

**Putrescin-N-methyltransferase in
Solanum tuberosum L. – ein Enzym der
Calysteginbiosynthese**



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

Herrn Dipl. Pharm. Olaf Stenzel

geb. am 29.09.1973 in Altenburg

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Werner Roos
3. Priv. Doz. Dr. Dietrich Ober

Halle(Saale), 08.07.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009710

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009710>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	a
Abbildungsverzeichnis	f
Abkürzungsverzeichnis	h
Tabellenverzeichnis	j
Publikationen und wissenschaftliche Beiträge	k
A Einleitung	1
A 1 Solanum tuberosum (L.)	1
A 2 Calystegine	2
A 2.1 Struktur und Verbreitung	2
A 2.2 Biologische Aktivität von Calysteginen	3
A 2.3 Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese	5
A 2.4 Putrescin- <i>N</i> -methyltransferasen	10
A 3 Aufgabenstellung	12
B Materialien und Methoden	13
B 1 Materialien	13
B 1.1 Pflanzen und Wurzelkulturen	13
B 1.2 Hefen und Bakterien	13
B 1.3 Vektoren	14
B 1.4 Oligonukleotide	14
B 1.5 Kits und Enzyme	16
B 1.6 Puffer, Standardlösungen und Medien	16
B 1.7 Chemikalien	17
B 1.8 Geräte und Hilfsmittel	17
B 2 Methoden	18
B 2.1 Analytische Methoden	18
B 2.1.1 Isolierung und Derivatisierung der Polyamine	18
B 2.1.2 Dünnschichtchromatographie	19
B 2.1.2.1 Einfachentwicklung	19
B 2.1.2.2 Automatische Mehrfachentwicklung	19

B 2.1.3	HPLC	20
B 2.1.4	Isolierung von Intermediaten der Calysteginbiosynthese ...	21
B 2.1.5	Isolierung und Derivatisierung der Calystegine	22
B 2.1.6	GC	22
B 2.1.7	GC-MS	24
B 2.2	Molekularbiologische Methoden	25
B 2.2.1	DNA-Isolierung	25
B 2.2.2	RNA-Isolierung	25
B 2.2.3	mRNA-Reinigung	26
B 2.2.4	cDNA-Herstellung	26
B 2.2.5	cDNA-Bank-Herstellung	27
B 2.2.6	cDNA-Bank-Screening	27
B 2.2.7	Northern Blot	29
B 2.2.8	Southern Blot	30
B 2.2.9	Dot Blot	31
B 2.2.10	PCR	31
B 2.2.10.1	Kolonie-PCR	32
B 2.2.10.2	5'- und 3'-RACE-PCR	32
B 2.2.11	Klonierung	34
B 2.2.11.1	Klonierung allgemein	34
B 2.2.11.2	Klonierung Chimäre	34
B 2.2.12	Sequenzierung	35
B 2.2.13	Transformation	35
B 2.2.13.1	particle bombardment-Transformation	35
B 2.2.13.2	Selektion und Regeneration	37
B 2.2.14	Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	38
B 2.2.15	Heterologe Expression in <i>Pichia pastoris</i>	39
B 2.3	Biochemische Methoden	41
B 2.3.1	Proteinextraktion aus Pflanzen	41
B 2.3.2	Proteinextraktion aus Bakterien	41
B 2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
B 2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
B 2.3.5	Enzymassay	43
B 2.3.6	Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Enzyme .	44
B 2.3.6.1	Reinigung mit Nickel-Affinitätschromatographie	44
B 2.3.6.2	Konzentrierung der Proteinlösung	45
B 2.3.6.3	K_m -Wert und V_{max} -Bestimmung	45

C	Ergebnisse	46
C 1	Analytik und Akkumulation der Polyamine	46
C 1.1	Analytik der Polyamine	46
C 1.1.1	Quantifizierung mit AMD-TLC	46
C 1.1.2	Quantifizierung mit HPLC	48
C 1.2	Akkumulation der Polyamine in <i>Solanum tuberosum</i>	49
C 2	Akkumulation der Calystegine in <i>Solanum tuberosum</i>	52
C 3	Transformation	53
C 3.1	Transformation in <i>Solanum tuberosum</i> -Blättern	53
C 3.2	Pflanzencharakteristika	54
C 3.3	Integrationsnachweis	54
C 3.4	Transkriptuntersuchung	56
C 3.5	Polyaminmessung	57
C 3.6	Intermediatmessung	58
C 3.7	Calysteginmessung	58
C 4	Isolierung einer <i>pmt</i> -cDNA	58
C 4.1	Bestimmung der spezifischen PMT-Aktivität	59
C 4.2	Isolierung eines <i>pmt</i> -cDNA-Fragmentes	59
C 4.3	Vervollständigung der <i>pmt</i> -cDNA	59
C 4.3.1	5'-RACE-PCR	59
C 4.3.2	3'-RACE-PCR	60
C 4.3.3	Abschließende PCR	60
C 5	Isolierung einer <i>spds</i> -cDNA	60
C 5.1	Isolierung eines <i>spds</i> -cDNA-Fragmentes	60
C 5.2	Vervollständigung der <i>spds</i> -cDNA	61
C 6	Charakterisierung der Sequenzen	62
C 6.1	<i>pmt</i> -Sequenzen	62
C 6.2	<i>spds</i> -Sequenzen	65
C 7	Heterologe Expression der <i>pmt</i> und <i>spds</i>	68
C 7.1	<i>pmt1</i> -Klon in <i>Escherichia coli</i>	68
C 7.2	<i>pmt2</i> -Klon in <i>Escherichia coli</i>	70
C 7.3	<i>pmt2</i> -Chimäre in <i>Escherichia coli</i>	71
C 7.4	<i>pmt2</i> -Klon in <i>Pichia pastoris</i>	73
C 7.5	<i>spds</i> -Klon in <i>Escherichia coli</i>	73
C 8	Biochemische Charakterisierung der PMT	75
C 9	Expressionsanalyse der <i>pmt</i> und <i>spds</i> -Transkripte	76
C 10	Genomische Struktur	78

D	Diskussion	79
D 1	Die Polyamine	79
D 1.1	Die Verteilung der Polyamine	79
D 1.2	N-Methylputrescin - Hinweis auf eine aktive PMT	81
D 2	Die heterologe Transformation	82
D 2.1	Die physiologische Bedeutung der PMT	82
D 2.2	Die Transformation von Kartoffelblättern	83
D 2.3	Die Morphologie der Transformanden	84
D 2.4	Die Transformationsrate	86
D 2.5	Die Transformationsergebnisse im Vergleich	89
D 3	Die PMT in <i>Solanum tuberosum</i>	91
D 3.1	Die PMT-Sequenz im Vergleich	92
D 3.2	Die PMT-Sequenzeigenschaften	93
D 3.3	Die PMT-Proteineigenschaften	95
D 3.4	Die PMT ist Bestandteil der Calysteginbiosynthese	96
D 4	Ausblick	97
E	Zusammenfassung	99
F	Literaturverzeichnis	101
G	Anhang	I
G 1	Polyamin-Bestimmung mit HPLC	I
G 2	Polyamine in Kartoffelgeweben	III
G 3	Polyamine in pmt-transformierten Pflanzenlinien	V
G 4	Intermediate in trII-transformierten Pflanzenlinien	VIII
G 5	cDNA-Sequenzen in <i>Solanum tuberosum</i>	IX
G 5.1	<i>pmt1</i> -cDNA	IX
G 5.2	<i>pmt2</i> -cDNA	X
G 5.3	<i>spds</i> -cDNA	XI
G 6	Charakterisierung der PMT	XII
G 6.1	Nachweis der Substratspezifität	XII
G 6.2	K_m -Wert und V_{max} -Bestimmung	XIII
G 7	Vektorkarten	XIV
G 7.1	Vektorkarte der <i>A. belladonna pmt</i> in pBI121	XIV
G 7.2	Vektorkarte der <i>S. tuberosum trII</i> in pBI121	XIV
G 7.3	Vektorkarte der <i>S. tuberosum pmt1</i> in pET21d	XV
G 7.4	Vektorkarte der <i>S. tuberosum spds</i> in pET21d	XV

G 7.5	Vektorkarte der Chimäre SH in pET21d	XVI
G 7.6	Vektorkarte der Chimäre HS in pET21d	XVI
G 7.7	Vektorkarte der <i>S. tuberosum pmt2</i> in pQE30	XVII
G 7.8	Vektorkarte der <i>S. tuberosum pmt2</i> in pPICZ α A	XVII

Abbildungsverzeichnis

Abb. A-1 <i>Solanum tuberosum</i> (L.)	1
Abb. A-2 Hauptvertreter der Calystegine in <i>Solanum tuberosum</i> L.	2
Abb. A-3 Tropanalkaloidbiosynthese	7
Abb. C-1 Quantifizierung der Polyamine mit AMD-TLC	47
Abb. C-2 Trennung der Polyamine mit HPLC	48
Abb. C-3 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Putrescin- Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	49
Abb. C-4 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermidin- Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	50
Abb. C-5 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermin- Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	50
Abb. C-6 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der <i>N</i> -Methyl- putrescin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	51
Abb. C-7 Wachstum von transformierten Pflanzen versus Wildtyp- Pflanzen (<i>in vitro</i>)	54
Abb. C-8 Dot Blot PMT S	55
Abb. C-9 Dot Blot PMT AS	55
Abb. C-10 Dot Blot TRII AS und S	55
Abb. C-11 Northern Blot TRII AS/S	57
Abb. C-12 Homologievergleich der PMT-Proteinsequenzen	65
Abb. C-13 Homologievergleich der SPDS-Proteinsequenzen	67
Abb. C-14 Elutionsprofil des rekombinanten PMT-Proteins	69
Abb. C-15 SDS-Gel PMT-Reinigung	69
Abb. C-16 Heterologe Expression verschiedener PMT in pET21d	72
Abb. C-17 SDS-Gel SPDS-Reinigung	74
Abb. C-18 Northern Blot <i>pmt/spds</i>	77
Abb. C-19 Southern Blot <i>pmt</i> und <i>spds</i>	78
Abb. G-1 Eichgerade zur Bestimmung von Putrescin	I
Abb. G-2 Eichgerade zur Bestimmung von <i>N</i> -Methylputrescin	I
Abb. G-3 Eichgerade zur Bestimmung von Spermidin	II
Abb. G-4 Eichgerade zur Bestimmung von Spermin	II
Abb. G-5 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Putrescin- Bestimmung in Blättern <i>pmt</i> -transformierter Pflanzenlinien	V
Abb. G-6 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermidin- Bestimmung in Blättern <i>pmt</i> -transformierter Pflanzenlinien	V

Abb. G-7 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermin- Bestimmung in Blättern <i>pmt</i> -transformierter Pflanzenlinien	VI
Abb. G-8 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Intermediat- Bestimmung in Wurzeln <i>trII</i> -transformierter Pflanzenlinien ...	VIII
Abb. G-9 <i>Solanum tuberosum pmt1</i> - cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz	IX
Abb. G-10 <i>Solanum tuberosum pmt2</i> - cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz	X
Abb. G-11 <i>Solanum tuberosum spds</i> - cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz	XI
Abb. G-12 Enzymumsatz der rekombinant gewonnenen PMT.....	XII
Abb. G-13 K_m - und V_{max} -Bestimmung der PMT.....	XIII
Abb. G-14 <i>A. belladonna pmt</i> (AB018573) in pBI121 (Clontech) in <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Orientierung	XIV
Abb. G-15 <i>S. tuberosum trII</i> (AJ292343) in pBI121 (Clontech) in <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Orientierung	XIV
Abb. G-16 <i>S. tuberosum pmt1</i> (AJ605553) in pET21d (Novagen).....	XV
Abb. G-17 <i>S. tuberosum spds</i> (AJ345003) in pET21d (Novagen).....	XV
Abb. G-18 Chimäre SH aus <i>S. tuberosum pmt2</i> und <i>H. niger pmt</i>	XVI
Abb. G-19 Chimäre HS aus <i>H. niger pmt</i> und <i>S. tuberosum pmt2</i>	XVI
Abb. G-20 <i>S. tuberosum pmt2</i> in pQE30 (Qiagen).....	XVII
Abb. G-21 <i>S. tuberosum pmt2</i> in pPICZ α A (Invitrogen).....	XVII

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ADC (<i>adc</i>)	Arginindecarboxylase (Gen)
AMD - TLC	<i>automated multiple development</i> TLC
<i>antisense</i>	3'- 5'-Orientierung einer cDNA
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	mit <i>antisense</i> -Konstrukt transformierte Pflanzenlinie
B5-Medium	Nährmedium nach Gamborg <i>et al.</i> 1968
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
Ci (μ Ci, mCi)	Curie (Mikro-, Milli-)
Da (KDa)	Dalton (Kilo-)
Da (kDa)	Dalton (kilo-)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dcSAM	dekarboxyliertes <i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHS (<i>dhs</i>)	Desoxyhypusinsynthase (Gen)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminteraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	und andere
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
g (ng, μ g, mg)	Gramm (Nano-, Mikro-, Milli-)
GC	Gaschromatograph(ie)
GC-MS	Gaschromatograph(ie) mit massenspezifischem Detektor
GUS (<i>gus</i>)	β -Glucuronidase (Gen)
H6H (<i>h6h</i>)	Hyoscyamin-6 β -hydroxylase (Gen)
HMDS	Hexamethyldisiloxan
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPSF	high purity salt free
HPTLC	<i>high performance thin layer chromatography</i>
HSS (<i>hss</i>)	Homospermidinsynthase (Gen)
l (μ l, ml)	Liter (Mikro-, Milli-)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kat (pkat, nkat)	Katal (Piko-, Nano-)
K_i	Dissoziationskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani-Medium
M (μ M, mM)	Mol (Mikro-, Milli-)
m (nm, mm, cm)	Meter (Nano-, Milli-, Centi-)
min	Minute(n)
MPO (<i>mpo</i>)	<i>N</i> -Methylputrescinoxidase (Gen)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS-Medium	Nährmedium nach Murashige <i>et al.</i> 1962
NAA	1-Naphtylessigsäure

NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-diphosphat (reduzierte Form)
NPTII (<i>nptII</i>)	Neomycinphosphotransferase (Gen)
ODC (<i>odc</i>)	Ornithindecaboxylase (Gen)
p.a.	<i>pro analysis</i>
Pa (kPa)	Pascal (Kilo-)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P	Pellet (unlösliche konjugierte Polyamine)
pfu	<i>plaque forming units</i>
Pfu-Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMT (<i>pmt</i>)	Putrescin- <i>N</i> -methyltransferase (Gen)
PND	Phosphor/Stickstoff-sensitiver Detektor
PVPP	Polyvenylpolypyrrolidon
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
Rf	Retentionsfaktor
Ri-Plasmid	Plasmid aus <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	<i>reverse phase</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> PCR
S	mit <i>sense</i> -Konstrukt transformierte Pflanzenlinie
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SAMDC (<i>samdc</i>)	S-Adenosyl-L-methionindecaboxylase (Gen)
S _D	<i>standard deviation</i>
SDR	<i>short-chain dehydrogenase/reductase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sense</i>	5'-3'-Orientierung einer cDNA
SPDS (<i>spds</i>)	Spermidinsynthase (Gen)
SPMS (<i>spms</i>)	Sperminsynthase (Gen)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	<i>transfer</i> DNA
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TM	Trockenmasse
TMCS	Trimethylchlorsiloxan
TRI (<i>trI</i>)	Tropinonreduktase I (Gen)
TRII (<i>trII</i>)	Tropinonreduktase II (Gen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
Ü1	Überstand 1 (freie Polyamine)
Ü2	Überstand 2 (lösliche konjugierte Polyamine)
UV	Ultraviolett
V (kV)	Volt (Kilo-)
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
V/V	Volumen/Volumen
var.	Varietät
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tab. A-1 Hauptvertreter der Calystegine in <i>Solanum tuberosum</i> und ihre biologische Aktivität	3
Tab. B-1 Verwendete Hefestämme und deren Eigenschaften.....	13
Tab. B-2 Verwendete Bakterienstämme und deren Eigenschaften.....	13
Tab. B-3 Verwendete Vektoren und deren Eigenschaften.....	14
Tab. B-4 Verwendete Primer, Anwendungen und Eigenschaften.....	15
Tab. B-5 Verwendete Kits und Enzyme und deren Bezugsfirmen.....	16
Tab. B-6 Verwendete Chemikalien anderer Firmen.....	17
Tab. B-7 Verwendete Größenmarker und deren Bezugsfirmen.....	17
Tab. B-8 Waschschemata nach Hybridisierung.....	30
Tab. B-9 Standard-PCR-Ansätze.....	31
Tab. B-10 Standard-PCR-Programme.....	32
Tab. B-11 Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gel.....	43
Tab. C-1 Regenerationsraten.....	53
Tab. C-2 Homologievergleich der <i>S. tuberosum. pmt1/PMT1</i> in % (Identität)	63
Tab. C-3 Homologievergleich der <i>S. tuberosum spds1/SPDS</i> in % (Identität)	65
Tab. C-4 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der PMT-Hemmversuche mit verschiedenen Substratanaloga	75
Tab. G-1 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Putrescin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	III
Tab. G-2 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der <i>N</i> -Methylputrescin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	III
Tab. G-3 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermidin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	IV
Tab. G-4 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben	IV
Tab. G-5 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Putrescin-Bestimmung in Blättern <i>pmt</i> -transformierter Pflanzenlinien	VI
Tab. G-6 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Spermidin-Bestimmung in Blättern <i>pmt</i> -transformierter Pflanzenlinien	VII
Tab. G-7 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Spermin-Bestimmung in Blättern <i>pmt</i> -transformierter Pflanzenlinien	VII
Tab. G-8 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Intermediat-Bestimmung in Wurzeln <i>trII</i> -transformierter Pflanzenlinien	VIII

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

- Rocha, P.; Stenzel, O.; Parr, A.; Walton, N.; Christou, P.; Draeger, B.; Leech, M.J., 2002, Functional expression of tropinon reductase I (*trI*) and hyoscyamin-6 β -hydroxylase (*h6h*) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*, Plant Science 162, 905-913
- Stenzel, O.; Teuber, M.; Draeger, B., 2006, Putrescine N-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine forming-plant, Planta 223, 200-212

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

- Rocha, P.; Stenzel, O.; Christou, P.; Draeger, B. and Leech, M.J., 2000, Production of tropane alkaloids in transgenic tobacco plant, Internationale Tagung der GA, DPhG und Deutschen Botanischen Gesellschaft "Biosynthesis and Accumulation of Secondary Products", Halle - (Poster)
- Stenzel, O. und Dräger, B., 2001, Untersuchungen zur Biosynthese der Tropanalkaloide in *Solanum tuberosum* L., Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Sektion: Pflanzliche Naturstoffe, Wittenberg - (Vortrag)
- Stenzel, O., Kaiser, H. und Dräger, B., 2002, Enzymes of the tropane alkaloid biosynthesis in *Solanum tuberosum* L. - molecular and biochemical characterisation, Deutsche Botanikertagung, Freiburg - (Poster)

A Einleitung

A 1 *Solanum tuberosum* (L.)

Die Kartoffel *Solanum tuberosum* (L.) gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae). Nach Hegnauer ist die Familie der Solanaceae nach chemotaxonomischen Gesichtspunkten in 5 Triben unterteilt (Hegnauer 1990). *Solanum tuberosum* ist dem Tribus Solaneae, Subtribus Solaninae zugeordnet. Sie ist eine 0,4 - 1,0 m hohe Staude mit unterbrochenen, unpaarig gefiederten Blättern mit einem kantigen, zum Teil behaarten Stengel. Sie besitzt radiärsymmetrische Blüten, mit einer fünfzähligen, weißen oder violetten Krone. Die Blütezeit dauert von Juli bis Oktober. Die Blüten stehen häufig in Wickeln und bilden kugelige, hellgrüne Beeren (Rothmaler 2002). Die Kartoffelpflanze besitzt Rhizome, die an ihren Enden Verdickungen bilden (Stolone). Aus ihnen gehen Kartoffelknollen hervor, die nach einer Dormanzphase eine vegetative Vermehrung ermöglichen (Strasburger *et al.* 2002).

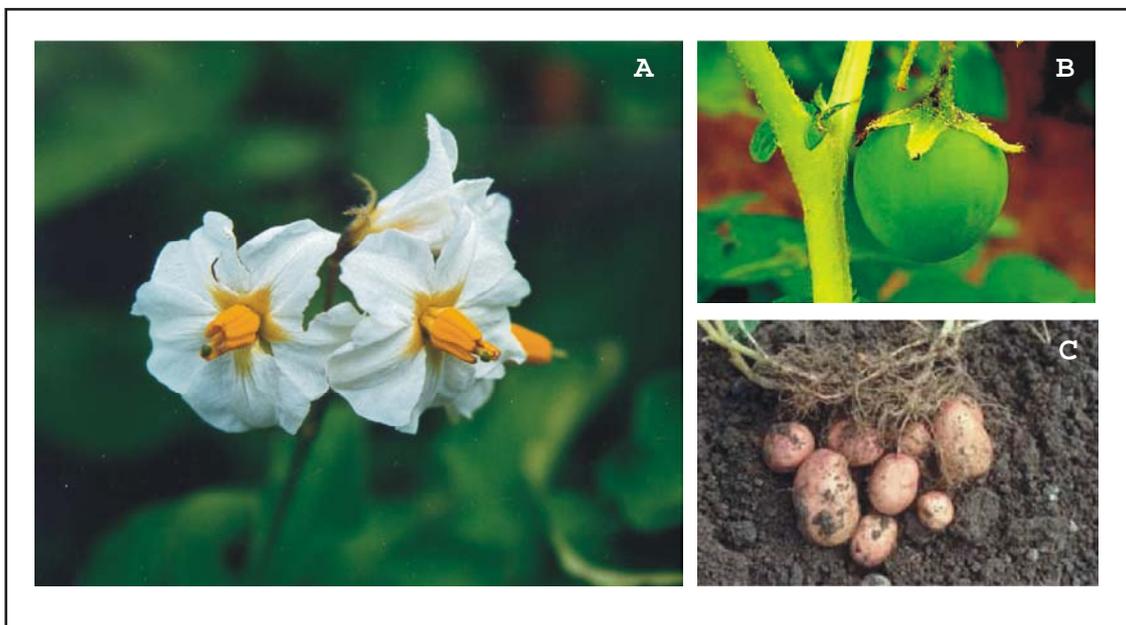


Abb. A-1 *Solanum tuberosum* (L.)

A - Blüten; B - Beeren und C - Knollen

A 2 Calystegine

A 2.1 Struktur und Verbreitung

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide, die an ihrem 8-Azabicyclo[3,2,1]octan-Grundgerüst drei bis fünf Hydroxylgruppen mit variierender stereochemischer Ausrichtung besitzen (Draeger 2004). Anhand ihres Hydroxylierungsgrades werden sie in die Gruppe der A-Calystegine (3 Hydroxylgruppen), B-Calystegine (4 Hydroxylgruppen) und C-Calystegine (5 Hydroxylgruppen) eingeteilt. Die Pflanze *Calystegia sepium* (Convolvulaceae), in der sie erstmals gefunden wurden, war namensgebend (Tepfer et al. 1988). In den vergangenen Jahren konnten 12 verschiedene Calystegine und zwei *N*-Methylcalystegine isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden (Goldmann et al. 1990; Asano et al. 1994; Asano et al. 1995; Asano et al. 1997b). Nortropanalkaloide mit 2 Hydroxylgruppen konnten aus Convolvulaceen und Solanaceen ebenfalls isoliert werden (Asano et al. 2001b).

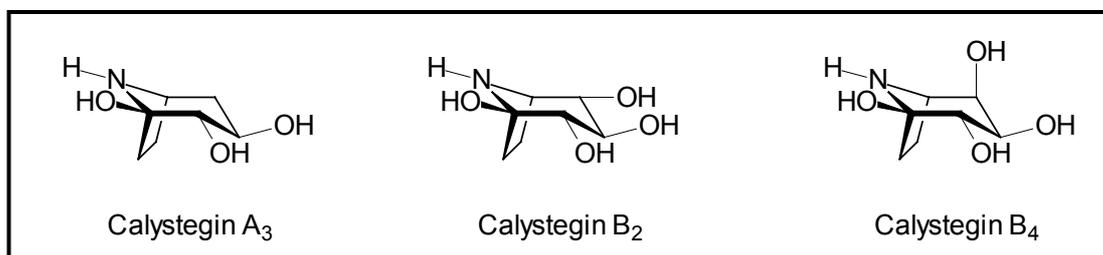


Abb. A-2 Hauptvertreter der Calystegine in *Solanum tuberosum* L.

Calystegine wurden bisher nur in zweikeimblättrigen Pflanzen (Rosiidae) aber nicht in einkeimblättrigen Pflanzen (Liliidae) gefunden. In dikotylen Pflanzen wurden sie bisher in acht Familien detektiert. Die meisten Pflanzenarten die Calystegine enthalten, waren in den Familien der Solanaceen und Convolvulaceen zu finden. Beide Familien sind eng verwandt und in der Ordnung der Solanales zusammengefasst. In den Solanaceen wurden Calystegine z.B. in *Solanum tuberosum* (Nash et al. 1993; Keiner et al. 2000), *Atropa belladonna* (Draeger et al. 1995), *Hyoscyamus niger* (Draeger et al. 1994; Draeger et al. 1995), *Lycopersicon esculentum* (Asano et al. 1997a) und *Mandragora officinarum* (Draeger et al. 1995) und in den

Convolvulaceen in *Calystegia sepium* (Scholl *et al.* 2001) und weiteren Arten dieser Familie detektiert (Schimming *et al.* 1998). Ein Fund von Calysteginen in *Morus alba* (Fam. Moraceae, Ord. Urticales) zeigte, dass Calystegine auch in Pflanzenfamilien zu finden sind, die der Ordnung Solanales nicht angehören (Asano *et al.* 1997a; Asano *et al.* 2001a).

Calystegine kommen meistens in Gemischen vor. In unterschiedlichen Pflanzenarten, aber auch innerhalb einer Pflanze können Zusammensetzung und Konzentration variieren (Draeger 2004). In Solanaceen sind sie oft gemeinsam mit den klassischen Tropanesteralkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin anzutreffen. Man nimmt an, dass sie aus derselben Biosynthese hervorgehen (Goldmann *et al.* 1990). In *Solanum tuberosum* sind als Produkte der Tropanalkaloidbiosynthese ausschließlich Calystegine zu finden (Keiner *et al.* 2000).

A 2.2 Biologische Aktivität von Calysteginen

Calystegine hemmen reversibel Glykosidasen. Ihre Inhibitor-eigenschaft ist in ihrer Struktur begründet, die Monosacchariden ähnelt. Polysaccharide sind das natürliche Substrat von Glykosidasen.

	Mandel-β-Glukosidase K _i -Werte (µM)	Kaffeebohnen-α-Galaktosidase K _i -Werte (µM)
Calystegin A ₃	20,00	20,00
Calystegin B ₂	1,20	0,86
Calystegin B ₄	7,30	k. H.

Tab. A-1 Hauptvertreter der Calystegine in *Solanum tuberosum* und ihre biologische Aktivität

k. H. - keine Hemmung, Werte stammen aus (Asano *et al.* 1997b)

Eine generelle Korrelation zwischen Struktur und Spezifität der Hemmung kann nicht getroffen werden. Mit zunehmendem Hydroxylierungsgrad nimmt die Hemmung von β-Glukosidasen zu. Eine N-Methylierung der Calystegine (B₂ und C₁) führt zum völligen Verlust der Aktivität gegenüber β-Glukosidasen. Die Position und stereochemische Ausrichtung der Hydroxylgruppen spielt bei der Hemmung der einzelnen Glykosidasen ebenfalls eine wichtige Rolle. So sind die Calystegine B₁ und C₁ potente Inhibitoren der Rinderleber-β-Galaktosidase mit K_i-Werten von 1,6 µM und 3,6 µM, wohingegen sie

keine bzw. nur eine sehr geringe Hemmung (K_i -Wert: 90 μM) der Kaffeebohnen- α -Galaktosidase zeigen (Asano *et al.* 1997b).

Die Calystegine B_1 und C_1 hemmen weiterhin auch die menschliche Leber- β -Glukosidase (lysosomal) mit K_i -Werten von 10 μM und 1,5 μM (Asano *et al.* 1997a). In der Hemmung von Glukosidasen könnte auch das therapeutische Potential dieser Verbindungen liegen (Asano *et al.* 2000). Bei der Behandlung von Diabetes mellitus (Typ 2) werden α -Glukosidase-Inhibitoren, wie das Pseudotetrasaccharid Acarbose (Glucobay[®]) und Pseudomonosaccharid Miglitol [*N*-(2-Hydroxyethyl)-1-deoxynojirimycin] (Diastabol[®]) erfolgreich eingesetzt. Der K_i -Wert für die Saccharose- α -Glukosidase (aus Rattendünndarm) liegt für Acarbose bei 0,99 μM und für Miglitol bei 0,086 μM (Samulitis *et al.* 1987).

Miglustat [*N*-(Butyl)-1-deoxynojirimycin] (Zavesco[®]) ist ein weiteres Deoxynojirimycin-Derivat, welches nicht nur Glukosidasen hemmt, sondern auch Glukosyltransferasen (Platt *et al.* 1994a; Platt *et al.* 1994b). Es wird bei Morbus Gaucher Typ 1, einer erblichen Fettstoffwechselstörung erfolgreich eingesetzt. Auf Grund von verminderter Enzymaktivität der Glukocerebrosidase kommt es zur Einlagerung von Glukocerebrosiden in Milz, Leber und Knochenmark, was zu einer krankhaften Vergrößerung dieser Organe und zu Blutbildveränderungen führt. Miglustat hemmt eine Glukosyltransferase die an der Biosynthese von Glukocerebrosiden beteiligt ist.

Ein Einsatz von Calysteginen und Calysteginderivaten als Glukosidase-Inhibitoren bei der Behandlung Diabetes mellitus Typ 2 wäre denkbar. Eine Anwendung in der Krebstherapie sowie als Immunstimulans wurde ebenfalls diskutiert (Asano *et al.* 2000).

Da die Synthese von Calysteginen schwierig ist, stehen nur ungenügende Mengen von reinen Calysteginen für Testzwecke zur Verfügung (Boyer *et al.* 1994; Johnson *et al.* 1995; Skaanderup *et al.* 2003). Eine Möglichkeit zur Gewinnung von Calysteginen wäre die selektive Reinigung aus Pflanzenextrakten. Auf Grund der polyhydroxylierten Grundstruktur von Nortropanalkaloiden ist diese jedoch problematisch (Buettner 1998; Garcia-Moreno *et al.* 2001), wie auch die selektive Derivatisierung dieser Moleküle (Garcia-Moreno *et al.* 2001).

A 2.3 Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese

Ein zentraler Metabolit im Primär- und Sekundärstoffwechsel von Pflanzen ist Putrescin. Es ist Ausgangsstoff für die Polyamine Spermidin und Spermin (Martin-Tanguy 2001) aber auch für Alkaloide wie Nicotin und die klassischen Tropanesteralkaloide (Hemscheidt 2000). Durch Fütterungsversuche mit ^{14}C -markiertem Putrescin an eine *Calystegia sepium*-Wurzelkultur konnte außerdem die Integration der ^{14}C -Markierung in Calystegine gezeigt werden (Goldmann *et al.* 1990).

Putrescin leitet sich von den Aminosäuren L-Ornithin und/oder L-Arginin ab. L-Ornithin wird dabei durch das Enzym Ornithin-decarboxylase (ODC E.C. 4.1.1.17) zu Putrescin decarboxyliert. ODC-Sequenzen sind z.B. von *Datura stramonium* (Michael *et al.* 1996), *Lycopersicon esculentum* (Alabadi *et al.* 1998) und *Nicotiana tabacum* (Imanishi *et al.* 1998) bekannt. L-Arginin wird durch das Enzym Arginindecarboxylase (ADC E.C. 3.5.3.1) decarboxyliert. Agmatin und *N*-Carbamoylputrescin sind Intermediate in der Putrescinbiosynthese. ADC-Sequenzen sind z.B. von *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum* (Rastogi *et al.* 1993), *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum* (partiell) (Nakane *et al.* 2003) beschrieben.

Putrescin ist gleichzeitig Substrat für die Spermidinsynthese, ein Primärstoffenzym, wie auch für die Putrescin-*N*-methyltransferase, ein Sekundärstoffenzym. Mit einem Fütterungsversuch von 1,4- ^{14}C -Putrescin an eine *Hyoscyamus albus*-Wurzelkultur konnte eine Inkorporation der ^{14}C -Markierung in Spermidin und *N*-Methylputrescin belegt werden. Alternative Wege zur Bildung von *N*-Methylputrescin über δ -*N*-Methylornithin (Leete 1979) ohne Beteiligung von Putrescin als Intermediat konnten ausgeschlossen werden (Hashimoto *et al.* 1989a; Hashimoto *et al.* 1989b).

Die Spermidinsynthese (SPDS E.C. 2.5.1.16) nutzt Putrescin für die Übertragung einer Aminopropylgruppe unter Verwendung von decarboxyliertem *S*-Adenosyl-L-methionin (dcSAM) als Cosubstrat. Die Decarboxylierung von *S*-Adenosyl-L-methionin erfolgt durch eine *S*-Adenosyl-L-methionindecarboxylase (SAMDC E.C. 4.1.1.50). In der Familie der Solanaceen sind SPDS-Sequenzen z.B. von *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger* (Hashimoto *et al.* 1998b), *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana sylvestris* und *Nicotiana tabacum* bekannt.

SAMDC-Sequenzen wurden erstmals von Arif und Mitarbeitern in *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum* beschrieben (Arif et al. 1994).

Die Sperminsynthase (SPMS E.C. 2.5.1.22) überträgt eine weitere Aminopropylgruppe unter Beteiligung von dcSAM auf Spermidin. Manche Spermidinsynthasen können auch Sperminsynthaseaktivität zeigen (Sarhan et al. 1987). Eine pflanzliche SPMS-Sequenz ist z.B. von *Brassica pekinensis* bekannt (Sindhu et al. 1984).

Die Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT E.C. 2.1.1.53) katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe auf Putrescin unter Beteiligung von *S*-Adenosyl-*L*-methionin (SAM). PMT-Sequenzen sind von *Atropa belladonna* (Suzuki et al. 1999a), *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *Nicotiana sylvestris* (Hashimoto et al. 1998a) und *Nicotiana tabacum* (Hibi et al. 1994) beschrieben. Phylogenetische Analysen legen nahe, dass sich die PMT im Laufe der Evolution aus SPDS entwickelt haben könnte (Hibi et al. 1994; Hashimoto et al. 1998b).

N-Methylputrescin wird in einem folgenden Schritt durch eine *N*-Methylputrescinoxidase (MPO E.C. 1.4.3.6) oxidativ desaminiert. Das Produkt ist 4-Methylaminobutanal, welches spontan zum *N*-Methyl- Δ^1 -pyrroliniumkation zyklisiert (Feth et al. 1989; Hashimoto et al. 1990). Dieses könnte mit einer Acetoacetyl-CoA-Einheit an Position C₂ zu 2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoat reagieren und anschließend nach Decarboxylierung Hygrin bilden. Nach Zyklisierung könnte so Tropinon gebildet werden (Leete 1990). Ein andere Möglichkeit wäre eine Reaktion mit einer Acetoacetyl-CoA-Einheit an Position C₄ zu 4-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoat und anschließender Zyklisierung zu 2-Carboxytropinon. Nach Decarboxylierung könnte ebenfalls Tropinon entstehen. Dies wurde von Robins und Mitarbeitern nach Fütterung von markierten Vorstufen an eine *Datura stramonium*-Wurzelkultur gezeigt (Robins et al. 1997).

Tropinon ist ein zentraler Metabolit in der Tropanalkaloid-Biosynthese. Durch die Schlüsselenzyme Tropinonreduktase I (TRI E.C. 1.1.1.206) und Tropinonreduktase II (TRII E.C. 1.1.1.236) wird die Ketogruppe an Position C₃ stereoselektiv reduziert.

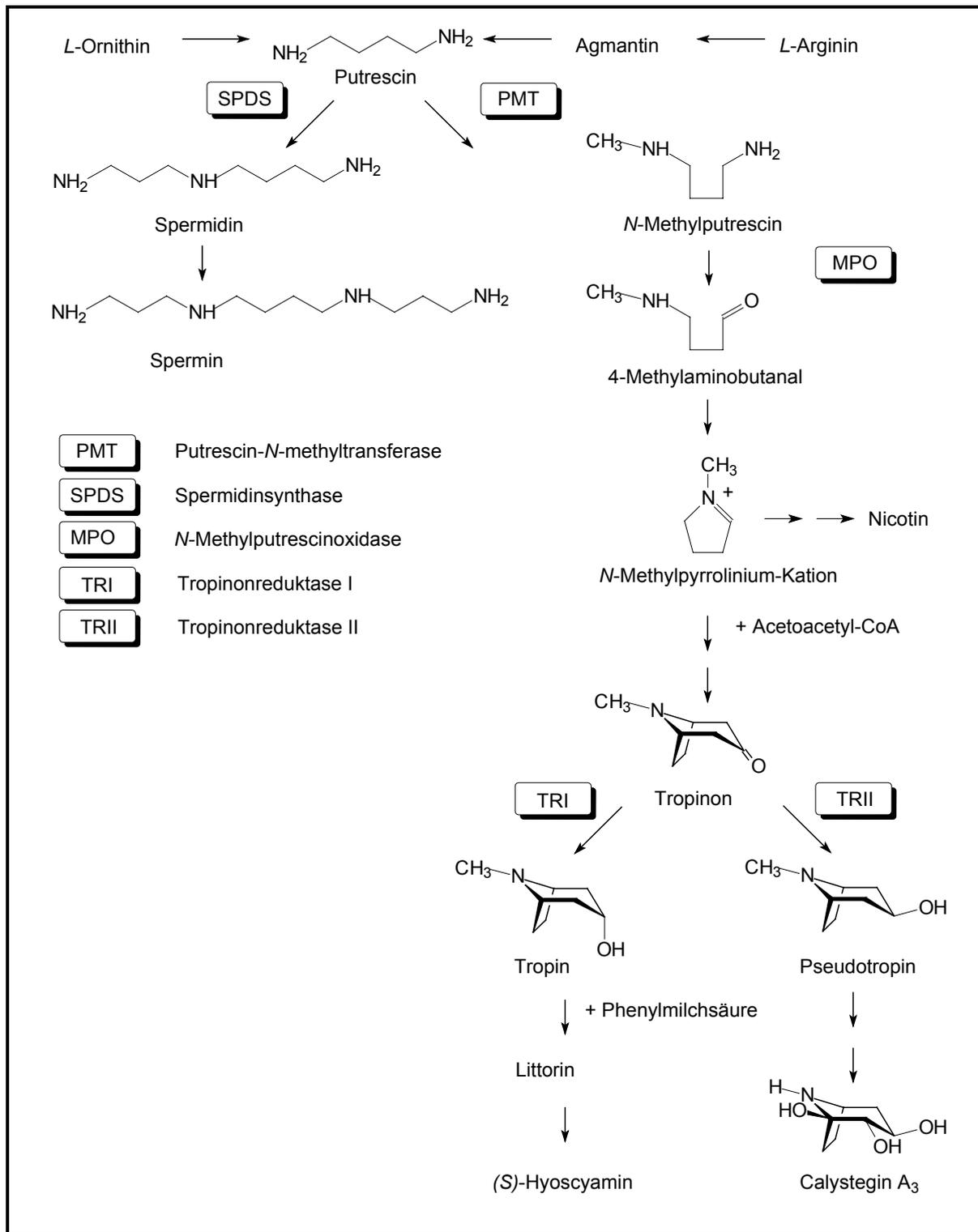


Abb. A-3 Tropanalkaloidbiosynthese

Durch Fütterungsversuche mit ^{15}N -Tropinon an eine *Calystegia sepium*-Wurzelkultur konnte eine Integration der Markierung in Pseudotropin belegt werden (Scholl *et al.* 2001; Scholl *et al.* 2003). Die TRI ist dabei für die Bildung von Tropin (Tropan-3 α -ol) maßgebend. Eine TRI wurde erstmals in einer Wurzelkultur von *Datura stramonium* nachgewiesen (Koelen *et al.* 1982).

Die TRII katalysiert im Gegensatz dazu die Bildung von Pseudotropin (Tropan-3 β -ol) und konnte erstmals aus einer *Hyoscyamus niger*-Wurzelkultur isoliert werden (Draeger *et al.* 1988). Später wurden TRII-Enzyme in *Datura stramonium* (Nakajima *et al.* 1993) und *Solanum tuberosum* (Keiner *et al.* 2002) beschrieben. Beide Tropinonreduktasen gehören zur Gruppe der kurzkettigen Dehydrogenasen (SDR, short-chain dehydrogenases) und verwenden NADPH oder NADH als Co-Substrat (Nakajima *et al.* 1993; Kallberg *et al.* 2002). Die Familie der SDR-Enzyme ist durch hochkonservierte Aminosäuremotive gekennzeichnet (Persson *et al.* 1991; Jörnvall *et al.* 1995).

Tropin reagiert mit Phenylmilchsäure zu Littorin (Ansarin *et al.* 1993; Robins *et al.* 1994). Durch Fütterungsversuche mit markiertem Tropin und Littorin an eine *Datura stramonium*-Wurzelkultur konnte in beiden Fällen eine Integration der Markierung in Hyoscyamin belegt werden (Duran *et al.* 2000). Die Umwandlung von Littorin zu Hyoscyamin ist noch nicht geklärt. Die Reaktion von Hyoscyamin zu Scopolamin dagegen ist belegt. Durch 6 β -Hydroxylierung des Tropanrings und anschließender Epoxidbildung wird Hyoscyamin in Scopolamin überführt. Das beteiligte Enzym ist die Hyoscyamin-6 β -hydroxylase (H6H E.C. 1.14.11.11). Die H6H ist eine 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenase, die erstmals in *Hyoscyamus niger* beschrieben wurde (Hashimoto *et al.* 1986; Hashimoto *et al.* 1987). Später wurde eine H6H auch aus *Atropa belladonna* isoliert (Suzuki *et al.* 1999b).

Nach Reduktion des Tropinons zu Pseudotropin wird eine *N*-Demethylierung und mehrere Hydroxylierung postuliert. *N*-Demethylierungen sind bei Pflanzen mit Nicotin- und Tropanesteralkaloidbiosynthese nicht ungewöhnlich. Nornicotin wurde als Hauptalkaloid in Zellkulturen von *Nicotiana plumbaginifolia* gefunden. Dieses wird durch Demethylierung aus Nicotin gebildet, bei der ein Tetrahydrofolat-katalysierter C₁-Gruppen Transfer postuliert wird (Mesnard *et al.* 2002). Außerdem wurde Norhyoscyamin und Norscopolamin in Pflanzen gefunden, die die klassischen Tropanesteralkaloide produzieren (Griffin *et al.* 2000). Norpseudotropin wurde in *Calystegia sepium*-Wurzelkulturen nachgewiesen (Scholl 2003) und unterstützt diese These.

Man nimmt an, dass nach der *N*-Demethylierung mehrere Hydroxylierungen folgen. Für eine schrittweise Hydroxylierung

spricht der Fund von Dihydroxynortropenen in Pflanzen, die Calystegine bilden können. Von Asano und Mitarbeitern wurden in *Calystegia soldanella* $2\alpha,7\beta$ - und $2\alpha,3\beta$ -Dihydroxynortropan und in *Duboisia leichhardtii* $3\alpha,7\beta$ -Dihydroxynortropan gefunden (Asano et al. 2001b). Die Detektion von $2\alpha,3\beta$ -Dihydroxynortropan in *Calystegia soldanella* stützt die These einer schrittweisen Hydroxylierung, da es mit der Hydroxylgruppe in 3β -Stellung eine potentielle Vorstufe der A- und B-Calystegine darstellen kann.

Alternative Wege in der Calysteginbiosynthese wurden oft diskutiert. So beschrieben Asano und Kollegen eine Biosynthese, bei der es weder zu einer N-Methylierung des Putrescins am Anfang noch zu einer N-Demethylierung am Ende der Biosynthese kommt (Asano et al. 1997b). Putrescin ist zwar Ausgangspunkt dieser Biosynthese, dieses wird jedoch zweimal oxidiert. Aus 4-Aminobutanal entsteht so 4-Iminobutanal, welches mit einer Acetoacetyl-CoA-Einheit zu einem Cycloheptanon-Ring mit Amino- und Hydroxylgruppe kondensiert. Im weiteren Verlauf der Biosynthese postulierte man, dass es zur Oxidation der Hydroxylgruppe und Stickstoffbrückenbildung mit der Aminogruppe kommt. Nach mehreren Hydroxylierungsschritten könnten so Calystegine entstehen (Asano et al. 1997b). Diese unsymmetrische Doppeloxydation ist ungewöhnlich, da vermutlich 4-Aminobutanal vor der zweiten Oxidation zu einem Δ^1 -Pyrrolin-Ring reagiert.

Dieser könnte auch mit einer Acetoacetyl-CoA-Einheit kondensieren und über Norhygrin Nortropinon bilden (Hashimoto et al. 1990). Nortropinon könnte wiederum einer TRII als Substrat dienen. Eine Umsetzung von Nortropinon durch die *Solanum tuberosum* TRII in Norpseudotropin unterstützt diese Möglichkeit (Keiner et al. 2002). Norpseudotropin könnte dann durch mehrere Hydroxylierungsschritte in Calystegine umgewandelt werden.

Ein Cycloheptanon-Ring mit Hydroxyl- und Aminogruppen wurde außerdem als Intermediat der Calysteginbiosynthese postuliert, nachdem in *Physalis alkekengi* (Solanaceae) neben verschiedenen Calysteginen Aminotrihydroxyl-Cycloheptan gefunden wurde (Asano et al. 1996). Es wurde vermutet, dass Aminotrihydroxyl-Cycloheptan durch eine enzymatische Reduktion zu 5-Aminodihydroxyl-Cycloheptanon reagiert und dieses in einem folgenden Schritt zu Calystegin A₅ zyklisiert.

A 2.4 Putrescin-N-methyltransferasen

Die N-Methylierung von Putrescin stellt den Übergang vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel dar. Die Putrescin-N-methyltransferase ist ein Schlüsselenzym in der Nicotin- und Tropanalkaloidbiosynthese und wurde aus Wurzeln von *Nicotiana tabacum* (Mizusaki et al. 1971), *Hyoscyamus albus* (Hibi et al. 1992) und *Datura stramonium* (Walton et al. 1994) isoliert und charakterisiert. *pmt*-cDNA wurde aus *Atropa belladonna* (AB018571), *Datura stramonium* (AJ583514), *Hyoscyamus niger* (AB018572), *Nicotiana attenuata* (AF280403), *Nicotiana sylvestris* (AB004322, AB004323, AB004324) und *Nicotiana tabacum* (D28506) kloniert.

Transkriptuntersuchungen der *Nicotiana tabacum pmt* (Hibi et al. 1994) und *Nicotiana sylvestris pmt* (Hashimoto et al. 1998b) belegten, dass diese ausschließlich in Wurzeln transkribiert werden. Histochemische Analysen bestätigten zudem, dass die *Nicotiana sylvestris* PMT in der Cortex, der Endodermis und dem Xylem junger Wurzeln lokalisiert ist (Shoji et al. 2000). Auch in *Atropa belladonna* wurde *pmt*-Transkript nur in Wurzeln gefunden (Suzuki et al. 1999a). Außerdem wurde durch histochemische Analysen gezeigt, dass die *Atropa belladonna* PMT ausschließlich im Perizykel der Wurzel zu finden ist (Suzuki et al. 1999a).

Die *pmt*-Transkription wird bei verschiedenen *Nicotiana*-Arten durch Stress induziert. So wurde festgestellt, dass die Nicotin-Konzentration in Wurzeln und Blättern von *Nicotiana sylvestris* signifikant erhöht war, nachdem diese durch Insektenfraß geschädigt waren. Parallel dazu stieg die Jasmonsäurekonzentration in Blättern und Wurzeln (Baldwin et al. 1997). Jasmonsäure bzw. deren Methylester sind Signalmoleküle, welche die Expression von Genen induzieren können. Durch Applikation von Methyljasmonat an eine *Nicotiana sylvestris*-Wurzelkultur konnte gezeigt werden, dass die Transkription der *pmt* induzierbar war (Shoji et al. 2000). Ein Versuch mit einer *Nicotiana tabacum*-Suspensionskultur führte ebenfalls zu einer Induktion der *pmt*-Transkription. In Folge einer erhöhten PMT-Expression kam es zur Steigerung der N-Methylputrescin- und Nicotinkonzentration (Imanishi et al. 1998).

Für eine verstärkte Transkription durch Jasmonsäure bzw. deren Methylester könnten bestimmte Regionen im Promotorbereich der *N. tabacum*- bzw. *N. sylvestris* *pmt* verantwortlich sein (Riechers et al. 1999; Shoji et al. 2000), die im Promotorbereich der *A. belladonna* *pmt* nicht zu finden sind (Suzuki et al. 1999a). Promotorstudien mit vier *pmt*-Genen aus *N. tabacum* zeigten, dass ein Bereich von ca. 110 bp vor dem Startcodon entscheidend ist. Durch Deletionsversuche konnte ein konserviertes G-Box-Element (GCACGTTG), eine TA-reiche Region und ein GCC-Motiv (TGCGCCC) gefunden werden, welche die Transkription regulieren (Xu et al. 2004).

Die PMT-Expression kann weiterhin durch Phytohormone beeinflusst werden. Inkubationsversuche mit dem Auxin-Analogon Indol-3-buttersäure und Wurzelkulturen von *Duboisia leichhardtii*, *Hyoscyamus niger* und *Nicotiana tabacum* zeigten, dass die PMT-Aktivität durch Zugabe dieses Auxins verringert wurde (Hashimoto et al. 1989a). Auch die Inkubation einer *N. tabacum*-Suspensionskultur mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure führte zu einer verminderten PMT-Aktivität (Imanishi et al. 1998).

A 3 Aufgabenstellung

Die *N*-Methylierung von Putrescin ist der erste spezifische Schritt in der Nicotin- und Tropanalkaloidbiosynthese. Es wird postuliert, dass Calystegine auf demselben Biosyntheseweg entstehen. Ausgehend von dieser Hypothese sollte ein Beleg für diese Reaktion in einer Pflanze gefunden werden, die ausschließlich Calystegine akkumuliert. Die Kartoffelpflanze war für diese Aufgabenstellung prädestiniert.

Messungen von *N*-Methylputrescin in verschiedenen Kartoffelgeweben könnten erste Hinweise auf eine aktive Putrescin-*N*-methyltransferase geben. Es sollte versucht werden durch heterologe Transformation transgene Kartoffelpflanzen zu generieren, deren PMT-Aktivität verändert ist. Durch Messungen von *N*-Methylputrescin und weiterer Intermediate der Biosynthese könnte der metabolische Fluss näher untersucht werden. Die Auswirkungen der Transformation werden Einblicke in die Regulation der Calysteginbiosynthese geben.

Parallel zu den Transformationsversuchen wird auf direktem Weg versucht, PMT-Aktivität in Kartoffelgeweben zu messen. Aus Geweben mit hoher PMT-Aktivität könnte eine *pmt*-cDNA kloniert werden. Durch heterologe Expression in *E. coli* und Reinigung könnte die Funktionalität belegt werden. Transkriptuntersuchungen der *pmt* in verschiedenen Geweben werden Hinweise auf die spezifische Lokalisation geben. Ein Vergleich mit Transkriptuntersuchungen der *trII* könnte Aufschluss über den Biosyntheseweg innerhalb der Kartoffelpflanze geben.

Der Beleg einer spezifischen und aktiven PMT in Kartoffel würde das Konzept der Calysteginbildung über den Tropanalkaloidbiosyntheseweg entscheidend festigen und alternative Biosynthesewege (A 2.3) würden an Bedeutung verlieren.

B Materialien und Methoden

B 1 Materialien

B 1.1 Pflanzen und Wurzelkulturen

Kartoffelpflanzen, *Solanum tuberosum* L. var. Désirée, wurden aus Kartoffelknollen unter Freilandbedingungen angebaut. Die Kartoffelknollen wurden von der Saatzucht-Firma Fritz Lange KG, Bad Schwartau bezogen. *In vitro* Kartoffelpflanzen, *Solanum tuberosum* L. var. Désirée, wurden von Frau Dr. S. Rosahl, Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale) zur Verfügung gestellt. Diese wurden auf MS-Medium mit 3% Saccharose unter Langtagbedingungen (16 h hell, 8 h dunkel) bei 23 °C kultiviert (Murashige et al. 1962). Aus diesen Pflanzen wurden Wildtyp-Wurzelkulturen gezogen, die in Gamborg's B5 Medium mit 3% Saccharose bei 23 °C, 100 rpm im Dunkeln kultiviert wurden (Gamborg et al. 1968). Außerdem wurden Wurzelkulturen durch Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* (Stamm LBA 9402) gewonnen und wie beschrieben kultiviert.

B 1.2 Hefen und Bakterien

Hefen	Firma	Genotyp	Phänotyp
X-33 (<i>Pichia pastoris</i>) GS115 KM71H	Invitrogen	Wildtyp <i>his4</i> <i>arg4 aox1::ARG4</i>	Mut ⁺ Mut ⁺ His ⁻ Mut ^S Arg ⁺

Tab. B-1 Verwendete Hefestämme und deren Eigenschaften

Bakterien	Firma	Genotyp
OneShot Top10 [®]	Invitrogen	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
XL1-Blue MRF ⁻	Stratagen	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lac^qZAM15</i> Tn10 (Tet ^r)]
SOLR [™]	Stratagen	<i>e14⁻</i> (McrA ⁻) Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>sbcC</i> <i>recB</i> <i>recJ</i> <i>uvrC</i> <i>umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>lac</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>thi-1</i> <i>endA1</i> λ ^R [F' <i>proAB lac^qZAM15</i>]Su ⁻
BL21 (DE3)	Novagen	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)
Rosetta-gami [™] (DE3)	Novagen	Δ <i>ara-leu</i> 7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoAPvuII</i> <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>ahpC</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Sm ^R) ⁴ F ⁺ [<i>lac⁺</i> (<i>lacI^q</i>) <i>pro</i>] <i>gor522::Tn 10</i> (Tc ^R) <i>trxB::kan</i> (DE3) pRARE (Cm ^R)
SG 13009 [pREP4]	Qiagen	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺

Tab. B-2 Verwendete Bakterienstämme und deren Eigenschaften

B 1.3 Vektoren

Vektor	Firma	Eigenschaften
pCR [®] 2.1TopoTA	Invitrogen	Amp ^r , Kan ^r , lacZ α
pGEM [®] -T	Promega	Amp ^r , lacZ α
pBI121	Clontech	Kan ^r , 35S-Pro, GUS
pBluescript [®] SK(+/-)	Stratagen	Amp ^r , lacZ α
pET21d	Novagen	Amp ^r , 6xHis-Tag(C)
pQE30	Qiagen	Amp ^r , 6xHis-Tag(N)
pPICZ α	Invitrogen	Zeo ^r , α -Faktor-Tag(N), c-myc-Epi(C), 6xHis-Tag(C)

Tab. B-3 Verwendete Vektoren und deren Eigenschaften

Amp^r - Ampicillinresistenz; Kan^r - Kanamycinresistenz; Zeo^r - Zeocinresistenz; lacZ α - β -Galaktosidase- α -fragment; 35S-Pro - 35S-Promotor; GUS - Glucoronidase; 6xHis-Tag - 6facher Histidin-Anhang C-terminal/N-terminal; α -Faktor-Tag - α -Faktor-Sekretionssignal; c-myc-Epi - Epitop des c-myc-Onkoproteins (zur Detektion dieses Epitop's bietet Invitrogen Antikörper an)

B 1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (HPSF[®]-Qualität) bezogen. Primer mit HPSF[®]-Qualität sind besonders gereinigt und frei von Kontaminationen, wie Produkten mit Schutzgruppen oder n-1-Produkten. Degenerierte Primer enthalten Buchstaben, die von der gängigen Basen-Kodierung (A, T, C, G) abweichen. Die Dekodierung dieser Buchstaben ist der Tabelle angehängt.

Primer	Anwendung	Sequenz	T _m in °C
A.bel.PMT.S.Dir	Transformation particle bombardment	GGA TCC <u>ATG</u> GAG GTC AAC CAC <i>Bam</i> HI	67,7
A.bel.PMT.AS.Dir		GAG CTC <u>ATG</u> GAG GTC AAC CAC <i>Sac</i> I	66,0
A.bel.PMT.S.Rev		GAG CTC TCA AAA CTC AAC CAA ATC <i>Sac</i> I	64,0
A.bel.PMT.AS.Rev		GGA TCC TCA AAA CTC AAC CAA ATC <i>Bam</i> HI	65,5
S.tub.TR.II.S.Dir	Transformation particle bombardment	GGA TCC <u>ATG</u> GCA GAA TTG AGA <i>Bam</i> HI	66,1
S.tub.TR.II.AS.Dir		GAG CTC <u>ATG</u> GCA GAA TTG AGA <i>Sac</i> I	64,4
S.tub.TR.II.S.Rev		GAG CTC TTA AAA CGC ACC ATT AGC <i>Sac</i> I	65,7
S.tub.TR.II.AS.Rev		GGA TCC TTA AAA CGC ACC ATT <i>Bam</i> HI	63,7
35-S Promotor Dir	Dot Blot Sonde	AAG CTT GCA TGC CTG CAG	61,3
35-S Promotor Rev		GGA TCC TCT AGA GTC CCC CG	62,2
Put. PMT Dir 1	RT-PCR I 1. PMT Fragment	CAA GAT GTC ATG CTC TTT GAG	60,0
Put. PMT Dir 2		ACA GAG AAT GGT GGA TTT CCA	63,2
Put. PMT Rev 1		ATT CTT GAA RTY AAC TTC TGG	54,2
Put. PMT Rev 2		GCR AAA GAT GGC AAA AT	52,4

RT PMT Dir 1	RT-PCR II 1. PMT Fragment	ATG GMT GWM RWM HMY AAC AA	51,8	
RT PMT Dir 2		ATG GMT GWM RWM HMY GGC AG	58,0	
RT PMT Dir 3		ATG GMT GWM RWM HMY GAG TA	53,9	
RT PMT Dir 4		ATG GMT GWM RWM HMY AGA GG	55,9	
RT PMT Dir 5		ATG GMT GWM RWM HMY TGG AA	53,9	
RT PMT Dir 6		ATG GMT GWM RWM HMY ACC AA	53,9	
T 7 M 13 Rev	cDNA-Bank	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA	52,6 56,1	
SPDS Spez. Dir SPDS Spez. Rev	SPDS-spez. PCR	GTG TCT TGC GCG AGG TAT CC AAT GGT CTT GAC AGG GCT TT	61,4 55,3	
5' RACE Dir 1	5' RACE-PCR (PMT)	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI	68,1	
5' RACE Dir 2		IGG GII GGG IIG		
5' RACE Rev 1		GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	63,1	
5' RACE Rev 2		GCT CCA TCG CCG AGA ACC	60,5	
5' RACE Rev 3		TTA CGC GAG GAT CAT TAA AAT TAG GGG GTA CGG AAG AAC TTC GAA T	55,9 60,3	
3' RACE Dir 1	3' RACE-PCR (PMT)	GGA ATT GGT TTT ACA TTA TTC GAA	54,2	
3' RACE Dir 2		CGG GAT CCT TGC GGC TAA T	58,8	
3' RACE Rev 1		CTC GAG CGG TAC CCC GTT TTT TTT TTT TTT TTT T	64,7	
3' RACE Rev 2		CTC GAG CGG TAC CCC G	59,4	
S.tub.PMT ges. Dir	PMT-RT-PCR	AAC AAT ATT TAC TTT CTC CCA AAC	54,2	
S.tub.SPDS ges. Dir	SPDS-RT-PCR	GGT GAA GAA GAC TGA AGA GTC C	60,3	
PMT Sonde Dir	Northern Blot	AAT ATT TAC TTT CTC CCA AAC	49,8	
PMT Sonde Rev	Southern Blot	GTT GGA GTT TCC CAA TAA TAG	54,0	
SPDS Sonde Dir	Northern Blot	GGT GAA GAA GAC TGA AGA GTC	57,9	
SPDS Sonde Rev	Southern Blot	AGA GAT ATA AGG AGA TGG CTC CT	56,8	
S.tub.PMT pET Dir	Expression pET21d	<u>CCA TGG</u> AAG TCA TAT CTA CTC ACA CA	61,6	
S.tub.PMT pET Rev		<u>NcoI</u> CTC GAG AGA CTC AAT CAA ACT TCT G	61,3	
H.nig.PMT pET Dir		<u>XhoI</u> <u>CCA TGG</u> AGG TCA TAA GTA ACC ACA	61,0	
H.nig.PMT pET Rev		<u>NcoI</u> CTC GAG AAA CTC AAC CAA ATC CCT	61,0	
N.tab.PMT pET Dir		<u>XhoI</u> <u>CCA TGG</u> AAG TCA TAT CTA CCA ACA	59,3	
N.tab.PMT pET Rev		<u>NcoI</u> CTC GAG AGA CTC GAT CAT ACT TCT G	60,9	
S.tub.SPDS pET Dir		<u>XhoI</u> <u>CCA TGG</u> CAG ATG AGT GTG CTG	61,8	
S.tub.SPDS pET Rev		<u>NcoI</u> CTC GAG TTT TCC TTT GGT TTC G	62,3	
S.tub.PMT pQE30 Dir		Expression pQE30	<u>XhoI</u> GGA TCC GAA GTC ATA TCT ACT C	58,4
S.tub.PMT pQE30 Rev			<u>BamHI</u> AAG CTT TTA AGA CTC AAT CAA ACT <u>HindIII</u>	54,2
S.tub.PMT Pichia Dir	Expression Pichia pastoris	GAA TTC GAA GTC ATA TCT ACT CAC A	58,1	
S.tub.PMT Pichia Rev		<u>EcoRI</u> GCG GCC GCA GAC TCA ATC AAA CT <u>NotI</u>	64,2	

Tab. B-4 Verwendete Primer, Anwendungen und Eigenschaften

Restriktionsschnittstellen innerhalb der Primer wurden unterstrichen und benannt. Dekodierung: M(A+C), W(A+T), R(A+G), H(A+T+C), Y(C+T)

B 1.5 Kits und Enzyme

Kit/Enzym	Firma
ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
ALFexpress AutoRead Sequencing Kit	Pharmacia
cDNA Synthesis Kit	Stratagen
EasySelect Pichia Expression Kit	Invitrogen
ExAssist Interference-resistant Helper Phage	Stratagen
High Prime DNA Labeling Kit	Roche
HotStar Taq-Polymerase (5 U/μl)	Qiagen
Lysozym	Applichem
mRNA Purification Kit	Pharmacia
PeqGOLD RNAPure	Peqlab
Pfu-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Promega
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	NEB, Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
RNase H	Promega
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4 Ligase	Peqlab
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Peqlab
Terminal Desoxynucleotidyl Transferase	NEB
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen
Trizol	Gibco BRL
Zap-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit	Stratagen
Zap-cDNA Synthesis Kit	Stratagen

Tab. B-5 Verwendete Kits und Enzyme und deren Bezugfirmen

B 1.6 Puffer, Standardlösungen und Medien

Alle verwendeten Puffer, Standardlösung sowie Medien wurden nach den Vorschriften von Sambrock und Mitarbeitern hergestellt (Sambrock *et al.* 1989).

B 1.7 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen "pro analysi"-Qualität und wurden im Wesentlichen von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Appllichem (Darmstadt) bezogen.

Chemikalien	Firma
[$\alpha^{32}\text{P}$] dATP 3000 Ci/mmol	NEN
Ampicillin	Gerbru
Biodyne A Membran 0,45 μm ; \varnothing 85 mm, 132 mm	Pall
Carbenicillin	Gerbru
Hybond [®] N ⁺ Membran	Amersham
Zeocin	Invitrogen

Tab. B-6 Verwendete Chemikalien anderer Firmen

Größenmarker	Firma
1 kbp DNA-Leiter	Gibco BRL
100 bp DNA-Leiter	Peqlab
Protein Standard Mixture IV	Merck

Tab. B-7 Verwendete Größenmarker und deren Bezugfirmen

B 1.8 Geräte und Hilfsmittel

Wesentliche Geräte und Hilfsmittel sind den Kapiteln zu entnehmen, in denen ihre Anwendung beschrieben wurde.

B 2 Methoden

B 2.1 Analytische Methoden

B 2.1.1 Isolierung und Derivatisierung der Polyamine

Nach Smith und Mitarbeitern wurden die Gewebe pulverisiert und lyophilisiert (Heto FD 1,0) (Smith *et al.* 1985). 50 mg wurden anschließend mit 1,5 ml 5% Perchlorsäure (V/V) homogenisiert und bei 4 °C im Dunklen 2 h inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 14000 g zentrifugiert.

Im Überstand (Ü1) fanden sich konjugierte und freie Polyamine.

1. Das Pellet enthielt nur konjugierte Polyamine und wurde mit 1 ml 1N NaOH resuspendiert.
2. 250 µl Originalüberstand (Ü2) und 250 µl Pelletsuspension (P) wurden einer Hydrolyse mit jeweils 250 µl 12 N HCl bei 110 °C 18 h im Trockenschrank in Braunglasampullen unterzogen. Anschließend wurde bei 14000 g 5 min zentrifugiert.
3. 100 µl vom Originalüberstand (Ü1) und 100 µl von beiden Überständen (Ü2 und P) wurden mit 100 µl gesättigter NaCO₃-Lösung, 400 µl Dansylchloridlösung (7,5 mg/ml Aceton) 1 h bei 60 °C im Dunklen inkubiert.
4. Um den Überschuss Dansylchlorid zu binden, wurden 100 µl Prolinlösung (100 mg/ml) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Extrahiert wurden die dansylierten Polyamine mit 700 µl Toluol.
6. Bei 37 °C wurden die Lösungen bis zur Trockne eingengt und in 500 µl Acetonitril für AMD-TLC-Analytik oder in 1000 µl Acetonitril für HPLC-Messungen gelöst.

B 2.1.2 Dünnschichtchromatographie

B 2.1.2.1 Einfachentwicklung

Mit Hilfe der einfachen Dünnschichtchromatographie lassen sich Polyamine nach Dansylierung (B 2.1.1) trennen (Smith *et al.* 1975). Zur Verbesserung der Trennung, wurden in Anlehnung an Lineares und Mitarbeitern HPTLC-Platten (20 cm x 10 cm Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 200 µm, Merck, Darmstadt) eingesetzt (Lineares *et al.* 2001). Die Proben wurden mit dem Linomat IV (Camag) aufgetragen. Als mobile Phase wurde ein Laufmittelgemisch aus Chloroform/Triethylamin (2 : 1, V/V) verwendet (Lineares *et al.* 2001).

B 2.1.2.2 Automatische Mehrfachentwicklung

Für die automatische Mehrfachentwicklung kam das AMD 2 System (Camag) zum Einsatz. Die Trennung erfolgte mit TLC-Platten (20 cm x 10 cm Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 250 µm, Merck, Darmstadt). Die Proben (50 µl) wurden mit dem Linomat IV (Camag) 5 mm breit und mit einem Abstand von 8 mm aufgesprüht. Als mobile Phase wurde zum einen mit einem Laufmittelgemisch aus Cyclohexan/Ethylacetat (5 : 4, V/V) und einer Vorkonditionierung mit 1 N Ammoniak gearbeitet. Zum anderen wurde ein Gemisch aus Chloroform/Triethylamin (2 : 1, V/V) und Vorkonditionierung mit 1N Ammoniak getestet. Für das 1. Laufmittelgemisch wurden die Platten in 4 Stufen (Laufstrecke: 50, 60, 70 und 80 mm) entwickelt. Beim 2. Laufmittelgemisch wurden die Platten ebenfalls in 4 Stufen entwickelt, allerdings bis zu einer maximalen Laufmittelhöhe von 90 mm. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit dem Camag Scanner II.

Eigenschaften:

Scan-Modus:	Fluoreszenzmodus
Wellenlänge:	320 nm
Scangeschwindigkeit:	20 mm/s
Scankopf:	4,00 mm x 0,45 mm
Auswertung:	Camag CATS 3.17 Software

B 2.1.3 HPLC

Die HPLC-Messung wurde mit dem HPLC-System La Chrom der Firma Merck-Hitachi durchgeführt.

Systemeigenschaften:

Pumpe:	L-7100
Interface module:	D-7000
Auto sampler:	L-7200
Säulenofen:	Column-Thermostat Jetstream 2 Plus
Ofentemperatur:	40 °C
Detektoren:	Dioden-Array Detektor (DAD) L-7455 Fluoreszenz Detektor L-7480
Säule:	RP ₁₈ -Säule Hypersil ODS (Knauer)
Säulenparameter:	250 mm x 4 mm, Ø 5 µm
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl

Für die Elution wurde ein Acetonitril/Wasser-Gradient verwendet (Marce *et al.* 1995).

Gradient für HPLC-Trennung:

Programm:	0 min- 5 min	isokratisch bei 65% Acetonitril
	5 min-15 min	steigend auf 90% Acetonitril
	15 min-22 min	isokratisch bei 90% Acetonitril
	22 min-24 min	fallend auf 35% Acetonitril
	24 min-35 min	isokratisch bei 35% Acetonitril

Die Detektion erfolgte bis 50 ng Polyamin pro Injektion mit dem Fluoreszenz-Detektor bei einer Extinktionswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm und ab 50 ng Polyamin pro Injektion mit dem Diodenarray-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 254 nm. Ausgewertet wurden die Proben mit Merck-Hitachi Model D-7000 Chromatography Data Station Software. Zur Identifizierung der Polyamine wurde der Vergleich von Retentionszeiten mit Standards herangezogen. Zusätzlich wurden zu allen Polyaminen die UV-Spektren untersucht und mit Standards verglichen, um die Messung abzusichern. Zur Quantifizierung wurden 3 - 6 unabhängige Proben vermessen.

Nach Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden die Proben als Ausreißer entfernt, die +/- 30% vom Mittelwert abweichen (Kaiser *et al.* 1972).

Kalibriergeraden:**bis 50 ng Polyamin pro Injektion**

Detektor:	Fluoreszenzdetektor
Putrescin:	$y = 0,3385x$ $R^2 = 0,9997$
N-Methylputrescin:	$y = 0,2106x$ $R^2 = 0,9999$
Spermidin:	$y = 0,2349x$ $R^2 = 0,9998$
Spermin:	$y = 0,2506x$ $R^2 = 0,9998$

ab 50 ng Polyamin pro Injektion

Detektor:	Dioden-Array Detektor
Putrescin:	$y = 0,0048 x + 0,0400$, $R^2 = 0,9994$
N-Methylputrescin:	$y = 0,0030 x + 0,0334$, $R^2 = 0,9993$
Spermidin:	$y = 0,0030 x + 0,0172$, $R^2 = 0,9995$
Spermin:	$y = 0,0023 x + 0,1021$, $R^2 = 0,9997$

B 2.1.4 Isolierung von Intermediaten der Calysteginbiosynthese

Tropinon, Tropin, Nortropin und Pseudotropin sind Intermediate der Calysteginbiosynthese. Aus 1 g (Frischmasse) Pflanzengewebe wurden diese mit zweimal 10 ml 50%igem (V/V) Methanol und Ultra Turrax extrahiert. Danach wurde abzentrifugiert (10 min, 4500 g, 4 °C) und die Extraktion wiederholt. Nach weiterer Zentrifugation wurden die vereinigten Überstände bei 50 °C unter Vakuum auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und mit 50 µl Ammoniak alkalisiert. Die Reinigung der Intermediate erfolgte mit Extrelut[®]-Säulen (Merck). Der alkalische Pflanzenextrakt wurde auf eine Säule gegeben und 20 min dort belassen. Die Elution erfolgte zweimal mit 4 ml Chloroform und einmal mit 4 ml Chloroform/Methanol (9 : 1). Die vereinigten Eluate wurden bei 30 °C unter Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und in 200 µl Ethylacetat aufgenommen, um sie im Anschluss per GC (B 2.1.6) zu analysieren.

B 2.1.5 Isolierung und Derivatisierung der Calystegine

Aus 1 g (Frischmasse) Pflanzengewebe wurden Calystegine mit zweimal 10 ml 50% (V/V) Methanol und Ultra Turrax extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 4500 g, 4 °C) und erneuter Extraktion wurden die vereinigten Extrakte auf ein Volumen von 3 ml unter Vakuum und bei 50 °C eingeengt. Die Reinigung erfolgte mit einem stark sauren Kationenaustauscher (Ionenaustauscher I LAB Merck, Säule 10 x 100 mm, mit 5 ml befüllt). Nach Applikation der Probe auf die Säule wurde diese so lange mit Wasser gespült, bis sie neutral reagierte. Danach konnte die Elution mit 2N Ammoniak erfolgen. Anschließend wurde mit Wasser gespült und die vereinigten Eluate auf ein Volumen < 1 ml eingeengt (50 °C und Vakuum). Zum Schluss wurden die Eluate auf 1g FM/ml mit Wasser eingestellt. Da Calystegine kein Chromophor besitzen, müssen diese für eine Detektion derivatisiert werden. Nach Lyophilisierung (Heto FD 1,0) der Extrakte wurde deshalb eine Silylierung durchgeführt (Fleet et al. 1990). Diese erfolgte durch Zugabe von 50 µl n-Hexan, 40 µl HMDS (Hexamethyldisiloxan) und 10 µl TMCS (Trimethylchlorsiloxan). Nach Homogenisierung im Ultraschallbad (Sonorex RK 100, Bandelin) wurde dieses Gemisch 15 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 50 µl des internen Standards Azobenzol (1 mg/ml in n-Hexan) zugegeben und mit n-Hexan auf 500 µl aufgefüllt.

B 2.1.6 GC

Biosyntheseintermediate und silylierte Calystegine wurden mit Hilfe der Gaschromatographie getrennt und quantifiziert. Die Identifizierung erfolgte im Vergleich zu den Retentionszeiten von Standards. Bei simultaner Messung konnte anhand des charakteristischen Peakverhältnisses der beiden Detektoren FID und PND die Identifizierung zusätzlich verifiziert werden. Zur Quantifizierung wurde ausschließlich der FID verwendet. 3 - 6 unabhängige Proben wurden erfasst. Nach Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden die Proben als Ausreißer entfernt, die +/- 30% vom Mittelwert abwichen.

Systemeigenschaften:

Typ:	Gaschromatograph Hewlett Packard 6890
Detektoren:	Flammenionisationsdetektor (FID) Phosphor-Stickstoff-Detektor (PND)
Brenngase:	Synthetische Luft, Wasserstoff
Säule:	HP-5 mit 20 cm HP-5-Vorsäule
Säulenparameter:	30 cm x 320 µm x 0,25 µm
Stationäre Phase:	95% Methylsiloxan, 5% Phenylsiloxan
Mobile Phase:	Helium
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	1 µl

Trennprogramm für Intermediate:

Säulentemperatur:	Initialtemperatur 65 °C 10 °C/min bis 120 °C 2 min 120 °C isotherm 15 °C/min bis 240 °C 10 °C/min bis 300 °C
Injektion:	gepulste Injektion ohne Split (200 kPa, 1,5 min, 250 °C)
Retentionszeiten Ø:	Tropinon: 8,1 min Nortropin: 9,0 min Tropin: 9,2 min Pseudotropin: 9,6 min Azobenzol: 14,1 min

Trennprogramm für Calystegine:

Säulentemperatur:	Initialtemperatur 160 °C, 2 min 5 °C/min bis 240 °C 10 °C/min bis 300 °C
Injektion:	Split (1 : 20), 120 kPa, 250 °C
Retentionszeiten Ø:	Azobenzol: 6,3 min Calystegin A ₅ : 7,4 min Calystegin A ₃ : 7,8 min Calystegin B ₁ : 10,4 min Calystegin B ₃ : 11,9 min

Kalibriergeraden:

Tropinon:	$y = 1956,4 x - 7,578, R^2 = 0,999$
Nortropin:	$y = 1164,5 x - 8,202, R^2 = 0,9958$
Tropin:	$y = 1559,4 x - 7,117, R^2 = 0,9923$
Pseudotropin:	$y = 1765,5 x - 7,319, R^2 = 0,9997$
A-Calystegine:	$y = 263,72 x - 4,505, R^2 = 0,9768$
B-Calystegine:	$y = 266,37 x - 1,277, R^2 = 0,9809$

B 2.1.7 GC-MS

Zur weiteren Absicherung der Identität von Intermediaten und Calyستeginen wurde bei vielen Proben Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion eingesetzt. Die Temperaturprogramme wurden wie in B 2.1.6 verwendet. Im Gegensatz zu B 2.1.6 erfolgte hier die Injektion ohne Split bei einem Druck von 120 kPa und einer Temperatur von 250 °C.

Systemeigenschaften:

Typ:	Gaschromatograph Hewlett Packard 5890, System II Plus
Detektor:	HP 5972 Quadrupolmassenspektrometer
Ionisierungsspannung:	30-70 eV
Säule:	DB-5
Säulenparameter:	30 m x 320 µl x 0,25 µm
Stationäre Phase:	95% Methylsiloxan, 5% Phenylsiloxan
Mobile Phase:	Helium
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	2 µl

B 2.2 Molekularbiologische Methoden

B 2.2.1 DNA-Isolierung

1 g Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 2 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Diese Suspension wurde 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,6 ml 5 M Kaliumacetatlösung zugegeben und 10 min im Eisbad inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 15000 g, 4 °C) wurde der Überstand mit 2 ml eines Gemisches aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) versetzt und die gefällten Proteine abzentrifugiert (5 min, 12000 g, 4 °C). Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die Proteine vollständig entfernt waren. Die in der Lösung enthaltene DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 g, 4 °C) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in ca. 75 µl Aqua dest. aufgenommen. Die photometrische Gehaltsbestimmung erfolgte mit Gene Quant II Pharmacia Biotech bei 260 nm.

Extraktionspuffer:

100 mM	Tris-HCl pH 8.0
50 mM	EDTA
500 mM	NaCl
10 mM	Mercaptoethanol
1,5%	(M/V) SDS

B 2.2.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit PeqGOLD-RNAPure (peqlab) oder mit Trizol® (Gibco BRL). Für stärkehaltige Gewebe, wie Knollen- und Wurzelgewebe wurde Gesamt-RNA nach einem modifizierten Protokoll von Reinbothe und Mitarbeitern isoliert (Reinbothe *et al.* 1992).

3 g Frischmasse wurden in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser und 6 ml NTES-Puffer extrahiert. Die in der Lösung enthaltenen Proteine wurden mit 6 ml Chloroform/Phenol (1:1) durch 5-minütiges kräftiges Mischen (Vortex Genie 2) gefällt. Im Anschluss wurden die Proteine durch Zentrifugation (10 min, 5000 g, 4 °C) von der Lösung abgetrennt. Dieser Fällungs- und Zentrifugationsschritt wurde so lange wiederholt, bis die Proteine vollständig abgetrennt

waren. Zum Ende der Fällung wurde die wässrige Lösung mit 6 ml Chloroform versetzt, gemischt (Vortex Genie 2) und zentrifugiert (10 min, 5000 g, 4 °C), um die Lösung von Phenolresten zu befreien. Danach wurden die Nukleinsäuren aus der wässrigen Lösung mit 3 Vol. 96% Ethanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 bei - 20 °C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 5000 g, 4 °C) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml DEPC behandeltem Wasser gelöst und die Gesamt-RNA mit 5 ml 4 M LiCl (pH 5,2) auf Eis über Nacht gefällt, zentrifugiert (30 min, 5000 g, 4 °C), gewaschen (70% Ethanol) und getrocknet (RT). Zum Ende der Gesamt-RNA-Isolation wurde das Pellet in 100 - 300 µl DEPC-Wasser gelöst und mit Gene Quant II Pharmacia Biotech bei 260 nm vermessen. Die Qualität der Gesamt-RNA wurde durch den Quotient aus $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ bestimmt. Dieser lag bei den verwendeten Proben über 1,6.

NTES - Puffer:

10 mM	Tris-HCl	pH 7,5
100 mM	NaCl	
1 mM	EDTA	
1%	(M/V) SDS	

B 2.2.3 mRNA-Reinigung

Die mRNA-Reinigung erfolgte mit dem "mRNA-Purification-Kit" der Firma Pharmacia. Aus 1,25 mg Gesamt-RNA wurden ca. 10 µg mRNA gewonnen. 5 µg mRNA wurden für die Herstellung einer cDNA-Bank verwendet.

B 2.2.4 cDNA-Herstellung

Für 3'- und 5'-RACE-PCR (B 2.2.10.2) und RT-PCR (B 2.2.10) wurde cDNA aus 5 µg Gesamt-RNA (B 2.2.2) mit Hilfe der SuperScript™ II RT (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Für die 3'-RACE-PCR und RT-PCR wurde ein Oligo(dt)₁₂₋₁₈-Primer (Invitrogen) und für die 5'-RACE-PCR sequenzspezifische Primer (B 1.4) verwendet.

B 2.2.5 cDNA-Bank-Herstellung

Für die Herstellung der cDNA-Bank wurde das "cDNA Synthesis Kit", das "ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit" und das "ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit" der Firma Stratagene verwendet. Entsprechend den Anweisungen wurde mit der mRNA eine Erststrang-cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase und einem Oligo(dt)-Primer mit *Xho*I-Schnittstelle durchgeführt. Dieser folgte eine Zweitstrang-cDNA-Synthese mit DNA-Polymerase I und anschließender Ligation eines Adapters mit *Eco*RI-Schnittstelle. Nach Phosphorylierung der *Eco*RI-Schnittstelle und Restriktion mit *Xho*I wurde mit den unterschiedlich großen cDNA-Fragmenten eine Gelfiltration mit Sepharose CL-2B durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Fraktionen aufgefangen. Fragmente über 400 bp Länge wurden mit T₄-Ligase über Nacht in den linearisierten Uni-ZAP[®] XR-Vektor (λ -Phagengenom mit Phagemid pBluescript SK⁻) ligiert. Mit Hilfe des ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kits wurde die λ -Phagen DNA in Capside (Phagenhüllen) verpackt. Von dieser "Primärbank" wurde der Phagen-Titer bestimmt. Er betrug $1,1 \times 10^6$ pfu/ml. Da dieser Titer für eine cDNA-Bank noch zu gering war, wurde diese mit Hilfe von XL1-Blue-Bakterienzellen amplifiziert. Der daraus resultierende Titer der cDNA-Bank betrug $2,4 \times 10^{10}$ pfu/ml. Mit diesem hohen Titer konnte die cDNA-Bank aliquotiert bei -80 °C eingefroren werden.

B 2.2.6 cDNA-Bank-Screening

Für das Screening wurde die hier beschriebene cDNA-Bank aus 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen der Sorte Désirée verwendet. $1,5 \times 10^5$ Phagen wurden gescreent. Das Primär-, Sekundär- und Tertiärscreening wurde nach den Anweisungen des Stratagene-Manuals durchgeführt. Auf fünf 14,5 cm (\emptyset) Petrischalen mit LB-Agar wurden pro Petrischale ca. 3×10^4 Phagen (pfu) ausplattiert. Nach 6 h bei 37 °C erreichten die Phagenhöfe im Agar eine Größe von ca. 1 - 2 mm im Durchmesser. Nach Lagerung bei 4 °C über Nacht wurden diese am nächsten Tag auf zwei Filter (Biodyne A \emptyset 13,5 cm Pall, Uk) pro Petrischale durch Auflegen (einmal 1 min, einmal 3 min) übertragen. Diese Filter wurden dann 5 min mit Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung (B 2.2.8) und 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat/NaOH,

pH 7,0) auf Filterpapier behandelt. Die Phagen-DNA wurde danach mittels UV-Licht (120 mJ, UV Stratalinker[®] 2400, Stratagene) auf die Filter fixiert, in destilliertem Wasser gespült und anschließend einer Vorhybridisierung (min 4 h bei 65 °C) unterzogen. Dabei kam ein auf 65 °C vorgewärmter Hybridisierungspuffer [6 x SSC, 10 mM EDTA, 5 x Denhardt's Lösung (Sambrock *et al.* 1989), 0,5% (M/V) SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA] zum Einsatz. Nach der Vorhybridisierung wurde der Puffer erneuert und mit einer radioaktiv markierten Sonde über 16 - 18 h hybridisiert. Als Sonde wurde das durch RT-PCR gewonnene PMT-Fragment (750 bp) verwendet. Die Markierung erfolgte mit dem "High-Prime-Labeling"-Kit (Roche) mit [α -³²P] dATP (NEN). Zur Reinigung der markierten Sonde von anhaftenden ungebundenen Nukleotiden wurde das "Nukleotide Removal Kit" (Qiagen) eingesetzt. Nach der radioaktiven Hybridisierung wurden mehrere Waschschriffe durchgeführt. Als erstes wurden die Filter zweimal bei RT 15 min in 2 x SSC und 0,1% SDS (M/V) gewaschen, danach folgte ein Waschschriff bei 62 °C je 30 min in 1 x SSC und 0,1% SDS (M/V) und zum Schluss ein Waschschriff bei 62 °C 15 min in 0,1 x SSC und 0,1% SDS (M/V). Um ein Autoradiogramm aufzunehmen, wurden die Filter zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak NEN X-OmatTM Blue XB-1) und Verstärkerfolie 72 h bei -80 °C inkubiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mit dem AGFA Curix 60. Nach Untersuchung der Röntgenfilme auf Doppelsignale wurden positive Plaques von den LB-Agarplatten abgenommen und in 500 µl SM-Puffer [100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 0,1% Gelatine (M/V)] und 20 µl Chloroform 3 h bei RT geschüttelt, zentrifugiert bei 14000 U/min und bei 4 °C gelagert. 50 µl dieser Lösung wurden mit PCR (B 2.2.10.1) auf das Vorhandensein des PMT-Fragmentes überprüft, welches zum Screening eingesetzt wurde. Um herauszufinden welcher Phagen-Klon das größte PMT-cDNA-Fragment enthielt, wurden PCR-Produkte mit den Vektor-spezifischen Primern T7 und M 13 Rev (B 1.4) in einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt und eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Die größten positiven Phagen-Klone wurden einem Sekundär- (500 pfu/100 mm Petrischale) und Tertiär (100 pfu/100 mm Petrischale) -Screening unterzogen. Nach dem Tertiär-Screening wurde mit Hilfe des ExAssist[®]-Helferphagen das pBluescript SK⁻-Phagemid aus dem λ -Phagen-Genom (Uni-ZAP[®] XR)

ausgeschnitten und in XL1-Blue Bakterienzellen vermehrt. Das pBluescript SK⁻-Phagemid wurde durch PCR (B 2.2.10) mit den Primern T 7 und M 13 Rev (B 1.4) und Sequenzierung (B 2.2.12) überprüft.

B 2.2.7 Northern Blot

Der Northern Blot wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um Transkriptmengen von Genen (*spds* versus *pmt*) in unterschiedlichen Pflanzengeweben zu erfassen und diese miteinander zu vergleichen.

20 µg Gesamt-RNA (B 2.2.2) wurden mit 2 Vol. RNA-Probenpuffer und 0,1 Vol. RNA-Stoppuffer versetzt (Sambrock et al. 1989), 15 min bei 65 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von 5 µl Ethidiumbromid (0,1 mg/ml) wurden die Proben in einem 1,2%igem denaturierendem Agarosegel bei 100 V in 1 x MOPS aufgetrennt (Sambrock et al. 1989). Nach zwei Waschschritten (jeweils 20 min) mit DEPC-Wasser und 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat/NaOH, pH 7,0) wurde die RNA durch Kapillartransfer (Sambrock et al. 1989) auf eine positiv geladene Hybond[®] N⁺-Nylonmembran (Amersham-Pharmacia) über Nacht übertragen und am nächsten Tag mit UV-Licht (120 mJ, UV Stratalinker[®] 2400 Stratagene) fixiert. Anschließend wurde eine Vorhybridisierung (4 h) und Hybridisierung (16 - 18 h) bei 42 °C durchgeführt. Der Hybridisierungspuffer wurde zwischen beiden Hybridisierungen gewechselt.

Hybridisierungspuffer:	50% (V/V)	deionisiertes Formamid
	5 x	SSC
	5 x	Denhardt (Sambrock et al. 1989)
	1% (M/V)	SDS
	10% (M/V)	Dextransulfat
	50 µg/ml	Heringssperma-DNA (denaturiert)

Vor der Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurden zahlreiche Spezifitätstests (B 2.2.9) durchgeführt. Auf Grund der hohen Homologie zwischen beiden Genen (*spds/pmt*) konnten nur sehr kurze Sonden gefunden werden, bei denen keine Kreuzhybridisierungen auftraten. Durch PCR mit den Primern PMT Sonde Dir und PMT Sonde Rev (B 1.4) wurde ein 200 bp langes Fragment vom 5'-Ende der *S. tuberosum pmt* amplifiziert und gereinigt (QIAquick Gel Extraktion Kit). Mit der *S. tuberosum spds* wurde ähnlich verfahren. Auch hier

wurde ein 300 bp langes Fragment vom 5'-Ende mit den Primern SPDS Sonde Dir und SPDS Sonde Rev (B 1.4) synthetisiert und gereinigt. Im Anschluss wurden die Fragmente mit dem "High-Prime-Labeling"-Kit (Roche) mit [α -³²P] dATP (NEN) nach den Anweisungen des Herstellers markiert (Feinberg *et al.* 1983). Ungebundene Nukleotide wurden im Anschluss mit dem "Nukleotide Removal Kit" (Qiagen) entfernt. Ebenso wurde mit der 18S-rRNA-Sonde aus *Lycopersicon esculentum* (Dobrowolski 1987) verfahren, die als Ladekontrolle eingesetzt wurde. Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran mehrfach mit unterschiedlich stark konzentrierten SSC-Lösungen bei unterschiedlichen Temperaturen gewaschen.

Puffer	Temperatur in °C	Zeit in min
2 x SSC + 0,1 SDS (M/V)	25	1
1 x SSC + 0,1 SDS (M/V)	58	30
0,1 x SSC + 0,1 SDS (M/V)	58	30
0,2 x SSC + 0,1 SDS (M/V)	60	15

Tab. B-8 Waschschemata nach Hybridisierung

Anschließend wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt und auf einer Phosphorimagerplatte (Fuji) oder einem Röntgenfilm (Kodak NEN X-Oma tTM Blue XB-1) für mindestens 20 h exponiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphorimager (Fuji BAS 1500) oder nach Entwicklung des Filmes mit AGFA Curix 60.

B 2.2.8 Southern Blot

Das Southern Blot-Verfahren (Southern 1975) wurde angewandt, um die Anzahl der Kopien eines Gens im Genom festzustellen. 20 µg genomische Blatt-DNA (B 2.2.1) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV*, *HindIII* und *Spe* über Nacht bei 37 °C verdaut. Nach einer Fällung wurde die gelöste DNA mit 0,1 Vol. Ladepuffer versetzt und in einem 0,8%igem Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid bei 100 V in TAE-Puffer aufgetrennt (Sambrook *et al.* 1989). Zur Denaturierung der DNA im Gel wurde dieses einmal 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), zweimal 15 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4) und einmal 15 min in 20 x SSC geschwenkt. Der Kapillartransfer auf die Nylonmembran, die Fixierung, Hybridisierung und Auswertung erfolgte, wie unter (B 2.2.7) beschrieben.

B 2.2.9 Dot Blot

Das Dot Blot-Verfahren wurde in dieser Arbeit für den Nachweis der Integration von Expressionsplasmid-DNA in das Pflanzengenom transformierter Pflanzenlinien genutzt.

DNA wurde dazu aus Blättern isoliert (B 2.2.1) in Mengen von 1 µg und 2 µg auf eine Nylonmembran (Hybond® N⁺, Amersham-Pharmacia) punktförmig aufgetragen. Danach wurde die Membran wie unter (B 2.2.8) beschrieben jeweils 5 min in Denaturierungs- und Neutralisierungslösung und 20 x SSC-Lösung inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte sind ebenfalls (B 2.2.8) zu entnehmen.

Auch die Spezifitätstests der *pmt/spds*-Sonden wurden analog durchgeführt. Als Template-DNA für die Tests wurde jedoch mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt.

B 2.2.10 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde für die Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Für RT-PCR wurde cDNA eingesetzt, die durch reverse Transkription aus mRNA (B 2.2.4) gewonnen wurde. Für Test- und Kolonie-PCR wurde eine *Taq*-Polymerase der Firma peqlab verwendet. Für die abschließende PCR nach 3'- und 5'-RACE-PCR kam HotStar-*Taq*-Polymerase (Qiagen) oder *Pfu*-Polymerase (Promega) zum Einsatz.

	<i>Taq</i> -Polymerase peqlab	<i>Taq</i> -Polymerase HotStar Qiagen	<i>Pfu</i> -Polymerase Promega
Template (100 ng)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
10 x PCR-Puffer	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
Q-Solution	0,0 µl	10,0 µl	0,0 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl
Primer Dir (50,0 µM)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Primer Rev (50,0 mM)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
DNA-Polymerase	2,0 U	2,0 U	2,0 U
Aqua dest. ad	50,0 µl	50,0 µl	50,0 µl

Tab. B-9 Standard-PCR-Ansätze

Die PCR wurden im T3 Thermocycler (Biometra) mit folgenden Programmen durchgeführt:

	Taq-Polymerase peqlab	Taq-Polymerase HotStar Qiagen	Pfu-Polymerase Promega
Initialphase 1 Zyklus	95 °C 5 min	95 °C 15 min	95 °C 1 min
Amplifikation 35 Zyklen	95 °C 1 min 50-65 °C 1 min 72 °C 2 min	95 °C 1 min 50-65 °C 1 min 72 °C 2 min	95 °C 1 min 50-65 °C 1 min 72 °C 3-5 min
Finalphase 1 Zyklus	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 5 min

Tab. B-10 Standard-PCR-Programme

B 2.2.10.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde nach einer Transformation (B 2.2.11) eingesetzt, um herauszufinden, welche Bakterienkolonie das eingebrachte Plasmid enthielt. Dazu wurden Kolonien von den Agar-Platten abgenommen und in 20 µl Aqua dest. in einem PCR-Tube gelöst. Anschließend wurden die Tubes dreimal abwechselnd bei 100 °C 3 min gekocht und in flüssigem Stickstoff (3 min) eingefroren. Mit der so zugänglich gemachten Plasmid-DNA konnte eine PCR durchgeführt werden, wobei die Probe mit dem PCR-Ansatz unter (B 2.2.10) auf 50 µl aufgefüllt wurde.

B 2.2.10.2 5´- und 3´-RACE-PCR

Die 5´- und 3´-RACE-PCR wurden im Wesentlichen in Anlehnung an die Protokolle des "5´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" und "3´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" der Firma Life Technologies®/Gibco BRL® durchgeführt.

Gesamt-RNA aus 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen der Sorte Désirée wurden nach (B 2.2.3) gereinigt. Mit 5 µg Gesamt-RNA und SuperScript II Reverser Transkriptase (Invitrogene®) wurde die Erststrang-Synthese durchgeführt. Dazu wurde für die 5´-RACE-PCR der PMT-genspezifische Primer 5´RACE Rev 1 und für die 3´-RACE-PCR der Oligo(dt)₁₂₋₁₈-Primer mit Adapter 3´RACE Rev 1 eingesetzt (B 1.4). Die Reaktion erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die so gewonnene Einzelstrang-DNA wurde im Anschluss mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und stand weiteren PCR-Schritten zur Verfügung.

Für die **5'-RACE-PCR** war es nötig, an das unbekannte komplementäre 3'-Ende der Einzelstrang-DNA ein definiertes Nukleotid-Ende anzuhängen, um damit eine erste PCR durchzuführen. Für das Anhängen von Desoxynukleotiden an das 3'OH-Ende des Einzelstranges stand eine Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) der Firma New England Biolabs® zur Verfügung. Entsprechend den Anweisungen wurde folgender Ansatz gewählt:

DNA	8,0 µl (20 ng)
10 x NEB-Buffer 4	5,0 µl
CoCl ₂	5,0 µl
dCTP (10 mM)	1,0 µl
Aqua	21,5 µl
TdT (5 U/µl)	1,0 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und bei 70 °C (10 min) gestoppt. Der DNA-Einzelstrang mit Cytosin-Anhang am 3'-Ende bildete die Grundlage für eine erste PCR mit dem direkten Primer 5'RACE Dir 1 (poly-dGTP-Primer mit Adapter) und dem reversen Primer 5'RACE Rev 2 (B 1.4). Für die PCR-Reaktion wurde die HotStar Taq-Polymerase der Firma Qiagen verwendet (B 2.2.10). Mit 5 µl einer 1 : 100 (V/V) Verdünnung wurde im Anschluss eine zweite PCR mit dem direkten Primer (Adapter-Primer) 5'RACE Dir 2 und dem in 5'-Richtung eingerückten reversen Primer (5'RACE Rev 3) durchgeführt (B 1.4). Die PCR-Produkte wurden im Anschluss in einem Agarosegel aufgetrennt, mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) gereinigt und in den pCR®2.1TopoTA-Vektor (Invitrogen) kloniert (B 2.2.11). Nach Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen) wurden diese sequenziert (B 2.2.12).

Die **3'-RACE-PCR** wurde ebenfalls in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Schritten durchgeführt. Mit der Einzelstrang-DNA wurde eine erste PCR mit dem PMT-sequenzspezifischen direkten Primer 3'RACE Dir 1 und dem reversen Primer 3'RACE Rev 2 durchgeführt (B 1.4). Der reverse Primer entsprach dem Adapterbereich des Primers 3'RACE Rev 1 (B 1.4). 2µl dieses PCR-Ansatzes wurden nach der PCR-Reaktion für eine zweite PCR eingesetzt. Bei dieser wurde der in 3'-Richtung eingerückte direkte Primer (3'RACE Dir 2) und derselbe reverse Primer, wie in der ersten 3'RACE-PCR eingesetzt (B 1.4). Mit den Amplifikaten wurde wie in der 5'RACE-PCR verfahren.

B 2.2.11 Klonierung

B 2.2.11.1 Klonierung allgemein

Die Klonierungen erfolgten nach einem einheitlichen Schema. Die Methoden der Auftrennung von DNA in einem Agarosegel, Restriktion mit Endonukleasen und Ligation mit T₄-Ligase wurden in Anlehnung an Sambrock und Mitarbeitern durchgeführt (Sambrock *et al.* 1989). Die Transformation der Plasmide in die Bakterienzellen folgte im Anschluss (Cohen *et al.* 1972). Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach den Anweisungen des "QIAquick Gel Extraction"-Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Präparation von Plasmiden wurde mit dem "QIAprep Spin Mini-, Midi- oder Maxiprep"-Kit (Qiagen) nach dessen Ausführungen durchgeführt.

Schema:

1. Amplifikation der DNA mittels PCR aus cDNA oder Plasmid-DNA mit *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase
2. Auftrennung des PCR-Ansatzes mittels Gel-Elektrophorese
3. Reinigung des PCR-Produktes mit QIAquick Gel Extraktion Kit
4. Klonierung in pCR[®]2.1TopoTA-Vektor (Invitrogen)
5. Selektion positiver Klone mit Kolonie-PCR (B 2.2.10.1)
6. Plasmidpräparation mit QIAprep Spin Mini- oder Midiprep Kit
7. Parallelrestriktion des pCR[®]2.1TopoTA-Plasmids und des Zielplasmids
8. Auftrennung des Ansatzes mittels Gel-Elektrophorese
9. Reinigung der Insert-DNA und Zielvektor-DNA mit QIAquick Gel Extraktion Kit
10. Ligation mit T₄-Ligase über Nacht bei 16 °C
11. Transformation des Plasmids in die Bakterienzellen
12. Selektion positiver Klone mit Kolonie-PCR
13. Plasmidpräparation mit QIAprep Spin Mini- oder Midiprep Kit

B 2.2.11.2 Klonierung Chimäre

Da es im Verlauf der heterologen Expression in *E. coli* immer wieder zu Schwierigkeiten mit der Löslichkeit des Proteins der *S. tuberosum* PMT2 kam, aber das Protein der *H. niger* PMT (AB 018572) als Positivkontrolle gut löslich war, sollte mit der Expression von Chimären versucht werden, die Löslichkeit der *S. tuberosum* PMT2 zu verbessern. Durch die Expression von Chimären sollte die Funktionalität einzelner Teile der *S. tuberosum* PMT2 belegt werden.

Die Chimärenbildung war möglich, da beide PMT-cDNA an fast gleicher Stelle die Restriktionsschnittstelle *Xba*I besaßen (C 6.1). Nach RNA-Isolierung (B 2.2.2) und cDNA-Herstellung (B 2.2.4) erfolgte die Klonierung (B 2.2.11.1) in den Expressionsvektor pET21d. Im Anschluss wurden die Plasmide *S. tuberosum pmt2* und *H. niger pmt* in pET21d einer Restriktion mit *Xba*I unterzogen. Auch der Vektor pET21d besaß diese Restriktionsschnittstelle. Nach Auftrennung der Restriktionsansätze durch Gelelektrophorese, und Reinigung mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit wurden beide mit *Xba*I geschnittene PMT-cDNA-Fragmente mit dem jeweils anderen Vektor-Fragment über Nacht mit T₄-Ligase bei 16 °C fusioniert. Die Vektor-Fragmente wurden vorher mit alkalischer Shrimp-Phosphatase (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Der korrekte Einbau in die Vektoren wurde mit Restriktionsanalyse und Sequenzierung (B 2.2.12) überprüft. Die Chimären wurden wie folgt bezeichnet:

SH - *S. tuberosum pmt2* cDNA-Anfang und *H. niger pmt* cDNA-Ende

HS - *H. niger pmt* cDNA-Anfang und *S. tuberosum pmt2* cDNA-Ende

B 2.2.12 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde zum einen der A.L.F.-Sequencer der Firma Amersham-Pharmacia und zum anderen der ABI Prism 377 DNA Sequencer der Firma Perkin Elmer verwendet. Für den A.L.F.-Sequencer wurden Cy-5 markierte Primer eingesetzt. Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Peterson, Biozentrum, Halle (Saale) durchgeführt (Sanger *et al.* 1977; Chen *et al.* 1985). Die Auswertung erfolgte mit Omega 1.2 Software (Oxford Molecular Ltd.) oder per Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

B 2.2.13 Transformation

B 2.2.13.1 particle bombardment-Transformation

Die Transformation von *pmt*- und *trII*-cDNA in *sense*- und *antisense*-Orientierung in *Solanum tuberosum*-Blätter wurde am John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney in Norwich (Großbritannien) unter Anleitung von Mark J. Leech und Leo A. H. Zeef durchgeführt. Für die Transformation wurde die particle gun ACCELL™ der Firma Agracetis verwendet (Mc Cabe *et al.* 1993).

Unter anderem bestanden Erfahrungen mit diesem Gerät für *Catharanthus roseus* (Leech et al. 1998; Hilliou et al. 1999) und für *Hyoscyamus muticus* (Zeef et al. 2000). Transformationen mit *Solanum tuberosum* waren noch nicht durchgeführt worden. Vor der Transformation wurde die *Atropa belladonna pmt* (AB018571) und *Solanum tuberosum trII* (AJ292343) in *sense*- und *antisense*-Orientierung in den Pflanzenexpressionsvektor pBI121 (Clontech) (Tab. B-3) kloniert (B 2.2.11). Nach Überprüfung der korrekten Integration mittels Sequenzierung (B 2.2.12) wurde die Plasmid-DNA an Goldpartikel gebunden.

Goldpartikelpräparation:

1. 10 μ l (1 μ g/ μ l) Plasmid-DNA (B 2.2.11) wurden mit 100 μ l XHO-Puffer vorsichtig gemischt
2. diese Lösung wurde anschließend mit 5 mg Goldpartikel ($\varnothing = 0,91 \mu$ m) versetzt (Vortex Genie 2)
3. 100 μ l 0,1 M Spermidin und 100 μ l 25% PEG (1300-1600) (V/V) wurden anschließend nacheinander unter gründlichem Mischen zugegeben
4. im Anschluss wurden 100 μ l CaCl_2 (2,5 M) tropfenweise eingearbeitet
5. danach wurde 10 min erneut stark gemischt (Vortex Genie 2) und zentrifugiert (1 min, 10000 g, 4 °C)
6. der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 ml Ethanol (96%) im Ultraschallbad resuspendiert und zentrifugiert (1 min, 10000 g, 4 °C)
7. anschließend wurde das Pellet erneut in 10 ml Ethanol (96%) im Ultraschallbad resuspendiert
8. 30 μ l dieser Suspension wurden auf das Trägermaterial (1 cm^2 Mica-Aluminiumfolie der Firma Du Pont) aufgetragen und getrocknet bis der Ethanol (96%) vollständig verdunstet war

XHO-Puffer:	5 M NaCl	30 μ l
	2 M Tris-HCl pH 8,0	5 μ l
	dest. Wasser	ad 1000 μ l

Vorbereitung der Blätter:

1. Junge Blätter der Kartoffelsorte Désirée wurden gesammelt und 15 min in 10%iger handelsüblicher Reinigungslösung mit NaOCl (bleach) inkubiert, gründlich mit sterilem Wasser gespült und unter sterilen Bedingungen in 1 cm²-große Stücke geschnitten.
2. Danach wurden die Blattstücken in Petrischalen mit MS-Medium (Murashige et al. 1962) mit 3% Zucker und 0,8% Agar 24 h bei 25 °C (12h Tag/Nachtregime) inkubiert.

Die Transformation erfolgte bei 14 kV. Pro Konstrukt wurden 30 bombardment durchgeführt. Die so behandelten Blattstücken wurden über Nacht bei 25 °C inkubiert und am nächsten Tag auf frisches MS-Medium mit 3% Zucker, 0,8% Agar, 1 mg/l 6-Benzylaminopurin (BAP) und 0,1 mg/l 1-Naphtylelessigsäure (NAA) überführt und für 48 h bei 25 °C (12h Tag/Nachtregime) inkubiert.

B 2.2.13.2 Selektion und Regeneration

Bei 25 C° und einem Tag/Nachtregime (16h/8h) wurden die folgenden Kulturschritte durchgeführt. 72 h nach dem particle bombardment wurde mit der Kanamycin-Selektion und Regeneration von Kalli begonnen. Dazu wurden die Blattstücken auf Kallus-Induktionsmedium überführt.

Kallus-Induktionsmedium:	Konzentration: Auxine ↑ Cytokinine ↓
MS-Medium mit	3,0% (M/V) Zucker
	0,8% (M/V) Agar
	3,0 mg/l 1-Naphthylelessigsäure
	0,1 mg/l Benzylaminopurin
	50,0 mg/l Kanamycin

Aller drei Wochen wurden die Medien durch frische ersetzt. Nach ca. sechs Wochen kam es zur ersten Kallus-Bildung. Insgesamt wurden die Blattstücken drei Monate auf Kallus-Induktionsmedium belassen. Danach wurden die Kalli von Blattresten befreit und auf Spross-Induktionsmedium kultiviert.

Spross-Induktionsmedium:	Konzentration:	Auxine ↓ Cytokinine ↑
MS-Medium mit	3,0%	(M/V) Zucker
	0,8%	(M/V) Agar
	2,00	mg/l Zeatinriboside
	0,02	mg/l 1-Naphthyllessigsäure
	0,02	mg/l Gibberellinsäure A ₃
	50,00	mg/l Kanamycin

Nach sechs Wochen kam es zur ersten Sprossbildung. Dieser Vorgang dauerte bei manchen Kalli bis zu sechs Monaten. Nachdem die Sprosse eine Größe von 1 - 2 cm erreicht hatten, konnten sie auf Hormon- und Kanamycin-freies MS-Medium mit 3,0% Zucker und 0,8% Agar kultiviert werden. Nachdem die Pflanzen eine entsprechende Größe (ca. 8 cm) erreicht hatten, wurde auch versucht, diese in gedämpfter Erde zu kultivieren.

B 2.2.14 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Als Plasmide für die heterologe Expression in *Escherichia coli* wurde hauptsächlich der Vektor **pET21d** (Novagen) verwendet, außerdem kam der Vektor **pQE30** (Qiagen) zum Einsatz. Mit diesen Vektoren ist eine Expression von Proteinen mit und ohne Histidin-Anhang (N- und C-terminal) möglich. Weitere Charakteristika dieser Vektoren sind dem Kapitel (B 1.3) zu entnehmen. Für SPDS-Konstrukte wurde, auf Grund des natürlichen Vorkommens der SPDS in Bakterien, der *E. coli*-Stamm HT 551 eingesetzt. Bei diesem sind die meisten SPDS- und SAMDC-Gene deletiert (Xie et al. 1993). Dieser Bakterienstamm wurde uns freundlicherweise von Prof. Takashi Hashimoto (Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Nara, Japan) zur Verfügung gestellt. Für PMT-Konstrukte wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers für den Vektor pET21d der Bakterienstamm BL 21 (DE3) und für den Vektor pQE30 der Bakterienstamm SG verwendet (B 1.2). Außerdem kam der BL 21 (DE3)-verwandte Bakterienstamm Rosetta-gami™ (DE3) zum Einsatz. Dieser Bakterienstamm ermöglicht die Expression von eukaryotischen Proteinen in *E. coli*, die auf Grund der "codon usage" von *E. coli* bei bestimmten Proteinen nicht möglich wäre. Er enthält die fehlenden tRNA-Gene, für in *E. coli* selten verwendete tRNAs [Rosetta™-Stämme] (Kane 1995). Außerdem verstärkt dieser

Bakterienstamm auf Grund von Mutationen in den Thioredoxin- und Glutathionreduktase-Genen [Origami™-Stämme] die Disulfidbrückenbildung von heterolog exprimierten Proteinen im Cytoplasma der Bakterien und kann somit den aktiven Anteil der exprimierten Proteine erhöhen (Bessette *et al.* 1999).

Transformierte Bakterien wurden in TB-Medium (B 1.6) mit 50 µg/ml Carbenicillin bei 37 °C im Schüttler (innova 4230, New Brunswick Scientific) bei 250 rpm bis zu einer optischen Dichte von $A_{600\text{ nm}} = 0,8 - 1,0$ inkubiert und bei Temperaturen von 16 °C, 25 °C und 37 °C mit 1 mM IPTG 2 h, 4 h, 8 h und 16 h induziert, um optimale Expressionsbedingungen zu finden. Nach Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4 °C) wurden die Bakterien aufgeschlossen (B 2.3.2) und exprimierte Proteine weiter untersucht.

B 2.2.15 Heterologe Expression in *Pichia pastoris*

Für Expressionsversuche in Hefezellen wurde das EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) verwendet. Innerhalb des Kits wurde der Expressionsvektor **pPICZ0A** (Invitrogen) (B 1.3) verwendet. Dieser Vektor ermöglicht die Expression eines Proteins als Fusionsprotein mit dem *Saccharomyces cerevisiae* α-Faktor Sekretionssignal (N-terminal) und einem Histidin-Anhang (C-terminal) (Brake *et al.* 1984; Brake 1989). Nach Klonierung (B 2.2.11) wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease *SacI* linearisiert und nach Anweisungen des *Pichia* EasyComp™ Kit (Invitrogen) in die Zeocin™-resistente, methylotrophen Stämme KM71H und GS115 (B 1.2) transformiert und auf YPDS/Zeoicin™-Agarplatten 4 Tage bei 30 °C inkubiert (Tschopp *et al.* 1987). Da sich beide Stämme in ihrem Phänotyp durch schnelles bzw. langsames Wachstum unterschieden, wurden beide auf ihre Expressionseffizienz untersucht.

Der Integrationsnachweis erfolgte nach Inkubation einzelner Klone in 25 ml MDH-Flüssigmedium bei 30 °C (2 Tage). Nach Zentrifugation (5000 g, 5 min, 4 °C) wurden die Pellets in 500 µl Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl Breaking Buffer resuspendiert und gründlich vermischt (Vortex Genie 2). Nach Zugabe von 0,3 g Seesand und 200 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25 : 24 : 1) wurde erneut stark gemischt (Vortex Genie 2). Danach folgte nach Zugabe

von 200 μ l TE-Puffer und Mischen ein Zentrifugationsschritt (14000 g, 5 min, 4 °C). Die im Überstand befindlichen Nukleotide wurden mit 1 ml 96%igem Ethanol gefällt, abzentrifugiert (14000 g, 5 min, 4 °C) und in 400 μ l TE-Puffer gelöst. In dieser Lösung enthaltene RNA wurde durch Inkubation bei 37 °C, 15 min mit DNase-freier RNase A (1mg/ml) entfernt. Nach erneuter Fällung mit 1,2 ml 96%igem Ethanol und 10 μ l 3M Natriumacetatlösung pH 5,2 und Zentrifugation (14000 g, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 100 μ l TE-Puffer aufgenommen und mit PCR (B 2.2.10) und genspezifischen Primern überprüft.

Positive Klone wurden anschließend in 25 ml MGYH-Medium bis zu einer optischen Dichte $A_{600nm} = 2,0 - 4,0$ bei 250 rpm und 30 °C inkubiert und abzentrifugiert (3000 g, 5 min, 4 °C). Danach wurde das Pellet in 300 ml BMMH-Medium aufgenommen und über 4 Tage inkubiert. Verbrauchtes Methanol wurde aller 24 h durch Zugabe ersetzt (Medium-Konzentration 0,5% Methanol). Jeweils nach 8 h wurde eine Probe genommen, um die Proteinexpression mit SDS-PAGE (B 2.3.4) zu überprüfen. Die Herstellung der Medien erfolgte nach EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

Breaking Buffer:	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 %	Triton X-100
	1 %	SDS

B 2.3 Biochemische Methoden

B 2.3.1 Proteinextraktion aus Pflanzen

Die PMT-Proteinextraktion wurde bei 4 °C durchgeführt (Feth *et al.* 1985; Hibi *et al.* 1992). Dazu wurden 2 g Pflanzenmaterial in sterilem Wasser gewaschen und in 2,5 ml Kaliumphosphatpuffer [(100 mM, pH 7,5) mit 0,25 M Saccharose, 5 mM EDTA, 0,5% (M/V) Natriumascorbat, 3 mM DTT und Pepstatin 1 mg/l (Sigma)] mit etwas Seesand und 10% (M/V) unlöslichem PVPP (Polyvenylpolypyrrolidon) gemörsert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (14000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand auf eine mit 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) präequilibrierte PD-10 Säule (Pharmacia) [Sephadex[®] G-25 M gepackt] gegeben. Nachdem der Überstand vollständig in die PD-10 Säule eingezogen war, wurden die Proteine mit 3,5 ml 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) eluiert und die Proteinkonzentration bestimmt.

B 2.3.2 Proteinextraktion aus Bakterien

Nach heterologer Expression von Proteinen in *E. coli* (B 2.2.14) wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000g, 10 min, 4 °C) und in Lysispuffer resuspendiert. Für Bakterien mit *spds*-Konstrukt wurde der Lysispuffer I (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7) und für Bakterien mit *pmt*-Konstrukt der Lysispuffer II (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) verwendet. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurden die Proben 30 min auf Eis lysiert und im Anschluss mit dem Potter-Homogenisator (Euro-St D, IKA Labortechnik Staufen) bei 2000 rpm für fünfmal 2 min, mit 1 min Kühlung auf Eis homogenisiert. Nach Zentrifugation (14000 g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt. Der Überstand wurde außerdem mit SDS-PAGE (B 2.3.4) untersucht und für die Proteinreinigung verwendet.

B 2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die quantitative Bestimmung von Proteinen in Zellaufschlüssen (Bradford 1976) erfolgte mit dem Zweistrahlphotometer UV 160 A (Shimadzu). Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Mit Hilfe einer Eichgeraden konnten Messungen in einem Bereich von 40 - 150 µg/ml durchgeführt werden.

B 2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde eingesetzt, um heterolog exprimierte Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen und zu detektieren. Dazu wurden die Proben mit Probenpuffer (0,625 M Tris-HCl pH 6.8, 10% Glycerol, 2% SDS (M/V), 4% α-Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau) im Verhältnis 1 : 1 gemischt und bei 95 °C 10 min denaturiert (Laemmli 1970). Danach wurden sie bei einer Spannung von 100 V in einem 5%igem Sammelgel konzentriert und bei einer Spannung von 150 V in einem 12,5%igem Trenngel elektrophoretisch aufgetrennt [Minikammer "PHERO-minivert" (Biotech-Fischer)]. Als Größenstandard wurde der "peqGOLD Proteinmarker II" (peqlab) eingesetzt. Zur Detektion wurden 2 verschiedene Verfahren eingesetzt:

Coomassie-Färbung: (Nachweisgrenze 100 ng/Bande)

Nach Sambrock und Mitarbeitern wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel 20 min mit Fixierlösung (50% (V/V) Methanol, 12% (V/V) Essigsäure, 0,02% (V/V) Formaldehyd) behandelt und anschließend 30 min mit Coomassie-Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R250, 42,5% (V/V) Ethanol, 10% (V/V) Essigsäure, 5% (V/V) Methanol) detektiert. Zum Schluss wurde das Gel mit einer Lösung aus 25% (V/V) Ethanol und 10% (V/V) Essigsäure so lange entfärbt, bis die Proteine im Gel gut sichtbar waren (Sambrock et al. 1989).

Silber-Färbung: (Nachweisgrenze 100 pg/Bande)

Die Silber-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach Heukeshoven und Mitarbeitern. Dazu wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel 1 h in (50% (V/V) Methanol, 12% (V/V) Essigsäure, 0,02% (v/v) Formaldehyd) fixiert, dreimal 20 min in 50% (V/V) Ethanol gewaschen und 1 min mit 0,02% (M/V) Natriumthiosulfat behandelt. Nach kurzem (20s) Waschen mit destilliertem Wasser (dreimal) wurde das Gel 20 min in (0,2% (M/V) Silbernitrat und 0,025% (V/V) Formaldehyd) imprägniert und erneut kurz (20s) gewaschen (dreimal). Anschließend wurde das Gel entwickelt (6% (M/V) Natriumcarbonat, 0,5% (M/V) Natriumthiosulfat, 0,02% (V/V) Formaldehyd), bis Banden sichtbar wurden. Gestoppt wurde diese Reaktion mit einer Lösung aus 50% (V/V) Methanol und 12% (V/V) Essigsäure (Heukeshoven *et al.* 1988).

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid / Bisacrylamid	5,000%	12,500%
Tris-HCl	0,125 M (pH 6,8)	0,125 M (pH 8,8)
SDS	0,100%	0,100%
Temed	0,100%	0,120%
APS	0,050%	0,016%
Aqua dest. ad	2,000 ml	6,000 ml

Tab. B-11 Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gel

B 2.3.5 Enzymassay

Die SPDS- und PMT-Aktivität wurde nach Feth und Mitarbeitern bestimmt (Feth *et al.* 1985). In diesem Assay wurde das Substrat Putrescin (Sigma) zum einen mit dem Co-Substrat decarboxyliertes *S*-Adenosyl-L-methionin [dcSAM] in Spermidin und zum anderen mit dem Co-Substrat *S*-Adenosyl-L-methionin (Sigma) [SAM] in *N*-Methylputrescin umgewandelt. Die Reaktionsprodukte wurden im Anschluss dansyliert (B 2.1.1) und per HPLC (B 2.1.3) quantifiziert. In der SPDS-Reaktion (1 ml) kamen 3,6 mM Putrescin und 1,2 mM dcSAM in 100 mM Tris-HCl (pH 9,0) zum Einsatz. Die PMT-Reaktion erfolgte analog, allerdings wurde dcSAM durch 0,6 mM SAM ersetzt. Nach Inkubation (37 °C, 30 min) wurden die Reaktionen durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff gestoppt. Im Anschluss wurden 100 µl von dem Reaktionsansatz abgenommen und nach (B 2.1.1 ab Punkt 4) weiter bearbeitet. Unter Verwendung der eingesetzten Proteinmenge (100 µg)

konnte die spezifische Aktivität berechnet werden. Sowohl das in der SPDS-Reaktion eingesetzte decarboxylierte *S*-Adenosyl-L-methionin, als auch das als Standard verwendete *N*-Methylputrescin wurde uns freundlicherweise von Prof. Takashi Hashimoto (Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Nara, Japan) zur Verfügung gestellt.

B 2.3.6 Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Enzyme

B 2.3.6.1 Reinigung mit Nickel-Affinitätschromatographie

Ergebnis der Expression mit dem pET21d-Vektorsystem (Novagen) waren SPDS- und PMT-Proteine mit Histidin-Anhang am C-Terminus. Mit Hilfe dieses Restes wurde eine Reinigung über Chelatkomplexbildung mit Nickel-Ionen ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden 5 ml HiTrap™ Chelating Sepharose™ HP-Säulen (Amersham-Pharmacia) eingesetzt. Vor der Reinigung wurden die Säulen mit NiSO₄ beladen und mit 30 ml Lysispuffer I oder II (B 2.3.2) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min präequilibriert. Die nachfolgenden Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Aus 250 ml Bakteriensuspension (B 2.2.14) wurden 5 ml Proteinlösung gewonnen (B 2.3.2). Mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde die Probe auf die Säule aufgetragen und mit 30 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7) gereinigt. Bei gleichbleibender Fließgeschwindigkeit wurde im Anschluss mit 30 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 3 ml aufgefangen. Für die Reinigung wurde eine Schlauchpumpe (Pump P-1, Pharmacia) und ein Fraktionssammler (Redifrac, Pharmacia) verwendet.

Für die Reinigung der PMT wurde außerdem ein ÄKTAexplorer 100 system (Amersham-Biosciences) verwendet, bei dem ein Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7) mit linearem Imidazolgradienten (10 mM - 500 mM) zum Einsatz kam. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Absorption der Proteinlösung wurde mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen. Eluatfraktionen wurden in einem Volumen von 2 ml aufgefangen. Die Reinigung erfolgte bei 4 °C.

B 2.3.6.2 Konzentrierung der Proteinlösung

PMT- oder SPDS-aktive und gereinigte Fraktionen (B 2.3.6.1) wurden vereinigt und mit Membranfiltersystemen konzentriert. Zum Einsatz kam ein Ultrafree[®]-15 (Biomax-30) Centrifugal Filter Device (Millipore) oder Macrosep[®] Centrifugal Filter Device (Pall/Life Science). Die Membranfilter wurden nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Beide Membranfilter hatten eine Durchlässigkeit von 30 kDa. 15 ml Proteinprobe wurden nach Entfernung von Salzen und Wasser auf 2 ml reduziert. Proteinkonzentration (B 2.3.3) und Enzymaktivität (B 2.3.5) wurden erneut bestimmt. Die Regeneration der Membranfilter erfolgte einmal mit 15 ml 0,5 M NaOH und fünfmal mit 15 ml Wasser.

B 2.3.6.3 K_m -Wert und V_{max} -Bestimmung

K_m - und V_{max} -Bestimmung wurden ausschließlich mit der PMT durchgeführt. Nach Walton und Mitarbeitern wurde ein Glycin-NaOH-Puffer (200 mM) mit pH 9,0 verwendet (Walton *et al.* 1994). Für die Messungen wurde die Konzentration von Putrescin zwischen 0,01 mM und 3,0 mM variiert. Die SAM-Konzentration betrug 1 mM. In einem Reaktionsansatz (1 ml) wurden 9 μ g gereinigtes PMT-Protein eingesetzt. Die Inkubation (30 min) erfolgte bei 30 °C im Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf) und wurde mit 17 M NaOH gestoppt. Nach Dansylierung (B 2.1.1) wurden die Proben per HPLC (B 2.1.3) vermessen und ausgewertet (Michaelis *et al.* 1913; Lineweaver *et al.* 1934). Für alle Ansätze wurden 3fach Bestimmungen durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet.

C Ergebnisse

C 1 Analytik und Akkumulation der Polyamine

C 1.1 Analytik der Polyamine

Polyamine wie Putrescin (PUT), *N*-Methylputrescin (Me-PUT), Spermidin (SPD) und Spermin (SPM) kommen in Pflanzengewebe in freier und konjugierter Form vor. Aus diesem Grund wurde die konjugierte Form einer Hydrolyse unterzogen. Nach dieser gab es verschiedene Möglichkeiten der Derivatisierung. Die zwei häufigsten Methoden sind die Dansylierung mit 5-Dimethylamino-1-naphthalin-sulfochlorid (Dansylchlorid) (Smith *et al.* 1985) und die Benzylierung mit Benzylchlorid (Flores *et al.* 1981). Dabei werden mono-, bis-, tri- und tetra-substituierte Amine gebildet (Seiler *et al.* 1978). Ein Vorteil der Dansylierung gegenüber der Benzylierung ist die Detektion von fluoreszierenden Derivaten. Dies ermöglicht eine höhere Sensitivität. Bei der Benzylierung erfolgt die Detektion im UV-Bereich. Nachteilig bei der Dansylierung ist eine gewisse Unspezifität der Derivatisierung, da auch andere Verbindungen mit Aminogruppen (z.B. Aminosäuren), Phenole und Alkohole derivatisiert werden (Kotzabasis *et al.* 1993). Nach der Dansylierung wurden die Polyamine mit AMD-TLC und HPLC getrennt und quantifiziert.

C 1.1.1 Quantifizierung mit AMD-TLC

Im Vergleich zur einfachen Dünnschichtchromatographie mit TLC-Platten konnte mit Hilfe der automatischen Mehrfachentwicklung mit AMD 2 System (Camag) eine wesentlich bessere Trennung und Schärfe der Banden erzielt werden. Als Laufmittel wurden verschiedene isokratische Laufmittelgemische getestet. Eine optimale Trennung konnte mit dem Laufmittelgemisch 1 aus Cyclohexan/Ethylacetat (5 : 4, V/V) und einer Vorkonditionierung mit 1 N Ammoniak erreicht werden, ebenfalls gute Ergebnisse brachte Laufmittelgemisch 2 aus Chloroform/Triethylamin (2 : 1, V/V) und Vorkonditionierung mit 1 N Ammoniak. Ein Laufmittelgradient wurde ebenfalls getestet (Vega *et al.* 1999). Dieser führte nicht zu einer höheren Trennschärfe und benötigt auf Grund von 20 Entwicklungsstufen zu viel Zeit. Die

Rf-Werte für die Dansylderivate von Spermin, Spermidin, Putrescin und *N*-Methylputrescin lagen beim Laufmittelgemisch 1 bei 0,32; 0,39; 0,50 und 0,67 und beim Laufmittelgemisch 2 bei 0,40; 0,58, 0,69 und 0,78.

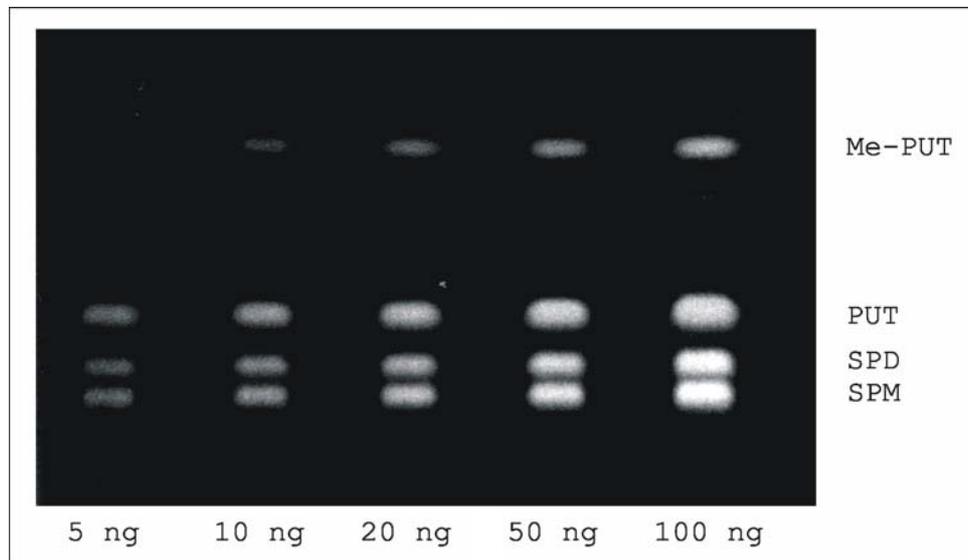


Abb. C-1 Quantifizierung der Polyamine mit AMD-TLC

Dansylderivate: Me-PUT - *N*-Methylputrescin; PUT - Putrescin; SPD - Spermidin und SPM -Spermin Die Trennung erfolgte mit dem Laufmittelgemisch 1. Das Bild wurde mit CCD Video Camera Module und Video Copy Prozessor (Vilber Lourmat) unter UV-Licht bei 312 nm (Transilluminator Model TC-312A, Spectroline) aufgenommen.

Reproduzierbare Detektionsgrenzen lagen bei 5 ng, 10 ng, 5 ng und 5 ng jeweils für Putrescin, *N*-Methylputrescin, Spermidin und Spermin pro Bande. Daraus ergab sich eine Messgrenze, die um den Faktor 3, 6 und 4 für die freien Polyamine (Ü1), für die löslichen konjugierten (Ü2) und für die unlöslichen konjugierten (P) Polyamine pro mg Trockenmasse höher lag als die Detektionsgrenze. Die Eichgeraden zu den einzelnen Polyaminen verliefen allerdings nur in einem Bereich bis 50 ng pro Bande linear. Aus diesem Grund mussten Standards auf jede TLC-Platte aufgetragen werden, um sie ins Verhältnis mit den Proben zu setzen. Zur Reproduzierbarkeit der Messung wurde festgestellt, dass 10 Wiederholungen der Messung aller 4 Polyamine eine Abweichung von unter 5% ergaben. Die Wiederfindungsrate für *N*-Methylputrescin betrug 98,9%. Dazu wurde eine definierte Menge dieses Amins vor der Aufarbeitung von Pelargonienblättern, die nachweislich kein *N*-Methylputrescin enthalten, zugegeben und nach B 2.1.1 bearbeitet. Dieser Versuch wurde fünfmal wiederholt. Der

Vorteil der AMD-TLC-Messung lag in der hohen Anzahl von Proben pro TLC-Platte und dem geringen Bedarf an Lösungsmittel, das zum Einsatz kam. Ein Nachteil dieser Methode war die noch zu hohe Nachweisgrenze von *N*-Methylputrescin, die für diese Arbeit von großer Bedeutung war. Als schnelle und preiswerte Screening-Methode für Polyamine in Pflanzengewebe eignet sich diese Methode aber sehr gut. Um geringe Mengen an *N*-Methylputrescin besser erfassen zu können, wurden diese mit Hilfe der HPLC und Fluoreszenzdetektor analysiert.

C 1.1.2 Quantifizierung mit HPLC

Die Trennung der lipophilen Polyamin-Dansylderivate erfolgte mit Hilfe von RP-18-Säulen (reversed phase). In Anlehnung an Marce und Mitarbeitern kam ein Acetonitril-Wasser Gradient zum Einsatz (Marce *et al.* 1995). Die Retentionszeiten für die Dansylderivate von Putrescin, *N*-Methylputrescin, Spermidin und Spermin lagen bei 6,20 min; 7,79 min; 10,23 min und 14,65 min.

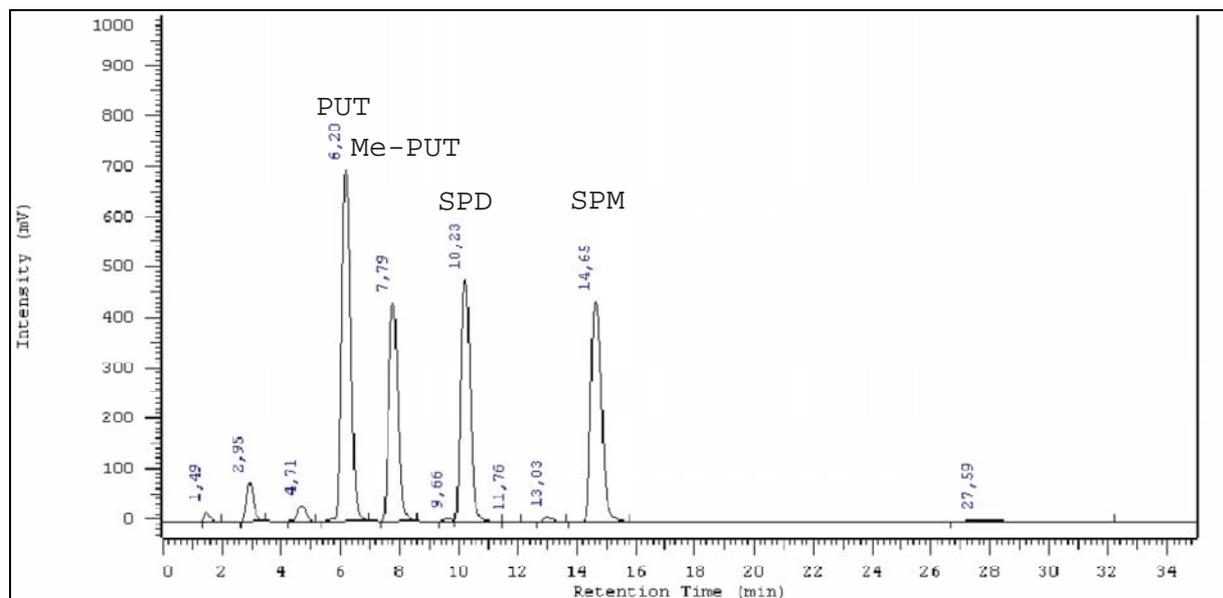


Abb. C-2 Trennung der Polyamine mit HPLC

HPLC-Chromatogramm (Fluoreszenz-Detektor-Signal/Retentionszeit in min); Dansylderivate: PUT - Putrescin; Me-PUT - *N*-Methylputrescin; SPD - Spermidin und SPM - Spermin; Konzentration: 40 ng pro Signal

Die reproduzierbaren Detektionsgrenzen lagen hier bei 0,5 ng pro Signal für alle Polyamine. Auf Grund unterschiedlicher Aufarbeitung der Proben ergaben sich Messgrenzen von 7,5 ng für die freien Polyamine (Ü1), 15,0 ng für die löslichen konjugierten (Ü2) und 10,0 ng für die unlöslichen konjugierten (P) Polyamine pro mg Trockenmasse.

C 1.2 Akkumulation der Polyamine in *Solanum tuberosum*

In *Solanum tuberosum* wurden Polyamine bisher im Zusammenhang mit der Bildung von Kartoffelknollen (Leubner *et al.* 1992; Taylor *et al.* 1993) und Keimungsprozessen von Kartoffelknollen (Kaur-Sawhney *et al.* 1982) untersucht. Bei diesen Messungen wurden nur freie Polyamine detektiert. Eine differenzierte Untersuchung der Polyamine in den verschiedenen Geweben von *Solanum tuberosum* erfolgte bisher noch nicht. Ausgehend von der Hypothese, dass Calystegine aus *N*-Methylputrescin gebildet werden, wurden Kartoffelgewebe besonders auf diese Verbindung untersucht. Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée wurden im Freiland 8 Wochen kultiviert und untersucht. Die Kartoffelknollen derselben Sorte wurden 6 Monate bei 4 °C gelagert und nach Keiminduktion (Lagerung bei RT, 3 - 5 Tage) vermessen.

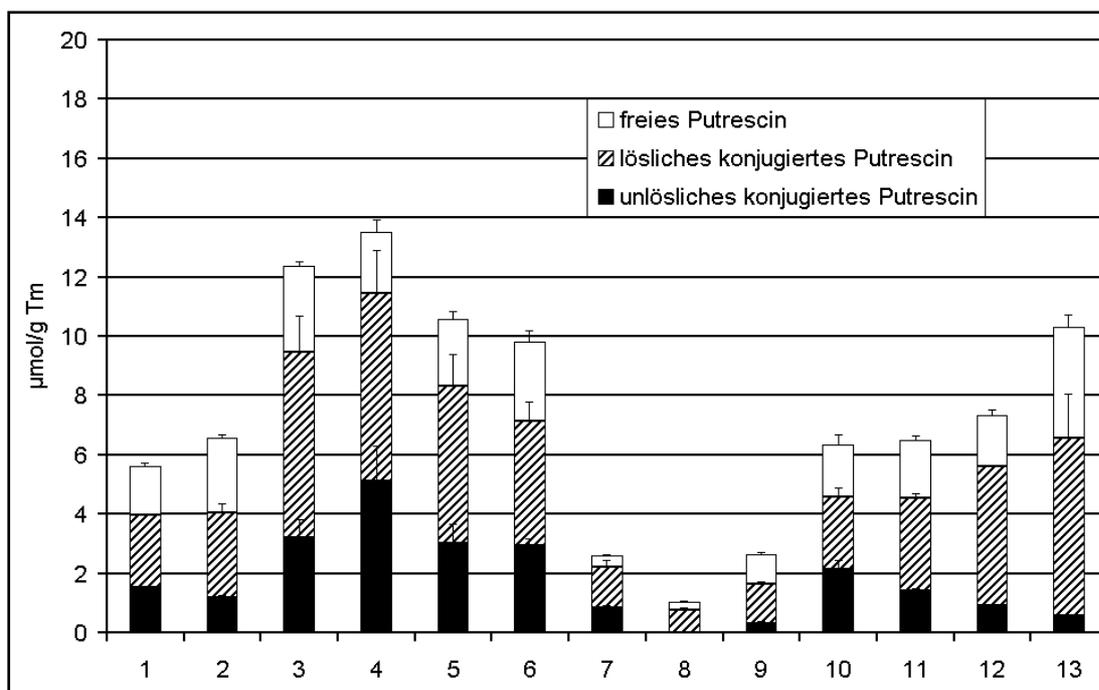


Abb. C-3 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Putrescine-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

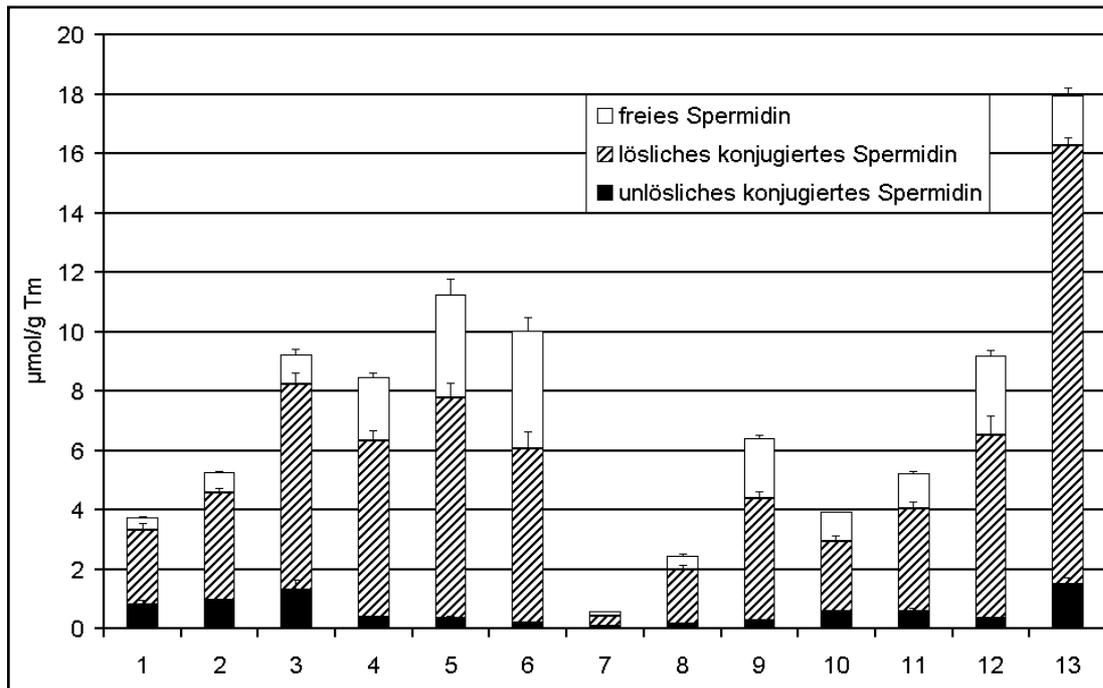


Abb. C-4 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermidin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

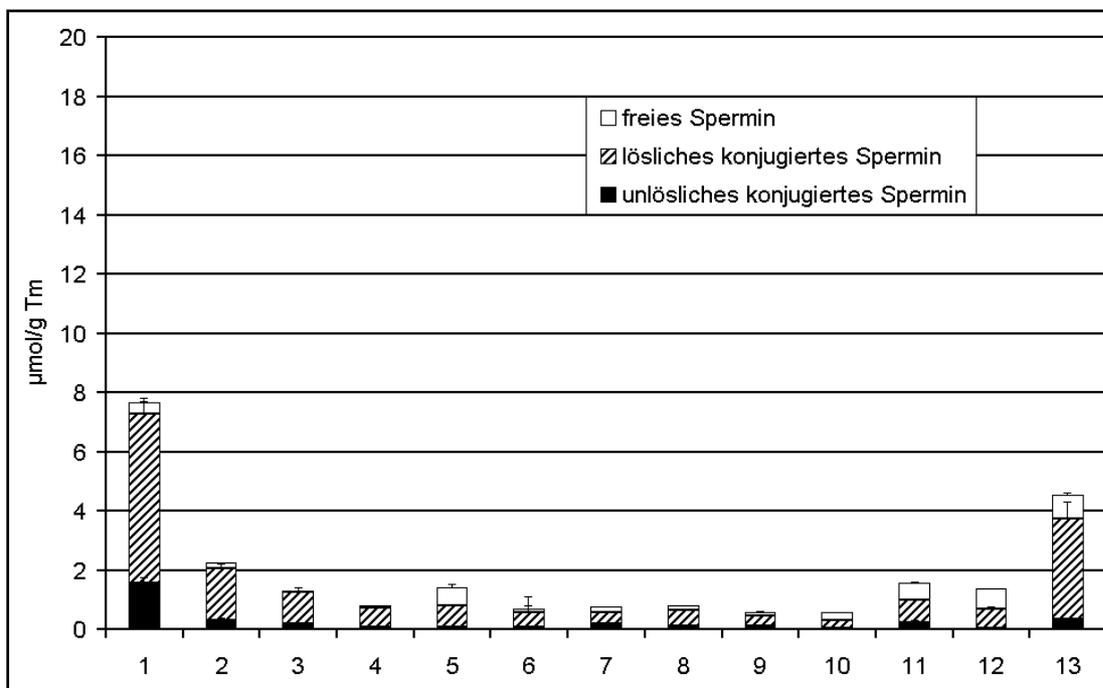


Abb. C-5 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

Putrescin, Spermidin und Spermin wurden in allen Geweben detektiert. Besonders in stark proliferierenden Geweben wie Kartoffelkeimen war die Gesamtkonzentration von Putrescin (max. 13,49 $\mu\text{mol/g TM}$) und Spermidin (max. 9,98 $\mu\text{mol/g TM}$) erhöht. Auffällig waren die hohen Gesamtkonzentrationen von Putrescin (10,30 $\mu\text{mol/g TM}$), Spermidin (17,94 $\mu\text{mol/g TM}$) und Spermin (4,49 $\mu\text{mol/g TM}$) in Blüten. Spermin wurde außerdem in der Kartoffelschale in großen Mengen (7,66 $\mu\text{mol/g TM}$) gemessen.

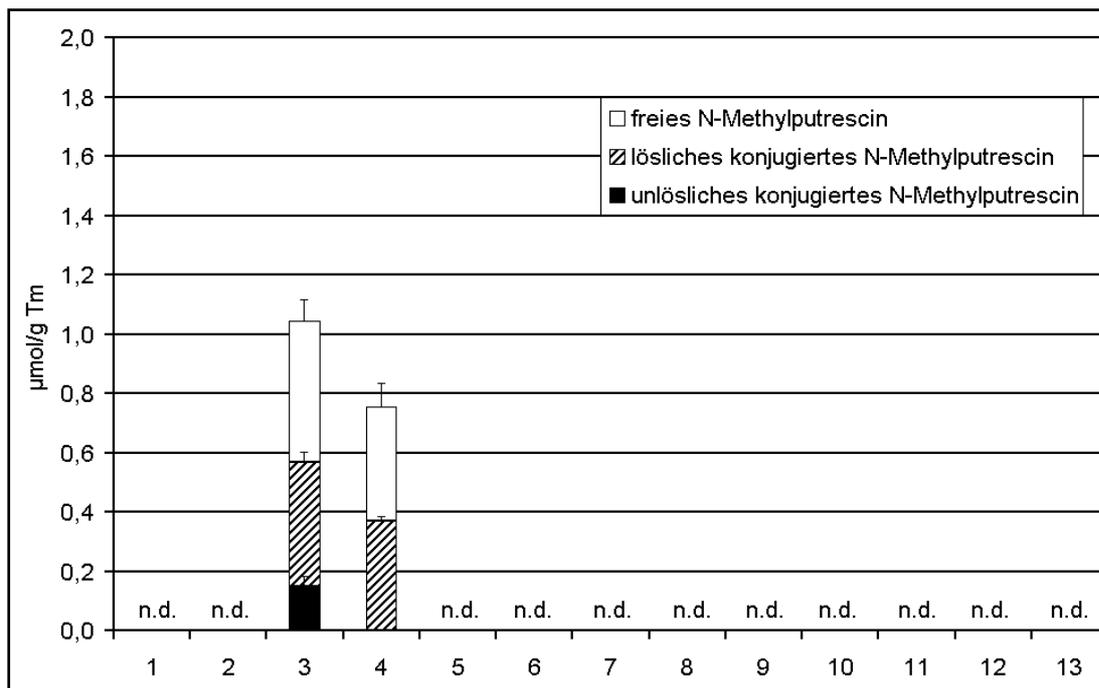


Abb. C-6 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der *N*-Methylputrescine-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

- | | |
|---------------------------------|----------------------|
| 1. Kartoffelschale | 8. Stengel |
| 2. Kartoffelaugen dormant | 9. Stolone |
| 3. Kartoffelaugen Start Keimung | 10. untere Blätter |
| 4. Kartoffelkeime 1 mm | 11. mittlere Blätter |
| 5. Kartoffelkeime 3 mm | 12. obere Blätter |
| 6. Kartoffelkeime 10 mm | 13. Blüten |
| 7. Wurzeln | |

Die Mittelwerte wurden aus 3-5 unabhängigen Messungen berechnet und Standardabweichungen in Balken angegeben.

Ausschließlich in Kartoffelaugen, deren Dormanz gebrochen war (1,05 $\mu\text{mol/g}$ TM) und in Kartoffelkeimen mit einer Länge von 1 mm (0,75 $\mu\text{mol/g}$ TM) konnte *N*-Methylputrescin gefunden werden. Des Weiteren wurden zwei *in vitro* Wurzelkulturen (Wildtyp und mit *Agrobacterium rhizogenes* transformiert) aus Kartoffel untersucht. Dabei wurden über 4 Wochen wöchentliche Messungen durchgeführt. Weder in Wurzeln von Freilandpflanzen noch in den zwei *in vitro* Wurzelkulturen konnte *N*-Methylputrescin detektiert werden. In einer Kartoffelzellsuspensionskultur und einem *in vitro* Kartoffelknollensystem (Gopal et al. 1997) wurde ebenfalls kein *N*-Methylputrescin gefunden.

C 2 Akkumulation der Calystegine in Solanum tuberosum

Die Akkumulation von Calysteginen im Wildtyp von *Solanum tuberosum* wurde von Keiner und Mitarbeitern beschrieben (Keiner et al. 2000). Um die Bedeutung der Putrescin-*N*-methyltransferase für die Calysteginbiosynthese untersuchen zu können, war es wichtig, ein *in vitro* System bereitzustellen, bei dem es gleichzeitig zu einer *N*-Methylputrescin- und Calysteginakkumulation kommt. Dazu wurden beide Wurzelkulturen (Wildtyp und mit *Agrobacterium rhizogenes* transformiert) und die Suspensionskultur von Kartoffel auf Calystegine untersucht. In keinem dieser drei *in vitro* Systeme konnten Calystegine gefunden werden. Außerdem wurden auch *in vitro* Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée untersucht. Auch hier wurden in keinem Gewebe Calystegine detektiert.

Nach Keiner und Mitarbeitern war Calysteginakkumulation in Kartoffelknollengewebe von Wildtyp-Pflanzen besonders in 3 mm Kartoffelkeimen am höchsten (3,3 mg/g Frischmasse) (Keiner et al. 2000). Aus diesem Grund wurde ein *in vitro* Kartoffelknollensystem getestet. Miniknollen wurden generiert (Gopal et al. 1997) und auf Calystegine untersucht. Auch nach einer Dormanzphase (3 Monate bei 4 °C im Dunkeln) mit anschließender Keiminduktion (Lagerung bei RT, 3 - 5 Tage) wurden keine Calystegine detektiert.

C 3 Transformation

C 3.1 Transformation in *Solanum tuberosum*-Blättern

Die Polyaminmessungen belegen, dass *N*-Methylputrescin ausschließlich in Kartoffelaugen, deren Dormanz gebrochen war und in Kartoffelkeimen mit einer Länge von 1 mm akkumuliert (C 1.2). Dies war ein erster Hinweis auf eine aktive PMT. Durch heterologe Transformation sollte die PMT-Aktivität verändert werden, um Auswirkungen auf den metabolischen Fluss der Calysteginbiosynthese zu untersuchen. Parallel dazu sollte auch die Aktivität der TRII durch Transformation manipuliert werden. Die TRII ist ein Schlüsselenzym in der Calysteginbiosynthese der Kartoffel (Keiner *et al.* 2002). Durch Veränderung der TRII-Aktivität sollte untersucht werden, ob die TRII eine regulierende Funktion in der Calysteginbildung besitzt.

Die Transformation (B 2.2.13) erfolgte in Anlehnung an Mc Cabe und Mitarbeitern durch particle bombardment von *Solanum tuberosum*-Blättern mit einer *Atropa belladonna pmt*-cDNA und mit der *Solanum tuberosum trII*-cDNA in *sense*- und *antisense*-Orientierung (Mc Cabe *et al.* 1993). Für die Transformation wurde der Pflanzenexpressionsvektor pBI121 (Clontech) verwendet (B 1.3). Zur Optimierung der Transformationsrate wurden verschiedene Spannungen getestet. Die höchste transiente GUS-Expression (Jefferson *et al.* 1987) wurde nach particle bombardment (B 2.2.13.1) bei einer Spannung von 14 kV erreicht. Dabei konnten pro Blattstück (1 cm²) 40 bis 50 blaue Spots nachgewiesen werden (Jefferson *et al.* 1987). Anschließend wurden pro Konstrukt 30 bombardments durchgeführt. Die daraus resultierenden Regenerationsraten sind in folgender Tabelle zu finden.

	PMT S	PMT AS	TRII S	TRII AS	pBI121
bombardment	30	30	30	30	30
Kalli	60	80	52	113	80
Pflanzenlinien (gesamt)	14	12	8	14	15
Pflanzenlinien (kultivierbar)	12	8	1	4	7

Tab. C-1 Regenerationsraten

PMT S - particle bombardment mit *pmt-sense*-Plasmid; PMT AS - particle bombardment mit *pmt-antisense*-Plasmid; TRII S - particle bombardment mit *trII-sense*-Plasmid; TRII AS - particle bombardment mit *trII-antisense*-Plasmid; pBI121 - particle bombardment mit pBI121-Leerplasmid

C 3.2 Pflanzencharakteristika

Alle Pflanzenlinien zeigten, unabhängig vom Plasmid, ein gestörtes Wachstum im Vergleich zu Wildtyp *in vitro* Pflanzen. Besonders auffällig war ein gehemmtes Wachstum, stark verzweigte Stengel, verkürzte Internodien, verkleinerte Blätter mit verstärkter Behaarung und stark verlangsamtes Wurzelwachstum. Auf Grund des gestörten Wurzelwachstums starben zahlreiche Pflanzenlinien ab (Tab. C-1). Während *in vitro* Pflanzen vom Wildtyp innerhalb von drei Monaten eine Höhe von 12 cm erreichten, bildeten transformierte Linien im selben Zeitraum nur 3 cm hohe Pflanzen (Abb. C-7). Auf Grund dieser Wachstumsstörungen war es unmöglich, transformierte Pflanzen in Erde zu kultivieren, da diese binnen weniger Tage abstarben. Zum Teil starben Pflanzenlinien auch durch Kontamination von Bakterien, Hefepilzen und anderen Schädlingen (z.B. *Thrips tabaci*).

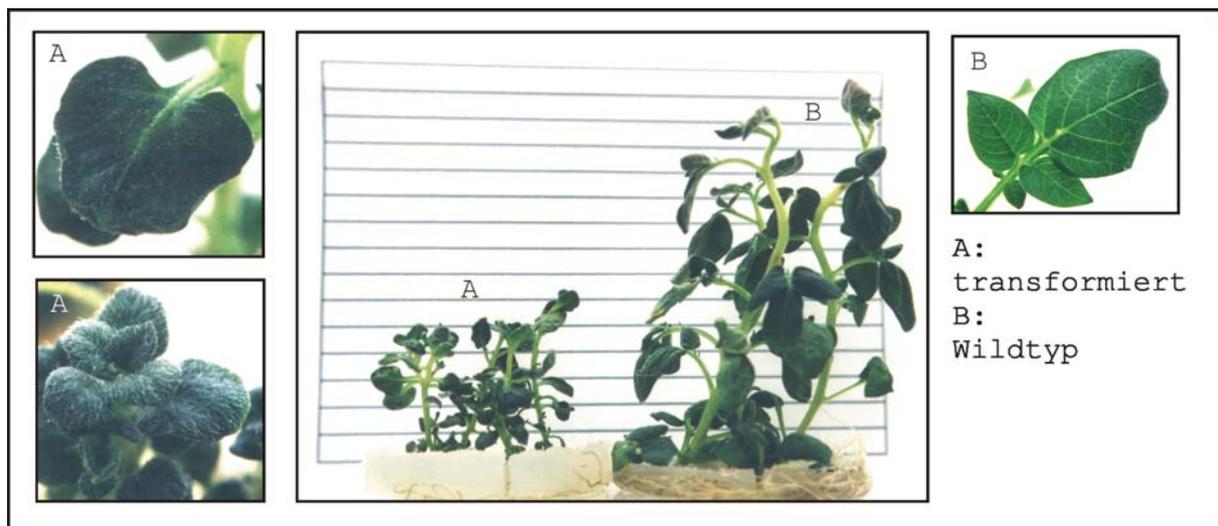


Abb. C-7 Wachstum von transformierten Pflanzen versus Wildtyp-Pflanzen (*in vitro*)

C 3.3 Integrationsnachweis

Nach Regeneration der Kartoffelpflanzen wurde die Integration der Plasmide (G 7.1, G 7.2) in das Pflanzengenom untersucht. Dazu wurde Gesamt-DNA (B 2.2.1) aus den Pflanzengeweben isoliert und ein Dot Blot (B 2.2.9) mit 35S-Promotor-DNA (G 7.1, G 7.2) als Sonde durchgeführt.

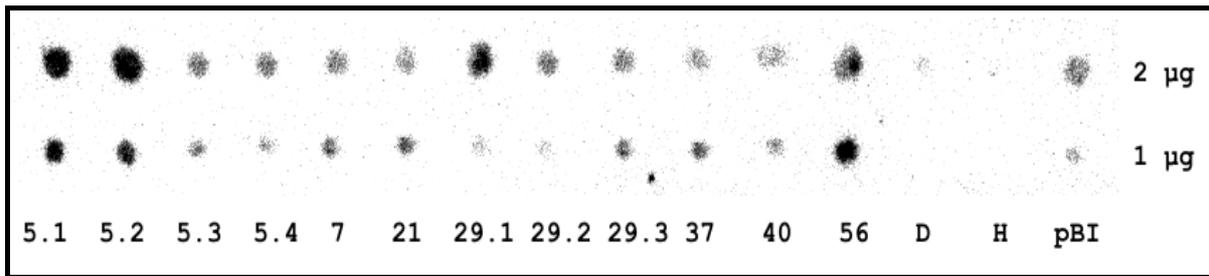


Abb. C-8 Dot Blot PMT S

PMT S 5.1 bis 56 - mit *pmt-sense*-Plasmid transformierte Pflanzenlinie; D - regenerierte Pflanzenlinie (nicht transformiert); H - Pflanzenlinie Wildtyp; pBI - mit pBI121-Leerplasmid transformierte Pflanzenlinie; (PMTS 5.1 - Kalluslinie 5, regenerierte Pflanze 1)

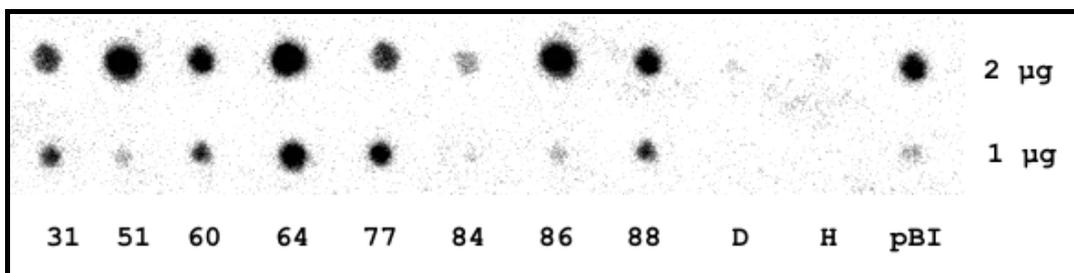


Abb. C-9 Dot Blot PMT AS

PMT AS 31 bis 88 - mit *pmt-antisense*-Plasmid transformierte Pflanzenlinie; D - regenerierte Pflanzenlinie (nicht transformiert); H - Pflanzenlinie Wildtyp; pBI - mit pBI121-Leerplasmid transformierte Pflanzenlinie

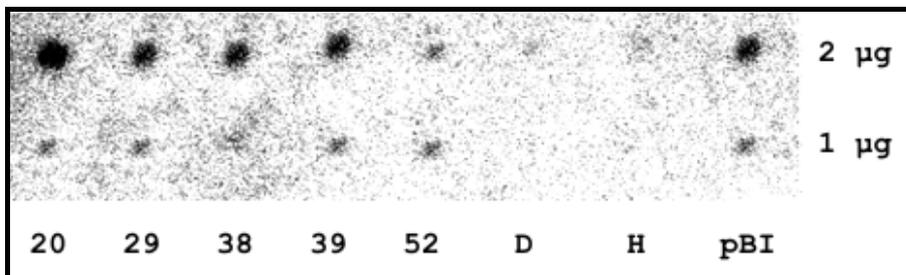


Abb. C-10 Dot Blot TRII AS und S

TRII AS 20 bis 39 - mit *trII-antisense*-Plasmid transformierte Pflanzenlinie; TRII S 52 - mit *trII-sense*-Plasmid transformierte Pflanzenlinie; D - regenerierte Pflanzenlinie (nicht transformiert); H - Pflanzenlinie Wildtyp; pBI - mit pBI121-Leerplasmid transformierte Pflanzenlinie

Genomische DNA wurde aus Blättern isoliert (B 2.2.1) und punktförmig auf eine Nylonmembran (Hybond[®] N⁺, Amersham-Pharmacia) aufgetragen. Nach Denaturierung und Neutralisierung erfolgte die Hybridisierung (B 2.2.8) mit dem 850 bp-Fragment des 35S-Promotors (pBI121) (G 7.1, G 7.2).

Für die sieben pBI121-Kontrollpflanzenlinien wurde auch ein Dot Blot durchgeführt. Dieser war positiv (Dot Blot nicht gezeigt). Zusätzlich wurde mit Wurzeln dieser Pflanzen ein GUS-Assay (Jefferson *et al.* 1987) durchgeführt, der negativ war.

C 3.4 Transkriptuntersuchung

Die Transkriptuntersuchung von Blättern der **PMT S**-Linien ergab mit dem *pmt*-cDNA-Fragment (200 bp) als Sonde kein Signal. Da die Kartoffel-*pmt*-cDNA ausschließlich nur in Kartoffelaugen, deren Dormanz gebrochen war und in 1 mm Kartoffelkeimen exprimiert wird (C 9) und der CaMV 35S-Promotor des Pflanzenexpressionsvektors pBI121 für eine Gewebe-unspezifische Expression verantwortlich ist, könnte dies ein starker Hinweis darauf sein, dass die Transformation mit dem *pmt-sense*-Konstrukt nicht zu transgenen Kartoffelpflanzenlinien führte. Eine Untersuchung der *pmt*-Transkriptmengen in **PMT AS**-Linien war nicht möglich, da es nicht gelang, Pflanzen in Erde zu kultivieren, die Kartoffelknollen bilden können. Eine *pmt*-Transkriptuntersuchung der PMT AS-Linien wäre nur nach Keiminduktion von Kartoffelknollen dieser Linien sinnvoll gewesen (C 9).

Für die **TRII S- und AS**-Linien galt dies auch. Da von Keiner und Mitarbeitern in Blättern und Wurzeln von Wildtyp-Kartoffelpflanzen *trII*-Transkript nachgewiesen werden konnte, bestand die Möglichkeit diese Gewebe zu untersuchen. In Blättern von Wildtyp-Kartoffelpflanzen akkumulierte nach Keiner und Mitarbeitern *trII*-Transkript jedoch nur sehr schwach. In Wurzeln von Wildtyp-Kartoffelpflanzen akkumulierte im Gegensatz dazu *trII*-Transkript in größeren Mengen (Keiner *et al.* 2002). Da die Wurzeln von *in vitro* Pflanzen ein stark verlangsamtes Wachstum zeigten, wurden Wurzelkulturen aus den TRII S- und AS-Linien in Gamborg's B5 Medium (B 1.1) kultiviert und ein gemeinsamer Northern Blot durchgeführt. Auffällig war hier, dass die Linie TRII AS 39 ein stärkeres Signal ergab als die Wildtyp-Linie H und regenerierte untransformierte Linie D. Dies könnte auf die doppelsträngige *trII*-cDNA-Sonde zurückzuführen sein, welche für den Northern Blot eingesetzt wurde. Transkribierte *antisense-trII*-RNA aus dem Plasmid, wie auch native *trII*-mRNA aus Kartoffel könnten durch die Sonde detektiert worden sein. Deshalb kann die Transkriptuntersuchung nur einen Überblick über das vorhandene *gesamt-trII*-Transkript der transformierten und untransformierten Linien geben.

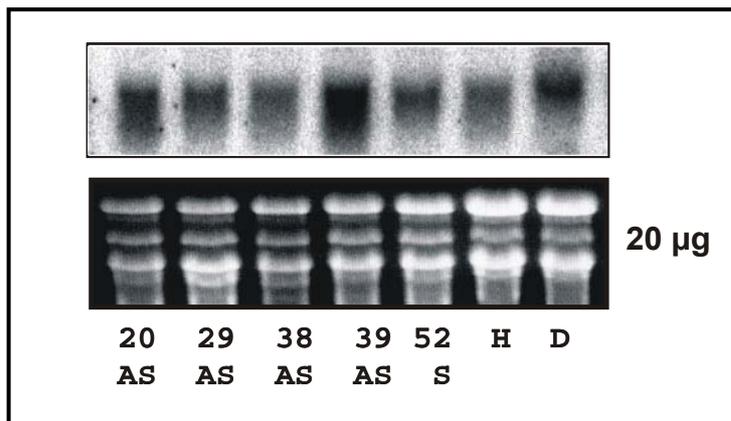


Abb. C-11 Northern Blot TRII AS/S

TRII AS 20, 29, 38, 39; TRII S 52

TRII AS 20 bis 39 - mit *trII-antisense*-Plasmid transformierte Pflanzenlinie; TRII S 52 - mit *trII-sense*-Plasmid transformierte Pflanzenlinie; D - regenerierte Pflanzenlinie (nicht transformiert); H - Pflanzenlinie Wildtyp

Die Gesamt-RNA wurde aus Wurzeln isoliert (B 2.2.2). 20 µg wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet (B 2.2.7). Die Hybridisierung erfolgte mit einem 400 bp langen Fragment der *S. tuberosum trII-cDNA* (3'-Ende). Gleiche Mengen an Gesamt-RNA wurden gezeigt (RNA mit Ethidiumbromid gefärbt).

C 3.5 Polyaminmessung

Auf Grund der negativen Northern Blot-Ergebnisse mit *pmt*-transformierten *in vitro* Pflanzen (C 3.4) wurden exemplarisch nur drei PMT S-Linien untersucht. Die PMT AS-Linien wurden komplett analysiert. Für die Messung wurden Blätter drei Monate alter *in vitro* Pflanzen verwendet. *N*-Methylputrescin konnte erwartungsgemäß in keiner Pflanzenlinie detektiert werden. Auffällig war aber, dass bei fast allen PMT AS-Linien die Putrescinkonzentration um das 4- bis 7fache erhöht war (Tab. G-5). In der Wildtyp-Linie betrug die Putrescinkonzentration 5,86 µmol/g TM, während in den PMT AS-Linien 64, 77, 84, 86 und 88 Werte um 25 µmol/g TM gemessen wurden. In den PMT AS-Linien 31 und 60 wurden sogar Putrescinkonzentrationen von 34,89 µmol/g TM und 42,71 µmol/g TM detektiert (Tab. G-5). Die Spermidinkonzentration schwankte um 6 µmol/g TM in allen Linien (Tab. G-6). Auch die Sperminkonzentration war für fast alle Linien gleich. Sie lag bei 2 µmol/g TM, mit Ausnahme der Linie PMT AS 64 (4,59 µmol/g TM) (Tab. G-7). Generell konnte festgestellt werden,

dass sich die Spermidin- und Sperminkonzentrationen in dem Bereich bewegten wie in Wildtyp- und Vektorkontrolllinien. Für die Putrescinkonzentration galt dies nicht. Ein Zusammenhang zu veränderter PMT-Aktivität konnte nicht hergestellt werden, da PMT-Aktivität nicht messbar war.

C 3.6 Intermediatmessung

Intermediate der Calysteginbiosynthese, wie Tropinon, Tropin und Pseudotropin, wurden ausschließlich in Wurzelkulturen der *trII*-transformierten Linien gemessen und mit der Wurzelkultur der Wildtyp-Linie verglichen. Wie im Anhang (Abb. G-8) zu sehen, bewegten sich die Gehalte an biosynthetischen Intermediaten der *trII*-transformierten Wurzelkulturen im Bereich der Wildtyp-Wurzelkultur.

C 3.7 Calysteginmessung

Wie unter C 2 bereits beschrieben, konnten in Wildtyp *in vitro* Kartoffelpflanzen keine Calystegine detektiert werden. Da eine Kultivierung der transformierten *in vitro* Kartoffelpflanzen in Erde nicht gelang, somit die Bildung von Kartoffelknollen ebenfalls ausgeschlossen war, konnte eine Calysteginanalytik mit den transformierten Kartoffelpflanzenlinien nicht durchgeführt werden.

C 4 Isolierung einer *pmt*-cDNA

Da es durch heterologe Transformation nicht gelang die Aktivität der PMT in Kartoffel zu verändern, die Messung von *N*-Methylputrescin in Kartoffelgeweben aber sehr aussichtsreich war (C 1.2), wurde versucht in diesen Geweben PMT-Aktivität zu messen, um eine Beteiligung der PMT an der Calysteginbiosynthese zu belegen. Außerdem wurden diese Gewebe verwendet, um eine *pmt*-cDNA zu isolieren. Die Expression von rekombinanter PMT in *E. coli* könnte die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Regulation der Calysteginbiosynthese sein (D 4).

C 4.1 Bestimmung der spezifischen PMT-Aktivität

Die Detektion von *N*-Methylputrescin in Kartoffelknollengewebe (C 1.2) zeigte, dass keimende Kartoffelknollen für die Messung der spezifischen PMT-Aktivität (B 2.3.1, B 2.3.5) geeignet waren. Dormante Kartoffelaugen, Kartoffelaugen zu Beginn der Keimung, 1 mm, 3 mm und 10 mm lange Kartoffelkeime wurden analysiert.

Ausschließlich in 1 mm langen Kartoffelkeimen konnte eine spezifische PMT-Aktivität von 20 pkat/mg Protein gemessen werden. Daraufhin wurde dieses Gewebe ausgewählt, um Gesamt-RNA zu extrahieren (B 2.2.2) und damit eine RT-PCR (B 2.2.10) durchzuführen. Außerdem wurde eine cDNA-Bank (B 2.2.5) hergestellt.

C 4.2 Isolierung eines *pmt*-cDNA-Fragmentes

Aus homologen Bereichen bekannter *pmt* cDNAs aus *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana glauca* [A. *belladonna pmt1* (AB018570), A. *belladonna pmt2* (AB018571), *H. niger pmt* (AB018573), *N. tabacum pmt* (D28506) und *N. glauca pmt* (AB004322)] wurden degenerierte Primer abgeleitet. Zwei degenerierte Primerpaare wurden für eine RT-PCR verwendet. Mit dem Primerpaar Put *pmt* Dir 1 und Put *pmt* Rev 2 (B 1.4) konnte ein 750 bp-Fragment amplifiziert werden. Dieses zeigte sehr hohe Homologien zur *N. tabacum* (D28506), A. *belladonna* (AB018570) und *H. niger* (AB018573) ***pmt*-cDNA** (89%, 88% und 83% Identität) und auch hohe Homologien zur *N. glauca* (AB006692), *H. niger* (AB006690) und *L. esculentum* (AJ006414) ***spds*-cDNA** (71%, 70% und 70% Identität).

C 4.3 Vervollständigung der *pmt*-cDNA

C 4.3.1 5'-RACE-PCR

Mit dem *pmt*-genspezifischen Primer 5'-RACE Rev 1 wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt. Im Anschluss daran wurde mit Hilfe einer Terminalen-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) am 3'-OH-Ende des Einzelstranges ein poly-dCTP-Bereich angefügt. Der so präparierte Einzelstrang bildete die Grundlage für 2 aufeinanderfolgende PCR (B 2.2.10.2) mit jeweils eingerückten reversen Primern. Resultat dieser PCR war ein 500 bp langes DNA-Fragment. Dieses wurde in den

pCR[®]2.1TopoTA-Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Das 5'-RACE-Produkt zeigte sehr hohe Homologien zu bekannten *pmt*.

C 4.3.2 3'-RACE-PCR

Die cDNA-Synthese für die 3'-RACE PCR erfolgte mit dem Oligo(dt)₁₂₋₁₈-Primer mit Adapter 3'-RACE Rev 2. Nach 2 weiteren PCR mit eingerückten direkten Primern und dem Adapter 3'-RACE Rev 2 als reversem Primer (B 2.2.10.2) wurden zwei DNA-Fragmente (820 bp, 740 bp) amplifiziert. Diese wurden ebenfalls in den pCR[®]2.1TopoTA-Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Auch diese Fragmente hatten sehr hohe Homologie zu bekannten *pmt*.

C 4.3.3 Abschließende PCR

Nach der Sequenzanalyse wurde ein direkter Primer vom 5'-Ende des 5'-RACE-PCR-Produktes abgeleitet, um mit dem Adapter 3'-RACE Rev 2 als reversem Primer eine abschließende RT-PCR durchzuführen. Als Template diente cDNA, wie unter C 4.3.2 beschrieben. Resultat dieser PCR waren zwei *pmt*-Klone, die als *pmt1* (1335 bp) und *pmt2* (1255 bp) bezeichnet wurden. Die Sequenz des Klones *pmt1* wurde in die EMBL-Datenbank eingetragen (AJ605553).

C 5 Isolierung einer spds-cDNA

C 5.1 Isolierung eines *spds*-cDNA-Fragmentes

Auf der Suche nach weiteren *pmt*-cDNA-Klonen wurde mit dem 750 bp langen *pmt*-homologen Fragment (C 4.2) eine cDNA-Bank aus 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen der Sorte Désirée (B 2.2.5) gescreent. Dabei wurden $1,5 \times 10^5$ pfu nach (B 2.2.6) untersucht. Das Primärscreening ergab 115 Doppelsignale. Da die Anzahl an Doppelsignalen sehr hoch war, wurden aus praktischen Gründen für eine Weiterbearbeitung nur 40 Primärklone ausgewählt. Mit diesen wurde eine Kontroll-PCR nach B 2.2.10 mit den "genspezifischen" Primern Put *pmt* Dir 1 und Put *pmt* Rev 2 durchgeführt. Diese war für alle 40 Klone positiv. 6 Klone wurden daraufhin für ein Sekundärscreening ausgewählt.

Sekundärklone wurden mit PCR zum einen mit "genspezifischen Primern" (Put *pmt* Dir 1 und Put *pmt* Rev 2) und zum anderen mit vektor-spezifischen Primern (T 7 und M 13 Rev) untersucht. 3 Klone mit der größten Insertation (ca. 1150 bp) wurden einer *in vivo*-Excision (B 2.2.6) unterzogen und anschließend sequenziert. Ein Klon zeigte nach Homologievergleich keine Homologien zu bekannten cDNA-Sequenzen. Die beiden anderen Klone waren identisch und zeigten sehr hohe Homologie zu *L. esculentum* (AJ006414), *H. niger* (AB006690), *D. stramonium* (Y08253), *N. sylvestris* (AB006692), *C. arabica* (AB015599) und *P. sativum* (AF043109)-*spds*-cDNA (96%, 93%, 92%, 92%, 82% und 80% Identität). Zum *pmt*-homologen Fragment aus *S. tuberosum* betrug die Homologie 70% (Identität). Auf Grund der großen Übereinstimmung zwischen *pmt* und *spds* auf DNA-Ebene wurde nun versucht, ein Primerpaar zu finden, welches spezifisch auf eines der beiden Fragmente reagierte. Nach entsprechenden Test-PCR wurde ein *spds*-spezifisches Primerpaar (SPDS Spez. Dir und SPDS Spez. Rev) gefunden (B 1.4), mit dem die 40 Primärklone erneut untersucht wurden. 12 Klone waren dabei negativ. Diese 12 Klone und drei positive Klone wurden nach einem Sekundärscreening einer *in vivo* Excision unterzogen und sequenziert. Neben Homologien zu cDNAs, die für diese Arbeit irrelevant (12 negative Klone) waren, zeigten die drei positiven Klone sehr hohe Homologie zu Spermidinsynthasen. Zwei der drei Klone waren mit dem bereits bekannten Klon identisch. Der dritte unterschied sich um 30 Nukleotide von dem bereits gefundenen. Beide Klone (im Folgenden als *spds1* und *spds2* bezeichnet) waren am 5' Ende unvollständig. Bis zum "Start-ATG" fehlten ca. 50 Nukleotide.

C 5.2 Vervollständigung der *spds*-cDNA

Nach Homologievergleich beider *spds*-Klone mit der EMBL-Datenbank wurde ein *Solanum tuberosum spds*-Fragment [EST] (BG596466, Länge: 632 bp) gefunden, mit welchem der Klon *spds1* in 5'-Richtung um ca. 200 Nukleotide verlängert werden konnte. Der überlappende Bereich beider Fragmente (ca. 440 bp) war bis auf 8 Nukleotide identisch. Nach Ableitung eines direkten Primers (*spds1* Dir) konnte dieser *spds1*-Klon mit Hilfe von RT-PCR und einem Oligo(dt)₁₂₋₁₈-Primer vervollständigt werden. Dieser hier als *spds1* bezeichnete

vollständige Klon hatte eine Länge von 1347 bp. Bei dem zweiten unvollständigen *spds2*-Klon wurde mit 5'-RACE-PCR versucht, einen vollständigen Klon zu erhalten. Dies gelang nicht. Die Sequenz des vollständigen Klones *spds1* wurde in die EMBL-Datenbank eingetragen (AJ345003).

C 6 Charakterisierung der Sequenzen

C 6.1 *pmt*-Sequenzen

Nach wiederholten Sequenzierungen (mindestens. fünf pro Klon) wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Klone *pmt1* und *pmt2* hatten eine Länge von 1335 bp und 1255 bp. Beide *pmt*-Klone schlossen einen kodierenden Bereich von 1023 Nukleotiden ein (einschließlich Stop-Codons). Diese Nukleotidsequenzen kodierten für zwei Proteine mit jeweils 340 Aminosäuren. Unterschiede in der Länge beider *pmt*-Klone ergaben sich im nichtkodierenden Bereich des 3'-Endes (G 5.1, G 5.2). Im kodierenden Bereich waren 8 Nukleotide unterschiedlich. Auf Aminosäureebene bedeutete dies einen Unterschied von 4 Aminosäuren. Mit den Aminosäuresequenzen PMT1 und PMT2 wurden theoretische Molekulargewichte von 37379,8 Da und 37355,7 Da und ein theoretischer isoelektrischer Punkt für beide PMT-Klone von 5,99 berechnet [http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html, (Bjellqvist *et al.* 1993)]. Mit der EMBL-Datenbank wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Auf Grund der geringen Abweichungen zwischen beiden PMT-Klonen wurde für den Sequenzvergleich mit bekannten *pmt*/PMT und *spds*/SPDS nur der *pmt1*/PMT1-Klon verwendet (Tab. C-2).

	Accession number	Nukleotid-sequenz	Aminosäure-sequenz
<i>Nicotiana tabacum</i> PMT (Ntab)	D28506	85	88
<i>Nicotiana attenuata</i> PMT	AF280403	84	88
<i>Atropa belladonna</i> PMT (Abel)	AB018571	80	80
<i>Hyoscyamus niger</i> PMT (Hnig)	AB018572	79	83
<i>Coptis japonica</i> Coclaurin-N-MT	AB061863	39	6
<i>Coffea arabica</i> Xanthin-N-MT	AB048793	39	3
<i>Limonium latifolium</i> β -Alanin-N-MT	AY216903	39	7
<i>Datura stramonium</i> SPDS	Y08253	68	62
<i>Coffea arabica</i> SPDS	AB015599	67	63
<i>Solanum tuberosum</i> SPDS (Stub)	AJ345003	66	57
<i>Lycopersicon esculentum</i> SPDS (Lesc)	AJ006414	65	57

Tab. C-2 Homologievergleich der *S. tuberosum*. *pmt1*/PMT1 in % (Identität)

Entscheidend für die Zuordnung der *S. tuberosum* PMT-Sequenzen zu den PMT war nicht nur die höhere Homologie zu bekannten PMT im Vergleich zu SPDS, sondern auch PMT- und SPDS-spezifische Aminosäuren (Abb. C-12) (Hashimoto *et al.* 1998b; Suzuki *et al.* 1999a). Zudem konnten die von Posfai und Mitarbeitern beschriebenen SAM-Bindemotive I - III und V zugeordnet werden (Posfai *et al.* 1989). In Motiv I fand sich außerdem die Glycin-reiche Domäne (G-Loop) der SAM-Bindungsstelle, wie sie für SAM-abhängige DNA-Methyltransferasen beschrieben wurde (Schluckebier *et al.* 1995). Zusätzlich konnte die katalytische Domäne für N-Methyltransferasen gefunden werden (Malone *et al.* 1995). Innerhalb dieser Domäne wurde der Bereich für die Bindung und Deprotonierung des Putrescins näher lokalisiert (Korolev *et al.* 2002). In den Sequenzvergleich wurde die *N. tabacum* PMT einbezogen, um zu zeigen, dass die dort gefundenen Aminosäurewiederholungen (tandem repeats), wie bei Hashimoto und Mitarbeitern beschrieben, in den *S. tuberosum* PMT-Sequenzen nicht zu finden sind (Hashimoto *et al.* 1998a).

```

Stub PMT1      -MEVISTHTNGS▼ITIT----IT'NGHHN-----N 23
Stub PMT2      -MEVISTHTNGSAIT----IT'NGHHN-----N 23
Ntab PMT       -MEVISTNTNGSTIFKNGAIPMNGHQNGTSEHLNGYQNGTSKHQNGHQNGT'FEHRNGHQ 59
Hnig PMT       -MEVISNHNNGSTTK---IILKNGSIC-----N 24
Abel PMT       -----MAFRNGSTTT---TIT'INHPN-----DA 21
Stub SPDS      MADECAAFVKGTELP----VKRPREEE-----AETEME 29
Lesc SPDS      MADECAAFMKGTELP----VKRPREEE-----AETEME 29
                *:          :
    
```

```

Stub PMT1      GKS▼DHRNGGTIHDNGNKLLLGN▼SNSIKPGWFSEFSALWPGEAFSVKIEKLLFQGKSDYQD 83
Stub PMT2      GKS▼DHRNGGTIHDNGNKLLLGN▼SNSIKPGWFSEFSALWPGEAFSVKIEKLLFQGKSDYQD 83
Ntab PMT       GTSEQQNGTISHDNGN-ELLGSSDSIKPGWFSEFSALWPGEAFSLKVEKLLFQGKSDYQD 118
Hnig PMT       GNVN--GNSHSNEKTENKLVECTNSIKPGWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQD 82
Abel PMT       STIPKNGTNIIT'TLLKNGSTNEFGCIKPGWFSEFSQLWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQD 81
Stub SPDS      AANN▼SN▼NNNGCSTNEKEEPSYISSVLP▼GW▼FSEISPLWPGEAHS▼LKVEKILFQGKSDYQ 89
Lesc SPDS      AANN▼SN--NGC--EKEESSPYISSVLP▼GW▼FSEISPLWPGEAHS▼LKVEKILFQGKSDYQ 84
                .          :          .: *****: *****: *:*:*:*:*:*:*:*:*:
    
```

SAM/(dcSAM)-Bindg.

```

Stub PMT1      VMLFESATYGV▼LTLDGAIQHTENGGFFPYTEMIVHLPLGSIPTPKKVLII▼GGGIGFTLFE 143
Stub PMT2      VMLFESATYGV▼LTLDGAIQHTENGGFFPYTEMIVHLPLGSIPTPKKVLII▼GGGIGFTLFE 143
Ntab PMT       VMLFESATYGV▼LTLDGAIQHTENGGFFPYTEMIVHLPLGSI▼PNPKKVLII▼GGGIGFTLFE 178
Hnig PMT       VMLFESATYGV▼LTLDGAIQHTENGGFFPYTEMIVHLPLGSI▼PSPKKVLII▼GGGIGFTLFE 142
Abel PMT       VMLFESATYGV▼LTLDGAIQHTENGGFFPYTEMIVHLPLGSI▼PSPKKVLII▼GGGIGFTLFE 141
Stub SPDS      VLVFQSSTYGV▼LVLDGVIQLTERDE▼CAYQEMITHLPLCSI▼PNPKKVLII▼GGGDG▼GV▼LRE 149
Lesc SPDS      VLVFQSSTYGV▼LVLDGVIQLTERDE▼CAYQEMITHLPLCSI▼PNPKKVLII▼GGGDG▼GV▼LRE 144
                *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
    
```

Motiv I

```

Stub PMT1      VLR▼YSTIEKIDIVEIDDVVIDVSRKFFPYLAANFNDPRVTLVLDGAA▼AFVKAQAGYYDA 203
Stub PMT2      VLR▼YSTIEKIDIVEIDDVVIDVSRKFFPYLAANFNDPRVTLVLDGAA▼TFVKAQAGYYDA 203
Ntab PMT       MLR▼YPSIEKIDIVEIDDVVIDVSRKFFPYLAANFNDPRVTLVLDGAA▼AFVKAQAGYYDA 238
Hnig PMT       VSR▼YSTIEKIDIVEIDDVVIDVSRKFFPYLAAGFDDPRVTLIVLDGAA▼AFVKAQAGYYDA 202
Abel PMT       VFR▼YPTIENIDIVEIDNVVVDVSRKFFPYLAAGFDDPRVTLVLDGAA▼AFVKAQAGYYDA 201
Stub SPDS      VSR▼HSSVEQIDICEIDKMVVEVAKOFFPDVAVGYEDPRVNLRI▼GDGVAFLKNVPAGTYDA 209
Lesc SPDS      VSR▼HSSVEQIDICEIDKMVVEVAKOFFPDVAVGYEDPRVNLHI▼GDGVAFLKNVPAGTYDA 204
                :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
    
```

Motiv II

Motiv III

Putrescin-Bindg./-Deprotonierung

```

Stub PMT1      IIVDSSDPIGPAKDL▼FERPFFEAVAKALRPGGVICTQAESIWLHMHI▼IKQIIANCRLVFK 263
Stub PMT2      IIVDSSDPIGPAKDL▼FERPFFEAVAKALRPGGVICTQAESIWLHMHI▼IKQIIANCRLVFK 263
Ntab PMT       IIVDSSDPIGPAKDL▼FERPFFEAVAKALRPGGVVCTQAESIWLHMHI▼IKQIIANCRQVFK 298
Hnig PMT       IIVDSSDPIGPAKDL▼FERPFFEAVTKALRPGGVVCTQAESIWLHMHI▼IKQIIANCRQVFK 262
Abel PMT       IIVDSSDPIGPAKDL▼FERPFFEAVAKALRPGGVVCTQAESIWLHMHI▼IKQIIDNCRQVFK 261
Stub SPDS      VIVDSSDPIGPAQEL▼EKPPFESIAKALRPGGVATQAESIWLHMHI▼IEEIVANCRQIFK 269
Lesc SPDS      VIVDSSDPIGPAQEL▼EKPPFESIAKALRPGGVVSTQAESIWLHMHI▼IEEIVANCRQIFK 264
                :*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
    
```

Motiv V

```

Stub PMT1      GSVNYAWTTVP▼TYPTGVIGYMLCSTEGPEVDFK▼NPVNPIDKDTTHVKS▼KLEPLKFYNTDI 323
Stub PMT2      GSVNYAWTTVP▼TYPTGVIGYMLCSTEGPEVDFK▼NPVNPIDKDTTHVKS▼KLEPLKFYNTDI 323
Ntab PMT       GSVNYAWTTAP▼TYPTGVIGYMLCSTEGPEVDFK▼NPVNPIDKETTQVKS▼KLGLPLKFYNSDI 358
Hnig PMT       GSVNYAWTTVP▼TYPTGVIGYMLCSTEGPEVDFK▼NPVNSIDKDTTHVKS▼-GPLKFYNSDI 321
Abel PMT       GSVNYAWTTVP▼TYPTGVIGYMLCSTKGPQVDFRNPVNPIDKKTSHIKS▼-GPLKFYNSDI 320
Stub SPDS      GSVNYAWTTVP▼TPSGMIGFMLCSTEGPAVDFK▼NPINPIDDESP--VKTIEPLKFYNSEI 327
Lesc SPDS      GSVNYAWTTVP▼TPSGMIGFMLCSTEGPAVDFK▼NPINPIDDESP--AKSIEPLKFYNSEI 322
                *****:*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
    
```

```

Stub PMT1      HKA▼AFILPSFARSLIES--- 340
Stub PMT2      HKA▼AFILPSFARSLIES--- 340
Ntab PMT       HKA▼AFILPSFARSMIES--- 375
Hnig PMT       HKA▼AFILPSFARDLVEF--- 338
Abel PMT       HKA▼AFILPSFARNLMESELD 340
Stub SPDS      HQAS▼FCLPSFAKRV▼ETK▼GK 347
Lesc SPDS      HQAS▼FCLPSFAKRV▼ETK▼GK 342
                *:*:* *****: ::*
    
```

Abb. C-12 Homologievergleich der PMT-Proteinsequenzen

Legende:

A	Aminosäureunterschiede der <i>S. tuberosum</i> PMT1 und PMT2
A/A	PMT- und SPDS-spezifische Aminosäuren
A	SAM/(dcSAM)-Bindg. und Putrescin-Bindg./-Deprotonierung
A	<i>Xba</i> I Schnittstelle
▼	Aminosäuren mit wichtigen Funktionen (D 3.2)
*	identische Aminosäuren
:	stark konservierte Aminosäuren
.	schwach konservierte Aminosäuren

C 6.2 *spds*-Sequenzen

Beide Spermidinsynthese-Klone wurden ebenfalls mehrfach sequenziert. Für eine Sequenzanalyse wurde nur der vollständige *spds1* Klon herangezogen. Dieser hatte eine Länge von 1347 bp mit einem kodierenden Bereich von 1044 Nukleotiden (einschließlich Stop-Codon) und entsprach einem Protein mit 347 Aminosäuren. Mit der Proteinsequenz konnte ein theoretisches Molekulargewicht von 38232.5 Da und ein isoelektrischer Punkt von 4,81 berechnet werden. Ein Sequenzvergleich wurde durchgeführt (Tab. C-3).

	Accession number	Nukleotidsequenz	Aminosäuresequenz
<i>Lycopersicon esculentum</i> SPDS (Lesc)	AJ006414	97	97
<i>Datura stramonium</i> SPDS (Dstr)	Y08253	94	93
<i>Hyoscyamus niger</i> SPDS (Hnig)	AB006690	93	94
<i>Nicotiana glauca</i> SPDS	AB006692	92	90
<i>Coffea arabica</i> SPDS	AB015599	79	82
<i>Pisum sativum</i> SPDS (Psat)	AF043109	74	74
<i>Atropa belladonna</i> PMT	AB018571	67	59
<i>Solanum tuberosum</i> PMT (Stub)	AJ605553	66	57

Tab. C-3 Homologievergleich der *S. tuberosum* *spds1*/SPDS in % (Identität)

Abb. C-13 Homologievergleich der SPDS-Proteinsequenzen

Legende:

A	Verlängerung am N-terminalen Ende (27 AS)
A	Aminosäureunterschiede zwischen <i>S. tuberosum</i> SPDS und <i>L. esculentum</i> SPDS
A/A	PMT- und SPDS-spezifische Aminosäuren
A	dcSAM/(SAM)-Bindg. und Putrescin-Bindg./-Deprotonierung
▼	Aminosäuren mit wichtigen Funktionen (D 3.2)
*	identische Aminosäuren
:	stark konservierte Aminosäuren
.	schwach konservierte Aminosäuren

Wie unter C 6.1 dargestellt, konnten auch hier die PMT- und SPDS-spezifischen Aminosäuren gefunden werden (Hashimoto *et al.* 1998b; Suzuki *et al.* 1999a). Allerdings wurde festgestellt, dass die *Pisum sativum* (Psat) SPDS in einer Aminosäure von den bekannten Aminosäuren abwich. Für 6 der 7 beschriebenen Aminosäuren konnte die Zuordnung übernommen werden. Zu den in C 6.1 beschriebenen Motiven nach Posfai und Mitarbeitern wurde festgestellt, dass diese auch in der SPDS-Proteinsequenz zu finden waren und somit für die Bindung von dcSAM gleichermaßen kennzeichnend sind (Posfai *et al.* 1989). Die Bindung von dcSAM müsste somit an gleicher Stelle erfolgen. Die Bindungstasche sollte jedoch schmaler im Vergleich zur PMT sein, da die Carboxylgruppe des Methionins bei dcSAM fehlt (Korolev *et al.* 2002). Entscheidend für die Größe der Bindungstasche ist Asparaginsäure [D] (Pos. 143), welches bei den PMT an gleicher Stelle durch Isoleucin [I] ersetzt ist. Dieser Unterschied in den Sequenzen zwischen SPDS und PMT könnte als Marker-Aminosäure dienen, um eine Zuordnung zu den SPDS oder PMT vorzunehmen. Auffällig war in diesem Vergleich auch die extrem hohe Homologie auf Aminosäureebene zur *L. esculentum* SPDS [97% (Identität)], von der sie sich nur in 11 Aminosäuren unterschied. Ebenso interessant war die Verlängerung beider Proteinsequenzen am N-terminalen Ende (27 Aminosäuren). Mit Ausnahme der *Pisum sativum* SPDS ist diese Verlängerung bisher bei keiner anderen pflanzlichen SPDS bekannt (Alabadi *et al.* 1999). Um eine Zuordnung der gefundenen PMT- und SPDS-Sequenzen eindeutig zu belegen, wurde im Anschluss an die Sequenzanalyse ein Enzymassay durchgeführt.

C 7 Heterologe Expression der pmt und spds

C 7.1 pmt1-Klon in Escherichia coli

Für die heterologe Expression in Bakterienzellen wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet. Zum einen wurde der Vektor pET21d in BL21 (DE3)- und Rosetta-gami™-Zellen verwendet, welcher die Expression von Protein mit Histidin-Anhang (6fach) am C-Terminus ermöglicht. Zum anderen wurde der Vektor pQE30 (Qiagen) in SG 13009 Zellen eingesetzt, um Protein mit Histidin-Anhang (6fach) am N-Terminus zu erhalten. Für beide Vektor-Systeme wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet. Die Induktion erfolgte mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM) und nach unterschiedlichen Zeiten (2 h, 4 h, 8 h und 16 h). Außerdem wurde die Induktion bei unterschiedlichen Temperaturen (16 °C, 25 °C und 37 °C) durchgeführt. Dabei wurde zum schnellen Screenen lösliches und unlösliches Protein nicht getrennt, sondern als Gesamtprotein durch SDS-Gelelektrophorese untersucht. Die besten Expressionsergebnisse wurden mit dem pET21d-Vektor in Rosetta-gami™-Zellen nach 4 h Inkubation mit 1 mM IPTG bei 37 °C erzielt. Nach Trennung des Gesamtproteins wurde erneut eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung war jedoch nicht eindeutig, da sowohl im löslichen als auch unlöslichen Bakterienlysat von Rosetta-gami™-Zellen, die mit pET21d-Leer-Plasmid transformiert waren, ein Protein mit ca. 38 kDa zu finden war. Deshalb wurden PMT-Aktivitätstests durchgeführt (B 2.3.5).

Die spezifische PMT-Aktivität betrug für das lösliche Bakterienlysat aus Rosetta-gami™-Zellen, die mit pET21d-*pmt1*-Plasmid (G 7.3) transformiert waren, 306 pkat/mg Protein, während im Bakterienlysat aus Rosetta-gami™-Zellen, die mit pET21d-Leer-Plasmid transformiert waren, keine PMT-Aktivität gemessen wurde. Da aus dem Proteinassay eindeutig zu erkennen war, dass das rekombinante Protein des PMT1-Clones aktiv war, wurde im Folgenden versucht, dieses zu reinigen und anzureichern, um unspezifische Methyltransferaseaktivität auszuschließen. Für die Reinigung des Proteins wurde der Histidin-Anhang am C-Terminus des rekombinanten Proteins genutzt und eine Reinigung über Chelatkomplexbildung mit Nickel-Ionen

durchgeführt (B 2.3.6.1). Für die Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurde das ÄKTA 100-System (Pharmacia) verwendet (B 2.3.6.1). Das rekombinante Protein wurde mit einem Imidazolgradienten eluiert.

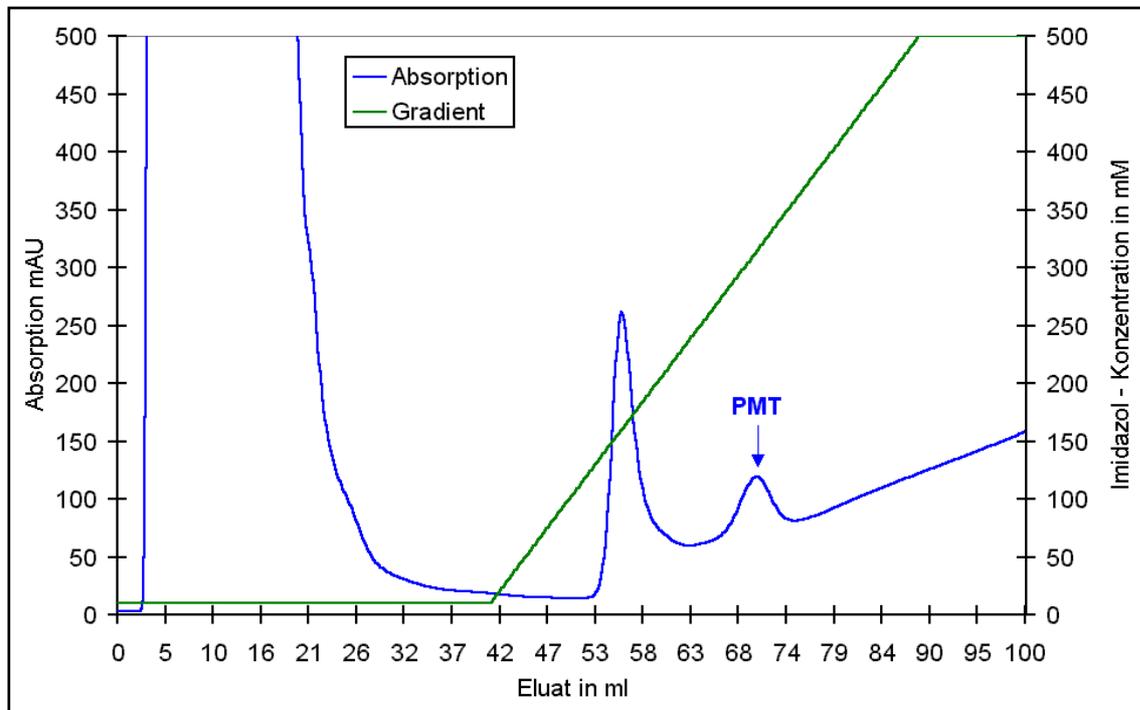


Abb. C-14 Elutionsprofil des rekombinanten PMT-Proteins

Im Elutionschromatogramm sind 40 ml Waschfraktionen (10 mM Imidazol) und 60 ml Eluatfraktionen (Gradient von 10 mM bis 500 mM Imidazol) dargestellt.

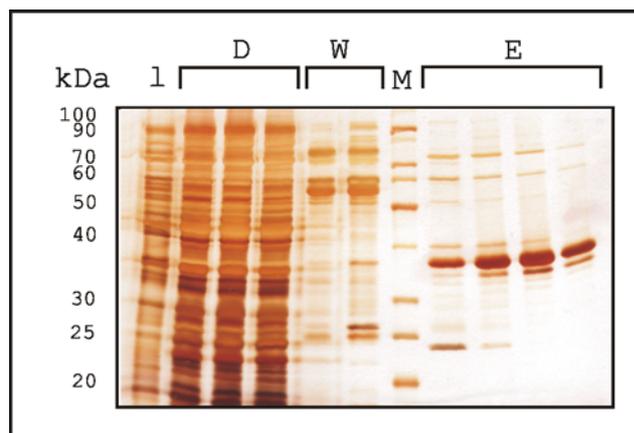


Abb. C-15 SDS-Gel PMT-Reinigung

l - lösliches Bakterienlysat; M - Proteinmarker; D - Durchflussfraktionen; W - Waschfraktionen; E - Elutionsfraktionen aus dem 2. Peak des Elutionschromatogramms

Eluatfraktionen wurden mit SDS-Gelelektrophorese auf rekombinantes PMT-Protein untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der 2. Peak im Elutionschromatogramm (Abb. C-14) das rekombinante PMT-Protein war. Wie in Abb. C-15 zu sehen, konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa gereinigt werden. Dies entsprach dem theoretischen Molekulargewicht des *S. tuberosum* PMT1-Clones mit Histidin-Anhang von 38,2 kDa. Die vereinigten und konzentrierten Eluatfraktionen ergaben eine spezifische Aktivität von 3036 pkat/mg Protein. Spermidinsynthaseaktivität wurde mit Putrescin und dcSAM als Cosubstrat geprüft, konnte aber nicht festgestellt werden.

C 7.2 *pmt2*-Klon in *Escherichia coli*

Mit dem *pmt2*-Klon, der sich nur in 4 Aminosäuren vom *pmt1*-Klon unterschied, wurden die gleichen Expressionsexperimente wie unter C 7.1 beschrieben durchgeführt. Die besten Expressionsraten wurden mit dem *pmt2*-Klon mit pET21d-Vektor in BL 21 (DE3) Zellen nach 4 h bei einer IPTG-Konzentration von 1 mM und 37 °C erzielt. Dies galt auch für die *H. niger pmt* (AB 018572), *N. tabacum pmt* (D 28506) und *D. stramonium pmt* (AJ 583514), die als Kontrollen eingesetzt wurden. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien nach (B 2.3.2) lysiert, um sowohl das Pellet aus unlöslichem Protein und Zelltrümmern, als auch das lösliche Zelllysate auf PMT-Protein mit SDS-Gelelektrophorese zu untersuchen. Jeder SDS-Gel-Analyse schloss sich ein PMT-Aktivitätstest an (B 2.3.5). Im Gegensatz zur *N. tabacum*-, *D. stramonium*- und *H. niger*-PMT lag die *S. tuberosum* PMT2 als unlösliches Protein vor, welches vermutlich Aggregate (inclusion bodies) bildete, wie sie häufig bei heterologen Expressionen in *E. coli* beobachtet werden (King et al. 1996). Eine Zusammenlagerung von Proteinen kann entstehen, wenn zu wenig Chaperone für die korrekte Faltung des Proteins vorhanden sind (Carrio et al. 2002; Carrio et al. 2003) oder Disulfidbrücken nicht ausgebildet werden. Mit dem Bakterienstamm Rosetta-gami™ bestand die Möglichkeit die Disulfidbrückenbildung von rekombinanten Proteinen zu verbessern. Rosetta (DE3)-Zellen enthalten in *E. coli* selten verwendete tRNA wie AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA, die für die Expression eukaryotischer Proteine notwendig sein können (Kane 1995). Origami (DE3)-Zellen enthalten Mutationen in den Thioredoxin- und

Glutathionreduktase-Genen, welche die Disulfidbrückenbildung der exprimierten Proteine im Cytoplasma fördern (Bessette *et al.* 1999). Auch der Einsatz dieses Bakterienstammes führte zu keiner Verbesserung der Löslichkeit des PMT2-Clones.

Mit dem pQE30-Vektor in SG 13009 Zellen zeigte der *pmt2*-Klon im Vergleich zum pET21d-Vektor in BL 21 (DE3) keine Proteinexpression. Die *H. niger* PMT (AB 018572) im pQE30-Vektor als Kontrolle wurde im Gegensatz dazu in SG 13009 Zellen exprimiert. Auch eine Veränderung der Expressionsbedingungen wie bereits beschrieben, führte nicht zum Erfolg.

C 7.3 *pmt2*-Chimäre in *Escherichia coli*

Auf Grund der positiven Expressionsergebnisse der *H. niger* PMT (AB018572) mit dem pET21d-Vektorsystem in BL 21 (DE3) Zellen entstand die Idee, Chimären aus *S. tuberosum pmt2* und *H. niger pmt* zu bilden, um den Nachweis der partiellen Funktionalität der *S. tuberosum pmt2* zu führen.

Wie unter B 2.2.11.2 beschrieben, wurde die Chimäre **HS** (*H. niger pmt* + *S. tuberosum pmt2*) und **SH** (*S. tuberosum pmt2* + *H. niger pmt*) hergestellt. Für die Expression wurde der Bakterienstamm BL 21 (DE3) unter optimierten Expressionsbedingungen (C 7.1) eingesetzt.

Die Expression der Chimäre **HS** war negativ. Weder im löslichen noch unlöslichen Bakterienlysat konnte überexprimiertes Protein nachgewiesen werden. PMT-Aktivität konnte im löslichen und unlöslichen Bakterienlysat nicht gemessen werden.

Die Expression der Chimäre **SH** verlief positiv. Die überexprimierte Proteinmenge im löslichen Bakterienlysat war relativ gering. Ein PMT-Aktivitätstest belegte aber eine Methylgruppenübertragung auf Putrescin.

Generell musste festgestellt werden, dass sich die SDS-Gel-elektrophorese als Analysenmethode für dieses Expressionssystem nicht eignete, da sich auch im löslichen Bakterienlysat aus BL 21 (DE3)-Zellen mit pET21d-Leer-Plasmid ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa mit hoher Intensität fand.

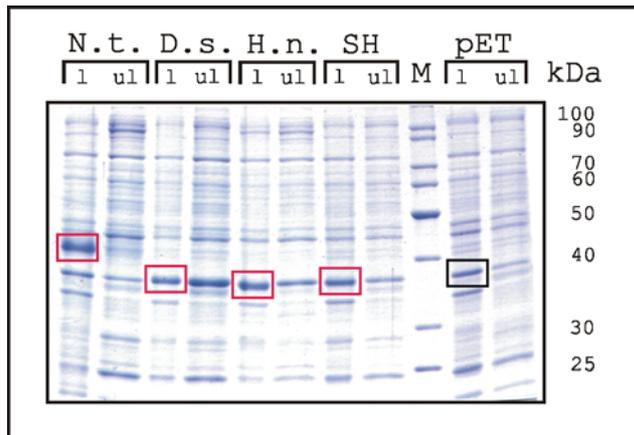


Abb. C-16 Heterologe Expression verschiedener PMT in pET21d

N.t. - *Nicotiana tabacum pmt*; D.s. - *Datura stramonium pmt*; H.n. - *Hyoscyamus niger pmt*; **SH** - Chimäre aus *Solanum tuberosum pmt2* und *Hyoscyamus niger pmt*; pET21d - Vektorkontrolle; l - lösliches Bakterienlysate; ul - unlösliches Bakterienlysate; M - Proteinmarker; rote Kästchen - rekombinantes lösliches Protein

Wie in Abb. C-16 zu sehen, korreliert das stärkste Proteinsignal im löslichen Bakterienlysate (l) mit dem theoretischen Molekulargewicht der einzelnen PMT Proteine. Für die *N. tabacum*, *D. stramonium*, *H. niger* PMT mit Histidin-Anhang und die Chimäre **SH** mit Histidin-Anhang wurden theoretische Molekulargewichte von 41,9 kDa; 38,6 kDa; 38,0 kDa und 38,0 kDa berechnet. Mit den löslichen Bakterienlysaten wurden im Anschluss Aktivitätstests durchgeführt. Dabei wurden spezifische Aktivitäten für die *N. tabacum* PMT (25,6 pkat/mg Protein), *H. niger* PMT (90,5 pkat/mg Protein) und Chimäre **SH** (66,6 pkat/mg Protein) gemessen.

Mit diesem Expressionsexperiment konnte gezeigt werden, dass die ersten 165 Aminosäuren des PMT2-Klons fusioniert mit der *H. niger* PMT ein funktionelles Protein ergeben. Da es allerdings nicht gelang, den kompletten PMT2-Klon in einem bakteriellen System zu exprimieren, wurde das Expressionssystem entscheidend geändert. Ein eukaryotisches Expressionssystem kam zum Einsatz.

C 7.4 *pmt2*-Klon in *Pichia pastoris*

Für die Expression des *pmt2*-Klons wurde der Vektor pPICZ α A (Invitrogen) in den methylotrophen Hefestämmen GS115 und KM71H (beide *Pichia pastoris*-Stämme) verwendet (Tschopp et al. 1987). Mit diesem Vektor können Fusionsproteine mit α -Faktor Sekretionssignal (N-terminal) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Brake et al. 1984; Brake 1989) einem *c-myc*-Epitop (C-terminal) und einem Histidin-Anhang (C-terminal) exprimiert werden. Der Vorteil dieses Systems bestand darin, dass auf eine aufwendige Aufarbeitung der Hefezellen verzichtet werden konnte, da das Fusionsprotein aktiv aus den Hefezellen in das Medium abgegeben wird. Beide Hefestämme jeweils mit pPICZ α A-*pmt2*-Plasmid und pPICZ α A-Leer-Plasmid wurden über 4 Tage inkubiert. Alle 8 h wurde eine Probe entnommen und mit SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung untersucht. Weder im Hefepellet noch im Medium konnte ein Proteinbande in der Größe des Fusionsproteins (49,1 kDa) nachgewiesen werden. Der PMT-Aktivitätstest war ebenfalls negativ. Auch eine Konzentrierung von 250 ml Medium (nach 3 Tagen Inkubation) auf 5 ml führte weder zu einer Proteinbande in der Größe des Fusionsproteins auf dem SDS-Gel noch zu einem positivem Aktivitätstest. Somit konnte auch die Expression geringer Mengen Protein ausgeschlossen werden. Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass auch hier eine Expression des PMT2-Klons nicht möglich war.

C 7.5 *spds*-Klon in *Escherichia coli*

Aufbauend auf den Erfahrungen mit der *pmt*-Expression wurde für die *spds*-Expression auch das pET21d-Vektor-System genutzt. Auf Grund des natürlichen Vorkommens von Spermidinsynthasen in *E. coli* musste der Bakterienstamm HT 551 eingesetzt werden, bei dem die meisten *spds*- und *samdc*-Gene deletiert sind (Xie et al. 1993). Dieser Bakterienstamm wurde uns freundlicherweise von Prof. Takashi Hashimoto (Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Nara, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Induktion erfolgte über Nacht bei 16 °C und mit einer IPTG-Konzentration von 1 mM (Hashimoto et al. 1998b). Nach Lyse der Bakterien wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der im

löslichen Bakterienlysat im Vergleich zur Kontrolle (HT 551-Zellen mit pET21d-Leerplasmid) eine Proteinbande in der Größe des erwarteten Proteins (ca. 40 kDa) detektiert wurde. Ein SPDS-Aktivitätstest (B 2.3.5) mit dem löslichen Bakterienlysat wurde durchgeführt und eine spezifische Aktivität von 34 pkat/mg Protein gemessen. Die Kontrolle zeigte keine SPDS-Aktivität. Nach diesem positiven Test wurde das SPDS-Protein mit Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt (B 2.3.6.1). Hierbei wurde das ÄKTA 100-System (Pharmacia) nicht eingesetzt, sondern mit einem Schlauchpumpensystem gearbeitet.

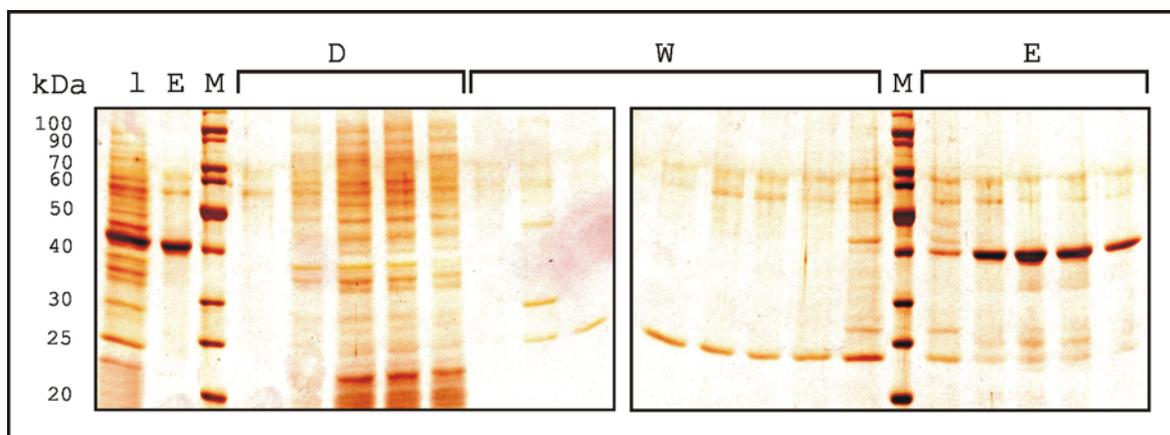


Abb. C-17 SDS-Gel SPDS-Reinigung

l - lösliches Bakterienlysat; M - Proteinmarker; D - Durchflussfraktionen;
W - Waschfraktionen; E - Elutionsfraktionen

In den Elutionsfraktionen war deutlich ein Protein mit der Größe von ca. 40 kDa zu sehen, welches dem theoretischen Molekulargewicht der SPDS mit Histidin-Anhang von 39,3 kDa entsprach. Mit den vereinigten Eluatfraktionen wurde eine spezifische Aktivität von 309 pkat/mg Protein bestimmt. Weder eine PMT- noch Sperminsynthaseaktivität konnte gemessen werden.

C 8 Biochemische Charakterisierung der PMT

Katalytische Parameter wurden ausschließlich von der PMT bestimmt (G 6.2). Eine Charakterisierung der SPDS wurde nicht durchgeführt, da nur geringe Mengen an dcSAM zur Verfügung standen. dcSAM ist käuflich nicht zu erwerben. Um dcSAM in ausreichenden Mengen bereitzustellen, wäre eine Umsetzung von SAM durch die *Solanum tuberosum* SAMDC denkbar (Arif *et al.* 1994). Die Reinigung von dcSAM könnte durch HPLC erfolgen (Graser *et al.* 2000).

Die K_m - und V_{max} -Bestimmung von Putrescin erfolgte in Anlehnung an Walton und Mitarbeiter bei einem pH-Wert von 9,0 (Walton *et al.* 1994). In einem Konzentrationsbereich von 0,01 mM bis 3 mM wurde die Umsetzung von Putrescin bestimmt (B 2.3.6.3). Es ergab sich ein K_m -Wert von 257 μ M und V_{max} von 2,43 nkat/mg Protein.

Die Spezifität des Enzyms wurde durch Umsetzungs- und Hemmversuche mit Substratanaloga bestimmt. Verwendet wurden natürlich vorkommende Substrate wie Spermidin und Cadaverin (1,5-Diaminopentan) und Substrate mit struktureller Ähnlichkeit zu Putrescin wie n-Butylamin, 1,6-Diaminohexan und 1,7-Diaminoheptan.

Die Umsetzung der Substratanaloga erfolgte nach (B 2.3.6) mit 9 μ g gereinigtem Protein und einer Konzentration von 1 mM. Resultat dieser Umsetzung war, dass keines dieser Mono-, Di- und Triamine durch die PMT umgesetzt wurde.

Die Hemmung der PMT-Aktivität durch Substratanaloga wurde analog durchgeführt. Die Konzentration von Putrescin und dem Substratanalogen betrug 1 mM.

Substrate	spezifische Aktivität nkat/mg Protein	S_D nkat/mg Protein	relative Aktivität %
Putrescin	1,720	0,165	100
Putrescin + n-Butylamin	0,546	0,026	32
Putrescin + 1,5-Diaminopentan	0,863	0,190	50
Putrescin + 1,6-Diaminohexan	1,273	0,271	74
Putrescin + 1,7-Diaminoheptan	1,159	0,211	67
Putrescin + Spermidin	1,594	0,212	93

Tab. C-4 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der PMT-Hemmversuche mit verschiedenen Substratanaloga

Die Mittelwerte sind aus 3 unabhängigen Messungen berechnet.

C 9 Expressionsanalyse der pmt und spds- Transkripte

Die Expressionsanalyse der *pmt*- und *spds*-Transkripte sollte Aufschluss über die gewebsspezifische Lokalisation der Transkription beider Gene geben. Für Northern Blots wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Kartoffelgeweben isoliert, wobei den Kartoffelknollengeweben besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Der Fokus auf diese Gewebe ist darin begründet, da zum einen ausschließlich in 1 mm Kartoffelkeimen (C 4) eine PMT-Aktivität gemessen wurde und zum anderen *N*-Methylputrescin nur in Kartoffelaugen, deren Dormanz gebrochen war und 1 mm Kartoffelkeimen akkumulierte (C 1.2). Die besondere Schwierigkeit in der Northern Blot-Analyse bestand darin, spezifische Sonden zu finden. Zwischen der *pmt* und *spds* bestand eine Homologie von 66% Identität. Diese führte oft zu Kreuzhybridisierungen. Deshalb wurden *pmt*-Sonden mit einer Länge von 1023 bp, 700 bp, 500 bp 300 bp und 200 bp mit Hilfe des Dot Blot (B 2.2.9) auf Spezifität getestet. Die einzige spezifische *pmt*-Sonde war ein 200 bp langes Fragment vom 5'-Ende der *pmt*. Für die *spds* wurde ebenfalls ein 300 bp langes Fragment vom 5'-Ende der *spds* gefunden, welches spezifisch hybridisierte. Gleichmäßige Gesamt-RNA-Mengen konnten durch Kontrollhybridisierung mit einer 18S rRNA-Sonde aus *Lycopersicon esculentum* gezeigt werden (Dobrowolski et al. 1989).

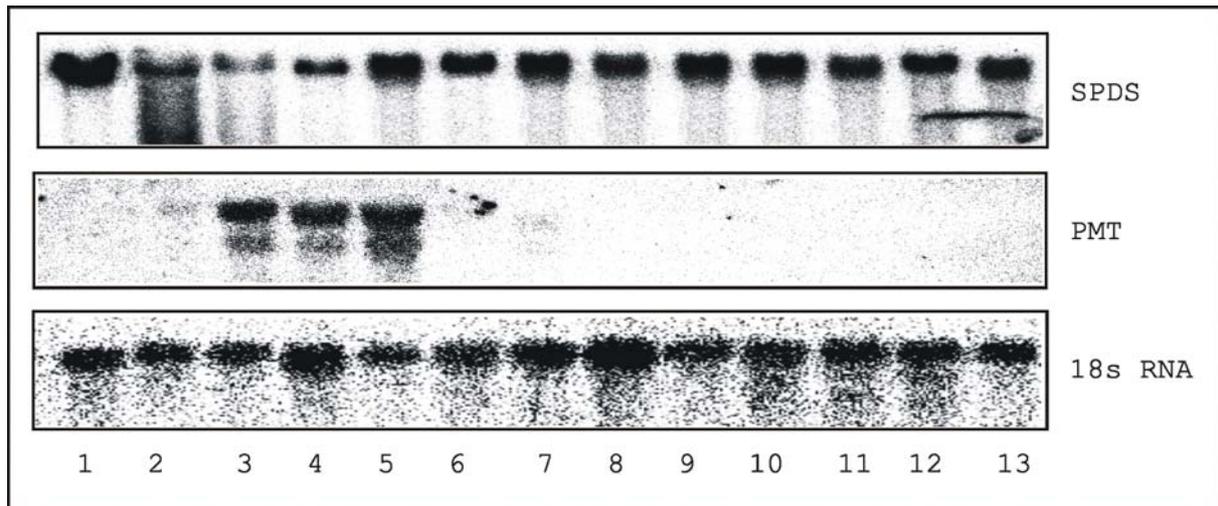


Abb. C-18 Northern Blot *pmt/spds*

- | | |
|---------------------------------|----------------------|
| 1. Kartoffelschale | 8. Stengel |
| 2. Kartoffelaugen dormant | 9. Stolone |
| 3. Kartoffelaugen Start Keimung | 10. untere Blätter |
| 4. Kartoffelkeime 1 mm | 11. mittlere Blätter |
| 5. Kartoffelkeime 3 mm | 12. obere Blätter |
| 6. Kartoffelkeime 10 mm | 13. Blüten |
| 7. Wurzeln | |

Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Geweben isoliert. 20 µg wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte zum einen mit einem 200 bp langen N-terminalen *pmt*-Fragment und zum anderen mit einem 300 bp langen N-terminalen *spds*-Fragment. Gleiche Gesamt-RNA-Mengen konnten durch Kontrollhybridisierung mit 18S RNA aus *L. esculentum* belegt werden.

Der Northern Blot zeigte ubiquitäres Vorkommen von *spds*-Transkript, während das *pmt*-Transkript ausschließlich nur in Kartoffelaugen zu Beginn der Keimung, in Kartoffelkeimen mit einer Länge von 1 und 3 mm Länge gefunden wurde. Ein sehr schwaches Signal wurde auch in Wurzeln detektiert.

C 10 Genomische Struktur

Mit Hilfe der Southern Blot-Analyse (B 2.2.8) erfolgte die Untersuchung der Kopienzahl von Genen der *pmt* und *spds* im *Solanum tuberosum* Genom. Dazu wurde DNA aus Kartoffelblättern isoliert (B 2.2.1) und mit den Restriktionsenzymen *EcoRV*, *HindIII* und *Spe* über Nacht geschnitten. Die cDNA der *S. tuberosum pmt* und *spds* enthalten keine dieser Restriktionsschnittstellen. Die Hybridisierung erfolgte nacheinander mit den unter C 9 beschriebenen Sonden. Zwischen den Hybridisierungen erfolgte ein Waschschrift, bei dem die radioaktiven Signale vollständig von der Membran entfernt wurden.

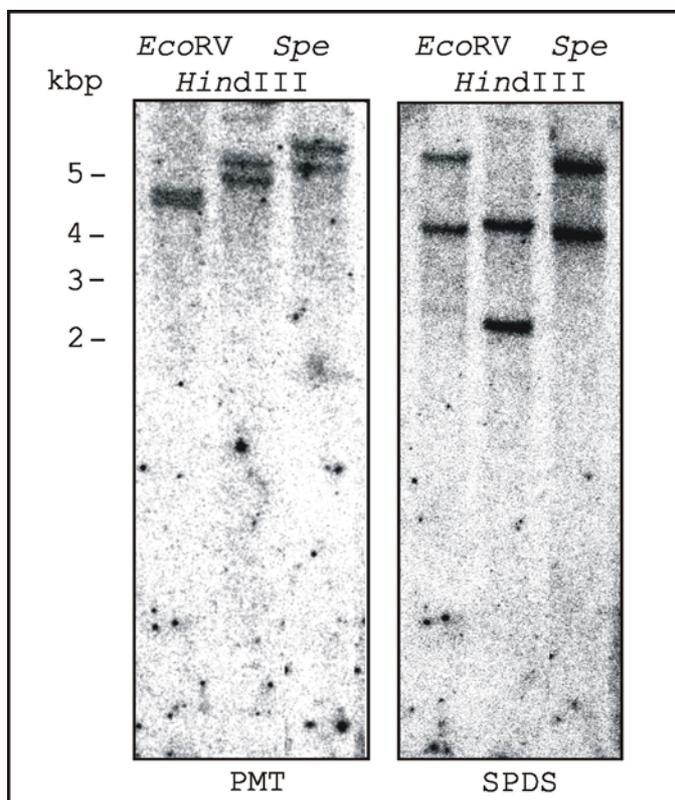


Abb. C-19 Southern Blot *pmt* und *spds*

Genomische DNA wurde aus Blättern isoliert. Über Nacht wurden 20µg mit den Restriktasen *EcoRV*, *HindIII* und *Spe* verdaut, in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit den gleichen Sonden, wie unter Abb. C-18 erwähnt.

Der Southern Blot stützt die Ergebnisse der cDNA-Isolierung von *pmt* und *spds* in denen jeweils zwei unterschiedliche cDNA-Klone gefunden wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich hierbei jeweils um zwei Gene handeln muss.

D Diskussion

D 1 Die Polyamine

D 1.1 Die Verteilung der Polyamine

Polyamine sind bei physiologischem pH-Wert als Polykationen in allen lebenden Organismen zu finden. In Pflanzen spielen sie bei vielfältigen biologischen Prozessen, wie Wachstum, Entwicklung und abiotischer Stressabwehr eine wichtige Rolle (Flores *et al.* 1989; Evans *et al.* 1989; Galston *et al.* 1990). Am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* wurde die Bedeutung der Polyamine für Wachstums- und Entwicklungsprozesse näher untersucht. Dabei konnte eine Verbindung zwischen vermindertem Zellwachstum und Zellteilungsraten in transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen und niedriger Sperminkonzentration nachgewiesen werden (Hanzawa *et al.* 2000; Hanzawa *et al.* 2002). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen Störungen der Embryonalentwicklung von *Arabidopsis*-Samen und erniedrigter Spermidinkonzentration hergestellt werden (Imai *et al.* 2004).

Auf Grund der polykationischen Struktur können Polyamine an negativ geladene Moleküle wie DNA (Basu *et al.* 1990), Proteine (Apelbaum *et al.* 1988) und Membranvesikel (Tassoni *et al.* 1996) binden. Polyamine sind in Pflanzen aber nicht nur als freie basische Verbindungen zu finden, sondern liegen oft in konjugierter Form vor. Dabei reagieren die basischen Polyamine mit Hydroxyzimtsäuren wie Kaffeesäure, Ferulasäure und *p*-Cumarsäure zu Amiden (Negrel 1989). Diese Reaktion erfolgt z.B. bei Putrescin durch eine Putrescinhydroxycinnamoyltransferase (Meurer-Grimes *et al.* 1989).

In Kartoffel wurden freie Polyamine im Zusammenhang mit Knollenbildung (Protacio *et al.* 1992; Taylor *et al.* 1993) und Keimung von Knollen (Kaur-Sawhney *et al.* 1982; Mikitzel *et al.* 1989) untersucht. In *in vitro* Kartoffelsystemen wie Internodienkulturen (Protacio *et al.* 1992; Mader 1995; Mader 1997; Mader 1999) und Suspensionskulturen (Scaramagli *et al.* 2000) wurden freie und konjugierte Polyamine gemessen.

Um einen Eindruck über die Verteilung der Polyamine in der gesamten Kartoffelpflanze zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen in Kartoffelgeweben vorgenommen, bei denen neben freien Polyaminen, lösliche und unlösliche konjugierte Polyamine in die Messungen mit einbezogen wurden (C 1.2). Diese Messungen ergaben, dass der Anteil von konjugierten Polyaminen an Gesamtpolyaminen durchschnittlich 75% betrug, zum Teil aber auch bis auf 88% ansteigen konnte (C 1.2). Dieser Umstand verdeutlicht die Notwendigkeit einer hydrolytischen Spaltung vor der Polyaminmessung. Besonders hervorzuheben war der enorme Anstieg der Putrescin- und Spermidinkonzentration in stark proliferierenden Geweben. Dies konnte während der Keimung von Kartoffelknollen deutlich beobachtet werden. Binnen kurzer Zeit (3 Tage) kam es zu einer Verdopplung der Putrescin- und Spermidinmengen in Augen, deren Dormanz gebrochen war, im Vergleich zu dormanten Augen (C 1.2).

Von Kaur-Sawhney und Mitarbeitern wurden ebenfalls Polyamine in den gleichen Geweben bestimmt (Kaur-Sawhney *et al.* 1982). Allerdings wurde nur ein Bruchteil der tatsächlich gebildeten Polyamine erfasst. Zusätzlich wurden die Enzymaktivitäten der ODC, ADC und SAMDC (A 2.3) in den gleichen Geweben vermessen (Kaur-Sawhney *et al.* 1982). Dabei wurde festgestellt, dass es während des Keimstarts zu starken Steigerungen der relativen Aktivität von ODC (um ca. 200%) und SAMDC (um ca. 100%) kam, während die Steigerung der relativen Aktivität von ADC (um ca. 20%) signifikant niedriger ausfiel. Die ODC ist somit das limitierende Enzym der Putrescinsynthese von Kartoffel.

Auffällig waren außerdem die hohen Gesamtkonzentrationen von Putrescin, Spermidin und Spermin in Blüten (C 1.2). Hiermit könnte eine Affinität dieser Stoffe zu DNA-reichen Geweben, wie Fruchtknoten und Pollen belegt werden, da zudem auch der größte Teil der Polyamine gebunden vorlag. Zu diesem Schluss kamen auch Figueras und Mitarbeiter, die *Nicotiana plumbaginifolia*-Gewebe untersuchten. Auch hier wurde festgestellt, dass in *N. plumbaginifolia*-Blüten die höchste Gesamtpolyaminkonzentration im Vergleich zu allen anderen Geweben zu finden war. Ein positiver Zusammenhang zwischen Polyaminkonzentration in Blüten und Polyploidie konnte nicht hergestellt werden (Figueras *et al.* 1990).

Aus den Polyaminmessungen dieser Arbeit ist außerdem ersichtlich, dass die Spermidinakkumulation mit der Putrescinakkumulation synchron verläuft, die Spermidinsynthese demnach im Polyaminstoffwechsel der Kartoffel keine limitierende Funktion besitzt, solange entsprechendes Co-Substrat in Form von decarboxyliertem SAM vorhanden ist. Dies wird durch die SAM-Decarboxylase bereit gestellt (Taylor *et al.* 1992; Arif *et al.* 1994). Antisense- und sense-Transformationen mit der SAM-Decarboxylase machten deutlich, dass dieses Enzym das limitierende Enzym in der Spermidin- und Sperminsynthese der Kartoffel ist (Kumar *et al.* 1996; Pedros *et al.* 1999),.

D 1.2 N-Methylputrescin - Hinweis auf eine aktive PMT

Der Nachweis von N-Methylputrescin in Kartoffelgeweben war das wichtigste Ergebnis der Polyaminmessungen und Beleg für eine aktive PMT in diesen Geweben.

Erstmals wurde ¹⁴C-markiertes N-Methylputrescin in einem Assay mit Putrescin und ¹⁴C-markiertem SAM nach Proteinextraktion von *N. tabacum*-Wurzeln detektiert. Anschließend wurde aus diesem Proteinextrakt die erste PMT gereinigt und ihre Funktion in der Nicotinbiosynthese beschrieben (Mizusaki *et al.* 1971). Zusätzlich wurden *N. tabacum*-Wurzeln auf Intermediate der Nicotinbiosynthese untersucht. Freies N-Methylputrescin wurde mit einer Konzentration von 1 µmol/g TM detektiert (Feth *et al.* 1989).

N-Methylputrescin wurde bisher nicht nur in *N. tabacum* gefunden, sondern auch in Pflanzen die Tropanesteralkaloide bilden können. In *A. belladonna*-Wurzeln wurden 0,3 µmol/g TM Gesamt-N-Methylputrescin detektiert. Nach Transformation mit *N. tabacum* PMT stieg die Konzentration von Gesamt-N-Methylputrescin in den Wurzeln transgener *A. belladonna*-Pflanzen auf 0,6 bis 0,95 µmol/g TM an (Rothe *et al.* 2003). Auch in einer *H. albus*-Wurzelkultur konnte 1,5 µmol/g TM freies N-Methylputrescin gemessen werden (Hashimoto *et al.* 1989c). Aus *A. belladonna* wie auch *H. albus* wurden PMT in Verbindung mit der Tropanesteralkaloidbiosynthese untersucht (Hibi *et al.* 1992; Suzuki *et al.* 1999a).

Im Gegensatz zu den Messungen von Nicotin- und Tropanesteralkaloid-produzierenden Pflanzen konnte in den Wurzeln von *Solanum tuberosum* kein *N*-Methylputrescin gefunden werden. Ausschließlich in Kartoffel-
augen, zu Beginn der Keimung (1,05 $\mu\text{mol/g}$ TM) und in 1 mm Kartoffel-
keimen (0,75 $\mu\text{mol/g}$ TM) wurde Gesamt-*N*-Methylputrescin detektiert
(C 1.2). Die Werte waren vergleichbar mit denen von Nicotin- und
Tropanesteralkaloid-produzierenden Pflanzen.

D 2 Die heterologe Transformation

D 2.1 Die physiologische Bedeutung der PMT

In *Solanum tuberosum* akkumulieren weder Nicotin noch Tropanester-
alkaloide. Ausschließlich Calystegine, eine polyhydroxylierte Form
der Tropanalkaloide, wurden gefunden. Die höchsten Gesamt-
Calysteginkonzentrationen (bis zu 100 $\mu\text{mol/g}$ TM) wurden in 1 - 3 mm
langen Kartoffelkeimen detektiert (Keiner *et al.* 2000). Der
Vergleich des molaren Verhältnisses von Calysteginen zu
N-Methylputrescin könnte möglicherweise zu dem Schluss führen, dass
die Bildung von *N*-Methylputrescin für die Calysteginbiosynthese
limitierend ist.

Dies wird deutlich, wenn man die Putrescinmenge mit der
N-Methylputrescin- und Spermidinmenge in Kartoffelaugen zu Beginn
der Keimung vergleicht (C 1.2). Nur ca. 1/10 des zur Verfügung
stehenden Putrescins wird von der PMT für eine *N*-Methylierung
genutzt, während die SPDS das vorhandene Putrescin nahezu
vollständig umsetzt (C 1.2). Unterschiedliche Enzymeigenschaften
könnten Ursache für diese Ergebnisse sein. Für *N. tabacum* PMT,
H. albus PMT und *D. stramonium* PMT wurden K_m -Werte für Putrescin von
400 μM , 277 μM und 310 μM bestimmt (Mizusaki *et al.* 1971; Hibi *et al.*
1992; Walton *et al.* 1994). Auch für die *S. tuberosum* PMT wurde
ein ähnlicher K_m -Wert für Putrescin von 257 μM berechnet (C 8). Im
Gegensatz dazu wurden für *Brassica pekinensis* SPDS, *Glycine max* SPDS
und *Senecio vulgaris* SPDS K_m -Werte für Putrescin von 32 μM , 30 μM und
21 μM gemessen (Sindhu *et al.* 1984; Graser *et al.* 2000; Yoon *et al.*
2000). Der K_m -Wert der *S. tuberosum* SPDS für Putrescin konnte auf
Grund fehlenden Co-Substrates (dcSAM) nicht ermittelt werden.

Die Affinität zu Putrescin ist demnach bei PMT wesentlich schwächer ausgeprägt als bei SPDS. Der Einfluss der PMT auf die Polyaminbiosynthese ist daher begrenzt.

Für die Calysteginbiosynthese könnte die PMT jedoch ein Schlüsselenzym, beim Übergang vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel sein. Man nimmt an, dass sie für den metabolischen Fluss der Calysteginbiosynthese entscheidend ist. Aus diesem Grund sollte die Aktivität der PMT durch heterologe Transformation verändert werden, um Auswirkungen auf die Calysteginbiosynthese zu untersuchen.

D 2.2 Die Transformation von Kartoffelblättern

Da Polyamin- und Calysteginmessungen (C 1.2, C 2) zeigten, dass weder in einer *in vitro* Wurzelkultur noch in *in vitro* Pflanzen von Kartoffel *N*-Methylputrescin und Calystegine zu finden waren, kam für eine heterologe Transformation von PMT-cDNA grundsätzlich nur eine Transformation in Frage, die die Regeneration von transgenen Kartoffelpflanzen ermöglichte. Diese sollten später im Gewächshaus in Erde kultiviert werden, um daraus Kartoffelknollen zu gewinnen. Nach einer Dormanzphase sollten diese zur Keimung gebracht werden, um darin *N*-Methylputrescin und andere Intermediate der Calysteginbiosynthese zu messen. Für eine solche Transformation ist der Einsatz von *Agrobacterium tumefaciens* üblich. Diese können zur Transformation von Internodien (Beaujean *et al.* 1998), Blättern (Tavazza *et al.* 1989) und Scheiben von Kartoffelknollen (Stiekema *et al.* 1988) eingesetzt werden.

Bei Agrobakterien-Transformationen, die sich mit Sekundärstoff-Enzymen beschäftigen, kann es jedoch allein durch Integration der *rol* A-, B- und C-Gene des Ri-Plasmids von Agrobakterien zur Beeinflussung der Sekundärstoffbiosynthese kommen. Dies wurde bei einer Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* und *A. belladonna*-Blättern festgestellt (Bonhomme *et al.* 2000). Wurzelkulturen die aus dieser Transformation resultierten, enthielten zwischen 4- und 27-mal mehr Hyoscyamin und Scopolamin als untransformierte Wurzeln von *in vitro* Pflanzen. Bei einer weiteren Transformationen mit *A. rhizogenes* und *N. tabacum*-Blättern mit anschließender Pflanzenregeneration führte die Integration der *rol* A-, B- und C-Gene zu

einer Erhöhung der Nicotinakkumulation (6fach in den Wurzeln und 11fach in den Blättern) (Palazon *et al.* 1997; Palazon *et al.* 1998). In der vorliegenden Arbeit sollten Probleme, die in Folge der Integration von *rol*-Genen entstehen können, umgangen werden. Im Rahmen einer Kooperation mit dem John Innes Centre Norwich (Großbritannien) bestand die Möglichkeit einer particle bombardment-Transformation ohne den Einsatz von Agrobakterien. Diese direkte Transformationsmethode wurde bereits mit *N. tabacum*-Blättern (Leech *et al.* 1998; Rocha *et al.* 2002), *C. roseus*-Blättern (Hilliou *et al.* 1999) und *H. muticus*-Blättern (Zeef *et al.* 2000) erfolgreich durchgeführt. Bis zu diesem Zeitpunkt (1999) gab es jedoch noch keine Erfahrungen mit *S. tuberosum*.

Auf Grund der hohen Auslastung der particle gun stand für die Transformation nur eine begrenzte Anzahl (150) bombardments zur Verfügung. Mit der *A. belladonna pmt* in *sense*- und *antisense*-Orientierung, der *S. tuberosum trII* in *sense*- und *antisense*-Orientierung und dem Leerplasmid pBI121 wurden jeweils 30 bombardments durchgeführt. Aus diesen ergab sich eine große Anzahl von Kalli (Tab. C-1), da sich aus einem bombardierten Blattstück oft mehrere unabhängige Kalli bildeten. Aus ca. 20% der Kalli konnten während der Regeneration Pflanzen gebildet werden (C 3.1). Bringt man die Anzahl von regenerierten Pflanzen (63) mit der Anzahl von bombardments (150) ins Verhältnis, so lässt sich feststellen, dass etwa jedes 2. bombardment zu einer regenerierten Pflanzenlinie führte.

D 2.3 Die Morphologie der Transformanden

Nicht alle *in vitro* Pflanzenlinien konnten untersucht werden, da sie im Laufe der Experimente auf Grund von Wachstumsstörungen verstarben (C 3.2).

Als Ursache könnte ein verschobenes Polyamingleichgewicht in den PMT-transformierten Pflanzen gesehen werden. Nach Transformation der *S. tuberosum S*-Adenosyl-L-methionindecaboxylase (SAMDC) in *antisense* Orientierung konnte ein Zusammenhang zwischen verminderten Spermidin- und Sperminmengen in den transgenen Kartoffelpflanzen und den in dieser Arbeit beobachteten morphologischen Effekten hergestellt werden (Kumar *et al.* 1996). Ähnliche Beobachtungen

wurden auch nach *antisense*-Transformation der Sperminsynthase aus *A. thaliana* gemacht. Als Ursache für gehemmtes Internodienwachstum wurden die niedrigen Sperminkonzentrationen in Folge der Transformation gesehen (Hanzawa *et al.* 2000). Beide Transformationen zeigten, dass Polyamine eine essentielle Rolle beim Wachstum von pflanzlichen Zellen spielen können. Die Polyaminmessungen (C 3.5) dieser Arbeit zeigten aber sowohl in den *pmt-sense* als auch in den *pmt-antisense* Pflanzenlinien ähnliche Spermidin- und Sperminwerte (G 3). Dies galt auch für untransformierte Pflanzen. Somit ist kein direkter Zusammenhang zwischen den Mengen dieser beiden Polyamine und der Morphologie der regenerierten Pflanzen erkennbar.

In den Polyaminmessungen (C 3.5) konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Putrescinwerte in den *pmt-antisense* Pflanzenlinien (G 3) erhöht waren. Diese Erhöhung allein könnte auch zu morphologischen Veränderungen der Pflanzen geführt haben. Dies zeigte eine Transformation der *Avena sativa* Arginindecarboxylase (ADC) in *N. tabacum* (Masgrau *et al.* 1997). Bei dieser konnten nach induzierter Expression der ADC erhöhte Putrescinwerte festgestellt werden. Diese korrelierten ebenfalls mit den gleichen Veränderungen im Phänotyp (C 3.2). Da aber bei den *pmt-sense*-Pflanzen und Vektorkontrollpflanzen die gleichen morphologischen Effekte festgestellt wurden (G 3), diese aber viel niedrigere Putrescinwerte als die *pmt-antisense* Pflanzen aufwiesen, ist ein Zusammenhang zwischen Putrescinkonzentration und Morphologie nicht festzustellen.

Die gleichen morphologischen Veränderungen wurden auch bei Transformationen mit Enzymen beobachtet, die sich nicht mit der Polyaminbiosynthese beschäftigten. Eine *A. rhizogenes*-Transformation der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase (H6H) mit *Duboisia*-Hybrid-Blättern (*Duboisia myoporoides* X *Duboisia leichhardii*) und anschließender Pflanzenregeneration führte ebenfalls zu einem stark veränderten Phänotyp, mit den gleichen Merkmalen, wie in dieser Arbeit beschrieben (Palazon *et al.* 2003). Die Ursache für die vorliegenden Veränderungen wurde in der Expression von *rol*-Genen des Ri-Plasmids von *A. rhizogenes* gesehen, die für diese Transformation eingesetzt wurden (Tepfer 1984). Dieser Effekt kann bei einer particle bombardment-Transformation ausgeschlossen werden. Bei dem verwendeten Transformationsplasmid pBI 121 (Clontech) handelt es sich um einen binären Vektor, der keine *rol*-Gene enthält. Innerhalb

der T-DNA werden lediglich die Kanamycinresistenz, der 35S-Promotor und die zu transformierende DNA übertragen (B 1.3).

Vielmehr ist zu vermuten, dass die Wachstumsstörungen Folge des Einsatzes von Photohormonen während der Regenerationsphase waren. Cytokinine wie Zeatin, Zeatinriboside, Isopentenyladenin und Isopentenyladenosin können einen Einfluss auf die Morphologie von *in vitro* Kartoffelpflanzen haben. Dies konnte durch die Expression des Schlüsselenzyms der Cytokininbiosynthese, die Isopentenyltransferase (*ipt*) aus *Agrobacterium tumefaciens*, in Kartoffelpflanzen gezeigt werden (Machackova *et al.* 1997). Eine stark erhöhte Cytokininkonzentration in den transgenen Kartoffelpflanzen hatte ähnliche morphologische Veränderung zur Folge. Durch die langen Inkubationszeiten der Kalli auf Sprossinduktionsmedium (B 2.2.13.2) sind ebenfalls hohe Cytokininkonzentrationen in den regenerierten Pflanzen zu vermuten. Der Einfluss dieser Substanzen auf die Morphologie wurde besonders deutlich bei Pflanzen, die sich erst nach mehreren Monaten entwickelten. Sehr wenige Pflanzen, die sich schon nach 6 Wochen bildeten, zeigten im Gegensatz dazu keine morphologischen Auffälligkeiten. Die große Mehrheit der Pflanzen entwickelte sich jedoch erst nach 4 - 6 Monaten Sprossinduktion. Nach Sprossinduktion wurden die Pflanzen auf Hormon-freies Medium umgesetzt. Morphologische Veränderungen hatten aber weiterhin Bestand.

D 2.4 Die Transformationsrate

Alle regenerierten Pflanzenlinien waren Kanamycin-resistent und zeigten die Integration von Transfer-DNA (T-DNA) (C 3.3).

Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Transformation ist aber nicht nur eine hohe Integrationsrate der T-DNA, sondern die Expression von exogener T-DNA oder Hemmung der Expression endogener DNA. Um die Transgenität der Pflanzenlinien zu untersuchen, wurden Transkriptuntersuchungen durchgeführt (C 3.4). Diese ergaben für die *pmt*- und *trII-sense* Linien keine erhöhten Transkriptmengen in Blättern. *pmt-antisense* Linien konnten nicht untersucht werden, da entsprechendes Kartoffelknollenmaterial nicht zur Verfügung stand. *trII-antisense* Linien zeigten ähnliche Transkriptmengen in den Wurzeln, mit Ausnahme der Pflanzenlinie TRIIAS 39, welche eine

erhöhte *trII*-Transkriptmenge aufwies (C 3.4). Für die Untersuchung von *trII-antisense* Linien wurde eine doppelsträngige cDNA-Sonde verwendet, die möglicherweise *trII-antisense*-RNA mit detektiert hat. Für eine spezifischere Hybridisierung wäre eine einzelsträngige cDNA-Sonde (Condon 1999) günstiger gewesen.

Weiterhin wurden Polyaminmessungen in den *pmt*-transformierten Linien (C 3.5) und Intermediatmessungen (C 3.6) in den *trII*-transformierten Linien durchgeführt. Diese bestätigten die Ergebnisse aus der Transkriptuntersuchung. Zusammenfassend kann deshalb festgestellt, dass Fremd-DNA in das Genom der Kartoffelpflanzen integriert wurde, dass eine Expression exogener DNA oder Hemmung der Expression endogener DNA nicht nachgewiesen werden konnte. Die Ursachen dafür können vielfältig sein und sind nur ansatzweise aufgeklärt.

Essentiell für eine erfolgreiche Transformation ist der korrekte Einbau der verwendeten cDNA in den Pflanzenexpressionsvektor. Dies wurde durch mehrfache Sequenzierungen belegt. Konstruktfehler im Plasmid können somit ausgeschlossen werden. Vielmehr sind die Ursachen für die schlechten Transformationsraten in der eigentlichen Transformationsmethode zu sehen.

Bei einer particle bombardment-Transformation geht man von einer 2-phasigen Integration der T-DNA aus, bei der es zunächst zu einer extrachromosomalen Multimerbildung durch Ligation und Neuordnung kommt. Anschließend kommt es zur Integration in das Pflanzengenom, wobei das Multimer als eine Einheit integriert wird (Kohli *et al.* 1998; Kohli *et al.* 1999). Bis zu diesem Schritt kann es jedoch zu Veränderungen innerhalb der Fremd-DNA kommen, die eine Expression verhindern können.

So kann es zu Mutationen und Deletionen nach der Penetration der Fremd-DNA in die Pflanzenzelle kommen. Die Übertragung der Fremd-DNA erfolgt bei particle bombardment-Transformationen mit Hilfe von Goldpartikeln. In Folge der Verletzung von Pflanzenzellen kann es zur Aktivierung einer ganzen Enzymkaskade kommen, die für die Reparatur endogener DNA, aber auch für den Abbau exogener DNA (Nukleasen) verantwortlich ist (Lippincott *et al.* 1969; Hunold *et al.* 1994).

Auch während der Bildung von Multimeren können Mutationen auftreten. So kann die Fremd-DNA vollständig, zum Teil aber auch unvollständig oder invers in das Multimer integriert werden (Gheysen *et al.* 1991; Mayerhofer *et al.* 1991; Gorbunova *et al.* 1997).

Nach der Multimerbildung wird die Fremd-DNA in das Pflanzengenom integriert. Die Integration kann abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanzenzelle sein. Bei einer Agrobakterium-Transformation von *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass die Fremd-DNA in transkriptionell aktive Regionen des Genoms während der S-Phase des Zellzyklusses integriert wurde (Coates *et al.* 1987; Koncz *et al.* 1989; Herman *et al.* 1990). Allerdings wurde auch festgestellt, dass die Transformationsraten von particle bombardment-Transformationen in der M- und G₂-Phase des Zellzyklusses höher waren, als in der S-Phase (Iida *et al.* 1991), was darauf hinweisen könnte, dass eine entspannte Konformation des Chromatins während der S-Phase für die Integration von Fremd-DNA nicht unbedingt erforderlich ist.

Zum anderen kann es bei Transformationen auch während (Meyer *et al.* 1993; Park *et al.* 1996) und nach (Baulcombe *et al.* 1996; Baulcombe 1996) der Transkription zu Suppressionseffekten kommen. Bei Leech und Mitarbeitern wurde z.B. von einer 100%igen Co-Integration zweier aufeinanderfolgender Gene durch particle bombardment-Transformation berichtet, bei der 26% der regenerierten *N. tabacum*-Pflanzen keines der beiden Gene exprimierten, 41% der Pflanzen nur ein Gen und nur 33% der Pflanzen beide Gene exprimierten. Suppressionseffekte nach der Transkription wurden als Ursache für die Transformationsergebnisse gesehen (Leech *et al.* 1998).

Die Effektivität einer Transformation wird durch die Transformationsrate beschrieben. Sie kann von Pflanzenart zu Pflanzenart stark variieren. Bei einer particle bombardment-Transformation mit *H. muticus*-Blättern wurde eine Transformationsrate von 10% erreicht (Zeef *et al.* 2000). Eine particle bombardment-Transformation von unreifen *Oryza sativa*-Embryos zweier Reis-Sorten führte zu Transformationsraten von 3,8% und 4,2% (Tinjuangjun *et al.* 2000), während eine particle bombardment-Transformation von *Phaseolus vulgaris*-Embryos eine Transformationsrate von 3% zum Ergebnis hatte (Russell *et al.* 1993). Eine particle bombardment-Transformation von unreifen *Triticum aestivum*-Embryos ergab zudem

Transformationsraten von 1,2%; 1,4% und 0,4% für drei verschiedene Sorten (Rasco-Gaunt *et al.* 1999).

Zum Schluss soll noch auf eine erfolgreiche, später publizierte particle bombardment-Transformationen mit verschiedenen Kartoffelgeweben eingegangen werden. Bei dieser wurde das Neomycinphosphotransferase-Gen (*nptII*) transformiert (Romano *et al.* 2001). 413 bombardments wurden mit Kartoffelscheiben, 1462 mit Internodien und 157 mit Blättern durchgeführt, bei denen Transformationsraten von 4%, 31% und 2% erreicht wurden. Diese bezogen sich allerdings nur auf die Kanamycinresistenz der regenerierten Pflanzen.

Eine Transformation von Internodien (180) und dem β -Glucuronidase-Reportergen (GUS-Gen) ergab eine Transformationsrate von 7% bezogen auf einen positiven GUS-Test der regenerierten Pflanzen. Die Ergebnisse von Romano und Mitarbeitern verdeutlichen, dass für eine erfolgreiche particle bombardment-Transformation von *S. tuberosum* auch eine entsprechende Anzahl von bombardments notwendig ist, um nur ein einzelnes Gen zu exprimieren. Die Aufteilung der in dieser Arbeit möglichen 150 bombardments in 5 unterschiedliche Konstrukte (C 3.1) erwies sich deshalb im Nachhinein als ungünstig. Eine particle bombardment-Transformation von Internodien scheint überlegenswert, da mit diesem Gewebe höhere Transformationsraten erreicht wurden als mit Blättern (Romano *et al.* 2001).

D 2.5 Die Transformationsergebnisse im Vergleich

In der Vergangenheit beschäftigten sich zahlreiche Untersuchungen mit dem Einfluss der PMT-Expression auf die Nicotin- und Tropanesteralkaloidbiosynthese. Dazu wurden verschiedene Transformationsexperimente mit alkaloidbildenden Pflanzen durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse waren sehr heterogen.

Am Beispiel der Transformation von *N. sylvestris* und *A. belladonna* mit der *N. tabacum* pmt wurden erste Unterschiede deutlich. Hohe pmt-Transkriptmengen in Wurzeln und erhöhte *N*-Methylputrescinnmengen in den Blättern konnten bei beiden Pflanzenarten festgestellt werden. Während bei transgenen *N. sylvestris*-Pflanzen eine Steigerung der Nicotinkonzentration in Blättern um 40% beobachtet wurde, konnte bei transgenen *A. belladonna*-Pflanzen keine Erhöhung der Hyoscyaminkonzentration in Blättern festgestellt werden (Sato *et al.* 2001).

Weitere Transformationen mit Tropanalkaloid-produzierenden Pflanzen verstärken den Eindruck, dass die PMT einen unterschiedlichen Einfluss auf die Alkaloidbiosynthesen besitzt. Mit einer *Duboisia*-Hybrid-Pflanze (*D. myoporoides* X *D. leichhardii*) wurden ebenfalls Transformationen mit *N. tabacum pmt* durchgeführt, die transgene Wurzelkulturen zum Ergebnis hatten. Diese zeigten auch erhöhte *pmt*-Transkriptmengen und *N*-Methylputrescinkonzentrationen in Wurzeln, aber keine Erhöhung der Tropanesteralkaloidkonzentration (Moyano *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu führten Transformationen von *Datura metel* und *Hyoscyamus muticus* mit *N. tabacum pmt* zu transgenen Wurzelkulturen mit erhöhtem Hyoscyamin- und Scopolamingehalt. Aussagen zum Gehalt von *N*-Methylputrescin wurden nicht getroffen (Moyano *et al.* 2003).

In den Transformationen wurden nur Nicotin und die klassischen Tropanesteralkaloide untersucht. Calystegine, die in *A. belladonna* (Rothe *et al.* 2002), *Duboisia*- und *Datura*-Arten (Nash *et al.* 1993; Draeger *et al.* 1995; Asano *et al.* 2001b) und *H. muticus* (Sevon *et al.* 1997; Asano *et al.* 2001b) ebenfalls zu finden sind, wurden nicht gemessen. Calysteginmessungen wurden bisher nur in transgenen *A. belladonna*-Pflanzen durchgeführt (Rothe *et al.* 2003). Auch diese wurden mit der *N. tabacum pmt* transformiert (Sato *et al.* 2001). Transgene *A. belladonna*-Pflanzen zeigten in den Wurzeln einen 1,3- bis 3,3fachen Anstieg des *pmt*-Transkriptes im Vergleich zu Wurzeln von Wildtyp-Pflanzen. Die *N*-Methylputrescinkonzentration betrug in den Blättern 0,9 bis 2,6 nmol/g Trockenmasse, während in Blättern von Wildtyp-Pflanzen kein *N*-Methylputrescin zu detektieren war. Die Hyoscyamin- und Scopolaminkonzentration, wie auch die Konzentration der Calystegine blieb unverändert. Untersucht wurden Wurzeln, Stengel, junge und alte Blätter.

Anhand dieser Veröffentlichungen ist zu erkennen, dass die PMT für die Nicotinbiosynthese ein Schlüsselenzym ist. Für Tropanalkaloid-produzierende Pflanzen ist die PMT aber nicht allein entscheidend. Nachfolgende Biosyntheseschritte könnten regulierend sein. Eine wichtige Funktion könnte die *N*-Methylputrescinoxidase (MPO) besitzen (Hashimoto *et al.* 1990). Erhöhte *N*-Methylputrescinnmengen in Folge einer *pmt*-Transformation könnten zu einer Substrathemmung der MPO führen und den metabolischen Fluss unterbrechen (A 2.3). Eine Hemmung der ADC und PMT durch *N*-Methylputrescin wurde bereits belegt

(Robins *et al.* 1991). Eine Wiederholung der *pmt-sense*-Transformation scheint deshalb wenig sinnvoll.

Eine *pmt-antisense*-Transformation mit veränderten Plasmiden wäre denkbar. Die Transformation könnte in Anlehnung an Stepphuhn und Mitarbeiter erfolgen (Steppuhn *et al.* 2004). Bei dieser wurde *N. attenuata* mit *N. tabacum pmt* in *inverser*- und *antisense*-Orientierung transformiert. Durch Transformation mit *inverser N. tabacum pmt* konnte die *pmt*-Transkriptmenge in transgenen *N. attenuata*-Pflanzen auf 10% und die Nicotinkonzentration auf 3 - 4% gegenüber dem Wildtyp gesenkt werden, während die Transformation mit *antisense N. tabacum pmt* erfolglos war. Durch Verringerung oder Blockierung der PMT-Aktivität könnte die Funktion (D 2.1) der PMT innerhalb der Calysteginbiosynthese weiter aufgeklärt werden.

D 3 Die PMT in *Solanum tuberosum*

Nach Detektion von *N*-Methylputrescin in Kartoffelknollengewebe (C 1.2) wurde die spezifische PMT-Aktivität in diesen Geweben gemessen (C 4.1).

In 1 mm langen Kartoffelkeimen betrug die spezifische PMT-Aktivität 20 pkat/mg Protein. Diese war vergleichbar mit Messungen von *H. niger*-Wurzeln (35 pkat/mg Protein), *H. albus*-Wurzelkultur (29 pkat/mg Protein) (Hibi *et al.* 1992; Hibi *et al.* 1994), *N. tabacum*-Wurzeln (35 pkat/mg Protein) (Feth *et al.* 1989) und *N. tabacum*-Wurzelkultur (10 - 20 pkat/mg Protein) (Hibi *et al.* 1994).

Aus 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen wurde im Anschluss Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe der RT-PCR und degenerierten Primern ein erstes *pmt*-homologes Fragment (750 bp) amplifiziert. Zur Vervollständigung dieses Fragmentes wurde eine 3'- und 5'-RACE-PCR durchgeführt, welche 2 unterschiedlich lange *pmt*-homologe cDNA-Klone *pmt1* (1335 bp) und *pmt2* (1255 bp) zum Ergebnis hatte.

Auf der Suche nach weiteren *pmt*-Klonen wurde eine cDNA-Bank aus mRNA von 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen hergestellt und gescreent. Das Primärscreening ergab eine große Anzahl (115) von positiven Klonen, bei denen sich im weiteren Verlauf des Screenings herausstellte, dass ein Großteil der Klone Homologien zu *spds* zeigte oder zu cDNA, die für diese Arbeit irrelevant waren. Ein Sequenzvergleich zwischen

dem bereits gefundenen *pmt*-homologen cDNA-Fragment (750 bp) und dem längsten *spds*-homologen cDNA-Klon (am 5'Ende noch unvollständig) ergab eine Homologie von 70% (Identität). Nach Vergleich beider Sequenzen mit dem "Dot Plot"-Verfahren (Omega 2,0 Software) musste festgestellt werden, dass innerhalb des *pmt*-homologen cDNA-Fragmentes keine Abschnitte zu finden waren, bei denen die Homologie über einen größeren Bereich wesentlich unter 70% Identität lag. Somit konnte weder das komplette *pmt*-homologe cDNA-Fragment (750 bp), noch Teile davon für ein cDNA-Bank-Screening verwendet werden.

Mit Hilfe der RT-PCR gelang es später den längsten der *spds*-homologen cDNA-Klone zu vervollständigen (1347 bp).

D 3.1 Die PMT-Sequenz im Vergleich

Die *Solanum tuberosum* PMT (AJ605553) zeigte die höchsten Homologien zu PMT, die Teil der Nicotin- oder Tropanesterbiosynthese sind, wie *Nicotiana tabacum* PMT (Hibi *et al.* 1994), *Nicotiana glauca* PMT (Riechers *et al.* 1999), *Atropa belladonna* PMT und *Hyoscyamus niger* PMT (Suzuki *et al.* 1999a).

Homologien bestanden aber auch zu Spermidinsynthasen, wie *Datura stramonium*-SPDS (Y08252) und *Coffea arabica*-SPDS (Hatanaka *et al.* 1999). Zur *Solanum tuberosum* SPDS (AJ345003) bestand eine Homologie von 57% (Identität). Die hohe Homologie zwischen PMT und SPDS resultiert aus einer engen Verwandtschaft beider Enzyme zueinander. Dabei wird angenommen, dass sich die PMT im Laufe der Evolution aus dem Primärstoffenzym SPDS entwickelt hat (Hashimoto *et al.* 1998b). Die Umwandlung von einem Primärstoff- zu einem Sekundärstoffenzym wurde auch bei der Homospermidinsynthase (HSS) festgestellt, die sich aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS) bildete (Ober *et al.* 1999; Ober *et al.* 2000).

Zu anderen pflanzlichen *N*-Methyltransferasen ist die PMT aus *Solanum tuberosum* nur begrenzt homolog. Dies wurde durch einen Homologievergleich mit der Coclaurin-*N*-methyltransferase aus *Coptis japonica* (Choi *et al.* 2002), Xanthin-*N*-methyltransferase aus *Coffea arabica* (Uefuji *et al.* 2003) oder β -Alanin-*N*-methyltransferase aus *Limonium latifolium* (Raman *et al.* 2003) deutlich (Tab. C-2).

SAM-abhängige Methyltransferasen teilen oft nur geringe Sequenz-ähnlichkeiten, vielmehr haben sie ein ähnliches Proteinfaltungsmuster, bei denen sich α -Helices mit β -Faltblättern abwechseln. Jede Methyltransferase bindet dabei SAM an equivalenter Stelle innerhalb der Proteinstruktur. Die Substratbindungsstellen der Methyltransferasen variieren dagegen stark (Martin *et al.* 2002). Dies könnte die geringe Homologie der *S. tuberosum* PMT zu anderen *N*-Methyltransferasen trotz ähnlicher Funktion erklären.

D 3.2 Die PMT-Sequenzeigenschaften

Die Funktionalität beider *pmt*-Klone und des *spds*-Klons konnte durch heterologe Expression in *E. coli* belegt werden. Im Gegensatz zum *pmt1*-Klon war der *pmt2*-Klon unlöslich und zeigte keine Aktivität. Beide Klone [*pmt1* (1335 bp) und *pmt2* (1255 bp)] unterschieden sich im Wesentlichen in der Länge des nichtkodierenden Bereichs. Im kodierenden Bereich (1023 bp) waren 8 Nukleotide unterschiedlich. Beide cDNA-Klone kodierten für Proteine (jeweils 340 Aminosäuren), die sich in 4 Aminosäuren unterschieden (C 6.1).

Der erste Unterschied zwischen den PMT-Klonen in Position 12, ein Austausch von Threonin (T) durch Alanin (A), hatte vermutlich keinen größeren Einfluss auf die Löslichkeit, da sich die Stelle am Anfang des Proteins befand und wahrscheinlich nicht zu einer Konformationsänderung des gesamten Proteins führte.

Weiterhin wurden unterschiedliche Aminosäuren in Position 163 festgestellt. Dabei war Valin (V) durch Isoleucin (I) ersetzt. Beide aliphatischen Aminosäuren differieren nur in einer Methylgruppe und besitzen ähnliche Eigenschaften. Deshalb sollte es auch an dieser Stelle nicht zu einer Änderung der Struktur des Proteins gekommen sein.

Ein weiterer Unterschied in den Sequenzen wurde in Position 191 festgestellt. Wie in Position 12 erfolgte ein Austausch von Alanin (A) durch Threonin (T). Beide aliphatischen Aminosäuren unterscheiden sich ebenfalls in einer Methylgruppe. Zusätzlich enthält Threonin aber noch eine Hydroxylgruppe, welche dem Molekül hydrophile Eigenschaften verleiht. Mit dieser Hydroxylgruppe könnte Threonin im Gegensatz zu Alanin kovalente Bindungen zu Acetylgruppen anderer Aminosäuren ausbilden und damit die Struktur variieren.

Am wichtigsten scheint der Sequenzunterschied in Position 287, bei dem Serin (S) durch Prolin (P) ausgetauscht war. Eine aliphatische, hydrophobe Aminosäure wurde dabei durch eine heterocyclische, hydrophile Aminosäure ersetzt. Dieser Austausch könnte zu einer Konformationsänderung des Proteins beigetragen haben, da Prolin zudem in cis und trans-isomerer Form vorliegen kann und bekanntlich die Proteinstruktur steuert. Gestützt wird diese Vermutung durch heterologe Expression der löslichen Chimäre SH (C 7.3), bei der der c-terminale Teil der *Solanum tuberosum* PMT2 ab Arginin (R) in Position 168 durch *Hyoscyamus niger* PMT ersetzt wurde. Dieser Versuch war ein Vorversuch, um abzuklären, welcher Bereich des Proteins für die Unlöslichkeit verantwortlich ist. Eine Punktmutation in Position 191 oder 287 könnte die Frage der Löslichkeit abschließend klären.

Konservierte Aminosäuren, die typisch für PMT und SPDS sind, konnten ebenfalls identifiziert werden (Hashimoto *et al.* 1998b; Suzuki *et al.* 1999a). Innerhalb der konservierten Aminosäuren nimmt Isoleucin (I) in Position 137 eine Schlüsselposition ein. Es ist für die Bindung des Aminopropylrestes von SAM verantwortlich. Bei SPDS müsste die Bindungstasche schmaler sein, durch die fehlende Carboxylgruppe des dcSAM (Korolev *et al.* 2002). An korrespondierender Stelle findet man bei den meisten SPDS Asparaginsäure (D). Außerdem findet man in Motiv I (Posfai *et al.* 1989) die Glycinreiche SAM-Bindungsstelle (G-Loop) SAM-abhängiger Methyltransferasen (Schluckebier *et al.* 1995). Zusätzlich konnte auch die katalytische Domäne (P-Loop) (Schluckebier *et al.* 1995; Malone *et al.* 1995) identifiziert werden. In dem Bereich zwischen Asparaginsäure (D) [Pos. 207] und Lysin (K) [Pos. 216] befindet sich die Putrescinbindungsstelle. Asparaginsäure (D) in Position 207 hat dabei die Funktion eines Wasserstoffakzeptors, der an einer der Aminogruppen des Putrescins angreift und diese deprotoniert. Zusammen mit Serin (S) [Pos. 208] und Tyrosin (Y) (Pos. 112) ist sie außerdem für die korrekte Ausrichtung des Putrescins im Protein verantwortlich (Korolev *et al.* 2002).

D 3.3 Die PMT-Proteineigenschaften

Die PMT ist ein sehr spezifisches Enzym. Substratanaloga wie n-Butylamin, 1,5-Diaminopentan, 1,6-Diaminohexan, 1,7-Diaminoheptan und Spermidin wurden nicht umgesetzt. Die PMT reagierte auch nicht mit dcSAM dem Co-Substrat der Spermidinsynthese. Eine Bindung der Substratanaloga wird vermutet, da in Hemmversuche die spezifische Aktivität der PMT reduziert war. Die Hemmung erfolgte in Abhängigkeit von der Molekülgröße. Kurzkettige Moleküle wie n-Butylamin, 1,5-Diaminopentan hemmten die spezifische Aktivität der PMT stärker als längerkettige Moleküle wie 1,6-Diaminohexan, 1,7-Diaminoheptan und Spermidin (Tab. C-4).

Die Bestimmung der Substratbindung ergab einen K_m -Wert von 257 μM . Der K_m -Wert für Putrescin lag in der gleichen Größenordnung wie der von PMT aus *N. tabacum* (400 μM), *H. albus* (277 μM) und *D. stramonium* (310 μM) (Mizusaki et al. 1971; Hibi et al. 1992; Walton et al. 1994). Im Vergleich dazu ist die Affinität zu Putrescin bei SPDS ca. 10fach stärker ausgeprägt. Dies belegen K_m -Wert-Bestimmungen für Putrescin von SPDS aus *Brassica pekinensis* (32 μM), *Glycine max* (30 μM) und *Senecio vulgaris* (21 μM) (Sindhu et al. 1984; Graser et al. 2000; Yoon et al. 2000).

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) der PMT lag bei 2,43 nkat/mg Protein. Im Vergleich zum V_{\max} -Wert der Tropinonreduktase II aus *S. tuberosum* für die Umsetzung von Tropinon (72 nkat/mg Protein) und V_{\max} -Wert der Nukleotidpyrophosphatase aus *S. tuberosum* für die Reaktion mit ATP (722 nkat/mg Protein) war dieser relativ niedrig (Bartkiewicz et al. 1984; Keiner et al. 2002).

Die Umsetzung erfolgte bei einem pH-Wert von 9,0. In Anlehnung an frühere Arbeiten (Hibi et al. 1992; Walton et al. 1994) stellte sich dieser pH-Wert als Optimum für die N-Methylierung des Putrescins heraus. Dieser unphysiologische pH-Wert ist ein Hinweis darauf, dass Putrescin in deprotonierter Form umgesetzt wird. Aminosäuren die innerhalb der PMT für die Deprotonierung verantwortlich sein könnten (D 3.2), wurden durch Korolev und Mitarbeiter benannt (Korolev et al. 2002).

D 3.4 Die PMT ist Bestandteil der Calysteginbiosynthese

Calystegine wurden in allen Geweben der Kartoffelpflanze gefunden. Die größten Calysteginmengen wurden jedoch in Geweben keimender Kartoffelknollen detektiert (Keiner *et al.* 2000). Fütterungsversuche mit ^{14}C -markiertem Putrescin an *Calystegia sepium*-Wurzelkulturen zeigten eine Integration der Markierung in Calystegine (Goldmann *et al.* 1990). Der Einbau dieser Markierung ist Beleg dafür, dass Putrescin Ausgangsstoff für Calystegine ist. Wenn Calystegine denselben Ursprung haben wie Nicotin und die klassischen Tropanesteralkaloide, sollten auch die gleichen Enzyme in die Biosynthese involviert sein. Das erste spezifische Enzym der Nicotin- und Tropanalkaloidbiosynthese beim Übergang vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel ist die PMT.

Die Messung einer PMT-Aktivität in 1 mm langen Kartoffelkeimen sowie die Detektion von *N*-Methylputrescin, dem Reaktionsprodukt der PMT, in Kartoffelaugen zu Beginn der Keimung und in 1 mm langen Kartoffelkeimen belegen den ersten Schritt der klassischen Tropanalkaloidbiosynthese. Während Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin in allen Geweben zu finden waren, konnte *N*-Methylputrescin ausschließlich nur in den Augen und Keimen von Kartoffelknollen, den Geweben mit der höchsten Calysteginakkumulation detektiert werden.

Die Klonierung einer *pmt*-cDNA aus diesen Geweben und Beleg der Funktionalität festigten die Abstammung der Calystegine aus dem Tropanalkaloidstoffwechsel. Die Lokalisation von *pmt*-Transkript in Kartoffelaugen zu Beginn der Keimung und in 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen unterstützen die Aktivitätsmessungen. *spds*-Transkript wurde im Gegensatz dazu in jedem Gewebe gefunden.

Durch PMT-Aktivitätsmessungen, Detektion von *N*-Methylputrescin, Klonierung und Expression einer *pmt* in Kartoffel werden alternative Wege der Biosynthese von Calysteginen ohne *N*-Methylierung (A 2.3) unwahrscheinlich (Hashimoto *et al.* 1990; Asano *et al.* 1997b). Die Calysteginbiosynthese schließt somit eine *N*-Methylierung des Putrescins ein und eine *N*-Demethylierung im weiteren Verlauf der Biosynthese muss postuliert werden.

Nach *N*-Methylierung des Putrescins folgt eine Oxidation zum 4-Methylaminobutanal (MPO). Über ein *N*-Methyl- Δ^1 -pyrroliniumkation kommt es dann zur Bildung von Tropinon. Durch Beleg einer TRII in Kartoffel (Keiner *et al.* 2002) wird die Bildung von Calysteginen über das *N*-Methyl- Δ^1 -pyrroliniumkation und Tropinon gestützt. Nach Reduktion zu Pseudotropin werden eine *N*-Demethylierung am Stickstoffbrückenatom und mehrere Hydroxylierungen vermutet. Enzyme, die für diese Reaktionen verantwortlich sind, bedürfen noch weiterer Aufklärung und sind Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeit.

D 4 Ausblick

Durch Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich weitere Möglichkeiten zur Untersuchung der Calysteginbiosynthese in *Solanum tuberosum*. Grundlagen zur Aufklärung der Proteineigenschaften von PMT und SPDS wurden geschaffen.

- Untersuchungen zur Calysteginbiosynthese

Mit Hilfe der gereinigten PMT könnte ^{13}C - oder ^{14}C -markiertes SAM in einem Assay in ^{13}C - oder ^{14}C -markiertes *N*-Methylputrescin umgewandelt werden. Nach einer präparativen Reinigung mittels HPLC könnte dieses in Fütterungsversuchen zum Einsatz kommen. Durch Analyse mit GC-MS könnte die Demethylierung des Pseudotropins weiter aufgeklärt werden.

Mit spezifischen Antikörpern gegen PMT und SPDS könnte ein immunohistochemischer Nachweis durchgeführt werden, um die Lokalisation von PMT und SPDS innerhalb der Zellschichten aufzuklären (Hibi *et al.* 1994; Suzuki *et al.* 1999a). Die zellspezifische Lokalisation der Enzyme ist Grundlage für Untersuchungen von Transportvorgängen der Intermediate zwischen den Zellschichten.

- PMT- und SPDS-Enzymeigenschaften

Weitere *pmt* und *spds* aus Solanaceen, Convolvulaceen und anderen Familien könnten isoliert werden. Nach heterologer Expression in *E. coli* könnten Sequenz- und Proteineigenschaften verglichen werden. Mit Hilfe zusätzlicher Sequenzen ließen sich genauere Aussagen über den evolutionären Ursprung der jeweiligen *pmt* treffen.

Mit einer gerichteten Mutagenese an den Substratbindungsstellen von PMT und SPDS könnte die Funktion einzelner Aminosäuren näher

beschrieben werden. Mögliche Aminosäuren wurden durch Hashimoto und Mitarbeiter benannt (Hashimoto *et al.* 1998b). Die Charakterisierung der rekombinanten Proteine könnte katalytische Eigenschaften aufklären.

Durch Kristallisation der Proteine mit anschließender Röntgenstrukturanalyse könnte die Substratbindungsstelle und das aktive Zentrum bestimmt werden. Dies könnte dazu beitragen den Reaktionsmechanismus der *N*-Methylierung und *N*-Aminopropylierung von Putrescin aufzuklären. Durch (Korolev *et al.* 2002) wurden Möglichkeiten einer Kristallisation aufgezeigt.

E Zusammenfassung

Calystegine sind selektive Glukosidase-Inhibitoren. Auf Grund dieser biologischen Aktivität könnten sie therapeutisches Potential bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 besitzen. Ein Einsatz in der Krebstherapie und als Virusstatikum wäre ebenfalls denkbar. Die Aufklärung der Biosynthese ist von zentralem Interesse und könnte dazu beitragen, die Gewinnung dieser Verbindungen zu verbessern.

Die *N*-Methylierung des Putrescins als erste spezifische Reaktion der Calysteginbiosynthese war Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

- Mit Hilfe des AMD 2 System (Camag) wurde ein Verfahren zum schnellen und preiswerten Screening von Polyaminen in Pflanzengewebe entwickelt. Eine Messung der Polyamine mit HPLC wurde etabliert, mit der Polyamine bis zu einer Messgrenze von 0,5 ng pro Injektion detektiert werden konnten.
- *N*-Methylputrescin wurde mit einer Gesamtkonzentration von 1,05 µmol/g TM in Kartoffelaugen, deren Dormanz gebrochen war und 0,75 µmol/g TM in Kartoffelkeimen mit einer Länge von 1 mm gemessen. Putrescin, Spermidin und Spermin konnte in allen Geweben detektiert werden. Die Detektion von *N*-Methylputrescin war ein erster Beleg für eine aktive Putrescin-*N*-methyltransferase.
- Durch Transformation mit der particle bombardment-Technologie wurden erstmals Kartoffelblätter mit *pmt* und *trII* transformiert. In den regenerierten Kartoffelpflanzen konnte DNA des verwendeten Pflanzenexpressionsplasmides nachgewiesen werden. Die Pflanzen waren jedoch nicht transgen. Eine Messung von *N*-Methylputrescin war nicht möglich, da keine keimenden Kartoffelknollen gezogen werden konnten. Die Messung von Intermediaten der Calysteginbiosynthese ergab keine Unterschiede in den Transformanten.
- Die Existenz einer PMT in Kartoffel konnte durch PMT-Aktivitätsmessungen in unterschiedlichen Kartoffelgeweben belegt werden. 1 mm lange Kartoffelkeime zeigten eine spezifische Aktivität von 20 pkat/mg Protein.
- Mit degenerierten Primern aus bekannten *pmt*-cDNA-Sequenzen wurde durch RT-PCR ein erstes *pmt*-homologes Fragment gefunden. Nach 3´-

und 5'-RACE-PCR konnten zwei vollständige *pmt*-homologe cDNA-Klone isoliert werden. Aus Gesamt-RNA von 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen wurde eine cDNA-Bank hergestellt und diese mit dem *pmt*-homologen Fragment gescreent. Resultat waren mehrere *spds*-homologe Fragmente. Durch RT-PCR gelang es einen vollständigen *spds*-homologen Klon zu gewinnen.

- Eine Zuordnung der resultierenden Proteinsequenzen erfolgte vorläufig auf Grund der hohen Homologie zu bekannten PMT (bis zu 88% Identität) und SPDS (bis zu 97% Identität) zum einen und PMT/SPDS-spezifischen Aminosäuren zum anderen. Zudem konnte in den Proteinsequenzen die SAM/dcSAM-Bindungsstelle und katalytische Domäne für PMT und SPDS beschrieben werden.
- Zur Bestätigung der biochemischen Funktion wurden beide *pmt*-Klone in *E. coli* als His-Tag-Fusionsproteine exprimiert. Das resultierende Protein des ersten Klons war löslich und zeigte spezifische PMT-Aktivität, während das Protein des zweiten Klons unlöslich war. Mit diesem zweiten *pmt*-Klon wurden Chimären exprimiert. Diese setzten sich jeweils aus einem Teil *Solanum tuberosum-pmt* und einem Teil *Hyoscyamus niger-pmt* zusammen. Eine der beiden Chimären war löslich. PMT-Aktivität konnte gemessen werden. Die Expression des zweiten *pmt*-Klons als Chimäre belegte die partielle Funktionalität.
- Der *spds*-Klon wurde ebenfalls in *E. coli* exprimiert. Das resultierende Protein war löslich und zeigte spezifische SPDS-Aktivität.
- Rekombinante Proteine von PMT und SPDS wurden gereinigt. Enzymmessungen mit beiden Proteinen bestätigten deren Funktionalität. Mit Hilfe der Proteinreinigung wurden Grundlagen für eine Kristallisation geschaffen.
- Transkriptuntersuchungen ergaben eine spezifische Akkumulation von *pmt*-Transkript in Kartoffelaugen zu Beginn der Keimung und in 1 - 3 mm langen Kartoffelkeimen. *spds*-Transkript wurde im Gegensatz dazu in jedem Gewebe der Kartoffelpflanze detektiert.
- Die Untersuchung der genomischen Struktur von *pmt* und *spds* weist jeweils auf zwei Gene hin.

F Literaturverzeichnis

Alabadi, D., Carbonell, J. 1998. Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiology* 118: 323-328.

Alabadi, D., Carbonell, J. 1999. Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant Molecular Biology* 39: 933-943.

Ansarin, M., Woolley, J.G. 1993. The biosynthesis of tropic acid - 4. The obligatory role of phenylacetate in biosynthesis of tropic acid. *Phytochemistry* 32: 1183-1187.

Apelbaum, A., Canellakis, Z.N., Applewhite, P.B., Kaur-Sawhney, R. and Galston, A.W. 1988. Binding of spermidine to a unique protein in thin-layer tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 88: 996-998.

Arif, S.A.M., Taylor, M.A., George, L.A., Butler, A.R., Burch, L.R., Davies, H.V., Stark, M.J.R. and Kumar, A. 1994. Characterization of the *S*-adenosylmethionine decarboxylase (Samdc) gene of potato. *Plant Molecular Biology* 26: 327-338.

Asano, N., Kato, A., Kizu, H. and Matsui, K. 1996. 1- β -amino-2- α ,3- β ,5- β -trihydroxycycloheptane from *Physalis alkekengi* var. *francheti*. *Phytochemistry* 42: 719-721.

Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J., Hackett, L., Topping, J. and Winchester, B. 1997a. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology* 7: 1085-1088.

Asano, N., Kato, A., Miyauchi, M., Kizu, H., Tomimori, T., Matsui, K., Nash, R.J. and Molyneux, R.J. 1997b. Specific α -galactosidase inhibitors, *N*-methylcalystegines structure/activity relationships of calystegines from *Lycium chinense*. *European Journal of Biochemistry* 248: 296-303.

Asano, N., Kato, A., Oseki, K., Kizu, H. and Matsui, K. 1995. Calystegins of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae). Structure determination and their glycosidase inhibitory activities. *European Journal of Biochemistry* 229: 369-376.

Asano, N., Nash, R.J., Molyneux, R.J. and Fleet, G.W. 2000. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry* 11: 1645-1680.

Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. 1994. *N*-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* 259: 243-255.

- Asano, N., Yamashita, T., Yasuda, K., Ikeda, K., Kizu, H., Kameda, Y., Kato, A., Nash, R.J., Lee, H.S. and Ryu, K.S. 2001a. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4208-4213.
- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoeke, D., Draeger, B., Watson, A.A. and Nash, R.J. 2001b. Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry* 57: 721-726.
- Baldwin, I.T., Zhang, Z.P., Diab, N., Ohnmeiss, T.E., McCloud, E.S., Lynds, G.Y. and Schmelz, E.A. 1997. Quantification, correlations and manipulation of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 201: 397-404.
- Bartkiewicz, M., Sierakowska, H. and Shugar, D. 1984. Nucleotide pyrophosphatase from potato tubers - Purification and properties. *European Journal of Biochemistry* 143: 419-426.
- Basu, H.S., Schwietert, H.C., Feuerstein, B.G. and Marton, L.J. 1990. Effects of variation in the structure of spermine on the association with DNA and the induction of DNA conformational changes. *Biochemical Journal* 269: 329-334.
- Baulcombe, D.C. 1996. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 32: 79-88.
- Baulcombe, D.C., English, J.J. 1996. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 173-180.
- Beaujean, A., Sangwan, R.S., Lecardonnel, A. and Sangwan-Norreel, B.S. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *Journal of Experimental Botany* 49: 1589-1595.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. and Georgiou, G. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13703-13708.
- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.C., Frutiger, S. and Hochstrasser, D. 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14: 1023-1031.
- Bonhomme, V., Laurain, M.D., Lacoux, J., Fliniaux, M. and Jacquin, D.A. 2000. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C genes only. *Journal Of Biotechnology* 81: 151-158.

- Boyer, F.D., Lallemand, J.Y. 1994. Enantioselective syntheses of polyhydroxylated nortropine derivatives: Total synthesis of (+) and (-)-calystegine B₂. *Tetrahedron* 50: 10443-10458.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brake, A.J. 1989. Secretion of heterologous proteins directed by the yeast α -factor leader. *Biotechnology* 13: 269-280.
- Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P. and Barr, P.J. 1984. α -factor directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 4642-4646.
- Buettner, F. 1998. Isolierung von Calysteginen aus *Calystegia sepium* und *Solanum tuberosum* mittels Ionenaustauschern und Untersuchungen ihrer Wechselwirkung mit aus *C. sepium* isolierten Pilzen, Diplomarbeit, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Carrio, M.M., Villaverde, A. 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal Of Biotechnology* 96: 3-12.
- Carrio, M.M., Villaverde, A. 2003. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters* 537: 215-221.
- Chen, E.J., Seeburg, P.S. 1985. Supercoiling sequencing: A simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165-170.
- Choi, K.B., Morishige, T., Shitan, N., Yazaki, K. and Sato, F. 2002. Molecular cloning and characterization of coclaurine N-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 830-835.
- Coates, D., Taliencio, E.W. and Gelvin, S.B. 1987. Generation of single-stranded DNA hybridization probes by PCR using a short, synthetic DNA template. *Biotechniques* 26: 18-19.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 2110-2115.
- Condon, T.P. 1999. Generation of single-stranded DNA hybridization probes by PCR using a short, synthetic DNA template. *Biotechniques* 26: 18-19.
- Dobrowolski, B., Glund, K. and Metzlauff, M. 1989. Cloning of tomato nuclear ribosomal DNA. Ribosomal DNA organization in leaves and suspension cultured cells. *Plant Science* 60: 199-205.

- Dobrowolski, B. 1987. Molekulare Klonierung und Charakterisierung genomischer ribosomaler DNA einer Zellsuspensionskultur von *Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus, Dissertation, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Draeger, B. 2004. Chemistry and biology of calystegines. Natural Product Reports 21: 211-223.
- Draeger, B., Funck, C., Hoehler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A. and Schmidt, R. 1994. Calystegines as a new group tropane alkaloids in Solanaceae. Plant Cell Tissue and Organ Culture 38: 235-240.
- Draeger, B., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1988. Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures. Agricultural And Biological Chemistry 52: 2663-2667.
- Draeger, B., Van-Almssick, A. and Mrachatz, G. 1995. Distribution of calystegines in several Solanaceae. Planta Medica 61: 577-579.
- Duran, P.R., O'-Hagan, D., Hamilton-John, T.G. and Wong, C.W. 2000. Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. Phytochemistry 53: 777-784.
- Evans, P.T., Malmberg, R.L. 1989. Do polyamines have roles in plant development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40: 235-269.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Chemistry 132: 6-13.
- Feth, F., Arfmann, H.A., Wray, V. and Wagner, K.G. 1985. Determination of putrescine N-methyltransferase by high performance liquid chromatography. Phytochemistry 24: 921-923.
- Feth, F., Wagner, K.G. 1989. Determination of ornithine, putrescine, N-methylputrescine and N-methylpyrroline pools in tobacco tissue by high performance liquid chromatography. Physiologia Plantarum 75: 71-74.
- Figueras, X., Gendy, C.A., Pinol, M.T., Tran, T., V and Tiburcio, A.F. 1990. Polyamine content in relation to ploidy level and to different organs of *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant and Cell Physiology 31: 823-828.
- Fleet, G.W., Fellows, L.E. and Winchester, B. 1990. Plagiarizing plants: amino sugars as a class of glycosidase inhibitors. Ciba Foundation Symposium 154: 112-122.
- Flores, H.E., Galston, A.W. 1981. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. Plant Physiology 69: 701-706.

- Flores, H.E., Protacio, C.M. and Signs, M.W. 1989. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. *Recent advances in Phytochemistry* 23: 329-393.
- Galston, A.W., Sawhney, R.K. 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* 94: 406-410.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Garcia-Moreno, M.I., Benito, J.M., Ortiz Mellet, C. and Garcia Fernandez, J.M. 2001. Synthesis and evaluation of calystegine B₂ analogues as glycosidase inhibitors. *Journal of Organic Chemistry* 66: 7604-7614.
- Gheysen, G., Villarroel, R. and Vanmontagu, M. 1991. Illegitimate recombination in plants - A model for T-DNA integration. *Genes & Development* 5: 287-297.
- Goldmann, A., Milat, M.L., Ducrot, P.H., Lallemand, J.Y., Maille, M., Lepingle, A., Charpin, I. and Tepfer, D. 1990. Tropane derivatives from *Calystegia sepium*. *Phytochemistry* 29: 2125-2128.
- Gopal, J., Minocha, J.L. and Sidhu, J.S. 1997. Comparative performance of potato crop raised from microtubers induced in the dark versus microtubers induced in light. *Potato Research* 40: 407-412.
- Gorbunova, V., Levy, A.A. 1997. Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertations. *Nucleic Acid Research* 25: 4650-4657.
- Graser, G., Hartmann, T. 2000. Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 211: 239-245.
- Griffin, W.J., Lin, G.D. 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* 53: 623-637.
- Hanzawa, Y., Imai, A., Michael, A.J., Komeda, Y. and Takahashi, T. 2002. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 527: 176-180.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A.J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G. and Komeda, Y. 2000. *ACAULIS5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *European Molecular Biology Organization Journal* 19: 4248-4256.
- Hashimoto, T., Mitani, A. and Yamada, Y. 1990. Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*: Its function in tropane alkaloid biosynthesis. *Plant Physiology* 93: 216-221.

- Hashimoto, T., Shoji, T., Mihara, T., Oguri, H., Tamaki, K., Suzuki, K. and Yamada, Y. 1998a. Intraspecific variability of the tandem repeats in *Nicotiana putrescine N*-methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 37: 25-37.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K. and Yamada, Y. 1998b. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant and Cell Physiology* 39: 73-79.
- Hashimoto, T., Yamada, Y. 1986. Hyoscyamine 6beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in alkaloid-producing root cultures. *Plant Physiology* 81: 619-625.
- Hashimoto, T., Yamada, Y. 1987. Purification and characterization of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. - hydroxylase and epoxidase activities in the enzyme preparation. *European Journal of Biochemistry* 164: 277-285.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y. and Yamada, Y. 1989a. Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus* 1. *Biochemical studies*. *Planta* 178: 123-130.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y. and Yamada, Y. 1989b. Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus* 2. Incorporation of labeled precursors. *Planta* 178: 131-137.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y. and Yamada, Y. 1989c. Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. I. *Biochemical studies*. *Planta* 178: 123-130.
- Hatanaka, T., Sano, H. and Kusano, T. 1999. Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. *Plant Science* 140: 161-168.
- Hegnauer, R. 1990. *Chemotaxonomie der Pflanzen, Solanaceae*. Birkenhäuser Verlag. Basel, Stuttgart. pp. 567-600.
- Hemscheidt, T. 2000. Tropane and related alkaloids. *Topics in Current Chemistry* 209: 175-206.
- Herman, L., Jacobs, A., Vanmontagu, M. and Depicker, A. 1990. Plant chromosome marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Molecular & General Genetics* 224: 248-256.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32.
- Hibi, N., Fujita, T., Hatano, M., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1992. Putrescine *N*-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*: *n*-Butylamine as a potent inhibitor of the transferase both in vitro and in vivo. *Plant Physiology* 100: 826-835.

- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1994. Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* 6: 723-735.
- Hilliou, F., Christou, P. and Leech, M.J. 1999. Development of an efficient transformation system for *Catharantus roseus* cell cultures using particle bombardment. *Plant Science* 140: 179-188.
- Hunold, R., Bronner, R. and Hahne, G. 1994. Early events in microprojectile bombardment - cell viability and particle location. *Plant Journal* 5: 593-604.
- Iida, A., Yamashita, T., Yamada, Y. and Morikawa, H. 1991. Efficiency of particle bombardment mediated transformation is influenced by cell-cycle stage in synchronized cultured cells of tobacco. *Plant Physiology* 97: 1585-1587.
- Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y. and Takahashi, T. 2004. Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. *Plant Physiology* 135: 1565-1573.
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y. and Nakamura, K. 1998. Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Molecular Biology* 38: 1101-1111.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Johnson, C.R., Bis, S.J. 1995. Enzymatic asymmetrization of 6-amino-2-cycloheptene-1,4-diol derivatives - synthesis of tropane alkaloids (+)-and (-)-calystegine A₃. *Journal of Organic Chemistry* 60: 615-623.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez, D.R., Jeffery, J. and Ghosh, D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34: 6003-6013.
- Kaiser, R., Gottschalk, G. 1972. Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten, Methode nach Nalimov. BI Wissenschaftsverlag, Bibliographisches Institut. Mannheim, Wien, Zürich.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. and Persson, B. 2002. Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: A large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Science* 11: 636-641.
- Kane, J.F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 494-500.
- Kaur-Sawhney, R., Liu-Mei Shih and Galston, A.W. 1982. Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiology* 69: 411-415.

- Keiner, R., Draeger, B. 2000. Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science* 150: 171-179.
- Keiner, R., Kaiser, H., Nakajima, K., Hashimoto, T. and Draeger, B. 2002. Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.). *Plant Molecular Biology* 48: 299-308.
- King, J., Haase-Pettingell, C., Robinson, A.S., Speed, M. and Mitraki, A. 1996. Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates. *The FASEB Journal* 10: 57-66.
- Koelen, K.J., Gross, G.G. 1982. Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Medica* 44: 227-230.
- Kohli, A., Griffiths, S., Palacios, N., Twyman, R.M., Vain, P., Laurie, D.A. and Christou, P. 1999. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant Journal* 17: 591-601.
- Kohli, A., Leech, M., Vain, P., Laurie, D.A. and Christou, P. 1998. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7203-7208.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Konczkalman, Z., Korber, H., Redei, G.P. and Schell, J. 1989. High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 8467-8471.
- Korolev, S., Ikeguchi, Y., Skarina, T., Beasley, S., Arrowsmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A., Pegg, A.E. and Savchenko, A. 2002. The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nature Structural Biology* 9: 27-31.
- Kotzabasis, K., Christakis-Hampsas, M.D. and Roubelakis-Angelakis, K.A. 1993. A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated and bound polyamines. *Analytical Biochemistry* 214: 484-489.
- Kumar, A., Taylor, M.A., Arif, S.-A.M. and Davies, H., V 1996. Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: Antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant Journal* 9: 147-158.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Leech, M.J., May, K., Hallard, D., Verpoorte, R., De, L., V and Christou, P. 1998. Expression of two consecutive genes of a secondary metabolic pathway in transgenic tobacco: molecular diversity influences levels of expression and product accumulation. *Plant Molecular Biology* 38: 765-774.
- Leete, E. 1979. Biosynthesis and metabolism of the tropane alkaloids. *Planta Medica* 36: 97-112.
- Leete, E. 1990. Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids. *Planta Medica* 56: 339-352.
- Leubner, M.G., Amrhein, N. 1992. Hydroxycinnamoylputrescine are not causally involved in the tuberization process in potato plants. *Physiologia Plantarum* 86: 495-501.
- Linares, R.M., Ayala, J.H., Afonso, A.M. and Gonzalez, V. 2001. Determination of polyamines in beers by HPTLC with fluorescence detection. *Journal of Planar Chromatography* 14: 4-7.
- Lineweaver, H., Burk, D. 1934. Determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* 56: 658-666.
- Lippincott, B.B., Lippincott, J.A. 1969. Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal Of Bacteriology* 97: 620-628.
- Machackova, I., Sergeeva, L., Ondrej, M., Zaltsman, O., Konstantinova, T., Eder, J., Ovesna, J., Golyanovskaya, S., Rakitin, Y. and Aksenova, N. 1997. Growth pattern, tuber formation and hormonal balance in in vitro potato plants carrying ipt gene. *Plant Growth Regulation* 21: 27-36.
- Mader, J.C. 1995. Polyamines in *Solanum tuberosum in vitro*: Free and conjugated polyamines in hormone induced tuberization. *Journal of Plant Physiology* 146: 115-120.
- Mader, J.C. 1997. Studies on polyamines in *Solanum tuberosum in vitro*: Effects of DFMO, DFMA, chlorogenic acid and putrescine on the endogenous distribution of polyamines, tuberization and morphology. *Journal of Plant Physiology* 150: 141-152.
- Mader, J.C. 1999. Effects of jasmonic acid, silver nitrate and L-AOPP on the distribution of free and conjugated polyamines in roots and shoots of *Solanum tuberosum in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 154: 79-88.
- Malone, T., Blumenthal, R.M. and Cheng, X. 1995. Structure guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *Journal of Molecular Biology* 253: 618-632.
- Marce, M., Brown, D.S., Capell, T., Figueras, X. and Tiburcio, A.F. 1995. Rapid high performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B, Biomedical Applications* 666: 329-335.

- Martin, J.L., McMillan, F.M. 2002. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 783-793.
- Martin-Tanguy, J. 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34: 135-148.
- Masgrau, C., Altabella, T., Farras, R., Flores, D., Thompson, A.J., Besford, R.T. and Tiburcio, A.F. 1997. Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 11: 465-473.
- Mayerhofer, R., Konczkalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G.P., Schell, J., Hohn, B. and Koncz, C. 1991. T-DNA integration - A mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO Journal* 10: 697-704.
- McCabe, D., Christou, P. 1993. Direct dna transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL™ technology). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33: 227-236.
- Mesnard, F., Roscher, A., Garlick, A.P., Girard, S., Baguet, E., Arroyo-Randolf, R.J., Lebreton, J., Robins, R.J. and Ratcliffe, R.G. 2002. Evidence for the involvement of tetrahydrofolate in the demethylation of nicotine by *Nicotiana glauca* cell-suspension cultures. *Planta* 214: 911-919.
- Meurer-Grimes, B., Berlin, J. and Strack, D. 1989. Hydroxycinnamoyl-CoA-putrescine hydroxycinnamoyltransferase in tobacco cell cultures with high and low levels of caffeoylputrescine. *Plant Physiology* 89: 488-492.
- Meyer, P., Heidmann, I. and Niedenhof, I. 1993. Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant Journal* 4: 89-100.
- Michael, A.J., Furze, J.M., Rhodes, M.J.C. and Burtin, D. 1996. Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochemical Journal* 314: 241-248.
- Michaelis, L., Menten, M.L. 1913. The kinetics of invertase activity. *Biochemische Zeitschrift* 49: 333-369.
- Mikitzel, L.J., Knowles, N.R. 1989. Polyamine metabolism of potato seed tubers during long-term storage and early sprout development. *Plant Physiology* 91: 183-189.
- Mizusaki, S., Tanabe, Y., Noguchi, M. and Tamaki, E. 1971. Phytochemical studies on tobacco alkaloids. 14. Occurrence and properties of putrescine N-methyltransferase in tobacco roots. *Plant and Cell Physiology* 12: 633-&.
- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R.M., Bagni, N. and Pinol, M.T. 2002. Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the pmt gene. *Phytochemistry* 59: 697-702.

- Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazon, J., Cusido, R.M., Pinol, M.T., Teeri, T.H. and Oksman-Caldentey, K.M. 2003. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Experimental Botany* 54: 203-211.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Nakajima, K., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1993. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 9591-9595.
- Nakane, E., Kawakita, K., Noriyuki, Y. and Yoshioka, H. 2003. Elicitation of primary and secondary metabolism during defense in the potato. *Journal of General Plant Pathology* 69: 378-384.
- Nash, R.J., Rothschild, M., Porter, E.A., Watson, A.A., Waigh, R.D. and Waterman, P.G. 1993. Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropus*). *Phytochemistry* 34: 1281-1283.
- Negrel, J. 1989. The biosynthesis of cinnamoylputrescines in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 28: 477-481.
- Ober, D., Harms, R. and Hartmann, T. 2000. Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vulgaris*: a revision. *Phytochemistry* 55: 305-309.
- Ober, D., Hartmann, T. 1999. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14777-14782.
- Palazon, J., Cusido, R.M., Roig, C. and Pinol, M.T. 1997. Effect of rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 35: 155-162.
- Palazon, J., Cusido, R.M., Roig, C. and Pinol, M.T. 1998. Expression of the rolC gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. *Plant Cell Reports* 17: 384-390.
- Palazon, J., Moyano, E., Cusido, R.M., Bonfill, M., Oksman-Caldentey, K.M. and Pinol, M.T. 2003. Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the h6h gene. *Plant Science* 165: 1289-1295.
- Park, Y.D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J.M. and Matzke, M.A. 1996. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant Journal* 9: 183-194.

- Pedros, A.R., MacLeod, M.R., Ross, H.A., Mcrae, D., Tiburcio, A.F., Davies, H., V and Taylor, M.A. 1999. Manipulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers: An increase in activity leads to an increase in tuber number and a change in tuber size distribution. *Planta* 209: 153-160.
- Persson, B., Krook, M. and Jornvall, H. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *European Journal of Biochemistry* 200: 537-543.
- Platt, F.M., Neises, G.R., Dwek, R.A. and Butters, T.D. 1994a. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8362-8365.
- Platt, F.M., Neises, G.R., Karlsson, G.B., Dwek, R.A. and Butters, T.D. 1994b. N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. *Journal of Biological Chemistry* 269: 27108-27114.
- Posfai, J., Bhagwat, A.S., Posfai, G. and Roberts, R.J. 1989. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acid Research* 17: 2421-2435.
- Protacio, C.M., Flores, H.E. 1992. The role of polyamines in potato tuber formation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 28P: 81-86.
- Raman, S.B., Rathinasabapathi, B. 2003. β -Alanine N-methyltransferase of *Limonium latifolium*. cDNA cloning and functional expression of a novel N-methyltransferase implicated in the synthesis of the osmoprotectant β -alanine betaine. *Plant Physiology* 132: 1642-1651.
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P. and Lazzeri, P.A. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* 19: 118-127.
- Rastogi, R., Dulson, J. and Rothstein, S.J. 1993. Cloning of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiology* 103: 829-834.
- Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M. and Reinbothe, S. 1992. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *The Plant Journal* 2: 917-926.
- Riechers, D.E., Timko, M.P. 1999. Structure and expression of the gene family encoding putrescine N-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: New clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Molecular Biology* 41: 387-401.
- Robins, R.J., Abraham, T.W., Parr, A.J., Eagles, J. and Walton, N.J. 1997. The biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium*: The identity of the intermediates between N-methylpyrrolinium salt and tropinone. *Journal of the American Chemical Society* 119: 10929-10934.

- Robins, R.J., Parr, A.J., Bent, E.G. and Rhodes, M.-J.C. 1991. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 1. Kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites. *Planta* 183: 185-195.
- Robins, R.J., Woolley, J.G., Ansarin, M., Eagles, J. and Goodfellow, B.J. 1994. Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures. *Planta* 194: 86-94.
- Rocha, P., Stenzel, O., Parr, A., Walton, N., Christou, P., Draeger, B. and Leech, M.J. 2002. Functional expression of tropinone reductase I (trI) and hyoscyamine-6beta-hydroxylase (h6h) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. *Plant Science* 162: 905-913.
- Romano, A., Raemakers, K., Visser, R. and Mooibroek, H. 2001. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment. *Plant Cell Reports* 20: 198-204.
- Rothe, G., Draeger, B. 2002. Tropane alkaloids - metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Science* 163: 979-985.
- Rothe, G., Hachiya, A., Yamada, Y., Hashimoto, T. and Draeger, B. 2003. Alkaloids in plants and root cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine N-methyltransferase. *Journal of Experimental Botany* 54: 2065-2070.
- Rothmaler, W. 2002. Exkursionsflora von Deutschland, Gefäßpflanzen: Kritischer Band, 9. Auflage, neubearbeitet von Jäger, E.J., Werner, K.. Spektrum - Akademischer Verlag. Heidelberg. pp. 551-552.
- Russell, D.R., Wallace, K.M., Bathe, J.H., Martinell, B.J. and McCabe, D.E. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports* 12: 165-169.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Samulitis, B.K., Goda, T., Lee, S.M. and Koldovsky, O. 1987. Inhibitory mechanism of acarbose and 1-deoxynojirimycin derivatives on carbohydrases in rat small intestine. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 13: 517-524.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 367-372.
- Sarhan, S., Dezeure, F. and Seiler, N. 1987. Putrescine derivatives as substrates of spermidine synthase. *International Journal of Biochemistry* 19: 1037-1047.

- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K., Choi, K.-B., Morishige, T., Fujimoto, H. and Yamada, Y. 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 367-372.
- Scaramagli, S., Biondi, S., Leone, A., Grillo, S. and Torrigiani, P. 2000. Acclimation to low water potential in potato cell suspension cultures leads to changes in putrescine metabolism. Plant Physiology and Biochemistry 38: 345-351.
- Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richer, A., Jenett-Siems, K., Drager, B., Asano, N., Gupta, M.P., Correa, M.D. and Eich, E. 1998. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the convolvulaceae. Phytochemistry 49: 1989-1995.
- Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W. and Cheng, X. 1995. Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. Journal of Molecular Biology 247: 16-20.
- Scholl, Y. 14-11-2003. Gene, Enzyme und Produkte der Calysteginbildung in *Calystegia sepium* (L.) R. Br., Dissertation, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Scholl, Y., Höke, D. and Dräger, B. 2001. Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway. Phytochemistry 58: 883-889.
- Scholl, Y., Schneider, B. and Drager, B. 2003. Biosynthesis of calystegines: ¹⁵N-NMR and kinetics of formation in root cultures of *Calystegia sepium*. Phytochemistry 62: 325-332.
- Seiler, N., Knodgen, B. 1978. Determination of di- and polyamines by high performance liquid chromatographic separation of their 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl derivatives. Journal Of Chromatography 145: 29-39.
- Sevon, N., Draeger, B., Hiltunen, R. and Oksman-Caldentey, K.M. 1997. Characterization of transgenic plants derived from hairy roots of *Hyoscyamus muticus*. Plant Cell Reports 16: 605-611.
- Shoji, T., Yamada, Y. and Hashimoto, T. 2000. Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. Plant Cell Physiology 41: 831-839.
- Sindhu, R.K., Cohen, S.S. 1984. Propylamine transferases in chinese cabbage leaves. Plant Physiology 74: 645-649.
- Skaanderup, P.R., Madsen, R. 2003. A short synthetic route to the calystegine alkaloids. Journal of Organic Chemistry 68: 2115-2122.
- Smith, M.A., Davies, P.J. 1985. Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. Plant Physiology 78: 89-91.
- Smith, T.A., Wilshire, G. 1975. Distribution of cadaverine and other amines in higher plants. Phytochemistry 14: 2341-2346.

- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.
- Stenzel, O., Teuber, M. and Drager, B. 2006. Putrescine N-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta* 223: 200-212.
- Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R. and Baldwin, I.T. 2004. Nicotine's defensive function in nature. *Plos Biology* 2: 1074-1080.
- Stiekema, W.J., Heidekamp, F., Louwerse, J.D., Verhoeven, H.A. and Dijkhuis, P. 1988. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Reports* 7: 47-50.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H. 2002. Strasburger Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 35. Auflage. neubearbeitet von Sitte, P., Weiler, E.W., Kadereit, J.W., Bresinsky, A., Körner, C. Spektrum - Akademischer Verlag. Heidelberg. pp. 154-156.
- Suzuki, K., Yamada, Y. and Hashimoto, T. 1999a. Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant and Cell Physiology* 40: 289-297.
- Suzuki, K., Yun, D.J., Chen, X.Y., Yamada, Y. and Hashimoto, T. 1999b. An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6beta-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Molecular Biology* 40: 141-152.
- Tassoni, A., Antognoni, F. and Bagni, N. 1996. Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. *Plant Physiology* 110: 817-824.
- Tavazza, R., Tavazza, M., Ordas, R.J., Ancora, G. and Benvenuto, E. 1989. Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*) - An efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Science* 59: 175-181.
- Taylor, M.A., Arif, S.A., Kumar, A., Davies, H.V., Scobie, L.A., Pearce, S.R. and Flavell, A.J. 1992. Expression and sequence analysis of cDNAs induced during the early stages of tuberisation in different organs of the potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Molecular Biology* 20: 641-651.
- Taylor, M.A., Burch, L.R. and Davies, H., V 1993. Changes in polyamine biosynthesis during the initial stages of tuberisation in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Plant Physiology* 141: 370-372.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes* - Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959-967.

- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Denarie, J. and Rosenberg, C. 1988. A Plasmid of *Rhizobium Meliloti* 41 encodes catabolism of 2 compounds from root exudate of *Calystegia sepium*. Journal Of Bacteriology 170: 1153-1161.
- Tinjuangjun, P., Loc, N.T., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. and Christou, P. 2000. Enhanced insect resistance in Thai rice varieties generated by particle bombardment. Molecular Breeding 6: 391-399.
- Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. and Gingeras, T.R. 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acid Research 15: 3859-3876.
- Uefuji, H., Ogita, S., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. 2003. Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. Plant Physiology 132: 372-380.
- Vega, M.H., Saelzer, R.F., Figueroa, C.E., Rios, G.G. and Jaramillo-Victor, H.M. 1999. Use of AMD HPTLC for analysis of biogenic amines in fish meal. Journal of Planar Chromatography Modern TLC 12: 72-75.
- Walton, N.J., Peerless, A.-C.J., Robins, R.J., Rhodes, M.-J.C., Boswell, H.D. and Robins, D.J. 1994. Purification and properties of putrescine N-methyltransferase from transformed roots of *Datura stramonium* L. Planta 193: 9-15.
- Xie, Q.W., Tabor, C.W. and Tabor, H. 1993. Deletion mutations in the speED operon: spermidine is not essential for the growth of *Escherichia coli*. Gene 126: 115-117.
- Xu, B., Timko, M. 2004. Methyl jasmonate induced expression of the tobacco putrescine-N-methyltransferase genes requires both G-box and GCC-motif elements. Plant Molecular Biology 55: 743-761.
- Yoon, S.O., Lee, Y.S., Lee, S.H. and Cho, Y.D. 2000. Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (*Glycine max*) axes. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects 1475: 17-26.
- Zeef, L.A.H., Christou, P. and Leech, M.J. 2000. Transformation of the tropane alkaloid-producing medicinal plant *Hyoscyamus muticus* by particle bombardment. Transgenic Research 9: 163-168.

G Anhang

G 1 Polyamin-Bestimmung mit HPLC

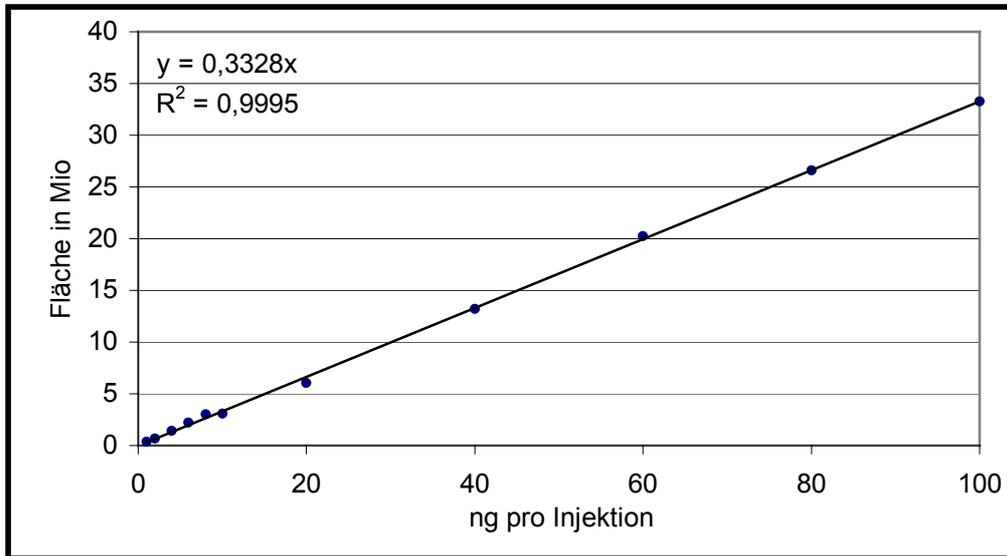


Abb. G-1 Eichgerade zur Bestimmung von Putrescin

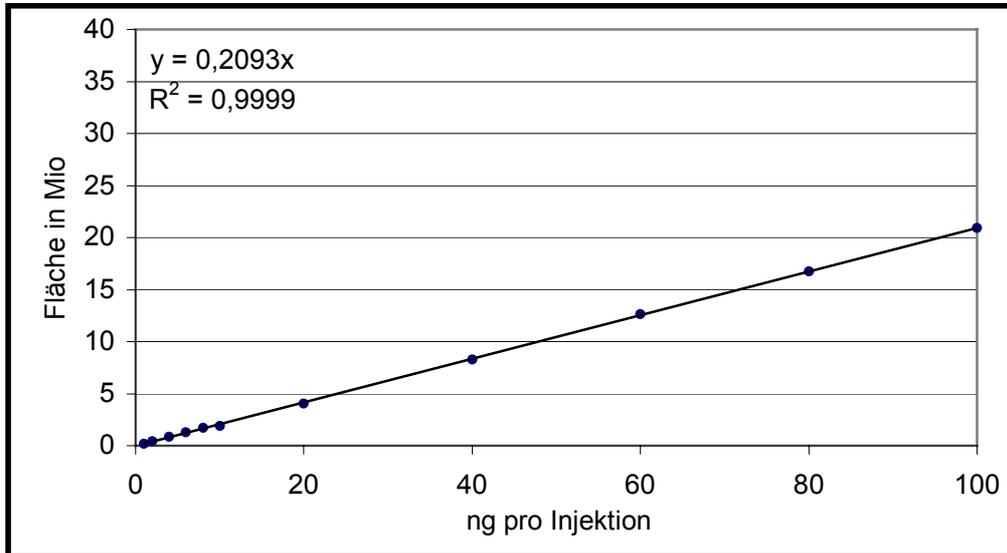


Abb. G-2 Eichgerade zur Bestimmung von *N*-Methylputrescin

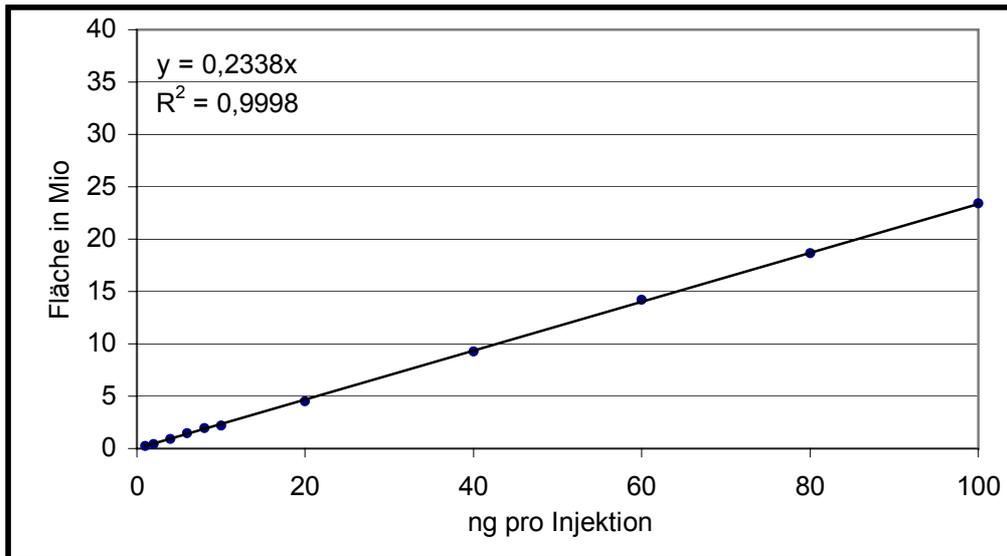


Abb. G-3 Eichgerade zur Bestimmung von Spermidin

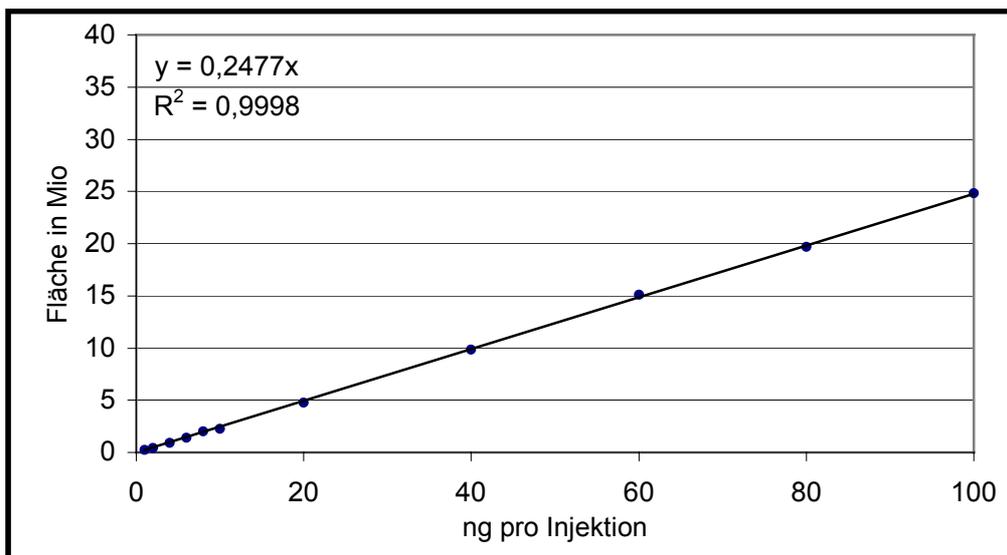


Abb. G-4 Eichgerade zur Bestimmung von Spermin

Der Messbereich für alle Polyamine lag zwischen 0 und 100 ng pro Injektion. Innerhalb des Messbereichs wurden 11 Messpunkte mit einer Doppelbestimmung ermittelt. Die Detektion der Polyamine erfolgte mit Fluoreszenzdetektor.

G 2 Polyamine in Kartoffelgeweben

Gewebe	freie Polyamine		lösliche konjugierte Polyamine		unlösliche konjugierte Polyamine		Polyamine gesamt	
	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D
Kartoffelschale	1,64	0,14	2,43	0,05	1,54	0,02	5,60	0,21
Kartoffelaugen dormant	2,49	0,15	2,88	0,30	1,19	0,06	6,55	0,51
Kartoffelaugen Start	2,87	0,17	6,29	1,22	3,19	0,61	12,35	2,00
Kartoffelkeime 1mm	2,05	0,43	6,33	1,44	5,13	1,16	13,50	3,03
Kartoffelkeime 3mm	2,27	0,26	5,29	1,05	3,03	0,63	10,59	1,95
Kartoffelkeime 10mm	2,65	0,41	4,21	0,63	2,93	0,24	9,80	1,28
Wurzeln	0,35	0,07	1,39	0,23	0,83	0,08	2,58	0,39
Stengel	0,28	0,03	0,76	0,09	0,00	0,00	1,04	0,12
Stolone	0,97	0,09	1,34	0,07	0,32	0,07	2,63	0,23
untere Blätter	1,73	0,35	2,46	0,29	2,13	0,33	6,32	0,97
mittlere Blätter	1,94	0,16	3,12	0,17	1,43	0,05	6,48	0,38
obere Blätter	1,71	0,19	4,68	0,02	0,92	0,04	7,32	0,25
Blüten	3,75	0,40	5,99	1,50	0,56	0,05	10,31	1,95

Tab. G-1 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Putrescin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

Gewebe	freie Polyamine		lösliche konjugierte Polyamine		unlösliche konjugierte Polyamine		Polyamine gesamt	
	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D
Kartoffelschale	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kartoffelaugen dormant	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kartoffelaugen Start	0,48	0,07	0,42	0,03	0,15	0,04	1,04	0,14
Kartoffelkeime 1mm	0,39	0,08	0,37	0,02	0,00	0,00	0,75	0,10
Kartoffelkeime 3mm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kartoffelkeime 10mm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Wurzeln	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Stengel	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Stolone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
untere Blätter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
mittlere Blätter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
obere Blätter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Blüten	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. G-2 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der *N*-Methylputrescin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

Gewebe	freie Polyamine		lösliche konjugierte Polyamine		unlösliche konjugierte Polyamine		Polyamine gesamt	
	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D
Kartoffelschale	0,43	0,01	2,51	0,21	0,81	0,12	3,75	0,35
Kartoffelaugen dormant	0,68	0,06	3,62	0,18	0,94	0,02	5,24	0,26
Kartoffelaugen Start	0,98	0,18	6,93	0,36	1,31	0,34	9,22	0,88
Kartoffelkeime 1mm	2,13	0,16	5,95	0,31	0,39	0,03	8,47	0,49
Kartoffelkeime 3mm	3,45	0,52	7,44	0,47	0,35	0,05	11,24	1,04
Kartoffelkeime 10mm	3,95	0,48	5,85	0,56	0,21	0,01	10,01	1,04
Wurzeln	0,14	0,00	0,33	0,02	0,09	0,01	0,56	0,03
Stengel	0,46	0,06	1,83	0,14	0,16	0,02	2,44	0,21
Stolone	2,03	0,11	4,08	0,23	0,28	0,03	6,40	0,37
untere Blätter	0,99	0,02	2,37	0,20	0,56	0,05	3,92	0,27
mittlere Blätter	1,18	0,07	3,48	0,24	0,56	0,11	5,22	0,43
obere Blätter	2,66	0,21	6,18	0,66	0,33	0,02	9,17	0,88
Blüten	1,68	0,28	14,77	0,28	1,49	0,23	17,95	0,79

Tab. G-3 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermidin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

Gewebe	freie Polyamine		lösliche konjugierte Polyamine		unlösliche konjugierte Polyamine		Polyamine gesamt	
	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D
Kartoffelschale	0,38	0,01	5,74	0,54	1,55	0,19	7,67	0,74
Kartoffelaugen dormant	0,19	0,02	1,74	0,16	0,31	0,06	2,24	0,23
Kartoffelaugen Start	0,04	0,00	1,05	0,17	0,20	0,02	1,29	0,20
Kartoffelkeime 1mm	0,07	0,00	0,65	0,05	0,07	0,01	0,79	0,06
Kartoffelkeime 3mm	0,59	0,10	0,75	0,03	0,07	0,01	1,40	0,15
Kartoffelkeime 10mm	0,11	0,11	0,52	0,52	0,06	0,06	0,69	0,69
Wurzeln	0,21	0,02	0,35	0,02	0,21	0,01	0,76	0,04
Stengel	0,16	0,02	0,52	0,02	0,12	0,01	0,80	0,04
Stolone	0,14	0,02	0,32	0,05	0,12	0,01	0,59	0,08
untere Blätter	0,24	0,02	0,27	0,01	0,05	0,01	0,55	0,04
mittlere Blätter	0,57	0,05	0,76	0,06	0,24	0,05	1,56	0,16
obere Blätter	0,66	0,02	0,65	0,06	0,05	0,01	1,36	0,09
Blüten	0,78	0,11	3,38	0,57	0,35	0,03	4,52	0,72

Tab. G-4 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermin-Bestimmung in verschiedenen Kartoffelgeweben

Die Mittelwerte sind aus 3 - 5 unabhängigen Messungen berechnet. Die Diagramme zu diesen Messungen sind unter (C 1.2) zu finden.

G 3 Polyamine in *pmt*-transformierten Pflanzenlinien

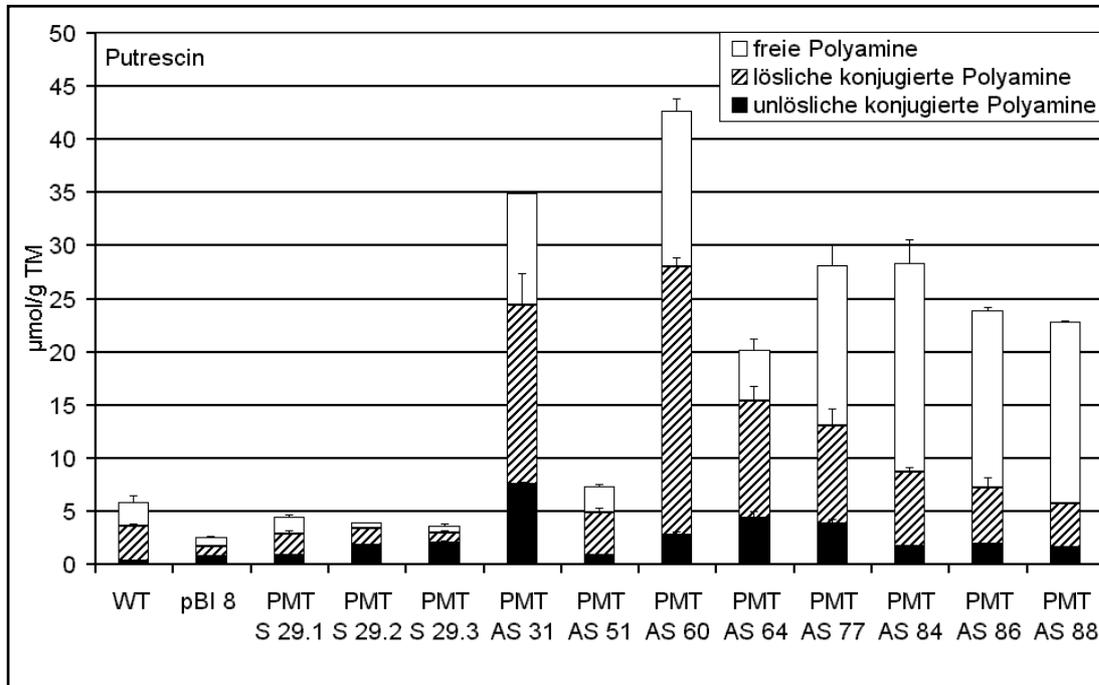


Abb. G-5 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Putrescin-Bestimmung in Blättern *pmt*-transformierter Pflanzenlinien

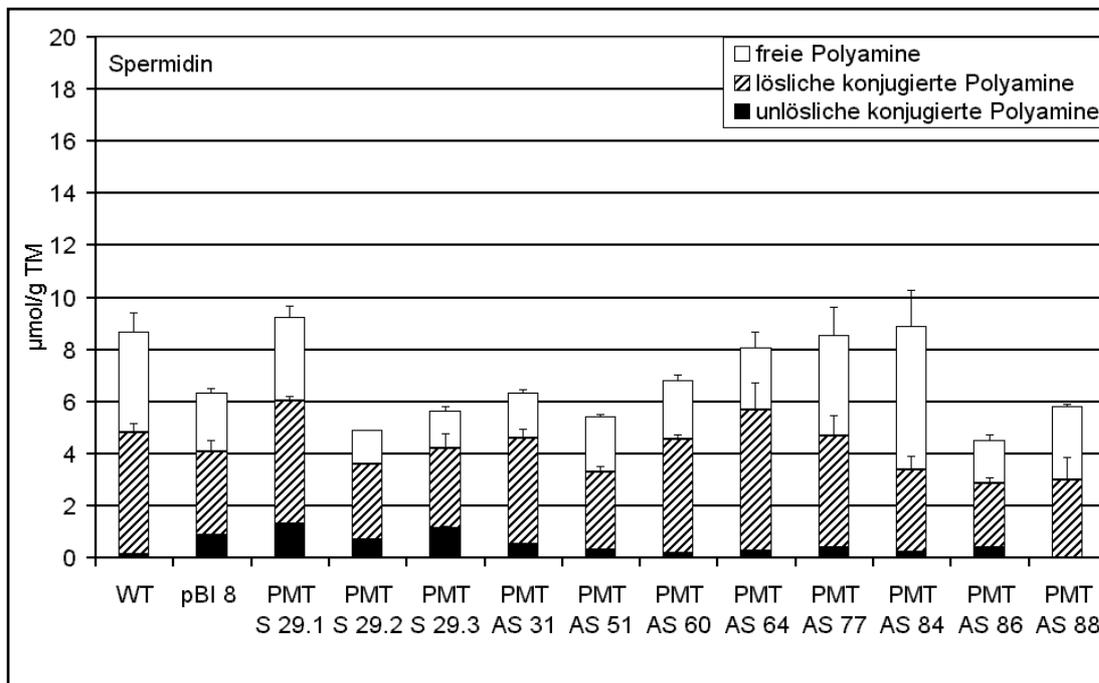


Abb. G-6 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermidin-Bestimmung in Blättern *pmt*-transformierter Pflanzenlinien

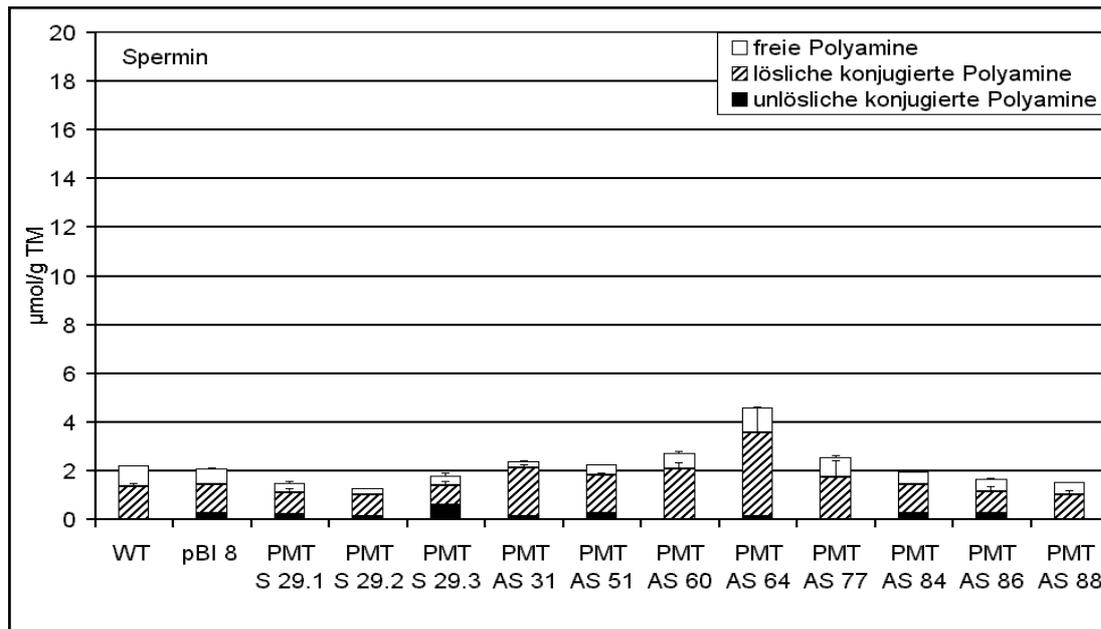


Abb. G-7 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Spermin-Bestimmung in Blättern *pmt*-transformierter Pflanzenlinien

Die Mittelwerte wurden aus 3 - 5 unabhängigen Messungen berechnet und Standardabweichungen wurden in Balken angegeben. Zur Bezeichnung: PMTS 29.1 - mit *pmt-sense*-Konstrukt transformierte Pflanzenlinie, Kallus 29, regenerierte Pflanze 1; WT - Wildtyp, pBI - mit pBI121-Leerplasmid transformierte Pflanzenlinie

Klon	freie Polyamine		lösliche konjugierte Polyamine		unlösliche konjugierte Polyamine		Polyamine gesamt	
	µmol/g TM	S_D	µmol/g TM	S_D	µmol/g TM	S_D	µmol/g TM	S_D
WT	2,20	0,64	3,32	0,13	0,34	0,06	5,86	0,83
pBI 8	0,86	0,06	1,00	0,01	0,72	0,02	2,58	0,09
PMT S 29.1	1,53	0,20	2,02	0,31	0,87	0,12	4,42	0,62
PMT S 29.2	0,49	0,00	1,58	0,00	1,82	0,00	3,90	0,00
PMT S 29.3	0,65	0,15	1,02	0,16	1,99	0,28	3,66	0,59
PMT AS 31	10,44	0,12	16,86	2,97	7,59	0,19	34,89	3,28
PMT AS 51	2,45	0,14	4,10	0,33	0,83	0,15	7,38	0,62
PMT AS 60	14,68	1,10	25,26	0,85	2,77	0,34	42,71	2,29
PMT AS 64	4,75	1,11	11,02	1,37	4,36	0,60	20,13	3,08
PMT AS 77	15,10	2,01	9,25	1,64	3,78	0,50	28,14	4,16
PMT AS 84	19,61	2,25	7,08	0,35	1,67	0,06	28,36	2,65
PMT AS 86	16,73	0,31	5,27	1,02	1,92	0,10	23,93	1,43
PMT AS 88	17,10	0,05	4,21	0,02	1,54	0,02	22,85	0,09

Tab. G-5 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Putrescin-Bestimmung in Blättern *pmt*-transformierter Pflanzenlinien

Klon	freie Polyamine		lösliche konjugierte Polyamine		unlösliche konjugierte Polyamine		Polyamine gesamt	
	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D
WT	3,84	0,77	4,71	0,33	0,12	0,01	8,67	1,11
pBI 8	2,28	0,14	3,23	0,45	0,85	0,07	6,35	0,66
PMT S 29.1	3,24	0,41	4,70	0,19	1,31	0,05	9,25	0,65
PMT S 29.2	1,30	0,00	2,93	0,00	0,68	0,00	4,90	0,00
PMT S 29.3	1,43	0,19	3,07	0,56	1,14	0,09	5,64	0,84
PMT AS 31	1,76	0,13	4,08	0,35	0,51	0,06	6,34	0,54
PMT AS 51	2,13	0,12	3,00	0,24	0,28	0,04	5,41	0,40
PMT AS 60	2,25	0,22	4,38	0,18	0,16	0,02	6,79	0,42
PMT AS 64	2,39	0,63	5,41	1,05	0,25	0,03	8,06	1,71
PMT AS 77	3,85	1,07	4,31	0,77	0,38	0,02	8,54	1,86
PMT AS 84	5,49	1,40	3,18	0,49	0,22	0,03	8,89	1,92
PMT AS 86	1,62	0,22	2,48	0,22	0,40	0,04	4,51	0,48
PMT AS 88	2,83	0,09	2,97	0,89	0,00	0,00	5,81	0,97

Tab. G-6 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Spermidin-Bestimmung in Blättern *pmt*-transformierter Pflanzenlinien

Klon	freie Polyamine		lösliche konjugierte Polyamine		unlösliche konjugierte Polyamine		Polyamine gesamt	
	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D	$\mu\text{mol/g TM}$	S_D
WT	0,86	0,01	1,36	0,15	0,00	0,00	2,21	0,16
pBI 8	0,65	0,04	1,19	0,06	0,26	0,02	2,10	0,12
PMT S 29.1	0,38	0,08	0,90	0,19	0,19	0,03	1,47	0,30
PMT S 29.2	0,24	0,00	0,91	0,00	0,12	0,00	1,27	0,00
PMT S 29.3	0,38	0,09	0,84	0,16	0,58	0,04	1,80	0,29
PMT AS 31	0,28	0,06	1,96	0,13	0,14	0,01	2,38	0,20
PMT AS 51	0,44	0,01	1,59	0,09	0,24	0,01	2,26	0,10
PMT AS 60	0,66	0,10	2,07	0,29	0,00	0,00	2,72	0,38
PMT AS 64	1,03	0,04	3,44	1,03	0,12	0,01	4,59	1,07
PMT AS 77	0,79	0,13	1,74	0,69	0,00	0,00	2,53	0,81
PMT AS 84	0,51	0,00	1,21	0,00	0,26	0,00	1,97	0,00
PMT AS 86	0,52	0,02	0,88	0,22	0,26	0,00	1,66	0,25
PMT AS 88	0,50	0,01	1,02	0,16	0,00	0,00	1,52	0,17

Tab. G-7 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Spermin-Bestimmung in Blättern *pmt*-transformierter Pflanzenlinien

G 4 Intermediate in *trII*-transformierten Pflanzenlinien

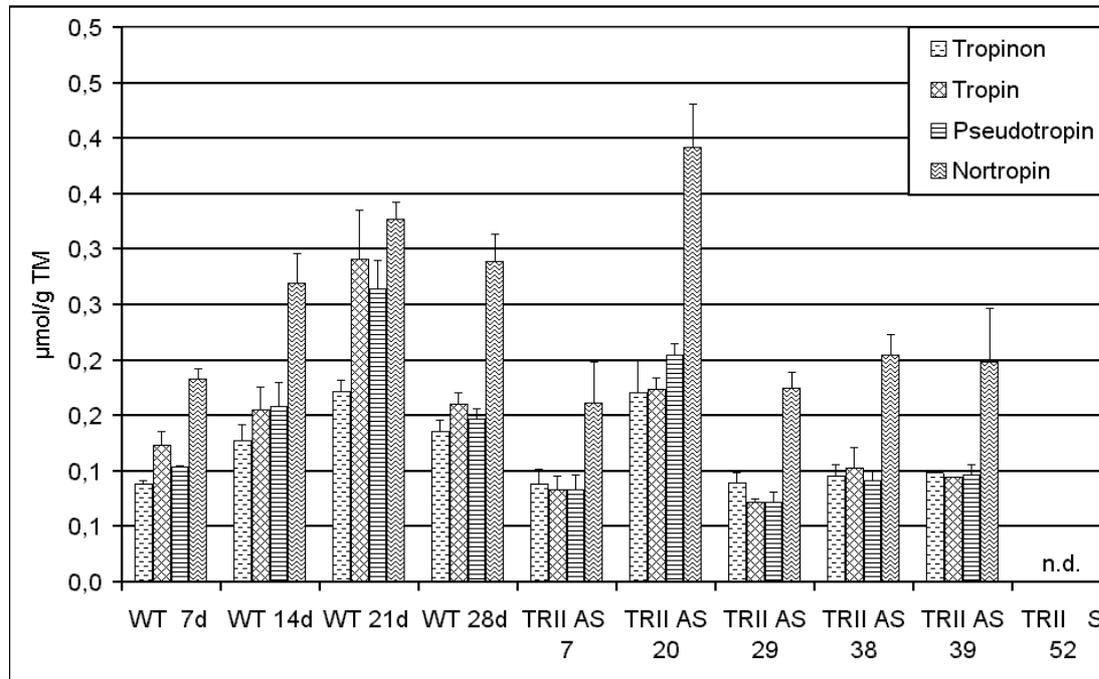


Abb. G-8 Mittelwerte und Standardabweichung (S_D) der Intermediat-Bestimmung in Wurzeln *trII*-transformierter Pflanzenlinien

Die Mittelwerte wurden aus 3 - 5 unabhängigen Messungen berechnet und Standardabweichungen wurden in Balken angegeben.

TRIIAS 7 - mit *trII-antisense*-Konstrukt transformierte Pflanzenlinie, Kallus 7, entspricht Pflanzenlinie 7, WT - Wildtyp, - aus regenerierten Pflanzen wurden Wurzelkulturen durch Abimpfen gezogen und nach 28 Tagen (28d) untersucht - zum Vergleich wurden Wildtyp-Wurzelkulturen nach 7, 14, 21 und 28 Tagen (7d, 14d, 21d und 28d) vermessen

Klon	Tropinon		Tropin		Pseudotropin		Nortropin	
	µmol/g TM	S_D	µmol/g TM	S_D	µmol/g TM	S_D	µmol/g TM	S_D
WT 7d	0,09	0,00	0,12	0,01	0,10	0,00	0,18	0,01
WT 14d	0,13	0,01	0,16	0,02	0,16	0,02	0,27	0,03
WT 21d	0,17	0,01	0,29	0,05	0,26	0,03	0,33	0,02
WT 28d	0,14	0,01	0,16	0,01	0,15	0,01	0,29	0,02
TRII AS 7	0,09	0,01	0,08	0,01	0,08	0,01	0,16	0,04
TRII AS 20	0,17	0,03	0,17	0,01	0,20	0,01	0,39	0,04
TRII AS 29	0,09	0,01	0,07	0,00	0,07	0,01	0,17	0,01
TRII AS 38	0,10	0,01	0,10	0,02	0,09	0,01	0,20	0,02
TRII AS 39	0,10	0,00	0,09	0,00	0,10	0,01	0,20	0,05
TRII AS 52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. G-8 Mittelwerte und Standardabweichungen (S_D) der Intermediat-Bestimmung in Wurzeln *trII*-transformierter Pflanzenlinien

G 5 cDNA-Sequenzen in *Solanum tuberosum*

G 5.1 *pmt1*-cDNA

AACAATATTTACTTTCTCCCAAACATAATATTACATACTTTCTATTCTCCAATTAATATG	60
<u>M</u>	
GAAGTCATATCTACTCACACAAATGGCTCTACCATCACAATCACCACCAACGGCCACCAC	120
E V I S T H T N G S T I T I T T N G H H	
AATAATGGCAAGTCCGATCACCGAAACGGCGGAACAATTCATGACAATGGCAATAAGCTA	180
N N G K S D H R N G G T I H D N G N K L	
TTATTGGGAAACTCCAACCTCTATTAAGCCTGGTTGGTTTTTCAGAGTTTAGCGCGTTATGG	240
L L G N S N S I K P G W F S E F S A L W	
CCAGGTGAAGCATTCTCAGTAAAAATTGAGAAGTTGCTATTTCAAGGGAAGTCTGATTAC	300
P G E A F S V K I E K L L F Q G K S D Y	
CAAGATGTCATGTTATTTGAGTCAGCAACTTATGGTAAAGTTCTAACATTGGATGGAGCA	360
Q D V M L F E S A T Y G K V L T L D G A	
ATTCAACACACAGAAAATGGTGGATTTCCATATACTGAAATGATTGTTTCATCTACCACTT	420
I Q H T E N G G F P Y T E M I V H L P L	
GGTTCAATCCCAACTCCCAAAAAGGTGTTGATCATGGTGGAGGAATTGGTTTTACATTA	480
G S I P T P K K V L I I G G G I G F T L	
TTCGAAGTGCTTCGTTATTCTACCATAGAAAAATAGATATTGTTGAGATTGATGACGTT	540
F E V L R Y S T I E K I D I V E I D D V	
GTGGTCGACGTGTCTAGAAAATTTTCCCCTACCTTGCTGCTAATTTTAATGATCCTCGT	600
V V D V S R K F F P Y L A A N F N D P R	
GTAActCTGGTTCTCGGCGACGGAGCAGCATTGTAAAGGCTGCACAAGCAGGGTATTAT	660
V T L V L G D G A A F V K A A Q A G Y Y	
GATGCTATTATTGTGGACTCTTCTGATCCTATTGGTCCAGCAAAGATTTATTTGAGAGG	720
D A I I V D S S D P I G P A K D L F E R	
CCATTTTTTGAGGCAGTAGCCAAAGCTCTTAGGCCAGGAGGATTATATGCACACAAGCT	780
P F F E A V A K A L R P G G V I C T Q A	
GAAAGTATATGGCTTCATATGCATATTATTAACAATTATTGCTAATTGTCGACTAGTC	840
E S I W L H M H I I K Q I I A N C R L V	
TTTAAAGTTCTGTTAACTATGCTTGGACTACTGTTCCAACATATCCAAGTGGTGAATT	900
F K G S V N Y A W T T V P T Y P T G V I	
GGTTACATGCTTTGCTCTACTGAGGGACCAGAAGTTGACTTTAAGAATCCAGTGAATCCA	960
G Y M L C S T E G P E V D F K N P V N P	
ATTGACAAAGATACAACCTCATGTCAAGTCAAATTAGAACCTCTCAAGTTCTACAACACT	1020
I D K D T T H V K S K L E P L K F Y N T	
GATATTCATAAAGCAGCTTTTATTTTGCCATCTTTTGCCAGAAGTTTGATTGAGTCTTAA	1080
<u>D I H K A A F I L P S F A R S L I E S</u>	
TCAAATAAAGAATCAAGATTGATGGTTAGGAGTTGAGGGATTGGAATTCTTGAGTTTTGC	1140
TTTATTTGTTATATGTAATAATATCGACCTTTAGAGATCGGTTAATTTATGTAGTTTTAT	1200
TTTTCATATCACTTGCAATAAAACTATAGTATACGTTACCGGCATCAAATATGATATGTA	1260
CGTATAGTAGAAGAATTCCATATTAATATCAGTATTAATTAATTTCTGATTCACAAAA	1320
AAAAAAAAAAAA	1332

Abb. G-9 *Solanum tuberosum pmt1*- cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz

Start- und Stop-Codon sind unterstrichen. Die Sequenz wurde in die EMBL-Datenbank eingetragen (AJ605553).

G 5.2 *pmt2*-cDNA

AACAATATTTACTTTCTCCCAAACATAATATTACATACTTTCTATTCTCCAATTAATATG	60
<u>M</u>	
GAAGTCATATCTACTCACACAAATGGCTCTGCCATCACAATCACCACCAACGGCCACCAC	120
E V I S T H T N G S A I T I T T N G H H	
AATAATGGCAAGTCCGATCACCGAAACGGCGGAACAATTCATGACAATGGCAATAAGCTA	180
N N G K S D H R N G G T I H D N G N K L	
TTATTGGGAAACTCCAACTCTATTAAGCCTGGTTGGTTTTTCAGAGTTTAGCGCGTTATGG	240
L L G N S N S I K P G W F S E F S A L W	
CCAGGTGAAGCATTCTCAGTAAAAATTGAGAAGTTGCTATTTCAAGGGAAGTCTGATTAC	300
P G E A F S V K I E K L L F Q G K S D Y	
CAAGATGTCATGTTATTTGAGTCAGCAACTTATGGTAAAGTTCTAACATTGGATGGAGCA	360
Q D V M L F E S A T Y G K V L T L D G A	
ATTCAACACACAGAAAATGGTGGATTTCCATATACTGAAATGATTGTTTCATCTACCACTT	420
I Q H T E N G G F P Y T E M I V H L P L	
GGTTCAATCCCAACTCCCAAAAAGGTGTTGATCATTGGTGGAGGAATTGGTTTTACATTA	480
G S I P T P K K V L I I G G G I G F T L	
TTCGAAGTGCTTCGTTATTCTACCATAGAAAAATAGATATTGTTGAGATTGATGACGTG	540
F E V L R Y S T I E K I D I V E I D D V	
GTGATCGATGTGTCTAGAAAATTTTTCCCCTACCTTGCTGCTAATTTAATGATCCTCGT	600
V I D V S R K F F P Y L A A N F N D P R	
GTAACTCTGGTTCTCGGCGATGGAGCAACATTTGTAAAGGCTGCACAAGCAGGGTATTAT	660
V T L V L G D G A T F V K A A Q A G Y Y	
GATGCTATTATTGTGGACTCTTCTGATCCTATTGGTCCAGCAAAAGATTTATTGAGAGG	720
D A I I V D S S D P I G P A K D L F E R	
CCATTTTTTGAGGCAGTAGCCAAAGCTCTTAGGCCAGGAGGGTTATATGCACACAAGCT	780
P F F E A V A K A L R P G G V I C T Q A	
GAAAGTATATGGCTTCATATGCATATTATTAACAAATTATTGCTAATTGTCGACTAGTC	840
E S I W L H M H I I K Q I I A N C R L V	
TTTAAAGTTCTGTAACTATGCTTGGACTACTGTTCCAACATATCCAAGTGGTGAATT	900
F K G S V N Y A W T T V P T Y P T G V I	
GGTTACATGCTTTGCCCTACTGAGGGACCAGAAGTTGACTTTAAGAATCCAGTGAATCCA	960
G Y M L C P T E G P E V D F K N P V N P	
ATTGACAAAGATACTCACTCATGTCAAGTCAAAATTAGAACCTCTCAAGTTCTACAACACT	1020
I D K D T T H V K S K L E P L K F Y N T	
GATATTCATAAAGCAGCTTTTATTTTGCCATCTTTTGCCAGAAGTTTGATTGAGTCTTAA	1080
D I H K A A F I L P S F A R S L I E S	
TCAAATAAAGAATCAAGATTGATGGTTAGGAGTTGAGGGATTGGAATTCTTGAGTTTTGC	1140
TTTATTTGTTATATGTAATAATATCGACCTCTAGAGATCGGTTAGTTTATGTAATTTTAT	1200
TTTTTCATATCACTTGCAATAAAACTATAGTATACGTTAAAAAAGAAAAAAAAA	1255

Abb. G-10 *Solanum tuberosum pmt2*- cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz

Start- und Stop-Codon sind unterstrichen.

G 5.3 *spds*-cDNA

GGTGAAGAAGACTGAAGAGTCCTCAGATTTGCGGTAACAATTGTAGGGATCCCACCTGAG	60
TTAAAGGGTTAAATTCAAGAACCCTGTTTTGTTTTGGGGCCTATAAATAGACAAGGTTTG	120
GTTATGGCAGATGAGTGTGCTGCTTTTGTGAAGGGAAGTGAATTGCCAGTGAAGAGGCCA	180
<u>M A D E C A A F V K G T E L P V K R P</u>	
AGAGAGGAAGAAGCAGAAACAGAGATGGAGGCAGCCAATAACAGCAACAACAACAATGGT	240
<u>R E E E A E T E M E A A N N S N N N N G</u>	
TGCAGCACCAATGAGAAAGAGGAGCCATCTCCTTATATCTCTTCTGTTTTACCTGGATGG	300
<u>C S T N E K E E P S P Y I S S V L P G W</u>	
TTCTCTGAGATTAGCCCCCTTTGGCCTGGGGAAGCACACTCATTGAAGGTTGAGAAGATA	360
<u>F S E I S P L W P G E A H S L K V E K I</u>	
CTGTTTCAGGGGAAGTCTGATTACCAGAATGTCTTGTTTTTTCAGTCATCAACTTATGGA	420
<u>L F Q G K S D Y Q N V L V F Q S S T Y G</u>	
AAGGTGCTTGTGTTTGGATGGTGTGATCCAGCTTACCGAGAGGGATGAATGTGCTTATCAA	480
<u>K V L V L D G V I Q L T E R D E C A Y Q</u>	
GAGATGATCACTCATCTTCCTCTTTGTTCAATTCCCAACCCCAAAAAGGTGCTGGTTATT	540
<u>E M I T H L P L C S I P N P K K V L V I</u>	
GGAGGAGGAGATGGTGGTGTCTTGCGTGAGGTATCCCGTCATTCTTCTGTGCGAACAGATC	600
<u>G G G D G G V L R E V S R H S S V E Q I</u>	
GACATATGTGAGATTGACAAAATGGTAGTTGAGGTTGCTAAACAATTTTTCCCAGATGTA	660
<u>D I C E I D K M V V E V A K Q F F P D V</u>	
GCTGTAGGATATGAGGATCCACGTGTGAATCTCCGCATTGGTGATGGAGTTGCATTTTTG	720
<u>A V G Y E D P R V N L R I G D G V A F L</u>	
AAAAATGTTCCCTGCCGGAAGTATGATGCTGTCATAGTGGATTTCATCTGACCCTATTGGT	780
<u>K N V P A G T Y D A V I V D S S D P I G</u>	
CCAGCACAAGAGTTGTTTCGAAAAGCCTTTCTTTGAATCTATAGCAAAGGCTCTTCGTCCT	840
<u>P A Q E L F E K P F F E S I A K A L R P</u>	
GGAGGGGTTGTAGCTACACAGGCTGAGAGCATATGGCTTACATGCACATAATTGAAGAA	900
<u>G G V V A T Q A E S I W L H M H I I E E</u>	
ATTGTTGCTAATTGCCGCCAGATCTTCAAAGGCTCAGTCAACTATGCTTGGACTACTGTT	960
<u>I V A N C R Q I F K G S V N Y A W T T V</u>	
CCTACTTATCCAAGTGGCATGATTGGTTTTCATGCTCTGCTCTACTGAGGGACCTGCAGTT	1020
<u>P T Y P S G M I G F M L C S T E G P A V</u>	
GATTTCAAGAACCCTATTAACCCCATCGACGATGAAAGCCCTGTCAAGACCATTGAACCT	1080
<u>D F K N P I N P I D D E S P V K T I E P</u>	
TTGAAGTTCTACAACCTCTGAGATTCACCAAGCATATTCTGTTTGCCATCATTCGCCAAG	1140
<u>L K F Y N S E I H Q A S F C L P S F A K</u>	
AGGGTGATCGAAACCAAAGGAAAATGATGGGGCACATTTTTGAAGGAGTGCTTAATTAGTG	1200
<u>R V I E T K G K</u>	
TACAACCTCCCTATAATTATTATTCAGTTTTTTTTTAAATTCAAGACAATGTTTTTAGGTT	1260
ATTTAAGCCAAATGGAGTTGAATGATGGAATATAATTTCTTTGTGCTGGATAAAGTTTT	1320
CATCTTGATTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	1347

Abb. G-11 *Solanum tuberosum spds*- cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz

Start- und Stop-Codon sind unterstrichen. Die Sequenz wurde in die EMBL-Datenbank eingetragen (AJ345003).

G 6 Charakterisierung der PMT

G 6.1 Nachweis der Substratspezifität

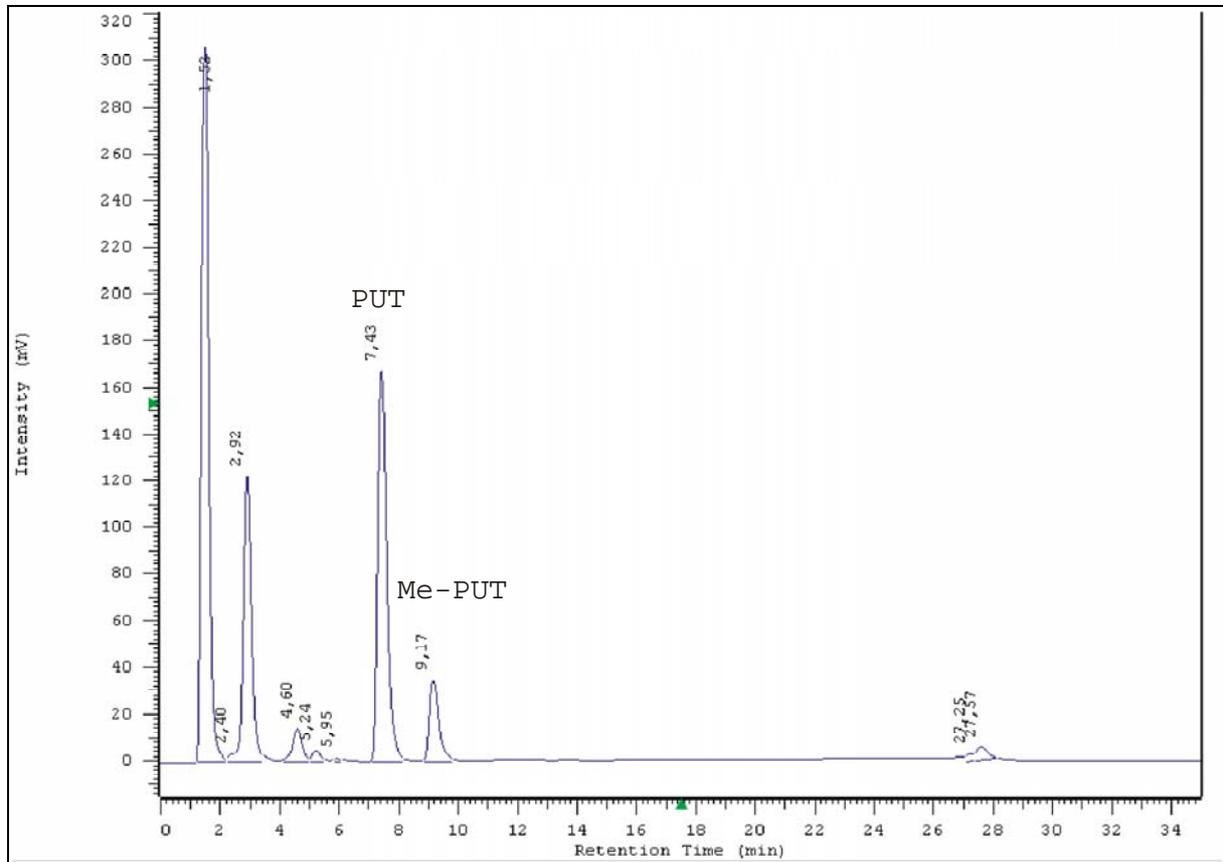
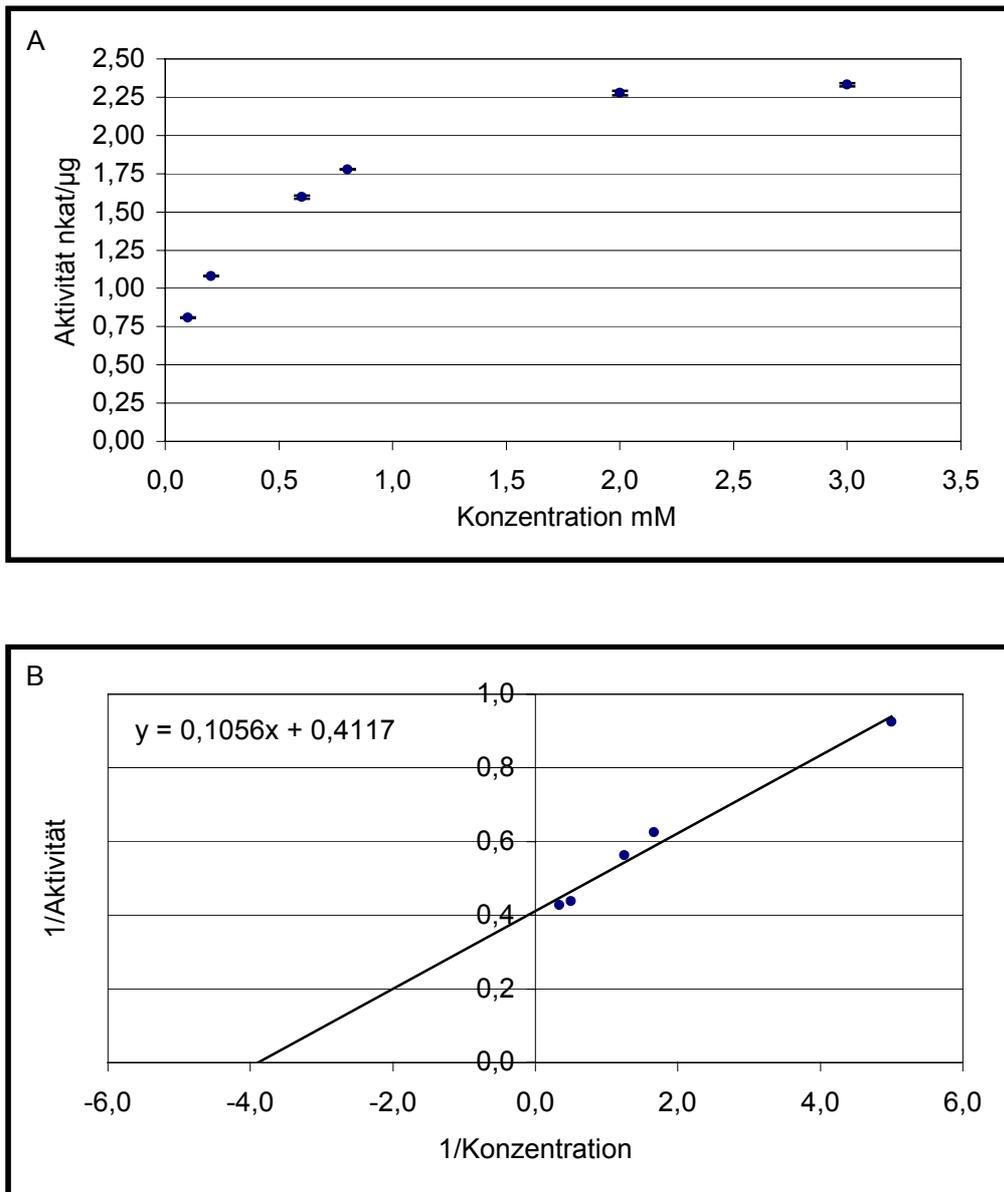


Abb. G-12 Enzymumsatz der rekombinant gewonnenen PMT

HPLC-Chromatogramm (Fluoreszenz-Detektor-Signal/Retentionszeit in min);
Dansylderivate: PUT - Putrescin; Me-PUT - *N*-Methylputrescin

G 6.2 K_m -Wert und V_{max} -BestimmungAbb. G-13 K_m - und V_{max} -Bestimmung der PMT

A - Michaelis-Menten-Kinetik; B - Lineweaver-Burk-Darstellung;

 K_m - und V_{max} -Bestimmung der PMT bei pH 9,0; Konzentrationsbereich 0 - 3 mM;

Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

G 7 Vektorkarten

G 7.1 Vektorkarte der *A. belladonna pmt* in pBI121

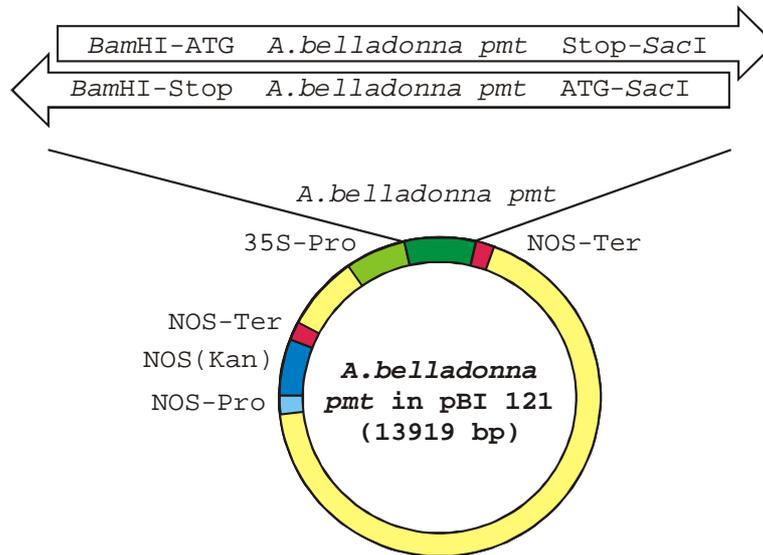


Abb. G-14 *A. belladonna pmt* (AB018573) in pBI121 (Clontech) in *sense*- und *antisense*-Orientierung

Nach Entfernung des GUS-Gens durch Restriktion mit *Bam*HI und *Sac*I wurde die c-DNA in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung in den Vektor kloniert.

G 7.2 Vektorkarte der *S. tuberosum trII* in pBI121

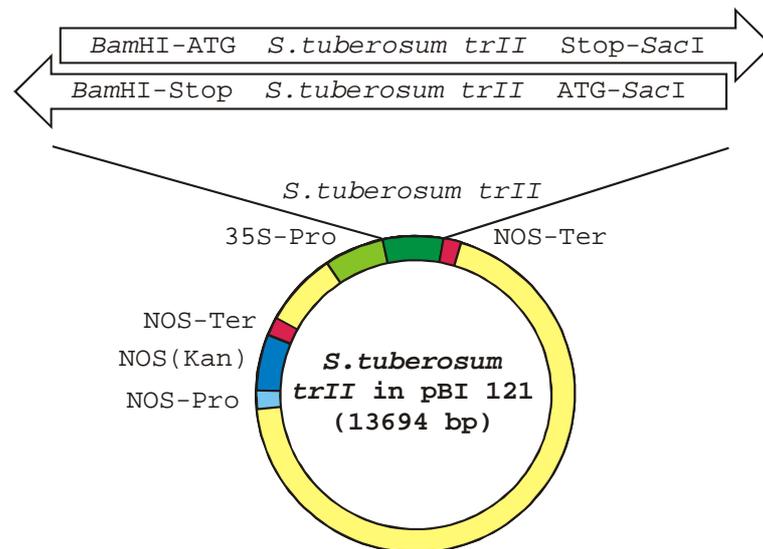


Abb. G-15 *S. tuberosum trII* (AJ292343) in pBI121 (Clontech) in *sense*- und *antisense*-Orientierung

Nach Entfernung des GUS-Gens durch Restriktion mit *Bam*HI und *Sac*I wurde die c-DNA in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung in den Vektor kloniert.

G 7.3 Vektorkarte der *S. tuberosum* *pmt1* in pET21d

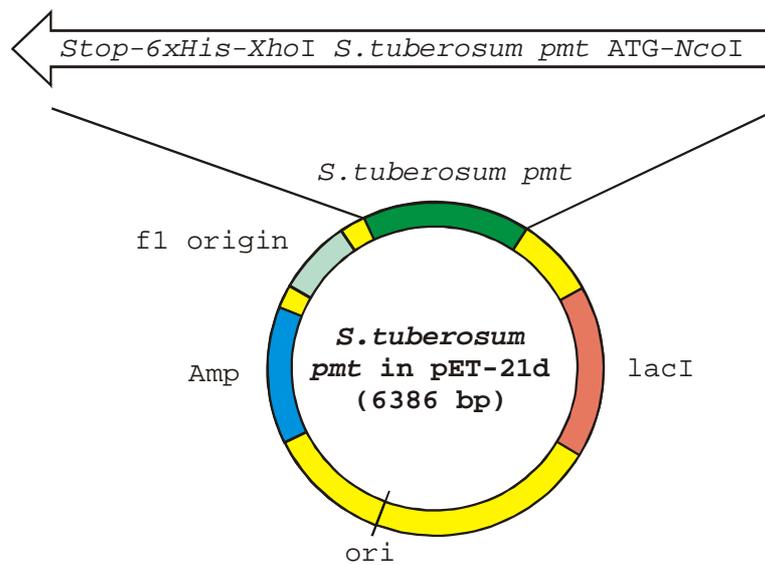


Abb. G-16 *S. tuberosum pmt1* (AJ605553) in pET21d (Novagen)

Die cDNA wurde zwischen *NcoI* und *XhoI* so eingefügt, dass der 6fache Histidin-Anhang genutzt werden konnte.

G 7.4 Vektorkarte der *S. tuberosum* *spds* in pET21d

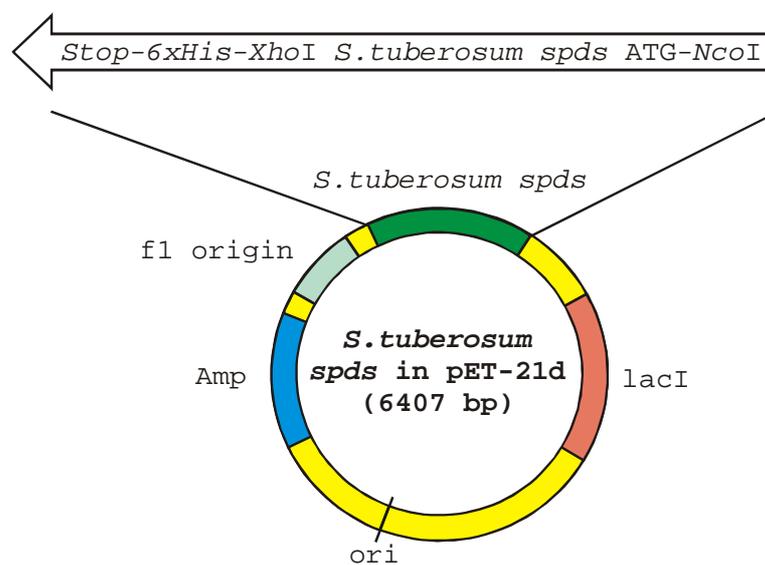


Abb. G-17 *S. tuberosum spds* (AJ345003) in pET21d (Novagen)

Die cDNA wurde zwischen *NcoI* und *XhoI* so eingefügt, dass der 6fache C-terminale Histidin-Anhang genutzt werden konnte.

G 7.5 Vektorkarte der Chimäre SH in pET21d

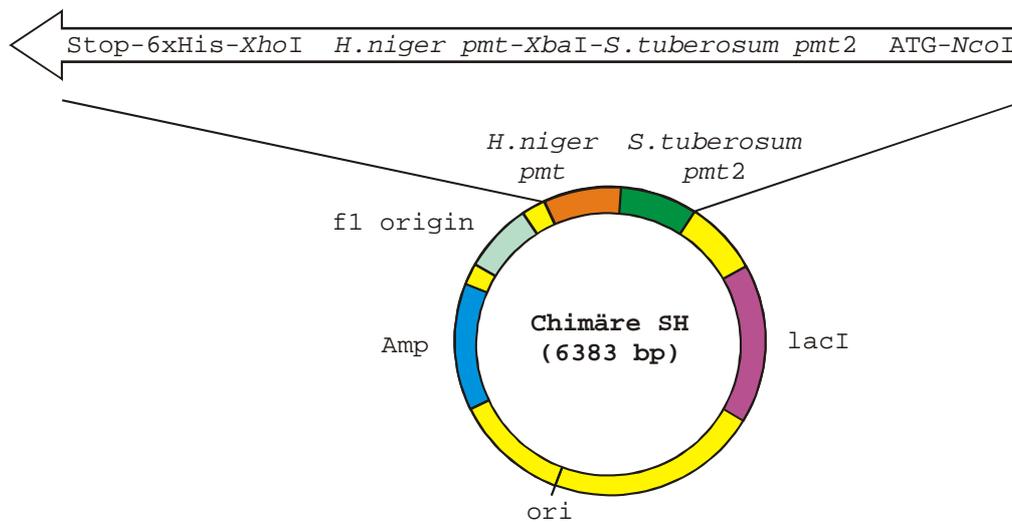


Abb. G-18 Chimäre SH aus *S. tuberosum pmt2* und *H. niger pmt*

Nach separater Klonierung beider *pmt*-cDNA's in den Vektor pET21d mit *NcoI* und *XhoI* wurde eine Restriktion beider Konstrukte mit *NcoI* und *XbaI* durchgeführt. Nach Auftrennung und Reinigung erfolgte die wechselseitige Ligation der isolierten *pmt*-cDNA-Fragmente in die Vektorfragmente.

G 7.6 Vektorkarte der Chimäre HS in pET21d

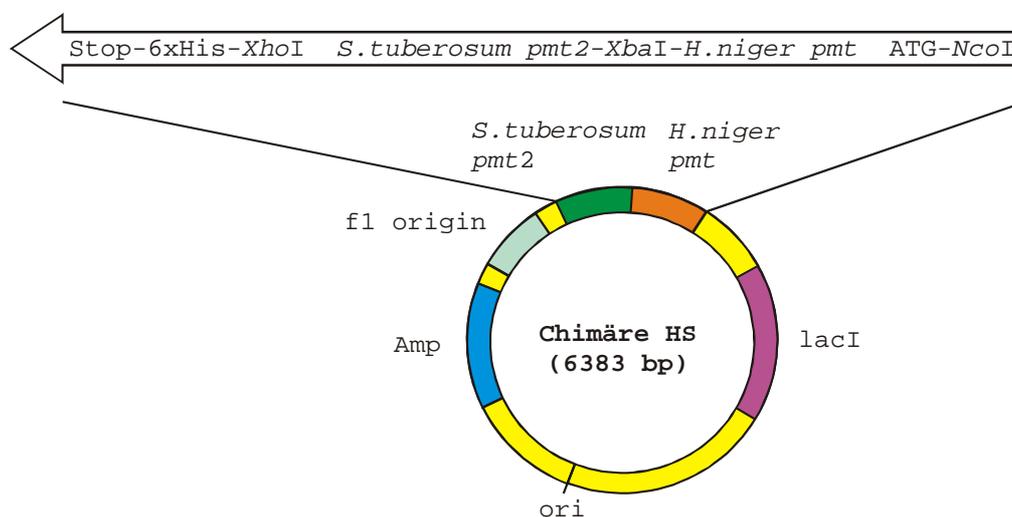


Abb. G-19 Chimäre HS aus *H. niger pmt* und *S. tuberosum pmt2*

Nach separater Klonierung beider *pmt*-cDNA's in den Vektor pET21d mit *NcoI* und *XhoI* wurde eine Restriktion beider Konstrukte mit *NcoI* und *XbaI* durchgeführt. Nach Auftrennung und Reinigung erfolgte die wechselseitige Ligation der isolierten *pmt*-cDNA-Fragmente in die Vektorfragmente.

G 7.7 Vektorkarte der *S. tuberosum* *pmt2* in pQE30

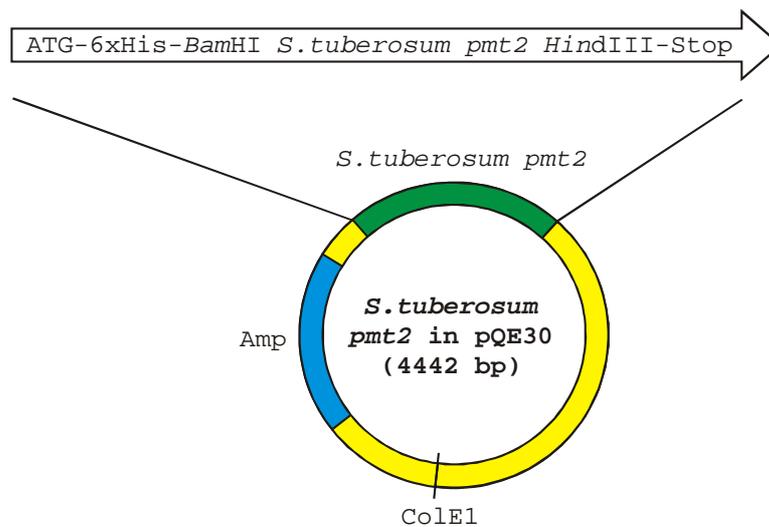


Abb. G-20 *S. tuberosum pmt2* in pQE30 (Qiagen)

Die cDNA wurde zwischen BamHI und HindIII so eingefügt, dass der 6fache N-terminale Histidin-Anhang genutzt werden konnte.

G 7.8 Vektorkarte der *S. tuberosum* *pmt2* in pPICZ α A

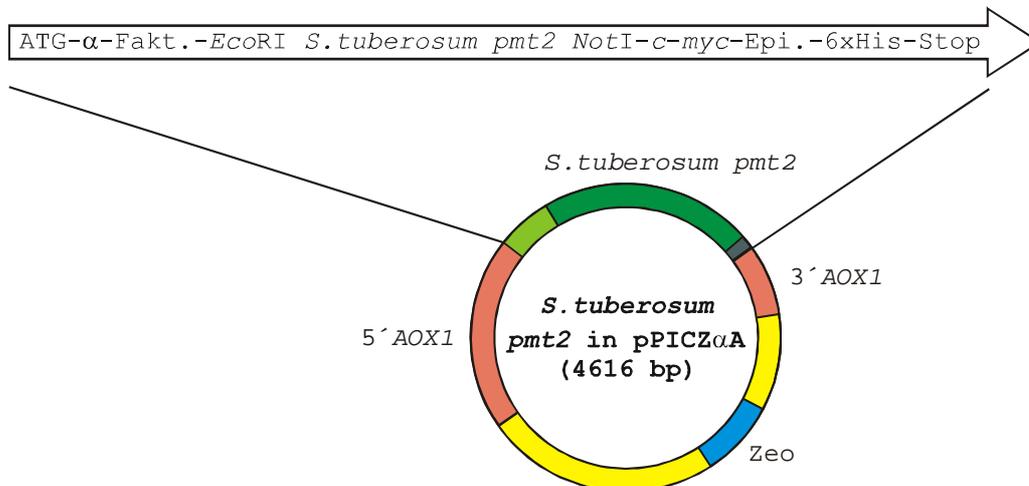


Abb. G-21 *S. tuberosum pmt2* in pPICZ α A (Invitrogen)

Die cDNA wurde zwischen EcoRI und NotI ligiert. Die Klonierung führte zu einem Konstrukt mit N-terminalem α -Faktor Sekretionssignal, C-terminalem *c-myc*-Epitop und 6fachem Histidin-Anhang.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Birgit Dräger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und stetige fachliche und persönliche Unterstützung und Freiheit in der Bearbeitung des Themas. Dankbar bin ich vor allem für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthaltes am John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney in Norwich (Großbritannien) unter Anleitung von Dr. Mark J. Leech und Dr. Leo A. H. Zeef. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Dr. Pedro Rocha bedanken, der mir als Kollege und Freund bei den Transformationsversuchen hilfreich zur Seite stand.

Ein herzliches Dankeschön gilt vor allem meiner Arbeitsgruppe für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima, welches wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrug. Vielen Dank für die schöne Zeit am Institut und im Privaten.

Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen von Diplomarbeiten danke ich Angelika Gils, Matthias Fischer-Schäfer und Marcin Kaminski.

Danken möchte ich außerdem den Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Biologie, insbesondere Frau Watzka, Frau Schöne, Frau Marx, Frau Wodak und Frau Ködel, die mit ihrem Know-how und technischer Unterstützung einen wichtigen Beitrag zum Erfolg der Arbeit leisteten.

Für die Gewährung eines Stipendiums nach Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt danke ich.

Meiner Familie und meiner Freundin Nicole möchte ich mit dieser Arbeit für jegliche Unterstützung auf dem Weg bis hierher danken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Dissertationschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle (Saale), 11.04.2005

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Olaf Stenzel
Geburtsdatum: 29.09.1973
Geburtsort: Altenburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1980-07/1990 Oberschule "Peter Göring" Lucka
09/1990-07/1992 Gymnasium Meuselwitz

Wehrdienst:

07/1992-07/1993 Bundeswehr

Studium/Praktika:

09/1993-07/1997 Pharmaziestudium an der Martin-Luther
Universität Halle-Wittenberg
10/1997-04/1998 Diplomarbeit an der Martin-Luther
Universität Halle-Wittenberg
Thema: "Untersuchung von Genen des
Alkaloidstoffwechsels in *Solanum tuberosum*"
07/1998-10/1998 Praktikum in der "Apotheke im Hauptbahnhof"
Leipzig
11/1998 Approbation als Apotheker

Promotion:

01/1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut
für Pharmazeutische Biologie der Martin-
Luther Universität Halle-Wittenberg in der
Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. B. Dräger
seit 06/2003 Anstellung als Apotheker in der "Apotheke
im Halle-Center" Peißen

Halle (Saale) 11.04.2005