

# **Calystegine in *Solanum tuberosum* L. – Biosynthese und physiologische Bedeutung im Kohlenhydratstoffwechsel**

## **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

Frau Diplom-Pharmazeutin

**Ute Richter**

geb. am 03.04.1978 in Torgau

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Herr Prof. Dr. Uwe Sonnewald
3. Herr Prof. Dr. Stephan Clemens

Halle (Saale), den 29.11.2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000010939**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010939>]

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	a
Abkürzungsverzeichnis .....	f
Publikationen und wissenschaftliche Beiträge .....	i
<b>A Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>A.1 <i>Solanum tuberosum</i> L.....</b>	<b>1</b>
<b>A.2 Calystegine .....</b>	<b>2</b>
A.2.1 Struktur und Verbreitung .....	2
A.2.2 Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese .....	3
A.2.3 Regulation der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese.....	6
A.2.4 Physiologische Bedeutung der Calystegine .....	7
A.2.5 Analytik der Calystegine .....	9
<b>A.3 Kohlenhydratstoffwechsel.....</b>	<b>9</b>
A.3.1 Saccharosesynthase .....	11
A.3.2 Invertase.....	11
A.3.3 UDPGlucose-Pyrophosphorylase .....	12
A.3.4 Metabolitenprofilanalyse.....	13
<b>A.4 Calystegine und Kohlenhydratstoffwechsel.....</b>	<b>13</b>
<b>A.5 Aufgabenstellung .....</b>	<b>14</b>
<b>B Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>B.1 Material.....</b>	<b>15</b>
B.1.1 Pflanzenmaterial.....	15
B.1.1.1 Lagerung der Kartoffelknollen .....	16
B.1.1.2 Kultivierung von Kartoffelpflanzen .....	16
B.1.2 Bakterienstämme .....	17
B.1.3 Vektoren .....	17
B.1.4 Oligonukleotide.....	17
B.1.5 Enzyme und Kits .....	18
B.1.6 Puffer, Standardlösungen und Medien .....	18
B.1.7 Chemikalien und Standards .....	18
B.1.8 Geräte und Hilfsmittel .....	19
<b>B.2 Methoden .....</b>	<b>19</b>
B.2.1 Analytische Methoden .....	19
B.2.1.1 Calystegine und Intermediate der Tropanalkaloidbiosynthese.....	19
B.2.1.1.1 Extraktion und Derivatisierung von Calysteginen .....	19
B.2.1.1.2 Extraktion von Intermediaten der Tropanalkaloidbiosynthese.....	20
B.2.1.1.3 Fütterungsversuche mit Tropinon.....	20

B.2.1.1.4	Fütterungsversuche mit Kohlenhydraten.....	20
B.2.1.1.5	Gaschromatographie (GC).....	20
B.2.1.1.6	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS) .....	21
B.2.1.2	Analyse von Stoffwechselmetaboliten ( <i>metabolic profiling</i> ).....	22
B.2.1.2.1	Extraktion von Stoffwechselmetaboliten.....	22
B.2.1.2.2	Derivatisierung der Stoffwechselmetabolite .....	22
B.2.1.2.3	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS) .....	23
B.2.1.2.4	Statistische Auswertung.....	23
B.2.1.3	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).....	24
B.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	25
B.2.2.1	Isolierung von DNA aus Bakterien .....	25
B.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial .....	25
B.2.2.2.1	Isolierung mit TRIzol <sup>®</sup> -Reagenz .....	25
B.2.2.2.2	Isolierung mit NTES-Puffer und Phenol/Chloroform.....	25
B.2.2.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	26
B.2.2.4	cDNA-Synthese.....	26
B.2.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
B.2.2.5.1	Standard-PCR.....	26
B.2.2.5.2	Kolonie-PCR .....	27
B.2.2.6	Klonierung und Sequenzierung .....	27
B.2.2.7	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i> .....	28
B.2.2.8	Northern Blot.....	28
B.2.2.9	Dot Blot .....	28
B.2.2.10	Radioaktive Sondenmarkierung .....	28
B.2.2.11	Hybridisierung von Northern Blot und Dot Blot .....	29
B.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	29
B.2.3.1	Proteinextraktion .....	29
B.2.3.1.1	Denaturierende Gesamtproteinextraktion aus Pflanzengeweben .....	29
B.2.3.1.2	Proteinextraktion aus Bakterien .....	30
B.2.3.2	Quantifizierung von Proteinen .....	30
B.2.3.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	30
B.2.3.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Esen .....	30
B.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
B.2.3.3.1	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	31
B.2.3.3.2	Silberfärbung von Proteingelen .....	31
B.2.3.4	Western Blot.....	32
B.2.3.4.1	Detektion von Proteinen auf dem Western Blot .....	32
B.2.3.5	Proteinreinigung .....	33
B.2.3.5.1	Nickelaffinitätschromatographie .....	33
B.2.3.5.2	Proteinkonzentrierung .....	33
B.2.3.6	Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase .....	34
B.2.3.6.1	Dreistufiger photometrischer Enzymassay.....	34
B.2.3.6.2	Einstufiger photometrischer Enzymassay .....	34
B.2.3.6.3	Bestimmung der Enzymaktivität durch HPLC .....	35
B.2.3.7	Enzymaktivität der Phosphoglucomutase .....	35
B.2.3.8	Enzymaktivität der Glucose-6-phosphatdehydrogenase .....	35
B.2.3.9	Bestimmung des $K_m$ -Wertes.....	36
B.2.3.10	Hemmversuche mit Calystegin B <sub>2</sub> .....	36
B.2.3.11	Bestimmung des $K_i$ -Wertes.....	36

<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>C.1</b>	<b>Untersuchungen zur Bildung der Calystegine in <i>Solanum tuberosum</i></b>	<b>37</b>
C.1.1	Transgene Kartoffelknollen und ihre Eigenschaften	38
C.1.1.1	Transgene Linien und Kohlenhydratstoffwechsel	38
C.1.1.2	Knollengröße und Knollenanzahl	39
C.1.1.3	Keimungsverhalten	39
C.1.1.4	Trockenmasseanteil	40
C.1.2	Calysteginbiosynthese 10 Tage nach der Ernte	41
C.1.2.1	Calysteginakkumulation	41
C.1.2.2	Transkriptnachweis	42
C.1.2.3	Proteinnachweis	43
C.1.3	Calysteginbiosynthese während der Lagerung	44
C.1.3.1	Calysteginakkumulation	44
C.1.3.1.1	Calysteginakkumulation in der Schale	44
C.1.3.1.2	Calysteginakkumulation in Kartoffelaugen	45
C.1.3.1.3	Calysteginakkumulation in Keimen	46
C.1.3.2	Transkriptnachweis	46
C.1.3.2.1	Transkriptnachweis der <i>trII</i>	46
C.1.3.2.2	Transkriptnachweis der <i>trI</i>	48
C.1.3.3	Intermediate der Biosynthese	48
C.1.4	Calysteginbiosynthese in Kartoffelpflanzen	49
C.1.4.1	Calysteginakkumulation	49
C.1.4.2	Transkriptnachweis	52
C.1.4.3	Proteinnachweis	53
C.1.4.4	Intermediate der Biosynthese	54
C.1.5	Calysteginbiosynthese in Kartoffelknollen nach Kältelagerung	55
C.1.5.1	Calysteginakkumulation	56
C.1.5.2	Transkriptnachweis	57
C.1.5.3	Proteinnachweis	57
C.1.5.4	Intermediate der Biosynthese	58
<b>C.2</b>	<b>Parallele Analyse von Calysteginen und Metaboliten in <i>Solanum tuberosum</i> durch GC-MS (<i>metabolic profiling</i>)</b>	<b>59</b>
C.2.1	Calysteginanalyse durch GC-MS ( <i>metabolic profiling</i> )	59
C.2.1.1	Erfassung von Calysteginstandardsubstanzen in der GC-MS	59
C.2.1.2	Nachweis von Calysteginen in Kartoffelgeweben	61
C.2.1.3	Quantifizierung von Calysteginen in Kartoffelgeweben	62
C.2.1.3.1	Calystegingehalt in Kartoffelkeimen	63
C.2.1.3.2	Calystegingehalt in Kartoffelschalen	63
C.2.1.3.3	Calystegingehalt in Kartoffelschalen während der Lagerung	64
C.2.2	Analyse von Stoffwechselmetaboliten durch GC-MS	65
C.2.2.1	Quantifizierung von Stoffwechselmetaboliten	67
C.2.2.1.1	Stoffwechselmetabolite in Kartoffelkeimen	67
C.2.2.1.2	Stoffwechselmetabolite in Kartoffelschalen	70
C.2.2.1.3	Stoffwechselmetabolite in Kartoffelschalen während der Lagerung	72
C.2.2.1.4	Metabolite der Calysteginbiosynthese in Keimen und Schalen	73
C.2.3	Korrelationen von Calysteginen mit Stoffwechselmetaboliten	74
<b>C.3</b>	<b>Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese</b>	<b>78</b>

C.3.1	Calysteginakkumulation.....	78
C.3.1.1	Calysteginakkumulation in Keimen .....	78
C.3.1.2	Calysteginakkumulation in der Schale .....	79
C.3.2	Transkriptakkumulation .....	79
C.3.3	Calystegine und Kältestress .....	81
<b>C.4</b>	<b>Wirkung von Calysteginen auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels .....</b>	<b>81</b>
C.4.1	Klonierung, Expression und Reinigung der UDPGlucose-Pyrophosphorylase .....	82
C.4.2	Enzymaktivität und $K_m$ -Wert-Bestimmung .....	83
C.4.3	Calystegin $B_2$ -Einfluss auf die UDPGlucose-Pyrophosphorylase .....	83
C.4.4	Kinetik der Phosphoglucomutase ( $K_m$ - und $K_i$ -Wert-Bestimmung).....	84
<b>D</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>
<b>D.1</b>	<b>Calysteginbiosynthese in transgenen Kartoffelknollen und Pflanzen .....</b>	<b>85</b>
D.1.1	Keimungsverhalten und Trockenmasseanteil .....	85
D.1.2	Calysteginakkumulation.....	86
D.1.2.1	<i>Solanum tuberosum</i> - Wildtyp .....	86
D.1.2.2	Calystegine und veränderter Kohlenhydratstoffwechsel .....	87
D.1.3	Expression der Biosyntheseenzyme .....	88
D.1.3.1	Putrescin- <i>N</i> -methyltransferase.....	89
D.1.3.2	Tropinonreduktase II .....	89
D.1.3.3	Tropinonreduktase I .....	90
D.1.3.4	Biosyntheseenzyme und veränderter Kohlenhydratstoffwechsel .....	91
D.1.4	Bilanz der Calysteginbiosynthese.....	92
D.1.4.1	Lokalisation der Calysteginbiosynthese .....	93
D.1.4.2	Einfluss der PMT und der TRII auf die Calysteginakkumulation.....	94
<b>D.2</b>	<b>Parallele Analyse von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten .....</b>	<b>96</b>
D.2.1	Calystegine und Stoffwechselmetabolite in <i>S. tuberosum</i> .....	96
D.2.2	Korrelationen von Calysteginen mit Stoffwechselmetaboliten .....	96
D.2.2.1	Calystegine und Metabolite der Calysteginbiosynthese .....	97
D.2.2.1.1	Putrescin und Calystegine .....	97
D.2.2.1.2	Calystegin $A_3$ und Calystegin $B_2$ .....	98
D.2.2.2	Calystegine und Stoffwechselmetabolite.....	99
D.2.2.2.1	Saccharose und Calystegine .....	99
D.2.2.2.2	Trehalose und Calystegine .....	101
D.2.2.2.3	Zuckerphosphate und Calystegine.....	101
<b>D.3</b>	<b>Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese.....</b>	<b>102</b>
D.3.1	Calysteginakkumulation.....	102
D.3.2	Transkriptakkumulation .....	103
<b>D.4</b>	<b>Wirkung von Calysteginen auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels .....</b>	<b>103</b>
D.4.1	Calystegine und UDPGlucose-Pyrophosphorylase .....	103
D.4.2	Calystegine und Phosphoglucomutase .....	104
<b>D.5</b>	<b>Physiologische Bedeutung der Calystegine.....</b>	<b>105</b>
<b>D.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>106</b>

<b>E Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>F Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>G Anhang.....</b>	<b>I</b>
<b>G.1 Calysteginbiosynthese in transgenen Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen ..I</b>	
G.1.1 Trockenmasseanteil in transgenen Kartoffelknollen während der Lagerung .....	I
G.1.1.1 Zusammenfassung Trockenmasseanteil.....	VI
G.1.2 Calysteginakkumulation.....	VII
G.1.2.1 Calystegingehalt in transgenen Kartoffelknollen 10 Tage nach der Ernte .....	VII
G.1.2.2 Calystegingehalt in transgenen Kartoffelknollen während der Lagerung .....	VIII
G.1.2.3 Calystegingehalt in Kartoffelpflanzen .....	XII
G.1.2.4 Calystegingehalt in Kartoffelknollen nach Kältelagerung .....	XIII
G.1.2.5 Calystegingehalt in Kartoffeln mit gehemmter ATP/ADP-Transporteraktivität .....	XIV
G.1.3 Intermediate der Biosynthese .....	XIV
G.1.3.1 Intermediate in Keimen .....	XIV
G.1.3.2 Intermediate in Kartoffelpflanzen.....	XIV
G.1.3.3 Intermediate in Kartoffelknollen nach Kältelagerung .....	XV
<b>G.2 Parallele Analyse von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten .....</b>	<b>XVI</b>
G.2.1 Calysteginakkumulation.....	XVI
G.2.1.1 Calystegingehalt in Keimen.....	XVI
G.2.1.2 Calystegingehalt in der Schale.....	XVI
G.2.1.3 Calystegingehalt in der Schale während der Lagerung.....	XVII
G.2.2 Akkumulation von Stoffwechselmetaboliten .....	XVIII
G.2.2.1 Stoffwechselmetabolite in Keimen .....	XVIII
G.2.2.2 Stoffwechselmetabolite in der Schale .....	XXI
<b>G.3 Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese.....</b>	<b>XXV</b>
G.3.1 Calysteginakkumulation in Keimen.....	XXV
G.3.2 Calysteginakkumulation in der Schale.....	XXV
G.3.3 Calysteginakkumulation bei Kältestress .....	XXVI
<b>G.4 Calysteginwirkung auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels .....</b>	<b>XXVI</b>
G.4.1 Wirkung von Calystegin B <sub>2</sub> auf die Phosphoglucomutase .....	XXVI
G.4.2 Wirkung von Calystegin B <sub>2</sub> auf die UDPGlucose-Pyrophosphorylase .....	XXVI

## Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette</i> -Transporter
Abb.	Abbildung
ADC	Arginindecarboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
<i>antisense</i>	3`-5`-Orientierung einer cDNA
AMD-TLC	<i>Automated multiple development thin layer chromatography</i>
Analyt-ID	<i>analyt identifier</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovin serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CaMV 35S Promotor	<i>cauliflower mosaic virus</i> 35S Promotor
Da	Dalton
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DAD	<i>dioden array detector</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMFA	Difluormethylarginin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	<i>enzyme classification</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
FB	Fachbereich
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
H6H	Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMDS	Hexamethyldisiloxan
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
$K_i$	Inhibitorkonstante
$k_{cat}$	katalytische Konstante
klx	kilolux
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$K'_m$	Michaelis-Menten-Konstante in Gegenwart eines Inhibitors
KMO	Kaiser-Mayer-Olkin-Maß
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MLU	Martin-Luther Universität
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MPIMP	Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie
MPO	<i>N</i> -Methylputrescinoxidase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure

MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
m/v	Masse/Volumen
MW	Mittelwert
MX	Methyloxim
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (reduzierte Form)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NIST	<i>National Institut of Standards and Technology</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanzspektroskopie)
OCS-Terminator	Terminator des Octopinsynthesegens
OD	optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Patatin B33	knollenspezifischer Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat
PMT, <i>pmt</i>	Putrescin- <i>N</i> -methyltransferase, Gen
PND	Phosphor-Stickstoff-Detektor
Primer dir	direkter Primer
Primer rev	reverser Primer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	<i>reverse phase</i>
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSSa	Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDR	<i>short chain dehydrogenase/reductase</i> (kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen)
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sense</i>	5´-3´-Orientierung einer cDNA
SPDS	Spermidinsynthese
SPS	Spermisynthese
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
<i>Suc2</i>	Gen der Invertase (aus Hefe)
<i>Sus3, Sus4</i>	Gene der Saccharosesynthese (aus <i>Solanum tuberosum</i> )
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TB-Medium	<i>Terrific Broth</i> Medium
TBON	8-Thiabicyclo[3.2.1]octan-3-on
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TM	Trockenmasse
TMCS	Trimethylchlorsiloxan
TMS-	Trimethylsilyl-
TRI, <i>trl</i>	tropinformende Tropinonreduktase, Gen
TRII, <i>trII</i>	pseudotropinformende Tropinonreduktase, Gen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	Technische Universität
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat 20
UDP	Uridindiphosphat
UGPase	UDPGlucose-Pyrophosphorylase
U-IN1	Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase
U-IN2	Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase

UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
var.	Varietät (Sorte)
vgl.	vergleiche
vs.	versus
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp

## Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

### Publikationen:

Richter, U., Rothe, G., Fabian, A.-K., Rahfeld, B., Dräger, B., **2005**, Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *Journal of Experimental Botany* 56: 645-652

Dräger, B., Richter, U., **2005**, Calystegine und veränderter Kohlenhydratstoffwechsel in Kartoffeln. *Bioforum* 28: 27-29

Kaiser, H., Richter, U., Keiner, R., Brabant, A., Hause, B., Dräger, B., **2006**, Immunolocalisation of two tropinone reductases in potato (*Solanum tuberosum* L.) root, stolon, and tuber sprouts. *Planta* DOI: 10.1007/s00425-006-0335-8

Richter, U., Sonnewald, U., Dräger, B., **in Vorbereitung**, Calystegines in potatoes with altered carbohydrate metabolism.

Richter, U., Kopka, J., Fehrle, I., Gatzke, N., Sonnewald, U., Dräger, B., **in Vorbereitung**, Calystegines in potato tuber sprouts correlate with disaccharides and sugar phosphates.

### Poster und Vorträge:

Richter, U., Dräger, B., **2004**, Calystegines and tropinone reduction in transgenic potato tubers (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée). *Deutsche Botanikertagung, Braunschweig* - Poster

Richter, U., Dräger, B., **2005**, Calystegine und Tropinonreduktion in transgenen Kartoffelknollen und Pflanzen (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée). *Doktorandentagung der DPhG, Leipzig* - Vortrag

## A Einleitung

### A.1 *Solanum tuberosum* L.

Die Kartoffel *Solanum tuberosum* L. gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae). *S. tuberosum* wird hierbei dem Genus *Solanum* und dem Subgenus *Potatoe* zugeordnet (Olmstead und Palmer, 1997). Die Kartoffel ist heute eines der bedeutendsten Weltnahrungsmittel. Sie stammt ursprünglich aus Südamerika und wird heute fast weltweit kultiviert (Alberts und Mullen, 2003; Frohne und Pfänder, 2004). Die Kartoffelpflanze ist eine ausdauernde, krautige, 40-100 cm große Staude mit 10-25 cm langen und 6-12 cm breiten Blättern. Die Blätter stehen wechselständig und sind unterbrochen, unpaarig gefiedert. Die radiärsymmetrischen Blüten sind fünfzipflig mit weißen oder bläulichen Kronblättern. Die Blütezeit der Kartoffel reicht von Juli bis Oktober. Ein weiteres Merkmal der Kartoffelpflanze sind hellgrüne Beeren mit 1,5-3 cm Durchmesser (Rothmaler 2002). Kartoffelpflanzen bilden unterirdisch Stolone. Die verdickten Enden der Stolone schwellen zu Knollen an, die eine Speicherfunktion in der Pflanze übernehmen. Die Vermehrung der Kulturkartoffeln erfolgt vegetativ. Nach einer Dormanzphase wachsen aus keimenden Knollen neue Pflanzen heran (Strasburger et al., 2002).



**Abb. A-1: Die Kartoffel - *Solanum tuberosum* L.: Blüten - Pflanze - Knollen**

Wichtige biologisch aktive Inhaltsstoffe der Kartoffelpflanze sind Glycoalkaloide, Calystegine und Polyphenole (Friedman 2004). Die toxischen Glycoalkaloide Solanin und Chaconin akkumulieren vor allem in oberirdischen Pflanzenteilen, in Beeren sowie in grünen Knollen und Knollenkeimen (Friedman und McDonald, 1997). Die Calystegine A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> sind hauptsächlich in Kartoffelknollen und in Keimen zu finden (Keiner und Dräger, 2000). Polyphenole, wie das Kaffeesäurederivat Chlorogensäure, akkumulieren auch zum großen Teil in Blättern und in Keimen (Friedman 2004).

Die Kartoffelknolle dient als Speicherorgan für Stärke. Stärke ist das Hauptpolysaccharid in *S. tuberosum* und akkumuliert in der Knolle zu ca. 20%. Stärke wird als Lebensmittel verwendet und ist auch Bestandteil von Pudern und Streupulvern. Des weiteren gibt es vielfältige Einsatzmöglichkeiten für Stärke in der pharmazeutischen Technologie. In der Tablettenherstellung dient Stärke als Füllmittel, Sprengmittel und Zerfallsbeschleuniger. Ferner wurden Anwendungen als Fließregulierungsmittel, als Absorptionmittel und als Hydrogelgerüstbildner beschrieben (Hänsel und Sticher, 2004).

## A.2 Calystegine

### A.2.1 Struktur und Verbreitung

Calystegine sind Nortropanalkaloide, die durch ein 8-Azabicyclo[3.2.1]octan-Grundgerüst gekennzeichnet sind (Dräger 2004). Das Grundgerüst ist mehrfach hydroxyliert, wobei je nach Calystegin der Hydroxylierungsgrad, die Position und die stereochemische Anordnung der Hydroxylgruppen variiert. Trihydroxylierte Calystegine werden der A-Gruppe, tetrahydroxylierte Calystegine der B-Gruppe und pentahydroxylierte Calystegine der C-Gruppe zugeordnet. Die Hydroxylgruppe in 1-Position bildet mit dem Stickstoffbrückenatom eine Aminoketalfunktion. Im Vergleich zu klassischen Tropanalkaloiden ist die Stickstoffbrücke bei Calysteginen in der Regel nicht methyliert. Abb. A-2 zeigt die Strukturen der wichtigsten Calystegine in *S. tuberosum*.

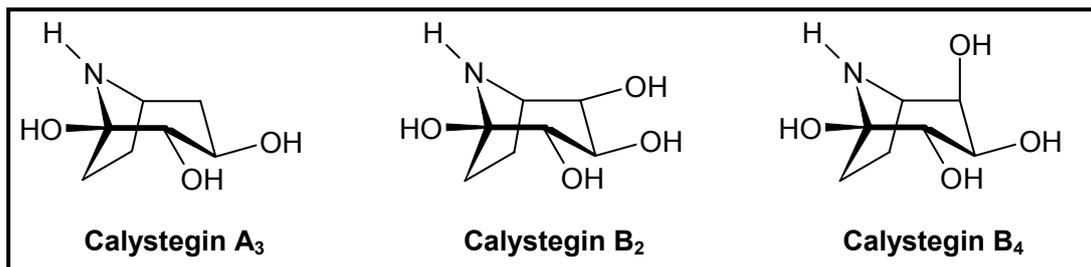


Abb. A-2: Struktur der wichtigsten Calystegine in *Solanum tuberosum*.

Calystegine wurden erstmals in *Calystegia sepium* entdeckt und erhielten daher ihren Namen (Tepfer et al., 1988). Erste Strukturaufklärungen erfolgten mit Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie von Goldmann und Mitarbeitern (Goldmann et al., 1990). Insgesamt wurden bisher 14 verschiedene Calystegine isoliert (Asano et al., 1997c; Dräger 2004). Calystegin A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> wurden zuerst aus *C. sepium* isoliert (Tepfer et al., 1988). Untersuchungen an *Physalis*-Wurzeln führten zur Identifizierung von Calystegin A<sub>5</sub> und B<sub>3</sub> (Asano et al., 1995). Calystegin B<sub>4</sub> wurde neben anderen Calysteginen in *Scopolia japonica* gefunden (Asano et al., 1996a). Pentahydroxylierte Calystegine (C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>) wurden aus Wurzeln von *Morus alba* und aus Blättern von *Duboisia leichhardtii* isoliert (Asano et al., 1994; Kato et al., 1997). Asano und Mitarbeiter entdeckten auch ein weiteres A-Calystegin (A<sub>6</sub>) sowie ein trihydroxyliertes Nortropanalkaloid mit Brückenkopfaminogruppe (Calystegin N<sub>1</sub>). Calystegin N<sub>1</sub> erwies sich als instabil, indem es nichtenzymatisch in Calystegin B<sub>2</sub> umgewandelt wurde (Asano et al., 1996b). Auch *N*-methylierte Calystegine wurden beschrieben. Asano und Mitarbeiter identifizierten aus *Lycium chinense* zwei *N*-Methylcalystegine (B<sub>2</sub> und C<sub>1</sub>) und zusätzlich noch Calystegin A<sub>7</sub> und B<sub>5</sub> (Asano et al., 1997c). Kürzlich wurden auch Dihydroxynortropane aus calysteginhaltigen Pflanzen der Convolvulaceen und Solanaceen beschrieben (Asano et al., 2001b). Die genannten Calystegine liegen alle unglycosiliert vor. Von Griffiths und Mitarbeitern wurde ein erstes glycosiliertes Calystegin (3-O-β-D-Glucopyranosylcalystegin B<sub>1</sub>) aus *Nicandra physalodes* identifiziert (Griffiths et al., 1996).

Calystegine akkumulieren vor allem in Solanaceen (Bekkouche et al., 2001). Calysteginhaltige Vertreter der Solanaceen sind die Gattungen *Atropa* (Tepfer et al., 1988; Dräger et al., 1995; Dräger 1995), *Datura* (Nash et al., 1993), *Hyoscyamus* (Dräger et al., 1994; Dräger et al., 1995; Asano et al., 1996b), *Solanum* (Asano et al., 1997b; Keiner und Dräger, 2000), *Lycium* (Asano et al., 1997c), *Physalis* (Asano et al., 1995), *Scopolia* (Asano et al., 1996a), *Duboisia* (Kato et al., 1997), *Mandragora* (Dräger et al., 1995), *Nicandra* (Griffiths et al.,

1996) sowie *Brunfelsia* und *Withania* (Bekkouche et al., 2001). Calystegine wurden ebenso in Convolvulaceen wie *C. sepium* (Scholl et al., 2001b) und *Ipomoea carnea* (Haraguchi et al., 2003) gefunden. Insgesamt wurden Calystegine in 62 von 129 untersuchten Convolvulaceen-Arten nachgewiesen (Schimming et al., 1998; Schimming et al., 2005). Weiterhin wurden Calystegine in Moraceen und Erythrocylaceen detektiert (Asano et al., 1994; Brock et al., 2005). Aktuelle Untersuchungen ergaben den Nachweis von Calysteginen in der Brassicaceae *Cochlearia officinales* (Strunz 2006).

Calystegine sind in Pflanzen häufig als Gemische zu finden. Die Zusammensetzung und die Konzentrationen der Calystegine variieren sowohl innerhalb einer Pflanze als auch zwischen verschiedenen Pflanzen bzw. Pflanzenfamilien. Am häufigsten akkumuliert Calystegin B<sub>2</sub>. Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>1</sub> sind ebenfalls weit verbreitet (Dräger 2004). Calystegine akkumulieren oft in Verbindung mit anderen Alkaloiden. In Solanaceen-Arten treten Calystegine oft gemeinsam mit den Tropanalkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin auf (Dräger 2004). Aber auch Glycoalkaloide (Friedman et al., 2003) und Cocain (Brock et al., 2005) akkumulieren zusammen mit Calysteginen.

### **A.2.2 Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese**

Calystegine werden wie die klassischen Tropanalkaloide über die Tropanalkaloidbiosynthese gebildet. Ausgangspunkt der Biosynthese sind die beiden Aminosäuren L-Ornithin und L-Arginin (Abb. A-3). In *Atropa belladonna* wurde der Einbau von <sup>14</sup>C-markiertem Arginin und Ornithin in die klassischen Tropanalkaloide Hyoscyamin und Scopolamin gezeigt (Nyman 1994). Putrescin, das Bindeglied zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel, entsteht durch Decarboxylierung der beiden Aminosäuren durch die Ornithindecarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) und/oder Arginindecarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19). In tierischen Organismen wird Putrescin ausschließlich über die Decarboxylierung von Ornithin synthetisiert. In Pflanzen und Bakterien hingegen existiert ein alternativer Biosyntheseweg über die Arginindecarboxylase (Masgrau et al., 1997). Sowohl die menschliche ODC als auch eine pflanzliche ODC aus *Datura stramonium* wurden bereits kloniert (Moshier et al., 1990; Michael et al., 1996). Die cDNA der ADC wurde beispielsweise aus *Lycopersicon esculentum* (Rastogi et al., 1993), *Vitis vinifera* (Primikiris und Roubelakis-Angelakis, 1999) und *Avena sativa* (Bell und Malmberg, 1990) isoliert. Die beiden Decarboxylasen sind in der Pflanze unterschiedlich reguliert. Während die ODC mit der Zellteilung in meristematischen Geweben in Verbindung gebracht wird, ist die ADC für die Putrescinsynthese in nichtteilenden und in gestressten Zellen verantwortlich (Ruiz et al., 2000). Ausgehend von Putrescin wird unter Katalyse der Spermidinsynthese (SPDS, EC 2.5.1.16) Spermidin und unter Katalyse der Sperminsynthese (SPS, EC 2.5.1.22) Spermin gebildet. Die Polyamine (Putrescin, Spermidin und Spermin) haben in der Pflanze wichtige Funktionen. Sie spielen einerseits eine wichtige Rolle im Pflanzenwachstum und in der Pflanzenentwicklung, werden aber auch in Verbindung mit Abwehrreaktionen gegen verschiedene Arten von Umweltstress genannt (Bouchereau et al., 1999; Kasukabe et al., 2004). Die Spermidinsynthese wurde bisher aus verschiedenen Pflanzen, z. B. *Nicotiana sylvestris*, *Hyoscyamus niger* und *S. tuberosum*, kloniert (Hashimoto et al., 1998; Stenzel et al., 2006).

Das erste spezifische Enzym der Tropanalkaloidbiosynthese ist die Putrescin-N-methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53). Die PMT katalysiert die N-Methylierung von Putrescin unter Verwendung von S-Adenosyl-L-methionin als Cosubstrat (Hibi et al., 1992).

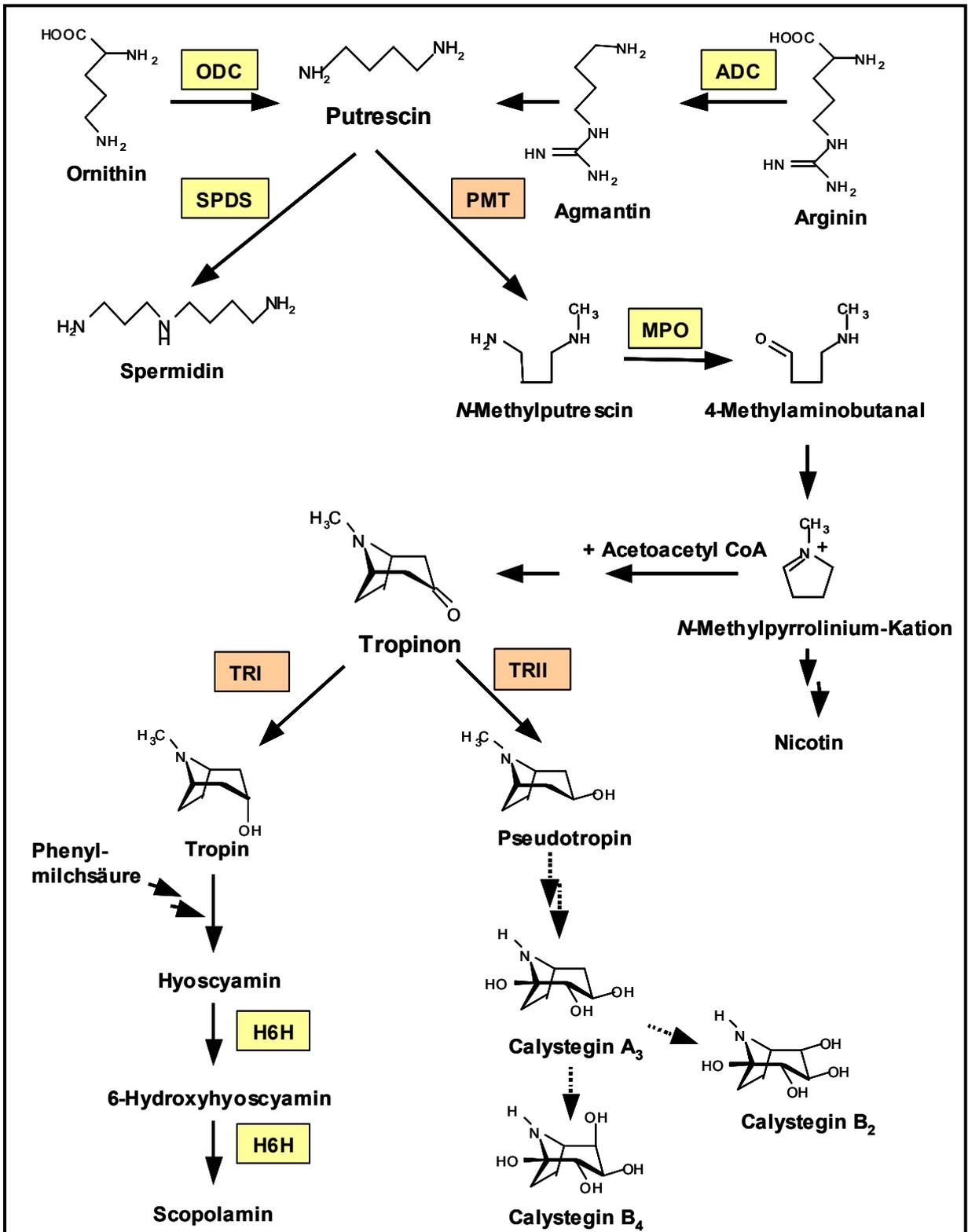


Abb. A-3: Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese.

ODC: Ornithindecaboxylase, ADC: Arginindecaboxylase, PMT: Putrescin-N-methyltransferase, SPDS: Spermidinsynthase, MPO: N-Methylputrescinoxidase, TRI: Tropinonreduktase I, TRII: Tropinonreduktase II, H6H: Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase

Die Beteiligung von Putrescin an der Tropanalkaloidbiosynthese wurde durch den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Putrescin in Tropin und Hyoscyamin gezeigt (Leete und Louden, 1963). Die cDNA der PMT wurde bereits aus verschiedenen Solanaceen, wie z. B. *A. belladonna*, *H. niger* (Suzuki et al., 1999a), *Nicotiana tabacum* (Hibi et al., 1994) und *S. tuberosum* (Stenzel et al., 2006) isoliert. Die nächste Stufe in der Biosynthese ist die Oxidation von *N*-Methylputrescin zu 4-Methylaminobutanal, was spontan zum *N*-Methylpyrrolinium-Salz zyklisiert. Diese Reaktion wird durch die *N*-Methylputrescinoxidase (MPO, EC 1.4.3.6) katalysiert. Das Enzym wurde aus Wurzelkulturen von *N. tabacum* gereinigt (McLauchlan et al., 1993). An der Stelle des *N*-Methylpyrrolinium-Salzes zweigt die Nicotin-Biosynthese ab (Leete 1967). Für die Tropanalkaloidbiosynthese wurden von Robins und Mitarbeitern die Zwischenstufen vom *N*-Methylpyrrolinium-Salz zum Tropinon identifiziert (Robins et al., 1997). Das *N*-Methylpyrrolinium-Salz reagiert mit Acetoacetyl-CoA zu 4-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoat. Tropinon entsteht anschließend durch Zyklisierung und Decarboxylierung von 4-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoat.

Tropinon ist der Verzweigungspunkt zwischen Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese. Tropinon wird stereospezifisch durch die Tropinonreduktasen I (TRI, EC 1.1.1.206) bzw. II (TRII, EC 1.1.1.236) zu Tropin (3 $\alpha$ -Hydroxytropan) bzw. Pseudotropin (3 $\beta$ -Hydroxytropan) reduziert. Tropin ist die Vorstufe von Hyoscyamin und Scopolamin und Pseudotropin der erste Metabolit auf dem Weg zu den Calysteginen. Beide Tropinonreduktasen gehören zur Gruppe der NADPH-abhängigen kurzkettigen Dehydrogenasen (SDR) (Nakajima et al., 1994; Dräger 2006). Die erste tropinbildende Tropinonreduktase wurde aus *D. stramonium* (Koelen und Gross, 1982) und die erste pseudotropinbildende Tropinonreduktase aus *H. niger* extrahiert (Dräger et al., 1988). Später wurden beide Tropinonreduktasen (TRI und TRII) aus *A. belladonna* (Dräger und Schaal, 1994), *H. niger* (Hashimoto et al., 1992), *Datura innoxia* (Couladis et al., 1991) und *D. stramonium* (Portsteffen et al., 1994) gereinigt. Die Klonierung der Tropinonreduktasen ergab Aufschluss über die Aminosäuresequenz. cDNA's der TRI und TRII wurden aus *D. stramonium* (Nakajima et al., 1993b), *H. niger* (Nakajima et al., 1993a) und *S. tuberosum* (Keiner et al., 2002; Kaiser et al., 2006) isoliert. Zur Aufklärung der Proteinstruktur wurden beide Tropinonreduktasen aus *D. stramonium* kristallisiert (Nakajima et al., 1998).

Die Bildung von Hyoscyamin verläuft über die Veresterung von Tropin mit Phenylmilchsäure (Ansarin und Woolley, 1993; Robins et al., 1994). Bei der Veresterung entsteht Littorin, was anschließend zu Hyoscyamin umgelagert wird (Ansarin und Woolley, 1994). Die Epoxidierung von Hyoscyamin zu Scopolamin wird durch die Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase (H6H, EC 1.14.11.11) katalysiert. Dabei entsteht zuerst 6-Hydroxyhyoscyamin, was anschließend zu Scopolamin epoxidiert (Hashimoto et al., 1993). Die Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase wurde beispielsweise aus *A. belladonna* (Suzuki et al., 1999b) und *H. niger* (Matsuda et al., 1991) kloniert. Klassische Tropanalkaloide wurden in *S. tuberosum* nicht nachgewiesen (Keiner und Dräger, 2000).

Calystegine werden ausgehend von Pseudotropin gebildet. Scholl und Mitarbeiter zeigten, dass Tropinon und Pseudotropin Metabolite der Calysteginbiosynthese sind (Scholl et al., 2001b; Scholl et al., 2003). Über die nachfolgenden Schritte vom Pseudotropin zu den Calysteginen ist wenig bekannt. Durch Nachweis von Norpseudotropin in *C. sepium* Wurzelkulturen kann davon ausgegangen werden, dass der erste Schritt eine Demethylierung von Pseudotropin ist (Sichhart 2003). Es wird postuliert, dass die *N*-Demethylierung Cytochrom P450 abhängig ist. Kürzlich wurde in *N. tabacum* eine Cytochrom P450 abhängige *N*-

Demethylase identifiziert, die Nicotin zu Nornicotin demethyliert (Siminszky et al., 2005). Die Demethylierung von Nicotin ist eine Reaktion, die der N-Demethylierung von Pseudotropin ähnlich ist. Weiterhin wird vermutet, dass die Hydroxylierungen der Calystegine schrittweise erfolgen. Der Nachweis von Dihydroxynortropanen unterstützt diese Vermutung (Asano et al., 2001b). Zudem postulierten Scholl und Mitarbeiter, dass A-Calystegine eine Vorstufe von B-Calysteginen sind (Scholl et al., 2003).

### **A.2.3 Regulation der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese**

Alkaloide sind stickstoffhaltige, niedermolekulare Substanzen mit charakteristischer Toxizität und pharmakologischer Aktivität. Sie akkumulieren in ca. 20% aller Pflanzenarten. Bisher wurden ca. 12000 Alkaloidstrukturen aufgeklärt (De-Luca und St-Pierre, 2000). Die meisten Alkaloide leiten sich von Aminosäuren ab (De-Luca und Laflamme, 2001). Über die Biosynthese der einzelnen Alkaloide und die Regulation der Biosynthese ist bisher wenig bekannt (Kutchan 1995). Einzelne Untersuchungen haben gezeigt, dass die Alkaloidbiosynthese kein zufälliger Prozess ist. Die Bildung der Alkaloide ist hoch reguliert in Bezug auf Pflanzenentwicklung und Expressionskontrolle der Biosynthese in bestimmten Organen oder Zellen. Sie läuft nur in bestimmten Zellen in einem begrenzten Zeitraum ab (De-Luca und St-Pierre, 2000). Die Alkaloide und/oder Zwischenprodukte der Alkaloidbiosynthese können in den Zellen, wo sie gebildet werden, akkumulieren. Aber auch Transportprozesse in andere Organe oder Zellen wurden für Alkaloide und Zwischenprodukte erwähnt (De-Luca und Laflamme, 2001; Facchini und St Pierre, 2005).

Die Tropanalkaloidbiosynthese läuft hauptsächlich in Wurzeln ab. Tropanalkaloide können über das Xylem in oberirdische Organe transportiert werden, wo eine Akkumulation nachgewiesen wurde (Wink und Roberts, 1998; De-Luca und St-Pierre, 2000). Für die PMT und die H6H wurde die Expression im Perizykel der Wurzel beschrieben (Suzuki et al., 1999a; Suzuki et al., 1999b). Demgegenüber ist die TRI eher in der äußeren Rinde sowie in der Endodermis der Wurzel und die TRII im Perizykel, in der Endodermis und in der inneren Rinde der Wurzel lokalisiert (Nakajima und Hashimoto, 1999). Daher ist ein Transport von Zwischenstufen der Alkaloidbiosynthese durch verschiedene Zellschichten notwendig.

Untersuchungen zur Regulation der Biosynthese können durch genetische Manipulation von Biosyntheseenzymen erfolgen, aber auch durch Veränderungen von Umweltbedingungen oder Applikation von Elicitoren. Untersuchungen zur genetischen Manipulation von Tropanalkaloiden wurden schon häufig durchgeführt. Die ersten Strategien dazu wurden von Robins und Mitarbeitern zusammengefasst (Robins et al., 1991c). So führte die Überexpression einer Hefe-ODC in *Nicotiana rustica* zu einem erhöhten Putrescin- und Nicotiningehalt (Hamill et al., 1990). Demgegenüber ergab die Überexpression der ADC, ein Schlüsselenzym im pflanzlichen Polyaminstoffwechsel, keinen Anstieg des Polyamin- oder Nicotiningehaltes (Burtin und Michael, 1997). Durch Überexpression der PMT wurde schon häufig versucht, die Tropanalkaloid- oder Nicotinproduktion zu steigern (Sato et al., 2001; Moyano et al., 2002; Rothe et al., 2003; Moyano et al., 2003). Dabei wurden allerdings unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Sato und Mitarbeiter zeigten beispielsweise bei Überexpression der PMT in *A. belladonna* keine erhöhten Tropanalkaloidgehalte, aber in *N. sylvestris* einen beinahe 40%igen Anstieg des Nicotiningehaltes in Blättern (Sato et al., 2001). Zur genetischen Manipulation der Tropinonreduktasen ist wenig bekannt. Die Überexpression der TRI führte zu einer 3fachen Erhöhung des Hyoscyamingehaltes und einer 5fachen Steigerung des Scopolamingehaltes. Die

Überexpression der TRII war weniger effektiv (Richter et al., 2005). Die Überexpression der H6H zur Steigerung des Scopolamingehaltes stand auch oft im Interesse der Forschung. In *A. belladonna* Blättern bestand der Alkaloidgehalt nach Überexpression der H6H fast ausschließlich aus Scopolamin (Yun et al., 1992). Andere Untersuchungen zeigten eine ca. 100fache Erhöhung des Scopolamingehaltes in *Hyoscyamus muticus* nach H6H-Überexpression (Jouhikainen et al., 1999). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die gleichzeitige Manipulation von PMT und H6H zu einer enormen Steigerung im Scopolamingehalt führt (Zhang et al., 2004).

Wichtige exogene Faktoren, die die Biosynthese beeinflussen, sind beispielsweise Zucker und Phytohormone. Die Induktion von Alkaloiden aus dem Tropanalkaloidstoffwechsel durch Zucker wurde vielfach beschrieben. Hierbei spielt vor allem Saccharose eine bedeutende Rolle. Die Applikation von Saccharose an *N. tabacum* Suspensionskulturen und *D. stramonium* Wurzelkulturen führte jeweils zur Erhöhung von Nicotin bzw. Hyoscyamin und Scopolamin (Mantell et al., 1983; Saenz und Loyola, V, 1997). Auch die Calysteginakkumulation in *A. belladonna* Wurzelkulturen wurde durch ein erhöhtes Saccharoseangebot gesteigert (Rothe et al., 2001). Die Behandlung mit Phytohormonen, wie z. B. Methyljasmonat, führte in Wurzeln von *N. sylvestris* zur Induktion von *pmt*-Transkript und in *N. tabacum* Zellkulturen zur Induktion der ODC und PMT sowie zu einer stark erhöhten Nicotinakkumulation (Imanishi et al., 1998; Shoji et al., 2000). Die Calystegin- und Hyoscyaminakkumulation wurde in *A. belladonna* Wurzelkulturen nach Applikation von Methyljasmonat allerdings nicht beeinflusst (Rothe et al., 2001).

#### **A.2.4 Physiologische Bedeutung der Calystegine**

In einer ersten Untersuchung zur Bedeutung von Calysteginen wurde von Tepfer und Mitarbeitern festgestellt, dass Calystegine als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für Bakterien in der Rhizosphäre dienen (Tepfer et al., 1988). Allerdings war nur ein Bakterium in der Lage, Calystegine zu katabolisieren, wobei 44 Bakterienstämme getestet wurden.

Polyhydroxylierte Alkaloide, die strukturell ähnlich den Monosacchariden aufgebaut sind, zeigen glycosidaseinhibitorische Eigenschaften (Asano et al., 2001a). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu bekannten Polyhydroxyalkaloidglycosidaseinhibitoren ließ sich auch für Calystegine eine Hemmwirkung vermuten (Molyneux et al., 1993). Erstmals wurde eine glycosidaseinhibitorische Wirkung der Calystegine von Molyneux und Mitarbeitern beschrieben. Sie zeigten, dass A-Calystegine und B-Calystegine Inhibitoren der  $\beta$ -Glucosidase und  $\alpha$ -Galactosidase sind (Molyneux et al., 1993). Nachfolgend wurde die Calysteginwirkung auf verschiedene Glycosidasen untersucht (Asano et al., 1994; Asano et al., 1995; Goldmann et al., 1996; Molyneux et al., 1996; Asano et al., 1996b; Asano et al., 1997b; Asano et al., 2000a). Für Calystegin B<sub>2</sub> wurde eine Hemmwirkung auf eine  $\beta$ -Glucosidase aus Mandel ( $K_i = 1,2 \mu\text{M}$ ) und eine  $\alpha$ -Galactosidase aus der Kaffeebohne ( $K_i = 0,86 \mu\text{M}$ ) ermittelt. Calystegin A<sub>3</sub> ist meist ein schwächerer Inhibitor im Vergleich zu Calystegin B<sub>2</sub> bei gleichem Wirkspektrum. Calystegin B<sub>1</sub> erwies sich als Inhibitor der  $\beta$ -Glucosidase aus Mandel ( $K_i = 1,9 \mu\text{M}$ ) und der  $\beta$ -Galactosidase aus Rinderleber ( $K_i = 1,6 \mu\text{M}$ ).  $\alpha$ -Galactosidasen werden durch Calystegin B<sub>1</sub> nicht gehemmt (Asano et al., 1995). Calystegin C<sub>1</sub> zeigt ein ähnliches Hemmspektrum wie Calystegin B<sub>2</sub>, wobei der Hemmeffekt auf  $\beta$ -Glucosidasen stärker und auf  $\alpha$ -Galactosidasen schwächer ist (Asano et al., 1994). Somit ist die Theorie der stärkeren Hemmwirkung bei höherem Hydroxylierungsgrad der Calystegine nur bedingt gültig (Molyneux et al., 1993; Asano et al., 1994). Calystegin A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und C<sub>1</sub> sind ebenfalls starke Inhibitoren verschiedener Leberglycosidasen aus Mensch, Rind und Ratte (Asano et al., 1997b). Mannosidasen werden von den genannten Calysteginen nicht

gehemmt (Molyneux et al., 1993; Asano et al., 1995). Nur Calystegin C<sub>2</sub> aus *D. leichhardtii* erwies sich als Inhibitor der  $\alpha$ -Mannosidase (Kato et al., 1997). Asano und Mitarbeiter zeigten, dass *N*-methylierte Calystegine eine höhere Affinität zu  $\alpha$ -Galactosidasen haben als ihre unmethylierten Formen (Asano et al., 1997c). Die Glycosilierung von Calysteginen führte zu einer Abnahme des Hemmeffektes gegenüber verschiedenen Glycosidasen (Asano et al., 1997a).

Calystegine sind in der Regel kompetitive Inhibitoren der Glycosidasen (Asano et al., 1995; Asano et al., 1997b; Asano et al., 1997c; Dräger 2004). Neben Calystegin N<sub>1</sub>, das ein nichtkompetitiver Inhibitor der Schweinenierentrehalase ist, wurde auch glycosiliertes Calystegin B<sub>1</sub> (3-*O*- $\alpha$ -D-Glucopyranosylcalystegin B<sub>1</sub>) als nichtkompetitiver Inhibitor der  $\alpha$ -Glucosidase aus Reis identifiziert (Asano et al., 1996b; Asano et al., 1997c).

Die Hemmeffekte der Calystegine sind vergleichbar mit denen von anderen Glycosidaseinhibitoren mit Alkaloidstruktur. Polyhydroxyalkaloide mit glycosidaseinhibitorischer Wirkung sind beispielsweise Nojirimycin-Derivate (Asano et al., 2000a), Castanospermin (Scofield et al., 1995) oder Swainsonin (Haraguchi et al., 2003). Calystegine und Swainsonin akkumulieren gemeinsam in australischen *Ipomoea*-Arten (Molyneux et al., 1995). Die Nahrungsaufnahme von *I. carnea* führte in Ziegen zu einer pflanzeninduzierten lysosomalen Speicherkrankheit. Die toxische Wirkung wurde anfangs sowohl Swainsonin als auch den Calysteginen zugeordnet (de Balogh et al., 1999). Ikeda und Mitarbeiter testeten die Wirkung von Calysteginen und Swainsonin auf die intrazelluläre Glycosidaseaktivität in menschlichen Lymphoblasten (Ikeda et al., 2003). Die Autoren sprachen den Calysteginen ein geringes Risiko bei der Vergiftung von Weidevieh zu. Eine Applikation von Calystegin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> und C<sub>1</sub> an Ratten rief keine klinischen Symptome oder histopathologischen Veränderungen hervor (Hueza et al., 2005). Die Autoren diskutierten allerdings, dass Ratten kein geeignetes Tiermodell für diese Studien sind, da auch nach Applikation von Swainsonin im Vergleich zu Ziegen keine neurologischen Symptome festgestellt wurden (de Balogh et al., 1999; Hueza et al., 2005). Daher sind weitere Untersuchungen zur Toxizität von Calysteginen an anderen Tierarten nötig.

Glycosidasen spielen eine wichtige Rolle in der intestinalen Verdauung, der post-translationalen Biosynthese von Glycoproteinen und dem lysosomalen Abbau von Glycokonjugaten (Asano et al., 2000a). Für Glycosidaseinhibitoren ergeben sich dadurch einige therapeutische Anwendungsmöglichkeiten. So werden beispielsweise Miglitol, ein Deoxynojirimycinderivat, und Acarbose, ein Pseudotetrasaccharid, in der Behandlung von Diabetes eingesetzt. Beide Substanzen hemmen  $\alpha$ -Glucosidasen und verhindern somit den Anstieg der Blutglucose nach der Nahrungsaufnahme (Asano et al., 2001a). Andere Glycosidaseinhibitoren zeigten antivirale (z. B. HIV-Virus) und anticancerogene Effekte oder wirkten als Immunstimulans (Asano et al., 2000a; Asano et al., 2001a). Weitere Anwendungsmöglichkeiten bestehen für die lysosomalen Speicherkrankheiten Morbus Gaucher und Morbus Fabry (Asano 2003b). Von Platt und Mitarbeitern wurde *N*-Butyldeoxynojirimycin in einem Morbus Gaucher *in vitro* Modell getestet (Platt et al., 1994). Diese Substanz schützt vor lysosomaler Glycolipidspeicherung und stellt somit eine neue Therapiemöglichkeit für Morbus Gaucher dar. Weiterhin wurde mit 1-Deoxygalactonojirimycin, ein starker Inhibitor der lysosomalen  $\alpha$ -Galactosidase A, eine Substanz gefunden, die die Aktivität der mutanten  $\alpha$ -Galactosidase A in Fabry-Lymphoblasten erhöht. Diese Substanz wirkt als sogenanntes „chemisches Chaperon“ (Asano et al., 2000b).

Zur Untersuchung der therapeutischen Anwendung von Calysteginen stehen momentan nicht ausreichend Reinsubstanzen zur Verfügung.

### **A.2.5 Analytik der Calystegine**

Calystegine sind aufgrund ihrer polyhydroxylierten Struktur sehr hydrophile Verbindungen. Calystegine wurden erst kürzlich entdeckt, da sie mit einem herkömmlichen Isolationschema für typische Alkaloide unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln nicht erfassbar waren (Dräger 2004). Erste Analysen der Calystegine wurden mit Papierelektrophorese durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit  $\text{AgNO}_3$  und NaOH (Tepfer et al., 1988; Molyneux et al., 1996). Eine schnelle Methode für die Calysteginanalytik ist die Dünnschichtchromatographie (Dräger 2002). Verschiedene Detektionsmöglichkeiten für Calystegine wurden beschrieben (Dräger 1995; Molyneux et al., 1996). Eine neue effizientere Methode AMD-TLC (*Automated multiple development thin layer chromatography*) wurde von Scholl und Mitarbeitern zur Trennung der einzelnen Calystegine entwickelt (Scholl et al., 2001a). Weitere Methoden zur Auftrennung von Calysteginen sind die HPLC und die Kapillarelektrophorese (Daali et al., 2000; Dräger 2002). Aufgrund der fehlenden chromophoren Struktur der Calystegine erfolgt die Detektion bei der HPLC refraktometrisch (Goldmann et al., 1990) und bei der Kapillarelektrophorese gepulst amperometrisch (Rüttinger und Dräger, 2001). Eine weitere Möglichkeit ist die UV-Detektion bei 191 nm nach vorheriger Komplexbildung der Calystegine mit Borat-Ionen (Daali et al., 2000).

Die Methode zur Quantifizierung von Calysteginen ist die Gaschromatographie (GC). Die Extraktion der Calystegine aus dem Pflanzenmaterial erfolgt mit wässrigem Methanol oder Wasser. Anschließend werden die Calystegine über einen stark sauren Kationenaustauscher gereinigt (Dräger 2002). Aufgrund der hohen Polarität der Calystegine ist eine Umwandlung in flüchtige Derivate erforderlich. Calystegine werden als TMS-Derivate gemessen. Als Derivatisierungsreagenzien wurden MSTFA (*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) sowie HMDS (Hexamethyldisiloxan) mit 10% TMCS (Trimethylchlorsiloxan) genannt. Während MSTFA alle Hydroxylgruppen und den Stickstoff derivatisiert, bilden HMDS und TMCS nur mit den Hydroxylgruppen TMS-Derivate (Molyneux et al., 1996). Die Identität der Calystegine wird durch GC-MS (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie) geklärt. Die Quantifizierung erfolgt mit sensitiveren Detektoren wie FID (Flammenionisationsdetektor) und PND (Phosphor-Stickstoff-Detektor) (Molyneux et al., 1996; Dräger 2002).

### **A.3 Kohlenhydratstoffwechsel**

Saccharose ist die Haupttransportform und Stärke die Hauptspeicherform von Kohlenhydraten in Pflanzen (Geigenberger et al., 2004). In der Kartoffelknolle wird Saccharose über Hexosephosphate in Stärke umgewandelt (Ferne et al., 2002b). Abb. A-4 zeigt den Kohlenhydratstoffwechsel der Kartoffelknolle im Cytosol und in den Plastiden. Enzyme, die in die Umwandlung von Saccharose in Stärke involviert sind, wurden charakterisiert und die Gene kloniert (Ferne et al., 2002b). Die Entladung von Saccharose aus dem Phloem kann sowohl apoplastisch als auch symplastisch erfolgen. Viola und Mitarbeiter zeigten, dass die Phloementladung während des Stolonwachstums apoplastisch und ab der ersten Phase der Knollenbildung symplastisch erfolgt (Viola et al., 2001). Saccharose wird in der Knolle durch die Invertase (EC 3.2.1.26) im Apoplast oder Cytosol in Glucose und Fructose oder durch die Saccharosesynthase (EC 2.4.1.13) im Cytosol in UDPGlucose und Fructose gespalten (Zrenner et al., 1995; Sonnewald et al., 1997). Während der Stolonentwicklung erfolgt die Saccharosespaltung bevorzugt durch Invertase. Zu Beginn der Knollenbildung sinkt die

Invertaseaktivität, wobei die Saccharosesynthaseaktivität stark ansteigt (Appeldoorn et al., 1997; Appeldoorn et al., 2002). Die Produkte der Saccharosespaltung werden je nach Saccharosesynthase- oder Invertaseweg durch Fructokinase (EC 2.7.1.4, (Davies et al., 2005)) und UDPGlucose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9, (Nakano et al., 1989)) oder Hexokinase (EC 2.7.1.1, (Veramendi et al., 1999)) und Fructokinase metabolisiert (Ferne et al., 2002b). Die entstandenen Hexosephosphate werden unter der Katalyse der cytosolischen Isoformen der Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2, (Ferne et al., 2002a)) sowie der Glucose-6-phosphatisomerase (EC 5.3.1.9) im Gleichgewicht gehalten (Ferne et al., 2002b). Neben dem Saccharoseabbau findet in den Geweben auch eine (Re)Synthese von Saccharose statt. Die Saccharosesynthese kann durch Katalyse der Saccharosesynthase oder durch Katalyse der Saccharosephosphatsynthase (EC 2.4.1.14) und Saccharosephosphatase (EC 3.1.3.24) erfolgen (Geigenberger und Stitt, 1993).

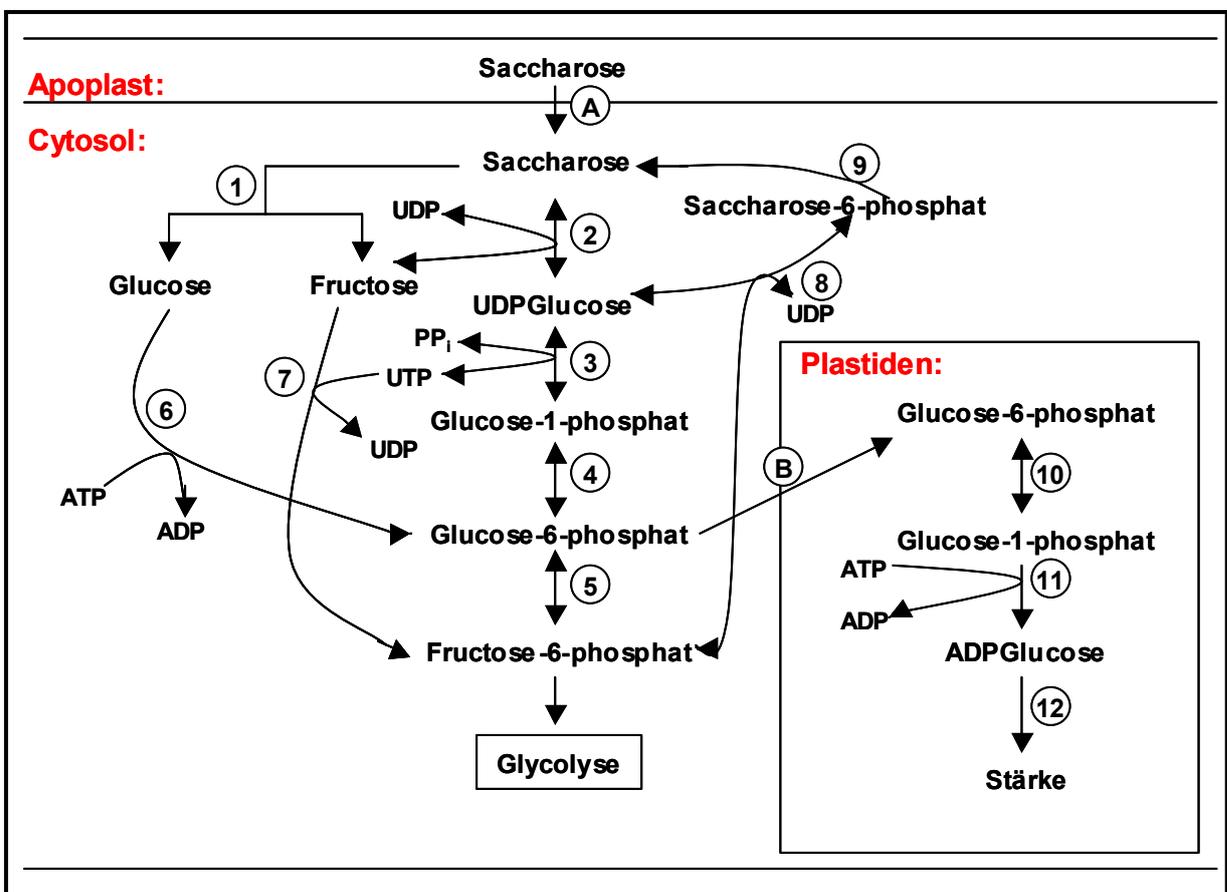


Abb. A-4: Kohlenhydratstoffwechsel der Kartoffelknolle im Cytosol und in den Plastiden. Enzyme: (1) Invertase, (2) Saccharosesynthase, (3) UDPGlucose-Pyrophosphorylase, (4) Phosphoglucomutase (cytosolisch), (5) Glucose-6-phosphatisomerase, (6) Hexokinase, (7) Fructokinase, (8) Saccharose-6-phosphatsynthase, (9) Saccharose-6-phosphatase, (10) Phosphoglucomutase (plastidär), (11) ADPGlucose-Pyrophosphorylase, (12) Stärkesynthase, Transporter: (A) Saccharosetransporter, (B) Glucose-6-phosphattransporter. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Ferne et al., 2002b) erstellt.

Die Stärkesynthese findet in den Plastiden statt. Es wird davon ausgegangen, dass der Kohlenstoff in Form von Glucose-6-phosphat in die Plastiden transportiert wird. Die Klonierung eines Hexosemonophosphattransporters mit einer hohen Spezifität für Glucose-6-phosphat spricht dafür (Kammerer et al., 1998). Ein weiteres Indiz dafür ist der reduzierte Stärkegehalt nach *antisense* Expression der plastidären Phosphoglucomutase (Tauberger et al., 2000). In den

Plastiden wird Glucose-6-phosphat unter der Katalyse der plastidären Isoform der Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2) in Glucose-1-phosphat umgewandelt (Tauberger et al., 2000; Fernie et al., 2001). Die Umwandlung von Glucose-1-phosphat in ADPGlucose wird durch die ADPGlucose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27) katalysiert (Boehlein et al., 2005). Neben Glucose-1-phosphat wird auch ATP als Substrat benötigt, was über einen ATP/ADP-Transporter in die Plastiden transportiert wird (Schunemann et al., 1993; Tjaden et al., 1998). Ausgehend von ADPGlucose erfolgen die letzten Polymerisierungsschritte der Stärkesynthese durch verschiedene Klassen von Stärkesynthasen (Geigenberger et al., 2001).

In vielen transgenen Studien wurden Gene des Saccharose-Stärke-Metabolismus überexprimiert oder supprimiert. Ziel war es, die Physiologie des Saccharose-Stärke-Metabolismus zu verstehen und langjährige Hypothesen zu bestätigen (Fernie et al., 2002b). Unter besonderem Interesse standen dabei die Invertase (Sonnewald et al., 1997), die Saccharosesynthase (Zrenner et al., 1995), die UDPGlucose-Pyrophosphorylase (Zrenner et al., 1993) sowie die Phosphoglucomutase (Tauberger et al., 2000; Fernie et al., 2002a). Aber auch kombinierte Expressionen von Invertase und Glucokinase wurden durchgeführt (Trethewey et al., 1998).

### **A.3.1 Saccharosesynthase**

Die Saccharosesynthase (EC 2.4.1.13) ist ein cytosolisches Enzym und katalysiert die reversible Umwandlung von Saccharose und UDP in UDPGlucose und Fructose. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Kohlenhydratverteilung und im Kohlenhydratmetabolismus (Sonnewald et al., 1994; Li et al., 2003). Die Saccharosesynthase ist das Hauptenzym in der Saccharose-spaltung und liefert Substrate für die Stärkesynthese (Chourey und Nelson, 1976; Clausen et al., 1985; Fu und Park, 1995). Das Enzym ist weiterhin in die Bereitstellung von UDPGlucose für die Zellwandsynthese involviert und spielt eine Schlüsselrolle bei der Be- und Entladung des Phloems (Martin et al., 1993; Fu und Park, 1995; Chourey et al., 1998). In Kartoffelknollen ist die Saccharosesynthaseaktivität ein Marker für die *sink*-Stärke (Zrenner et al., 1995). Die Suppression der Saccharosesynthaseaktivität in Kartoffelknollen führte zu einem signifikant verringerten Stärkegehalt (Zrenner et al., 1995).

Gene der Saccharosesynthase wurden aus vielen Pflanzen isoliert. Die meisten Gene wurden aus stärkespeichernden Pflanzen wie *S. tuberosum* (Salanoubat und Genevieve, 1987), *Zea mays* (Huang et al., 1994) und *Oryza sativa* (Wang et al., 1992; Yu et al., 1992) sowie aus *Arabidopsis thaliana* (Martin et al., 1993) kloniert. Fu und Park zeigten, dass in *S. tuberosum* verschiedene Isoformen der Saccharosesynthase vorliegen (Fu und Park, 1995). Das *Sus3* Gen zeigte die höchsten Expressionen in Stängeln und Wurzeln und wurde mit einer Funktion in den Gefäßen in Verbindung gebracht. Das *Sus4*-Gen hingegen ist in Knollengewebe exprimiert und ermöglicht damit die *sink*-Funktion (Fu und Park, 1995). Verschiedene Isoformen wurden auch für andere Pflanzen, wie z. B. *O. sativa* (Wang et al., 1992), beschrieben.

### **A.3.2 Invertase**

Die Invertase (EC 3.2.1.26) ist eine Hydrolase, die Saccharose in zwei Monosaccharide, Glucose und Fructose, spaltet (Sturm und Tang, 1999). Pflanzenzellen haben eine vakuoläre, eine extrazelluläre und eine cytosolische Invertase (Sturm 1999). Die vakuoläre saure Invertase akkumuliert als lösliches Protein in der Vakuole. Die extrazelluläre saure Invertase ist ionisch an

die Zellwand (Apoplast) gebunden. Beide Invertasen spalten Saccharose bei einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5. Die cytosolische Invertase hat ein pH-Optimum für die Saccharosespaltung im neutralen oder leicht alkalischen Bereich. Von jeder Invertase existieren verschiedene Isoformen (Sturm 1999). Alle drei Invertase-Arten wurden bisher erfolgreich kloniert. Die cDNA der vakuolären Invertase wurde beispielsweise aus *S. tuberosum* (Zhou et al., 1994) und aus *Ipomoea batatas* isoliert (Wang et al., 2005b). Die extrazelluläre Invertase wurde aus *S. tuberosum* (Hedley et al., 1993) und *O. sativa* (Cho et al., 2005) kloniert. Eine neutrale Invertase wurde aus *Daucus carota* isoliert (Sturm et al., 1999).

Für die verschiedenen Invertasen wurden eine Reihe von Funktionen in der Pflanze beschrieben. Am wenigsten ist über die cytosolische Invertase bekannt. Sie ist in den Saccharoseabbau involviert und stellt somit Saccharose für den weiteren Metabolismus bereit (Sturm und Tang, 1999). Die extrazelluläre Invertase ist ein Schlüsselenzym bei der apoplastischen Phloementladung (Roitsch et al., 2003). Sie liefert einen wichtigen Beitrag bei der Saccharoseverteilung zwischen *sink*- und *source*-Gewebe. Die Stärke dieser Funktion ist abhängig von der jeweiligen Spezies und vom Entwicklungszustand der Pflanze (Sturm 1999). Weitere Funktionen der extrazellulären Invertase betreffen Abwehrreaktionen gegen Verletzungen und Infektionen sowie die Kontrolle der Zelldifferenzierung und der Pflanzenentwicklung (Sturm und Tang, 1999; Roitsch und González, 2004). Vakuoläre Invertasen spielen eine Rolle in der Osmoregulation und in der Zellstreckung. Daneben kontrolliert die vakuoläre Invertase die Zuckerzusammensetzung in Früchten und Speicherorganen. Sie ist außerdem für die kälteinduzierte Hexoseakkumulation in Kartoffelknollen verantwortlich (Zrenner et al., 1996; Sturm und Tang, 1999).

Die Überexpression der extrazellulären (apoplastischen) Invertase in Kartoffelknollen führte zu größeren Knollen, einem geringeren Saccharosegehalt, einer höheren Glucosekonzentration und einer geringfügig veränderten metabolischen Aktivität. Knollen mit cytosolisch überexprimierter Invertase unterscheiden sich davon durch geringere Knollengrößen und eine stark erhöhte metabolische Aktivität (Sonnewald et al., 1997; Hajirezaei et al., 2000).

### **A.3.3 UDPGlucose-Pyrophosphorylase**

Die UDPGlucose-Pyrophosphorylase (UGPase, EC 2.7.7.9) katalysiert die Umwandlung von Glucose-1-phosphat und UTP in UDPGlucose und anorganisches Pyrophosphat im Cytosol (Zrenner et al., 1993). Die UDPGlucose-Pyrophosphorylase ist ein Schlüsselenzym des Kohlenhydratstoffwechsels in photosynthetischen und nichtphotosynthetischen Geweben (Kleczkowski et al., 2004). In photosynthetischen Geweben katalysiert die UDPGlucose-Pyrophosphorylase die Bildung von UDPGlucose aus Glucose-1-phosphat, während in nichtphotosynthetischen Geweben UDPGlucose in Glucose-1-phosphat umgewandelt wird (Zrenner et al., 1993). UDPGlucose selbst ist ein wichtiger Glycosyldonor für Kohlenhydrate in höheren Pflanzen. Sie stellt einen wichtigen Verzweigungspunkt im Kohlenhydratstoffwechsel dar. UDPGlucose wird einerseits für die Saccharosesynthese benötigt, ist aber auch Präkursor von Cellulose oder anderen Zuckermetaboliten (Zrenner et al., 1993). Demnach spielt die UDPGlucose-Pyrophosphorylase eine wichtige Rolle in der Zellwandsynthese. Andere Funktionen betreffen die Synthese der Kohlenhydrateinheiten von Glycolipiden und Glycoproteinen (Kleczkowski et al., 2004).

Die UDPGlucose-Pyrophosphorylase aus *S. tuberosum* wurde bereits gereinigt und charakterisiert (Nakano et al., 1989; Sowokinos et al., 1993). Weitere Untersuchungen führten zur

Isolierung und Sequenzierung der cDNA der UDPGlucose-Pyrophosphorylase aus *S. tuberosum* (Katsube et al., 1990). Weitere Sequenzen der UDPGlucose-Pyrophosphorylase wurden beispielsweise aus Bakterien isoliert (Brede et al., 1991).

### **A.3.4 Metabolitenprofilanalyse**

Die Metabolitenprofilanalyse (Metabolomics) ist neben der Genexpressionsanalyse (Transcriptomics) und der Proteinanalyse (Proteomics) die dritte Technologie zur Untersuchung von Gen-Funktionsbeziehungen (Hall et al., 2002). Pflanzen bestehen aus einer Vielzahl von niedermolekularen Substanzen. Insgesamt wurden mehr als 100000 Metabolite aus dem Pflanzenreich identifiziert (Trethewey 2004). Die Metabolitenprofilanalyse beinhaltet die umfangreiche Untersuchung von komplexen Metabolitengemischen in Pflanzenextrakten (Hall et al., 2002). Die Messung von Metaboliten ist allerdings nicht einfach. Einerseits haben Metabolite ein sehr dynamisches Verhalten. Sie ändern sich innerhalb von Stunden, Minuten oder auch Sekunden. Die zweite Problematik ist die chemische Vielfalt der einzelnen Metabolite (Stitt und Fernie, 2003). Von Roessner und Mitarbeitern wurde eine Methode für *S. tuberosum* entwickelt, mit der verschiedene Metabolite nebeneinander quantitativ bestimmt werden können (Roessner et al., 2000). Ziel dieser Entwicklung war eine schnelle, sensitive und quantitative Analyse von verschiedenen Metaboliten des Kohlenhydrat- und Stickstoffmetabolismus, um Stoffwechselwege besser zu verstehen. Die Extraktion der Metabolite aus dem Pflanzenmaterial erfolgt mit einem Methanol/Wasser-Gemisch, wobei lipophile Bestandteile mit Chloroform abgetrennt werden. Die Derivatisierung der polaren Phase wird in zwei Stufen durchgeführt. Nach Methoxymierung von Carbonylgruppen werden azide Protonen durch MSTFA silyliert und entsprechende TMS-Derivate gebildet. Die Auftrennung der Metabolite erfolgt über GC-MS. Durch Vergleich mit Standardsubstanzen und mit massenspektralen Bibliotheken (z. B. NIST) werden die Substanzen identifiziert (Roessner et al., 2000; Fiehn et al., 2000b). Für die automatische Auswertung der Metabolite wurden Retentionszeitfenster für jede Substanz festgelegt. Die Quantifizierung erfolgt durch Kalibrierung mit Isotopen-markierten Referenzsubstanzen (Fiehn et al., 2000a). Zur statistischen Auswertung werden oft hierarchische Clusteranalysen und Hauptkomponentenanalysen herangezogen. Diese Methoden erlauben eine Abgrenzung von metabolischen Phänotypen (Fiehn et al., 2000a; Roessner et al., 2001b).

Metabolitenprofilanalysen wurden beispielsweise für *S. tuberosum* (Roessner et al., 2000; Roessner et al., 2001a; Roessner et al., 2001b), *Lycopersicon esculentum* (Roessner-Tunali et al., 2003) und *A. thaliana* (Fiehn et al., 2000a) beschrieben. Diese Methode hat aber auch im Bereich der Sekundärstoffe von *A. thaliana* Anwendung gefunden (Roepenack-Lahaye et al., 2004). Calystegine wurden bei all diesen Untersuchungen nicht gefunden.

## **A.4 Calystegine und Kohlenhydratstoffwechsel**

Über eine Verbindung von Calysteginen zum Kohlenhydratstoffwechsel ist wenig bekannt. Wie in Kapitel A.2.4 beschrieben, wirken Calystegine als Glycosidaseinhibitoren. Allerdings sind die natürlichen Substrate der jeweiligen Glycosidasen nicht bekannt. Damit kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Auswirkungen eine Hemmung der Glycosidasen durch Calystegine auf pflanzliche Glycoside oder auf den Kohlenhydratmetabolismus in der Pflanze hat. Erste Ansatzpunkte gibt es durch die Hemmung einer pflanzlichen Invertase aus *C. sepium* (Höke und Dräger, 2004). Damit könnten Calystegine in den Saccharoseabbau eingreifen. Eine

weitere Untersuchung zeigte die Hemmung einer Schweinenierentrehalase durch Calystegin B<sub>4</sub> (Asano et al., 1996a). Somit wäre auch Trehalose ein Ansatzpunkt für eine Calysteginwirkung. Allerdings kann die Hemmbarkeit von tierischen Enzymen durch Calystegine nicht unmittelbar auf pflanzliche Enzyme übertragen werden.

Interaktionen zwischen Calysteginen und Kohlenhydraten könnten beiderseitig bestehen. Erhöhte Saccharosekonzentrationen führten in *A. belladonna* Wurzelkulturen zu einer gesteigerten Calysteginakkumulation (Rothe und Dräger, 2002). Die wenigen bekannten Fakten zeigen, dass sowohl Calystegine den Kohlenhydratstoffwechsel als auch Kohlenhydrate die Calysteginbiosynthese beeinflussen könnten. Eine Beeinflussung von Sekundärstoffen durch veränderten Kohlenhydratstoffwechsel wurde bisher für Phenylpropane beschrieben (Baumert et al., 2001).

## A.5 Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der Calystegine im Kohlenhydratstoffwechsel. *Solanum tuberosum* L. wird dazu als pflanzlicher Organismus verwendet. In einer ersten Analyse wird überprüft, ob Calystegine in der Pflanze auf einen veränderten Kohlenhydratstoffwechsel reagieren und damit eine Bedeutung im Kohlenhydratstoffwechsel möglich ist. Die Calysteginakkumulation wird in transgenen Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen mit apoplastisch überexprimierter Invertase, mit cytosolisch überexprimierter Invertase und mit supprimierter Saccharosesynthase analysiert. Die transgenen Kartoffeln unterscheiden sich vom Wildtyp insbesondere im Gehalt ihrer löslichen Zucker (Zrenner et al., 1995; Sonnewald et al., 1997). Zusätzlich finden Untersuchungen zur Expression verschiedener Biosyntheseenzyme statt. Von den Enzymen PMT, TRI und TRII, die Reaktionen an wichtigen Verzweigungspunkten der Tropanalkaloidbiosynthese katalysieren, werden Transkript- und Proteingehalte sowie Enzymaktivitäten bestimmt. Diese Analysen geben Auskunft über eine mögliche veränderte Calysteginbiosynthese bei verändertem Kohlenhydratstoffwechsel.

In einer nächsten Fragestellung wird nach möglichen Interaktionspartnern für die Calystegine gesucht. Eine geeignete Methode dafür ist die Metabolitenprofilanalyse (*metabolic profiling*). Dazu muss als erstes die Bestimmung von Calysteginen mit dieser Methode etabliert werden. Danach werden Calystegine und Stoffwechselmetaboliten gemeinsam in Kartoffelgeweben gemessen. Über Korrelationen sollen die Metabolite identifiziert werden, mit denen Calystegine interagieren könnten. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit dem Kohlenhydratstoffwechsel und der Calysteginbiosynthese interpretiert.

Da bei Korrelationen keine Aussagen zu Kausalzusammenhängen getroffen werden können, sind weitere Untersuchungen zur Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese und zur Wirkung von Calysteginen auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels nötig. Dazu werden verschiedene Kohlenhydrate an isolierte Kartoffelgewebe appliziert. Anschließend wird die Calysteginakkumulation sowie die Expression der oben genannten Biosyntheseenzyme analysiert. Des Weiteren wird die Beeinflussung der Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase durch Calystegin B<sub>2</sub> untersucht. Die UDPGlucose-Pyrophosphorylase ist ein zentrales Enzym an einem wichtigen Verzweigungspunkt im Kohlenhydratstoffwechsel.

## B Material und Methoden

### B.1 Material

#### B.1.1 Pflanzenmaterial

Wildtyp-Kartoffeln, *Solanum tuberosum* L. var. Désirée, wurden von der Saatzucht Fritz Lange KG, Bad Schwartau bezogen. Transgene Kartoffelknollen sowie der entsprechende Wildtyp *S. tuberosum* L. var. Désirée wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald (IPK Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Es wurden Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase und Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese erhalten. Die transgenen Kartoffelknollen wurden am IPK Gatersleben von Pflanzen geerntet, die in Form einer Hydrokultur 3 Monate im Gewächshaus angebaut wurden. In Tab. B-1 sind die einzelnen Transformationslinien zusammengefasst.

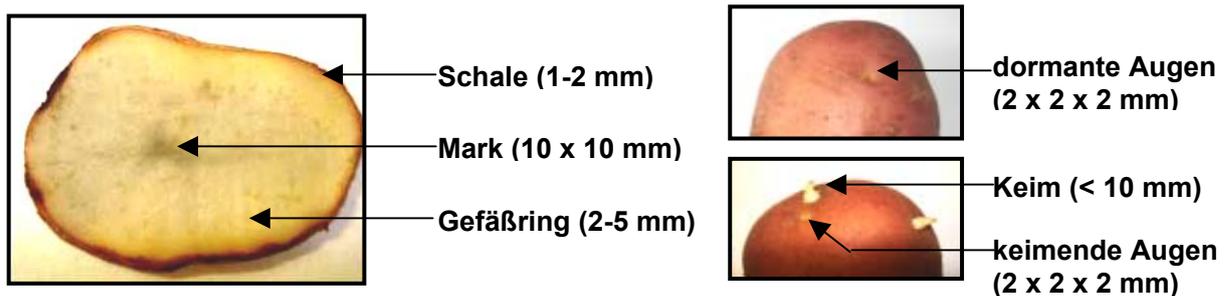
**Tab. B-1: Zur Untersuchung verwendete Transformationslinien mit den dazugehörigen Gesamtmassen der Knollen.**

Transformation	Linie	Gesamtmasse der Knollen von 5 Pflanzen
Wildtyp Désirée	WT1	700 g
	WT2	500 g
Invertase apoplastisch	U-IN1 (3)	465 g
	U-IN1 (33)	585 g
	U-IN1 (41)	480 g
Invertase cytosolisch	U-IN2 (17)	270 g
	U-IN2 (30)	355 g
	U-IN2 (33)	325 g
	U-IN2 (34)	375 g
	U-IN2 (42)	210 g
Saccharosesynthese <i>antisense</i>	RSSa (99)	380 g
	RSSa (108)	430 g
	RSSa (112)	475 g
	RSSa (114)	570 g
	RSSa (129)	345 g
	RSSa (130)	415 g

Die Transformation wurde mit Agrobakterien durchgeführt. Das zur Transformation verwendete Plasmid bestand für die Kartoffelknollen mit überexprimierter Invertase aus einem knollenspezifischen Promotor Patatin B33, dem *suc2* Gen (Hefe-Invertase) in *sense* Orientierung und dem OCS-Terminator. Zur apoplastischen Überexpression der Invertase wurde das *suc2* Gen mit einer Proteinase-Inhibitor II Signalsequenz fusioniert (Sonnewald et al., 1997). Das Plasmid zur Suppression der Saccharosesynthese bestand aus dem konstitutiven CaMV 35S Promotor, der cDNA der Saccharosesynthese (aus Kartoffel, *Sus4*-Isoform) in *antisense* Orientierung und dem OCS-Terminator (Zrenner et al., 1995).

### B.1.1.1 Lagerung der Kartoffelknollen

Wildtyp-Knollen wurden nach der Ernte bei 4°C im Kühlraum bis zur Verwendung aufbewahrt. Transgene Kartoffelknollen und der entsprechende Wildtyp wurden nach der Ernte 10 Tage bei Raumtemperatur und anschließend 76 Tage bei 12-15°C gelagert. Nach 6tägiger Kühlung bei 4°C wurden die Kartoffelknollen bei Raumtemperatur ausgelegt, um den Keimungsprozess zu starten. Alle Lagerungsstufen erfolgten im Dunkeln. Zu verschiedenen Lagerungszeitpunkten wurden einzelne Gewebe (Schale, Mark, Gefäßring, dormante Augen, keimende Augen und Keime) zur Analyse präpariert.

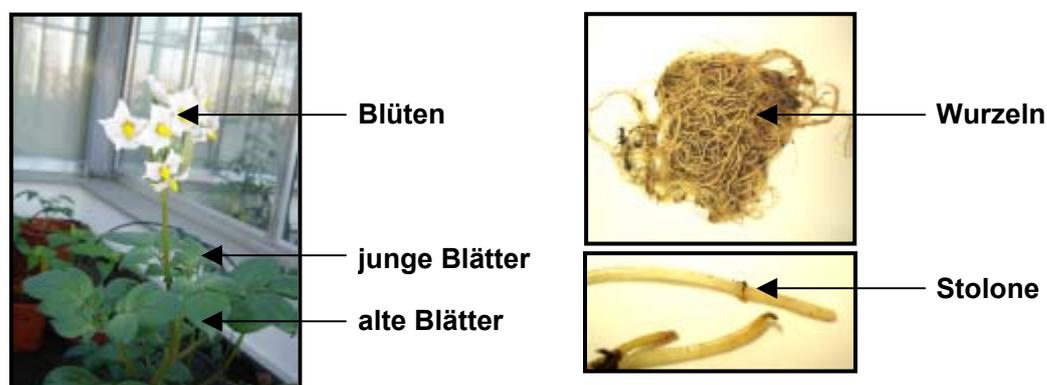


**Abb. B-1: Analysierte Knollengewebe.**

Der Knollenquerschnitt wurde zur besseren Sichtbarkeit der Gewebestrukturen mit Jod-(10%)/Kaliumjodid-(2,5%)lösung angefärbt.

### B.1.1.2 Kultivierung von Kartoffelpflanzen

Wildtyp-Pflanzen wurden unter Freilandbedingungen angebaut. Transgene Kartoffelpflanzen und die entsprechenden Wildtyp-Pflanzen wurden im Gewächshaus des Biozentrums der Martin-Luther-Universität Halle in Erde kultiviert. Die Pflanzen wuchsen bei Tageslicht unter Langtagbedingungen (16 h hell/8 h dunkel) bei einer Temperatur von 23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%. Eine zusätzliche Beleuchtung war erforderlich, wenn die Beleuchtungsstärke des Tageslichtes unter 5 klx lag. Aufgrund von Schädlingsbefall mit Blattläusen (*Myzus persicae*) und Weißer Fliege (*Trialeurodes vaporariorum*) mussten die Kartoffelpflanzen mehrfach mit Pestiziden (Perfekthion® 0,2%) behandelt werden. Für nachfolgende Analysen wurden Blüten, junge und alte Blätter sowie Wurzeln und Stolone vorbereitet.



**Abb. B-2: Analysierte Pflanzengewebe.**

## B.1.2 Bakterienstämme

### *Escherichia coli* Bakterienstämme und deren Eigenschaften:

One Shot®Top10 (Invitrogen):	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU</i> <i>galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>
BI21 Codon Plus® (DE3) -RP(Stratagen)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA</i> <i>Hte [argU proL Cam<sup>r</sup>]</i>
XL1-Blue (Stratagen)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac [F<sup>-</sup> proAB laqI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>

### Bakterienkultivierung:

Transformierte Bakterien wurden auf verfestigtem LB-Medium (15 g/l Agar) bei 37°C unter Zusatz von 50 mg/l Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) kultiviert.

Flüssigbakterienkulturen wurden in LB- oder TB-Medium (Sambrook et al., 1989) bei 37°C und 150 rpm unter Zusatz von 50 mg/l Ampicillin als Selektionsantibiotikum angezogen.

## B.1.3 Vektoren

Tab. B-2: Vektoren und deren Eigenschaften.

Vektor	Firma	Antibiotikaresistenz
pCR®2.1 TOPO TA	Invitrogen	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>
pET21d	Novagen	Amp <sup>r</sup>

Amp<sup>r</sup> – Ampicillinresistenz; Kan<sup>r</sup> – Kanamycinresistenz

## B.1.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG bezogen.

Tab. B-3: verwendete Primer mit Sequenz, Schmelztemperatur und Anwendung.

Primer	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> in °C	Anwendung
TRI dir	AAG AAC TTG GCA TGT GAA TGG GCC AAG	65,0	Sonde
TRI rev	TTG CTC GAG AAA CGC ACC ATT AGC TGT	65,0	Northern Blot
TRII dir	ACC ACT TAT CTG TAC TAG CAC ACC CCT	65,0	Sonde
TRII rev	AAG GAT CCT TAA AAG CCA CCA TTA GCC A	63,7	Northern Blot
UGPase dir	<u>CCA TGG</u> CTA CTG CTA CTA CTC TTT C <i>NcoI</i>	63,0	Klonierung der UGPase
UGPase rev	<u>CTC GAG</u> TAT ATC CTC AGG TCC ATT G <i>XhoI</i>	63,0	

Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen innerhalb der Primer wurden unterstrichen.

### **B.1.5 Enzyme und Kits**

**Tab. B-4: verwendete Enzyme und Kits sowie deren Bezugsfirmen.**

<b>Enzym/Kit</b>	<b>Firma</b>
ALFexpress AutoRead Sequencing Kit	Pharmacia
Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sigma
High Prime DNA Labelling Kit	Roche
Lysozym	Applichem
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	Promega
Phosphoglucomutase aus <i>Oryctolagus cuniculus</i>	Sigma
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	New England Biolabs
RNase H	New England Biolabs
Superscript II Reverse Transkriptase	GibcoBRL und Invitrogen
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase 1U/μl	Eigenproduktion (MLU-Halle)
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen

### **B.1.6 Puffer, Standardlösungen und Medien**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Standardlösungen und Medien entsprechen, sofern nicht anders angegeben, den Vorschriften von Sambrook und Mitarbeitern (Sambrook et al., 1989).

### **B.1.7 Chemikalien und Standards**

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt); Applichem (Darmstadt); Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und besaßen den analytischen Reinheitsgrad „p.a.“.

**Tab. B-5: verwendete Chemikalien und deren Bezugsfirmen.**

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Agarose	Peqlab
[α- <sup>32</sup> P] dATP 3000 Ci/mmol	NEN
Ampicillin	Gerbu
Carbenicillin	Gerbu
Hybond™-N <sup>+</sup> Membran	Amersham-Bioscience
Hybond™-P Membran	Amersham-Bioscience
NADP	Gerbu

Tab. B-6: verwendete Größenmarker und deren Bezugfirmen.

Größenmarker	Firma
peqGOLD Leiter-Mix	Peqlab
peqGOLD 1 kb DNA-Leiter	Peqlab
PageRuler™ Prestained Protein Marker	Fermentas
peqGOLD Protein-Marker II	Peqlab

Die Calystegine B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>1</sub> und *N*-Methylcalystegin B<sub>2</sub> wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Naoki Asano (Kanazawa, Japan) zur Verfügung gestellt. Calystegin B<sub>2</sub> wurde von Herrn Prof. Robert Madsen (Technische Universität von Dänemark, Lungby) synthetisiert (Skaanderup und Madsen, 2001). Calystegin A<sub>3</sub> (33% rein) wurde von Frau Antje-Kristin Kießling (MLU Halle-Wittenberg) aufgereinigt. Pseudotropin wurde von Frau Prof. Birgit Dräger (MLU Halle-Wittenberg) nach der Vorschrift von Nickon und Fieser synthetisiert (Nickon und Fieser, 1952).

### **B.1.8 Geräte und Hilfsmittel**

Die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

## **B.2 Methoden**

### **B.2.1 Analytische Methoden**

#### **B.2.1.1 Calystegine und Intermediate der Tropanalkaloidbiosynthese**

Nach der Ernte wurde die Frischmasse der pflanzlichen Gewebe bestimmt. Die einzelnen Gewebe wurden in der Gefriertrocknung (Heto FD 1.0) bis zur konstanten Masse getrocknet und die Trockenmasse ermittelt.

##### **B.2.1.1.1 Extraktion und Derivatisierung von Calysteginen**

Calystegine wurden aus den pflanzlichen Geweben mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) extrahiert. Dazu wurde für 1 g Frischmasse 10 ml Extraktionsmittel verwendet. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm (SIGMA 3K12 Braun Biotech International) wurde der Extraktionsvorgang wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden im Vakuum-Rotationsverdampfer (Heidolph WB 2000) eingeeengt. Zur Abtrennung von neutralen und sauren Begleitstoffen war eine Applikation des wässrigen Extraktes auf einen stark sauren Kationenaustauscher (Ionentauscher I, Merck) erforderlich. Danach wurde die Säule solange mit Wasser gewaschen bis das Eluat einen neutralen pH-Wert aufwies. Die Elution der Calystegine erfolgte mit 2 N Ammoniak. Danach folgte ein weiterer Waschschriff mit zweimal 10 ml Wasser. Das Eluat, bestehend aus dem Ammoniak/Wasser-Gemisch, wurde 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert und anschließend am Rotationsverdampfer bei 50°C auf ein Volumen < 1 ml eingeeengt. Der wässrige Extrakt wurde mit Wasser auf 1 ml/g Frischmasse aufgefüllt.

Da Calystegine nichtflüchtige Substanzen sind, mussten sie für die GC-Analytik (B.2.1.1.5) derivatisiert werden. Ein Aliquot des Extraktes wurde lyophilisiert und nach der Vorschrift von Fleet und Mitarbeitern silyliert (Fleet et al., 1990). Dem Lyophilisat wurden 40 µl Hexamethyldisiloxan (HMDS), 10 µl Trimethylchlorsiloxan (TMCS) und 30 µl Pyridin zugesetzt.

Dieser Ansatz wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 20 min bei 75°C inkubiert. Es wurde 50 µl Azobenzol (1 mg/ml) als interner Standard hinzugefügt und mit n-Hexan auf 500 µl aufgefüllt.

#### **B.2.1.1.2 Extraktion von Intermediaten der Tropanalkaloidbiosynthese**

Mit dieser Methode wurden Tropinon, Tropin und Pseudotropin analysiert. Dazu wurde das Pflanzenmaterial zweimal mit 10 ml/g Frischmasse Methanol/Wasser (1:1) extrahiert und anschließend 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden am Rotationsverdampfer bei 50°C auf ein Volumen < 1 ml eingengt und mit destilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 µl Ammoniak (2 N) wurde der Extrakt auf eine Extrelutsäule (1 g Extrelut®; Merck) appliziert und 20 min inkubiert. Die Elution der Metabolite erfolgte zweimal mit 4 ml Chloroform und einmal mit 4 ml Chloroform/Methanol (9:1). Das vereinigte Eluat wurde zur Trockne eingengt und anschließend in 150 µl Ethylacetat aufgenommen. Der Extrakt wurde mit GC (B.2.1.1.5) oder GC-MS (B.2.1.1.6) untersucht. Dazu wurden 90 µl Extrakt entnommen und 10 µl Azobenzol (1 mg/ml) als interner GC-Standard hinzugefügt.

#### **B.2.1.1.3 Fütterungsversuche mit Tropinon**

Frisch präparierte Knollengewebe (Schale, Mark, Gefäßring), Pflanzengewebe (junge und alte Blätter, Blüten, Wurzeln, Stolone) und Keime wurden mit 60 ml einer 2 mM Tropinonlösung 48 h bei 23°C und 100 rpm inkubiert. Die Experimente fanden unter Langtagbedingungen (16 h hell/8 h dunkel) statt. Als Kontrolle diente jeweils 60 ml destilliertes Wasser. Die Probenaufbereitung erfolgte nach Kapitel B.2.1.1.2. Die Proben wurden mit GC (B.2.1.1.5) oder GC-MS (B.2.1.1.6) untersucht.

#### **B.2.1.1.4 Fütterungsversuche mit Kohlenhydraten**

Die Kohlenhydrate Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Trehalose und Raffinose wurden an verschiedene Knollen- und Pflanzengewebe appliziert. Dazu wurden frisch geerntete Gewebe (Blätter, Keime, Schale, Mark) in jeweils 50 ml 100 mM Zuckerlösung über einen Zeitraum von 48 h bei 23°C, 100 rpm und Langtagbedingungen (16 h hell/8 h dunkel) geschüttelt. Als Kontrolle dienten 50 ml einer 100 mM Sorbitollösung und 50 ml destilliertes Wasser. Die Proben wurden entsprechend Kapitel B.2.1.1.1 aufgearbeitet. Die Calystegine wurden in Keimen und Schale mit GC (B.2.1.1.5) analysiert. Weiterhin wurden die vier Gewebe auf *trl*-, *trll*- und *pmt*-Transkript untersucht (B.2.2.8).

#### **B.2.1.1.5 Gaschromatographie (GC)**

Die Gaschromatographie (GC) diente zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Calystegine und Intermediate der Biosynthese (Tropinon, Tropin und Pseudotropin). Calystegine wurden als Trimethylsilylderivate (TMS-Derivate) bestimmt. Tropinon, Tropin und Pseudotropin wurden ohne Derivatisierung gemessen. Zur Identifizierung der Calystegine und Intermediate wurde neben der Retentionszeit auch das Verhältnis der Peakflächen von PND/FID herangezogen. Die Quantifizierung wurde nur mit dem FID-Signal durchgeführt. Die Ergebnisse für die Calysteginbestimmung ergeben sich aus 3 bis 6 unabhängigen Messwerten, während für

die Intermediate jeweils 3 unabhängige Messungen durchgeführt wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet.

#### Geräteausstattung:

Typ:	Gaschromatograph Hewlett Packard 6890
Vorsäule:	20 cm HP5-Säule
Säule:	HP5 (30 m x 320 µm x 0,25 µm)
Stationäre Phase:	95% Methylsiloxan; 5% Phenylsiloxan
Mobile Phase:	Helium
Detektoren:	Flammenionisationsdetektor (FID) Phosphor-Stickstoff-Detektor (PND)
Brenngase:	synthetische Luft, Wasserstoff
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	1-5 µl

#### GC-Programm für Calystegine:

Starttemperatur:	160°C → 2 min halten
Temperaturgradient:	5°C/min bis 240°C 10°C/min bis 300°C
Injektion:	Split (1:20); 120 kPa; 250°C
Retentionszeiten: (durchschnittlich)	Azobenzol 7,8 min Calystegin A <sub>3</sub> 9,4 min Calystegin B <sub>2</sub> 13,8 min

#### GC-Programm für Intermediate:

Starttemperatur:	65°C
Temperaturgradient:	10°C/min bis 120°C → 2 min halten 15°C/min bis 240°C → 1 min halten
Injektion:	Pulsed Splitless; 200 kPa (1,5 min); 250°C
Retentionszeiten: (durchschnittlich)	Tropinon 8,8 min Tropin 8,9 min Pseudotropin 9,3 min Azobenzol 13,9 min

#### Kalibriergeraden:

Tropinon:	$y = 1956,4 x - 7,5781$	$R^2 = 0,9990$
Tropin :	$y = 1559,4 x - 7,1167$	$R^2 = 0,9923$
Pseudotropin :	$y = 1765,5 x - 7,3190$	$R^2 = 0,9997$
A-Calystegine :	$y = 231,89 x$	$R^2 = 0,9573$
B-Calystegine :	$y = 275,24 x$	$R^2 = 0,9794$

#### B.2.1.1.6 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS)

Gaschromatographie mit Massenspektrometrie wurde zusätzlich zum qualitativen Nachweis der Calystegine (stichprobenartig), zum Identitätsnachweis der endogen vorhandenen Intermediate und zum Nachweis der durch Tropinonfütterung gebildeten Intermediate genutzt. Die Temperaturprogramme entsprechen denen in Kapitel B.2.1.1.5. Die Injektion erfolgte ohne Split bei 250°C und 120 kPa.

**Geräteausstattung:**

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

**B.2.1.2 Analyse von Stoffwechselmetaboliten (*metabolic profiling*)**

Die Analyse von Stoffwechselmetaboliten in *Solanum tuberosum* L. wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt.

**B.2.1.2.1 Extraktion von Stoffwechselmetaboliten**

Das pflanzliche Gewebe wurde im Mörser mit flüssigem Stickstoff zerkleinert, aliquotiert (57–64 mg Frischmasse) und anschließend in der Retschmühle (Schwingmühle Retsch<sup>®</sup> MM 200) homogenisiert. Die Kontrollproben (ohne Pflanzengewebe) wurden dem gleichen Verfahren unterzogen. Als Extraktionsmittel diente 300 µl bei –20°C vorgekühlter Methanol (100%). Anschließend erfolgte die Zugabe von je 30 µl Standard für die apolare und die polare Phase.

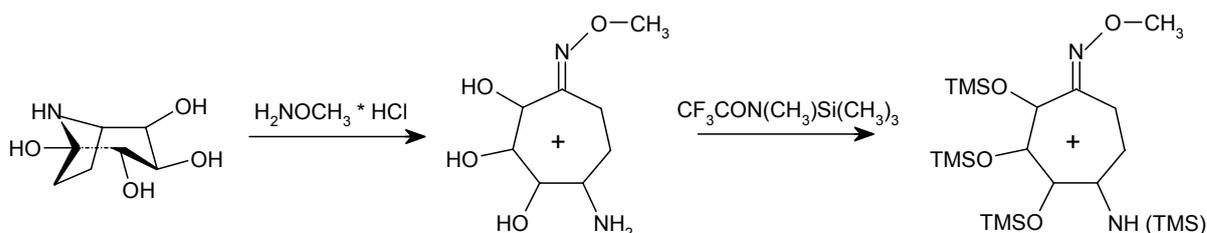
<b>Standards:</b>	Nonadecansäuremethylester (2 mg/ml in Chloroform)	→ apolarer Standard
	Ribitol (0,2 mg/ml in 100% Methanol)	
	d4Alanin (1 mg/ml in Wasser)	
	Isoascorbat (0,5 mg/ml in Wasser)	→ polarer Standard

Dieser Extraktionsansatz wurde 15 min bei 70°C und 750 rpm auf dem Eppendorf-Thermomixer geschüttelt, wobei nach 1 min ein Druckausgleich erfolgen musste. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde erneut 5 min bei 37°C geschüttelt. Dem Ansatz wurden 400 µl Wasser hinzugefügt und danach 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417 C). Von der polaren Phase wurden zwei Aliquots mit je 160 µl über Nacht im Vakuumkonzentrator (Heto) zur Trockne eingengt und bis zur Derivatisierung bei –80°C gelagert.

**B.2.1.2.2 Derivatisierung der Stoffwechselmetabolite**

Die Derivatisierung von Stoffwechselmetaboliten ist ein zweistufiger Prozess. Die Metabolite werden zuerst methoxymiert und anschließend silyliert. Abb. B-3 zeigt die Reaktionsgleichung der Derivatisierung am Beispiel von Calystegin B<sub>2</sub>.

Dem getrockneten Aliquot der polaren Phase wurden 40 µl Methoxyaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridin) zugesetzt und 90 min bei 30°C geschüttelt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden 10 µl Alkane (Dodecan, Pentadecan, Octadecan, Nonadecan, Docosan, Octacosan, Dotriacontan, Hexatriacontan) und 70 µl MSTFA (*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, Macherey-Nagel) hinzugefügt und nochmals 30 min bei 37°C geschüttelt. Von diesem Derivatisierungsansatz wurden 80 µl in GC-Fläschchen überführt. Gleichzeitig wurden mehrere Waschproben vorbereitet, die 10 µl Alkane und 110 µl MSTFA enthielten.



**Abb. B-3: Reaktionsgleichung für die Derivatisierung von Calystegin B<sub>2</sub>.**

Bei den Calysteginen besteht vermutlich eine Tautomerie zwischen dem Bicyklus und dem Monozyklus als Keton. Bei der Derivatisierung reagiert zuerst die Ketogruppe mit Methoxyaminhydrochlorid zum Methyloxim. Anschließend werden die Hydroxylgruppen und die primäre Aminogruppe mit MSTFA silyliert.

### B.2.1.2.3 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS)

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Stoffwechselmetaboliten wurde ebenfalls die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion genutzt.

#### Geräteausstattung:

GC:	Fison Instruments GC 8000 Series
MS:	Fison Instruments MD 800
Autosampler :	Fison Instruments AS 800
Software :	MASSLAB (ThermoQuest, Manchester UK)
Säule :	Rtx <sup>®</sup> -5Sil MS w/integra guard (Restek) 30 m x 250 µm x 0,25 µm
Stationäre Phase :	mit Silarylenphase überzogen, Polarität ähnlich einer 5% Diphenyl- /95% Dimethylpolysiloxanphase, mit Phenylringen in der Polymerkette
Mobile Phase :	Helium
Detektor:	Quadrupolmassenspektrometer Source-Temperatur: 200°C Interface-Temperatur: 250°C Scan: 40-600 (EL+)
Flussrate :	1 ml/min
Injektionsvolumen:	1 µl und 3 µl Luft

#### GC-Programm:

Starttemperatur:	70°C
Temperaturgradient:	1°C/min bis 76°C 6°C/min bis 350°C → 1 min halten 50°C/min bis 310°C → 10 min halten
Injektion:	Splitless, 2 min; 129 kPa; 230°C

### B.2.1.2.4 Statistische Auswertung

Chromatogramme und Massenspektren wurden mit der MASSLAB-Software ausgewertet. Zur qualitativen Auswertung wurde zusätzlich AMDIS (NIST) herangezogen unter Verwendung

der massenspektralen Bibliothek Q\_MSRI\_ID („The Golm Metabolome Database“, [www.csdb.mpimp-golm.mpg.de/gmd.html](http://www.csdb.mpimp-golm.mpg.de/gmd.html)) (Schauer et al., 2005). Die quantitative Auswertung erfolgte mit Excel (Microsoft, USA). Die Ergebnisse ergaben sich aus 1-7 Einzelwerten. Mittelwert, Standardabweichung, student's t-Test sowie Pearson-Korrelationen wurden berechnet. Die Hauptkomponentenanalyse erfolgte mit SPSS. Bei der Hauptkomponentenanalyse wurde aus einem mehrdimensionalen Datensatz ein zweiter mehrdimensionaler Datensatz erstellt, der die Hauptinformationen enthielt. Dadurch wurde der Datensatz reduziert. Die Hauptkomponentenanalyse wurde nach den vier Schritten (Korrelationsmatrizen, Faktorextraktion, Rotation und Faktorwerte) durchgeführt (Brosius 2004). Das Ergebnis wurde in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt. Zur Überprüfung der Güte des Datensatzes wurde das Kaiser-Meyer-Olkin-Maß (KMO) berechnet (Kaiser 1974; Brosius 2004).

### B.2.1.3 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase (B.2.3.6.3) angewendet. Das Substrat UDPGlucose sowie das Produkt UTP wurden chromatographisch untersucht.

#### Geräteausstattung:

Typ:	Merck HITACHI
Probenaufgabesystem:	Autosampler L-7200
Registriergerät:	Interface Module D-7000
Software:	Chromatography Data Station Merck Hitachi Model D-7000
Säule:	Li-Chrospher RP18 125 x 4 mm
Mobile Phase:	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Lösung (pH 6,4) mit 0,6 mM Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat und 3% Methanol
Säulenofentemperatur:	30°C
Detektor:	DAD (L-7455) bei 260 nm
Flussrate:	0,4 ml/min
Hochdruckpumpe:	Pumpe L-7100
Injektionsvolumen:	30 µl

#### Retentionszeiten: (durchschnittlich)

UDPGlucose	6,1 min
UTP	9,7 min

Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde eine Kalibriergerade für UTP im Konzentrationsbereich von 0,1 mM bis 2 mM erstellt.

#### Kalibriergerade:

UTP:	$y = 15,921 x + 0,064$	$R^2 = 0,99799$
------	------------------------	-----------------

## **B.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **B.2.2.1 Isolierung von DNA aus Bakterien**

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit und das QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen) verwendet. Jeweils 2 ml (Miniprep) bzw. 50 ml (Midiprep) Bakterienkultur, die über Nacht bei 37°C und 150 rpm angezogen wurde, wurden 15 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Die DNA-Präparation aus dem Bakterienpellet wurde anschließend nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **B.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA kamen nur RNase freie Materialien zum Einsatz. Alle Geräte wurden sterilisiert und wässrigen Pufferlösungen wurde 0,1% (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) zugesetzt.

#### **B.2.2.2.1 Isolierung mit TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz**

Diese Methode wurde zur Isolation von Gesamt-RNA aus Kartoffelschalen (Lagerungsexperiment) angewendet. Für diese Methode waren 200 mg des in flüssigem Stickstoff gemörserten Gewebes ausreichend. Die Isolation der RNA erfolgte mit TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz (GibcoBRL und Invitrogen) nach Herstellerangaben. Zur besseren Abtrennung der Proteine wurde die Chloroformfällung wiederholt.

#### **B.2.2.2.2 Isolierung mit NTES-Puffer und Phenol/Chloroform (Reinbothe et al., 1992)**

Diese Methode diente zur Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen- und Knollengeweben. Je nach Gewebeart wurden 0,1 - 3,0 g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Dem Pflanzenpulver wurden 6 ml NTES-Puffer und 6 ml Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt.

**NTES-Puffer:**

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

Der Mörser wurde anschließend mit 4 ml NTES-Puffer und 4 ml Phenol/Chloroform (1:1) gespült. Danach wurde 5 min kräftig geschüttelt und 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Zur Abtrennung der Proteine wurde die obere polare Phase mit 1 Volumenteil Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, 1 min kräftig geschüttelt und 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis die Interphase proteinfrei war. Die Fällung der Nukleinsäuren aus der polaren Phase erfolgte über Nacht mit 0,1 Volumenteil 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumenteilen 96%igem Ethanol. Die Nukleinsäuren wurden 10 min bei 4°C und 5000 rpm abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 5 ml DEPC-Wasser gelöst. Die Gesamt-RNA wurde über Nacht mit 5 ml Lithiumchlorid (4 M LiCl; 20 mM Natriumacetat pH 5,2) gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die RNA je nach Pelletgröße in 20 – 1000 µl DEPC-Wasser gelöst.

### B.2.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm. Hierzu wurde der RNA/DNA Calculator Gene Quant II verwendet. Die Verunreinigung mit Proteinen wurde aus dem Verhältnis der optischen Dichten bei 260 und 280 nm ermittelt. Werte zwischen 1,8 – 2,0 stehen für eine hohe Reinheit (Mülhardt 2000).

### B.2.2.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit der SUPERSCRIPT™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (GibcoBRL und Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurden 5 µg Gesamt-RNA verwendet. Alle Schritte erfolgten nach Herstellerangaben.

### B.2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Hierbei kam die Standard-PCR und die Kolonie-PCR zum Einsatz.

#### B.2.2.5.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde zur Amplifikation der cDNA der UDPGlucose-Pyrophosphorylase genutzt. Weiterhin wurden die Sonden der Tropinonreduktasen I und II für den Northern Blot durch Standard-PCR hergestellt. Als DNA-Template wurde cDNA oder Plasmid-DNA verwendet. Die benutzten Oligonukleotide sind in Kapitel B.1.4 aufgeführt. Ein PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

<b>PCR-Ansatz:</b>	10 x PCR-Puffer	5 µl
	2,5 mM dNTP`s	4 µl
	direkter Primer 50 pmol/µl	1 µl
	reverser Primer 50 pmol/µl	1 µl
	DNA-Template	1 µl
	<i>Taq-/Pfu</i> -DNA-Polymerase	1 U
	Aqua bidest.	ad 50 µl

Für die PCR kamen zwei verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde für einfache PCR-Reaktionen verwendet. Um eine höhere Lesegenauigkeit zu erreichen, wurde für die Amplifikation der cDNA`s der entsprechenden Gene die *Pfu*-DNA-Polymerase benutzt.

Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem T3 Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Folgende Bedingungen wurden für die PCR verwendet:

<b>PCR-Bedingungen:</b>	<b>für <i>Taq</i>-DNA-Polymerase</b>		<b>für <i>Pfu</i>-DNA-Polymerase</b>	
Denaturierung:	95°C	5 min	95°C	5 min
	95°C	1 min	95°C	1 min
Annealingphase:	AT (Primer)	1 min	AT (Primer)	1 min
Elongation:	72°C	1 min/kb	72°C	2 min/kb
	72°C	10 min	72°C	10 min

} 35 Zyklen

Annealingtemperatur (AT) des Primers = Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) des Primers – 1°C

Die amplifizierten Fragmente wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert und anschließend kloniert und sequenziert (B.2.2.6).

#### B.2.2.5.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Überprüfung der Transformation in *E. coli* angewendet. Dazu wurden Bakterienkolonien von der Agarplatte mittels Zahnstocher in ein PCR-Gefäß mit 20 µl sterilem Wasser überführt. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte 10 min bei 95°C. Danach wurde eine Standard-PCR (B.2.2.5.1) mit genspezifischen Primern (B.1.4) und *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

#### B.2.2.6 Klonierung und Sequenzierung

Die für die Klonierung verwendeten Methoden zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA im Agarosegel, zur Restriktion von DNA und zur Ligation von DNA wurden nach Vorschriften von Sambrook und Mitarbeitern (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur (B.2.2.1), die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und die Reinigung von PCR-Produkten standen Kits (B.1.5) zur Verfügung. Die Methoden wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Alle Transformationen erfolgten nach der Hitzeschockmethode von Cohen und Mitarbeitern (Cohen et al., 1972).

Die **Klonierung** lief nach folgendem Schema ab:

1. Standard-PCR
2. elektrophoretische Auftrennung der DNA im Agarosegel
3. Elution der DNA aus dem Agarosegel
4. Klonierung in den pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO TA-Vektor (Invitrogen)
5. Transformation in TOP10<sup>®</sup>-Zellen (Invitrogen)
6. Identifizierung von positiven Klonen durch Kolonie-PCR (B.2.2.5.2)
7. Plasmidpräparation (B.2.2.1)
8. Restriktion, Auftrennung der DNA im Agarosegel, Elution der DNA aus dem Gel
9. Ligation in den pET21d-Vektor (Novagen)
10. Transformation in XL1-Blue-Zellen (Stratagen)
11. Identifizierung von positiven Klonen durch Kolonie-PCR (B.2.2.5.2)
12. Plasmidpräparation (B.2.2.1)
13. Transformation in die Expressionszellen BI21 Codon Plus<sup>®</sup> (DE3) –RP(Stratagen)

Zur Klonierung des PCR-Produktes in den pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO TA-Vektor (Invitrogen) wurde die Eigenschaft der *Taq*-DNA-Polymerase ausgenutzt, überhängende Adenosin-Reste am PCR-Produkt zu synthetisieren. Bei Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase musste das Adenosin nach vorheriger Reinigung des PCR-Produktes angefügt werden. Das PCR-Produkt wurde 15 min bei 72°C mit 10 x PCR-Puffer, 0,25 µmol dATP und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase inkubiert.

Die PCR-Produkte wurden nach dem Klonierungsschritt in die Vektoren durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurde mit dem A.L.F.-Sequenziergerät (Pharmacia) von Frau Dr. Angela Peterson am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle sowie von der Firma MWG-

Biotech durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software OMIGA 1.2 (Oxford Molecular Ltd.) und über das Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### B.2.2.7 Rekombinante Expression in *E. coli*

Die transformierten Bakterien wurden in TB-Medium unter Zusatz von 50 µg/ml Carbenicillin als Selektionsantibiotikum bei 37°C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Die Induktion der Proteinbiosynthese erfolgte mit 1 mM IPTG bei 37°C für 4 h. Anschließend wurden die Bakterien 30 min bei 4°C und 5000 rpm abzentrifugiert und lysiert (B.2.3.1.2).

### B.2.2.8 Northern Blot

Der Northern Blot wurde zum Transkriptonachweis der *trl*, *trll* und *pmt* in Pflanzengeweben genutzt. Dazu wurden 20 µg Gesamt-RNA in einem 1,2%igen Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde zusammen mit 2-3 Volumenteil Probenpuffer (66,7% deionisiertes Formamid; 27 mM MOPS; 8,9% Formaldehyd) und 0,1 Volumenteil Stopppuffer (0,25% (m/v) Bromphenolblau; 50% (v/v) Glycerol; 1 mM EDTA; pH 8,0) 15 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zusatz von 2 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) erfolgte die Elektrophorese für 3-4 h bei 100 V unter Verwendung von MOPS-Puffer (20 mM MOPS pH 7,0; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA). Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert und 10 min in 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat) geschwenkt. Die RNA wurde über Nacht durch Kapillarwirkung auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond™-N<sup>+</sup> Membran, Amersham-Bioscience) gebロットet. Als Transferpuffer diente 20 x SSC. Die RNA wurde anschließend durch UV-Strahlung (120 mJ, UV Stratalinker 2400, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden und die Membran 10 min in DEPC-Wasser gewaschen. Die Membran wurde bis zur Hybridisierung (B.2.2.11) in Folie eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

### B.2.2.9 Dot Blot

Der Dot Blot wurde zur Überprüfung der Sonden und zum Ausschluss der Sondenkreuzreaktivität zwischen *trl* und *trll* eingesetzt. Plasmid-DNA (0,5–5 µg), die das nachzuweisende Gen enthielt, wurde punktförmig auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond™-N<sup>+</sup> Membran, Amersham-Bioscience) aufgetragen. Als Negativkontrolle diente bidestilliertes Wasser. Der Blot wurde 5 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), 5 min in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4) und 5 min in 2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M Natriumcitrat) geschwenkt. Durch UV-Strahlung (120 mJ) wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden. Bis zur Hybridisierung (B.2.2.11) wurde der Blot in Folie eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

### B.2.2.10 Radioaktive Sondenmarkierung

Für die Hybridisierung wurden folgende Sonden verwendet:

*trl*: 400 bp-Fragment vom 3`Terminus (Keiner 2001)

*trll*: 400 bp-Fragment vom 3`Terminus (Keiner 2001)

*pmt*: 200 bp-Fragment vom 5`Terminus (Stenzel 2005)

Die Sonden wurden durch Standard-PCR (B.2.2.5.1) amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert.

Als Ladekontrolle diente die 18S rRNA aus *Lycopersicon esculentum* (Dobrowolski et al., 1989).

Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte nach dem *random primed* Verfahren nach Feinberg und Vogelstein (Feinberg und Vogelstein, 1983) unter Verwendung des High Prime DNA Labeling Kits (Roche) und 50  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dATP (NEN). Anschließend wurden ungebundene Nukleotide mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit entfernt.

### B.2.2.11 Hybridisierung von Northern Blot und Dot Blot

Die Hybridisierung von Northern Blot (B.2.2.8) und Dot Blot (B.2.2.9) wurde nach (Amasino 1986) durchgeführt. Die Blots wurden in 100 ml Hybridisierungspuffer für 4 h bei 42°C vorhybridisiert. Zum Abblocken aller freien Bindungsstellen wurde Heringsperma-DNA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugefügt.

**Hybridisierungspuffer:**

0,25 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
0,25 M	NaCl
1 mM	EDTA
7% (m/v)	SDS
50% (v/v)	deionisiertes Formamid
10% (m/v)	PEG (M <sub>r</sub> 6000)

Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde erfolgte die Hybridisierung für 16 h bei 42°C. Die unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde anschließend nach folgendem Waschschemata entfernt:

**Waschschemata:**

	5 min; RT	2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M Natriumcitrat)
zweimal	20 – 60 min; 65°C	0,25 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2% (m/v) SDS, 1 mM EDTA
zweimal	20 min; 65°C	0,05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1% (m/v) SDS, 1 mM EDTA

Der Blot wurde in Folie eingeschweißt und zur Detektion für 16 h auf eine Phosphorimagerplatte (Fuji) exponiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphorimager (Fuji, BAS 1500). Mit 0,1%iger (m/v) kochender SDS-Lösung wurde die Sonde wieder von der Membran entfernt. Der Blot wurde danach mit weiteren Sonden hybridisiert.

## B.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### B.2.3.1 Proteinextraktion

#### B.2.3.1.1 Denaturierende Gesamtproteinextraktion aus Pflanzengewebe

Pflanzenproteinextrakte für die Western Blot-Analyse (B.2.3.4) wurden durch Phenol-extraktion nach Meyer und Mitarbeitern durchgeführt (Meyer et al., 1988). Das gemörserte Pflanzenmaterial (ca. 1 g) wurde mit 3 ml Tris-gesättigtem Phenol pH 8,0 und mit 3 ml phenolgesättigtem 10 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert und anschließend 30 min geschüttelt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm wurde die wässrige Phase und die Interphase verworfen. Die Proteine wurden aus der Phenolphase mit 0,1 M methanolischer Ammoniumacetatlösung für mindestens 4 h bei -20°C gefällt. Durch 10minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm wurden die Proteine abgetrennt. Das Pellet wurde viermal mit 0,1 M

methanolischer Ammoniumacetatlösung gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Proteine wurden in Probenpuffer (68 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% Glycerol; 2,3% (m/v) SDS; 5% (v/v) Mercaptoethanol) gelöst und danach 3 min bei 100°C erhitzt.

### **B.2.3.1.2 Proteinextraktion aus Bakterien**

Das in *E. coli* überexprimierte Protein (B.2.2.7) wurde aus den Bakterien durch Bakterienlyse gewonnen. Dazu wurde die Bakterienkultur nach entsprechender Induktion des Proteins 30 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Zur Lyse wurde das Bakterienpellet in Lysepuffer resuspendiert und mit 0,1% Triton X-100 und 1 mg/ml Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienzellen wurden im Ultraschallbad (Sonorex RK 100) aufgeschlossen (sechsmal 10 s mit jeweils 5 s Pause auf Eis). Zur Trennung von löslicher und unlöslicher Fraktion wurde das Bakterienlysat 30 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Zur Reduktion der Viskosität der löslichen Proteinfraction wurde DNase (FLUKA) zugesetzt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Proteingehalt (B.2.3.2.1) und die Enzymaktivität des Lysates (B.2.3.6) bestimmt und das Protein gereinigt (B.2.3.5).

**Lysepuffer:**                      50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,0  
  10 mM Imidazol  
  300 mM NaCl

### **B.2.3.2 Quantifizierung von Proteinen**

#### **B.2.3.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Quantifizierung von Proteinen aus Bakterienlysaten (B.2.3.1.2) erfolgte photometrisch nach einer Methode von (Bradford 1976). Die Messungen wurden am Zweistrahlphotometer UV-160 A (Shimadzu) durchgeführt. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 50 – 180 µg/ml verwendet.

#### **B.2.3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Esen**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Pflanzenproteinextrakten (B.2.3.1.1), die durch Phenolextraktion gewonnen wurden, erfolgte mit einer Methode von (Esen 1978). Hierzu wurden 5 µl des Proteinextraktes auf eine Filterscheibe FN7 (Durchmesser 24 mm) appliziert und getrocknet. Als Standard wurden 5 µl Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 2 µg/µl eingesetzt. Als Blindwert wurden 5 µl Probenpuffer (B.2.3.1.1) verwendet. Die Filterscheiben wurden 20 min in Färbelösung (0,2% (m/v) Coomassie Brilliant Blau R250; 25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert und anschließend einmal mit kaltem, zweimal mit heißem und nochmals mit kaltem Wasser gewaschen. Die Elution des Protein-Farbstoffkomplexes erfolgte mit 3 ml 0,5% (m/v) SDS über Nacht bei Raumtemperatur. Die Absorption wurde am Photometer (Pharmacia LKB – Ultrospec III) bei 578 nm bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Absorptionswerte auf den Standard bezogen.

#### **B.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) wurde zur Detektion von überexprimiertem Protein (B.2.2.7) und zur Auftrennung von Pflanzenproteinextrakten (B.2.3.1.1) für den nachfolgenden Western Blot (B.2.3.4) verwendet.

Die Proteinproben wurden mit gleichen Teilen Probenpuffer (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,01% (m/v) Bromphenolblau; 2% (m/v) SDS; 50% (v/v) Glycerol); 5% (v/v) Mercaptoethanol) versetzt und 10 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der Minikammer „PHERO-minivert“ (Biotech-Fischer). Die Proteine wurden zuerst bei 100 V und 25 mA im Sammelgel konzentriert und anschließend bei 150 V und 40 mA im Trenngel aufgetrennt. Als Größenmarker diente der PageRuler™ Prestained Protein Marker von Fermentas sowie der peqGOLD Protein-Marker II von Peqlab.

**Sammelgel:**

5% (m/v)	Acrylamid/Bisacrylamid
0,125 M	Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (m/v)	SDS
0,1% (v/v)	TEMED
0,05% (m/v)	APS

**Trenngel:**

12,5% (m/v)	Acrylamid/Bisacrylamid
0,375 M	Tris-HCl, pH 8,8
0,1% (m/v)	SDS
0,1% (v/v)	TEMED
0,05% (m/v)	APS

**Elektrophoresepuffer :**

25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
192 mM	Glycin
0,1% (m/v)	SDS

Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie- (B.2.3.3.1) oder Silberfärbung (B.2.3.3.2) sichtbar gemacht oder für den Western Blot (B.2.3.4) verwendet.

#### **B.2.3.3.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen**

Die Proteingele wurden 20 min in Fixierlösung (50% (v/v) Methanol; 12% (v/v) Essigsäure) geschwenkt. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation der Proteingele in Färbelösung (0,2% (m/v) Coomassie Brilliant Blau R250; 42,5% (v/v) Ethanol; 5% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure). Zum Sichtbarwerden der Proteinbanden wurden die Gele 2-3 h entfärbt (25% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure). Die Gele wurden noch 10 min in Trocknerlösung (40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 6% (v/v) Glycerol) geschwenkt und zur Dokumentation in Folie eingebettet.

#### **B.2.3.3.2 Silberfärbung von Proteingelen**

Für die Silberfärbung wurden die Proteingele für 1 h in der Fixierlösung (50% (v/v) Methanol; 12% (v/v) Essigsäure; 0,05% (v/v) Formaldehyd) fixiert. Nach drei 20minütigen Waschrufen mit 50%igem Ethanol wurden die Gele 1 min mit 0,02% (m/v) Natriumthiosulfat behandelt. Die Gele wurden dreimal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und darauf folgend 20 min mit Silbernitratlösung (0,2% (m/v) Silbernitrat; 0,075% (v/v) Formaldehyd) imprägniert. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit Wasser, wurden die Proteingele entwickelt (4% (m/v) Natriumcarbonat; 0,0005% (m/v) Natriumthiosulfat; 0,05% (v/v) Formaldehyd). Die Gele wurden dreimal kurz gewaschen und die Entwicklung 10 min mit 50% (v/v) Methanol und 12% (v/v) Essigsäure abgestoppt. Die Gele wurden getrocknet und in Folie aufbewahrt (B.2.3.3.1).

### B.2.3.4 Western Blot

Der Western Blot wurde zur Detektion von TRI- und TRII-Protein in pflanzlichen Geweben angewendet. Dazu wurden Gesamtproteine extrahiert (B.2.3.1.1) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (B.2.3.3). Für jedes Gewebe wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt. Die aufgetragenen Proteinkonzentrationen lagen zwischen 5 und 50 µg. Die Proteine wurden unter Verwendung des Nass-Blot Verfahrens vom Gel auf eine PVDF-Membran (Hybond™-P Membran, Amersham-Bioscience) transferiert. Als Apparatur wurde das EC 140 Mini Blot Module verwendet. Der Transfer erfolgte bei 20 V und 150 mA für mindestens 6 h in Elektrophoresepuffer (B.2.3.3) mit 20% (v/v) Methanolanteil.

#### B.2.3.4.1 Detektion von Proteinen auf dem Western Blot

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zum Abblocken aller freien Bindungsstellen 45 min in Blockpuffer geschüttelt. Anschließend wurde der Blot über Nacht bei 4°C in 20 ml Blockpuffer mit dem primären Antikörper inkubiert. TRI- und TRII-Antikörper aus *S. tuberosum* wurden freundlicherweise von Frau Heike Kaiser (MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Die Antikörper wurden von Frau Kaiser über HiTrap™ NHS aktivierte HP Säulen (Amersham Bioscience) gereinigt und somit die Kreuzreaktivität zwischen TRI und TRII ausgeschlossen (Kaiser et al., 2006). Die gereinigten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Nach der Reaktion mit primärem Antikörper folgten drei 10minütige Waschstschritte in Waschpuffer. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Rabbit IgG – Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma) verwendet. Die Reaktion mit sekundärem Antikörper (1:4000 verdünnt) wurde in 20 ml Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Proteine wurden in 20 ml Entwicklungspuffer mit 0,15 mM BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) und 0,15 mM NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) angefärbt. Die Reaktion wurde 10 min in 20 ml Stopppuffer abgestoppt.

<b>Blockpuffer:</b>	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,2% (m/v)	Tween 20
	5% (m/v)	Magermilchpulver
<b>Waschpuffer:</b>	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,2% (m/v)	Tween 20
<b>Entwicklungspuffer:</b>	100 mM	Tris-HCl, pH 9,7
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
<b>Stopppuffer:</b>	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,02% (m/v)	Natriumazid
	20 mM	EDTA

### B.2.3.5 Proteinreinigung

Um das überexprimierte Protein (UGPase) für weitere Versuche zu verwenden, war eine Reinigung des Proteins nötig. Durch die Expression im pET21d-Vektor (Novagen) wurde an das Protein ein 6facher Histidin-Tag am C-Terminus angefügt. Dieser ermöglichte die Reinigung durch Nickelaffinitätschromatographie. Nach der Reinigung wurde das Protein aufkonzentriert.

#### B.2.3.5.1 Nickelaffinitätschromatographie

Die Proteinreinigung wurde am ÄKTA™ Explorer 100 (Amersham Bioscience) unter Verwendung einer HiTrap™ Chelating Sepharose™ HP-Säule (Amersham Bioscience) durchgeführt. Das Reinigungsprinzip beruht auf der Chelatkomplexbildung zwischen Nickel-Ionen und Histidin-Resten. Zur Vorbereitung der Reinigung wurde die Säule mit NiSO<sub>4</sub> beladen und das zu reinigende Bakterienlysats durch einen Filter (hydrophobic PTFE) mit einer Porengröße von 45 µm filtriert.

Für die Reinigung wurde die Säule zunächst mit 20 ml Bindepuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Proteinrohextrakt (ca. 50 ml) auf die Säule aufgetragen. Zur Entfernung von nicht gebundenen Proteinen wurde die Säule mit 30 ml Bindepuffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte über einen Imidazolgradienten von 10 – 500 mM Imidazol über 25 ml unter Verwendung von Bindepuffer und Elutionspuffer. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml Elutionspuffer nachgewaschen. Während der Elution wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml gesammelt und sofort mit 3 ml Stabilitätspuffer versetzt, um die Imidazolkonzentration zu verringern. Die einzelnen Fraktionen wurden im Anschluss auf den Proteingehalt (B.2.3.2.1) und die Enzymaktivität (B.2.3.6) untersucht sowie mit der SDS-PAGE (B.2.3.3) überprüft.

<b>Bindepuffer:</b>	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,8
	500 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol

<b>Elutionspuffer:</b>	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,8
	500 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol

<b>Stabilitätspuffer:</b>	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	15% (v/v)	Glycerol

#### B.2.3.5.2 Proteinkonzentrierung

Die Proteinlösung musste für weitere Anwendungen aufkonzentriert werden, um Protein in ausreichender Konzentration zur Verfügung zu haben. Hierzu wurden die proteinhaltigen Fraktionen (UGPase) vereinigt und 4-5 h bei 4°C und 5000 rpm unter Verwendung eines Membranfilters (Macrosept®, PALL) mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa zentrifugiert.

### B.2.3.6 Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase

Die Bestimmung der Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase (UGPase) wurde nach modifizierten Vorschriften von Nakano und Mitarbeitern durchgeführt (Nakano et al., 1989). Die UGPase katalysiert folgende Reaktion:



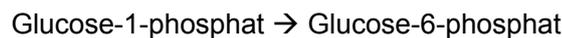
Zur Bestimmung der Enzymaktivität unter Verwendung von UDPGlucose als Substrat wurden zwei verschiedene photometrische Assays angewendet sowie eine HPLC-Methode. Bei der HPLC-Methode wurde UTP als Reaktionsprodukt direkt quantifiziert, während die photometrischen Bestimmungen gekoppelte Enzymreaktionen darstellten.

Den photometrischen Methoden lag folgendes Reaktionsschema zugrunde:

#### 1. Reaktion: UDPGlucose-Pyrophosphorylase



#### 2. Reaktion: Phosphoglucomutase



#### 3. Reaktion: Glucose-6-phosphatdehydrogenase



### B.2.3.6.1 Dreistufiger photometrischer Enzymassay

Bei Verwendung des dreistufigen Assays wurde jede Reaktion separat durchgeführt. Reaktion 1 und 2 wurde jeweils 2 min bei 30°C inkubiert und anschließend 5 min bei 100°C denaturiert. Reaktion 3 erfolgte am Zweistrahlphotometer UV-160A (Shimadzu). Hier wurde die NADPH+H<sup>+</sup>-Zunahme bei 340 nm und 30°C über einen Zeitraum von 2 min verfolgt. Der Blindwert wurde ohne Substrat durchgeführt.

**Reaktion 1:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
2 mM PP<sub>i</sub>  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM UDPGlucose  
3,1 µg UDPGlucose-Pyrophosphorylase  
ad 500 µl Aqua bidest.

**Reaktion 3:** 200,61 µl Reaktion 2  
0,3 mM NADP<sup>+</sup>  
1 Unit Glucose-6-phosphat-dehydrogenase  
ad 1000 µl Aqua bidest.

**Reaktion 2:** 200 µl Reaktion 1  
1 Unit Phosphoglucomutase

### B.2.3.6.2 Einstufiger photometrischer Enzymassay

Der einstufige photometrische Assay wurde zur Bestimmung des K<sub>m</sub>-Wertes der UGPase herangezogen. Hier liefen alle drei Reaktionen gleichzeitig ab. Die NADPH+H<sup>+</sup>-Zunahme wurde am Zweistrahlphotometer bei 340 nm und 30°C über einen Zeitraum von 2 min verfolgt. Der Blindwert enthielt kein Substrat.

**Enzymassay:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
2 mM PP<sub>i</sub>  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,3 mM NADP<sup>+</sup>  
2 mM UDPGlucose  
1 Unit Phosphoglucomutase  
1 Unit Glucose-6-phosphatdehydrogenase  
0,16 µg UDPGlucose-Pyrophosphorylase  
ad 1000 µl Aqua bidest.

### B.2.3.6.3 Bestimmung der Enzymaktivität durch HPLC

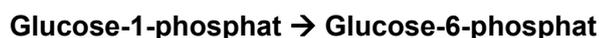
Zur direkten Bestimmung der Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase wurde ein HPLC-Verfahren angewendet. Das Endprodukt UTP wurde hierbei direkt quantifiziert.

**Enzymassay:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
2 mM PP<sub>i</sub>  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM UDPGlucose  
2 µg UDPGlucose-Pyrophosphorylase  
ad 1000 µl Aqua bidest.

Die Reaktion wurde 2 min bei 30°C inkubiert und 30 µl des Ansatzes in der HPLC (B.2.1.3) analysiert.

### B.2.3.7 Enzymaktivität der Phosphoglucomutase

Die Enzymaktivität der Phosphoglucomutase wurde photometrisch am Zweistrahlphotometer und am Microtiterplatten-Lesegerät (ThermoLabsystems Multiskan Ascent) bestimmt. Die Phosphoglucomutase katalysiert folgende Reaktion:



Der Bestimmung lagen die Reaktionen 2 und 3 aus Kapitel B.2.3.6 zugrunde. Die NADPH+H<sup>+</sup>-Zunahme wurde am Zweistrahlphotometer bei 340 nm und 30°C über einen Zeitraum von 2 min und am Microtiterplatten-Lesegerät bei 30°C über einen Zeitraum von 10 min gemessen.

**Enzymassay:** 25 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1 mM Glucose-1-phosphat  
0,3 mM NADP<sup>+</sup>  
1 Unit Phosphoglucomutase  
1 Unit Glucose-6-phosphatdehydrogenase

### B.2.3.8 Enzymaktivität der Glucose-6-phosphatdehydrogenase

Die Glucose-6-phosphatdehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



Die Enzymaktivität wurde photometrisch bei 340 nm am Zweistrahlphotometer bestimmt. Hierzu wurde die NADPH+H<sup>+</sup>-Zunahme bei 30°C über einen Zeitraum von 2 min gemessen.

**Enzymassay:** 25 mM Tris-HCl, pH 8,0  
0,1 mM Glucose-6-phosphat  
0,3 mM NADP<sup>+</sup>  
1 Unit Glucose-6-phosphatdehydrogenase

### B.2.3.9 Bestimmung des $K_m$ -Wertes

Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für die UDPGlucose-Pyrophosphorylase und die Phosphoglucomutase wurden die in den Kapiteln B.2.3.6.2 und B.2.3.7 beschriebenen Methoden verwendet. Die Phosphoglucomutase wurde am Microtiterplatten-Lesegerät untersucht. Für die UGPase wurden Substratkonzentrationen im Bereich von 0,03125 mM bis 2 mM UDPGlucose eingesetzt und für die Phosphoglucomutase 0,0625 mM bis 12 mM Glucose-1-phosphat. Je Substratkonzentration wurden bei der UGPase 10 Messungen und bei der Phosphoglucomutase eine Messung durchgeführt. Für die UGPase wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Enzyme Kinetics Module 1.1* (Systat). Zur  $K_m$ -Wert-Berechnung wurden die Methoden von Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk sowie Eadie-Hofstee verwendet (Michaelis und Menten, 1913; Lineweaver und Burk, 1934; Eadie 1942; Hofstee 1952).

### B.2.3.10 Hemmversuche mit Calystegin B<sub>2</sub>

Um eine mögliche Hemmung der UGPase mit Calystegin B<sub>2</sub> zu untersuchen, wurde der dreistufige photometrische Assay (B.2.3.6.1) angewendet. Calysteginkonzentrationen wurden im Bereich von 0,25 mM bis 1 mM eingesetzt. Da der verwendete Assay ein gekoppelter Enzymtest ist, mussten alle daran beteiligten Enzyme auf Calystegin B<sub>2</sub>-Wirkung untersucht werden.

Zur Untersuchung der Glucose-6-phosphatdehydrogenase wurden 0,1 mM und 0,2 mM Calystegin B<sub>2</sub>-Lösungen zum Enzymassay (B.2.3.8) gegeben. Zur Untersuchung der Phosphoglucomutase wurde der Enzymtest (B.2.3.7) am Zweistrahlphotometer mit 0,25 mM und 0,5 mM Calystegin B<sub>2</sub>-Lösung durchgeführt. Es wurden 4 bis 10 Messungen durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet.

Da Calystegin B<sub>2</sub> eine Wirkung auf die Phosphoglucomutase zeigte, musste die Calystegin B<sub>2</sub>-Wirkung auf die UGPase über das HPLC-Verfahren (B.2.3.6.3) getestet werden. Calysteginkonzentrationen im Bereich von 0,25 mM bis 1 mM wurden untersucht.

### B.2.3.11 Bestimmung des $K_i$ -Wertes

Für die Hemmung der Phosphoglucomutase mit Calystegin B<sub>2</sub> wurde der  $K_i$ -Wert ermittelt. Als Inhibitorkonzentration wurde 0,25 mM Calystegin B<sub>2</sub> eingesetzt. Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wurde wie bei der  $K_m$ -Wert Bestimmung (B.2.3.9) verfahren. Die Messungen wurden am Microtiterplatten-Lesegerät durchgeführt.

## C Ergebnisse

### C.1 Untersuchungen zur Bildung der Calystegine in *Solanum tuberosum*

Calystegine akkumulieren in *Solanum tuberosum* L. in allen Pflanzenorganen. Knollengewebe wie Schale, Augen und Keime weisen die höchsten Calystegingehalte auf. Die beiden Hauptcalystegine in *S. tuberosum* sind Calystegin A<sub>3</sub> und Calystegin B<sub>2</sub> (Keiner und Dräger, 2000). In Wildtyp-Kartoffeln und in Kartoffeln, die mit Invertase (apoplastisch bzw. cytosolisch) bzw. mit Saccharosesynthase (*antisense*) transformiert waren, wurde die Calysteginakkumulation in Knollengeweben bestimmt und Transkript- und Proteingehalte für die Biosyntheseenzyme PMT, TRI und TRII analysiert. Dazu wurden die Wildtyp-Knollen und die Kartoffelknollen jeder Transformationsart in zwei verschiedene Größen eingeteilt (Größe 1 = 4-6 cm Durchmesser; Größe 2 = 2-4 cm Durchmesser). Die Gewebe Mark und 1-2 mm Schale wurden 10 Tage nach der Ernte verwendet.

In einem nächsten Experiment wurde die Calysteginbiosynthese während der Lagerung der Kartoffeln bei verschiedenen Temperaturbedingungen untersucht. Die Knollen wurden nach der Ernte 10 Tage bei Raumtemperatur gelagert und anschließend 76 Tage bei 12-15°C. Zum Start des Keimungsprozesses wurden die Kartoffeln nach 6tägiger Kühlung bei 4°C bei Raumtemperatur ausgelegt. Das Lagerungsschema ist in Abb. C-1 dargestellt. An den gekennzeichneten Tagen 1-7 wurden Proben vorbereitet.

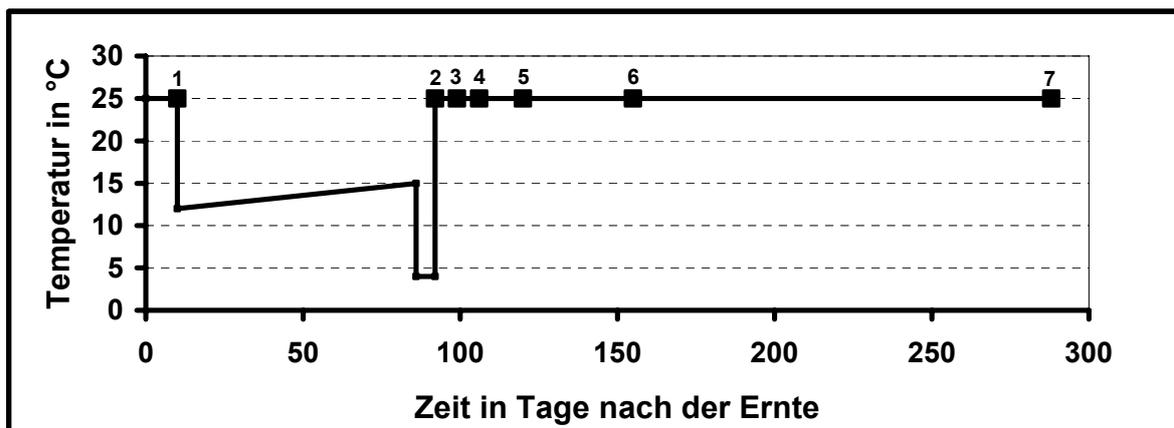


Abb. C-1: Lagerungsschema der Kartoffelknollen.

Probenvorbereitungen nach 10 Tagen (Probe 1); nach 92 Tagen (Probe 2); nach 99 Tagen (Probe 3); nach 106 Tagen (Probe 4); nach 120 Tagen (Probe 5); nach 155 Tagen (Probe 6) und nach 288 Tagen (Probe 7) nach der Ernte.

Zu den jeweiligen Erntezeitpunkten wurden verschiedene Knollengewebe (1-2 mm Schale, Mark, Augen und Keime) präpariert. In der Schale wurde an den Tagen 1-7 die Calysteginakkumulation sowie die Transkriptmenge für die Biosyntheseenzyme PMT, TRI und TRII untersucht. Im Mark wurde die Calysteginakkumulation nur am Tag 1 und in den Augen an den Tagen 2-6 analysiert. Keime wurden je nach Verfügbarkeit auf Calystegingehalte und auf Transkripte sowie Proteine der Biosyntheseenzyme untersucht. Die Einteilung der Knollen in zwei Größen wurde beibehalten.

Daneben wurde die Calysteginbiosynthese in Kartoffelpflanzen untersucht. Pflanzen zweier verschiedener Generationen wurden auf die Calysteginakkumulation in Blüten, in jungen und alten Blättern sowie in Stolonen und Wurzeln analysiert. Außerdem wurden Transkript- und Proteingehalte der Enzyme PMT, TRI und TRII für die entsprechenden Gewebe bestimmt.

Zusätzliche Aufschlüsse über die Calysteginbiosynthese sollten die Bestimmung der endogen vorkommenden Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin und die Analyse der Tropin- und Pseudotropinbildung nach Tropinonapplikation geben.

Von den Kartoffelpflanzen der ersten Generation konnten Kartoffelknollen gewonnen werden. In diesem Experiment sollte beobachtet werden, wie sich die Calystegine und Biosynthesenzyme nach 5monatiger Lagerung in der Kälte bei 4°C verhalten. Hierzu wurde neben 1-2 mm Schale und Mark auch der Gefäßring (ca. 2-5 mm breit) präpariert. Zusätzlich zu den Transkript- und Proteingehalten der Enzyme PMT, TRI und TRII wurde auch die Akkumulation von endogenen Intermediaten und die Bildung von Tropin und Pseudotropin nach Tropinonfütterung untersucht.

### **C.1.1 Transgene Kartoffelknollen und ihre Eigenschaften**

#### **C.1.1.1 Transgene Linien und Kohlenhydratstoffwechsel**

Von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase standen drei verschiedene Transformationslinien (U-IN1 (3); U-IN1 (33) und U-IN1 (41)) zur Verfügung, wobei Linie 33 die höchste und Linie 3 die geringste Transformationsstärke aufwies. Die Kartoffelknollen zeichneten sich durch eine erhöhte Invertaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp aus. Durch die erhöhte Invertaseaktivität akkumulierten mehr lösliche Zucker. Bei verringerter Saccharosekonzentration und gleichem Fructosegehalt waren stark erhöhte Glucosegehalte zu verzeichnen (Tab. C-1; (Sonnewald et al., 1997)). Von den Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase standen fünf verschiedene Transformationslinien (U-IN2 (17); U-IN2 (30); U-IN2 (33); U-IN2 (34) und U-IN2 (42)) zur Verfügung. Hierbei zeichnete sich Linie 17 mit der höchsten Transformationsstärke aus, gefolgt von Linie 30 und 34. Zu den Linien 33 und 42 wurden keine Angaben gemacht. Auch diese Kartoffellinien waren durch eine erhöhte Invertaseaktivität gekennzeichnet. Die erhöhte Invertaseaktivität resultierte in einer verstärkten Akkumulation von löslichen Zuckern. Die Saccharosekonzentration war stark und die Fructosekonzentration leicht erniedrigt. Demgegenüber waren sehr hohe Glucosekonzentrationen zu verzeichnen (Tab. C-2; (Sonnewald et al., 1997)). Von den Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese wurden sechs verschiedene Transformationslinien (RSSa (99); RSSa (108); RSSa (112); RSSa (114); RSSa (129) und RSSa (130)) verwendet. Linie 112 wies den stärksten Transformationseffekt auf, gefolgt von Linie 129 und Linie 108. Die Kartoffellinien waren durch eine stark verringerte Saccharosesyntheseaktivität gekennzeichnet. Demgegenüber war die Invertaseaktivität in den transgenen Linien stark erhöht. Daraus resultierte eine erhöhte Akkumulation von löslichen Zuckern. Während in Linie 112 die Saccharosekonzentration nur verdoppelt ist, wurde eine 277fach erhöhte Glucosekonzentration und eine 158fach erhöhte Fructosekonzentration im Vergleich zum Wildtyp ermittelt (Tab. C-3; (Zrenner et al., 1995)). Für die Linien 99, 114 und 130 lagen die Eigenschaften nicht vollständig vor.

**Tab. C-1: Eigenschaften der Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase. (Sonnewald et al., 1997)**

<b>Eigenschaft</b>	<b>Wildtyp</b>	<b>U-IN1 (3)</b>	<b>U-IN1 (33)</b>	<b>U-IN1 (41)</b>
Invertaseaktivität nmol*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> Protein	9	82	598	479
Saccharosegehalt in µmol/g FM	15,8	2,7	1,2	1,9
Glucosegehalt in µmol/g FM	2,1	29,6	38,0	36,9
Fructosegehalt in µmol/g FM	1,1	1,9	1,1	2,2

**Tab. C-2: Eigenschaften der Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase. (Sonnewald et al., 1997)**

Eigenschaft	Wildtyp	U-IN2 (17)	U-IN2 (30)	U-IN2 (34)
Invertaseaktivität nmol*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> Protein	24	452	358	246
Saccharosegehalt in µmol/g FM	15,8	0,6	0,7	1,4
Glucosegehalt in µmol/g FM	2,1	40,6	38,3	24,2
Fructosegehalt in µmol/g FM	1,1	0,8	0,9	0,5

**Tab. C-3: Eigenschaften der Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase. (Zrenner et al., 1995)**

Eigenschaft	Wildtyp	RSSa (112)	RSSa (129)	RSSa (108)
Saccharosesynthaseaktivität µmol*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> Protein	36,5	1,4	3,0	8,5
saure Invertaseaktivität nmol*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> Protein	0,4	15,2	10,4	1,7
neutrale Invertaseaktivität nmol*min <sup>-1</sup> *mg <sup>-1</sup> Protein	1,7	6,0	3,9	2,9
Saccharosegehalt in %/g TM	1,6	2,5	2,7	1,0
Glucosegehalt in %/g TM	0,03	7,0	2,5	0,5
Fructosegehalt in %/g TM	0,01	2,2	0,6	0,15

### C.1.1.2 Knollengröße und Knollenanzahl

Kartoffeln mit überexprimierter Invertase zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Knollengröße und eine veränderte Knollenanzahl je Pflanze. Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase zeigten größere Knollen bei geringerer Knollenanzahl je Pflanze. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase waren kleiner als Wildtyp-Kartoffeln. Die Knollenanzahl je Pflanze war erhöht (Sonnewald et al., 1997; Tauberger et al., 1999). Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase wiesen keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf (Zrenner et al., 1995). Die erhaltenen Kartoffelknollen hatten unterschiedliche Größen. Es wurde versucht, die Knollen in zwei Größen einzuteilen (Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser, Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser).

### C.1.1.3 Keimungsverhalten

Die Kartoffelknollen wurden nach dem Lagerungsschema in Abb. C-1 aufbewahrt. Nach dem Auslegen bei Raumtemperatur keimten Wildtyp-Kartoffeln und Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase nach ca. 3-4 Wochen. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase keimten im Rahmen der Lagerungsperiode von 288 Tagen nicht. Die Kartoffeln färbten sich schwarz und vertrockneten. Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase (Linien RSSa (99), (108), und (130)) keimten ebenfalls 3-4 Wochen nach dem Auslegen bei Raumtemperatur, während Kartoffeln der Linien RSSa (112), (114) und (129) erst nach 8-9 Wochen keimten. Die Linien RSSa (112) und (129) wiesen die höchsten Transformationseffekte auf und zeigten die geringste Saccharosesynthaseaktivität (Zrenner et al., 1995). Abb. C-2 zeigt das Keimungsverhalten am Tag 150 nach der Ernte.

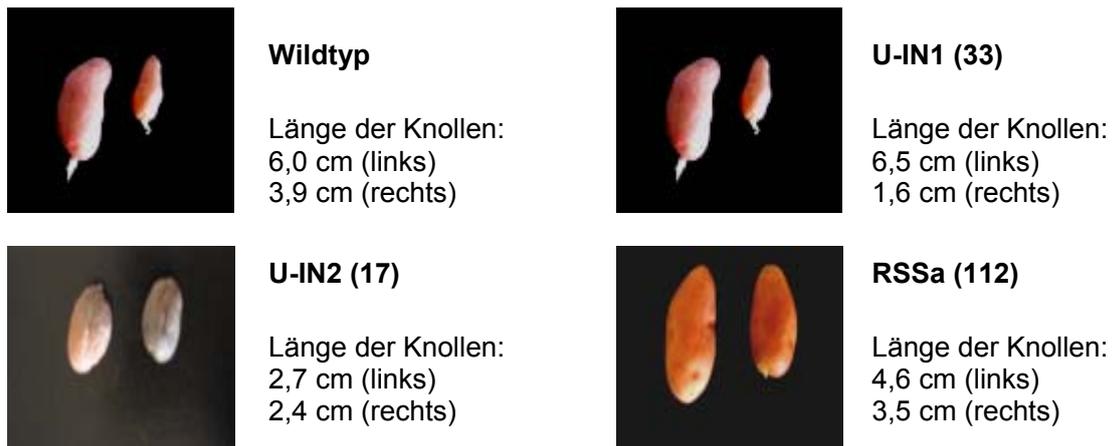


Abb. C-2: Keimungsverhalten der transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung zeigt die jeweils transformationsstärksten Linien und den Wildtyp am Tag 150 nach der Ernte.

#### C.1.1.4 Trockenmasseanteil

Der Trockenmasseanteil wurde im Mark, in der Schale und in den Augen an den Erntetagen 1-7 bestimmt. Die größten Unterschiede im Trockenmasseanteil zwischen Wildtyp- und transgenen Kartoffelknollen zeigten sich im Mark. In Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase und in Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese (Ausnahme: Linie 112) war der Trockenmasseanteil im Vergleich zum Wildtyp nur leicht erniedrigt. Demgegenüber betrug der Trockenmasseanteil in der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese und in Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase nur ca. 54-62% des Wildtypanteils. Hiermit wurden die Ergebnisse aus der Literatur bestätigt (Zrenner et al., 1995; Sonnewald et al., 1997). Während der Lagerung blieb mit Ausnahme von Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase und Kartoffeln der Linie RSSa (112) die Trockenmasse konstant. In Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase sowie in Linie RSSa (112) nahm die Trockenmasse während der Lagerung ab.

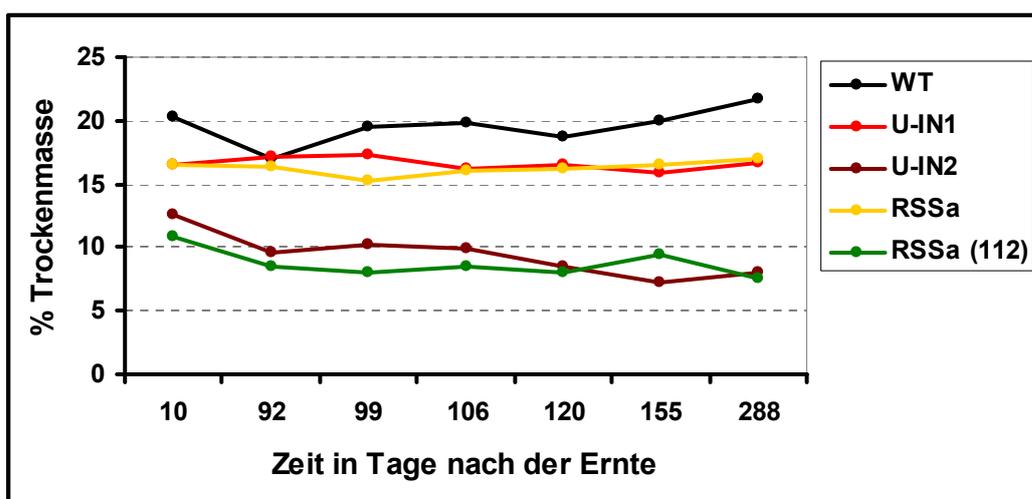


Abb. C-3: Trockenmasseanteil im Mark von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp.

Die Ergebnisse ergeben sich als Mittelwerte von 3-30 Bestimmungen. Die Einzeldaten der jeweiligen Transformationsarten wurden zusammengefasst. Linie RSSa (112) mit der höchsten Transformationsstärke wurde separat betrachtet. Beide Knollengrößen wurden einbezogen. Die Standardabweichung liegt zwischen 10-30%.

### C.1.2 Calysteginbiosynthese 10 Tage nach der Ernte

In transgenen Kartoffelknollen und in Wildtyp-Knollen wurde die Calysteginakkumulation sowie die Expression der Biosyntheseenzyme TRI, TRII und PMT auf Transkript- und Proteinebene untersucht.

#### C.1.2.1 Calysteginakkumulation

Der Calystegingehalt wurde im Mark und in 1-2 mm Schale bestimmt. In beiden Geweben wurden die Calystegine A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> nachgewiesen. Abb. C-4 zeigt die Gesamtcalystegingehalte in transgenen und in Wildtyp-Knollen. In allen Kartoffellinien war der Calystegingehalt in der Schale signifikant höher als im Mark. In Knollen der Größe 1 war in der Schale der meisten Linien der Calystegingehalt geringfügig höher im Vergleich zur Größe 2. In Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase wies die Linie U-IN1 (33) mit dem höchsten Transformationseffekt einen leicht erhöhten Calystegingehalt im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Linien U-IN1 (3) und (41) enthielten weniger Calystegine. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase zeigten ähnliche Calystegingehalte wie der Wildtyp. Lediglich in Linie U-IN2 (30) war der Calystegingehalt leicht erhöht. Bei Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese fiel vor allem Linie RSSa (112) auf. In dieser Linie war in der Schale der 3fache und im Mark sogar der 10fache Gehalt verglichen mit dem Wildtyp zu finden. Linie RSSa (112) ist die Linie mit dem stärksten Transformationseffekt und hat dementsprechend die geringste Saccharosesyntheseaktivität (Zrenner et al., 1995). Alle anderen Linien mit supprimierter Saccharosesynthese zeigten kaum Unterschiede zum Wildtyp. Der Calystegin A<sub>3</sub>-Anteil war innerhalb der transgenen Linien konstant und betrug im Mark ca. 53% und in der Schale ca. 45%.

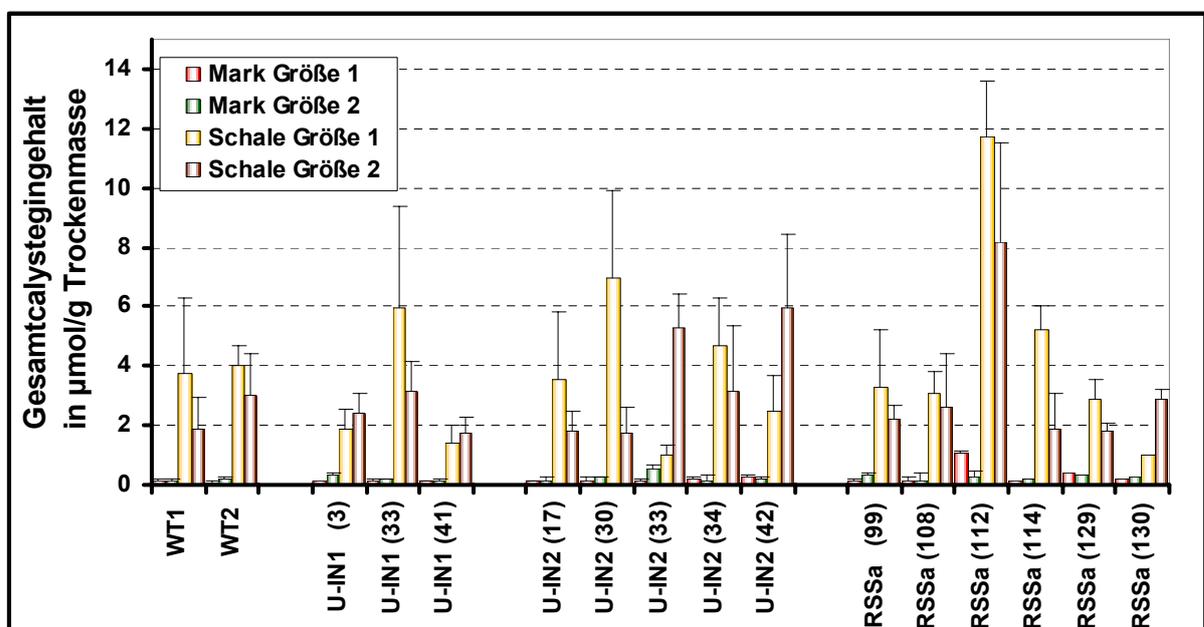


Abb. C-4: Gesamtcalysteginakkumulation im Mark und in 1-2 mm Schale von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp 10 Tage nach der Ernte.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2-3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser

### C.1.2.2 Transkriptnachweis

Transkriptuntersuchungen wurden für die PMT sowie für die TRI und die TRII an 1-2 mm Schale durchgeführt. Mark wurde nicht analysiert. Die Ergebnisse ergeben sich aus Einfachbestimmungen. Für die beiden Enzyme PMT und TRII, die an wichtigen Verzweigungspunkten der Calysteginbiosynthese wirken, wurde in der Schale kein Transkript nachgewiesen. Für die TRI, die für die Tropinbildung verantwortlich ist, wurde hingegen in allen transgenen Linien sowie im Wildtyp Transkript nachgewiesen. Die *trl* zeigte bei modifiziertem Kohlenhydratstoffwechsel veränderte Expressionsstärken. Die höchsten Transkriptmengen für die *trl* wurden in der Linie U-IN1 (41) mit apoplastisch überexprimierter Invertase, den Linien U-IN2 (17) und (33) mit cytosolisch überexprimierter Invertase sowie in den drei transformationsstärksten Linien RSSa (112), (129) und (108) mit supprimierter Saccharosesynthese gefunden. Die Abb. C-5 und Abb. C-6 zeigen die *trl*-Transkripte in 1-2 mm Schale.

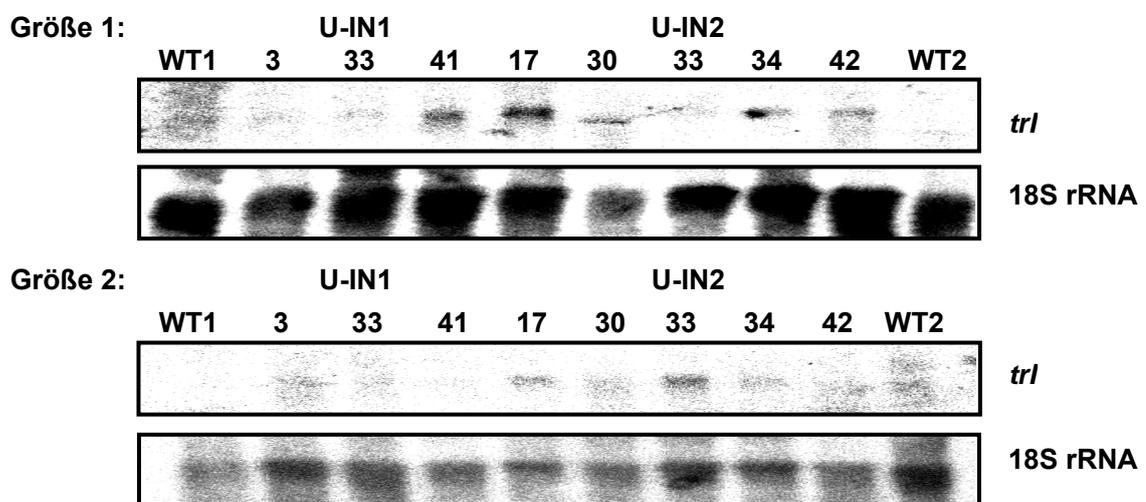


Abb. C-5: Transkriptnachweis der *trl* in 1-2 mm Schale von Kartoffeln mit überexprimierter Invertase im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trl*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle;

Proben: WT1 und WT2: Wildtyp 1 und 2, U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, U-IN2 (17), (30), (33), (34) und (42): Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase; Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser; Knollenalter: 10 Tage nach der Ernte

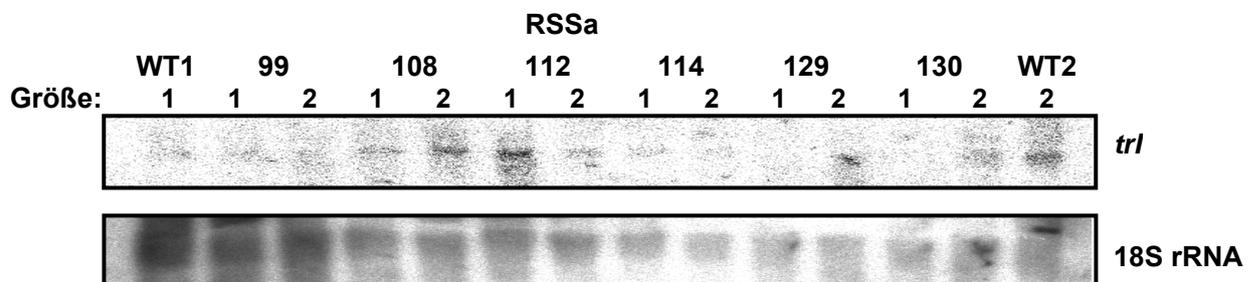


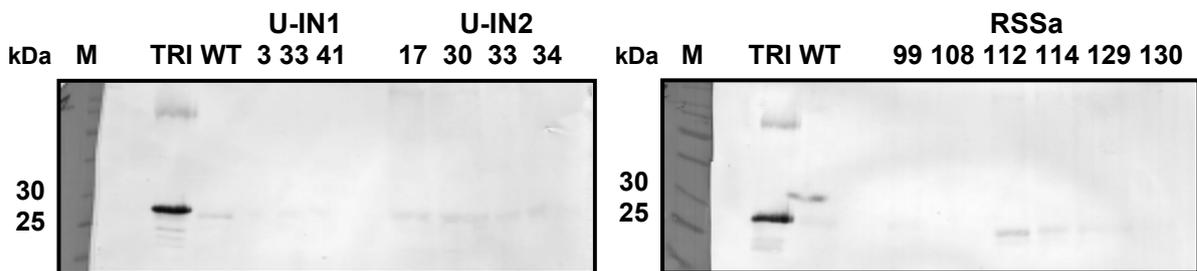
Abb. C-6: Transkriptnachweis der *trl* in 1-2 mm Schale von Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trl*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle;

Proben: WT1 und WT2: Wildtyp 1 und 2, RSSa (99), (108), (112), (114), (129) und (130): Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese; Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser; Knollenalter: 10 Tage nach der Ernte

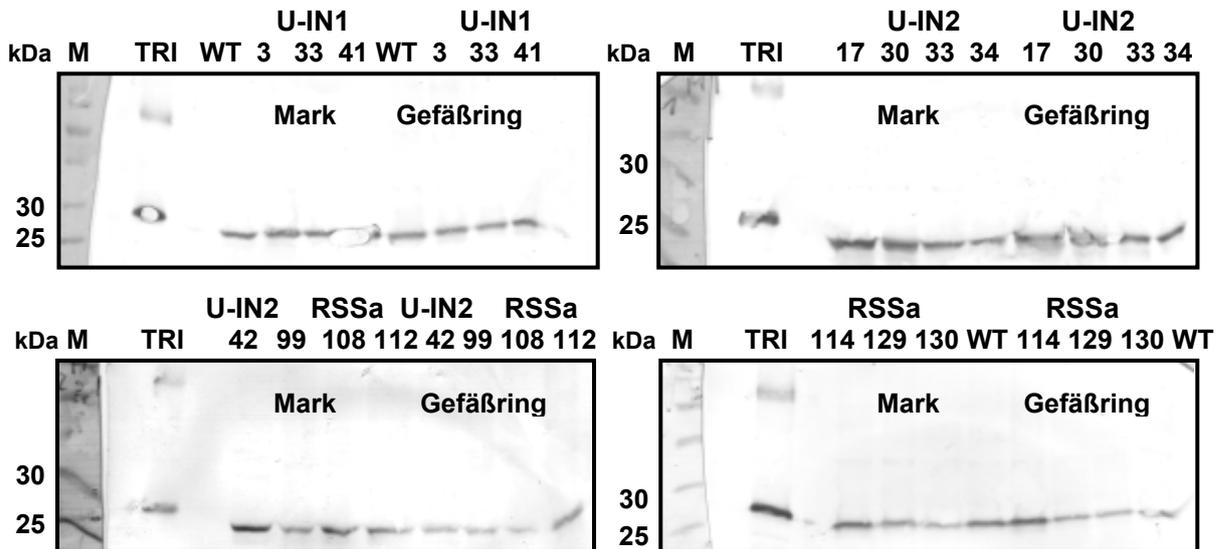
**C.1.2.3 Proteinnachweis**

Proteingehalte für die TRI und die TRII wurden im Mark, in 1-2 mm Schale und im Gefäßring untersucht. TRII-Protein wurde in keinem Gewebe der transgenen Kartoffeln und der Wildtyp-Kartoffeln nachgewiesen. Die TRI hingegen wurde in allen Geweben gefunden. Starke TRI-Expressionen wurden im Mark und im Gefäßring beobachtet, während in der Schale weniger TRI-Protein exprimiert wurde. Zwischen transgenen Linien und Wildtyp waren im Mark und im Gefäßring kaum Unterschiede im TRI-Proteingehalt zu finden. In der Schale lag der Proteingehalt für Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase im Bereich des Wildtyps. Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase zeigten geringere TRI-Proteingehalte, während die transformationsstärkste Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese mehr TRI-Protein enthielt. Die Abb. C-7 und Abb. C-8 zeigen den TRI-Proteinnachweis in Knollengeweben.



**Abb. C-7: Proteinnachweis der TRI in 1-2 mm Schale von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp durch Western Blot.**

Probenauftrag: 6 µg Gesamtprotein; Proben: M: Marker, TRI: Positivkontrolle, WT: Wildtyp, U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, U-IN2 (17), (30), (33) und (34): Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase (Linie U-IN2 (42) ist nicht abgebildet), RSSa (99), (108), (112), (114), (129) und (130): Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese; Knollengröße 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Knollenalter: 10 Tage nach der Ernte; Einfachbestimmung



**Abb. C-8: Proteinnachweis der TRI im Mark und im Gefäßring von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp durch Western Blot.**

Probenauftrag: 30 µg Gesamtprotein; Proben: M: Marker, TRI: Positivkontrolle, WT: Wildtyp, U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, U-IN2 (17), (30), (33), (34) und (42): Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase, RSSa (99), (108), (112), (114), (129) und (130): Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese; Knollengröße 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Knollenalter: 10 Tage nach der Ernte; Einfachbestimmung

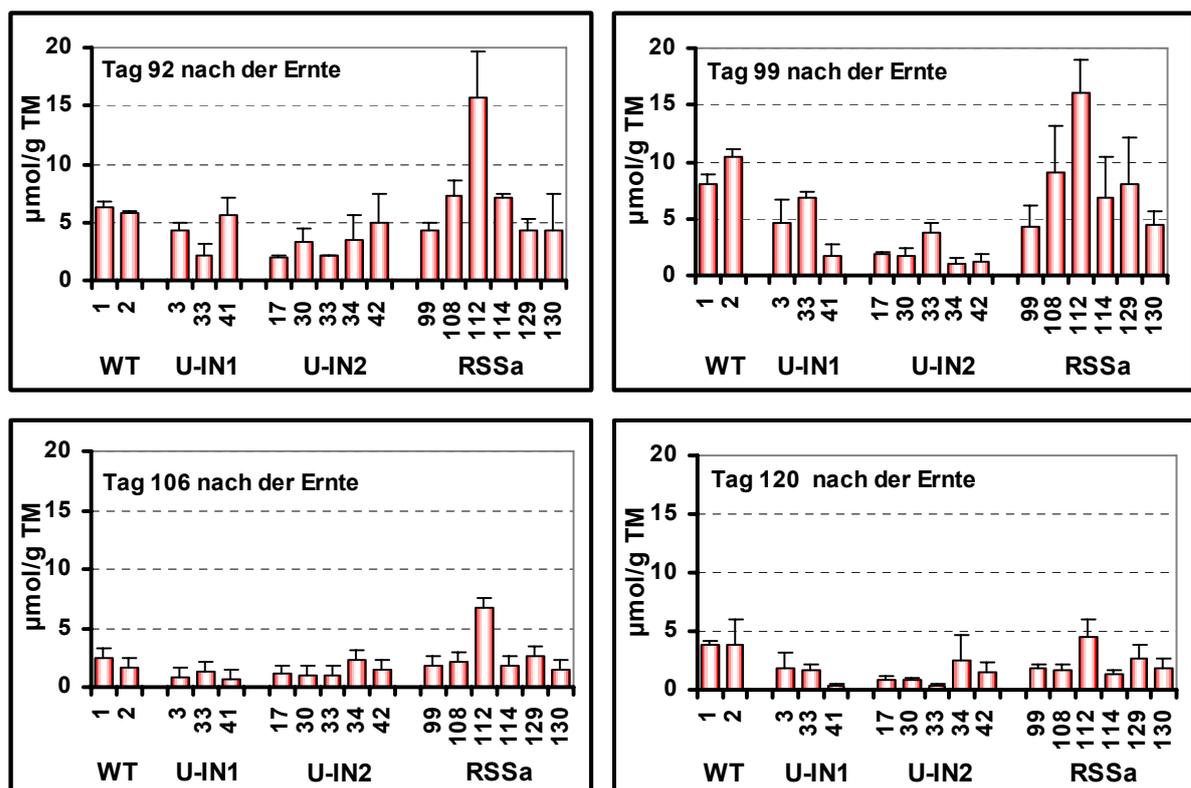
### C.1.3 Calysteginbiosynthese während der Lagerung

Die Kartoffelknollen wurden nach dem Lagerungsschema in Abb. C-1 aufbewahrt. Die Calysteginakkumulation wurde in 1-2 mm Schale sowie in Kartoffelaugen an den Zeitpunkten 1-7 bzw. 2-6 untersucht. Aufgrund des geringen Calystegeingehaltes im Mark (C.1.2.1) wurden für dieses Gewebe keine weiteren Analysen während der Lagerung durchgeführt. Keime wurden je nach Verfügbarkeit untersucht. In der Schale wurde zusätzlich die Transkriptakkumulation der *trl*, *trll* und *pmt* verfolgt.

#### C.1.3.1 Calysteginakkumulation

##### C.1.3.1.1 Calysteginakkumulation in der Schale

Während der Lagerung wurde in der Schale jeweils Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> nachgewiesen. Der höchste Calystegeingehalt wurde an jedem Erntetag für Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese gemessen. Damit wurde das Ergebnis vom Tag 10 (C.1.2.1) bestätigt. Während der Lagerung wurde für Wildtyp-Kartoffeln, für Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase sowie für Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese ein Maximum im Calystegeingehalt am Tag 99 nach der Ernte beobachtet. Innerhalb einer Woche sank der Calystegeingehalt am Tag 106 nach der Ernte stark ab. In diesem Zeitraum begannen die Kartoffeln der genannten Linien mit Ausnahme der Linien RSSa (112), (129) und (114) zu keimen. Anschließend sank der Calystegeingehalt weiter bis zum Tag 288 nach der Ernte. Für Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase lag das Maximum im Calystegeingehalt schon am Tag 10 nach der Ernte. Danach sank der Calystegeingehalt kontinuierlich bis zum Tag 288. Diese Kartoffeln keimten nicht. Abb. C-9 zeigt den Calysteginverlauf in der Schale von Knollen der Größe 1 während der Lagerung. Knollen der Größe 2 zeigten ein ähnliches Bild (ohne Abbildung). Der Anteil an Calystegin A<sub>3</sub> an den Gesamtcalysteginen betrug durchschnittlich 49%.



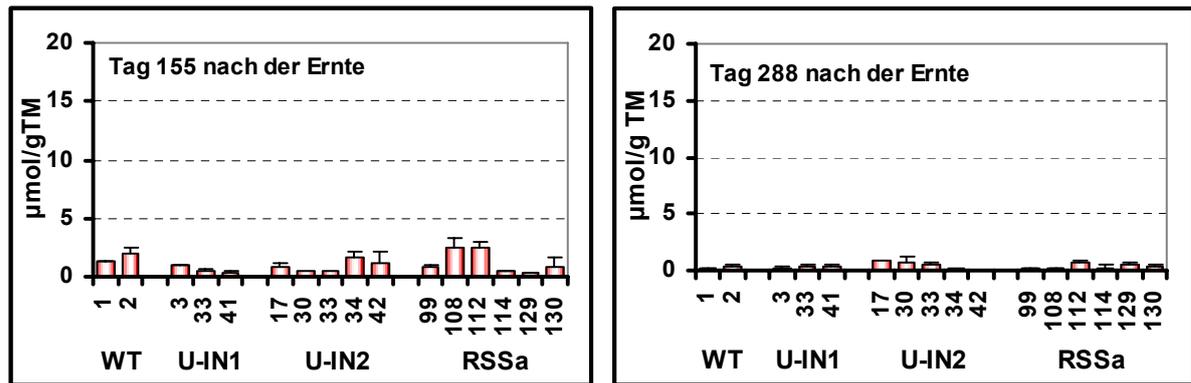


Abb. C-9: Gesamtcalysteginakkumulation in 1-2 mm Schale von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp während der Lagerung.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin  $A_3$  und  $B_2$  dar. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2 Kartoffelknollen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. Größe 1: 4-6 cm Knolldurchmesser

### C.1.3.1.2 Calysteginakkumulation in Kartoffelaugen

In Kartoffelaugen wurden ebenfalls Calystegin  $A_3$  und  $B_2$  nachgewiesen. Am Tag 92 wurden hohe Calysteginkonzentrationen gemessen. Allerdings erreichten nur die Linien RSSa (112) und (129) mit supprimierter Saccharosesynthese sowie die Linie U-IN2 (30) mit cytosolisch überexprimierter Invertase Calysteginkonzentrationen im Wildtyp-Bereich. Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase akkumulierten in den Augen weniger Calystegine als der Wildtyp. Am Tag 120 schwankt der Calystegingehalt sehr stark. Diese Schwankung ist auch im Wildtyp zu beobachten. In Linien mit überexprimierter Invertase (mit Ausnahme der Linien U-IN2 (34) und (42)) sank der Calystegingehalt auf ein Minimum. In Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese wurden noch höhere Calysteginkonzentrationen gefunden. Die Schwankungen im Calystegingehalt wurden auch an anderen Erntetagen sowie in den Augen von Knollen der Größe 2 beobachtet (ohne Abbildung). Keiner und Dräger beschrieben sehr hohe Calystegingehalte in keimenden Augen (Keiner und Dräger, 2000). Es ist denkbar, dass sich die Knollen in unterschiedlichen Phasen vom Übergang aus der Dormanz- in die Keimungsphase befanden und dadurch unterschiedliche Calysteginmengen akkumulierten. Die gezeigten Ergebnisse waren jeweils Momentaufnahmen an den einzelnen Erntetagen. Abb. C-10 zeigt ausgewählte Ergebnisse. Der Anteil Calystegin  $A_3$  lag zwischen 52 und 58%.

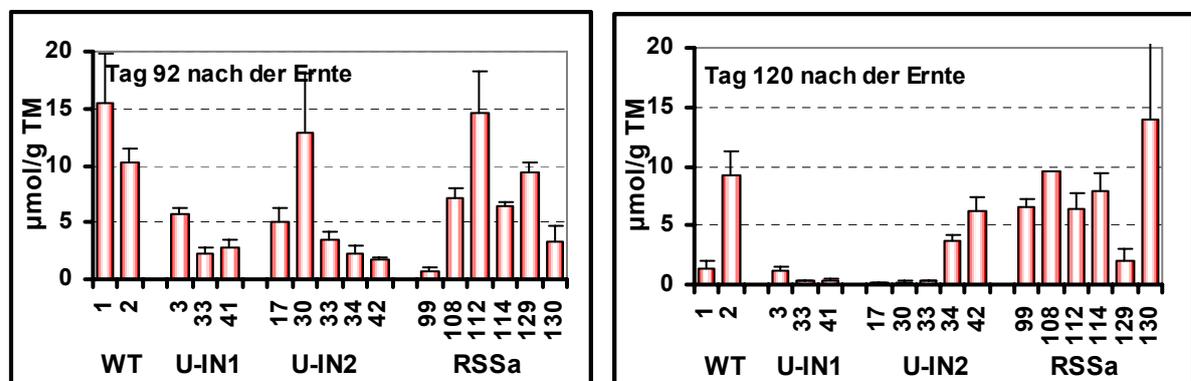


Abb. C-10: Gesamtcalysteginakkumulation in den Augen von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp an ausgewählten Tagen während der Lagerung.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin  $A_3$  und  $B_2$  dar. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2 Kartoffelknollen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. Größe 1: 4-6 cm Knolldurchmesser

### C.1.3.1.3 Calysteginakkumulation in Keimen

Der Calystegingehalt in 1 cm langen Keimen wurde am Tag 288 nach der Ernte bestimmt. Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> waren in allen Keimen zu finden, wobei der Gesamtgehalt sehr gering war. In den transgenen Linien U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase sowie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese wurden höhere Calystegingehalte als im Wildtyp gemessen. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase keimten unter den gewählten Bedingungen nicht. Abb. C-11 zeigt die Calystegingehalte in Keimen 288 Tage nach der Ernte. Der Calystegin A<sub>3</sub>-Anteil betrug ca. 42%. Keime sind in der Literatur als Gewebe mit sehr hohen Calystegingehalten beschrieben worden (Keiner und Dräger, 2000). Der sehr geringe Calystegingehalt am Tag 288 könnte mit dem Alter der Knollen erklärt werden, da auch in der Schale zu diesem Zeitpunkt sehr wenig Calystegine gefunden wurden (Abb. C-9). Im Rahmen der Metabolitenprofilanalyse (C.2.1.3.1) wurden Keime am Tag 176 nach der Ernte analysiert. Aufgrund fehlender Kalibrierung war hier keine Bestimmung der absoluten Calysteginkonzentration im Gewebe möglich. Nach Standardisierung über Ergebnisse in der Schale am Tag 106, die im Rahmen des Lagerungsversuches aber auch in der Metabolitenprofilanalyse untersucht worden waren, konnten Calysteginkonzentrationen für diese Keime abgeschätzt werden. In Wildtyp-Keimen akkumulierten 176 Tage nach der Ernte ca. 20 µmol/g TM, in Keimen der Linie U-IN1 (33) ca. 25 µmol/g TM und in Keimen der Linie RSSa (112) ca. 55 µmol/g TM. Damit akkumulierten in Keimen deutlich mehr Calystegine als in den übrigen Knollengeweben.

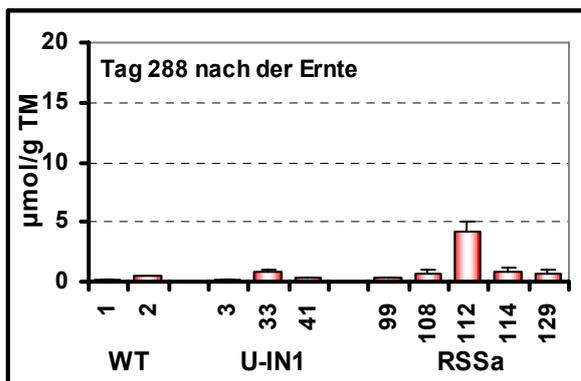


Abb. C-11: Gesamtcallysteginakkumulation in Keimen von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp am Tag 288 nach der Ernte.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2 Kartoffelknollen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. Größe 1: 4-6 cm Knolldurchmesser

### C.1.3.2 Transkriptnachweis

Während der Lagerung wurden Transkripte der *trl*, *trll* und *pmt* in der Schale an den Erntetagen 2-7 sowie in 1 cm und 5-10 cm langen Keimen am Tag 191 und 249 nach der Ernte analysiert. Die Ergebnisse wurden aus Einzelanalysen erhalten. In beiden Geweben wurde kein *pmt*-Transkript detektiert. Transkripte der *trl* und *trll* wurden in beiden Geweben nachgewiesen.

#### C.1.3.2.1 Transkriptnachweis der *trll*

In der Schale wurde *trll*-Transkript an den Tagen 92 und 99 im Wildtyp nachgewiesen. In der Schale von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase wurde die *trll* in den Linien U-IN1 (3) und (33) am Tag 99 (Abb. C-12) und in Kartoffeln mit supprimierter

Saccharosesynthese in der Linie RSSa (99) am Tag 92 (ohne Abbildung) detektiert. Bis zum Tag 99 nach der Ernte stiegen die Calystegine in der Schale an. Der Nachweis der *trll* zu diesem Zeitpunkt könnte auf die Bildung von Calysteginen in der Knolle während der Lagerung hindeuten. In der Schale von Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase wurde kein *trll*-Transkript nachgewiesen. In diesen Kartoffeln sank der Calystegingehalt während der Lagerung kontinuierlich. In Keimen wurde die *trll* in allen transgenen Linien, von denen Keime gewonnen wurden (C.1.1.3), sowie im Wildtyp detektiert. Auch die *trll* zeigte veränderte Expressionsstärken bei verändertem Kohlenhydratstoffwechsel. Eine Korrelation der Transkriptmenge mit der Transformationsstärke wurde für 1 cm bzw. 5-10 cm lange Keime von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase festgestellt. In Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese wurde diese Korrelation nur bedingt beobachtet, da die transformationsstärkste Linie RSSa (112) sehr wenig *trll* exprimierte. Die Linien RSSa (129) und (108) mit dem zweit- bzw. dritthöchsten Transformationseffekt zeigten deutlich erhöhte *trll*-Transkriptmengen (Abb. C-13).

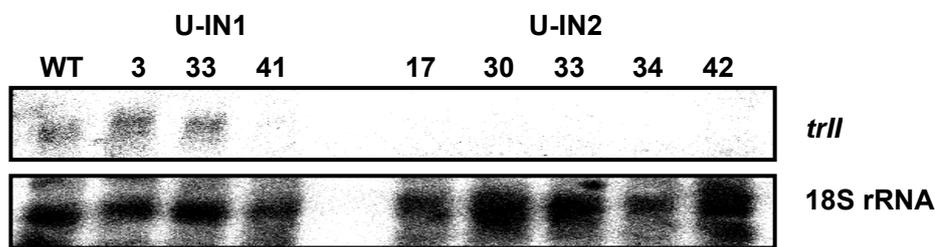


Abb. C-12: Transkriptnachweis der *trll* in 1-2 mm Schale von Kartoffeln mit überexprimierter Invertase im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trll*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: WT: Wildtyp 1, U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, U-IN2 (17), (30), (33), (34) und (42): Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase; Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser; Knollenalter: 99 Tage nach der Ernte

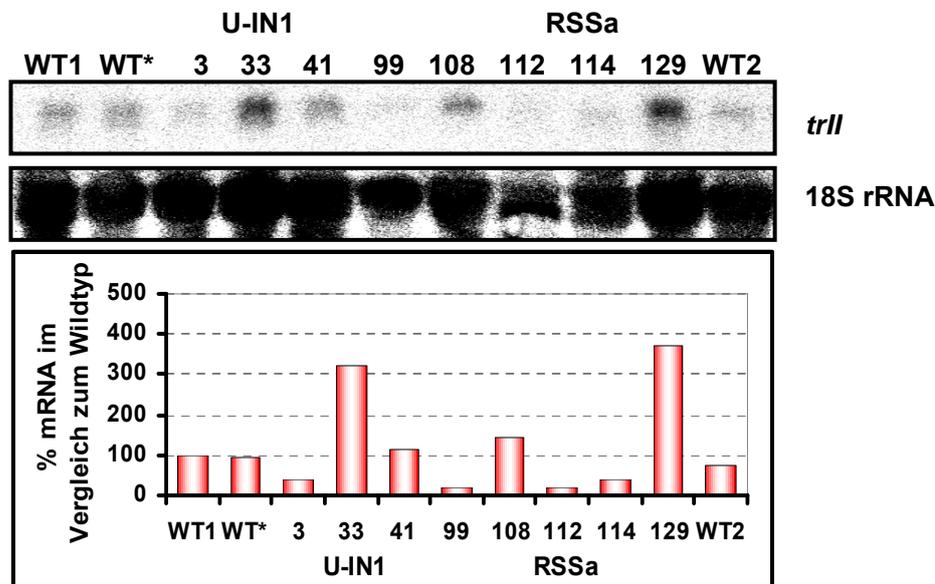


Abb. C-13: Transkriptnachweis der *trll* in Keimen von transgenen Kartoffeln im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trll*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Das Diagramm beinhaltet die Quantifizierung der mRNA der *trll* aus dem Northern Blot im Vergleich zum Wildtyp; Proben: WT1 und WT2: Wildtyp 1 und 2 (1 cm Keime), WT\*: Wildtyp 1 (5-10 cm Keime), U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase (1 cm Keime), RSSa (99), (108), (112), (114) und (129): Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese (1 cm Keime); Knollenalter: 249 Tage nach der Ernte

### C.1.3.2 Transkriptnachweis der *trl*

*trl*-Transkript wurde im Wildtyp und in Kartoffeln mit überexprimierter Invertase bis zum Tag 120 nach der Ernte und in Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase nur bis zum Tag 99 nach der Ernte nachgewiesen. Während der Lagerung wurde die *trl* in der Schale unterschiedlich stark exprimiert. Im Wildtyp wurde die größte *trl*-Transkriptmenge am Tag 92 nach der Ernte nachgewiesen (ohne Abbildung). In der Schale von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase sowie von Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase wurden die höchsten Transkriptmengen am Tag 92 und 99 bzw. am Tag 99 beobachtet. In der Schale von Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase wurde die *trl* bis zum Tag 120 nach der Ernte stark exprimiert, wobei die transformationsstärkste Linie U-IN2 (17) meist die höchste Transkriptakkumulation aufwies. Abb. C-14 zeigt *trl*-Transkript in der Schale am Tag 99 nach der Ernte. In Keimen wurde *trl*-Transkript nur schwach detektiert (ohne Abbildung).

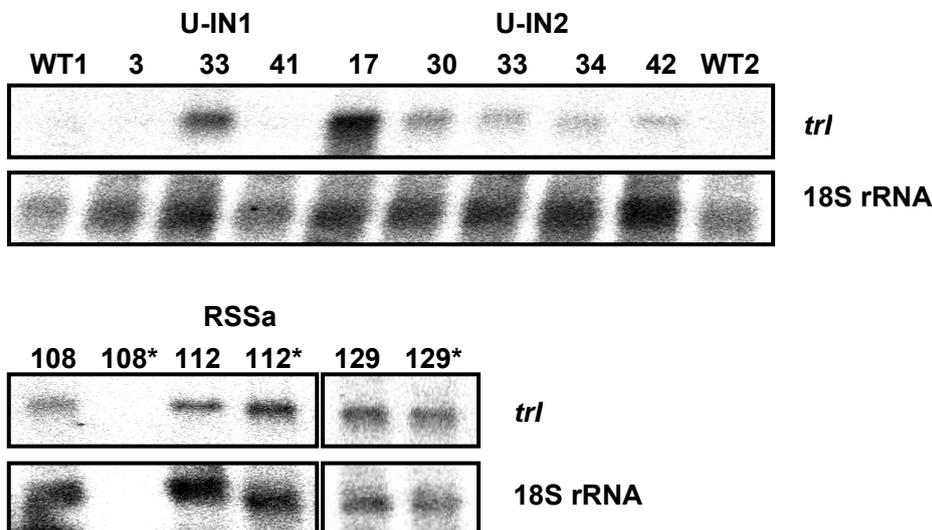


Abb. C-14: Transkriptnachweis der *trl* in 1-2 mm Schale von transgenen Kartoffeln im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trl*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: WT1 und WT2: Wildtyp 1 und 2, U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, U-IN2 (17), (30), (33), (34) und (42): Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase; RSSa (108), (112) und (129): Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase; Von Linie RSSa (108\*) war nicht ausreichend Material für eine gute RNA-Präparation vorhanden; Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser (durch \* gekennzeichnet); Knollenalter: 99 Tage nach der Ernte

### C.1.3.3 Intermediate der Biosynthese

In Keimen sollte die Bestimmung von endogen vorhandenen Intermediaten (Tropinon, Tropin und Pseudotropin) weitere Aufschlüsse über die Biosynthese geben. Zusätzlich wurde an Keime 2 mM Tropinonlösung appliziert und die Bildung der Reduktionsprodukte der TRI bzw. TRII, Tropin und Pseudotropin, verfolgt. Davon können Rückschlüsse auf die TRI- und/oder TRII-Aktivität gezogen werden. Endogen wurde in Keimen von transgenen Linien und vom Wildtyp jeweils Tropinon in Spuren detektiert (Konzentration < 0,1 µmol/g TM). Tropin und Pseudotropin wurden nicht gefunden. Nach Applikation von Tropinon wurde Pseudotropin gebildet. Tropin entstand nur in Spuren. Somit wurde TRI- und TRII-Aktivität im Gewebe nachgewiesen. Im Western Blot wurde allerdings weder TRI- noch TRII-Protein detektiert.

Die höchste Pseudotropinmenge wurde in der Linie U-IN1 (33) gebildet. In dieser Linie wurde schon erhöhtes *trll*-Transkript sowie eine leicht erhöhte Calysteginkonzentration beobachtet. In Keimen von Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese wurde weniger Pseudotropin als im Wildtyp gebildet. Die Linie RSSa (112) hatte weniger *trll*-Transkript aber einen stark erhöhten Calystegingehalt. Abb. C-15 zeigt das Ergebnis.

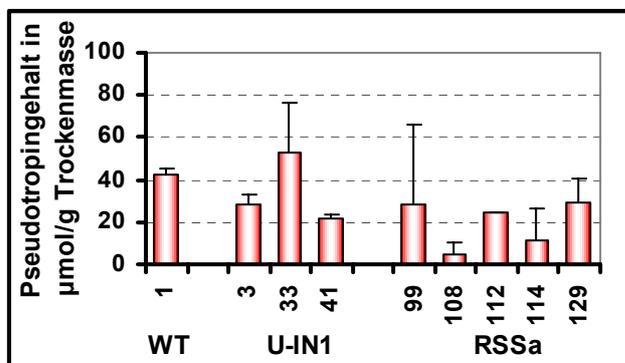


Abb. C-15: Pseudotropinakkumulation in Keimen (1 cm) von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp nach Tropinonapplikation. Die Daten sind Mittelwerte aus 1-3 unabhängigen Bestimmungen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

### C.1.4 Calysteginbiosynthese in Kartoffelpflanzen

Kartoffelpflanzen wurden von Wildtyp-Kartoffeln, von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase sowie von Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese regeneriert. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase keimten nicht. Somit konnten keine Pflanzen regeneriert werden. Pflanzen von zwei verschiedenen Generationen wurden auf die Calysteginbiosynthese untersucht. Pflanzen der ersten Generation wurden von Knollen aus dem Lagerungsversuch regeneriert. Diese Knollen wurden ursprünglich von Hydrokulturen gewonnen. Pflanzen der zweiten Generation wurden von Knollen regeneriert, die von Pflanzen der ersten Generation gewonnen wurden. Beide Pflanzengenerationen wurden in Erde kultiviert. In Tab. C-4 ist das Alter der Gewebe für die einzelnen Analysen dargestellt.

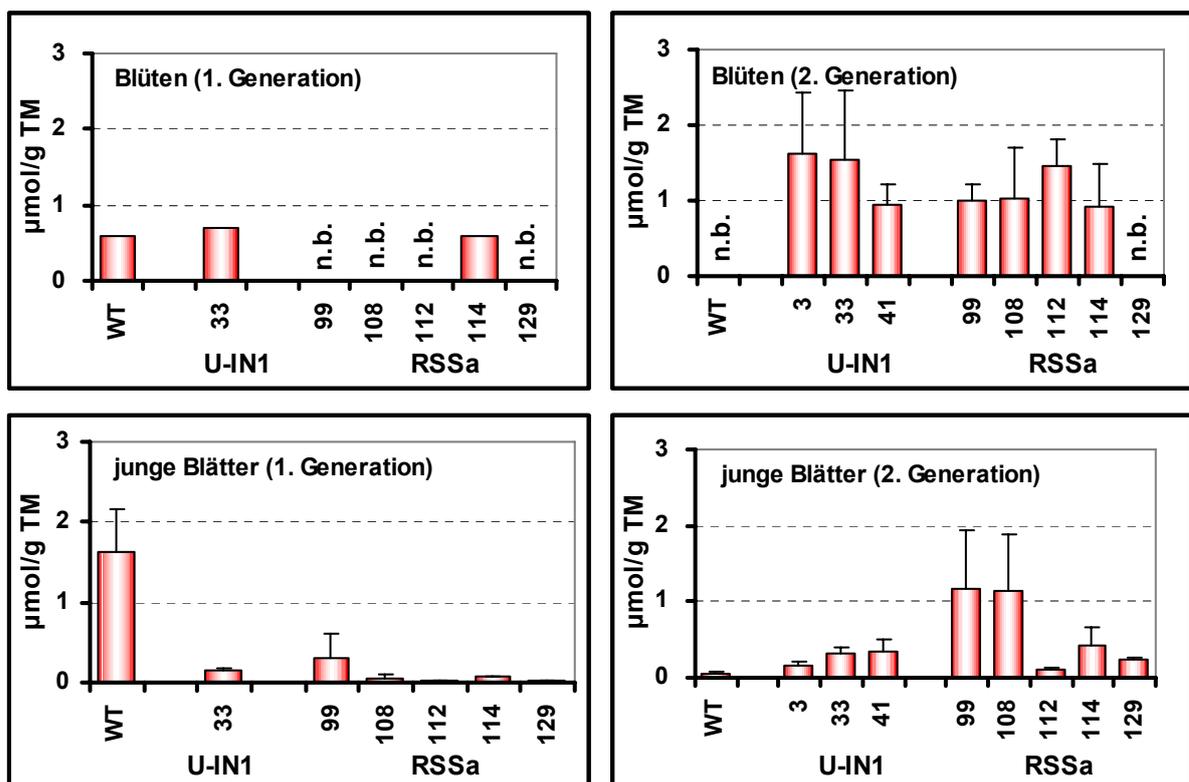
Tab. C-4: Alter der Pflanzengewebe für die Calystegin- und Intermediatanalytik sowie die Transkript- und Proteinbestimmung.

Gewebe	erste Generation (eine Pflanze)		zweite Generation (3 Pflanzen)
	Calystegine	Transkripte/Proteine	Calystegine/Transkripte/Proteine/Intermediate
Blüten	45 Tage	45 Tage	48 Tage
junge Blätter	45 Tage	106 Tage	56 Tage
alte Blätter	45 Tage	106 Tage	56 Tage
Stolone	155 Tage	155 Tage	56 Tage
Wurzeln	155 Tage	155 Tage	56 Tage

#### C.1.4.1 Calysteginakkumulation

Die Calysteginakkumulation wurde in Wildtyp-Pflanzen, in Pflanzen mit apoplastisch überexprimierter Invertase (1. Generation: nur Linie U-IN1 (33)) und in Pflanzen mit supprimierter Saccharosesynthese (außer Linie RSSa (130)) bestimmt. Die Linien U-IN1 (3) und (41) der

ersten Generation wuchsen zeitverzögert. Von Linie RSSa (130) wurden keine Pflanzen regeneriert. Das Alter der jeweiligen Pflanzengewebe zum Analysezeitpunkt ist in Tab. C-4 angegeben. In den Blättern der Linien RSSa (112) und (129) (1. Generation) wurden die Calystegine erst nach 74 Tagen gemessen, da nach 45 Tagen noch nicht ausreichend Biomasse vorhanden war. Abb. C-16 zeigt die Calysteginakkumulation in Blüten, in jungen und alten Blättern sowie in Wurzeln und Stolonen von transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Calysteginakkumulation in Blüten und in jungen sowie alten Blättern war deutlich geringer als in Knollengeweben, wie z. B. Schale oder Augen (C.1.2.1, C.1.3.1). Blüten wurden nicht von allen Pflanzen gewonnen. In den analysierten Blüten akkumulierten zwischen 0,5 und 1,6  $\mu\text{mol/g}$  TM Gesamtcalystegine. In jungen Blättern wurden höhere Calystegingehalte als in alten Blättern gemessen. Diese Beobachtungen wurden bereits für Wildtyp-Kartoffeln aber auch für andere Solanaceen-Pflanzen gemacht (Dräger et al., 1995; Keiner und Dräger, 2000). Interessantere Gewebe waren Wurzeln und Stolone. Die Calystegingehalte in Wurzeln und Stolonen von Pflanzen der ersten Generation (Alter: 155 Tage) waren ebenfalls gering. In Pflanzen der zweiten Generation (Alter: 56 Tage) wurden in Wurzeln bis zu 15  $\mu\text{mol/g}$  TM und in Stolonen bis zu 7  $\mu\text{mol/g}$  TM Gesamtcalystegine gemessen. Hier wurden starke Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen beobachtet. In Wurzeln akkumulierten in allen transgenen Linien deutlich mehr Calystegine als im Wildtyp. In Stolonen waren die Calystegingehalte vor allem in Pflanzen mit apoplastisch überexprimierter Invertase aber auch in einigen Pflanzen mit supprimierter Saccharosesynthese erhöht. Sowohl in Wurzeln als auch in Stolonen von Pflanzen mit apoplastisch überexprimierter Invertase korrelierte der Calystegingehalt mit der Transformationsstärke der transgenen Linien. Der Calystegin  $A_3$ -Anteil lag in Pflanzen der ersten Generation in oberirdischen Pflanzenteilen zwischen 30 und 40% und in unterirdischen Geweben zwischen 75 und 85%. In Pflanzen der zweiten Generation war Calystegin  $A_3$  zu 45-65% in den Geweben zu finden.



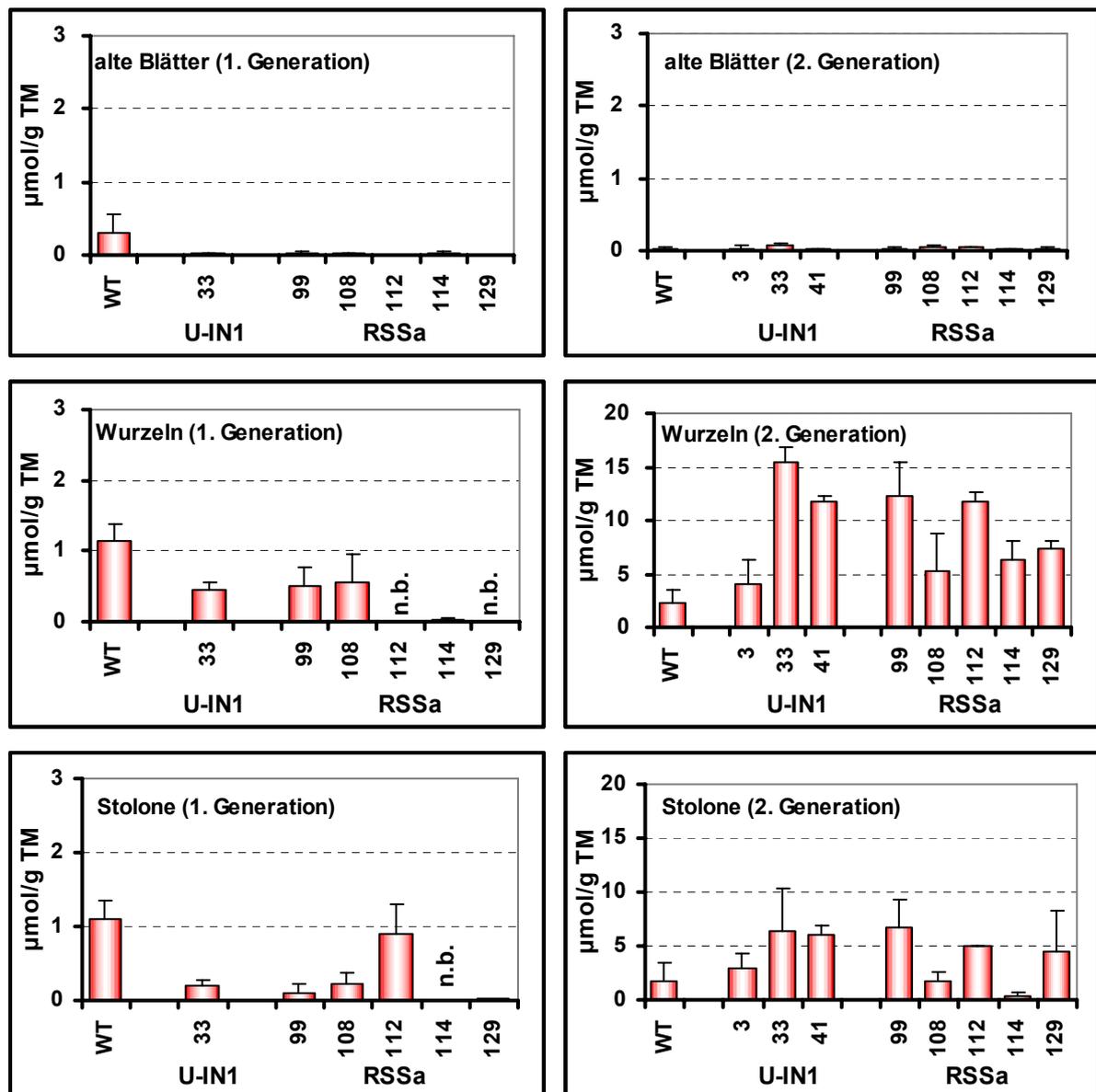


Abb. C-16: Gesamtcalysteginakkumulation in verschiedenen Geweben von transgenen Kartoffelpflanzen der ersten und zweiten Generation im Vergleich zum Wildtyp.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen von 1-3 Pflanzen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

n.b. nicht bestimmt

Die geringen bzw. schwankenden Calystegingehalte in oberirdischen Pflanzenteilen könnten möglicherweise durch den Befall der Pflanzen mit Blattläusen und Weißer Fliege verursacht worden sein (B.1.1.2). Die geringeren Calysteginkonzentrationen in Wurzeln und Stolonen von Pflanzen der ersten Generation im Vergleich zur zweiten Generation könnten mit dem Alter der Pflanzen begründet werden (Tab. C-4). Die Wurzeln und Stolone von Pflanzen der ersten Generation wurden von 5 Monate alten Pflanzen gewonnen, wobei die Blätter schon welkten.

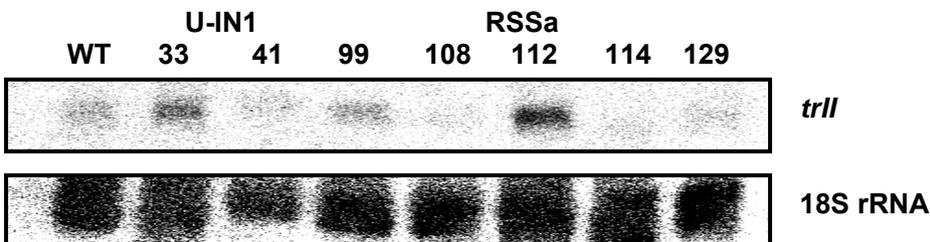
### C.1.4.2 Transkriptnachweis

Transkripte der *trl*, *trll* und *pmt* wurden in den in Tab. C-4 aufgeführten Geweben analysiert. Die Ergebnisse resultieren aus einer Einfachbestimmung. Tab. C-5 zeigt die nachgewiesenen Transkripte im Überblick für alle transgenen Linien und den Wildtyp.

**Tab. C-5: Transkriptnachweis der *trl*, *trll* und *pmt* in Pflanzengeweben des Wildtyps und aller transgenen Linien im Überblick.**

Gewebe	Pflanzen der ersten Generation	Pflanzen der zweiten Generation
Blüten	<i>trl</i>	<i>trl</i> und <i>trll</i>
junge Blätter	<i>trll</i>	<i>trl</i> und <i>trll</i>
alte Blätter	-	<i>trl</i> und <i>trll</i>
Wurzeln	<i>trl</i>	<i>pmt</i> und <i>trll</i>
Stolone	-	<i>trl</i> und <i>trll</i>

In Pflanzen der ersten Generation wurde die *trll* nur in jungen Blättern nachgewiesen (Abb. C-17). Die höchsten Transkriptmengen wurden in den jeweils transformationsstärksten Linien U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase und RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthase detektiert. In diesen Linien waren allerdings nur sehr geringe Calystegingehalte in jungen Blättern enthalten. *trl*-Transkript wurde in Wurzeln (Alter: 155 Tage) sowie in Blüten nachgewiesen. In Wurzeln der Linie U-IN1 (41) (erste Generation) wurde zusätzlich *trll*- und *pmt*-Transkript detektiert (Abb. C-18). Diese Linie war zum Analysezeitpunkt aufgrund von Wachstumsproblemen erst 110 Tage alt. Die Expression der *trll* und *pmt* könnte somit altersabhängig sein. Der Nachweis von *trll*- und *pmt*-Transkript in Wurzeln der zweiten Generation (Alter: 56 Tage) (Abb. C-20) bekräftigt diese Hypothese. Die *trll* wurde in allen Geweben von Pflanzen der zweiten Generation gefunden. Die *trl* wurde am stärksten in Blüten exprimiert (Abb. C-19) und fehlte nur in Wurzeln. Beim Vergleich der *trll*- und *pmt*-Transkripte der transgenen Linien mit dem Wildtyp fiel eine schwächere Expression in den jeweils transformationsstärksten Linien U-IN1 (33) und RSSa (112) auf. Diese Beobachtung traf für alle Gewebe zu. In Wurzeln und Stolonen akkumulierten in den transformationsstärksten Linien allerdings die höchsten Calysteginmengen.



**Abb. C-17: Transkriptnachweis der *trll* in jungen Blättern von transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot.**

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trll*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: WT: Wildtyp, U-IN1 (33) und (41): Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase, RSSa (99), (108), (112), (114) und (129): Linien mit supprimierter Saccharosesynthase; Alter der Pflanze: 106 Tage (erste Generation)

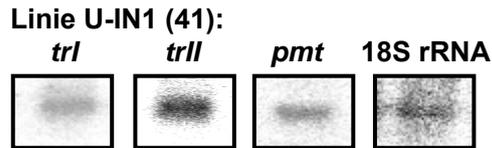


Abb. C-18: Transkriptnachweis der *trl*, *trll* und *pmt* in Wurzeln der Linie U-IN1 (41) mit apoplastisch überexprimierter Invertase durch Northern Blot. Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; Die 18S rRNA wurde als Ladekontrolle verwendet. Alter der Pflanze: 110 Tage (erste Generation)

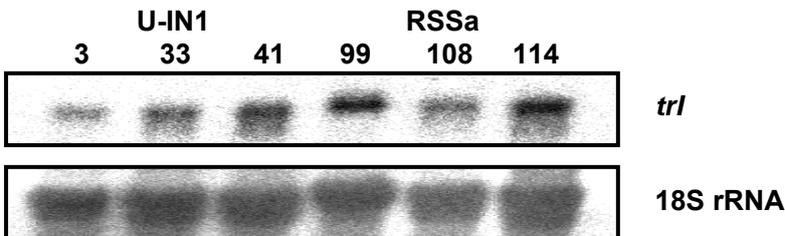


Abb. C-19: Transkriptnachweis der *trl* in Blüten von transgenen Pflanzen durch Northern Blot. Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trl*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: WT: Wildtyp blühte nicht, U-IN1 (3), (33) und (41): Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase, RSSa (99), (108) und (114): Linien mit supprimierter Saccharosesynthase; Alter der Pflanze: 48 Tage (zweite Generation)

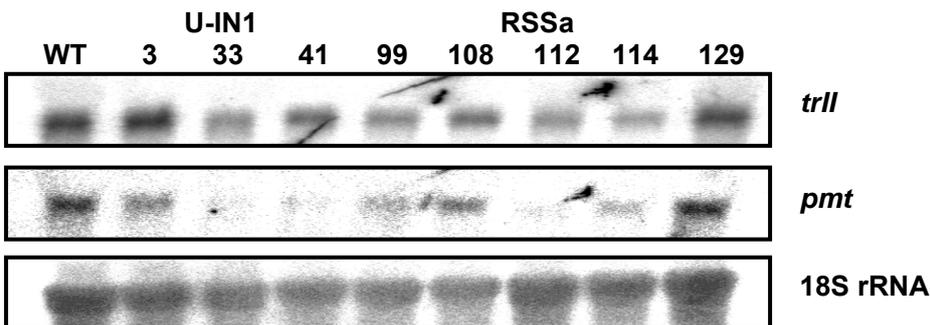


Abb. C-20: Transkriptnachweis der *trll* und *pmt* in Wurzeln von transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot. Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeilen zeigen die mRNA der *trll* und der *pmt*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: WT: Wildtyp, U-IN1 (3), (33) und (41): Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase, RSSa (99), (108), (112), (114) und (129): Linien mit supprimierter Saccharosesynthase; Alter der Pflanze: 56 Tage (zweite Generation)

### C.1.4.3 Proteinnachweis

TRI- und TRII-Protein wurden ebenfalls in den in Tab. C-4 aufgeführten Geweben analysiert. Tab. C-6 zeigt die Proteinnachweise im Überblick für alle transgenen Linien und den Wildtyp. TRII-Protein wurde in alten Blättern und Stolonen von Pflanzen der ersten Generation detektiert sowie in alten Blättern und Wurzeln von Pflanzen der zweiten Generation. Unterschiede zwischen transgenen Linien und Wildtyp wurden kaum festgestellt. Das Signal der TRII in alten Blättern hatte die Größe des Dimers der TRII (56 kDa). Die TRI wurde in Blüten von Pflanzen beider Generationen sowie in Stolonen von Pflanzen der ersten Generation nachgewiesen. Der höchste TRI-Proteingehalt wurde in Blüten der Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase und in Blüten der Linie RSSa (108) mit supprimierter Saccharosesynthase gefunden (zweite Generation). Allerdings war hier der Vergleich mit dem Wildtyp nicht möglich. Wildtyp-Pflanzen blühten nicht.

Tab. C-6: Proteinnachweis der TRI und TRII in Pflanzengewebe des Wildtyps und aller transgenen Linien im Überblick.

Gewebe	Pflanzen der ersten Generation	Pflanzen der zweiten Generation
Blüten	TRI	TRI
junge Blätter	-	-
alte Blätter	TRII	TRII
Wurzeln	-	TRII
Stolone	TRI und TRII	-

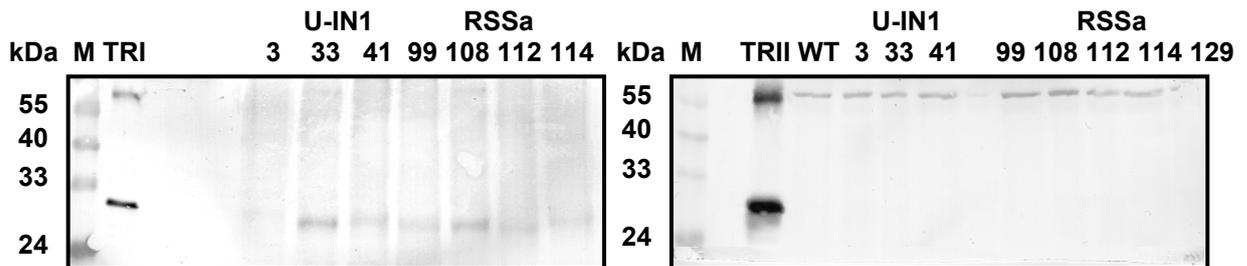


Abb. C-21: Proteinnachweis der TRI und TRII in Blüten bzw. alten Blättern von transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp durch Western Blot.

Probenauftrag: 30 µg Gesamt-Protein für Blüten, 50 µg Gesamt-Protein für alte Blätter;

Proben: M: Marker, TRI, TRII: Positivkontrollen, WT: Wildtyp, U-IN1 (3), (33) und (41): Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase, RSSa (99), (108), (112), (114) und (129): Linien mit supprimierter Saccharosesynthese; Alter der Pflanze: 48 Tage bei Blüten, 56 Tage bei alten Blättern (zweite Generation)

#### C.1.4.4 Intermediate der Biosynthese

Die endogen vorkommenden Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin wurden in Geweben von Pflanzen der zweiten Generation analysiert. Zusätzlich wurde 2 mM Tropinon an die entsprechenden Gewebe appliziert und die Bildung von Tropin und Pseudotropin verfolgt. Endogen wurde in Blüten, in jungen und alten Blättern sowie in Wurzeln und Stolonen Tropinon nachgewiesen. Die Tropinongehalte lagen im Bereich von 0,1 – 1 µmol/g TM. In Wurzeln wurde zusätzlich Pseudotropin (Konzentration ca. 1 µmol/g TM) gefunden. Nach Applikation von Tropinon wurde in allen Geweben Pseudotropin gebildet, was die Aktivität der TRII in Pflanzengewebe bestätigt. Tropin wurde nicht nachgewiesen. In Wurzeln wurde die höchste Pseudotropinkonzentration gemessen, was auf eine sehr aktive TRII hindeutet. In Wurzeln wurden ebenfalls Transkript und Protein der TRII sowie sehr hohe Calystegingehalte nachgewiesen. Die Pseudotropinbildung war in transgenen Wurzeln höher als im Wildtyp.

In Stolonen wurde weniger Pseudotropin als in Wurzeln gebildet. In Stolonen akkumulierten auch weniger Calystegine. In den transgenen Linien wurde auch hier mehr Pseudotropin als im Wildtyp gebildet. Junge Blätter setzten mehr Tropinon zu Pseudotropin um als alte Blätter. In jungen Blättern wurden ebenfalls höhere Calystegingehalte als in alten Blättern bestimmt. Den geringsten Umsatz von Tropinon zu Pseudotropin zeigten Blüten. In Blüten war nur wenig *trII*-Transkript und kein TRII-Protein vorhanden. In Blüten und in jungen sowie alten Blättern wurden kaum Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen beobachtet. Abb. C-22 zeigt die Ergebnisse der Pseudotropinbildung.

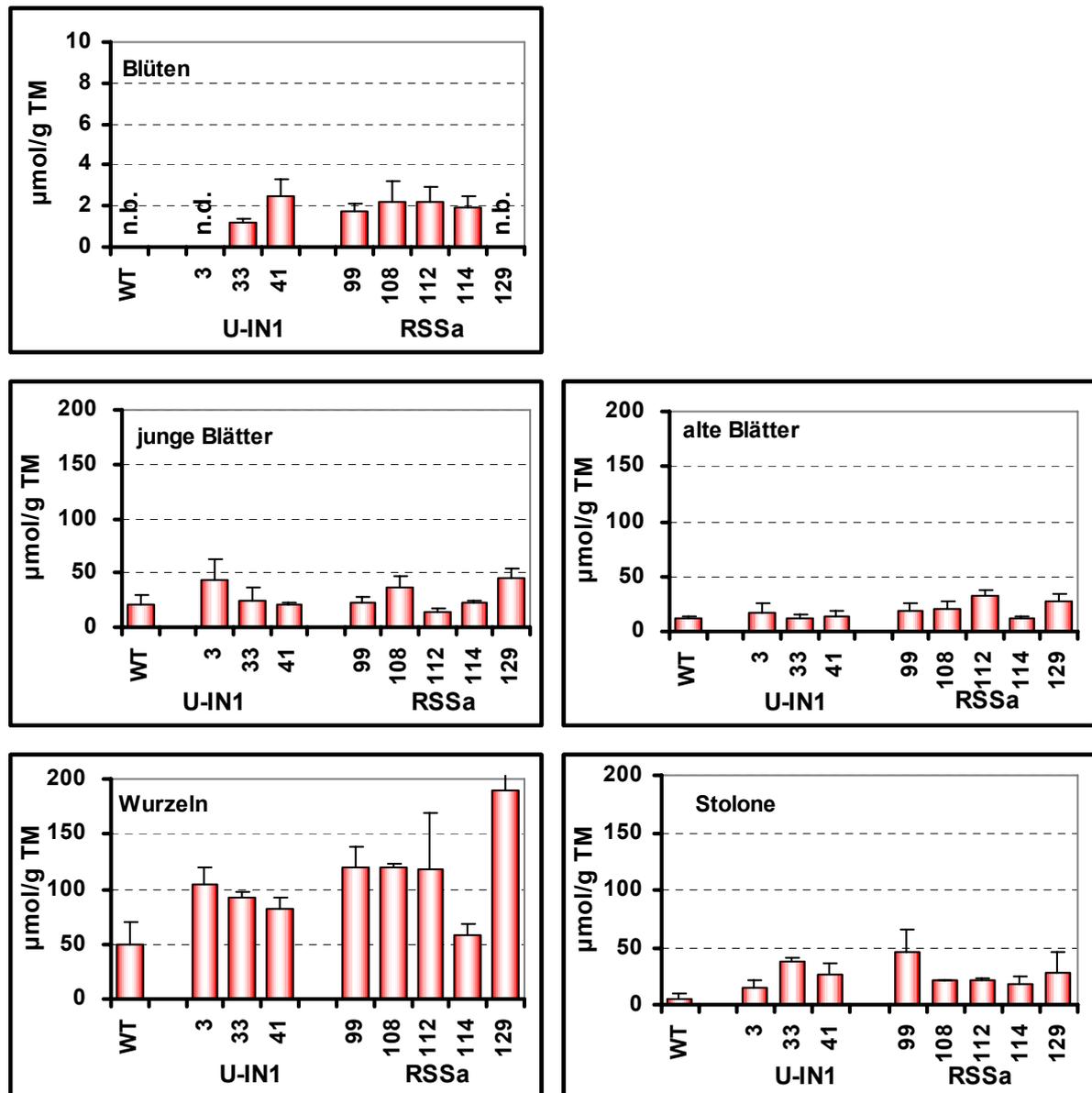


Abb. C-22: Pseudotropinakkumulation in Geweben von transgenen Kartoffelpflanzen der zweiten Generation im Vergleich zum Wildtyp nach Tropinonapplikation.

Die Daten sind Mittelwerte aus 2-3 unabhängigen Bestimmungen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. n.b. nicht bestimmt; n.d. nicht detektiert

### C.1.5 Calysteginbiosynthese in Kartoffelknollen nach Kältelagerung

In der Literatur wurde ein Ansteigen von löslichen Zuckern bei Kältelagerung beschrieben (Greiner et al., 1999). In diesem Versuch sollte beobachtet werden, ob nach 5monatiger Lagerung bei 4°C die Calysteginbiosynthese gesteigert ist. Dazu wurden Kartoffelknollen, die von Pflanzen der ersten Generation (C.1.4) gewonnen wurden, verwendet. Der Calystegingehalt wurde im Mark, im 2-5 mm Gefäßring sowie in 1-2 mm Schale bestimmt. Zusätzlich wurden Transkripte und Proteine der TRI, TRII und PMT untersucht. Abschließend wurden die endogen vorkommenden Intermediate der Biosynthese (Tropinon, Tropin und Pseudotropin) analysiert und die Bildung von Tropin und Pseudotropin nach Tropinonapplikation verfolgt.

### C.1.5.1 Calysteginakkumulation

In allen Geweben wurde Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> nachgewiesen. Abb. C-23 zeigt die Ergebnisse. In der Schale akkumulierten deutlich mehr Calystegine als im Mark oder Gefäßring (vgl. C.1.2.1), wobei im Gefäßring geringfügig mehr Calystegine als im Mark zu finden waren. Der Calystegin A<sub>3</sub>-Anteil betrug im Mark und im Gefäßring ca. 59% und in der Schale 42%. Nach 5monatiger Kältelagerung akkumulierte in der Schale des Wildtyps mit 34 µmol/g TM die 3-4fache Calysteginkonzentration im Vergleich zum maximalen Gehalt beim Lagerungsversuch (C.1.3.1). Dort erfolgte die Lagerung bei höheren Temperaturen. Auch im Mark und im Gefäßring waren die Calysteginkonzentrationen deutlich erhöht. In Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase waren veränderte Calystegingehalte im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen, wobei die transformationsstärkste Linie U-IN1 (33) in der Schale den höchsten Gehalt mit 46 µmol/g TM, im Mark und im Gefäßring aber den geringsten Gehalt aufwies. Im Vergleich zum Lagerungsversuch (C.1.3.1) war auch hier die Calysteginakkumulation stark erhöht. In der Schale von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase wurde eine positive Korrelation mit der Transformationsstärke und im Mark und im Gefäßring eine negative Korrelation mit der Transformationsstärke der Linien festgestellt. In Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase war der Calystegingehalt in der Schale im Vergleich zum Lagerungsversuch (C.1.3.1) nicht so stark erhöht. Die höchsten Gehalte in der Schale lagen in den Linien RSSa (99), (108) und (112) bei 20 µmol/g TM. Im Mark und im Gefäßring wies die transformationsstärkste Linie RSSa (112) die höchsten Calystegingehalte auf. Eine Korrelation der Calystegingehalte mit der Transformationsstärke wurde nicht beobachtet.

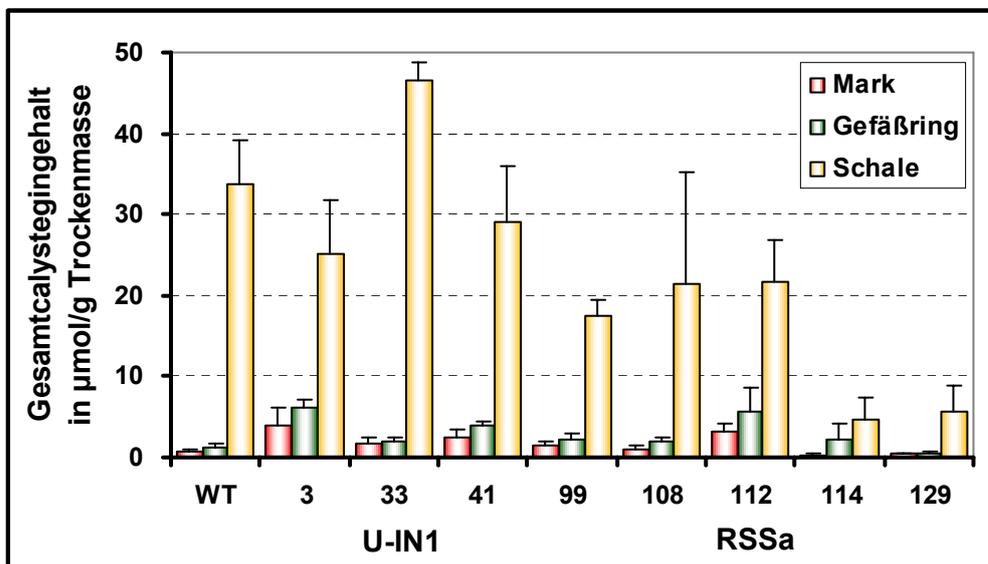


Abb. C-23: Gesamtcallysteginakkumulation in verschiedenen Geweben von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp nach 5monatiger Kältelagerung (156 Tage). Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen von 3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. Die Kartoffeln wurden von Pflanzen der ersten Generation gewonnen.

Nach 132tägiger Kältelagerung von Wildtyp-Kartoffeln akkumulierten in der Schale nur ca. 10 µmol/g TM Gesamtcallystegine (Abb. C-47). Somit ist die 5monatige Kältelagerung nicht allein für die hohen Calystegingehalte in Mark, Schale und Gefäßring verantwortlich. Möglicherweise

spielen auch die Kultivierungsbedingungen der Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Calysteginakkumulation.

### C.1.5.2 Transkriptnachweis

Transkripte der *trl*, *trll* und *pmt* wurden im Mark, im Gefäßring und in der Schale in Form einer Einfachbestimmung analysiert. *pmt*-Transkript wurde in keinem Gewebe nachgewiesen. Die *trll* wurde nur in Spuren in der Schale detektiert (ohne Abbildung). Demgegenüber wurde die *trl* in allen Geweben exprimiert. Die höchste *trl*-Expression wurde in der Schale (Abb. C-24) und im Gefäßring (ohne Abbildung) beobachtet. Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp bezüglich der *trl*-Expression wurden ebenfalls festgestellt. Die transformationsstärkste Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthase zeigte in der Schale die geringste aber im Gefäßring die höchste *trl*-Expression. Im Vergleich zu Abb. C-14 ist die *trl*-Expression in einigen transgenen Linien sowie im Wildtyp erhöht.

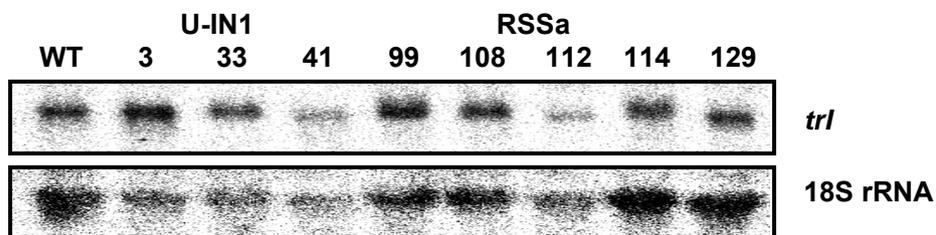


Abb. C-24: Transkriptnachweis der *trl* in der Schale von transgenen Kartoffelknollen nach Kältelagerung im Vergleich zum Wildtyp durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; obere Zeile zeigt die mRNA der *trl*; untere Zeile zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: WT: Wildtyp, U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, RSSa (99), (108), (112), (114) und (129): Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase

### C.1.5.3 Proteinnachweis

TRI- und TRII-Protein wurde im Mark, im Gefäßring und in der Schale untersucht. Die Ergebnisse ergeben sich jeweils aus einer Einfachbestimmung. TRII-Protein wurde in keinem der Gewebe nachgewiesen. TRI-Protein wurde in allen Geweben detektiert, wobei zwischen transgenen Linien und Wildtyp kaum Unterschiede beobachtet wurden. Abb. C-25 zeigt den TRI-Proteinnachweis im Mark.

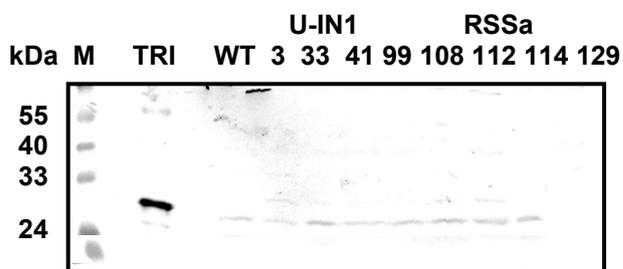


Abb. C-25: Proteinnachweis der TRI im Mark von transgenen Kartoffelknollen nach Kältelagerung im Vergleich zum Wildtyp durch Western Blot.

Probenauftrag: 50 µg Gesamt-Protein; Proben: M: Marker, TRI: Positivkontrolle, WT: Wildtyp, U-IN1 (3), (33) und (41): Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase, RSSa (99), (108), (112), (114) und (129): Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase

### C.1.5.4 Intermediate der Biosynthese

Die endogenen Metabolite der Biosynthese wurden im Mark, im Gefäßring und in der Schale analysiert. In allen drei Geweben wurde Tropinon (Konzentration ca.  $0,1 \mu\text{mol/g TM}$ ) nachgewiesen. Nach Applikation von 2 mM Tropinon entstand hauptsächlich Tropin als Reaktionsprodukt. Pseudotropin wurde nur in der Schale der Linien U-IN1 (3) und (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase gebildet. In allen drei Geweben wurde somit TRI-Aktivität und in der Schale teilweise TRII-Aktivität nachgewiesen. Der Umsatz von Tropinon zu Tropin war in der Schale höher als im Mark und im Gefäßring. In Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase wurde in der Linie U-IN1 (33) im Mark und in den Linien U-IN1 (33) und (41) in der Schale mehr Tropin als im Wildtyp gebildet. In Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese wurden im Mark und im Gefäßring kaum Unterschiede zum Wildtyp beobachtet. In der Schale bildete Linie RSSa (99) mehr und die Linien RSSa (114) und (129) weniger Tropin. Abb. C-26 zeigt die Ergebnisse.

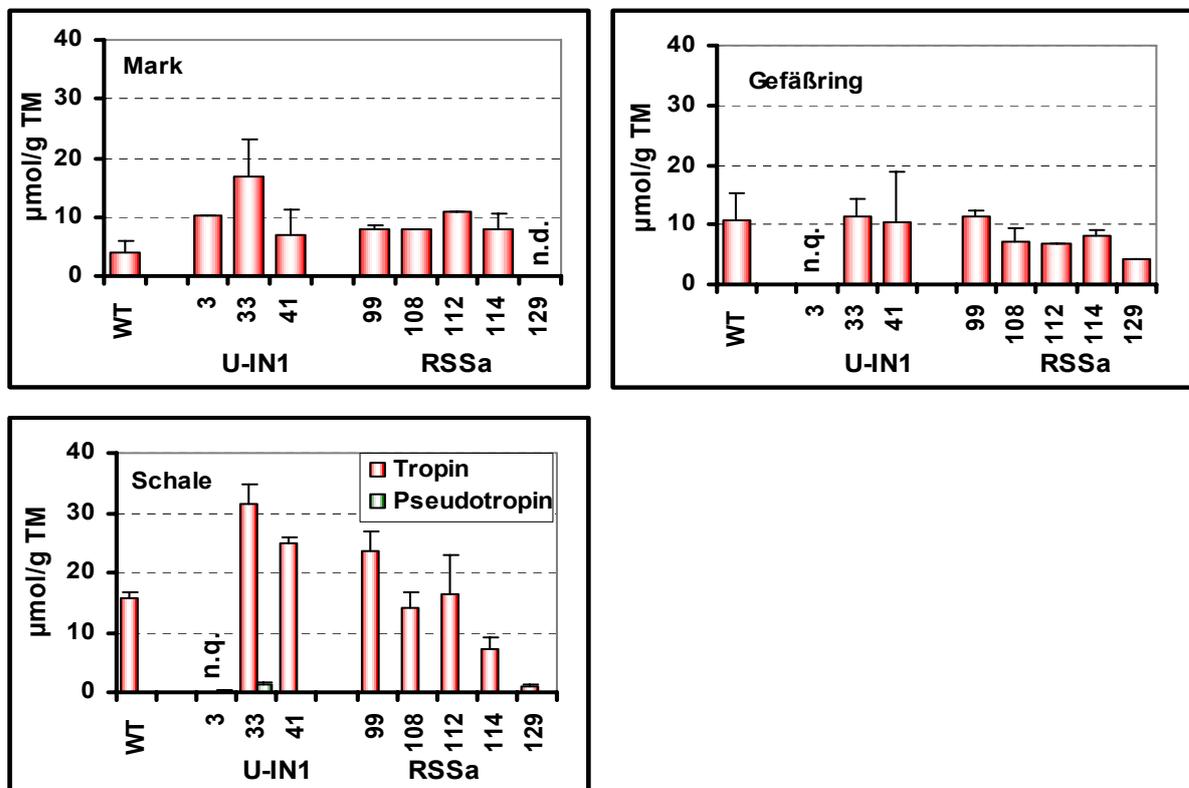


Abb. C-26: Tropin- und Pseudotropinakkumulation in Geweben von kältegelagerten transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp nach Tropinonapplikation.

Die Daten sind Mittelwerte aus 1-3 unabhängigen Bestimmungen von 3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

n.d. nicht detektiert; n.q. nicht quantifiziert

## **C.2 Parallele Analyse von Calysteginen und Metaboliten in *Solanum tuberosum* durch GC-MS (metabolic profiling)**

In ersten Untersuchungen konnte für die Calystegine eine Korrelation mit dem veränderten Kohlenhydratstoffwechsel festgestellt werden. Auch Biosyntheseenzyme (TRI, TRII und PMT) reagierten mit einer veränderten Expressionsstärke auf den modifizierten Kohlenhydrathaushalt (vgl. Kap.C.1). Die nächste Fragestellung war nun, welche Metaboliten aus dem Kohlenhydratstoffwechsel oder aus anderen Stoffwechselwegen mit den Calystegingehalten korrelieren und an welcher Stelle Calystegine ihre Funktion haben könnten. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten Calystegine gemeinsam mit Stoffwechselmetaboliten gemessen und anschließend über Korrelationsuntersuchungen mögliche Interaktionspartner gefunden werden.

Diese Untersuchungen wurden am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt. Von Roessner und Mitarbeitern wurde dort eine Methode entwickelt, mit der mehr als 150 Metabolite (Zucker, Zuckeralkohole, Aminosäuren, organische Säuren u.a.) gleichzeitig in Kartoffelknollen gemessen werden können. Die polaren Substanzen werden durch heiße Methanolextraktion (70°C) gewonnen und anschließend nach Methoxymierung und Silylierung in der GC-MS analysiert (Roessner et al., 2000).

In einer ersten Untersuchung sollte nun überprüft werden, ob auch Calystegine mit diesem Verfahren detektiert werden können. Dazu wurden Standardsubstanzen derivatisiert und in der GC-MS gemessen. In einem nächsten Schritt wurde getestet, ob die Calystegine in Kartoffelgeweben zu finden sind.

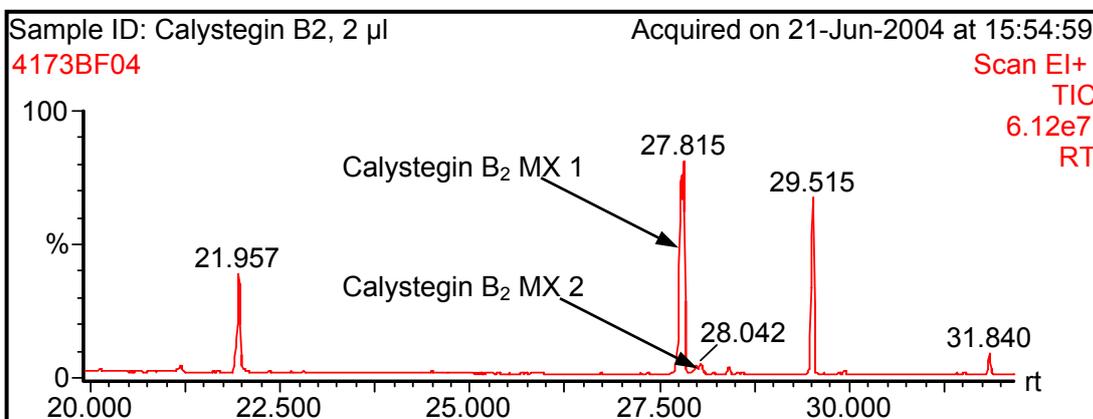
Anschließend wurden Kartoffelschalen und Keime auf Calystegine und Stoffwechselmetabolite analysiert. Die Gewebe wurden von den transgenen Kartoffeln gewonnen, die in Kapitel C.1 beschrieben wurden. Kartoffelschalen wurden nach 106, 120 und 155 Tagen nach der Ernte von Knollen der Größe 1 (4-6 cm Durchmesser) präpariert. Keime wurden von Knollen gewonnen, die 176 Tage gelagert worden waren. Kartoffelschalen wurden an den Tagen 106 und 120 nach der Ernte von allen transgenen Linien analysiert, während die Kartoffelschalen am Tag 155 nach der Ernte und Keime am Tag 176 nach der Ernte nur von Wildtyp-Kartoffeln, von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase und von Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase untersucht werden konnten. Kartoffelknollen mit cytosolisch überexprimierter Invertase keimten unter den hier gewählten Lagerungsbedingungen nicht.

### **C.2.1 Calysteginanalyse durch GC-MS (metabolic profiling)**

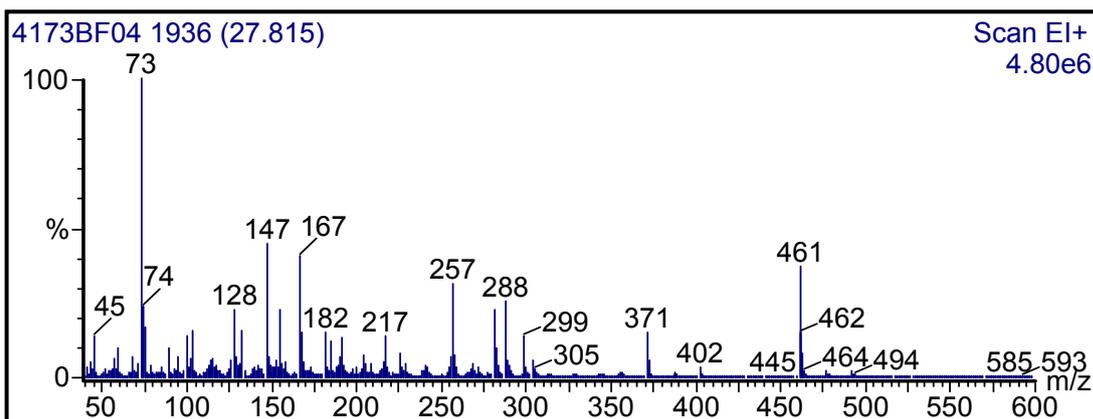
#### **C.2.1.1 Erfassung von Calysteginstandardsubstanzen in der GC-MS**

Um Calystegine zusammen mit Stoffwechselmetaboliten messen zu können, wurden Standardsubstanzen von Calysteginen mit dem GC-MS Verfahren getestet. Neben den beiden Hauptcalysteginen A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>, die in *S. tuberosum* akkumulieren, wurden Calystegin B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> sowie Calystegin C<sub>1</sub> und N-Methylcalystegin B<sub>2</sub> untersucht. Ein Ziel war es, die Calystegine in eine Datenbank einzutragen, um eine gemeinsame Erfassung mit Metaboliten möglich zu machen. Die Calystegine wurden durch Methoxymierung und Silylierung mit MSTFA derivatisiert (Abb. B-3) und in der GC-MS analysiert. Abb. C-27 zeigt das Chromatogramm für Calystegin B<sub>2</sub>. Im Chromatogramm sind für Calystegin B<sub>2</sub> zwei Peaks bei 27,815 min (Calystegin B<sub>2</sub> MX1) und bei 28,042 min (Calystegin B<sub>2</sub> MX2) erhalten worden. Bei der Methoxymierungsreaktion von Ketonen entstehen zwei Stereoisomere, die bei unterschiedlichen Retentionszeiten erfasst

werden (Roessner et al., 2000). In Abb. C-28 ist das Massenspektrum von methoxymiertem und silyliertem Calystegin B<sub>2</sub> dargestellt. Diesem Zerfallsmuster ist der Peak bei 27,815 min im GC-MS Chromatogramm zugeordnet. Für die Quantifizierung von Calystegin B<sub>2</sub> wurden drei charakteristische Ionen  $m/z = 167$ , 288 und 461 ermittelt.



**Abb. C-27: GC-MS Chromatogramm der Calystegin B<sub>2</sub>-Standardsubstanz (2 µg).** Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Chromatogramms zwischen 20 und 32 min – das gesamte Chromatogramm umfasst 60 min; Die Peaks bei 21,957 und 29,515 min sind die Retentionszeitstandards Pentadecan und Nonadecan.



**Abb. C-28: Massenspektrum von methoxymiertem und silyliertem Calystegin B<sub>2</sub>.** Das Spektrum entspricht dem Peak bei 27,815 min in Abb. C-27.

Neben Calystegin B<sub>2</sub> wurden auch für alle anderen Calysteginstandardsubstanzen die Retentionszeiten der beiden Methyloxim-Stereoisomere sowie charakteristische Ionen zur Quantifizierung ermittelt. Nach Abgleich mit den Retentionszeitstandards (Alkane: vgl. Kap. B.2.1.2.2) wurden die Retentionszeiten und die Massenspektren der Calystegine in die Bibliothek zur automatischen Peakquantifizierung (MASSLAB-Methode) eingetragen.

Tab. C-7: Retentionszeiten und charakteristische Ionen zur Peakquantifizierung von Calysteginstandardsubstanzen in der GC-MS Analytik.

Calystegin	Retentionszeit in min 1. Methyloxim (MX 1)	Retentionszeit in min 2. Methyloxim (MX 2)	charakteristische Ionen m/z
Calystegin A <sub>3</sub>	26,993	27,050	167, 216, 404
Calystegin B <sub>1</sub>	28,651	29,250	216, 477, 492
Calystegin B <sub>2</sub>	28,077	28,308	167, 288, 461
Calystegin B <sub>3</sub>	28,349	29,674	167, 288, 461
Calystegin B <sub>4</sub>	28,488	29,214	167, 288, 461
Calystegin C <sub>1</sub>	29,668	30,260	304, 549, 580
N-Methylcalystegin B <sub>2</sub>	30,494	30,393	313, 416, 475

### C.2.1.2 Nachweis von Calysteginen in Kartoffelgeweben

In Kartoffelkeimen und in Schalen wurde überprüft, welche Calystegine nach Derivatisierung nachweisbar sind. Dazu wurden aus jeweils 60 mg Gewebe die Metaboliten extrahiert und anschließend derivatisiert. Die Abb. C-29 bis Abb. C-31 zeigen GC-MS Chromatogramme von Extrakten aus Kartoffelkeimen und aus Kartoffelschalen. In Abb. C-29 und Abb. C-30 sind jeweils die Gesamtchromatogramme dargestellt, während in Abb. C-31 nur ein Ausschnitt zwischen 26,5 und 29 min zu sehen ist.

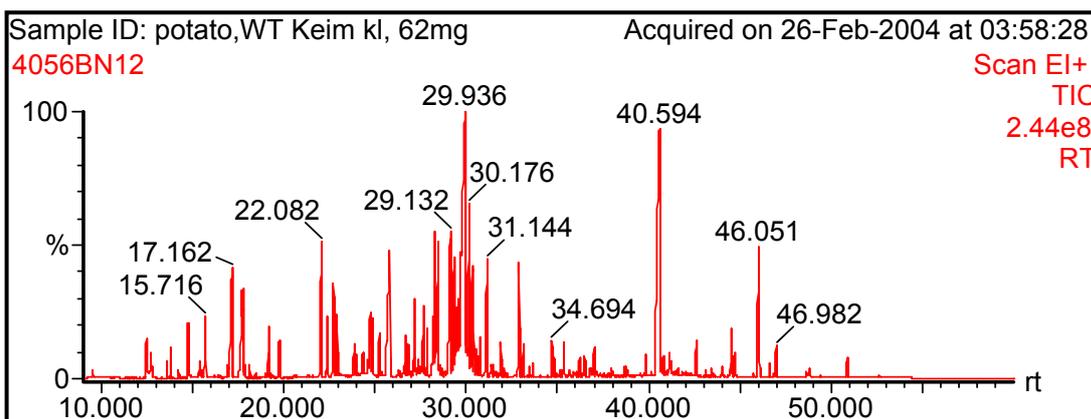


Abb. C-29: GC-MS Chromatogramm von einem Extrakt aus Kartoffelkeimen (*Solanum tuberosum* var. Désirée) - Gesamtchromatogramm von 10–60 min.

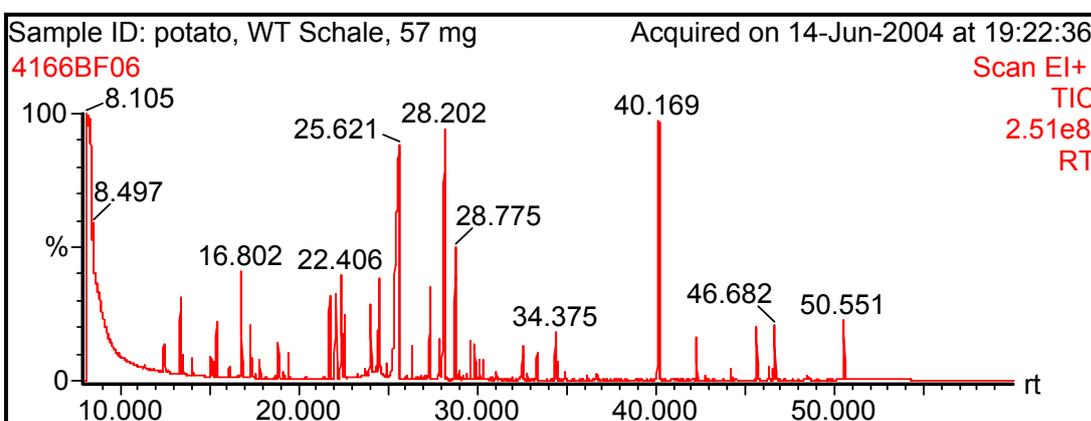


Abb. C-30: GC-MS Chromatogramm von einem Extrakt aus Kartoffelschalen (*Solanum tuberosum* var. Désirée) - Gesamtchromatogramm von 10–60 min.

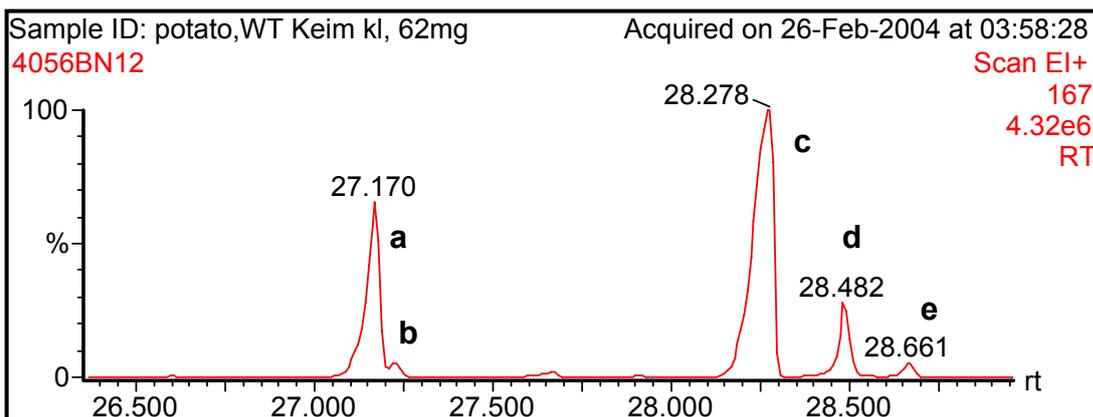


Abb. C-31: GC-MS Chromatogramm von einem Extrakt aus Kartoffelkeimen (*Solanum tuberosum* var. Désirée) - Ausschnitt aus dem Chromatogramm zwischen 26,5 und 29 min. Das Chromatogramm zeigt Peaks mit der  $m/z = 167$ ; Peaks: (a) Calystegin A<sub>3</sub> MX1; (b) Calystegin A<sub>3</sub> MX2; (c) Calystegin B<sub>2</sub> MX1; (d) Calystegin B<sub>2</sub> MX2; (e) Calystegin B<sub>4</sub> MX1

Auffällig in den Chromatogrammen war eine große Anzahl von Metaboliten zwischen 20 und 35 min und ein großer Peak bei ca. 40 min. Weiterhin war die Anzahl an erfassten Substanzen aus Kartoffelkeimen wesentlich höher als aus Kartoffelschalen. Da es schwierig war, in dem Gesamtchromatogramm die Calysteginpeaks zu finden, wurde versucht, über die charakteristischen Ionen (vgl. Kap. C.2.1.1) die Calystegine zu identifizieren. So wurden sowohl in Keimen als auch in Kartoffelschalen Calystegin A<sub>3</sub>, Calystegin B<sub>2</sub> und Calystegin B<sub>4</sub> nachgewiesen. Abb. C-31 zeigt die Peaks der drei identifizierten Calystegine, die über das spezifische Ion  $m/z = 167$  nachgewiesen wurden. Für die Massenfragmente  $m/z 167$ , 216 und 461 werden folgende Strukturen postuliert:

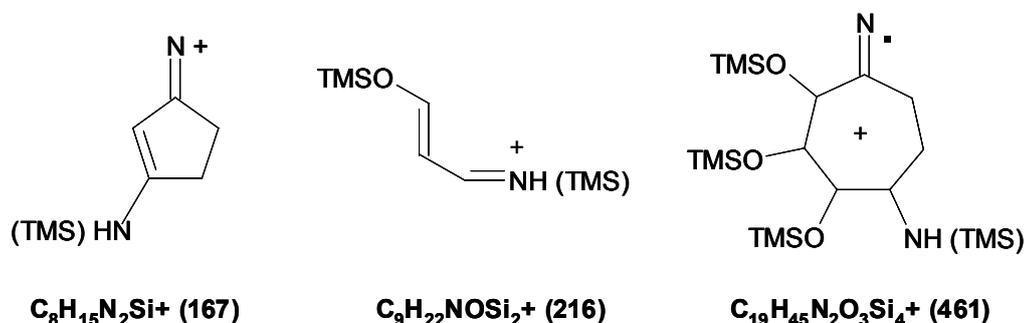


Abb. C-32: Strukturvorschlag für charakteristische Massenfragmente von Calystegin A<sub>3</sub>, Calystegin B<sub>2</sub> und Calystegin B<sub>4</sub> nach Methoxymyierung und Silylierung.

### C.2.1.3 Quantifizierung von Calysteginen in Kartoffelgeweben

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Gehalte der Calystegine in den transgenen Linien miteinander zu vergleichen und mit anderen Metaboliten zu korrelieren. Die Quantifizierung der Peaks erfolgte automatisch (MASSLAB-Methode). Dazu wurden jeweils die spezifischen Ionen der Calystegine verwendet. Die ermittelte Peakfläche des Calystegins wurde auf den internen Standard Ribitol und auf die eingesetzte Frischmasse bezogen. Um die Calystegingehalte zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp zu vergleichen, wurde das Verhältnis zwischen dem Mittelwert der transgenen Linie und dem Mittelwert des Wildtyps gebildet. Für den Wildtyp ergab sich demnach jeweils ein Wert von 1,00.

### C.2.1.3.1 Calystegingehalt in Kartoffelkeimen

Der Calystegingehalt wurde in Keimen mit einer Größe von 1-10 mm bestimmt. Für den Wildtyp wurden zusätzlich lange Keime mit einer Größe von 1-10 cm analysiert. In Keimen wurden Calystegin A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> nachgewiesen. Abb. C-33 zeigt die Vergleiche der Calystegingehalte zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp.

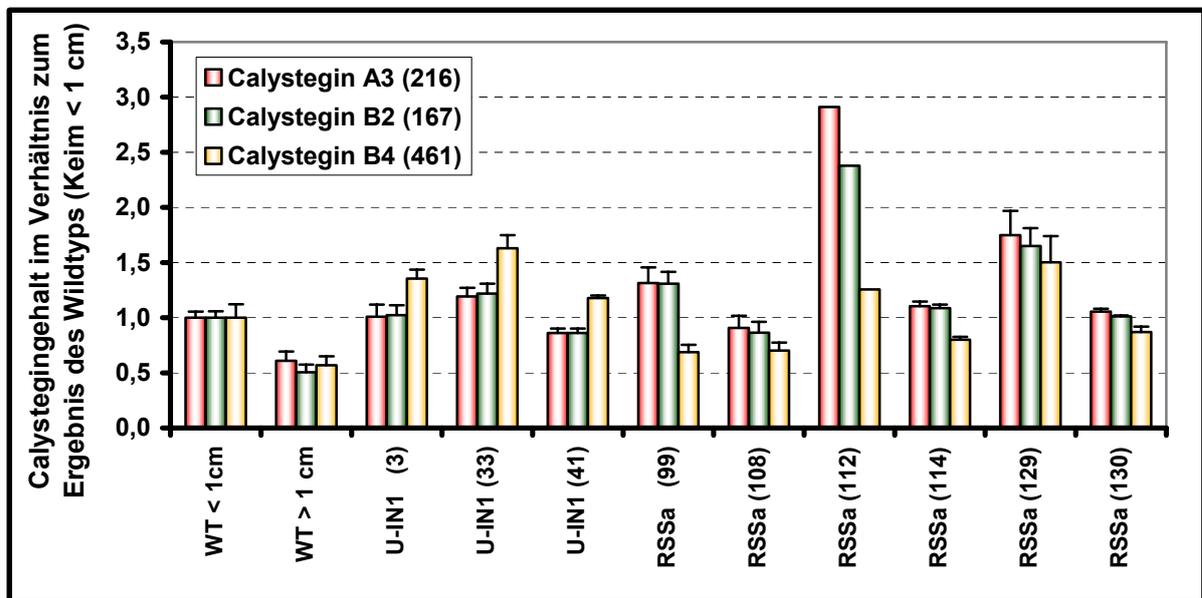


Abb. C-33: Calystegingehalt in Keimen (< 1 cm) von transgenen Kartoffeln 176 Tage nach der Ernte im Vergleich.

Das Ergebnis ergibt sich aus 1-7 Bestimmungen; die Standardabweichung ist angegeben; für Linie RSSa (112) war mangels Biomasse nur eine Einfachbestimmung möglich; die Zahlen hinter den Calysteginen stehen für das zur Quantifizierung verwendete spezifische Ion

In großen Wildtyp-Keimen (> 1 cm) akkumulierten jeweils nur ca. 50% des Calystegingehaltes von kleinen Keimen (Wildtyp). In Keimen von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase und von Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese wurde der höchste Calystegingehalt für A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> jeweils in den transformationsstärksten Linien (U-IN1 (33), RSSa (112)) bestimmt. Damit wurde das Ergebnis des Lagerungsversuches bestätigt (C.1.3.1.3).

### C.2.1.3.2 Calystegingehalt in Kartoffelschalen

In 1-2 mm Kartoffelschalen wurden ebenfalls Calystegin A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> nachgewiesen. In Abb. C-34 sind die Calysteginkonzentrationen in der Schale von Kartoffeln nach 106tägiger Lagerung im Vergleich zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp dargestellt.

In Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase wurde der höchste Gehalt für Calystegin A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> in der Linie U-IN1 (33) mit dem größten Transformationseffekt festgestellt. In Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese akkumulierte in der transformationsstärksten Linie RSSa (112) der höchste Calystegingehalt. Calystegin A<sub>3</sub> bzw. B<sub>2</sub> waren im Vergleich zum Wildtyp 5,0 bzw. 5,7fach erhöht. Calystegin B<sub>4</sub> war leicht erhöht. Auffällig waren Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase. Hier wurden für die Linie U-IN2 (17) mit der größten Transformationsstärke für Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> die geringsten Calystegingehalte gemessen. Die Calysteginmengen erreichten nur ca. 60% der Wildtyp-Gehalte. Demgegenüber wurde für Calystegin B<sub>4</sub> eine starke Erhöhung festgestellt. In der Linie U-IN2 (17) war der Calystegin B<sub>4</sub>-

Gehalt im Vergleich zum Wildtyp 6,3fach erhöht. Auch hier wurde für Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> das Ergebnis des Lagerungsexperimentes bestätigt (C.1.3.1.1).

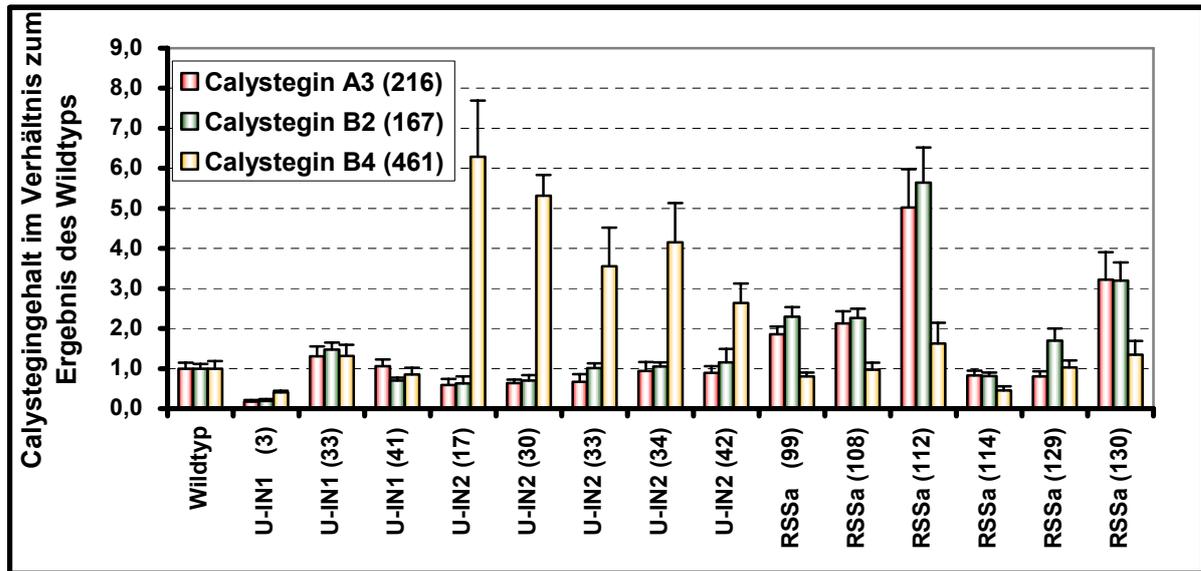
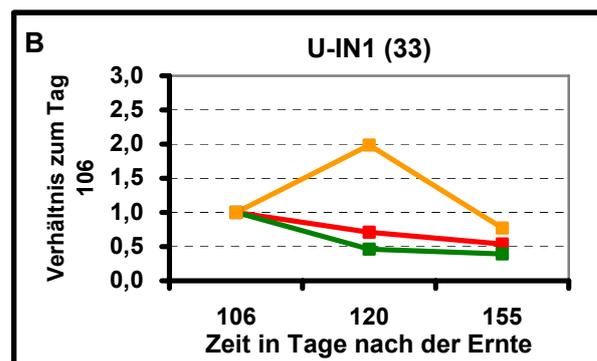
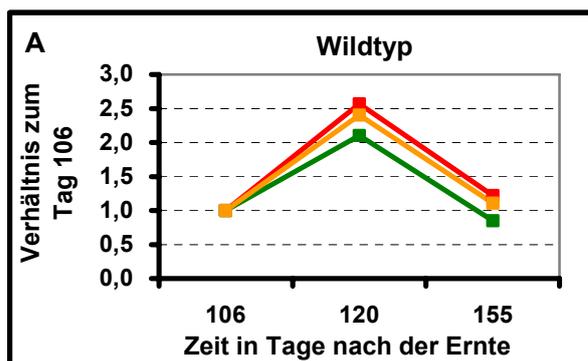


Abb. C-34: Calystegingehalt in 1-2 mm Schale von transgenen Kartoffeln nach 106tägiger Lagerung im Vergleich. Das Ergebnis ergibt sich aus 4-5 Bestimmungen; die Standardabweichung ist angegeben; die Zahlen hinter den Calysteginen stehen für das zur Quantifizierung verwendete spezifische Ion

### C.2.1.3.3 Calystegingehalt in Kartoffelschalen während der Lagerung

Der Calystegingehalt wurde während der Lagerung der Kartoffelknollen 106, 120 und 155 Tage nach der Ernte in der Schale untersucht. Die Analysen wurden für alle transgenen Linien durchgeführt. Die Ergebnisse werden hier nur für den Wildtyp und die jeweils transformationsstärksten Linien dargestellt (Abb. C-35). Für die Linie U-IN2 (17) fand am Tag 155 nach der Ernte mangels Biomasse keine Untersuchung statt. Die Ergebnisse sind jeweils als Verhältnis zum Resultat am Tag 106 angegeben. Für Calystegin B<sub>4</sub> wurde für alle dargestellten Linien sowie den Wildtyp eine Steigerung am Tag 120 und anschließend eine Abnahme am Tag 155 festgestellt. Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> verhielten sich im Wildtyp wie Calystegin B<sub>4</sub>. In den transgenen Linien hingegen wurde am Tag 120 und 155 eine Abnahme der Konzentration von Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> beobachtet. Für Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> konnten die Ergebnisse des Lagerungsversuches (C.1.3.1) weitgehend bestätigt werden. Calystegin B<sub>4</sub> wurde dort nicht gefunden.



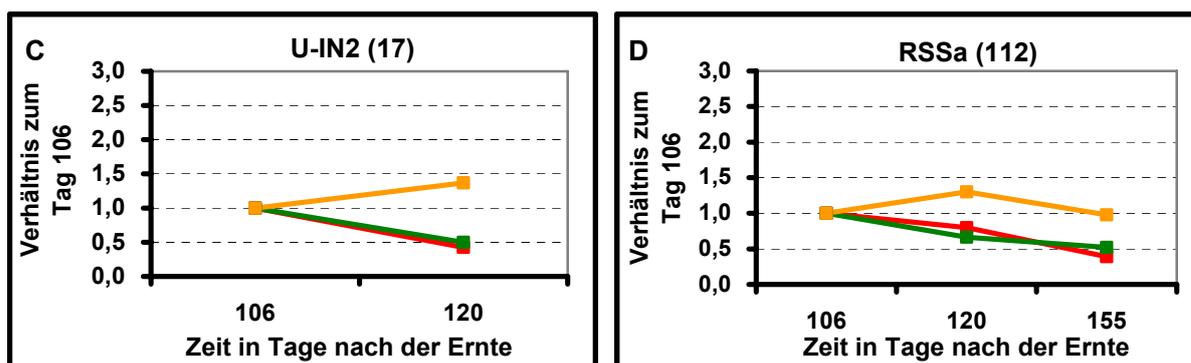


Abb. C-35: Calystegingehalt in Kartoffelschalen der jeweils transformationsstärksten Linien während der Lagerung 106, 120 und 155 Tage nach der Ernte.

Die Ergebnisse ergaben sich jeweils als Verhältnis der Resultate am Tag 120 (155) zum Tag 106; Mittelwerte wurden aus 4-6 Einzelwerten gebildet. Standardabweichungen lagen zwischen 5,2 und 31,5%; — Calystegin A<sub>3</sub>; — Calystegin B<sub>2</sub>; — Calystegin B<sub>4</sub>; (A) Wildtyp; (B) Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase; (C) Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase; (D) Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese

## C.2.2 Analyse von Stoffwechselmetaboliten durch GC-MS

Innerhalb der Metabolitenprofilanalyse wurden verschiedene Substanzklassen erfasst. Hierzu zählten Aminosäuren, Säuren, Fettsäuren, Alkohole, Stickstoffverbindungen, Phosphate, Phenylpropane, Polyole, Zucker, Zuckerkonjugate, Polyhydroxysäuren und Calystegine (C.2.1.2). Weiterhin kamen unbekannte Substanzen hinzu, die deutliche Korrelationen zu Calysteginen aufwiesen. Zuerst wurden alle nachweisbaren Metabolite identifiziert und den genannten Substanzklassen zugeordnet. Anschließend wurden ausgewählte Substanzen quantifiziert und mit Calysteginen korreliert. Folgende Auswahlkriterien für die Quantifizierung einer Substanz wurden festgelegt:

- Identität der Substanz eindeutig belegt
- Substanz über automatische Peakquantifizierung erfassbar
- Substanzpeak eindeutig integrierbar
- Interesse am Stoffwechsel
- Korrelation mit Calysteginen

Tab. C-8 zeigt alle identifizierten Metabolite aus Keimen und aus Schalen (106 Tage nach der Ernte). Alle grau unterlegten Substanzen wurden quantifiziert.

Tab. C-8: Identifizierte Metabolite aus Keimen und aus Schalen (106 Tage nach der Ernte). Neben den Substanznamen ist jeweils der dazugehörige Analyt identifiziert angegeben.

Substanz	Analyt-ID	Substanz	Analyt-ID	Substanz	Analyt-ID
<b>Aminosäuren:</b>					
2-Amino adipinsäure	A172006	Glutamin	A178001	Prolin	A132003
Alanin	A110001	Glutaminsäure	A163001	4-Hydroxyprolin	A153001
beta-Alanin	A144001	Glycin	A133001	(Pyroglutaminsäure, A153002 Glutamin, Glutaminsäure)	
3-cyano Alanin	A138005	Histidin	A192006	Serin	A138001
(Arginin, Citrullin)	A183001	Isoleucin	A132002	Homoserin	A146001
Asparagin	A168001	Leucin	A129002	Threonin	A140001
Asparaginsäure	A152002	Lysin	A192003	Tryptophan	A223001
2-Aminobuttersäure	A117002*	Methionin	A152001	Tyrosin	A194002
4-Aminobuttersäure	A153003	(Ornithin, Arginin, Citrullin)	A182002	Valin	A122001
Butyro-1,4-lactam	A114004	Phenylalanin	A164001	Norvalin	A126001
Cystein	A156002*				
S-Methylcystein	A144002				

Substanz	Analyt-ID	Substanz	Analyt-ID	Substanz	Analyt-ID
<b>Säuren:</b>					
Adipinsäure	A151006	4-Hydroxy-	A126002	Oxalsäure	A113002
Äpfelsäure	A149001	buttersäure		Pantothensäure	A200006*
Azelainsäure	A181007**	Fumarsäure	A137001	Salicylsäure	A152003*
Benzoessäure	A128003	Glycolsäure	A106002	Schwefelsäure	A116001**
4-Aminobenzoe-	A184001*	2-Ketoglutarsäure	A158004	Shikimisäure	A181002
säure		2-Ketopropansäure	A104002*	Zitronensäure	A182004
4-Hydroxybenzoe-	A164003*	Maleinsäure	A133003*	Isozitronensäure	A182003
säure		Malonsäure	A122003	2-Methylzitronen-	A184011*
Bernsteinsäure	A134001	Milchsäure	A105001	säure	
Chinasäure	A185001				
<b>Fettsäuren:</b>					
Capronsäure	A106001*	Palmitinsäure	A205001	Stearinsäure	A225002
Myristinsäure	A185004				
<b>Alkohole:</b>					
Benzylalkohol	A115003**				
<b>Stickstoffverbindungen:</b>					
Adenin	A188005	Homoprolin	A137004	Phenethylamin	A156006**
Adenosin 5` mono-	A307003	3-Hydroxypyridin	A114003	(Putrescin, Agmatin)	A175002
phosphat		Nicotianamin	A259003*	Spermidin	A220002**
Allantoin	A189007	Nicotinsäure	A133004*	Triethanolamin	A163003*
Ethanolamin	A128002	6-Hydroxynicotin-	A158008*	Tryptamin	A222002*
Guanin	A214002**	säure		5-Hydroxytryptamin	A248001
Guanosin	A278001**	Noradrenalin	A216001*	Tyramin	A156006**
Harnstoff	A127002	4,5-Dihydroorot-	A178007*	Uracil	A136001*
Histamin	A188007*	säure		Uridin	A247002
<b>Phosphate:</b>					
Fructose-6-	A232002	Glycerol-3-phosphat	A177002	Mannose-6-	A231001
phosphat		Gluconsäure-6-	A244001	phosphat	
Galactose-6-	A232001	phosphat		Phosphorsäure	A129001
phosphat		<i>myo</i> -Inositol-1-	A243001		
Glucose-6-phosphat	A233002	phosphat			
<b>Phenylpropane:</b>					
<i>trans</i> -Ferulasäure	A210001	<i>cis</i> -3-Chlorogen-	A299001*	<i>trans</i> -3-Chlorogen-	A311001
Kaempferol	A318005	säure		säure	
<i>cis</i> -Kaffeesäure	A199001	<i>cis</i> -4-Chlorogen-	A301001	<i>trans</i> -4-Chlorogen-	A317001
<i>trans</i> -Kaffeesäure	A214001	säure		säure	
<i>trans</i> -4-Hydroxy-	A195001	<i>cis</i> -5-Chlorogen-	A301002**	<i>trans</i> -5-Chlorogen-	A319001
zimtsäure		säure		säure	
<b>Polyole:</b>					
Erythritol	A150002	<i>myo</i> -Inositol	A209002	Sorbitol	A193001
Galactitol	A194001	<i>allo</i> -Inositol	A189011	Threitol	A149002
Glycerol	A129003	Mannitol	A193002	Xylitol	A171001
<b>Zucker:</b>					
Arabinose	A167002	Glucose	A191001	Rhamnose	A172002
Fructose	A188004	Kestose	A340003	Ribose	A168002*
Fucose	A173002*	Maltose	A274001	Saccharose	A264001
Galactose	A188001	Mannose	A188002*	Trehalose	A274002
1,6 anhydro-	A172001	Melizitose	A346001	Xylose	A166001
Glucose		Raffinose	A337002		

Substanz	Analyt-ID	Substanz	Analyt-ID	Substanz	Analyt-ID
<b>Polyhydroxysäuren:</b>					
Ascorbinsäure	A195002	Galacturonsäure	A194003*	Ribonsäure	A177001
Dehydroascorbin- säure (Dimer)	A185002**	Gluconsäure	A200001	Schleimsäure	A204001
Erythronsäure	A154001	Gluconsäure-1,5- lacton	A189008	Threonsäure	A156001
Erythronsäure-1,4- lacton	A144008*	Glucuronsäure	A193004*	Threonsäure-1,4- lacton	A140005*
Galactonsäure	A199002	Glycerinsäure	A135003	Zuckersäure	A201001
Galactonsäure-1,4- lacton	A189003	Gulonsäure	A196001		
		Gulonsäure-1,4- lacton	A192004*		
<b>Zuckerkonjugate:</b>					
1-O-Methylgalacto- pyranosid	A182012**	Galactinol	A299002		
<b>Calystegine:</b>					
Calystegin A <sub>3</sub>	A176008	Calystegin B <sub>2</sub>	A181006	Calystegin B <sub>4</sub>	A184009
<b>Unbekannte Substanzen:</b>					
S01	A160001*	S09	A225007	S17	A241001*
S02	A168011*	S10	A228001	S18	neu*
S03	A171003	S11	A237002	S19	A288003*
S04	A171011	S12	A257007**	S20	A341005*
S05	A175010	S13	A276009	S21	A202007**
S06	A178005*	S14	A283005*	S22	A301005
S07	A199003*	S15	neu*	S23	A277011
S08	A217011*	S16	A240002*		
* → Metabolit wurde nur in Keimen nachgewiesen					
** → Metabolit wurde nur in der Schale nachgewiesen					
Substanzen in Klammern konnten nicht eindeutig differenziert werden					
grau unterlegte Metabolite wurden quantifiziert					

### C.2.2.1 Quantifizierung von Stoffwechselmetaboliten

Die Quantifizierung der Stoffwechselmetabolite erfolgte analog zu den Calysteginen (C.2.1.3). Die in Tab. C-8 grau unterlegten Substanzen wurden in allen transgenen Linien quantifiziert. Die Ergebnisse der Quantifizierung werden hier nur für ausgewählte Stoffwechselmetabolite in den transformationsstärksten Linien und im Wildtyp dargestellt. Im Interesse der Stoffwechselmetabolite standen aufgrund der vorliegenden Fragestellung (C.2) die Zucker, Zuckeralkohole, Phosphate und Zuckerkonjugate. Neben den Startaminosäuren der Tropanalkaloidbiosynthese Arginin und Ornithin wurden die Polyamine Putrescin und Spermidin sowie ausgewählte Aminosäuren erfasst. Zusätzlich werden die Ergebnisse für vier organische Säuren gezeigt.

#### C.2.2.1.1 Stoffwechselmetabolite in Kartoffelkeimen

Die Stoffwechselmetabolite wurden in Keimen mit einer Länge von 1-10 mm bestimmt. Für den Wildtyp wurden zusätzlich 1-10 cm lange Keime analysiert. In Abb. C-36 sind die Ergebnisse der Quantifizierung für große Wildtyp-Keime (1-10 cm), für Keime von Kartoffeln der Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase und für Keime von Kartoffeln der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese im Vergleich zum Wildtyp (1-10 mm Keime) dargestellt.

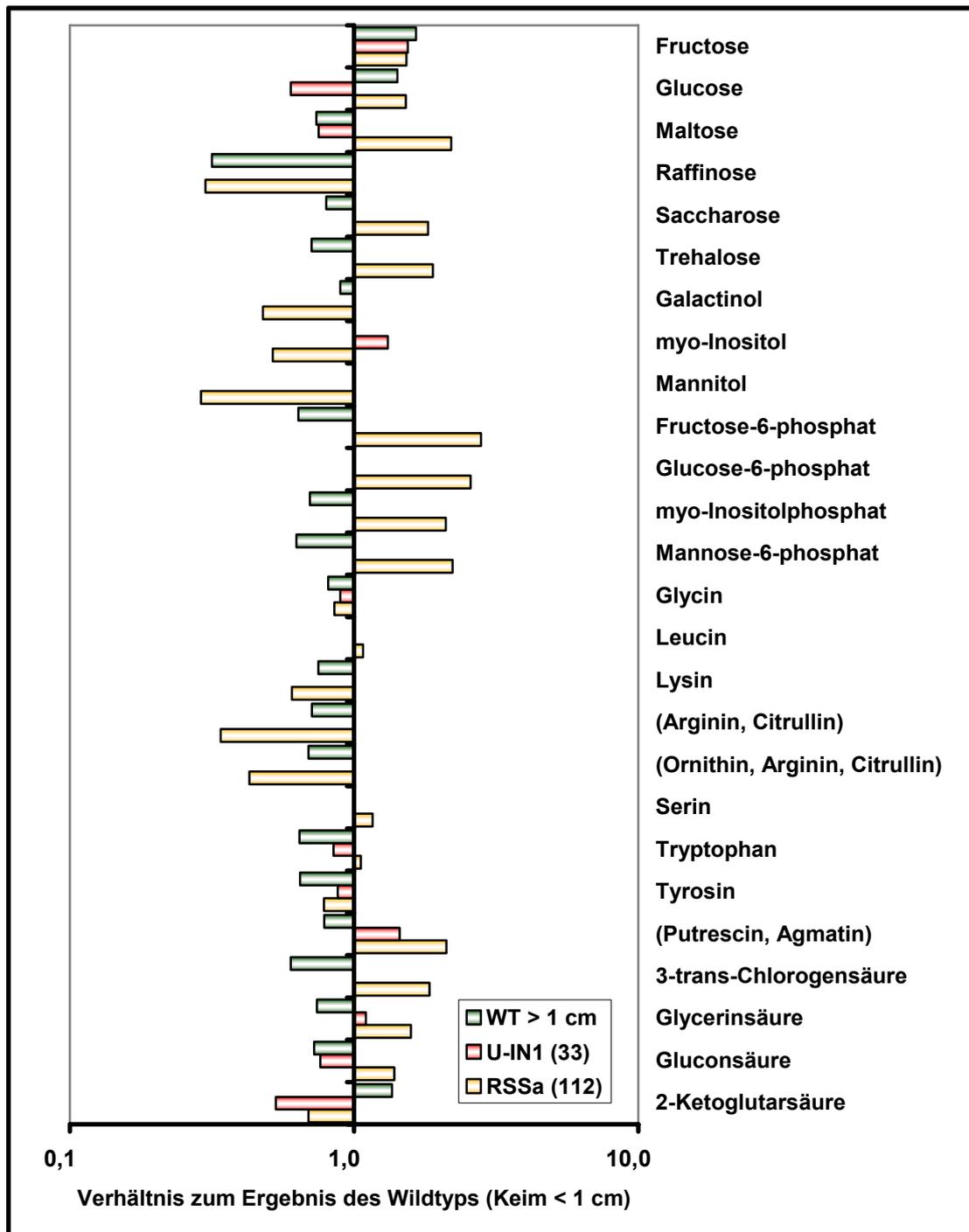


Abb. C-36: Stoffwechselmetabolite in Keimen von Wildtyp- und transgenen Kartoffeln. Die Ergebnisse sind für Wildtyp-Keime > 1 cm; für Keime von Kartoffeln der Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase und für Keime der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese dargestellt. Das Ergebnis ergibt sich als Verhältnis zu Wildtyp-Keimen < 1 cm. Die Daten sind Mittelwerte aus 1–6 Bestimmungen. Es wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, die sich signifikant vom Ergebnis des Wildtyp-Keims < 1 cm unterschieden (t-Test,  $P < 0,05$ ). Für Linie RSSa (112) war kein t-Test möglich. Zur besseren Darstellung kleiner und großer Unterschiede wurde die y-Achse logarithmiert.

In großen Wildtyp-Keimen (> 1 cm) fiel der verringerte Metabolitengehalt im Vergleich zu kleinen Wildtyp-Keimen mit Ausnahme von Fructose, Glucose und 2-Ketoglutarsäure auf. Für die Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase wurden nur wenige Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Keimen detektiert. Leichte Erhöhungen wurden für Fructose, *myo*-

Inositol und Putrescin beobachtet, während Glucose, Maltose, vereinzelte Aminosäuren, Gluconsäure und 2-Ketoglutarinsäure leicht erniedrigt waren. Die größten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp wurden in der Linie RSSa (112) gemessen. Neben einer Erhöhung der Mono- und Disaccharide, der Phosphate und einiger organischer Säuren wurde eine geringere Raffinose-, Galactinol- sowie Zuckeralkoholkonzentration festgestellt. Auffallend war weiterhin ein geringerer Gehalt der beiden Startaminosäuren der Tropanalkaloidbiosynthese Arginin und Ornithin und eine Erhöhung des Decarboxylierungsproduktes Putrescin.

Um eine Charakterisierung aller transgenen Linien hinsichtlich der gesamten Metaboliten zu erreichen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Abb. C-37) durchgeführt. Zur Analyse wurden alle Einzelproben der Keime verwendet. Als Variablen dienten die in Abb. C-36 aufgeführten Substanzen, da das Faktormodell mit allen quantifizierten Metaboliten nicht für die Hauptkomponentenanalyse geeignet war. Ein Maß für die Eignung des Faktormodells ist das Kaiser-Meyer-Olkin-Maß (KMO) (Kaiser 1974). Das KMO-Maß für das Faktormodell mit ausgewählten Variablen betrug 0,7. Damit wird das Faktormodell mit „middling“ bewertet (Kaiser 1974).

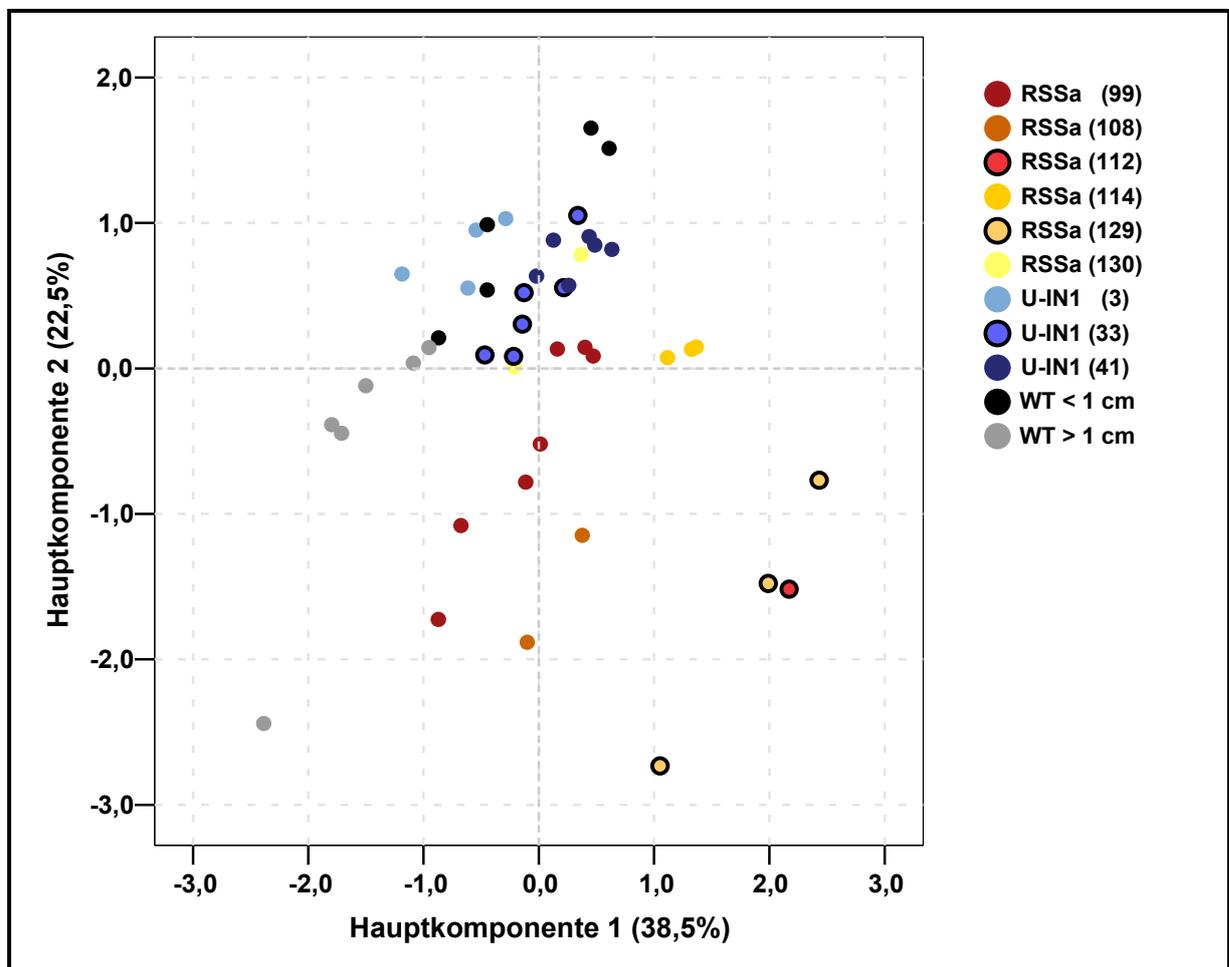


Abb. C-37: Hauptkomponentenanalyse von ausgewählten Metaboliten aus transgenen Kartoffelkeimen.

Die Hauptkomponenten wurden berechnet wie in Kapitel B.2.1.2.4 beschrieben. Die standardisierten Daten (vgl. C.2.1.3) der Einzelmessungen wurden logarithmiert ( $\log_{10}$ ) und für die Analyse herangezogen. 6 Hauptkomponenten wurden extrahiert, wobei jeder Punkt eine Linearkombination der ausgewählten Metabolite von einer einzelnen Probe darstellt. Um die beste Trennung der transgenen Linien zu erreichen, wurden die Hauptkomponenten 1 und 2 ausgewählt. Diese erklären 61% der Gesamtvarianz.

Abb. C-37 zeigt eine unterschiedliche Einordnung der transgenen Keime hinsichtlich der ausgewählten Metabolite. Auch Wildtyp-Keime unterschiedlicher Größe unterscheiden sich in ihrem Metabolitenprofil. Während die transformationsstärksten Linien RSSa (112) und RSSa (129) mit supprimierter Saccharosesynthese die stärkste Trennung zum Wildtyp aufwiesen, waren Keime von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase im Bereich des Wildtyps zu finden.

#### C.2.2.1.2 Stoffwechselmetabolite in Kartoffelschalen

Die Stoffwechselmetabolite wurden in 1-2 mm Schale von Kartoffeln nach 106tägiger Lagerung bestimmt. In Abb. C-38 sind die Ergebnisse für die Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase, für die Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase und für die Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese dargestellt. Für die Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase wurden die höchsten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp im Bereich der Zucker beobachtet. Neben einer stark verringerten Saccharosekonzentration wurde für alle anderen Zucker sowie Galactinol ein erhöhter Gehalt festgestellt (vgl. auch C.1.1.1). Weiterhin fiel eine leichte Erhöhung der beiden Startaminosäuren der Biosynthese Arginin und Ornithin sowie eine Verringerung der Putrescin- und Spermidingehalte auf. Stark veränderte Metabolitengehalte waren in der Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase zu finden. Im Bereich der Zucker wurde für Fructose und Trehalose ein erhöhter Gehalt festgestellt. Besonders auffällig war der im Vergleich zum Wildtyp ca. 600fach erhöhte Glucosegehalt und der auf ein hundertstel reduzierte Saccharosegehalt (vgl. auch C.1.1.1). Während für die Zuckerphosphate und Mannitol ebenfalls höhere Konzentrationen gemessen wurden, waren Galactinol und *myo*-Inositol erniedrigt. Die Aminosäuren waren leicht erhöht, währenddessen Putrescin und Spermidin hier nur ein dreißigstel bzw. ein fünftel der Wildtyp-Konzentration erreichten. In Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese waren kaum große Veränderungen zum Wildtyp zu beobachten. Auffallend war hier der erhöhte Glucose- und Fructosegehalt (vgl. auch C.1.1.1) sowie geringere Zuckeralkoholgehalte. Die Startaminosäuren waren hier nur minimal erhöht und die Polyamine Putrescin und Spermidin nur leicht erniedrigt.

Auch hier wurde eine Charakterisierung der transgenen Linien hinsichtlich der gesamten Metaboliten mit einer Hauptkomponentenanalyse (Abb. C-39) vorgenommen. Alle Einzelproben der Schale nach 106tägiger Lagerung wurden für die Analyse verwendet. Als Variablen dienen die in Abb. C-38 aufgeführten Substanzen. Das KMO-Maß für das Faktormodell mit diesen ausgewählten Variablen betrug 0,78 („middling“). Die Hauptkomponentenanalyse zeigt die Auftrennung der transgenen Kartoffellinien anhand der ausgewählten Metabolite in zwei große Gruppen. Die erste Gruppe bildete der Wildtyp sowie die Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase und die Linien mit supprimierter Saccharosesynthese, wobei sich die transgenen Linien leicht vom Wildtyp unterscheiden. Die zweite Gruppe, die sich stark von der ersten Gruppe abgrenzte, bestand aus den Kartoffellinien mit cytosolisch überexprimierter Invertase. Diese Linien wichen bei fast allen vorhergehenden Untersuchungen von den Ergebnissen des Wildtyps sowie den restlichen transgenen Linien ab (C.1, C.2).

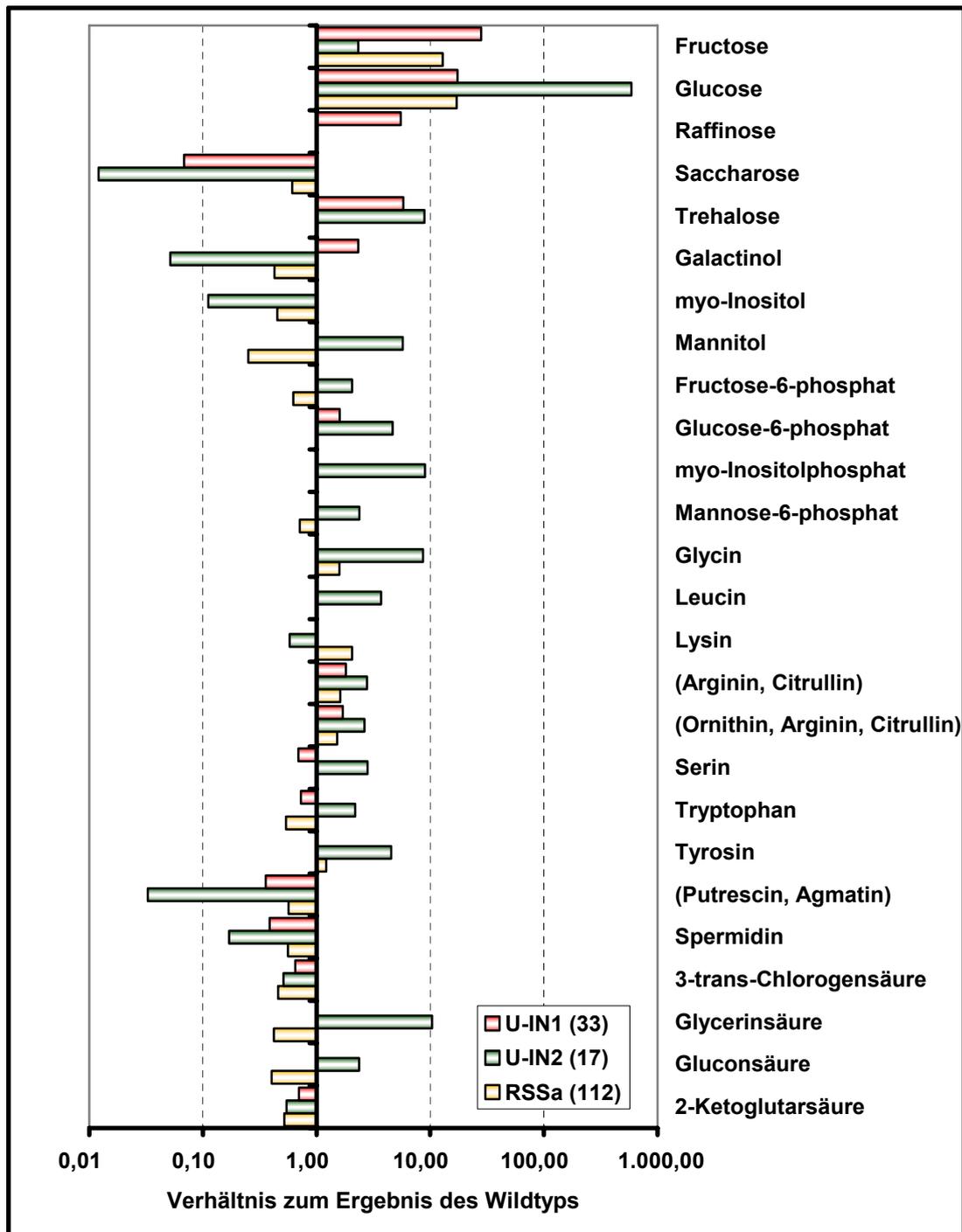


Abb. C-38: Stoffwechselmetabolite in 1-2 mm Schale von Wildtyp- und transgenen Kartoffeln. Die Ergebnisse sind für Kartoffeln der Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase, für Kartoffeln der Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase und für Kartoffeln der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese dargestellt. Das Ergebnis ergibt sich als Verhältnis zu Wildtyp-Kartoffeln. Die Daten sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen. Es wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, die sich signifikant vom Ergebnis des Wildtyps unterschieden (t-Test,  $P < 0,05$ ). Zur besseren Darstellung kleiner und großer Unterschiede wurde die y-Achse logarithmiert

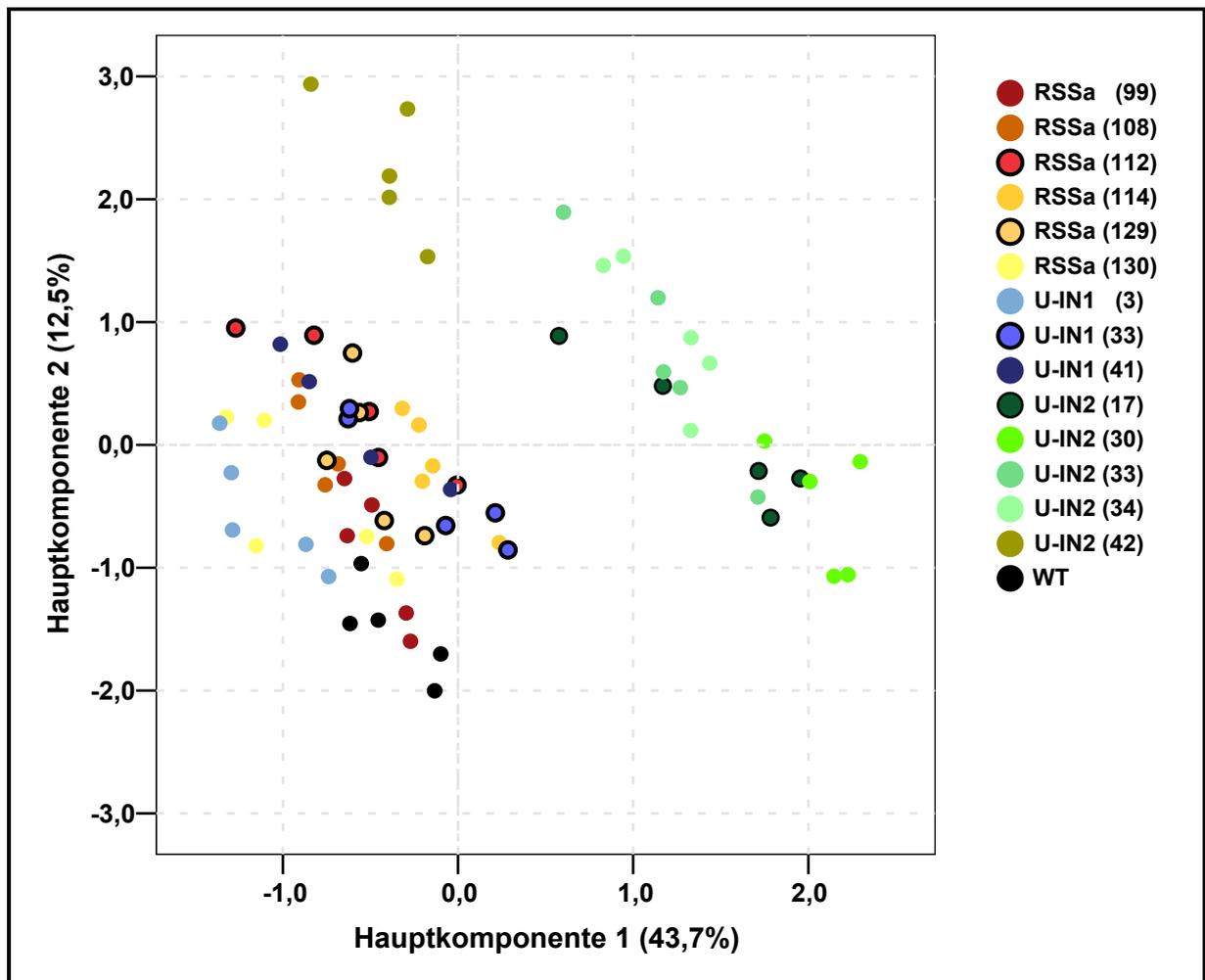


Abb. C-39: Hauptkomponentenanalyse von ausgewählten Metaboliten aus transgenen Kartoffelschalen nach 106tägiger Lagerung.

Die Hauptkomponenten wurden berechnet wie in Kapitel B.2.1.2.4 beschrieben. Die standardisierten Daten (vgl. C.2.1.3) der Einzelmessungen wurden logarithmiert ( $\log_{10}$ ) und für die Analyse herangezogen. 6 Hauptkomponenten wurden extrahiert, wobei jeder Punkt eine Linearkombination der ausgewählten Metabolite von einer einzelnen Probe darstellt. Um die beste Trennung der transgenen Linien zu erreichen, wurden die Hauptkomponenten 1 und 2 ausgewählt. Diese erklären 56,2% der Gesamtvarianz.

### C.2.2.1.3 Stoffwechselmetabolite in Kartoffelschalen während der Lagerung

Die Analyse von Stoffwechselmetaboliten in Kartoffelschalen während der Lagerung erfolgte analog zum Kapitel C.2.1.3.3. Die Untersuchungen wurden nur für die transformationsstärksten Linien jeder Transformationsart sowie den Wildtyp durchgeführt. Tab. C-9 zeigt die Ergebnisse. Von den Metaboliten wurden vor allem Zucker, ausgewählte Zuckerphosphate und Zuckeralkohole, Arginin und Ornithin sowie Putrescin und Spermidin betrachtet. In Wildtyp-Kartoffeln wurde eine Zunahme von Fructose und Trehalose während der Lagerung sowie eine Zunahme von Raffinose und Glucose-6-phosphat am Tag 120 beobachtet. Der Galactinol- und der Saccharosegehalt nahmen ab. Die Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase war durch eine Zunahme von Raffinose und Glucose-6-phosphat am Tag 120 sowie eine Abnahme von Galactinol, Trehalose und Putrescin charakterisiert. Die Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase fiel durch eine Abnahme der meisten Metabolite am Tag 120 auf. In der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese stiegen demgegenüber eine Vielzahl von Metaboliten an (z. B. Putrescin, Trehalose und

Raffinose (Tag 120)). Eine Abnahme wurde für Glucose, Fructose und Galactinol sowie Raffinose am Tag 155 beobachtet.

**Tab. C-9: Stoffwechselmetabolite in Kartoffelschalen der jeweils transformationsstärksten Linien während der Lagerung 106, 120 und 155 Tage nach der Ernte.**

		Wildtyp			U-IN1 (33)		
Substanz	Analyt-ID	Tag 106	Tag 120	Tag 155	Tag 106	Tag 120	Tag 155
(Arginin, Citrullin)	A183001	1,00	0,76	1,36	1,00	0,74	0,78
(Ornithin, Arginin, Citrullin)	A182002	1,00	0,70	0,88	1,00	0,91	0,68
(Putrescin, Agmatin)	A175002	1,00	0,84	1,23	1,00	0,58	1,25
Spermidin	A220002	1,00	0,79	0,89	1,00	0,99	1,10
Fructose	A188004	1,00	1,33	1,42	1,00	1,01	0,73
Glucose	A191001	1,00	0,78	1,25	1,00	1,13	1,01
Raffinose	A337002	1,00	1,72	0,62	1,00	1,94	0,80
Saccharose	A264001	1,00	0,49	0,53	1,00	0,82	1,21
Trehalose	A274002	1,00	1,51	1,80	1,00	0,32	0,72
Galactinol	A299002	1,00	0,42	0,23	1,00	0,59	0,29
<i>myo</i> -Inositol	A209002	1,00	0,71	0,92	1,00	1,08	1,16
<i>myo</i> -Inositolphosphat	A243001	1,00	0,92	0,82	1,00	1,04	0,98
Glucose-6-phosphat	A233002	1,00	1,33	1,05	1,00	1,34	0,85

		U-IN2 (17)			RSSa (112)		
Substanz	Analyt-ID	Tag 106	Tag 120	Tag 155	Tag 106	Tag 120	Tag 155
(Arginin, Citrullin)	A183001	1,00	0,55	n.b.	1,00	1,70	1,33
(Ornithin, Arginin, Citrullin)	A182002	1,00	0,36	n.b.	1,00	1,25	0,70
(Putrescin, Agmatin)	A175002	1,00	1,09	n.b.	1,00	2,15	4,27
Spermidin	A220002	1,00	0,78	n.b.	1,00	1,42	1,40
Fructose	A188004	1,00	0,20	n.b.	1,00	0,48	0,23
Glucose	A191001	1,00	0,01	n.b.	1,00	0,47	0,43
Raffinose	A337002	1,00	0,35	n.b.	1,00	2,83	0,45
Saccharose	A264001	1,00	0,07	n.b.	1,00	1,24	0,74
Trehalose	A274002	1,00	0,41	n.b.	1,00	2,18	0,79
Galactinol	A299002	1,00	0,38	n.b.	1,00	0,62	0,35
<i>myo</i> -Inositol	A209002	1,00	1,30	n.b.	1,00	1,74	1,51
<i>myo</i> -Inositolphosphat	A243001	1,00	1,98	n.b.	1,00	1,46	0,91
Glucose-6-phosphat	A233002	1,00	0,03	n.b.	1,00	1,63	2,00

Die Ergebnisse ergeben sich jeweils als Verhältnis der Resultate am Tag 120 (155) zum Tag 106; Die Mittelwerte wurden aus 4-6 Einzelwerten gebildet. Die Standardabweichungen liegen zwischen 2,2 und 36,9%; eine Konzentrationsabnahme auf < 70% wurde gelb und eine Konzentrationszunahme um > 30% orange unterlegt.

#### C.2.2.1.4 Metabolite der Calysteginbiosynthese in Keimen und Schalen

In Keimen und Schalen wurde weiterhin versucht, die Metabolite der Calysteginbiosynthese *N*-Methylputrescin, Tropinon, Tropin und Pseudotropin nachzuweisen. Dazu wurden zuerst die jeweiligen Standardsubstanzen getestet. Es wurden jeweils Peaks bei

16,724 min (Tropin), 16,789 min (Tropinon), 17,729 min (Pseudotropin) und 22,732 min (*N*-Methylputrescin) erhalten. In Keimen und Schalen wurde allerdings keiner der Metabolite gefunden. Tropinon wurde in vorhergehenden Untersuchungen in allen Geweben und Pseudotropin in Wurzeln detektiert (C.1.3.3, C.1.4.4, C.1.5.4). Möglicherweise lagen die Metabolitengehalte bei dieser Untersuchung unter der Nachweisgrenze der GC-MS. *N*-Methylputrescin wurde in vorhergehenden Untersuchungen nur in kleinen Keimen detektiert (Stenzel et al., 2006).

### **C.2.3 Korrelationen von Calysteginen mit Stoffwechselmetaboliten**

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten herauszufinden, wurden Korrelationen durchgeführt. Hierzu wurde der Pearsonsche Korrelationsfaktor berechnet, der Werte zwischen  $1 \geq 0 \geq -1$  ergibt. Voraussetzung für diese Untersuchungen waren sowohl veränderte Calystegingehalte als auch veränderte Gehalte von Stoffwechselmetaboliten. Diese Voraussetzung wurde für Keime und Schale erfüllt (C.2.1.3, C.2.2.1). Alle in Keimen und in der Schale (106 Tage nach der Ernte) quantifizierten Metabolite wurden mit den Calysteginen A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> korreliert. Hierzu wurden jeweils alle Einzelproben verwendet. In Tab. C-10 sind die in Keimen und in der Schale gefundenen Korrelationen zusammen mit den Pearsonschen Korrelationskoeffizienten dargestellt. In Keimen fiel eine hohe Anzahl Korrelationen mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> auf, während in der Schale mehr Korrelationen mit Calystegin B<sub>4</sub> gefunden wurden. Eine erste wichtige Korrelation, die sowohl in Keimen als auch in der Schale beobachtet wurde, bestand zwischen Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>. Calystegin B<sub>4</sub> korrelierte mit keinem der beiden Calystegine.

In Keimen wurden positive Korrelationen zwischen Calystegin A<sub>3</sub> bzw. B<sub>2</sub> und Disacchariden (Maltose, Saccharose und Trehalose), Zuckerphosphaten (z. B. Glucose-6-phosphat und *myo*-Inositolphosphat) sowie Putrescin gefunden. Negative Korrelationen mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> zeigten Mannitol und Glutamin. Mit Calystegin B<sub>4</sub> korrelierten Putrescin, Zitronensäure und *trans*-Ferulasäure in positiver Richtung sowie Glucose und 2-Ketoglutar Säure in negativer Richtung. Neben bekannten Metaboliten korrelierten auch eine Vielzahl unbekannter Metabolite (z. B. S 19). In der Schale wurden schwache Korrelationen mit Calystegin A<sub>3</sub> bzw. B<sub>2</sub> nur für Glutamin und Galactonsäure beobachtet. Stärkere Korrelationen wurden für drei unbekannte Metabolite (S 03, S 04 und S 21) nachgewiesen. Eine große Zahl der Metabolite korrelierte in der Schale mit Calystegin B<sub>4</sub>. Positive Korrelationen wurden z. B. mit Glucose, Trehalose, Mannitol und Zuckerphosphaten beobachtet, während negative Korrelationen für Saccharose, Galactinol, *myo*-Inositol, sowie Putrescin und Spermidin nachgewiesen wurden. Die wichtigsten Korrelationen werden in Abb. C-40 und Abb. C-41 graphisch dargestellt. Die Korrelationen lassen Ansatzpunkte für Calysteginwirkungen vermuten, geben allerdings keine Kausalzusammenhänge wieder.

Tab. C-10: Korrelationen zwischen Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten in Keimen und in der Schale von transgenen Kartoffelknollen.

Substanz	Keime (< 1cm; Wildtyp > 1 cm)			Schale (106 Tage nach der Ernte)		
	Cal. A <sub>3</sub>	Cal. B <sub>2</sub>	Cal. B <sub>4</sub>	Cal. A <sub>3</sub>	Cal. B <sub>2</sub>	Cal. B <sub>4</sub>
Calystegin A <sub>3</sub>	1,000	0,972		1,000	0,963	
Calystegin B <sub>2</sub>	0,972	1,000		0,963	1,000	
Calystegin B <sub>4</sub>			1,000			1,000
Glucose			- 0,690			0,854
Maltose	0,665	0,594		n.q.	n.q.	n.q.
Saccharose	0,719	0,664				- 0,515
Trehalose	0,693	0,661				0,749
Galactinol						- 0,706
<i>myo</i> -Inositol			0,534			- 0,789
Mannitol	- 0,590	- 0,558				0,886
Fructose-6-phosphat	0,713	0,670				0,764
Glucose-6-phosphat	0,655	0,614				0,881
<i>myo</i> -Inositolphosphat	0,786	0,769				0,926
Mannose-6-phosphat	0,683	0,664				0,805
beta-Alanin	0,504	0,544				
Glutamin	- 0,569	- 0,613		0,579	0,597	- 0,572
Glutaminsäure			0,525			0,674
Isoleucin			0,515			0,761
Phenylalanin			0,540			
Tryptophan	0,535	0,550	0,523			0,740
Ethanolamin	0,689	0,758	0,503			0,805
(Putrescin, Agmatin)	0,650	0,664	0,791			- 0,600
Spermidin	n.d.	n.d.	n.d.			- 0,556
Benzoessäure	0,544	0,496				0,787
2-Ketoglutarensäure			- 0,732			
Zitronensäure	0,511	0,615	0,724			
Isozitronensäure	0,597	0,661	0,578			
Galactonsäure				- 0,488	- 0,568	0,720
Glycerinsäure	0,716	0,731				0,965
3- <i>trans</i> -Chlorogensäure	0,713	0,721				
<i>trans</i> -Ferulasäure	0,538	0,572	0,755			
S 21	n.d.	n.d.	n.d.	0,909	0,860	
S 01	- 0,495	- 0,596	- 0,516	n.d.	n.d.	n.d.
S 02	- 0,571	- 0,655		n.d.	n.d.	n.d.
S 03	- 0,594	- 0,676		0,745	0,659	
S 04	- 0,495	- 0,543		0,729	0,661	
S 19	0,839	0,787		n.d.	n.d.	n.d.
S 20	0,868	0,845		n.d.	n.d.	n.d.
S 22	0,870	0,871				0,768
S 23	0,763	0,700				0,888

Die Keime wurden nach 176tägiger Lagerung und die Schale nach 106tägiger Lagerung der Knollen verwendet; berechnet wurde jeweils der Pearsonsche Korrelationskoeffizient; Werte  $\geq 0,5$  stehen für positive Korrelationen; Werte  $\leq -0,5$  stehen für negative Korrelationen; es wurden nur Werte mit einem Betrag  $\geq 0,5$  abgebildet; n.q. – nicht quantifiziert; n.d. – nicht detektiert  
S 01 bis S 23: unbekannte Metabolite

ausgewählte Korrelationen in Keimen:

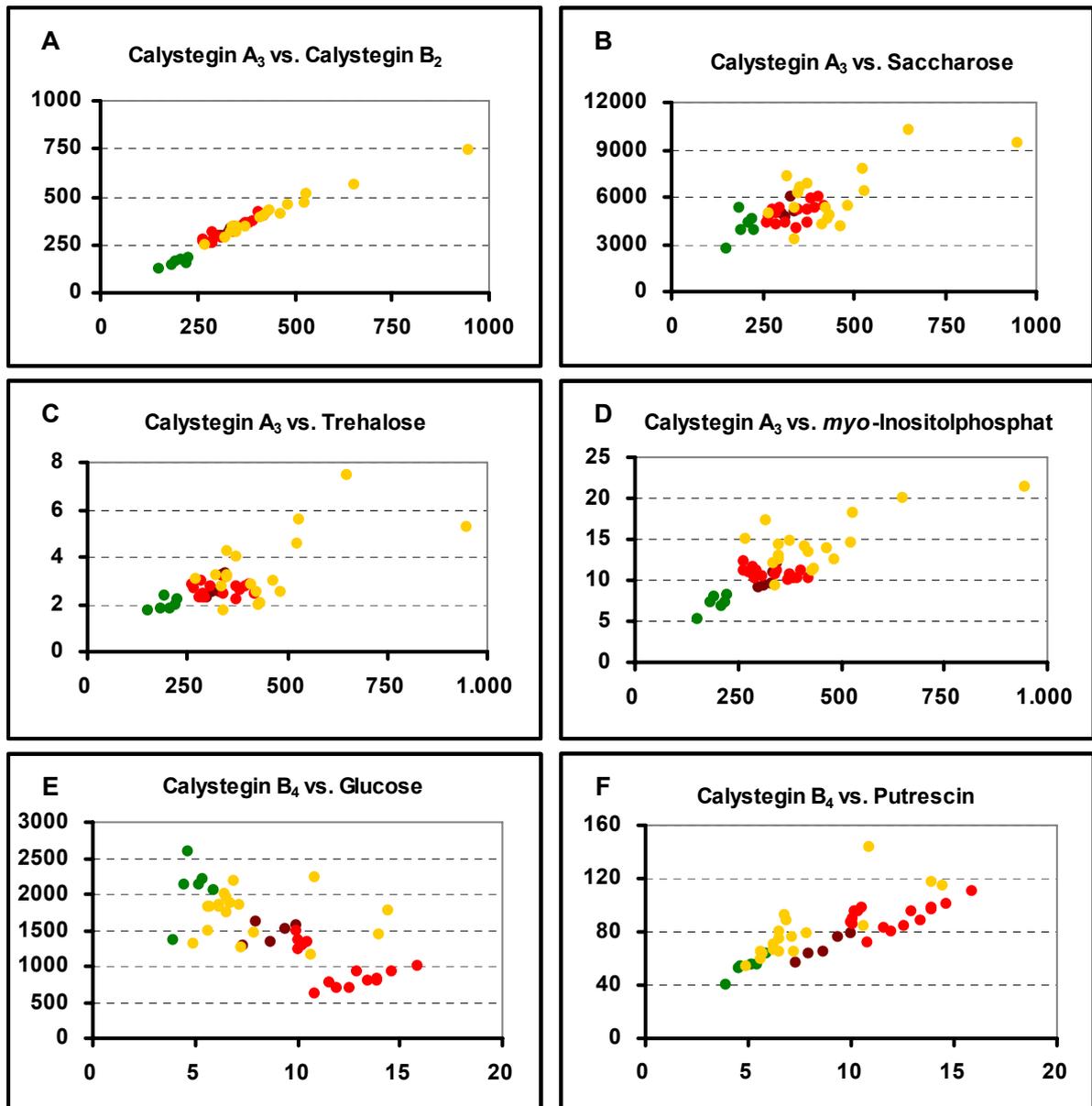


Abb. C-40: Ausgewählte Korrelationen zwischen Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten in Keimen.

In den Diagrammen sind die Resultate der Einzelmessungen für die jeweiligen Metabolite gegeneinander aufgetragen; (A) Calystegin A<sub>3</sub> vs. Calystegin B<sub>2</sub>, (B) Calystegin A<sub>3</sub> vs. Saccharose, (C) Calystegin A<sub>3</sub> vs. Trehalose, (D) Calystegin A<sub>3</sub> vs. *myo*-Inositolphosphat, (E) Calystegin B<sub>4</sub> vs. Glucose, (F) Calystegin B<sub>4</sub> vs. Putrescin; ● Wildtyp < 1 cm, ● Wildtyp > 1 cm, ● Invertase apoplastisch, ● Saccharosesynthase antisense

ausgewählte Korrelationen in der Schale:

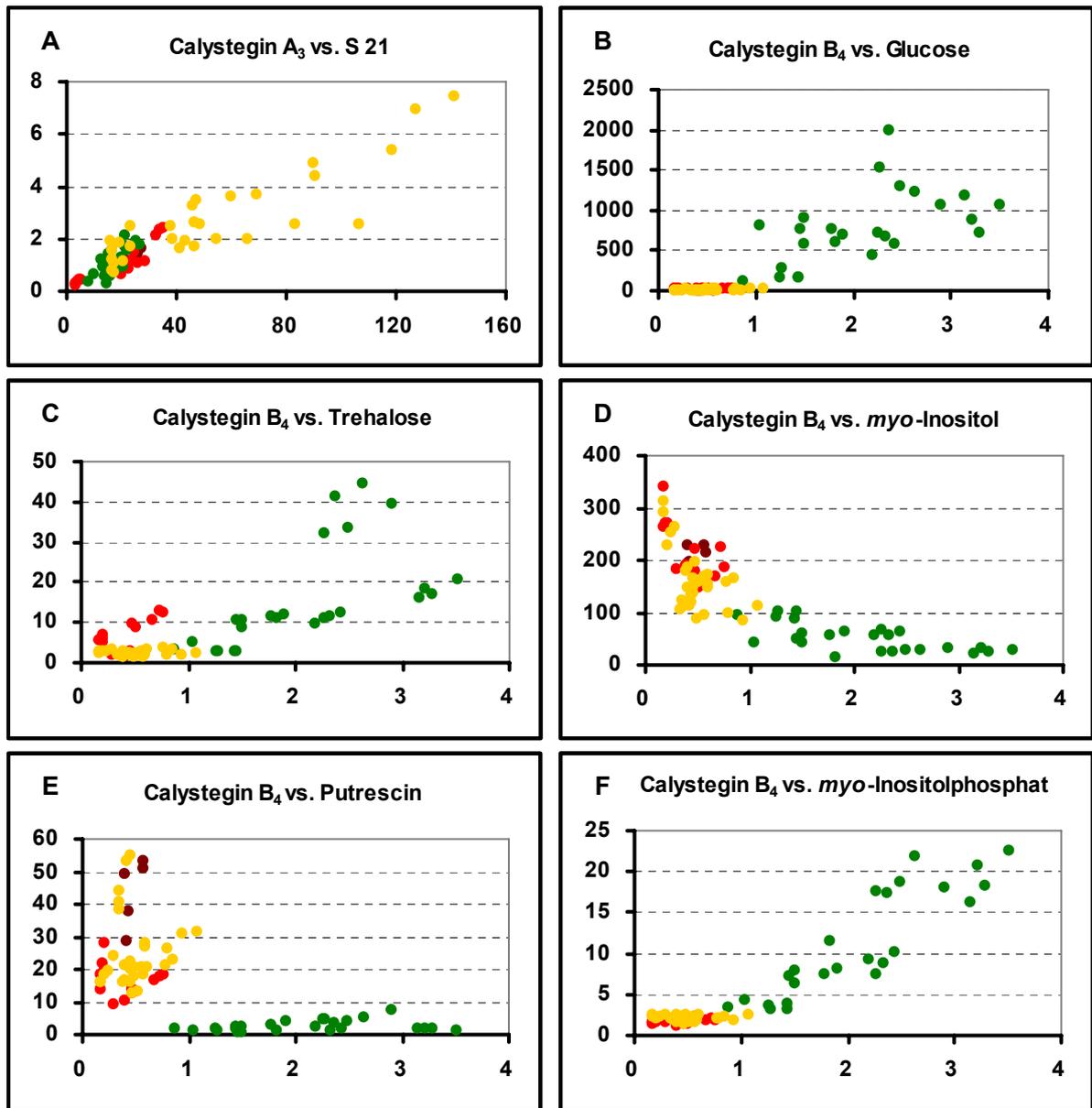


Abb. C-41: Ausgewählte Korrelationen zwischen Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten in der Schale.

In den Diagrammen sind die Resultate der Einzelmessungen für die jeweiligen Metabolite gegeneinander aufgetragen; (A) Calystegin A<sub>3</sub> vs. S 21, (B) Calystegin B<sub>4</sub> vs. Glucose, (C) Calystegin B<sub>4</sub> vs. Trehalose, (D) Calystegin B<sub>4</sub> vs. *myo*-Inositol, (E) Calystegin B<sub>4</sub> vs. Putrescin, (F) Calystegin B<sub>4</sub> vs. *myo*-Inositolphosphat; ● Wildtyp, ● Invertase apoplastisch, ● Invertase cytosolisch, ● Saccharosesynthase antisense

### C.3 Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese

Bei der gemeinsamen Analyse von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten wurden Korrelationen zwischen Calysteginen und Kohlenhydraten festgestellt. Allerdings konnte keine Aussage getroffen werden, ob Calystegine den Kohlenhydratstoffwechsel oder Kohlenhydrate die Calysteginbiosynthese beeinflussen. Auch indirekte Korrelationen ohne Kausalzusammenhang sind denkbar. In einem nächsten Experiment wurde die Wirkung der Kohlenhydrate auf die Calysteginbiosynthese an verschiedenen isolierten Kartoffelgeweben untersucht. Die in Tab. C-11 aufgelisteten Zucker wurden an Mark, Schale, Keime und an alte Blätter appliziert. Wasser diente als Negativkontrolle und Sorbitol als osmotische Kontrolle. Die genauen Kultivierungsbedingungen sind in Kapitel B.2.1.1.4 benannt.

Tab. C-11: An Kartoffelgewebe applizierte Kohlenhydrate.

Zucker	Konzentration	Zucker	Konzentration
Fructose	100 mM	Trehalose	100 mM
Glucose	100 mM	Raffinose	100 mM
Galactose	100 mM	Sorbitol	100 mM
Saccharose	100 mM	Wasser	

Die Calysteginakkumulation wurde in 1-2 mm Schale und in 1-2 cm langen Keimen analysiert. Die *trl-*, *trll-* und *pmt-*Transkriptakkumulation wurde im Mark, in 1-2 mm Schale, in 1 cm langen Keimen und in alten Blättern untersucht.

#### C.3.1 Calysteginakkumulation

##### C.3.1.1 Calysteginakkumulation in Keimen

Die Abb. C-42 zeigt die Ergebnisse für die Calysteginakkumulation in Keimen nach 48 h Kohlenhydratapplikation.

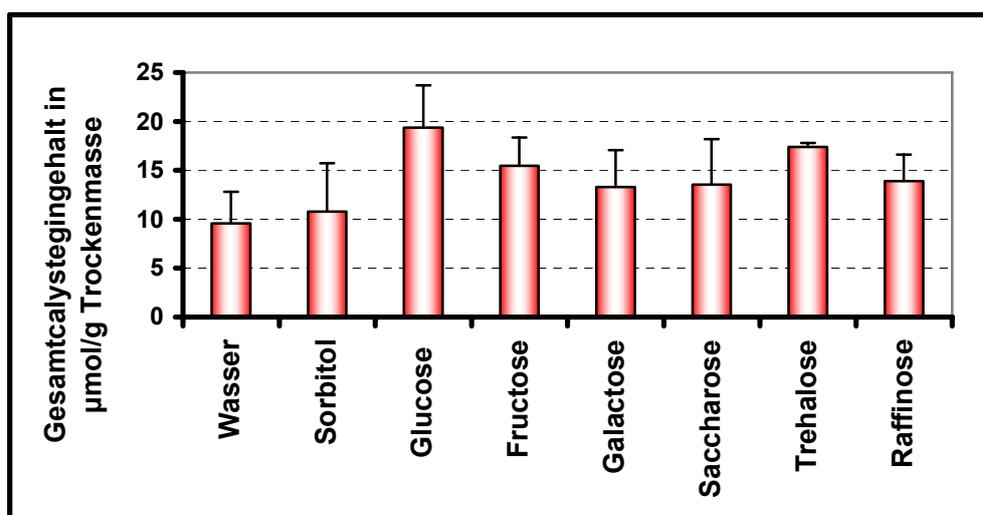


Abb. C-42: Gesamtcalysteginakkumulation in 1-2 cm langen Keimen nach 48 h 100 mM Kohlenhydratapplikation.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und Calystegin B<sub>2</sub> dar. Die Daten ergeben sich aus 4 unabhängigen Bestimmungen; Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben

Nach 48 h Fütterung wurde in der Negativkontrolle (Wasser) ein Gesamtcalystegingehalt von 10  $\mu\text{mol/g}$  TM ermittelt. Der Calystegin A<sub>3</sub>-Anteil betrug ca. 23%. In der osmotischen Kontrolle (Sorbitol) wurde ein ähnlicher Calystegingehalt gemessen. Nach Applikation von Kohlenhydraten wurde für jeden Zucker eine Steigerung in der Calysteginakkumulation erreicht, wobei nach Glucose- und Trehaloseapplikation die höchsten Calystegingehalte detektiert wurden. Der Calystegin A<sub>3</sub>-Anteil schwankte in allen Proben zwischen 18 und 20%. Um sicher zu gehen, dass keine Calystegine in die Lösung abgegeben wurden, wurde der Calystegingehalt in den Zuckerlösungen gemessen. Die höchsten Calysteginmengen mit 0,36 bzw. 0,42  $\mu\text{mol/g}$  TM wurden in die Glucose- bzw. Galactoselösung abgegeben und sind damit vernachlässigbar.

### C.3.1.2 Calysteginakkumulation in der Schale

Nach 48 h Inkubation wurde für die Wasserkontrolle ein Gesamtcalystegingehalt von 0,74  $\mu\text{mol/g}$  TM bestimmt. Der Calystegin A<sub>3</sub>-Anteil betrug ca. 61,5%. In der osmotischen Kontrolle (Sorbitol) wurden nur 0,54  $\mu\text{mol/g}$  TM Calystegine nachgewiesen.

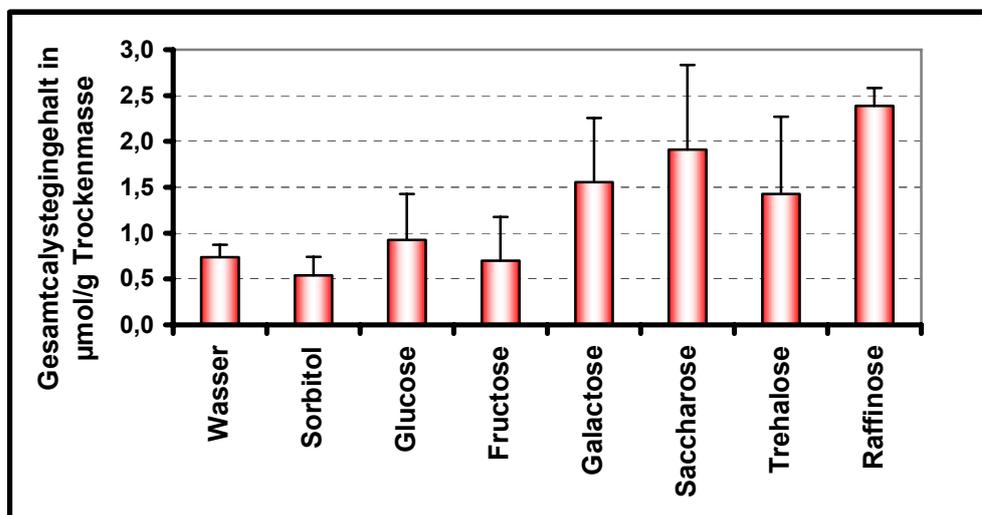


Abb. C-43: Gesamtcalysteginakkumulation in 1-2 mm Schale nach 48 h 100 mM Kohlenhydratapplikation.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und Calystegin B<sub>2</sub> dar; Die Daten ergeben sich aus 4 unabhängigen Bestimmungen; Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben

Nach Kohlenhydratapplikation wurde in der Schale für Galactose, Saccharose, Trehalose und Raffinose ein höherer Calystegingehalt festgestellt. Nach Fütterung von Raffinose wurde der dreifache Calystegingehalt im Vergleich zur Wasserkontrolle nachgewiesen. Für Glucose und Fructose wurden kaum Veränderungen im Calystegingehalt beobachtet. Abb. C-43 zeigt die Ergebnisse. Der Calystegin A<sub>3</sub>-Anteil lag für Monosaccharide und Sorbitol zwischen 53 und 60% und für Di- und Trisaccharide zwischen 48 und 51%. Bei der Untersuchung der Zuckerlösungen wurden nur sehr geringe Calysteginmengen festgestellt. Der höchste Wert wurde in der Glucoselösung mit 0,042  $\mu\text{mol/g}$  TM gemessen.

### C.3.2 Transkriptakkumulation

Die Transkriptakkumulation der *trl*, *trll* und *pmt* nach Kohlenhydratapplikation wurde in Keimen, im Mark, in der Schale und in alten Blättern analysiert. Die Ergebnisse ergeben sich jeweils aus Einzelanalysen. *pmt*-Transkript wurde auch nach Kohlenhydratapplikation in keinem

der vier Gewebe nachgewiesen. *trII*-Transkript war in der Schale und in Blättern sehr schwach repräsentiert (ohne Abbildung). In vorhergehenden Experimenten wurde in Blättern mehr *trII*-Transkript gefunden (C.1.4.2). Unterschiede in der *trII*-Expression nach Zuckerfütterung wurden in Blättern nicht festgestellt. Der Calystegingehalt nach Zuckerfütterung wurde in Blättern nicht analysiert. In Keimen wurde eine Erhöhung des *trII*-Transkriptes nach Trehalose- sowie Raffinosefütterung festgestellt. Das *trI*-Transkript wurde in allen vier Geweben detektiert. In Keimen und in der Schale wurden nach Zuckerapplikation meist geringere Transkriptmengen der *trI* nachgewiesen als in der Wasserkontrolle. In Blättern hingegen wurde eine Erhöhung des *trI*-Transkriptes nach Glucose- sowie Galactosefütterung erzielt. Im Mark war das *trI*-Transkript sehr schwach repräsentiert (ohne Abbildung). Die Abb. C-44 bis Abb. C-46 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Transkriptakkumulation.

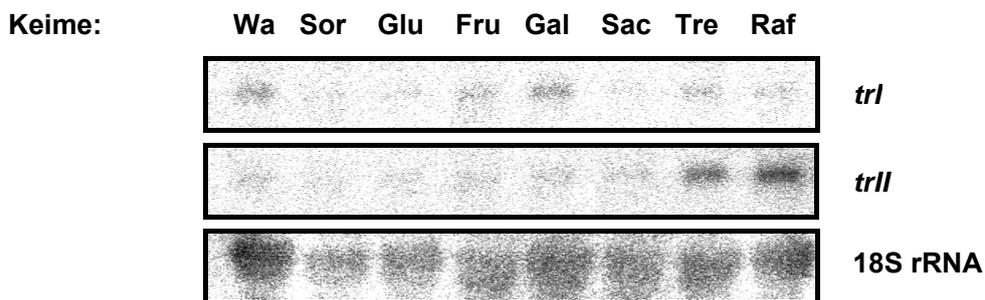


Abb. C-44: Transkriptnachweis der *trI* und *trII* in 1 cm Keimen nach Kohlenhydratapplikation durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; Zeile 1 zeigt die mRNA der *trI*; Zeile 2 zeigt die mRNA der *trII*; Zeile 3 zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: Wa: Wasser, Sor: Sorbitol, Glu: Glucose, Fru: Fructose, Gal: Galactose, Sac: Saccharose, Tre: Trehalose, Raf: Raffinose

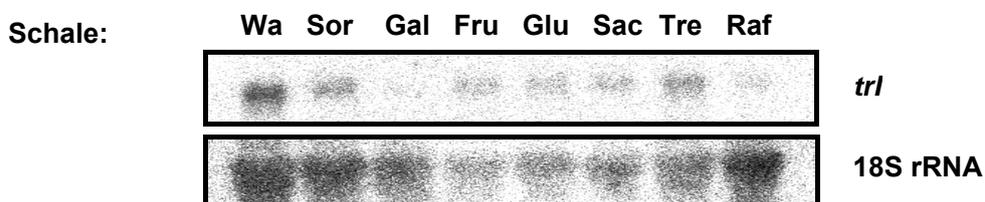


Abb. C-45: Transkriptnachweis der *trI* in 1-2 mm Schale nach Kohlenhydratapplikation durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; Zeile 1 zeigt die mRNA der *trI*; Zeile 2 zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: Wa: Wasser, Sor: Sorbitol, Gal: Galactose, Fru: Fructose, Glu: Glucose, Sac: Saccharose, Tre: Trehalose, Raf: Raffinose

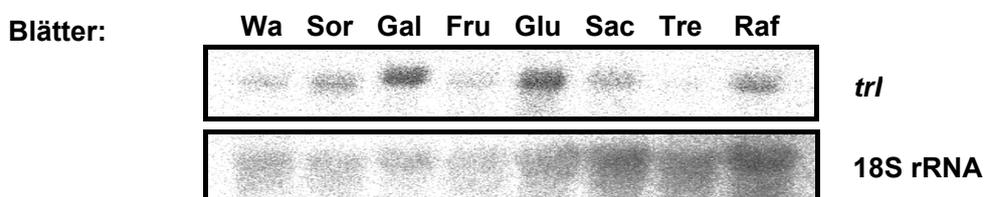


Abb. C-46: Transkriptnachweis der *trI* in alten Blättern nach Kohlenhydratapplikation durch Northern Blot.

Probenauftrag: 20 µg Gesamt-RNA; Zeile 1 zeigt die mRNA der *trI*; Zeile 2 zeigt die 18S rRNA als Ladekontrolle; Proben: Wa: Wasser, Sor: Sorbitol, Gal: Galactose, Fru: Fructose, Glu: Glucose, Sac: Saccharose, Tre: Trehalose, Raf: Raffinose

### C.3.3 Calystegine und Kältestress

Nach Trehalose- sowie Raffinoseapplikation wurden sowohl in der Schale als auch in Keimen mehr Calystegine gebildet. Zusätzlich wurde in Keimen die *trII*-Transkriptmenge erhöht. Trehalose und Raffinose spielen eine entscheidende Rolle in der Kältestressabwehr (Elbein et al., 2003; Pennycooke et al., 2003). In Kapitel C.1.5.1 wurden in der Schale von Wildtyp-Knollen nach 5monatiger Kältelagerung 34  $\mu\text{mol/g}$  TM Gesamtcalystegine bestimmt. Es wurde nun untersucht, ob diese Steigerung in der Calysteginakkumulation durch Kältestress ausgelöst wurde. Dazu wurden Wildtyp-Knollen bei 4°C und bei 25°C gelagert. Während der Lagerung keimten die bei 25°C gelagerten Kartoffeln im Gegensatz zu den bei 4°C gelagerten Knollen. Der Calystegingehalt wurde in der Schale am Lagerungstag 0, 83 und 132 (25°C) sowie am Tag 132 (4°C) bestimmt. Am Tag 132 (4°C und 25°C) wurde zusätzlich das Mark und der Gefäßring analysiert. Abb. C-47 zeigt die Ergebnisse.

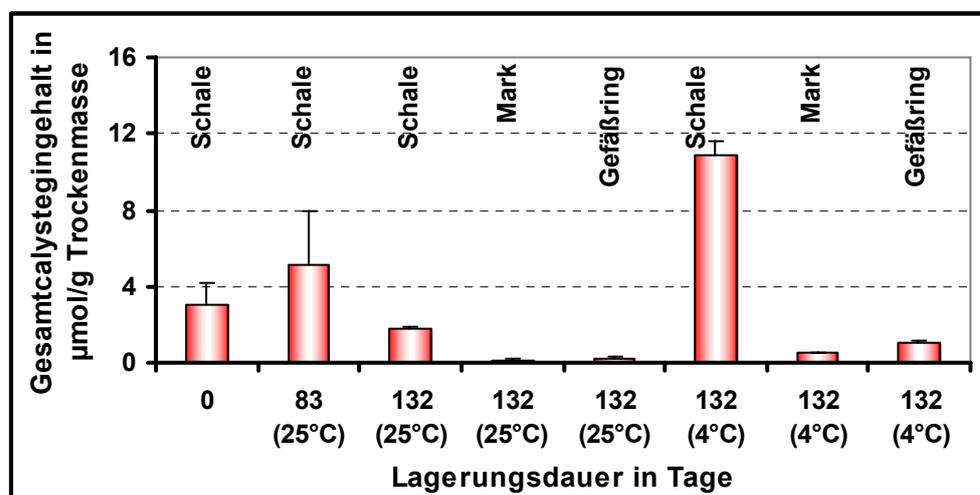


Abb. C-47: Gesamtcalysteginakkumulation in Wildtyp-Knollengewebe bei verschiedenen Lagerungstemperaturen.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar; Die Daten ergeben sich aus 2-4 unabhängigen Bestimmungen; Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Nach Kältelagerung akkumulierten am Tag 132 im Mark, im Gefäßring und in der Schale jeweils mehr Calystegine als am Tag 132 nach Lagerung bei 25°C. Der Calystegingehalt nach Kältelagerung war ebenfalls höher als am Tag 83 (25°C). Allerdings wurden auch nach Kältelagerung keine Calysteginkonzentrationen > 30  $\mu\text{mol/g}$  TM in der Schale erreicht, so dass der Kältestress nicht als alleiniger Grund für diesen hohen Calystegingehalt in der Schale zu sehen ist.

### C.4 Wirkung von Calysteginen auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels

Eine zweite wichtige Fragestellung, die sich aus der Korrelation von Calysteginen mit Stoffwechselmetaboliten ergab (C.2.3), war die mögliche Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Calystegine. Ein wichtiges Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels ist die UDPGlucose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9). Das Enzym katalysiert den Abbau von UDPGlucose zu Glucose-1-phosphat und UTP. Eine UDPGlucose-Pyrophosphorylase

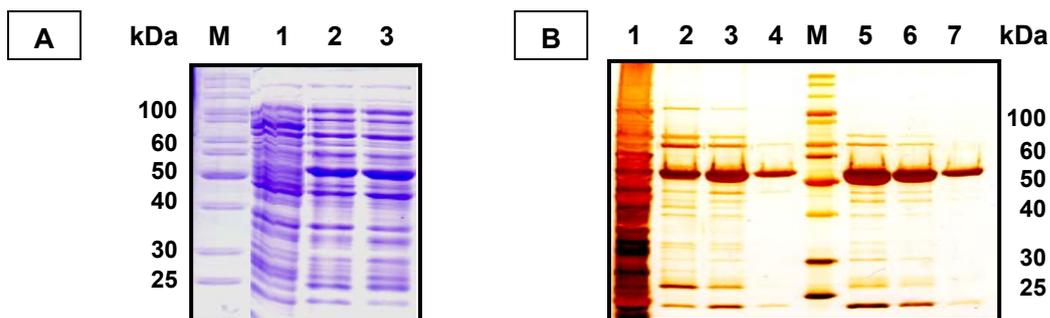
aus *Solanum tuberosum* L. wurde bereits kloniert und sequenziert (Katsube et al., 1990) bzw. nativ gereinigt und charakterisiert (Nakano et al., 1989).

Die UDPGlucose-Pyrophosphorylase aus *Solanum tuberosum* wurde kloniert, in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Anschließend wurde der  $K_m$ -Wert ermittelt und der Einfluss von Calystegin B<sub>2</sub> auf dieses Enzym untersucht.

#### **C.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung der UDPGlucose-Pyrophosphorylase**

Aus 1-2 mm Schale wurde Gesamt-RNA isoliert (B.2.2.2). Die mRNA wurde mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (B.2.2.4). Die cDNA der UDPGlucose-Pyrophosphorylase (1434 bp) wurde durch Standard-PCR (B.2.2.5.1) mit den in Kapitel B.1.4 angegebenen Primern amplifiziert und zur Expression mit den Schnittstellen *Nco*I und *Xho*I in den pET21d Expressionsvektor (Novagen) kloniert (B.2.2.6). Die Überexpression des Proteins erfolgte in *E. coli* (Stamm: BI21 Codon Plus<sup>®</sup> (DE3) -RP(Stratagene)) unter folgenden Bedingungen: Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C und 250 rpm.

Die Expression und Löslichkeit der UDPGlucose-Pyrophosphorylase wurde im SDS-PAGE (B.2.3.3) mit anschließender Coomassie-Färbung (B.2.3.3.1) überprüft (Abb. C-48).



**Abb. C-48: SDS-PAGE zur Überprüfung von Überexpression, Löslichkeit und Reinigungsgrad der UDPGlucose-Pyrophosphorylase.**

(A) Coomassiegefärbtes Proteingel; Proben: M: peqGOLD Protein-Marker II (Peqlab), 1: Kontrolle Leerplasmid (pET21d), 2: nicht induzierte Fraktion, 3: induzierte lösliche Fraktion des Bakterienlysates; (B) Silbergefärbtes Proteingel; Proben: 1: Bakterienlysate, 2-4: gereinigte Proteinfractionen der 1. Reinigung, M: peqGOLD Protein-Marker II (Peqlab), 5-7: gereinigte Proteinfractionen der 2. Reinigung (Streubühr 2005)

Die Proteinreinigung des Bakterienlysates erfolgte über Nickelaffinitätschromatographie, da das Enzym mit einem C-terminalen Histidin-Tag exprimiert wurde. Die Reinigung wurde zweimal, wie in Kapitel B.2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Abb. C-48 zeigt das Ergebnis der ersten und zweiten Reinigung. Die Fraktionen der zweiten Reinigung wurden aufkonzentriert, vereinigt und für weitere Untersuchungen verwendet (Streubühr 2005).

### C.4.2 Enzymaktivität und $K_m$ -Wert-Bestimmung

Die Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase wurde im Bakterienlysat und nach jeder Reinigungsstufe bestimmt (B.2.3.6). Folgende spezifische Aktivitäten wurden ermittelt:

Bakterienlysat:	0,772 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ Protein
1. Reinigung:	19,43 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ Protein
2. Reinigung:	50,79 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ Protein

Somit ergab sich nach der 2. Reinigung ein Reinigungsgrad von 65,8 im Vergleich zum Bakterienlysat (Streubühr 2005). Aus den vereinigten Fraktionen der 2. Reinigung wurde der  $K_m$ -Wert nach Michaelis-Menten (Michaelis und Menten, 1913) ermittelt. Substratkonzentrationen (UDPGlucose) wurden im Bereich von 0,03125 mM bis 2 mM eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach Lineweaver-Burk (Lineweaver und Burk, 1934) sowie nach Eadie-Hofstee (Eadie 1942; Hofstee 1952). Der  $K_m$ -Wert für die UDPGlucose-Pyrophosphorylase betrug 0,174 mM bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 615,12 nkat/mg Protein (Streubühr 2005).

### C.4.3 Calystegin B<sub>2</sub>-Einfluss auf die UDPGlucose-Pyrophosphorylase

Unter Verwendung des dreistufigen Assays (B.2.3.6.1) wurde getestet, ob Calystegin B<sub>2</sub> einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der UDPGlucose-Pyrophosphorylase hat. Calysteginkonzentrationen im Bereich von 0,25 mM bis 1,0 mM kamen zum Einsatz. Bei allen Calysteginkonzentrationen wurde eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet. Da an dem Enzymassay noch zwei weitere Enzyme, Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.49), beteiligt waren, konnte die Calysteginwirkung nicht eindeutig der UDPGlucose-Pyrophosphorylase zugesprochen werden (Streubühr 2005).

Phosphoglucomutase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase wurden daraufhin auf die Hemmung durch Calystegin B<sub>2</sub> untersucht (B.2.3.7, B.2.3.8). Während Calystegin B<sub>2</sub> auf die Glucose-6-phosphatdehydrogenase keine Wirkung zeigte, wurde eine Hemmung der Phosphoglucomutase durch Calystegin B<sub>2</sub> (Abb. C-49) beobachtet (Streubühr 2005). Zur Untersuchung der Hemmbarkeit der UDPGlucose-Pyrophosphorylase durch Calystegin B<sub>2</sub> wurde ein HPLC-Verfahren entwickelt (B.2.3.6.3). Mit dieser Methode wurde kein Einfluss von Calystegin B<sub>2</sub> auf die UDPGlucose-Pyrophosphorylase festgestellt (Streubühr 2005).

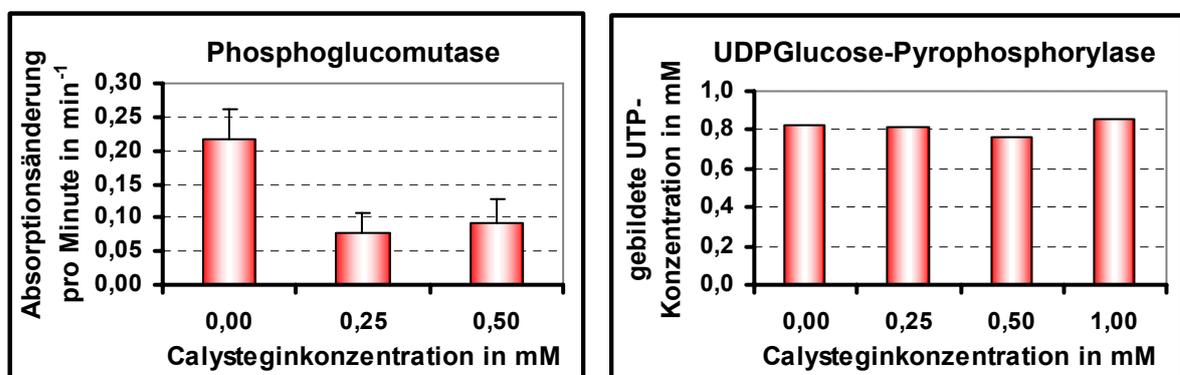


Abb. C-49: Beeinflussung der Enzymaktivität der Phosphoglucomutase und der UDPGlucose-Pyrophosphorylase durch Calystegin B<sub>2</sub>.

Die Daten für die Phosphoglucomutase ergeben sich aus 4-10 Einzelmessungen; Die Daten für die UDPGlucose-Pyrophosphorylase sind Einzelbestimmungen, die aber durch weitere Messungen belegt wurden (Streubühr 2005).

#### **C.4.4 Kinetik der Phosphoglucomutase ( $K_m$ -und $K_i$ -Wert-Bestimmung)**

Der  $K_m$ -Wert und der  $K_i$ -Wert für Calystegin B<sub>2</sub> wurde an der Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2) aus *Oryctolagus cuniculus* gemessen. Es wurden jeweils Substratkonzentrationen im Bereich von 0,0625 mM bis 12 mM sowie eine Calysteginkonzentration von 0,25 mM getestet. Bei beiden Bestimmungen wurde keine Substratsättigungskurve nach Michaelis-Menten erhalten (Streubühr 2005). Eine Berechnung des  $K_m$ -Wertes und des  $K_i$ -Wertes nach Michaelis-Menten konnte deshalb nicht erfolgen. Für die Bestimmung dieser Werte sind weitere Untersuchungen nötig.

## D Diskussion

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu einer möglichen physiologischen Funktion von Calysteginen im Kohlenhydratstoffwechsel durchgeführt. Calystegine haben aufgrund ihrer polyhydroxylierten Struktur Ähnlichkeit zu Zuckermolekülen und hemmen Glycosidasen. Ein ideales Untersuchungsobjekt stellte *Solanum tuberosum* L. dar. In der Kartoffel ist sowohl der Kohlenhydratstoffwechsel (Fernie et al., 2002b; Geigenberger 2003; Geigenberger et al., 2004) als auch die Calysteginbiosynthese (Keiner und Dräger, 2000; Keiner et al., 2002; Stenzel et al., 2006) sehr gut untersucht. In transgenen Kartoffelknollen mit modifiziertem Saccharoseabbau wurde die Calysteginbiosynthese, aber auch der Primärstoffwechsel analysiert. Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase sowie Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase sind aufgrund der erhöhten Invertaseaktivität durch stark verringerte Saccharosegehalte und stark erhöhte Glucose- und Fructosegehalte charakterisiert. Die Stärkeakkumulation ist geringfügig reduziert (Sonnewald et al., 1997). Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthase zeigen bei fast unverändertem Saccharosegehalt eine starke Akkumulation von reduzierenden Zuckern sowie eine Hemmung der Stärkeakkumulation (Zrenner et al., 1995).

### **D.1 Calysteginbiosynthese in transgenen Kartoffelknollen und Pflanzen**

#### **D.1.1 Keimungsverhalten und Trockenmasseanteil**

In transgenen Kartoffelknollen wurde ein verändertes Keimungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (C.1.1.3). Die transformationsstärksten Linien mit supprimierter Saccharosesynthase keimten unter den gegebenen Lagerungsbedingungen verzögert, während Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase nicht keimten. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase sind in der Literatur allerdings als zeitig keimend beschrieben worden (Fernie und Willmitzer, 2001). Es sind viele Faktoren bekannt, die die Länge der Dormanzphase bzw. den Keimstart beeinflussen. Zum Beispiel spielen Umweltfaktoren (Temperatur, Photoperiode) und der Genotyp eine wichtige Rolle (Fernie und Willmitzer, 2001; Sonnewald 2001). Die Kartoffeln wurden 3 Monate kühl und 1 Woche kalt gelagert (C.1). Durch Kältelagerung wird Stärke in reduzierende Zucker umgewandelt (Fernie und Willmitzer, 2001; Sonnewald 2001). So ist es denkbar, dass durch die Kältelagerung und die zusätzliche Überexpression der cytosolischen Invertase eine starke Akkumulation von reduzierenden Zuckern die Keimung verhinderten. Eine Lagerung der Knollen über 20°C hätte möglicherweise die Dormanzphase verkürzt (Carrera et al., 2000) bzw. das Keimen dieser Kartoffeln ermöglicht. Auch Phytohormone wurden als mögliche Regulatoren des Keimungsverhaltens diskutiert. Hierbei wurden Gibberelline (Carrera et al., 2000) und Cytokinine (Galis et al., 1995) als Induktoren des Keimstarts genannt, während Abscisinsäure und Ethylen (Claassens und Vreugdenhil, 2000) die Dormanzphase verlängerten. Eine Bestimmung dieser Hormone könnte Aufschluss über das Keimungsverhalten der transgenen Kartoffeln geben. Weiterhin wurde das Keimungs- und Dormanzverhalten im Zusammenhang mit Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel diskutiert. Ein wichtiger Cofaktor im Saccharosemetabolismus ist Pyrophosphat (Sonnewald 2001). Die knollenspezifische Expression einer bakteriellen Pyrophosphatase führte zu einer Beschleunigung der Keimung (Farre et al., 2001), während die konstitutive Expression der Pyrophosphatase in einer verzögerten Keimung resultierte (Hajirezaei und Sonnewald, 1999). Saccharose, Stärke und Hexosen wurden hierbei als wichtige Kohlenhydrate im

Keimungsprozess diskutiert (Hajirezaei und Sonnewald, 1999). Somit könnten die veränderten Gehalte dieser Kohlenhydrate in Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese die Ursache für das verzögerte Keimen der transformationsstärksten Linien sein. Ein weiteres Beispiel für verzögertes Keimen sind Kartoffeln mit überexprimierter Phosphoglucomutase (Lytovchenko et al., 2005), während bei Kartoffeln mit supprimierter cytosolischer Stärke-Phosphorylase die Keimung stark erhöht ist (Duwenig et al., 1997).

Der Trockenmasseanteil der transgenen Kartoffeln war in allen Linien geringer als im Wildtyp (C.1.1.4). Eine typische Wildtyp-Kartoffelknolle besteht aus ca. 75-80% Wasser und 16-20% Stärke (Zrenner et al., 1995). Der geringere Trockenmasseanteil wird mit der verringerten Stärkeakkumulation in den transgenen Linien erklärt (Zrenner et al., 1995; Sonnewald et al., 1997). Der höhere Wassergehalt in den Knollen könnte mit der starken Akkumulation von Hexosen zusammenhängen (Zrenner et al., 1995). Während der Lagerung nahm besonders in Linien mit cytosolisch überexprimierter Invertase der Trockenmasseanteil ab. Für diese Linien wurde eine erhöhte Glycolyse- und Respirationsrate beschrieben (Junker et al., 2004).

## **D.1.2 Calysteginakkumulation**

### **D.1.2.1 *Solanum tuberosum* - Wildtyp**

Die Calysteginakkumulation in *S. tuberosum* wurde schon mehrfach beschrieben (Nash et al., 1993; Asano et al., 1997b; Keiner und Dräger, 2000). Um die Calysteginakkumulation in transgenen Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen diskutieren zu können, ist es wichtig, die Ergebnisse für den Wildtyp einzuordnen. Die Calysteginakkumulation wurde in den wichtigsten Knollen- und Pflanzengeweben bestimmt (B.1.1). Die höchsten Calystegingehalte für die Kartoffelknolle akkumulierten in der Schale (C.1.2.1), in dormanten Augen sowie in Keimen (C.1.3.1). Diese Beobachtungen wurden auch in der Literatur beschrieben (Dräger et al., 1995; Keiner und Dräger, 2000). Die Unterschiede in der Calysteginakkumulation zwischen den gewählten Knollengrößen (C.1.1.2) waren geringfügig. Die Kartoffeln wurden ursprünglich in zwei Größen eingeteilt, da durch apoplastische Überexpression der Invertase größere und durch cytosolische Überexpression der Invertase kleinere Knollen im Vergleich zum Wildtyp resultierten. (Sonnewald et al., 1997; Tauberger et al., 1999). Knollen unterschiedlicher Größe unterscheiden sich außerdem signifikant in ihrem Gehalt an löslichen Zuckern (De Wilde et al., 2006).

Während der Lagerung der Kartoffelknollen stieg der Calystegingehalt in der Schale leicht an. In der Keimungsphase sank der Calystegingehalt allerdings innerhalb einer Woche stark ab (C.1.3.1). In einem weiteren Versuch wurden nach 5monatiger Kältelagerung Calysteginkonzentrationen in der Schale erreicht, die bisher nur in Keimen gefunden wurden (C.1.5.1). Von Keiner und Dräger wurden 5 Monate nach der Ernte in der Schale ebenfalls höhere Calystegingehalte als direkt nach der Ernte nachgewiesen (Keiner und Dräger, 2000). Ein starker Abfall der Calysteginkonzentration nach 8 Monaten wurde nicht beobachtet. Die Lagerung der Knollen erfolgte hier durchgängig bei 4°C.

In Wildtyp-Pflanzen akkumulierten in dieser Untersuchung die höchsten Calysteginmengen in Wurzeln und Stolonen von jungen Pflanzen (C.1.4.1). Von Keiner und Dräger wurden die höchsten Calystegingehalte in Blüten und in Wurzeln beobachtet (Keiner und Dräger, 2000). Hohe Calysteginkonzentrationen in Wurzeln im Vergleich zu anderen Pflanzengeweben wurden in jungen Wurzeln von *C. sepium* festgestellt (Scholl et al., 2001b).

In *S. tuberosum* akkumulieren neben den Calysteginen die Glycoalkaloide Solanin und Chaconin (Friedman et al., 2003). Die höchsten Glycoalkaloidgehalte wurden in jungen Blättern, in Blüten und in Keimen gefunden (Friedman und McDonald, 1997). Im Gegensatz zu anderen Pflanzengeweiben verhalten sich die Calystegingehalte in der Knolle parallel zu den Glycoalkaloiden (Keiner und Dräger, 2000; Friedman et al., 2003). Zwischen einzelnen Kartoffelsorten variieren neben den Calystegingehalten auch die Glycoalkaloidgehalte. Dadurch variiert zusätzlich das Glycoalkaloid-Calystegin-Verhältnis. Daraus schlossen Friedman und Mitarbeiter eine unterschiedliche genetische Kontrolle der Biosynthese von beiden Alkaloiden (Friedman et al., 2003). Neben den genetischen Faktoren spielen für die Akkumulation von Glycoalkaloiden in der Kartoffelknolle auch viele Umweltfaktoren (Klima, Licht, Lagerungsbedingungen, mechanische Verletzung) eine Rolle (Friedman und McDonald, 1997). Wichtige Faktoren für die Calysteginakkumulation in Knollen sind die Lagerungsbedingungen (Temperatur, Lagerungsdauer; C.1.3.1). Sowohl von Keiner und Dräger als auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Calystegingehalt je nach Lagerungsdauer und -temperatur variiert (Keiner und Dräger, 2000). Da während der Lagerung in der Kälte Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel auftreten und verstärkt reduzierende Zucker akkumulieren (Sonnewald 2001), ist ein Einfluss der Kohlenhydrate auf die Calysteginakkumulation denkbar.

#### D.1.2.2 Calystegine und veränderter Kohlenhydratstoffwechsel

In transgenen Kartoffelknollen wurden veränderte Calystegingehalte im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Während in den Linien mit überexprimierter Invertase (U-IN1 (33), U-IN2 (30)) in der Schale nur leicht erhöhte Calystegingehalte im Vergleich zum Wildtyp gefunden wurden, war der Calystegingehalt in der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese 3fach erhöht (C.1.2.1). Auch in Keimen der Linie RSSa (112) war der höchste Calystegingehalt zu finden (C.1.3.1.3). Die Linie RSSa (112) ist durch eine starke Akkumulation von löslichen Zuckern gekennzeichnet. Der Saccharosegehalt ist 1,6fach erhöht und der Glucose- und Fructosegehalt sogar ca. 200fach erhöht (Zrenner et al., 1995). In Kartoffeln mit überexprimierter Invertase ist nur der Glucosegehalt erhöht, während der Saccharosegehalt verringert ist (Sonnewald et al., 1997). In Kooperation mit Herrn Thomas Reinhold (AG Neuhaus, FB Biologie, TU Kaiserslautern) wurden Kartoffeln mit gehemmter ATP/ADP-Transporteraktivität in Plastiden (Tjaden et al., 1998) auf ihren Calystegingehalt untersucht. Die Daten werden derzeit vervollständigt. Es ist bereits offensichtlich, dass in den Schalen der Kartoffeln der 5-6fache Calystegingehalt im Vergleich zum Wildtyp akkumuliert (G.1.2.5). Diese Kartoffeln weisen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls einen erhöhten Gehalt an löslichen Zuckern auf (Tjaden et al., 1998). Analog zu der Linie RSSa (112) ist hier der Saccharosegehalt bis zu 2,5fach erhöht und der Glucose- bzw. Fructosegehalt 10fach bzw. 4fach erhöht (Geigenberger et al., 2001). Aus diesen Zusammenhängen lässt sich schlussfolgern, dass Glucose eine entscheidende Rolle in der Erhöhung der Calysteginakkumulation spielt. Bei einer zusätzlichen Erhöhung der Saccharosekonzentration akkumulieren Calystegine noch stärker. Eine Erhöhung der Calysteginakkumulation durch Saccharoseapplikation wurde bereits für *A. belladonna* Wurzelkulturen gezeigt. Für Glucose wurde dieser Effekt nicht beobachtet (Rothe et al., 2001). Weitere Beispiele für eine Stimulation der Sekundärstoffakkumulation durch Saccharose bekräftigen den Einfluss von Saccharose auf die erhöhte Calysteginakkumulation in Kartoffelknollen. So wurde durch Saccharoseapplikation die Akkumulation von Indolalkaloiden in *Catharanthus roseus* Zellen (Merillon et al., 1984; Zhao et al., 2001), die Akkumulation von

Rosmarinsäure in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* (Gertlowski und Petersen, 1993) und die Anthocyaninbildung in *Vitis vinifera* Suspensionskulturen (Larronde et al., 1998) gesteigert.

Während der Lagerung zeigten Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase und Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese einen dem Wildtyp vergleichbaren Verlauf der Calysteginakkumulation auf einem anderen Konzentrationsniveau. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase verhielten sich anders (C.1.3.1.1). Hier nahm der Calystegingehalt nach der Ernte kontinuierlich ab. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase unterscheiden sich von den anderen transgenen Linien und dem Wildtyp durch ihre hohe metabolische Aktivität (Sonnewald et al., 1997; Trethewey et al., 1998; Hajirezaei et al., 2000). Möglicherweise gehört auch der verringerte Calystegingehalt zu den pleiotropen Effekten nach cytosolischer Überexpression der Invertase (Junker et al., 2004).

Untersuchungen an Tabakpflanzen mit apoplastisch bzw. cytosolisch überexprimierter Invertase zeigten vergleichbare Ergebnisse in der Sekundärstoffakkumulation. Während in Pflanzen mit apoplastisch überexprimierter Invertase die Phenylpropanbildung induziert wurde, zeigten Tabakpflanzen mit cytosolisch überexprimierter Invertase signifikant erniedrigte Phenylpropangehalte (Baumert et al., 2001).

In den Pflanzen von den transgenen Kartoffellinien wurden die größten Unterschiede im Calystegingehalt in jungen Wurzeln festgestellt. In Wurzeln der Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase ist der Calystegingehalt 7fach und in Wurzeln der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese 5fach erhöht. Die Überexpression der Invertase erfolgte jeweils mit dem knollenspezifischen Klasse I Patatin Promotor (B33). Dieser Promotor erlaubt eine 100-1000fach höhere Genexpression in Knollen im Vergleich zu Blättern, Stängeln und Wurzeln (Rocha-Sosa et al., 1989). Demnach ist die Überexpression der Invertase in der Pflanze weitaus schwächer als in der Knolle. In *S. tuberosum* wurden zwei Klassen von Saccharosesynthese-Genen (*Sus3* und *Sus4*) identifiziert. Zur Suppression der Saccharosesynthese wurde das *Sus4*-Gen unter Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotor verwendet. Das *Sus4*-Gen wird vor allem in Kartoffelknollen exprimiert. Die Expression in Wurzeln und Stängeln ist weitaus geringer (Fu und Park, 1995; Zrenner et al., 1995). In der transformationsstärksten Linie RSSa (112) sind nur geringe Änderungen in der Aktivität der saccharoseabbauenden Enzyme und in den Zuckergehalten in Wurzeln beobachtet worden (Biemelt et al., 1999). Somit reichen in Wurzeln möglicherweise geringe Änderungen im Kohlenhydratstoffwechsel aus, um den Calystegingehalt zu erhöhen. Weiterhin kann sich eine Änderung des Kohlenhydratstoffwechsels in der Knolle auch auf den Metabolismus in Wurzeln auswirken.

### **D.1.3 Expression der Biosyntheseenzyme**

Wichtige Biosyntheseenzyme in der Tropanalkaloidbiosynthese sind die Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT), die am Verzweigungspunkt zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel steht, und die Tropinonreduktasen I und II (TRI und TRII), die am Verzweigungspunkt zwischen Tropanalkaloid- und Nortropanalkaloidbiosynthese wirken. Um die Regulation der Biosynthese zu verstehen, ist es wichtig die Expression und die Lokalisation der Biosyntheseenzyme zu betrachten. PMT, TRI und TRII aus *S. tuberosum* wurden bereits kloniert, exprimiert und charakterisiert (Keiner et al., 2002; Kaiser et al., 2006; Stenzel et al., 2006).

### D.1.3.1 Putrescin-*N*-methyltransferase

Die Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT) ist das erste spezifische Enzym der Tropanalkaloidbiosynthese. *pmt*-Transkript wurde ausschließlich in Wurzeln detektiert (C.1.4.2). Für *S. tuberosum* wurde die Lokalisation von *pmt*-Transkript auch in keimenden Augen sowie in 1-3 mm Keimen beschrieben (Stenzel et al., 2006). Keimende Augen und 1-3 mm Keime konnten aufgrund der begrenzten Anzahl von transgenen Kartoffeln (B.1.1) nicht in die Transkriptanalysen einbezogen werden. Die Expression der PMT in Wurzeln wurde bereits für *N. tabacum* (Hibi et al., 1994) und für *A. belladonna* (Suzuki et al., 1999a) beschrieben. PMT-Aktivität wurde ebenfalls in Wurzeln von verschiedenen Solanaceen gemessen (Hibi et al., 1992). Die PMT ist in Wurzeln nicht während der gesamten Kultivierungsperiode exprimiert. Die Expression wurde nur in jungen Wurzeln von 2 Monate alten Pflanzen und nicht in Wurzeln von 5 Monate alten Pflanzen nachgewiesen (C.1.4.2). Auch Stenzel und Mitarbeiter zeigten die Expression der PMT nur in einem kurzen Zeitraum in jungen Keimen (Stenzel et al., 2006). Ein weiteres Beispiel für die kurzzeitige Expression der PMT wurde in Blättern von *N. tabacum* nach Verletzung festgestellt (Sachan und Falcone, 2002). In jungen Kartoffelwurzeln wurden ebenfalls hohe Calystegingehalte beobachtet, während in älteren Wurzeln nur sehr geringe Calysteginmengen verblieben. PMT-Expression wurde auch in keimenden Augen festgestellt (Stenzel et al., 2006), wo ebenfalls hohe Calysteginmengen akkumulieren (Keiner und Dräger, 2000). Somit scheint die PMT limitierend für die Calysteginbiosynthese zu sein.

Untersuchungen zur Lokalisation von PMT-Protein wurden aufgrund fehlender Antikörper nicht durchgeführt. PMT-Aktivität wurde ebenfalls nicht analysiert. Diese Untersuchungen könnten weiteren Aufschluss über die Rolle der PMT geben.

### D.1.3.2 Tropinonreduktase II

Die Tropinonreduktase II (TRII) ist das erste spezifische Enzym der Calysteginbiosynthese (Dräger 2006). Transkript und Protein der TRII wurde vor allem in Pflanzengewebe und in Keimen nachgewiesen (C.1.3.2.1, C.1.4.2, C.1.4.3), wobei nicht in jedem Gewebe bei positivem Transkriptnachweis Protein detektiert wurde. Es ist denkbar, dass in einzelnen Geweben sehr geringe TRII-Proteinkonzentrationen enthalten sind, die im Western Blot nicht erfassbar waren. Die Nachweisgrenze der TRII für gereinigte Antikörper betrug 100 µg/l (Kaiser et al., 2006). TRII-Aktivität in Form von Tropinonumsatz zu Pseudotropin wurde in allen Pflanzengewebe sowie in Keimen beobachtet (C.1.3.3, C.1.4.4), so dass auch TRII-Protein im Gewebe vorhanden sein müsste. Die Enzymaktivität der TRII konnte nicht mit einem photometrischen Assay bestimmt werden. Der Gehalt an Polyphenolen (z. B. Chlorogensäure) in *S. tuberosum* (Friedman 2004) wird als mögliche Ursache diskutiert (Keiner 2001). Trotz des geringen TRII-Proteingehaltes wurde je nach Gewebe ein hoher Tropinonumsatz zu Pseudotropin beobachtet. Für die TRII wurde eine sehr hohe katalytische Aktivität ( $k_{\text{cat}}$  9,4 s<sup>-1</sup>) ermittelt (Kaiser et al., 2006), so dass geringe TRII-Proteinkonzentrationen im Gewebe ausreichen, um Tropinon zu metabolisieren.

Die TRII-Expression in Wurzeln, in Stolonen und in Keimen aus vorhergehenden Arbeiten an *S. tuberosum* wurde bestätigt (Keiner et al., 2002; Kaiser et al., 2006). Hohe TRII-Expressionen in Wurzeln wurden auch für *H. niger*, *D. stramonium* und *A. belladonna* beobachtet, geringere Expressionen wurden in oberirdischen Pflanzenorganen detektiert (Hashimoto et al., 1992; Nakajima et al., 1999). Eine auffällige Beobachtung wurde für TRII-Protein in alten Blättern

gemacht. Hier wurde im Western Blot ein Signal in der Größe des Dimers (56 kDa) erhalten. Möglicherweise führten posttranslationale Veränderungen zu kovalenten Bindungen zwischen den Proteinuntereinheiten, die durch reduzierende Reagenzien nicht spaltbar waren.

Analog zur PMT wurde auch die TRII in Wurzeln nicht über die gesamte Kultivierungsperiode exprimiert (C.1.4.2). Die TRII wurde nur in Wurzeln von 2 Monate alten Pflanzen aber nicht in Wurzeln von 5 Monate alten Pflanzen gefunden. Die TRII ist damit auch nur in einem bestimmten Zeitfenster exprimiert und korreliert ähnlich wie die PMT mit der Calysteginakkumulation. Diese Korrelation wurde auch in 10 mm Keimen beobachtet (Keiner und Dräger, 2000; Keiner et al., 2002).

In Kartoffelknollen wurde die TRII nur in Form des Transkriptes in der Schale während der Lagerung gefunden (C.1.3.2.1). Ein geringer Umsatz von Tropinon zu Pseudotropin wurde in der Schale von Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase nach Kältelagerung beobachtet (C.1.5.4). Dieses Ergebnis bestätigt die Überlegung der kurzzeitigen TRII-Expression. Weiterhin lässt sich hieraus ableiten, dass die Calysteginbiosynthese in Kartoffelknollen nicht sehr aktiv ist. Während der Lagerung stieg der Calystegingehalt genau in dem Zeitraum der TRII-Expression auch nur leicht an. Für die hohe Calysteginakkumulation in der Schale könnten somit noch andere Prozesse, z. B. Transport von Metaboliten oder Calysteginen, eine Rolle spielen (D.1.4.1).

### D.1.3.3 Tropinonreduktase I

Die Tropinonreduktase I (TRI) ist an der Hyoscyamin- und Scopolaminbildung beteiligt. In tropanalkaloidhaltigen Pflanzen ist die TRI hauptsächlich in Wurzeln lokalisiert (Hashimoto et al., 1992). Tropanalkaloide, die wie Hyoscyamin und Scopolamin Tropin enthalten, wurden in *S. tuberosum* nicht detektiert (Keiner und Dräger, 2000). Auch andere Tropinester wurden für *S. tuberosum* nicht beschrieben.

Transkript der TRI wurde in allen Pflanzengewebe sowie in Keimen detektiert, während TRI-Protein nur in Blüten und Stolonen nachgewiesen wurde (C.1.3.2.2, C.1.4.2, C.1.4.3). Auch hier könnte der TRI-Proteingehalt in einigen Geweben sehr gering sein, so dass ein Nachweis im Western Blot bei einer Nachweisgrenze des TRI-Antikörpers von 65 µg/l (Kaiser et al., 2006) nicht möglich war. In Pflanzengewebe sowie in Keimen wurde keine TRI-Aktivität beobachtet. Auch wurde für das Substrat Tropinon eine wesentlich höhere Affinität zur TRII ( $K_m$ -Wert für *S. tuberosum*: 33 µM) aus verschiedenen Solanaceen beobachtet im Vergleich zur TRI ( $K_m$ -Wert für *S. tuberosum*: 188 µM) (Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994; Kaiser et al., 2006). Dies könnte die fehlende TRI-Aktivität in Pflanzengewebe bei den Experimenten dieser Arbeit erklären. Nur nach Applikation von höheren Tropinonkonzentrationen (5 mM) wurde auch in Wurzeln und Stolonen Tropin detektiert (Kaiser et al., 2006).

Für die PMT und die TRII wurde die Expression in jungen Wurzeln nachgewiesen. Die TRI hingegen wurde erst in Wurzeln von 5 Monate alten Pflanzen exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die PMT und die TRII nicht mehr exprimiert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die TRI erst in Wurzeln aktiv wird, wenn die Calysteginbiosynthese weitgehend abgeschlossen ist. Geringe Calysteginkonzentrationen in Wurzeln von 5 Monate alten Pflanzen könnten diese Hypothese kräftigen. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Pflanze *C. sepium*, die ebenfalls keine klassischen Tropanalkaloide enthält, gemacht. Dort wurde die Tropinbildung zeitlich verzögert zur Pseudotropinbildung beobachtet (Sichhart 2003).

Relativ hohe Transkript- und Proteingehalte der TRI wurden in Knollengewebe bestimmt (C.1.2.2, C.1.2.3, C.1.3.2.2), aber die TRI-Aktivität in Knollengewebe ist im Vergleich zur TRII-Aktivität in Pflanzen-gewebe geringer. Für die TRI wurde *in vitro* nur eine sehr geringe katalytische Aktivität ermittelt ( $k_{\text{cat}} 15 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) (Kaiser et al., 2006). Dieser Wert erklärt die geringe TRI-Aktivität im Gewebe bei hohem Proteingehalt. Da Tropin in keinem Gewebe gefunden wurde, stellt sich die Frage nach der physiologischen Rolle der TRI *in vivo*. Die Tropinonreduktion zu Tropin könnte *in vitro* eine Nebenreaktion darstellen (Kaiser et al., 2006). Die physiologische Bedeutung der TRI in *S. tuberosum* bleibt bislang unbekannt.

#### D.1.3.4 Biosyntheseenzyme und veränderter Kohlenhydratstoffwechsel

In transgenen Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen wurden veränderte Expressionsstärken der Biosyntheseenzyme PMT, TRI und TRII beobachtet (C.1.2.2, C.1.3.2, C.1.4.2, C.1.5.2). Während *pmt*-Transkript in Wurzeln von transgenen Pflanzen meist erniedrigt war, wurden für das *trII*-Transkript unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Je nach Alter bzw. Generation der Pflanze wurden für die transformationsstärksten Linien U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase und RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese höhere oder geringere Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp detektiert (Abb. C-17 bis Abb. C-20). In Keimen wurde für die Linie U-IN1 (33) ein stärkeres *trII*-Transkript aber für die Linie RSSa (112) ein schwächeres *trII*-Transkript im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Die stärksten *trII*-Transkripte wurden in der Schale der transformationsstärksten Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase nachgewiesen (Abb. C-14).

Es ist denkbar, dass die Genexpression der *pmt*, *trI* und *trII* durch Zucker moduliert wird. Veränderte Genexpressionen in Pflanzen als Reaktion auf einen veränderten Kohlenhydratstoffwechsel wurden bereits beschrieben. Dabei können Gene induziert aber auch unterdrückt werden (Koch 1996). Zu den Genen, die positiv durch Zucker beeinflusst werden, zählen Gene aus Sekundärstoffwechselwegen (Koch 1996). So wurde für eine *Arabidopsis* Mutante (*pho3*), die hohe Konzentrationen Saccharose und andere Zucker akkumuliert, eine stark erhöhte Expression von Genen der Anthocyaninbiosynthese beobachtet (Lloyd und Zakhleniuk, 2004). In späteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Induktion der Anthocyaninbiosynthese saccharosespezifisch erfolgt (Solfanelli et al., 2006). Von einem alleinigen Einfluss der Saccharose auf die Tropanalkaloidbiosynthese kann allerdings nicht ausgegangen werden, da Saccharose in Kartoffeln mit überexprimierter Invertase erniedrigt ist (Sonnewald et al., 1997) und in Keimen der Linie RSSa (112) mit erhöhtem Saccharosegehalt kaum *trII*-Transkript nachgewiesen wurde. Möglicherweise reicht das geringe *trII*-Transkript in den Keimen der Linie RSSa (112) aus, um hohe Calysteginmengen zu synthetisieren. Ebenso können auch Glucose und Fructose die Expression von Genen des Sekundärstoffwechsels beeinflussen, wobei Glucose vergleichbare Effekte zur Saccharose erreichen kann (Solfanelli et al., 2006). Somit könnte auch Glucose einen Einfluss auf die Enzyme der Tropanalkaloidbiosynthese haben, da die transgenen Kartoffelknollen durch stark erhöhte Glucosegehalte gekennzeichnet sind (Zrenner et al., 1995; Sonnewald et al., 1997).

Die kontroverse Expression der *trII* je nach Pflanzenalter könnte an der metabolischen Situation in der Pflanze an dem jeweiligen Erntezeitpunkt liegen. Je nach Alter der Pflanze akkumulieren möglicherweise unterschiedliche Zuckerkonzentrationen, so dass dadurch die Genexpression der *trII* im Wildtyp und in den transgenen Linien unterschiedlich beeinflusst werden könnte. Für *Arabidopsis* wurden ebenfalls veränderte Genexpressionen in Abhängigkeit

vom Alter der Pflanze festgestellt (Lee et al., 2004). Hier zeigten sich veränderte Zuckergehalte in Blättern während der Seneszenz (Lee et al., 2004).

Von Davies und Schwinn wurde beschrieben, dass Sekundärstoffwechselwege hauptsächlich auf Transkriptebeine reguliert werden (Davies und Schwinn, 2003). Die Regulation von Alkaloidbiosynthesen auf Transkriptebeine wurde bereits zusammengefasst (Memelink et al., 2001). Wenn die Calysteginbiosynthese auch auf Transkriptebeine reguliert wird, müssten sich diese Effekte in der Menge der Enzymproteine widerspiegeln. Auf Proteinebeine wurden aber kaum Veränderungen zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien festgestellt. Die Aktivität der Tropinonreduktasen in den transgenen Linien war im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht. Die Aktivität wurde allerdings nur indirekt bestimmt, indem die Reduktionsprodukte nach Tropinonapplikation analysiert wurden. Bei der Messung der Enzymaktivität über die Produktakkumulation ist noch zu beachten, dass der Transport von Tropinon im Gewebe die Aktivität verringern könnte oder die Reduktionsprodukte weiter metabolisiert werden. Zur Untersuchung, auf welcher molekularen Ebene (Transkription, Translation) die Calysteginbiosynthese reguliert wird, sind weitere Untersuchungen nötig, wobei bei der Transkript-, Protein- und Aktivitätsbestimmung methodische Optimierungen hilfreich wären.

#### **D.1.4 Bilanz der Calysteginbiosynthese**

Eine Bilanz der Calysteginbiosynthese wurde in den Geweben erstellt, wo ausreichende Informationen über PMT, TRII und Calystegine ermittelt wurden. Diese Kriterien wurden besonders in Pflanzengeweben und in Keimen erfüllt (Tab. D-1). Knollengewebe waren weniger geeignet, da kaum *trII*-Transkript, kein TRII-Protein und kaum TRII-Aktivität nachgewiesen wurde. Diese erste Bilanz sollte Aufschluss über die Lokalisation der Calysteginbiosynthese geben.

**Tab. D-1: Bilanz der Calysteginbiosynthese in Pflanzengeweben und in Keimen.**

Gewebe	Blüten	junge Blätter	alte Blätter	Wurzeln	Stolone	Keime
<i>pmt</i> -Transkript	-	-	-	++	-	-
<i>trII</i> -Transkript	+	++	++	++	++	++
TRII-Protein	-	-	++	++	+	-
TRII-Aktivität	+	++	++	+++	++	++
Calystegine	+	+	+	++	++	+++

**Transkript, Protein:** “+“ gerade sichtbar, “++“ deutlich nachgewiesen, “-“ nicht nachgewiesen  
**Aktivität:** “+“ < 10 µmol/g TM; “++“ 10-49 µmol/g TM; “+++“ ≥ 50 µmol/g TM Pseudotropin  
**Calystegine:** “+“ < 2 µmol/g TM; “++“ 2-20 µmol/g TM; “+++“ > 15 µmol/g TM Calystegine

Eine weitere Bilanz der Calysteginbiosynthese in Wurzeln und in Keimen von transgenen Kartoffellinien wurde erstellt (Tab. D-2), um Aufschluss über die Rolle der Putrescin-N-methyltransferase und die Rolle der Tropinonreduktase II in der Calysteginbiosynthese zu erhalten

Tab. D-2: Bilanz der Calysteginbiosynthese in Wurzeln und in Keimen von transgenen Kartoffellinien im Vergleich zum Wildtyp.

Gewebe	Wurzel			Keime		
	WT	U-IN1 (33)	RSSa (112)	WT	U-IN1 (33)	RSSa (112)
<i>pmt</i> -Transkript	++	+	+	-	-	-
<i>trll</i> -Transkript	++	+	+	++	+++	+
TRII-Protein	++	++	++	-	-	-
TRII-Aktivität	++	+++	+++	+	++	+
Calystegine	+	+++	+++	+	++	+++

WT: Wildtyp, U-IN1 (33): apoplastisch überexprimierte Invertase, RSSa (112): supprimierte Saccharosesynthase;

Transkript, Protein: “+“ schwach nachgewiesen, “++“ deutlich nachgewiesen, “+++“ stark nachgewiesen; “-“ nicht nachgewiesen

Aktivität: “+“ < 50 µmol/g TM; “++“ = 50 µmol/g TM; “+++“ > 50 µmol/g TM Pseudotropin

Calystegine: “+“ Wildtyp; “++“ < 2fach erhöht; “+++“ > 2fach erhöht

#### D.1.4.1 Lokalisation der Calysteginbiosynthese

Die Tropanalkaloidbiosynthese einschließlich Nicotinbiosynthese findet hauptsächlich in Wurzeln statt (Hashimoto und Yamada, 2003). Auch die Calysteginbiosynthese ist hauptsächlich in Wurzeln lokalisiert (Tab. D-1). In Wurzeln wurde das erste spezifische Enzym der Tropanalkaloidbiosynthese (PMT) sowie das erste spezifische Enzym der Calysteginbiosynthese (TRII) nachgewiesen. Aber auch in kleinen Keimen läuft die Calysteginbiosynthese ab, denn auch hier wurde *pmt*-Transkript detektiert (Stenzel et al., 2006). Alle anderen Pflanzen- und Knollengewebe sind in der Lage, Tropinon zu reduzieren, aber der erste Schritt der Biosynthese, die *N*-Methylierung von Putrescin, ist nach den gezeigten Ergebnissen nicht möglich. Es wurden aber in allen Geweben von *S. tuberosum* Calystegine nachgewiesen, so dass entweder Calystegine selbst oder Intermediate der Biosynthese transportiert werden müssen. Da auch Tropinon in allen Geweben nachgewiesen wurde, ist es denkbar, dass Tropinon von der Wurzel in oberirdische Pflanzenteile sowie in die Kartoffelknolle transportiert wird und anschließend über Pseudotropin Calystegine gebildet werden. Tropanalkaloide können über das Xylem oder Phloem transportiert werden (Kitamura et al., 1993; De-Luca und St-Pierre, 2000). Da die Tropinonreduktase II in Phloemgeweben lokalisiert ist (Kaiser et al., 2006), ist ein Phloemtransport für Tropinon denkbar. Tropinon könnte während des Transportes im Phloem reduziert werden. In Knollengewebe ist eher ein Calysteginimport aus der Wurzel vorstellbar, da in Kartoffelknollen nur eine geringe TRII-Aktivität nachgewiesen wurde. Der Transport könnte auch hier über das Phloem erfolgen, da für polyhydroxylierte Alkaloide, wie z. B. Swainsonin, Phloemtransport gezeigt wurde (Wink und Roberts, 1998; De-Luca und St-Pierre, 2000). Die Calystegine könnten in der Knolle aus dem Gefäßring in Richtung Schale transportiert werden. In der Schale akkumulierten deutlich mehr Calystegine als im Mark (C.1.2.1). Die hohen Calysteginkonzentrationen in Kartoffelaugen könnten wiederum aus einem Transport der Calystegine aus der Schale in die Augen resultieren, da auch in Kartoffelaugen keine TRII nachgewiesen wurde (Keiner et al., 2002). Der Transport von Sekundärstoffmetaboliten wurde erst kürzlich zusammengefasst. Sekundärstoffmetabolite werden oft zwischen einzelnen Zellen oder in andere Gewebe bzw. Organe transportiert (Yazaki 2005). Der Transport von Sekundärstoffmetaboliten wurde auch für die Morphinbiosynthese in *Papaver somniferum* aufgrund unterschiedlicher Lokalisation der Biosyntheseenzyme diskutiert (Yazaki 2005; Kutchan

2005). Während die beiden O-Methyltransferasen sowie eine O-Acetyltransferase in den Parenchymzellen von Kapsel und Stängel lokalisiert sind, wurde die Codeinreduktase in Milchröhren nachgewiesen (Weid et al., 2004). Weitere Untersuchungen zeigten die Lokalisation von drei Enzymen der Morphinbiosynthese in Siebelementen (Bird et al., 2003). Ein weiteres Beispiel für Intermediattransport wurde für die Biosynthese der Monoterpen-Indolalkaloide in *Catharanthus roseus* beschrieben (Burlat et al., 2004). Alle gezeigten Untersuchungen belegen, dass die Regulation der Sekundärstoffakkumulation nicht allein über die Expression der Biosyntheseenzyme erfolgt, sondern auch Transportprozesse eine wichtige Rolle spielen.

#### D.1.4.2 Einfluss der PMT und der TRII auf die Calysteginakkumulation

Während die PMT die erste spezifische Reaktion der Tropanalkaloidbiosynthese katalysiert, ist die TRII ein mittleres Enzym der Calysteginbiosynthese. Für die PMT wurde nur das Transkript analysiert. In Wurzeln der transformationsstärksten Linien wurden geringere *pmt*-Transkriptmengen detektiert als im Wildtyp. Die Calysteginkonzentrationen sind allerdings in den transformationsstärksten Linien höher als im Wildtyp (Tab. D-2). Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen einer Einfachbestimmung scheint der erste Schritt der Tropanalkaloidbiosynthese nicht limitierend für die Calysteginakkumulation in Wurzeln mit verändertem Kohlenhydratstoffwechsel zu sein. Der Einfluss der PMT auf die Alkaloidakkumulation wurde schon vielfach untersucht, wobei sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Auf der einen Seite führte die Überexpression der PMT zu keiner Steigerung der Tropanalkaloid- bzw. Calysteginakkumulation (Moyano et al., 2002; Rothe et al., 2003). Andere Untersuchungen zeigen gesteigerte Tropanalkaloidgehalte bei erhöhter PMT-Aktivität (Moyano et al., 2003; Lee et al., 2005). Für die Nicotinbiosynthese, eine kürzere Alkaloidbiosynthese, wurden durch PMT-Überexpression höhere Nicotiningehalte und bei PMT-Suppression geringere Nicotiningehalte nachgewiesen (Sato et al., 2001), so dass die Nicotinakkumulation gezielt durch die PMT-Expression reguliert werden kann. Um Aufschluss über den Einfluss der PMT auf die Calysteginakkumulation in *S. tuberosum* zu bekommen, wäre es sinnvoll, *S. tuberosum* mit überexprimierter bzw. supprimierter PMT auf Calystegingehalte zu analysieren. Der Einfluss der PMT auf die Alkaloidakkumulation scheint je nach Pflanze (Moyano et al., 2003) und analysiertem Alkaloid verschieden zu sein.

Für die TRII wurde Transkript, Protein und Aktivität analysiert. Auch hier korreliert die Transkriptmenge und die Aktivität nicht immer mit der Calysteginkonzentration (Tab. D-2). Somit ist auch die TRII allein nicht konzentrationsbestimmend für die Calystegine. Untersuchungen zur Regulation der Tropanalkaloidbiosynthese durch Tropinonreduktasen wurden kürzlich zusammengefasst (Dräger 2006). So wurde z. B. in *A. belladonna* Wurzelkulturen nach Applikation von TBON, einer schwefelanalogen Substanz zu Tropinon, eine Zunahme der Calysteginkonzentration gezeigt (Dräger et al., 1994). TBON ist ein Hemmstoff der TRI (Dräger et al., 1992), so dass mehr Tropinon für die TRII zur Verfügung stand. Eine Überexpression der TRII in *A. belladonna* Wurzelkulturen führte zu einer leichten Verschiebung des TRI:TRII Alkaloidverhältnisses in Richtung TRII-Alkaloide. Die Effekte für die TRI-Überexpression waren allerdings stärker (Richter et al., 2005). Bei beiden genannten Beispielen wurde jeweils das TRI:TRII Alkaloidverhältnis in Richtung TRII-Alkaloide verschoben. In *S. tuberosum* akkumulieren allerdings keine TRI-Alkaloide (Keiner und Dräger, 2000).

Beim Vergleich der Zucker, die die Calysteginakkumulation beeinflussen, mit denen, die die Transkriptmenge der TRII beeinflussen, wurde kein einheitliches Bild erhalten. Während

Saccharose eher die Calysteginakkumulation erhöht, ist möglicherweise Glucose für die erhöhte Transkriptakkumulation verantwortlich. Dies spricht auch gegen einen limitierenden Einfluss der TRII auf die Calysteginakkumulation. Ebenso wurde in *A. belladonna* Wurzelkulturen nach Nährmedienmodifikation die Beteiligung der Tropinonreduktasen an der Alkaloidinduktion ausgeschlossen (Rothe 2002). Somit existieren kontroverse Ergebnisse zum Einfluss der TRII auf die Calysteginakkumulation. Um den Einfluss der TRII auf die Calysteginakkumulation in *S. tuberosum* zu untersuchen, wäre es auch hier sinnvoll, die Calysteginakkumulation in Pflanzen und Knollen mit überexprimierter bzw. supprimierter TRII zu untersuchen. Es wurden bereits TRII-*sense* und TRII-*antisense* Transformanten auf die Calysteginbiosynthese untersucht. Da die Pflanzen im Freiland nicht kultiviert werden konnten und *in vitro* Kartoffelpflanzen keine Calystegine enthielten, konnte keine Aussage über den Einfluss der TRII auf die Calysteginakkumulation getroffen werden (Stenzel 2005). Weiterhin geben Zuckerfütterungsversuche Aufschluss über die Rolle der TRII in der Calysteginbiosynthese (C.3).

Wenn die PMT und die TRII nicht limitierend für die Calysteginakkumulation sind, stellt sich die Frage nach dem Enzym oder den Enzymen, die einen regulierenden Einfluss auf die Calysteginbiosynthese haben. Es ist beispielsweise denkbar, dass späte Enzyme der Biosynthese regulierend wirken. Der Weg vom Pseudotropin zu den Calysteginen ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass Enzyme des Cytochrom P450 Komplexes, die saccharoseinduzierbar sind (Cabello et al., 1998), an der Umwandlung beteiligt sind. Eine Regulation der gesamten Alkaloidakkumulation durch späte Enzyme der Biosynthese wurde auch für Scopolamin durch Überexpression der Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase (H6H) gezeigt (Palazon et al., 2003; Kang et al., 2005). Ferner ist eine Beteiligung von mehreren Enzymen an der Regulation der Calysteginbiosynthese denkbar. Für Tropanalkaloide wurde gezeigt, dass die gleichzeitige Überexpression von PMT und H6H zu einer massiven Steigerung des Scopolamingehaltes führte (Zhang et al., 2004).

## **D.2 Parallele Analyse von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten**

### **D.2.1 Calystegine und Stoffwechselmetabolite in *S. tuberosum***

In transgenen Kartoffelknollen und Keimen wurden Calystegine sowie eine Vielzahl von Stoffwechselmetaboliten analysiert. Die Auswertung der Metabolitenprofile bezog sich auf den Vergleich der transgenen Linien hinsichtlich der Einzel- und Gesamtmetabolite (Roessner et al., 2001b). Beim Vergleich der Gesamtmetabolite fiel in der Schale eine Distanzierung der Linien mit cytosolisch überexprimierter Invertase vom Wildtyp auf, während Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase in der Nähe des Wildtyps zu finden waren (C.2.2). Diese Beobachtungen wurden auch schon von Roessner und Mitarbeitern in wachsenden Knollen (Roessner et al., 2001a; Roessner et al., 2001b) gemacht. Die Vielzahl von phänotypischen Veränderungen im Bereich der Stoffwechselmetabolite von Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase wurden schon häufig beschrieben (Sonnewald et al., 1997; Trethewey et al., 1998; Hajirezaei et al., 2000; Junker et al., 2004). Linien mit supprimierter Saccharosesynthese waren hinsichtlich ihrer Gesamtmetabolite in der Schale im Bereich von Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase einzuordnen. Diese beiden Transformationsarten unterschieden sich im Vergleich zum Wildtyp hauptsächlich in den reduzierenden Zuckern (Zrenner et al., 1995; Sonnewald et al., 1997). Diese Ergebnisse wurden hier bestätigt.

Auch in Keimen distanzierten sich die Linien mit apoplastisch überexprimierter Invertase kaum vom Wildtyp. Große Unterschiede zum Wildtyp waren bei den transformationsstärksten Linien RSSa (112) und (129) mit supprimierter Saccharosesynthese zu verzeichnen. Hinsichtlich der Einzelmetabolite wurden in Keimen deutlich geringere Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Linien festgestellt als in der Schale. Dies könnte die Folge einer geringeren Expression der Invertase bzw. Saccharosesynthese in Keimen sein. Die Überexpression der Invertase bzw. die Suppression der Saccharosesynthese erfolgten knollenspezifisch (Rocha-Sosa et al., 1989; Fu und Park, 1995; Zrenner et al., 1995; Sonnewald et al., 1997), aber nicht keimspezifisch.

Auch für die Calystegingehalte wurden die vorangegangenen Ergebnisse (C.1) im *metabolic profiling* in Keimen und in der Schale bestätigt. Diese Ergebnisse bildeten einen guten Ausgangspunkt für Korrelationsuntersuchungen von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten mit dem Ziel mögliche Interaktionspartner für die Calystegine zu finden. Voraussetzung für die Korrelationsuntersuchungen waren sowohl veränderte Calystegingehalte als auch veränderte Gehalte von Stoffwechselmetaboliten.

### **D.2.2 Korrelationen von Calysteginen mit Stoffwechselmetaboliten**

Zwischen Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten wurden eine Vielzahl von Korrelationen gefunden. Während in Keimen mehr Korrelationen für Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> erhalten wurden, korrelierte in der Schale eher Calystegin B<sub>4</sub> mit anderen Metaboliten. Diese Unterschiede könnten darin begründet liegen, dass die Calysteginbiosynthese in Keimen selbst stattfinden kann, während in die Knolle Calystegine oder Vorstufen von Calysteginen transportiert werden (D.1.4.1). Damit sind in Keimen und in der Schale möglicherweise unterschiedliche Regulationsmechanismen für die Calysteginakkumulation verantwortlich. Da Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>

die Hauptcalystegine in *S. tuberosum* sind, werden in der Folge die wichtigsten Korrelationen für Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> in Keimen erläutert.

### D.2.2.1 Calystegine und Metabolite der Calysteginbiosynthese

Bei Metaboliten der Calysteginbiosynthese war die Korrelation in Keimen zwischen Putrescin und Calysteginen auffällig, wobei Calystegin B<sub>4</sub> stärker korrelierte als Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>. Eine weitere Korrelation wurde zwischen den Calysteginen A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> gefunden. Calystegin B<sub>4</sub> korrelierte mit diesen beiden Calysteginen nicht (Abb. D-1).

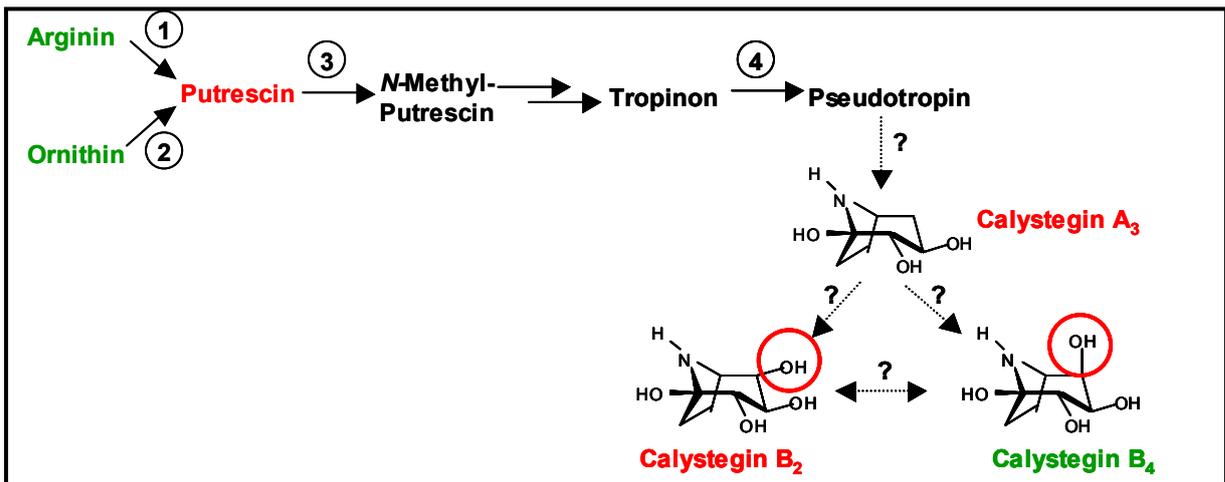


Abb. D-1: Calysteginbiosynthese mit Berücksichtigung von Korrelationen zwischen Calysteginen und Intermediaten der Biosynthese in Keimen.

**Rot:** Metabolit korreliert mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>; **Grün:** Metabolit korreliert nicht mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>; **Schwarz:** Metabolit wurde nicht detektiert;

Enzyme: (1) Arginindecarboxylase, (2) Ornithindecaboxylase, (3) Putrescin-N-methyltransferase, (4) Tropinonreduktase II

#### D.2.2.1.1 Putrescin und Calystegine

In den vorangegangenen Kapiteln (D.1.4.2) konnte die Regulation durch die PMT und die TRII in der Calysteginakkumulation nicht eindeutig belegt werden. Hier wurde geprüft, ob die Putrescinverfügbarkeit entscheidend für die Calysteginakkumulation sein kann. Eine positive Korrelation bedeutet hohe Calystegingehalte bei hohen Putrescingehalten. Putrescin wird durch Decarboxylierung von Ornithin und Arginin gebildet (Tabor und Tabor, 1984). Demnach könnte die Aktivität der Ornithin- bzw. Arginindecarboxylase eine entscheidende Rolle für die Putrescin- bzw. Calysteginakkumulation spielen. In Keimen der Linie RSSa (112) mit dem höchsten Calystegingehalt waren geringe Ornithin- und Argininkonzentrationen bei hohem Putrescingehalt gemessen worden (C.2.2.1.1). Dies spricht für eine erhöhte Decarboxylaseaktivität. In der Schale von Linien mit cytosolisch überexprimierter Invertase waren bei geringem Calystegingehalt hohe Ornithin- bzw. Arginingehalte und ein sehr geringer Putrescingehalt detektiert worden (C.2.2.1.2). Diese Beobachtungen sprechen für eine geringe Decarboxylaseaktivität. Eine negative Korrelation für Ornithin und Arginin wurde allerdings nicht beobachtet. Die Applikation von Putrescin an Wurzelkulturen von *Nicotiana rustica* führte zur erhöhten Nicotinproduktion (Walton et al., 1988). Durch Hemmung der Ornithin- bzw. Arginindecarboxylase mit DMFA wurde eine verringerte Putrescin- sowie Hyoscyaminkonzentration beobachtet (Walton et al., 1990; Robins et al., 1991b). Diese Untersuchungen unterstützen die Vermutung auf einen Einfluss der Putrescinkonzentration auf den Calystegingehalt. Putrescin liegt in der Pflanze allerdings nicht

nur in der freien Form vor, sondern kann auch mit Hydroxyzimtsäurederivaten konjugiert sein. Diese Reaktion wird durch die Putrescinhydroxycinnamoyltransferase katalysiert (Negrel et al., 1992). Die einzelnen Derivate sind entweder säurelösliche oder säureunlösliche Amide (Smith 1985; Mayer und Michael, 2003). In Keimen von *S. tuberosum* liegt der Anteil an freiem Putrescin zwischen 15-20% und der Anteil an gebundenem Putrescin zwischen 80-85% (Stenzel et al., 2006). Im Rahmen des *metabolic profiling* wurde nur freies Putrescin erfasst. Es konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wie viel Putrescin exakt für die Calysteginbiosynthese zur Verfügung stand. Putrescin ist möglicherweise auch nicht allein für die Regulation der Calysteginakkumulation verantwortlich. Durch Überexpression der Ornithindecaboxylase in *N. rustica* wurden sowohl erhöhte Putrescin- als auch erhöhte Nicotingehalte festgestellt (Hamill et al., 1990). Allerdings war der Nicotingehalt nur verdoppelt. Die Autoren diskutierten hier einen möglichen Einfluss von weiteren Biosyntheseenzymen oder anderen regulatorischen Faktoren. Zusammenfassend mit Kapitel D.1.4.2 ist die Calysteginbiosynthese von vielen regulatorischen Faktoren abhängig, wo nicht ein Enzym allein, sondern eine Enzymkaskade für die Höhe der Calysteginakkumulation verantwortlich ist.

Bei einer positiven Korrelation zwischen Putrescin und Calysteginen ist natürlich auch umgekehrt eine Beeinflussung des Putrescingehaltes durch Calystegine denkbar. Ein hoher Putrescingehalt bei hoher Calysteginkonzentration wäre beispielsweise durch eine Hemmung der PMT durch Calystegine als Feed-back Effekt zu erreichen. Feed-back Hemmungen wurden bereits für die Intermediate der Tropanalkaloidbiosynthese Putrescin und Tropin beschrieben. Hier wurde die ADC, die PMT und die *N*-Methylputrescinoxidase (MPO) gehemmt (Robins et al., 1991a).

#### D.2.2.1.2 Calystegin A<sub>3</sub> und Calystegin B<sub>2</sub>

Die Korrelation von Calystegin A<sub>3</sub> mit B<sub>2</sub> aber nicht mit Calystegin B<sub>4</sub> (Abb. D-1) könnte in der Biosynthese begründet liegen. Der erste Schritt auf dem Weg vom Pseudotropin zu den Calysteginen ist wahrscheinlich eine *N*-Demethylierung. Norpseudotropin wurde in *C. sepium* Wurzelkulturen bereits nachgewiesen (Sichhart 2003). Auch für Nicotin (Bartholomeusz et al., 2005) und Hyoscyamin bzw. Scopolamin (Griffin und Lin, 2000) wurden *N*-Demethylierungen beschrieben. Es wird vermutet, dass anschließend die Hydroxylierung schrittweise erfolgt. Die Isolierung von 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -Dihydroxynortropan aus *Calystegia soldanella* (Asano et al., 2001b) als mögliche Vorstufe von Calystegin A<sub>3</sub> (1 $\beta$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -Trihydroxynortropan), Calystegin B<sub>2</sub> (1 $\beta$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ -Tetrahydroxynortropan) und Calystegin B<sub>4</sub> (1 $\beta$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ -Tetrahydroxynortropan) unterstützen diese Vermutung. Weiterhin wurde von Scholl und Mitarbeitern postuliert, dass Calystegin A<sub>3</sub> ein Intermediat der B-Calystegine (B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub>) ist (Scholl et al., 2003). Damit könnte man davon ausgehen, dass die Bildung von Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> unter gleichen Regulationsmechanismen steht, während die letzte Hydroxylierung der Calystegin B<sub>4</sub>-Bildung anders reguliert ist. Calystegin B<sub>4</sub> unterscheidet sich von Calystegin B<sub>2</sub> nur in der stereochemischen Stellung der OH-Gruppe in 4-Position. Eine weitere Möglichkeit für die Calystegin B<sub>4</sub>-Bildung, die die fehlende Korrelation von Calystegin B<sub>4</sub> erklären könnte, ist eine Epimerisierung ausgehend von Calystegin B<sub>2</sub>. Epimerasen, die ähnliche Reaktionen katalysieren, sind z. B. aus dem Nukleotidzuckerstoffwechsel bekannt (Gu und Bar-Peled, 2004; Major et al., 2005).

### D.2.2.2 Calystegine und Stoffwechselmetabolite

Stoffwechselmetabolite, die mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> in Keimen korrelierten, waren insbesondere Disaccharide und Zuckerphosphate. Abb. D-2 zeigt die wichtigsten Korrelationen im Zusammenhang des Kohlenhydratstoffwechsels. Bei einer Korrelation sind immer beiderseitige Einflüsse möglich. Aber auch zufällige Korrelationen sind denkbar. In den folgenden Abschnitten werden für Saccharose, Trehalose und Zuckerphosphate mögliche Ansatzpunkte einer Interaktion mit Calysteginen diskutiert.

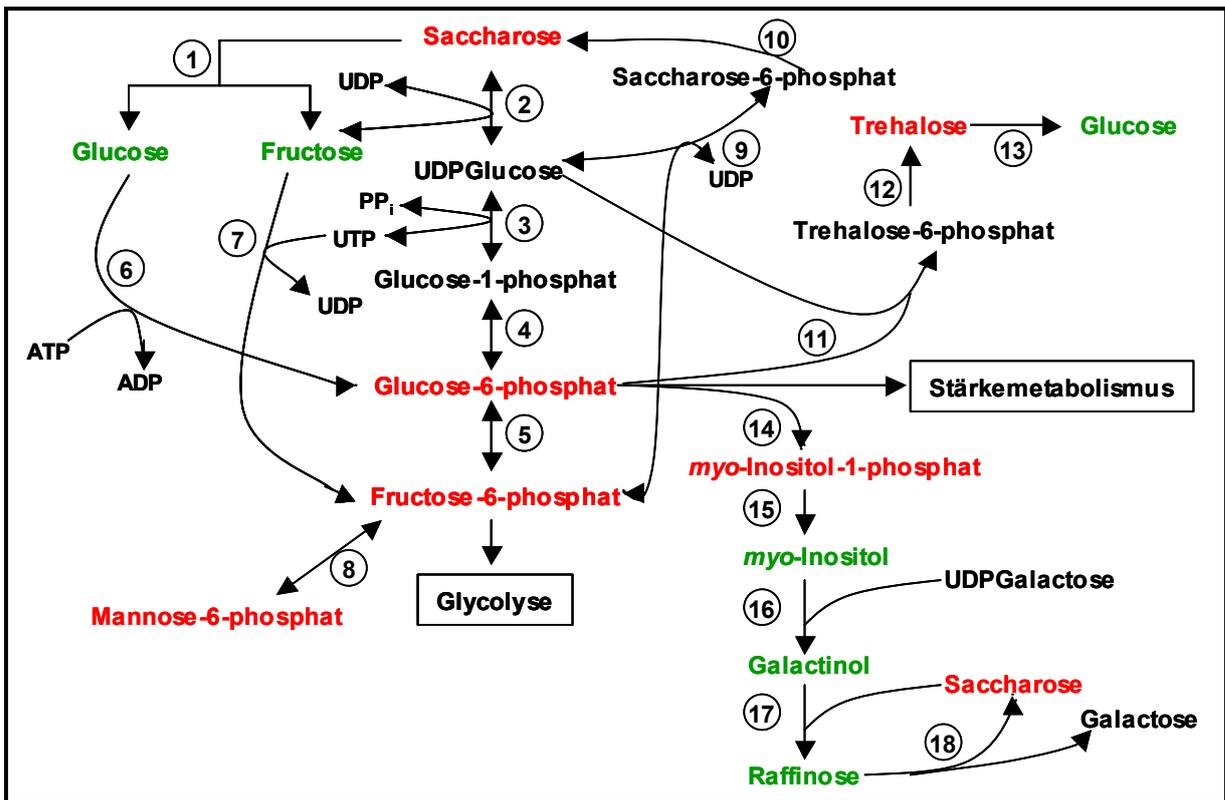


Abb. D-2: Kohlenhydratstoffwechsel mit Berücksichtigung der Korrelationen zwischen Calysteginen und Metaboliten in Keimen.

**Rot:** Metabolit korreliert mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>; **Grün:** Metabolit korreliert nicht mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>; **Schwarz:** Metabolit wurde nicht untersucht;

Enzyme: (1) Invertase, (2) Saccharosesynthase, (3) UDPGlucose-Pyrophosphorylase, (4) Phosphoglucomutase, (5) Glucose-6-phosphatisomerase, (6) Hexokinase, (7) Fructokinase, (8) Mannose-6-phosphatisomerase, (9) Saccharose-6-phosphatsynthase, (10) Saccharose-6-phosphatase, (11) Trehalose-6-phosphatsynthase, (12) Trehalose-6-phosphatase, (13) Trehalase, (14) myo-Inositol-1-phosphatsynthase, (15) myo-Inositol-1-phosphatase, (16) Galactinolsynthase, (17) Raffinosesynthase, (18) α-Galactosidase

Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Ferne et al., 2002b; Eastmond und Graham, 2003) sowie <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> erstellt.

#### D.2.2.2.1 Saccharose und Calystegine

Bei einer positiven Korrelation zwischen Saccharose und Calysteginen in Keimen sind bei hohen Saccharosegehalten hohe Calystegingehalte zu finden. Hierbei könnte Saccharose die Calysteginbiosynthese oder Calystegine den Saccharosestoffwechsel beeinflussen. Ein Einfluss von Saccharose auf die Calysteginbiosynthese wurde schon in den Kapiteln D.1.2.2 und D.1.3.4 diskutiert. Die postulierten Saccharosewirkungen werden durch die Korrelation untermauert.

Zusätzlich führte die Applikation von Saccharose an Keime und Schale zu einer Erhöhung der Calysteginkonzentration im Gewebe (C.3.1).

Eine positive Korrelation zwischen Calysteginen und Saccharose könnte sich auch ergeben, wenn die saccharoseabbauenden Enzyme durch Calystegine gehemmt werden (Abb. D-2). Saccharose wird entweder durch Invertase oder durch Saccharosesynthase gespalten (Ferne et al., 2002b). Es ist beispielsweise denkbar, dass Calystegine Invertasen oder die Saccharosesynthase hemmen. In der Vergangenheit wurde eine Hemmung der pflanzlichen Invertaseaktivität durch verschiedene Alkaloide gezeigt. Besonders stark gehemmt wurde die Invertase aus *S. tuberosum* durch Strychnin und Chinidin (Rojo et al., 1997). Auch eine Invertase aus *Nicotiana glauca* war durch endogene Alkaloide hemmbar (Rojo et al., 1998). Calystegine wurden ebenso getestet. So konnte für Calystegin B<sub>2</sub> eine Hemmung der pflanzeigenen Invertase aus *C. sepium* festgestellt werden (Höke und Dräger, 2004). Neben den Alkaloiden wurden hauptsächlich Proteine als pflanzliche Invertaseinhibitoren beschrieben. Einzelne Inhibitoren wurden bereits kloniert (Greiner et al., 1998; Greiner et al., 1999). Die Hemmung von Invertasen wird insbesondere mit der Pflanzenentwicklung, der Stressantwort sowie der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht (Greiner et al., 2000; Ordonez et al., 2000; Isla et al., 2002; Rausch und Greiner, 2004). Möglicherweise haben auch Calystegine in diesen Bereichen ihre Funktion. Eine Hemmung der Saccharosesynthase ist ebenfalls denkbar. Als Inhibitoren der Saccharosesynthase wurden beispielsweise die stickstoffhaltigen Verbindungen Imidazol und Tris-HCl beschrieben (Morell und Copeland, 1985). Auch für die Invertase aus *N. glauca* wurde eine Hemmung durch Tris-HCl gezeigt (Rojo et al., 1998). Eine Hemmung durch Alkaloide wurde für die Saccharosesynthase bisher noch nicht beschrieben. Hemmstudien zwischen Calysteginen und Saccharosesynthase könnten Aufschluss über die Rolle der Saccharosesynthase bei der Korrelation zwischen Saccharose und Calysteginen geben. Die Saccharosesynthase hat in der Pflanze wichtige Funktionen im Saccharose-Stärke-Stoffwechsel (Fu und Park, 1995). Sie ist für die *sink*-Stärke der Knollen verantwortlich, indem sie die Stärkeeinlagerung in wachsenden Knollen reguliert (Ferne und Willmitzer, 2001). Eine Hemmung der Saccharosesynthase führte in *S. tuberosum* zu einer verringerten Stärkeakkumulation, mehr löslichen Zuckern sowie einem verringerten Trockenmasseanteil (Zrenner et al., 1995). In *Lycopersicon esculentum* führte die Reduktion der Saccharosesynthaseaktivität zu einer geringeren Fruchtanzahl pro Pflanze (D'Aoust et al., 1999).

Ein weiterer Metabolit in *S. tuberosum* ist Raffinose. Eine mögliche Enzym für eine Calysteginhemmung ist die Raffinosesynthase. Die Raffinosesynthase katalysiert die Übertragung von Galactose in Form von Galactinol auf Saccharose unter Bildung von Raffinose (Abb. D-2, (Lehle und Tanner, 1973)). Raffinose wird in Verbindung mit Trockenstress- und Kältestresstoleranz genannt (Gilmour et al., 2000; Taji et al., 2002; Pennycooke et al., 2003). Raffinose selbst korrelierte nicht mit Calysteginen. Für die Raffinosesynthase aus *Pisum sativum* wurde eine Hemmung durch 1-Deoxygalactonojirimycin gezeigt (Peterbauer et al., 2002). 1-Deoxygalactonojirimycin wurde auch als Inhibitor der  $\alpha$ -Galactosidase beschrieben (Asano et al., 2000b). Auch Calystegine sind als Hemmstoffe der  $\alpha$ -Galactosidase bekannt (Molyneux et al., 1993). Diese Aspekte bekräftigen die Hypothese, dass auch Calystegine die Raffinosesynthase hemmen könnten.

#### D.2.2.2.2 Trehalose und Calystegine

Bei der positiven Korrelation zwischen Trehalose und Calystegin A<sub>3</sub> bzw. B<sub>2</sub> in Keimen sind ebenfalls hohe Trehalosekonzentrationen bei hohen Calysteginkonzentrationen zu finden. Auch hier sind zwei verschiedene Interaktionen denkbar. Trehalose könnte die Calysteginbiosynthese beeinflussen oder Calystegine den Trehalosestoffwechsel. Eine Beeinflussung der Calysteginbiosynthese durch Trehalose ist möglich. Die Applikation von Trehalose an isolierte Kartoffelgewebe führte zu einer erhöhten Calysteginakkumulation (C.3.1). Auch Transkript der TRII wurde induziert (C.3.2). Über die Induktion der Sekundärstoffakkumulation nach Trehaloseapplikation ist im Vergleich zu Saccharose wenig bekannt. Die Anthocyaninakkumulation in *A. thaliana* wurde durch Trehaloseapplikation leicht beeinflusst (Teng et al., 2005). Nach Trehaloseapplikation wurden auch Transkripte von verschiedenen Genen induziert, unter anderem das Transkript der Anthocyaninsynthese aus dem Sekundärstoffwechsel der Anthocyanine (Bae et al., 2005).

Auch ein Eingriff der Calystegine in den Trehalosestoffwechsel ist vorstellbar. Trehalose ist ein nichtreduzierender Zucker und akkumuliert in einer großen Anzahl von Organismen wie Bakterien, Pilze und Nematoden (Wingler 2002). Auch in einigen Pflanzenarten wurde Trehalose gefunden (Müller et al., 1995b). Die Biosynthese von Trehalose in Pflanzen geht von UDPGlucose und Glucose-6-phosphat aus (Abb. D-2). Über die Trehalose-6-phosphatsynthese wird Trehalose-6-phosphat gebildet, was anschließend durch die Trehalose-6-phosphatase zu Trehalose dephosphoryliert wird (Goddijn und van Dun, 1999). Der Abbau von Trehalose erfolgt über die Trehalase (Müller et al., 1995b; Müller et al., 1999). Hohe Trehalosekonzentrationen bei hohen Calysteginkonzentrationen wären bei einer Hemmung der Trehalase durch Calystegine zu erreichen. In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits Calystegin B<sub>4</sub> als Hemmstoff der Trehalase aus Schweineniere beschrieben (Asano et al., 1996a). Weitere Inhibitoren der Trehalase sind die Trehaloseanaloga Validamycin A, Validoxylamin A und MDL 25,637 sowie das Polyhydroxyalkaloid Castanospermin (Salleh und Honek, 1990; Müller et al., 1995a; Temesvari und Cotter, 1997). Die Hemmung der Trehalase mit Validamycin A *in vivo* führte in Blättern von Tabak-Pflanzen zu einer erhöhten Trehaloseakkumulation (Goddijn et al., 1997). Trehalose hat in Organismen vielfältige Funktionen. Trehalose schützt die Zelle vor Austrocknung, Kälte- und Hitzestress und wirkt als Energie- und Kohlenstoffquelle (Elbein et al., 2003). In Pflanzen akkumuliert Trehalose nur selten (Goddijn und van Dun, 1999). Hier wird Trehalose in Verbindung mit Trockenstress erwähnt (Romero et al., 1997; Goddijn und Smeekens, 1998). Während extremer Trockenheit kann der Trehalosegehalt in Pteridophyten wie *Seliganella lepidophylla* bis auf 10% der Trockenmasse ansteigen (Müller et al., 1995b). Weiterhin wird Trehalose als Regulator für Pflanzenwachstum und -entwicklung (Romero et al., 1997; Vogel et al., 1998) und als Regulator in Zuckersignalwegen (Müller et al., 1999; Avonce et al., 2005) diskutiert. Auch die Vorstufe von Trehalose, Trehalose-6-phosphat, wird als Regulator im Kohlenhydratstoffwechsel und Wachstum diskutiert (Kolbe et al., 2005).

#### D.2.2.2.3 Zuckerphosphate und Calystegine

Bei den Zuckerphosphaten korrelierten Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat und *myo*-Inositol-1-phosphat mit Calystegin A<sub>3</sub> bzw. B<sub>2</sub> in Keimen. Bei hohen Calysteginkonzentrationen liegen somit hohe Zuckerphosphatkonzentrationen vor. Die Zuckerphosphate könnten die Calysteginbiosynthese beeinflussen oder Calystegine den

Zuckerphosphatstoffwechsel. Ein zentraler Metabolit im Kohlenhydratstoffwechsel ist Glucose-6-phosphat (Abb. D-2). Ausgehend davon können die anderen Zuckerphosphate gebildet werden. Die Umwandlung in Fructose-6-phosphat wird durch die Glucose-6-phosphatisomerase (Lal und Sachs, 1995) und die Umwandlung in *myo*-Inositol-1-phosphat durch die *myo*-Inositol-1-phosphatsynthase (Johnson und Sussex, 1995) katalysiert. Mannose-6-phosphat wird ausgehend von Fructose-6-phosphat unter Katalyse der Mannose-6-phosphatisomerase (Darzins et al., 1985) gebildet. Eine Beeinflussung dieser genannten Enzyme durch Calystegine ist relativ unwahrscheinlich, da jeweils Substrat und Produkt der Enzyme mit Calysteginen korrelieren. Glucose-6-phosphat könnte der Hauptinteraktionspartner von Calysteginen sein. Die Korrelationen mit den anderen Zuckerphosphaten könnten sekundäre Effekte darstellen. Wichtige Enzyme im Glucose-6-phosphatmetabolismus sind die Hexokinase (Veramendi et al., 1999) sowie die cytosolische (Ferne et al., 2002a) und die plastidäre Phosphoglucomutase (Tauberger et al., 2000). Mögliche Hemmungen dieser Enzyme durch Calystegine könnten die Korrelation verursachen. Als Hemmstoffe der Hexokinase wurden bereits stickstoffhaltige Verbindungen wie *N*-Acetylglucosamin genannt (Racagni und de Domenech, 1983; Vandercammen und van Schaftingen, 1991). Die Phosphoglucomutase aus *Oryctolagus cuniculus* konnte durch Calystegin B<sub>2</sub> gehemmt werden (C.4.3). Als nächstes sollte die Hemmbarkeit der pflanzlichen Enzyme mit Calysteginen überprüft werden. Zuckerphosphate haben eine entscheidende Rolle in der Regulation des Saccharose-Stärke-Stoffwechsels und sind Vorstufen der Glycolyse und des oxidativen Pentosephosphatweges (Ferne et al., 2002b). Weiterhin sollte überprüft werden, ob Zuckerphosphate die Calysteginbiosynthese beeinflussen können.

### **D.3 Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese**

Zucker haben in der Pflanze wichtige Funktionen als Kohlenstoffquelle aber auch als Signalmoleküle. Sie können ebenso wie Hormone Genexpressionen verändern (Smeekens 2000; Gibson 2000). Es wurde eine Signalwirkung für Saccharose und Hexosen gezeigt, prinzipiell könnten aber alle neutralen Zucker oder Glycolyseintermediate eine Signalfunktion haben (Smeekens 2000).

#### **D.3.1 Calysteginakkumulation**

Nach Applikation von Kohlenhydraten an Keime und an Schale wurden erhöhte Calystegingehalte beobachtet. Während in Keimen für alle applizierten Zucker (Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Trehalose, Raffinose) eine ca. 1,5-2fache Erhöhung der Calysteginkonzentration gemessen wurde, war in der Schale der Calystegingehalt nach Galactose- bzw. Trehaloseapplikation 2fach und nach Saccharose- bzw. Raffinoseapplikation 2,5-3fach erhöht. Glucose und Fructose führten in der Schale zu keiner Erhöhung der Calysteginkonzentration (C.3.1). In vorangegangenen Untersuchungen an *A. belladonna* Wurzelkulturen wurde vor allem für Saccharose eine Steigerung im Alkaloidgehalt festgestellt. Glucose und Fructose allein oder in Kombination erreichten nicht die Effekte von Saccharose (Rothe und Dräger, 2002). Auch in *A. thaliana* führte die Saccharoseapplikation zu der höchsten Anthocyaninakkumulation. Der Effekt von Glucose war weitaus geringer (Teng et al., 2005). Diese Beobachtungen korrelieren mit dem Ergebnis in der Schale (C.3.1.2). In Keimen waren die Effekte für alle Zucker in etwa gleichwertig (C.3.1.1). Die Zuckerapplikation an Kartoffelgewebe deutet möglicherweise darauf hin, dass die Calysteginbiosynthese nicht von einem Zucker allein

sondern eher durch das Zusammenwirken von mehreren Zuckern beeinflusst wird. Die regulierenden Zucker variieren in Abhängigkeit vom Gewebe.

Mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass isolierte Knollen, sogar isolierte Schalen, durchaus Calystegine zu bilden vermögen. Ob die Bildung aus Tropinon erfolgt, oder ob eventuell die PMT induziert wird, bleibt zunächst unklar.

### **D.3.2 Transkriptakkumulation**

Nach Kohlenhydratapplikation wurde *trl*-, *trll*- und *pmt*-Transkript analysiert (C.3.2). *pmt*-Transkript wurde in keinem Gewebe detektiert. In Keimen wurde *trll*-Transkript nach Trehalose- und Raffinoseapplikation induziert. Eine Induktion der Genexpression durch Raffinose wurde zuvor nur in Bakterien gezeigt. Bei Wachstum von *Lactobacillus acidophilus* auf raffinosehaltigem Medium wurden Gene von ABC-Transportern induziert (Barrangou et al., 2006). Für Trehalose wurde die Induktion der Genexpression sowohl in Bakterien als auch in Pflanzen gezeigt (Bae et al., 2005; Barrangou et al., 2006). Die Applikation von Trehalose und Raffinose an Keime führte auch zu einer Erhöhung der Calysteginkonzentration im Vergleich zu den Kontrollproben (C.3.1.1). Im Vergleich zu anderen Zuckern, die die *trll*-Expression nicht induzierten, war der Calystegingehalt nicht erhöht. Dies bekräftigt die Hypothese, dass die Tropinonreduktion zu Pseudotropin nicht regulationsbestimmend ist (D.1.4.2). Auch in isolierten Keimen ist demnach die Calysteginbiosynthese möglich.

Für die TRI ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. In der Schale und in Keimen wurden geringere *trl*-Transkriptgehalte im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. In Blättern hingegen wurde *trl*-Transkript nach Glucose- und Galactoseapplikation induziert. Durch erhöhte Zuckergehalte können Gene induziert aber auch unterdrückt werden (Koch 1996). In *A. thaliana* wurden beispielsweise Gene gefunden, die in Gegenwart von Saccharose, Glucose und Fructose induziert wurden, und Gene, die in der Gegenwart der drei Zucker unterdrückt wurden (Gonzali et al., 2006). In diesen Untersuchungen wurde aber für ein Gen (*trl*) bei gleicher Zuckerapplikation in Abhängigkeit vom Gewebe die Expression induziert oder unterdrückt. Gewebe in *S. tuberosum* werden in zuckerexportierende (*source*, z. B. Blätter) und zuckerimportierende Gewebe (*sink*, z. B. Knolle, Keime) eingeteilt (Sonnewald et al., 1994). Möglicherweise wird der exogen applizierte Zucker in *source*- und *sink*-Gewebe unterschiedlich aufgenommen und metabolisiert, so dass ein verändertes Zuckersignal resultiert. In Baumwolle wurden z. B. unterschiedliche Kinetiken für die Saccharoseaufnahme in *source*- und *sink*-Gewebe festgestellt (Hendrix 1984). Welche physiologische Rolle die TRI in Kartoffel *in vivo* spielt, ist momentan unklar.

## **D.4 Wirkung von Calysteginen auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels**

### **D.4.1 Calystegine und UDPGlucose-Pyrophosphorylase**

In dieser Arbeit wurde die Hemmbarkeit der pflanzlichen UDPGlucose-Pyrophosphorylase (UGPase; EC 2.7.7.9) durch Calystegine untersucht. Die UGPase katalysiert die reversible Umwandlung von Glucose-1-phosphat in UDPGlucose unter Verbrauch von UTP und Bildung von Pyrophosphat (Sowokinos et al., 1993). Die UGPase wurde ausgewählt, da UDPGlucose ein wichtiger Verzweigungspunkt im Kohlenhydratstoffwechsel in höheren Pflanzen ist (Zrenner et al., 1993). UDPGlucose ist ein Glycosyl-Donor, wird für die Saccharosesynthese benötigt und ist

Vorstufe von Cellulose und anderen Zuckermetaboliten (Zrenner et al., 1993). Die UGPase ist in Kartoffelknollen ein sehr aktives Enzym (Sweetlove et al., 1999). Die regulatorische Rolle der UGPase wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert (Kleczkowski et al., 2004). Zrenner und Mitarbeiter zeigten bei 96%iger Hemmung der UGPase aus *S. tuberosum* keine Veränderungen im Wachstum und im Kohlenhydratstoffwechsel (Zrenner et al., 1993). Demgegenüber wurde bei einer 30 bzw. 50%igen Hemmung der UGPase ein verringerter Saccharosegehalt in Kartoffelknollen festgestellt (Spychalla et al., 1994; Borovkov et al., 1996).

Das Enzym wurde in dieser Arbeit kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Der  $K_m$ -Wert wurde für UDPGlucose mit 0,174 mM bestimmt (C.4.2). Dieser Wert ist mit den vorangegangenen Untersuchungen der nativen UGPase (Nakano et al., 1989; Sowokinos et al., 1993) und der rekombinanten UGPase (Katsube et al., 1991) aus *S. tuberosum* vergleichbar. Eine Hemmung der UGPase mit Calystegin B<sub>2</sub> wurde nicht gezeigt. Im Konzentrationsbereich von 0,25 – 1,00 mM Calystegin B<sub>2</sub> wurde keine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit der UGPase erreicht. Die Hemmversuche wurden nur unter der Verwendung von UDPGlucose als Substrat durchgeführt. Weitere Hemmversuche sollten mit dem Substrat Glucose-1-phosphat durchgeführt werden. Sowokinos und Mitarbeiter zeigten Unterschiede in der Sättigungskinetik zwischen Synthese- und Pyrophosphorolysereaktion (Sowokinos et al., 1993).

#### **D.4.2 Calystegine und Phosphoglucomutase**

Im Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung der UGPase wurde die Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2) aus dem Kaninchenmuskel (*Oryctolagus cuniculus*) verwendet. Bei Einsatz von 0,25 mM und 0,50 mM Calystegin B<sub>2</sub> wurde eine Hemmung der Phosphoglucomutase festgestellt (C.4.3). Bereits in früheren Untersuchungen wurde eine Hemmung der Phosphoglucomutase aus Kaninchenmuskel durch Nojirimycin-6-phosphat gezeigt (Kim und Raushel, 1988). Nojirimycin ist nicht nur ein klassischer Glycosidaseinhibitor (Asano 2003a), sondern weist auch strukturelle Ähnlichkeit zu den Calysteginen auf. Weitere Untersuchungen müssen noch zum  $K_m$ - und  $K_i$ -Wert mit Calystegin B<sub>2</sub> erfolgen. Nach ersten Untersuchungen wurde für die Phosphoglucomutase ein Ping-pong bi-bi Mechanismus diskutiert (Streubühr 2005). Bei steigender Substratkonzentration nahm die Reaktionsgeschwindigkeit zuerst zu und ab 0,5 mM Glucose-1-phosphat wieder ab. Ab einer Konzentration von 2 mM Glucose-1-phosphat wurde wieder ein Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt. Auch in *Acetobacter xylinum* wurde ein Ping-pong Mechanismus beschrieben (Kvam et al., 1997). Weiterhin sollte zukünftig der Hemmmechanismus für Calystegin B<sub>2</sub> aufgeklärt werden. Für Nojirimycin-6-phosphat wurde eine Phosphorylierung in 1-Position durch die phosphorylierte Phosphoglucomutase beschrieben (Kim und Raushel, 1988). Es ist zu klären, ob auch Calystegine durch Phosphoglucomutase phosphorylierbar sind.

Es ist durchaus denkbar, dass auch die pflanzliche Phosphoglucomutase durch Calystegine hemmbar ist. Um das zu klären, müsste die Phosphoglucomutase aus *S. tuberosum* kloniert, exprimiert und gereinigt werden. In *S. tuberosum* liegen zwei Isoformen der Phosphoglucomutase vor. Eine Hemmung der cytosolischen Phosphoglucomutase in *S. tuberosum* führte zu einer drastischen Wachstumsretardierung, einer reduzierten Knollenanzahl pro Pflanze, einem stark veränderten Kohlenhydrathaushalt (Ferne et al., 2002a) und einer reduzierten Photosyntheserate (Lytovchenko et al., 2002b). Die Autoren sprachen der cytosolischen Phosphoglucomutase eine entscheidende Rolle in der Saccharosesynthese in Blättern und in der Stärkeakkumulation in der Knolle zu. Eine Hemmung der plastidären

Phosphoglucomutase führte zu einer reduzierten Photosyntheserate (Lytovchenko et al., 2002a) sowie einer starken Reduktion der Stärkesynthese bei signifikant erhöhten Saccharose- und Hexosephosphatkonzentrationen (Tauberger et al., 2000). Daraus wurde geschlossen, dass die plastidäre Phosphoglucomutase ein Teil der Stärkebiosynthese ist. Sollten Calystegine eine Hemmwirkung auf die Phosphoglucomutase haben, würde ihnen eine bedeutende regulatorische Funktion im Saccharose-Stärke-Stoffwechsel zukommen.

## **D.5 Physiologische Bedeutung der Calystegine**

In dieser Arbeit wurde versucht, die mögliche physiologische Funktion der Calystegine im Kohlenhydratstoffwechsel zu beschreiben. Die Korrelation von Calysteginen mit Saccharose und Zuckerphosphaten sowie die Hemmung der Phosphoglucomutase geben Ansätze für eine Rolle der Calystegine im Saccharose-Stärke-Stoffwechsel. Aber auch der Trehalosestoffwechsel ist ein Ansatzpunkt. Somit könnten Calystegine als Sekundärstoffe eine Funktion im Primärstoffwechsel haben.

Während Primärstoffwechselmetaboliten in jeder lebenden Pflanzenzelle vorhanden sind, akkumulieren Sekundärstoffe eher zufällig (Rhodes 1994). Der Primärstoffwechsel ist für das Wachstum und die Entwicklung einer Pflanze von Bedeutung. Pflanzliche Sekundärstoffe wurden in früheren Theorien als "Abfallprodukte" des Metabolismus bezeichnet (Rhodes 1994). Spätere Untersuchungen zeigten, dass Sekundärstoffe als Abwehrstoffe gegen verschiedenste Pathogene oder Umweltstress wirken (Rhodes 1994). Kürzlich wurde der Sekundärstoffwechsel in *A. thaliana* zusammengefasst (D'Auria und Gershenzon, 2005). Die Autoren zeigten Beispiele, in denen Sekundärstoffe Funktionen im Primärstoffwechsel aufweisen und somit in das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze eingreifen. Die Übergänge der Sekundärstofffunktionen im Primär- oder Sekundärstoffwechsel scheinen aber fließend zu sein. So wurde für *Arabidopsis* Mutanten mit reduzierter Flavonoid- bzw. Hydroxyzimtsäurebildung eine erhöhte Empfindlichkeit gegen UV-B Strahlung festgestellt. Insbesondere Hydroxyzimtsäureester wurden als Schutzstoffe gegen UV-B Strahlung genannt (Landry et al., 1995). Weiterhin wurden Flavonoid-Aglycone als Regulatoren des Auxin-Transportes in *A. thaliana* beschrieben (Brown et al., 2001; Peer et al., 2004). In Tabakpflanzen wurde ein Diterpen isoliert, das in die Aktivierung von Signaltransduktionswegen nach Verwundung integriert ist (Seo et al., 2003). Diese Beispiele zeigen, dass Sekundärstoffe, wie z. B. Calystegine, durchaus eine Funktion im Primärstoffwechsel haben könnten.

Calystegine sind bisher aus der Literatur als Glycosidaseinhibitoren bekannt (Dräger 2004). Eine Beeinflussung von anderen Enzymen durch Calystegine wurde bisher nicht beschrieben. Aber andere Glycosidaseinhibitoren, wie der Iminozucker Isogommin, wirken z. B. als Inhibitoren der Glycogenphosphorylase (Jakobsen et al., 2001). Somit ist durchaus eine Wirkung für Calystegine im Zuckerphosphatstoffwechsel denkbar. Die physiologische Rolle von Glycosidaseinhibitoren wurde kürzlich zusammengefasst (Bellincampi et al., 2004). Die meisten pflanzlichen Glycosidaseinhibitoren sind Proteine. Sie haben eine Funktion im Pflanzenwachstum und in der Pflanzenentwicklung, sind aber auch an Abwehrreaktionen gegen Pathogene beteiligt (Bellincampi et al., 2004).

Ausgehend von den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lässt sich für Calystegine eine physiologische Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel ableiten. Eine detaillierte Aussage zur physiologischen Funktion kann noch nicht getroffen werden. Es wurden verschiedene Interaktionspartner für Calystegine gefunden, die jetzt in weiteren Untersuchungen

getestet werden sollten. Die Calysteginbiosynthese unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen. Insbesondere Zuckersignale spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Calysteginbiosynthese.

## **D.6 Ausblick**

Ausgehend von den Ergebnissen leiten sich weitere Fragestellungen ab. Die nächsten Untersuchungen sollten sich auf die Regulation der Calysteginbiosynthese sowie die physiologische Bedeutung der Calystegine beziehen.

### **Regulation der Biosynthese:**

Untersuchungen zur Regulation der Calysteginbiosynthese in *S. tuberosum* sollten mit transgenen Pflanzen durchgeführt werden. Dabei ist es sinnvoll, Gene an Verzweigungspunkten (PMT, TRII, TRI) überzuexprimieren bzw. zu supprimieren. Die Überexpression der PMT und der TRII sollten den regulatorischen Einfluss der Enzyme auf die Calysteginakkumulation klären. Ferner könnte überprüft werden, ob eine gleichzeitige Überexpression der PMT und der TRII zu einer drastischen Steigerung in der Calysteginakkumulation führt. Zur Suppression der PMT und/oder TRII ist das RNAi-Verfahren gut geeignet (Nakamura et al., 2006). Dabei sollten Mutanten entstehen, die sehr wenig Calystegine akkumulieren. Interessant ist dabei, ob die entstandenen Pflanzen lebensfähig sind bzw. ob phänotypische Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp bestehen. Durch Überexpression bzw. Suppression der TRI könnte die physiologische Rolle der TRI geklärt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Transport von Tropinon und von Calysteginen postuliert. Ein weiterer Ansatzpunkt sind daher Untersuchungen zum Transport von Metaboliten der Biosynthese oder von Calysteginen. Dabei wäre es sinnvoll, markierte ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) Metabolite der Biosynthese (z. B. Putrescin, Tropinon) an intakte Pflanzen zu applizieren. In einzelnen Pflanzen- und Knollengewebe sollten anschließend Zwischen- und Endprodukte der Calysteginbiosynthese nachgewiesen werden. Dabei können Aussagen getroffen werden, welcher Metabolit transportiert und welcher Metabolit metabolisiert wird. Auch markierte Calystegine sollten appliziert werden.

Ein wichtiger Punkt ist die Aufklärung der Biosynthese vom Pseudotropin zu den Calysteginen. Gene, die für die *N*-Demethylierung und die Hydroxylierung von Pseudotropin kodieren, sollten identifiziert werden. Anschließend könnte überprüft werden, ob diese Gene zuckerinduzierbar sind und damit einen regulatorischen Einfluss auf die Calysteginakkumulation haben. Auch die Gene auf dem Weg vom *N*-Methylputrescin zum Tropinon sind noch nicht identifiziert. Bei Vorliegen der Sequenzen von allen Genen der Calysteginbiosynthese, könnte die regulatorische Wirkung jedes einzelnen Enzyms untersucht werden.

### **Physiologische Bedeutung der Calystegine:**

Eine wichtige Voraussetzung für weitere Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von Calysteginen ist die Verfügbarkeit von Calysteginreinsubstanzen. Diese könnten aus Kartoffelkeimen isoliert werden und anschließend über verschiedene Ionenaustauscher gereinigt werden (Hueza et al., 2005).

Bisher wurden Calystegine und Stoffwechselmetabolite in Kartoffeln mit verändertem Kohlenhydratstoffwechsel analysiert. Als nächstes sollten Analysen von Stoffwechselmetaboliten

in Kartoffeln mit veränderter Calysteginbiosynthese untersucht werden. Dadurch könnten Metabolite oder Stoffwechselwege gefunden werden, die auf erhöhte oder verringerte Calystegingehalte reagieren. Die Applikation von Calysteginen an verschiedene Pflanzen- und Knollengewebe könnte zu ähnlichen Ergebnissen führen. Interessant ist auch eine Transkriptprofilanalyse von Kartoffeln mit veränderter Calysteginbiosynthese oder in Geweben nach Calysteginapplikation. Unter Verwendung von cDNA-*Microarrays* (Urbanczyk-Wochniak et al., 2005; Wang et al., 2005a) könnte die Transkription von Primärstoffwechsellzymen bei verändertem Calystegingehalt untersucht werden.

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der Calystegine sollten die Hemmstudien mit verschiedenen Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels fortgesetzt werden. Viele Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels aus *S. tuberosum* wurden bereits kloniert und charakterisiert. In die Untersuchungen sollten die saccharoseabbauenden Enzyme Invertase (Hedley et al., 1993; Zhou et al., 1994) und Saccharosesynthase (Salanoubat und Genevieve, 1987) einbezogen werden. Neben der Hexokinase (Veramendi et al., 1999) und der Phosphoglucomutase (Tauberger et al., 2000; Fernie et al., 2002a) ist auch die Trehalase ein interessanter Ansatzpunkt. Dabei sollten verschiedene Calystegine auf ihre Hemmwirkung getestet und anschließend  $K_i$ -Werte bestimmt werden. Neben *in vitro* Studien ist es sinnvoll, die Hemmwirkung der Calystegine *in vivo* zu studieren. Dazu sollten Calystegine an Kartoffelgewebe appliziert werden und anschließend die Aktivität der entsprechenden Enzyme bestimmt werden.

## E Zusammenfassung

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide, die Glycosidasen hemmen. In *Solanum tuberosum* akkumulieren Calystegine in allen Knollen- und Pflanzengeweben mit unterschiedlichen Gehalten. Calystegine leiten sich von der Tropanalkaloidbiosynthese ab. Wichtige Biosyntheseenzyme wie PMT und TRII aus *S. tuberosum* sind hinreichend charakterisiert. In dieser Arbeit wurde nach Ansatzpunkten für eine physiologische Funktion der Calystegine gesucht. Dazu wurden Kartoffeln mit verändertem Kohlenhydratstoffwechsel auf die Calysteginbiosynthese analysiert. Durch parallele Untersuchungen von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten wurde nach möglichen Interaktionspartnern der Calystegine gesucht. Zur Untersuchung wurden Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase (U-IN1), Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase (U-IN2) und Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese (RSSa) verwendet.

### Calysteginbiosynthese in Kartoffeln mit verändertem Kohlenhydratstoffwechsel:

- Die Kartoffeln wurden hinsichtlich des Keimungsverhaltens und des Trockenmasseanteils charakterisiert. Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase keimten nicht. Die transformationsstärksten Linien mit supprimierter Saccharosesynthese keimten verzögert. Alle transgenen Linien hatten einen geringeren Trockenmasseanteil als der Wildtyp.
- Die höchsten Calystegingehalte in Wildtyp-Kartoffeln wurden in der Schale, in dormanten Augen sowie in Keimen nachgewiesen. Während der Lagerung stieg der Calystegingehalt in der Schale leicht an. Während der Keimung sank der Calystegingehalt innerhalb einer Woche stark ab. In Wildtyp-Pflanzen akkumulierten in Wurzeln und Stolonen hohe Calysteginkonzentrationen.
- In Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen mit verändertem Kohlenhydratstoffwechsel wurden veränderte Calystegingehalte gefunden. In Kartoffeln mit überexprimierter Invertase (U-IN1 (33), U-IN2 (30)) ist der Calystegingehalt in der Schale kurz nach der Ernte 1,5fach und in Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese (RSSa (112)) 3fach erhöht. Während der Lagerung zeigten Kartoffeln mit apoplastisch überexprimierter Invertase und Kartoffeln mit supprimierter Saccharosesynthese einen dem Wildtyp vergleichbaren Verlauf auf einem anderen Konzentrationsniveau. In Kartoffeln mit cytosolisch überexprimierter Invertase nahm der Calystegingehalt während der Lagerung kontinuierlich ab. In Wurzeln von Pflanzen mit apoplastisch überexprimierter Invertase (U-IN1 (33)) war der Calystegingehalt 7fach und in Wurzeln von Pflanzen mit supprimierter Saccharosesynthese (RSSa (112)) 5fach erhöht.
- Die Expression der Biosyntheseenzyme PMT, TRI und TRII wurde analysiert. Transkript der PMT wurde in Wurzeln lokalisiert, wobei die transgenen Linien weniger Transkript im Vergleich zum Wildtyp akkumulierten. Transkript, Protein und Aktivität der TRII wurde hauptsächlich in Pflanzengeweben und in Keimen nachgewiesen. In den transgenen Linien wurden veränderte Transkriptmengen und Enzymaktivitäten der TRII detektiert, während der Proteingehalt der TRII nahezu identisch war. Transkript, Protein und Aktivität der TRI wurden vorrangig in Knollengeweben detektiert. Besonders Kartoffeln mit überexprimierter Invertase zeigten erhöhte *trI*-Transkripte. Proteingehalte und Aktivitäten der TRI waren nur geringfügig verändert.

**Parallele Analyse von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten:**

- 7 Calysteginstandardsubstanzen wurden in der GC-MS im Rahmen des *metabolic profiling* untersucht. Retentionszeiten, Massenspektren und spezifische Ionen wurden in eine Datenbank eingetragen, so dass eine gemeinsame Analyse von Calysteginen und Metaboliten möglich war.
- In Kartoffelgeweben (Keime und Schale) wurden Calystegin A<sub>3</sub>, Calystegin B<sub>2</sub> und Calystegin B<sub>4</sub> mit der Metabolitenprofilanalyse nachgewiesen. Die quantitativen Ergebnisse sind mit vorangegangenen Untersuchungen mit der GC identisch.
- In Keimen und in der Schale wurden 172 verschiedene Stoffwechselmetabolite detektiert, von denen 85 quantifiziert wurden. Die transgenen Linien wurden auf ihre Gesamtmetabolite und ihre Einzelmetabolite charakterisiert. Dabei wurden die aus der Literatur bekannten Ergebnisse bestätigt.
- Korrelationsanalysen zwischen Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten ergaben in Keimen eine Vielzahl an Korrelationen mit Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> und in der Schale mit Calystegin B<sub>4</sub>. In Keimen und in der Schale korrelierte Calystegin A<sub>3</sub> mit B<sub>2</sub> aber nicht mit Calystegin B<sub>4</sub>. Wichtige Korrelationen in Keimen sowie in der Schale wurden zwischen Calysteginen und Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels festgestellt. Damit wurden Ansatzpunkte für die weitergehende Untersuchung einer physiologischen Rolle der Calystegine im Kohlenhydratstoffwechsel geschaffen.

**Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese:**

- Verschiedene Kohlenhydrate (Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Trehalose, Raffinose) sowie das Osmotikum Sorbitol wurden an Kartoffelgewebe appliziert. Anschließend wurde der Calystegingehalt und Transkript der PMT, TRI und TRII analysiert.
- Der Calystegingehalt in Keimen war bei allen Zuckern ca. 1,5-2fach erhöht, während in der Schale nur die Applikation von Galactose, Saccharose, Trehalose und Raffinose zu einer signifikanten Erhöhung des Calystegingehaltes führte.
- Das *trII*-Transkript wurde in Keimen durch Trehalose und Raffinose induziert. *trI*-Transkript war in der Schale und in Keimen bei allen Zuckern im Vergleich zur Kontrolle verringert. In Blättern hingegen wurde eine Induktion des *trI*-Transkriptes nach Glucose- und Galactoseapplikation beobachtet.

**Wirkung von Calysteginen auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels:**

- Die UDPGlucose-Pyrophosphorylase (UGPase) aus *S. tuberosum* wurde kloniert, exprimiert und gereinigt. Für die gereinigte UGPase wurde ein K<sub>m</sub>-Wert von 0,174 mM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 615,12 nkat/mg Protein ermittelt.
- Die UGPase war nicht durch Calystegin B<sub>2</sub> hemmbar.
- Calystegin B<sub>2</sub> wurde als Inhibitor der Phosphoglucomutase aus Kaninchenmuskel (*Oryctolagus cuniculus*) bestimmt.

## F Literaturverzeichnis

- Alberts, A., Mullen, P., **2003**, Giftpflanzen in Natur und Garten. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co, Stuttgart. 216-217
- Amasino, R. M., **1986**, Acceleration of nucleic acid hybridisation rate by polyethylene glycol. *Analytical Biochemistry* 152: 304-307
- Ansarin, M., Woolley, J. G., **1993**, The obligatory role of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid. *Phytochemistry* 32: 1183-1187
- Ansarin, M., Woolley, J. G., **1994**, The rearrangement of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid. *Phytochemistry* 35: 935-939
- Appeldoorn, N. J. G., Sergeeva, L., Vreugdenhil, D., van der Plas, L. H. W., Visser, R. G. F., **2002**, In situ analysis of enzymes involved in sucrose to hexose-phosphate conversion during stolon-to-tuber transition of potato. *Physiologia Plantarum* 115: 303-310
- Appeldoorn, N.-J. G., De-Bruijn, S.-M., Koot-Gronsveld, E.-A. M., Visser, R.-G. F., Vreugdenhil, D., van der Plas, L.-H. W., **1997**, Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberisation of potato. *Planta* 202: 220-226
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Griffiths, R. C., Jones, M. G., Watson, A. A., Nash, R. J., **1997a**, Enzymatic synthesis of the glycosides of calystegines B1 and B2 and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* 304: 173-178
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., **1996a**, Calystegine B4, a novel trehalase inhibitor from *Scopolia japonica*. *Carbohydrate Research* 293: 195-204
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Hackett, L., Topping, J., Winchester, B., **1997b**, 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., Molyneux, R. J., **1997c**, Specific  $\alpha$ -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., 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., Kato, A., Watson, A. A., **2001a**, Therapeutic applications of sugar-mimicking glycosidase inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 1: 145-154
- Asano, N., Kato, A., Yokoyama, Y., Miyauchi, M., Yamamoto, M., Kizu, H., Matsui, K., **1996b**, Calystegin N-1, a novel nortropane alkaloid with a bridgehead amino group from *Hyoscyamus niger*. Structure determination and glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* 284: 169-178
- Asano, N., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Fleet, G. W., **2000a**, 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., Matsui, K., **1994**, N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* 259: 243-255

- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoke, D., Dräger, B., Watson, A. A., Nash, R. J., **2001b**, Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry* 57: 721-726
- Asano, N., **2003a**, Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* 13: 93R-104R
- Asano, N., **2003b**, Naturally occurring iminosugars and related compounds: Structure, distribution, and biological activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry (Sharjah, United Arab Emirates)* 3: 471-484
- Asano, N., Ishii, S., Kizu, H., Ikeda, K., Yasuda, K., Kato, A., Martin, O. R., Fan, J. Q., **2000b**, *In vitro* inhibition and intracellular enhancement of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *European Journal of Biochemistry* 267: 4179-4186
- Avonce, N., Leyman, B., Thevelein, J., Iturriaga, G., **2005**, Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Biochemical Society Transactions* 33: 276-279
- Bae, H., Herman, E., Sicher, R., **2005**, Exogenous trehalose promotes non-structural carbohydrate accumulation and induces chemical detoxification and stress response proteins in *Arabidopsis thaliana* grown in liquid culture. *Plant Science* 168: 1293-1301
- Barrangou, R., Azcarate-Peril, M. A., Duong, T., Conners, S. B., Kelly, R. M., Klaenhammer, T. R., **2006**, Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3816-3821
- Bartholomeusz, T. A., Bhogal, R. K., Molinie, R., Felpin, F. X., Mathe-Allainmat, M., Meier, A. C., Drager, B., Lebreton, J., Roscher, A., Richard, R. J., Mesnard, F., **2005**, Nicotine demethylation in *Nicotiana* cell suspension cultures: N<sup>1</sup>-formylnornicotine is not involved. *Phytochemistry* 66: 2432-2440
- Baumert, A., Mock, H. P., Schmidt, J., Herbers, K., Sonnewald, U., Strack, D., **2001**, Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochemistry* 56: 535-541
- Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J., Christen, P., **2001**, Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry* 58: 455-462
- Bell, E., Malmberg, R. L., **1990**, Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia-coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Molecular & General Genetics* 224: 431-436
- Bellincampi, D., Camardella, L., Delcour, J. A., Desseaux, V., D'Ovidio, R., Durand, A., Elliot, G., Gebruers, K., Giovane, A., Juge, N., Frisbaek Sorensen, J., Svensson, B., Vairo, D., **2004**, Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696: 265-274
- Biemelt, S., Hajirezaei, M. R., Melzer, M., Albrecht, G., Sonnewald, U., **1999**, Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic conditions. *Planta* 210: 41-49
- Bird, D. A., Franceschi, V. R., Facchini, P. J., **2003**, A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* 15: 2626-2635
- Boehlein, S. K., Sewell, A. K., Cross, J., Stewart, J. D., Hannah, L. C., **2005**, Purification and characterization of adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase from maize/potato mosaics. *Plant Physiology* 138: 1552-1562

- Borovkov, A. Y., McClean, P. E., Sowokinos, J. R., Ruud, S. H., Secor, G. A., **1996**, Effect of expression of UDP-glucose pyrophosphorylase ribozyme and antisense RNAs on the enzyme activity and carbohydrate composition of field-grown transgenic potato plants. *Journal of Plant Physiology* 147: 644-652
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin, T. J., **1999**, Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Science* 140: 103-125
- Bradford, M. 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
- Brede, G., Fjaervik, E., Valla, S., **1991**, Nucleotide sequence and expression analysis of the *Acetobacter xylinum* uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase gene. *Journal of Bacteriology* 173: 7042-7045
- Brock, A., Bieri, S., Christen, P., Dräger, B., **2005**, Calystegines in wild and cultivated *Erythroxyllum* species. *Phytochemistry* 66: 1231-1240
- Brosius, F., **2004**, SPSS 12, 1. Auflage, mitp-Verlag, Bonn. 773-804
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., Taiz, L., Muday, G. K., **2001**, Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 524-535
- Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M., St Pierre, B., **2004**, Co-expression of three MEP pathway genes and *geraniol 10-hydroxylase* in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant Journal* 38: 131-141
- Burtin, D., Michael, A. J., **1997**, Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants. *Biochemical Journal* 325 ( Pt 2): 331-337
- Cabello, H. F., Durst, F., Jorin, J., V, Werck, R. D., **1998**, Coumarins in *Helianthus tuberosus*: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* 49: 1029-1036
- Carrera, E., Bou, J., Garcia-Martinez, J. L., Prat, S., **2000**, Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant Journal* 22: 247-256
- Cho, J. I., Lee, S. K., Ko, S. H., Kim, H. K., Jun, S. H., Lee, Y. H., Bhoo, S. H., Lee, K. W., An, G. H., Hahn, T. R., Jeon, J. S., **2005**, Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* 24: 225-236
- Chourey, P. S., Nelson, O. E., **1976**, Enzymatic deficiency conditioned by shrunken 1 mutations in maize. *Biochemical Genetics* 14: 1041-1055
- Chourey, P. S., Taliercio, E. W., Carlson, S. J., Ruan, Y. L., **1998**, Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Molecular and General Genetics* 259: 88-96
- Claassens, M. M. J., Vreugdenhil, D., **2000**, Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation? *Potato Research* 43: 347-369
- Claassen, W., Loveys, B. R., Hawker, J. S., **1985**, Comparative investigations on the distribution of sucrose synthase activity and invertase activity within growing, mature and old leaves of some C-3 and C-4 plant species. *Physiologia Plantarum* 65: 275-280

- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., 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: 2110-2114
- Couladis, M. M., Friesen, J. B., Landgrebe, M. E., Leete, E., **1991**, Enzymes catalyzing the reduction of tropinone to tropine and pseudotropine isolated from the roots of *Datura innoxia*. *Phytochemistry* 30: 801-806
- D'Aoust, M. A., Yelle, S., Nguyen-Quoc, B., **1999**, Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* 11: 2407-2418
- D'Auria, J. C., Gershenzon, J., **2005**, The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 308-316
- Daali, Y., Bekkouche, K., Cherkaoui, S., Christen, P., Veuthey, J. L., **2000**, Use of borate complexation for the separation of non-UV-absorbing calystegines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 903: 237-244
- Darzins, A., Nixon, L. L., Vanags, R. I., Chakrabarty, A. M., **1985**, Cloning of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase genes and their expression in alginate-negative mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 161: 249-257
- Davies, H. V., Shepherd, L. V. T., Burrell, M. M., Carrari, F., Urbanczyk-Wochniak, E., Leisse, A., Hancock, R. D., Taylor, M., Viola, R., Ross, H., Mcrae, D., Willmitzer, L., Fernie, A. R., **2005**, Modulation of fructokinase activity of potato (*Solanum tuberosum*) results in substantial shifts in tuber metabolism. *Plant and Cell Physiology* 46: 1103-1115
- Davies, K. M., Schwinn, K. E., **2003**, Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology* 30: 913-925
- de Balogh, K. K., Dimande, A. P., van der Lugt, J. J., Molyneux, R. J., Naude, T. W., Welman, W. G., **1999**, A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 266-273
- De Wilde, T., De Meulenaer, B., Mestdagh, F., Govaert, Y., Ooghe, W., Fraselle, S., Demeulemeester, K., Van Peteghem, C., Calus, A., Degroodt, J. M., Verhe, R., **2006**, Selection criteria for potato tubers to minimize acrylamide formation during frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2199-2205
- De-Luca, V., Laflamme, P., **2001**, The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 225-233
- De-Luca, V., St-Pierre, B., **2000**, The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 5: 168-173
- Dobrowolski, B., Glund, K., Metzlauff, M., **1989**, Cloning of tomato nuclear ribosomal DNA. Ribosomal DNA organization in leaves and suspension cultured cells. *Plant Science* 60: 199-205
- Dräger, B., **1995**, Identification and quantification of calystegines, polyhydroxyl nortropane alkaloids. *Phytochemical Analysis* 6: 31-37
- Dräger, B., **2002**, Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* 978: 1-35
- Dräger, B., **2004**, Chemistry and biology of calystegines. *Natural Product Reports* 21: 211-223
- Dräger, B., **2006**, Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 67: 327-337

- Dräger, B., Funck, C., Hoehler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A., Schmidt, R., **1994**, Calystegines as a new group of tropane alkaloids in Solanaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38: 235-240
- Dräger, B., Hashimoto, T., Yamada, Y., **1988**, Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures. *Agricultural And Biological Chemistry* 52: 2663-2667
- Dräger, B., Portsteffen, A., Schaal, A., MacCabe, P. H., Peerless, A.-C. J., Robins, R. J., **1992**, Levels of tropinone-reductase activities influence the spectrum of tropane esters found in transformed root cultures of *Datura stramonium* L. *Planta* 188: 581-586
- Dräger, B., Schaal, A., **1994**, Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures. *Phytochemistry* 35: 1441-1447
- Dräger, B., van Almsick, A., Mrachatz, G., **1995**, Distribution of calystegines in several Solanaceae. *Planta Medica* 61: 577-579
- Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L., Kossmann, J., **1997**, Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant Journal* 12: 323-333
- Eadie, G. S., **1942**, The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *Journal of Biological Chemistry* 146: 85-93
- Eastmond, P. J., Graham, I. A., **2003**, Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Current Opinion in Plant Biology* 6: 231-235
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., Carroll, D., **2003**, New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R
- Esen, A., **1978**, A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay for protein. *Analytical Biochemistry* 89: 264-273
- Facchini, P. J., St Pierre, B., **2005**, Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 657-666
- Farre, E. M., Bachmann, A., Willmitzer, L., Trethewey, R. N., **2001**, Acceleration of potato tuber sprouting by the expression of a bacterial pyrophosphatase. *Nature Biotechnology* 19: 268-272
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B., **1983**, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13
- Fernie, A. R., Roessner, U., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., **2001**, The contribution of plastidial phosphoglucomutase to the control of starch synthesis within the potato tuber. *Planta* 213: 418-426
- Fernie, A. R., Tauberger, E., Lytovchenko, A., Roessner, U., Willmitzer, L., Trethewey, R. N., **2002a**, Antisense repression of cytosolic phosphoglucomutase in potato (*Solanum tuberosum*) results in severe growth retardation, reduction in tuber number and altered carbon metabolism. *Planta* 214: 510-520
- Fernie, A. R., Willmitzer, L., **2001**, Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127: 1459-1465
- Fernie, A. R., Willmitzer, L., Trethewey, R. N., **2002b**, Sucrose to starch: A transition in molecular plant physiology. *Trends in Plant Science* 7: 35-41
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., **2000a**, Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18: 1157-1161

- Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., **2000b**, Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 72: 3573-3580
- Fleet, G. W., Fellows, L. E., Winchester, B., **1990**, Plagiarizing plants: amino sugars as a class of glycosidase inhibitors. *Ciba Foundation Symposium* 154: 112-125
- Friedman, M., **2004**, Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Chromatography, A* 1054: 143-155
- Friedman, M., McDonald, G. M., **1997**, Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16: 55-132
- Friedman, M., Roitman, J. N., Kozukue, N., **2003**, Glycoalkaloid and Calystegine Contents of Eight Potato Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2964-2973
- Frohne, D., Pfänder, H. J., **2004**, Giftpflanzen. Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte, Toxikologen und Biologen. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. 387-389
- Fu, H., Park, W. D., **1995**, Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* 7: 1369-1385
- Galis, I., Macas, J., Vlasak, J., Ondrej, M., van Onckelen, H. A., **1995**, The effect of an elevated cytokinin level using the *ipt* gene and N6-benzyladenine on single node and intact potato plant tuberization *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 143-150
- Geigenberger, P., Stitt, M., **1993**, Sucrose synthase catalyzes a readily reversible-reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189: 329-339
- Geigenberger, P., Stitt, M., Fernie, A. R., **2004**, Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant Cell and Environment* 27: 655-673
- Geigenberger, P., **2003**, Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany* 54: 457-465
- Geigenberger, P., Stamme, C., Tjaden, J., Schulz, A., Quick, P. W., Betsche, T., Kersting, H. J., Neuhaus, H. E., **2001**, Tuber physiology and properties of starch from tubers of transgenic potato plants with altered plastidic adenylate transporter activity. *Plant Physiology* 125: 1667-1678
- Gertlowski, C., Petersen, M., **1993**, Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34: 183-190
- Gibson, S. I., **2000**, Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* 124: 1532-1539
- Gilmour, S. J., Sebolt, A. M., Salazar, M. P., Everard, J. D., Thomashow, M. F., **2000**, Overexpression of the Arabidopsis *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* 124: 1854-1865
- Goddijn, O., Smeekens, S., **1998**, Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant Journal* 14: 143-146
- Goddijn, O. J., Verwoerd, T. C., Voogd, E., Krutwagen, R. W., de-Graaf, P. T., van-Dun, K., Poels, J., Ponstein, A. S., Damm, B., Pen, J., **1997**, Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology* 113: 181-190
- Goddijn, O. J. M., van Dun, K., **1999**, Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science* 4: 315-319

- Goldmann, A., Message, B., Tepfer, D., Molyneux, R. J., Duclos, O., Boyer, F. D., Pan, Y. T., Elbein, A. D., **1996**, Biological activities of the nortropane alkaloid, calystegine B2, and analogs: structure-function relationships. *Journal of Natural Products* 59: 1137-1142
- Goldmann, A., Milat, M. L., Ducrot, P. H., Lallemand, J. Y., Maille, M., Lepingle, A., Charpin, I., Tepfer, D., **1990**, Tropane derivatives from *Calystegia sepium*. *Phytochemistry* 29: 2125-2128
- Gonzali, S., Loreti, E., Solfanelli, C., Novi, G., Alpi, A., Perata, P., **2006**, Identification of sugar-modulated genes and evidence for in vivo sugar sensing in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Research* 119: 115-123
- Greiner, S., Krausgrill, S., Rausch, T., **1998**, Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor - Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiology* 116: 733-742
- Greiner, S., Koster, U., Lauer, K., Rosenkranz, H., Vogel, R., Rausch, T., **2000**, Plant invertase inhibitors: expression in cell culture and during plant development. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 807-814
- Greiner, S., Rausch, T., Sonnewald, U., Herbers, K., **1999**, Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nature Biotechnology* 17: 708-711
- Griffin, W. J., Lin, G. D., **2000**, Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* 53: 623-637
- Griffiths, R. C., Watson, A. A., Kizu, H., Asano, N., Sharp, H. J., Jones, M. G., Wormald, M. R., Fleet, G.-W. J., Nash, R. J., **1996**, The isolation from *Nicandra physalodes* and identification of the 3-O-beta-D-glucopyranoside of 1-alpha,2-beta,3-alpha,6-alpha-tetrahydroxy-nor-tropane (Calystegine B-1). *Tetrahedron Letters* 37: 3207-3208
- Gu, X. G., Bar-Peled, M., **2004**, The biosynthesis of UDP-galacturonic acid in plants. Functional cloning and characterization of *Arabidopsis* UDP-D-glucuronic acid 4-epimerase. *Plant Physiology* 136: 4256-4264
- Hajirezaei, M. R., Sonnewald, U., **1999**, Inhibition of potato tuber sprouting: low levels of cytosolic pyrophosphate lead to non-sprouting tubers harvested from transgenic potato plants. *Potato Research* 42: 353-372
- Hajirezaei, M. R., Takahata, Y., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., Sonnewald, U., **2000**, Impact of elevated cytosolic and apoplasmic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *Journal of Experimental Botany* 51 Spec No: 439-445
- Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L., Bino, R., **2002**, Plant metabolomics: The missing link in functional genomics strategies (meeting report). *The Plant Cell, American Society of Plant Biologists* 14: 1437-1440
- Hamill, J. D., Robins, R. J., Parr, A. J., Evans, D. M., Furze, J. M., Rhodes, J. C., **1990**, Over-expressing a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation. *Plant Molecular Biology* 15: 27-38
- Hänsel, R., Sticher, O., **2004**, Pharmakognosie-Phytopharmazie. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. 321-322
- Haraguchi, M., Gorniak, S. L., Ikeda, K., Minami, Y., Kato, A., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Asano, N., **2003**, Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4995-5000
- Hashimoto, T., Matsuda, J., Yamada, Y., **1993**, Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase. *Febs Letters* 329: 35-39

- Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G., Yamada, Y., **1992**, Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiology* 100: 836-845
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K., Yamada, Y., **1998**, Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant and Cell Physiology* 39: 73-79
- Hashimoto, T., Yamada, Y., **2003**, New genes in alkaloid metabolism and transport. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 163-168
- Hedley, P. E., Machray, G. C., Davies, H. V., Burch, L., Waugh, R., **1993**, cDNA cloning and expression of a potato (*Solanum tuberosum*) invertase. *Plant Molecular Biology* 22: 917-922
- Hendrix, D. L., **1984**, Sugar uptake by cotton tissues - leaf disk versus cultured roots. *Plant Physiology* 74: 16-20
- Hibi, N., Fujita, T., Hatano, M., Hashimoto, T., 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., Yamada, Y., **1994**, Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* 6: 723-735
- Hofstee, G. H. J., **1952**, Specificity of esterases. I. Identification of two pancreatic aliesterases. *Journal of Biological Chemistry* 199: 357-364
- Höke, D., Dräger, B., **2004**, Calystegines in *Calystegia sepium* do not inhibit fungal growth and invertase activity but interact with plant invertase. *Plant Biology* 6: 206-213
- Huang, X. F., Nguyenquoc, B., Chourey, P. S., Yelle, S., **1994**, Complete nucleotide sequence of the maize (*Zea mays* L.) sucrose synthase 2 cDNA. *Plant Physiology* 104: 293-294
- Hueza, I. M., Guerra, J. L., Haraguchib, M., Asanoc, N., Gorniak, S. L., **2005**, The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: A study in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57: 53-58
- Ikeda, K., Kato, A., Adachi, I., Haraguchi, M., Asano, N., **2003**, Alkaloids from the Poisonous Plant *Ipomoea carnea*: Effects on Intracellular Lysosomal Glycosidase Activities in Human Lymphoblast Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7642-7646
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y., 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
- Isla, M. I., Ordonez, R. M., Moreno, M. I. N., Sampietro, A. R., Vattuone, M. A., **2002**, Inhibition of hydrolytic enzyme activities and plant pathogen growth by invertase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 17: 37-43
- Jakobsen, P., Lundbeck, J. M., Kristiansen, M., Breinholt, J., Demuth, H., Pawlas, J., Candela, M. P. T., Andersen, B., Westergaard, N., Lundgren, K., Asano, N., **2001**, Imino sugars: potential inhibitors of liver glycogen phosphorylase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9: 733-744
- Johnson, M. D., Sussex, I. M., **1995**, 1L-myo-Inositol 1-phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107: 613-619
- Jouhikainen, K., Lindgren, L., Jokelainen, T., Hiltunen, R., Teeri, T. H., Oksman-Caldentey, K. M., **1999**, Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta* 208: 545-551
- Junker, B. H., Wuttke, R., Tiessen, A., Geigenberger, P., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Fernie, A. R., **2004**, Temporally regulated expression of a yeast invertase in potato tubers allows dissection

- of the complex metabolic phenotype obtained following its constitutive expression. *Plant Molecular Biology* 56: 91-110
- Kaiser, H. F., **1974**, An index of factorial simplicity. *Psychometrika* 39: 31-36
- Kaiser, H., Richter, U., Keiner, R., Brabant, A., Hause, B., Dräger, B., **2006**, Tropinone reductase of potato (*Solanum tuberosum* L.) involved in calystegine biosynthesis localised in root and stem phloem. *Planta*: DOI: 10.1007/s00425-006-0335-8
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., Flugge, U. I., **1998**, Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: The glucose 6-phosphate phosphate antiporter. *Plant Cell* 10: 105-117
- Kang, Y. M., Lee, O. S., Jung, H. Y., Kang, S. M., Lee, B. R., Karigar, C., Prasad, T., Bahk, J. D., Choi, M. S., **2005**, Overexpression of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase (h6h) gene and enhanced production of tropane alkaloids in *Scopolia parviflora* hairy root lines. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 91-98
- Kasukabe, Y., He, L. X., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., Tachibana, S., **2004**, Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45: 712-722
- Kato, A., Asano, N., Kizu, H., Matsui, K., Suzuki, S., Arisawa, M., **1997**, Calystegine alkaloids from *Duboisia leichhardtii*. *Phytochemistry* 45: 425-429
- Katsube, T., Kazuta, Y., Mori, H., Nakano, K., Tanizawa, K., Fukui, T., **1990**, UDP-Glucose Pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing. *Journal of Biochemistry* 108: 321-326
- Katsube, T., Kazuta, Y., Tanizawa, K., Fukui, T., **1991**, Expression in *Escherichia coli* of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA from potato-tuber and functional assessment of the five lysyl residues located at the substrate-binding site. *Biochemistry* 30: 8546-8551
- Keiner, R., **2001**, Calystegine in *Solanum tuberosum* L. - Klonierung, Expression und Charakterisierung der Tropinonreduktasen I und II, putativer Enzyme des Tropanalkaloidstoffwechsels, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Keiner, R., Dräger, B., **2000**, Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science* 150: 171-179
- Keiner, R., Kaiser, H., Nakajima, K., Hashimoto, T., Dräger, 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
- Kim, S. C., Raushel, F. M., **1988**, Mechanism-based inactivation of rabbit muscle phosphoglucomutase by nojirimycin 6-phosphate. *Biochemistry* 27: 7328-7332
- Kitamura, Y., Yamashita, R., Miura, H., Watanabe, M., **1993**, Phloem transport of tropane and pyridine alkaloids in *Duboisia myoporoides*. *Journal of Plant Physiology* 142: 635-637
- Kleczkowski, L. A., Geisler, M., Ciereszko, I., Johansson, H., **2004**, UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiology* 134: 912-918
- Koch, K. E., **1996**, Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540
- 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

- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluempmann, H., Paul, M., Ulrich, S., Geigenberger, P., **2005**, Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11118-11123
- Kutchan, T. M., **1995**, Alkaloid biosynthesis-the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* 7: 1059-1070
- Kutchan, T. M., **2005**, A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 292-300
- Kvam, C., Olsvik, E. S., McKinleyMcKee, J., Saether, O., **1997**, Studies on recombinant *Acetobacter xylinum* alpha-phosphoglucomutase. *Biochemical Journal* 326: 197-203
- Laemmli, U. K., **1970**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lal, S. K., Sachs, M. M., **1995**, Cloning and characterization of an anaerobically induced cDNA encoding glucose-6-phosphat isomerase from maize. *Plant Physiology* 108: 1295-1296
- Landry, L. G., Chapple, C. C. S., Last, R. L., **1995**, Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology* 109: 1159-1166
- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C., Deffieux, G., Merillon, J. M., **1998**, Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Reports* 17: 946-950
- Lee, E. J., Koizumi, N., Sano, H., **2004**, Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* 27: 337-345
- Lee, O. S., Kang, Y. M., Jung, H. Y., Min, J. Y., Kang, S. M., Karigar, C. S., Prasad, D. T., Bahk, J. D., Choi, M. S., **2005**, Enhanced production of tropane alkaloids in *Scopolia parviflora* by introducing the PMT (putrescine N-methyltransferase) gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41: 167-172
- Leete, E., **1967**, Biosynthesis of the *Nicotiana* Alkaloids. XI. Investigation of Tautomerism in N-Methyl-<sup>1</sup>-pyrrolinium Chloride and Its Incorporation into Nicotine<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society* 89: 7081-7084
- Leete, E., Loudon, M. C. L., **1963**, Incorporation of putrescine into the tropine moiety of hyoscyamine. *Chemistry and Industry* : 1725-1726
- Lehle, L., Tanner, W., **1973**, Function of *myo*-inositol in Biosynthesis of Raffinose: Purification and Characterization of Galactinol-Sucrose 6-Galactosyltransferase from *Vicia faba* Seeds. *European Journal of Biochemistry* 38: 103-110
- Li, C. R., Zhang, X. B., Hew, C. S., **2003**, Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. *Physiologia Plantarum* 118: 352-360
- Lineweaver, H., Burk, D., **1934**, Determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* 56: 658-666
- Lloyd, J. C., Zakhleniuk, O. V., **2004**, Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant, pho3. *Journal of Experimental Botany* 55: 1221-1230
- Lytovchenko, A., Hajirezaei, M., Eickmeier, I., Mittendorf, V., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Fernie, A. R., **2005**, Expression of an *Escherichia coli* phosphoglucomutase in potato (*Solanum tuberosum* L.) results in minor changes in tuber metabolism and a considerable delay in tuber sprouting. *Planta* 221: 915-927

- Lytovchenko, A., Bieberich, K., Willmitzer, L., Fernie, A. R., **2002a**, Carbon assimilation and metabolism in potato leaves deficient in plastidial phosphoglucomutase. *Planta* 215: 802-811
- Lytovchenko, A., Sweetlove, L., Pauly, M., Fernie, A. R., **2002b**, The influence of cytosolic phosphoglucomutase on photosynthetic carbohydrate metabolism. *Planta* 215: 1013-1021
- Major, L. L., Wolucka, B. A., Naismith, J. H., **2005**, Structure and function of GDP-mannose-3',5'-epimerase: An enzyme which performs three chemical reactions at the same active site. *Journal of the American Chemical Society* 127: 18309-18320
- Mantell, S. H., Pearson, D. W., Hazell, L. P., Smith, H., **1983**, The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Reports* 2: 73-77
- Martin, T., Frommer, W. B., Salanoubat, M., Willmitzer, L., **1993**, Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant Journal* 4: 367-377
- Masgrau, C., Altabella, T., Farras, R., Flores, D., Thompson, A. J., Besford, R. T., Tiburcio, A. F., **1997**, Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 11: 465-473
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., Yamada, Y., **1991**, Molecular cloning of hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 9460-9464
- Mayer, M. J., Michael, A. J., **2003**, Polyamine homeostasis in transgenic plants overexpressing ornithine decarboxylase includes ornithine limitation. *Journal of Biochemistry* 134: 765-772
- McLaughlan, W. R., Mckee, R. A., Evans, D. M., **1993**, The purification and immunocharacterisation of *N*-methylputrescine oxidase from transformed root cultures of *Nicotiana tabacum* L. cv SC58. *Planta* 191: 440-445
- Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, J. W., **2001**, ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* 6: 212-219
- Merillon, J. M., Rideau, M., Chenieux, J. C., **1984**, Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells in vitro. *Planta Medica* 50: 497-501
- Meyer, Y., Grosset, J., Chartier, Y., Cleyet-Marel, J.-C., **1988**, Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* 9: 704-712
- Michael, A. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J. C., 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**, Kinetics of invertase action. *Biochemische Zeitschrift* 49: 333-369
- Molyneux, R. J., McKenzie, R. A., O'Sullivan, B. M., Elbein, A. D., **1995**, Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea* sp. Q6 [aff. *calobra*]) and correlation with toxicity. *Journal of Natural Products* 58: 878-886
- Molyneux, R. J., Nash, R. J., Asano, N., **1996**, The chemistry and biology of calystegines, and related nortropane alkaloids. *Alkaloids: Chemical and biological perspectives* 11: 303-343
- Molyneux, R. J., Pan, Y. T., Goldmann, A., Tepfer, D. A., Elbein, A. D., **1993**, Calystegins, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304: 81-88
- Morell, M., Copeland, L., **1985**, Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiology* 78: 149-154

- Moshier, J. A., Gilbert, J. D., Skunca, M., Dosescu, J., Almodovar, K. M., Luk, G. D., **1990**, Isolation and expression of a human ornithine decarboxylase gene. *Journal of Biological Chemistry* 265: 4884-4892
- Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazon, J., Cusido, R. M., Pinol, M. T., Teeri, T. H., 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
- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R. M., Bagni, N., Pinol, M. T., **2002**, Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the *pmt* gene. *Phytochemistry* 59: 697-702
- Mülhardt, C., **2000**, Der Experimentator: Molekularbiologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin. 23-24
- Müller, J., Boller, T., Wiemken, A., **1995a**, Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* 197: 362-368
- Müller, J., Boller, T., Wiemken, A., **1995b**, Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science* 112: 1-9
- Müller, J., Wiemken, A., Aeschbacher, R., **1999**, Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Science* 147: 37-47
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., **1993a**, cDNA encoding tropinone reductase-II from *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiology* 103: 1465-1466
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., **1993b**, 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
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., **1994**, Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites. *Journal of Biological Chemistry* 269: 11695-11698
- Nakajima, K., Oshita, Y., Kaya, M., Yamada, Y., Hashimoto, T., **1999**, Structures and expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyoscyamus niger*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63: 1756-1764
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., Yamada, Y., **1998**, Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4876-4881
- Nakajima, K., Hashimoto, T., **1999**, Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant and Cell Physiology* 40: 1099-1107
- Nakamura, N., Fukuchi-Mizutani, M., Miyazaki, K., Suzuki, K., Tanaka, Y., **2006**, RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnology* 23: 13-17
- Nakano, K., Omura, Y., Tagaya, M., Fukui, T., **1989**, UDP-Glucose Pyrophosphorylase from potato tuber: Purification and characterization. *Journal of Biochemistry* 106: 528-532
- Nash, R. J., Rothschild, M., Porter, E. A., Watson, A. A., Waigh, R. D., 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., Paynot, M., Javelle, F., **1992**, Purification and properties of putrescine hydroxycinnamoyl transferase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell suspensions. *Plant Physiology* 98: 1264-1269
- Nickon, A., Fieser, L. F., **1952**, Configuration of tropine and pseudotropine. *Journal of the American Chemical Society* 74: 5566-5570
- Nyman, S., **1994**, Incorporation of arginine, ornithine and phenylalanine into tropane alkaloids in suspension-cultured cells and aseptically roots of intact plants of *Atropa belladonna*. *Journal of Experimental Botany* 45: 979-986
- Olmstead, R. G., Palmer, J. D., **1997**, Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Systematic Botany* 22: 19-29
- Ordóñez, R. M., Isla, M. I., Vattuone, M. A., Sampietro, A. R., **2000**, Invertase proteinaceous inhibitor of *Cyphomandra betacea* Sendt fruits. *Journal of Enzyme Inhibition* 15: 583-596
- Palazon, J., Moyano, E., Cusido, R. M., Bonfill, M., Oksman-Caldentey, K. M., Pinol, M. T., **2003**, Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the *h6h* gene. *Plant Science* 165: 1289-1295
- Peer, W. A., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J. J., Makam, S. I., Chen, R. J., Masson, P. H., Murphy, A. S., **2004**, Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 1898-1911
- Pennycooke, J. C., Jones, M. L., Stushnoff, C., **2003**, Down-regulating  $\alpha$ -galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. *Plant Physiology* 133: 901-909
- Peterbauer, T., Mach, L., Mucha, J., Richter, A., **2002**, Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta* 215: 839-846
- Platt, F. M., Neises, G. R., Dwek, R. A., Butters, T. D., **1994**, N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8362-8365
- Portsteffen, A., Dräger, B., Nahrstedt, A., **1994**, The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. *Phytochemistry* 37: 391-400
- Primikiris, N. I., Roubelakis-Angelakis, K. A., **1999**, Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L.-cell-suspension cultures. *Planta* 208: 574-582
- Racagni, G. E., de Domenech, E. E. M., **1983**, Characterization of *Trypanosoma-cruzi* hexokinase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 9: 181-188
- Rastogi, R., Dulson, J., Rothstein, S. J., **1993**, Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiology* 103: 829-834
- Rausch, T., Greiner, S., **2004**, Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1696: 253-261
- Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M., Reinbothe, S., **1992**, Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *Plant Journal* 2: 917-926
- Rhodes, M.-J. C., **1994**, Physiological roles for secondary metabolites in plants: Some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology* 24: 1-20

- Richter, U., Rothe, G., Fabian, A.-K., Rahfeld, B., Dräger, B., **2005**, Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *Journal of Experimental Botany* 56: 645-652
- Robins, R. J., Abraham, T. W., Parr, A. J., Eagles, J., 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., Rhodes, M.-J. C., **1991a**, 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., Parr, A. J., Walton, N. J., **1991b**, Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 2. On the relative contributions of L-arginine and L-ornithine to the formation of the tropane ring. *Planta* 183: 196-201
- Robins, R. J., Woolley, J. G., Ansarin, M., Eagles, J., 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
- Robins, R. J., Walton, N. J., Hamill, J. D., Parr, A. J., Rhodes, M. J. C., **1991c**, Strategies for the Genetic Manipulation of Alkaloid-Producing Pathways in Plants. *Planta Medica* 57: 27-36
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J., Willmitzer, L., **1989**, Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *The EMBO Journal* 8: 23-29
- Roepenack-Lahaye, E., Degenkolb, T., Zerjeski, M., Franz, M., Roth, U., Wessjohann, L., Schmidt, J., Scheel, D., Clemens, S., **2004**, Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiology* 134: 548-559
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., Fernie, A. R., **2001a**, Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13: 11-29
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., **2000**, Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Journal* 23: 131-142
- Roessner, U., Willmitzer, L., Fernie, A. R., **2001b**, High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies. *Plant Physiology* 127: 749-764
- Roessner-Tunali, U., Hegemann, B., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruedigam, C., Granot, D., Fernie, A. R., **2003**, Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology* 133: 84-99
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A. K., **2003**, Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54: 513-524
- Roitsch, T., González, M.-C., **2004**, Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9: 606-613
- Rojo, H. P., Quiroga, E. N., Vattuone, M. A., Sampietro, A. R., **1997**, The effects of a selection of alkaloids on the invertase activity of some higher plants. *Biochemistry and Molecular Biology International* 43: 1331-1338
- Rojo, H. P., Quiroga, E. N., Vattuone, M. A., Sampietro, A. R., **1998**, *Nicotiana glauca* invertase: Characterization and effects of endogenous alkaloids. *Phytochemistry* 49: 965-969

- Romero, C., Belles, J. M., Vaya, J. L., Serrano, R., CullianezMacia, F. A., **1997**, Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: Pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297
- Rothe, G., **2002**, Regulation und Manipulation der Tropanalkaloidbiosynthese in *Atropa belladonna* L., Dissertation, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Rothe, G., Dräger, B., **2002**, Tropane alkaloids - metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Science* 163: 979-985
- Rothe, G., Garske, U., Dräger, B., **2001**, Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation. *Plant Science* 160: 1043-1053
- Rothe, G., Hachiya, A., Yamada, Y., Hashimoto, T., Dräger, 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, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin. 549-552
- Ruiz, O. A., Bortolotti, C., Masgrau, C., Tiburcio, A. F., Altabella, T., **2000**, Molecular forms of arginine decarboxylase in oat leaves. *Physiologia Plantarum* 108: 370-375
- Rüttinger, H. H., Dräger, B., **2001**, Pulsed amperometric detection of calystegines separated by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 925: 291-296
- Sachan, N., Falcone, D. L., **2002**, Wound-induced gene expression of putrescine *N*-methyltransferase in leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 61: 797-805
- Saenz, C. L., Loyola, V., V., **1997**, *Datura stramonium* hairy roots tropane alkaloid content as a response to changes in Gamborg's B-5 medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 61: 321-337
- Salanoubat, M., Genevieve, B., **1987**, Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase cDNA from potato (*Solanum tuberosum* L.): preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution. *Gene* 60: 47-56
- Salleh, H. M., Honek, J. F., **1990**, Time-dependent inhibition of porcine kidney trehalase by aminosugars. *Febs Letters* 262: 359-362
- 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.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K., Choi, K. B., Morishige, T., Fujimoto, H., 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
- Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., Lundgren, K., Roessner-Tunali, U., Forbes, M. G., Willmitzer, L., Fernie, A. R., Kopka, J., **2005**, GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *Febs Letters* 579: 1332-1337
- Schimming, T., Jenett-Siems, K., Mann, P., Tofern-Reblin, B., Milson, J., Johnson, R. W., Deroin, T., Austin, D. F., Eich, E., **2005**, Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* 66: 469-480
- Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richter, A., Jenett-Siems, K., Dräger, B., Asano, N., Gupta, M. P., Correa, M. D., Eich, E., **1998**, Phytochemistry and chemotaxonomy of the Convolvulaceae. 6. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* 49: 1989-1995

- Scholl, Y., Asano, N., Dräger, B., **2001a**, Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors. *Journal of Chromatography A* 928: 217-224
- Scholl, Y., Höke, D., Dräger, B., **2001b**, Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway. *Phytochemistry* 58: 883-889
- Scholl, Y., Schneider, B., Dräger, B., **2003**, Biosynthesis of calystegines: <sup>15</sup>N NMR and kinetics of formation in root cultures of *Calystegia sepium*. *Phytochemistry* 62: 325-332
- Schunemann, D., Borchert, S., Flugge, U. I., Heldt, H. W., **1993**, ADP/ATP Translocator from pea root plastids - comparison with translocators from spinach chloroplasts and pea leaf mitochondria. *Plant Physiology* 103: 131-137
- Scofield, A. M., Witham, P., Nash, R. J., Kite, G. C., Fellows, L. E., **1995**, Castanospermine and other polyhydroxy alkaloids as inhibitors of insect glycosidases. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 112: 187-196
- Seo, S., Seto, H., Koshino, H., Yoshida, S., Ohashi, Y., **2003**, A diterpene as an endogenous signal for the activation of defense responses to infection with *Tobacco mosaic virus* and wounding in tobacco. *Plant Cell* 15: 863-873
- Shoji, T., Yamada, Y., Hashimoto, T., **2000**, Jasmonate induction of putrescine *N*-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol.* 41: 831-839
- Sichhart, Y., **2003**, Gene, Enzyme und Produkte der Calysteginbildung in *Calystegia sepium* (L.) R. Br., Dissertation, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Siminszky, B., Gavilano, L., Bowen, S. W., Dewey, R. E., **2005**, Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14919-14924
- Skaanderup, P. R., Madsen, R., **2001**, Short syntheses of enantiopure calystegine B2, B3, and B4. *Chemical Communication*: 1106-1107
- Smeekens, S., **2000**, Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 49-81
- Smith, T. A., **1985**, Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 117-143
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., Perata, P., **2006**, Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140: 637-646
- Sonnewald, U., Lerchl, J., Zrenner, R., Frommer, W., **1994**, Manipulation of sink-source relations in transgenic plants. *Plant Cell and Environment* 17: 649-658
- Sonnewald, U., **2001**, Control of potato tuber sprouting. *Trends in Plant Science* 6: 333-335
- Sonnewald, U., Hajirezaei, M. R., Kossmann, J., Heyer, A., Trethewey, R. N., Willmitzer, L., **1997**, Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnology* 15: 794-797
- Sowokinos, J. R., Spsychalla, J. P., Desborough, S. L., **1993**, Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. IV. Purification, tissue localization, and physicochemical properties of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 101: 1073-1080
- Spsychalla, J. P., Scheffler, B. E., Sowokinos, J. R., Bevan, M. W., **1994**, Cloning, antisense RNA inhibition, and the coordinated expression of UDP-glucose pyrophosphorylase with starch biosynthetic genes in potato-tubers. *Journal of Plant Physiology* 144: 444-453

- Stenzel, O., **2005**, Putrescin-*N*-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L. - ein Enzym der Calyseteginbiosynthese, Dissertation, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Stenzel, O., Teuber, M., Dräger, B., **2006**, Putrescine *N*-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calysetegine-forming plant. *Planta* 223: 200-212
- Stitt, M., Fernie, A. R., **2003**, From measurements of metabolites to metabolomics: an on the fly' perspective illustrated by recent studies of carbon-nitrogen interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 136-144
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W., **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-Berlin. 154-156, 854
- Streubühr, S., **2005**, Untersuchungen zur Beeinflussung der Enzymaktivität von UDP-Glucose-Pyrophosphorylase aus *Solanum tuberosum* L. durch Calysetegin B2, Diplomarbeit, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Strunz, J., **2006**, Anlegen einer cDNA-Expressionsbank von *Cochlearia officinales* L., Diplomarbeit, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Sturm, A., Hess, D., Lee, H. S., Lienhard, S., **1999**, Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. *Physiologia Plantarum* 107: 159-165
- Sturm, A., Tang, G. Q., **1999**, The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4: 401-407
- Sturm, A., **1999**, Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7
- Suzuki, K., Yamada, Y., 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., Hashimoto, T., **1999b**, An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Molecular Biology* 40: 141-152
- Sweetlove, L. J., Muller-Rober, B., Willmitzer, L., Hill, S. A., **1999**, The contribution of adenosine 5' -diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers. *Planta* 209: 330-337
- Tabor, C. W., Tabor, H., **1984**, Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* 53: 749-790
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., **2002**, Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29: 417-426
- Tauberger, E., Fernie, A. R., Emmermann, M., Renz, A., Kossmann, J., Willmitzer, L., Trethewey, R. N., **2000**, Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. *Plant Journal* 23: 43-53
- Tauberger, E., Hoffmann-Benning, S., Fleischer-Notter, H., Willmitzer, L., Fisahn, J., **1999**, Impact of invertase overexpression on cell size, starch granule formation and cell wall properties during tuber development in potatoes with modified carbon allocation patterns. *Journal of Experimental Botany* 50: 477-486
- Temesvari, L. A., Cotter, D. A., **1997**, Trehalase of *Dictyostelium discoideum*: Inhibition by amino-containing analogs of trehalose and affinity purification. *Biochimie* 79: 229-239

- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., Smeekeens, S., **2005**, Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology* 139: 1840-1852
- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Denarie, J., Rosenberg, C., **1988**, A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *Journal of Bacteriology* 170: 1153-1161
- Tjaden, J., Mohlmann, T., Kampfenkel, K., Henrichs, G., Neuhaus, H. E., **1998**, Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *Plant Journal* 16: 531-540
- Trethewey, R. N., Geigenberger, P., Riedel, K., Hajirezaei, M. R., Sonnewald, U., Stitt, M., Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., **1998**, Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant Journal* 15: 109-118
- Trethewey, R. N., **2004**, Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 196-201
- Urbanczyk-Wochniak, E., Baxter, C., Kolbe, A., Kopka, J., Sweetlove, L. J., Fernie, A. R., **2005**, Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Planta* 221: 891-903
- Vandercammen, A., van Schaftingen, E., **1991**, Competitive-inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *European Journal of Biochemistry* 200: 545-551
- Veramendi, J., Roessner, U., Renz, A., Willmitzer, L., Trethewey, R. N., **1999**, Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Physiology* 121: 123-133
- Viola, R., Roberts, A. G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R. D., Marmioli, N., Machray, G. C., Oparka, K. J., **2001**, Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13: 385-398
- Vogel, G., Aeschbacher, R. A., Muller, J., Boller, T., Wiemken, A., **1998**, Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: Identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant Journal* 13: 673-683
- Walton, N. J., Robins, R. J., Peerless, A.-C. J., **1990**, Enzymes of *N*-methylputrescine biosynthesis in relation to hyoscyamine formation in transformed root cultures of *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*. *Planta* 182: 136-141
- Walton, N. J., Robins, R. J., Rhodes, M. J. C., **1988**, Perturbation of alkaloid production by cadaverine in hairy root cultures of *Nicotiana rustica*. *Plant Science* 54: 125-131
- Wang, A. Y., Yu, W. P., Juang, R. H., Huang, J. W., Sung, H. Y., Su, J. C., **1992**, Presence of three rice sucrose synthase genes as revealed by cloning and sequencing of cDNA. *Plant Molecular Biology* 18: 1191-1194
- Wang, B. L., Liu, J., Tian, Z. D., Song, B. T., Xie, C. H., **2005a**, Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays. *Plant Science* 169: 1155-1167
- Wang, L. T., Wang, A. Y., Hsieh, C. W., Chen, C. Y., Sung, H. Y., **2005b**, Vacuolar invertases in sweet potato: Molecular cloning, characterization, and analysis of gene expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3672-3678

- Weid, M., Ziegler, J., Kutchan, T. M., **2004**, The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 13957-13962
- Wingler, A., **2002**, The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry* 60: 437-440
- Wink, M., Roberts, M. F., **1998**, Compartmentation of alkaloid biosynthesis, transport, and storage. In *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications* (Roberts; M.F. and Wink, M., eds), Plenum Press, New York. 239-262
- Yazaki, K., **2005**, Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 301-307
- Yu, W. P., Wang, A. Y., Juang, R. H., Sung, H. Y., Su, J. C., **1992**, Isolation and sequences of rice sucrose synthase cDNA and genomic DNA. *Plant Molecular Biology* 18: 139-142
- Yun, D. J., Hashimoto, T., Yamada, Y., **1992**, Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 11799-11803
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K.-M., Xu, T., Pi, Y., Wang, Z., Zhang, H., Kai, G., Liao, Z., Xiaofen Sun, X., Tang, K., **2004**, Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 6786-6791
- Zhao, J., Zhu, W.-H., Hu, Q., He, X.-W., **2001**, Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. *Plant Growth Regulation* 33: 33-41
- Zhou, D. B., Mattoo, A., Li, N., Imaseki, H., Solomos, T., **1994**, Complete nucleotide-sequence of potato-tuber acid invertase cDNA. *Plant Physiology* 106: 397-398
- Zrenner, R., Schueler, K., Sonnewald, U., **1996**, Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198: 246-252
- Zrenner, R., Willmitzer, L., Sonnewald, U., **1993**, Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta* 190: 247-252
- Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U., **1995**, Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* 7: 97-107

## G Anhang

### G.1 Calysteginbiosynthese in transgenen Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen

#### G.1.1 Trockenmasseanteil in transgenen Kartoffelknollen während der Lagerung

Tab. G-1: Trockenmasseanteil im Mark von Knollen der Größe 1 in % während der Lagerung.

	Tage nach der Ernte							
	10		92		99		106	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	in %	in %	in %	in %	in %	in %	in %	in %
WT1	20,20	1,96	18,23	1,59	21,17	1,20	20,38	0,46
WT2	21,44	2,05	19,88	0,51	18,47	0,49	19,53	2,50
U-IN1 (3)	19,11	1,14	16,63	0,16	20,31	0,28	16,10	0,93
U-IN1 (33)	14,71	1,58	16,34	0,18	16,34	0,16	16,19	0,82
U-IN1 (41)	15,66	0,48	15,49	1,06	16,65	2,63	17,70	0,50
U-IN2 (17)	12,69	0,99	8,96	0,38	9,79	0,19	9,18	0,79
U-IN2 (30)	11,63	1,15	9,78	0,31	9,10	0,03	10,73	0,62
U-IN2 (33)	11,89	0,69	9,25	0,56	8,87	1,25	9,97	0,57
U-IN2 (34)	11,71	0,45	8,67	0,68	8,21	0,30	8,73	0,27
U-IN2 (42)	11,06	0,22	11,39	0,42	14,43	1,61	10,81	0,64
RSSa (99)	16,33	0,10	13,95	0,93	14,72	0,75	16,95	1,22
RSSa (108)	16,42	0,51	19,24	1,77	14,13	1,76	14,51	0,68
RSSa (112)	8,64	0,79	7,49	0,61	7,47	0,54	7,97	0,13
RSSa (114)	15,77	0,30	14,66	0,94	13,87	0,30	16,69	1,40
RSSa (129)	14,58	1,91	16,39	0,89	15,37	1,95	17,55	1,24
RSSa (130)	15,75	0,76	18,98	4,13	15,40	0,41	16,05	0,93

	Tage nach der Ernte					
	120		155		288	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	in %	in %	in %	in %	in %	in %
WT1	18,24	0,55	20,23	0,61	21,40	1,00
WT2	16,26	0,51	17,35	2,47	18,43	0,44
U-IN1 (3)	15,09	1,43	13,01	0,64	13,98	0,68
U-IN1 (33)	16,40	0,28	16,00	0,42	16,15	1,20
U-IN1 (41)	16,97	0,44	15,98	0,40	16,98	0,11
U-IN2 (17)	7,79	0,79	7,66	0,44	n.b.	n.b.
U-IN2 (30)	7,82	0,05	8,24	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN2 (33)	7,54	0,60	7,70	0,11	n.b.	n.b.
U-IN2 (34)	6,97	0,34	6,11	0,50	n.b.	n.b.
U-IN2 (42)	8,40	0,24	7,04	0,13	n.b.	n.b.
RSSa (99)	14,73	0,47	14,09	0,80	18,43	0,77
RSSa (108)	16,82	1,09	18,81	1,92	18,51	1,48
RSSa (112)	8,07	1,88	6,98	1,46	7,97	1,15
RSSa (114)	17,27	2,31	15,99	1,00	15,24	1,15
RSSa (129)	12,29	0,85	19,24	0,54	15,61	4,97
RSSa (130)	17,19	1,03	15,87	0,48	17,10	0,83

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Das Ergebnis resultiert aus einer Dreifachbestimmung von 2 unabhängigen Knollen; n.b. nicht bestimmt

Tab. G- 2: Trockenmasseanteil im Mark von Knollen der Größe 2 in % während der Lagerung.

	Tage nach der Ernte							
	10		92		99		106	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	in %	in %	in %	in %	in %	in %	in %	in %
WT1	19,62	3,25	12,78	2,94	19,45	2,15	19,91	3,21
WT2	20,23	4,34	16,73	2,87	19,08	2,70	19,67	1,25
U-IN1 (3)	15,30	2,54	17,66	1,49	17,76	3,18	16,22	2,29
U-IN1 (33)	17,07	2,30	18,19	2,39	16,86	1,71	17,86	1,14
U-IN1 (41)	17,38	1,02	18,38	2,29	15,81	0,72	17,43	1,17
U-IN2 (17)	15,65	2,31	8,81	0,75	10,06	1,01	8,70	0,48
U-IN2 (30)	14,26	4,06	8,81	1,11	9,97	1,13	8,82	1,01
U-IN2 (33)	10,34	0,89	8,23	1,42	10,04	0,46	8,34	0,92
U-IN2 (34)	11,74	1,63	10,66	0,52	11,73	1,11	10,21	1,29
U-IN2 (42)	14,70	1,45	11,79	0,99	10,29	0,69	13,40	3,78
RSSa (99)	17,07	1,97	14,46	0,84	17,91	2,34	18,01	1,08
RSSa (108)	16,18	2,32	16,09	2,86	16,02	0,35	14,07	0,65
RSSa (112)	13,17	2,21	9,35	1,43	8,56	0,83	9,11	0,74
RSSa (114)	20,66	3,01	16,54	2,00	17,32	0,60	17,64	1,65
RSSa (129)	15,82	2,20	18,03	1,88	14,00	4,96	15,48	3,25
RSSa (130)	16,13	2,97	15,84	1,05	13,78	1,44	14,10	0,16

	Tage nach der Ernte					
	120		155		288	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	in %	in %	in %	in %	in %	in %
WT1	19,72	2,83	20,18	6,52	28,48	6,20
WT2	20,91	4,35	22,13	0,82	16,61	7,63
U-IN1 (3)	15,43	2,11	15,42	1,56	14,54	2,70
U-IN1 (33)	18,15	2,30	17,37	2,08	22,82	4,83
U-IN1 (41)	16,57	0,69	17,25	3,08	15,70	2,39
U-IN2 (17)	9,24	0,30	8,47	0,18	n.b.	n.b.
U-IN2 (30)	9,05	3,19	6,85	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN2 (33)	8,70	0,70	5,65	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN2 (34)	9,35	1,46	6,13	0,69	n.b.	n.b.
U-IN2 (42)	10,25	0,27	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
RSSa (99)	16,64	0,11	17,35	1,39	17,45	n.b.
RSSa (108)	15,54	2,02	n.b.	n.b.	18,09	n.b.
RSSa (112)	7,83	1,10	12,03	0,21	6,77	n.b.
RSSa (114)	18,91	1,55	17,90	1,04	18,07	1,16
RSSa (129)	14,35	1,64	13,34	1,14	16,10	3,95
RSSa (130)	17,74	2,47	15,73	1,25	n.b.	n.b.

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Das Ergebnis resultiert aus einer Dreifachbestimmung von 3 unabhängigen Knollen; n.b. nicht bestimmt

Tab. G-3: Trockenmasseanteil in der Schale von Knollen der Größe 1 in % während der Lagerung.

	Tage nach der Ernte							
	10		92		99		106	
	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %
WT1	21,44	1,47	15,62	0,49	15,88	0,21	16,21	0,36
WT2	19,40	2,03	15,70	0,63	14,80	0,12	16,77	0,77
U-IN1 (3)	22,02	0,86	14,51	0,44	17,02	0,09	14,11	0,56
U-IN1 (33)	19,80	1,78	15,38	1,28	15,89	0,46	14,98	1,06
U-IN1 (41)	18,91	0,61	14,72	0,41	14,82	1,10	14,74	0,58
U-IN2 (17)	12,67	1,33	10,53	0,09	11,23	0,60	11,00	0,37
U-IN2 (30)	15,11	0,91	10,86	0,22	10,81	0,09	11,30	0,70
U-IN2 (33)	12,59	2,01	11,14	0,12	11,09	0,99	11,26	0,81
U-IN2 (34)	14,46	1,05	10,52	1,02	10,27	0,46	10,15	0,22
U-IN2 (42)	16,30	3,37	14,45	1,69	12,80	0,32	11,89	0,97
RSSa (99)	18,49	0,91	15,06	0,69	14,72	0,67	15,98	0,49
RSSa (108)	17,90	0,55	13,76	0,59	12,67	0,90	12,49	0,86
RSSa (112)	11,26	1,01	10,72	0,28	10,27	0,56	10,56	0,53
RSSa (114)	19,15	0,88	16,48	0,50	14,44	0,70	17,07	0,56
RSSa (129)	17,54	1,69	17,13	0,53	12,51	0,53	15,69	0,46
RSSa (130)	20,76	1,70	16,66	1,19	14,19	0,62	15,07	1,19

	Tage nach der Ernte					
	120		155		288	
	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %
WT1	16,49	0,59	15,59	0,19	20,41	1,34
WT2	15,28	0,48	15,14	1,56	15,62	0,99
U-IN1 (3)	13,85	0,75	11,20	0,14	14,47	0,11
U-IN1 (33)	14,25	0,06	13,44	0,58	17,09	2,15
U-IN1 (41)	14,14	0,43	13,56	1,15	14,80	0,47
U-IN2 (17)	10,68	0,88	9,68	0,73	n.b.	n.b.
U-IN2 (30)	10,16	0,45	8,24	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN2 (33)	9,92	0,56	9,95	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN2 (34)	9,17	1,27	8,00	0,41	n.b.	n.b.
U-IN2 (42)	10,15	0,51	8,88	0,35	n.b.	n.b.
RSSa (99)	14,10	0,15	12,77	0,21	18,07	0,89
RSSa (108)	12,83	0,74	14,43	0,66	16,15	1,23
RSSa (112)	10,53	2,51	10,26	1,08	7,24	1,46
RSSa (114)	15,14	1,13	15,86	0,58	12,82	3,26
RSSa (129)	11,04	0,86	14,42	0,69	11,55	2,40
RSSa (130)	15,76	0,42	14,47	1,58	15,98	0,02

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Das Ergebnis resultiert aus einer Dreifachbestimmung von 2 unabhängigen Knollen; n.b. nicht bestimmt

Tab. G-4: Trockenmasseanteil in der Schale von Knollen der Größe 2 in % während der Lagerung.

	Tage nach der Ernte							
	10		92		99		106	
	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %
WT1	23,60	2,39	16,29	1,42	18,34	1,71	17,14	1,33
WT2	22,00	0,32	17,01	1,84	16,60	1,48	18,23	0,38
U-IN1 (3)	21,68	1,42	17,08	2,27	18,84	1,22	14,62	1,03
U-IN1 (33)	23,11	1,69	17,92	0,12	17,10	2,17	16,04	3,77
U-IN1 (41)	22,15	0,66	19,13	0,08	19,50	0,81	18,37	2,17
U-IN2 (17)	16,19	1,61	10,35	1,12	11,60	0,86	10,52	0,85
U-IN2 (30)	13,26	1,34	10,65	0,25	11,34	0,97	10,58	0,17
U-IN2 (33)	13,52	0,47	11,19	0,90	12,71	1,82	12,20	1,43
U-IN2 (34)	16,10	4,45	13,81	0,50	14,03	0,39	12,72	1,85
U-IN2 (42)	18,77	3,19	12,58	0,59	11,12	0,87	12,80	0,60
RSSa (99)	20,29	0,66	17,35	1,56	18,09	1,15	18,68	0,85
RSSa (108)	18,37	1,54	14,87	1,16	15,31	1,25	13,19	0,78
RSSa (112)	19,29	0,57	13,66	1,68	11,88	1,34	11,17	1,00
RSSa (114)	24,72	2,21	19,14	2,23	19,15	0,34	17,33	0,25
RSSa (129)	19,54	2,10	19,20	1,34	12,52	2,19	15,11	1,80
RSSa (130)	21,18	2,37	18,21	2,31	16,22	1,05	14,85	1,22

	Tage nach der Ernte					
	120		155		288	
	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %	MW in %	SD in %
WT1	17,00	0,85	18,24	1,79	23,31	8,70
WT2	18,48	2,49	18,40	0,75	20,37	1,14
U-IN1 (3)	16,98	3,50	14,91	0,65	17,60	3,34
U-IN1 (33)	21,95	3,92	16,37	0,59	26,67	4,71
U-IN1 (41)	17,43	0,57	15,57	2,71	16,81	0,94
U-IN2 (17)	12,18	0,23	10,99	0,20	n.b.	n.b.
U-IN2 (30)	10,73	2,44	9,20	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN2 (33)	10,82	0,93	9,20	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN2 (34)	11,79	1,20	9,07	1,05	n.b.	n.b.
U-IN2 (42)	14,21	1,71	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
RSSa (99)	15,41	0,89	16,37	1,41	16,85	n.b.
RSSa (108)	14,02	2,95	n.b.	n.b.	18,78	n.b.
RSSa (112)	10,84	0,87	13,95	1,22	9,42	n.b.
RSSa (114)	15,57	2,24	15,91	0,45	15,99	2,47
RSSa (129)	12,96	1,77	13,28	0,35	15,28	0,73
RSSa (130)	17,61	2,40	15,37	1,12	n.b.	n.b.

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Das Ergebnis resultiert aus einer Dreifachbestimmung von 3 unabhängigen Knollen; n.b. nicht bestimmt

**Tab. G-5: Trockenmasseanteil in Augen von Knollen der Größe 1 in % während der Lagerung.**

	Tage nach der Ernte				
	92	99	106	120	155
	in %	in %	in %	in %	in %
WT1	19,29	19,43	19,50	38,34	18,93
WT2	20,30	19,06	19,04	17,80	18,12
U-IN1 (3)	16,96	19,65	17,33	20,21	13,55
U-IN1 (33)	15,52	19,72	16,84	30,67	17,41
U-IN1 (41)	15,14	17,86	17,72	27,31	15,53
U-IN2 (17)	8,36	12,27	11,33	15,79	n.b.
U-IN2 (30)	10,72	12,07	13,15	33,89	n.b.
U-IN2 (33)	11,77	12,67	12,49	11,56	n.b.
U-IN2 (34)	12,67	12,84	12,54	12,49	n.b.
U-IN2 (42)	14,96	15,28	13,27	11,46	n.b.
RSSa (99)	20,37	17,19	18,65	15,83	16,56
RSSa (108)	15,60	14,72	13,69	11,34	16,09
RSSa (112)	15,85	14,04	15,00	14,15	12,07
RSSa (114)	19,71	16,58	20,35	17,87	18,75
RSSa (129)	19,00	15,99	17,58	13,17	4,65
RSSa (130)	20,14	18,36	17,90	18,62	22,24

Das Ergebnis resultiert aus einer Einfachbestimmung von 2 unabhängigen Knollen  
n.b. nicht bestimmt

**Tab. G-6: Trockenmasseanteil in Augen von Knollen der Größe 2 in % während der Lagerung.**

	Tage nach der Ernte				
	92	99	106	120	155
	in %	in %	in %	in %	in %
WT1	18,69	21,72	18,50	20,63	19,54
WT2	20,31	18,74	21,08	20,55	21,60
U-IN1 (3)	20,34	21,25	15,94	43,06	12,04
U-IN1 (33)	16,67	18,79	18,62	23,68	14,72
U-IN1 (41)	18,83	21,61	20,66	18,53	18,29
U-IN2 (17)	8,71	10,31	8,72	18,11	n.b.
U-IN2 (30)	11,36	14,77	12,63	40,66	n.b.
U-IN2 (33)	11,06	14,63	13,49	6,47	n.b.
U-IN2 (34)	13,77	17,21	14,07	13,22	n.b.
U-IN2 (42)	11,75	13,21	13,18	14,00	n.b.
RSSa (99)	18,97	19,50	20,08	17,90	16,34
RSSa (108)	15,03	16,76	14,91	16,86	n.b.
RSSa (112)	15,85	15,22	14,72	13,79	12,90
RSSa (114)	21,14	21,17	18,52	16,67	17,48
RSSa (129)	19,75	16,38	17,39	16,62	13,82
RSSa (130)	20,75	17,72	15,40	18,47	12,39

Das Ergebnis resultiert aus einer Einfachbestimmung von 3 unabhängigen Knollen  
n.b. nicht bestimmt

## G.1.1.1 Zusammenfassung Trockenmasseanteil

Tab. G-7: Trockenmasseanteil im Mark von allen transgenen Linien während der Lagerung im Vergleich zum Wildtyp.

	Tage nach der Ernte							
	10		92		99		106	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	in %	in %	in %	in %	in %	in %	in %	in %
WT	20,34	2,93	16,90	3,44	19,54	2,10	19,87	2,17
U-IN1	16,54	2,24	17,12	1,87	17,29	2,36	16,26	2,87
U-IN2	12,58	2,40	9,64	1,41	10,25	1,90	9,89	2,01
RSSa	16,47	2,44	16,42	2,66	15,25	2,44	16,11	2,04
RSSa (112)	10,90	2,81	8,42	1,44	8,02	0,89	8,54	0,78

	Tage nach der Ernte					
	120		155		288	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	in %	in %	in %	in %	in %	in %
WT	18,78	3,14	19,97	3,91	21,65	6,45
U-IN1	16,44	1,76	15,84	2,22	16,70	3,86
U-IN2	8,53	1,54	7,17	0,97	8,01	1,03
RSSa	16,15	2,40	16,48	2,22	17,00	2,84
RSSa (112)	7,95	1,54	9,51	2,73	7,57	1,09

Die Ergebnisse ergeben sich als Mittelwerte von 3-30 Bestimmungen. Die Einzeldaten der jeweiligen Transformationsarten wurden zusammengefasst. Die Linie RSSa (112) mit der höchsten Transformationsstärke wurde separat betrachtet. Beide Knollengrößen wurden einbezogen.

Wertetabelle zu Abb. C-3.

## G.1.2 Calysteginakkumulation

### G.1.2.1 Calystegingehalt in transgenen Kartoffelknollen 10 Tage nach der Ernte

Tab. G-8: Gesamtcalysteginakkumulation im Mark und in 1-2 mm Schale von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp 10 Tage nach der Ernte.

	WT1		WT2		U-IN1 (3)		U-IN1 (33)		U-IN1 (41)	
	MW	SD								
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
Mark Größe 1	0,14	0,08	0,10	0,02	0,13	0,03	0,15	0,00	0,11	0,03
Mark Größe 2	0,16	0,06	0,21	0,07	0,31	0,20	0,18	0,10	0,11	0,02
Schale Größe 1	3,74	2,58	3,99	0,69	1,85	0,66	5,98	3,41	1,39	0,59
Schale Größe 2	1,90	1,03	3,02	1,42	2,43	0,63	3,14	0,98	1,76	0,54

	U-IN2 (17)		U-IN2 (30)		U-IN2 (33)		U-IN2 (34)		U-IN2 (42)	
	MW	SD								
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
Mark Größe 1	0,10	0,05	0,17	0,03	0,12	0,01	0,22	0,10	0,27	0,06
Mark Größe 2	0,13	0,08	0,24	0,16	0,56	0,11	0,16	0,03	0,17	0,10
Schale Größe 1	3,57	2,23	6,93	2,98	1,02	0,31	4,72	1,55	2,49	1,22
Schale Größe 2	1,80	0,65	1,77	0,86	5,32	1,13	3,14	2,23	5,94	2,48

	RSSa (99)		RSSa (108)		RSSa (112)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
Mark Größe 1	0,16	0,08	0,11	0,09	1,05	0,37
Mark Größe 2	0,34	0,17	0,15	0,08	0,30	0,09
Schale Größe 1	3,29	0,38	3,06	1,92	11,72	0,78
Schale Größe 2	2,21	0,48	2,58	1,84	8,15	3,38

	RSSa (114)		RSSa (129)		RSSa (130)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
Mark Größe 1	0,14	0,05	0,38	0,15	0,17	0,08
Mark Größe 2	0,17	0,06	0,35	0,26	0,25	0,17
Schale Größe 1	5,22	1,87	2,91	0,84	1,01	0,66
Schale Größe 2	1,89	1,19	1,81	0,29	2,90	0,31

Der Calystegingehalt in  $\mu\text{mol/g TM}$  stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2-3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben.

Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser  
Wertetabelle zu Abb. C-4.

### G.1.2.2 Calystegingehalt in transgenen Kartoffelknollen während der Lagerung

Tab. G-9: Gesamtcalystegingehalt in der Schale von transgenen Kartoffelknollen der Größe 1 im Vergleich zum Wildtyp.

	Tage nach der Ernte					
	92		99		106	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT1	6,22	0,55	8,09	0,81	2,40	1,08
WT2	5,73	0,14	10,47	0,58	1,65	0,06
U-IN1 (3)	4,27	0,61	4,63	1,96	0,83	0,52
U-IN1 (33)	2,23	0,97	6,88	0,48	1,39	0,31
U-IN1 (41)	5,70	1,46	1,79	0,96	0,65	0,22
U-IN2 (17)	1,97	0,21	1,84	0,23	1,08	0,48
U-IN2 (30)	3,36	1,04	1,74	0,58	0,97	0,24
U-IN2 (33)	2,17	0,01	3,75	0,93	1,03	0,48
U-IN2 (34)	3,51	2,11	1,03	0,45	2,24	1,45
U-IN2 (42)	4,93	2,54	1,23	0,67	1,44	0,44
RSSa (99)	4,33	0,63	4,28	1,79	1,80	0,39
RSSa (108)	7,25	1,33	8,98	4,20	2,12	0,64
RSSa (112)	15,68	4,04	16,04	2,92	6,75	1,02
RSSa (114)	7,07	0,36	6,85	3,58	1,75	0,80
RSSa (129)	4,27	1,06	8,07	4,07	2,64	0,94
RSSa (130)	4,36	3,04	4,43	1,19	1,54	0,80

	Tage nach der Ernte					
	120		155		288	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT1	3,82	0,33	1,24	0,02	0,13	0,03
WT2	3,78	2,22	1,91	0,58	0,35	0,22
U-IN1 (3)	1,80	1,34	0,91	0,15	0,22	0,06
U-IN1 (33)	1,60	0,53	0,44	0,15	0,30	0,23
U-IN1 (41)	0,40	0,10	0,41	0,13	0,37	0,21
U-IN2 (17)	0,81	0,39	0,80	0,33	0,85	n.b.
U-IN2 (30)	0,87	0,16	0,48	n.b.	0,68	0,61
U-IN2 (33)	0,38	0,19	0,45	n.b.	0,56	0,08
U-IN2 (34)	2,44	2,23	1,65	0,58	0,09	n.b.
U-IN2 (42)	1,55	0,80	1,13	1,07	n.b.	n.b.
RSSa (99)	1,80	0,30	0,88	0,11	0,12	0,07
RSSa (108)	1,66	0,53	2,46	0,87	0,10	0,00
RSSa (112)	4,51	1,55	2,44	0,60	0,76	0,13
RSSa (114)	1,26	0,38	0,45	0,12	0,23	0,22
RSSa (129)	2,73	1,15	0,29	0,09	0,48	0,25
RSSa (130)	1,90	0,78	0,91	0,68	0,37	0,09

Der Calystegingehalt in µmol/g TM stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt  
Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser. Wertetabelle zu Abb. C-9.

Tab. G-10: Gesamtcalystegingehalt in der Schale von transgenen Kartoffelknollen der Größe 2 im Vergleich zum Wildtyp.

	Tage nach der Ernte					
	92		99		106	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
WT1	5,98	2,04	3,17	2,06	1,33	0,05
WT2	6,29	1,25	3,47	1,89	5,43	3,61
U-IN1 (3)	4,83	1,87	2,82	1,37	0,52	0,23
U-IN1 (33)	2,88	1,15	4,38	1,52	1,18	0,79
U-IN1 (41)	2,74	1,00	0,68	0,21	0,84	0,70
U-IN2 (17)	1,60	0,11	0,90	0,39	0,49	0,06
U-IN2 (30)	3,39	0,67	1,09	0,83	0,47	0,08
U-IN2 (33)	4,30	1,33	1,35	0,20	1,25	0,89
U-IN2 (34)	1,21	0,29	0,48	0,23	0,98	0,20
U-IN2 (42)	3,97	2,50	2,95	0,99	3,71	4,75
RSSa (99)	7,11	2,14	4,04	1,83	2,36	0,38
RSSa (108)	7,57	3,95	7,54	1,44	4,65	2,97
RSSa (112)	14,67	5,21	19,66	8,30	6,63	4,20
RSSa (114)	3,43	3,02	1,28	0,71	1,66	0,85
RSSa (129)	1,17	0,64	3,40	2,56	4,38	2,36
RSSa (130)	3,91	1,89	4,30	1,18	4,68	1,46

	Tage nach der Ernte					
	120		155		288	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
WT1	2,41	1,22	1,11	0,70	0,29	0,02
WT2	2,05	1,11	0,75	0,28	0,29	n.b.
U-IN1 (3)	0,47	0,25	0,25	n.b.	0,41	0,22
U-IN1 (33)	1,87	1,11	0,53	0,05	0,37	0,23
U-IN1 (41)	2,02	0,72	0,42	0,33	0,20	0,17
U-IN2 (17)	0,55	0,61	0,27	0,08	0,14	n.b.
U-IN2 (30)	0,67	0,17	0,39	n.b.	0,09	0,04
U-IN2 (33)	1,15	0,74	0,36	n.b.	0,95	0,76
U-IN2 (34)	0,40	0,15	1,59	0,33	n.b.	n.b.
U-IN2 (42)	1,10	0,50	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
RSSa (99)	2,49	1,37	0,45	0,16	0,06	n.b.
RSSa (108)	3,90	2,37	n.b.	n.b.	0,03	n.b.
RSSa (112)	7,10	4,63	3,91	0,38	0,33	n.b.
RSSa (114)	0,38	0,20	2,20	0,68	0,25	0,05
RSSa (129)	1,27	0,28	0,84	0,02	0,17	0,07
RSSa (130)	0,19	0,12	1,22	0,89	n.b.	n.b.

Der Calystegingehalt in  $\mu\text{mol/g TM}$  stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt  
Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser

Tab. G-11: Gesamtcalystegingehalt in Augen von transgenen Kartoffelknollen der Größe 1 im Vergleich zum Wildtyp.

	Tage nach der Ernte					
	92		99		106	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
WT1	15,44	4,31	3,10	0,91	0,84	0,04
WT2	10,22	1,19	1,72	1,13	1,67	0,25
U-IN1 (3)	5,73	0,57	2,91	1,48	0,29	0,04
U-IN1 (33)	2,27	0,43	3,73	1,03	0,28	0,04
U-IN1 (41)	2,83	0,58	1,87	0,77	0,24	0,05
U-IN2 (17)	5,11	1,14	2,64	1,04	14,91	4,54
U-IN2 (30)	12,83	5,27	4,45	1,49	6,09	0,49
U-IN2 (33)	3,54	0,65	1,42	0,92	19,27	2,70
U-IN2 (34)	2,19	0,72	0,75	0,25	0,91	0,10
U-IN2 (42)	1,71	0,20	0,65	0,15	9,04	4,99
RSSa (99)	0,76	0,22	12,06	2,62	6,55	2,24
RSSa (108)	7,12	0,81	6,09	1,61	n.b.	n.b.
RSSa (112)	14,67	3,65	13,91	4,23	3,03	0,39
RSSa (114)	6,41	0,37	2,54	0,37	n.b.	n.b.
RSSa (129)	9,46	0,88	2,01	0,21	n.b.	n.b.
RSSa (130)	3,31	1,39	2,99	0,76	15,39	6,38

	Tage nach der Ernte			
	120		155	
	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
WT1	1,36	0,72	2,19	0,82
WT2	9,28	1,93	6,74	3,61
U-IN1 (3)	1,25	0,23	5,96	3,09
U-IN1 (33)	0,37	0,05	3,55	n.b.
U-IN1 (41)	0,28	0,17	2,43	0,67
U-IN2 (17)	0,15	0,09	n.b.	n.b.
U-IN2 (30)	0,17	0,10	n.b.	n.b.
U-IN2 (33)	0,33	0,08	n.b.	n.b.
U-IN2 (34)	3,76	0,49	n.b.	n.b.
U-IN2 (42)	6,28	1,05	n.b.	n.b.
RSSa (99)	6,56	0,60	7,40	2,27
RSSa (108)	9,59	n.b.	5,21	0,70
RSSa (112)	6,37	1,37	8,60	2,72
RSSa (114)	7,86	1,51	2,24	0,74
RSSa (129)	2,01	0,94	13,58	9,75
RSSa (130)	13,95	6,94	9,10	0,67

Der Calystegingehalt in  $\mu\text{mol/g TM}$  stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt  
Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Wertetabelle zu Abb. C-10.

Tab. G-12: Gesamtcalystegingehalt in Augen von transgenen Kartoffelknollen der Größe 2 im Vergleich zum Wildtyp.

	Tage nach der Ernte					
	92		99		106	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
WT1	3,29	0,13	1,08	0,36	0,30	0,04
WT2	1,27	0,28	1,21	0,42	10,55	2,11
U-IN1 (3)	9,20	3,62	0,79	0,41	0,31	0,21
U-IN1 (33)	6,23	2,90	4,15	1,54	1,21	0,37
U-IN1 (41)	3,15	1,32	3,02	0,09	0,23	0,09
U-IN2 (17)	10,91	5,54	4,94	1,15	1,40	0,37
U-IN2 (30)	12,70	5,63	5,91	2,66	24,07	12,63
U-IN2 (33)	3,33	0,29	0,30	0,22	2,19	0,29
U-IN2 (34)	2,82	0,40	0,93	0,40	0,55	0,09
U-IN2 (42)	9,99	6,48	3,28	1,28	2,27	0,85
RSSa (99)	1,96	0,22	1,74	0,15	2,58	0,97
RSSa (108)	2,79	0,87	1,70	0,79	2,75	1,48
RSSa (112)	17,85	4,25	10,94	1,37	3,12	2,62
RSSa (114)	2,88	1,05	1,26	0,20	2,46	0,39
RSSa (129)	6,05	2,70	1,17	0,03	4,85	1,77
RSSa (130)	2,11	0,32	5,72	0,49	7,18	1,31

	Tage nach der Ernte			
	120		155	
	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/ g TM}$		$\mu\text{mol/ g TM}$	
WT1	3,99	1,81	5,65	1,97
WT2	2,03	0,66	1,48	0,35
U-IN1 (3)	0,49	0,28	9,25	0,83
U-IN1 (33)	0,29	0,09	0,52	0,20
U-IN1 (41)	2,87	2,06	0,98	0,34
U-IN2 (17)	0,19	0,13	n.b.	n.b.
U-IN2 (30)	0,03	0,01	n.b.	n.b.
U-IN2 (33)	0,14	0,06	n.b.	n.b.
U-IN2 (34)	0,31	0,29	n.b.	n.b.
U-IN2 (42)	0,75	0,14	n.b.	n.b.
RSSa (99)	9,28	0,93	0,77	0,08
RSSa (108)	8,55	4,94	n.b.	n.b.
RSSa (112)	14,30	2,25	5,65	2,46
RSSa (114)	1,78	0,40	8,31	1,28
RSSa (129)	1,50	0,72	6,59	4,25
RSSa (130)	0,44	0,10	5,44	2,09

Der Calystegingehalt in  $\mu\text{mol/g TM}$  stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt  
Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser

Tab. G-13: Gesamtcalystegingehalt in Keimen von transgenen Kartoffelknollen der Größe 1 und 2 im Vergleich zum Wildtyp.

	Größe 1		Größe 2	
	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/}$	g TM	$\mu\text{mol/}$	g TM
WT 1	0,16	0,01	0,18	0,04
U-IN1 (3)	0,13	0,02	1,01	0,40
U-IN1 (33)	0,77	0,27	0,22	0,09
U-IN1 (41)	0,31	0,07	0,33	0,07
RSSa (99)	0,42	0,00	0,28	0,16
RSSa (108)	0,71	0,33	0,07	0,05
RSSa (112)	4,22	0,85	2,42	2,19
RSSa (114)	0,80	0,29	0,63	0,45
RSSa (129)	0,73	0,23	0,70	0,29
WT2	0,50	n.b.	n.b.	n.b.

Der Calystegingehalt in  $\mu\text{mol/g}$  TM stellt die Summe aus Calystegin  $A_3$  und  $B_2$  dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 3 unabhängigen Bestimmungen von jeweils 2-3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt  
Größe 1: 4-6 cm Knollendurchmesser; Größe 2: 2-4 cm Knollendurchmesser  
Knollenalter: 288 nach der Ernte; Wertetabelle zu Abb. C-11.

### G.1.2.3 Calystegingehalt in Kartoffelpflanzen

Tab. G-14: Gesamtcalystegingehalt in transgenen Kartoffelpflanzen der ersten Generation im Vergleich zum Wildtyp.

	Blüten		junge Blätter		alte Blätter	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/}$	g TM	$\mu\text{mol/}$	g TM	$\mu\text{mol/}$	g TM
WT	0,58	n.b.	1,62	0,54	0,29	0,27
U-IN1 (33)	0,68	n.b.	0,15	0,04	0,03	0,01
RSSa (99)	n.b.	n.b.	0,31	0,31	0,02	0,03
RSSa (108)	n.b.	n.b.	0,06	0,04	0,02	0,01
RSSa (112)	n.b.	n.b.	0,02	0,01	0,00	0,00
RSSa (114)	0,58	n.b.	0,06	0,01	0,02	0,02
RSSa (129)	n.b.	n.b.	0,01	0,00	0,00	0,00

	Wurzeln		Stolone	
	MW	SD	MW	SD
	$\mu\text{mol/}$	g TM	$\mu\text{mol/}$	g TM
WT	1,15	0,24	1,10	0,24
U-IN1 (33)	0,46	0,10	0,20	0,07
RSSa (99)	0,51	0,27	0,11	0,12
RSSa (108)	0,56	0,39	0,23	0,14
RSSa (112)	n.b.	n.b.	0,89	0,40
RSSa (114)	0,03	0,03	n.b.	n.b.
RSSa (129)	n.b.	n.b.	0,02	n.b.

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin  $A_3$  und  $B_2$  dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 1-3 Bestimmungen von einer Pflanze. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt  
Wertetabelle zu Abb. C-16.

Tab. G-15: Gesamtcalystegingehalt in transgenen Kartoffelpflanzen der zweiten Generation im Vergleich zum Wildtyp.

	Blüten		junge Blätter		alte Blätter	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT	n.b.	n.b.	0,05	0,02	0,03	0,01
U-IN1 (3)	1,62	0,82	0,16	0,06	0,03	0,04
U-IN1 (33)	1,54	0,92	0,31	0,09	0,07	0,03
U-IN1 (41)	0,95	0,28	0,36	0,14	0,02	0,01
RSSa (99)	0,99	0,23	1,16	0,78	0,03	0,01
RSSa (108)	1,02	0,69	1,15	0,74	0,05	0,04
RSSa (112)	1,46	0,34	0,10	0,03	0,04	0,02
RSSa (114)	0,92	0,56	0,43	0,25	0,02	0,00
RSSa (129)	n.b.	n.b.	0,23	0,04	0,03	0,02

	Wurzeln		Stolone	
	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT	2,31	1,14	1,80	1,70
U-IN1 (3)	4,07	2,23	2,97	1,43
U-IN1 (33)	15,43	1,40	6,37	4,02
U-IN1 (41)	11,68	0,69	5,95	1,03
RSSa (99)	12,33	3,20	6,66	2,73
RSSa (108)	5,22	3,49	1,73	0,94
RSSa (112)	11,76	0,83	4,99	n.b.
RSSa (114)	6,40	1,70	0,34	0,32
RSSa (129)	7,36	0,67	4,48	3,80

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 1-3 Bestimmungen von einer Pflanze. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt

Wertetabelle zu Abb. C-16.

#### G.1.2.4 Calystegingehalt in Kartoffelknollen nach Kältelagerung

Tab. G-16: Gesamtcalysteginakkumulation in verschiedenen Geweben von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp nach 5monatiger Kältelagerung.

	Mark		Gefäßring		Schale	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT	0,83	0,16	1,35	0,28	33,72	5,44
U-IN1 (3)	3,92	2,18	6,27	0,94	25,24	6,44
U-IN1 (33)	1,65	0,80	1,96	0,49	46,61	2,05
U-IN1 (41)	2,46	1,07	3,82	0,53	29,15	6,84
RSSa (99)	1,48	0,48	2,14	0,78	17,48	1,95
RSSa (108)	1,02	0,51	2,07	0,36	21,34	13,99
RSSa (112)	3,16	0,98	5,58	2,94	21,78	5,00
RSSa (114)	0,35	0,22	2,13	1,98	4,65	2,74
RSSa (129)	0,40	0,08	0,61	0,18	5,72	3,03

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 3 unabhängigen Bestimmungen von 3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben. Wertetabelle zu Abb. C-23.

### G.1.2.5 Calystegingehalt in Kartoffeln mit gehemmter ATP/ADP-Transporteraktivität

Tab. G-17: Gesamtcalysteginakkumulation in der Schale von Kartoffeln mit gehemmter ATP/ADP-Transporteraktivität im Vergleich zum Wildtyp.

	Schale	
	MW	SD
	µmol/ g TM	
Wildtyp	3,03	1,13
JT 595	15,24	4,12
JT 654	18,32	5,93

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar. Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 4 unabhängigen Bestimmungen von 4 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben.

### G.1.3 Intermediate der Biosynthese

#### G.1.3.1 Intermediate in Keimen

Tab. G-18: Pseudotropinakkumulation in Keimen (1 cm) von transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp nach Tropinonapplikation.

	Pseudotropin	
	MW	SD
	µmol/ g TM	
WT	42,51	2,87
U-IN1 (3)	28,77	4,40
U-IN1 (33)	53,21	23,66
U-IN1 (41)	21,61	1,82
RSSa (99)	27,99	38,16
RSSa (108)	4,76	5,88
RSSa (112)	24,59	n.b.
RSSa (114)	11,70	14,63
RSSa (129)	29,69	11,07

Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 1-3 unabhängigen Bestimmungen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt; Wertetabelle zu Abb. C-15.

#### G.1.3.2 Intermediate in Kartoffelpflanzen

Tab. G-19: Pseudotropinakkumulation in Geweben von transgenen Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp nach Tropinonapplikation.

	Blüten		junge Blätter		alte Blätter	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT	n.b.	n.b.	21,23	8,89	11,37	1,99
U-IN1 (3)	n.b.	n.b.	43,80	19,36	17,45	7,57
U-IN1 (33)	1,20	0,15	24,76	12,43	11,72	4,09
U-IN1 (41)	2,45	0,83	20,13	2,16	14,34	4,73
RSSa (99)	1,73	0,35	22,60	4,54	19,38	5,50
RSSa (108)	2,22	0,97	37,37	10,31	20,03	6,80
RSSa (112)	2,18	0,73	14,25	2,92	33,26	4,59
RSSa (114)	1,96	0,49	22,74	1,12	12,32	1,07
RSSa (129)	n.b.	n.b.	45,75	8,78	26,84	6,95

	Wurzeln		Stolone	
	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT	49,85	20,58	5,50	5,16
U-IN1 (3)	103,47	16,32	15,40	6,72
U-IN1 (33)	91,81	5,58	37,81	2,62
U-IN1 (41)	81,69	10,87	25,80	11,04
RSSa (99)	118,89	20,37	46,44	19,67
RSSa (108)	119,29	4,12	20,70	0,28
RSSa (112)	117,87	51,98	20,81	2,37
RSSa (114)	57,63	10,63	17,93	5,87
RSSa (129)	189,47	112,03	27,66	17,83

Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 2-3 unabhängigen Bestimmungen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt; Wertetabelle zu Abb. C-22.

### G.1.3.3 Intermediate in Kartoffelknollen nach Kältelagerung

Tab. G-20: Tropin- und Pseudotropinakkumulation in Geweben von kältelagerten transgenen Kartoffelknollen im Vergleich zum Wildtyp nach Tropinonapplikation.

	Mark	Tropin	Gefäßring	Tropin
	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT	4,02	1,92	10,81	4,54
U-IN1 (3)	10,34	n.b.	n.b.	n.b.
U-IN1 (33)	16,85	6,21	11,40	2,91
U-IN1 (41)	6,83	4,52	10,25	8,62
RSSa (99)	8,05	0,47	11,42	1,09
RSSa (108)	8,08	n.b.	7,14	2,20
RSSa (112)	10,76	n.b.	6,82	n.b.
RSSa (114)	8,09	2,39	8,12	0,93
RSSa (129)	n.b.	n.b.	4,07	n.b.

	Schale	Tropin	Schale	Pseudotropin
	MW	SD	MW	SD
	µmol/ g TM		µmol/ g TM	
WT	15,62	1,01	n.b.	n.b.
U-IN1 (3)	n.b.	n.b.	0,32	0,12
U-IN1 (33)	31,49	3,33	1,19	0,36
U-IN1 (41)	24,94	1,01	n.b.	n.b.
RSSa (99)	23,74	3,13	n.b.	n.b.
RSSa (108)	13,94	2,89	n.b.	n.b.
RSSa (112)	16,39	6,59	n.b.	n.b.
RSSa (114)	7,14	2,17	n.b.	n.b.
RSSa (129)	0,92	0,33	n.b.	n.b.

Die Daten sind Mittelwerte (MW) aus 1-3 unabhängigen Bestimmungen von 3 Kartoffelknollen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben; n.b. nicht bestimmt Wertetabelle zu Abb. C-26.

## G.2 Parallele Analyse von Calysteginen und Stoffwechselmetaboliten

### G.2.1 Calysteginakkumulation

#### G.2.1.1 Calystegingehalt in Keimen

Tab. G-21: Calystegingehalt in Keimen (< 1 cm) von transgenen Kartoffeln im Vergleich.

	Calystegin A <sub>3</sub>		Calystegin B <sub>2</sub>		Calystegin B <sub>4</sub>	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
WT > 1 cm	1,00	0,05	1,00	0,06	1,00	0,12
WT < 1 cm	0,61	0,08	0,51	0,07	0,57	0,08
U-IN1 (3)	1,01	0,11	1,02	0,09	1,35	0,08
U-IN1 (33)	1,19	0,08	1,22	0,09	1,63	0,12
U-IN1 (41)	0,86	0,04	0,86	0,04	1,18	0,02
RSSa (99)	1,31	0,14	1,31	0,11	0,69	0,07
RSSa (108)	0,91	0,11	0,86	0,10	0,70	0,07
RSSa (112)	2,91	n.b.	2,38	n.b.	1,25	n.b.
RSSa (114)	1,10	0,04	1,09	0,03	0,80	0,03
RSSa (129)	1,75	0,22	1,65	0,16	1,50	0,24
RSSa (130)	1,05	0,03	1,01	0,01	0,87	0,05

Der Calystegingehalt wird als Verhältnis zum Wildtyp Keim < 1 cm angegeben.

Der Mittelwert (MW) ergibt sich aus 1-7 Bestimmungen; die Standardabweichung (SD) ist angegeben; für Linie RSSa (112) war mangels Biomasse nur eine Einfachbestimmung möglich. Wertetabelle zu Abb. C-33.

#### G.2.1.2 Calystegingehalt in der Schale

Tab. G-22: Calystegingehalt in 1-2 mm Schale von transgenen Kartoffelknollen 106 Tage nach der Ernte im Vergleich.

	Calystegin A <sub>3</sub>		Calystegin B <sub>2</sub>		Calystegin B <sub>4</sub>	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
WT	1,00	0,15	1,00	0,12	1,00	0,18
U-IN1 (3)	0,18	0,03	0,19	0,05	0,41	0,04
U-IN1 (33)	1,31	0,24	1,48	0,17	1,32	0,28
U-IN1 (41)	1,06	0,16	0,70	0,07	0,85	0,17
U-IN2 (17)	0,59	0,14	0,63	0,18	6,29	1,40
U-IN2 (30)	0,64	0,09	0,70	0,13	5,31	0,52
U-IN2 (33)	0,67	0,19	1,01	0,12	3,56	0,96
U-IN2 (34)	0,94	0,23	1,05	0,11	4,15	0,98
U-IN2 (42)	0,89	0,17	1,16	0,33	2,64	0,48
RSSa (99)	1,86	0,19	2,29	0,24	0,80	0,10
RSSa (108)	2,13	0,30	2,26	0,23	0,97	0,18
RSSa (112)	5,02	0,95	5,65	0,88	1,63	0,51
RSSa (114)	0,83	0,12	0,81	0,09	0,45	0,11
RSSa (129)	0,80	0,13	1,70	0,30	1,03	0,17
RSSa (130)	3,22	0,68	3,20	0,45	1,35	0,35

Der Calystegingehalt wird als Verhältnis zum Wildtyp angegeben. Der Mittelwert (MW) ergibt sich aus 4-5 Bestimmungen; die Standardabweichung (SD) ist angegeben. Wertetabelle zu Abb. C-34.

### G.2.1.3 Calystegingehalt in der Schale während der Lagerung

Tab. G-23: Calystegingehalt in Kartoffelschalen der jeweils transformationsstärksten Linien während der Lagerung 106, 120 und 155 Tage nach der Ernte.

Wildtyp	Tage nach der Ernte		
	106	120	155
Calystegin A3	1,00	2,57	1,22
Calystegin B2	1,00	2,10	0,85
Calystegin B4	1,00	2,40	1,11

U-IN1 (33)	Tage nach der Ernte		
	106	120	155
Calystegin A3	1,00	0,71	0,54
Calystegin B2	1,00	0,46	0,39
Calystegin B4	1,00	1,98	0,77

U-IN2 (17)	Tage nach der Ernte		
	106	120	155
Calystegin A3	1,00	0,43	n.b.
Calystegin B2	1,00	0,50	n.b.
Calystegin B4	1,00	1,37	n.b.

RSSa (112)	Tage nach der Ernte		
	106	120	155
Calystegin A3	1,00	0,80	0,39
Calystegin B2	1,00	0,67	0,52
Calystegin B4	1,00	1,30	0,98

Die Ergebnisse ergaben sich jeweils als Verhältnis der Resultate am Tag 120 (155) zum Tag 106; Die Mittelwerte (MW) wurden aus 4-6 Einzelwerten gebildet. Standardabweichungen (SD) lagen zwischen 5,2 und 31,5%; n.b. nicht bestimmt; Wertetabellen zu Abb. C-35.

Wildtyp; Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase; Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase; Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese

## G.2.2 Akkumulation von Stoffwechselmetaboliten

### G.2.2.1 Stoffwechselmetabolite in Keimen

Tab. G-24: Stoffwechselmetabolite in Keimen von Wildtyp- und transgenen Kartoffeln.

	WT < 1 cm	WT > 1 cm	U-IN1 (33)	RSSa (112)
Fructose	1,00	1,65	1,55	1,53
Glucose	1,00	1,42	0,60	1,52
Maltose	1,00	0,74	0,75	2,20
Raffinose	1,00	0,32	1,00	0,30
Saccharose	1,00	0,80	1,00	1,82
Trehalose	1,00	0,71	1,00	1,89
Galactinol	1,00	0,89	1,00	0,48
<i>myo</i> -Inositol	1,00	1,00	1,31	0,52
Mannitol	1,00	1,00	1,00	0,29
Fructose-6-phosphat	1,00	0,64	1,00	2,80
Glucose-6-phosphat	1,00	1,00	1,00	2,57
<i>myo</i> -Inositolphosphat	1,00	0,70	1,00	2,10
Mannose-6-phosphat	1,00	0,63	1,00	2,22
Glycin	1,00	0,81	0,89	0,85
Leucin	1,00	1,00	1,00	1,08
Lysin	1,00	0,75	1,00	0,60
Arginin	1,00	0,71	1,00	0,34
Ornithin	1,00	0,69	1,00	0,43
Serin	1,00	1,00	1,00	1,16
Tryptophan	1,00	0,64	0,85	1,06
Tyrosin	1,00	0,65	0,88	0,78
Putrescin	1,00	0,78	1,45	2,11
3-trans-Chlorogensäure	1,00	0,60	1,00	1,84
Glycerinsäure	1,00	0,74	1,10	1,58
Gluconsäure	1,00	0,72	0,76	1,38
2-Ketoglutarinsäure	1,00	1,36	0,53	0,69

Die Ergebnisse sind für Wildtyp-Keime < 1 cm; für Wildtyp-Keime > 1 cm; für Keime von Kartoffeln der Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase und für Keime der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese dargestellt. Das Ergebnis ergibt sich als Verhältnis zu Wildtyp-Keimen < 1 cm. Die Daten sind Mittelwerte aus 1–6 Bestimmungen. Es wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, die sich signifikant vom Ergebnis des Wildtyp-Keims < 1 cm unterschieden (t-Test,  $P < 0,05$ ). Für Linie RSSa (112) war kein t-Test möglich. Wertetabelle zu Abb. C-36.

Tab. G-25: Faktorladungen der extrahierten Faktoren bei der Hauptkomponentenanalyse von Keimen.

Substanz	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
Mannose-6-phosphat	0,976					
Fructose-6-phosphat	0,951					
3-trans-Chlorogensäure	0,949					
Glucose-6-phosphat	0,914					
myo-Inositolphosphat	0,903					
Trehalose	0,900					
Maltose	0,826		-0,408			
Putrescin	0,788		0,415			
Glycerinsäure	0,780			0,441		
Saccharose	0,758			0,405		
Calystegin A3	0,742					0,519
Tryptophan	0,742			0,438		
Calystegin B2	0,739					0,497
Mannitol	-0,636	0,622				
Ornithin		0,864				
Lysin		0,851				
Arginin	-0,443	0,823				
myo-Inositol		0,796				
Galactinol		0,794				
Tyrosin		0,760				
Glycin		0,733				
Raffinose	0,429	0,703			-0,402	
Leucin		0,557				0,502
2-Ketoglutarinsäure			-0,898			
Glucose			-0,895			
Calystegin B4	0,491	0,401	0,709			
Gluconsäure	0,460			0,792		
Fructose					0,959	
Serin		0,462				0,533

Extraktionsmethode: Hauptkomponentenanalyse  
 Rotationsmethode: Varimax mit Kaiser Normalisierung  
 Werte mit einem Betrag < 0,4 sind nicht angegeben

Tab. G-26: Faktorwerte der extrahierten Faktoren bei der Hauptkomponentenanalyse von Keimen.

Linie	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
WT < 1 cm	0,61	1,51	-1,07	0,50	-0,98	-0,50
WT < 1 cm	0,45	1,65	-1,04	0,07	-1,10	0,74
WT < 1 cm	-0,45	0,54	-0,09	0,80	-1,52	0,37
WT < 1 cm	-0,45	0,99	-0,27	1,13	-0,69	0,41
WT < 1 cm	-0,87	0,21	0,29	1,20	-1,65	0,45
WT > 1 cm	-0,95	0,14	-1,37	-0,32	1,14	-0,43
WT > 1 cm	-1,71	-0,45	-1,38	0,76	1,95	-1,08
WT > 1 cm	-1,80	-0,39	-0,95	1,07	1,14	-0,16
WT > 1 cm	-1,50	-0,12	-1,23	-0,38	1,44	0,37
WT > 1 cm	-2,39	-2,44	0,36	-1,72	-1,18	-1,68
WT > 1 cm	-1,09	0,04	-1,66	0,03	1,28	-1,04
U-IN1 (3)	-0,62	0,55	1,14	0,97	-0,06	-0,85
U-IN1 (3)	-0,29	1,03	1,02	-0,14	-0,24	0,35
U-IN1 (3)	-0,54	0,95	1,15	0,12	0,00	0,41
U-IN1 (3)	-1,19	0,65	1,99	1,77	-0,53	1,65
U-IN1 (33)	-0,22	0,08	1,77	0,53	0,11	-1,29
U-IN1 (33)	0,21	0,55	1,37	-1,14	0,35	-0,36
U-IN1 (33)	0,34	1,05	1,19	-0,58	1,20	0,13
U-IN1 (33)	-0,13	0,52	1,39	-0,45	0,53	0,52
U-IN1 (33)	-0,47	0,09	1,63	0,24	0,37	0,40
U-IN1 (33)	-0,14	0,30	1,72	-0,48	0,63	0,18
U-IN1 (41)	0,63	0,82	-0,07	-1,64	-0,41	-1,45
U-IN1 (41)	0,49	0,85	-0,02	-1,35	-0,14	-1,35
U-IN1 (41)	0,26	0,57	0,12	-1,32	-0,03	-0,89
U-IN1 (41)	0,44	0,91	-0,06	-0,27	-0,30	-0,97
U-IN1 (41)	0,13	0,88	0,08	-0,99	-0,16	0,65
U-IN1 (41)	-0,02	0,63	0,21	0,33	0,25	-0,78
RSSa (99)	0,40	0,14	-1,12	-0,53	-0,40	0,58
RSSa (99)	0,47	0,08	-1,21	-1,22	-0,24	1,00
RSSa (99)	-0,87	-1,73	0,17	-2,36	-1,56	1,29
RSSa (99)	0,01	-0,52	-0,77	-0,06	0,13	0,45
RSSa (99)	0,16	0,13	-1,09	-0,33	0,17	2,20
RSSa (99)	-0,11	-0,78	-0,61	-1,42	0,12	1,02
RSSa (99)	-0,68	-1,08	-0,14	0,08	-0,20	1,42
RSSa (108)	-0,10	-1,88	-0,17	1,38	-1,96	-0,50
RSSa (108)	0,38	-1,15	-0,82	2,82	-0,64	-0,81
RSSa (112)	2,17	-1,52	-0,23	0,43	0,76	2,80
RSSa (114)	1,32	0,13	-0,93	0,37	-1,54	-0,89
RSSa (114)	1,37	0,15	-0,63	0,32	-1,09	-1,24
RSSa (114)	1,12	0,07	-0,72	-0,29	-1,14	-0,08
RSSa (129)	2,43	-0,77	-0,06	0,63	1,88	-0,91
RSSa (129)	1,99	-1,48	0,75	0,09	0,96	-0,95
RSSa (129)	1,05	-2,73	1,61	0,04	0,45	-0,29
RSSa (130)	0,37	0,78	-0,49	0,21	1,94	0,71
RSSa (130)	-0,21	0,01	0,25	1,12	0,95	0,39

Die Faktoren 1 und 2 bilden die Grundlage der Abb. C-37.

## G.2.2.2 Stoffwechselmetabolite in der Schale

Tab. G-27: Stoffwechselmetabolite in 1-2 mm Schale von Wildtyp- und transgenen Kartoffeln.

	WT	U-IN1 (33)	U-IN2 (17)	RSSa (112)
Fructose	1,00	28,03	2,33	12,93
Glucose	1,00	17,33	588,38	17,03
Raffinose	1,00	5,51	0,63	0,70
Saccharose	1,00	0,07	0,01	0,61
Trehalose	1,00	5,81	8,90	0,95
Galactinol	1,00	2,33	0,05	0,43
<i>myo</i> -Inositol	1,00	0,85	0,11	0,45
Mannitol	1,00	1,12	5,75	0,25
Fructose-6-phosphat	1,00	1,22	2,06	0,62
Glucose-6-phosphat	1,00	1,60	4,67	0,82
<i>myo</i> -Inositolphosphat	1,00	0,83	9,00	0,98
Mannose-6-phosphat	1,00	1,04	2,38	0,71
Glycin	1,00	0,84	8,67	1,59
Leucin	1,00	1,13	3,69	0,85
Lysin	1,00	0,85	0,58	2,05
Arginin	1,00	1,82	2,79	1,62
Ornithin	1,00	1,70	2,64	1,52
Serin	1,00	0,69	2,81	0,99
Tryptophan	1,00	0,73	2,19	0,54
Tyrosin	1,00	0,94	4,55	1,22
Spermidin	1,00	0,56	0,17	0,39
Putrescin	1,00	0,57	0,03	0,36
2-Ketoglutar säure	1,00	0,52	0,54	0,70
Gluconsäure	1,00	0,40	2,37	1,00
Glycerinsäure	1,00	0,42	10,39	1,00
3-trans-Chlorogensäure	1,00	0,46	0,51	0,65

Die Ergebnisse sind für den Wildtyp, für Kartoffeln der Linie U-IN1 (33) mit apoplastisch überexprimierter Invertase, für Kartoffeln der Linie U-IN2 (17) mit cytosolisch überexprimierter Invertase und für Kartoffeln der Linie RSSa (112) mit supprimierter Saccharosesynthese dargestellt. Das Ergebnis ergibt sich als Verhältnis zu den Wildtyp-Kartoffeln. Die Daten sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen. Es wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, die sich signifikant vom Ergebnis des Wildtyps unterschieden (t-Test,  $P < 0,05$ ). Wertetabelle zu Abb. C-38.

Tab. G-28: Faktorladungen der extrahierten Faktoren bei der Hauptkomponentenanalyse von der Schale.

Substanz	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
Glucose-6-phosphat	0,932					
myo-Inositolphosphat	0,928					
Mannose-6-phosphat	0,926					
Fructose-6-phosphat	0,917					
Glycerinsäure	0,861					
Glycin	0,837	0,414				
Trehalose	0,833					
Gluconsäure	0,833		0,432			
Calystegin B4	0,831					
Galactinol	-0,828					
Glucose	0,790	0,465				
myo-Inositol	-0,789					
Tyrosin	0,742	0,443				
Mannitol	0,721					
Tryptophan	0,666				0,537	
Leucin	0,661	0,524				
Serin	0,607	0,474			0,490	
2-Ketoglutarsäure		-0,851				
Spermidin	-0,505	-0,710				
Putrescin	-0,606	-0,704				
Calystegin A3			-0,907			
Calystegin B2			-0,894			
Raffinose			0,740		-0,441	
3-trans-Chlorogensäure				0,854		
Saccharose	-0,556			0,655		
Lysin	-0,549			0,609		
Fructose					-0,801	
Arginin						0,876
Ornithin		0,512				0,639

Extraktionsmethode: Hauptkomponentenanalyse  
 Rotationsmethode: Varimax mit Kaiser Normalisierung  
 Werte mit einem Betrag < 0,4 sind nicht angegeben

Tab. G-29: Faktorwerte der extrahierten Faktoren bei der Hauptkomponentenanalyse von der Schale.

Linie	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
WT	-0,10	-1,70	0,08	0,53	0,75	-0,99
WT	-0,45	-1,43	0,04	-0,04	0,99	-1,42
WT	-0,62	-1,45	0,20	-0,06	1,55	-1,10
WT	-0,55	-0,97	0,22	0,53	1,30	-1,97
WT	-0,13	-2,00	-0,13	-0,02	0,62	-1,08
U-IN1 (3)	-0,74	-1,07	2,22	-0,61	-0,54	1,63
U-IN1 (3)	-0,87	-0,81	2,32	-0,53	-0,55	1,57
U-IN1 (3)	-1,29	-0,69	2,52	-0,97	0,02	1,59
U-IN1 (3)	-1,29	-0,23	2,39	-0,87	0,01	1,50
U-IN1 (3)	-1,36	0,18	3,14	-0,01	0,13	1,29
U-IN1 (33)	0,21	-0,55	0,05	-0,49	-2,05	-0,67
U-IN1 (33)	0,29	-0,86	0,22	0,11	-1,80	0,62
U-IN1 (33)	-0,07	-0,66	0,10	-0,80	-1,64	-0,07
U-IN1 (33)	-0,63	0,21	0,26	-1,33	-1,52	-0,87
U-IN1 (33)	-0,62	0,30	0,54	-0,56	-1,25	-0,60
U-IN1 (41)	-0,50	-0,10	0,70	-0,78	-1,31	-1,73
U-IN1 (41)	-0,85	0,51	0,97	-0,79	-1,27	-2,47
U-IN1 (41)	-1,01	0,82	0,85	-1,41	-1,14	-2,03
U-IN1 (41)	-0,04	-0,36	0,75	-0,27	-1,68	-2,17
U-IN2 (17)	1,78	-0,59	-0,18	-1,33	0,25	0,28
U-IN2 (17)	1,72	-0,21	0,03	-1,03	0,59	0,72
U-IN2 (17)	1,95	-0,27	-0,06	-0,63	0,73	0,54
U-IN2 (17)	0,58	0,89	0,11	-3,15	1,22	-1,34
U-IN2 (17)	1,17	0,48	0,07	-1,79	1,81	0,87
U-IN2 (30)	2,15	-1,07	-0,10	-0,92	-0,25	0,12
U-IN2 (30)	2,23	-1,06	0,18	-0,61	-0,06	0,30
U-IN2 (30)	2,01	-0,30	0,25	-0,64	-0,06	-0,67
U-IN2 (30)	1,75	0,03	0,30	-1,12	0,33	-0,14
U-IN2 (30)	2,30	-0,14	0,40	0,24	0,36	-0,25
U-IN2 (33)	1,71	-0,42	0,14	1,00	-0,56	-0,22
U-IN2 (33)	1,17	0,59	0,48	0,86	-0,09	-0,31
U-IN2 (33)	1,27	0,47	0,56	0,89	0,01	-0,81
U-IN2 (33)	1,14	1,20	0,76	1,35	0,28	-1,03
U-IN2 (33)	0,60	1,89	0,77	0,52	0,21	-2,44
U-IN2 (34)	1,33	0,12	-0,32	0,10	-0,58	1,14
U-IN2 (34)	1,44	0,67	-0,45	0,99	-0,76	1,77
U-IN2 (34)	1,33	0,87	-0,17	0,84	0,07	0,59
U-IN2 (34)	0,83	1,46	0,06	0,35	0,37	-0,20
U-IN2 (34)	0,94	1,54	0,40	0,99	0,99	0,33
U-IN2 (42)	-0,17	1,53	-0,38	-0,68	0,03	1,32
U-IN2 (42)	-0,39	2,02	-0,25	-0,84	0,21	0,89
U-IN2 (42)	-0,39	2,19	-0,06	-0,48	0,54	0,66
U-IN2 (42)	-0,84	2,94	0,35	-0,38	1,04	0,82
U-IN2 (42)	-0,29	2,73	-0,01	0,38	0,85	0,51

Linie	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
RSSa (99)	-0,27	-1,60	-0,88	-0,08	0,91	0,17
RSSa (99)	-0,30	-1,37	-0,60	0,55	1,16	0,31
RSSa (99)	-0,63	-0,74	-0,58	0,19	1,39	-0,50
RSSa (99)	-0,65	-0,27	-0,41	0,66	1,46	-1,08
RSSa (99)	-0,49	-0,49	-0,41	1,25	1,90	-0,78
RSSa (108)	-0,41	-0,80	-0,98	0,40	-0,37	0,96
RSSa (108)	-0,76	-0,33	-0,77	0,24	-0,16	0,48
RSSa (108)	-0,68	-0,15	-0,73	0,38	-0,18	0,52
RSSa (108)	-0,91	0,35	-0,52	0,86	0,10	0,00
RSSa (108)	-0,91	0,53	-0,63	1,26	0,23	-0,14
RSSa (112)	-0,45	-0,10	-2,54	-1,23	-1,49	0,35
RSSa (112)	-0,01	-0,33	-2,34	0,11	-1,56	0,75
RSSa (112)	-0,51	0,27	-2,23	-0,31	-1,27	0,23
RSSa (112)	-1,27	0,95	-2,08	-1,70	-1,00	-0,01
RSSa (112)	-0,82	0,89	-2,24	-0,01	-1,12	-0,48
RSSa (114)	0,24	-0,80	0,03	1,63	-1,28	1,17
RSSa (114)	-0,20	-0,30	0,21	1,33	-1,10	0,37
RSSa (114)	-0,14	-0,17	0,07	1,55	-0,98	0,57
RSSa (114)	-0,32	0,30	0,46	2,09	-0,68	0,23
RSSa (114)	-0,22	0,16	0,52	2,70	-0,57	0,23
RSSa (129)	-0,19	-0,74	-0,18	0,66	-0,39	0,37
RSSa (129)	-0,42	-0,62	0,05	0,01	-0,27	-0,14
RSSa (129)	-0,75	-0,13	-0,06	-0,08	0,04	0,11
RSSa (129)	-0,56	0,26	0,12	0,85	-0,04	0,40
RSSa (129)	-0,60	0,75	0,24	1,41	-0,02	-1,02
RSSa (130)	-0,35	-1,09	-0,88	0,22	0,86	0,63
RSSa (130)	-1,15	-0,82	-0,99	-1,89	1,32	1,55
RSSa (130)	-0,52	-0,75	-0,94	0,21	1,30	0,89
RSSa (130)	-1,32	0,23	-0,54	-0,42	1,61	-0,22
RSSa (130)	-1,11	0,20	-0,45	0,64	2,03	-0,34

Die Faktoren 1 und 2 bilden die Grundlage der Abb. C-39.

### G.3 Wirkung von Kohlenhydraten auf die Calysteginbiosynthese

#### G.3.1 Calysteginakkumulation in Keimen

Tab. G-30: Gesamtcalysteginakkumulation in 1-2 cm langen Keimen nach Kohlenhydratapplikation.

Zucker	MW	SD
	µmol/ g TM	
Wasser	9,56	3,26
Sorbitol	10,78	4,94
Glucose	19,37	4,32
Fructose	15,46	2,87
Galactose	13,29	3,77
Saccharose	13,54	4,64
Trehalose	17,41	0,38
Raffinose	13,90	2,72

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und Calystegin B<sub>2</sub> dar; Die Mittelwerte (MW) ergeben sich aus 4 unabhängigen Bestimmungen; Standardabweichungen (SD) sind angegeben. Wertetabelle zu Abb. C-42.

#### G.3.2 Calysteginakkumulation in der Schale

Tab. G-31: Gesamtcalysteginakkumulation in 1-2 mm Schale nach Kohlenhydratapplikation.

Zucker	MW	SD
	µmol/ g TM	
Wasser	0,74	0,14
Sorbitol	0,54	0,20
Glucose	0,93	0,50
Fructose	0,70	0,48
Galactose	1,56	0,70
Saccharose	1,91	0,92
Trehalose	1,43	0,84
Raffinose	2,39	0,19

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und Calystegin B<sub>2</sub> dar; Die Mittelwerte (MW) ergeben sich aus 4 unabhängigen Bestimmungen; Standardabweichungen (SD) sind angegeben. Wertetabelle zu Abb. C-43.

### G.3.3 Calysteginakkumulation bei Kältestress

Tab. G-32: Gesamtcalysteginakkumulation in Wildtyp-Knollengeweben bei verschiedenen Lagerungstemperaturen.

Lagerung: Temperatur und Dauer	MW	SD	Gewebe
	$\mu\text{mol/ g TM}$		
0	3,03	1,13	Schale
83 (25°C)	5,17	2,79	Schale
132 (25°C)	1,74	0,19	Schale
132 (25°C)	0,13	0,04	Mark
132 (25°C)	0,25	0,09	Gefäßring
132 (4°C)	10,82	0,76	Schale
132 (4°C)	0,54	0,03	Mark
132 (4°C)	1,05	0,09	Gefäßring

Der Calystegingehalt stellt die Summe aus Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> dar; Die Mittelwerte (MW) ergeben sich aus 2-4 unabhängigen Bestimmungen; Standardabweichungen (SD) sind angegeben. Wertetabelle zu Abb. C-47.

## G.4 Calysteginwirkung auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels

### G.4.1 Wirkung von Calystegin B<sub>2</sub> auf die Phosphoglucomutase

Tab. G-33: Beeinflussung der Enzymaktivität der Phosphoglucomutase durch Calystegin B<sub>2</sub>.

Calystegin- konzentration	MW	SD
0,00	0,22	0,05
0,25	0,08	0,03
0,50	0,09	0,04

Die Werte sind als Absorptionsänderung pro Minute ( $\text{min}^{-1}$ ) angegeben. Die Mittelwerte (MW) für die Phosphoglucomutase ergeben sich aus 4-10 Einzelmessungen. Standardabweichungen (SD) sind angegeben. Wertetabelle zu Abb. C-49.

### G.4.2 Wirkung von Calystegin B<sub>2</sub> auf die UDPGlucose-Pyrophosphorylase

Tab. G-34: Beeinflussung der Enzymaktivität der UDPGlucose-Pyrophosphorylase durch Calystegin B<sub>2</sub>.

Calystegin- konzentration	UTP- konzentration
0,00	0,82
0,25	0,82
0,50	0,76
1,00	0,85

Die Daten für die UDPGlucose-Pyrophosphorylase sind Einzelbestimmungen, die aber durch weitere Messungen belegt wurden. Die gebildete UTP-Konzentration ist in mM angegeben. Wertetabelle zu Abb. C-49

---

## Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Birgit Dräger für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung eines hoch interessanten Themas. Meine Forschungstätigkeit hat sie mit Interesse verfolgt. Ich danke ihr für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie die Freiheit bei der Bearbeitung der Thematik.

Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald von der Universität Erlangen (vorher IPK Gatersleben) danke ich für die Bereitstellung der transgenen Kartoffelknollen.

Herrn Dr. Joachim Kopka vom Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm danke ich für die Möglichkeit der Metabolitenprofilanalysen am dortigen Institut. Besonders dankbar bin ich ihm für die fachliche Unterstützung, insbesondere für die Einführung in die Metabolomics-Problematik und die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse. Darüber hinaus danke ich der gesamten AG Kopka, insbesondere Frau Nicole Gatzke und Frau Ines Fehrlé, für die technische Unterstützung bei den GC-MS Messungen und für das nette Arbeitsklima.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Dräger sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Biologie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Beate Schöne, Frau Ursula Ködel, Frau Anja Wodak, Frau Brigitte Marx und Frau Dorothea Watzka für ihre hilfsbereite Unterstützung im technischen Bereich, besonders bei der Aufarbeitung der vielen Proben.

Für eine gute Zusammenarbeit im Rahmen von Diplomarbeiten danke ich Frau Anne-Katrin Fabian, Frau Stefanie Goedeke und Frau Kathleen Menzel.

Frau Dr. Margret Köck und Frau Karin Klar vom Biozentrum der Universität danke ich für die Möglichkeit der Pflanzenkultivierung im Gewächshaus sowie für die Nutzung des Phosphorimagers. Frau Dr. Angela Peterson danke ich für zahlreiche Sequenzierungen.

Frau Heike Kaiser danke ich für die Bereitstellung von gereinigten Antikörpern für die Western Blot Analysen.

Für die Einführung in die statistische Auswertung danke ich Frau Ingrid Haufe vom Rechenzentrum der Martin-Luther Universität Halle.

Meiner Familie möchte ich mit dieser Arbeit ganz herzlich für jegliche Unterstützung auf meinem Weg bis hierher danken.

Am Ende danke ich allen nicht genannten Personen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde an keiner anderen Hochschule oder Universität eingereicht.

Halle (Saale), den 27.07.06

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Ute Richter  
Geburtstag: 03.04.1978  
Geburtsort: Torgau  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

1984-1991 Polytechnische Oberschule Ernst Legal Schlieben  
1991-1997 Philipp Melanchthon Gymnasium Herzberg (Elster)

## Studium:

1997-2001 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther Universität  
Halle-Wittenberg  
Oktober 2001-März 2002 Diplomarbeit an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg  
Thema: Tropanalkaloidbiosynthese in TR-I überexprimierenden  
*Atropa belladonna* L. Wurzelkulturen  
Abschluss Juli 2002 Diplom-Pharmazeutin  
April 2002-September 2002 Pharmaziepraktikum in der Markt-Apotheke in Luckau  
November 2002 Approbation als Apothekerin

## Beruf:

November – Dezember 2002 Arbeit als Apothekerin in der Markt-Apotheke in Luckau

## Promotion:

Januar 2003- Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische  
Biologie und Pharmakologie der Martin-Luther Universität Halle-  
Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Birgit Dräger