

Gene, Enzyme & Produkte  
der (Nor)tropanalkaloidbiosynthese  
in *Cochlearia officinalis* L.

Dissertation

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

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

von  
Frau Andrea Brock  
geb. am 27.05.1977 in Hoyerswerda

Gutachterin bzw. Gutachter  
1. Prof. Dr. Birgit Dräger, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2. Prof. Dr. Wolfgang Kreis, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
3. Prof. Dr. Claus Wasternack, Institut für Pflanzenbiochemie Halle

Halle(Saale), 04.03.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
A1	Tropan- und Nortropanalkaloide und ihr Stoffwechsel . . . . .	13
A1.1	Tropanalkaloide . . . . .	13
A1.2	Calystegine . . . . .	14
A1.3	Biosynthese . . . . .	18
A2	Pflanzenfamilien . . . . .	23
A2.1	Moraceae LINK . . . . .	23
A2.2	Brassicaceae BURNETT . . . . .	23
A3	Aufgabenstellung . . . . .	25
<b>B</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>26</b>
B1	Materialien . . . . .	26
B1.1	Pflanzen und Wurzelkulturen . . . . .	26
B1.2	Bakterien . . . . .	27
B1.3	Vektoren . . . . .	27
B1.4	Oligonukleotide . . . . .	28
B1.5	Chemikalien und Standards . . . . .	29
B1.6	Kits und Enzyme . . . . .	30
B1.7	Puffer, Standardlösungen und Medien . . . . .	30
B1.8	Geräte und Hilfsmittel . . . . .	30
B2	Methoden . . . . .	31
B2.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	31
B2.2	Biochemische Methoden . . . . .	40
B2.3	Analytische Methoden . . . . .	43
B2.4	Methoden des Molekularen Modellings . . . . .	47
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
C1	Calystegin-Screening . . . . .	49
C1.1	Moraceae . . . . .	49
C1.2	Erythroxylaceae . . . . .	50
C1.3	Brassicaceae . . . . .	52
C2	Tropinonreduktase aus <i>Cochlearia officinalis</i> L. (COTR) . . . . .	57
C2.1	Isolierung einer <i>tr</i> -homologen cDNA-Sequenz . . . . .	57
C2.2	Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung . . . . .	60
C2.3	Expressionsanalyse des <i>cotr</i> -Transkriptes . . . . .	66

C2.4	Molekulares Modell . . . . .	66
C2.5	Mutation . . . . .	70
C3	Tropinonreduktion in <i>Arabidopsis thaliana</i> L. . . . .	71
C3.1	Umsatz von Tropinon . . . . .	71
C3.2	Isolierung einer <i>tr</i> -homologen cDNA-Sequenz ( <i>atsdr</i> ) . . . . .	71
C3.3	Überexpression, Reinigung & biochemische Charakterisierung der ATSDR . . . . .	72
C3.4	Molekulares Modell . . . . .	74
C3.5	Mutation . . . . .	75
C4	Putrescin umsetzendes Enzym . . . . .	78
C4.1	Isolierung einer <i>spds</i> -homologen Sequenz mittels PCR-Screening . . . . .	78
C4.2	Expressionsanalyse des <i>spds</i> -Transkripts . . . . .	80
C4.3	Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung . . . . .	80
<b>D</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>88</b>
D1	Calystegin-Screening . . . . .	88
D2	Tropinonreduktasen . . . . .	92
D2.1	Katalytische Eigenschaften der Tropinonreduktase . . . . .	92
D2.2	Eigenschaften von Enzym und Modell . . . . .	96
D2.3	Evolution von Tropinonreduktasen . . . . .	105
D3	Putrescin umsetzendes Enzym . . . . .	107
D3.1	Eigenschaften der Sequenz . . . . .	107
D3.2	Eigenschaften des Proteins . . . . .	109
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>112</b>
<b>F</b>	<b>Anhang</b> . . . . .	<b>I</b>
F1	Screening . . . . .	I
F1.1	Erythroxylaceae . . . . .	I
F1.2	Brassicaceae . . . . .	VI
F1.3	GC-MS Identifizierung Calystegine in Brassicaceae am Beispiel <i>Cochlearia officinalis</i> L. Blüten . . . . .	VIII
F2	Kinetik COTR und ATSDR . . . . .	X
F2.1	COTR . . . . .	X
F2.2	ATSDR . . . . .	XII
F3	Sequenzen . . . . .	XIII
F3.1	<i>cotr</i> -Sequenzen . . . . .	XIII
F3.2	<i>spds</i> -Sequenzen . . . . .	XIII
F4	Kinetik Putrescin umsetzendes Enzym . . . . .	XIV
F4.1	Bildung von MP; Abhängigkeit von Putrescin- und SAM-Konzentration . . . . .	XIV
F4.2	Bildung von MP; Abhängigkeit von Putrescin und dcSAM-Konzentration . . . . .	XVII
F5	Vektorkarten . . . . .	XX

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADC	Arginindecarboxylase
AMD-TLC	<i>Automated Multiple Development Thin Layer Chromatography</i>
ARC	<i>Arabidopsis Root Culture Medium</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
dcSAM	decarboxyliertes S-Adenosyl- <i>L</i> -methionin
bp (kbp)	Basenpaare (Kilo-)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	<i>enzyme classification</i>
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
GC	Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatograph mit massenspezifischem Detektor
H6H	Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMDS	Hexamethyldisiloxan
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
IAA	Indolessigsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani-Medium
<i>m</i>	Mittelwert
MeOH	Methanol

MLCR	<i>Mouse Lung Carbonyl Reductase</i>
MP	<i>N</i> -Methylputrescin
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Murashige & Skoog Medium
NADP+	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (reduzierte Form)
NBT	Nitrotetrazoliumblau
NMP	<i>N</i> -Methylpiperidin-4-on
NPP	<i>N</i> -Propylpiperidin-4-on
ODC	Ornithindecaboxylase
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE (SDS-)	Polyacrylamidgelelektrophorese (denaturierend, mit Natriumdodecylsulfat)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMT	Putrescin- <i>N</i> -methyltransferase
PND	Phosphor-Stickstoff-sensitiver Detektor
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> PCR
<i>s</i>	Standardabweichung
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
SDR	<i>Short-chain dehydrogenase/reductase</i> , kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
SPDS	Spermidinsynthase
SPS	Sperminsynthase
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TB	<i>terrific broth</i> Medium
TBON	8-Thiabicyclo [3.2.1] octan-3-on
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TM	Trockenmasse
TR	Tropinonreduktase(n)
TRI	tropinformende Tropinonreduktase
TRII	pseudotropinformende Tropinonreduktase
var.	Varietät
$V_{max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit

# Abbildungsverzeichnis

A.1	Grundstrukturen der Calystegine . . . . .	14
A.2	Glykosidaseinhibitoren . . . . .	17
A.3	Von den Aminosäuren zum <i>N</i> -Methylputrescin . . . . .	19
A.4	Vom <i>N</i> -Methylputrescin zu Tropanolen . . . . .	20
A.5	Biosynthesewege Hyoscyamin und Calystegine . . . . .	22
B.1	Herstellung einer cDNA Bank . . . . .	35
B.2	Substratanaloga für TR-Charakterisierung . . . . .	41
C.1	Gehalt Calystegine in Morceae . . . . .	49
C.2	Calystegine in Erythroxyllaceae (1) . . . . .	51
C.3	Calystegine in Erythroxyllaceae (2) . . . . .	51
C.4	Calystegine in Erythroxyllaceae (3) . . . . .	51
C.5	Calystegine in Brassicaceae (1) . . . . .	52
C.6	Calystegine in Brassicaceae (2) . . . . .	52
C.7	Calystegine in Brassicaceae (3) . . . . .	53
C.8	Calystegine in <i>Cochlearia officinalis</i> L. . . . .	53
C.9	DC Alkaloidextrakte <i>Cochlearia</i> Spezies . . . . .	54
C.10	Endogenes Tropin/Pseudotropin in <i>Cochlearia</i> Spezies . . . . .	55
C.11	Tropinonfütterung <i>Cochlearia officinalis</i> L. . . . .	55
C.12	DC Alkaloidextraktion . . . . .	56
C.13	Agarosegel . . . . .	57
C.14	RACE-PCR: (A) 5'RACE (B) 3'RACE . . . . .	58
C.15	Elutionsprofil Affinitätschromatographie COTR . . . . .	60
C.16	SDS-PAGE COTR . . . . .	60
C.17	pH-Optimum Tropinonreduktion . . . . .	61
C.18	pH- und Zeitabhängigkeit der Tropinonreduktion; 30–60–120min; pH 5–10 . . . . .	61
C.19	Tropinonoxidation und Reduktion von Tropanolen . . . . .	62
C.20	Vergleich NADPH / NADH . . . . .	63
C.21	Substratanaloga (1); Test an COTR . . . . .	65
C.22	Substratanaloga (2); Test an COTR . . . . .	65
C.23	Agarosegel RT-PCR <i>cotr</i> -Transkript . . . . .	66
C.24	Tertiärstruktur COTR . . . . .	67
C.25	Modelle des aktiven Zentrums; bewegliche Seitenkette von Tyr209; Dockingpositionen für Tropinon . . . . .	69

C.26 Sequenzausschnitt mutierter Bereich COTR . . . . .	70
C.27 SDS-PAGE Mutation COTR . . . . .	70
C.28 DC - Reduktion von Tropin zu Tropin/Pseudotropin - Fütterungsversuch . . . . .	71
C.29 Agarosegel . . . . .	71
C.30 SDS-PAGE Reinigung ATSDR . . . . .	72
C.31 pH-Optimum . . . . .	73
C.32 Km-Wert-Bestimmung nach HANES . . . . .	73
C.33 Sequenzausschnitt des mutierten Bereichs ATSDR . . . . .	75
C.34 SDS PAGE ATSDR und ATSDR mutiert . . . . .	75
C.35 Mutagenese - Spezifische Aktivitäten (1) . . . . .	76
C.36 Mutagenese - Spezifische Aktivitäten (2) . . . . .	76
C.37 Mutagenese - Spezifische Aktivitäten (3) . . . . .	77
C.38 Agasosegel PCR Screening . . . . .	78
C.39 Agarosegel RT-PCR <i>spds</i> -Transkript . . . . .	80
C.40 SDS-PAGE, SPDS . . . . .	80
C.41 Vorversuch Cosubstratspezifität SPDS; nmol Produkt/assay . . . . .	81
C.42 Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung (1) . . . . .	82
C.43 HPLC Chromatogramme 350 $\mu$ M SAM; 0,1–10 mM Putrescin . . . . .	82
C.44 SAM-Abhängigkeit der MP-Bildung . . . . .	83
C.45 Chromatogramm 750 $\mu$ M SAM, 10 mM Putrescin Retentionszeiten 6,7 min MP; 8,7 min Spermidin; 12,2 min Spermin . . . . .	83
C.46 Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung (2) . . . . .	84
C.47 Ermittlung katalytische Konstanten (1) . . . . .	84
C.48 Ermittlung katalytische Konstanten (2) . . . . .	85
C.49 Ermittlung katalytische Konstanten (3) . . . . .	85
C.50 SAM-Abhängigkeit der MP-Bildung . . . . .	86
C.51 Putrescin-Abhängigkeit MP-Bildung mit dcSAM . . . . .	86
D.1 Anteil der calysteginhaltigen Spezies . . . . .	90
D.2 Systematik der Angiospermen; Familien mit Calysteginen . . . . .	91
D.3 Alignment der Sequenzen von COTR, ATSDR und <i>Datura stramonium</i> TRII . . . . .	96
D.4 Ausschnitt aus dem COTR-Modell; Aminosäuren, die an der Bindung von NADPH beteiligt sind (1) . . . . .	97
D.5 Ausschnitt aus dem COTR-Modell; Aminosäuren, die an der Bindung von NADPH beteiligt sind (2) . . . . .	98
D.6 Vergleich der substratbindenden Region - COTR links und ATSDR rechts; gleiche Perspektive . . . . .	102
D.7 Synthesemöglichkeiten . . . . .	111
D.8 Mögliche Syntheserouten, kinetische Darstellung . . . . .	111
F.1 Gaschromatogramm <i>Cochlearia officinalis</i> L. Blüten . . . . .	VIII

---

F.2	<i>Cochlearia officinalis</i> L. Blüten; Massenspektrum Peak bei 4,9 min; Calystegin A5 . . . . .	VIII
F.3	<i>Cochlearia officinalis</i> L. Blüten; Massenspektrum Peak bei 5,2 min; Calystegin A3 . . . . .	IX
F.4	<i>Cochlearia officinalis</i> L. Blüten; Massenspektrum Peak bei 6,5 min; Calystegin B3 . . . . .	IX
F.5	SAM-Abhängigkeit 5–750 $\mu$ M und Putrescin 10 mM . . . . .	XVI
F.6	Vektorkarten (A) <i>cotr</i> (B) <i>atsdr</i> (C) <i>spds</i> . . . . .	XX

# Tabellenverzeichnis

A.1	Ausschnitte aus der substratbindenden Region von TR . . . . .	21
B.1	Verwendete Bakterien . . . . .	27
B.2	Verwendete Vektoren . . . . .	27
B.3	Verwendete Oligonukleotide . . . . .	28
B.4	Verwendete Chemikalien und Größenmarker . . . . .	29
B.5	Verwendete Kits und Enzyme . . . . .	30
C.1	Moraceae ohne Calystegine und Deoxynojirimycin . . . . .	50
C.2	Erythroxyllaceae ohne Calystegine . . . . .	50
C.3	Brassicaceae ohne nachgewiesene Calystegine . . . . .	54
C.4	Brassicaceae ohne endogene Tropanole . . . . .	54
C.5	Alignment Scores mit ClustalW 4.0 . . . . .	58
C.6	Nicht-translatierte Bereiche der <i>cotr</i> -Sequenz . . . . .	59
C.7	katalytische Konstanten, Auswertung mit Sigma Plot . . . . .	62
C.8	Alignment ‚putative‘ TR aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , Solanaceae TR und COTR; Cosubstratbindung . . . . .	64
C.9	Docking Übersicht; zum Vergleich: Km-Werte experimentell . . . . .	68
D.1	Übersicht Km-Werte [mM] . . . . .	92
D.2	Sequenzalignment SPDS <i>Cochlearia officinalis</i> und SPDS sowie PMT von Solanaceae	107
F.1	Calystegin-Screening . . . . .	I
F.2	Übersicht Proben Erythroxyllaceae; Spezies; Sammlungsdaten 1 . . . . .	II
F.3	Übersicht Proben Erythroxyllaceae; Spezies; Sammlungsdaten 2 . . . . .	III
F.4	Übersicht Proben Erythroxyllaceae; Spezies; Sammlungsdaten 3 . . . . .	IV
F.5	Übersicht Proben Erythroxyllaceae; Spezies; Sammlungsdaten 4 . . . . .	V
F.6	Calystegine in <i>Cochlearia</i> -Spezies . . . . .	VI
F.7	Calystegine in <i>Cochlearia officinalis</i> L. . . . .	VI
F.8	Calystegine in Brassicaceae . . . . .	VII
F.9	Spezifische Aktivitäten Substratanaloga . . . . .	X
F.10	pH-Optimum . . . . .	X
F.11	Substrattestung NADH . . . . .	X
F.12	Km-Wert-Bestimmung Substratanaloga . . . . .	XI
F.13	pH-Optimum . . . . .	XII
F.14	Substratanaloga . . . . .	XII

F.15 Km-Wert 4-Methylcyclohexanon . . . . .	XII
F.16 SAM- und Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung . . . . .	XIV
F.17 Wiederholung SAM- und Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung . . . . .	XIV
F.18 Spermin- und Spermidinbildung . . . . .	XV
F.19 Wiederholung Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung . . . . .	XV
F.20 SAM-Abhängigkeit der MP-Bildung Wiederholung . . . . .	XVI
F.21 Putrescinabhängigkeit . . . . .	XVII
F.22 dcSAM-Abhängigkeit . . . . .	XVII
F.23 Spezifische Aktivität der Spermidinbildung dcSAM 5 $\mu$ M . . . . .	XVIII
F.24 Spezifische Aktivität der Spermidinbildung Putrescin 10 mM . . . . .	XVIII
F.25 Versuch Hemmung durch SAH . . . . .	XIX

# Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

## Publikationen

Brock A, Bieri S, Christen P und Dräger B, 2005  
Calystegines in wild and cultivated *Erythroxyllum* species.  
*Phytochemistry* 66(11), pp. 1231–1240

Brock A, Herzfeld T, Paschke R, Koch M und Dräger B, 2006  
Brassicaceae contain nortropane alkaloids.  
*Phytochemistry* 67(18), pp. 2050–2057

Brock A, Brandt W, Dräger B  
Evolution of an alkaloid biosynthetic enzyme-tropinone reductase  
of *Cochlearia officinalis*, Brassicaceae.  
in Vorbereitung

## Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen (Poster)

Brock A, Dräger B, 2002  
Calystegine in Moraceae  
Deutsche Botanikertagung, Freiburg

## Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen (Vorträge)

Brock A, 2002  
Tropane alkaloid biosynthesis in Solanaceae, Convolvulaceae and Moraceae  
Kurt-Mothes Doktoranden-Workshop, Jena

Brock A, Strunz J, Dräger B, 2005  
Tropanalkaloidstoffwechsel in Brassicaceae  
Doktorandentagung der DPhG, Leipzig

**If you don't take a temperature, you can't find a fever.**

The Fat Man -

Medical Resident in the House of God

# A Einleitung

## A1 Tropan- und Nortropanalkaloide und ihr Stoffwechsel

Sekundäre Pflanzenstoffe, wie zum Beispiel Alkaloide, sind Faktoren, die das Überleben einer Pflanze beeinflussen. Ihre biologische Bedeutung liegt außerhalb des primären, lebenserhaltenden Metabolismus und ist weitgehend ungeklärt. Bei der Anpassung von Pflanzen an wechselnde ökologische Bedingungen spielen sie offenbar eine wichtige Rolle. Für einige Sekundärstoffe ist eine Wirkung bei der Abwehr von pathogenen Organismen und Insekten oder eine Schutzwirkung gegen Umweltstress nachgewiesen (Kutchan 1995). Auch eine Signalwirkung der Sekundärstoffe innerhalb der pflanzlichen Entwicklung wird beschrieben (Kutchan 2001). Dass Biosynthese und Akkumulation von Sekundärstoffen lokal und temporal begrenzt sind, spricht für diese Theorie (De Luca 2000). Phytohormone und Licht können die Bildung von Sekundärstoffen beeinflussen (Hashimoto 1985, Yazaki 1999). Etwa 20% aller untersuchten Pflanzen enthalten Alkaloide (De Luca 2001) und ca. 12000 verschiedene Alkaloide sind isoliert und strukturell aufgeklärt worden (Wink 1999).

Die Vielfalt der Strukturen reicht von einfachen monozyklischen Verbindungen (z.B. Coniin) bis hin zu komplizierten annellierten Systemen (z.B. Morphin, Ergot-Alkaloide). Ebenso breit ist das Spektrum der Anwendungen von Alkaloiden - vom Gewürz über die Arznei bis zum Gift (Kutchan 1995). So dient z.B. Capsaicin aus *Capsicum frutescens* L. als Gewürz (Paprika) und wird auch in thermisch wirksamen Pflastern und Salben zur Behandlung von Muskelverspannungen eingesetzt. Therapeutisch eingesetzte Alkaloide wie Atropin, Morphin und Cocain sind in Abhängigkeit von der Dosierung rauscherzeugend und die missbräuchliche Verwendung daher genauso häufig wie der Einsatz als Arzneimittel. In der Regel werden Alkaloide für die Anwendung als Pharmazeutika aus Pflanzen isoliert, da ihre zum Teil recht komplizierten chemischen Strukturen durch Synthese nicht zugänglich sind, beziehungsweise sich die Synthese aus Rentabilitätsgründen nicht lohnt.

### A1.1 Tropanalkaloide

Tropanalkaloide sind in der Regel Esteralkaloide. Die Säurekomponente kann aliphatischer oder aromatischer Natur sein, sie ist mit einem bipyklischen Aminoalkohol verestert.

Die Tropasäureester des Tropins sind lediglich in Solanaceae beschrieben. Alkaloide mit einem Tropangerüst wurden hingegen in verschiedenen Pflanzenfamilien wie z.B. Convolvulaceae, Erythroxylaceae, Moraceae oder Proteaceae nachgewiesen (Woolley 1993, Asano 1997b).

Pharmazeutisch in Verwendung befinden sich folgende Tropanalkaloide: **Atropin** - Dessen mydriatische und zykloplegische Wirkung ist langanhaltend (Mydriasis bis zu 12 Tage), für diagnostische Eingriffe ist es daher nicht geeignet und wird durch kürzer wirkende, synthetische Substanzen wie z.B. Tropicamid (Mydrum<sup>®</sup>) ersetzt. Bei der Behandlung von Schielkindern und zur Ruhigstellung des Auges bei Entzündungen ist der langanhaltende Effekt jedoch erwünscht. Als kompetitiver Antagonist an muscarinergen Acetylcholin-Rezeptoren findet Atropin Einsatz als Antidot bei Vergiftung mit Organophosphaten oder cholinergen Therapeutika.

**Scopolamin** - Das als transdermales therapeutisches System (Scopoderm<sup>®</sup>) bei Reisekrankheit und in Form des *N*-Butylamids als Spasmolytikum (Buscopan<sup>®</sup>) eingesetzt wird. Das verwandte, synthetische Tiotropiumbromid (Spiriva<sup>®</sup>) wird bei COPD angewendet.

**Cocain** - wird eingesetzt als Lokalanästhetikum am Auge. Cocain führt als indirektes Sympathomimetikum am Auge auch zu Mydriasis. Es befinden sich keine Fertigarzneimittel im Handel, jedoch führt das NRF die Rezeptur Cocainhydrochlorid-Augentropfen 4% (NRF 15.24) für den Stations- und Praxisbedarf.

## A1.2 Calystegine

### A1.2.1 Strukturen

Nortropanalkaloide vom Typ der Calystegine sind erstmalig im Wurzelextrakt von *Calystegia sepium* L. identifiziert worden (Tepfer 1988), die Pflanze wurde namensgebend für diese Reihe von Verbindungen, die inzwischen 16 Vertreter umfasst. Eine ausführliche Übersicht über Vorkommen und Struktur findet sich bei Dräger (2004).

**Grundstruktur** Im Unterschied zu den klassischen Tropanalkaloiden wie Hyoscyamin und Scopolamin ist der Stickstoff des 8-Azabicyclo[3,2,1]octan-Grundgerüsts in den meisten Calysteginen nicht methyliert. Calystegine sind Aminoketale die ausschließlich in der bicyklischen Form vorliegen (Molyneux 1996).

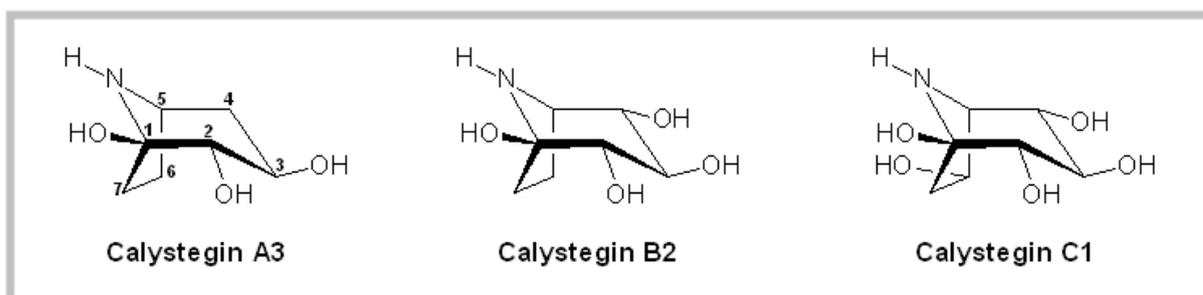


Abbildung A.1: Grundstrukturen der Calystegine

## Einteilung

**Polyhydroxyliert ABC** Der Nortropanring der Calystegine trägt drei bis fünf Hydroxylgruppen in variablen Positionen und stereochemischer Anordnung. Eine dieser Hydroxylgruppen bildet eine Aminoketalfunktion am Brückenkopfkohlenstoffatom des Bizyklus. Je nach Grad der Hydroxylierung werden die Calystegine in Gruppen eingeteilt: die Calystegine der A-Gruppe sind trihydroxyliert, die der B-Gruppe tragen vier und die der C-Gruppe fünf Hydroxylgruppen (Abbildung A.1).

**Dihydroxyliert** Dihydroxylierte Nortropanalkaloide wurden ebenfalls in *Calystegia sepium* und anderen Convolvulaceae und Solanaceae beschrieben (Asano 2001). Ihnen fehlt die für Calystegine typische Aminoketalfunktion am Brückenkopfkohlenstoffatom.

**Calystegin N** Calystegin N1, das aus *Hyoscyamus niger* isoliert wurde, ist ein Trihydroxynortropan analog zu Calystegin B2. Die Hydroxylgruppe am Brückenkopf ist hier durch eine Aminogruppe ersetzt. Es zerfällt bei längerer Lagerung zu Calystegin B2 (Asano 1996).

**N-Methylcalystegine** Aus *Lycium chinense* wurden N-Methylcalystegin B2 und N-Methylcalystegin C1 isoliert (Asano 1997b).

**Glykosilierte Calystegine** Als erstes glykosiliertes Calystegin wurde das 3-O- $\beta$ -D-Glucopyranosid von Calystegin B1 in *Nicandra physaloides* nachgewiesen (Griffiths 1996).

### A1.2.2 Vorkommen

Calystegine sind in den Schwesterfamilien Solanaceae und Convolvulaceae verbreitet (Griffin 2000, Schimming 1998, Watson 2001, Bekkouche 2001, Stefanovic 2002).

**Convolvulaceae** In den Spezies *Calystegia sepium* L. und *Convolvulus arvensis* erfolgte der erstmalige Nachweis von Calysteginen (Goldmann 1990, Molyneux 1993, Tepfer 1988). Convolvulaceae sind intensiv auf Calystegine untersucht worden. Calystegine wurden in 62 von 129 Spezies aus 22 der 57 bekannten Genera gefunden (Schimming 2005).

**Solanaceae** Der Familie der Solanaceae sind etwa 2460 Spezies in 102 Genera zugeordnet. Von sieben Subfamilien (Olmstead 1992, Olmstead 1994) stellen die Solanoideae mit 1925 Spezies in 61 Genera die größte Subfamilie dar. Der Genus *Solanum* umfasst 1250–1700 Spezies je nach angewandter Taxonomie (Lynn 1997, Olmstead 1997) und ist der artenreichste der Familie. Der Nachweis von Calysteginen in Spezies dieser Familie erfolgte bei Einzeluntersuchungen von Pflanzen, die medizinisch verwendet werden oder als Nahrungsmittel dienen. Ein systematisches Screening der Familie ist nicht erfolgt.

Calystegine wurden in 13 von 102 Genera und 25 von 2460 Spezies gefunden, vorwiegend in Arten der Subfamilie Solanoideae.

**Moraceae** In der Familie Moraceae wurden Calystegine in den Früchten, Blättern und der Wurzelrinde von *Morus alba* L. und den Blättern *Morus bombycis* gefunden (Asano 1994a, Asano 1994b). Die Calystegine kommen in den einzelnen Arten meist als Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung vor. Spitzenreiter ist bisher *Lycium chinense* (Solanaceae), hier wurden 14 verschiedene Calystegine detektiert (Asano 1997b). In vielen Gattungen (*Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*) treten sie gemeinsam mit den klassischen Tropanalkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin auf. Sie werden aber auch zusammen mit Glycoalkaloiden (*Solanum tuberosum* (Friedman 1997)) oder Pyrrolizidinalkaloiden (*Ipomoea hederifolia* (Jenett-Siems 1993)) gefunden. Eine Übersicht der Vorkommen der Calystegine innerhalb der Tropanalkaloidproduzierenden Pflanzenfamilien wird von Griffin und Lin gegeben (Griffin 2000).

### A1.2.3 Analytik

Aufgrund ihrer Hydrophilie werden Calystegine nicht durch klassische Alkaloidextraktion erfasst und es bedarf eines aufwendigen Extraktionsverfahrens (Hohenschutz 1981, Dräger 1995). Die routinemäßige Quantifizierung der Calystegine und ihrer Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin erfolgt gaschromatographisch. Im Gegensatz zu den ausreichend flüchtigen Intermediateen müssen die hydrophilen Calystegine derivatisiert werden. Da eine komplette Derivatisierung mit *N*-Methyl-*N*-(trimethyl)-silyl-fluoroacetamid in Pyridin aller Hydroxylgruppen und des sekundären Stickstoffs zum teilweisen Abbau der Calystegine führt (Molyneux 1993), wird unter milden Bedingungen mit Hexamethyldisiloxan und 10% Trichlorsiloxan derivatisiert (Dräger 1995).

Die Detektion erfolgt simultan durch Flammenionisationsdetektor (FID) und Phosphor-Stickstoff-sensitiven Detektor (PND). Zur Identifikation der stickstoffhaltigen Verbindungen wird das Verhältnis der beiden Signale verwendet. Der PND ist zunächst etwa fünfmal empfindlicher als der FID, durch Abnutzungserscheinungen des PND resultieren fortschreitend unterschiedliche Peakflächen, so dass dieses Signal ohne ständige Rekalibrierung nicht zur Quantifizierung geeignet ist. Quantifiziert wird durch das FID-Signal unter Verwendung eines internen Standards (Azobenzol). Die Identifizierung und Quantifizierung durch Massenspektrometrie ist ebenfalls möglich (Dräger 1995).

Eine weitere zur Analytik von Calysteginen eingesetzte Methode ist HPLC mit refraktometrischer Detektion (Goldmann 1990). Da Calystegine im Gegensatz zu den klassischen Tropanalkaloiden kein Chromophor besitzen, ist diese Methode nicht selektiv. Es bestehen weiterhin Methoden zur kapillarelektrophoretischen Trennung der Calystegine. Die Detektion kann entweder als Boratkomplex mit UV bei 191 nm (Daali 2000) oder nach elektrochemischer Oxidation (Rüttinger 2001) erfolgen. Die Vorteile der geringen benötigten Probevolumina ( $\mu\text{l}$ ) und geringem Aufwand in der Probenvorbereitung werden durch die häufig notwendige Rekalibrierung des Systems aufgewogen, da reine Calystegine dafür nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Für ein effizientes Vorabscreening steht eine optimierte AMD-TLC Methode zur Verfügung (Scholl 2001). Diese Methode ermöglicht die Auftrennung von Calysteginen innerhalb einer Gruppe gleicher Hydroxylierungszahl.

### A1.2.4 Glykosidasehemmung

Die Hemmung von Glykosidasen durch Calystegine ist aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu Zuckern nicht überraschend, das Stickstoffatom mimt dabei das positiv geladene Glykosylkation nach (Asano 2000a, Asano 2000b). Glykosidasen sind Bestandteil der intestinalen Verdauung, der Biosynthese und posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen und Glykolipiden (Asano 2000a). Sie fungieren auch als lysosomale Enzyme (Watson 2001). Die zumeist genetisch bedingten Enzymbausfälle führen beim Menschen zu verschiedenen Speicherkrankheiten wie z.B. Morbus Fabry und Morbus Gaucher.

Einen Überblick über die hemmende Wirkung von Calysteginen auf Glykosidasen geben die Reviews von Simmonds und Mitarbeitern (1999), Asano und Mitarbeitern (2000) sowie Dräger (2004). Eine Korrelation zwischen der Stärke der Hemmung und der chemischen Struktur der Calystegine besteht nur zum Teil. So haben die dreifach hydroxylierten Calystegine kaum inhibitorische Eigenschaften (Asano 1995). Die bicyclische Struktur ist eine wichtige Voraussetzung für  $\beta$ -Glukosidasehemmung, die Brückenkopfhydroxylgruppe ist für eine gute Bindung an die zu hemmenden Enzyme entscheidend (Garcia-Moreno 2001). Dass die Hemmung von Glykosidasen heftige Auswirkungen auf

den Säugetierstoffwechsel haben kann, wurde mehrfach gezeigt: Eine durch Castanospermin (aus *Castanospermum australe*; (Colegate 1979, Hohenschutz 1981)) hervorgerufene Hemmung lysosomaler  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glukosidasen führt zu lysosomalen Speicherkrankheiten (Morbus Pompe, Morbus Gaucher) (Molyneux 1996, Saul 1985). Die Hemmung der lysosomalen  $\alpha$ -Mannosidase durch Swainsonin (aus *Castanospermum australe* (Colegate 1979, Hohenschutz 1981)) führt zur Akkumulation mannosereicher Oligosaccharide. Das entstehende Krankheitsbild wird Locoismus genannt. Dieses ist durch axonale Dystrophie und Verlust der Zellfunktion bis hin zum Tode gekennzeichnet (Dorling 1978). Ähnliche neurologische Störungen wurden bei Tieren beschrieben, die von verschiedenen Solanum-Arten (*S. dimidiatum*,

*S. kwebense*) gefressen hatten. In beiden Arten sind Calystegine beschrieben worden (Nash 1993). Inwiefern Calystegine im Gastrointestinaltrakt resorbiert werden und ob durch normalen Verzehr calysteginhaltiger Früchte toxische Konzentrationen überhaupt erreicht werden können, ist nicht aufgeklärt. Sicher wären akute Vergiftungen längst aufgefallen. Andererseits haben Glykosidasehemmstoffe aufgrund ihrer biologischen Aktivität ein großes Potential für therapeutische Anwendungen (Asano 2000a, Asano 2000b). Bislang häufigstes Einsatzgebiet für Glykosidasehemmstoffe ist die Therapie des Diabetes mellitus. Das Pseudotetrasaccharid Acarbose (Glucobay<sup>®</sup>) ist zur

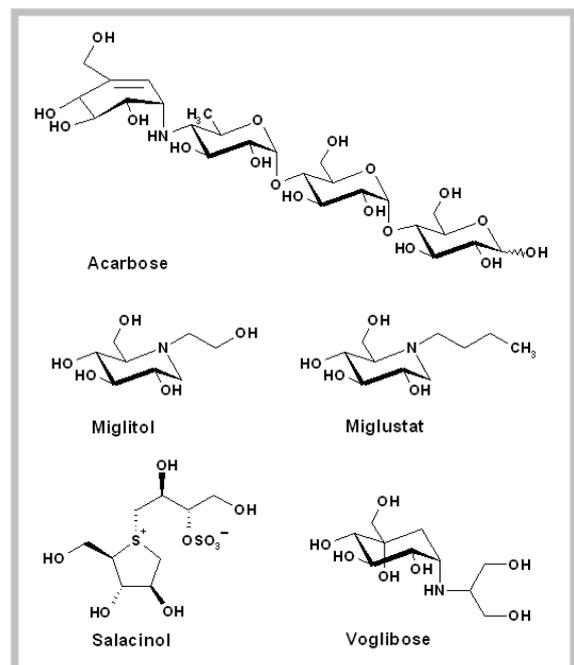


Abbildung A.2: Glykosidaseinhibitoren

Therapie des nicht insulinpflichtigen Diabetes mellitus in Ergänzung zu diätetischen Maßnahmen beziehungsweise zusätzlich zu Sulfonylharnstoffen indiziert. Das niedermolekulare Miglitol (Diastabol<sup>®</sup>) ähnelt strukturell Glucose (entwickelt aus Deoxynojirimycin) und bindet reversibel  $\alpha$ -Glukosidasen, nämlich an Sukrase, Maltase und Isomaltase (Ahr 1997). Auch die Hemmung des Natrium-abhängigen Glukosetransportes im Dünndarm wurde diskutiert, doch scheint dies nicht wesentlich zur blutzuckersenkenden Wirkung beizutragen (Lebovitz 1998). Beiden Substanzen ist die Hemmung der  $\alpha$ -Glukosidase gemein, damit wird die Spaltung von Polysacchariden in ihre Monomere verzögert, es resultieren niedrigere postprandiale Blutglucosespiegel.

Mit Salacinol identifizierten Yoshikawa und Mitarbeiter (1997) das wirksame Prinzip von *Salacia reticulata* WIGHT, einer in der ayurvedischen Medizin traditionell bei Diabetes mellitus eingesetzten Pflanze. Dieser potente  $\alpha$ -Glukosidasehemmer mit Thiozuckersulfoniumsulfatstruktur wird in Indien unter dem Namen Salaretin<sup>®</sup> vermarktet. Der  $\alpha$ -Glukosidasehemmer Voglibose ist unter dem Namen Volix<sup>®</sup> in Japan zur Therapie des Diabetes mellitus zugelassen (Wieckhorst 1995). Miglustat (Zavesca<sup>®</sup>) inhibiert die Glycosylceramid-Synthase, eine Glykosyltransferase, die für den ersten Schritt der Biosynthese der meisten Glykosphingolipide verantwortlich ist. Miglustat ist ein *N*-alkylierter Aminozucker (1,5-(butylimino)-1,5-dideoxy-*D*-glucitol), ein synthetisches *D*-Glucoseanalogon. Indiziert ist Miglustat für die orale Therapie der leichten bis mittelschweren Gaucher Krankheit (Typ1) von Patienten, für die eine Enzymsubstitutionstherapie nicht in Frage kommt (Elstein 2004).

Glykosidasehemmstoffe wie Castanospermin, Deoxynojirimycin und deren Derivate können auch die Glykosylierungsmuster von Tumorzellen und viralen Hüllproteinen verändern. Ein Einsatz in der antitumoralen und antiviralen Therapie ist daher denkbar. Das anti-HIV Potential von Glukosidasehemmern wird von Robina und Mitarbeitern ausführlich beleuchtet (Robina 2004). Sie befinden die *in vitro* anti-HIV Wirkung von Deoxynojirimycin als vielversprechend und erhoffen sich von Analoga nicht nur neue Einsichten zum Eintrittsmechanismus des HI-Virus sondern auch neue Therapeutika.

### A1.3 Biosynthese

#### A1.3.1 Von den Aminosäuren zum *N*-Methylputrescin

Alle Alkaloide werden von wenigen Aminosäuren ausgehend gebildet und erreichen damit eine Diversität, die eine Gesamtmenge von ca. 12000 Alkaloiden im Pflanzenreich umfasst (De Luca 2000). Ein Überblick über die ersten Schritte der Tropanalkaloidbiosynthese wird von Hemscheidt gegeben (Hemscheidt 2000). Die Biosynthese der Tropanalkaloide und der Calystegine hat ihren Ursprung in den Aminosäuren *L*-Ornithin oder *L*-Arginin. Putrescin wird durch Decarboxylierung von *L*-Ornithin durch Ornithindecarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) und/oder durch Decarboxylierung von *L*-Arginin durch Arginindecarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) über die Zwischenprodukte Agmatin und *N*-Carbamoylputrescin gebildet (Robins 1991). Alle lebenden Organismen besitzen eine ODC, während den Säugetierzellen und vielen niederen Eukaryoten die ADC fehlt (Hashimoto 1994). Aus Arginin kann aber auch direkt durch das Enzym Arginase (ARG, EC 3.5.3.1) Ornithin gebildet werden. ODC-cDNA sind aus *Datura stramonium* und *Nicotiana tabacum* bekannt (Imanishi 1998, Michael 1996). Die cDNA der Arginindecarboxylase

(EC 3.5.3.1) von *Avena sativa* (Bell 1990) ist bekannt. In *Lycopersicon esculentum* sind beide Enzyme aktiv (Rastogi 1993). In *Nicotiana tabacum* wurde gezeigt, dass der Argininweg bevorzugt abläuft (Tiburcio 1986). Ob der Einbau von *L*-Ornithin in *L*-Hyoscyamin regiospezifisch ist, wurde durch Fütterungsversuche von [2-<sup>14</sup>C]-Ornithin an *Datura stramonium* Pflanzen untersucht. Dabei fand Leete zunächst einen regiospezifischen Einbau in C1 oder C5 des Tropanringes, später jedoch einen gleichmäßigen Einbau in C1 (Leete 1962). Von Liebisch und Mitarbeitern wurden sowohl [2-<sup>14</sup>C]-Ornithin als auch [1,4-<sup>14</sup>C]-Putrescin an Wurzelkulturen von *Datura metel* appliziert. Beide Substanzen wurden als Vorstufen für Tropane ermittelt, dabei ist das Vorhandensein der Carboxylgruppe des *L*-Ornithins nicht für den Ringschluß notwendig. Der gebildete symmetrische Metabolit (Putrescin) ermöglicht keinen regiospezifischen Einbau des markierten Kohlenstoffs (Liebisch 1963, Liebisch 1965). An *Cochlearia officinalis* Pflanzen zeigten Liebisch und Mitarbeiter ebenfalls den Einbau von [1,4-<sup>14</sup>C]-Putrescin in das Tropangerüst von Cochlearin (m-Hydroxybenzoesäureester des Tropins) (Liebisch 1973).

Ausgehend vom Putrescin werden Polyamine gebildet. Die ubiquitären Polyamine Spermidin und Spermin sind an der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung bei allen Organismen beteiligt (Galston 1997, Bouchereau 1999). Die Enzyme Spermidinsynthase (SPDS, EC 2.5.1.16) und Sperminsynthase (SPS, EC 2.5.1.22) katalysieren die Übertragung der Aminopropylgruppe des Cosubstrates dcSAM auf Putrescin.

Der erste spezifische Schritt der Biosynthese von Tropanalkaloiden und Nicotin (Hashimoto 1993, Hibi 1992, Hashimoto 1989) ist die *N*-Methylierung des Putrescins (Leete 1990). Dabei überträgt das Enzym Putrescin-*N*-Methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53) die Methylgruppe vom Cosubstrat SAM auf Putrescin. An dieser Stelle trennen sich die Wege des primären und sekundären Stoffwechsels.

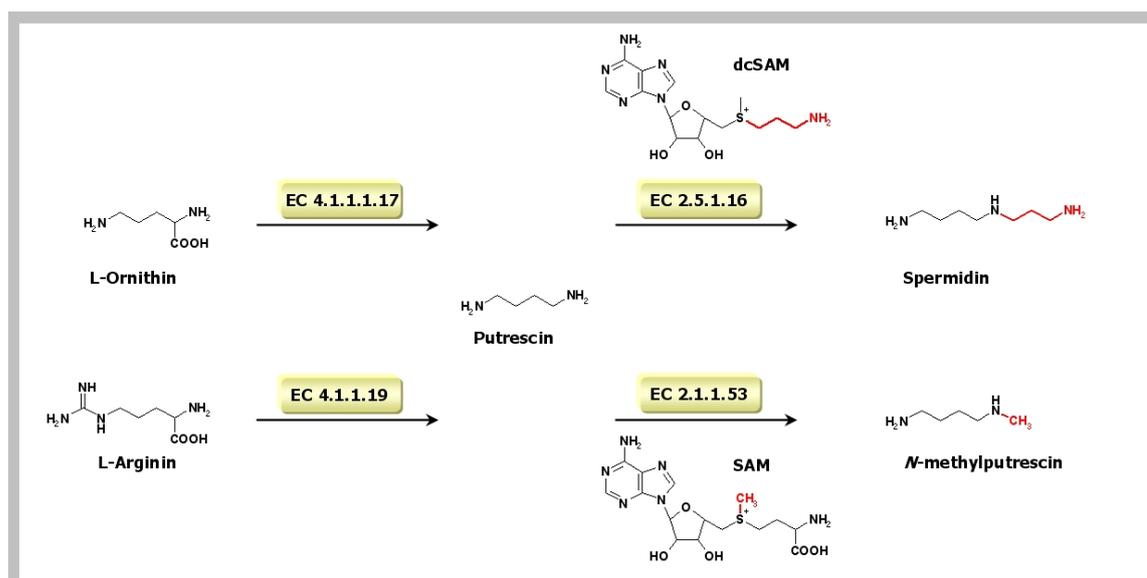


Abbildung A.3: Von den Aminosäuren zum *N*-Methylputrescin

### A1.3.2 Vom *N*-Methylputrescin zu den Tropanolen

*N*-Methylputrescinoxidase (MPO, EC 1.4.3.6) katalysiert die oxidative Desaminierung des *N*-Methylputrescins zum 4-Methylaminobutanal (Hashimoto 1990), welches spontan zum 1-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolinium-Kation zyklisiert (Davies 1989, Feth 1989, Hashimoto 1990).

Zunächst wurde angenommen, dass das Kation mit Acetoacetyl-Coenzym A reagiert und Hygrin nichtenzymatisch gebildet wird (Leete 1990). Der Einbau von Hygrin in Hyoscyamin wurde durch Fütterung  $^{14}\text{C}$ -markierter Vorstufen bei verschiedenen Solanaceae gezeigt (McGaw 1978, McGaw 1979). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Bildung des Tropinons über 4-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-3-Oxobutanoat vonstatten geht (Hemscheidt 1992, Robins 1997). Tropinon ist der gemeinsame Vorläufer der Tropanalkaloide und Calystegine.

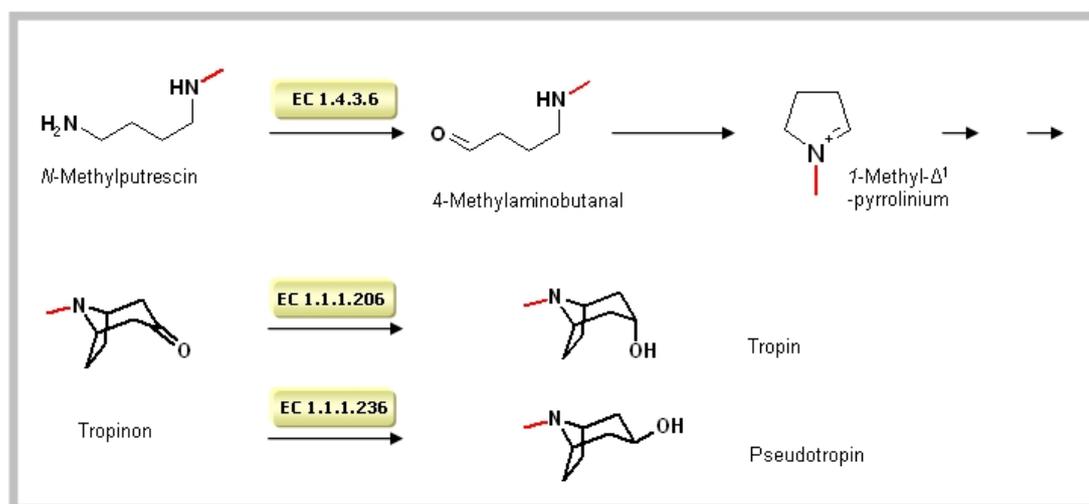


Abbildung A.4: Vom *N*-Methylputrescin zu Tropanolen

Tropinon wird durch NADPH-abhängige Reduktasen vom Typ der kurzkettigen Dehydrogenasen/ Reduktasen (SDR) zu den Tropanolen reduziert. Die Zuordnung zu der großen Familie der SDR ist zum einen an das Vorhandensein weniger aber dafür hochkonservierter Aminosäuren gekoppelt, einen Überblick dazu geben Filling und Mitarbeiter (Filling 2002). Zum anderen wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse der TR von *Datura stramonium* (Nakajima 1998) gezeigt, dass vor allem die dreidimensionale Struktur und die Geometrie der NADPH-Bindestelle stark konserviert sind. Die Reduktion ist stereospezifisch und wird von Tropinonreduktasen katalysiert. Tropinonreduktase I (TRI, EC 1.1.1.206) reduziert Tropinon zu Tropin (Tropan-3 $\alpha$ -ol, axiale Stellung der OH-Gruppe). Die stereospezifische Reduktion des Tropinons durch die Tropinonreduktase II (TRII, EC 1.1.1.236) führt zur Bildung des Pseudotropins (Tropan-3 $\beta$ -ol, äquatoriale Stellung der OH-Gruppe).

TRI wurde erstmals in *Datura stramonium*-Wurzelkulturen nachgewiesen (Koelen 1982). Dräger und Mitarbeiter identifizierten TRII in Wurzelkulturen von *Hyoscyamus niger* (Dräger 1988). In *Datura innoxia* wurden beide Reduktasen anhand ihrer Aktivität nachgewiesen (Couladis 1991). Die Aminosäuresequenzen der beiden TR von *Datura stramonium* stimmen zu 64% überein; auf ein direktes Verwandtschaftsverhältnis ist daher schnell geschlossen worden (Nakajima 1993). Die Analyse von Mutanten der TR aus *Datura stramonium* ergab, dass die für die Substratbindung

und stereospezifische Reduktion verantwortliche Region des Proteins im C-terminalen Bereich zu finden ist. (Nakajima 1994, Nakajima 1998, Nakajima 1999a). Dies konnte durch röntgenkristallographische Charakterisierung dieser beiden Enzyme bestätigt und der Mechanismus der Substatorientierung beschrieben werden (Nakajima 1998). Bereits auf Nukleinsäureebene sind die entsprechenden Aminosäuren konserviert, Tabelle A.1 zeigt Ausschnitte aus der substratbindenden Region.

Tabelle A.1: Ausschnitte aus der substratbindenden Region von TR

	TRI	SPEZIES	TRII
Ausschnitt I	AGV <b>V</b> I <b>H</b> KEAKDF	<i>Datura stramonium</i>	AGI <b>V</b> I <b>Y</b> KEAKDY
	AGV <b>V</b> I <b>H</b> KEAKDF	<i>Hyoscyamus niger</i>	AGI <b>V</b> I <b>Y</b> KEAKDY
	AGV <b>A</b> I <b>H</b> KEAKDF	<i>Solanum tuberosum</i>	AGI <b>V</b> I <b>Y</b> KEAKDY
	AGT <b>I</b> L <b>P</b> KDATEF	<i>Calystegia sepium</i>	SSVAGI <b>I</b> P <b>V</b> F <b>K</b> T
Ausschnitt II	SSIAGFSAL <b>P</b> SV	<i>Datura stramonium</i>	SSVSGALAV <b>P</b> YE
	SSIAGFSAL <b>P</b> SV	<i>Hyoscyamus niger</i>	SSISGASAL <b>P</b> YE
	SSIAGFSAL <b>P</b> SL	<i>Solanum tuberosum</i>	SSISGASAL <b>P</b> YE

**Legende:** blau markiert: Für die Orientierung des Substrates entscheidende Aminosäuren

So wird bei TRII das Substrat durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Seitenkette eines Glutaminsäurerestes orientiert, während die Positionierung des Substrates in TRI-Orientierung durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt (Nakajima 1998). Mit der Isolation der TR aus *Calystegia sepium* L. verliert dieses Schema seine scheinbare Allgemeingültigkeit. Wie in Tabelle A.1 zu erkennen, ist aus der bloßen Aminosäuresequenz keine Präferenz für eine Reduktionsrichtung ablesbar. Die biochemische Charakterisierung weist das Enzym als TRI aus (Sichhart 2003). Trotz der geringen verwandtschaftlichen Distanz der Familien Solanaceae und Convolvulaceae (Solanales) treten hier bereits starke Unterschiede zutage.

Die Frage nach dem Vorfahren-Enzym der TR ist unbeantwortet, da das Spektrum der von SDR katalysierten Reaktionen, die Vielfalt der Substrate und nicht zuletzt die hohe Variabilität der Primärstruktur der Enzyme keine Rückschlüsse erlauben.

### A1.3.3 Von den Tropanolen zu Tropanalkaloiden und Calysteginen

Die Biosynthese des Tropanalkaloids *L*-Hyoscyamin verläuft über die Veresterung des Tropins mit Phenylmilchsäure zu Littorin (Ansarin 1993, Robins 1994). Dieses lagert sich zu *L*-Hyoscyamin um, der Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt (Duran-Patron 2000). Humphrey und O'Hagan postulieren eine von Coenzym B12 vermittelte Isomerisierung (Humphrey 2001). Von Zabetakis und Mitarbeitern wird eine Beteiligung einer P450 abhängigen Monooxygenase nicht ausgeschlossen (Zabetakis 1998). In einer zweistufigen enzymatischen Reaktion wird aus *L*-Hyoscyamin *L*-Scopolamin gebildet. Sowohl die 6 $\beta$ -Hydroxylierung des Tropanringes als auch die intramolekulare Epoxidbildung (6,7-Epoxid) werden von der 2-oxoglutaratabhängigen Dioxygenase Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase (H6H, EC 1.14.11.11) katalysiert (Hashimoto 1986, Hashimoto 1987).

Die Hydroxylierung benötigt Oxoglutarat als Co-Substrat, sowie  $\text{Fe}^{2+}$ , Ascorbat und molekularen Sauerstoff. Die erste H6H-cDNA wurde aus *Hyoscyamus niger*, später die aus *Atropa belladonna* isoliert (Matsuda 1991, Suzuki 1999). In der Biosynthese der Calystegine sind die Schritte vom Pseudotropin zu den Calysteginen bislang unaufgeklärt. Biochemisch müssen eine *N*-Demethylierung und Ringhydroxylierungen ablaufen. Welcher dieser beiden Schritte zuerst stattfindet, ist ebenso unbekannt.

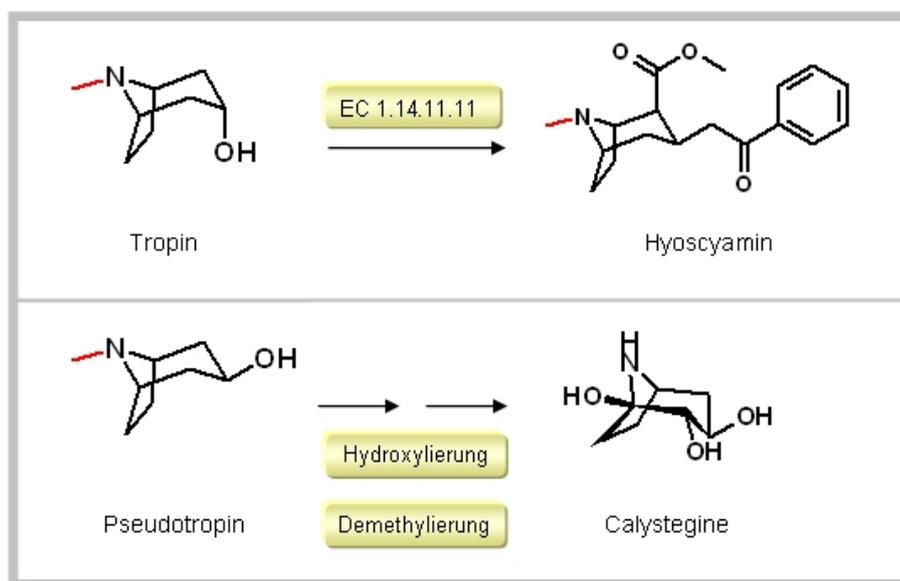


Abbildung A.5: Biosynthesewege Hyoscyamin und Calystegine

Möglicherweise kommen für die *N*-Demethylierung Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen in Frage, eine oxidative Demethylierung verschiedener Xenobiotika in Pflanzen ist gezeigt worden (Young 1976, Dohn 1984). So ist beispielsweise die Demethylierung von Nicotin zum Nornicotin bereits mehrfach betrachtet worden: die Beteiligung einer Cytochrom P450-abhängigen Reduktase wurde zunächst vorgeschlagen, als die Reaktion in Mikrosomenpräparationen beobachtet wurde (Chelvarajan 1993). Tatsächlich fungiert die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP82E4 von *Nicotiana tabacum* als Nicotindemethylase (Siminszky 2005). Gegen eine Beteiligung membranständiger Enzyme spricht, dass Hao und Mitarbeiter Enzymaktivität auch im Zellüberstand nachweisen konnten (Hao 1996, Hao 1998). Die abgespaltene Methylgruppe wird im Primärstoffwechsel u.a. für die Biosynthese von Serin, Methylmethionin und Cystein-Derivaten verwendet (Mesnard 2002).

Auch für Hydroxylierungen kommen Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen in Betracht, beispielhaft ist hier Zimtsäure-4-Hydroxylase zu nennen, die in verschiedenen Pflanzen charakterisiert wurde (Werck-Reichhart 1995). Naheliegender scheint auch die Ringhydroxylierung durch 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen, schließlich katalysiert die Dioxygenase Hyoscyamin-6 $\beta$ -Hydroxylase die Einführung einer Hydroxylgruppe am Tropanring (Hashimoto 1986, Hashimoto 1987). Weitere bekannte 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel sind Gibberellin-2 $\beta$ -Hydroxylase aus *Pisum sativum* (Smith 1986) oder Desacetoxyvindolin-4-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* (Vazquez-Flota 1997).

## A2 Pflanzenfamilien

Als Grundlage diente die Angiosperm Phylogeny Group Classification (Stevens 2001). Die Zahlen für Genera und Spezies unterliegen häufigen Änderungen, so dass die hier aufgeführte Einteilung zur Orientierung gedacht ist.

### A2.1 Moraceae LINK

Die Familie der Moraceae ist der Ordnung Rosales zugeordnet. Sie umfasst 38 Gattungen mit etwa 1100 Arten. Moraceae sind in der Regel Bäume oder Sträucher. Ficus-Arten treten auch als Lianen und Würger auf. Meist führen Moraceae Milchsaft, oft finden sich Luftwurzeln. Die Blätter sind meist immergrün, mittelgroß bis groß und gegenständig angeordnet. Die Blüten stehen meist in dichten Infloreszenzen, häufig werden fleischige Sammelfrüchte durch mehrere benachbarte Blüten ausgebildet. Die Blüten sind klein, reduziert und der oberständige bis halbunterständige Fruchtknoten besteht aus 2 verwachsenen Fruchtblättern. Moraceae sind weitverbreitet in warmen bis tropischen Regionen, die einzigen Kosmopoliten sind *Morus* Spezies. *Bombyx mori* (Seidenraupe) frisst auf Moraceae.

Die pharmazeutische Verwendung von Moraceae beschränkt sich auf traditionelle Medizin. Die Deoxynojirimycin-haltige Wurzelrinde von *Morus alba* L. wird in der traditionellen chinesischen Medizin zur Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt.

#### A2.1.1 Erythroxylaceae KUNTH

Die zur Ordnung Malphigiales gehörende Familie enthält 4 Genera (*Aneulophus* BENTH, *Erythroxylum* P. BROWNE, *Nectaropetalum* ENGL., *Pinacopodium* EXELL & MENDONCA) und etwa 240 Spezies, davon entfallen 230 auf die Gattung *Erythroxylum*. Die Familie ist pantropisch verbreitet. Erythroxylaceae sind mesophytische Bäume oder Sträucher. Die ungeteilten, ganzrandigen Blätter sind meist wechselständig oder spiralig angeordnet. Die kleinen, radiärsymmetrischen Blüten bestehen aus jeweils 5 Kron- und Kelchblättern (frei oder verwachsen), 10 Staubblättern und einem oberständigen Fruchtknoten mit 3 verwachsenen Fruchtblättern. Es entwickeln sich einsamige Steinfrüchte.

Cocain akkumuliert in *E. coca* und *E. novogranatense*, diese Spezies werden zur Gewinnung von Cocain kultiviert, ihr Cocaingehalt kann bis zu 2% der Trockenmasse (Blatt) betragen (Plowman 1983). In einigen anderen *Erythroxylum* Spezies wurden nur Spuren von Cocain gefunden (Louasmaa 1993, Griffin 2000).

### A2.2 Brassicaceae BURNETT

Circa 2,2% der Eudikotyledonen finden sich in der Ordnung Brassicales (Magallón 1999). Typisches Merkmal der Ordnung ist das Vorkommen von Glucosinolaten und des Enzyms Myrosinase, welches in separaten Zellen vorliegt und daher erst bei Verletzung des Gewebes Kontakt zu den Glucosinolaten erhält, aus denen es dann die Abspaltung von Glucose katalysiert, wodurch die weitere spontane Entstehung von Senfölen eingeleitet wird (Bones 1996).

Die Ordnung enthält 17 Familien, unter anderem Brassicaceae, Capparaceae, Moringaceae und Tropaeolaceae. Die Familie der Kreuzblütengewächse umfasst 338 Gattungen mit etwa 3700 Arten. Es handelt sich um eine weltweit verbreitete Familie, besonders viele Spezies sind in nördlichen, gemäßigten Gebieten beheimatet, Brassicaceae sind jedoch von der Dauerfrostzone bis zu den Tropen vertreten. Die meisten Kreuzblütengewächse sind einjährig und von krautigem Wuchs. Die Größe ihrer Blätter reicht von winzig (*Lepidium*) bis sehr groß (*Crambe*), Form, Rand und Anordnung können ebenso variieren. Der deutsche Name der Familie sowie die ältere Bezeichnung Cruciferae stammen von der kreuzartigen Anordnung der 4 Petalen her. Vier Kelchblätter, sechs Staubblätter mit relativ kurzen Filamenten, der oberständige Fruchtknoten bestehend aus zwei Fruchtblättern komplettieren die radiärsymmetrischen, winzigkleinen bis mittelgroßen Blüten, die in verschiedenen Blütenstandsformen angeordnet sein können. Die Fruchtform ist eine Schote oder ein Schötchen.

Die in der Familie auftretenden Glucosinolate variieren hinsichtlich Struktur und Gehalt beträchtlich und können sowohl als Fraßschutz als auch als Attraktor z.B. für die Eiablage des Kohlweißlings (*Pieris rapae*) fungieren. Das fette Öl im Samen von *Brassica napus* L. (Raps) wird als Speiseöl oder nach Umesterung als Biokraftstoff verwendet. Cardenolide finden sich beispielsweise in *Cheiranthus cheiri* (Goldlack). Bei *Arabidopsis thaliana* L. handelt es sich um eine der wichtigsten Modellpflanzen in der Biologie. Pharmazeutisch verwendete Brassicaceae sind zum Beispiel: *Brassica napus* var. *napus* L. (Rapsöl - Rapae oleum), *Brassica nigra* L. KOCH. (Schwarze Senfsamen - Sinapis semen), *Capsella bursa-pastoris* L. MEDIK. (Hirtentäschelkraut - Bursae pastoris herba), *Sinapis alba* L. (Weiße Senfsamen - Erucae semen).

Fürderhin werden Arten der Gattung Brassica weltweit als Gemüse kultiviert (diverse Kohlar-ten), ebenso Armoracia (Meerrettich), *Lepidium sativum* L. (Gartenkresse), *Raphanus sativus* L. (Radieschen) Auch bekannte Zierpflanzen wie z. B. Iberis (Schleifenblume), Lunaria (Silberblatt) oder Cheiranthus (Goldlack) stammen aus dieser Familie.

### A2.2.1 *Cochlearia officinalis* L.

Das gemeine Löffelkraut, auch bekannt unter den Namen Kressekraut, Bitterkresse und Skorbutkraut, gehört zur Familie der Brassicaceae. Die zweijährige, krautige Pflanze ist in der gesamten nördlichen Hemisphäre verbreitet, sie bevorzugt feuchte, salzhaltige Böden. Volkstümlich wird das Löffelkraut als harntreibendes Mittel, bei Rheuma, Gicht und Magenbeschwerden verwendet. Als natürlicher Vitamin-C-Lieferant wurde die Pflanze schon im Altertum auf langen Seereisen verwendet, woher der Name Skorbutkraut stammt. Äußerlich wird das Kraut für Umschläge bei Geschwüren verwendet und als Mundspülung bei Zahnfleischentzündungen.

Die verwendeten Pflanzenteile sind die getrockneten, im ersten Jahr geernteten grundständigen Blätter oder die im zweiten Jahr kurz vor oder während der Blüte geernteten oberirdischen Teile der Pflanze. Ihren Namen erhielt die Pflanze von ihren löffelartig geformten Blättern (Löffel - lat. cochlear). *Cochlearia officinalis* L. findet heute Verwendung in der Homöopathie in den Konzentrationen D1-3. Neben Globuli und Salben befindet sich zum Beispiel das Präparat Oculoheel® Augentropfen zur Behandlung des Sicca-Syndroms im Handel.

### A3 Aufgabenstellung

Die Ziele der Arbeit bestanden darin, interessant erscheinende Pflanzenfamilien systematisch nach Calysteginen zu untersuchen und geeignete Kandidaten für die Untersuchung der an der Biosynthese beteiligten Enzyme zu identifizieren. Das Screening sollte sich an Pflanzenfamilien orientieren, in denen bereits Tropanstrukturen bekannt waren.

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass die Biosynthese in anderen Pflanzenfamilien nach dem gleichen Schema abläuft wie in Solanaceae, sollte durch *in vivo* Fütterungsversuche mit Tropinon die enzymatische Umsetzung zu Pseudotropin gezeigt werden. Das tropinonreduzierende Enzym sollte kloniert, exprimiert und biochemisch charakterisiert werden. Der Vergleich der genetischen Sequenzen des Enzyms mit den Solanaceae-Enzymen verspricht Auskunft über die Entwicklungsgeschichte der Tropanalkaloidstoffwechsels.

# B Materialien und Methoden

## B1 Materialien

### B1.1 Pflanzen und Wurzelkulturen

#### B1.1.1 Moraceae

Blattmaterial von Moraceae wurde gesammelt im Botanischen Garten der Universität Halle, Samen von *Morus alba* L. wurden bezogen über B&T World Seeds und Rühlemanns Samenhandlung, keimten aber nicht.

#### B1.1.2 Brassicaceae

Samen von *Cochlearia officinalis* L. , *Cochlearia arctica* SCHLECHTD und *Arabidopsis thaliana* L. *Ecotype Columbia* stammen aus dem Botanischen Garten der Universität Halle. Samen und Pflanzen weiterer *Cochlearia*-Arten entstammen der Sammlung von Professor Dr. Marcus Koch (Universität Heidelberg). Die Kultivierung erfolgte unter Langtagbedingungen (16 Stunden hell, 8 Stunden dunkel) bei ca. 23°C im Gewächshaus des Biozentrums Halle. Die Wurzelkulturen von *Arabidopsis thaliana* L. und *Cochlearia officinalis* L. wurden selbst angelegt (Czako 1993), sie wuchsen in ca. 70 ml ARC Medium in 300 ml Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler mit 100 U/min im Dunkeln. Der Zusatz von 0,05 mg/l IAA war nötig. Weitere Brassicaceae-Proben wurden im Botanischen Garten der Universität Halle gesammelt.

#### ARC-MEDIUM

MS Salze	4,3	g
Miller'sche Lösung (6 % m/v KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3	ml
myo-Inositol	200	mg
Vitamix Stammlösung	2	ml
Sucrose	3	g
Aqua dest.	ad 1	l

#### VITAMIX STAMMLÖSUNG (500X)

Vitamin B1	500	mg
Vitamin B6	50	mg
Glycin	100	mg
Nikotinsäure	50	mg
Folsäure	25	mg
Biotin	50	mg
Aqua dest.	ad 100	ml

#### B1.1.3 Erythroxylaceae

Das getrocknete, gepulverte Blattmaterial wurde zur Verfügung gestellt von Philippe Christen (Universität Zürich), alle Proben entstammten der Sammlung von Dr. Timothy Plowman, größtenteils finden sich Voucher dieser Proben im Herbarium des Field Museum (Chicago, Ill, USA). Die Übersicht über die Proben mit Informationen zu Sammlungszeit und Sammlungsart befindet sich im Anhang. Die Proben sind durch Accession numbers gekennzeichnet, wenn ein Voucher vorhanden ist. Proben ohne Voucher sowie Proben von Mauritius und aus Südafrika wurden von

den entsprechenden Sammlern identifiziert. Frisches Pflanzenmaterial und Samen von *Erythroxy- lum novogranatense* stammten aus dem Botanischen Garten der Universität Halle. Die Anlage von Gewebekulturen gelang nicht. Wenn nicht anders ausgewiesen, wurden Blattproben für die Analysen verwendet.

### B1.2 Bakterien

Tabelle B.1: Verwendete Bakterien

STAMM	GENOTYP
BL21 Codonplus DE3-RP <sup>®</sup> (Stratagene)	<i>E. coli</i> BF <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU_proL Cam</i> <sup>r</sup> ]
OneShot <sup>®</sup> Top10 (Invitrogen)	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ</i> _( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) <i>φ_80lacZ Δ_M15 Δ_lacX74 recA1 araD199 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>endA1 nupG</i>
XL1-Blue <sup>®</sup> (Stratagene)	<i>E. coli</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]
ER 1647 <sup>®</sup> (Novagen)	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> <i>λ</i> <sup>-</sup> <i>trp-31 rpsL104</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>fhuA2 Δ(lacZ)r1 sup E44 xyl-7 mtl-2 metB1 recD1014</i>
BM25.8 <sup>®</sup> (Novagen)	<i>E. coli</i> F' [ <i>tra D36 lacI<sup>q</sup> lacZ Δ M15 pro A<sup>+</sup>B<sup>+</sup></i> ] <i>sup_E thi (lac pro AB)</i> (P1) Cm <sup>r</sup> <i>hsdR</i> (r <sup>+</sup> m <sup>+</sup> ) ( <i>λ imm</i> <sup>434</sup> Kan <sup>r</sup> )
BL21(DE3)pLysE <sup>®</sup> (Novagen)	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> <i>optT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysE (C <sup>a</sup> m <sup>r</sup> )
Rosetta-gami <sup>®</sup> B 5615 (Novagen)	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1 ahpC gor522_::_Tn10</i> (Tc <sup>R</sup> ) <i>trxB::kan pRARE2</i> (C <sup>a</sup> m <sup>R</sup> ) pAR5615 (Ap <sup>R</sup> )

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme erfolgte in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten unter Zugabe von Antibiotika bei 37°C. Für Flüssigkulturen wurden LB- oder TB- Medium (Sambrook 1989) verwendet. Transformierte Bakterien wurden auf verfestigtem LB-Medium (15 g/l Agar), ausgestrichen und kultiviert.

### B1.3 Vektoren

Tabelle B.2: Verwendete Vektoren

VEKTOR	CHARAKTERISTIKA	HERSTELLER
pCR <sup>®</sup> 2.1 TopoTA	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pet21d	Amp <sup>r</sup> , 6xHis- <i>tag</i> (C-terminal)	Novagen
pSCREEN-1b(+)	Amp <sup>r</sup> , 6xHis- <i>tag</i> (N-terminal)	Novagen

<b>Legende</b>	ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
	Antibiotikaresistenz	
	Amp	Ampicillin
	Kan	Kanamycin

## B1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden synthetisiert durch die Firma MWG Biotech AG. Gewobbelte Stellen innerhalb der Oligonukleotide werden durch Angabe der Basen in Klammern gekennzeichnet. Das Design der Primer wurde unterstützt durch PRIMO (BioToolKit, ChangBioscience).

Tabelle B.3: Verwendete Oligonukleotide

NAME	SEQUENZ / ANWENDUNG	TM	LÄNGE (bp)
<b>forward, TR-Suche</b>			
TRdir01	GCGTA CTGCT GGTAT TGTCATA TATAC	61,3	25
TRdir02	CAGGC GCAGC CAACG GCATA GG	67,7	22
TRdir03	TGCAC TGCCC TTGTT AC(CT)GG TGG	65,1	23
TRdir04	CTAAT GC(AC)GG (AGT)GTGG (CT)(AG)ATA CAT	60,3	23
TRdir05	T(TA)GGG TA(CT)GC (AT)(AG)TA GTGGA AGAA	58,9	23
<b>TRdir06</b>	<b>TGGTG GCTC(CT) AAAGG (AC)AT(ACT)G GG</b>	<b>62,7</b>	<b>22</b>
TRdir07	GCA(AT)(GC) AGT(AGT)T ATACA TGTTT ACG	57,7	23
TRdir08	CAATA T(CF)(CT)TG GT(AG)AA TAATG C(CT)GG	57,3	24
TRdir09	GGCAT AGGGT ATGGG AT(AC)GT AG	61,2	22
TRdir10	GCATC AGT(GT)T ATACA TGTTT ACG	58,0	23
TRdir11	GG(AT)GC ATCAG T(GT)TAT ACATG	54,2	20
<b>reverse, TR-Suche</b>			
TRrev01	CGCGA CCA(GT)A GAAG(AT) TGCAA TAAC	61,9	24
TRrev02	TTTGG TTGCT CCATA AACAG CCTC	61,0	24
TRrev03	TGC(AT)(AG) AAGCC CC(AG)GA AA(CT)(AG)G AAG	62,4	23
TRrev04	CCAGT GACAT ATGAA GCAGC AGG	62,4	23
TRrev05	CCAC(AC) ATTAG CCATA A(AG)TCC ACC	60,6	23
TRrev06	CCCAA (CT)(GCT)(AT)GT GGGGT TAAAA TGAC	61,3	24
TRrev07	TTTGG AAGC(AT) GA(AG)TA AAGAG AAA(GC)	56,7	24
TRrev08	GGAA(GT) AAA(CT)A AA(AGT)A(CT) AACAT TTCC	53,9	24
TRrev09	CCACC ATTAG CCATA AATCC ACC	60,6	23
<b>TRrev10</b>	<b>GCACC TTTGG (AT)(AT)GC(AT) (GC)(AC)(AG)TA AA</b>	<b>58,4</b>	<b>22</b>
TRrev11	GCCAT AAATC CACCA TCAAC AT	56,5	22
<b>RACE-PCR TR</b>			
AAP	GGCCA CBCGT CGACT AGTAC GGGII GGGII G	>75	36
AP	GGCCA CGCGT CGACT AGTAC T(T)16		
AUAP	GGCCA CGCGT CGACT AGTAC	63,5	20
3' TR_RACE_01	TGGTG GCTCT AAAGG CATTG G	59,8	21
5' TR_RACE_02	CAGGT TACCA CTTCT GTCTG C	59,8	21
3' TR_RACE_03	CGAGA GAAGC TCATG GAAAC C	59,8	21
5' TR_RACE_04	ACGTA AGAAG CCGCA GGGAG AC	64,0	22
5' TR_RACE_05	GCACC TTTGG AAGCT CCGTA ATAG	62,7	24
5' TR_RACE_06	GTACA ACTCC AGATA CGGAG G	59,8	21
5' TR_RACE_07	TGAGC ACGAT GCTCC CTGAA C	61,8	21
5' TR_RACE_08	CGAGC TGCGA GAGAT GAAAA GC	62,1	22
5' TR_RACE_09	GGATG CGCGA GCTGC GAAAG	63,5	20
5' TR_RACE_10	GATGC GCGAG CTGCG AAAGA TG	64,0	22
<b>forward, PMT-Suche</b>			
PMTdir01	AGTC(AT) GCAAC (AT)TATG G(AGT)GTT	56,8	23
PMTdir02	TTGGA TGGAG (CT)AAT(CT) CAA	49,1	18
<b>PMTdir03</b>	<b>GCACA CTC(AGC)T TGAAG GTTGA</b>	<b>56,6</b>	<b>20</b>
PMTdir04	GG(GT)TG GTT(CT)T C(AGT)GAG TTTAG C	58,5	21
PMTdir05	TTTGA GTCAG CAACT TATGG (AGT)AA (G)	59,4	25

NAME	SEQUENZ / ANWENDUNG	TM	LÄNGE (bp)
<b>reverse, PMT-Suche</b>			
PMTrev01	GGACC (AG)AT(AT)G GATC(AT) GAAGA	56,3	20
PMTrev02	CCAAG CATAG TT(AGC)AC AGAAC C	57,2	21
PMTrev03	GGCAA AAT(CT)A AAGCT GCTTT (AG)TGAA TATC	61,0	29
PMTrev04	CTTTT GCTGG ACCAA TAGG(AG) TCAT	61,9	24
PMTrev05	<b>CCATC (AT)CCTC CTCCA AT(AG)AC C</b>	60,8	21
<b>Ganzlängenklone</b>			
TRdir	CCATG GCTAA TTAA GAGAG AGCTC	61,3	25
TRrev	GCGGC CGCTC TAAAA GGC	60,5	18
SPSdir	CCATG GATCC TTGTT CTGCT ACCG	64,4	24
SPSrev	GCGGC CGCAT TGGAT TTTGA CTCG	66,1	24
<b>putative <i>TR Arabidopsis thaliana</i> L. (genspezifisch)</b>			
AT360dir	CCATG GCAAA GGAAG GGGGC TTGGG AGAG	68,2	29
AT360rev	CTCGA GTGGC ATAGT CTTGA AGGAA AAACC	68,3	30
<b>TR-Mutagenese</b>			
C_Y209S_dir	CAACT CCTTT AGCTT CCAAT <b>AGTTT</b> TAGAA ATGAG GAG	67,3	38
C_Y209S_rev	CTCCT CATTT CTAAG <b>ACTAT</b> TGGAA GCTAA AGGAG TTG	67,3	38
A_S209Y_dir	GAAAC TCCTT TAGTT ACCGA <b>ATATC</b> TTAGT AATGA GGAG	67,4	39
A_S209Y_rev	CTCCT CATTG CTAAG <b>ATATT</b> CGGT AACTA AAGGA GTTTG	67,4	39

**fett:** Primer, die zur Amplifikation *tr*- bzw. *spds*- homologer Fragmente führten

TM: Schmelztemperatur

fett hervorgehoben bei TR-Mutagenese: Positionen der Punktmutation

## B1.5 Chemikalien und Standards

Die verwendeten Chemikalien entsprachen den Reinheitsansprüchen *p. a.* und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Tabelle B.4: Verwendete Chemikalien und Größenmarker

CHEMIKALIE	BEZUGSFIRMA
Kanamycin	Gerbu
Ampicillin	Gerbu
Carbenicillin	Gerbu
Biotrace NT <sup>®</sup> Membran	Pall
ATP	Biomol
NADPH	Gerbu
GRÖSSENMARKER	
100bp DNA-Leiter	Peqlab / Sigma
FastRuler Middle Range	Fermentas
PeqGOLD 1kb Leiter	Peqlab
PeqGOLD Protein Marker II	Peqlab
PageRuler (prestained)	Fermentas

Die Calystegine A3, A5, B1, B2, B3 und B4 wurden freundlicherweise von Prof. N. Asano (Kanazawa, Japan) zur Verfügung gestellt. Nortropin wurde dankenswerterweise von der Firma Boehringer-Ingelheim zur Verfügung gestellt, Pseudotropin wurde von Frau Prof. B. Dräger (MLU Halle-Wittenberg) synthetisiert.

## B1.6 Kits und Enzyme

Tabelle B.5: Verwendete Kits und Enzyme

KIT / ENZYM	BEZUGSFIRMA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen
TA-Cloning Kit	Invitrogen
PeqGOLD RNAPure	Peqlab
HotStar <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Qiagen
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Promega
Superscript Preamplification System Kit	GibcoBRL
<i>RACE</i> -PCR Kit	GibcoBRL
Straight A's mRNA Isolation System	Novagen
OrientExpress <sup>®</sup> Oligo(dT) cDNA Synthesis Kit	Novagen
QuikChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	NEB, Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
RNase H	Promega
T4 DNALigase	Peqlab
Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase	Takara
Lysozym	Applichem
Glucose-6-phosphatdehydrogenase (von <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	Sigma Aldrich
Desoxyribonucleosidtriphosphate	NEB / Fermentas
Desoxyribonuclease I aus Rinderpankreas	Sigma Aldrich
SuperScript <sup>™</sup> II/III reverse Transkriptase	Invitrogen

## B1.7 Puffer, Standardlösungen und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Standardlösungen und Medien basieren, wenn nicht anders angegeben, auf den Vorschriften von Sambrook und Mitarbeitern (Sambrook 1989).

## B1.8 Geräte und Hilfsmittel

Die wichtigsten verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in den einzelnen Kapiteln aufgeführt.

## B2 Methoden

### B2.1 Molekularbiologische Methoden

#### B2.1.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Für kleine Mengen RNA das Kit PeqGOLD RNAPure (Tabelle B.5) oder die TRIZOL<sup>®</sup> Methode, für größere RNA-Mengen wurde eine modifizierte Form des von Reinbothe und Mitarbeitern beschriebenen Protokolls angewandt (Reinbothe 1992). Bis zu 3 g frisches Pflanzenmaterial konnten bei dieser Methode eingesetzt werden. Dieses wurde mit flüssigem Stickstoff fein gemörsert und mit 6 ml NTES-Puffer extrahiert. Die Fällung der Proteine erfolgte durch Zusatz einer 1:1 Mischung aus Chloroform und Phenol, starkes Mischen der Probe (Vortex Genie 2); durch anschließende Zentrifugation (10 min; 5000 g; 4°C) wurden diese abgetrennt. Nach Abtrennung der wässrigen, oberen Phase wurde dieser Schritt so lange wiederholt, bis kein Protein mehr ausfiel. Die wässrige Phase wurde dann nochmals mit Chloroform geschüttelt um Reste von Phenol zu entfernen.

##### NTES-PUFFER

100	mM	Tris-HCl pH 7.5
1	mM	EDTA
100	mM	NaCl
1%	(m/v)	SDS
		Aqua dest.

Durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 3 Vol Ethanol 96% (v/v) wurden die Nukleinsäuren über Nacht bei -20°C gefällt. Das Pellet wurde nach Zentrifugation (30 min; 5000 g; 4°C) mit Ethanol 70% (v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert, bei RT getrocknet und in 5 ml sterilisiertem, mit DEPC behandeltem Wasser gelöst. Durch Zugabe von 5 ml 4 M LiCl (pH 5,2) erfolgte die Fällung der RNA über Nacht. Das Pellet wurde nach Zentrifugation (30 min; 5000 g; 4°C) gewaschen, getrocknet und in 100–300 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst. Die Gehaltsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm (Gene Quant II Pharmacia Biotech). Die Reinheit der RNA wurde durch den Quotient  $A_{260nm}/A_{280nm}$  bestimmt, dieser lag bei allen Proben > 1,6.

#### B2.1.2 Isolierung von mRNA (Straight A's<sup>®</sup>mRNA Isolation System)

Für die Erstellung einer cDNA Bank empfahl sich die direkte Isolation von mRNA, hierzu wurde das Straight A's<sup>®</sup>mRNA Isolation System (Tabelle B.5) verwendet. Maximal 4 g frisches Pflanzengewebe konnten für diese Methode eingesetzt werden. Die Lysepuffermenge betrug 12,5 ml pro 1 g Gewebe, die verwendete Menge Magnetight<sup>®</sup>Oligo(dT) Partikel 10 mg pro 1 g Gewebe. Das mit flüssigem Stickstoff gemörserte Pflanzenmaterial wurde mit der entsprechenden Menge Lysepuffer und DTT (Endkonzentration 10 mM) versetzt, die Mischung 1–2 min homogenisiert und dann zentrifugiert (15 min; RT; 9000 g). Die entsprechende Menge Oligo(dT)-Partikel wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Im magnetischen *SeparationStand* wurden die Partikel festgehalten, so dass der Überstand durch dekantieren abtrennbar war. Die Partikel wurden nachfolgend mit 1,5 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend in 1 ml Waschpuffer resuspendiert.

Der Überstand nach Zentrifugation der Lyse-Mischung wurde mit den Magnetight<sup>®</sup>Oligo(dT) Partikeln versetzt und vorsichtig gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Partikel aus der Lösung mit Hilfe des *SeparationStand* festgehalten und der Überstand abgegossen. Danach erfolgten 2 Waschschriffe mit je 6 ml Waschpuffer. Am Ende des zweiten Waschschriffs wurde das Reaktionsgefäß langsam dem *SeparationStand* entnommen, so dass sich die Oligo(dT)-Partikel am Boden sammelten. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Oligo(dT)-Partikel mit Hilfe von 1 ml Waschpuffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sämtliche Flüssigkeit weitestgehend entfernt. Zur Elution der mRNA wurden die Oligo(dT)-Partikel mit 0,5 ml nukleasefreiem Wasser versetzt, kurz gemischt (Vortex Genie 2) und für 10 min auf 60°C erhitzt. Durch Festhalten der Oligo(dT)-Partikel im *SeparationStand* konnte nun der Überstand, der die mRNA enthielt, abgetrennt werden. Die Fällung der mRNA erfolgte durch Zugabe von 2 µl Glycogen (10 mg/ml), 50 µl 3 M Natriumacetat und 0,6 Volumen Isopropanol, die Abtrennung durch Zentrifugation (10 min; 14000 g; 4°C). Das Pellet wurde mit 0,5 ml Ethanol 70% (v/v) gewaschen, anschließend getrocknet und in 25 µl H<sub>2</sub>O DEPC gelöst. Die Gehaltsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm (Gene Quant II Pharmacia Biotech). Die Reinheit der mRNA wurde durch den Quotient  $A_{260nm}/A_{280nm}$  bestimmt, dieser lag bei allen Proben > 1,6. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist nicht bekannt und Teil des Patents des Herstellers.

### B2.1.3 Herstellung von cDNA

Die Umschreibung von mRNA in cDNA erfolgte mittels SuperScript II<sup>®</sup>Reverser Transkriptase (Invitrogen) (Tabelle B.5) entsprechend den Herstellerangaben.

### B2.1.4 PCR (RT, multiplex, RACE, colony, Plaque)

**RT-PCR** Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente zur Amplifikation von cDNA Fragmenten. Ein Standardansatz von 50 µl war wie folgt zusammengesetzt:

#### PCR-STANDARDANSATZ

5	µl	10x PCR-Puffer
0,1	mM	dNTP-Mix
0,25	mM	je Primer
3	µl	cDNA
1	U	Polymerase
ad 50	µl	Aqua dest.

Verwendung fanden auch Ansätze, die das Halbe oder ein Viertel des Standardvolumens umfassten. Die *Taq*-Polymerase von Peqlab wurde für Standard-, *colony*- und Plaque-PCR verwendet. Für höhere Lesegenauigkeit wurde für die finale RT-PCR der einzelnen Gene und bei den Ausgangs-PCR für Klonierungen die *Pfu*-Polymerase (Promega) eingesetzt. Die PCR wurde im T3 Thermocycler (Biometra) oder im Tgradient Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Die Standardbedingungen waren dabei für die *Taq*-Polymerase: 95°C 5 min, 35 x [95°C 1 min; 50-62°C 1 min; 72°C 1 min], 72°C 10 min und für die *Pfu*-Polymerase: 95°C 5 min, 30 x [95°C 1 min; 50-62°C 0,5-1 min; 72°C 2-3 min], 72°C 10 min.

**Multiplex-PCR** Die Reaktionsmischungen (50 µl Standardansatz) enthielten hierbei insgesamt sechs Primer - jeweils drei *forward* und drei *reverse* gerichtete. Diese Multiplexreaktionen wurden bei niedrigen Annealingtemperaturen durchgeführt.

**RACE-PCR** Das *tr*-homologe Amplifikat (C2.1) wurde mit Hilfe der *RACE*-PCR am 5' und am 3'-Ende vervollständigt (Frohmann 1993). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des *RACE*-PCR Kits von GibcoBRL (Tabelle B.5). Für die 5'-*RACE*-PCR wurde Gesamt-RNA aus Blättern für die Erststrangsynthese verwendet. Die verwendeten Primer (TR\_RACE\_04–10) sind Tabelle B.3 zu entnehmen. Die erhaltene cDNA wurde mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Tabelle B.5) gereinigt und mittels terminaler Desoxynukleotid Transferase (TdT) mit Desoxycytosinnukleotiden am 3'-OH Ende versehen.

Die Cytosinreste bilden die Annealingposition des Abridged Anchor Primer (AAP, poly-G-Primer) und ermöglichen so eine erste PCR mit dem genspezifischen Primer (TR\_RACE\_05); (Tabelle B.3) (10 µM) bei Einsatz von 5 µl der o.g. cDNA und 2,5 U Taq-Polymerase (Pqlab) unter PCR-Standardbedingungen. Es folgte eine so genannte *nested*-PCR mit den genspezifischen Primern (Tabelle B.3) (10 µM), dem Abridged Universal Amplification Primer AUAP(10 µM) und 5 µl der 1:50 verdünnten ersten PCR.

Für die 3'-*RACE* wurde die cDNA aus Gesamt-RNA von Wurzelkulturen, Wurzeln oder Blättern erzeugt, Oligo(dT)12-18-Primer (AP, Adapter Primer) und die SuperScript™II oder III Reversen Transkriptasen (GibcoBRL, Tabelle B.5) wurden dafür verwendet. Für die erste PCR wurden 2 µl dieser cDNA, der genspezifische Primer TR\_RACE\_01 (Tabelle B.3) (10 µM) und AUAP (10 µM) eingesetzt und unter PCR-Standardbedingungen mit 2 U Taq-Polymerase (Pqlab) amplifiziert. In der darauf folgenden *nested*-PCR mit den genspezifischen Primern TR\_RACE\_02 und TR\_RACE\_03 (Tabelle B.3) (10 µM) und AUAP (10 µM) dienten 2 µl des 1:50 verdünnten Produkts der ersten PCR als *template*.

Die entstandenen Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese getrennt, Banden ausgeschnitten, eluiert (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen), kloniert (TA-Cloning Kit, Invitrogen) (Tabelle B.5) und sequenziert.

**Colony-PCR** Die *colony-PCR* wurde zur Überprüfung der Transformationseffizienz in *E. coli* angewendet. Mit einem sterilen Holzstäbchen wurden Bakterienkolonien von LB-Platten gepickt und in 20 µl sterilem Wasser suspendiert. Die Bakterien wurden dann durch Erhitzen auf 99°C für 10 min zerstört, um die Plasmide der Standard-PCR zugänglich zu machen. Die Auswertung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

**Plaque-PCR** Die Plaque-PCR wurde zum Screening von Phagen-Plaques verwendet. Zum Einsatz kamen dabei die vektorspezifischen Primer SP6\_Promotor und T7\_Terminator beziehungsweise die entsprechenden genspezifischen Primer (Tabelle B.3). Dazu wurde ein Agar *plug*, der den vereinzelt Phagen enthielt, in 25 µl SM-Puffer überführt. Die Elution der Phagen dauerte etwa 1 Stunde, dann wurden 5 µl des Eluats in ein PCR Reaktionsgefäß 0,5 ml überführt und bei 99°C für 5 min erhitzt um den Vektor der Standard-PCR zugänglich zu machen. Die Auswertung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

### B2.1.5 Klonierung und Transformation

Die Auftrennung von DNA im Agarosegel, Restriktionen von DNA, Ligationen und Plasmidisolierungen erfolgten nach den Methoden von Sambrook und Mitarbeitern (Sambrook 1989). Alle Transformationen erfolgten nach der Hitzeschockmethode von Cohen und Mitarbeitern (Cohen 1972). Für einige dieser Arbeitsschritte standen Kits zur Verfügung, bei denen nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde (Tabelle B.5). Durch PCR amplifizierte Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und eluiert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR 2.1 (Tabelle B.2) kloniert und der Vektor in *E. coli* OneShot®Top10 (Tabelle B.1) transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch *colony*-PCR (B2.1.4). Positive Klone wurden dann in 10 ml flüssigem LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin über Nacht kultiviert. Die aus diesen Kulturen präparierten Plasmide wurden anschließend sequenziert. Für die Ganzlängklone wurde *Pfu*-Polymerase zur Amplifikation eingesetzt, daher war nach Reinigung des PCR-Produktes das Anfügen überhängende Adenosinreste notwendig, um eine Transformation in den Vektor pCR 2.1 (Tab. B.2) zu ermöglichen. Das PCR-Produkt wurde dazu nach der Elution aus dem Agarosegel für 15 min bei 72°C mit 10 x PCR-Puffer, 50 µM dATP und 2 U *Taq*-Polymerase inkubiert. Die so behandelten PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR 2.1 (Tab. B.2) kloniert und der Vektor in *E. coli* OneShot®Top10 (Tab. B.1) transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch *colony*-PCR (B2.1.4). Positive Klone wurden dann in 50 ml flüssigem LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin über Nacht kultiviert. Die aus diesen Kulturen präparierten Plasmide wurden anschließend sequenziert. Für die Klonierung in den Expressionsvektor pet21d (Tab. B.2) wurden durch die PCR mit Hilfe der Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen an den Enden der Ganzlängklone eingeführt. Sowohl der Expressionsvektor (Leervektor pet21d) als auch der, das Zielgen enthaltende Vektor (Ganzlängklone *tr/spds* in pCR 2.1) wurden einem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen unterzogen (5–16 Stunden bei 37°C), dann per Agarosegelelektrophorese getrennt, die Banden ausgeschnitten und gereinigt. Die Ligation der klebrigen Enden erfolgte bei 16°C über Nacht. Nach Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 15 min wurden 2 µl des Ligationansatzes in *E. coli* XL1-Blue (Tab. B.1) transformiert, positive Klone mittels *colony*-PCR identifiziert (B2.1.4), Plasmide präpariert und nochmals sequenziert. Abschließend erfolgte die Transformation in die Expressionszellen *E. coli* BL21 Codon plus (Tab. B.1).

### B2.1.6 Rekombinante Expression in *E. coli*

Die transformierten Bakterien wurden in LB oder TB- Medium unter Zugabe von 50 µg/ml Carbenicillin bei 37°C in Horizontalschüttlern bei 150 U/min bis zu einer optischen Dichte von  $A_{600nm}=0,8-1$  kultiviert. Die Induktion der Proteinsynthese erfolgte mit 1 mM IPTG bei variablen Temperaturen und Zeiten. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000 g; 10 min; 4°C Zentrifuge Sigma 3K12) und wie in B2.2.2 beschrieben lysiert.

### B2.1.7 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen wurden durchgeführt von MWG Biotech AG, Fraunhofer Str. 22, Martinsried.

### B2.1.8 cDNA Expressionsbank - Orient Express<sup>®</sup> cDNA Library Construction System (Novagen)

**Herstellung einer cDNA-Expressionsbank** Für die Herstellung der cDNA Expressionsbank wurde mRNA verwendet, die, wie unter B2.1.2 beschrieben, aus oberirdischen Teilen von 12 Wochen alten *Cochlearia officinalis* L. Pflanzen isoliert wurde. Unter Verwendung der Oligo (dT)-Strategie entstanden *EcoRI* Restriktionsstellen an den 5'- und *HindIII* Restriktionsstellen an den 3'-Enden der cDNA, diese ermöglichten den Einbau in den  $\lambda$ SCREEN-1 Vektor in einer definierten Orientierung (*sense*). Die Synthese der beiden cDNA Stränge, das Glätten der klebrigen Enden, die Ligation mit den *EcoRI* und *HindIII*-Linkern, die Restriktion und die Ligation in den Vektor erfolgten gemäß den Angaben des Handbuchs des Herstellers und sind in Abbildung B.1 dargestellt. Die *in vitro*-Verpackung der Ligrationsreaktion in Phagen erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll des Kit-Herstellers (Tabelle B.5) in PhageMaker<sup>®</sup> Extrakte. Dabei wurden 1,5  $\mu$ l Ligrationsreaktion zu 50  $\mu$ l PhageMaker<sup>®</sup> Extrakt gegeben und für 2 Stunden bei 22°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SM-Puffer ad 500  $\mu$ l gestoppt. Der Titer der so erhaltenen primären Bank wurde bestimmt und die Bank vermehrt.

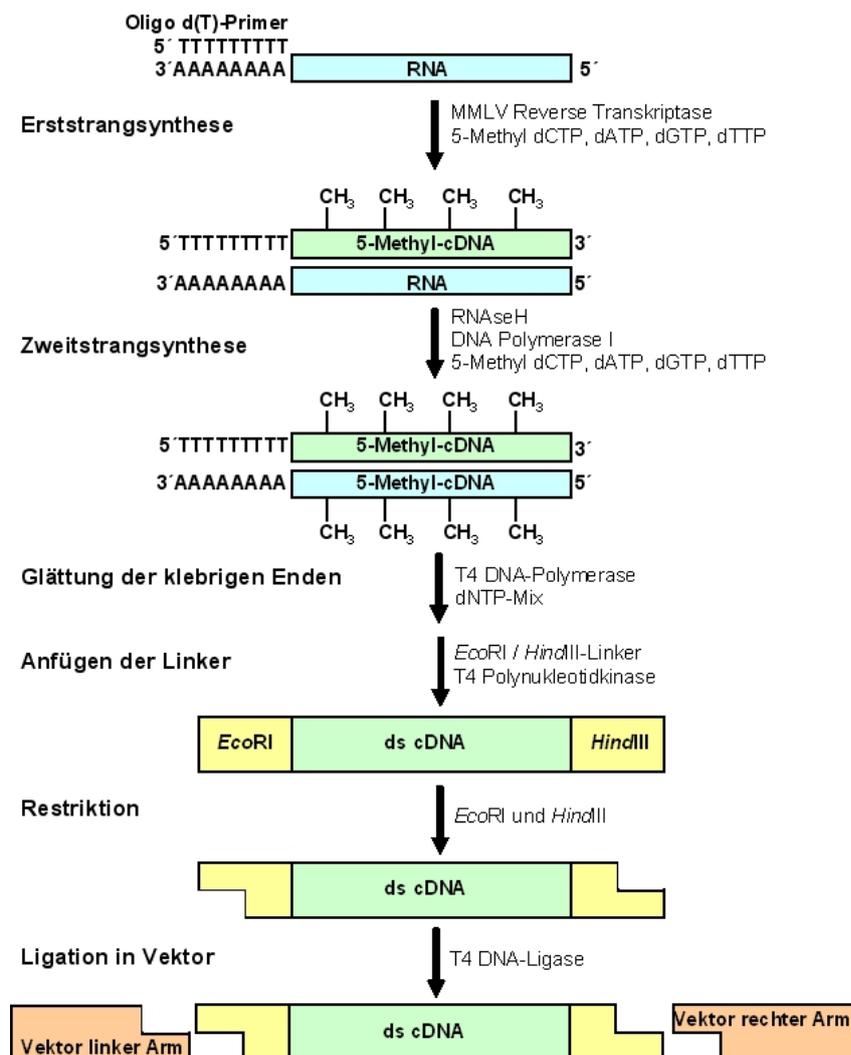


Abbildung B.1: Herstellung einer cDNA Bank

**Ausplattieren der Phagen/Bestimmung des Phagentiters** Der Stamm *E. coli* ER 1647 (Tabelle B.1) wurde in LB-Medium mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> (LBMM) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 600 nm vermehrt. Nach der anschließenden Herstellung von Verdünnungen der Phagen in SM-Puffer, wurden 100 µl jeder Verdünnung mit 100 µl Bakterien vermischt und bei 37°C 20 Minuten lang inkubiert um die Adsorption der Phagen zu ermöglichen. Anschließend wurden 3 ml geschmolzene, auf 47°C abgekühlte Top-Agarose zu dem Gemisch gegeben und diese Mischung komplett auf einer LB-Agar-Platte verteilt. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Bestimmung des Phagentiters wurden die gebildeten Plaques ausgezählt. Der Phagentiter (pfu/ml) wurde wie folgt berechnet:

$10 \times \text{Plaqueszahl}_{\text{Platte}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ .

**Vervielfältigung der Phagenbibliothek** Es wurden Zellen des Stammes *E. coli* ER 1647 (Tabelle B.1) in LBMM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 vermehrt. In einem sterilen 15 ml-Reaktionsgefäß wurden die Phagen mit der Zellsuspension vermischt. Das Verhältnis betrug  $1 \times 10^5$  Phagen zu 0,25 ml Zellen. Zur Adsorption der Phagen an die Zellen wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml geschmolzener Top-Agarose wurde dieses Gemisch auf eine 150 mm H-Agar-Platte gegeben und nach Erstarren der Top-Agarose bei 37°C für 7 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Elution der Phagen von der Platte mit 10 ml SM-Puffer bei 4°C über Nacht. Die SM-Puffer von allen Platten wurden in einem sterilen Reaktionsgefäß vereinigt und 0,5 ml Chloroform zugegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min (Zentrifuge Sigma 3K12) wurde der Überstand in ein frisches Behältnis gegeben und der Titer der sekundären Bibliothek bestimmt. Die Bank wurde mit DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% versetzt, aliquotiert und dann bei -80°C aufbewahrt.

**PCR-Screening** Das PCR-Screening ist eine Methode zum nicht-radioaktiven Screening von cDNA-Banken (Israel 1993). Durch sukzessive Verdünnung werden so Einzelklone isoliert:

### 1. Bestimmung der optimalen *pfu*-Menge

Benötigt wird die geringste *pfu*-Menge, die gerade noch ein PCR-Produkt ergibt. Eingesetzt wurden dazu Dilutionen im Bereich von  $10^3$  bis  $10^7$  pfu/µl, jeweils 1 und 5 µl pro Verdünnung wurden als *template* für eine Standard-PCR verwendet. Die Menge *pfu*, die nötig ist, um gerade noch ein PCR Produkt zu erzeugen, wird  $N_{t1}$  genannt.

**2. Erstes Screening** Eine Übernachtskultur von *E. coli* ER 1647 wurde abzentrifugiert und mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1,5 eingestellt. Ein Milliliter dieser Suspension wurde mit 1 ml SM-Puffer versetzt, der  $3 \times N_{t1}$  *pfu* enthielt. Die Zellen wurden für 15 min bei 37°C inkubiert und dann 18 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> zugesetzt. 6,4 ml der Suspension wurden auf  $8 \times 8$  wells einer Mikrotiterplatte verteilt (100 µl/well). Das entsprach einer Menge von  $N_{w1} = 3 \times N_{t1}/200$ . Die Platte wurde dann für 5–6 h bei 37°C im Schüttelschrank (200–300 U/min) inkubiert. Anschließend wurden Proben von je 20 µl/well in Zeilen und Spalten vereinigt und die Proben 1:1 mit Aqua dest. verdünnt. Von der Verdünnung wurden 5 µl als *template* für eine Standard-PCR eingesetzt.

Die PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese ausgewertet, das machte die Bestimmung der

*wells* an den Kreuzungspunkten positiver Spalten und Zeilen möglich. Die ermittelten *wells* wurden dann einer erneuten PCR-Überprüfung unterzogen und der Phagentiter der positiven *wells* bestimmt.

**3. Zweites Screening** Für die zweite Runde des Screenings wurde  $N_{t2} = N_{w1} \times 2$  *pfu* ermittelt und  $3 \times N_{t2}$  in 1 ml SM eingesetzt. Die Vorgehensweise war dabei dieselbe wie im 1. Screening. Die Anzahl der *pfu* pro *well* betrug  $N_{w2} = 3 \times N_{t2}/200$ .

**4. Drittes Screening** Für die dritte Runde des Screenings wurde  $N_{t3} = N_{w2} \times 2$  ermittelt und  $3 \times N_{t3}$  in 1 ml SM eingesetzt. Die Anzahl der *pfu* pro *well* betrug  $N_{w3} = 3 \times N_{t3}/200$ . PCR-positive *wells* wurden getitert und die einzelnen Plaques der Analyse durch Plaque PCR (B2.1.4) zugeführt. Phagen aus positiven Plaques wurden in Miniflüssigkultur weitergeführt.

**Mini-Flüssigkultur Phagen (Sambrook 1989)** Es wurden Zellen des Stammes *E. coli* ER 1647 (Tabelle B.1) in LBMM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 vermehrt. Zur Anlage einer Flüssigkultur wurde 1 µl des Phageneluats (B2.1.4) zu 100 µl dieser Bakterienkultur gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert um die Adsorption der Phagen an die Bakterien zu ermöglichen. Anschließend wurden 4 ml LB-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben und bei 37°C weiter inkubiert bis die Zellen lysiert waren (6–12 Stunden). Nach Zugabe von 2 Tropfen Chloroform wurde für weitere 15 Minuten inkubiert und dann zentrifugiert (400 g; 10 Minuten; 4°C, Sigma 3K12). Dem Überstand wurde erneut ein Tropfen Chloroform zugesetzt, anschließend erfolgten Bestimmung des Titers der Kultur und dauerhafte Lagerung bei 4°C.

**Subklonierung durch Cre-vermittelte Plasmidexzision** Im Anschluß an die Identifizierung *spds*-positiver rekombinanter Phagen wurden diese in Plasmid-Subklone überführt. Das ausgewählte System ermöglichte, dank des enthaltenen loxP-cre Systems, die 'automatische' Subklonierung *in vivo*. Im λSCREEN Vektorsystem sind vollständige Plasmide im Phagen integriert, diese sind von loxP Erkennungssequenzen (34 bp) flankiert. Die Plasmide wurden erhalten durch Infektion von *E. coli* BM 25.8 (Tabelle B.1), der die cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 exprimiert. Die P1 cre-Rekombinase erkennt die loxP-Sequenzen und formt die Plasmide durch ortsspezifische Rekombination. Da das System mit dem T7 Promotor ausgestattet ist, findet in dem gewählten Bakterienstamm kaum eine Expression des Proteins statt, das ermöglicht auch die Klonierung und Identifikation von Proteinen, die für *E. coli* toxisch sind.

Die Kultivierung erfolgte in LBMM-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 34 µg/ml Chloramphenicol bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0. Die Flüssigkultur wurde 1:10<sup>7</sup> verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung mit 100 µl der Bakterienkultur gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Phagenadsorption). Die Hälfte dieser Mischung wurde auf einer LB-Platte mit 50 µg/ml Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden durch *colony*-PCR (B2.1.4) überprüft und in 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin kultiviert. Die Plasmide wurden präpariert (Qiaquick Mini Prep Kit, Tabelle B.5). Nach Transformation in *E. coli* XL-1 Blue (Tabelle B.1, B2.1.5) und anschließende Präparation der Plasmide aus 50 ml Kulturen (Quiagen Midi Prep Kit, Tabelle B.5) wurden diese der Sequenzierung zugänglich.

**Immunoscreening** Da aufgrund der entlegenen verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Solanaceae und Brassicaceae eine hohe Homologie auf Nukleinsäuresequenzebene zwischen den Tropinonreduktasen nicht zu erwarten war, wurde für die erstellte cDNA-Bank eine immunologische Screeningmethode entwickelt, um zusätzlich zu molekularbiologischen Mitteln auch auf Proteinebene zu suchen.

In einem Dot Blot Vorversuch wurde eine Reaktion zwischen einem Proteinrohextrakt aus den Blättern von 12 Wochen alten *Cochlearia officinalis* L. Pflanzen und *Solanum tuberosum* L. - TRI Antikörpern beobachtet. Als primärer Antikörper dienten Antikörper die gegen rekombinantes TRI-Protein aus *Solanum tuberosum* L. in Kaninchen erzeugt wurden (Fa. Pineda Antikörper Berlin, Heike Kaiser, Halle).

Für das Immunoscreening der cDNA Bank wurde der *E. coli* Stamm BL 21 (DE3)pLysE (Tabelle B.1) in LB-Medium unter Zusatz von 0,2% Maltose, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 34 µg/ml Chloramphenicol kultiviert. Es wurden  $2 \times 10^4$  pfu in 100 µg SM-Puffer mit 200 µg der Bakterienkultur vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Top-Agarose (47°C) zugegeben und die Mischung auf 2XYT-Platten verteilt. Nach 5–7 Stunden Inkubation bei 37°C erreichten die Plaques einen Durchmesser von 0,5–1 mm. Dann wurden trockene BiotraceNT® Nitrocellulosefilter luftblasenfrei aufgebracht und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Position des Filters auf der Platte wurde mit wasserfester Tinte markiert und der Filter von der Platte gelöst. Absättigung der Filter erfolgte durch Behandlung mit Blockpuffer (TBST, 1% Gelatine) über 30 min, anschließend wurde mit primärem Antikörper (20 ml TBST, 1% Gelatine + 40 µl AK + 100 µl *E. coli* BL21 (DE3)pLysE Lysat 2 h vorinkubiert) für 60 min inkubiert.

Nach Waschen der Filter mit TBST-Puffer für 3 x 10 Minuten erfolgten 45 Minuten Inkubation mit sekundärem Antikörper (40 ml TBST, 1% Gelatine + 10 µl AntiRabbit IgG).

Nach Waschen der Filter mit TBST-Puffer für 3 x 10 Minuten wurden diese auf Whatman-Paper leicht abgetrocknet und anschließend entwickelt (40 ml Entwicklungspuffer + 50 µl BCIP-Lösung + 100 µl NBT-Lösung). Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung beendet und die Nitrocellulosefilter zwischen herkömmlichem Filterpapier getrocknet. Die vollständig entwickelte Methode kam zum Screening nicht mehr zum Einsatz nachdem bereits zuvor eine *tr*-ähnliche Sequenz kloniert wurde.

Für das rekombinante COTR-Protein wurde aber mittels dieser Methode eine Nachweisgrenze < 10 pg ermittelt. Ein Screening mit dieser Methode hätte mindestens zum gleichen Gen geführt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

ENTWICKLUNGSPUFFER		STOPPLÖSUNG	
100 mM	Tris-HCl ph 9.7	50 mM	Tris-HCl ph 7.5
100 mM	NaCl	150 mM	NaCl
50 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,02%	NaN <sub>3</sub>
	Aqua dest.	20 mM	EDTA
			Aqua dest.

SM-PUFFER		TBST	
50 mM	Tris-HCl ph 7.5	10 mM	Tris-HCl ph 8.0
100 mM	NaCl	150 mM	NaCl
10 mM	MgSO <sub>4</sub>	0,1%	Tween 20
0,01%	Gelatine		Aqua dest.
	Aqua dest.		
2XYT		LBMM	
1,6 %	Bacto-Trypton		LB-Medium
1%	Hefeextrakt	0,2%	Maltose
0,5 %	NaCl	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
1,5 %	Agar	für Platten 15 g/l	Agar
	Aqua dest.		Aqua dest.
H-AGAR		TOP-AGAROSE	
1 %	Bacto-Trypton	1 %	Bacto-Trypton
0,8 %	NaCl	0,5 %	NaCl
1,5 %	Agar	0,6 %	Agarose
	Aqua dest.	0,5 %	Hefeextrakt
			Aqua dest.
BCIP-LÖSUNG		NBT-LÖSUNG	
50 mg	BCIP	50 mg	NBT
1000 µl	DMF	300 µl	H <sub>2</sub> O
		700 µl	DMF

### B2.1.9 Site-directed mutagenesis

Für die Einführung einer Mutation wurden hierbei der Vektor mit dem betreffenden Insert (dsDNA) und zwei Oligonukleotide mit der entsprechenden Mutation benötigt. Die Oligonukleotide waren komplementär zu den beiden Strängen des Vektors und wurden während der Reaktion durch die DNA-Polymerase verlängert. Es entstanden zirkulare Stränge mit Strangbrüchen, diese wurden später nach der Transformation durch die *E. coli* XL1-Blue Zellen repariert.

In dem aus *E. coli* stammenden Vektor lag die DNA methyliert vor, der neu synthetisierte Strang war jedoch nicht methyliert. Daher konnte nach abgeschlossener Reaktion das nichtmutierte *template* gezielt durch Verdau mit *DpnI* aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden (Braman 1996). Der mutierte Vektorstrang wurde anschließend in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Auf das Vorhandensein der Mutation wurde durch Sequenzierung geprüft und die Mutanten anschließend in Expressionzellen (*E. coli* Rosetta gami, Tabelle B.2) transformiert.

#### TEMPERATURPROGRAMM SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

95°C	30	s	Denaturierung
95°C	30	s	Denaturierung
55°C	60	s	Annealing der Oligonukleotide
68°C	360	s	Extension (60 s pro 1kb Vektor); 16 Zyklen
37°C	300	s	
37°C	60	min	Verdau mit <i>DpnI</i>
4°C			Pause

## B2.2 Biochemische Methoden

### B2.2.1 Quantifizierung von Proteinen

Die spektrophotometrische Bestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Für die Erstellung der Eichgerade diente Rinderserumalbumin als Referenzprotein. Die photometrische Bestimmung im Bereich von 60–150 µg/ml Protein wurde mit Hilfe eines Zweistrahlphotometers UV 160A (Shimadzu) durchgeführt.

### B2.2.2 Bakterienlyse

Die Lyse der Bakterien machte die überexprimierten Proteine der Reinigung und Charakterisierung zugänglich. Die durch IPTG-Zusatz induzierten *E. coli*-Zellen wurden abzentrifugiert (5000 g; 10 min; 4°C), das Pellet wurde in Lyse-Puffer (300 mM NaCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Imidazol; pH 7,0), unter Zugabe von 0,003% Triton X-100, und 30 mg/l Lysozym und DNase resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte in einem eisgekühlten Ultraschallbad, die Proben wurden 5 x 10 Sekunden mit je 10 Sekunden Pause im Ultraschallbad behandelt. Nach Zentrifugation (14000 g; 30 min; 4°C) wurde im Überstand der Proteingehalt bestimmt und das überexprimierte Protein gereinigt (B2.2.6).

### B2.2.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur Überprüfung der Proteinreinigung wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli 1970). Die Proben wurden mit Probenpuffer (0,625 M Tris-HCl pH 6,8; 10% Glycerol; 2% (m/v) SDS; 4% Mercaptoethanol; 0,25% Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 für 10 min bei 95°C zur Denaturierung behandelt. Die Proteinproben wurden in dem 5%-igen Sammelgel bei einer Spannung von 100 V konzentriert und in dem 12,5%-igen Trenngel bei 140 V in der Minikammer ‚PHERO-minivert‘ (Biotech-Fischer) aufgetrennt. Als Größenstandard diente der PeqGOLD Protein Marker II (Tabelle B.4). Die Proteinbanden wurden durch Coomassie- oder Silber-Färbung sichtbar gemacht.

SAMMELGEL:	TRENNGEL:
5% Acrylamid/Bisacrylamid	12,5% Acrylamid/Bisacrylamid
0,125 M Tris-HCl pH 6,8	0,125 M Tris-HCl pH 8,8
0,1% SDS	0,1% SDS
0,1% Temed	0,12% Temed
0,05% APS	0,016% APS
Aqua dest. ad 2 ml	Aqua dest. ad 6 ml

### B2.2.4 Enzymassay zur Bestimmung der Tropinonreduktaseaktivität

Bei der Umsetzung des Tropinons zu den Tropan-Alkoholen wird NADPH verbraucht (Dräger 1988, Koelen 1982). Der Verbrauch wurde in einem Zweistrahlphotometer UV 160A (Shimadzu) bei 340 nm über 6 min bei 30°C gemessen. Im Standardassay wurden 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,4; 0,2 mM NADPH; 5 mM Tropinon und je nach Aktivität 5–400 µl Proteinlösung

eingesetzt. Die Referenzküvette enthielt anstelle des Substrats das gleiche Volumen Wasser um den unspezifischen NADPH-Verbrauch zu erfassen.

Die Aktivitätsberechnung erfolgte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH mit  $6,18 \times 10^2 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$  bei 340 nm und 30°C (Bergmeyer 1985). Nach der photometrischen Bestimmung wurde dem Assay ein NADPH-regenerierendes System (1 mM Glucose-6-phosphat; 0,5 mM NADP; 0,4 U Glucose-6-phosphatdehydrogenase) zugesetzt und die Reaktion nach 1 Stunde (30°C) durch Zugabe von 100 µl Ammoniak beendet. Der Assay zur Testung der Substratanaloga war analog zusammengesetzt. Abbildung B.2 zeigt die zur Charakterisierung eingesetzten Substratanaloga. Der Enzymassay zur Oxidation der Tropanole enthielt 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5–7,5), 5 mM Tropin oder Pseudotropin und 2 mM NADP. Zum Nachweis des entstandenen Tropinons wurde der Assay über 1 h bei 30°C inkubiert und analog zur Reduktion analysiert. Die Assays wurden über Extrelut<sup>®</sup>-Säulen (Merck) gereinigt (B2.3.2). Die Analyse der Produkte erfolgte per DC (B2.3.7) und GC (B2.3.5).

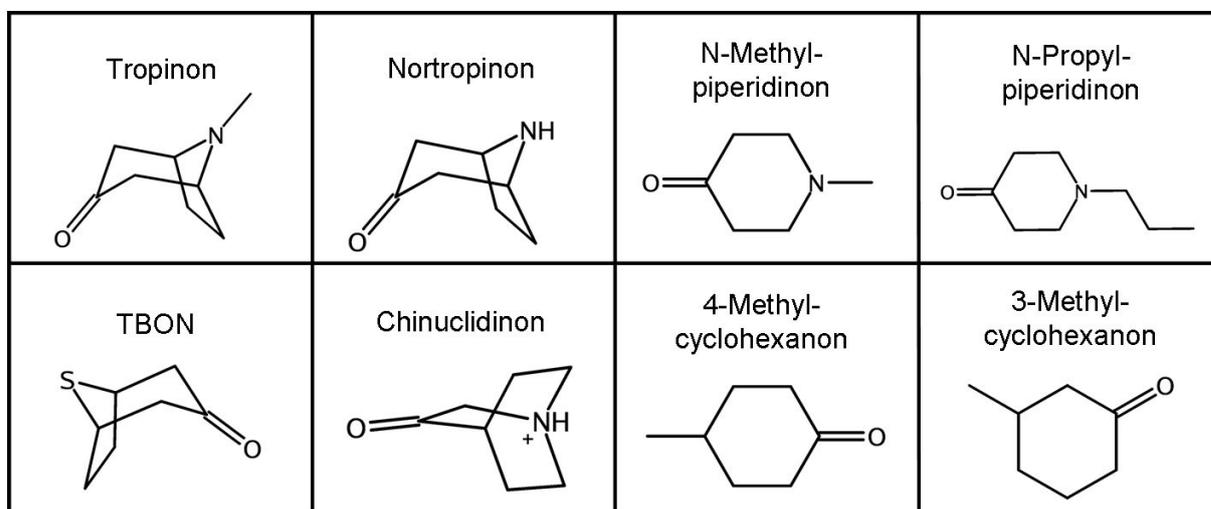


Abbildung B.2: Substratanaloga für TR-Charakterisierung

### B2.2.5 Enzymassay zur Bestimmung der PMT/SPDS-Aktivität

Grundlage dieses Assays bildete ein 100 mM Glycin-Puffer pH 9,0 dem das Substrat Putrescin, die Cosubstrate SAM oder dcSAM sowie Proteinlösung in variablen Anteilen zugesetzt wurden. Die Assays wurden durch Zugabe des Substrats gestartet und die Reaktion durch 17 M NaOH Lösung gestoppt. Die Assays wurden anschließend dansyliert (B2.3.8) und per HPLC analysiert (B2.3.9).

### B2.2.6 Reinigung & Charakterisierung der rekombinanten 6xHis-Fusionsproteine

**Nickel-Affinitätschromatographie** Die rekombinanten Proteine enthielten durch die Klonierung in den pET21d-Vektor einen 6fachen Histidinrest am C-Terminus. Diese Histidingruppen ermöglichen die Chelatkomplexbildung mit zweiwertigen Metallionen, so wurde das rekombinante Protein der Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie zugänglich. Es wurden HiTrap

HP Chelating Sepharose-Säulen mit 5 ml Säulenvolumen (Amersham-Pharmacia) verwendet und ein ÄKTA Explorer System eingesetzt. Das Reinigungsprogramm umfasste folgende Schritte:

Im ersten Schritt fand die Äquilibrierung mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer (300 mM NaCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM Imidazol; pH 7,0) statt. Danach wurde das Bakterienlysate aufgetragen. Darauf folgte das Waschen der Säule mit Bindepuffer. Die Elution erfolgte im Imidazol-Gradienten (20–250 mM) über 4 Säulenvolumen. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden im Enzymassay (B2.2.4) und mit SDS-PAGE (B2.2.3) überprüft.

**Konzentrierung des Proteins** Die aktiven, gereinigten Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von Membranfiltern (Icon, Pierce) durch Zentrifugation (5000 g; 10–20 min; 4°C) eingengt. Die Membranfilter haben eine Ausschlußgröße von 10 kDa, so dass Salze und H<sub>2</sub>O entfernt wurden. Die aktiven, konzentrierten Fraktionen wurden gepoolt und zur biochemischen Charakterisierung verwendet.

**Bestimmung des pH-Optimums** Die konzentrierte Proteinlösung wurde für die Bestimmung des pH-Optimums der Enzyme verwendet. Im Standardassay (B2.2.4) wurde die Art des Puffers variiert um über den gesamten pH-Bereich messen zu können (0,1 M Glycinpuffer für pH 3,5–5,0 / 0,1 M Kaliumphosphatpuffer für pH 5,5–8,0 / 0,1 M Tris-HCl-Puffer für pH 8,0–9,0). Für alle Messungen wurde das gepoolte Protein eingesetzt, Dreifachbestimmungen durchgeführt, Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

**K<sub>m</sub>- und V<sub>max</sub>-Bestimmung TR** Für die K<sub>m</sub>- und V<sub>max</sub>-Bestimmung der TR mit Tropinon wurde das Substrat in einer Konzentration von 0,1–10 mM eingesetzt. Für die Messungen wurde der photometrische Standardassay (B2.2.4) verwendet. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 6,4 durchgeführt, um die erhaltenen Werte mit den bekannten Werten der TR der Solanaceae vergleichen zu können. Die Bestimmung der kinetischen Daten für die anderen Substrate erfolgte analog. Für alle Messungen wurde das gepoolte Protein eingesetzt, Dreifachbestimmungen durchgeführt, Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Auswertung erfolgte durch nicht-lineare Regression mit dem Enzym Kinetik Modul von Sigma Plot.

**Kinetik PMT/SPDS** Zur Ermittlung der kinetischen Daten des Enzyms wurden im Assay (B2.2.5) die Konzentrationen des Substrats und der Cosubstrate variiert. Für jeden Messpunkt wurden je 2 Assays erstellt und von jedem Assay wurden 2 Danyslierungen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach MICHAELIS-MENTEN und HILL.

## B2.3 Analytische Methoden

### B2.3.1 Extraktion und Derivatisierung von Calysteginen

**Moraceae (Standardmethode)** Ein methanolisch-wässriger Extrakt aus lyophilisiertem Pflanzengewebe (entsprechend 1 g Frischmasse) wurde erstellt und nach Abtrennen der festen Bestandteile im Vakuum eingeeengt. Der konzentrierte Extrakt wurde über einen stark sauren Kationenaustauscher (Ionenaustauscher I LAB Merck, Säule: 10 x 100 mm, ca. 5 ml Austauschergel) gereinigt (Molyneux 1996). Der gereinigte Extrakt wurde auf 1 ml eingeeengt und in einem 1 ml GC-Fläschchen gefriergetrocknet. Zum Lyophilisat wurden 50 µl n-Hexan, 40 µl Hexamethyldisiloxan (HMDS), 10 µl Trimethylchlorsiloxan (TMCS) gegeben, 15 min bei 70°C inkubiert und im Ultraschallbad homogenisiert. Als interner Standard wurden 50 µl Azobenzol (1 mg/ml in n-Hexan) dazugegeben und mit n-Hexan auf 500 µl aufgefüllt. Die Silylierung unter milden Bedingungen führt zur Trimethylsilylierung der Hydroxylgruppen (Fleet 1990) und erlaubt die gaschromatographische Bestimmung der Calystegine.

**Erythroxyllaceae** Die zuvor beschriebene Methode wurde für diese Herbariumsproben angepasst. Es wurden 50–100 mg Trockenmasse zur Extraktion eingesetzt. Der Kationenaustauscherschritt wurde ausgelassen. Der konzentrierte Extrakt wurde aliquotiert und die Menge der eingesetzten Silylierungsreagenzien wurde gedrittelt. Die silylierten Proben wurden vor der Injektion zentrifugiert um die bei der Gefriertrocknung und Silylierung gebildeten Präzipitate abzutrennen.

**Brassicaceae** Folgende Veränderungen der oben stehenden Methode wurden vorgenommen: Die Gefriertrocknung und Silylierung des gereinigten Extrakts erfolgte in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß. Eingesetzt wurden dabei nur 50% der üblichen Silylierungsmischung. Nach der Silylierung wurde das Gemisch zentrifugiert und aus dem klaren Überstand 90 µl in einen GC-Fläschchen Einsatz überführt. Der interne Standard Azobenzol wurde dann hinzugefügt (10 µl). Anstelle einer Suspension konnte so eine Lösung injiziert werden, die Spritze und Säule weniger verunreinigte und somit die Säule schonte.

### B2.3.2 Extraktion von Intermediaten der Calysteginbiosynthese/Tropanolen

Ein Gramm Frischmasse wurde zweimal mit 50% wässrigem Methanol extrahiert (Ultra-Turrax). Die vereinigten, zellfreien Überstände nach Zentrifugation (10 min; 4500 g; 4°C) wurden bei 50°C im Vakuum bis auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und mit 50 µl konzentriertem Ammoniak alkalisiert. Der Extrakt wurde über Extrelut<sup>®</sup>-Säulen (Merck) gereinigt. Die Säulen (30 mm x 8 mm) wurden mit 1 g Extrelut<sup>®</sup> gefüllt und 1 ml Extrakt beschickt. Eine zwanzigminütige Inkubation des Extraktes auf der Säule förderte die Absorption des Wassers. Die Elution erfolgte mit 2 x 4 ml Chloroform und 1 x 4 ml Chloroform/Methanol (9:1). Das Eluat wurde bei 30°C im Vakuum zur Trockne eingedampft und in 100 µl Ethylacetat aufgenommen. Die Extrakte konnten dann per GC (B2.3.7) oder DC (B2.3.9) analysiert werden. Enzymassays (B2.2.4), die ebenfalls ein Volumen von 1 ml umfassten, wurden analog behandelt.

### B2.3.3 Extraktion von Tropanalkaloiden

Frisches oder gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial wurde zweifach mit wäßrigem Methanol (50%) extrahiert (Ultra-Turrax). Die vereinigten, zellfreien Überstände nach Zentrifugation (10 min; 4500 g; 4°C) wurden im Vakuum bei 30°C vom Methanol befreit und anschließend zu Weinsäure 2% (m/v) gegeben. Dabei wurde der pH-Wert des Extrakts auf 3–4 eingestellt. Im Anschluss daran erfolgte eine sukzessive Extraktion mit Petrolether, Dichlormethan und Ethylacetat zur Entfernung unerwünschter Begleitstoffe. Die organischen Phasen wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde mit Ammoniak 25% auf pH 9–10 eingestellt und mit Chloroform: Isopropanol (3:1) extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum bei 30°C konzentriert. Alkaloidextrakte wurden per DC (B2.3.7) und GC-MS (B2.3.6) analysiert.

### B2.3.4 Fütterungsversuche

Ganze Pflanzen sowie Blätter und Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* L. und *Cochlearia officinalis* L. wurden mit 2 mM beziehungsweise 5 mM Tropinon-Lösung gefüttert. Dazu wurden die Pflanzen von Erde befreit, gegebenenfalls geteilt und in die auf pH 7 gepufferten Tropinonlsungen oder 2 mM NaCl-Lösung (Kontrolle) gestellt. Die Fütterungen wurden über 24–72 Stunden durchgeführt. Die Pflanzen wurden anschließend nach (B2.3.2) aufgearbeitet und per GC (B2.3.5) oder DC (B2.3.7) analysiert.

### B2.3.5 Gaschromatographie

Die standardmäßige Quantifizierung von Calysteginen und Tropanalkoholen erfolgte per Gaschromatographie. Während die Tropanole direkt vermessen werden konnten, mussten die Calystegine vor der Bestimmung derivatisiert werden. Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch Vergleich mit den Retentionszeiten von Referenzsubstanzen, sowie durch simultane Detektion per FID und PND und gegebenenfalls durch GC-MS-Analyse. Für die Quantifizierung wurden nur die Signale des FID herangezogen. Zur Quantifizierung wurden 3–5 unabhängige Proben verwendet. Von diesen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

#### GERÄTEPARAMETER GASCHROMATOGRAPH

Typ:	Gaschromatograph Hewlett Packard 6890
Detektoren:	Flammenionisationsdetektor (FID) Phosphor-Stickstoff-Detektor (PND)
Brenngase:	Synthetische Luft, Wasserstoff
Säule:	HP-5 (30 m x 320 µm x 0,25 µm)
Stationäre Phase:	95% Methylsiloxan, 5% Phenylsiloxan
Mobile Phase:	Helium
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	1 µl–3 µl

## TRENNSPROGRAMM FÜR DIE INTERMEDIATE

Säulentemperatur:	65°C 10°C/min bis 120°C, 2 min 15°C/min bis 240°C 10°C/min bis 300°C
Injektion:	Gepulste Injektion ohne Split (200 kPa, 1,5 min, 250°C)
Retentionszeiten in min:	Tropinon: 8,7 Nortropinon: 9,0 Tropin: 9,2 Norpseudotropin: 9,4 Pseudotropin: 9,6 Azobenzol (Standard): 14,1

## TRENNSPROGRAMM FÜR CALYSTEGINE

Säulentemperatur:	160°C, 2 min halten 5°C/min bis 240°C 10°C/min bis 300°C
Injektion:	Split (1:20), 120 kPa, 250°C
Retentionszeiten in min:	Azobenzol (Standard): 6,3 Calystegin A5: 7,4 Calystegin A3: 7,8 Calystegin B1: 10,4 Calystegin A2: 11,9

## KALIBRIERGERADEN:

Tropinon:	$y = 1956,4x - 7,578$	$R^2 = 0,9990$
Tropin:	$y = 1559,4x - 7,117$	$R^2 = 0,9923$
Pseudotropin:	$y = 1765,5x - 7,319$	$R^2 = 0,9997$
A-Calystegine:	$y = 231,89x$	$R^2 = 0,9573$
B-Calystegine:	$y = 275,24x$	$R^2 = 0,9754$

**B2.3.6 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie**

Zur Identifizierung von enzymatischen Umsetzungsprodukten (B2.2.4) sowie zur Absicherung von Extrakten wurde die Massenspektroskopie verwendet. Die Temperaturprogramme sind wie unter B2.3.5 aufgeführt. Die Injektionen erfolgten hier ohne Split bei einer Temperatur von 250°C und einem Druck von 120 kPa.

## GERÄTEPARAMETER FÜR GASCHROMATOGRAPH HP 5890

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

### B2.3.7 Dünnschichtchromatographie (Tropane)

Als stationäre Phase wurden Aluminiumplatten mit 250 µm Schichtdicke Kieselgel 60 (Merck) verwendet. Die Proben wurden mit dem Linomat IV (Camag) aufgetragen. Das Laufmittel setzte sich aus Chloroform : Methanol : Ethylacetat : Ammoniak = 10:10:10:1 zusammen. Dragendorff's Reagenz variiert nach Munier als Sprühreagenz diente zum Nachweis von Tropinon, Tropin, Pseudotropin und Alkaloiden (Baerheim 1983).

### B2.3.8 Derivatisierung von Polyaminen

In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl gesättigte Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung vorgelegt und 100–200 µl Assay sowie 400 µl Dansylchorididlösung (7,5 mg/ml in Aceton) zugegeben und eine Stunde bei 60 °C unter Lichtausschluß inkubiert (Eppendorf Thermomixer 1000 min<sup>-1</sup>). Nach Zentrifugation wurden 100 µl Prolinlösung (100 mg/ml) zugesetzt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch drei Mal mit je 500 µl Toluol extrahiert, die vereinigten organischen Phasen in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt und in der SpeedVac zur Trockne eingedampft. Die trockenen Proben wurden bei -20°C gelagert und vor der HPLC Analyse in 800 µl Acetonitril aufgenommen.

### B2.3.9 HPLC-Analyse von Polyaminen

Die Bestimmung der Polyamine Putrescin, *N*-Methylputrescin, Spermin und Spermidin erfolgte mittels HPLC nach einer modifizierten Methode von Marce (Feth 1989, Marce 1995).

#### KONFIGURATION DES HPLC-SYSTEMS D-7000

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

#### ACETONITRIL/WASSER-GRADIENT FÜR HPLC-TRENNUNG

00 min – 05 min	isokratisch bei 65% Acetonitril
05 min – 15 min	steigend auf 90% Acetonitril
15 min – 22 min	isokratisch bei 90% Acetonitril
22 min – 24 min	fallend auf 35% Acetonitril
24 min – 35 min	isokratisch bei 35% Acetonitril

Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz-Detektor bei einer Extinktionswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm und Diodenarray-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 220 nm. Zur Datenauswertung und Programmierung wurde das Merck-Hitachi Model

D-7000 Chromatography Data Station Softwareprogramm genutzt. Vor Beginn eines Messzyklus wurde ein Gemisch mit 25 ng je Polyamin (Putrescin, *N*-Methylputrescin, Spermin und Spermidin) injiziert, so dass eine Identifizierung der Polyamine anhand der Retentionszeiten möglich war. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der UV-Spektren, um die Zuordnung der Signale abzusichern.

## B2.4 Methoden des Molekularen Modellings

Sämtliche Schritte der Modellierung wurden in Kooperation mit Dr. W. Brandt (IPB, Halle) an Silicone-Graphics Workstations unter Verwendung der SYBYL<sup>®</sup>Software (SYBYL<sup>®</sup>, Tripos Associates Inc., St. Louis, MO, USA) und MOE<sup>®</sup>(Molecular Operating Environment, The Chemical Computing Group Inc., Kanada) durchgeführt.

### B2.4.1 MOE<sup>®</sup>Homologiemodelling

Um die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu modellieren, ist eine sogenannte *template* Struktur die wichtigste Voraussetzung. Diese sollte eine möglichst hohe Sequenzhomologie zum Zielprotein aufweisen. Zunächst wurde in der Proteindatenbank (Berman 2000) eine BLAST-Suche ausgeführt, die Sequenzvergleiche erfolgten mit der BLOSUM50-Matrix (Henikoff 1992, Henikoff 1993).

#### ERGEBNISSE DER HOMOLOGIESUCHE

PDB KÜRZEL	ORGANISMUS	ENZYM	HOMO <sup>1</sup>	AUFL <sup>2</sup>
1XQ1	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	putative Tropinonreduktase Gen At1G07440	63	2,1
1AE1	<i>Datura stramonium</i> L.	TRI mit NADP <sup>+</sup>	51	2,4
2AE2	<i>Datura stramonium</i> L.	TRII mit NADP <sup>+</sup> & Pseudotropin	53	2,3
1IPF	<i>Datura stramonium</i> L.	TRII mit NADPH & Tropinon	53	1,9
1VL8	<i>Thermotoga maritima</i>	Gluconat 5-Dehydrogenase	31	2,1

<sup>1</sup>HOMO = Homologie in %

<sup>2</sup>AUFL = Auflösung in Ångström

Die putative Tropinonreduktase aus *Arabidopsis thaliana* L. erwies sich als *template* ungeeignet, da der substratbindende Bereich in der Röntgenkristallstruktur nicht enthalten war. Aus den TR-Strukturen von *Datura stramonium* L. wurde die mit der besten Auflösung als *template* (1IPF) ausgewählt. Zur Entwicklung des Proteinmodells wurde mit MOE eine Datenbank-gestützte Methode eingesetzt. Die Modellierungsroutine ordnet das Rückgrat des Zielproteins so an wie das des *templates*. Es verwendet dabei das Alignment für die Entscheidung, welche Position welche Aminosäure einnehmen soll. Die Richtigkeit eines Modells wird durch die Qualität des Alignments diktiert. Wenn das Alignment an einigen Positionen Lücken oder Insertionen aufweist, wird dadurch die korrekte räumliche Anordnung der Aminosäuren in diesem Bereich erschwert. Zur Anwendung kommt dabei ein Loop-Search-Algorithmus auf der Basis von Loop-Datenbanken. Zunächst wird für die zu modellierende Sequenz eine partielle Startgeometrie spezifiziert, die von einem ausgewählten *template*-Bereich kopiert wird. Vom Programm werden die Koordinaten des Rückgrats und für strukturell konservierte Bereiche alle Daten kopiert. Im zweiten Schritt erfolgt eine Boltzmann-Zufalls-Modellierungsprozedur, die von Levitt (Levitt 1992) abgewandelt

wurde. In diesem Fall wurden dabei 10 unabhängige Modelle erstellt. Jedes dieser Modelle wurde hinsichtlich der Ausrichtung unpolarer Seitenketten und der Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrücken gewertet. Abschließend wurden die Koordinaten des vielversprechendsten Modells ausgewählt und dessen Energie minimiert.

Die Entwicklung des Modells der Tropinonreduktase aus *Cochlearia officinalis* L. beinhaltete zunächst die Optimierung des Rückgrates anhand des zugrunde gelegten *templates*. Danach wurde das optimierte Rückgrat fixiert und Seitenketten sowie Loopbereiche schrittweise optimiert. Dafür wurde in MOE<sup>®</sup> das CHARMM22-Kraftfeld mit Born-Solvation (MacKerell 1998, Pellegrini 2002) verwendet. Kraftfeldmethoden ermöglichen für große Moleküle die Vorhersage von Anordnungen, Geometrien und die Berechnung von Wechselwirkungs- und Konformationsenergien.

Während des Modellierungsprozesses wurde die stereochemische Qualität des Modells laufend geprüft. Dies geschah mit Hilfe des Programms PROCHECK (Laskowski 1993). Die Geometrie von Bindungslängen, Bindungswinkeln sowie Torsionswinkeln wird dabei überprüft.

Ziel der Modellierung ist ein stereochemisch richtiges UND biologisch funktionales, d.h. nativ gefaltetes, Modell zu erstellen. Das Programm PROSA II (Sippl 1993) diente zur Bewertung, ob es sich bei der erhaltenen Faltung um eine native handelt. Die Bewertung beruht dabei auf empirischen Energiepotentialen (Konformationsenergie), die von paarweisen Interaktionen aus gut definierten Proteinstrukturen abgeleitet wurden. Diese werden über alle Aminosäuren im Modell aufsummiert und es resultiert ein Energieprofil. Positive Energiewerte weisen auf nicht-nativ gefaltete Proteinbereiche hin, negative korrelieren mit nativ gefalteten Bereichen. Zusätzlich kann mit dem Z-Score ein Indikator für die Güte der nativen Faltung kalkuliert werden (Sippl 1995).

#### B2.4.2 Docking-Studien

Die Docking-Versuche wurden mit GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) durchgeführt. Dieses Programm ermöglicht die Vorhersage von Liganden-Bindungspositionen und Affinitäten (Jones 1995). Es enthält einen genetischen Algorithmus zum Docking von Ligandenmolekülen an die zu definierende Bindungsstelle im Protein. Der Ligand ist hierbei frei beweglich. Die von GOLD ermittelten Ligandenpositionen wurden anschließend energetisch optimiert. Um die Affinitäten der verschiedenen Liganden zu beurteilen, wurden Wechselwirkungsenergien berechnet. Zusätzlich wurde das Programm X-SCORE (Wang 2002) eingesetzt, welches mittels einer empirischen Bewertungsfunktion die freie Bindungsenergie beschreibt. Die Funktion enthält unter anderem Terme für van-der-Waals-Kontakte, Wasserstoffbrückenbindungen und Desolvatationseffekte. Den größten Einfluß auf den berechneten Score haben hier hydrophobe Wechselwirkungen. Die berechneten pKD-Werte stellen die Bindungsaffinitäten eines Liganden zum Enzym dar, sie sind nicht gleich dem experimentell ermittelbaren Km-Wert. Sie entsprechen dem pKI-Wert eines Inhibitors.

# C Ergebnisse

## C1 Calystegin-Screening

### C1.1 Moraceae

In Abbildung C.1 sind die Calystegingehalte in drei *Morus* Spezies sowie *Ficus carica* dargestellt, aufgetragen sind die Mittelwerte  $m$  und die Standardabweichungen  $s$  ( $n=4$ ).

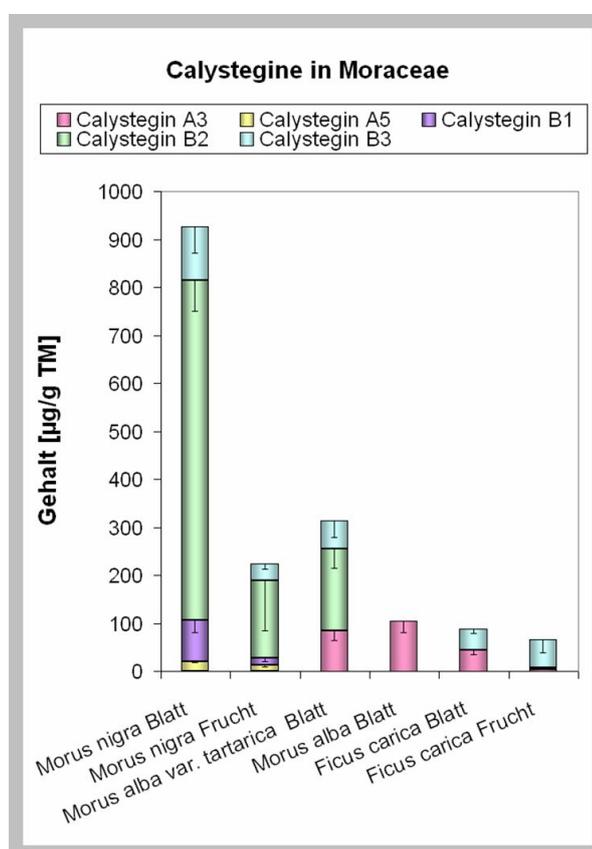


Abbildung C.1: Gehalt Calystegine in Morceae

In oben genannten Spezies konnte darüber hinaus auch Deoxynojirimycin nachgewiesen werden. Stark schwankende Deoxynojirimycin-Gehalte wurden in *Cudrania tricuspidata* (CARR.) BUR. EX LAVALLEE, *Maclura pomifera* (RAF.) C.K.SCHNEID. und *Broussonetia papyrifera* L'HER. EX VENT. gefunden, Calystegine konnten hier jedoch nicht nachgewiesen werden. In Tabelle C.1 sind die Spezies aufgeführt, in denen weder Deoxynojirimycin noch Calystegine nachgewiesen werden konnten.

Tabelle C.1: Moraceae ohne Calystegine und Deoxynojirimycin

FICEAE	FICEAE
<i>Ficus benjamini</i> L.	<i>Ficus sur</i> FORSK.
<i>Ficus elastica</i> ROXB.	<i>Ficus coronata</i> SPIN.
<i>Ficus lepriurii</i> MIQ.	<i>Ficus villosa</i> BLUME
<i>Ficus benghalensis</i> L.	<i>Ficus sycamorus</i> L.
<i>Ficus rubiginosa</i> DESF. EX VENT.	
<i>Ficus pumila</i> L.	DORSTENIEAE
<i>Ficus subscrabrida</i> WARB.	<i>Dorstenia contrajerva</i> L.
<i>Ficus erecta</i> THUNB.	<i>Dorstenia foetida</i> SCHWEINF.
<i>Ficus sagittata</i> VAHL.	<i>Dorstenia multiradiata</i>
<i>Ficus platypoda</i> (MIQ.) A. CUNN. EX MIQ.	<i>Dorstenia barnimiana</i> var. <i>telekii</i>
<i>Ficus cotinifolia</i> var. <i>cotinifolia</i> KUNTH	<i>Dorstenia psilurus</i>
<i>Ficus natalensis</i> MIQ.	<i>Dorstenia urceolata</i>
<i>Ficus deltoidea</i> JACK	<i>Dorstenia turneifolia</i> var. <i>argentata</i>
<i>Ficus ilicina</i> MIQ.	<i>Dorstenia arifolia</i>
<i>Ficus obliqua</i> FORST. F.	<i>Dorstenia brownii</i>
<i>Ficus petiolaris</i> KUNTH.	
<i>Ficus aurea</i> NUTT.	CASTILLEAE
<i>Ficus binnendijkii</i> MIQ.	<i>Antiaris africana</i> ENGL.
<i>Ficus cyathistipula</i> WARB.	<i>Antiaris toxicaria</i> LESCH.
<i>Ficus retusa</i> L.	
<i>Ficus eximia</i>	

## C1.2 Erythroxyllaceae

Während in den in Tabelle C.2 gelisteten Spezies keine Calystegine nachgewiesen werden konnten, zeigen Abbildungen C.2–C.4 die Calystegingehalte in verschiedenen *Erythroxyllum* Spezies, aufgetragen sind die Mittelwerte  $m$  und Standardabweichungen  $s$  ( $n=3$  bis 4).

Bei der mit *E. coca* Trujillo bezeichneten Spezies handelt es sich um *Erythroxyllum novogranatense* var. *truxillense*.

Tabelle C.2: Erythroxyllaceae ohne Calystegine

<i>E. argentinum</i> O.E. SCHULZ
<i>E. bradeanum</i> O.E. SCHULZ
<i>E. densum</i> RUSBY
<i>E. confusum</i> BRITT.
<i>E. cuspidifolium</i> MART.
<i>E. fimbriatum</i> PEYRITSCH VEL AFF.
<i>E. foetidum</i> PLOWMAN
<i>E. frangulifolium</i> O.E. SCHULZ
<i>E. macrocarpum</i>
<i>E. macrophyllum</i> CAV.
<i>E. macrophyllum</i> CAV. var. <i>savannarum</i> PLOWMAN
<i>E. splendidum</i> PLOWMAN sp. nov.
<i>E. ulei</i> . O.E. SCHULZ

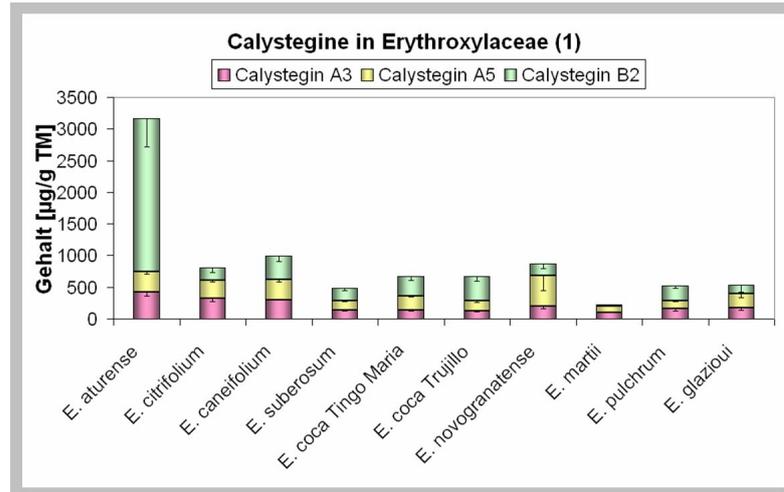


Abbildung C.2: Calystegine in Erythroxyloaceae (1)

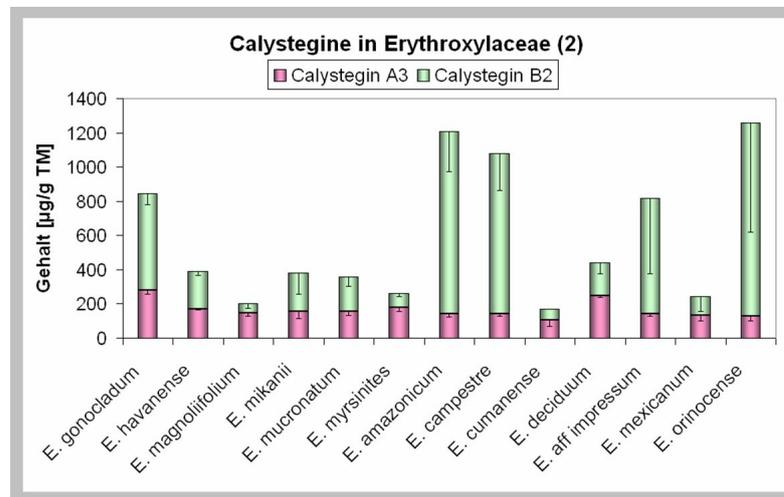


Abbildung C.3: Calystegine in Erythroxyloaceae (2)

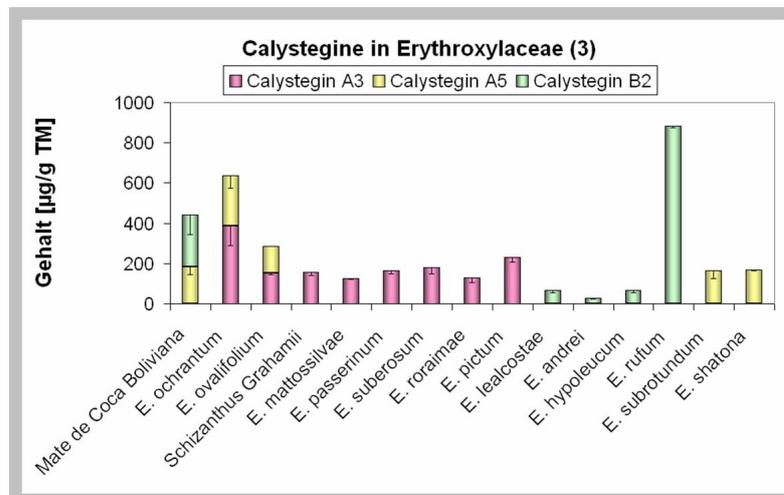


Abbildung C.4: Calystegine in Erythroxyloaceae (3)

### C1.3 Brassicaceae

#### C1.3.1 Calystegine

Die in den Abbildungen C.5 bis C.7 aufgetragenen Calystegingehalte sind Mittelwerte  $m$  aus 2–4 Einzelbestimmungen, die Standardabweichungen  $s$  sind ebenfalls angegeben, sofern  $n \geq 3$ .

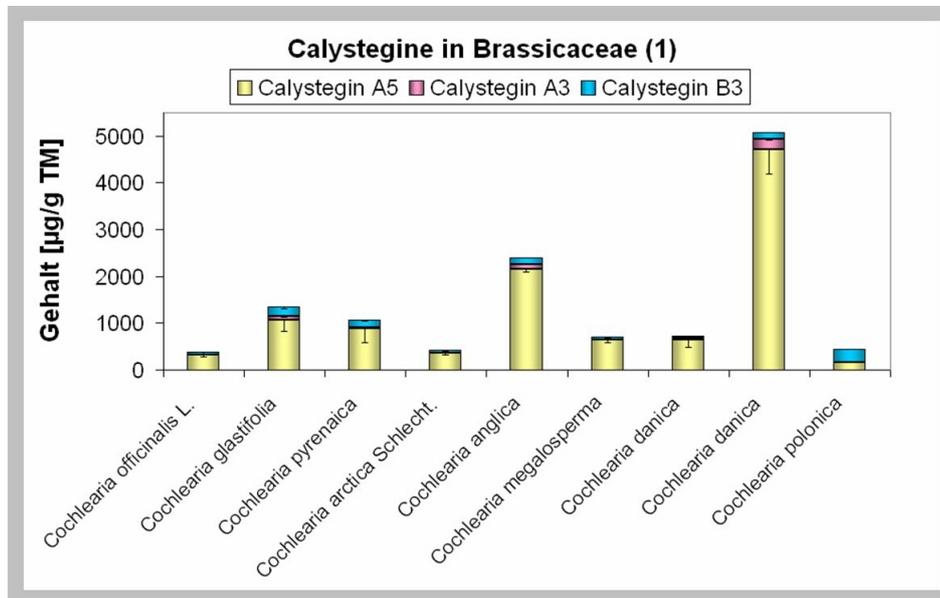


Abbildung C.5: Calystegine in Brassicaceae (1)

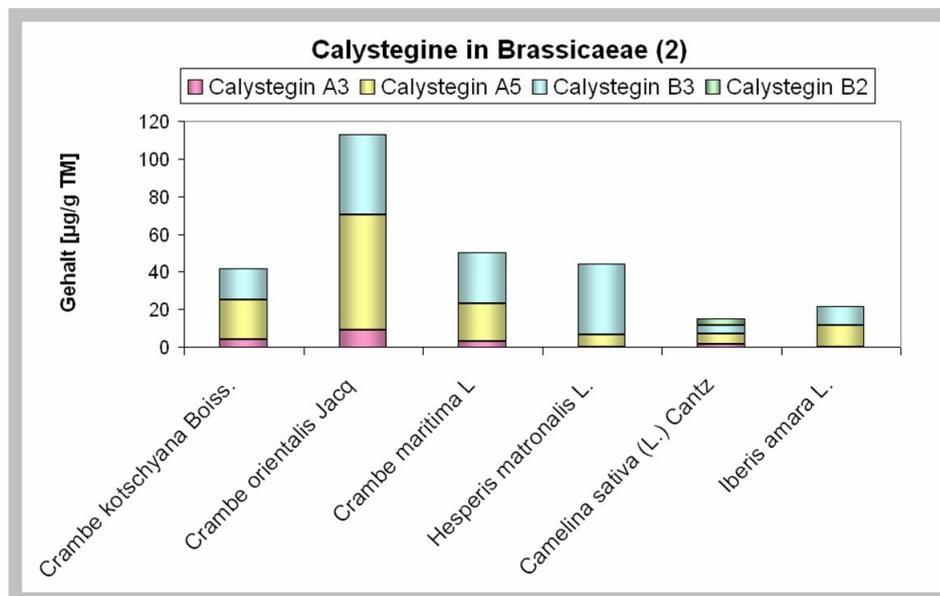


Abbildung C.6: Calystegine in Brassicaceae (2)

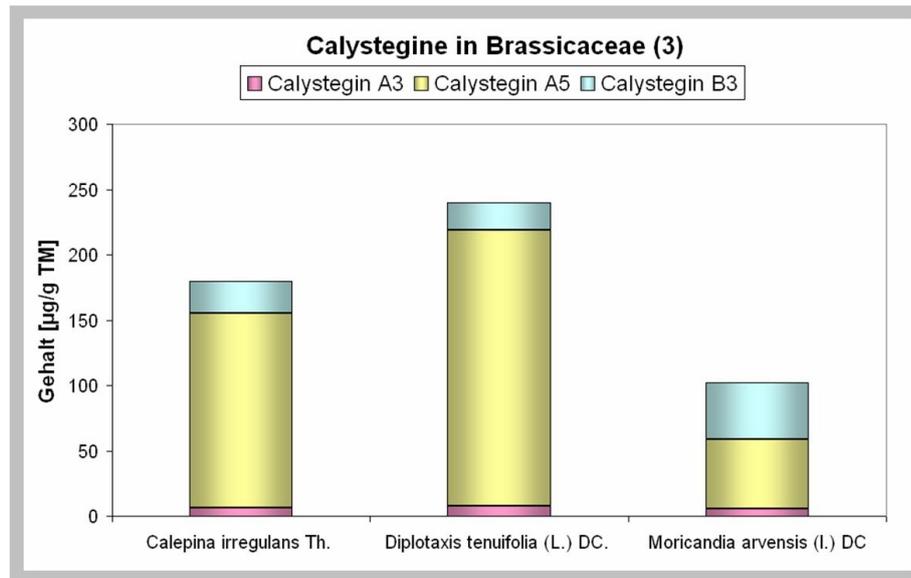
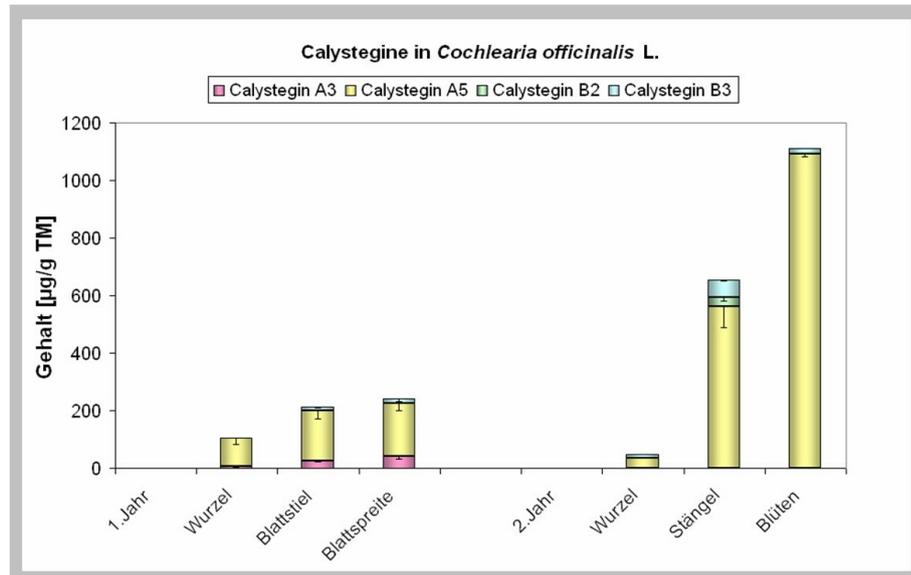


Abbildung C.7: Calystegine in Brassicaceae (3)

In *Cochlearia officinalis* L. wurden verschiedene Gewebe auf ihren Calystegingehalt untersucht. Es handelt sich dabei um dieselben Gewebeproben, die auch zur Extraktion der Intermediate (Abbildung C.10) und zur Extraktion der RNA für die Expressionsanalyse (Abbildung C.15) verwendet wurden.

Abbildung C.8: Calystegine in *Cochlearia officinalis* L.

In folgenden Kreuzblütengewächsen konnten keine Calystegine nachgewiesen werden:

Tabelle C.3: Brassicaceae ohne nachgewiesene Calystegine

<i>Bunias erucago</i> L.	<i>Neslia paniculata</i> DEV.
<i>Peltaria alliacea</i> JACQ.	<i>Bunias orientalis</i> L.
<i>Isatis tinctoria</i> L.	<i>Cronopus squamatus</i> (FORSSK.) ASCHERS.
<i>Coringia orientalis</i> DUM.	<i>Lunaria annua</i> L.
<i>Barbarea vulgaris</i> R. BR.	<i>Diplotaxis murales</i> (L) DC.
<i>Berteroa incana</i> DC.	<i>Matthiola incana</i> (L.) R.BR. IN AITON
<i>Lunaria rediviva</i> L.	<i>Sisymbrium strictissimum</i> L.
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	

### C1.3.2 Alkaloidextraktion

Weiterhin wurden alle calysteginhaltigen Brassicaceae gemäß B2.3.3 extrahiert und per Dünnschichtchromatogramm analysiert (B2.3.7). Lediglich die untersuchten *Cochlearia*-Arten enthielten nachweisbare Alkaloidmengen (Abbildung C.9).

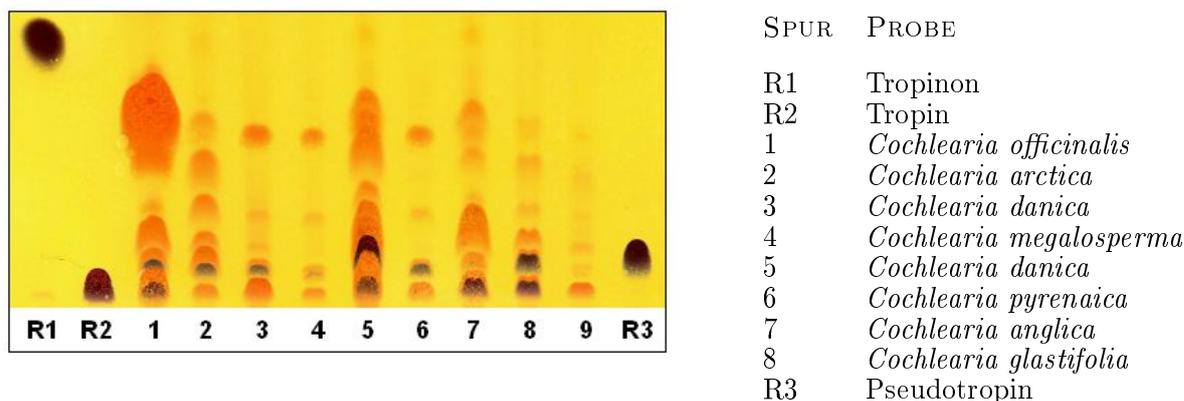


Abbildung C.9: DC Alkaloidextrakte *Cochlearia* Spezies

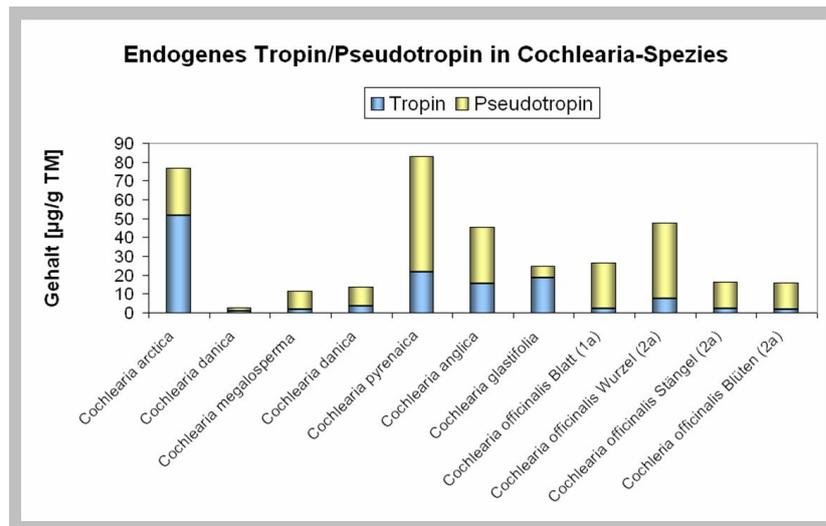
Eine ausführliche Charakterisierung der Alkaloide war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

### C1.3.3 Endogenes Tropin/Pseudotropin in Brassicaceae

Die calysteginhaltigen Brassicaceae wurden nach B2.3.2 extrahiert und GC-FID analysiert (B2.3.5), der Tropin/Pseudotropingehalt ist in  $\mu\text{g pro g}$  Trockenmasse in Abbildung C.10 dargestellt. In folgenden Brassicaceae konnten weder Tropin noch Pseudotropin gefunden werden:

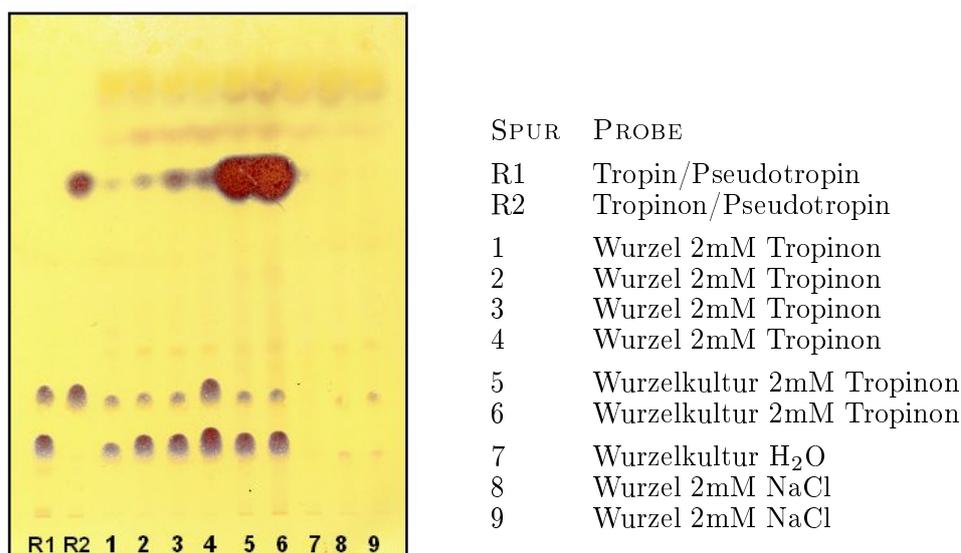
Tabelle C.4: Brassicaceae ohne endogene Tropanole

<i>Moricandia arvensis</i> (I.) DC.
<i>Crambe kotschyana</i> BOISS.
<i>Crambe orientalis</i> JAQU.
<i>Crambe cordifolia</i> STEV.
<i>Camelina sativa</i> L. CANTZ
<i>Iberis amara</i> L.
<i>Carrichtera annua</i> (L.) DC.
<i>Diplotaxis murales</i> (L.) DC.

Abbildung C.10: Endogenes Tropin/Pseudotropin in *Cochlearia* Spezies

### C1.3.4 Tropanalkaloide in *Cochlearia officinalis* L.

**Fütterung Wurzeln/Wurzelkultur mit Tropinon (B2.3.4)** Die Reduktion von Tropinon ist ein entscheidender Schritt in der Biosynthese von Tropanalkaloiden und Calysteginen. Gefüttert wurden eine *Cochlearia officinalis* L. Wurzelkultur (B1.1.2) sowie Wurzeln, die von etwa 10 Wochen alten Pflanzen abgetrennt wurden. Gefüttert wurde mit 2 mM Tropinonlösung, als Negativkontrolle diente 2 mM NaCl-Lösung. Es wurde jeweils 1 g Frischmasse für die Extraktion nach B2.3.2 eingesetzt und für die Dünnschichtchromatographie (B2.3.7, Abbildung C.11) gleiche Volumina aufgetragen.

Abbildung C.11: Tropinonfütterung *Cochlearia officinalis* L.

Sowohl Tropin als auch Pseudotropin konnten nachgewiesen werden.

**Alkaloidextraktion** Die Alkaloide wurden aus oberirdischen Teilen von etwa 4 Monate alten *Cochlearia officinalis* L. Pflanzen gemäß B2.3.3 extrahiert, dabei wurde die wäßrige, alkaloidhaltige Phase sukzessive auf pH-Werte zwischen 7,0 und 10,5 eingestellt und so eine fraktionierte Extraktion vorgenommen. Abbildung C.12 zeigt das Dünnschichtchromatogramm (B2.3.7) dieser Extraktion. Als Referenzen (R) sind Tropin, Pseudotropin und Cocain aufgetragen.

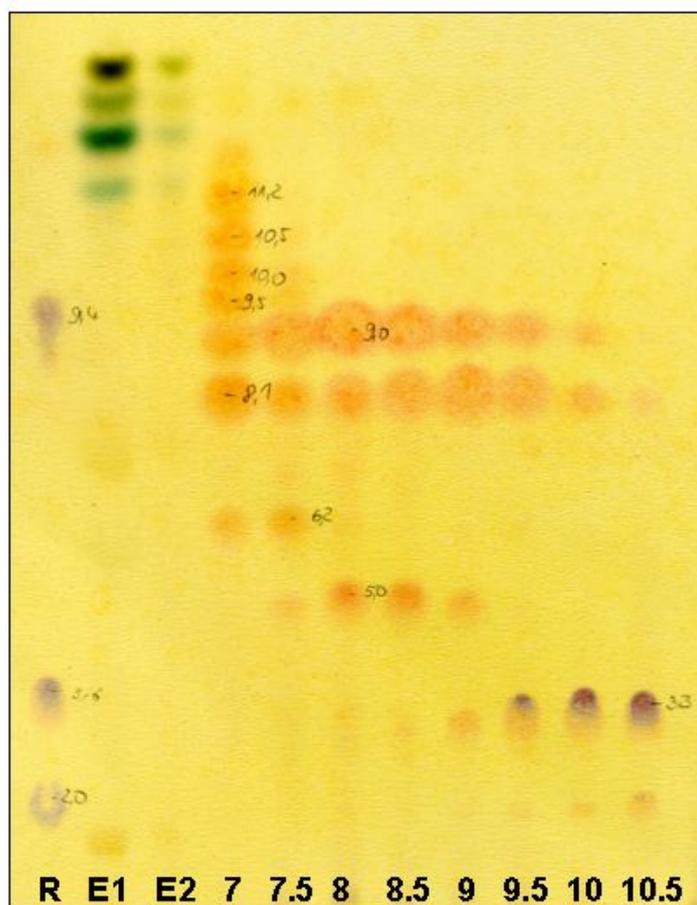


Abbildung C.12: DC Alkaloidextraktion

Insgesamt konnten durch Besprühen mit Dragendorff's Reagenz (var. nach Munier) 10 Flecken detektiert werden. Durch Vergleich mit den Referenzen wurden Tropin und Pseudotropin identifiziert. Die mit E1 und E2 bezeichneten Proben sind die Petrolether bzw. Dichlormethanextrakte, die frei von Alkaloiden sind.

Alle Extrakte wurden nach B2.3.6 gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht. Die Massenspektren der extrahierten Alkaloide wiesen einheitlich das typische Fragmentierungsmuster des Tropan-Grundgerüsts auf. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den isolierten Alkaloiden um Ester des Tropins und Pseudotropins handelt.

## C2 Tropinonreduktase aus *Cochlearia officinalis* L. (COTR)

### C2.1 Isolierung einer *tr*-homologen cDNA-Sequenz

#### C2.1.1 *Multiplex-PCR*

Die PCR-Suche wurde in drei Etappen durchgeführt. Als *template* diente cDNA von *Cochlearia officinalis* L. Diese wurde durch Umschreibung aus RNA erhalten (B2.1.3), die aus 12 Wochen alten ganzen *Cochlearia officinalis* L. Pflanzen isoliert wurde (B2.1.1). Die erste Etappe wurde mit *multiplex*-Reaktionen (B2.1.4) bei niedrigen Annealingtemperaturen durchgeführt. Die Reaktionsmischungen der ersten Runde enthielten jeweils drei *forward* und drei *reverse* gerichtete Primer (Tabelle B.3). Auf Reaktionsprodukte wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Sambrook 1989) geprüft. Jede positive Reaktion wurde anschließend in ihre neun korrespondierenden Einzelreaktionen geteilt und die PCR unter Beibehaltung des Temperaturprogrammes wiederholt. Enthielt eine Einzelreaktion ein Amplifikat wurde die PCR mit höheren Annealingtemperaturen wiederholt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Die Reaktionsprodukte wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eluiert. Die Klonierung und Transformation erfolgte mittels des TA-Cloning Kit (Tabelle B.5). Die Präparation des Plasmids wurde mithilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit (Tabelle B.5) durchgeführt. Diese Screeningmethode ergab 12 verschiedene Produkte. Lediglich ein 450 Basenpaare langes Produkt war den bekannten Tropinonreduktasen ähnlich (Abbildung C.13). Die Identität der Nukleinsäuresequenzen im Vergleich zu den bekannten Tropinonreduktasen lag bei etwa 60%.

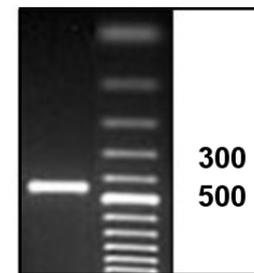


Abbildung C.13: Agarosegel

Das Fragment konnte der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) zugeordnet werden, denn es fanden sich die hochkonservierten Muster dieser darüberhinaus sehr variablen Enzymfamilie. Sowohl das zur NADPH-Bindestelle gehörige GlyXXXGlyXGly-Muster als auch die katalytische Triade aus Serin, Tyrosin und Lysin im Bereich zwischen 150–170 aa sind vorhanden (Kallberg 2002).

#### C2.1.2 *RACE-PCR*

Das Primerdesign wurde durch das Primo Pro Tool (ChangBioScience) unterstützt. Für die 3'-*RACE-PCR* wurden die Primer TR\_RACE\_01–03 verwendet (Tabelle B.3). Von den drei resultierenden Produkten **P1–P3** überlappte eines mit dem internen Fragment (Abbildung C.14(B)). Für die 5'-*RACE-PCR* wurden TR\_RACE\_05 für die erste PCR und TR\_RACE\_06–10 für die *nested-PCR* verwendet. Die vier entstandenen Produkte **P1–P4** überlappten mit dem internen Fragment (Abbildung C.14(A)). Die Auswertung der Sequenzierungen ergab eine Ganzlängensequenz von 822 Basenpaaren.

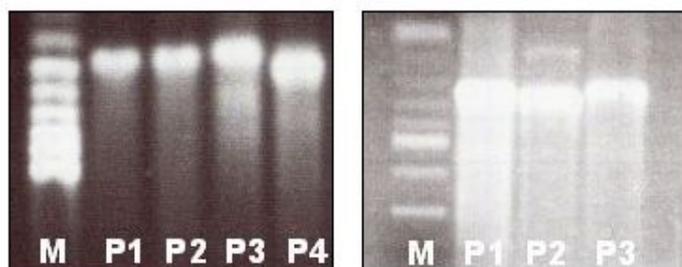


Abbildung C.14: RACE-PCR: (A) 5'RACE (B) 3'RACE

Von der so erhaltenen theoretischen Sequenz wurden Primer abgeleitet und der Ganzlängenklon mittels *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Das Produkt dieser Reaktion wurde in den Vektor pet21d (Tabelle B.2) kloniert, dabei wurden die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* verwendet. Am resultierenden Protein entstand dadurch ein sechs Histidinreste umfassendes *tag*, welches eine affinitätschromatographische Reinigung ermöglichte. Als Expressionszellen dienen *E. coli* Rosetta gami<sup>®</sup> (Tabelle B.1).

### C2.1.3 Eigenschaften der COTR

EIGENSCHAFTEN:	NATIV	MIT His- <i>tag</i>
LÄNGE (aa)	273	284
MW (Da)	29478	30757
pI	5,87	6,20

Die Sequenz wurde unter der Accession AM 748271 in die Datenbank eingetragen. Ein multiples Sequenzalignment mit ClustalW 4.0 (Chenna 2003) wurde für sowohl für die Nuklein- als auch die Aminosäuresequenzen durchgeführt (Tabelle C.5).

Tabelle C.5: Alignment Scores mit ClustalW 4.0

	NS	AS		NS	AS
TRI <i>Solanum tuberosum</i>	61	51	At1G07440	67	64
TRI <i>Datura stramonium</i>	54	52	At2G29170	85	80
TRI <i>Hyoscyamus niger</i>	55	52	At2G29300	66	59
TRI <i>Calystegia sepium</i>	40	53	At2G29320	65	58
TRII <i>Solanum tuberosum</i>	56	52	At2G29330	64	62
TRII <i>Datura stramonium</i>	54	53	At2G29340	63	59
TRII <i>Hyoscyamus niger</i>	65	53	At2G29350	82	79
			At2G29360	84	80
At1G07450	68	63	At2G29370	82	76
At2G29150	84	78	At2G29670	66	62

NS = NUKLEINSÄURE SCORE

AS = AMINOSÄURE SCORE

Während die Score-Werte beim Vergleich mit den bekannten TR mit 40 bis 65 relativ niedrig sind, finden sich im Vergleich mit den als putative Tropinonreduktase annotierten *Arabidopsis*-Sequenzen Score-Werte von bis zu 85. Im Falle der Sequenz AT2G29360 sind 218 der 273 Aminosäuren identisch.

Da Brassicaceae und Solanaceae taxonomisch entfernt voneinander stehen, konnte, der geringen Ähnlichkeit zum Trotz, die klonierte Sequenz als potentielle TR betrachtet werden. Daher wurde mit dieser Sequenz weitergearbeitet.

Im Rahmen der *RACE*-PCR wurden auch die nicht-translatierten Bereiche der *cotr*-Sequenz gefunden.

Tabelle C.6: Nicht-translatierte Bereiche der *cotr*-Sequenz

	5' UTR	3' UTR
Sequenz	AGCGGCCGCCAGTGTGATGGATCTGCAG AATTCGGCTTGGCCACGCGTCGACTAGTAC GGGGGGGGGGGGGAAGAA	TAATCAAAAAGGTCTATATATGTTTGAAC TATATTATGTTTTCGTTTGACGTGTTTAGC AAAATAAACATAATAAATGAAATTGTTA ATTTTCAGATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Länge (bp)	80	118

Eine TATA-ähnliche Sequenz *upstream* vom Startcodon ist vorhanden.

## C2.2 Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung

### C2.2.1 Überexpression, Reinigung

Die Überexpression, Lyse und Reinigung erfolgten nach den unter B2.2.2 und B2.2.6 beschriebenen Methoden. Abbildung C.15 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil einer Reinigung. Die Elution des überexprimierten Proteins erfolgte bei einer Imidazolkonzentration von ca. 200 mM im Gradienten.

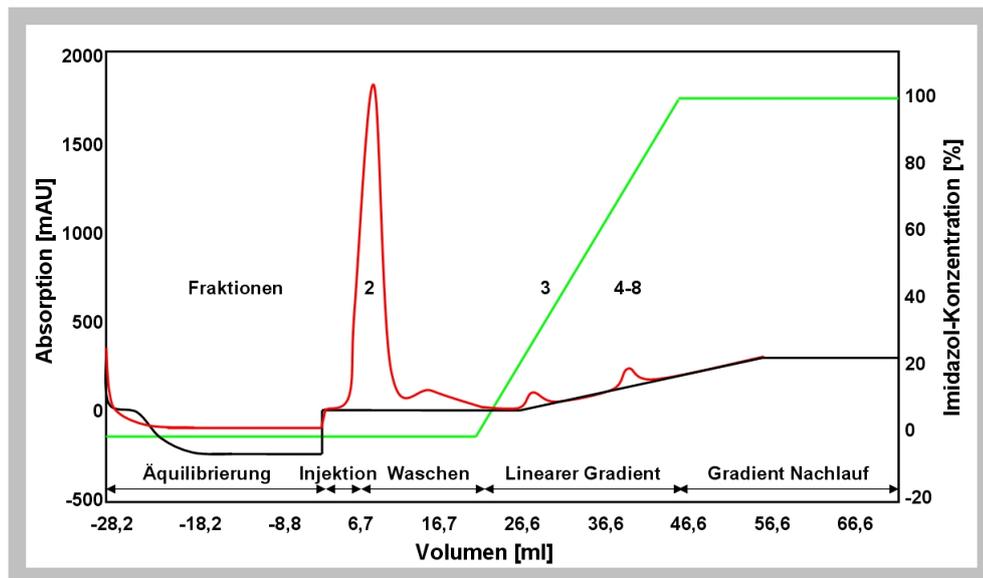


Abbildung C.15: Elutionsprofil Affinitätschromatographie COTR

Das Lysat, die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE überprüft (B2.2.3).

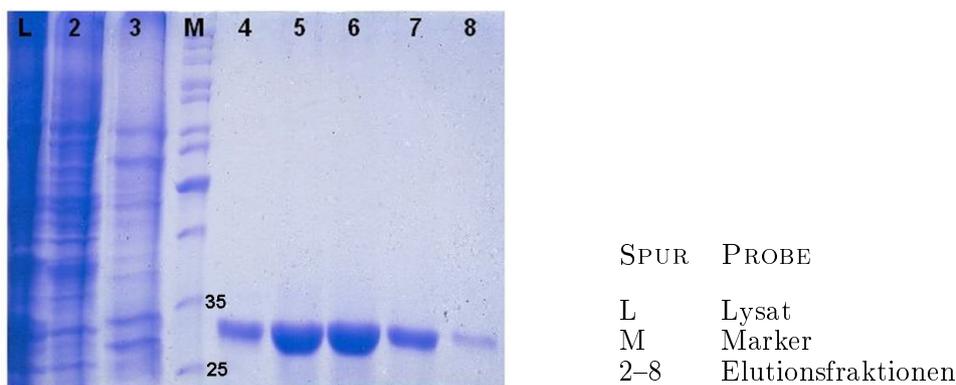


Abbildung C.16: SDS-PAGE COTR

Abbildung C.16 zeigt die SDS-PAGE einer Reinigung. Der Reinigungsgrad des Proteins ist gut zu erkennen, leider lief die Elektrophorese etwas zu lang, so daß der Bereich  $< 25$  kDa bereits herausgelaufen war. Die Elutionsfraktionen (4-8) wurden vereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Die Elutionsfraktionen aller durchgeführten Reinigungen wurden gepoolt, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der Protein-Pool hatte eine Konzentration von  $2,63 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , insgesamt wurden  $39 \text{ mg}$  Protein aufgereinigt.

### C2.2.2 Biochemische Charakterisierung

Die biochemische Charakterisierung erfolgte mittels des unter B2.2.4 beschriebenen Assays. Wurden die Reaktionsbedingungen variiert, ist dies im Zusammenhang mit dem Ergebnis angezeigt.

**Tropinonreduktion** Das Enzym katalysierte die Reduktion von Tropinon zu Tropin und Pseudotropin. Dieses Verhalten war nicht erwartet worden, da alle bisher charakterisierten TR Tropinon stereospezifisch entweder zu Tropin oder Pseudotropin reduzierten. Das pH-Optimum dieser Reaktion lag bei pH 8,5 (Abbildung C.17). In diesem Bereich liegt etwa die Hälfte des Substrates ungeladen vor ( $pK_A$  Tropinon 8,7).

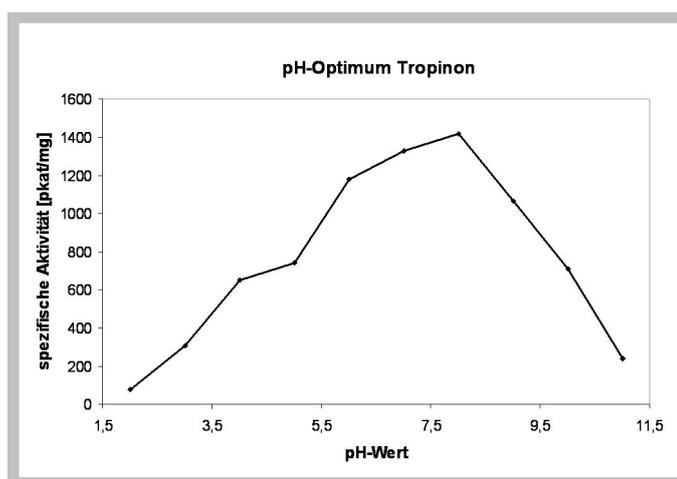


Abbildung C.17: pH-Optimum Tropinonreduktion

Eine pH- oder Zeitabhängigkeit der Bildung beider Produkte - speziell des Verhältnisses - konnte nicht nachgewiesen werden. Abbildung C.18 zeigt die Dünnschichtchromatographien dieser Assays. Im pH-Bereich 5–10 wurden Assays über 30, 60 und 120 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Aufbereitung der Assays erfolgte nach B2.3.2.

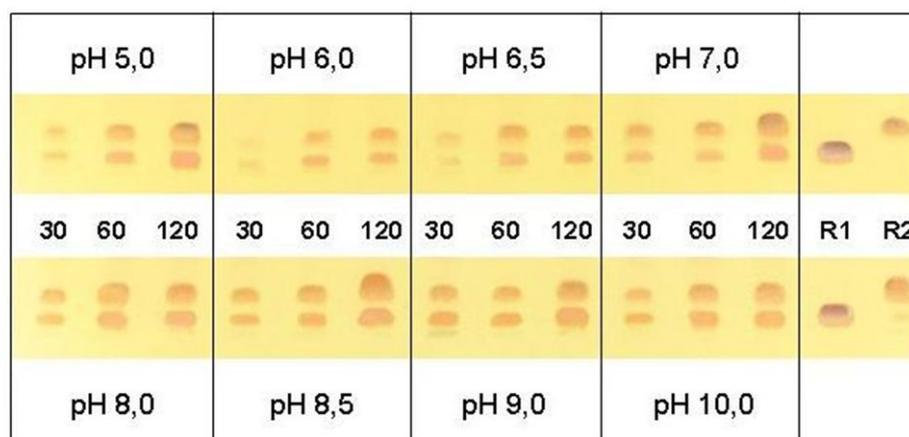


Abbildung C.18: pH- und Zeitabhängigkeit der Tropinonreduktion; 30–60–120min; pH 5–10

**Tropinonoxidation** Die Katalyse der Umkehrreaktion ist charakteristisch für Tropinonreduktasen vom Typ I. Die Tropinonreduktase von *Cochlearia officinalis* L. ist in der Lage Tropin zu oxidieren. Darüber hinaus wird auch die Oxidation von Pseudotropin katalysiert. Dieses Verhalten ist bisher nur von der TRII aus *Hyoscyamus niger* bekannt (Hashimoto 1992). Die GC-Analyse bestätigte das Vorhandensein aller drei Verbindungen - Tropinon, Tropin und Pseudotropin - in der Reaktion, unabhängig davon, welche Reaktanden anfänglich zugegeben wurden. Am wahrscheinlichsten ist, dass die gebildeten Produkte vom Enzym direkt wieder als Reaktanden eingesetzt werden. Eine Stereoisomerisierung, d.h. ein direkter Umsatz von Tropin in Pseudotropin oder umgekehrt, wurde nicht beobachtet. In Reaktionsmischungen, die nur ein Tropanol und das Enzym enthielten, fand keine Isomerisierung statt.

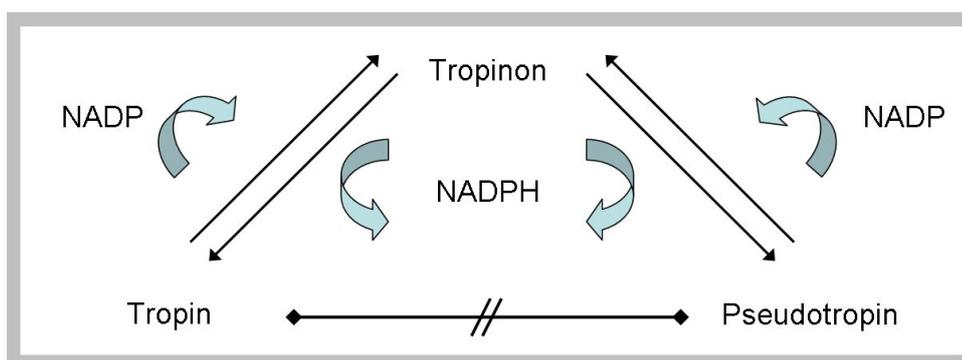


Abbildung C.19: Tropinonoxidation und Reduktion von Tropanolen

In Kontrollreaktionen ohne NADP(H) bzw. mit denaturiertem Protein war keine Umsetzung nachweisbar. Alle Reaktionen wurden bei pH 6,4 durchgeführt.

**Katalytische Konstanten** Der  $K_m$ -Wert und  $V_{max}$  der Reaktion wurden unter Verwendung des Sigma Plot Enzyme Kinetics Modul durch nicht-lineare Regression berechnet.

Tabelle C.7: katalytische Konstanten, Auswertung mit Sigma Plot

Substrat	$V_{max}$ [pkat/mg]	$K_m$	$K_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_{cat}/K_m$ [mol·s <sup>-1</sup> ·l <sup>-1</sup> ]
3MC	21666,5	13,0 μM	0,67	51091,6
4MC	47226,2	15,1 μM	1,45	95976,9
NMP	29535,0	7,6 mM	0,91	119,9
NPP	22244,1	1,3 mM	0,68	510,2
Tropinon	785,7	3,3 mM	0,02	7,4
Chinuclidinon	2726,1	2,6 mM	0,08	31,8
Nortropinon	578,0	2,0 mM	0,02	8,9
TBON	1496,6	42,0 μM	0,05	1096,3

Hervorzuheben sind hierbei die deutlich niedrigeren  $K_m$ -Werte und damit höheren Affinitäten ungeladener Substrate (TBON und Cyclohexanone) und die höheren  $k_{cat}$ -Werte von Substraten ohne Brücke (Piperidinone und Cyclohexanone), die durch den erheblich schnelleren Umsatz dieser monozyklischen Substratanaloga bedingt sind.

**Cosubstrate** Sowohl NADPH als auch NADH wurden als Cosubstrate getestet. Für geladene Substrate erfolgte mit NADH keine Reduktion. Für die ungeladenen Substrate wurden auch mit NADH spezifische Aktivitäten gemessen. Gemessen wurde bei 5 mM Substratkonzentration.

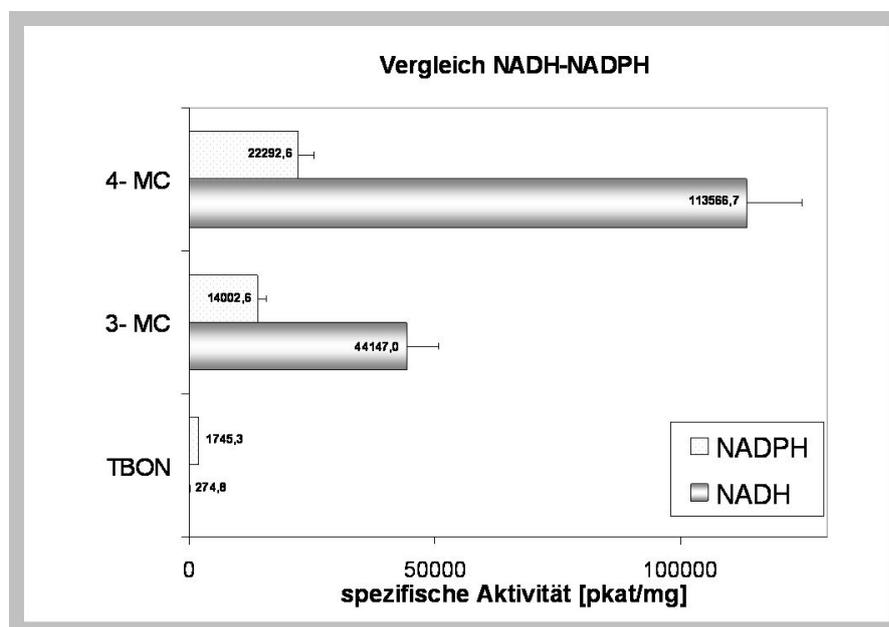


Abbildung C.20: Vergleich NADPH / NADH

Im Falle der Methylcyclohexanone waren diese um das Drei- bis Vierfache höher als mit NADPH (Abbildung C.20).

Für die Bevorzugung von NAD(H) oder NADP(H), wurden zwei Aminosäuren im N-terminalen Bereich ausgemacht, deren Charakter über die Cosubstratspezifität entscheidet. In NADP(H) bevorzugenden SDR sind an beiden Positionen basische Aminosäuren konserviert, während in NAD(H) bevorzugenden SDR an der zweiten Position ein Asparagin konserviert ist, dass durch seine negative Ladung die 2-Phosphatgruppe von NADP(H) abstoßen würde (Tanaka 2001, Nakajima 1998). Sowohl in der COTR als auch in der ATSDR finden sich zwei basische Aminosäuren an diesen Positionen.

Eine Suche im *Arabidopsis*-Genom mit dem Begriff ‚*tropinone reductase*‘ lieferte 15 Treffer, alle konnten anhand konservierter Muster der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen (SDR) zugeordnet werden. Unter diesen befanden sich zwei Pseudogene und zwei weitere Sequenzen, die wegen eines durchschnittlichen ClustalW Scores von 28 zu den anderen Treffern sowie zu den bekannten Solanaceae-Tropinonreduktasen vom weiteren Vergleich ausgeschlossen wurden. In Tabelle C.8 wurden die *Arabidopsis*-SDR sowie die Solanaceae TR hinsichtlich der konservierten Aminosäuren für die Cosubstratbindung betrachtet.

Tabelle C.8: Alignment ‚putative‘ TR aus *Arabidopsis thaliana*, Solanaceae TR und COTR; Cosubstratbindung

	COTR	TALVTGGS <b>K</b> GIGEAVVEELAMLGARVHTCARDE
Gruppe 1	AT2G29360	TALVTGGS <b>K</b> GIGEAVVEELATLGARIHTCARDE
	AT2G29150	TALVTGGS <b>K</b> GLGEAVVEELAMLGARVHTCARDE
	AT2G29170	TALVTGGS <b>K</b> GLGEAVVEELAMLGARVHTCARNE
	AT2G29290	NALVTGGT <b>K</b> GIGEAVVEELSILGARVHTCARDE
	AT2G29350	TALVTGGS <b>K</b> GIGEAVVEELAMLGAKVHTCARDE
	AT2G29370	TALVTGGS <b>K</b> GLGKAVVEELAMLGARVHTCARDE
	AT2G29440	TVLVTGGT <b>K</b> GIGHAIVEEFAGFGAVIHTCARNE
	AT2G29260	SALVTGGT <b>R</b> GIGRAIVEELAGLGAEVHTCARNE
Gruppe 2	AT1G07450	TALVTGGS <b>K</b> GIGYAVEELVFGGARVHICDIDE
	AT2G29300	TALVTGAA <b>S</b> GIGYAVEELAGFGARIHVCDISE
	AT2G29320	TALVTGAA <b>S</b> GIGYAVEELAGFGAKIHCIDISK
	AT2G29310	TALVTGAA <b>S</b> GIGYAVEELASFGAIIHCIDISE
	AT2G29340	TALVTGGA <b>S</b> GIGYAVEELAGFGARIHVCDISE
	AT2G29330	TALVTGGA <b>S</b> GIGHAVEELAGFGAKIHVCDISK
	AT2G29670	TALVTGGA <b>S</b> GIGHAVEEFAGLGAERYVCDISE
	TRII <i>Hyoscyamus niger</i>	TALVTGGS <b>R</b> GIGYGI VEELANLGASVYTCSR <b>N</b> Q
	TRII <i>Solanum tuberosum</i>	TALVTGGS <b>R</b> GIGYGI VEELASLGASVYTCSR <b>N</b> Q
	TRII <i>Datura stramonium</i>	TALVTGGS <b>R</b> GIGYGI VEELASLGASVYTCSR <b>N</b> Q
	TRI <i>Datura stramonium</i>	TALVTGGS <b>K</b> GIGYAVEELAGLGARVYTCSR <b>N</b> E
	TRI <i>Solanum tuberosum</i>	TALVTGGS <b>K</b> GIGYAVEELANFGARVYTCSR <b>N</b> E
	TRI <i>Hyoscyamus niger</i>	TALVTGGS <b>K</b> GIGYAVEELAGLGARVYTCSR <b>N</b> E
	TRI <i>Calystegia sepium</i>	TALVTGGT <b>R</b> GIGYGI VEELAGFGAEVYICSR <b>K</b> Q

Das Alignment wurde hinsichtlich der Cosubstratspezifität der Proteine ausgewertet. Dabei ergaben sich zwei Gruppen: 8 der *Arabidopsis*-Sequenzen enthielten an den konservierten Positionen Lysin bzw. Arginin (Tabelle C.8, Gruppe 1), darunter auch die ATSDR (AT2G29360). Weitere 7 Sequenzen enthielten an den konservierten Positionen Serin und Isoleucin, was keine eindeutige Zuordnung eines Cosubstrates möglich macht (Tabelle C.8, Gruppe 2). Zum Vergleich sind weiterhin die Solanaceae-TR enthalten, die alle NADPH als Cosubstrat verwenden.

**Weitere Substrate** Um dem evolutionären Ursprung der Tropinonreduktasen auf die Spur zu kommen und um zu untersuchen, ob es sich bei dem Enzym *in vivo* um eine Tropinonreduktase handelt, wurden für weitere Substrate spezifische Aktivitäten bestimmt. Die ausgewählten Substrate waren zum einen die in Abbildung B.2 dargestellten üblicherweise zur Charakterisierung von TR eingesetzten Substrate. Zum anderen wurden verschiedene Zucker und Zuckeralkohole eingesetzt, mit dem Ziel, zu untersuchen, ob ein Umsatz stattfindet und ob dies mit höherer Affinität und Geschwindigkeit geschieht.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $m$  mit Standardabweichungen  $s$  aus Dreifachbestimmungen. Dazu wurde im photometrischen Standardassay (B2.2.4) das Substrat Tropin durch das entsprechende Substrat ersetzt. Im Gegensatz zu den in Tabelle C.7 gelisteten, kalkulierten kinetischen Daten ( $V_{max}$ ) sind dies Darstellungen von Messwerten für die spezifische Aktivität bei fester Substratkonzentration von 5 mM. Die Daten aus den Abbildungen C.21 und C.22 sind daher nur geeignet untereinander und mit den Daten aus Charakterisierungen von Solanaceae-TR verglichen zu werden.

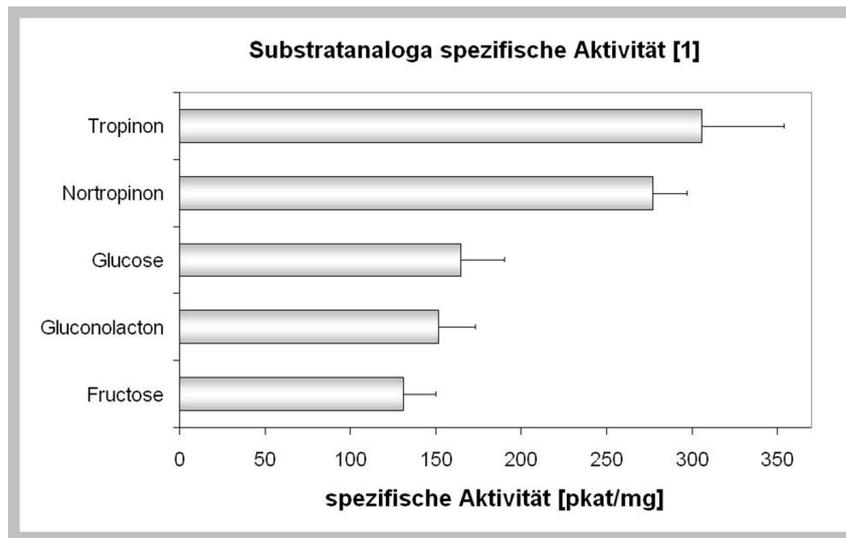


Abbildung C.21: Substratanaloga (1); Test an COTR

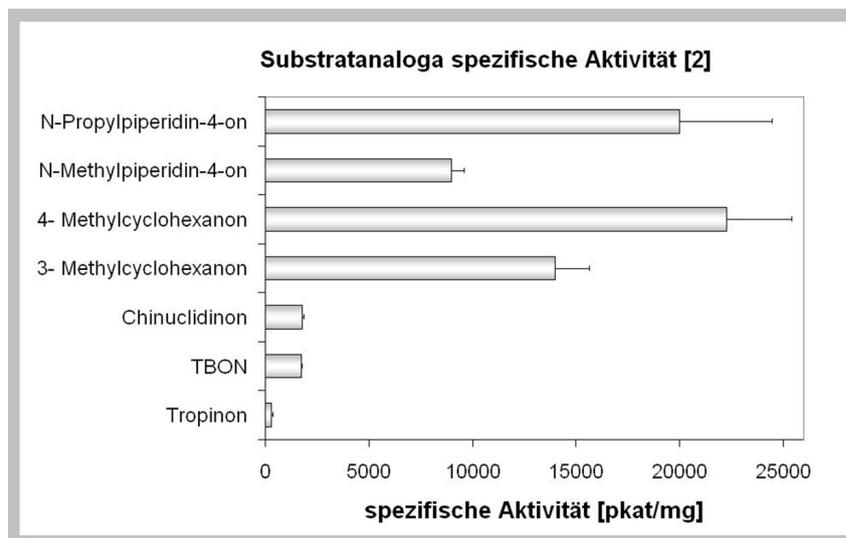


Abbildung C.22: Substratanaloga (2); Test an COTR

Für keines der hier gewählten Substrate aus dem Primärstoffwechsel konnte eine höhere spezifische Aktivität gemessen werden als bei Tropinon. Auch eine Oxidation von Mannitol oder Sorbitol mit NADP wurde nicht festgestellt.

Alle hier gewählten Substratanaloga wurden durch das Enzym stärker umgesetzt als Tropinon, dies gilt insbesondere für die monozyklischen Verbindungen. Kontrollreaktionen ohne Cosubstrat bzw. mit denaturiertem Enzym zeigten keinerlei Umsatz.

### C2.3 Expressionsanalyse des *cotr*-Transkriptes

Zur Untersuchung, wann und in welchen Geweben die Tropinonreduktase exprimiert wird, wurde aus verschiedenen Gewebeproben RNA mittels der TRIZOL<sup>®</sup>-Methode isoliert und in cDNA umgeschrieben (B2.1.2). Die Gewebeproben sind identisch mit denen unter C1.3.1 auf Calystegine und den unter C1.3.3 auf Tropin/Pseudotropin untersuchten Proben. Die Teilung der Gewebeproben erlaubte nur eine einzelne Extraktion von RNA. Mittels genspezifischen Primern (Tabelle B.3) wurde eine Standard-PCR durchgeführt und anschließend per Agarosegelelektrophorese auf das Reaktionsprodukt (822 bp) untersucht (B2.1.4). Das Ergebnis ist in Abbildung C.23 dargestellt.

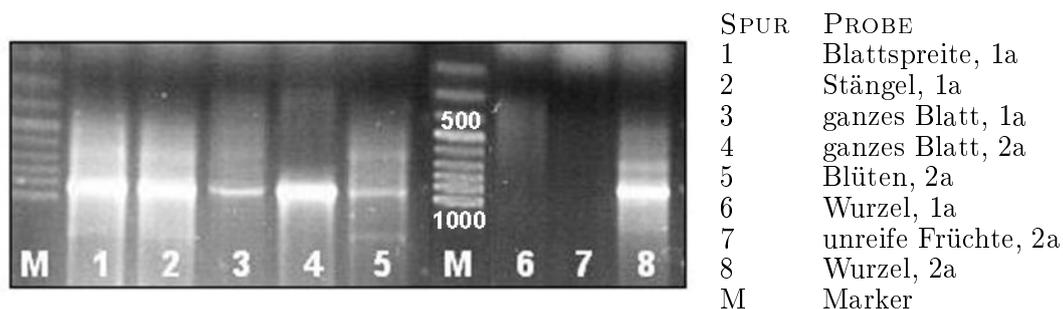


Abbildung C.23: Agarosegel RT-PCR *cotr*-Transkript

1a - Pflanze im 1. Lebensjahr  
2a - Pflanze im 2. Lebensjahr

Das *cotr*-Transkript wurde mit dieser Methode in den meisten Geweben nachgewiesen. Eine Ausnahme bildeten die einjährigen Wurzeln sowie die unreifen Früchte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das Fehlen eines Signals auf die Qualität der extrahierten RNA oder der Umschreibung in cDNA zurückzuführen ist.

### C2.4 Molekulares Modell

#### C2.4.1 Eigenschaften der COTR

Da bei der funktionellen Expression und Charakterisierung des Proteins nicht vorhergesehene Funktionen zu Tage traten und die bloße Betrachtung der Aminosäuresequenz keine Rückschlüsse auf die Eigenschaften des katalytischen Zentrums zuließ, wurde eine komparative Modellierung gewählt, um Erklärungsansätze für die Substratspezifität zu finden. Von besonderem Vorteil hierbei war, dass es der Gruppe um Nakajima gelungen ist, beide Tropinonreduktasen von *Datura stramonium* L. zu kristallisieren (Nakajima 1998). Die Tropinonreduktase II wurde für das Homologiemodelling als *template*-Struktur (PDB: 1IPF) ausgewählt. Das Sequenzalignment mit ClustalW 4.1 (Chenna 2003) ergab einen Alignment Score von 53, das Sequenzalignment ist in Abbildung D.3 zu sehen.

Beide Enzyme sind aufgrund ihrer Sequenz eindeutig der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen / Reduktasen zuzuordnen. Diese Enzym-Super-Familie umfasst etwa 3000 Mitglieder deren Substratspektrum von Alkoholen über Zucker bis hin zu Steroiden reicht (Kallberg 2002). Innerhalb der SDR Familie finden sich Sequenzidentitäten von 15 bis maximal 30 Prozent, trotzdem sind sich die 3D-Strukturen sehr ähnlich, ausnehmlich des C-Terminus. Unter D2 wird näher

darauf eingegangen.

Die Vorgehensweise bei der komparativen Modellierung ist unter B.2.4 beschrieben. Im Laufe der Modellierung mussten zunächst einige *cis*-Peptidbindungen nach Glycinresten korrigiert und die  $\alpha$ -Helix musste im Bereich Glu220 und Asn221 manuell geformt werden, um sie dem *template*-Molekül anzugleichen. Schwierigkeiten bereitete die Lücke im Sequenzalignment, auch hier wurden Bindungswinkel und die Länge der Wasserstoffbrücken manuell korrigiert, anschließend energetisch minimiert.

Zur laufenden Beurteilung der stereochemischen Qualität des Modells wurde das Programm PROCHECK (Laskowski 1993) verwendet. Im endgültigen Modell befanden sich 87,2% der Aminosäuren in den am meisten bevorzugten Regionen. Weitere 12,4% in zusätzlich erlaubten sowie 0,4% in großzügig erlaubten Bereichen. Alle weiteren stereochemischen Parameter, wie zum Beispiel Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkel und  $\omega$ -Planarität lagen in erlaubten Bereichen. Die Seitenkettenparameter ergaben sogar bessere Werte, als bei einem Proteinkristall mit einer Auflösung von 2 Ångström zu erwarten gewesen wären. Das Modell ist stereochemisch korrekt.

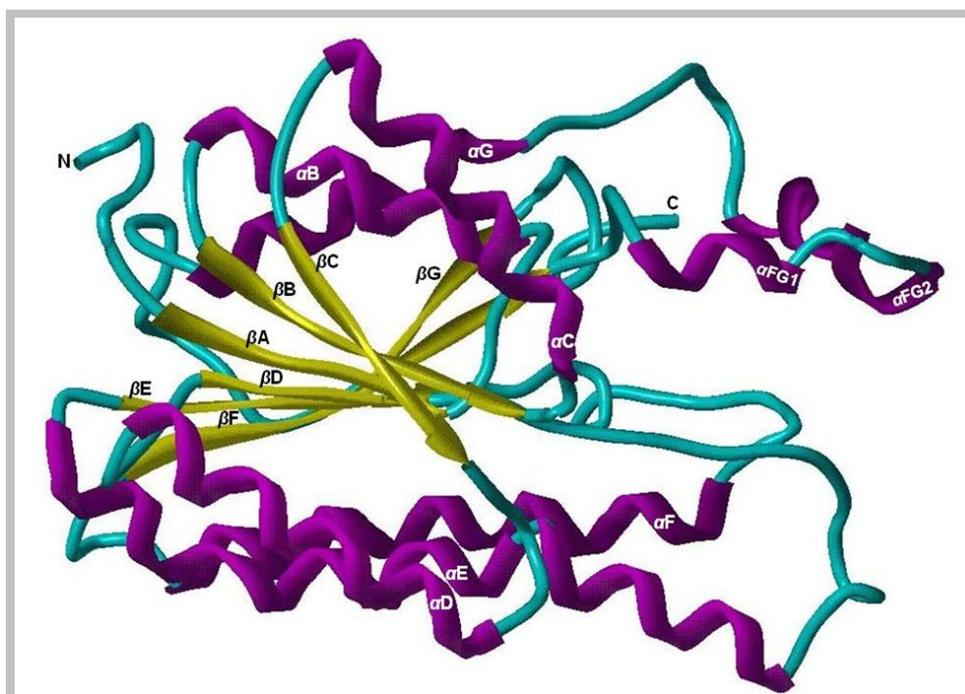


Abbildung C.24: Tertiärstruktur COTR

Ob es sich bei der erhaltenen Faltung um eine native handelt, wurde mit PROSA II (Sippl 1993) untersucht. Die PROSA-Plot-Analyse wies für das Modell über die gesamte Kettenlänge ein günstigeres Energieprofil als für das verwendete *template* aus. Für alle Aminosäuren lag der Plot im negativen Bereich.

Der kalkulierte Z-Score (combined energy) betrug  $-9,66$ . Legt man die Geradengleichung  $y = -6,67 - 0,0141x$  (mit  $x =$  Anzahl der Aminosäuren) zugrunde, sollte der theoretische Wert  $-10,26$  betragen (Sippl 1995). Die Faltung des Proteinmodells kann als nativ beurteilt werden. Das Modell ist von guter Qualität.

Als Resultat der Modellierung wurde die in (Abbildung C.24) dargestellte Tertiärstruktur erhalten:

Ein siebensträngiges, paralleles  $\beta$ -Faltblatt im Zentrum des Moleküls ist von zwei Gruppen aus je 3  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ C,  $\alpha$ B, und  $\alpha$ G auf der linken und  $\alpha$ D,  $\alpha$ E, und  $\alpha$ F auf der rechten Seite) umgeben. Zwei kurze Helices,  $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2, liegen etwas abseits vom Kern des Proteins. Diese Helices und der C-Terminus bilden die Substratbinderegion. Sechs der sieben Stränge ( $\beta$ A bis  $\beta$ F), flankiert von 4  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ B,  $\alpha$ C,  $\alpha$ E, und  $\alpha$ F), bilden den sogenannten ‚Rossman Fold‘, ein charakteristisches Dinukleotid-Bindungsmotiv. Es besteht aus zwei  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  Einheiten. Die Faltung vieler SDR ist fast identisch. Lediglich die kurzen  $\alpha$ -Helices,  $\alpha$ FG1 und/oder  $\alpha$ FG2, scheinen in diesen Enzymen ungeordnet zu sein. So erhält diese Region der TRII von *Datura stramonium* L. erst durch Bindung des Substrates eine geordnete Form (Yamashita 1999, Yamashita 2003).

Duax und Mitarbeiter stellten 1996 ausführliche Vergleiche dreidimensionaler SDR Strukturen an. Sie stellten fest, dass die größte Ähnlichkeit im coenzymbindenden Rossman-Fold besteht, während die Substratbinderegion am variabelsten ist (Duax 1996). Die Substratbinderegion der COTR ist in Abbildungen C.25 und D.6 dargestellt.

#### C2.4.2 Docking

In Tabelle C.9 sind die berechneten nichtbindenden Wechselwirkungsenergien (Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen) und die mit dem Programm X-SCORE berechneten Dissoziationskonstanten der Protein-Ligand-Komplexe aufgeführt.

Die berechneten Wechselwirkungsenergien repräsentieren die freie Wechselwirkungsenthalpie, der Einfluß von Solvatation-Desolvatation wird nicht berücksichtigt. Diese wird bei der Berechnung der pKD-Werte mit dem Programm X-SCORE wieder mit einbezogen. Eine negativere Wechselwirkungsenergie zeigt eine höhere Affinität zum Enzym an.

Tabelle C.9: Docking Übersicht; zum Vergleich: Km-Werte experimentell

	$\Delta E$ [kcal/mol]	pKD	Km [ $\mu$ M]
Tropinon	-35,36	4,68	3290,35
Nortropinon	-30,95	4,55	2001,72
N-propylpiperidin-3-on	-34,37	4,67	1341,56
N-methylpiperidin-3-on	-29,24	4,28	7582,83
Chinuclidinon	-21,44	4,51	2635,92
T-BON	-32,23	4,65	42,00
3-Methylcyclohexanon	-32,71	4,79	13,05
4-Methylcyclohexanon	-28,46	4,74	15,14

Des Weiteren ergab die Überprüfung der Ligandenpositionen im Dockingversuch, dass für Tropinon, Nortropinon und TBON lediglich die Reduktion zu Tropin und  $\alpha$ -TBOL möglich war. Experimentell wurden jedoch auch die Produkte Pseudotropin und  $\beta$ -TBOL gefunden. Eine Variation der Position der Seitenkette von Tyr209 im aktiven Zentrum löste dieses Problem. In Abbildung C.25 sind beide Modelle des aktiven Zentrums und die im Docking resultierende Position des Tropinons dargestellt.

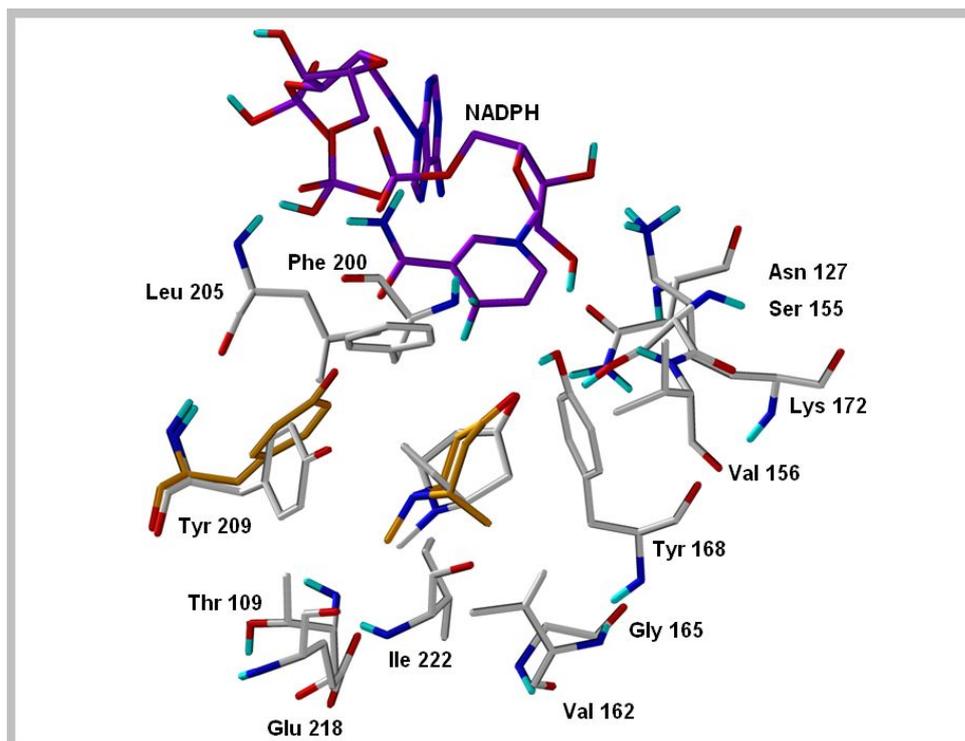


Abbildung C.25: Modelle des aktiven Zentrums; bewegliche Seitenkette von Tyr209; Dockingpositionen für Tropinon

In grau sind hierbei die Strukturen des ursprünglichen Modells dargestellt. Die Dockingposition des grau eingefärbten Tropinonmoleküls erlaubt die Reduktion zu Tropin. Die alternative Positionierung des Tyr209 und die daraus resultierende Dockingposition für Tropinon in Pseudotropin-Orientierung sind orange dargestellt.

Dieses Modell ermöglicht auch die Reduktion zu Pseudotropin und  $\beta$ -TBOL. Für Nortropinon ergab sich keine Bindungsposition, die eine Reduktion möglich machen würde. Für die Methylcyclohexanone ergaben sich verschiedene gleichwertige Dockingvarianten, die berechneten  $pK_D$ -Werte sind mit den experimentell bestimmten  $K_m$ -Werten vergleichbar. Sie liegen im mikromolaren Bereich.

## C2.5 Mutation

In der COTR wurde Tyr209 zu Ser209 mutiert (B2.1.9) um zu untersuchen, wie dadurch die Substratbindung und/oder die Spezifität des Enzyms beeinflusst wird.

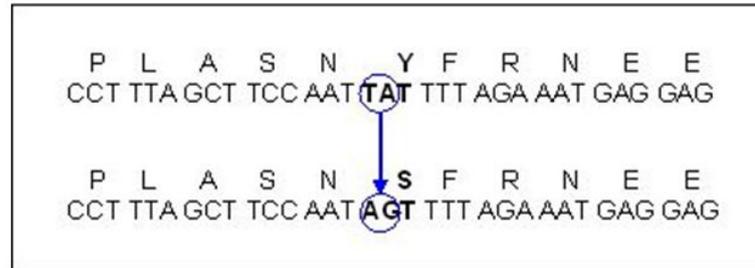
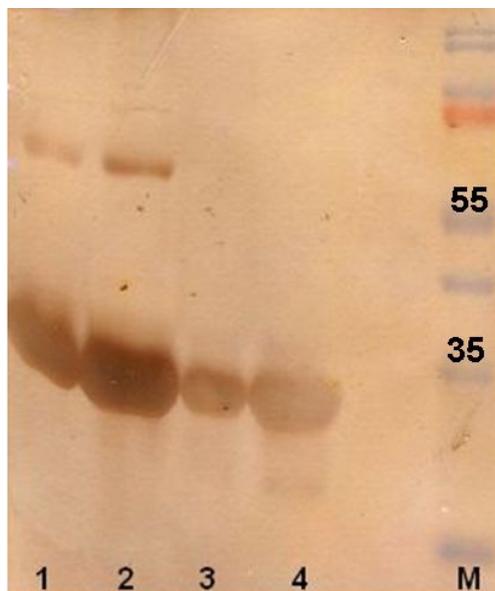


Abbildung C.26: Sequenzausschnitt mutierter Bereich COTR

Die erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt.

### C2.5.1 Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung

Das mutierte Protein wurde mehrfach exprimiert und gereinigt (B2.2.6). Das Profil der Reinigung war analog zu Abbildung C.15. Abbildung C.27 zeigt die SDS-PAGE einer Reinigung.



SPUR	PROBE
M	Marker
1 und 2	COTR Tyr209
3 und 4	COTR Tyr209Ser

Abbildung C.27: SDS-PAGE Mutation COTR

Das gereinigte Protein wurde gemäß B2.2.4 charakterisiert. Das mutierte Protein war **nicht** mehr in der Lage die Reduktion von Tropinon zu katalysieren.

Aus Übersichtsgründen sind die Ergebnisse der Charakterisierung mit den Substratanaloga in Abschnitt C3.5.1 abgebildet.

## C3 Tropinonreduktion in *Arabidopsis thaliana* L.

### C3.1 Umsatz von Tropinon

Durch Fütterung von Tropinon an ganze Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* L. (B2.3.4) konnte eine Reduktion von Tropinon zu Tropin/Pseudotropin in der Pflanze nachgewiesen werden. Die Proben wurden nach B2.3.2 aufgearbeitet und mittels Dünnschichtchromatographie (B2.3.7) und GC-MS untersucht (B2.3.6). Abbildung C.28 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm nach Fütterung von 2 mM Tropinonlösung über 48 Stunden, als Kontrolle wurde hier eine junge *Nicotiana tabacum* Pflanze mit Tropinon gefüttert. Eine mit 2 mM NaCl-Lösung gefütterte *Arabidopsis thaliana* L. Pflanze diente ebenfalls als Kontrolle.

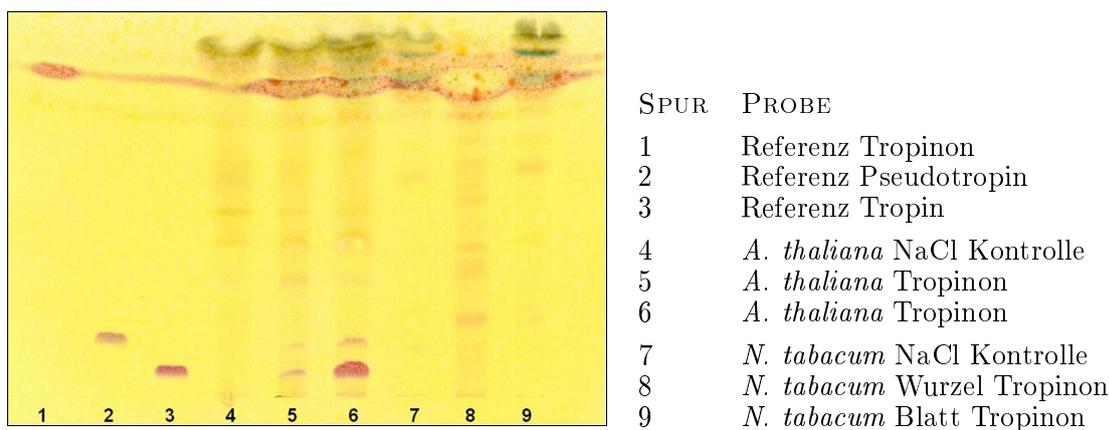


Abbildung C.28: DC - Reduktion von Tropin zu Tropin/Pseudotropin - Fütterungsversuch

Die Tropinonreduktion durch die Pflanze konnte mehrfach gezeigt werden. In einem umfangreichen Versuch gelang es jedoch nicht, eine Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Pflanze oder vom Gewebe zu zeigen. Somit erwies sich der Nachweis dieser Eigenschaft als schwer reproduzierbar.

### C3.2 Isolierung einer *tr*-homologen cDNA-Sequenz (*atsdr*)

Aus acht Wochen alten ganzen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* L. wurde Gesamt-RNA isoliert (B2.1.1), in cDNA umgeschrieben (B2.1.3) und diese als *template* für eine PCR (B2.1.4) mit genspezifischen Primern (Tabelle B.3) für das Gen At2G29360 eingesetzt, das eine hohe Ähnlichkeit zu *cotr* aufwies.

Der erhaltene Ganzlängenklon (813 bp; 271 Aminosäuren; MW 29185 Da; pI 6,23) wurde in den pet21d Vektor kloniert (Tabelle B.2; B2.1.5) und in *E. coli* Rosetta gami<sup>®</sup> Zellen transformiert (Tabelle B.1). Es wurden die Restriktionsstellen *NotI* und *NheI* verwendet und so ein *tag* aus 6 Histidinresten am C-Terminus angefügt.

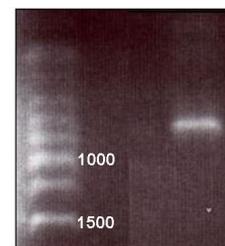


Abbildung C.29: Agarosegel

### C3.3 Überexpression, Reinigung & biochemische Charakterisierung der ATSDR

Die Überexpression, Lyse und Reinigung erfolgte nach den unter B2.2.2 und B2.2.6 beschriebenen Methoden. Das Reinigungsprofil war dem in Abbildung C.15 vergleichbar. Das rekombinante Protein hat ein Molekulargewicht von 30750 Da und einen theoretischen pI von 6,41. Es wurden mehrere Reinigungen durchgeführt, Abbildung C.30 zeigt die SDS-PAGE einer Reinigung. Die

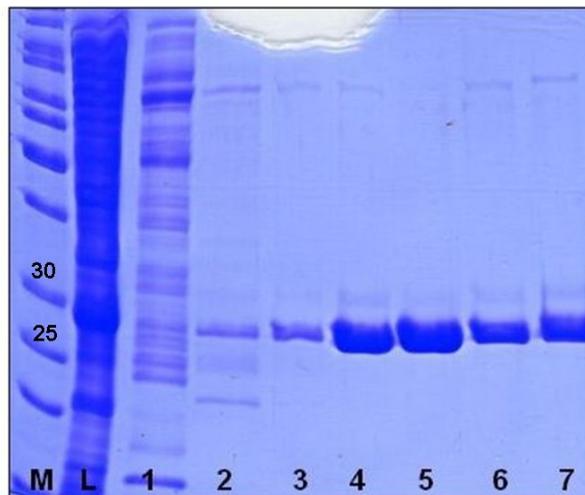


Abbildung C.30: SDS-PAGE Reinigung ATSDR

Elutionsfraktionen sind unter den Ziffern 1 bis 7, das Lysat unter L aufgetragen; M steht für Marker. Die gereinigten, entsalzten und konzentrierten Proben wurden gepoolt und zur biochemischen Charakterisierung eingesetzt.

#### C3.3.1 Tropinonreduktion

Die rekombinante ATSDR war in einem pH-Bereich von 4–10 **nicht** in der Lage, Tropinon zu reduzieren.

#### C3.3.2 Substratanaloga

Die in Abbildung B.2 dargestellten Substrate wurden auch an diesem Enzym getestet. Ein Umsatz von Tropinon und Nortropinon war nicht messbar und auch nach 24-stündiger Inkubation waren keine Reaktionsprodukte detektierbar. Auch Fructose und Glucose wurden vom Enzym nicht umgesetzt. Ebenso fand keine Oxidation von Mannitol und Sorbitol mit NADP statt.

Zur Bestimmung von katalytischen Konstanten wurde daher 4-Methylcyclohexanon herangezogen. Die spezifischen Aktivitäten für die übrigen Substratanaloga sind aus Übersichtsgründen im Abschnitt C3.5.1 dargestellt.

Für 4-Methylcyclohexanon weist dieses Enzym ein breites pH-Optimum zwischen pH 5,5 und 7,5 auf, ab pH 8 nimmt die Aktivität des Enzyms deutlich ab. Für das basische Substrat Chinuclidinon ergab sich ein scharfes Maximum bei pH 7,8.

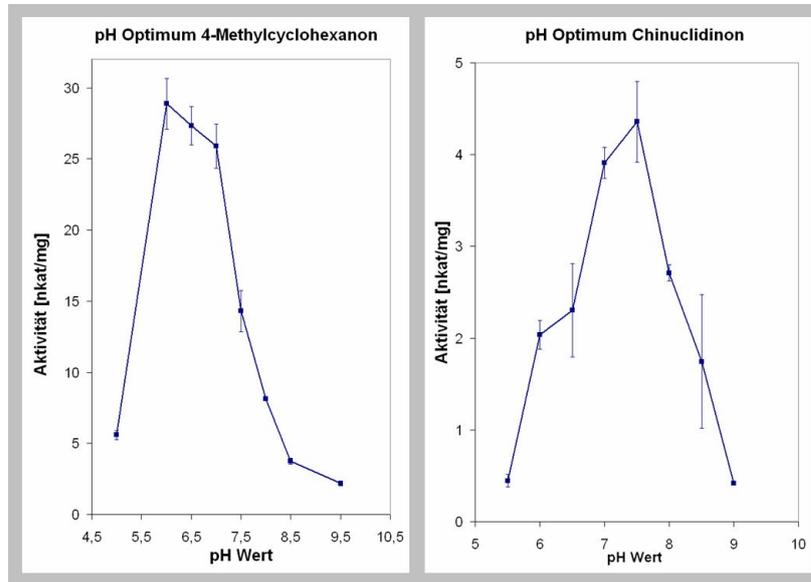


Abbildung C.31: pH-Optimum

### C3.3.3 Katalytische Konstanten

Für 4-Methylcyclohexanon wurden der  $K_m$ -Wert und die  $V_{max}$  nach der Methode von HANES ermittelt (Abbildung C.32).

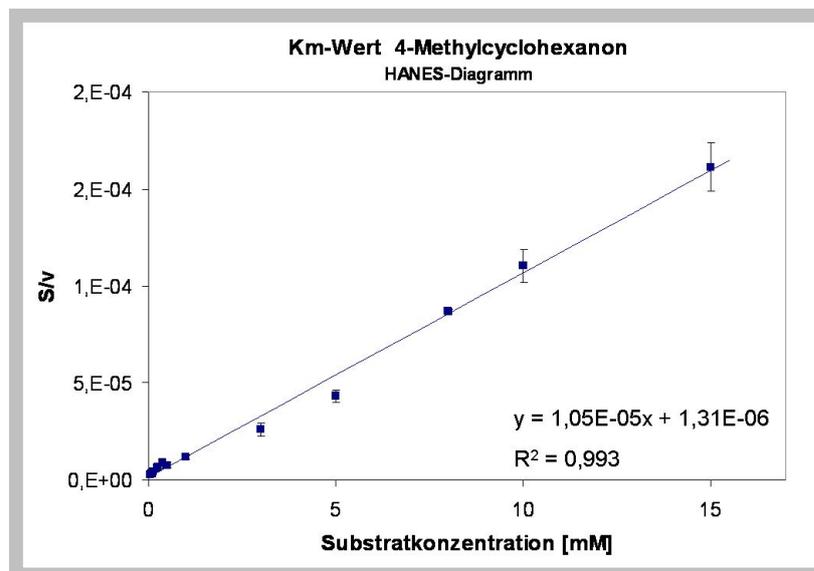


Abbildung C.32:  $K_m$ -Wert-Bestimmung nach HANES

Der berechnete  $K_m$ -Wert ist 0,36 mM,  $V_{max}$  liegt bei 125 nkat.

### C3.4 Molekulares Modell

Von der putativen Tropinonreduktase aus *Arabidopsis thaliana* L. wurde analog zu C2.4 ein molekulares Modell erstellt. Hier diente ebenfalls die TRII aus *Datura stramonium* L. (IIPF) als *template* Struktur.

#### C3.4.1 Eigenschaften des Modells

Es ist aus Abbildung D.3 ersichtlich, daß die Mehrzahl der Aminosäuren der ATSDR identisch ist mit denen der COTR (218 von 273 Aminosäuren). Es überrascht daher nicht, dass das molekulare Modell der ATSDR die gleiche Tertiärstruktur aufweist. Die Erläuterungen zur Tertiärstruktur unter C3.4.1 sind somit auch hier zutreffend.

Zur laufenden Beurteilung der stereochemischen Qualität des Modells wurde das Programm PROCHECK (Laskowski 1993) verwendet. Im endgültigen Modell befanden sich 87,9 % der Aminosäuren in den am meisten bevorzugten Regionen. Weitere 10,8 % in zusätzlich erlaubten sowie 1,3 % in großzügig erlaubten Bereichen. Alle weiteren stereochemischen Parameter, wie zum Beispiel Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkel,  $\omega$ -Planarität, lagen in erlaubten Bereichen. Die Seitenkettenparameter ergaben sogar bessere Werte als bei einem Proteinkristall mit einer Auflösung von 2 Ångström zu erwarten gewesen wären. Das Modell ist stereochemisch korrekt. Ob es sich bei der erhaltenen Faltung um eine native handelt, wurde mit PROSA II (Sippl 1993) untersucht.

Der kalkulierte Z-Score (combined energy) betrug  $-9,23$ . Legt man die Geradengleichung  $y = -6,67 - 0,0141x$  (mit  $x =$  Anzahl der Aminosäuren) zugrunde, sollte der theoretische Wert  $-10,26$  betragen. Die Faltung des Proteinmodells kann als nativ beurteilt werden. Das Modell ist von guter Qualität. Die PROSA-Plot-Analyse wies für das Modell über die gesamte Kettenlänge ein ähnliches Energieprofil wie für das verwendete *template* aus. An 2 Stellen des Plots traten positive Energiewerte auf (ca. 150–170 aa).

#### C3.4.2 Docking

Analog zu C2.4.2 wurden auch mit dem Modell der ATSDR Dockingversuche durchgeführt. Keine der durch das Docking ermittelten Ligandenpositionen hätte eine Reduktion der Carbonylgruppe ermöglicht. Eine Feineinstellung der Seitenkettenpositionen im aktiven Zentrum des Moleküls war im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht möglich. Im direkten Vergleich der aktiven Zentren der beiden modellierten Enzyme sind die Unterschiede leicht zu erkennen. Fünf der zwölf Aminosäuren im aktiven Zentrum, die Kontakt zum Substrat haben, sind verschieden. Besonders auffällig ist dabei lediglich die Position 209. In der COTR befindet sich hier das voluminöse Tyrosin, während in der ATSDR Serin zu finden ist, welches deutlich weniger raumfordernd ist. Dieser augenscheinlich bedeutendste Unterschied wurde daher zum Gegenstand eines Mutageneseexperimentes.

### C3.5 Mutation

Komplementär zur Mutation der COTR (C2.5) wurde hier Ser209 zu Tyr209 mutiert, um zu untersuchen wie dadurch die Substratbindung und / oder die Spezifität des Enzyms beeinflusst wird. Die erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt (Abbildung C.33).

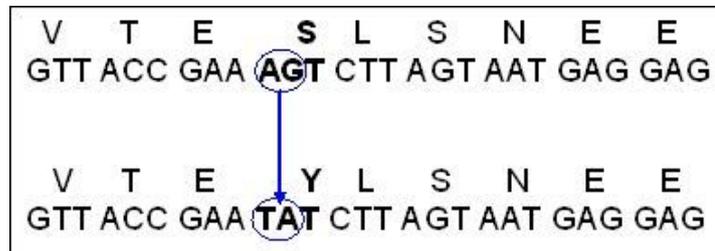
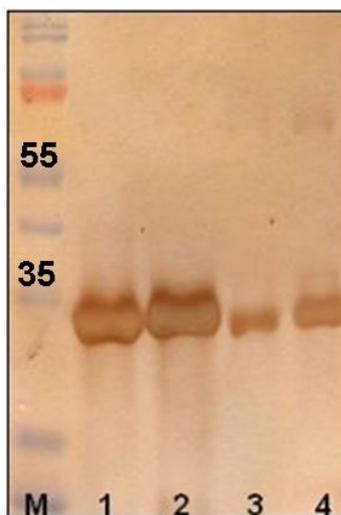


Abbildung C.33: Sequenzausschnitt des mutierten Bereichs ATSDR

#### C3.5.1 Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung

Das mutierte Protein wurde mehrfach exprimiert und gereinigt (B2.2.6). Das Elutionsprofil der Reinigung entsprach dem in Abbildung C.15. Abbildung C.34 zeigt die SDS-PAGE einer Reinigung (Silberfärbung).

Diese gereinigten Proteine wurden gemäß B2.2.4 charakterisiert.



SPUR	PROBE
M	Marker
1 und 2	ATSDR Ser209
3 und 4	ATSDR Ser209Tyr

Abbildung C.34: SDS PAGE  
ATSDR und ATSDR mutiert

Die Abbildungen C.35 bis C.37 enthalten die spezifischen Aktivitäten der Wildtyp- und der mutierten Enzyme, gemessen im photometrischen Standardassay bei einer Substratkonzentration von 5 mM, für die in Abbildung B.2 dargestellten Substratanaloga.

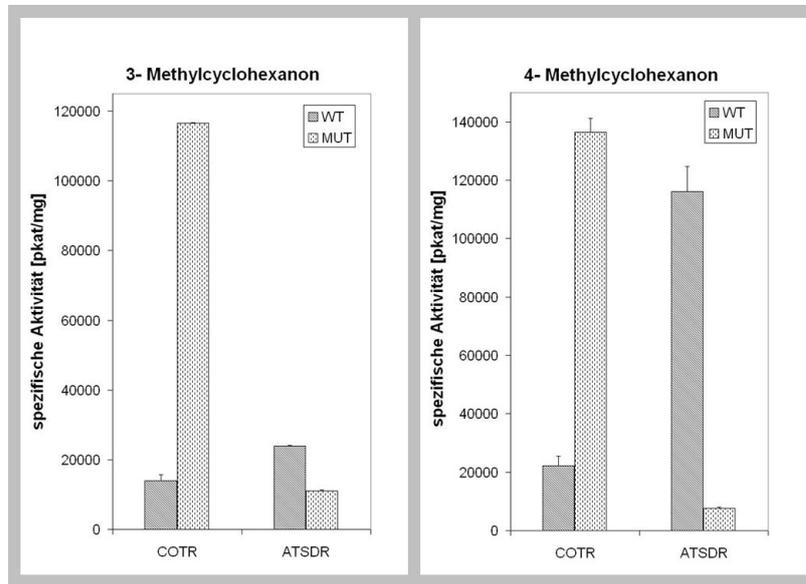


Abbildung C.35: Mutagenese - Spezifische Aktivitäten (1)

Für die Methylcyclohexanone zeigt sich eine deutliche Verstärkung des Umsatzes durch den Austausch Tyrosin gegen Serin, während der umgekehrte Tausch in der ATSDR vergleichsweise geringe Auswirkungen auf die gemessene Aktivität hat.

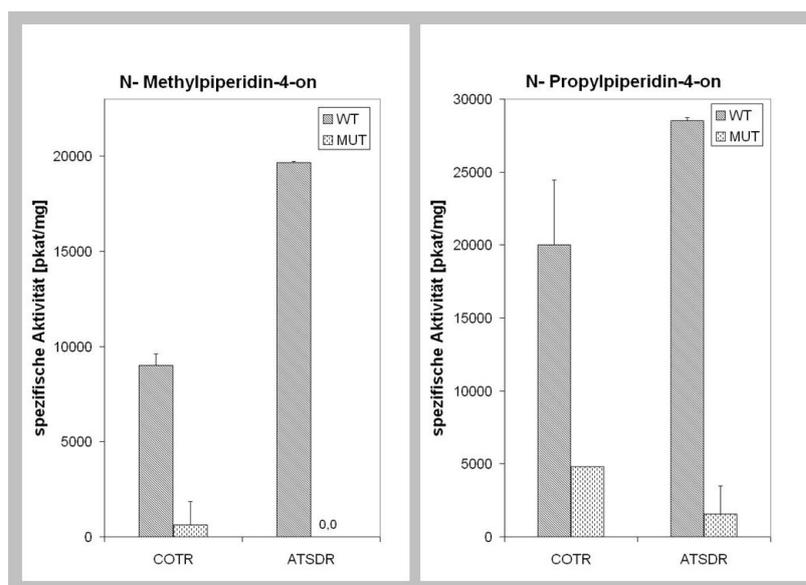


Abbildung C.36: Mutagenese - Spezifische Aktivitäten (2)

Keine der Mutanten war in der Lage Tropinon und Nortropinon zu reduzieren. *N*-Methylpiperidinon wurde von der mutierten COTR noch umgesetzt, während die ATSDR-Mutante dieses Substrat nicht akzeptierte. Bei *N*-Propylpiperidinon wurde für beide Mutanten eine verringerte spezifische Aktivität gefunden, wobei sich für die ATSDR-Mutante nur eine geringe Änderung der Aktivität ergab.

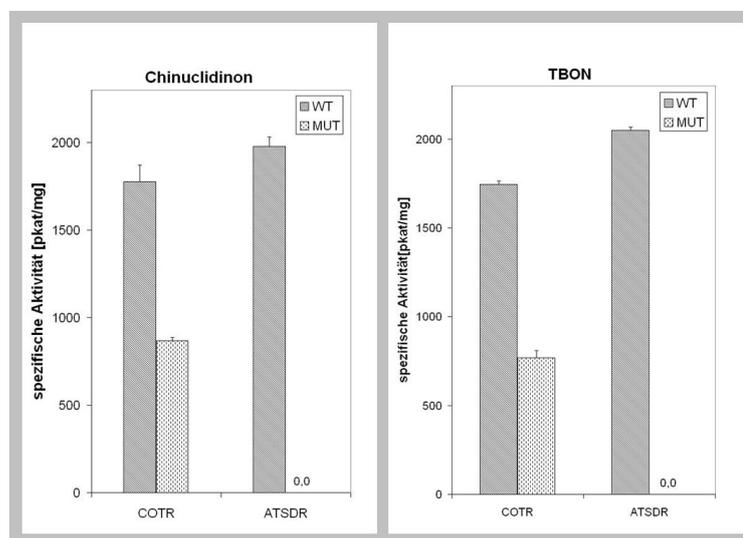


Abbildung C.37: Mutagenese - Spezifische Aktivitäten (3)

Für die bityklischen Substrate TBON und Chinuclidinon sank in der mutierten COTR die Aktivität um etwa die Hälfte. Die mutierte ATSDR akzeptierte diese Substrate nicht mehr.

## C4 Putrescin umsetzendes Enzym

### C4.1 Isolierung einer *spds*-homologen Sequenz mittels PCR-Screening

Ausgehend von einem Alignment der bekannten PMT sowie der Spermidinsynthasen von Solanaceae und *Arabidopsis thaliana* L. wurden Primer abgeleitet (PMTdir01 bis 05, PMTrev01 bis 05, Tabelle B.3). Diese Primer waren entsprechend der Motive in PMT und SPDS so angelegt, dass entweder PMT oder SPDS oder aber beide damit erfasst werden sollten. Die PCR wurde gemäß B2.1.4 (Standard-PCR) durchgeführt. Als *template* der PCR diente zum einen die cDNA-Bank (B2.1.8), zum anderen cDNA aus verschiedenen Geweben von *Cochlearia officinalis* L. Keiner der PMT-spezifischen Primer ergab ein Produkt. Ein spermidinsynthaseähnliches Fragment wurde durch die Kombination der Primer PMTdir03 und PMTrev05 erhalten. Dieses 221 Basenpaare umfassende Fragment wurde sowohl in der cDNA-Bank als auch in verschiedenen cDNA amplifiziert. Die zuverlässige Amplifikation dieses Fragments war Voraussetzung für das anschließende PCR-basierte Screening der cDNA-Bank. Das Screening-Verfahren wurde, wie unter B2.1.8 erläutert, durchgeführt.

#### C4.1.1 Bestimmung der geringsten noch PCR-Produkt gebenden *pfu*-Menge

Als *template* für die PCR wurden Dilutionen der Bank im Bereich  $10^3$  bis  $10^7$  *pfu*/ $\mu$ l verwendet, es wurden jeweils 1  $\mu$ l und 5  $\mu$ l der Verdünnung in einer Standard-PCR (B2.1.4) eingesetzt. Im Falle des *spds*-Fragments wurde mit  $5 \times 10^4$  *pfu* =  $N_{t1}$  gerade noch ein Signal erhalten.

#### C4.1.2 Erstes Screening

Für das erste Screening wurden  $3 \times N_{t1} = 1,5 \times 10^5$  *pfu* entsprechend  $N_{w1} = 7,5 \times 10^2$  *pfu* (*pfu* pro *well*) eingesetzt. Nach Inkubation wurden die *wells* in Spalten und Zeilen gepoolt und die Pools per PCR getestet.

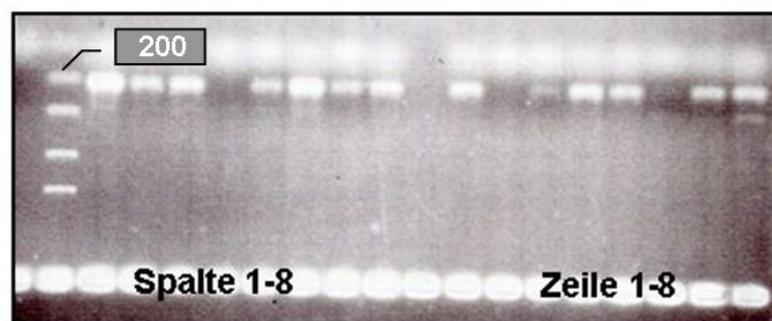


Abbildung C.38: Agarosegel PCR Screening

So war die Bestimmung der *wells* an den Kreuzungspunkten positiver Spalten und Zeilen, z.B. Spalte1-Zeile1(*well* A1) möglich. Nachfolgend wurde für diese *wells* eine PCR zur Überprüfung durchgeführt und der Phagentiter für positive *wells* (z.B. A1) bestimmt. Dafür wurden die Verdünnungen  $1 : 10^5$ – $10^6$ – $10^7$  ausplattiert, der bestimmte Titer war:  $1,7 \times 10^9$  *pfu*/ml.

### C4.1.3 Zweites und drittes Screening

Die Vorgehensweise war hierbei analog dem ersten Screening. Die Zahl der eingesetzten Phagen wird dabei im Laufe des Screenings immer weiter verringert und das Vorhandensein des Zielphagen wiederholt durch PCR kontrolliert.

ZWEITES SCREENING		DRITTES SCREENING		
$N_{t2}$	$=N_{w1} \times 2$	$N_{t3}$	$=N_{w2} \times 2$	Gesamtzahl der eingesetzten Phagen
	$=7,5 \times 10^2 \text{ pfu} \times 2$		$=7,5 \times 10^2 \text{ pfu} \times 2$	
	$=1,5 \times 10^3 \text{ pfu}$		$=45 \text{ pfu}$	
$3 \times N_{t2}$	$=4,5 \times 10^3 \text{ pfu}$ in 1 ml SM	$3 \times N_{t3}$	$=135 \text{ pfu}$ in 1 ml SM	Phagenzahl/ <i>well</i>
$N_{w2}$	$=22,5 \text{ pfu}$	$N_{w3}$	$=0,6 \text{ pfu}$	

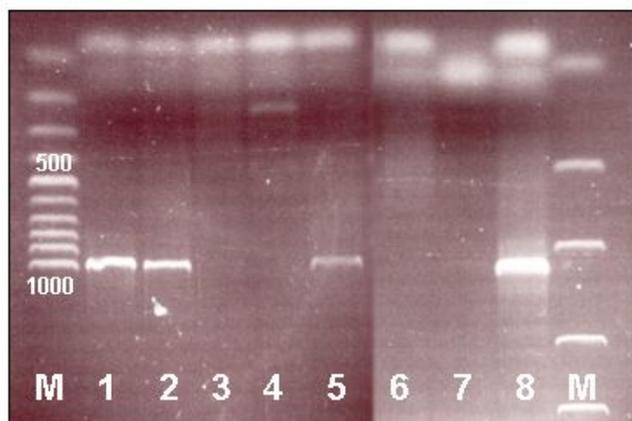
So sollten sich in der dritten Screeningrunde in jedem *well* nur noch einzelne Phagen befinden und vermehren. PCR-positive *wells* wurden dann ausplattiert und die entstandenen Plaques nochmals per PCR (B2.1.4) getestet. Es wurden mehrere *spds*-positive Einzelklone erhalten und Mini-Flüssigkulturen aus den Phageneluatn erstellt (B2.1.8). Mit den verdünnten Flüssigkulturen wurden *E. coli* B25.8 infiziert (Tabelle B.1) und dann auf festem LB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin) ausgebracht. Die gebildeten Kolonien wurden mittels *colony*-PCR (B2.1.4) überprüft und in 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin kultiviert. Die Plasmide wurden mittels Qiaquick Mini Prep Kit (Tabelle B.5) präpariert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert (Tabelle B.1). Anschließend erfolgte die Präparation der Plasmide aus 50 ml Kulturen. Zur Sequenzierung dienten die Vektorprimer T7 und SP6. Die Auswertung der Sequenzierung ergab eine Sequenz mit einer Länge von 981 Basenpaaren. Es wurden Primer mit den Restriktionsschnittstellen *Nco*1 und *Not*1 entworfen um PCR-Produkte zu erhalten, die in den pet21d-Vektor (Tabelle B.2) kloniert und mit sechsfachem Histidin-*tag* exprimiert werden können. Als *template* für die PCR wurde cDNA eingesetzt, die aus der RNA verschiedener Gewebe durch Umschreibung erhalten wurde. Für die Amplifikation wurde *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Das Agarosegel dieser PCR ist im Abschnitt C4.2 abgebildet. Alle Produkte wurden aus dem Gel geschnitten, eluiert, in den TA-Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert (Tabelle B.1). Durch *colony*-PCR (B2.1.4) identifizierte positive Klone wurden in TB-Medium mit Ampicillin vermehrt und die Plasmide anschließend präpariert und sequenziert. Alle Sequenzierungen stimmten untereinander sowie mit den aus dem Screening erhaltenen Ganzlängenklonen überein. Eine parallel durchgeführte *RACE-PCR* lieferte das gleiche Ergebnis. Nach Klonierung in den pet21d-Vektor wurde in *E. coli* XL1-Blue (Tabelle B.1) zwischenkloniert, nochmals zur Kontrolle sequenziert und abschließend in den Expressionshost *E. coli* Rosetta gami (Tabelle B.1) transformiert (B2.1.5).

EIGENSCHAFTEN:	SPDS	SPDS MIT His- <i>tag</i>
LÄNGE (aa)	326	338
MOLGEW (Da)	35539	36955
PI	4,86	5,22

Die Sequenz wurde unter der Accession AM 78272 in die Datenbank eingetragen. Ein multiples Sequenzalignment mit ClustalW 4.0 wurde für die Aminosäuresequenzen durchgeführt. Ein Ausschnitt aus diesem Alignment ist in Tabelle D.2 zu sehen.

## C4.2 Expressionsanalyse des *spds*-Transkripts

Zur Untersuchung, wann und in welchen Geweben die SPDS exprimiert wird, wurde aus verschiedenen Gewebeprouben RNA isoliert (B2.1.1) und in cDNA umgeschrieben (B2.1.3). Die Gewebeprouben sind identisch mit denen unter C1.3.1 auf *Calystegine* und den unter C1.3.3 auf Tropin/Pseudotropin untersuchten Proben. Mittels genspezifischen Primern (Tabelle B.4) wurde eine Standard-PCR durchgeführt und anschließend per Agarosegelelektrophorese auf das Reaktionsprodukt untersucht (B2.1.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung C.39 dargestellt.



SPUR	PROBE
1	Blattspreite, 1a
2	Stängel, 1a
3	ganzes Blatt, 1a
4	ganzes Blatt, 2a
5	Blüten, 2a
6	Wurzel, 1a
7	unreife Früchte, 2a
8	Wurzel, 2a

1a - Pflanze im 1. Lebensjahr  
2a - Pflanze im 2. Lebensjahr

Abbildung C.39: Agarosegel RT-PCR *spds*-Transkript

Das *spds*-Transkript wurde mit dieser Methode in verschiedenen Geweben, sowohl in der einjährigen als auch in der zweijährigen Pflanze nachgewiesen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das Fehlen eines Signals auf die Qualität der RNA-Extraktion oder Fehler in der Umschreibung in cDNA zurückzuführen ist.

## C4.3 Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung

Die Überexpression, Lyse und Reinigung der rekombinanten SPDS erfolgte nach den unter B2.2.2 und B2.2.6 beschriebenen Methoden. Die Elution des überexprimierten Proteins erfolgte bei einer Imidazolkonzentration von ca. 200 mM im Gradienten. Das Lysat (L), die Wasch (W)- und Elutionsfraktionen (1–5) wurden mittels SDS-PAGE überprüft (B2.2.3; Abbildung C.40). Die Elutionsfraktionen (1–4) wurden vereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Da das Protein sich als sehr instabil gegenüber Temperatureinflüssen erwies, wurden die entsalzten Proteinlösungen bei 4°C aufbewahrt und so zügig wie möglich verbraucht. Die biochemische Charakterisierung erfolgte mittels des unter B2.2.5 beschriebenen Assays. Wurden die Reaktionsbedingungen variiert, ist dies im Zusammenhang mit dem Ergebnis angezeigt.

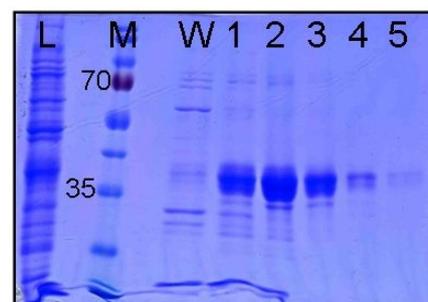


Abbildung C.40: SDS-PAGE, SPDS

### C4.3.1 Vorversuch-Cosubstratspezifität

Da die PCR-Suche nach einer typischen PMT nicht erfolgreich war, wurde in einem Vorversuch die gefundene Spermidinsynthase mit SAM und dcSAM als Cosubstrat getestet. Wie erwartet, wurde mit dcSAM Spermidin gebildet - überraschenderweise wurden zusätzlich Spermin und ein Produkt mit der Retentionszeit und dem UV-Spektrum von *N*-Methylputrescin gefunden. Dieses Produkt wird nachfolgend mit MP bezeichnet. Eine Identifizierung als *N*-Methylputrescin durch MS-Methoden war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Spermin wird üblicherweise durch Sperminsynthasen gebildet und entsteht durch Aminopropylierung von Spermidin. Mit der Bildung von MP war in keiner der beiden Assayvarianten gerechnet worden. Abbildung C.41 zeigt die Menge der gebildeten Produkte in nmol berechnet auf das gesamte Assayvolumen. Insgesamt wurden ca. 35 nmol Produkt gebildet, dabei ist die MP-Menge in dcSAM1 und dcSAM2 nur unwesentlich geringer als in SAM1 und SAM2. Das verwendete dcSAM wurde mit Hilfe rekombinanter SAM-Decarboxylase aus handelsüblichem SAM hergestellt, daher sind keine Angaben zur Reinheit des Produktes erhältlich. Neben der Übertragung der Methylgruppe von dcSAM ist auch die Übertragung der Methylgruppe von SAM (als Verunreinigung) in Betracht zu ziehen. Leider stehen auch für SAM (Sigma-Aldrich) abgesehen vom Gehalt (ca 80%) keine Informationen zum Charakter der Verunreinigungen zur Verfügung.

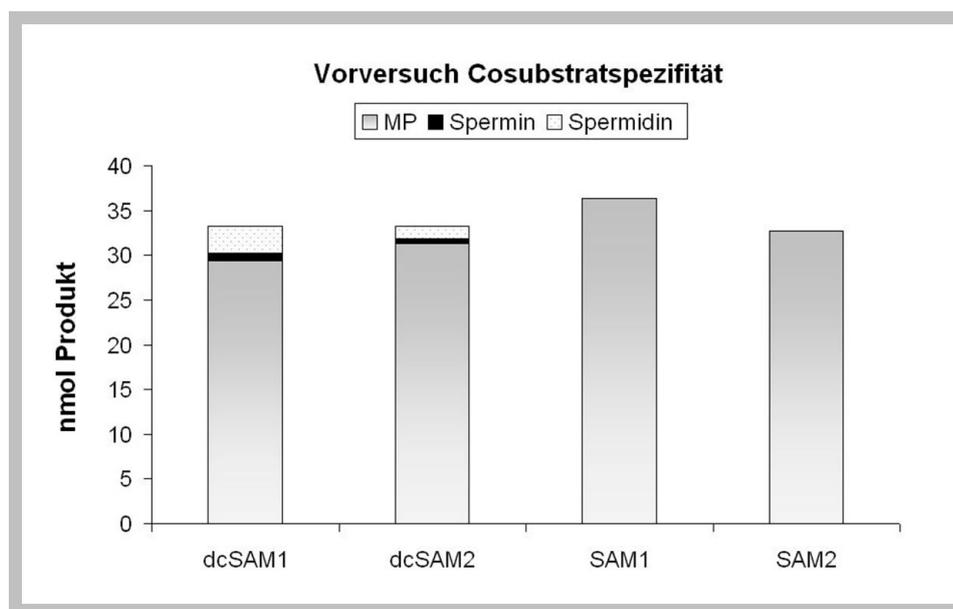


Abbildung C.41: Vorversuch Cosubstratspezifität SPDS; nmol Produkt/assay

ASSAYZUSAMMENSETZUNG:

6 µg	Protein
30 µl	Putrescin 0,1 M
5 µl	SAM oder 0,1 M dcSAM
ad 500 µl	Glycin-Puffer
200 µl	dansyliertes Volumen

### C4.3.2 Produktbildung - Abhängigkeit von Putrescin und SAM-Konzentration

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der MP-Bildung von den Konzentrationen des Substrates Putrescin und des Cosubstrates SAM wurden Assays unterschiedlicher Zusammensetzungen durchgeführt. Die Putrescinkonzentration wurde zunächst im Bereich 0,1 bis 10 mM, die SAM-Konzentration im Bereich 100–1000  $\mu\text{M}$  variiert. In den Abbildungen C.42 und C.44 sind die Mittelwerte aus Drei- oder Vierfachbestimmungen aufgetragen.

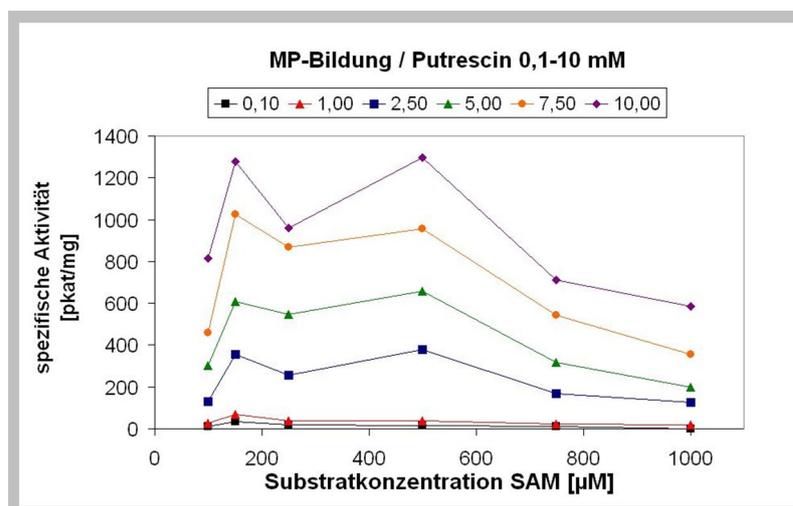
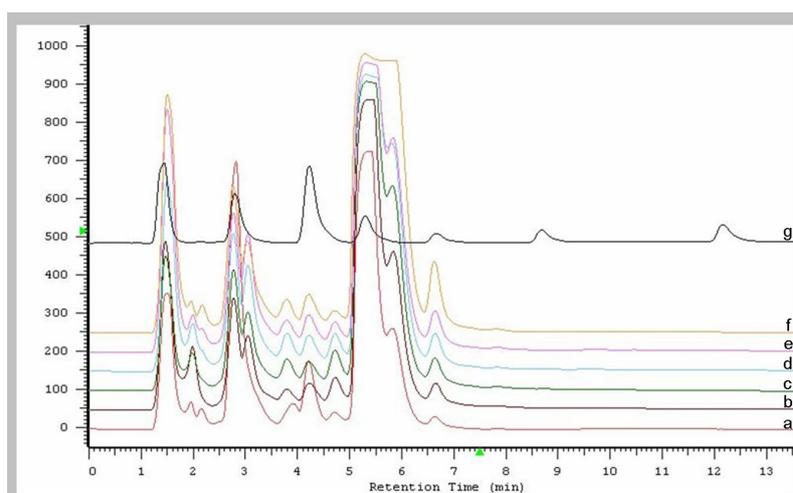


Abbildung C.42: Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung (1)

Die spezifische Aktivität lässt sich im Meßbereich durch Erhöhung der Putrescin-Konzentration steigern. Es resultiert eine zweigipflige Kurve mit Maxima in den Bereichen um 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ , die ab 750  $\mu\text{M}$  SAM abfällt. Abbildung C.43 zeigt das HPLC Chromatogramm einer Probenreihe mit steigenden Putrescinkonzentrationen. Die Vergrößerung der Peakfläche bei ca. 6,7 min ist deutlich zu erkennen.



CHROMATOGRAMME EINER REIHE BEI 350  $\mu\text{M}$  SAM

a	2,5 mM	Putrescin
b	5,0 mM	Putrescin
c	7,5 mM	Putrescin
d	10,0 mM	Putrescin
e	12,5 mM	Putrescin
f	15,0 mM	Putrescin
g		Referenz

#### RETENTIONSZEITEN

Putrescin	5,3 min
MP	6,7 min
Spermidin	8,7 min
Spermin	12,2 min

Abbildung C.43: HPLC Chromatogramme 350  $\mu\text{M}$  SAM; 0,1–10 mM Putrescin

Die entstehenden Konzentrations-Aktivitäts-Kurven folgen nicht dem typischen hyperbolen Verlauf, der bei Vorliegen einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik entsteht. Inwiefern die SAM-Konzentration Einfluß auf die spezifische Aktivität ausübt, ist nicht eindeutig erkennbar: während diese im Bereich bis 250  $\mu\text{M}$  steigt, führen höhere Konzentrationen zu flacheren Kurven.

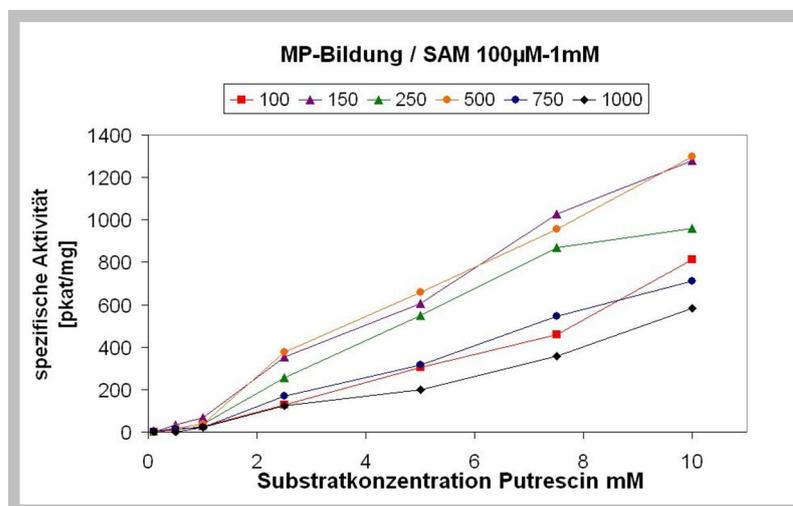


Abbildung C.44: SAM-Abhängigkeit der MP-Bildung

Darüber hinaus wurden für die Reihen 750 und 1000  $\mu\text{M}$  Spermidin und Spermin als Reaktionsprodukte gefunden. Abbildung C.45 zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer dieser Proben (10 mM Putrescin, 750  $\mu\text{M}$ ) Sowohl SAM, MP, als auch Spermidin und Spermin sind vorhanden.

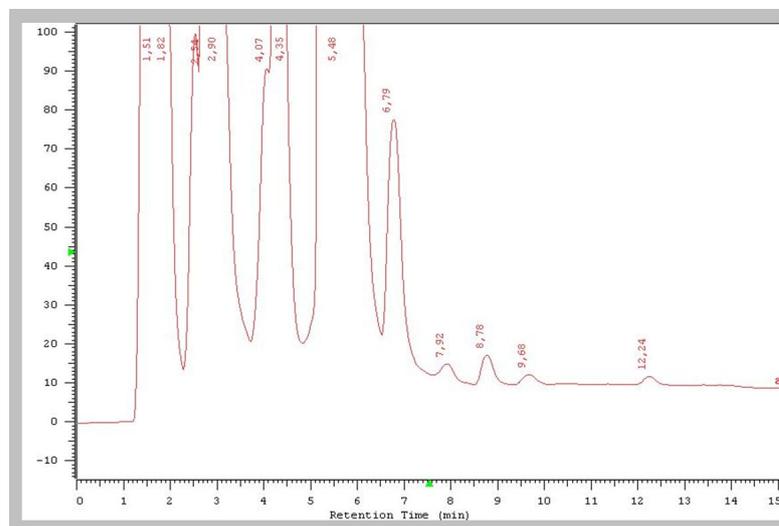


Abbildung C.45: Chromatogramm 750  $\mu\text{M}$  SAM, 10 mM Putrescin  
Retentionszeiten 6,7 min MP; 8,7 min Spermidin; 12,2 min Spermin

Eine Kontamination des eingesetzten SAM (Sigma-Aldrich) mit dcSAM und/oder SAH ist nicht auszuschließen. Das könnte gleichzeitig eine Erklärung für den Abfall der Aktivität der MP-Bildung bei hohen SAM-Konzentrationen sein. Eine Hemmung der Aktivität durch Substratüberschuß ist ebenfalls denkbar.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Konzentrationsbereich von Putrescin bis 15 mM erweitert und SAM-Konzentrationen von 10 bis 350  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

Eine Steigerung der Putrescinkonzentration auf 15 mM führte zu einer weiteren Steigerung der Aktivität. Alle Kurven haben ein erstes Maximum bei ca. 25  $\mu\text{M}$  und steigen ab 250  $\mu\text{M}$  erneut an. Im untersuchten SAM-Konzentrationsbereich führten höhere SAM-Konzentrationen zu höherer Aktivität.

Um den Reaktionsmechanismus zu klären, wurde die Kurve bei 350  $\mu\text{M}$  SAM im Bereich 0,25 bis 50 mM Putrescin präzisiert. Abbildung C.46(A) zeigt die Konzentrations-Aktivitäts-Kurve über den gesamten Konzentrationsbereich, Abbildung C.46(B) den Ausschnitt bis 5 mM. Den Meßpunkten liegen 2 bis 4 Einzelwerte zugrunde, die Standardabweichungen sind nur für Vierfachbestimmungen berechnet.

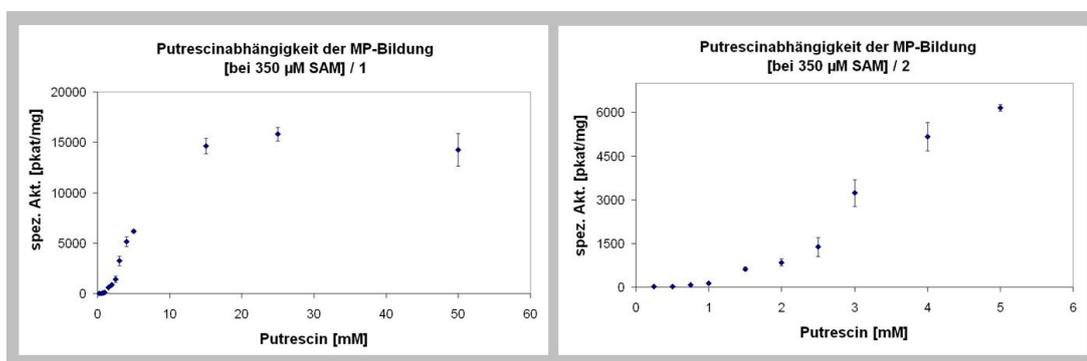


Abbildung C.46: Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung (2)

Anstatt eines hyperbolen ergibt sich bei dieser Auftragung ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Zur Berechnung der katalytischen Konstanten wurde daher die HILL-Gleichung bemüht.

In einem ersten Schritt wurde durch Auftragung der Werte für 10–50 mM nach HANES eine Abschätzung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  vorgenommen. Die Maximalgeschwin-

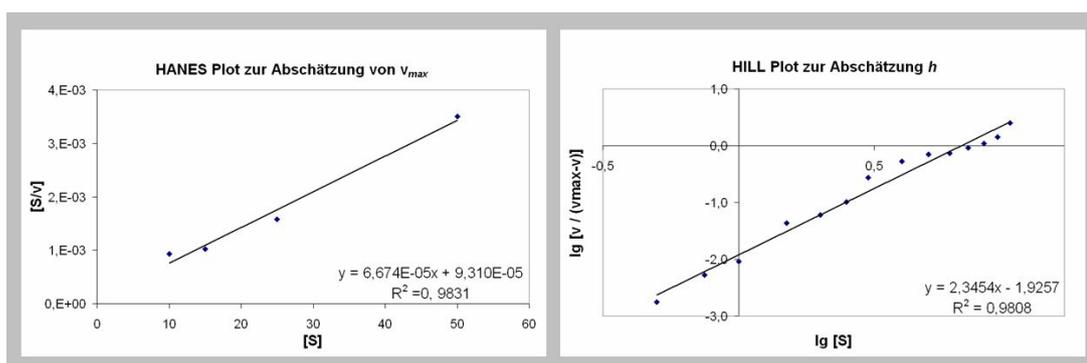


Abbildung C.47: Ermittlung katalytische Konstanten (1)

digkeit wurde aus dieser Auftragung mit 14983,52 pkat ermittelt. Diese wurde zur Darstellung der gemessenen Daten im HILL-Plot  $\lg[S]$  vs.  $\lg[\frac{v}{v_{max}-v}]$  verwendet. Abbildung C.47 zeigt diesen HILL-Plot, in dieser Darstellung gelingt die Linearisierung der gemessenen Daten, der HILL-Koeffizient  $h$  sowie  $K_{0,5}$  lassen sich daraus ablesen.

Die Steigung der Geraden entspricht dem HILL-Koeffizienten  $h = 2,3454$ . Aus  $x = 0$  entspricht  $-h \cdot \log K_{0.5}$  wurde  $K_{0.5} = 6,62$  mM ermittelt. Durch Verwendung des berechneten HILL-Koeffizienten als Exponent zur Basis [Substratkonzentration] wird eine Darstellung der Meßwerte nach HANES möglich (Abbildung C.47). Aus dieser wurde  $V_{max}$  neu berechnet.

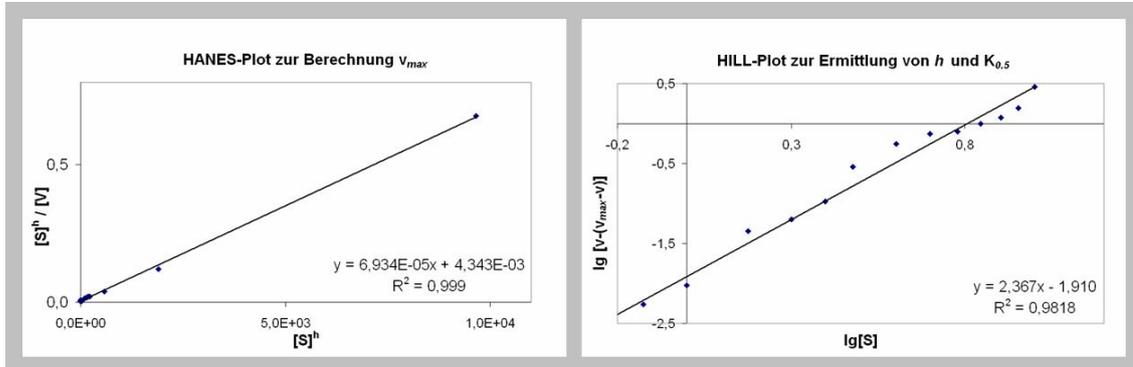


Abbildung C.48: Ermittlung katalytische Konstanten (2)

Die aus Abbildung C.47 ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  beträgt 14421,69 pKat. Durch Einsetzung in die HILL-Darstellung wird Abbildung C.48 erhalten. Die so ermittelten Werte  $h = 2,3696$  und  $K_{0,5} = 6,39$  mM ergeben durch einsetzen in die HILL-Gleichung die Kurve in Abbildung C.49. Zum Vergleich sind die gemessenen Werte in Form von Punkten mit Standardabweichung angegeben.

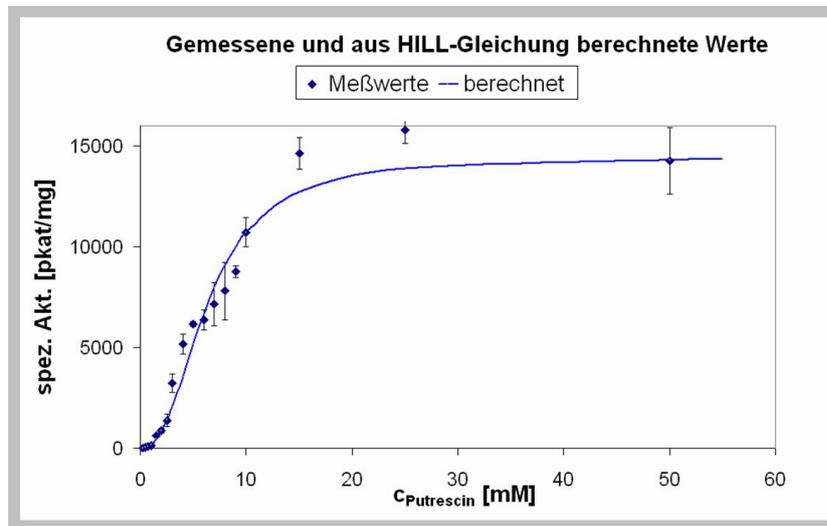


Abbildung C.49: Ermittlung katalytische Konstanten (3)

$$\text{HILL-Gleichung: } V = \frac{V_{max} \cdot [S]^h}{K_{0.5}^h + [S]^h} \quad \text{mit } h = 2,37 \quad \text{und } K_{0.5} = 6,39 \text{ mM}$$

In einem weiteren Versuch wurde die Kurve bei 10 mM Putrescin im Bereich 5 bis 750  $\mu\text{M}$  SAM präzisiert. Abbildung C.50 zeigt die Konzentrations-Aktivitäts-Kurve über den gesamten Konzentrationsbereich.

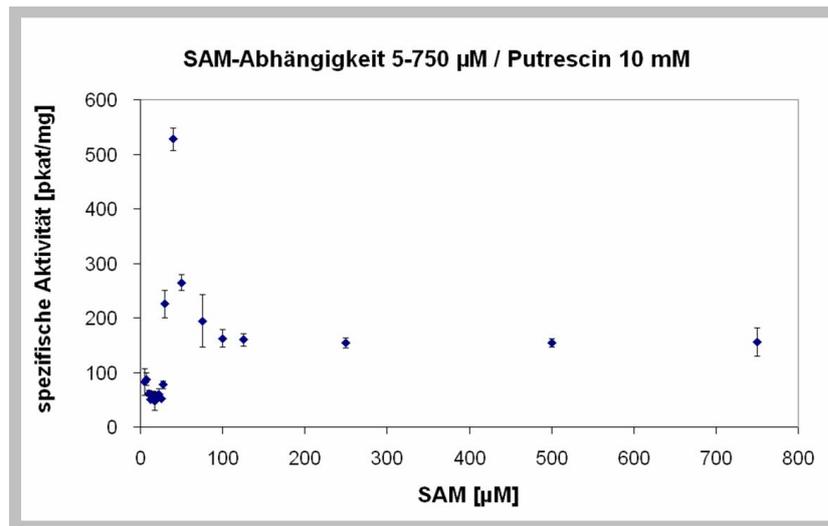


Abbildung C.50: SAM-Abhängigkeit der MP-Bildung

Es ergibt sich ein deutliches Maximum bei 50 µM SAM, das zuvor beobachtete zweite Maximum zwischen 125 und 500 µM tritt nicht auf. Dies könnte an der Auswahl der SAM-Konzentrationen für die Meßreihe gelegen haben. Auffällig ist die um das mehr als Zehnfache niedrigere spezifische Aktivität im Vergleich zum vorherigen Versuch. Dies spiegelt die Empfindlichkeit des Proteins wider. Lagerungsbedingt traten starke Aktivitätsschwankungen auf. Das Protein erwies sich als sehr empfindlich gegenüber Temperatureinflüssen: durch Einfrieren ging jegliche Aktivität verloren und während der Lagerung bei 4°C nahm die Aktivität deutlich ab. Auch Assays, die bei -20°C gelagert wurden, waren temperaturempfindlich. Zweimal aufgetaute Assays lieferten deutlich niedrigere Werte.

### C4.3.3 Reaktion mit Putrescin und dcSAM - die Bildung von MP

Die Bildung von MP wurde im Bereich 0,25–50 mM Putrescin bei 2,5 mM dcSAM untersucht. Abbildung C.51 zeigt die Konzentrations-Geschwindigkeitskurve, die in diesem Fall die Form einer Hyperbel einnimmt. Aus der Auftragung nach HANES wurde die Maximalgeschwindigkeit mit 130,21 pkat/mg und der Km Wert für Putrescin bei 4,19 mM ermittelt.

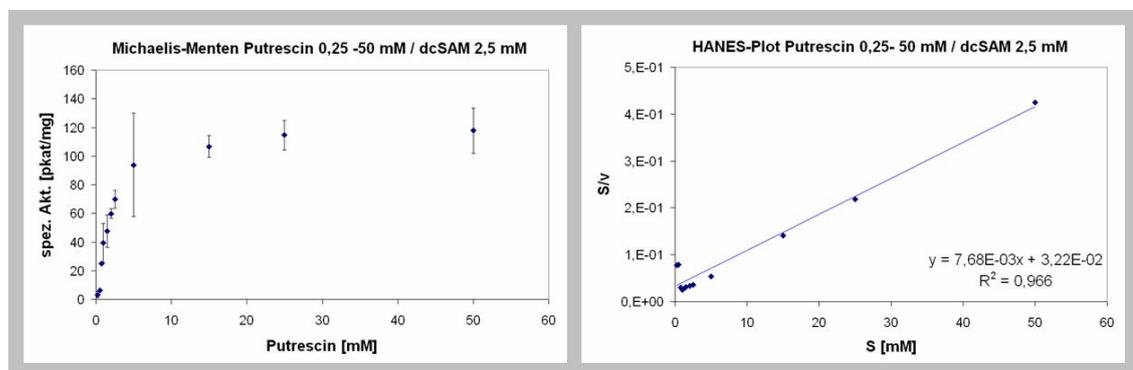


Abbildung C.51: Putrescin-Abhängigkeit MP-Bildung mit dcSAM

**C4.3.4 Reaktion mit Putrescin und dcSAM - die Bildung von Spermidin/Spermin**

Die Bildung von Spermidin/Spermin wurde im Bereich 0,5–10 mM dcSAM bei 10 mM Putrescin untersucht. Dabei schwankten die Meßwerte so stark, daß letztendlich keine Auswertung möglich war. Die Meßwerte befinden sich in Anhang F4.1. Weitergehende Untersuchungen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da nur eine begrenzte Menge dcSAM zur Verfügung stand.

**C4.3.5 Versuch Hemmung der PMT-Reaktion durch SAH**

Der Zusatz von SAH führte ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität (F.25). Die Meßwerte sind im Anhang aufgeführt. Für die Bestimmung von  $k_I$  hätten geringere SAH-Konzentrationen eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit war das zeitlich nicht mehr möglich.

**C4.3.6 Versuch bevorzugtes Cosubstrat**

In diesem Versuch wurden die Cosubstrate SAM und dcSAM einzeln und als Mischung in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt. Es wurde kein Spermidin gebildet. Wegen der wechselnden Aktivität des Enzyms kann das Ausbleiben von Spermidinbildung hierbei nicht eindeutig als eine Bevorzugung von SAM als Cosubstrat gedeutet werden.

# D Diskussion

## D1 Calystegin-Screening

Im Rahmen der Suche nach Calysteginen im Pflanzenreich wurde zunächst die Familie der Moraceae untersucht. Hier sind bereits Calystegine in der Wurzelrinde von *Morus alba* L. nachgewiesen worden (Asano 1994a). Auch *Morus bombycis* enthielt Calystegine (Asano 1994b). Die Familie umfasst etwa 1100 Arten, davon wurden hier 43 auf Calystegine untersucht. Lediglich 4 der untersuchten Spezies enthielten Calystegine: die drei Morus-Spezies *Morus alba*, *Morus nigra* und *Morus alba* var. *tartarica* sowie *Ficus carica*. Keine andere *Ficus*-Spezies enthielt Calystegine. In Moraceae dominiert vor allem Calystegin B2, weiterhin wurden A3 und B3 gefunden. Eine Abhängigkeit von Gewebe, Entwicklungszustand, Jahreszeit und Klima wurde in diesem Rahmen nicht untersucht.

Die Strategie zur Suche nach Calysteginen folgte den Berichten über Tropanalkaloide in verschiedenen Familien. Daher wurde darauffolgend die Familie Erythroxylaceae untersucht, für *Erythroxylum coca* war hier das Vorkommen von Cocain bekannt (Plowman 1983). Auch andere Alkaloide mit Tropanstruktur wurden in der Familie gefunden, diese haben nicht das Ecgonin-Grundgerüst, sondern stammen von den stereoisomeren Tropanolen oder 3,6-Tropandiolen ab, auch Nortropane kommen vor (Lounasmaa 1993, Griffin 2000, Zuanazzi 2001, Bringmann 2000, Mi 2002, Zanolari 2003).

Es handelt sich in der Regel um 3 $\alpha$ - und 3 $\beta$ -Hydroxytropane, die mit verschiedenen Säuren verestert sind. Für *E. amazonicum* (Salama 1994), *E. argentinum* (Zuanazzi 2001), *E. campestre* (Aynilian 1974), *E. havanense* (Dominicis 1991), *E. macrocarpum* (Al-Said 1986), und *E. pulchrum* (Aynilian 1974) sind bereits Alkaloide mit Tropangerüst beschrieben. Bei Calysteginen trägt das Brückenkohlenstoffatom (C1) eine Hydroxylgruppe. Ähnliche 1-Hydroxytropanalkaloide wurden in *Erythroxylum* Arten gefunden (Moore 1993, Lounasmaa 1993), auch *N*-Demethyltropanstrukturen wurden beschrieben (Christen 1995, Zuanazzi 2001, Khattak 2003).

Die zur Verfügung stehenden Herbariumspalten wurden mit Hilfe einer abgewandelten Analyse-methode untersucht. Von 45 untersuchten Spezies waren 38 calysteginhaltig. Wie bei Solanaceae ist auch hier Calystegin B2 das Hauptcalystegin, das Muster der Calysteginverteilung ist jedoch unterschiedlich. Die meisten der untersuchten Erythroxylaceae enthielten mindestens ein Calystegin. Neun Spezies enthielten keine Calystegine, beziehungsweise nicht quantifizierbare Spuren. Dies ist für die Mehrheit der *Erythroxylum*-Spezies der erste Bericht über Alkaloide, die meisten sind zuvor noch nie untersucht worden.

Bei der Bewertung der Calystegingehalte muss das Alter der Herbariumsproben in Betracht gezogen werden. Inwiefern Calystegine bei trockener Lagerung in einem Zeitraum von über 20 Jahren degradieren, ist nicht untersucht. Daher sollten die Daten als Minimumgehalte betrachtet werden. Frische *E. novogranatense* Proben enthielten nicht mehr Calystegine als Herbariumsproben, dies deutet darauf hin, dass Calystegine sehr stabil sind. In jeder Einzelprobe wurden Calystegine durch GCMS sicher identifiziert und per GC-FID quantifiziert. Abweichende Fragmentierungsmuster führten immer zum Ausschluss von Calysteginen.

Die Untersuchungen von Leete zeigten zunächst, dass die Biosynthese des Cocains andere Schritte zur Formierung des Tropangerüsts beinhaltet als bei Solanaceae-Tropanalkaloiden (Leete 1982, Leete 1988, Leete 1991). Später wurde vorgeschlagen, dass die Biosynthesen von Cocain und Hyoscyamin analog ablaufen (Abraham 1995). Die ersten spezifischen Schritte der Alkaloidbiosynthese (*N*-Methylputrescin; Pyrroliniumkation) für Nicotin, Cocain und Calystegine könnten den Solanaceae und Erythroxylaceae gemeinsam sein (El-Imam 1988, Christen 1993, Brachet 1997). Eine Charakterisierung der beteiligten Gene und Enzyme wäre der nächste Schritt, um dem evolutionären Ursprung, beziehungsweise der Entwicklung der Tropanalkaloidbiosynthese in verschiedenen Familien auf die Spur zu kommen.

Alkaloide sind für Kreuzblütler eher untypische Sekundärstoffe, bisher sind Indolalkaloide wie Camalexin in *Arabidopsis thaliana* (Glawischnig 2004) oder Indigo in *Isatis tinctoria* (Oberthür 2004) sowie Lunarin, ein Oxidationsprodukt von Dicumaroylspermidin, in *Lunaria* Spezies (Sagner 1998) beschrieben.

Ausgehend vom Bericht der russischen Autoren Platonova und Kuzovkov (1963) über den *m*-Hydroxybenzoesäureester des Tropins (Cochlearin) in *Cochlearia arctica* SCHLECHTD (heute: *C. groenlandica*) wurde zunächst in *Cochlearia officinalis* L. nach Calysteginen gesucht. Cochlearin ist auch in *Cochlearia officinalis* L. identifiziert worden (Liebisch 1973). In beiden Pflanzen macht Cochlearin maximal 0,05% der Trockenmasse aus.

In der Folge wurden zunächst andere *Cochlearia*-Spezies und anschließend weitere Brassicaceae untersucht. Die Auswahl der Pflanzen erfolgte entlang den hauptsächlichen Entwicklungslinien der Familie (Koch 2007). Insgesamt wurde weniger als ein Prozent der bekannten Brassicaceae-Arten untersucht. Mehr als die Hälfte der untersuchten Brassicaceae enthielt Calystegine. Das Vorkommen von Tropanolen und Tropanestern wie Cochlearin war jedoch auf *Cochlearia*-Spezies beschränkt. Im Gegensatz zu den anderen bisher untersuchten Familien dominieren in Brassicaceae die Calystegine der A-Gruppe. Am häufigsten findet sich Calystegin A5, gefolgt von A3 und B2. Die Calystegingehalte waren durchschnittlich höher als bei Solanaceae-Blättern (Dräger 2004), der besonders hohe Gehalt in Blüten erreicht etwa das gleiche Niveau wie in Blüten von *Solanum tuberosum* (Keiner 2000).

Der Genus *Aethionema* findet sich an der Basis der Entwicklungsgeschichte der Brassicaceae (Koch 2003). Dass hier Calystegine gefunden wurden, weist auf eine frühe Entwicklung der Tro-

panalkaloidbiosynthese in der Familie hin. Das Verständnis über taxonomische Beziehungen und Phylogenie ist bei Brassicaceae am weitesten fortgeschritten. Dies liegt sicher daran, dass es sich bei *Arabidopsis thaliana* L. um eine Brassicaceae und eine Modellpflanze handelt. Daher sind Brassicaceae geeignete Kandidaten für die Untersuchung molekularer Evolution. Die Entwicklungsgeschichte der Glucosinolate in *Arabidopsis thaliana* L. ist bereits Gegenstand von Untersuchungen gewesen (Windsor 2005, Kroymann 2005, Benderoth 2006).

In Abbildung D.1 sind die Verhältnisse dargestellt: der Kreis repräsentiert jeweils die Zahl der Arten, die in einer Familie bekannt sind, der gelbe Ausschnitt steht für die Arten, die untersucht wurden, aber keine Calystegine enthielten. Der rote Ausschnitt repräsentiert die calysteginpositiven Arten. So ist die relativ kleine Familie der Erythroxylaceae zu etwa 20% untersucht, während man in den beiden anderen Familien lediglich von Stichprobenuntersuchungen sprechen kann.

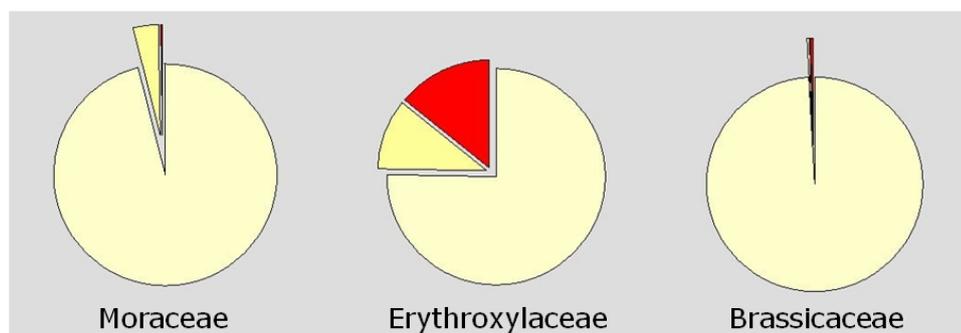


Abbildung D.1: Anteil der calysteginhaltigen Spezies

In Convolvulaceae kommen Calystegine häufig vor, sie finden sich in allen Pflanzenorganen. Sie wurden in 62 von 129 Spezies aus 22 der 29 bekannten Genera gefunden. Tropinon bzw. Pseudotropin und Calystegine fanden sich gemeinsam bei 96%, nur in zwei Spezies konnten Calystegine, aber keine Tropane gefunden werden. Im Gegenzug enthielten von den untersuchten Spezies 40 keine Calystegine, aber Tropane (Schimming 2005). Das häufigste Calystegin in Convolvulaceae ist B2, gefolgt von B1, A3 und C1.

In der Schwesterfamilie Solanaceae sind bisher lediglich 38 Spezies (von ca. 2460) auf Calystegine geprüft worden. Man wurde in 32 Spezies fündig, eine Übersicht findet sich bei Dräger (Dräger 2004). Auch in Solanaceae ist Calystegin B2 dominierend (Dräger 1995, Keiner 2000). Bei der Betrachtung der Systematik der Angiospermen (Abbildung D.2) erkennt man, dass sich die bisherigen Calysteginfunde auf die Ordnung Solanales konzentrieren.

Während die Convolvulaceae systematisch untersucht worden sind, handelt es sich bei den Calysteginfunden in Solanaceae um Einzelfunde, die vorwiegend in tropanalkaloidhaltigen Pflanzen gemacht wurden.

In Abbildung D.2 ist am phylogenetischen Baum der Angiospermen die Position der calysteginpositiven Pflanzenfamilien gekennzeichnet.



Abbildung D.2: Systematik der Angiospermen; Familien mit Calysteginen

Mit dem Nachweis von Calysteginen in Moraceae, Erythroxyllaceae und Brassicaceae erweitert sich der Bereich der Verbreitung und umfasst nun auch die Rosiden. Insgesamt muss konstatiert werden, dass alle bisherigen Bemühungen nur einen kleinen Bruchteil des Pflanzenreiches erfasst haben. Eine Aussage darüber, ob Calystegine ubiquitäre Pflanzenstoffe sind, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich.

## D2 Tropinonreduktasen

### D2.1 Katalytische Eigenschaften der Tropinonreduktase

Tropinonreduktasen wurden bereits in *Hyoscyamus niger* (Dräger 1988), *Datura stramonium* (Koelen 1982, Portsteffen 1994), *Atropa belladonna* (Dräger 1994), *Brugmansia candida x aurea* (Boswell 1999a), *Solanum tuberosum* (Keiner 2002) und *Calystegia sepium* (Sichhart 2003) charakterisiert. Für die heterolog exprimierte Tropinonreduktase aus *Cochlearia officinalis* L. und die SDR aus *Arabidopsis thaliana* L. wurden das pH-Optimum, die Substratspezifität (durch Test auf Akzeptanz von Substratanaloga) und die katalytischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  für eine Auswahl von Substratanaloga bestimmt (Tabelle D.1).

Tabelle D.1: Übersicht  $K_m$ -Werte [mM]

SUBSTRAT	Ds TRI	HN TRI	Cs TRI	CoTR	Cs TRII	Ds TRII	HN TRII	AB TRII	ST TRII
Tropinon	1,3	1,01	0,07	3,3	5,88	0,03	0,034	0,090	0,033
NMP	1,4	0,23	n.b.	7,6	n.b.	20	0,77	0,65	n.b.
NPP	n.m.	n.m.	n.b.	1,3	n.b.	n.m.	0,26	n.b.	n.b.
4MC	0,03	0,012	n.b.	0,015	n.b.	2,8	2,03	n.b.	n.b.
3MC	n.b.	0,041	n.b.	0,013	n.b.	n.b.	7,58	n.b.	n.b.
CHI	2,2	1,81	n.b.	2,6	n.b.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
TBON	0,03	0,033	n.b.	0,042	n.b.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
NTR	3,0	n.b.	n.b.	2,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,025
Referenz	Po1994, Ko1982	Ha1992	Sc2001		Sc2001	Po1994	Ha1992	DS1994	Ke2002

Legende	ABKÜRZUNG	SPEZIES	REFERENZ	LITERATUR
	AB	<i>Atropa belladonna</i>	DS1994	(Dräger & Schaal 1994)
	Co	<i>Cochlearia officinalis</i> L.	Ha1992	(Hashimoto 1992)
	Cs	<i>Calystegia sepium</i> L.	Ke2002	(Keiner 2002)
	Ds	<i>Datura stramonium</i>	Ko1982	(Koelen 1982)
	HN	<i>Hyoscyamus niger</i>	Po1994	(Portsteffen 1994)
	ST	<i>Solanum tuberosum</i>	Sc2001	(Scholl 2001)
	ABKÜRZUNG	SUBSTRAT	ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
	NMP	<i>N</i> -Methylpiperidin-4-on	n.b.	nicht bestimmt
	NPP	<i>N</i> -Propylpiperidin-4-on	n.m.	nicht messbar
	4MC	4-Methylcyclohexanon		
	3MC	3-Methylcyclohexanon		
	CHI	Chinuclidinon		
	NTR	Nortropinon		
	TBON	8-Thiabicyclo [3.2.1] octan-3-on		

Die CoTR weist ein breites pH-Optimum bei pH 6,5 bis 8,5 auf, was typisch für die bereits bekannten TRII ist. Über den gesamten pH-Bereich reduziert das Enzym Tropinon zu beiden Tropanolen, ein Einfluß des pH-Wertes auf die Stereospezifität konnte nicht festgestellt werden. Die Oxidation von Tropin wurde bereits bei den TRI von *Datura stramonium* und *Hyoscyamus niger* beobachtet (Hashimoto 1992, Portsteffen 1994), eine Oxidation von Pseudotropin wurde für die TRII von *Hyoscyamus niger* beschrieben (Hashimoto 1992), die Aktivität betrug dort ca. 1% der Aktivität der Reduktionsreaktion. Der  $K_m$ -Wert für Tropinon wurde bei pH 6,4 bestimmt und lag mit 3,3 mM deutlich über den Werten für Solanaceae TR (Vergleich siehe Tabelle D.1) jedoch unter dem für die TRI von *Calystegia sepium*. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Ladung

des Substrates Tropinon bei pH 6,4. Auch für die TRI von *Datura stramonium* liegt der Km-Wert bei diesem pH im millimolaren Bereich, sinkt jedoch bei pH 7,6 auf 100  $\mu\text{M}$  (Portsteffen 1994).

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  reicht ebenfalls an die der Solanaceae-TR nicht heran (pkat vs. nkat). Ob die heterologe Expression mit C-terminalem His-tag zu einer Veränderung im kinetischen Verhalten im Vergleich zum nativen Protein führen kann, ist nicht sicher belegt. Moleküldynamische Simulationen am Modell der *Solanum dulcamara* TRII zeigten keine Behinderung des Zuganges zum aktiven Zentrum durch den frei beweglichen C-Terminus (A.C. Meier, Uni Halle).

Auch für andere SDR sind Km-Werte im mM-Bereich bekannt, so liegt z.B. der Km-Wert der D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase für ihr Substrat bei 1,5 mM (Feller 2006).

Die COTR akzeptierte alle angebotenen Substratanaloga. Die höchste spezifische Aktivität wurde mit den Cyclohexanonen gemessen. Für alle ungeladenen Substrate (Cyclohexanone und TBON) wurden darüber hinaus Km-Werte im mikromolaren Bereich ermittelt, während geladene Substrate durchweg Km-Werte im millimolaren Bereich aufwiesen.

Der Eindruck von der Abhängigkeit der Aktivität vom Ladungszustand des Substrates wird durch die höhere spezifische Aktivität und den niedrigeren Km-Wert für *N*-Propylpiperidinon im Vergleich zu *N*-Methylpiperidinon verstärkt. Der gleiche Effekt wurde bei der TRI von *Calystegia sepium* beobachtet (Sichart 2003).

Interessant ist auch der Vergleich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten: für die nahezu planaren Substrate (Cyclohexanone und Piperidinone) liegen diese in einem Bereich von 20–47 nkat, die Substrate mit einer Brücke dagegen haben  $V_{max}$  zwischen 500 und 2000 pkat. Insgesamt resultieren daraus auch die höchsten  $k_{cat}$ -Werte für die Cyclohexanone und ein relativ niedriger  $k_{cat}$ -Wert für Tropinon (0,02  $\text{s}^{-1}$ ). Zwar ist diese katalytische Konstante ein Maß für die Effizienz des Umsatzes, jedoch schwanken die  $k_{cat}$ -Werte bekannter Enzyme von 600000  $\text{sec}^{-1}$  für Carboanhydrase bis 30  $\text{min}^{-1}$  für Lysozym. Hashimoto postuliert, dass die Solanaceae TR viel aktiver sind, als es für die Tropanalkaloidbiosynthese notwendig wäre (Hashimoto 1992). Letzendlich wird jeder einzelne Schritt der Biosynthese von Calysteginen durch eine Vielzahl von einzelnen Enzymen gelenkt und katalysiert, so dass der Wert einer langsamen TR in der Steuerung des Produktflusses liegen könnte. Die Wechselzahlen der vorgeschalteten Enzyme vom Typ PMT aus Solanaceae liegen in derselben Größenordnung (Teuber 2007) wie bei der COTR. Die Reduktion von Tropinon scheint nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Tropanalkaloidbiosynthese zu sein.

Die TR von *Cochlearia officinalis* L. vereint die typischen TRI-Eigenschaften wie Umsetzung von Chinuclidinon (Hashimoto 1992), stärkerer Umsatz von Cyclohexanonen und Oxidation von Tropin, mit typischen TRII-Eigenschaften wie Umsatz von Piperidinonen und einem breitem pH-Optimum. Zusammen mit der Fähigkeit zur Oxidation von Pseudotropin erweist sich die Tropinonreduktase von *Cochlearia officinalis* L. als funktionsfähige Tropinonreduktase, die dem bisherigen Klassifikationsschema (TRI und TRII) eine universelle TR hinzufügt.

Die *Datura stramonium* TRI reduzierte Tropinon bei saurem pH am schnellsten, jedoch mit dem

höchsten Km-Wert. Das könnte bedeuten, dass die Reaktion bei saurem pH bevorzugt stattfindet, das Substrat im aktiven Zentrum aber ungeladen besser fixiert ist. Dies stimmt überein mit der Beobachtung aus der röntgenkristallographischen Struktur der TRI, nach der die Orientierung des Tropinons durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt (Nakajima 1999b).

TBON wurde durch die *Datura stramonium* TRI langsamer reduziert, vermutlich wurde es durch das Fehlen der Ladung stärker gebunden. Bei der Reduktion entstanden beide möglichen Produkte  $\alpha/\beta$ -TBOL (8-thiabicylo[3.2.1]octan-3 $\alpha/\beta$ -ol) im Verhältnis 4:1, die Reduktion erfolgt beim Schwefelanalogen von Tropinon also weniger stereospezifisch (Portsteffen 1994). Bei der Reduktion von TBON durch die COTR entstanden ebenfalls beide Produkte. Da keines bevorzugt gebildet wurde, bedeutet das, dass die Orientierung der Substrate bei TBON und Tropinon analog abläuft.

In Bezug auf die Km-Werte für die Substratanaloga ist die COTR den TR aus *Datura stramonium* und *Hyoscyamus niger* sehr ähnlich. So liegen die Werte für die Cyclohexanone und TBON für die COTR und die TRI im  $\mu\text{M}$ -Bereich und die Km-Werte für die Piperidinone in etwa so wie die der TRII. Die übliche Praxis der Angabe relativer spezifischer Aktivitäten ermöglicht keinen direkten Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werten. Die TRI und TRII von *Datura stramonium* und *B. candida* setzten *in vitro* und *in vivo* N-Alkylnortropinonderivate um (Boswell 1999a, Boswell 1999b). Das unterstreicht die beträchtliche Flexibilität der SDR im Allgemeinen und TR im Speziellen in Bezug auf Substratanaloga.

Seit der Sequenzierung der Genome verschiedener Organismen wurde festgestellt, dass die Zahl der gefundenen Gene nicht mit der Vielzahl von gebildeten Metaboliten in Einklang zu bringen ist (Schwab 2003, Facchini 2004). Entgegen dem allgemeinen Dogma der Biochemie, dass ein Enzym für eine Reaktion oder ein Substrat spezifisch sein muss, werden immer häufiger Enzyme gefunden, die multifunktional sind (Firn 2003). Die Multifunktionalität von Enzymen kann unterschiedlich ausgeprägt sein. Sie können:

- mehr als ein Substrat akzeptieren (z.B. Hexokinase akzeptiert Glucose und Fructose; O-Methyltransferase aus *Thalictrum tuberosum* methyliert Catechine, Phenylpropane und Isochinolinalkaloide (Frick 1999))
- mehr als ein Produkt bilden (z.B. (+)-Bornyldiphosphatsynthase bildet 7 Produkte (Wink 1999))
- mehr als eine Reaktion katalysieren (z.B. GDP-Mannose-3',5'- Epimerase aus *Arabidopsis thaliana* reduziert, oxidiert und epimerisiert (Major 2005))

Auch die Akzeptanz von verschiedenen Cosubstraten ist beobachtet worden: ein Protein aus *Triphysaria versicolor* reduziert Chinone mit NADH und NADPH (Wrobel 2002).

Multifunktionalität ist nicht zwangsläufig auf das Vorhandensein mehrerer aktiver Zentren zurückzuführen, die o.g. GDP-Mannose-3',5'- Epimerase aus *Arabidopsis thaliana* führt alle Reaktionen im selben aktiven Zentrum aus. Ein Mangel an Stereospezifität bei der Reduktion von Tropinon durch die COTR nimmt sich in Anbetracht dessen eher als ein einfaches Beispiel für

Multifunktionalität aus.

Ein Sekundärstoffwechselprodukt muss nicht zwangsläufig durch eine hoch spezifische Reaktion entstehen, denn das verringerte die Wahrscheinlichkeit, während der Evolution überhaupt an einen nützlichen Metaboliten zu gelangen. Nicht selektive Enzyme sind die Voraussetzung für die Biosynthese einer Unzahl von Verbindungen, von denen nur die wenigen, die biologische Aktivität besitzen, selektiert werden (Firn 2003).

Die von Jones und Firn aufgestellte Screening Hypothese beruht auf dieser Annahme (Jones 1991) und findet in Form vieler multifunktionaler Enzyme argumentative Unterstützung.

Die 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus *Digitalis lanata* weist zum Beispiel neben einer breiten Substrattoleranz - sowohl 3 $\beta$ - als auch 17 $\beta$ -Aktivität - auch noch die Beteiligung an mehr als einem Punkt der Cardenolid-Biosynthese auf (Herl 2007). Eine Beteiligung von Enzymen an mehreren Reaktionen innerhalb eines Stoffwechselweges ist durch die Screening Hypothese ebenfalls postuliert worden.

Auch Enzyme wie die COTR, die mehr als ein Produkt bilden können, wurden von Jones und Fern vorweggenommen. Diese Enzyme gelten als kostengünstige Variante für die Erzeugung chemischer Diversität und in der Tat entstehen aus den zwei Produkten der COTR-Reaktion drei verschiedene Calysteginstrukturen sowie Cochlearin und 9 weitere Ester der Tropanole.

Für viele Verbindungen, so auch für Calystegine, fehlen Beweise für eine physiologische Funktion. Es wird daher angenommen, dass Organismen durch die Synthese einer Vielzahl von Verbindungen zu denen gelangen, die eine nützliche biologische Aktivität aufweisen (Firn 2003). Andere Autoren argumentieren hingegen, dass oft Funktionen nur noch nicht untersucht worden sind (Pichersky 2006). Die *High-Throughput-Screening*-Methoden der pharmazeutischen Industrie beruhen auf dem gleichen Prinzip.

## D2.2 Eigenschaften von Enzym und Modell

### D2.2.1 Cosubstratbindung

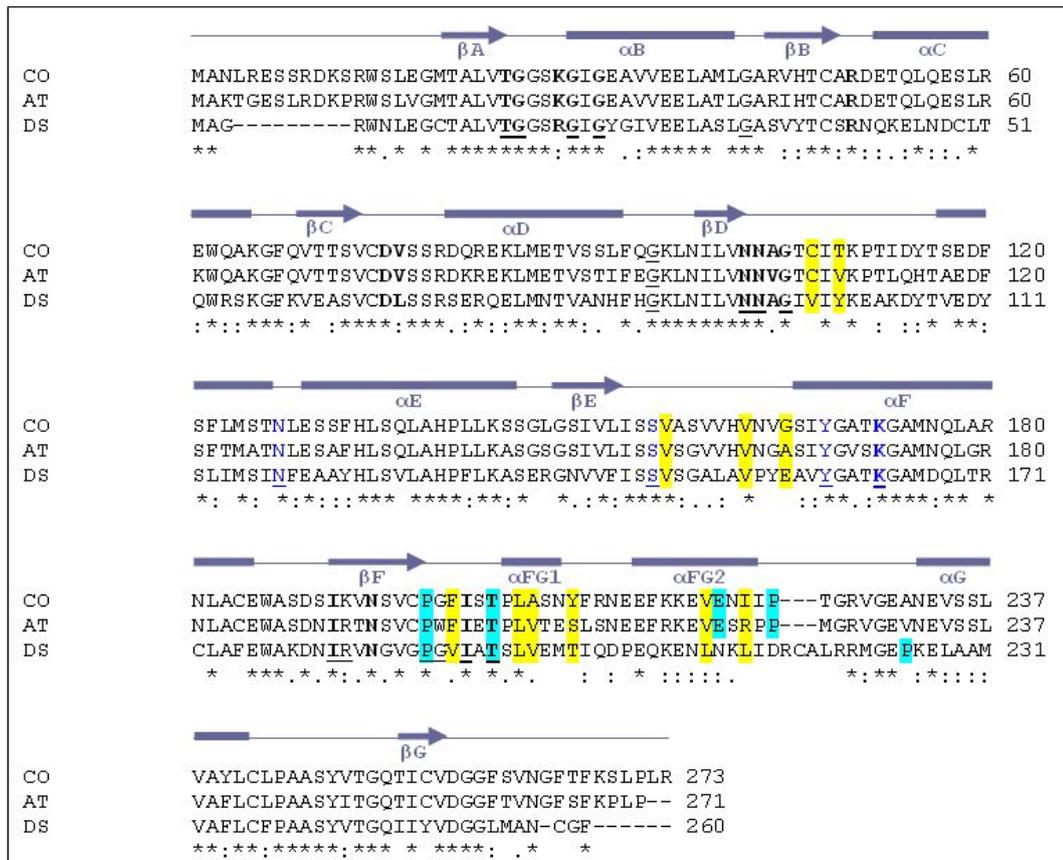


Abbildung D.3: Alignment der Sequenzen von COTR, ATSDR und *Datura stramonium* TRII

Legende	ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
	CO	Tropinonreduktase <i>Cochlearia officinalis</i> L.
	AT	<i>Arabidopsis thaliana</i> L. Gen At2G29360
	DS	TRII von <i>Datura stramonium</i> (auch <i>template</i> 1IPF)
	unterstrichen	As, die in SDR-Familie konserviert sind
	fett	As, die an der Cosubstratbindung beteiligt sind
	blau	As der katalytischen Tetrade
	gelb unterlegt	As, die an der Substratbindung beteiligt sind
	türkis unterlegt	As, die als Scharniere und Stabilisatoren des <i>substrate-binding</i> Loops fungieren könnten
	Sekundärstruktur	Pfeil = β-Faltblatt Balken = α-Helix

**Zur Erläuterung:** die im Text genannten Aminosäuren tragen die Nummerierung der *Datura stramonium* TRII und der COTR, z.B. Arg19/Lys28

Die Cosubstratspezifität der SDR wurde bereits von einigen Autoren untersucht. Das Vorhandensein einer oder zweier N-terminaler basischer Aminosäuren (**Arg19/Lys28** und **Arg41/50**) ist ausschlaggebend für die Bevorzugung von NADP(H) als Cosubstrat (Tanaka 2001, Nakanishi 1996). Durch starke elektrostatische Anziehung der negativ geladenen 2'-Phosphatgruppe wird das NADP(H) fixiert. In NAD(H)-bevorzugenden Enzymen findet sich an dieser Position ein Asparagin dessen negative Ladung eine elektrostatische Abstoßung von der negativ geladenen 2'-Phosphatgruppe des NADPH bewirkt, stattdessen wird eine zweifache Wasserstoffbrücke zu den 2'- und 3'-Hydroxylgruppen des Adeninriboseteils von NAD(H) ausgebildet. Insgesamt ist bei pflanzlichen SDR NADP(H)-Bindung häufiger als NAD(H)-Bindung (Kallberg 2006). Tanaka und Mitarbeiter beschreiben, wie das Coenzym gebunden wird: die Adenin- und Nicotinamidringe des NADPH sind senkrecht zu den Flächen der entsprechenden Ribosereste orientiert (Tanaka 2001).

So entsteht eine *anti*-Konformation für den Adeninring und eine *syn*-Konformation für den Nicotinamidring. Die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxyamidgruppe und dem Pyrophosphatteil stabilisiert die glycosidische Bindung in *syn*-Konformation (Shi 2006). Die A-Seite des Nicotinamidringes zeigt so zum Protein, die B-Seite zum aktiven Zentrum, so wird stereochemisch der B-face 4-*pro*-S Hydrid Transfer ermöglicht.

Der Nicotinamidteil von NADPH liegt im aktiven Zentrum, die Seitenkette von **Lys163/172** stabilisiert den Nucleosidteil des gebundenen NADPH durch eine doppelte Wasserstoffbrücke zu den beiden (2'- und 3'-) Hydroxylgruppen der Nicotinamidribose (gemessener Abstand COTR: 3,11 Å und 3,14 Å) (Abbildung D.4).

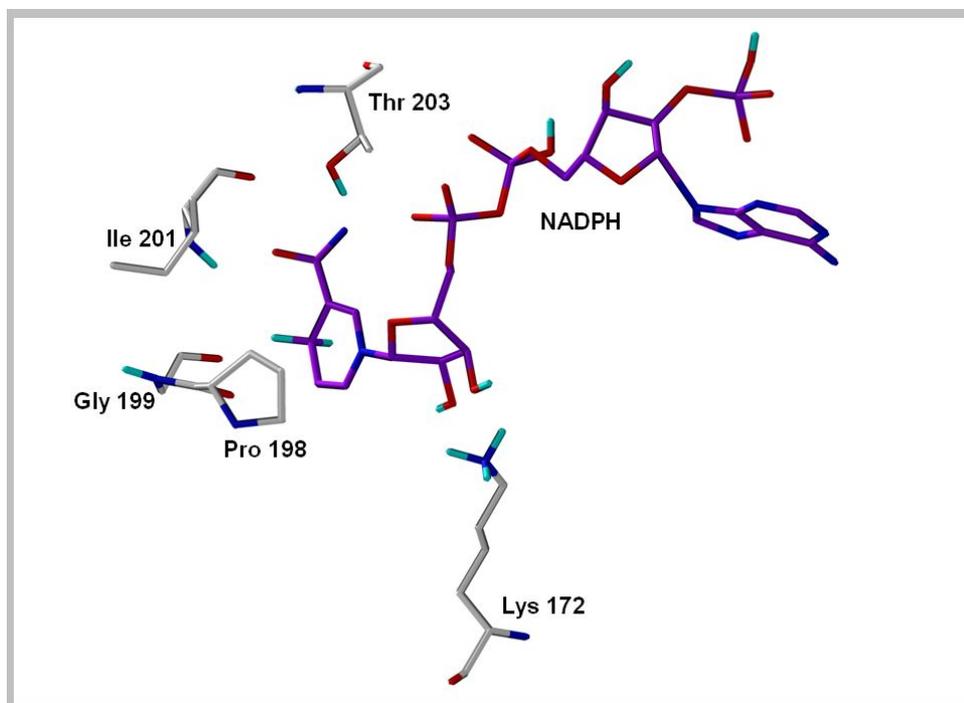


Abbildung D.4: Ausschnitt aus dem COTR-Modell; Aminosäuren, die an der Bindung von NADPH beteiligt sind (1)

Der Pyrophosphatteil von NADPH befindet sich in dem Turn zwischen  $\beta A$  und  $\alpha B$ , dieser Turn

hat die Consensus-Sequenz **GxxxGxG**. Die Mutagenese des ersten Glycins in der Alkoholdehydrogenase von *Drosophila* führte zu totalem Aktivitätsverlust (Chen 1990). Die Nicotinamidgruppe ist mit der Enzymoberfläche durch eine Wasserstoffbrücke (COTR gemessen: 2,75 Å) zwischen dem Carboxyamid des Coenzym und dem Stickstoffatom von **Ile192/201** verbunden (Hashimoto 1992). Polare Interaktionen bestehen dort auch mit der Seitenkette von **Thr194/203** (Yamashita 1999). Dieses Threonin ist ebenfalls konserviert in der SDR Familie (Abbildung D.4). Die Carboxyamidgruppe spielt eine wichtige Rolle bei der Orientierung des Nicotinamidringes hin zu den katalytischen Aminosäuren, die beschriebene Interaktion mit den Hauptkettenatomen von **Ile192/201** findet sich bei 29 von 33 Röntgenkristallstrukturen von SDR. Während diese Interaktion selbst ein gemeinsames Merkmal für SDR darstellt, ist die Art der Aminosäure an dieser Stelle nicht konserviert (Shi 2006).

Vier Aminosäuren vor diesem Threonin befindet sich das konservierte **ProGly**-Motiv (Jörnvall 1995), welches über seine Carbonylgruppen mit dem Cosubstrat interagiert.

Filling und Mitarbeiter fanden an der Position Alanin88 der bakteriellen  $3\beta/17\beta$ -HSD hydrophobe Kontakte zum Adeninring, dessen Mutation zur Serin zu signifikanten Veränderungen der Aktivität führte (Filling 2002). An dieser Position sind in SDR 'kleine' Aminosäuren (Alanin, Valin) konserviert, diese finden sich im Alignment an **Ala95/Ala104**. Der Adeninring ist in einer hydrophoben Bindungstasche positioniert. Die  $C\gamma$ - $C\delta$ - $C\zeta$  Bindungen von **Arg41/50** liegen parallel zum Adeninring und haben so hydrophoben Kontakt, genauso wie die Seitenketten von **Ala94/104** sowie **Leu67/Val76**.

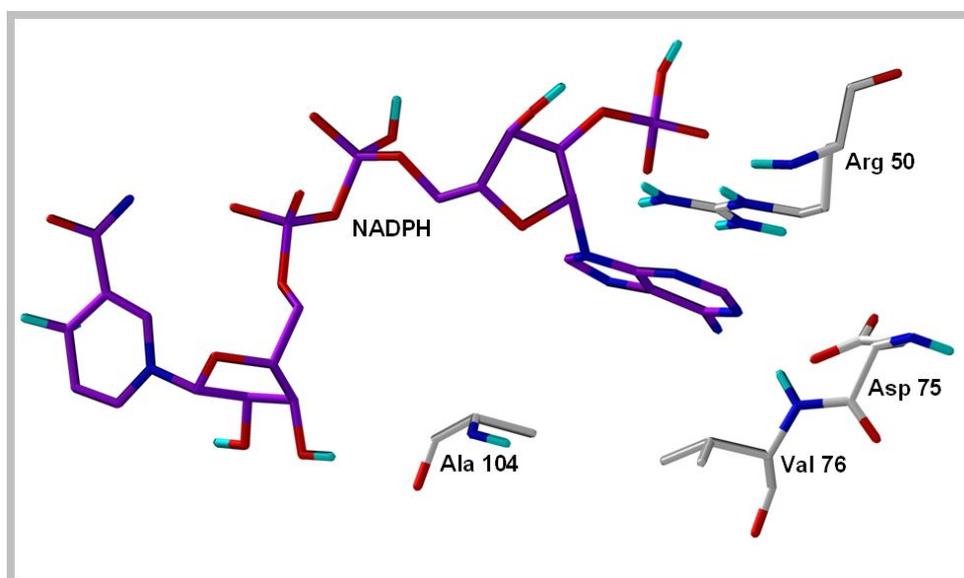


Abbildung D.5: Ausschnitt aus dem COTR-Modell; Aminosäuren, die an der Bindung von NADPH beteiligt sind (2)

Die Adeninbindungstasche wird außerdem durch **Asp66/75** im Loop zwischen  $\beta$ C und  $\alpha$ D stabilisiert (Kallberg 2002). Die Carboxylseitenkette von **Asp66/75** befindet sich bei der bakteriellen  $3\beta/17\beta$ -HSD in schwacher *H*-Bindungsdistanz zum Adeninring (ca. 4 Å) (Filling 2002), in COTR wurde dieser Abstand mit 2,52 Å gemessen, eine Feineinstellung der **Asp75** Seitenkette hätte noch vorgenommen werden können, erschien aber im Rahmen der Modellierung als nicht entscheidend

für die zu untersuchende Substratbindung.

Filling und Mitarbeiter beschreiben weiterhin die Aminosäuren korrespondierend zu Thr15/24 - Asn93/102 - Asn94/103 als essentiell für die Strangorientierung im zentralen  $\beta$ -Faltblatt und die Positionierung des Coenzym (Filling 2002). Auch diese Positionen sind innerhalb der SDR konserviert und finden sich ebenso bei den hier untersuchten Enzymen.

Anhand der Sequenz muss die COTR als NADPH-bevorzugend eingestuft werden, die experimentell erhaltenen Ergebnisse - Cyclohexanone wurden unter Verbrauch von NADH deutlich schneller umgesetzt - bestätigten dies nicht.

In der Röntgenkristallstruktur der humanen östrogenbildenden 17 $\beta$ -HSD1 wurde gefunden, dass sich die Seitenkette eines der beiden Argininreste, die für die Bindung der 2'-Phosphatgruppen notwendig sind, zur Proteinoberfläche hin bewegte und damit nicht mehr zur Bindung des Co-substrates zur Verfügung stand (Shi 2006). Eine Veränderung der Arginin-Seitenkette dieser Art würde die Bindungsfähigkeit für NADH verbessern und ist eine denkbare Ursache für den Umsatz von NADH durch die COTR. Es besteht darüberhinaus die Möglichkeit, dass der Umsatz von NADH schneller geschieht, da das Cosubstrat weniger stark an das Enzym gebunden wird.

### D2.2.2 Substratspezifität

Die Kristallstrukturen der binären und ternären Komplexe von SDR zeigen, dass die Topologie der Substratbindestelle an eine Spalte erinnert, die aus mehreren Teilen besteht: der große substratbindende Loop (bestehend aus  $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2) und das C-terminale Segment bilden eine Seite der Spalte; die gegenüberliegende Seite wird von zwei kleinen Loops aus  $\beta$ D $\rightarrow\alpha$ E,  $\beta$ E $\rightarrow\alpha$ F und den N-terminalen Regionen von  $\alpha$ E und  $\alpha$ F gebildet (Tanaka 2001). NADP(H) befindet sich auf dem Boden der Spalte. Generell ist die Geometrie der 'Ser-Tyr-Lys Triade' in der SDR Familie konserviert, während die Konformation der Aminosäuren sowie die Länge der einzelnen Polypeptidabschnitte in den kurzen Helices ( $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2) im C-terminalen Abschnitt sehr variabel sind. Damit wird die Unterbringung verschiedener Substrate im aktiven Zentrum ermöglicht.

SDR verwenden verschiedene Mechanismen zur Substratbindung: In der D-3-Hydroxybutyratdehydrogenase von *Pseudomonas putida* stehen insgesamt 4 konservierte, geladene Aminosäuren durch Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxylatgruppe des Substrates in Kontakt und halten dieses in Position (Feller 2006).

Die D-Aldohexosedehydrogenase von *Thermoplasma acidophilum* benötigt das Zusammenspiel von hydrophoben Aminosäuren und einem Glutamat. Dessen Seitenkettenkonformation ist verantwortlich für die Erkennung der axialen C2-Hydroxylgruppe von D-Mannose (Yasutake 2007). Dieses konservierte Glutamat ist in der Glucosedehydrogenase von *Bacillus megaterium* ebenfalls vorhanden, jedoch nimmt die Seitenkette (durch einen veränderten  $\chi$ -Winkel) eine andere Position ein und erkennt hier die äquatoriale C2-Hydroxylgruppe der Glucose (Yamamoto 2001). Die D-Aldohexosedehydrogenase von *Thermoplasma acidophilum* akzeptiert zwar auch D-Glucose und diverse andere Monosaccharide als Substrat, setzt diese aber deutlich geringer um als D-Mannose (Yasutake 2007). Die Autoren fanden anstelle eines *substrate-induced fit* Mechanismus eine geschlossene Struktur, bei der Zutritt des Substrates und Austritt des Reaktionsproduktes

durch die Mobilität des C-Terminus beschränkt sind.

Geissler und Mitarbeiter beschreiben die Substratbindung bei der Salutaridinhydrogenase von *Papaver bracteatum*: das Substrat wird vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Leucin, Isoleucin oder Methionin mit den aromatischen Ringsystemen und den Methyl-/Methoxygruppen gebunden. Weiterhin werden Wasserstoffbrücken zwischen dem Substrat und den Seitenketten von Asparagin bzw. Threonin ausgebildet. Das Substrat kann durch die eng angepasste hydrophobe Bindungstasche nur in einer Orientierung gebunden werden, so kommt die Stereospezifität der Reaktion zustande. Durch die vier zusätzlich vorhandenen Helices, deren Aminosäuren indirekten Einfluß auf die hydrophoben Interaktionen von Salutaridin und den Aminosäuren aus  $\alpha$ D und  $\alpha$ E ausüben, ist jedoch der Vergleich mit anderen SDR, insbesondere TR, schwierig (Geissler 2007).

NADP(H)-abhängige Reaktionen erfolgen oft auch nach einem sequentiellen Mechanismus, bei dem das Coenzym zuerst gebunden wird und die Konformation des Enzyms sich durch die Bindung des Liganden ändert (Tanaka 2001). Diese substratinduzierten Konformationsänderungen finden an der Substratbindestelle statt, zwischen  $\beta$ F,  $\alpha$ G und dem C-terminalen Segment, in dem sich mehrere Aminosäuren befinden, die mit dem Substrat/Reaktionsprodukt interagieren. Bei der kristallisierten TRII ist die Substratbindestelle im Apoenzym und dem NADPH-bindenden Binärkomplex strukturell ungeordnet, das aktive Zentrum faltet sich jedoch bei der Interaktion mit dem Substrat (Yamashita 1999).

Röntgenkristallstrukturanalysen zeigen, dass die großen strukturellen Veränderungen durch eine Bewegung des gesamten Loops als solchen entstehen. Im Fall der  $7\alpha$ -HSD fungieren die Aminosäuren Thr194 and Gln211 der Hauptkette als Scharniere. Diese Scharniere werden durch Prolinreste 5 Aminosäuren *upstream* bzw. 3 Aminosäuren *downstream* von den genannten Aminosäuren stabilisiert, so dass sich die Bewegung des Loops nicht auf angrenzende Bereiche übertragen kann (Tanaka 2001).

Die erwähnten Prolinreste sind innerhalb der SDR-Familie konserviert und im Alignment (Abbildung D.3) türkis hinterlegt. In den während dieser Arbeit charakterisierten Enzymen sind sowohl die Prolinreste als auch die für die  $7\alpha$ -HSD beschriebenen Scharnier-Aminosäuren vorhanden (Alignment COTR: Pro198-Thr203-Gln220-Pro224). Ein ähnlicher *substrate-induced fit* Mechanismus ist denkbar.

Es ist nicht sicher, welche Aminosäuren die Bewegung auslösen könnten. Vermutlich ist eine Vielzahl von Aminosäuren am *substrate-induced fit* Mechanismus beteiligt, so daß einfache oder doppelte Mutationen nicht ausreichen, um diesen zu zerstören. Wären Substrat-induzierte Konformationsänderungen ein generelles Merkmal von SDR, bliebe es immer noch sehr schwer, die Aminosäuren zu identifizieren, die für den *substrate-induced fit* Mechanismus verantwortlich sind. Die beschriebene *substrate-induced fit* Bewegung während der Substratbindung und die Flexibilität der Seitenketten einiger Aminosäuren in diesem Loop könnten für die breite Substrattoleranz eines Enzyms verantwortlich sein: die humane  $17\beta$ -HSD1 katalysiert die Reduktion von Estron zu  $17\beta$ -Estradiol, ist zusätzlich aber in der Lage, C19-Steroide, wie Dehydroepiandrosteron und Dihydrotestosteron, allerdings wesentlich schlechter, zu reduzieren. Der Vergleich der Strukturen der  $17\beta$ -HSD1 komplexiert mit den drei verschiedenen Steroiden zeigte die unterschiedlichen

Seitenkettenkonformationen einiger Aminosäuren (Han 2000). Die Bindungstasche ist fast vollständig mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet, so dass ausschließlich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat stattfinden. Anstelle einer engen Bindungstasche fanden Han und Mitarbeiter, dass der Abschnitt von  $\alpha$ FG1 $\rightarrow\alpha$ FG2 über große konformationelle Beweglichkeit verfügt und sich der Position des Substrates anpasst. Die Form der Bindungstasche spielt eine kritische Rolle bei der Substraterkennung. Die unterschiedliche Aktivität beim Umsatz der Substrate ist vor allem durch den unterschiedlichen Abstand für den Hydridtransfer bedingt (Han 2000).

Ein ähnlicher Effekt ist für die Tropinonreduktase aus *Cochlearia officinalis* L. anzunehmen. In Abbildung C.25 ist dargestellt, wie im Modell die bewegliche Seitenkette von Tyr209 die Reduktion von Tropinon zu beiden Tropanolen ermöglicht. Dieses Tyr209 ist jedoch nicht allein verantwortlich für die Befähigung zur Bindung von Tropinon. Der einfache Austausch gegen Serin machte zwar diese Eigenschaft zunichte, umgekehrt konnte in der ATSDR keine TR-Aktivität generiert werden, indem an dieser Stelle ein Tyrosin eingeführt wurde (C3.5). Der Aufbau einer Bindungstasche, die Tropinonreduktion ermöglicht, bedarf sicher mehrerer Mutationen. Der direkte Vergleich der aktiven Zentren der modellierten Enzyme von *Cochlearia officinalis* und *Arabidopsis thaliana* zeigt, dass 5 der 11 Aminosäuren mit Kontakt zum Substrat verschieden sind (Abbildung D.6). Im Vergleich zu 82% Identität über die gesamte Sequenz, finden sich bei den Aminosäuren, die das aktive Zentrum auskleiden, lediglich 54% Identität.

Die Untersuchungen von Tian und Skolnick zeigten, dass trotzdem die globale Sequenzidentität am stärksten mit der Konservierung der Funktion korreliert (Tian 2003). Für die Annotation von Funktionen wurde festgestellt, dass mehr als 60% globale Identität notwendig sind, um alle vier Stellen der EC-Nummer mit 90%-iger Sicherheit zu übertragen. Für die Übertragung der ersten drei Stellen der EC-Nummer sind 40% globale Identität ausreichend. Für die COTR liegen die Identitäten im Grenzbereich um 60% zu den Solanceae-TR. In Anbetracht der biochemischen Aktivität des Enzyms ist es daher möglich, das Enzym als Tropinonreduktase zu annotieren, lediglich eine Zuweisung der Stereospezifität ist allein aufgrund der Sequenz nicht möglich.

Der Ähnlichkeit der aktiven Zentren zum Trotz verhielten sich die beiden Enzyme unterschiedlich - vor allem aber war die ATSDR nicht in der Lage, Tropinon zu reduzieren (C4.3). Analog zu den TR aus *Datura stramonium* präsentiert sich die Eigenschaft der Reduktion von Tropinon bei Mutanten als schwer vorhersagbar. Mehrere Aminosäuren der Substratbindestelle sind also gemeinsam verantwortlich für die Substraterkennung.

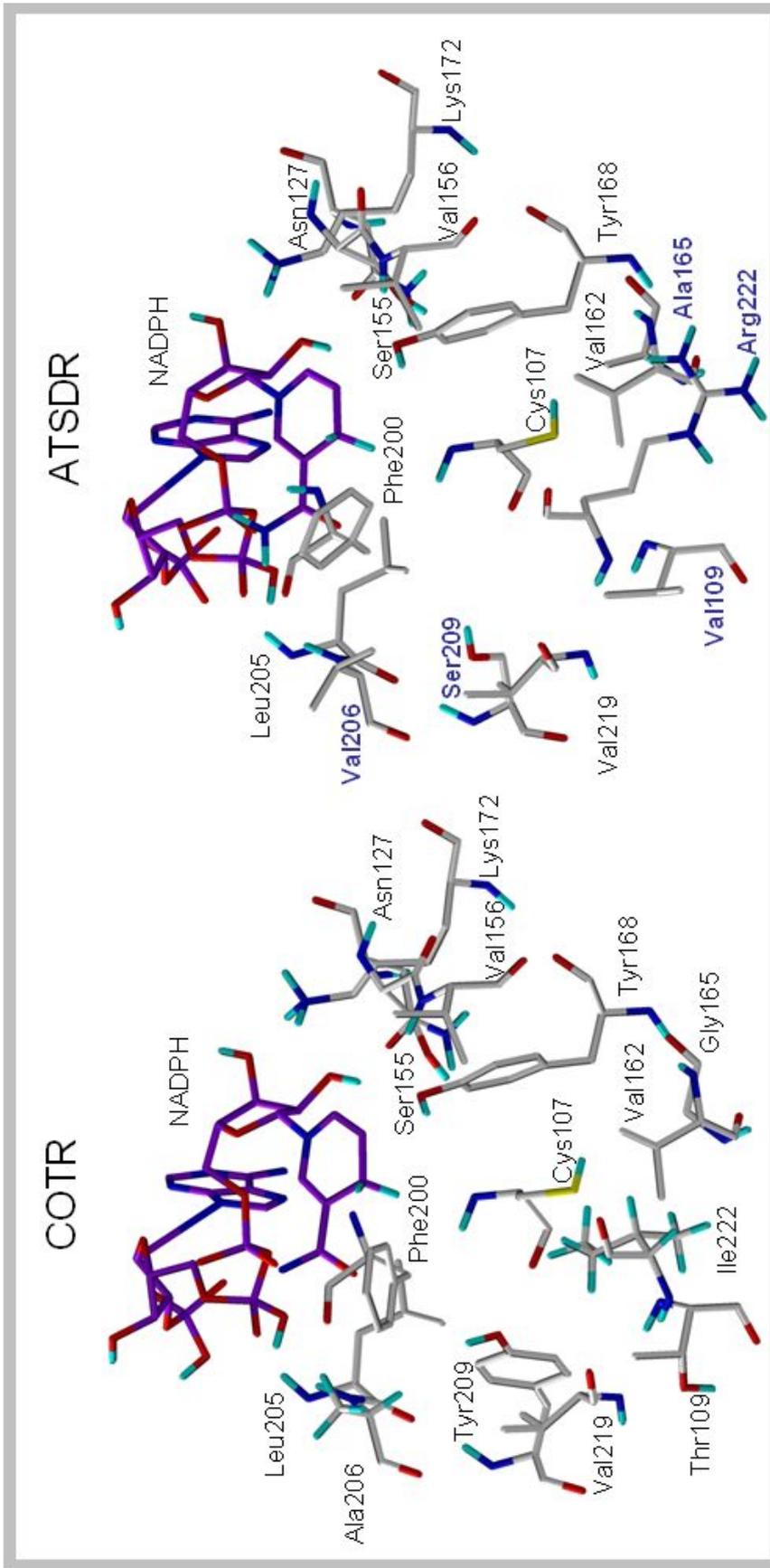


Abbildung D.6: Vergleich der substratbindenden Region - COTR links und ATSDR rechts; gleiche Perspektive

unterschiedliche Aminosäuren in der ATSDR blau/fett beschriftet  
 Ser155-Lys172-Tyr168-Asn127 = katalytische Tetrade

Betrachtet man ausschließlich die TR der Solanaceae, muss man zu dem Schluss kommen, dass die Stereospezifität der Reduktion durch die Orientierung im Enzym-Substratkomplex diktiert wird (Nakajima 1998). In *Datura stramonium* TR stehen elf Aminosäuren in direktem Kontakt mit dem Substrat, fünf davon sind in TRI und TRII verschieden. Diese 5 Aminosäuren (His112-Tyr100, Ala160-Ser148, Val168-Glu156, Ile223-Leu210, Phe226-Leu213) wurden durch Nakajima und Mitarbeiter in Mutageneseversuchen getauscht (Nakajima 1999c). Nur durch Mutation aller 5 Positionen konnte eine Umkehr der Stereospezifität erreicht werden. Diese war jedoch nicht vollständig (ca. 90%) und abhängig von der Konzentration des Substrates. Es haben also, über die postulierten Wechselwirkungen hinaus, viele Aminosäuren einen indirekten Einfluß auf die Substratbindung. In der TRII übt das negativ geladene Glu156 einen elektrostatischen Zug auf das positive Stickstoffatom des Tropinons aus (Yamashita 1999) und führt so zur TRII-Orientierung des Substrates, andere Aminosäuren dienen der Feineinstellung der Substratlage. In COTR und ATSDR finden sich an dieser Position Glycin/Alanin.

Die Bindungstasche der TRI ist dergestalt, dass sich eine komplementäre Passform vorwiegend hydrophober Natur für das Substrat entwickelt hat. Im Alignment sind die Aminosäuren mit hydrophobem Kontakt zur Methylgruppe bzw. zur Methylenbrücke des Tropinons gelb hinterlegt.

Bezüglich des Mechanismus der Substratorientierung bedient sich die hier beschriebene TR aus *Cochlearia officinalis* der gleichen Taktik wie die TRI aus Solanaceae, zwingt das Substrat jedoch nicht in genau eine Position, sondern erlaubt die Reduktion zu beiden Tropanolen.

Bei SDR, die auch als therapeutische Ziele von Bedeutung sind, erschwert die Variabilität das Design eines Moleküls, das später ein selektiver Inhibitor werden soll oder die Reaktion eines Enzyms verändert und erfordert ausführliche Struktur-Funktions-Studien.

#### SDR ALS THERAPEUTISCHES ZIEL

11 $\beta$ -HSD 1	Reduktase bildet aktive Glucokortikoide, Hyperglykämie, Fettsucht (Stewart 1999)
PTR 1	Parasitosen, Leishmaniasis (Nare 1997)
15-PGDH	NAD <sup>+</sup> -abhängig potentiell Target bei Entzündungskrankheiten, zentrales Enzym für Kontrolle biologischer Aktivität von Prostaglandinen (Ensor 1995)

**Die Katalytische Triade S-Y-K von SDR** Durch Röntgenstrukturanalyse und gerichtete Mutagenese zeigte sich dieses Motiv S-Y-K von SDR als essentiell (Chen 1993, Persson 1995, Tanaka 1996a, Nakanishi 1997). Das konservierte Tyrosin ist unentbehrlich als katalytische Base, aber nicht verantwortlich für Substraterkennung und Coenzymbindung. Die Mutation von Tyrosin (Tyr159/168) führt immer zu inaktivem Enzym bzw. bei Austausch gegen Phenylalanin zu stark verminderter Aktivität; an der Coenzymbindung ändert sich jedoch nichts (Tanaka 2001). Das Lysin (Lys163/172) der katalytischen Triade erfüllt gleich zwei Aufgaben: zum einen die Orientierung der Nicotinamidregion des Cosubstrates und zum anderen die Senkung des pK<sub>A</sub>-Wertes von Tyrosin durch starken elektrostatischen Einfluß der positiv geladenen Seitenkette, dadurch wird die Katalyse bei neutralem pH erleichtert. Beschrieben wird eine Senkung der Dehydrogenaseaktivität bei Lysin-Mutanten der MLCR, die durch Anheben des pH-Wertes auf 10 erhöht werden

konnte. Die direkte Deprotonierung des Tyrosin-OH durch die basische Umgebung ist dafür verantwortlich. Die Mutation dieser Aminosäuren (insbesondere konserviertes Lysin) zeigte, daß die richtige Orientierung des Nicotinamidringes kritisch für die SDR Reaktionen ist (Nakanishi 1996).

In den Kristallstrukturen von MLCR und 7 $\alpha$ -HSD interagiert die Hydroxylgruppe des Serins (Ser146/155) mit dem O-Atom der Carbonylgruppe des Reaktionsproduktes. Es übernimmt dadurch eine wichtige Rolle bei der Orientierung der empfänglichen Gruppe des Substrates hin zur phenolischen Gruppe des katalytischen Tyrosins und dem C4N des Nicotinamidteils von NADP(H) sowie bei der Stabilisation der Reaktionspartner um die Reversibilität der Reaktion zu gewährleisten die für SDR typisch ist (Tanaka 2001) und auch bei COTR auftrat.

Die Carbonylgruppe des Substrates ist wasserstoffverbrückt mit den Hydroxylgruppen von Serin und Tyrosin aus der katalytischen Triade. Wichtig für die Architektur der Substratbindestelle ist weiterhin ein konserviertes Asparagin. Es entsteht, vermittelt durch die Seitenkette des Asn185/194, ein Wasserstoffbrückensystem, das über ein Wassermolekül Verbindung zum aktiven Zentrum herstellt (Filling 2002). Indem die Interaktionen im Prinzip zwischen den Seitenkettenatomen von Asparagin und den Hauptkettenatomen anderer Aminosäuren (z.B. Val1243-O und Glu246-N) bestehen, ist außer dem Asparagin keine Aminosäure konserviert. So bleibt trotz großer Variabilität der Substratbinderegion immer ein allgemeines Gerüst erhalten, die katalytische Triade wird somit zur Tetrade. Diese Eigenschaft der bakteriellen 3 $\beta$ /17 $\beta$ -HSD konnte auf die TR von *Datura stramonium* übertragen werden (Filling 2002) und ist ebenso denkbar für die COTR.

El-Kabbani und Mitarbeiter konnten durch Mutagenese der humanen L-Xylulosereduktase zeigen, dass das konservierte Asparagin eine duale Funktion in SDR übernimmt. Dabei stellten sich die Beteiligung an der Protonenstaffel und die Unterstützung bei der Ausrichtung des katalytischen Tyrosins als weniger bedeutsam dar. Wichtiger ist der Einfluß auf die Bindung des Cosubstrates, die über die Seitenkette des katalytischen Lysins vermittelt wird (El-Kabbani 2004).

**Der Mechanismus des Wasserstofftransfers** Im ersten Schritt bildet die phenolische Gruppe des konservierten Tyrosins der katalytischen Tetrade eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe des Substrates aus. Die Hydroxylgruppe von Serin kann ebenso eine Wasserstoffbrücke zum Substrat bilden und dessen Position stabilisieren (Tanaka 1996a, Tanaka 1996b). Im zweiten Schritt fungiert das Tyrosin-Anion als katalytische Base und entfernt ein Hydridion von der B-Seite des Nicotinamidrings auf der Position 4. Dieses wird gleichzeitig vom Substrat empfangen. So entstehen das Produkt und NADP. Die gesamte Reaktion besteht aus mehreren dissoziativen und assoziativen Übergangszuständen die von Serin stabilisiert werden. Wie diese Stabilisierung genau aussieht, ist noch ungeklärt.

Für den Hydridtransfer sollte der optimale Angriffswinkel ein stumpfer Winkel sein (Yamashita 2003), die gemessenen Winkel betragen: IIPF - 114,6°, COTR - 112,3° (Tropin) und 121,4° (Pseudotropin).

Für die SDR wird eine Protonenstaffel im aktivem Zentrum bestehend aus Coenzym, Substrat, Tyr159, Ribose 2-OH, Lys163, Wasser und Asn118 postuliert (Filling 2002).

Auch in der TRII von *Datura stramonium* finden sich Wassermoleküle im aktiven Zentrum.

Eine hydrophile Tasche soll als Protonenbrücke zwischen Lys163 und dem Bulk des Solvens fungieren und bildet ein temporäres Protonenreservoir während der enzymatischen Katalyse. So werden die Wassermoleküle stabilisiert und der Protonentransport zwischen ihnen wird trotz des ansonsten hydrophoben Milieus ermöglicht (Filling 2002). Inwiefern eine Protonenstaffel in COTR möglich ist, wurde nicht untersucht.

### D2.3 Evolution von Tropinonreduktasen

Der evolutionäre Ursprung der Tropinonreduktasen war bisher selten Gegenstand von Untersuchungen. Die aktuellste Theorie geht davon aus, dass zunächst eine TR mit Stereospezifität für  $\beta$ -Konfiguration des Produktes existierte, aus der sich nach Duplikation und Mutation die andere TR entwickelte (Nakajima 1999c). Dabei könnte sich die Entwicklung beider Biosynthesewege (Tropan- und Nortropanalkaloide) als Überlebensvorteil für die Pflanze darstellen. Somit wäre die TRII das phylogenetisch ältere Enzym. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass in Pflanzen der untersuchten Familien (Convolvulaceae, Solanaceae, Moraceae, Erythroxylaceae, Brassicaceae) bisher entweder nur aus Pseudotropin stammende Calystegine oder aber Calystegine und Tropinester gefunden wurden.

In Pflanzen wie *Calystegia sepium* L. und *Solanum tuberosum*, in denen Calystegine vorkommen, wurde auch TRI-Aktivität nachgewiesen (Keiner 2002, Sichhart 2003), ohne dass sich klassische Tropanalkaloide oder Tropinester finden. Dies kann als Indiz dafür gedeutet werden, dass TRI-Aktivität auch als unspezifische Nebenaktivität von SDR aus dem Primär- oder Sekundärmetabolismus auftreten kann.

Eine frühere Theorie von Nakajima und Mitarbeitern (1993) geht von einem TR-Protoenzym aus, welches aus einer beliebigen SDR durch Mutation hervorgegangen ist. Dieses TR-Protoenzym besaß noch keine Stereospezifität, diese entstand erst nach Genduplikation durch Mutation der Substratbinderegion. Die hochkonservierte Tertiärstruktur und gleichzeitig enorme Variabilität der Substratbinderegion bestätigen diese Theorie. Durch die Duplikation von Genen oder Geno-

men entsteht eine Situation, in der funktionell redundante Enzyme vorhanden sind. Es bestehen vielfältige Möglichkeiten, was einem redundanten Gen widerfahren kann: durch Mutation kann die Funktionalität verloren gehen, z.B. durch Frameshift oder vorzeitige Stop-Codons oder aber neue biochemische Funktion entstehen. In vielen Fällen ist es jedoch vielmehr eine verwandte denn eine vollkommen neue Funktionalität (Zhang 2003). Die Evolution einer Tropinonreduktase aus einer beliebigen SDR ist im Sinne einer Neofunktionalisierung zu betrachten, die Entwicklung der Stereospezifität als Subfunktionalisierung.

Die in dieser Arbeit beschriebene Tropinonreduktase von *Cochlearia officinalis* L. wäre gleichsam als ‚lebender‘ Vertreter eines solchen Protoenzym zu betrachten. In jedem Fall scheint die Rekrutierung einer beliebigen SDR zu jedem Zeitpunkt möglich und damit die Entwicklung einer Tropinonreduktase vergleichsweise einfach zu realisieren.

Es wird angenommen, dass Evolution eher durch Retroevolution, d.h. durch Rekrutierung vorhandener Enzyme geschieht, denn durch die Entwicklung völlig neuer Enzyme (Roy 1999). Es verwundert nicht, dass schlussendlich die biosynthetische Vielfalt durch eine geringe Zahl konservierter enzymatischer Mechanismen generiert wird. Schon 1977 verglich François Jacob die Evolution mit der Arbeit eines Bastlers, der aus vorhandenem Material wieder und wieder Neues entstehen lässt (Jacob 1977). Eine kleine Anzahl von Faltungsmustern oder Domänen wird immer wieder neu kombiniert und angepasst, um diese Diversität funktioneller Proteine zu erhalten (Hrmova 2001).

Die SDR sind ein Modul in diesem Baukasten konservierter Strukturelemente.

Die Struktur der SDR-Domäne bildet ein allgemeines Gerüst für diverse Reaktionen, sie ist nicht nur bei Dehydrogenasen / Reduktasen sondern auch Lyasen (z.B. Halohydrin-Lyase), Epimerasen (z.B. UDP-galactose-4-epimerase), Hydratase (z.B. Enoyl-CoA-Hydratase) sowie RNAbindenden Proteinen oder sogar Transkriptionsfaktoren (Stammers 2001) zu finden.

In diesem Zusammenhang sei auf die Vielzahl von SDR ohne bekannte Funktion verwiesen.

Im 25500 Gene umfassenden *Arabidopsis*-Genom (Bevan 2001) finden sich allein 15 Gene mit der Annotation ‚putative Tropinonreduktase‘, die mit einer durchschnittlichen Identität von über 50% zu Solanaceae durchaus als Kandidaten für die Entwicklung einer TR in Frage kämen.

Auch ein Gen mit hoher Ähnlichkeit zum Berberin-Brücken-Enzym, welches aus der Sanguinarinbiosynthese in *Eschscholtzia californica* bekannt ist, ist vorhanden (Accession AY072198.1). Trotzdem bleibt das Phytoalexin Camalexin (Indolgrundstruktur) das einzige Biosyntheseprodukt in *Arabidopsis thaliana*, das einer Alkaloidstruktur nahe kommt (Facchini 2004).

Zusammen mit der prinzipiellen Befähigung der Pflanze zur Tropinonreduktion kann man folgern, dass die Fähigkeit zur Biosynthese eines Alkaloids auf mehr beruht, als dem bloßen Vorhandensein eines Satzes entsprechender Enzyme. Auch Faktoren wie Steuerung, Lokalisation (räumliche und/oder zeitliche Trennung von Enzym und Substrat) und Transport müssen berücksichtigt werden.

Der begrenzende Faktor für die Entwicklung der Biosynthese von Tropan- und Nortropanalkaloiden scheint damit das Vorhandensein einer PMT, SAM und die Synthese des Tropinons.



Bereich A ist hochkonserviert und nach Korolev und Mitarbeitern sind Tyrosin und Threonin bzw. Glutamin an der Bindung des Cosubstrates beteiligt. Sieben der elf Aminosäuren, die hier betrachtet werden, sind in den Enzymfamilien verschieden. Die Aminosäuren NGGFP sind zu 100% in den bekannten PMT konserviert, während in den SPDS RDECA bzw. KDECA zu finden ist. Damit ist dieser Bereich geeignet, um zwischen PMT und SPDS zu differenzieren. In der kristallisierten *Thermotoga maritima* SPDS wird durch Glutamin die Aminopropylgruppe des dcSAM fixiert (Korolev 2002). Diese Fixierung ist notwendig für die korrekte Orientierung des zu übertragenden Aminopropylrestes. In PMT ist an dieser Stelle Threonin konserviert. Dies könnte im Zusammenhang mit dem veränderten Cosubstrat stehen. An Position B ist die in SPDS konservierte Asparaginsäure gegen Isoleucin in den PMT ausgetauscht, dies könnte Einfluß auf die Cosubstratspezifität haben. Dabei wäre Asparaginsäure theoretisch in der Lage die Aminopropylgruppe von dcSAM zu fixieren, jedoch dürfte dann die noch vorhandene Carboxylfunktion im SAM durch elektrostatische Abstoßung die Bindung desselben unmöglich machen. In PMT ist an dieser Stelle Isoleucin konserviert. Die PMT von *Solanum tuberosum* L. wies keine SPDS-Aktivität auf (Stenzel 2006) und keine SPDS zuvor ist auf PMT-Aktivität getestet worden. Auch im Bereich C unterscheiden sich die Enzymfamilien beträchtlich, weniger als die Hälfte der Aminosäuren sind identisch.

Das in dieser Arbeit beschriebene Enzym ist anhand seiner Aminosäuresequenz als eine Spermidinsynthase zu identifizieren. Es wird angenommen, dass sich die PMT im Laufe der Evolution aus pflanzlichen SPDS entwickelt haben (Hashimoto 1998). Daher rührt die höhere Sequenzidentität von pflanzlichen SPDS und PMT (75-80%) im Vergleich zu z.B. bakteriellen SPDS (30%). Die Evolution von einem Primärstoff- zu einem Sekundärstoffenzym wurde auch bei der Homospermidinsynthase (HSS) postuliert, die sich aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS) entwickelt haben soll (Ober 1999, Ober 2000). Dieser Vorgang fand sogar an vier unabhängigen Zeitpunkten in 3 verschiedenen Pflanzenfamilien statt (Reimann 2004). PMT haben eine höhere Sequenzähnlichkeit zu pflanzlichen Spermidinsynthasen als zu anderen bekannten pflanzlichen SAM-abhängigen Methyltransferasen.

### D3.2 Eigenschaften des Proteins

Das untersuchte Enzym wurde durch Einfrieren komplett inaktiviert. Eine Temperaturempfindlichkeit dieser Art ist ebenfalls von der *Glycine max* SPDS bekannt (Yoon 2000).

In einem Vorversuch wurde getestet, welche Aktivität das Enzym aufweist. Dafür wurden beide Cosubstrate untersucht. Wie erwartet, bildete sich mit dcSAM das Produkt Spermidin. Wider Erwarten wurde jedoch auch Spermin gefunden. Das Enzym akzeptierte also auch Spermidin als Substrat und zeigte damit zusätzlich Sperminsynthaseaktivität. Dieses Verhalten ist zum Beispiel auch für die *Plasmodium falciparum* SPDS beschrieben (Haider 2005).

Das hauptsächlich gebildete Produkt (MP) entsprach in seiner Retentionszeit und dem UV-Spektrum *N*-Methylputrescin. Da auch dcSAM eine aktivierte Methylgruppe am Schwefel besitzt, ist eine Übertragung dieser denkbar. Die Reaktion mit SAM als Cosubstrat lieferte ebenfalls dieses Produkt. Eine PMT-Aktivität ist bei Spermidinsynthesen bisher nicht beobachtet worden. Nachfolgende Untersuchungen zur Bildung von Spermidin und Spermin führten nicht zu einer auswertbaren Kinetik. Die Untersuchungen waren vor allem durch die Instabilität des Enzyms bei Lagerung und die zur Verfügung stehenden Mengen an dcSAM begrenzt.

Für die Bildung von MP mit dcSAM konnte eine MICHAELIS-MENTEN-Kinetik aufgestellt werden,  $V_{max}$  wurde mit 130,21 pkat/mg und der Km-Wert für Putrescin bei 4,19 mM ermittelt. Da eine Aktivität dieser Art bei SPDS bisher noch nicht gezeigt werden konnte, fehlen Vergleichswerte. Im Allgemeinen liegt der Km-Wert für Putrescin bei SPDS im Bereich 0,01 bis 0,1 mM (*E. coli* (Tabor 1983)); (*Rattus norvegicus* (Samejima 1983)), für pflanzliche SPDS liegt er bei 0,02 mM (*Senecio vulgaris* (Graser 2000)) bis 0,03 mM (*Glycine max* (Yoon 2000)). Bei PMT sind für Putrescin höhere Km-Werte ermittelt worden: sie liegen zwischen 0,2 mM (*Solanum tuberosum* (Stenzel 2006)) und 0,88 mM (*Datura stramonium* (Feth 1985)). Das hier untersuchte Enzym weist für die Bildung von MP eine vergleichsweise geringe Affinität zu Putrescin auf.

Die Km-Werte von SPDS für dcSAM liegen deutlich niedriger, z.T. im nanomolaren Bereich. Pflanzliche SPDS haben Km-Werte im Bereich von 40 nM bis 400 nM (*Glycine max* (Yoon 2000) und *Senecio vulgaris* (Graser 2000)). Um eine Abhängigkeit von der dcSAM-Konzentration zu ermitteln, stand leider nicht ausreichend Cosubstrat zur Verfügung.

Der Umsatz von SAM wurde mit variierenden Konzentrationen von SAM und Putrescin untersucht. Bei konstanter SAM-Konzentration und Variation der Putrescinkonzentration wurden Konzentrations-Geschwindigkeitskurven mit sigmoidalem Verlauf erhalten. Zur Auswertung wurde die HILL-Gleichung verwendet, die eine Beschreibung sigmoidaler Kinetiken erlaubt.

Die berechnete Maximalgeschwindigkeit beträgt 14,4 nkat/mg. Der  $K_{0,5}$ -Wert, der in etwa dem Km-Wert einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik entspricht, liegt bei 6,62 mM Putrescin. Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit, die in dieser Versuchsreihe gemessen wurde, wurde in keinem anderen Versuch wiedergefunden. In der Regel lagen die Reaktionsgeschwindigkeiten um ca. 1500 pkat/mg. Dies spiegelt deutlich die Empfindlichkeit des Enzyms wieder, das bei Lagerung bei 4°C schon innerhalb einer Woche beträchtlich an Aktivität einbüßte. Ein ähnlich hohe Reaktionsgeschwindigkeit findet sich nur bei der PMT von *Datura stramonium* (ca. 10 nkat/mg; (Teuber 2007)).

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Reaktion vom SAM-Gehalt ergaben widersprüchliche

Ergebnisse. Zum einen wurden zweigipfelige Kurven mit Maxima bei ca. 100 und ca 500  $\mu\text{M}$  SAM gefunden (Abbildung C.41), zum anderen ergab sich eine eingipfelige Kurve mit einem Maximum zwischen 25 und 75  $\mu\text{M}$  SAM (Abbildung C.49). Kinetische Konstanten für SAM waren daher nicht zu ermitteln.

Die Spermidinsynthasen erweisen sich als sehr vielfältig, wenn es um die Reaktionskinetik der Spermidinbildung geht: während die *Homo sapiens* SPDS nach MICHAELIS-MENTEN-Kinetik arbeitet (Kajander 1989), warten die bakteriellen SPDS mit einer Single-Displacement-Kinetik auf (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* (Pegg 1983)).

Die Spermidinsynthase von *Bos taurus* zeigt eine Ping-Pong-Kinetik (Raina 1984) und für die pflanzliche SPDS aus *Glycine max* ist gar eine Tetra-Uni Ping-Pong-Kinetik beschrieben (Yoon 2000).

Für SPDS ist ein Reaktionsmechanismus nach dem Muster einer nukleophilen Substitution (SN2) postuliert. Dabei wird eine Aminogruppe des Putrescins durch das Enzym deprotoniert und greift als Nukleophil den positiven Schwefel an. Die Methylgruppe wird vom Schwefel gelöst und kovalent an die Aminogruppe des Putrescins gebunden. Es bildet sich ein ternärer Komplex aus Enzym, Substrat und Cosubstrat (Korolev 2002, Orr 1988).

Alle bisher untersuchten PMT wiesen eine MICHAELIS-MENTEN-Kinetik auf (Teuber 2007).

Als mögliche Ursachen für den sigmoidalen Kurvenverlauf kommt zum einen eine Kooperativität des Enzyms in Betracht, d.h. das Enzym würde nicht monomer vorliegen und die Bindung der Untereinheiten aneinander hätte Einfluß auf die Reaktivität.

Die Quartärstrukturen von SPDS sind vielgestalt: am häufigsten finden sich Dimere: bei *E. coli* als Homodimer (Bowman 1973), bei *Homo sapiens* als Heterodimere (Kajander 1989), die SPDS von *Glycine max* und *Zea mais* liegen als Monomer vor (Yoon 2000). Korolev und Mitarbeiter gelang es die SPDS von *Thermotoga maritima* zu kristallisieren, das Enzym liegt im Kristall und in Lösung als Tetramer vor (Korolev 2002). Die Tetramerisierung ist möglicherweise der Schlüssel zur Thermostabilität des Enzyms, nicht unwahrscheinlich ist also, dass die quartäre Organisation der Aminopropyltransferasen ihre Stabilität beeinflusst (Korolev 2002). In *Arabidopsis thaliana* L. existieren drei SPDS-homologe Sequenzen, die SPDS2 ist charakterisiert worden (Hashimoto 1998). Darüberhinaus ist eine SPMS bekannt.

Eine andere Möglichkeit zur Erklärung des sigmoidalen Kurvenverlaufs wäre, ein Zwei-Substrat-System anzunehmen, in dem weder eine Random-Kinetik noch eine obligate Reihenfolge der Substratbindung vorliegt. So müssen nicht notwendigerweise Interaktionen zwischen Untereinheiten oder ligandeninduzierte Konformationsänderungen vorliegen.

Dabei wären theoretisch zwei Syntheserouten möglich, von denen jedoch eine kinetisch präferiert wird (Abbildung D.7).

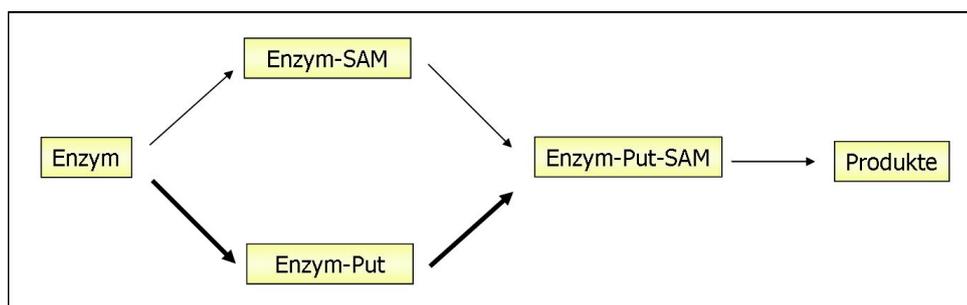


Abbildung D.7: Synthesemöglichkeiten

Der Kurvenverlauf bei Fixierung der Konzentration jeweils eines der Substrate ist in Abbildung D.8 exemplarisch dargestellt.

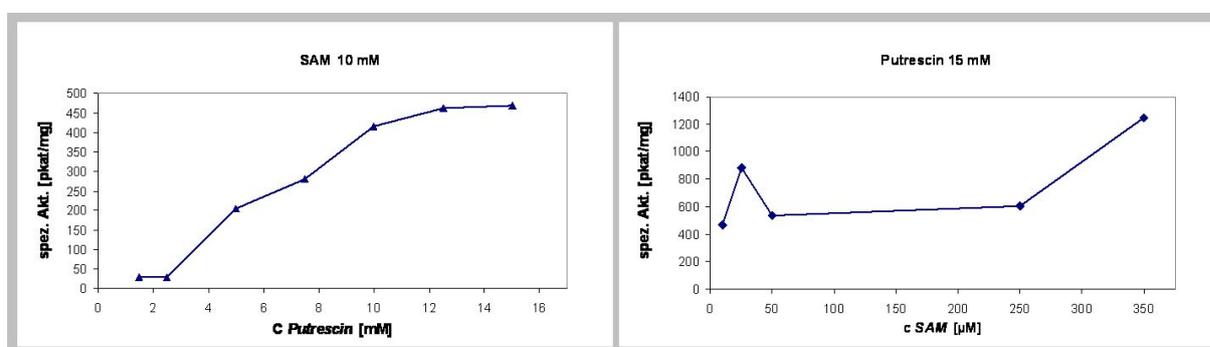


Abbildung D.8: Mögliche Syntheserouten, kinetische Darstellung

Lässt man die SAM-Konzentration konstant, überwiegt bei sehr niedrigen Putrescinkonzentrationen die Formierung von ENZYM-SAM, bei steigender Putrescinkonzentration wird vermehrt ENZYM-PUT gebildet, es kommt zu einem steilen Anstieg der Kurve. Bei hohen Putrescinkonzentrationen ist die Bildung von ENZYM-PUT-SAM über ENZYM-PUT der dominierende Weg. Es entsteht ein normaler Kurvenverlauf in Richtung  $V_{max}$ . Die gesamte Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf.

Bei konstanter Putrescinkonzentration wäre folgendes denkbar: bei sehr niedrigen SAM-Konzentrationen entsteht ein normaler Anstieg der Kurve, da die Formierung von ENZYM-PUT bevorzugt abläuft. Übersteigt die SAM-Konzentration einen bestimmten Wert (hier ca. 50  $\mu\text{M}$ ) werden die kinetischen Faktoren, die die ENZYM-PUT Route bevorzugen, überwunden. Es wird mehr ENZYM-PUT-SAM über den Weg ENZYM-SAM produziert. Die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt dann auf ein Plateau, das von der Geschwindigkeitskonstanten der kinetisch nicht bevorzugten Route bestimmt wird. Im Falle des untersuchten Enzyms wäre die Route über die Bildung des ENZYM-PUTRESCIN-Komplexes bevorzugt. Leider stehen über die Natur des gebildeten Produktes keine weiteren analytischen Daten zur Verfügung. Eine Aufklärung der Identität des gebildeten Produktes als *N*-Methylputrescin ist dringend nötig. Möglich wäre dies z.B. durch Massenspektrometrie.

## E Zusammenfassung

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide, ihre Biosynthese ist in Solanaceae und Convolvulaceae untersucht. Sie leitet sich von der Tropanalkaloidbiosynthese ab, einzelne Schritte wie zum Beispiel *N*-Demethylierung und Hydroxylierung sind nicht aufgeklärt. Calystegine hemmen verschiedene Glykosidasen. Potentielle Einsatzgebiete für Glykosidasehemmstoffe sind Diabetes mellitus, Krebserkrankungen oder virale Infektionen. Sowohl die Synthese als auch die Isolierung aus biologischem Material sind kompliziert und aufwendig. Ein Verständnis der biosynthetischen Schritte kann die Voraussetzung für die Gewinnung größerer Mengen schaffen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die Untersuchung der Verbreitung von Calysteginen in verschiedenen Pflanzenfamilien und biosynthetischer Schritte in *Cochlearia officinalis* L. Die Familien Moraceae, Erythroxylaceae und Brassicaceae wurden auf Calystegine untersucht.

In allen Familien wurden Calystegine gefunden. Während in Moraceae nur *Morus* Spezies und *Ficus carica* L. calysteginhaltig sind, enthielt bei Erythroxylaceae und Brassicaceae die Mehrzahl der untersuchten Spezies Calystegine. In Brassicaceae dominierten Calystegine vom Typ A.

Mit *Cochlearia officinalis* L. wurde ein geeigneter Kandidat für die Untersuchung der an der Biosynthese beteiligten Enzyme gefunden. Die Pflanze enthält sowohl Calystegine als auch Tropinester, wie zum Beispiel Cochlearin. Sie erwies sich als leicht kultivierbar, auch eine Wurzelkultur war problemlos zu etablieren.

Es gelang die Amplifikation eines *tr*-homologen Fragmentes mit Hilfe von RT-PCR und degenerierten Primern. Das Fragment wurde mit *RACE*-PCR vervollständigt. Die resultierende cDNA-Sequenz weist alle Merkmale einer kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase (SDR) auf. Der Vergleich mit Tropinonreduktasen aus Solanaceae zeigt auf Aminosäureebene eine durchschnittlich 57%-ige Identität, aufgrund der Unterschiede im substratbindenden Bereich sind Aussagen zur Substrat- und Stereospezifität des Enzyms auf Basis der Primärstruktur nicht möglich.

Die COTR wurde in *E. coli* rekombinant exprimiert und mit Hilfe des sechsfachen C-terminalen Histidin-*tags* affinitätschromatographisch gereinigt. Das Enzym katalysiert sowohl die Reduktion von Tropinon als auch die Oxidation von Tropin und Pseudotropin. Bei der Reduktion von Tropinon entstehen sowohl Tropin als auch Pseudotropin, keines der Produkte wird bevorzugt gebildet. Eine Abhängigkeit der Reduktion von Tropinon von pH-Wert oder Zeit besteht nicht. Die Affinität zu Tropinon ist geringer als die der Tropinonreduktasen von Solanaceae. In seinen Eigenschaften ist das Enzym vergleichbar der TRI von *Calystegia sepium* L. : dazu zählen die

geringere Affinität zu Tropinon und der stärkere Umsatz von Cyclohexanon und Piperidinon im Vergleich zu Tropinon.

Um Erklärungsansätze für dieses ungewöhnliche Verhalten des Enzyms zu erhalten wurde ein molekulares Modell des Enzyms erstellt. Als Vorlage für die Modellierung diente die Struktur der kristallisierten TRII von *Datura stramonium* L. Das Modell war von guter Qualität und erfüllte die Spezifikation einer SDR. Mit Dockingversuchen wurde die bewegliche Seitenkette eines Tyrosins im aktiven Zentrum des Enzyms als mögliche Einflußgröße auf die Reduktionsrichtung ausgemacht. Die Mutation dieses Tyrosins zu Serin vernichtete jegliche TR-Aktivität, die Reduktaseaktivität wurde verändert, blieb jedoch erhalten.

Zu Vergleichszwecken wurde eine der 15 ‚putativen‘ TR aus *Arabidopsis thaliana* L. mit genspezifischen Primern amplifiziert, kloniert, in *E. coli* überexprimiert, gereinigt und biochemisch charakterisiert. Dieses Enzym war der COTR sehr ähnlich. Es war jedoch nicht in der Lage, die Reduktion von Tropinon zu katalysieren. Analog zur COTR wurde ein molekulares Modell des Enzyms erstellt. Beim Vergleich der aktiven Zentren beider Modelle wurde ein augenfälliger Unterschied festgestellt. Dieser wurde zum Gegenstand eines Mutageneseexperiments.

Die eingeführte Punktmutation von Serin zu Tyrosin stellte im Prinzip den Umkehrversuch zur Mutation der COTR dar. Die mutierte ATSDR war als Reduktase aktiv, eine TR-Aktivität konnte durch die Punktmutation nicht generiert werden.

Mit degenerierten Primern aus bekannten *pmt* und *spds*-cDNA-Sequenzen wurde durch RT-PCR ein *spds*-homologes Fragment gefunden. Durch PCR-basiertes Screening einer cDNA-Bank von *Cochlearia officinalis* L. wurde ein vollständiger *spds*-homologer cDNA-Klon isoliert. Die Zuordnung erfolgte aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu bekannten SPDS. Weiterhin fanden sich in der Sequenz die dcSAM-Bindungsstelle und die katalytische Domäne der SPDS.

Zur Bestätigung der biochemischen Funktion wurde die Sequenz in *E. coli* als His-tag-Fusionsprotein exprimiert. Das resultierende Protein war löslich und zeigte keine spezifische Aktivität, die gefundene SPDS-Aktivität war nicht reproduzierbar und eine enzymkinetische Auswertung nicht möglich. Zusätzlich wurde mit dem PMT-Cosubstrat SAM wiederholt ein Produkt gefunden, das in UV-Spektrum und Retentionszeit *N*-Methylputrescin entspricht.

# Literaturverzeichnis

- (Abraham 1995) Abraham TW und Leete E, 1995  
New intermediate in the biosynthesis of the tropane alkaloids in *Datura innoxia*.  
*Journal of the American Chemical Society* 117, pp. 8100–8105
- (Ahr 1997) Ahr HJ et al., 1997  
Pharmacokinetics of miglitol. Absorption, distribution, metabolism, and excretion following administration to rats, dogs, and man  
*Arzneimittelforschung* 47, pp. 734–745
- (Al-Said 1986) Al-Said MS, Evan WC and Grout RJ, 1986  
Alkaloids of the genus *Erythroxyllum*. Part 6. Alkaloids of *Erythroxyllum macrocarpum* and *E. sideroxyloides*.  
*Phytochemistry* 24, pp. 851–853
- (Ansarin 1993) Ansarin M und Woolley JG, 1993  
The obligatory role of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid  
*Phytochemistry* 32, pp. 1183–1187
- (Asano 1994a) Asano N et al., 1994a  
*N*-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities  
*Carbohydrate Research* 259, pp. 243–255
- (Asano 1994b) Asano N et al., 1994  
Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*.  
*Carbohydrate Research* 253, pp. 235–245
- (Asano 1995) Asano N et al., 1995  
Calystegins of *Physalis alkekengi var. francheti* (Solanaceae)-structure determination and their glycosidase inhibitory activities  
*European Journal of Biochemistry* 229, pp. 369–376
- (Asano 1996) Asano N et al., 1996  
Calystegin *N*-1, a novel nortropane alkaloid with a bridgehead amino group from *Hyoscyamus niger*: Structure determination and glycosidase inhibitory activities  
*Carbohydrate Research* 284, pp. 169–178
- (Asano 1997a) Asano N et al., 1997a  
The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases  
*Glycobiology* 7, pp. 1085–1088
- (Asano 1997b) Asano N et al., 1997b  
Specific  $\alpha$ -galactosidase inhibitors, *N*-methylcalystegines - structure/activity relationships of calystegines from *Lycium chinense*  
*European Journal of Biochemistry* 248, pp. 296–303

- (Asano 2000a) Asano N et al., 2000a  
Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application  
*Tetrahedron* 11, pp. 1645–1680
- (Asano 2000b) Asano N, 2000b  
Alkaloidal sugar mimetics: biological activities and therapeutic applications  
*Journal of Enzyme Inhibition* 15, pp. 215–234
- (Asano 2001) Asano N et al., 2001  
Dihydroxynortropine alkaloids from calystegine-producing plants  
*Phytochemistry* 57, pp. 721–726
- (Aynilian 1974) Aynilian GH et al., 1974  
Cocaine content of *Erythroxylum* species.  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* 63, pp. 1938–1939
- (Baerheim 1983) Baerheim Svendsen, A. and Verpoorte, R., 1983  
*Thin-layer chromatography, In: Chromatography of alkaloids, Part A*, Elsevier, Amsterdam, 91–101.
- (Bekkouche 2001) Bekkouche K et al., 2001  
Calystegine distribution in some solanaceous species  
*Phytochemistry* 58(3), pp. 455–62
- (Bell 1990) Bell E und Malmberg RL, 1990  
Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing  
*Molecular and General Genetics* 224, pp. 431–436
- (Benderoth 2006) Benderoth M et al., 2006  
Positive selection driving diversification in plant secondary metabolism  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(24), pp. 9118–9123
- (Bergmeyer 1985) Bergmeyer HU, 1985  
*Absorption coefficients of NAD(P)H, In: Methods of Enzymatic Analysis*, VCH-Verlag, Weinheim, p. 489
- (Berman 2000) Berman et al., 2000  
The Protein Data Bank.  
*Nucleic Acids Research* 28, pp. 235–242
- (Bevan 2001) Bevan M et al., 2001  
Sequence and Analysis of the *Arabidopsis* Genome  
*Current Opinion in Plant Biology* 4, pp. 105–110
- (Bones 1996) Bones AM und Rossiter JT, 1996  
The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry  
*Physiologia Plantarum* 97 (1), pp. 194–208
- (Boswell 1999a) Boswell HD et al., 1999a  
Specificities of the enzymes of *N*-alkyltropine biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*  
*Phytochemistry* 52, pp. 871–878
- (Boswell 1999b) Boswell HD et al., 1999b  
Metabolism of *N*-alkyldiamines and *N*-alkylnortropinones by transformed root cultures of *Nicotiana* and *Brugmansia*  
*Phytochemistry* 52, pp. 855–869

- (Bouchereau 1999) Bouchereau A et al., 1999  
Polyamines and environmental challenges: recent development  
*Plant Science* 140, pp. 103–125
- (Bowman 1973) Bowman WH, Tabor CW und Tabor H, 1973  
Spermidine biosynthesis. Purification and properties of propylamine transferase from *Escherichia coli*.  
*Journal of Biological Chemistry* 248(7), pp. 2480–2486
- (Brachet 1997) Brachet A et al., 1997  
Alkaloids of *Erythroxyllum lucidum* stem-bark.  
*Phytochemistry* 46, pp. 1439–1442
- (Bradford 1976) Bradford MM, 1976  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Analytical Biochemistry* 72, pp. 248–254
- (Braman 1996) Braman J, Papworth C, and Greener A  
Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates.  
*Methods in Molecular Biology*, 57, pp. 31–44
- (Bringmann 2000) Bringmann G et al., 2000  
Tropane alkaloids from *Erythroxyllum zeylanicum* O.E. Schulz (Erythroxyllaceae).  
*Phytochemistry* 53, pp. 409–416
- (Chelvarajan 1993) Chelvarajan RL, Fannin FF und Bush LP, 1993  
Study of nicotine demethylation in *Nicotiana otophora*  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, pp. 858–862
- (Chen 1990) Chen Z et al., 1990  
Site-directed mutagenesis of glycine-14 and two "critical" cysteinyl residues in *Drosophila* alcohol dehydrogenase  
*Biochemistry* 29, pp. 1112–1118
- (Chen 1993) Chen Z et al., 1993  
Site-specific mutagenesis of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis  
*Biochemistry* 32, pp. 3342–3346
- (Chenna 2003) Chenna et al., 2003  
Multiple Sequence alignment with the Clustal series of programs.  
*Nucleic Acids Research* 31 (11), pp. 3497–3500
- (Christen 1993) Christen P et al., 1993  
Alkaloids of the genus *Erythroxyllum*. Part 11. Alkaloids of *Erythroxyllum zambeziacum* stem-bark.  
*Phytochemistry* 34, pp. 1147–1151
- (Christen 1995) Christen P et al., 1995  
Alkaloids of *Erythroxyllum monogynum* root-bark  
*Phytochemistry* 38, pp. 1053–1056
- (Cohen 1972) Cohen SN, Chang AC und 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, pp. 2110–2114

- (Colegate 1979) Colegate SM, Dorling PR und Huxtable CR, 1979  
A spectroscopic investigation of swainsonine: an  $\alpha$ -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*  
*Australian Journal of Chemistry* 32, pp. 2257–2264
- (Couladis 1991) Couladis MM et al., 1991  
Enzymes catalyzing the reduction of tropinone to tropine and pseudotropine isolated from the roots of *Datura innoxia*  
*Phytochemistry* 30, pp. 801–806
- (Czako 1993) Czako et al., 1993  
Sustained root culture for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis thaliana*.  
*Plant Cell Reports* 12(11), pp. 603–606
- (Daali 2000) Daali Y et al., 2000  
Use of borate complexation for the separation of non-UV-absorbing calystegines by capillary electrophoresis  
*Journal of Chromatography A* 903, pp. 237–244
- (Davies 1989) Davies HM, Hawkins DJ, und Smith LA, 1989  
Quinoprotein characteristics of *N*-methylputrescineoxidase from tobacco roots  
*Phytochemistry* 28, pp. 1573–1578
- (De Luca 2000) De Luca V und St Pierre B, 2000  
The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis  
*Trends in Plant Science* 5, pp. 168–173
- (De Luca 2001) De Luca V und Laflamme P, 2001  
The expanding universe of alkaloid biosynthesis  
*Current Opinion in Plant Biology* 4(3), pp. 225–233
- (Dohn 1984) Dohn DR und Krieger RI, 1984  
*N*-demethylation of *p*-Chloro-*N*-methylaniline catalized by subcellular fractions from Avocado pear (*Persea americana*)  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* 231, pp. 416–423
- (Dominicis 1991) Dominicis ME und Fernandez H, 1991  
Phytochemical study of *Erythroxyllum havanense* Jacq. (Erythroxyllaceae).  
*Revista Cubana de Farmacia* 25, pp. 137–139
- (Dorling 1978) Dorling PR, Huxtable CR und Vogel P, 1978  
Lysosomal storage in *Swainsona spp.* toxicosis: an induced mannosidosis  
*Neuropathology and Applied Neurobiology* 4, pp. 285–295
- (Dräger 1988) Dräger B, Hashimoto T und Yamada Y, 1988  
Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures  
*Agricultural and Biological Chemistry* 52, pp. 2663–2668
- (Dräger 1994) Dräger B et al., 1994  
Calystegines as a new group tropane alkaloids in Solanaceae  
*Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38, pp. 235–240
- (Dräger 1995) Dräger B, 1995  
Identification and quantification of calystegines, polyhydroxyl nortropane alkaloids  
*Phytochemical Analysis* 6, pp. 31–37
- (Dräger 2004) Dräger B, 2004  
Chemistry and biology of calystegines  
*Natural Products Report* 21, pp. 211–223

- (Duax 1996) Duax WL, Griffin JF und Ghosh D, 1996  
The fascinating complexities of steroid-binding enzymes  
*Current Opinion in Structural Biology* 6, pp. 813–823
- (Duran-Patron 2000) Duran-Patron R et al., 2000  
Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from  
*Datura stramonium*  
*Phytochemistry* 53, pp. 777–784
- (El-Imam 1988) El-Imam YMA, Evans WC und Grout RJ, 1988  
Alkaloids of the genus *Erythroxyllum*. Part 8. Alkaloids of *Erythroxyllum cu-*  
*neatum*, *E. ecarinatum* and *E. australe*.  
*Phytochemistry* 27, pp. 2181–2184
- (El-Kabbani 2004) El-Kabbani O et al.  
Crystal structure of human *L*-Xylulose Reductase holoenzyme:probing the  
role of Asn107 with site-directed mutagenesis.  
*Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55, pp. 724–732
- (Elstein 2004) Elstein D et al., 2004  
Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, *N*-  
butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease  
*Journal of Inherited Metabolic Disease* 27(6), pp. 757–766
- (Ensor 1995) Ensor CM und Tai HH, 1995  
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase.  
*Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 12 (2–3), pp. 313–319
- (Facchini 2004) Facchini PJ, Bird DA and St-Pierre B,  
Can *Arabidopsis* make complex alkaloids?  
*Trends in Plant Science*, 9(3), pp. 116–122
- (Feller 2006) Feller C et al.  
Molecular basis of substrate recognition in *D*-3-Hydroxybutyrate Dehydro-  
genase from *Pseudomonas putida*.  
*ChemBioChem*, 7, pp. 1410–1418
- (Feth 1985) Feth F et al., 1985  
Determination of putrescine *N*-methyltransferase by high performance liquid  
chromatography  
*Phytochemistry* 24, pp. 921–923
- (Feth 1989) Feth F und Wagner KG, 1989  
Determination of ornithine, putrescine, *N*-methylputrescine and *N*-  
methylpyrroline pools in tobacco tissue by high-performance liquid chroma-  
tography  
*Physiologia Plantarum* 75, pp. 71–74
- (Filling 2002) Filling C et al., 2002  
Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogen-  
ases/Reductases  
*Journal of Biological Chemistry* 277(28), pp. 25677–25684
- (Firn 2003) Firn RD and Jones CG 2003  
Natural products - a simple model to explain chemical diversity.  
*Natural Product Reports* 20 , pp. 382–391
- (Fleet 1990) Fleet GW, Fellows LE und Winchester B, 1990  
Plagiarizing plants: amino sugars as a class of glycosidase inhibitors.  
*Ciba Foundation Symposium* 154, pp. 112–122

- (Frick 1999) Frick S and Kutchan T, 1999  
Combinatorial biochemistry in plants: the case of *O*-Methyltransferases  
*Phytochemistry* 56, pp. 1–4
- (Friedman 1997) Friedman M und McDonald G, 1997  
Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety and plant physiology  
*Critical Reviews in Plant Science* 16, pp. 55–132
- (Frohmann 1993) Frohman MA, 1993  
Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE  
*Methods in Enzymology* 218, pp. 340–356
- (Galston 1997) Galston AW et al., 1997  
Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress  
*Botanica Acta* 110, pp. 197–207
- (Garcia-Moreno 2001) Garcia-Moreno MI et al., 2001  
Synthesis and evaluation of calystegine B2 analogues as glycosidase inhibitors  
*Journal of Organic Chemistry* 66, pp. 7604–7614
- (Geissler 2007) Geissler R, Brandt W and Ziegler J  
Molecular Modeling and Site-directed Mutagenesis reveal the benzyloquinoline binding site of the short-chain dehydrogenase/Reductase Salutaridin Reductase.  
*Plant Physiology*, 143, pp.1493–1503
- (Glawischnig 2004) Glawischnig E et al., 2004  
Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, pp. 8245–8250
- (Goldmann 1990) Goldmann A et al., 1990  
Tropane derivatives from *Calystegia sepium*  
*Phytochemistry* 29, pp. 2125–2128
- (Graser 2000) Graser G und Hartmann T, 2000  
Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L.  
*Planta* 211(2), pp. 239–245
- (Griffin 2000) Griffin WJ und Lin GD, 2000  
Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids.  
*Phytochemistry* 53, pp. 623–637
- (Griffiths 1996) Griffiths RC et al., 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 B1).  
*Tetrahedron Letters* 37, pp. 3207–3208
- (Haider 2005) Haider N et al., 2005  
The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme.  
*Molecular and Biochemical Parasitology* 142, pp. 224–236
- (Han 2000) Han Q et al., 2000  
Dehydroepiandrosterone and Dihydrotestosterone Recognition by Human Estrogenic 17- $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase C-18/C-19 Steroid discrimination and enzyme-induced strain  
*Journal of Biological Chemistry* 275 (2), pp.1105–1111

- (Hao 1996) Hao DY und Yeoman MM, 1996  
Nicotine *N*-demethylase in cell-free preparations from tobacco cell cultures  
*Phytochemistry* 42, pp. 325–329
- (Hao 1998) Hao DY und Yeoman MM, 1998  
Evidence in favour of an oxidative *N*-Demethylation of nicotine in Tobacco cell cultures.  
*Journal of Plant Physiology* 152, pp. 420–426
- (Hashimoto 1985) Hashimoto T, Yukimune Y, und Yamada Y, 1985  
Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures  
*Journal of Plant Physiology* 124, pp. 61–75
- (Hashimoto 1986) Hashimoto T und Yamada Y, 1986  
Hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures  
*Plant Physiology* 81, pp. 619–625
- (Hashimoto 1987) Hashimoto T und Yamada Y, 1987  
Purification and characterization of hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. Hydroxylase and epoxidase activities in the enzyme preparation.  
*European Journal of Biochemistry* 164, pp. 277–285
- (Hashimoto 1989) Hashimoto T, Yukimune Y und Yamada Y, 1989  
Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*  
*Planta* 178, pp. 123–130
- (Hashimoto 1990) Hashimoto T, Mitani A und Yamada Y, 1990  
Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*: Its function in tropane alkaloid biosynthesis  
*Plant Physiology* 93, pp. 216–221
- (Hashimoto 1992) Hashimoto T et al., 1992  
Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*  
*Plant Physiology* 100, pp. 836–845
- (Hashimoto 1993) Hashimoto T, Matsuda J und Yamada Y, 1993  
Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase  
*FEBS Letters* 329, pp. 35–39
- (Hashimoto 1994) Hashimoto T und Yamada Y, 1994  
Alkaloid Biogenesis: Molecular aspects  
*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, pp. 257–285
- (Hashimoto 1998) Hashimoto T et al., 1998  
Molecular cloning of plant spermidine synthases  
*Plant Cell Physiology* 39, pp. 73–79
- (Hemscheidt 1992) Hemscheidt T und Spenser ID, 1992  
Biosynthesis of 6- $\beta$ -hydroxytropine in *Datura stramonium*: Nonregiospecific incorporation of [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]acetate  
*Journal of the American Chemical Society* 114, pp. 5472–5473
- (Hemscheidt 2000) Hemscheidt T, 2000  
Tropane and related alkaloids  
*Topics in Current Chemistry* 209, pp. 175–206

- (Henikoff 1992) Henikoff S, Henikoff JG, 1992  
Amino acid substitution matrices from protein blocks  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, pp. 10915–10919
- (Henikoff 1993) Henikoff S, Henikoff JG, 1993  
Performance evaluation of amino acid substitution matrices  
*Proteins* 17, pp. 49–61
- (Herl 2007) Herl V et al. 2007  
 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) from *Digitalis lanata*. Heterologous expression and Characterization of the Recombinant Enzyme.  
*Planta Medica* 73, pp. 704–710
- (Hibi 1992) Hibi N et al., 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, pp. 826–835
- (Hohenschutz 1981) Hohenschutz LD et al., 1981  
Castanospermine, a 1,6,7,8-tetrahydroxy-octahydroindolizidine alkaloid from seeds of *Castanospermum australe*  
*Phytochemistry* 20, pp. 811–814
- (Hrmova 2001) Hrmova M and Fincher GB, 2001  
Plant enzyme structure: Explaining substrate specificity and the evolution of function  
*Plant Physiology*, 125, pp. 54–57
- (Humphrey 2001) Humphrey AJ und O'Hagan D, 2001  
Tropane alkaloid biosynthesis. A century old problem unresolved  
*Natural Products Report* 18, pp. 494–502
- (Imanishi 1998) Imanishi S et al., 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, pp. 1101–1111
- (Israel 1993) Israel DI, 1993  
A PCR-based method for high stringency screening of DNA library.  
*Nucleic Acids Research* 21, pp. 2627–2631
- (Jacob 1977) Jacob F 1977  
Evolution and tinkering.  
*Science* 196 , pp. 1161–1166
- (Jenett-Siems 1993) Jenett-Siems K, Kaloga M und Eich E, 1993  
Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulaceae  
*Phytochemistry* 34, pp. 437–440
- (Jones 1991) Jones CG and Firn RD 1991  
On the evolution of plant secondary chemical diversity.  
*Philosophical Transactions of the Royal Society London* 333 , pp. 271–280
- (Jones 1995) Jones G, Willett P und Glen RC, 1995  
Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation  
*Journal of Molecular Biology* 245, pp. 43–53
- (Jörnvall 1995) Jörnvall H et al., 1995  
Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)  
*Biochemistry* 34, pp. 6003–6013

- (Kajander 1989) Kajander EO et al., 1989  
Purification and partial characterization of human polyamine synthases.  
*Biochemical Journal* 259(3), pp. 879–86
- (Kallberg 2002) Kallberg Y et al., 2002  
Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant Genomes  
*Protein Science* 11, pp. 636–641
- (Kallberg 2006) Kallberg Y and Persson B 2006  
Prediction of Coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases  
A hidden Markov model-based method and its application on completed genomes.  
*FEBS Journal* 273 , pp. 1177–1184
- (Keiner 2000) Keiner R und Dräger B, 2000  
Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants  
*Plant Science* 150, pp. 171–179
- (Keiner 2002) Keiner R et al., 2002  
Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.).  
*Plant Molecular Biology* 48, pp. 299–308
- (Khattak 2003) Khattak KF, Rahman AU, Choudhary MI, 2003  
Nortropane alkaloids from the leaves of *Erythoxylum moonii*.  
*Heterocycles* 60, pp. 917–924.
- (Koch 2003) Koch M, Al-Shebaz IA und Mummenhoff K, 2003  
Molecular systematics, evolution, and population biology in the mustard family (Brassicaceae).  
*Annals of the Missouri Botanical Garden* 90, pp. 151–171
- (Koch 2007) Koch M et al., 2007  
Supernetwork Identifies Multiple Events of Plastid trnF(GAA) Pseudogene Evolution in the Brassicaceae  
*Molecular Biology and Evolution* 24(1), pp. 63–73
- (Koelen 1982) Koelen KJ und Gross GG, 1982  
Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*  
*Planta Medica* 44, pp. 227–230
- (Korolev 2002) Korolev S et al., 2002  
The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor  
*Nature Structural Biology* 9, pp. 27–31
- (Kroymann 2005) Kroymann J, Mitchell-Olds T, 2005  
Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation.  
*Nature* 435, pp. 95–98
- (Kutchan 1995) Kutchan TM, 1995  
Alkaloid biosynthesis: The basis for metabolic engineering of medicinal plants  
*Plant Cell* 7, pp. 1059–1070
- (Kutchan 2001) Kutchan TM, 2001  
Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism  
*Plant Physiology* 125, pp. 58–60

- (Laemmli 1970) Laemmli UK, 1970  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* 227, pp. 680–685
- (Laskowski 1993) Laskowski RA et al., 1993  
PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures  
*Journal of Applied Crystallography* 26, pp. 283–291
- (Lebovitz 1998) Lebovitz H, 1998  
 $\alpha$ -glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes  
*Diabetes Review* 6, pp. 132–45
- (Leete 1962) Leete E, 1962  
The Stereospecific Incorporation of Ornithine into the Tropane Moiety of Hyoscyamine  
*Journal of the American Chemical Society* 84, pp. 55–57
- (Leete 1982) Leete E, 1982  
Biosynthesis of the pyrrolidine rings of cocaine and cuscohygrine from [5-<sup>14</sup>C]-ornithine via a symmetrical intermediate.  
*Journal of the American Chemical Society* 104, pp. 1403–1408
- (Leete 1988) Leete E und Kim SH, 1988  
A revision of the generally accepted hypothesis for the biosynthesis of the tropane moiety of cocaine.  
*Journal of the American Chemical Society* 110, pp. 2976–2978
- (Leete 1990) Leete E, 1990  
Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids  
*Planta Medica* 56, pp. 339–352
- (Leete 1991) Leete E et al., 1991  
Late intermediates in the biosynthesis of cocaine: 4-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoate and methyl ecgonine.  
*Journal of the American Chemical Society* 113, pp. 9286–9292
- (Liebisch 1963) Liebisch HW, Schütte HR und Mothes K, 1963  
Putrescin als mögliche Vorstufe des Pyrrolidin-Rings der Tropan-Alkaloide  
*J. Liebig's Annalen der Chemie* 668, pp. 139–144
- (Liebisch 1965) Liebisch HW et al., 1965  
Zur Biosynthese der Tropanalkaloide V  
*Zeitschrift für Naturforschung* 20, pp. 1183–1185
- (Liebisch 1973) Liebisch HW, Bernasch H und Schuette HR, 1973  
Biosynthesis of tropane alkaloids. 12. Biosynthesis of cochlearine.  
*Zeitschrift für Chemie* 13, pp. 372–373
- (Lounasmaa 1993) Lounasmaa M und Tamminen T, 1993  
*The tropane alkaloids.*  
*In: The Alkaloids*, Vol. 44. Academic Press, New York, Brossi, A. (Ed.), pp. 1–114
- (Lynn 1997) Lynn, B, Olmstead, RG, 1997  
Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on ndhF sequences  
*Systematic Botany* 22, pp. 5–17

- (MacKerell 1998) MacKerell AD et al., 1998  
All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins  
*Journal of Physical Chemistry B* 102, pp. 3586–3616
- (Magallón 1999) Magallón SA, Crane PR und Herendeen PS, 1999  
Phylogenetic pattern, diversity, and diversification of eudicots  
*Annals of the Missouri Botanical Garden* 86, pp. 297–372
- (Major 2005) Major LL, Wolucka BA and Naismith JH, 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, pp. 18309–18320
- (Marce 1995) Marce M et al., 1995  
Rapid high performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues.  
*Journal of Chromatography B, Biomedical Applications* 666 [2], pp. 329–335
- (Matsuda 1991) Matsuda J et al., 1991  
Molecular cloning of Hyoscyamine 6- $\beta$ -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*  
*Journal of Biological Chemistry* 266, pp. 9460–9464
- (McGaw 1978) McGaw BA und Woolley JG, 1978  
Stereochemistry of Tropane Alkaloid Formation in *Datura*  
*Phytochemistry* 17, pp. 257–259
- (McGaw 1979) McGaw BA und Woolley JG, 1979  
Metabolism of Hygrine in *Atropa*, *Hyoscyamus* and *Physalis*  
*Phytochemistry* 18, pp. 189–190
- (Mesnard 2002) Mesnard F et al. 2000  
Use of  $^{15}\text{N}$  reverse gradient two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to follow metabolic activity in *Nicotiana plumbaginifolia* cell-suspension cultures  
*Planta* 210, pp. 446–453
- (Mi 2002) Mi Q et al., 2002  
Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay.  
*Cancer Letters* 184, pp. 13–20
- (Michael 1996) Michael AJ et al., 1996  
Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA  
*Biochemical Journal* 314, pp. 241–248
- (Molyneux 1993) Molyneux RJ et al., 1993  
Calystegines, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* 304, pp. 81–88
- (Molyneux 1996) Molyneux RJ, Nash RJ und Asano N, 1996  
The chemistry and biological activity of calystegines and related nortropane alkaloids  
*Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Elsevier Science Ltd., Oxford, Pelletier, S. W., pp. 303–343

- (Moore 1993) Moore JM et al., 1993  
1-Hydroxytropacocaine: an abundant alkaloid of *Erythroxylum novogranatense* var., *novogranatense* and var. *truxillense*.  
*Phytochemistry* 36, pp. 357–360
- (Nakajima 1993) Nakajima K, Hashimoto T und Yamada Y, 1993  
Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, pp. 9591–9595
- (Nakajima 1994) Nakajima K, Hashimoto T und Yamada Y, 1994  
Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites.  
*Journal of Biological Chemistry* 269, pp. 11695–11698
- (Nakajima 1998) Nakajima K et al., 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, pp. 4876–4881
- (Nakajima 1999a) Nakajima K et al., 1999a  
Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecificities of two tropinone reductases  
*Journal of Biological Chemistry* 274, pp. 16563–16568
- (Nakajima 1999b) Nakajima K und Hashimoto T, 1999b  
Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns  
*Plant Cell Physiology* 40, pp. 1099–1107
- (Nakajima 1999c) Nakajima K et al., 1999c  
Structures and expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyoscyamus niger*  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63, pp. 1756–1764
- (Nakajima 1999c) Nakajima K et al., 1999d  
Insight into the molecular evolution of two tropinone reductases  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1819–1822
- (Nakanishi 1996) Nakanishi M et al., 1996  
Involvement of two basic residues (Lys-17 and Arg-39) of mouse lung carbonyl reductase in NADP(H)-binding and fatty acid activation: site-directed mutagenesis and kinetic analyses  
*Journal of Biochemistry* 120, pp. 257–263
- (Nakanishi 1997) Nakanishi M et al., 1997  
Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 272, pp. 2218–2222
- (Nare 1997) Nare B et al., 1997  
New approaches to Leishmania chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity.  
*Parasitology* 114, Suppl:S101–10
- (Nash 1993) Nash RJ et al., 1993  
Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth

- (Acherontia atropus)  
*Phytochemistry* 34, pp. 1281–1283
- (Ober 1999) Ober D und Hartmann T, 1999  
Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis evolved from deoxyhypusine synthase  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, pp. 14777–14782
- (Ober 2000) Ober D, Harms R und Hartmann T, 2000  
Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vulgaris*: a revision  
*Phytochemistry* 55, pp. 305–309
- (Oberthür 2004) Oberthür C et al., 2004  
The elusive indigo precursors in woad (*Isatis tinctoria* L.) - Identification of the major indigo precursor, isatan A, and a structure revision of isatan B.  
*Chemistry & Biodiversity* 1, pp. 174–182
- (Olmstead 1992) Olmstead RG und Palmer JD, 1992  
A chloroplast DNA phylogeny of the solanaceae: subfamilial relationships and character evolution  
*Annals of the Missouri Botanical Garden* 79, pp. 346–360
- (Olmstead 1994) Olmstead RG und Sweere JA, 1994  
Combining data in phylogenetic systematics: An empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae  
*Systematic Biology* 43, pp. 467–481
- (Olmstead 1997) Olmstead, RG, Palmer, JD, 1997  
Implications for the Phylogeny, Classification, and Biogeography of Solanum from cpDNA Restriction Site Variation. *Systematic Botany* 22, pp. 19–29
- (Orr 1988) Orr GR et al.  
Synthesis of Chirally Deuteriated (S-Adenosyl-S-Methylsulfonio) Propylamines and Spermidines - Elucidation of the Stereochemical Course of Putrescine Aminopropyltransferase (Spermidine Synthase).  
*Journal of the American Chemical Society*, 110(17), pp. 5791–5799
- (Panicot 2002) Panicot M et al., 2002  
A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis.  
*The Plant Cell* 14(10), pp. 2539–51
- (Pegg 1983) Pegg AE et al., 1983  
Inhibition of bacterial aminopropyltransferases by S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane and by dicyclohexylamine.  
*FEBS Letters* 155, pp. 192–196
- (Pellegrini 2002) Pellegrini E und Field MJ, 2002  
A generalized-born solvation model for macromolecular hybrid-potential calculations  
*Journal of Physical Chemistry A* 106, pp. 1316–1326
- (Persson 1995) Persson B, Krook M und Jörnvall H, 1991  
Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes  
*European Journal of Biochemistry* 200, pp. 537–543
- (Pichersky 2006) Pichersky E, Sharkey TD und Gershenzon J, 2006  
Plant volatiles: a lack of function or a lack of knowledge?  
*TRENDS in Plant Science* 11(9)

- (Platonova 1963) Platonova TF und Kuzovkov AD, 1962  
On the alkaloids of the arctic spoonwort, *Cochlearia arctica* SCHLECHTD  
*Medizinskaja Promyshlennost SSSR* 17, pp. 19–20
- (Plowman 1983) Plowman T und Rivier L, 1983  
Cocaine and Cinnamoylcocaine Content of *Erythroxylum* Species  
*Annals of Botany* 51, pp. 641–659
- (Portsteffen 1994) Portsteffen A, Dräger B und Nahrstedt A, 1994  
The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases.  
*Phytochemistry* 37, pp. 391–400
- (Raina 1984) Raina A et al., 1984  
Polyamine synthesis in mammalian tissues. Isolation and characterization of spermidine synthase from bovine brain.  
*Biochemical Journal* 219(3), pp. 991–1000
- (Rastogi 1993) Rastogi R, Dulson J und Rothstein SJ, 1993  
Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening.  
*Plant Physiology* 103, pp. 829–834
- (Reimann 2004) Reimann A et al. 2004  
Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate Angiosperm lineages.  
*The Plant cell* 73 , pp. 704–710
- (Reinbothe 1992) Reinbothe C et al., 1992  
Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by in vivo and in vitro protein synthesis.  
*Plant Journal* 2, pp. 917–926
- (Robina 2004) Robina I et al., 2004  
Glycosidase Inhibitors as Potential HIV Entry Inhibitors?  
*Current Drug Metabolism* 5(4), pp. 329–361
- (Robins 1991) Robins RJ et al., 1991  
Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 1. Kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites.  
*Planta* 183, pp. 185–195
- (Robins 1994) Robins RJ et al., 1994  
Esterification reactions in the biosynthesis of tropane alkaloids in transformed root cultures.  
*Plant Cell Tissue and Organ Culture* 38, pp. 241–247
- (Robins 1997) Robins RJ et al., 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, pp. 10929–10934
- (Roy 1999) Roy S, 1999  
Multifunctional enzymes and evolution of biosynthetic pathways: retro-evolution by jumps.  
*Proteins*, 37, pp. 303–309
- (Rüttinger 2001) Rüttinger HH und Dräger B, 2001  
Pulsed amperometric detection of calystegines separated by capillary electrophoresis.  
*Journal of Chromatography A* 925, pp. 291–296

- (Sagner 1998) Sagner S et al., 1998  
The biosynthesis of lunarine in seeds of *Lunaria annua*.  
*Phytochemistry* 47, pp. 375–387
- (Samejima 1983) Samejima K et al., 1983  
Purification of putrescine aminopropyltransferase (spermidine synthase) from eukaryotic tissues.  
*Methods in Enzymology* 94, pp. 270–276
- (Salama 1994) Salama AM et al., 1994  
Phytochemical studies on some coca species grown in Colombia.  
*Revista Colombiana de Ciencias Quimico-Farmacéuticas* 22, pp. 27–30
- (Sambrook 1989) Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T, 1989  
*Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- (Saul 1985) Saul R et al., 1985  
Castanospermine inhibits  $\alpha$ -glucosidase activities and alters glycogen distribution in animals.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, pp. 93–97
- (Schimming 1998) Schimming T et al., 1998  
Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae.  
*Phytochemistry* 49, pp. 1989–1995
- (Schimming 2005) Schimming T et al., 2005  
Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae.  
*Phytochemistry* 66, pp. 469–480
- (Scholl 2001) Scholl Y, Asano N und Dräger B, 2001  
Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors.  
*Journal of Chromatography A* 928, pp. 217–224
- (Schwab 2003) Schwab W, 2003  
Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites?  
*Phytochemistry* 62(6), pp. 837–849
- (Shi 2006) Shi R and Lin SX  
Cofactor hydrogen bonding onto the protein main chain is conserved in short chain dehydrogenase/reductase family and contributes to niotinamide orientation.  
*The Journal of Biological Chemistry*, 279 (16), pp. 16778–16785
- (Sichhart 2003) Sichhart Y, 2003  
*Gene, Enzyme und Produkte der Calysteginbildung in Calystegia sepium (L.) R. Br.*  
Dissertationsschrift, Universität Halle
- (Simmonds 1999) Simmonds MSJ, Kite GC und Porter EA 1999  
*Iminosugars as Glycosidase Inhibitors - Nojirimycin and Beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, ed. A. E. Stütz
- (Siminszky 2005) Siminszky et al., 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, pp. 14919–14924

- (Sipl 1993) Sipl MJ, 1993  
Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins.  
*Proteins* 17(4), pp. 355–62
- (Sipl 1995) Sipl MJ, 1995  
Knowledge-based potentials for proteins  
*Current Opinion in Structural Biology* 5, pp. 229–235
- (Smith 1986) Smith VA und Macmillan J, 1986  
The partial purification and characterization of gibberellin 2-betahydroxylases from seeds of *Pisum sativum*.  
*Planta* 167, pp. 9–18
- (Stammers 2001) Stammers, DK et al., 2001  
The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain-dehydrogenases / reductases  
*The EMBO Journal* 20 Nr. 23, pp. 6619–6626
- (Stefanovic 2002) Stefanovic S, Krueger L und Olmstead RG, 2002  
Monophyly of the Convolvulaceae and circumscription of their major lineages based on DNA sequences of multiple chloroplast loci.  
*American Journal of Botany* 89, pp. 1510–1522
- (Stenzel 2006) Stenzel O, Teuber M und Dräger B, 2006  
Putrescine *N*-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant.  
*Planta* 223(2), pp. 200–212
- (Stevens 2001) Stevens PF, 2001 onwards  
Angiosperm Phylogeny Website [online] Version 5, Mai 2004 erhältlich auf: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> accessed: Januar 2007
- (Stewart 1999) Stewart PM und Krozowski ZS, 1999  
11- $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase.  
*Vitamines and Hormones* 57, pp. 249–324
- (Suzuki 1999) Suzuki K, Yamada Y und Hashimoto T, 1999  
Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle.  
*Plant Cell Physiology* 40, pp. 289–297
- (Tabor 1983) Tabor CW und Tabor H, 1983  
Putrescine aminopropyltransferase *Escherichia coli*.  
*Methods in Enzymology* 94, pp. 265–70
- (Tanaka 1996a) Tanaka N et al., 1996a  
Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family.  
*Structure* 4, pp. 33–45
- (Tanaka 1996b) Tanaka N et al., 1996b  
Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*.  
*Biochemistry* 35, pp. 7715–7730
- (Tanaka 2001) Tanaka N et al., 2001 SDR: Structure, Mechanism of Action, and Substrate Recognition  
*Current Organic Chemistry* 5, pp. 89–111

- (Tepfer 1988) Tepfer D et al., 1988  
A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegia sepium*.  
*Journal of Bacteriology* 170, pp. 1153–1161
- (Teuber 2007) Teuber M et al., 2007  
Putrescine *N*-methyltransferases - a structure-function analysis.  
*Plant Molecular Biology in press*
- (Tian 2003) Tian W und Skolnick J, 2003  
How Well is Enzyme Function Conserved as a Function of Pairwise Sequence Identity ?  
*Journal of Molecular Biology* 333, pp. 863–882
- (Tiburcio 1986) Tiburcio AF und Galston AW, 1986  
Arginine decarboxylase as the source of putrescine for tobacco alkaloids.  
*Phytochemistry* 25, pp. 107–110
- (Vazquez-Flota 1997) Vazquez-Flota F et al., 1997  
Molecular cloning and characterization of desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.  
*Plant Molecular Biology* 34, pp. 935–948
- (Walton 1994) Walton NJ et al., 1994  
Purification and properties of putrescine *N*-methyltransferase from transformed roots of *Datura stramonium* L.  
*Planta* 193, pp. 9–15
- (Wang 2002) Wang R, Lai L und Wang S, 2002  
Further Development and Validation of Empirical Scoring Functions for Structure-Based Binding Affinity Prediction.  
*Journal of Computer-Aided Molecular Design* 16, pp. 11–26
- (Watson 2001) Watson AA et al., 2001  
Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications.  
*Phytochemistry* 56, pp. 265–29
- (Werck-Reichhart 1995) Werck-Reichhart D, 1995  
Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism.  
*Drug Metabolism and Drug Interactions* 12, pp. 221–243
- (Wieckhorst 1995) Wieckhorst et al., 1995  
Voglibose (AO-128) is an efficient  $\alpha$ -glucosidase inhibitor and mobilizes the endogenous GLP-1 reserve.  
*Digestion* 56(6), pp. 493–501
- (Windsor 2005) Windsor AJ et al., 2005  
Geographic and evolutionary diversification of glucosinolates among near relatives of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae).  
*Phytochemistry* 66, pp. 1321–1333
- (Wink 1999) Wink M, 1999  
Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites  
*In: Biochemistry of plant secondary metabolism*, Sheffield Academic Press, Wink, M., pp. 1–16
- (Woolley 1993) Woolley JG, 1993  
Tropane alkaloids.  
*in: Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, pp. 133–173

- (Wrobel 2002) Wrobel RL et al., 2002  
Heterologous expression and biochemical characterization of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase from the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor*  
*Plant Physiology and Biochemistry*, 40, pp. 265–272
- (Yamamoto 2001) Yamamoto K et al.  
Crystal structure of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 Å resolution.  
*Journal of Biochemistry*, 129, pp. 303–312
- (Yamashita 1999) Yamashita A et al., 1999  
Structure of tropinone reductase-II complexed with NADP<sup>+</sup> and pseudotropine at 1.9 Å resolution: implication for stereospecific substrate binding and catalysis.  
*Biochemistry* 38, pp. 7630–7637
- (Yamashita 2003) Yamashita A et al., 2003  
Capturing Enzyme Structure Prior to Reaction Initiation: Tropinone Reductase-II-Substrate Complexes.  
*Biochemistry* 42, pp. 5566–5573
- (Yasutake 2007) Yasutake Y et al.  
Structural insights into unique substrate selectivity of *Thermoplasma acidophilum* D-Aldohexose Dehydrogenase.  
*Journal of Molecular Biology*, 367, pp. 1034–1046
- (Yazaki 1999) Yazaki K et al., 1999  
Shikonin Biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*: Light-induced Negative Regulation of Secondary Metabolism.  
*Plant Biotechnology* 16, pp. 335–342
- (Yoon 2000) Yoon SO et al., 2000  
Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (*Glycine max*) axes.  
*Biochimica et Biophysica Acta* 1475, pp. 17–26
- (Yoshikawa 1997) Yoshikawa M et al., 1997  
Salacinol potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India.  
*Tetrahedron Letters*, 38(48), pp. 8367–8370
- (Young 1976) Young O und Beevers H, 1976  
Mixed function oxidases from germinating castor bean endosperm.  
*Phytochemistry* 15, pp. 379–385
- (Zabetakis 1998) Zabetakis I, Edwards R und O'Hagan D, 1999  
Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*.  
*Phytochemistry* 50, pp. 53–56
- (Zanolari 2003) Zanolari B et al., 2003  
On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry.  
*Journal of Chromatography A* 1020, pp. 75–89
- (Zhang 2003) Zhang J 2003  
Evolution by Gene Duplication: an update.  
*Trends in Ecology and Evolution* 18 (6) , pp. 292–298

(Zuanazzi 2001)

Zuanazzi JAS et al., 2001

Alkaloids of *Erythroxyllum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil.  
*Biochemical Systematics and Ecology* 29, pp. 819–825.

# F Anhang

## F1 Screening

### F1.1 Erythroxylaceae

Tabelle F.1: Calystegin-Screening

	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>		<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
	<b>Cal A3</b>	<b>Cal A5</b>	<b>Cal B2</b>		<b>Cal A3</b>	<b>Cal A5</b>	<b>Cal B2</b>
<i>E. aturense</i>	416,8	328,12	2424,58		54,99	37,36	445,69
<i>E. citrifolium</i>	328,55	281,48	195,3		60,81	30,09	67,45
<i>E. caneifolium</i>	301,53	315,98	375,97		1,61	37,37	89,42
<i>E. suberosum</i>	136,89	142,74	202,49		17,4	12,65	33,93
<i>E. coca Tingo Maria</i>	137,19	219,83	310,61		16,56	3,94	60,03
<i>E. coca Trujillo</i>	125,38	155,47	390,22		14	20,13	79,54
<i>E. novogranatense</i>	192,76	490,61	187,78		37,52	239,4	80
<i>E. martii</i>	104,06	98,85	21,81		2,54	0,38	8,05
<i>E. pulchrum</i>	158,68	122,16	238,92		30,55	6,19	41,34
<i>E. glazioui</i>	170,22	227,85	130,89		29,5	68,07	110,06
<i>E. gonocladum</i>	278,7		567,62		19,74		67,51
<i>E. havanense</i>	167,73		220,73		3,93		23,03
<i>E. magnoliifolium</i>	147,61		56,07		17,97		27,61
<i>E. mikanii</i>	156,23		225,33		42,29		123,78
<i>E. mucronatum</i>	154,61		203,22		21,65		54,32
<i>E. myrsinites</i>	177,69		82,91		20,7		16,62
<i>E. amazonicum</i>	144,18		1064,85		18,63		237,49
<i>E. campestre</i>	141,28		939,7		10,63		220,08
<i>E. cumanense</i>	105,12		64,88		38,16		
<i>E. deciduum</i>	246,13		194,03		7,28		62,22
<i>E. aff impressum</i>	144,464		672,42		16,1		438,27
<i>E. mexicanum</i>	130,95		113,86		31,08		88,55
<i>E. orinocense</i>	127,29		1130,46		27,28		639,71
<i>Mate de Coca Boliviana</i>		183,73	258,03			40,66	97,75
<i>E. ochrantum</i>	387,56	248,69			100,1	63,96	
<i>E. ovalifolium</i>	154,19	131,78			10,52	1,65	
<i>Schizanthus Grahamii</i>	157,18				14,86		
<i>E. mattosilvae</i>	124,21				1,55		
<i>E. passerinum</i>	162,2				13,97		
<i>E. suberosum</i>	179,69				31,8		
<i>E. roraimae</i>	130,45				26,64		
<i>E. pictum</i>	230,88				24,26		
<i>E. lealcostae</i>			64,86				10,78
<i>E. andrei</i>			27,91				4,36
<i>E. hypoleucum</i>			67,66				13,96
<i>E. rufum</i>			881,37				7,03
<i>E. subrotundum</i>		162,76				36,11	
<i>E. shatona</i>		168,49				3,25	

Alle Werte in [mg/gTM].

Tabelle F.2: Übersicht Proben Erythroxylaceae; Spezies; Sammlungsdaten 1

Probe	Spezies Sammler	Sammlungsdaten	FMAN	Nummer
1	<i>E. amazonicum</i> Peyr. vel aff.	Venezuela. Estado Falcon. 111103000 N., 694100000 W. Alt. 1200 – 1400 m. Coll. T. Plowman, P.E. Berry, R. Wingfield; March 1984	F193I666	13413
2	<i>E. andrei</i> sp. nov	Brazil. Estado da Bahia. 14040 S., 38580 W. Sea level. Coll. T. Plowman, A.M. de Carvalho; Feb. 1983	F19I6656	12786
3	<i>E. argentinum</i> O.E. Schulz	Bolivia. Depto. Tarija. Prov. OConnor, 21250 S., 64160 W. Alt. 1700 m. Coll. J.C. Solomon; May 1983	F1929656	10404
4	<i>E. bradeanum</i> O.E. Schulz	Brazil. Municipio de Santa Maria Madalena 21560 S., 41520 W. Alt. 450 m. Coll. T. Plowman, H.C. de Lima; Feb. 1983	F19I6492	12950
5	<i>E. campestre</i> (Mart.) St. Hil.	Paraguay. Coll. Hahn	F1948025	1768
6	<i>E. citrifolium</i> St. Hil.	Venezuela. Estado Falcón. 11110 N., 69410 W. Alt. 1100 1200 m. Coll. T. Plowman, P.E. Berry, R. Wingfield; March 1984	F193I672	13424
7	<i>E. coca</i> var. <i>coca</i>	Peru, Trujillo desert, collector: unknown Authenticated by T. Plowman		
8	<i>E. coca</i> var. <i>coca</i>	Peru, Tingo Maria, collector: unknown Authenticated by T. Plowman		
9	<i>E. coca</i> "Mate de Coca Boliviana" Coca Boliviana"	Bolivia, La Paz 1998 5 S Marktkauf, Teebeutel "Mate de Coca Boliviana", durch Alkaloidmuster identifiziert		
10	<i>E. confusum</i> Britt.	Mexico. Quintana Roo Coll. T. Plowman; May 1982	F19I0848	20642
11	<i>E. cumanense</i> H.B.K.	Venezuela. Dtto Federal. Alt. 900 950 m. Coll. P.E. Berry; Feb. 1984		
12	<i>E. cuneifolium</i> (Mart.) O.E. Schulz	Paraguay Parque Nacional Cerro Cora, Coll. Hahn Blätter und Zweige	F1948031	1782
13	<i>E. cuspidifolium</i> Mart.	Brazil. Estado da Bahia. 13400 S., 39070 W. Coll. T. Plowman, A.M. de Carvalho; Feb. 1983 Blätter und Zweige	F19I6662	12810
14	<i>E. deciduum</i> St. Hil.	Brazilia. Municipio de Curitiba Coll. T. Plowman, P.E. Berry, F. Juarez; Jan. 1985	F1954563	4457
15	<i>E. densum</i> Rusby	Venezuela. Dtto. Federal. Alt. 900 950 m Coll. P.E. Berry; Feb. 1984	F1930165	4298
16	<i>E. fimbriatum</i> Peyritsch vel aff.	Coll. T. Plowman	F1899111	11400

Tabelle F.3: Übersicht Proben Erythroxylaceae; Spezies; Sammlungsdaten 2

Probe	Spezies Sammler	Sammlungsdaten	FMAN	Nummer
17	<i>E. foetidum</i> Plowman	Venezuela. Ter. Fed. Amazonas. Depto Átures. Puerto Ayacucho, Coll. T.Plowman; April 1984 E. "nervosum" nom. inval., corrected into <i>E. Foetidum</i>	F1933543	1373
18	<i>E. frangulifolium</i> O.E. Schulz	Brazil. Município de Maricá 22580 S., 42540 W. Sea level	F1916625	12860
19	<i>E. glaziovii</i> O.E. Schulz	Brazil. Município de Cabo Frio. Sea level. Coll. T. Plowman, D. Araujo; Feb. 1985	F1947952	13939
20	<i>E. gonocladum</i> (Mart.) O.E. Schultz	Brazil. Município de Macaé. Alt. 1150 1250 m. Coll. T. Plowman, C. Farney, G. Martinelli, S. Pessoa, A. Costa; Nov. 1985	F1950280	585
21	<i>E. havanense</i> Jacq.	Venezuela. Dtto Fed.. Alt. 900 950 m. Coll. P.E.Berry; 1979	F1859518	3494
22	<i>E. hypoleucum</i> Plowman	Venezuela. Ter. Fed. Amazonas. Depto Rio Negro Coll. T. Plowman; April 1984	F1932963	13700
23	<i>E. aff. impressum</i> O.E. Schulz	Peru. Depto Cajamarca. Prov. Jaén. Alt.520 m. Coll. T. Plowman; July 1986	F1973368	14253
24	<i>E. lealcostae</i> Plowman	Brazil. Estado da Bahia. Município de Salvador.12550 S., 38210 W. Sea level Coll. T. Plowman; Jan. 1983 Blätter und Zweige	F1916645	12770
25	<i>E. ligustrinum</i> var. <i>ligustrinum</i> DC.	( <i>E. aturense</i> Plowman sp. nov. ined.) Venezuela. Ter. Fed. Amazonas. Depto Átures. 5220 N., 67330 W. Coll. T. Plowman; April 1984	F1934043	13773
26	<i>E. macrocarpum</i>	Mauritius Coll. V. Ridges, von William C. Evans., Nottingham Endemic plant of Mauritius, Blätter und Zweige		
27	<i>E. macrophyllum</i> Cav. (syn. <i>lucidum</i> E. H.B.K.)	Mexico. Selva alta Perennifolia. 18180 N., 94470 W. Alt. 300 m. Coll. M. Nee, G. Diggs, F. Ramirez R.; July 1982 früher <i>E. lucidum</i> , korrigiert in <i>E. macrophyllum</i>	F1921436	25112
28	<i>E. macrophyllum</i> Cav. var. <i>savannarum</i> Plowman	<i>E. Savannarum</i> Plowman sp. nov. ined.) Venezuela. Ter. Fed. Amazonas. Depto Átures Coll. T. Plowman, F. Guánchez; April 1984 (Independent species <i>E. savannarum</i> is not described)	F1934047	13757
29	<i>E. macrophyllum</i> Cav.	Coll. T. Plowman, H. Kennedy	F1763768	5804

Tabelle F.4: Übersicht Proben Erythroxylaceae; Spezies; Sammlungsdaten 3

Probe	Spezies Sammler	Sammlungsdaten	FMAN	Nummer
30	<i>E. magnoliifolium</i>	St. Hil. Brazil. Município Rio de Janeiro. Mata de Lagoá. Alt. 150 350 m. Coll. T. Plowman; April 1980	F1872652	10101
31	<i>E. martii</i> Peyr.	Brazil. Estado da bahia. Município de Ituberá. 13400 S., 39070 W. Coll. T. Plowman, A.M. de Carvalho; Feb. 1983	F1916659	12805
32	<i>E. mattos-silvae</i> Plowman	Brazil. Município de Ilhéus Coll. T.Plowman, L.A.M. Silva, T.S. dos Santos; Feb. 1985	F1944101	13970
33	<i>E. mexicanum</i> H.B.K.	Mexico. Município San Andre´s Tuxtla.182703000 N., 951101500 W. Alt. 300 m. Coll. M. Nee, G. Diggs, G.Schatz; July 1982	F1921739	24756
34	<i>E. mikanii</i> Peyr.	Brazil. Município de Ilhéus Coll. T. Plowman, L.A.M.Silva, T.S. dos Santos; Feb. 1985	F1944044	13959
35	<i>E. mucronatum</i> Benth.	Brazil. Município de Ilhéus Coll. T. Plowman	F1898255	11375
36	<i>E. myrsinites</i> Mart.	Brazil. Município de Balsa Nova. Alt. 885 m. Coll.T. Plowman, P.E. Berry; Jan. 1985 Leaves and twigs	F1954578	4490
37	<i>E. ochranthum</i> Mart.	Brazilia. Município de Ilhéus Coll. T. Plowman, L.A.M. Silva, T.S. dos Santos; Feb. 1985	F1944049	13968
38	<i>E. orinocense</i> H.B.K.	Venezuela. Ter. Fed. Amazonas. Depto Áturess.Savanna Coll. T. Plowman, F. Guánchez; April 1984	F1934045	13755
39	<i>E. ovalifolium</i> Peyr.	Brazil. Município de Marica ´ 22580 S., 42540 W.Sea level Coll. T. Plowman; Feb. 1983	F1916623	12840
40	<i>E. passerinum</i> Mart.	Brazil. Município de Cabo Frio. Sea level Coll. T.Plowman, D. Araujo; Feb. 1985	F1947948	13936
41	<i>E. pictum</i> E. Mey.	South Africa, Coll. by R.G. Strey, obtained from W.C. Evans. I0277 Stem bark and twigs		
42	<i>E. pulchrum</i> St Hil.	Brazil. Município de Cabo Frio. Sea level Coll. T.Plowman, D. Araujo; Feb. 1985	F1947953	13940

Tabelle F.5: Übersicht Proben Erythroxylaceae; Spezies; Sammlungsdaten 4

Probe	Spezies Sammler	Sammlungsdaten	FMAN	Nummer
43	<i>E. roraimae</i> (sp. aff. <i>E. roraimae</i> ) Klotsch ex O.E. Schulz	Brazil.Amapá. Município de Mazagao. 0100 N., 51370 W. Coll. S. Mori, B.Rabelo, R. Cardoso; Dec. 1984 Corrected into "E. roraimae"	F1962321	17485
44	<i>E. rufum</i> Cav.	Venezuela. Ter. Fed. Amazonas. Depto Átuces Coll. T.Plowman, F. Guaínchez; April 1984	F1934034	13765
45	<i>E. shatona</i> Macbride	Coll. T. Plowman	F1824664	6046
46	<i>E. splendidum</i> Plowman sp. nov.	Brazil. Município de Valença, a. Guaibim. 13180 S., 39000 W. Sea level Coll. T. Plowman, A.M. De Carvalho; Feb. 1983; Zweige und Blätter	F1916633	12818
47	<i>E. suberosum</i> St. Hil.	Coll. Hahn; Jan. 1983	F1948034	1787
48	<i>E. suberosum</i> St. Hil.	Brazil. State of Goiás Coll. M.J. Balick et al.; Nov. 1981	F1945882	1308
49	<i>E. subrotundum</i> St. Hil.	Brazil. Município de Cabo Frio. Armacao de Búzios Coll. T. Plowman, D. Araujo; Feb. 1985	F1947945	13942
50	<i>E. ulei</i> O.E. Schulz	Coll. T. Plowman, M. Ramirez, P.M. Rury	F1896991	11419

FMAN - Field Museum Accession Number

## F1.2 Brassicaceae

Tabelle F.6: Calystegine in *Cochlearia*-Spezies

		A3	B3	A3
<i>Cochlearia officinalis</i>	<i>m</i>	327,84	53,52	
	<i>s</i>	39,87	33,35	
<i>Cochlearia glastifolia</i>	<i>m</i>	1075,15	208,20	67,00
	<i>s</i>	244,71	44,05	10,15
<i>Cochlearia pyrenaica</i>	<i>m</i>	893,21	154,10	21,07
	<i>s</i>	311,20	22,67	6,37
<i>Cochlearia arctica</i>	<i>m</i>	358,40	73,11	
	<i>s</i>	35,81	23,26	
<i>Cochlearia danica</i>	<i>m</i>	4722,25	139,48	218,89
	<i>s</i>	540,84	13,22	24,96
<i>Cochlearia anglica</i>	<i>m</i>	2151,41	142,00	105,45
	<i>s</i>	53,17	3,02	3,40
<i>Cochlearia megalosperma</i>	<i>m</i>	636,98	75,54	
	<i>s</i>	60,51	22,31	
<i>Cochlearia danica</i>	<i>m</i>	643,82	48,06	40,79
	<i>s</i>	157,84	31,51	13,86
<i>Cochlearia polonica</i>		169,15	264,36	

Alle Werte in [ $\mu\text{g/gTM}$ ].

Tabelle F.7: Calystegine in *Cochlearia officinalis* L.

Wurzel	Einjährige Pflanze			Wurzel	Zweijährige Pflanze		
	A5	A3	B3		A5	B3	B2
<i>m</i>	98,88	7,24		<i>m</i>	36,19	12,13	
<i>s</i>	22,71	3,51		<i>s</i>	2,67	2,18	
Blattstiel				Stängel			
<i>m</i>	172,58	26,48	12,34	<i>m</i>	561,50	62,21	31,29
<i>s</i>	27,36	5,28	2,18	<i>s</i>	71,03	4,93	11,68
Blattspreite				Blüten			
<i>m</i>	183,31	41,98	15,65	<i>m</i>	1093,60	19,01	
<i>s</i>	26,61	8,83	7,95	<i>s</i>	10,22	0,39	

Alle Werte in [ $\mu\text{g/gTM}$ ].

Tabelle F.8: Calystegine in Brassicaceae

Probe		A5	B3	A3	B2
		[µg/gTM]	[µg/gTM]	[µg/gTM]	[µg/gTM]
<i>Calepina irregulans</i> Th.		143,25	24,31	6,18	
<i>Calepina irregulans</i> Th.		154,20	25,13	6,19	
	<i>m</i>	148,72	24,72	6,19	
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.		219,38	21,25	7,63	
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.		202,85	21,49	7,54	
	<i>m</i>	211,12	21,37	7,58	
<i>Moricandia arvensis</i> (L.) DC		63,66	46,45	6,54	
<i>Moricandia arvensis</i> (L.) DC		42,93	39,90	4,65	
	<i>m</i>	53,30	43,18	5,59	
<i>Crambe kotschyana</i> Boiss.		19,95	15,74	3,32	
<i>Crambe kotschyana</i> Boiss.		22,27	17,59	4,52	
	<i>m</i>	21,11	16,67	3,92	
<i>Crambe orientalis</i> Jacq		66,88	49,42	7,13	
<i>Crambe orientalis</i> Jacq		55,17	36,79	11,03	
	<i>m</i>	61,03	43,10	9,08	
<i>Crambe maritima</i> L.		20,34	27,98	3,22	
<i>Crambe maritima</i> L.		19,50	26,41	2,70	
	<i>m</i>	19,92	27,20	2,96	
<i>Hesperis matronalis</i> L.		6,35	38,96		
<i>Hesperis matronalis</i> L.		6,88	36,24		
	<i>m</i>	6,62	37,60		
<i>Camelina sativa</i> (L.) Cantz		5,53	5,59	1,66	3,49
<i>Camelina sativa</i> (L.) Cantz		5,20	4,08	1,33	2,85
	<i>m</i>	5,36	4,83	1,49	3,17
<i>Iberis amara</i> L.		11,17	10,33		
<i>Iberis amara</i> L.		12,00	9,17		
	<i>m</i>	11,59	9,75		

Alle Werte in [µg/gTM].

### F1.3 GC-MS Identifizierung Calystegine in Brassicaceae am Beispiel *Cochlearia officinalis* L. Blüten

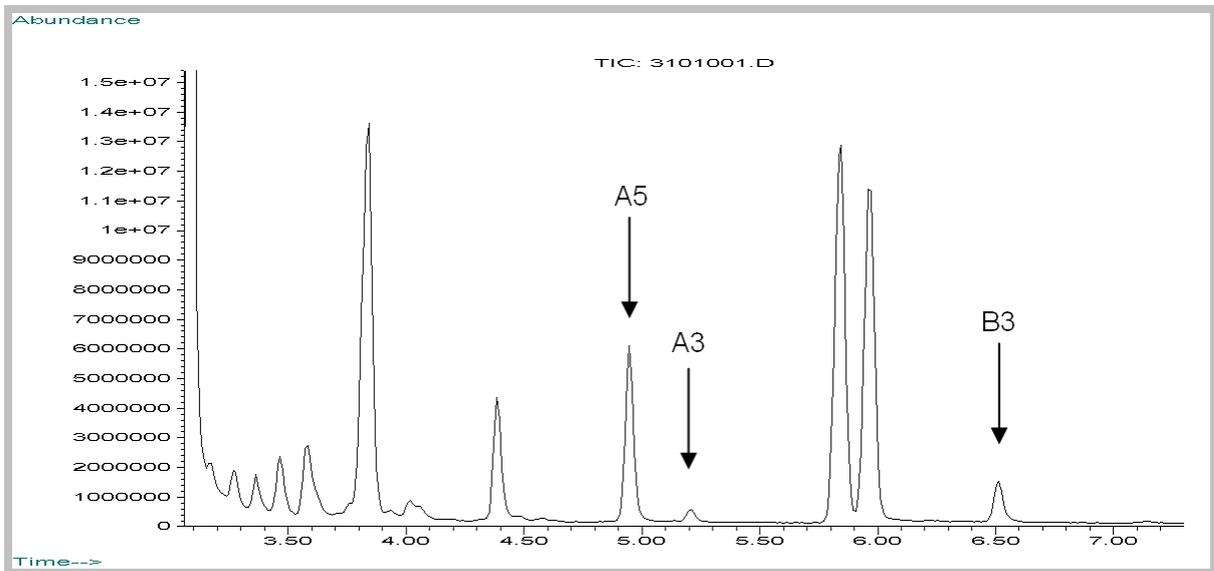


Abbildung F.1: Gaschromatogramm *Cochlearia officinalis* L. Blüten

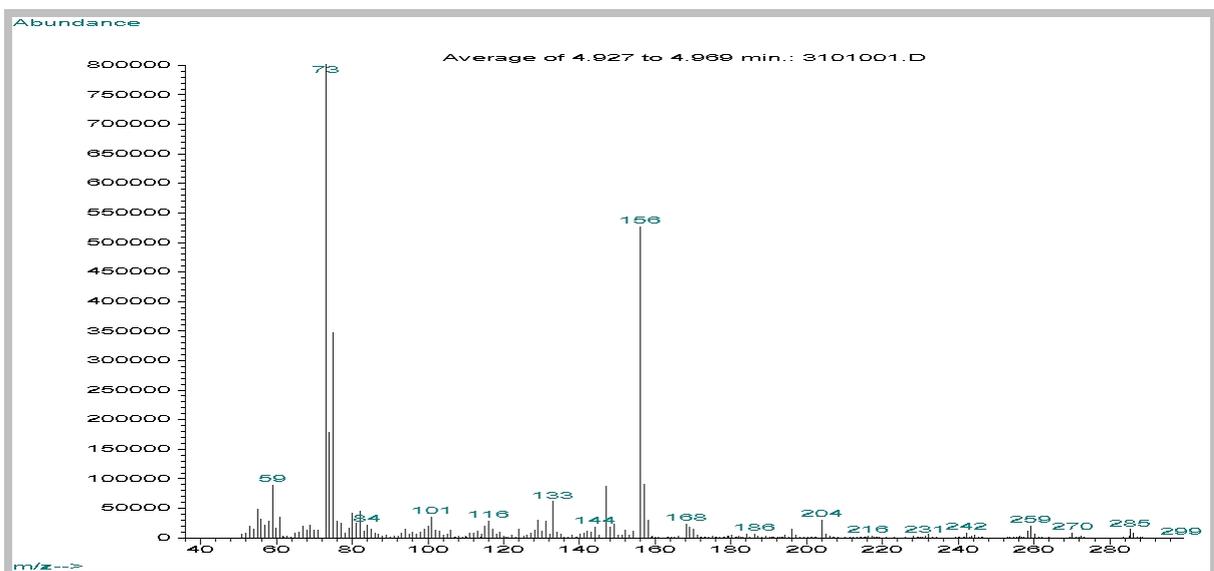


Abbildung F.2: *Cochlearia officinalis* L. Blüten;  
Massenspektrum Peak bei 4,9 min; Calystegin A5

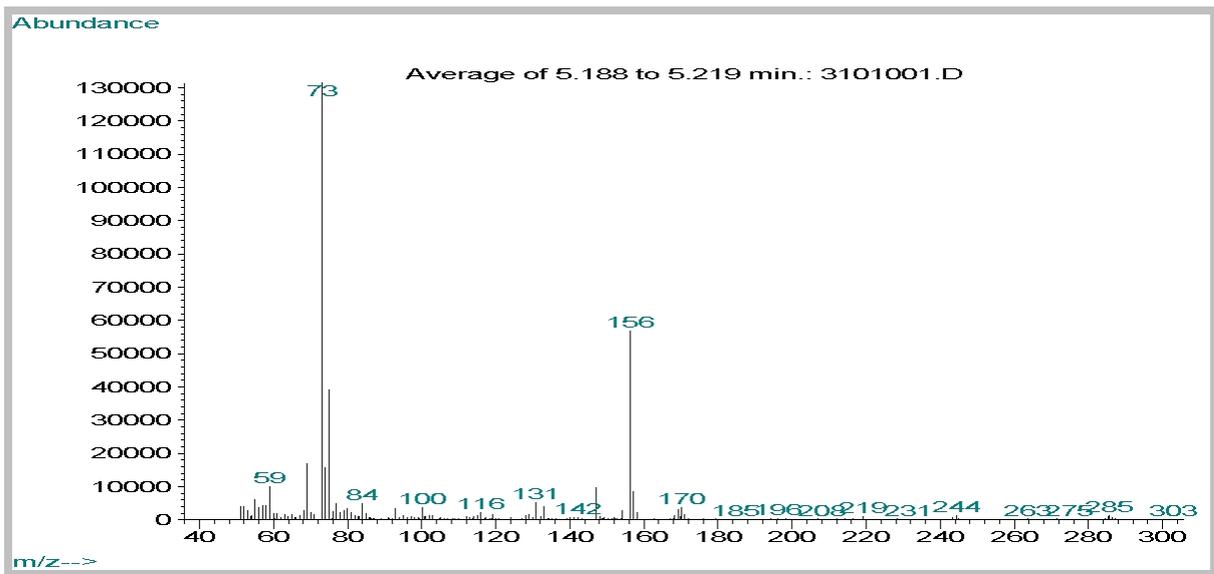


Abbildung F.3: *Cochlearia officinalis* L. Blüten;  
Massenspektrum Peak bei 5,2 min; Calystegin A3

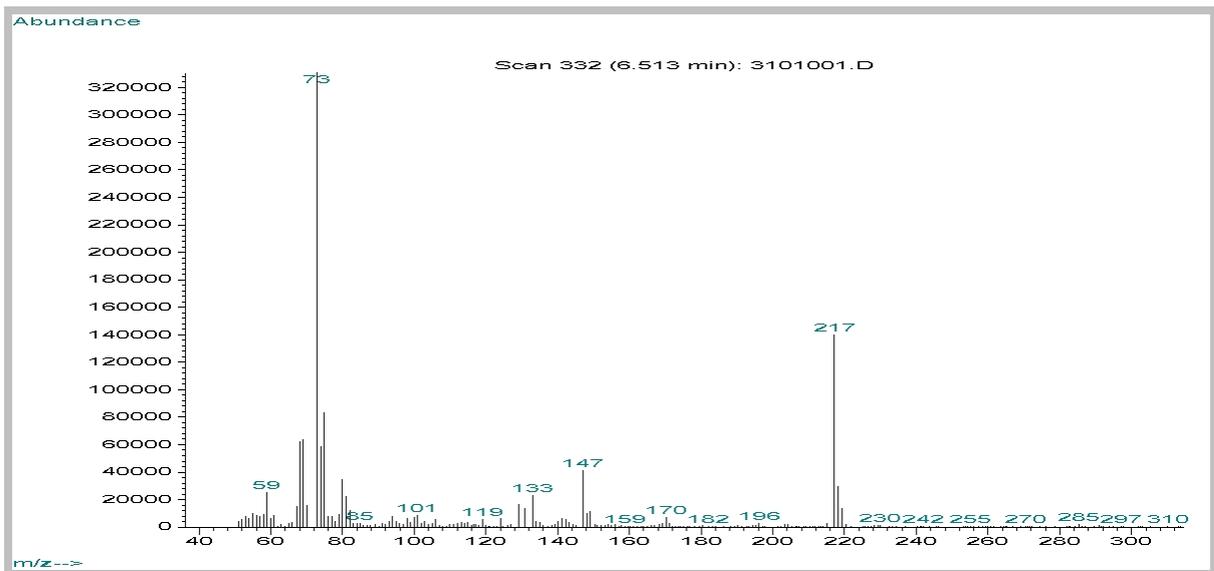


Abbildung F.4: *Cochlearia officinalis* L. Blüten;  
Massenspektrum Peak bei 6,5 min; Calystegin B3

## F2 Kinetik COTR und ATSDR

### F2.1 COTR

Tabelle F.9: Spezifische Aktivitäten Substratanaloga

Substrat	Wildtyp		Mutante Y209S	
	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
Tropinon	305,69	48,27	n.m.	n.m.
TBON	1745,25	18,38	768,47	18,96
3-Methylcyclohexanon	14002,60	1648,25	116572,33	221,35
4-Methylcyclohexanon	22292,60	3129,17	136450,47	4673,76
N-Methylpiperidin-4-on	8999,07	617,91	643,22	66,57
N-Propylpiperidin-4-on	20003,73	4452,12	4807,65	226,93
Chinuclidinon	1778,91	94,20	867,53	53,79
6-Exohydroxytropinon	189,24	36,99	n.m.	n.m.
Glucose	164,90	25,23	n.m.	n.m.
Fructose	130,81	19,23	n.m.	n.m.
Gluconolacton	151,69	21,68	n.b.	n.b.

Alle Werte in [pkat/mg].

Tabelle F.10: pH-Optimum

pH	<i>m</i>	<i>s</i>
5,0	78,67	13,93
6,0	309,27	26,39
6,5	650,4	40,66
7,0	740,93	30,73
7,5	1180,97	24,18
8,0	1329,37	11,04
8,5	1420,8	69,44
9,0	1067,83	26,18
9,5	708,6	61,32
10,5	241,47	23,61

Alle Werte in [pkat/mg].

Tabelle F.11: Substrattestung NADH

Substrat	$c_{Substrat}$ [mM]	NADH [mM]	Protein [ $\mu$ g]	<i>m</i> [pkat/mg]	<i>s</i> [pkat/mg]
Tropinon	5	50	50	n.m.	n.m.
TBON	5	50	50	274,77	15,81
3-Methylcyclohexanon	5	1	5	44147,00	6579,08
4-Methylcyclohexanon	5	1	5	113566,67	11221,93
N-Methylpiperidin-4-on	5	5	5	n.m.	n.m.
N-Propylpiperidin-4-on	5	5	5	n.m.	n.m.
Chinuclidinon	5	50	50	n.m.	n.m.
6-Exohydroxytropinon	5	50	50	n.m.	n.m.
Nortropinon	5	50	80	n.m.	n.m.

Tabelle F.12: Km-Wert-Bestimmung Substratanaloga

c [mM]	N-Methylpiperidinon		N-Propylpiperidinon		Tropinon		Nortropinon			
	m	s	m	s	m	s	m	s		
30	22271,86	316,86			1	243,40	18,52	1	156,45	9,07
20	21622,81	316,86			2	295,04	0,60	2	331,64	16,33
15	21052,28	242,66			3			3	454,55	89,64
10	17646,39	3527,28	18579,43	2573,31	5	427,01	3,83	5	524,67	12,72
7	13197,19	1103,97	19025,67	2299,65	8			8	481,87	36,76
5	12436,95	236,17	17812,42	3036,10	10	575,43	3,77	10	443,05	32,14
2	4646,49	1616,38	14372,41	1690,65	15	679,61	11,89	15		
1	3130,61	1255,00	10326,47	68,71	20	630,88	22,88	20		
0,5			4143,11	227,35	25	724,29	44,81	25		
0,2	2283,14	124,62			30	718,25	14,53	30		

c [µM]	3-Methylcyclohexanon		4-Methylcyclohexanon		Chinucidinon		TBON			
	m	s	m	s	m	s	m	s		
300	19329,85	2809,6			15	2417,07	156,78	0,5	271,8	16,1
200	22488,91	1372,8			10	2042,27	37,79	1	415,4	19,2
100	19904,47	4441,1	35838,72	3415,2	5	1790,73	161,58	5	683,5	47,0
80	18920,15	502,6	42152,41	9602,7	1	687,10	40,25	50	735,4	1,5
60	18711,66	3410,7	36685,36	7312,9	0,8	663,41	55,22	200	1128,2	136,9
40	15940,75	5053,1	38769,96	2116,7	0,6	539,43	50,90	500	1275,8	6,1
20	14658,43	3705,4	31197,08	3428,1	0,2	253,43	15,31	1000	1478,3	18,8
15	10264,13	715,2	21713,88	3260,6	0,1	196,85	9,56	3000	1539,7	27,0
10	9418,12	883,1	17017,11	2889,8				5000	1567,8	9,4
5	5209,13	426,3	8203,14	1661,4						

Alle Werte in [pkat/mg].

## F2.2 ATSDR

Tabelle F.13: pH-Optimum

pH	Chinuclidinon		4-Methylcyclohexanon		
	<i>m</i>	<i>s</i>	pH	<i>m</i>	<i>s</i>
5,50	446,60	66,02	5,00	5580,33	122,15
6,00	2037,33	158,22	6,00	28864,67	710,97
6,50	2306,00	509,03	6,50	27338,50	540,09
7,00	3911,00	169,81	7,00	25907,00	626,04
7,50	4359,13	439,69	7,50	14296,00	586,52
8,00	2711,87	90,45	8,00	8108,67	38,87
8,50	1745,40	725,30	8,50	3740,17	86,57
9,00	416,13	20,41	9,50	2174,67	68,73

Alle Werte in [pkat/mg].

Tabelle F.14: Substratanaloga

	Wildtyp		Mutante S209Y	
	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
Tropinon	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
Nortropinon	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
T-BON	2049,0	41,1	n.m.	n.m.
Chinuclidinon	1977,6	20,1	n.m.	n.m.
N-Methylpiperidinon	19645,2	1227,7	1557,5	153,5
N-Propylpiperidinon	28500,5	1938,1	n.m.	n.m.
3-Methylcyclohexanon	23963,3	1043,3	11055,0	314,3
4-Methylcyclohexanon	116042,3	8714,0	7689,5	332,5

Substratkonzentrationen 5 mM; NADPH-Konzentration 0,2 mM;

Alle Werte in [pkat/mg].

Tabelle F.15: Km-Wert 4-Methylcyclohexanon

$c_{Substrat}$ [mM]	<i>m</i>	<i>s</i>
0,05	17643,55	1097,87
0,075	25701,18	2652,22
0,1	29996,63	3786,55
0,15	34630,26	675,00
0,5	65693,44	9540,50
1	85479,84	8609,69
3	117063,29	15021,32
5	116029,26	8713,01

Alle Werte in [pkat/mg].

## F3 Sequenzen

### F3.1 *cotr*-Sequenzen

> *cotr*

```
ATGGCTAATTTAAGAGAGAGCTCGAGAGACAAATCTAGATGGAGCCTTGAAGGCATGACCGCTCTTGTACTGGTGGCTCCAAAGGC
ATCGGAGAAGCTGTGGTGGAGGAACTAGCCATGTTGGGAGCAAGAGTCCACACATGTGCAAGAGACGAACTCAGCTTCAAGAAAGC
TTACGTGAGTGGCAAGCAAAAGGGTTTCAAGTCACAACCTCTGTTTGGGACGTGTCTTCGCGTGACCAACGAGAGAACTCATGGAA
ACCGTTTCATCTCTCTTCCAAGGAAAACCTCAACATCCTTGTGAACAATGCGGGAACATGTATAACAAAGCCGACCATAGACTACACA
TCAGAAGACTTCTCTTTTCTAATGTCCACAAATCTCGAGTCAAGCTTTCATCTTTTCGCGACTCGCGCATCCTCTCTTGAATCTTCG
GGTTTAGGGAGCATTGTGTTAATATCTTCCGTTGCTAGTGTGTACATGTTAATGTTGGATCCATCTATGGTGCAACTAAAGGAGCA
ATGAATCAGCTAGCAAGAAATTTAGCATGCGAGTGGGCAAGTGACAGCATAAAGGTTAACTCGGTGTGTCCAGGGTTCATATCAACT
CCTTTAGCTTCCAATTATTTTAGAAATGAGGAGTTTAAAAAGAAGTGGAGAATATTATACCAACGGGACGTGTTGGAGAGGCAAAAT
GAAGTATCATCGCTGTTGCATATCTTTGTCTCCCTGCGGCTTCTTACGTAACCTGGTCAAACCATTTGCGTTGACGGAGGTTTCTCG
GTCAACGGTTTCACTTTCAAGTCTTTGCCTTTAAGATAA
```

> COTR

```
MANLRESSRDKSRWSLEGMTALVTGGSKGIGEAVVEELAMLGARVHTCARDQTLQESLREWQAKGFQVTTTSCVDVSSRDQREKLME
TVSSLFQGKLNILVNNAGTCITKPTIDYTSDFSLMSTNLESSFHLSQLAHLPLKSSGLGSI VLISVASVVHVNVGSIYGATKGA
MNQLARNLACEWASDSIKVNSVCPGFISTPLASNYFRNEEFKKEVENI IPTGRVGEANEVSSLVAYLCLPAASYVTGTQICVDGGFS
VNGFTFKSLPLR
```

### F3.2 *spds*-Sequenzen

> *spds*

```
ATGGATCCTTGTCTGCTACCGATTTGAAACGACCTAGAGAAGAGGACGCTAACTCCGCCGCCGCTTCTAACGGCGATCCGACGAAG
GAGCCTGCTTGTCTCTCCGTGATTCTGGCTGGTCTCCGAGATGAGTCTATGTGGCCAGGGGAGGCACACTCTTTGAAAGTT
GAGAAGGTTTTGTTTCAAGGAAATCAGATTATCAAGATGTCATTGTTTTCAAGTCTGCAACATATGGGAAAGTTTTGGTACTTGAT
GGAGTAATACAGCTTACCGAAAGAGACGAATGCGCGTATCAGGAGATGATCACTCACCTTCCATTGTGCTCTATCCCTAATCCTAAG
AAGGTCTTGTTATTGGAGGAGGAGATGGAGGTGTCCTGCGAGAAGTTGCGCGCCATGCTTCTGTTGAGCATATTGACATGTGTGAG
ATTGATAAAATGGTGGTAGATGTGTCTAAACAGTTTTTCCCTGATGTAGCAATTGGATATGAGGATCCTCGAGTGAACCTTGTGATT
GGCGATGGTGTGCTTTCTTGAAGAATGCCGAGAAGGATCATAACGATGCAGTTATTGTTGACTCATCAGATCCTATAGGTCCAGCA
AAAGAGCTGTTTGAGAAACCATTCTTCCAATCCGTAGCTAGAGCTCTACGACCTGGTGGTGTGTGCACTCAAGCCGAAAAGCTTG
TGGCTTCACATGGACATCATCGAAGACATTGTTTCAAATGCGGTGAGATCTTCAAAGGTTCTGTCAACTATGCATGGACCAGCGTC
CCAACATACCCAAGTGGAGTTATTGGGTTTATGTTGTGTTCAACGGAGGGACCCGATGTGCGACTTCAAAAACCGGTGAACCTCGATT
GATGAGAGCTCTAGCAAATCAAACGGACCCTTGAAGTTTTACAACGCCGAGATTCATTCAGCTGCGTTCTGCTTACCTTCTTTCGCC
AAGAAGGTAATCGAGTCAAAATCCAATTGA
```

> SPDS

```
MDPCSATDLKRPREDANSAAAANGDPTKEPACFSSVIPGWFSEMSMPWPGEAHSKLVKVEKVLFGQKSDYQDVI VFKSATYGVKVLVLD
GVIQLTERDECAEQEMITHLPLCSIPNPKKVLVIGGGDGGVLEVARHASVEHIDMCEIDKMVDVSKQFFPDVAIGYEDPRVNLVI
GDGVAFKNAAEQSYDAVIDVSSDPIGPAKELFEKPFQSVARALRPGGVVCTQAESLWLHMDI IEDIVSNCREIFKGSVNYAWTSV
PTYPGVI GFMLCSTEGPDVDFKNPVNSIDESSKSNGLPKFYNAEIHSAAFCLPSFAKKVIESKSN
```

## F4 Kinetik Putrescin umsetzendes Enzym

### F4.1 Bildung von MP; Abhängigkeit von Putrescin- und SAM-Konzentration

Tabelle F.16: SAM- und Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung

<b>SAM/Putrescin</b>	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
100 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	0,00	12,14	26,36	129,49	303,69	459,20	814,52
<i>s</i>	0,00	1,71	7,85	6,97	9,54	55,28	78,99
150 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	0,78	32,92	68,10	355,13	607,16	1026,31	1278,28
<i>s</i>	0,63	5,93	1,56	25,15	63,43	137,10	162,84
250 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	0,00	20,18	39,38	255,07	548,69	869,83	961,45
<i>s</i>	0,00	8,87	6,83	49,16	112,49	49,97	131,14
500 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	1,39	16,95	37,52	377,44	659,48	955,71	1297,17
<i>s</i>	1,61	6,06	3,18	54,75	104,94	26,51	78,52
750 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	2,20	13,35	23,18	169,71	316,82	545,02	709,97
<i>s</i>	2,57	1,63	9,15	6,75	68,94	71,23	57,42
1000 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	0,00	0,52	20,90	125,03	200,58	357,25	584,94
<i>s</i>	0,00	0,51	2,90	34,11	36,45	80,56	67,51

SAM 100–1000  $\mu\text{M}$ ; Putrescin 0,1–10 mM; alle Werte in [pkat/mg]

Tabelle F.17: Wiederholung SAM- und Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung

<b>SAM/Putrescin</b>	1,5	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
10 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	28,37	29,81	204,97	278,94	415,55	463,12	469,00
<i>s</i>	8,48	2,20	29,19	33,36	37,15	84,72	26,56
25 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	29,78	174,73	242,54	322,94	415,23	610,23	883,07
<i>s</i>	13,31	29,01	22,23	22,24	77,18	58,91	76,04
50 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	35,70	185,06	187,23	406,25	503,59	488,23	533,03
<i>s</i>	1,31	32,02	79,78	199,05	70,85	35,74	37,08
250 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	32,45	215,35	248,30	382,97	517,67	565,66	606,50
<i>s</i>	17,16	64,33	24,34	73,33	17,09	48,68	44,09
350 $\mu\text{M}$							
<i>m</i>	35,25	347,04	388,31	535,28	710,46	766,39	1251,63
<i>s</i>		64,89	82,97	66,68	116,56	91,84	211,90

SAM 10–350  $\mu\text{M}$ ; Putrescin 1,5–15 mM; alle Werte in [pkat/mg]

Tabelle F.18: Spermin- und Spermidinbildung

SAM Putrescin [mM]	750 $\mu$ M				1 mM			
	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
	<b>Spmdn</b>	<b>Spmn</b>	<b>Spmdn</b>	<b>Spmn</b>	<b>Spmdn</b>	<b>Spmn</b>	<b>Spmdn</b>	<b>Spmn</b>
0,1	5,84	0,00	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	13,92	6,22	1,59	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00
1,0	15,59	6,54	5,50		12,44	0,00	1,82	0,00
2,5	52,83	13,23	0,67	0,68	29,90	6,00	9,83	6,06
5,0	74,70	15,15	16,13	1,58	49,08	14,59	8,64	0,92
7,5	78,11	14,35	14,87	1,12	128,62	21,37	33,62	4,28
10,0	103,78	23,67	17,16	6,43	184,96	26,30	18,12	5,88

Spmdn Spermidin

Spmn Spermin

SAM 0,75 und 1 mM; Putrescin 0,1–10 mM; alle Werte in [pkat/mg]

Tabelle F.19: Wiederholung Putrescinabhängigkeit der MP-Bildung

Putrescin [mM]	<i>m</i>	<i>s</i>
0,25		
0,5	26,53	9,43
0,75	78,26	7,04
1,00	134,90	23,36
1,50	621,72	63,71
2,00	851,19	123,26
2,50	1383,34	326,22
3,00	3232,93	458,36
4,00	5174,16	487,06
5,00	6156,44	116,33
15,00	14636,70	776,24
25,00	15803,82	692,45
50,00	14260,44	1637,60

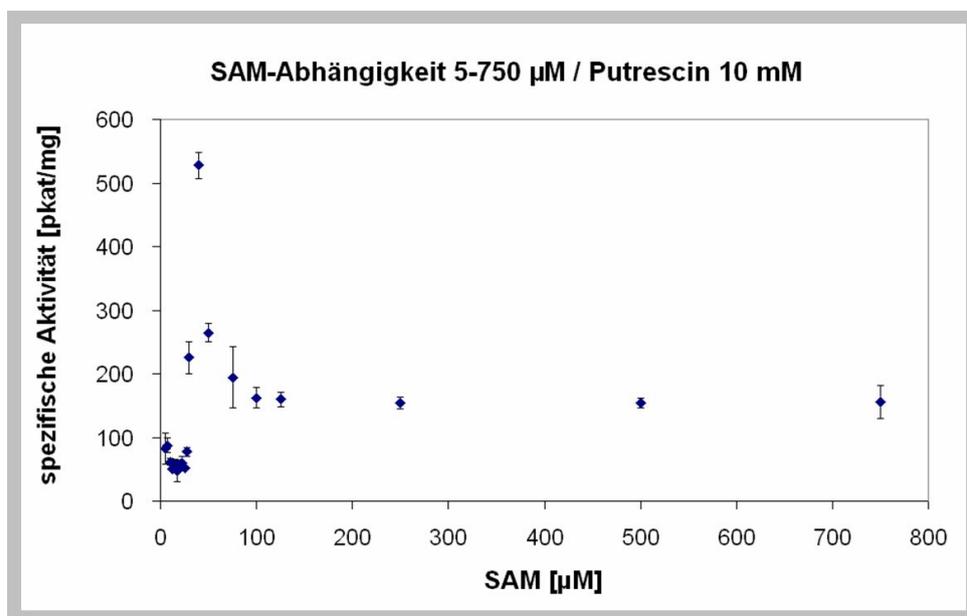
SAM-Konzentration 350  $\mu$ M

alle Werte in [pkat/mg]

Tabelle F.20: SAM-Abhängigkeit der MP-Bildung Wiederholung

	[pkat/mg]	[pkat/mg]	[pkat/mg]	[pkat/mg]	[pkat/mg]
SAM	5,00	7,5	10	12,5	15
<i>m</i>	82,86	87,59	61,43	51,01	58,51
<i>s</i>	24,14	11,10	5,23	2,60	6,86
SAM	17,50	20	22,5	25	27,5
<i>m</i>	46,88	58,51	60,04	52,66	77,77
<i>s</i>	15,85	5,02	9,45	2,55	6,85
SAM	30,00	40	50	75	100
<i>m</i>	225,75	527,50	264,86	194,65	162,23
<i>s</i>	25,07	21,17	14,71	48,27	16,28
SAM	125,00	250	500	750	
<i>m</i>	159,55	154,32	153,82	155,41	
<i>s</i>	11,28	9,66	7,41	25,87	

SAM 5–750  $\mu$ M; Putrescin 10 mM

Abbildung F.5: SAM-Abhängigkeit 5–750  $\mu$ M und Putrescin 10 mM

## F4.2 Bildung von MP; Abhängigkeit von Putrescin und dcSAM-Konzentration

Tabelle F.21: Putrescinabhängigkeit

Putrescin	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2
<i>m</i>	3,24	6,30	24,80	39,53	47,54	59,87
<i>s</i>	2,07	0,53	0,33	13,67	11,23	3,24

Putrescin	2,5	5	15	25	50	
<i>m</i>	69,88	93,82	106,70	114,66	117,71	
<i>s</i>	6,08	36,17	7,66	10,41	15,69	

dcSAM 2,5 mM; Putrescin 0,25–50 mM

alle Werte in [pkat/mg]

$V_{max}=130,21$  pkat

$K_m= 4,19$  mM (nach HANES)

Tabelle F.22: dcSAM-Abhängigkeit

dcSAM	0,5	1	2	3	4	5
	209,52	137,37	95,94	1598,72	1453,91	944,03
	140,87	158,98	74,76	1708,11	1672,84	1204,38
	151,91	242,10	1538,62	1596,88	1027,51	1246,69
<i>m</i>	167,43	179,48	569,77	1634,57	1384,75	1131,70
<i>s</i>	36,86	55,29	839,11	63,69	328,18	163,89

dcSAM	6	7	8	9	10	
	759,16	664,82	1340,03	835,06	224,67	
	923,53	924,71	9082,07	948,87	796,18	
	719,89	1022,26	686,09	939,42	740,84	
<i>m</i>	800,86	870,60	3702,73	907,78	587,23	
<i>s</i>	108,03	184,76	4670,10	63,16	315,20	

Putrescin 10 mM; dcSAM 0,5–10 mM

alle Werte in [pkat/mg]

Die Meßwerte ergaben kein auswertbares Ergebnis.

Tabelle F.23: Spezifische Aktivität der Spermidinbildung dcSAM 5  $\mu$ M

$c_{Put}$	pkat/mg	$c_{Put}$	pkat/mg	$c_{Put}$	pkat/mg	$c_{Put}$	pkat/mg	pkat/mg	$c_{Put}$
0,25	24,04	0,5	n.m.	0,75	5,87	1	6,16	1,5	11,00
	n.m.		n.m.		1553,03		9,79		12,64
	n.m.		56,76		13,44		7,60		n.m.
2,0	12,50	2,5	n.m.	3,0	n.m.	4,0	n.m.	5,0	8,30
	5,13		32,44		n.m.	4,0	n.m.	5,0	4413,50
	n.m.		6,68		n.m.	4,0	n.m.	5,0	n.m.
6,0	n.m.	7,0	n.m.	8,0	9,84	9,0	n.m.	10,0	n.m.
	50,91		n.m.		n.m.		n.m.		22,01
	n.m.		n.m.		n.m.		n.m.		n.m.
15,0	n.m.	25,0	n.m.	50,0	n.m.				
	n.m.		n.m.		n.m.				
	95,08		n.m.		n.m.				

$c_{Put}$  = Putrescinkonzentration [mM]

n.m. = nicht messbar

Tabelle F.24: Spezifische Aktivität der Spermidinbildung Putrescin 10 mM

$c_{dcSAM}$	pkat/mg	$c_{dcSAM}$	pkat/mg	$c_{dcSAM}$	pkat/mg	$c_{dcSAM}$	pkat/mg
0,5	n.m.	1,0	n.m.	2,0	n.m.	3,0	10,52
	34,78		n.m.		51,46		172,65
	44,71		n.m.		8,96		73,84
4,0	77,26	5,0	16,52	6,0	47,11	7,0	44,26
	105,71		23,69		20,92		20,16
	92,50		27,36		10,78		20,13
8,0	27,37	9,0	21,43	10,0	n.m.		
	n.m.		4879,79		21,56		
	n.m.		25,98		17,88		

$c_{dcSAM}$  = Putrescinkonzentration [mM]

n.m. = nicht messbar

Tabelle F.25: Versuch Hemmung durch SAH

SAM		Putrescin [mM]	1		2,5		5
	SAH [ $\mu$ M]	Probe		Probe		Probe	
10 $\mu$ M	25	660/1	15,01	666/7	10,66	672/3	18,93
	50	662/3	17,34	668/9	15,09	674/5	20,70
	125	664/5	36,85	670/1	32,28	676/7	46,97
	ohne		26,36		129,49		303,69
25 $\mu$ M	25	678/9	12,98	684/5	12,85	690/1	14,92
	50	680/1	87,53	686/7	45,36	692/3	18,07
	125	682/3	44,24	688/9	13,26	694/5	37,26
	ohne		39,38		255,07		548,69

SAH 25, 50 100  $\mu$ M; SAM 10, 25  $\mu$ M; Putrescin 1, 2,5 5 mM

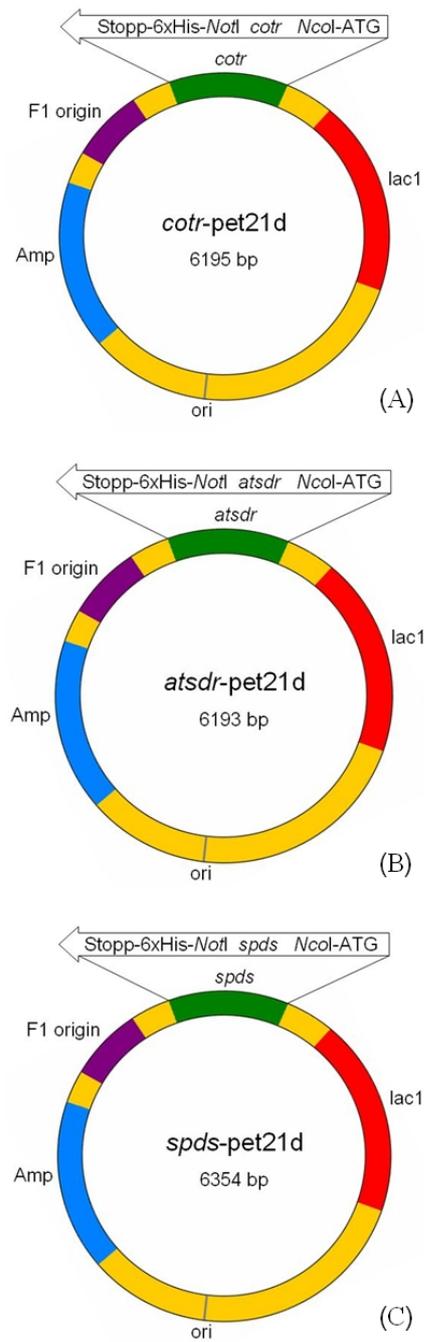
Alle Werte in [pkat/mg].

Mittelwerte  $m$  aus Doppelbestimmungen.

Deutliche Verminderung der Aktivität durch SAH-Zusatz bereits bei 25  $\mu$ M, bei Putrescin über 1 mM.

Für Hemmversuche noch deutlich niedrigere SAH Konzentrationen möglich.

## F5 Vektorkarten

Abbildung F.6: Vektorkarten (A) *cotr* (B) *atsdr* (C) *spds*

# Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. B. Dräger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihre stetige fachliche und persönliche Unterstützung, Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und ihre hilfreichen kritischen Bemerkungen zur Arbeit.

Für eine freundliche Arbeitsatmosphäre sorgte die gesamte Arbeitsgruppe bestehend aus Dr. Yvonne Sichhart, Dr. Olaf Stenzel, Antje-Kristin Kiessling, Margret Hentzschel, Michael Teuber, Anna-Carolin Meier und Dr. Bettina Rahfeld.

Bei Heike Kaiser bedanke ich mich für die schöne Zeit am Institut und im Privaten!

Mein herzlicher Dank gilt ebenso Frau Ködel, Frau Schöne, Frau Watzka und Frau Marx für die ständige und hilfsbereite Unterstützung im technischen Bereich.

Anja Wodak danke ich für ihren Einsatz, der oft über das normale Maß hinausging.

Bei Julia Strunz, Victoria Beyer und Susanne Krieger bedanke ich mich für die gelungene Zusammenarbeit im Rahmen von Diplomarbeiten.

Thank goodness for GHW and FBI - danke für die Rettung verloren geglaubter Daten!

Danke, Frobi, dass Du nie müde wurdest, mich mit Deinen Nachfragen voranzutreiben.

Meinem Steuermann Peter-Paul Heym habe ich zu verdanken, dass dieses Schiff auch in rauen emotionalen Gewässern nie zu kentern drohte. Deine Hilfe war für mich von unschätzbarem Wert.

Das Entstehen dieser Arbeit beruht, wie alles in meinem Leben Erreichte, auf der ausnahmslosen Unterstützung meiner lieben Eltern. Zum Dank widme ich Euch diese Arbeit.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle (Saale), 01.09.2007

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

<b>Name</b>	Brock
<b>Vorname</b>	Andrea
<b>geb. am/in</b>	27.05.1977 Hoyerswerda

## Schulischer Werdegang

1983–1987	15. Polytechnische Oberschule Hoyerswerda
1987–1989	Kinder- und Jugendsportschule Luckenwalde
1989–1990	Kinder- und Jugendsportschule Berlin
1990–1991	15. Oberschule Hoyerswerda
1991–1995	Konrad-Zuse-Gymnasium Hoyerswerda (Abitur)

## Studium/Ausbildung

2004	Certificate in Pharmacy Practice (University of London & Universität Tübingen)
07/2001	Approbation als Apothekerin
2000–2001	Pharmaziepraktikum Globus-Apotheke Hoyerswerda Pharmaziepraktikum Barts and the London NHS Trust London (UK) (pre-registration pharmacist)
1995–1999	Studium der Pharmazie an der Humboldt-Universität zu Berlin

## Tätigkeiten

seit 09/2006	Bayer Bitterfeld GmbH
2006	Waisenhausapotheke Halle/Saale
2002–2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg AG Biogene Arzneistoffe
2001	Apotheke im Globus Hoyerswerda

Andrea Brock                      01.09.2007