a cell free preparation from *Macleaya microcarpa* cell suspension cultures. *FEBS Lett.*, **49**, 396-399.
- Roberts, M.; McCarthy, D.; Kutchan, T.M.; Coscia, C.J. (1983):** Localization of enzymes and alkaloidal metabolites in *papaver* latex. *Arc Biochem. Biophysics*, **222**(2), 599-609.
- Roberts, M.F.; Homeyer, B.C.; Pham, T.D.T. (1991):** Further studies of sequestration of alkaloids in *Papaver somniferum* L. Latex vacuoles. *Z. Naturforsch.*, **46c**, 377-388.
- Roberts, A.G.; Oparka, K.J. (2003):** Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 103-124.
- Rüffer, M.; Zenk, M.H. (1987):** Distant precursors of Benzylisoquinoline Alkaloids and their Enzymatic Formation. *Z. Naturforsch.*, **42c**, 319-332.
- 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. *Plant Cell Rep.*, **4**, 237-240.
- Saiki, R.; Short, S.; Falona, F.; Mullis, K.; Horn, G.; Erlich, H.; Arnheim, N. (1985):** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, **230**, 1350-1352.
- Samanani, N.; Facchini, P.J. (2001):** Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis from opium poppy. *Planta*, **213**, 898-906.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York (Cold Spring Harbor Laboratory press)
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulsen, A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sato, F.; Hashimoto, T.; Hachiya, A.; Tamura, K.; Choi, K.-B.; Morishige, T.; Fujimoto, ; Yamada, Y. (2001):** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(1), 367-372.
- Schooneveld, H.; Veenstra, J.A. (1988):** Immunological techniques in insect biology, New York (Springer)

Shitan, N.; Bazin, I.; Dan, K.; Obata, K.; Kigawa, K.; Ueda, K.; Sato, F.; Forestier, C.; Yazaki, K. (2003): Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(2), 751-756.

Shoji, T.; Yamada, Y.; Hashimoto, T. (2000): Jasmonate induction of putrescine *N*-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 831-839.

Shoji, T.; Winz, R.; Iwase, T.; Nakajima, K.; Yamada, Y.; Hashimoto, T. (2002): Expression patterns of two isoflavone reductase-like genes and their possible role in secondary metabolism. *Plant Mol. Biol.*, **50**, 427-440.

St-Pierre, B.; Vazquez-Flota, F.A.; De Luca, V. (1999): Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, **11**, 887-900.

Stadler, R.; Kutchan, T.M.; Löffler, S.; Nagakura, N.; Cassels, B.; Zenk, M.H. (1987): Revision of the early steps of reticuline biosynthesis. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1251-1254.

Stadler, R.; Zenk, M.H. (1990): A Revision of the generally accepted Pathway for the Biosynthesis of the Benzylisoquinoline Alkaloid Reticuline. *Liebigs Ann. Chem.*, 555-562.

Stark, D.M.; Timmerman, K.P.; Barry, G.F.; Preiss, J.; Kishore, G.M. (1992): Regulation of the amount of Starch in Plant Tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Science*, **258**, 287-292.

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

Stöckigt, J.; Zenk, M.H. (1977): Strictosidine (Isovincoside): The key intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 912-914.

Suzuki, K.; Yamada, Y.; Hashimoto, T. (1999): Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol.*, **40**(3), 289-297.

Thureson-Klein, A. (1970): Observations and fine Structure of the Articulated Laticifers of *Papaver somniferum*. *Ann. Bot.*, **34**, 751-759.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.

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*. *Plant J.*, **18**(5), 465-475.

van Bel, A.J.E. (1993): The Transport Phloem. Specifics of its functioning. *Progress in Bot.*, **54**, 134-150.

van Bel, A.J.E.; Knoblauch, M. (2000): Sieve element and companion cell: the story of the comatose patient and the hyperactive nurse. *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 477-487.

van Bel, A.J.E.; Ehlers, K.; Knoblauch, M. (2002): Sieve elements caught in the act. *Trends Plant Sci.*, **7**(3), 126-132.

van Bel, A.J.E. (2003): The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 125-149.

van der Fits, L.; Memelink, J. (2000): ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, **289**, 295-297.

Van der Fit, L.; Memelink, J. (2001): The jasmonate-inducible AP/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J.*, **25**, 43-53.

Van der Heijden, R.; Verpoorte, R.; Ten Hoopen, H.J.G. (1989): Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.)G. Don: a literature survey. *Plant Cell Tissue Org Cult*, **18**, 231-280.

Vasquez-Flota, F.A.; St-Pierre, B.; De Luca, V. (2000): Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry*, **55**, 531-536.

Veau, B.; Courtois, M.; Oudin, A.; Chenieux, J-C.; Rideau, M.; Clastre, M. (2000): Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1517**, 159-163.

Westekemper, P.; Wieczorek, U.; Gueritte, F.; Langlois, N.; Langlois, Y.; Potier, P.; Zenk, M.H. (1980): Radioimmunoassay for the determination of the indole alkaloid vindoline in *Catharanthus*. *Planta Med.*, **39**, 24-37.

Whitmer, S.; Canel, C.; Hallard, D.; Goncalves, C.; Verpoorte, R. (1998): Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.*, **116**, 853-857.

Wieczorek, U.; Nagakura, N.; Sund, C.; Jendrzewski, S.; Zenk, M.H. (1986): Radioimmunoassay Determination of six Opium Alkaloids and its Application to Plant Screening. *Phytochemistry*, **25**(11), 2639-2646.

Wilhelm, R.; Zenk, M.H. (1997): Biotransformation of Thebaine by Cell Culture of *Papaver somniferum* and *Mahonia nervosa*. *Phytochemistry*, **46**, 701-708.

Yun, D.-J.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. (1992): Metabolic engineering of medicinal plants: *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11799-11803.

Zenk, M.H. (1991): Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry*, **30**, 3861-3863.

Zenk, M.H. (1994): Über das Opium, das den Schmerz besiegt und die Sucht weckt. *Pharmazeutische Zeitung*, **48**, 9-23.

Ziegler, J.; Vogt, T.; Miersch, O.; Strack, D. (1997): Concentration of dilute protein solution prior to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **250**, 257-260.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. T.M. Kutchan für die Überlassung dieses faszinierenden Themas und der Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen. Insbesondere hat Ihr stetes Interesse und Ihre Ermutigung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für meine neben der Arbeit doch hohen familiären Belastungen zeigte Sie immer großes Verständnis.

Frau Dr. Hause danke ich besonders für die ausführliche Einführung in mikroskopische Techniken. Ihre wertvollen Anregungen haben mir geholfen, manches Problem mit dem schwierig zu handhabenden Mohnewebe zu lösen.

Bei Herr Dr. J. Ziegler bedanke ich mich für wertvolle Anregungen zu der vorliegenden Arbeit, sowie für die Bereitstellung des MLP und 4'OMT-Klons.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. S. Frick für die Einführung in molekularbiologische Techniken und dem Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Herr Dr. J. Page danke ich für die Hilfe bei den mir anfänglich völlig unbekanntem molekularbiologischen Arbeiten.

Frau Dr. K. Springob danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau V. Dietl, Frau A. Flier und Frau S. Wegener für die Schaffung einer guten Arbeitsatmosphäre und so manche Hilfe, wenn das Ende einer Inkubationszeit meine knappe Zeitplanung überschritten hätte.

Frau U. Schäfer war mir in den Jahren am IPB eine gute Freundin und wird es weiterhin bleiben. Die täglichen Gespräche und Ihre Anteilnahme an meiner Familie werde ich sehr vermissen.

Bei den Mitarbeitern der Gärtnerei bedanke ich mich für die Bereitstellung des pflanzlichen Materials.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich allen Kolleginnen und Kollegen.

Vor allem gilt mein Danke meinem Mann, dessen tatkräftige Hilfe und Unterstützung der Drahtseilakt zwischen Familie und Berufstätigkeit erst möglich gemacht hat.

Lebenslauf

Name: Marion Weid, geb. Merk
Anschrift: Naundorf 24 c; 04703 Bockelwitz
Geburtsdatum: 4.01.1968
Geburtsort: Heidenheim-Mergelstetten
Familienstand: verheiratet seit dem 20.2.1992
3 Kinder

Schulbildung:

1973-1978 Grundschule Mergelstetten
1978-1987 Schillergymnasium Heidenheim/Brenz

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

WS 1987/88-SS 1991 Studium der Lebensmittelchemie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1.02.1992-31.1.1993 Praktikum der Lebensmittelchemie am
Landesuntersuchungsamt für da Gesundheitswesen
Nordbayern

Abschluss: Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

Erziehungszeit:

15.7.1993-30.11.2000 in Mutterschutz und Erziehungsjahre

Berufstätigkeit:

1.1.1996-30.11.2000 geringfügige Beschäftigung
Tätigkeit: Grundwasseranalytik
Ingenieurbüro Wilhelm
04720 Eichardt

1.12.2000-31.3.2004 Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
06120 Halle/Saale
Abt. Naturstoffbiotechnologie
Tätigkeit: wissenschaftliche Angestellte,
Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bockelwitz, den 1.7.2004