

**Calystegine in *Solanum tuberosum* L.-  
Klonierung, Expression und Charakterisierung  
der Tropinonreduktasen I und II, putativer Enzyme des  
Tropanalkaloidstoffwechsels**



**Dissertation**

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Herrn Ronald Keiner**

geb. am 03.03.1970

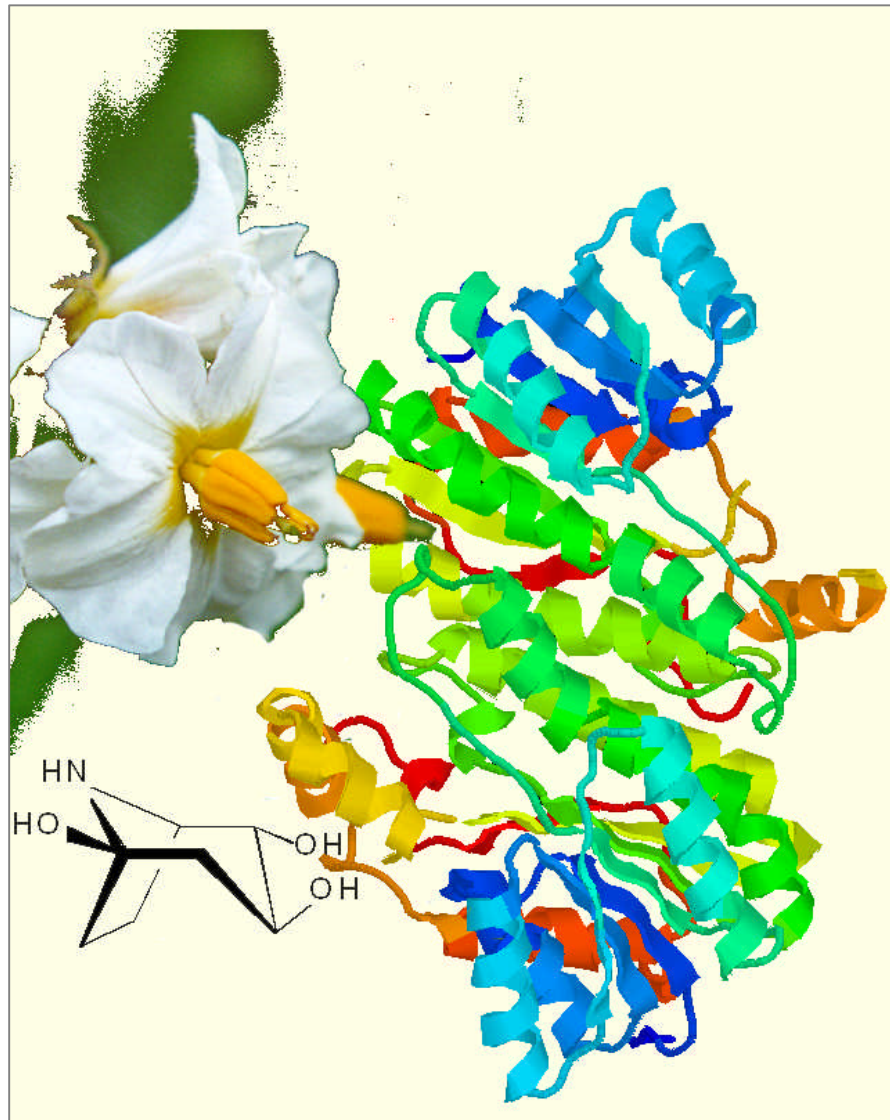
Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Martin Luckner
3. Prof. Dr. Kazufumi Yazaki

Halle/Saale, den 14.12.2001

**urn:nbn:de:gbv:3-000002796**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002796>]



Die Photomontage zeigt eine *Solanum tuberosum* L. Blüte, die Calystegin A<sub>3</sub> Strukturformel und eine Tropinonreduktase I (PDB Nr. 1AE1) im Bänder-Modell, welches durch die Ras Mol-Software erstellt wurde.

<b>A Einleitung</b> .....	1
<b>A 1 Die Calystegine</b> .....	1
A 1.1 Verbreitung der Calystegine .....	2
A 1.2 Glycosidasehemmstoffe .....	3
A 1.3 Tropanalkaloid-Biosynthese .....	4
A 1.4 Regulation der Tropan- und Calysteginbiosynthese .....	7
A 1.5 Die Analytik der Calystegine.....	8
<b>A 2 Aufgabenstellung</b> .....	9
<b>B Material und Methoden</b> .....	11
<b>B 1 Materialien</b> .....	11
B 1.1 Pflanzenmaterial.....	11
B 1.2 Keimungsbedingungen, Pflanzenanzucht und Probennahme .....	11
B 1.3 Bakterienstämme.....	12
B 1.4 Plasmide und Vektoren .....	12
B 1.5 cDNA-Banken.....	12
B 1.6 Oligonukleotide.....	13
B 1.7 Puffer, Standardlösungen und Medien .....	14
B 1.8 Kits und Enzyme.....	14
B 1.9 Chemikalien und Standards .....	15
<b>B 2 Methoden</b> .....	15
B 2.1 Methoden der Analytik.....	15
B 2.1.1 Isolierung und Derivatisierung der Calystegine .....	15
B 2.1.2 Calysteginbestimmung in verletzten Kartoffelkeimen .....	16
B 2.1.3 Fütterungsversuche mit Tropinon.....	16
B 2.1.4 Isolierung der Metabolite und Reaktionsprodukte des Enzymassays	16
B 2.1.5 Gaschromatographie.....	16
B 2.1.6 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie.....	18
B 2.1.7 AMD-TLC ( <i>Automated Multiple Development-TLC</i> ) .....	19
B 2.2 Methoden der Molekularbiologie .....	19
B 2.2.1 Klonierung und Sequenzierung .....	19
B 2.2.2 Isolierung von RNA .....	20
B 2.2.3 Erststrangsynthese von cDNA.....	20
B 2.2.4 Isolierung von cDNA durch PCR-Techniken .....	21
B 2.2.4.1 RT-PCR .....	21
B 2.2.4.2 RACE-PCR .....	22
B 2.2.4.3 Plasmid-PCR .....	24
B 2.2.4.4 PCR zur Selektion .....	24
B 2.2.5 Screening von cDNA-Banken.....	24

B 2.2.6	Isolierung von genomischer DNA	25
B 2.2.7	<i>Southern Blot</i> Analyse	26
B 2.2.8	Northern Blot Analyse	27
B 2.2.9	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	27
B 2.3	Methoden der Biochemie	28
B 2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)	28
B 2.3.2	Enzymassay	29
B 2.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	30
B 2.3.4	Partielle Reinigung und Charakterisierung der StTRII	30
B 2.3.4.1	Partielle Reinigung der TRII mittels FPLC	30
B 2.3.4.2	Konzentrierung des TRII-Proteins	30
B 2.3.4.3	pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität	31
B 2.3.4.4	$K_m$ und $V_{max}$ Bestimmung	31
B 2.3.4.5	Testung von Substratanaloga	31
B 2.3.5	Reinigung der rekombinanten TR-Enzyme als 6xHis-Fusionsprotein	31
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>C 1</b>	<b>Analytik und Akkumulation der Calystegine in <i>S. tuberosum</i></b>	<b>33</b>
C 1.1	Analytik der Calystegine	33
C 1.1.1	Quantifizierung von Calysteginen mittels GC	33
C 1.1.2	Identifizierung von Calysteginen mit GC-MS	34
C 1.2	Akkumulation der Calystegine in <i>S. tuberosum</i>	38
C 1.2.1	Calystegine in verschiedenen Sorten von <i>S. tuberosum</i>	38
C 1.2.2	Calystegine in Geweben der Sorte Liu	39
C 1.2.2.1	Calysteginverteilung in Knollen und Keimen	39
C 1.2.2.2	Calysteginverteilung in Pflanzen	42
C 1.2.2.3	Verteilung der Calystegine innerhalb der Kartoffelkeime	45
C 1.2.2.4	Calysteginakkumulation nach Verletzung	45
<b>C 2</b>	<b>Fütterung von Tropinon an Kartoffelgewebe</b>	<b>46</b>
<b>C 3</b>	<b>Isolierung <i>TRII</i>-homologer cDNA-Sequenzen aus <i>S. tuberosum</i></b>	<b>49</b>
C 3.1	Isolierung eines <i>TRII</i> -cDNA-Fragmentes	49
C 3.2	Isolierung einer <i>TRII</i> -homologen cDNA mit RACE-PCR	49
C 3.2.1	3'-RACE-PCR	49
C 3.2.2	5'-RACE-PCR	50
C 3.2.3	Finale PCR	50

C 3.3 Isolierung einer <i>TRII</i> -homologen cDNA-Sequenz durch Screening einer cDNA-Bank .....	50
<b>C 4 Isolierung einer <i>TRI</i>-homologen cDNA-Sequenz .....</b>	<b>51</b>
<b>C 5 Charakterisierung der Tropinonreduktase-Sequenzen .....</b>	<b>52</b>
C 5.1 Charakterisierung der <i>StTRII</i> -Sequenzen.....	52
C 5.2 Charakterisierung der <i>StTRI</i> -Sequenzen.....	55
<b>C 6 Überexpression und Reinigung der Tropinonreduktasen .....</b>	<b>57</b>
C 6.1 Expression und Reinigung der <i>StTRII</i> für die katalytische Charakterisierung.....	57
C 6.1.1 Expression der <i>StTRII</i> in <i>E. coli</i> .....	57
C 6.1.2 Partielle Reinigung der <i>StTRII</i> mittels FPLC .....	58
C 6.2 Expression und Reinigung der <i>StTRII</i> für die Gewinnung von Antikörpern.....	59
C 6.3 Expression und Reinigung der putativen <i>TRI</i> .....	60
<b>C 7 Biochemische Charakterisierung der Tropinonreduktasen.....</b>	<b>61</b>
C 7.1 Katalytische Charakterisierung der <i>StTRII</i> .....	61
C 7.1.1 Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Reduktaseaktivität .....	62
C 7.1.2 Bestimmung katalytischer Parameter.....	63
C 7.1.3 <i>StTRII</i> -Umsetzung mit Substratanaloga.....	64
C 7.2 Katalytische Charakterisierung der <i>StTRI</i> .....	65
<b>C 8 Genomische <i>Southern Blot</i> Analyse.....</b>	<b>65</b>
<b>C 9 Akkumulation der <i>TR</i>-Transkripte in den Pflanzen.....</b>	<b>66</b>
C 9.1 Expression von <i>TRII</i> .....	67
C 9.2 Expression von <i>TRI</i> .....	68
<b>D Diskussion.....</b>	<b>70</b>
<b>D 1 Die Calystegine .....</b>	<b>70</b>
D 1.1 Verbreitung der Calystegine .....	70
D 1.2 Die physiologische Bedeutung der Calystegine .....	71
D 1.3 Calystegine und ihre Bedeutung für den Menschen.....	73
D 1.4 Tropinon-Fütterungsversuche – Hinweise auf die Biosynthese.....	74
<b>D 2 Die Tropinonreduktasen .....</b>	<b>76</b>
D 2.1 Tropinonreduktasen in Kartoffel .....	76
D 2.2 Die <i>TR</i> gehören zur Familie der SDR-Enzyme.....	77

D 2.3 Die Stereospezifität der Tropinonreduktasen I und II.....	78
D 2.4 Die evolutionäre Entwicklung der Tropinonreduktasen.....	79
D 2.5 Katalytische Eigenschaften der TR.....	82
D 2.6 Die <i>TR</i> -Gene im Kartoffelgenom .....	83
D 2.7 Expression und Lokalisation der Tropinonreduktasen .....	84
<b>D 3 Ausblick.....</b>	<b>86</b>
<b>E Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>F Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>G Anhang .....</b>	<b>I</b>
<b>G 1 Kalibrierung der Calysteginbestimmung.....</b>	<b>I</b>
<b>G 2 Calysteginbestimmung in Kartoffelgeweben .....</b>	<b>I</b>
<b>G 3 <i>S. tuberosum</i> TR-cDNA-Sequenzen .....</b>	<b>IV</b>
G 3.1 <i>TRI</i> -cDNA-Sequenzen.....	IV
G 3.2 <i>TRII</i> -cDNA-Sequenzen.....	VII
G 3.2.1 <i>TRII</i> -cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Désirée.....	VII
G 3.2.2 <i>TRII</i> -cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Liu .....	X
<b>G 4 Vektorkarte StTRII-pET 21d .....</b>	<b>XIII</b>
<b>G 5 Vektorkarte StTRI-His-pET 21d.....</b>	<b>XIV</b>
<b>G 6 Umsetzungsprodukte des Enzymassay .....</b>	<b>XV</b>
G 6.1 Umsetzungsprodukte des StTRII-Enzyms.....	XV
G 6.2 Umsetzungsprodukte des StTRI und des StTRI-homologen Enzyms ....	XV
<b>G 7 Charakterisierung des TRII-Enzyms .....</b>	<b>XVI</b>
G 7.1 pH-Abhängigkeit der TRII-Aktivität .....	XVI
G 7.2 $K_m$ und $V_{max}$ Bestimmung .....	XVII
G 7.3 Umsetzung mit Substratanaloga .....	XIX

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. A-1:</b> Strukturformeln ausgewählter Calystegine.	1
<b>Abb. A-2:</b> Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese.	5
<b>Abb. B-1:</b> Anatomischer Aufbau der Kartoffelknolle.	11
<b>Abb. B-2:</b> RACE-PCR-Schema.	22
<b>Abb. B-3:</b> Prinzip des photometrischen Enzymassays.	29
<b>Abb. B-4:</b> Strukturen von Tropinon-Substratanaloga für den Enzymassay.	32
<b>Abb. C-1:</b> Gaschromatogramme eines Kartoffelkeimextraktes.	34
<b>Abb. C-2:</b> GC-MS-Fragmentierungsmuster von Calystegin-TMS-Derivaten.	35
<b>Abb. C-3:</b> Gaschromatogramm mit Massenspektrum des Calystegins.B <sub>1</sub>	37
<b>Abb. C-4:</b> Akkumulation der Calystegine in verschiedenen Kartoffelsorten.	39
<b>Abb. C-5:</b> Calysteginakkumulation in Knollen und Keimen.	41
<b>Abb. C-6:</b> Calysteginakkumulation in Pflanzen.	43
<b>Abb. C-7:</b> Prozentuales Trockenmasse/Frischmasse-Verhältnis.	44
<b>Abb. C-8:</b> Verteilung der Calystegine in ca. 120 mm langen Kartoffelkeimen.	45
<b>Abb. C-9:</b> Fütterung von Kartoffelkeimen und in vitro Pflanzen mit 5 mM Tropinon.	46
<b>Abb. C-10:</b> Gaschromatogramm (FID-Signal) nach Fütterungsversuchen.	48
<b>Abb. C-11:</b> GC-MS Fragmentierungsmuster des Tropins und Pseudotropins.	48
<b>Abb. C-12:</b> Aminosäurevergleich der TRII-Sequenzen.	54
<b>Abb. C-13:</b> Aminosäurevergleich der TRI-Sequenzen.	56
<b>Abb. C-14:</b> SDS-PAGE der TRII-Überexpression.	57
<b>Abb. C-15:</b> Chromatogramm des Anionenaustauschers Fractogel EMD-DEAE.	58
<b>Abb. C-16:</b> rekombinantes TRII-Protein nach FPLC Anreinigung.	59
<b>Abb. C-17:</b> Reinigungsschema für rekombinantes StTRII-His-Tag-Protein.	60
<b>Abb. C-18:</b> Reinigungsschema für rekombinantes StTRI-SE-His-Tag-Protein.	61
<b>Abb. C-19:</b> pH-Abhängigkeit der TRII-Reduktaseaktivität beim Umsatz von Tropinon.	62
<b>Abb. C-20:</b> Relative Aktivitäten für verschiedene Substratanaloga.	64
<b>Abb. C-21:</b> Nachweis der TRI- und TRII-Gene im Genom von <i>S. tuberosum</i> .	66
<b>Abb. C-22:</b> Expression von TRII in Kartoffelpflanzen und Knollen.	67
<b>Abb. C-23:</b> Expression von TRII in Wurzelkulturen und in vitro Pflanzen.	68
<b>Abb. C-24:</b> Expression von TRI in Kartoffelpflanzen und Knollen.	69
<b>Abb. D-1:</b> Aminosäurevergleich der TR's.	80
<b>Abb. G-1:</b> Eichgerade zur Calysteginbestimmung.	I
<b>Abb. G-2:</b> StTRI-SE-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	IV
<b>Abb. G-3:</b> StTRI-SS-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	V
<b>Abb. G-4:</b> StTRI-homologe cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	VI
<b>Abb. G-5:</b> StTRII-D1-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	VII
<b>Abb. G-6:</b> StTRII-D2-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	VIII
<b>Abb. G-7:</b> StTRII-D3-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	IX
<b>Abb. G-8:</b> StTRII-L1-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	X
<b>Abb. G-9:</b> StTRII-L2-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	XI
<b>Abb. G-10:</b> StTRII-L3-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	XII
<b>Abb. G-11:</b> Vektorkarte TRII-cDNA pET21d.	XIII
<b>Abb. G-12:</b> Vektorkarte TRI-cDNA pET21d.	XIV
<b>Abb. G-13:</b> Gaschromatogramm der TRII-Tropinonumsetzung.	XV
<b>Abb. G-14:</b> Gaschromatogramm der TRII-Nortropinonumsetzung.	XV
<b>Abb. G-15:</b> Gaschromatogramm) der TRI-Tropinonumsetzung.	XV
<b>Abb. G-16:</b> Dünnschichtchromatogramm der Tropinonumsetzung.	XVI
<b>Abb. G-17:</b> TRII K <sub>m</sub> und V <sub>max</sub> Bestimmung des Tropinons.	XVII
<b>Abb. G-18:</b> Kinetische Parameter der TRII mit Nortropinon bei pH 6.4.	XVIII

<b>Tab. A-1:</b> Calystegine als Glykosidasehemmstoffe. _____	3
<b>Tab. B-1:</b> PCR-Primer. _____	13
<b>Tab. B-2:</b> Primer zur Sequenzierung und PCR-Selektion. _____	14
<b>Tab. B-3:</b> Vektoren für die heterologe Expression von rekombinanten TR-Proteinen. _____	27
<b>Tab. C-1:</b> Typische Fragmente der Calystegin-TMS-Derivate. _____	36
<b>Tab. C-2:</b> Strukturvergleich der StTRII-cDNA-Sequenzen. _____	52
<b>Tab. C-3:</b> Strukturvergleich der StTRI-cDNA-Sequenzen. _____	55
<b>Tab. C-4:</b> $K_m$ und $V_{max}$ Werte für Tropinon und Nortropinon. _____	63
<b>Tab. C-5:</b> Katalytische Konstante für Tropinon und Nortropinon. _____	63
<b>Tab. C-6:</b> Enzymaktivitäten des StTRI-SE-Proteins und des StTRI-Homologen. _____	65
<b>Tab. D-1:</b> Homologievergleich der StTRI und StTRII-Sequenzen. _____	77
<b>Tab. G-1:</b> Mittelwerte der Calysteginbestimmung in verschiedenen Kartoffelsorten. _____	I
<b>Tab. G-2:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der Calysteginbestimmung in Keimen und Knollen. _____	II
<b>Tab. G-3:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der Calysteginbestimmung innerhalb der Keime. _____	II
<b>Tab. G-4:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der Calysteginbestimmung in Kartoffelpflanzen _____	III
<b>Tab. G-5:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der TM/FM Verhältnisse ausgesuchter Kartoffelgewebe. _____	III
<b>Tab. G-6:</b> pH-Abhängigkeit der Tropinonumsetzung durch rekombinantes TRII-Enzym. _____	XVI
<b>Tab. G-7:</b> pH-Abhängigkeit der Nortropinonumsetzung durch rekombinantes TRII-Enzym _____	XVI
<b>Tab. G-8:</b> Mittelwerte und Standardabweichung der StTRII-Umsetzung mit verschiedenen Substratanloga. _____	XIX



**Abkürzungsverzeichnis**

6xHis	C-terminal fusionierter sechsfacher Histidinanker
Ab	<i>Atropa belladonna</i>
Abb.	Abbildung
ADC (ADC)	Arginindecarboxylase (und ihr Gen)
AMD-TLC	<i>Automated Multiple Development-TLC</i>
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Bca	<i>Brugmansia candida x aurea</i> Hybrid
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
Cac <sup>+</sup>	calytaginkatabolisierende Bakterien
Cal	Calystegin
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CE	<i>capillary electrophoresis</i> (Kapillarelektrophorese)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Ds	<i>Datura stramonium</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EST	<i>expressed sequence tag</i> (ermittelte Nukleotidsequenz einer mRNA)
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GBSSI	stärkekorngelinkten Stärke-Synthase I
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion
h	Stunde(n)
H6H ( <i>H6H</i> )	Hyoscyamin-6-Hydroxylase (und ihr Gen)
HMDS	Hexamethyldisiloxan
Hn	<i>Hyoscyamus niger</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
i. D.	innerer Durchmesser
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani-Medium
MeJa	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MS	Murashige & Skoog Medium
MW	Mittelwert
NADP <sup>+</sup>	Nicotinadeninukleotiddiphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinadeninukleotiddiphosphat (reduziert)

OD	optische Dichte
ODC ( <i>ODC</i> )	Ornithindecaboxylase (und ihr Gen)
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAT	Pseudotropin-Acetyl-Transferase
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>plaque forming units</i> (Anzahl der Plaques)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT ( <i>PMT</i> )	Putrescine- <i>N</i> -Methyltransferase (und ihr Gen)
PND	Phosphor-Stickstoff-Detektor
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SAM-S	S-Adenosylmethionin-Synthase
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDR	<i>short-chain dehydrogenase/reductase</i> (kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPDS ( <i>SPDS</i> )	Spermidinsynthase (und ihr Gen)
SPS ( <i>SPS</i> )	Sperminsynthase (und ihr Gen)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat- Puffer
SSPE	Natriumchlorid-Natriumdihydrogenphosphat-EDTA-Puffer
St	<i>Solanum tuberosum</i>
STTRI-SS	tropinformende Tropinonreduktase Start-Stop-cDNA-Klon
STTRI-SE	tropinformende Tropinonreduktase Start-Ende-cDNA-Klon
Tab.	Tabelle
TAT	Tropin-Acetyl-Transferase
TBON	8-Thiabicyclo[3,2,1]octan-3on
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TLC	<i>thin layer chromatography</i> (DC)
TMCS	Trimethylchlorsiloxan
TMS	Trimethylsilyl-Gruppe
TR	Tropinonreduktase(n)
TRI ( <i>TRI</i> )	tropinformende Tropinonreduktase (und ihr Gen)
TRII ( <i>TRII</i> )	pseudotropinformende Tropinonreduktase (und ihr Gen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> [Enzymeinheit(en)]
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
var.	Varietät (Sorte)
V <sub>max</sub>	maximale Umsatzgeschwindigkeit
w/v	Gewicht/Volumen

Publikationen, aus denen Teile der vorliegenden Arbeit entnommen wurden:

**Publikationen:**

- Keiner, R., Kaiser, H., Nakajima, K., Hashimoto, T., Dräger, B. 2001. Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.). *Plant Mol. Biol.*, in Druck.
- Keiner, R., Dräger, B. 2000. Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science* **150**, 171–179.
- Keiner, R., Nakajima, K., Hashimoto, T., Dräger, B. 2000. Accumulation and biosynthesis of calystegines in potato. *J. of Applied Botany* **74**, 122-125.

**Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen:**

**1. Vorträge:**

- Keiner, R., Dräger, B. 2000. Calystegines in *Solanum tuberosum* – Exploring tropinone reductase II, an enzyme that could be involved in the biosynthesis. Lecture, 3. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop, Halle, Germany.

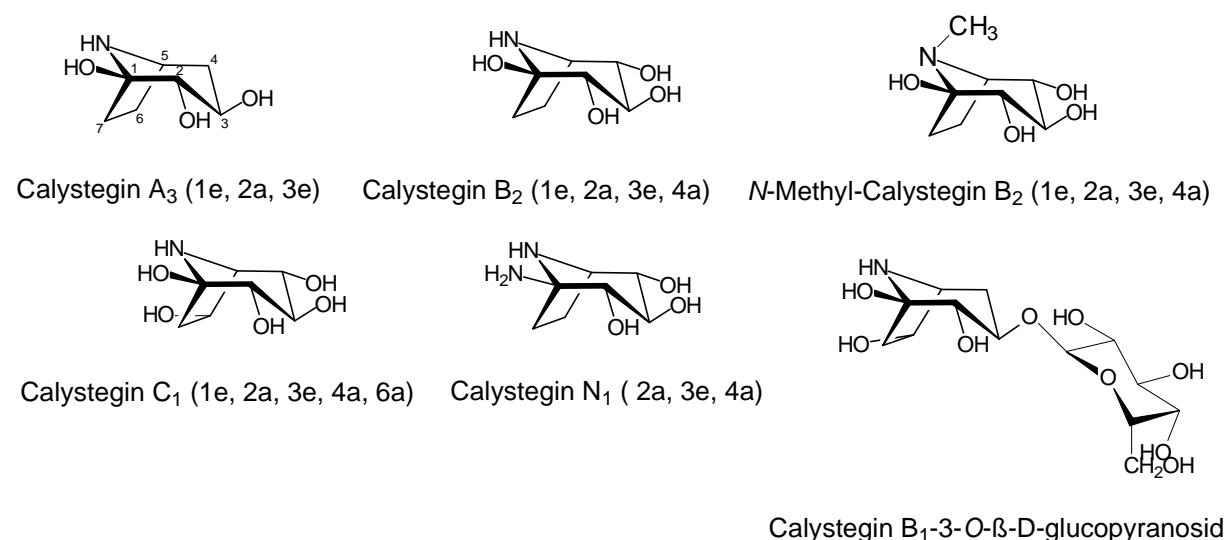
**2. Poster:**

- Keiner, R., Kaiser, H., Dräger, B. 2000. Cloning and characterization of tropinone reductase II (TR II) from *Solanum tuberosum*. Poster, Joint Meeting of the GA, DPhG and German Botanical Society, Halle, Germany.
- Keiner, R., Nakajima, K., Hashimoto, T., Dräger, B. 1999. Tropinone reductase in *Solanum tuberosum* – an enzyme that could be involved in calystegine biosynthesis. Poster, Joint Meeting of the AFERP, ASP, GA and PSE, Amsterdam, Netherlands.
- Keiner, R., Dräger, B. 1998. Distribution of calystegines in *Solanum tuberosum*. Poster, PSE-Symposium "Future trends in Phytochemistry", Rolduc, Netherlands.

## A Einleitung

### A 1 Die Calystegine

Im Unterschied zu den klassischen Tropanalkaloiden wie Hyoscyamin und Scopolamin trägt der Stickstoff des 8-Azabicyclo[3,2,1]octan-Grundgerüsts in den meisten Calysteginen keine Methylgruppe. Der Nortropanring der Calystegine hat drei bis fünf Hydroxylgruppen in variablen Positionen und stereochemischer Anordnung. Eine dieser Hydroxylgruppen bildet eine Aminoketalfunktion am Brückenkohlenstoffatom des Bicyklus. Je nach Grad der Hydroxylierung werden die Calystegine in Gruppen eingeteilt: die A-Gruppe hat drei, die B-Gruppe vier und die C-Gruppe fünf Hydroxylgruppen. In Abb. A-1 sind einige bekannte Calystegine abgebildet.



**Abb. A-1:** Strukturformeln ausgewählter Calystegine.

Tepfer und Mitarbeiter (1988a; 1988b) berichteten von der Entdeckung neuartiger Substanzen im Wurzelexudat von *Calystegia sepium*, *Convolvulus arvensis* (beide *Convolvulaceae*) und *Atropa belladonna* (*Solanaceae*). Die Strukturen der Calystegine A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> wurden mittels HPLC-MS und NMR aufgeklärt (Ducrot und Lallemand 1990; Goldmann *et al.* 1990). Ihr Trivialname leitet sich von *Calystegia sepium* ab, der Pflanze, in der sie zuerst entdeckt wurden. Allerdings wurde die Struktur von zwei Verbindungen (bezeichnet als Calystegin A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>), die ein ähnliches Elutionsverhalten wie Calystegin A<sub>3</sub> aufwiesen, nicht bestimmt (Goldmann *et al.* 1990). Aus diesem Grund existieren auch keine Strukturen für die Calystegine A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. In späteren Untersuchungen wurde in *C. sepium* neben den Calysteginen B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> noch das Calystegin A<sub>5</sub> entdeckt (Schimming *et al.* 1998; Scholl *et al.*

2001). Dihydroxylierte Nortropanalkaloide wurden vor kurzem ebenfalls in *C. sepium* und anderen Convolvulaceen und Solanaceen beschrieben (Asano *et al.* 2001). Ihnen fehlt die für Calystegine typische Aminoketalfunktion am Brückenkopfkohlenstoffatom.

## A 1.1 Verbreitung der Calystegine

Bisher wurden insgesamt 16 verschiedene Calystegine entdeckt (Asano *et al.* 2000a). Sie sind in den Familien der Solanaceen und Convolvulaceen weit verbreitet (Griffin und Lin 2000; Schimming *et al.* 1998; Watson *et al.* 2001; Bekkouche *et al.* 2001). In der Familie der Solanaceen wurden bisher Calystegine in der nach Hegnauer vorgenommenen chemotaxonomischen Einteilung der Solanaceen in 4 von 5 Triben, nämlich in *Solaneae*, *Datureae*, *Nicandreae* und *Salpiglossideae*, nicht aber in dem Tribus *Cestreae*, detektiert (Hegnauer 1973; 1990). Der *Solaneae*-Tribus wird nochmals in 4 Subtriben unterteilt. Auch dort finden sich jeweils Vertreter, in denen Calystegine akkumulieren (*Lyciinae*: z. B. in *Atropa belladonna*; *Hyoscyaminae*: z. B. in *Hyoscyamus niger*; *Solaninae*: z. B. in *Capsicum frutescens*; *Mandragorinae*: z. B. in *Mandragora officinalis*) (Asano *et al.* 1997a; Dräger *et al.* 1995c). *Solanum tuberosum* gehört wie *Lycopersicon esculentum* zu dem Subtribus *Solaninae*.

In den Convolvulaceen wurden Calystegine in 22 Arten detektiert (Schimming *et al.* 1998).

Überraschenderweise wurden sie aber auch in der phylogenetisch entfernten Familie der *Moraceae* gefunden (Asano *et al.* 1994a; 1994b). Darüber hinaus enthielten die Motte *Acherontia atopus*, der Schmetterling *Michanitis polymnia* und deren Larven Calystegine (Nash *et al.* 1993). Die Larven dieser Arten fressen auf *Solanum*- und *Datura*spezies.

Es ist anzunehmen, daß die Calystegine aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften bisher beim Screening nach Alkaloiden aus den Pflanzengeweben nicht extrahiert worden sind. Eine weitere Verbreitung als bisher bekannt ist deshalb möglich.

Die Calystegine treten in den einzelnen Pflanzenarten meist im Gemisch auf; in *Lycium chinense* (*Solanaceae*) wurden sogar 14 verschiedene Calystegine detektiert (Asano *et al.* 1997b). Darunter befinden sich zwei Calystegine vom Tropantyp, *N*-Methylcalystegin B<sub>2</sub> und C<sub>1</sub> (vgl. Abb. A-1). Neben Calystegin B<sub>1</sub> kommt in den Früchten von *Nicandra physaloides* ein 3-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-Calystegin B<sub>1</sub> vor (Griffiths *et al.* 1996).

Für das aus *Hyoscyamus niger* isolierte Calystegin N<sub>1</sub> (vgl. Abb. A-1) wurde in der Literatur diskutiert, daß es möglicherweise ein Artefakt der Isolierung ist. Es kann sich leicht in Calystegin B<sub>2</sub> umwandeln (Molyneux *et al.* 1996).

Calystegine wurden auch in eßbaren Früchten und in Gemüse der Familien *Convolvulaceae*, *Moraceae* und *Solanaceae* gefunden, unter anderem auch in der

Kartoffel (Asano *et al.* 1997a; Dräger *et al.* 1994b; Nash *et al.* 1993). Allerdings schwankt der angegebene Gehalt beträchtlich (vgl. Kap. D 1.1).

Das Vorkommen in Kartoffel (*S. tuberosum*) ist aufgrund der biologischen Aktivität der Calystegine nicht ohne Bedeutung, da die Kartoffel ein wichtiges Weltnahrungsmittel darstellt. Mit jährlich über 311 Millionen Tonnen liegt die Kartoffel auf Platz vier der bedeutendsten Nahrungsmittel (Quelle: <http://apps.fao.org>, 2000).

## A 1.2 Glycosidasehemmstoffe

Die strukturelle Ähnlichkeit der Calystegine mit den Kohlenhydraten begründet ihre biologische Aktivität als Glycosidasehemmstoffe. Molyneux und Mitarbeiter (1993) berichten zum ersten Mal über die kompetitive Hemmung von  $\alpha$ -Galactosidase und  $\beta$ -Glucosidase durch die Calystegine A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>. In der Folgezeit wurden intensive Untersuchungen zur Hemmung der Glycosidasen durchgeführt (Asano *et al.* 1994a; 1995; 1996a; 1996b; 1997a; 1997b; 1997c; Kato *et al.* 1997). Einige markante Daten der Glycosidasehemmung sind in Tab. A-1 dargestellt. Mannosidasen werden durch Calystegine nicht gehemmt (Molyneux *et al.* 1993).

Enzym	Herkunft	Cal A <sub>3</sub>	Cal B <sub>1</sub>	Cal B <sub>2</sub>	Cal C <sub>1</sub>
		IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]			
$\beta$ -Glucosidase	Mandel	26	4	2,6	0,82
$\alpha$ -Galactosidase	Kaffeebohnen	160	kH	1,9	360
$\alpha$ -Galactosidase	<i>Aspergillus niger</i>	180	kH	3,9	440
$\beta$ -Galactosidase	Leber (Rind)	270	9,8	240	16
$\beta$ -Glucosidase	Leber (Mensch)	kH	50	kH	3
$\alpha$ -Galactosidase	Leber (Mensch)	410	kH	140	kH

**Tab. A-1:** Calystegine als Glycosidasehemmstoffe. IC<sub>50</sub>-Werte für ausgewählte Glycosidasen. kH: keine Hemmung. Die Werte entstammen Asano *et al.* 1995; 1997b.

Eine Korrelation zwischen der Stärke der Hemmung und der chemischen Struktur der Calystegine ist schwierig. Eine Zunahme der Hydroxylierung steigert die Hemmeigenschaften gegenüber einigen Enzymen ( $\beta$ -Glucosidase). Die dreifach hydroxylierten Calystegine haben keine (Calystegin A<sub>5</sub>) oder nur geringe inhibitorische Eigenschaften (Asano *et al.* 1995). Calystegin C<sub>1</sub> ist ein potenter Inhibitor von  $\beta$ -Glucosidasen; gegenüber  $\alpha$ -Galactosidasen ist seine Aktivität aber nur gering.

Glycosidasehemmstoffe haben aufgrund ihrer biologischen Aktivität ein großes Potential für therapeutische Anwendungen (Asano 2000a; 2000c). Bekanntestes Beispiel ist das Pseudotetrasaccharid Acarbose (Glucobay<sup>®</sup>), welches bei der Behandlung des *Diabetes mellitus* als Zusatztherapie in Verbindung mit Diät oder mit Insulin eingesetzt wird.

Interessant ist aber auch die Hemmung von lysosomalen Glycosidasen bei der Prozessierung von Glycoproteinen und Glycosphingolipiden (Asano *et al.* 2000a).

Dies führt zur Akkumulation bestimmter Intermediate, die im Körper nicht abgebaut werden. Solche lysosomalen Speicherkrankheiten wie Mannosidosis, Morbus Fabry und Morbus Glaucher sind zwar beim Menschen selten, verlaufen aber oft fatal. Glycosidasehemmstoffe können als Modellsubstanzen dienen, da sie dieselben Symptome hervorrufen.

Auf der anderen Seite wurde vor kurzem eindrucksvoll gezeigt, daß 1-Desoxy-Galaktonorjirimycin, ein potenter kompetitiver Inhibitor der lysosomalen  $\alpha$ -Galactosidase A, die Aktivität des mutanten Enzyms in Fabry-Lymphoblasten beeinflusst (Asano *et al.* 2000b; Fan *et al.* 1999). Bei Konzentrationen, die unter der eigentlichen Hemmkonzentration lagen, konnte die Aktivität der mutanten  $\alpha$ -Galactosidase A um das 7 - 8fache erhöht werden (Fan *et al.* 1999). Als Mechanismus wurde eine Stabilisierung bei der Enzymfaltung diskutiert, bei der 1-Desoxy-Galaktonorjirimycin als „chemisches Chaperon“ dient.

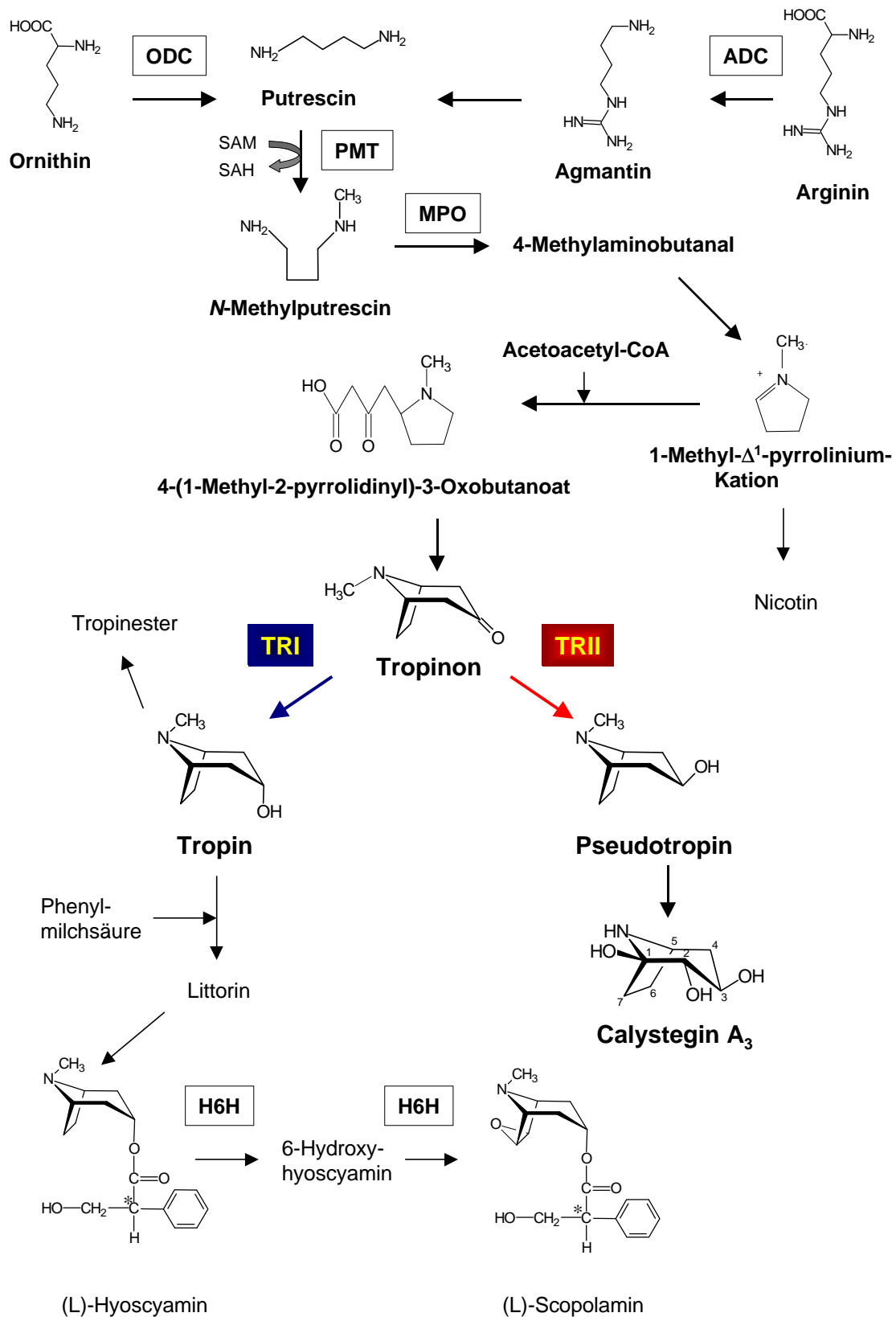
Außerdem haben Glycosidasehemmstoffe ein therapeutisches Potential bei der Behandlung von Tumoren, von Viruserkrankungen sowie als Immunstimulantien (Watson *et al.* 2001).

Tumorzellen verfügen aufgrund der veränderten Expression von Glycosyltransferasen über ein abweichendes Glycosylierungsmuster auf der Zelloberfläche (Hakomori 1985). Swainsonin, ein Indolizidinalkaloid, wurde u. a. aus *Swainsonia canescens* isoliert und ist ein potenter Inhibitor der lysosomalen  $\alpha$ -Mannosidase (Asano 2000a). Es verhindert die Formation dieser tumorspezifischen Glycosylierungsmuster und hemmt katabolische Glycosidasen. Dies führt zu einem verminderten Wachstum und einer erniedrigten Metastasenbildung des Tumors (Dennis *et al.* 1990; Olden *et al.* 1991). Für Swainsonin werden derzeit klinische Studien Phase II durchgeführt (Watson *et al.* 2001). Auch bei Viren können Glycosidasehemmstoffe (Castanospermin, Desoxy-Norjirimycin und Derivate) das Glycosylierungsmuster der Hüllproteine verändern, indem sie die Konformation der Glycoproteine ändern (Fischer *et al.* 1995; Taylor *et al.* 1991).

Bei den meisten Glycosidasehemmstoffen, wie auch bei den Calysteginen, besteht das Problem, daß sie nicht in ausreichender Menge für die Testung zur Verfügung stehen.

### A 1.3 Tropanalkaloid-Biosynthese

Die Biosynthese der Tropanalkaloide und der Calystegine hat ihren Ursprung in den Aminosäuren (AS) L-Ornithin oder L-Arginin (vgl. Abb. A 2). 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 das Zwischenprodukt Agmatin gebildet. Alle lebenden Organismen besitzen eine ODC, während den Säugetierzellen und vielen niederen Eukaryoten die ADC fehlt (Hashimoto und Yamada 1994). ODC und ADC-cDNA's wurden aus Tomate isoliert (Alabadi und Carbonell 1998; Rastogi *et al.* 1993).



**Abb. A-2:** Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese. ODC: Ornithindecaboxylase; ADC: Arginindecaboxylase; PMT: Putrescin-*N*-Methyltransferase; MPO: Methylputrescin-Oxidase; TRI: tropinbildende Tropinonreduktase; TRII: pseudotropinbildende Tropinonreduktase; H6H: Hyoscyamin-6-Hydroxylase; SAM: S-Adenosyl-L-Methionin; SAH: S-Adenosyl-Homocystein.



Weiterhin ist die ODC-cDNA aus *D. stramonium* und *N. tabacum* bekannt (Imanishi *et al.* 1998; Michael *et al.* 1996).

Putrescin wird durch Übertragung von Aminopropylgruppen in die Polyamine Spermidin und Spermin umgewandelt. Die Reaktionen werden durch Spermidin-synthase (SPDS, EC 2.5.1.16) bzw. Sperminsynthase (SPS, EC 2.5.1.22) katalysiert.

Die Polyamine kommen ubiquitär in allen Lebewesen vor und haben eine wichtige regulatorische Rolle bei der Proliferation und Differenzierung der Zellen (Bouchereau *et al.* 1999).

SPDS wurden u.a. aus *Nicotiana tabacum*, *Hyoscyamus niger*, *Arabidopsis thaliana* und *Pisum sativum* isoliert (Alabadi und Carbonell 1999; Hashimoto *et al.* 1998a).

Die N-Methylierung einer Aminogruppe des Putrescins ist der erste Biosyntheseschritt auf dem Weg zu den Tropanalkaloiden, den Calysteginen und Nicotin (Hibi *et al.* 1992). Putrescin-N-Methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53) katalysiert die S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) abhängige N-Methylierung. PMT wurde aus *N. tabacum*, *N. sylvestris*, *H. niger* und *A. belladonna* isoliert (Hashimoto *et al.* 1998b; Hibi *et al.* 1994; Riechers und Timko 1999; Suzuki *et al.* 1999a).

N-Methylputrescinoxidase (MPO, EC 1.4.3.6) katalysiert die oxidative Desaminierung des N-Methylputrescins zum 4-Methylaminobutanal (Hashimoto *et al.* 1990), welches spontan zum 1-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolinium-Kation zyklisiert (vgl. Abb. A-2). Neuere Untersuchungen zeigten, daß die Bildung des Tropinons über 4-(1-Methyl-2-pyrrolidiny)-3-Oxobutanoat vonstatten geht (Robins *et al.* 1997). Am Tropinon verzweigt sich die Biosynthese; zwei unterschiedliche NADPH-abhängige Oxidoreduktasen reduzieren die 3-Ketogruppe. Die Tropinonreduktase I (TRI, EC 1.1.1.206), die die Bildung des Tropins (3a-OH) katalysiert, wurde erstmals von (Koelen und Gross 1982) in *D. stramonium* Wurzelkulturen entdeckt. Die Tropinonreduktase II (TRII, EC 1.1.1.236) formt Pseudotropin (3e-OH). Sie wurde später in *H. niger* Wurzelkulturen gefunden (Dräger *et al.* 1988). cDNA-Sequenzen der TRI und TRII wurden bisher aus *H. niger* und *D. stramonium* isoliert (Nakajima *et al.* 1993a; 1993b; 1999a). In diesen beiden Pflanzen akkumulieren neben Calysteginen auch die klassischen Tropanalkaloide. Die TR-Enzyme zeigen eine hohe Homologie zu den kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). Die SDR-Enzymfamilie umfaßt nicht weniger als 1056 bekannte Enzyme, die sich durch charakteristische Sequenz-Motive auszeichnen (Jörnvall *et al.* 1999; Persson *et al.* 1991; 1995). Beispiele für pflanzliche Enzyme aus der SDR-Familie sind die  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Digitalis lanata* und 1,2-Dehydroreticulon-Reduktase aus *Papaver somniferum* (Finsterbusch *et al.* 1999; De-Eknamkul und Zenk 1992).

Während Pseudotropin der potentielle Vorläufer der Calystegine ist, wird Tropin mit Phenylmilchsäure verestert (Ansarin und Woolley 1993; Robins *et al.* 1994a). Das entstandene Littorin lagert sich zum Hyoscyamin um, wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist (Ansarin und Woolley 1994; Duran *et al.* 2000; Robins *et al.* 1994a). Bei

Fütterungsversuchen mit Littorin konnte gezeigt werden, daß der Einbau in Hyoscyamin zum Teil durch Inhibitoren von Cytochrom P-450 Enzymen gehemmt wurde (Zabetakis *et al.* 1998).

Das Endprodukt der Tropanalkaloidbiosynthese Scopolamin, ein 6,7-Epoxid, wird aus Hyoscyamin über das Zwischenprodukt 6 $\beta$ -Hydroxyhyoscyamin gebildet. Die Hyoscyamin-6-hydroxylase (H6H, EC 1.14.11.11) gehört zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Hashimoto und Yamada 1986). Sie katalysiert bifunktional beide Oxidationsreaktionen (Hashimoto *et al.* 1993; Hashimoto und Yamada 1987), wobei die Hydroxylierung Oxoglutarat als Co-Substrat, sowie Fe<sup>2+</sup>, Ascorbat und molekularen Sauerstoff benötigt. *H6H*-cDNA's wurde bisher aus *H. niger* und *A. belladonna* Wurzelkulturen isoliert (Matsuda *et al.* 1991; Suzuki *et al.* 1999b).

In *S. tuberosum* gab es zu Beginn der Arbeit keine Hinweise auf das Vorhandensein des Tropanalkaloidstoffwechsels. Klassische Tropanalkaloide, wie Hyoscyamin und Scopolamin, sind in der Kartoffel nicht bekannt. Eine aktuelle Datenbankrecherche ergab den Eintrag von zwei Kartoffel-EST-Sequenzen aus dem Jahre 2000, die eine hohe Homologie zu bekannten *ADC*-cDNA-Sequenzen aufweisen (Datenbankeintrag: BE341738, BE344376). *ADC* ist ein Enzym des Grundstoffwechsels. Erst seit kurzem ist eine putative *PMT*-cDNA-Sequenz aus *S. tuberosum* bekannt (Stenzel, unveröffentlichte Ergebnisse).

## A 1.4 Regulation der Tropan- und Calysteginbiosynthese

Die Tropanalkaloidbiosynthese ist in den Wurzeln lokalisiert. Alkaloide wie beispielsweise Hyoscyamin werden über den Xylem-Saft in die Blätter transportiert und akkumulieren dort (De Luca und St-Pierre 2000; Luckner 1990; Wink 1999). Es wurde gezeigt, daß Tropanalkaloide in *Erythroxylum*-Spezies in Vakuolen zu finden sind (Ferreira-Jorge *et al.* 1998).

In den Pflanzen hat der Biosyntheseweg, ausgehend vom Arginin, größere Bedeutung als der Weg über Ornithin, wie am Beispiel von *D. stramonium* Wurzelkulturen gezeigt wurde (Robins *et al.* 1991a). Die Überexpression von Hafer-*ADC* in Tabak führte zwar zu einer 10 - 20fachen Erhöhung des Agmatinlevels, der Polyaminlevel veränderte sich aber nicht (Burtin und Michael 1997).

*S*-Adenosylmethionin-Synthase-1 (*SAM-S*, EC 2.5.1.6) aus *A. thaliana* wurde in Tabakkalluskulturen überexprimiert (Belbahri *et al.* 2000). Durch das erhöhte *SAM*-Angebot, welches der *PMT* als Co-Substrat dient, wurde in einigen transgenen Kalluslinien eine 2 - 5fach höhere Akkumulation von Nicotin beobachtet. Einen weiteren Hinweis auf die regulative Bedeutung der Methylgruppenübertragung durch die *PMT* zeigt die reversible Änderung der *PMT*-Transkriptmenge bei veränderter Hormonzusammensetzung des Mediums. Indol-3-buttersäure, ein synthetisches Auxin, erniedrigt reversibel die *PMT*-Transkriptakkumulation innerhalb von 30 min

(Hibi *et al.* 1994).

Die TR-Enzyme haben eine sehr hohe Aktivität. Bei Fütterungsversuchen mit Tropinon akkumulieren Pseudotropin und Tropin. Der Hyoscyaminlevel hingegen ist erniedrigt (Dräger und Schaal 1994a). Ein hohes Angebot an Tropin vermindert die Expression von ODC und ADC auf 30 % (Robins *et al.* 1991b). PMT und MPO-Aktivitäten sind ebenfalls erniedrigt (Robins *et al.* 1991b). Neben diesen negativen Feed-back Effekten des Tropins scheint die Veresterung der 3a-OH-Gruppe der geschwindigkeitsbestimmende Biosyntheseschritt auf dem Weg zu den klassischen Tropanalkaloiden zu sein (Robins *et al.* 1991b).

Die Regulation der Biosynthese läßt sich nicht ohne weiteres auf andere Pflanzen übertragen. Wie verschieden die Auswirkungen der Regulation gleicher Enzyme in unterschiedlichen Pflanzen sein kann, wird an folgendem Beispiel deutlich. Während bei der Überexpression der *PMT* in *N. silvestris* nicht nur die *PMT*-Transkriptmengen um das 4 - 8fache gesteigert wurden, sondern auch der Nicotingehalt in den Blättern um 40 % höher war als im Wildtyp, blieb der Gehalt an Tropanalkaloiden in transgenen *A. belladonna* *PMT*-sense-Pflanzen unverändert (Sato *et al.* 2001).

Das Verhältnis der Akkumulation der klassischen Tropanalkaloide Hyoscyamin und Scopolamin wird durch die Expression der *H6H* reguliert (Kanegae *et al.* 1994). Die Expression von *H6H* in *Hyoscyamus muticus* Wurzelkulturen war proportional zur Scopolaminakkumulation, in einem *H6H*-sense-Klon wurde der Scopolamingehalt sogar um mehr als 100fach gesteigert (Jouhikainen *et al.* 1999).

Es war aber auch möglich einzelne Gene des Tropanalkaloidstoffwechsels in Tabak, in dem Tropanalkaloide nicht vorkommen, zu exprimieren. Yun und Mitarbeiter (1993) zeigten am Beispiel der *H6H*, daß transgenen *H6H*-sense-Tabakpflanzen in der Lage waren exogen zugeführtes Hyoscyamin in Scopolamin umzuwandeln, welches in den Blättern akkumulierte.

## A 1.5 Die Analytik der Calystegine

Methode der Wahl zur quantitativen Bestimmung der Calystegine ist die Gaschromatographie (GC). Da die Calystegine nicht flüchtig sind, müssen sie derivatisiert werden. Eine Silylierung mit *N*-Methyl-*N*-(trimethyl)-silyl-fluoroacetamid in Pyridin, wie sie von Molyneux und Mitarbeitern angewendet wurde, führt zur Derivatisierung der OH-Gruppen und des sekundären Stickstoffatoms (Molyneux *et al.* 1993). Außerdem kann es bei dieser Silylierungsmethode zur Degradierung der Calystegine kommen. Zur quantitativen Bestimmung ist daher eine „milde“ Silylierung nötig (vgl. Kap. B 2.1.1) (Dräger 1995a).

Die Detektion erfolgt in der GC simultan im Flammenionisationsdetektor (FID) und im stickstoffsensitiven Detektor (PND). Der PND ist bei der Detektion stickstoffhaltiger Substanzen wesentlich selektiver und sensitiver. Die Detektionsgrenze ist ca. fünffach höher als beim FID. Allerdings unterliegt die Rubidiumsalsperle einer

ständigen Korrosion, so daß das System sehr oft recalibriert werden müßte. In der Praxis wird deshalb mit dem FID quantifiziert.

Mit HPLC wurden Calystegine mit refraktometrischer Detektion aus *C. sepium* Wurzelkulturen bestimmt (Goldmann *et al.* 1990). Die refraktometrische Detektion (RI-Detektor) ist aber nicht besonders selektiv. Calystegine und ihre Vorstufen wie Pseudotropin besitzen im Gegensatz zu den klassischen Tropanalkaloiden kein Chromophor. Die für die Tropanalkaloide publizierten Methoden mit UV-Detektion können deshalb nicht zur Anwendung kommen (Mateus *et al.* 1998; 1999). Es wurde vorgeschlagen, Calystegine bei der HPLC mit elektrochemischer Detektion zu erfassen (Dräger *et al.*, unveröffentlicht). Castanospermin, den Calysteginen strukturell verwandt, wurde so mit gepulster amperometrischer Detektion bestimmt (Donaldson *et al.* 1990).

Kürzlich wurde eine Methode zur kapillarelektrophoretischen Auftrennung (CE) der Calystegine beschrieben, die ebenfalls die gepulste amperometrische Detektion verwendet (Rüttinger und Dräger 2001). Die beschriebene Methode benötigt nur wenige Mikroliter „Pflanzensaft“. Das hat den Vorteil, daß zeitaufwendige Probenvorbereitungen entfallen können. Der Einsatz als Standardmethode ist noch nicht praktikabel, da das System sehr oft recalibriert werden muß. Dafür stehen reine Calystegine noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Daali und Mitarbeiter (2000) zeigten ebenfalls die Trennung der Calystegine mit Kapillarelektrophorese. Die UV-Detektion bei niedriger Wellenlänge (191 nm) der nicht-UV-absorbierenden Calystegine wurde durch *in situ* Komplexierung mit Borationen erreicht.

Eine effiziente Methode zum Vorab-Screening vieler verschiedener Proben auf Calystegine bietet neuerdings eine AMD-TLC Methode (*Automated Multiple Development-TLC*) (Scholl *et al.* 2001). Im Gegensatz zu klassischen DC-Methoden können erstmals Calystegine innerhalb einer Gruppe gleicher Hydroxylierungszahl aufgetrennt werden.

## A 2 Aufgabenstellung

In der Arbeit sollte die Verteilung der Calystegine in *S. tuberosum* während des gesamten Kultivierungsprozesses in verschiedenen Pflanzenorganen untersucht werden. Dabei wurde der Akkumulation in den verschiedenen Geweben der Kartoffelknolle besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht, da diese ein wichtiges Nahrungsmittel darstellt.

Für weitergehende Untersuchungen werden Calystegine in größeren Mengen benötigt. Da bekannte Isolierungsverfahren sehr zeitaufwendig sind (Asano *et al.* 1995; Büttner 1998), sollte ein Gewebe gesucht werden, welches in hohem Maße Calystegine akkumuliert. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit die Calysteginakkumulation durch Lichteinfluß und Verletzung verändert wird.

Ausgehend von der Hypothese, daß sich die Calysteginbiosynthese vom Tropanstoffwechsel der Pflanzen ableitet, sollte nach Hinweisen auf einen solchen Biosyntheseweg für die Calystegine in der Kartoffel gesucht werden. *In vivo* Fütterungsversuche mit Tropinon, einem Metabolit der Tropanalkaloidbiosynthese, sollten die Umsetzung zum Pseudotropin zeigen. Die genetische Sequenz des Enzyms, welches die spezifische Reduktion katalysiert, sollte anschließend isoliert und das Protein in *E. coli* überexprimiert werden. Besonderes Interesse sollte den Unterschieden in der AS-Sequenz im Vergleich zu den bereits bekannten TR`s und der Charakterisierung des Enzyms gelten.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Verteilung der mRNA-Transkripte der *TR`s* zu bestimmen, um Aufschluß über den Ort der Biosynthese zu erhalten.

Protein-Reinigungsschemata sollten erarbeitet werden, die es ermöglichen, die heterolog exprimierten Proteine als Fusionsproteine zu reinigen. Homogen gereinigte Proteine sind die Grundlage zur Herstellung von Antikörpern, mit deren Hilfe die Verteilung der TR-Proteine in den einzelnen Gewebeschichten gezeigt werden kann.

## B Material und Methoden

### B 1 Materialien

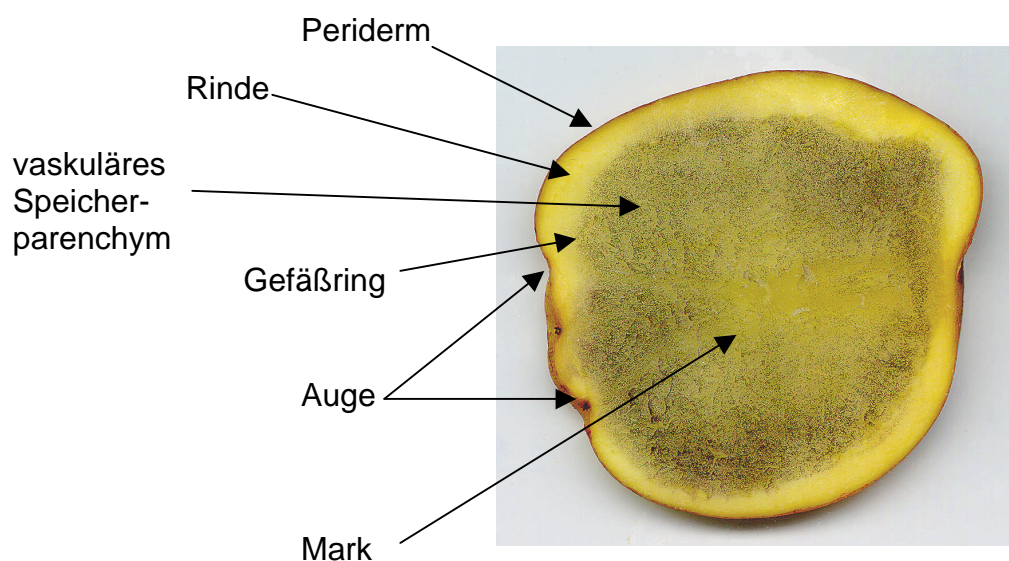
#### B 1.1 Pflanzenmaterial

Kartoffeln, *Solanum tuberosum* L. var. Liu, Arkula und Adretta wurden von einem regionalen Landwirtschaftsbetrieb (Fa. Müller, Köthen), *Solanum tuberosum* L. var. Désirée von der Saatzucht Fritz Lange KG, Bad Schwartau, bezogen. Es wurde sichergestellt, daß diese frisch geerntet und nicht mit Keiminhibitoren behandelt worden waren. Weiterhin wurden *in vitro* Kartoffelpflanzen var. Désirée, Kartoffelwurzelskulturen var. Désirée und Tabakblätter, *Nicotiana tabacum* L., verwendet. Die Kartoffelwurzelskulturen wurden durch Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes*, Stamm LBA 9402, gewonnen.

#### B 1.2 Keimungsbedingungen, Pflanzenanzucht und Probennahme

Die frisch geernteten Knollen wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Unter diesen Bedingungen keimten die Knollen während der nächsten 8 Monate nicht. Zur Keiminduktion wurden sie in Raumtemperatur überführt und im Dunkeln gelagert. Innerhalb einer Woche begannen die Kartoffeln zu keimen. Die Probennahme wurde alle zwei Tage durchgeführt.

Die Augen sind die anatomischen Strukturen, aus denen sich die Keime entwickeln (Abb. B-1). Kartoffelkeime sind Seitentriebe, die Kartoffeln Sproßknollen. Die Augen wurden in zwei Größen (2 x 2 x 2 mm und 5 x 5 x 5 mm) ausgeschnitten.



**Abb. B-1:** Anatomischer Aufbau der Kartoffelknolle nach International Potato Center, Peru, Bull. 6 (1986). Teile des Querschnittes wurden zur besseren Erkennung der Strukturen angefärbt.

Die Probennahme dormanter Augen 5 Monate nach der Ernte erfolgte direkt aus dem Kühlraum. Die Korkhaut (0,5 - 1,0 mm) umfaßt nur das Periderm, die Schale (2 mm) das Periderm und Teile des Rindengewebes. Das in den Untersuchungen als Mark bezeichnete Gewebe vereint das vaskuläre Speicherparenchym und das Mark (Abb. B-1).

Kartoffelpflanzen wuchsen unter natürlichen Bedingungen im Arzneipflanzengarten des Institutes. Junge Blätter sind die ersten oberirdischen Blätter im Frühjahr. *In vitro* Pflanzen wurden auf MS Medium mit 3 % Saccharose (3MS) in Kulturkammern bei 23 °C und einem 16 h/8 h Licht-Dunkel-Rhythmus (Langtagbedingungen). Kartoffelwurzelkulturen wurden kontinuierlich in Gamborg's B5 Medium (300 ml Erlenmeyerkolben) auf einem Rundschtüttler bei 100 rpm und 23 °C im Dunkeln kultiviert (vgl. Kap B 1.7).

### B 1.3 Bakterienstämme

BL21 (DE3)	<i>hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene1)</i>
XL1-Blue	<i>hsdR17 endA1 supE44 thi recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ M15 Tn10( tet<sup>r</sup>)]</i>
SOLR™	<i>e14-(mcrA) (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ umuC:Tn5(Kan<sup>r</sup>) uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 lac F[proAB lacI<sup>q</sup> lacZ M15] Su- (nonsuppressing)</i>
One Shot TOP10	<i>F- mcrA ( mrr-hsdRMS-mcrBC) Ö80/lacZ M15 lacX74 recA1 deoR araD139 ( araleu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>
DH5α	<i>supE44 lac U169 (Ö80 lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>

### B 1.4 Plasmide und Vektoren

pCR® 2.1 TOPO TA	Amp <sup>r</sup> (Invitrogen)
pBluescript SK(+)	Amp <sup>r</sup> (Stratagene)
pET 21d	Amp <sup>r</sup> (Novagen)

### B 1.5 cDNA-Banken

- λ-Zap cDNA-Bank (Stratagene) aus Keimaugen (*S. tuberosum*) var. Désirée, wurde von Herrn Prof. L. Willmitzer (Max-Planck-Institut Golm) zur Verfügung gestellt.
- λ-Zap cDNA-Bank (Stratagene) aus 3 mm Kartoffelkeimen, 5 Monate nach der Ernte, von *S. tuberosum* var. Désirée, wurde von Herrn Olaf Stenzel (Institut für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) hergestellt.

## B 1.6 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligodesoxyribonukleotide erfolgte durch die Firmen Pharmacia und MWG Biotech.

Primer	Sequenz
P01	5' TGAAGSYTCTGTTTGTGA 3'
P02	5' NGCCAYTCAMANGCCAA 3'
P03	5' GATTACACTAGGAAGATTACTCTC 3'
P04	5' <u>GCCGGATCC</u> GTGCCATATGAGGCTGTNTA 3' <i>Bam</i> HI
P05	5' <u>GGAATTCTCGAGT</u> TTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' <i>Eco</i> RI <i>Xho</i> I
P06	5' GCAAGTACCGATAAGTGGTAAGCAGC 3'
P07	5' GCATTATTG <u>ACCAGA</u> AATATTGAG 3' <i>Spe</i> I
P08	5' <u>CTGAGCTCTAGAGGATCC</u> TTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' <i>Sac</i> I <i>Xba</i> I <i>Bam</i> HI
P09	5' <u>AGCCATGGC</u> AGCAGGAAGATGGAATC 3' <i>Nco</i> I
P10	5' <u>AAGGATCC</u> TTAAAAGCCACCATTAGCCA 3' <i>Bam</i> HI
P11	5' <u>CGCGCCATGGC</u> AGAATTGAGAGAAAAA 3' <i>Nco</i> I
P12	5' <u>TTGCTCGAGAA</u> ACGCACCATTAGCTGT 3' <i>Xho</i> I
P13	5'GGAAGTGTGTCGTTGATGAACACAAGC 3'
P14	5' <u>TACCTCGAGAA</u> AGCCACCATTAGCCAT 3' <i>Xho</i> I
P15	5' ACCACTTATCTGTACTAGCACACCCCT 3'
P16	5' AAGAACTTGGCATGTGAATGGGCCAAG 3'
A01	5'- <u>CTGAGCTCTAGAGGATCC</u> -3' <i>Sac</i> I <i>Xba</i> I <i>Bam</i> HI

**Tab. B-1:** PCR-Primer. Folgende Codes wurden verwendet: S: G+C; Y: C+T; M: A+C; N: A+T+G+C. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Start- und Stop-Codon sind hervorgehoben.



Primer	Sequenz
T7-Promotor	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3'
T7-Terminator	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'
Rev	5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'
TRI Seq	5' CAGGAGTGGCAATACATAAG 3'
TRII Seq	5' TCACGTAATCAAAAGGAGCT 3'

**Tab. B-2:** Primer zur Sequenzierung und PCR-Selektion. Für die A.L.F. Sequenzierung waren diese Cy5-Fluoreszenz markiert.

## B 1.7 Puffer, Standardlösungen und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Medien entsprechen den Vorschriften nach Sambrook und Mitarbeitern (1989). Abweichungen sind gesondert aufgeführt. *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium [Luria-Bertani-Medium, (Sambrook *et al.* 1989)], wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C angezogen. Gamburg's B5-Medium wurde nach Gamburg und Mitarbeitern 1968 und 3MS-Medium nach Murashige und Skoog 1962 hergestellt.

## B 1.8 Kits und Enzyme

ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
ALFexpress AutoRead Sequencing Kit	Pharmacia
Ampli Taq-Polymerase (5 U/μl)	Perkin Elmer
Chroma Spin Columns (100 und 400)	Clontech
Exassist Interference-Resistant Helper Phage	Stratagene
Genclean Kit	Bio 101
High Prime DNA Labeling Kit	Roche
Lysozym	Boehringer Mannheim
mRNA Purification Kit	Pharmacia
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	Promega
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
PeqGOLD RNAPure	Peqlab
<i>Pyrobest</i> DNA-Polymerase	Takara
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	NEB, Takara, Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer
Superscript Preamplification System Kit	GibcoBRL
T4 Ligase	Peqlab
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Peqlab
<i>Terminal Desoxynucleotidyl Transferase</i>	Takara
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen

## B 1.9 Chemikalien und Standards

Alle genutzten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „p. a.“ und wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Deisenhofen, BRD), Roth (Karlsruhe, BRD), AppliChem (Darmstadt, BRD) und Merck (Darmstadt, BRD) bezogen.

1 kb DNA-Leiter	GIBCO BRL
100 bp DNA-Leiter	Peqlab
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Bodyne A Membran 0,2 µm	Pall
dATP[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] 3000 Ci/mmol	NEN
Hybond <sup>TM</sup> -N <sup>+</sup> -Membran	Amersham
Glycin	ICN
Nylonmembran positiv geladen	Roche
Proteintestmixture 4/5	Serva
Nortropin	Boehringer Ingelheim

Calysteginreferenzsubstanzen (A<sub>5</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>1</sub> und *N*-Methylcalystegin B<sub>2</sub>) sowie zwei dihydroxylierte Nortropanalkaloide [bezeichnet als Alkaloid I und II, (Asano *et al.* 2001) ] wurden von Prof. Naoki Asano (Kanazawa, Japan) zur Verfügung gestellt..

Nortropinon wurde freundlicherweise von Herrn Dr. P. Bachmann (Braunschweig, BRD), Nortropin von der Firma Boehringer Ingelheim (Ingelheim, BRD) zur Verfügung gestellt. Pseudotropin wurde von Frau Prof. B. Dräger (Institut für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) gemäß Nickon und Fieser (1952) synthetisiert.

## B 2 Methoden

### B 2.1 Methoden der Analytik

#### B 2.1.1 Isolierung und Derivatisierung der Calystegine

Zur Quantifizierung der Calystegine in den Pflanzengewebe wurden 1 – 5 g Frischmasse verwendet. Die Gewebe wurden lyophilisiert (Heto FD 1.0) und anschließend zweimal mit 10 ml/g FM MeOH/H<sub>2</sub>O (50 Vol%) extrahiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm wurden die Überstände vereinigt, unter Vakuum auf 40 % des Volumens eingengt und anschließend neutralisiert. Der eingengte Überstand wurde auf eine mit einem stark sauren Kationenaustauscher (Merck Ionenaustauscher I) gefüllte Säule (Länge 100 mm, d = 10 mm, ca. 5 ml Gel) gegeben. Gewaschen wurde mit H<sub>2</sub>O entsprechend dem 3 - 4fachen Säulenvolumen und anschließend mit 2 N NH<sub>4</sub>OH eluiert, bis das Eluat einen basischen pH-Wert hatte. Das Eluat wurde neutralisiert, unter Vakuum auf 1 ml/g FM eingengt und ein

Aliquot für die Derivatisierung lyophilisiert.

Die Silylierung als Derivatisierung wurde wie folgt durchgeführt: zum Lyophilisat wurden:

- 40 µl wasserfreies Pyridin
- 40 µl Hexamethyldisiloxan (HMDS)
- 10 µl Trimethylchlorsiloxan (TMCS)

gegeben, das Gemisch 5 min im Ultraschallbad behandelt und 15 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Azobenzol-Lösung (1 mg/ml Azobenzol in n-Hexan) und 360 µl n-Hexan zugegeben. Azobenzol dient als interner Standard bei der GC-Untersuchung (vgl. Kap. B 2.1.5).

### B 2.1.2 Calysteginbestimmung in verletzten Kartoffelkeimen

3 cm lange Kartoffelkeime wurden vertikal mit einem Skalpell im Abstand von 3 mm ca. 3 mm tief und 25 mm lang eingeschnitten und über 6 Tage bei RT im Dunkeln gelagert. Kontrollkeime waren unverletzt. Die Keime wurden alle 24 h nach Verletzung geerntet. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß Kap. B 2.1.1.

### B 2.1.3 Fütterungsversuche mit Tropinon

Frisch abgeschnittene Kartoffelkeime (20 – 30 mm), var. Liu, *in vitro* Pflanzen, var. Désirée, deren Knollen (d = 5 mm) sowie Blätter von Gewächshauspflanzen, var. Liu, und Tabakblätter wurden in einer neutralisierten 5 mM Tropinonlösung über 24 bzw. 48 h bei RT unter normalen Tag/Nacht Bedingungen inkubiert. Als Kontrolle diente eine 5 mM KCl-Lösung. Die Probenvorbereitung erfolgte nach Kap. B 2.1.4. Eine Untersuchung erfolgte mit GC, GC-MS und AMD-TLC.

### B 2.1.4 Isolierung der Metabolite und der Reaktionsprodukte des Enzymassays

2 g Pflanzengewebe aus den Fütterungsversuchen (vgl. Kap. B 2.1.3) wurde mit dem Mörser homogenisiert, mit 700 µl MeOH/H<sub>2</sub>O (50 Vol%) extrahiert und zentrifugiert (5 min, 12000 rpm, 4 °C). 950 µl des Überstandes bzw. 950 µl des Enzymassays bei der Untersuchung der Reaktionsprodukte (vgl. Kap. B 2.3.2) wurden mit 50 µl konzentriertem Ammoniak versetzt und auf Säulen, die mit 1 g Extrelut (Merck) gefüllt waren, gegeben. Nach 15 min wurde zweimal mit je 6 ml Chloroform eluiert. Das Eluat wurde unter Vakuum eingedampft und in 100 µl Ethylacetat aufgenommen. Diese Lösungen konnten direkt mittels GC und AMD-TLC untersucht werden (vgl. Kap. B 2.1.5).

### B 2.1.5 Gaschromatographie

Calystegine lassen sich als TMS-Derivate gut gaschromatographisch erfassen. Deren Probenvorbereitung ist unter Kap. B 2.1.1 beschrieben. Zur Kalibrierung

wurde Calystegin B<sub>2</sub> verwendet (vgl. Anhang Kap. G 1), als interner Standard diente Azobenzol. Die Quantifizierung aller Calystegine mit Hilfe der Calystegin B<sub>2</sub> Eichgerade war möglich, da der Unterschied in den Peakflächen der verschiedenen Calystegine bei gleicher Konzentrationen 5 % war. Pseudotropin, Tropin und Norpseudotropin wurden gewöhnlich als freie Alkohole analysiert. In silylierten Proben konnten sie aber auch als TMS-Derivate detektiert werden.

Für die Quantifizierung der Calystegine wurden 3 bis 10 unabhängige Proben pro Gewebe aufgearbeitet und der Gehalt an Calysteginen mittels GC bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden auf Ausreißer untersucht. Werte, die mehr als +/- 30 % vom Mittelwert abwichen, wurden als Ausreißer gewertet und nicht mit in die Berechnung einbezogen. Die Grenze von +/- 30 % wurde festgelegt, nachdem für einige Gewebe die Ausreißer nach der Methode von Nalimov bestimmt worden waren (Kaiser und Gottschalk 1972). Die Standardabweichung SD wurde bei n = 3 Meßwerten berechnet.

#### Geräteausstattung:

Gerät:	Hewlett Packard Gaschromatograph HP 6890
Detektoren: (simultan)	Flammenionisationsdetektor (FID) Phosphor-Stickstoff-Detektor (PND)
Vorsäule:	20 cm deaktivierte Silica Kapillare, 320 µm i. D.
Säule:	HP-5
stationäre Phase:	95 % Methylsiloxan, 5 % Phenylsiloxan
Säulendimension:	30 m x 320 µm x 0,25 µm
mobile Phase:	Helium
Flußrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	1 µl

#### GC-Temperaturprogramme für die Calysteginbestimmung:

Je nach Extraktzusammensetzung wurden zwei verschiedene Temperaturprogramme gewählt. Das Temperaturprogramm 2 bietet die Möglichkeit, neben den Calystegin-TMS-Derivaten auch Tropin- und Pseudotropin-TMS-Derivate zu detektieren.

#### Programm 1:

Anfangstemperatur:	160 °C
Temperaturgradient 1:	5 °C/min bis 240 °C
Temperaturgradient 2:	10 °C/min bis 300 °C
Injektion:	Split: 1/20
Druck/Temperatur:	120 kPa / 250 °C

Programm 2:

Anfangstemperatur: 100 °C  
Temperaturgradient 1: 8 °C/min bis 240 °C  
Temperaturgradient 2: 15 °C/min bis 300 °C

Injektion: Split:1/20  
Druck/Temperatur: 120 kPa/250 °C

GC-Temperaturprogramm für Tropinon und dessen Metabolite:

Anfangstemperatur: 65 °C  
Temperaturgradient 1: 7 °C/min bis 120 °C  
Plateau: 2 min 120 °C  
Temperaturgradient 2: 15 °C/min bis 300 °C

Injektion: ohne Split,  
Druck/Temperatur: gepulste Injektion (200 kPa, 1,5 min), 250 °C

### B 2.1.6 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie

Geräteausstattung:

Gerät: Hewlett Packard Gaschromatograph HP 5890  
Serie II Plus  
Detektor: HP 5972 Quadrupolmassenspektrometer  
Ionisierungsspannung: 30 – 70 eV  
Säule: HP-5  
stationäre Phase: 95 % Methylsiloxan, 5 % Phenylsiloxan  
Säulendimension: 30 m x 320 µm x 0,25 µm  
mobile Phase: Helium  
Flußrate: 1 ml/min

GC-MS-Temperaturprogramm für Calystegine

Anfangstemperatur: 100 °C  
Plateau: 2 min 100 °C  
Temperaturgradient 1: 8 °C/min bis 240 °C  
Temperaturgradient 2: 15 °C/min bis 300 °C

Injektion: ohne Split  
Druck/Temperatur: 120 kPa/250 °C

GC-MS-Temperaturprogramm für Tropinon und dessen Metabolite:

Es wurde das unter Kap. B 2.1.5 beschriebene GC-Temperaturprogramm für Tropinon und dessen Metabolite mit der Ausnahme verwendet, daß die Injektion ohne Split bei 120 kPa/260 °C erfolgte.

### B 2.1.7 AMD-TLC (*Automated Multiple Development-TLC*)

AMD-Dünnschichtchromatographie wurde verwendet, um Tropinon und dessen Metabolite aufzutrennen. Für die von Scholl und Mitarbeiter (2001) entwickelte Trennmethode wurde das AMD 2 System (Camag, Schweiz) verwendet. Als stationäre Phase kamen Kieselgel-Platten (250 µm Schichtdicke, 10 x 20 cm, Glas, Merck) zum Einsatz. Die Proben wurden mit dem Linomat IV (Camag, Schweiz) aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte über 11 Stufen, beginnend mit einer mobilen Phase aus MeOH/CHCl<sub>3</sub> (100 : 0 Vol%) und einer Trennung über 20 mm. Die Kammer wurde vor jeder Trennstufe für 6 s mit komprimierter Luft konditioniert, die durch eine Flasche mit 9 M Ammoniak geleitet wurde. Die Trockenzeit zwischen den Läufen betrug 2 min. In den weiteren Stufen wurde das Laufmittelverhältnis jeweils um 10 Vol% verändert und die Trennstrecke um 5 mm bis auf 75 mm Gesamttrennstrecke erhöht (Ausnahme Lauf 10 und 11: Erhöhung Trennstrecke um 8 bzw. 7 mm).

Die Detektion erfolgte mit Dragendorffs Reagenz variiert nach Munier als Spray (Baerheim-Svendsen und Verporte 1983). Im Reagenz wurde Weinsäure anstelle Essigsäure verwendet, welches zu einer höheren Empfindlichkeit führt (Dräger 1995b). Die Detektionsgrenze lag bei 1 µg für Tropinon und 0,5 µg für Tropin und Pseudotropin.

## B 2.2 Methoden der Molekularbiologie

### B 2.2.1 Klonierung und Sequenzierung

Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren in Agarosegelen, allgemeine Klonierungsschritte, DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen, Ligationen und Plasmidisolierung wurden nach den Protokollen von Sambrook und Mitarbeiter (1989) durchgeführt. Für einige dieser Standardmethoden standen Kits zur Verfügung, bei denen, wenn nicht anders angegeben, nach den Vorschriften des Herstellers gearbeitet wurde (vgl. Kap. B 1.8).

Die Transformation der *E. coli* Stämme erfolgte mit der Hitzeschock-Methode von Cohen und Mitarbeitern (1972).

Die Sequenzierung erfolgte nach Chen und Seeburg (1985) sowie Sanger und Mitarbeitern (1977) mit dem „ABI Prism 377DNA Sequencer“ (Perkin Elmer) oder mit dem A.L.F.-Sequenziergerät (Pharmacia). Für die A.L.F.-Sequenzierung waren Cy5-markierte Oligonukleotide nötig. Die Sequenzierung mit dem A.L.F.-Gerät wurde von Dr. A. Peterson (Biozentrum Halle/S.) durchgeführt. Für die Sequenzauswertung und Restriktionsschnittstellenanalyse wurde die OMIGA 1.2 (Oxford Molecular Ltd.) Software genutzt. DNA- und Proteinhomologievergleiche wurden mit den ein-

schlägigen Tools wie FASTA3 und BLASTN durchgeführt. Diese Anwendungen sind unter [http://www.ebi.ac.uk/ebi\\_home.html](http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html) zusammengefaßt.

### B 2.2.2 Isolierung von RNA

Gesamt-RNA wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll mit dem „peqGOLD RNA Pure“ Kit (Peqlab) gewonnen. Für stärkehaltige Gewebe wie Kartoffelkeime, Wurzeln und Gewebe aus der Kartoffelknolle wurde eine modifizierte Form des von Reinbothe und Mitarbeiter (1992) beschriebenen Protokolls verwendet.

3 – 5 g Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff zerrieben und mit 6 ml Extraktionspuffer [10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (m/v) SDS] und 6 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25 : 24 : 1) für 5 min unter kräftigem Schütteln (Vortex Genie 2) extrahiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 rpm wurde die wäßrige Phase mit 1 Volumen PCI gemischt, für 5 min geschüttelt und wiederum für 10 min zentrifugiert. Die Fällung der Proteine wurde sooft wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr sichtbar war. Die in der wäßrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren wurden mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 3 Volumenanteilen Ethanol (96 %) über Nacht bei –20 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 5000 rpm wurde das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet auf Eis in 5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte mit 1 Volumen 4 M LiCl-Lösung (in 20 mM Natriumacetat, pH 5,2) mindestens 4 h auf Eis. Nach Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 5000 rpm wurde das Pellet bei RT getrocknet, in 2 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 3 Volumenanteilen Ethanol (96 %) über Nacht bei –20 °C gefällt. Die RNA wurde nach Sedimentation (45 min, 4 °C, 5000 rpm) mit Ethanol (70 %) gewaschen, bei RT getrocknet und anschließend in 300 – 500 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Verunreinigung mit Protein wurde über das Verhältnis von  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  bestimmt und lag bei allen Proben > 1,6.

Aus 3 mm Kartoffelkeimen der Varietät Liu wurde mit dem „mRNA Purification“ Kit (Pharmacia) mRNA gewonnen, die für die RACE-PCR verwendet wurde (vgl. Kap. B 2.2.4.2).

### B 2.2.3 Erststrangsynthese von cDNA

Die reverse Transkription von 5 µg Gesamt-RNA, isoliert aus 3 mm-Kartoffelkeimen der Sorte Liu oder Désirée, erfolgte mit 200 U „Superscript™ II Reverse Transkriptase“ nach dem Protokoll des „Superscript Preamplification System“ Kits (Gibco BRL). Dabei wurde für die Gewinnung der cDNA, die für die RT-PCR und die 3'RACE-PCR verwendet werden sollte, ein Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (Gibco BRL) verwendet. Die cDNA als Matrix für die 5'RACE-PCR wurde mit dem TR-genspezifischen Primer P02 generiert (vgl. Tab. B-1).

## B 2.2.4 Isolierung von cDNA durch PCR Techniken

### B 2.2.4.1 RT-PCR

Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde angewendet, um cDNA-Fragmente der *TRI* und *TRII* aus *S. tuberosum* zu isolieren. In der Regel wurden im 50  $\mu$ l Standardansatz 3  $\mu$ l cDNA als Matrix verwendet. Bei der PCR zur Isolation des TRI-homologen Fragmentes wurde als Matrix ein Aliquot der cDNA-Bank, gewonnen aus Kartoffelaugen, benutzt. Dieses wurde vorher wie unter B 2.2.4.4 beschrieben behandelt.

#### Standard-PCR Ansatz:

Primer	je	0,25 $\mu$ M
10 x PCR-Puffer		5 $\mu$ l
dNTP's		0,1 mM
Taq-Polymerase (Peqlab)		2 U
Aqua dest.		ad 50 $\mu$ l

Die PCR's wurden im T3 Thermocycler (Biometra) unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

95 °C	5 min	
95 °C	1 min	} 35 Zyklen
52 – 62 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Um eine hohe Lesegenauigkeit zu erreichen, kamen bei der Amplifikation der TRI und TRII über die gesamte Länge der cDNA die *Pyrobest* DNA-Polymerase (Takara) und die *Pfu*-Polymerase (Promega) zur Anwendung. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

95 °C	1 min	
94 °C	1 min	} 30 Zyklen
55 °C	0,5 – 1 min	
72 °C	1,5 min	
72 °C	5 min	

*Pfu*-Polymerase hat keine matrixunabhängige terminale Transferase-Aktivität, die an den 3'Enden des PCR-Produktes ein einzelnes Desoxyadenosin (A) anhängt. Vor der Klonierung der PCR-Fragmente in den pCR<sup>®</sup> 2.1 Vektor (Invitrogen) wird ein solches Desoxyadenosin mit folgendem Ansatz 30 min bei 70 °C synthetisiert:

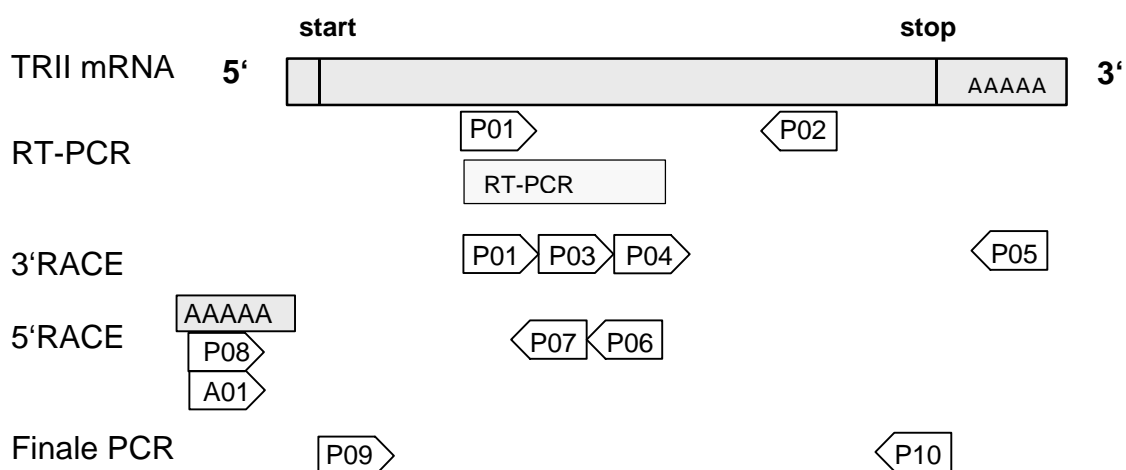
Qiaquick (Qiagen) gereinigtes PCR-Produkt	6 $\mu$ l
Ampli Taq 10 x PCR-Puffer	1 $\mu$ l
dATP 2 mM	1 $\mu$ l
Ampli Taq 2 U/ $\mu$ l (Perkin Elmer)	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1 $\mu$ l



### B 2.2.4.2 RACE-PCR

Die Durchführung der RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) orientierte sich an den Protokollen von Nakajima und Mitarbeitern (1999a). In Abb. B-2 ist der schematische Ablauf des RACE-PCR-Experimentes dargestellt. Zu Beginn wurde mit RT-PCR ein TRII-homologes Fragment amplifiziert (vgl. Kap. B 2.2.4.1) und sequenziert.

**3'RACE:** Aus der cDNA, gewonnen durch Erststrangsynthese mit einem Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (Gibco BRL) aus Kartoffel-mRNA (3 mm-Keime), wurden mit dem *TRIII*-genspezifischen Primer P01 und einem Oligo-dT Primer P05 (vgl.Tab. B-1) nach Standard-PCR-Protokoll Produkte amplifiziert (vgl. Kap. B 2.2.4.1). Wie für die RACE-PCR typisch, sind diese Amplifikate noch keiner distinkten Bande zuzuordnen. Mit 1 µl des ersten PCR-Ansatzes als Matrix wurde eine zweite PCR, eine sogenannte *nested* PCR, mit dem genspezifischen Primer P03 und dem Oligo-dT Primer P05 bei gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Da nach dieser zweiten PCR immer noch keine distinkten Produkte entstanden waren, war eine dritte, *nested* PCR mit den Primern P04 und dem Oligo-dT Primer P05 nötig. Dabei waren die Primer P04 und P05 so gewählt, daß sie eine *Bam*HI und *Xho*I Restriktionsschnittstelle in die Sequenz einfügten (vgl.Tab. B-1). Die PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit dem Genclean Kit (Bio 101) aus dem Agarosegel isoliert und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I gespalten. Nach Abtrennung von Nukleinsäureresten bis 400 bp Länge über „Chroma Spin 400“ Säulen (Clontech) wurden die Produkte in den vorher ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen und gereinigten Vektor pBluescriptSK(+) kloniert. Positive TRII-Klone wurden mit PCR (vgl. Kap. B 2.2.4.4) selektiert und sequenziert.



**Abb. B-2:** Schematische Darstellung der RACE-PCR.

**5'RACE:** cDNA wurde durch Erststrangsynthese mit dem genspezifischen Primer P02 generiert. Die „*Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase*“ (TdT, Takara) kata-

lysiert die Inkorporation von Desoxynukleotiden an das 3'-OH der cDNA.

Dazu wurde ein Ansatz von:

cDNA	0,03 µg
5 x TdT CoCl <sub>2</sub> -Puffer	12 µl
dATP 1mM	12 µl
<i>Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase</i> (Takara)	7 U
Aqua dest.	ad 60 µl

7 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die TdT bei 65 °C für 5 min deaktiviert. 3 µl des Ansatzes wurden zur PCR mit dem genspezifischen Primer P06 und einem Oligo-dT Primer P08 unter Standard-PCR-Bedingungen angewendet (vgl. Kap. B 2.2.4.1).

1 µl dieses PCR-Ansatzes wurde für eine weitere PCR verwendet, bei der neben dem Primerpaar P07 (0,4 µM) und P08 (0,1 µM) ein Ankerprimer A01 (0,3 µM) zum Einsatz kam. Dabei waren die Primer P07, P08 und A01 so gewählt, daß sie eine *SpeI* und *Bam*HI Restriktionsschnittstelle in die Sequenz einfügten (vgl.Tab. B-1).

Das Temperaturprogramm war wie folgt:

94 °C	5 min	} 1 Zyklus
55 °C	5 min	
72 °C	40 min	
94 °C	1 min	} 35 Zyklen
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Fragmentisolierung erfolgte analog der 3'RACE. Geschnitten wurden die Produkte mit *SpeI* und *Bam*HI. Nach Abtrennung von Nukleinsäureresten bis 100 bp Länge über „Chroma Spin 100“ Säulen (Clontech) wurden diese in den vorher ebenfalls mit *SpeI* und *Bam*HI geschnittenen und gereinigten Vektor pBluescriptSK(+) kloniert. Positive *TRII*-Klone wurden mit PCR (vgl. Kap. B 2.2.4.4) selektiert und sequenziert.

Finale RT-PCR: Mit dem Primerpaar P09 und P10 wurde eine RT-PCR (vgl. Kap. B 2.2.4.1) durchgeführt, um einen cDNA-Klon zu erhalten, der vollständig den codierenden Bereich umfaßt. Durch Integration einer *NcoI* Schnittstelle am Start-Codon und einer *Bam*HI Schnittstelle nach dem Stop-Codon konnten die Amplifikate nach Restriktionsspaltung und Abtrennung von Nukleinsäureresten („Chroma Spin 400“ Säulen, Clontech) in den vorher ebenfalls mit *NcoI* und *Bam*HI gespaltenen und gereinigten pET 21d Vektor (Novagen) ligiert werden. Nach Transformation von *E. coli* DH5α mit den entsprechenden Plasmiden wurden die positiven Klone mittels PCR (vgl. Kap. B 2.2.4.4) selektiert und anschließend sequenziert.

### B 2.2.4.3 Plasmid-PCR

Plasmid-PCR wurde zur Subklonierung und zur Gewinnung von Fragmenten, die zur Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet wurden, durchgeführt.

Zur Subklonierung der *StTRI*-homologen- und der *StTRII-L1*-cDNA's in den Expressionsvektor pET 21d (Novagen) wurden Restriktionsschnittstellen mit PCR in die cDNA-Sequenzen so eingeführt, daß die cDNA's im Zielvektor im richtigen Leserahmen vorlagen. Zur Amplifizierung der *StTRI*-cDNA wurde das Primerpaar P11 und P12, zur Amplifizierung der *StTRII*-cDNA das Primerpaar P09 und P14 verwendet (vgl.Tab. B-1).

Die Primer, die zur PCR zur Gewinnung von cDNA-Fragmenten für Hybridisierungssonden verwendet wurden, sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

Im Standard-PCR-Ansatz wurden jeweils 100 ng des Ausgangsplasmides (*StTRI*-homolog-pBluescript bzw. *StTRII-L1*-pET) als Matrix benutzt.

### B 2.2.4.4 PCR zur Selektion

PCR zur Selektion wurde zum Nachweis rekombinanter Klone bzw. positiver Phagenpools beim Screenen einer cDNA-Bank verwendet.

Bakterien: Kolonien wurden von den Kulturplatten abgenommen und in 20 µl Aqua dest. 10 min bei 95 °C behandelt, um durch Hitzedenaturierung die Plasmide für die PCR zugänglich zu machen.

Phagen: Aus den Phagenpools wurde ein Aliquot dreimal im Wechsel für je 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 95 °C denaturiert.

Die PCR erfolgte nach Standardbedingungen (vgl. Kap. B 2.2.4.1) mit den Primern P01 und P02 (Nachweis *TRI* und *TRII*) bzw. P09 und P10 (Nachweis *TRII*), wobei im Falle der Bakterien die gesamten 20 µl, im Falle der Phagen 5 µl als Matrices eingesetzt wurden.

### B 2.2.5 Screening von cDNA-Banken

Es standen die unter Kap. B 1.5 aufgeführten cDNA-Banken zur Verfügung. Zum Screening mit der *TRI*-Sonde wurde die cDNA-Bank aus Kartoffelaugen, zum Screening mit der *TRII*-Sonde die cDNA-Bank aus 3 mm langen Keimen benutzt. Die Durchführung des Primär-, Sekundär- und Tertiärscreenings lehnte sich an die Protokolle von Stratagene an.

Beim *TRI*-Screening wurden  $6 \times 10^5$  Phagen (beim *TRII*  $1,5 \times 10^5$  Phagen), verteilt auf  $5 \times 10^4$  pfu/145mm Petrischale, entsprechend dem Protokoll ausplattiert und 8 h bei 37 °C inkubiert, bis die Phagen eine Größe von 1 – 2 mm aufwiesen. Nach Abkühlung über Nacht im Kühlschrank wurden pro Petrischale nacheinander 2 Filter (Biodyne A Membran, d = 135 mm, Pall, UK) 1 bzw. 3 min aufgelegt. Nach Behandlung der Filter je 5 min mit 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und 0,5 M Tris-HCl/1,5 M NaCl (pH 7,4), 15 min mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat/NaOH, pH 7,0) und dem Fixieren der Phagen-DNA mittels UV-Licht (120 mJ, Stratalinker,

Stratagene) wurden die Filter mit den Sonden hybridisiert. Als Hybridisierungssonde diente beim *TRI*-Screening das durch PCR mit den Primern P01 und P02 aus der Kartoffelaugen-cDNA-Bank gewonnene Fragment, beim *TRII*-Screening das mit Plasmid-PCR gewonnene Fragment (Primer: P09 und P10). Die radioaktive Markierung erfolgte unter Verwendung des „High Prime Labeling“ Kits (Roche) mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. Nichteingebaute Nukleotide wurden mit dem „Nucleotide Removal“ Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

Nach Vorhybridisierung (3 – 4 h, 65 °C) in 30 ml Hybridisierungspuffer [6 x SSC, 10 mM EDTA, 5 x Denhardt's Lösung (Sambrook *et al.* 1989), 0,5 % (m/v) SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA] und anschließender Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde (15 – 18 h) bei 65 °C im gleichen Hybridisierungspuffer wurden die Membranen gewaschen [je zweimal bei RT in 2 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS für 15 min, je zweimal bei 55 °C in 1 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS für 30 min und einmal bei 55 °C in 0,1 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS für 15 min]. In Folie eingelegt, wurde von den Filtern ein Autoradiogramm durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Kodak X-Omat Blue XB-1) und einer Verstärkerfolie über 72 h bei - 80 °C aufgenommen.

Plaques, denen positive Signale auf beiden Membranen zuzuordnen waren, wurden in 500 µl SM-Puffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Gelatine, pH 7,5) gelöst und unter Zugabe von 20 µl Chloroform 2 h bei RT geschüttelt. Diese Phagenpools wurden wie unter B 2.2.4.4 beschrieben mittels PCR untersucht.

Beim *TRII*-Screening erfolgte eine Selektion der Phagenpools nach Größe der in den Phagemiden enthaltenen cDNA's gemäß dem Protokoll von Luo und Mitarbeitern (1994). PCR-Amplifikate, synthetisiert mit den vektorspezifischen Primern T7-Promotor und Rev (vgl. Tab. B-2), wurden nach Auftrennung im 1,5%igen Agarosegel und Übertragung auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) einer *Southern Blot* Analyse unterzogen (Arbeitsschritte vgl. Kap. B 2.2.7).

Mit einem Sekundär- (500 pfu/100 mm Petrischale) und einem Tertiärscreening (100 pfu/100 mm Petrischale) unter gleichartigen Bedingungen wurden aus den Phagenpools mit positivem PCR-Signal Einzelphagen isoliert. Die *in vivo* Excision der pBluescript-Phagemide aus den UNI-ZAP XR Vektoren der ausgewählten Phagen wurde nach Herstellerprotokoll von Stratagene durchgeführt.

### B 2.2.6 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Blättern von *S. tuberosum* var. Désirée nach einem Protokoll von Brandstädter und Mitarbeitern (1993) isoliert. 200 mg Blattmaterial, gemörsert in flüssigem Stickstoff, wurden mit 1 ml Extraktionspuffer [100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1,5 % (m/v) SDS, 10 mM  $\beta$ -Mercapto-

ethanol) 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 3 M Kaliumacetat (in 11,5%iger Essigsäure) und Inkubation für 10 min im Eisbad wurde für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen PCI vorsichtig gemischt und für 5 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und wiederum 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Die RNA-Spaltung erfolgte mit RNase A (1 µg/ml) 1 h bei 37 °C.

### B 2.2.7 Southern Blot Analyse

Mit Hilfe von *Southern Blot* Analysen wurde die Kopienzahl der *TR*-Gene im Genom von *S. tuberosum* untersucht (Southern 1975). Je 20 µg genomische DNA (vgl. Kap. B 2.2.6) wurde in verschiedenen Ansätzen mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII* und *XbaI* (100 U, 12 h bei 37 °C) vollständig gespalten. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0,8%igen Agarosegel wurde das Gel 15 min mit 0,25 M HCl behandelt. Es folgten eine Inkubation für 30 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und nach kurzem Spülen mit H<sub>2</sub>O eine zweimalige Inkubation für je 15 min in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,4). Der Kapillartransfer der Nukleinsäuren (Sambrook *et al.* 1989) erfolgte auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) in 20 x SSC (vgl. Kap. B 2.2.5), die Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran mit UV-Licht (120 mJ, Stratalinker, Stratagene).

Für die Vorhybridisierung (4 h) und die Hybridisierung (20 h) bei 42 °C wurde ein Puffer aus 50 % (v/v) Formamid, 5 x SSPE (0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O/NaOH pH 7,0, 0,75 M NaCl, 0,005 M EDTA) 0,1 % (m/v) SDS, 0,2 % (m/v) BSA, Ficoll und PVP und 120 µg/ml Heringssperma-DNA verwendet. Als Hybridisierungssonde kam beim *TRI Southern Blot* ein 210 bp großes C-terminales Fragment zum Einsatz, welches durch Restriktionsspaltung des *TRI*-pET 21d Vektors (Insertation der *TRI*-homologen-cDNA zwischen der *NcoI* und der *BamHI* Schnittstelle des Vektors) mit *BsaI* und *BamHI* gewonnen wurde. Radioaktiv markiert wurde nach der beim cDNA-Bank-Screening beschriebenen Methode (vgl. Kap. B 2.2.5). Nach dem Waschen [zweimal für 15 min mit 3 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS bei RT und zweimal für 25 min bei 60 °C] wurde die Membran in Folie eingeschweißt und ein Autoradiogramm durch Auflegen eines „Cyclone™ Storage Phosphor Screens“ (Multipurpose, Packard) erstellt. Entwickelt wurde nach 48 h mit dem „Cyclone™ Phosphorimager“ (Packard). Nach dem vollständigen Abwaschen der Radioaktivität [zweimal 15 min mit 0,1 % (m/v) SDS bei 95 °C] wurde die Membran mit der *TRII*-Hybridisierungssonde (786 bp), gewonnen mittels Plasmid-PCR (Primer: P09 und P10), unter oben genannten Bedingungen rehybridisiert, gewaschen und entwickelt.

### B 2.2.8 Northern Blot Analyse

Je 20 µg Gesamt-RNA der unterschiedlichen Gewebe wurde nach 10 min Denaturierung bei 65 °C in einem 1,2%igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt (Sambrook *et al.* 1989). Nach dem Waschen des Gels (zweimal 25 min mit DEPC-H<sub>2</sub>O und 15 min mit 20 x SSC) wurden die Nukleinsäuren durch Kapillartransfer (Sambrook *et al.* 1989) auf eine Hybond N+ (Amersham) Membran über Nacht transferiert und mit UV-Licht (120 mJ, Stratlinker, Stratagene) auf der Membran fixiert. Für die Vorhybridisierung (4 h) und die Hybridisierung (20 h) bei 42 °C wurde ein Puffer aus 50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 5 x Denhard`s (Sambrook *et al.* 1989), 1 % (m/v) SDS, 10 % (m/v) Dextransulfat und 50 µg/ml Heringssperma-DNA verwendet. Hybridisiert wurde mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP markierter *TRI*- oder *TRII*-Sonde (je 400 bp langes C-terminales Fragment durch Plasmid PCR gewonnen; *TRI*: Primer P16 und P12; *TRII*: Primer P15 und P10). Nach dem Waschen [zweimal für 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS bei RT, einmal für 30 min bei 58 °C mit 1 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS und zweimal für 20 min bei 58 °C mit 0,2 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS] wurde ein Autoradiogramm wie unter B 2.2.7 beschrieben erstellt. Nach dem vollständigen Abwaschen der Radioaktivität (vgl. Kap. B 2.2.7) wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten 18S rRNA-Sonde aus *L. esculentum* unter oben genannten Bedingungen rehybridisiert, gewaschen und entwickelt.

### B 2.2.9 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Die Herstellung der *StTRII-L1* bis *L3*-pET 21d Plasmide ohne 6xHis-Fusionsprotein ist in Kap. B 2.2.4.2 (Finale RT-PCR) beschrieben. Ausgehend von Plasmid-PCR-Produkten (vgl. Kap. B 2.2.4.3) erfolgte die Herstellung der *StTRII-L1*- und *TR*-homolog-pET 21d Vektoren unter Verwendung der 6xHis-Fusion. Das *StTRI-SE*-pET-21d Plasmid mit dem Histidinanker wurde durch PCR mit *Pfu* DNA-Polymerase (vgl. Kap. B 2.2.4.1, Primerpaar P11 und P12), anschließendem Restriktionspaltung und Ligation erstellt.

Bei der Expression von rekombinanten TR-Proteinen wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert (vgl. Tab. B-3 ).

pET 21d Plasmide (Klonierungsstelle in der MCS)	Rekombinantes Protein
<i>StTRII-L1</i> ( <i>NcoI/BamHI</i> )	StTRII
<i>StTRII-L2</i> ( <i>NcoI/BamHI</i> )	StTRII
<i>StTRII-L3</i> ( <i>NcoI/BamHI</i> )	StTRII
<i>StTRII-L1-His</i> ( <i>NcoI/XhoI</i> )	StTRII-6xHis-Fusion
<i>TRI</i> -homolog-His ( <i>NcoI/XhoI</i> )	TR-homolog-6xHis-Fusion
<i>StTRI-SE-His</i> ( <i>NcoI/XhoI</i> )	StTRI-6xHis-Fusion

**Tab. B-3:** Vektoren für die heterologe Expression von rekombinanten TR-Proteinen.

Die Anzucht der transformierten Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0. Die Induktion der Expression erfolgte IPTG (1 mM) und wurde für die TRI 6 h bei 37 °C, 150 rpm und für die TRII 18 h bei 25 °C, 150 rpm fortgeführt. Nach Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit STE-Puffer (Sambrook *et al.* 1989) gewaschen und rezentrifugiert. Das im Lysepuffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 3 mM DTT, 0,2 % Triton X-100, 0,001 % Lysozym) suspendierte Pellet wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und dreimal bei - 80 °C eingefroren und aufgetaut. Der Zellaufschluß wurde mit dem Potter-Homogenisator (Glass Col, USA) viermal 2 min bei 1000 rpm/min auf Eis durchgeführt. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 rpm, 4 °C) wurden die Überstände zur Proteinreinigung und für den Enzymassay verwendet.

## **B 2.3 Methoden der Biochemie**

### **B 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)**

Proteinproben wurden mit Probenpuffer [0,625 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % Glycerol, 2% (m/v) SDS, 4 % β-Mercaptoethanol, 0,25 % Bromphenolblau] im Verhältnis 1 : 1 gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Laemmli (1970) in der Minikammer „PHERO-minivert“ (Biotech-Fischer). Die Proteine wurden in einem 5%igen Sammelgel bei 25 mA konzentriert und im 12,5%igen Trenngel bei 35 mA elektrophoretisch aufgetrennt.

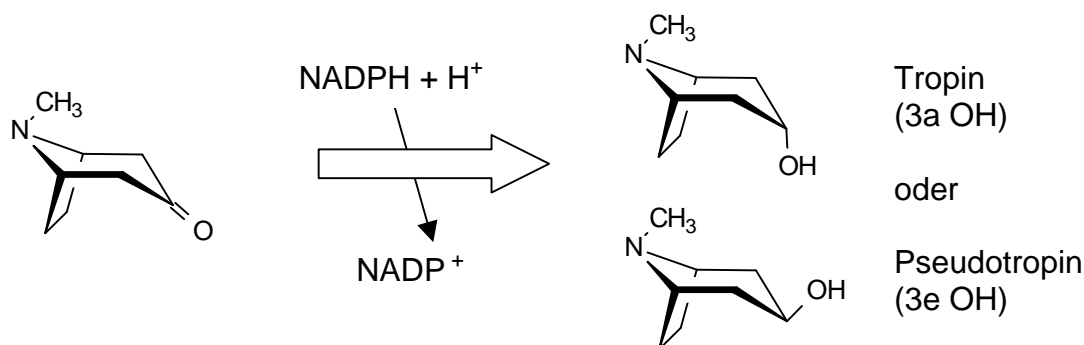
Zur Auswertung der Gele wurden die Coomassie-Färbung (Empfindlichkeit 200 ng/Bande) oder die empfindlichere Silberfärbung (100 pg/Bande) verwendet.

Bei der Coomassiefärbung wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung [0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) MeOH, 1 % Glycerol] gefärbt und mit einer Lösung aus 25 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Heukhofen und Dernick (1988) durchgeführt. Nach Fixierung [1 h mit 50 % (v/v) MeOH, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,02 % (v/v) Formaldehyd] wurde dreimal für 20 min mit Ethanol (50 %) gewaschen und anschließend das Gel für 1 min mit einer 0,02 % (m/v) Natriumthiosulfatlösung behandelt. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit Wasser und eine Imprägnierung [0,2 % (m/v) Silbernitrat, 0,025 % (v/v) Formaldehyd] über 20 min. Entwickelt wurde nach dreimaligem Waschen (H<sub>2</sub>O) mit Entwicklungslösung [6 % (m/v) Natriumcarbonat, 0,5 % (m/v) Natriumthiosulfat, 0,02 % (v/v) Formaldehyd] bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Reaktion mit [50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure] abgestoppt.

### B 2.3.2 Enzymassay

Zur enzymatischen Reduktion des Tropinons und der Substratanaloga wird NADPH als Co-Substrat benötigt (Koelen und Gross 1982; Dräger *et al.* 1988). Die Umwandlung von NADPH zu NADP<sup>+</sup> folgt einer Extinktionsabnahme (Abb. B-3). In die Aktivitätsberechnung fließt der molare Extinktions-Koeffizient von NADPH mit  $6.18 \times 10^2$  (l x mol<sup>-1</sup> x mm<sup>-1</sup>) bei 340 nm und 30 °C ein (Bergmeyer 1985).



**Abb. B-3:** Prinzip des photometrischen Enzymassays: Reduktion des Tropinons.

Der Ansatz in der Meßküvette:

Protein (Probe)		3 – 20 µg
Kaliumphosphat-Puffer pH 6,4		0,1 M
Substrat		5 mM
NADPH		0,2 mM
Aqua dest.	ad	1 ml

wurde bei 30 °C und 340 nm über 120 Sekunden in einem Meßbereich von A – 1,00 bis + 1,00 im Zweistrahlphotometer (UV-160A, Shimadzu) vermessen. Um den unspezifischen NADPH-Abbau nicht zu erfassen, wurde als Kontrolle der oben beschriebene Ansatz, aber ohne Substrat, verwendet. Unter Verwendung der Proteinkonzentrationen (vgl. Kap. B 2.3.3) konnte die Enzymaktivität/mg Protein errechnet werden.

Der Enzymassay der reversen Oxidationsreaktion, bei dem die Bildung von NADPH bei 340 nm untersucht wurde, enthielt 0,1 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,4, 0,2 mM NADP<sup>+</sup> und 5 mM Pseudotropin.

Zum Nachweis der Reduktionsprodukte mittels GC und GC-MS (vgl. Kap. B 2.1.5) wurde ein Enzymassay mit einem NADPH regenerierenden System verwendet. 3 bis 20 µg Proteinlösung wurden in einem 1 ml Ansatz (1 mM Glucose-6-Phosphat, 2 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.4, 1 mM Substrat) 1 h bei 30 °C inkubiert. Mit 100 µl Ammoniak wurden die Enzyme inaktiviert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte laut Kap. B 2.1.4 über Extrelut (Merck).



### B 2.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellaufschlüssen erfolgte spektrophotometrisch nach Bradford (1976). Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 40 bis 150 µg/ml verwendet.

### B 2.3.4 Partielle Reinigung und Charakterisierung der StTRII

#### B 2.3.4.1 Partielle Reinigung der TRII mittels FPLC

Vom Bakterienlysat aus einem Liter Bakterienkultur (vgl. Kap. B 2.2.9) mit rekombinantem StTRII-Protein wurden über PD10 Säulen (Pharmacia, Sephadex G-25 M Matrix) Ionen und oberflächenaktive Substanzen abgetrennt. Eluiert wurde dabei mit Startpuffer [10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 1 mM DTT, 15 % (m/v) Glycerol].

Als Säulenmaterial für die *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) wurde Fractogel EMD-DEAE 650(M) ausgewählt, welches ein basischer Anionenaustauscher mit Diethylaminoethyl-Resten ist. Die Probe wurde mit Hilfe des Superloops aufgetragen und anschließend so lange mit Startpuffer gewaschen, bis alle nichtgebundenen Proteine von der Säule eluiert worden waren. Das rekombinante Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,2 M NaCl in 120 ml eluiert.

Die Fraktionen wurden im Enzymassay (vgl. Kap. B 2.3.2) sowie mittels SDS-PAGE (vgl. Kap. B 2.3.1) überprüft.

#### Geräteausstattung FPLC:

Gerät:	FPLC Pharmacia
Detektor:	Photometer Uvicord SII Absorption bei 280 nm
Schreiber:	REC 102
Säule:	Pharmacia C10 (Länge 110 mm)
Matrix:	Fractogel EMD-DEAE 650(M)
Flußrate:	1 ml/min
Pumpe A:	Pump P-500: Startpuffer
Pumpe B:	Pump P-500: Startpuffer, 0,2 M NaCl
Gradientenprogrammer	GP-250 Plus
Fraktionierung:	Frac 100: jeweils 5 ml

#### B 2.3.4.2 Konzentrierung des TRII-Proteins

Die FPLC-Fraktionen, die im Standardenzymassay (vgl. Kap. B 2.3.2) eine pseudotropinformende Aktivität zeigten, wurden vereint und mittels Dialyse aufkonzentriert. Die Dialyse erfolgte in Cellulose-Membranen (Sigma), die mit PEG 40000 (Serva) umhüllt wurden. Bei 4 °C wurden die Proteinlösungen auf 2 – 3 ml eingengt. Es wurden die Enzymaktivität (vgl. Kap. B 2.3.2) und der Proteingehalt (vgl. Kap. B 2.3.3) bestimmt.

### B 2.3.4.3 pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

Der Einfluß des pH-Wertes auf die relative Enzymaktivität des StTRII-Enzyms wurde in den wie unter B 2.3.4.2 gewonnenen, konzentrierten Proteinlösungen in einem Bereich von pH 3,5 bis 8,5 ermittelt. Bei pH 3,5 bis 5,0 wurde in einem 0,1 M Glycin-Puffer, im Bereich von pH 5,5 bis 8,5 in einem 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer gemessen, wobei die Zusammensetzung des Enzymassays den Standardbedingungen entsprach (vgl. Kap. B 2.3.2).

Für die Messungen wurde immer dieselbe Proteinpräparation verwendet. Jeder Meßwert wurde drei bis fünfmal wiederholt; es wurden Mittelwerte gebildet. Die Standardabweichung (SD) wurde bei  $n = 3$  Meßwerten berechnet und ist in Balken angegeben.

### B 2.3.4.4 $K_m$ und $V_{max}$ Bestimmung

Zur Bestimmung der  $K_m$  und  $V_{max}$  Werte der StTRII wurde der Standardenzymassay genutzt. Tropinon bzw. Nortropinon wurden in Konzentrationen von 0,01562 mM bis 4 mM eingesetzt. Beim Tropinon wurden die Parameter zusätzlich auch bei pH 5,0 und 7,6 untersucht. Im Falle des Nortropinons konnte nur im Bereich von 0,01562 mM bis 0,30 mM gemessen werden, da das Substanzgemisch über eine hohe Eigenabsorption verfügt. Für jeden Meßpunkt wurden 3 - 5 Messungen durchgeführt. Die Auswertung der Enzymkinetik erfolgte nach den Methoden von Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk (Lehninger *et al.* 1994).

### B 2.3.4.5 Testung von Substratanaloga

Neben Tropinon wurden verschiedene andere Substrate getestet, die in Abb. B-4 dargestellt sind. Im Enzymassay wurden diese analog Kap. B 2.3.2 verwendet.

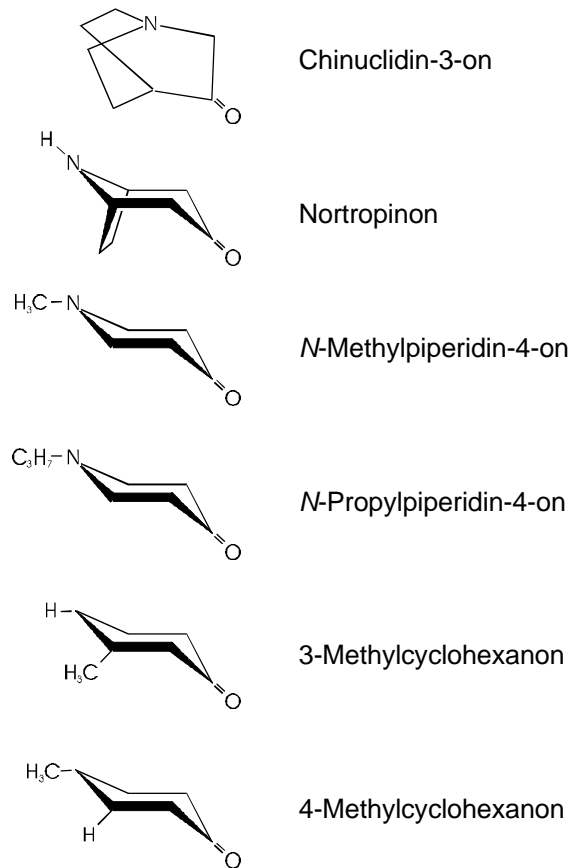
### B 2.3.5 Reinigung der rekombinanten TR-Enzyme als 6xHis-Fusionsprotein

Die Reinigung der rekombinanten TRI- und TRII-Enzyme (Fusion mit Histidinanker) wurde mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose durchgeführt (Schmitt *et al.* 1993; Sulkowski 1985).

Die Bakterienpellets aus 50 ml Expressionskulturen (vgl. Kap. B 2.2.9, Expressionsbedingungen) wurden in 1 ml Lysepuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, 1 mg/ml Lysozym, 3  $\mu\text{l}$  gesättigte PMSF-Lösung) suspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Homogenisierung mit dem Potter-Homogenisator (Glass Col, USA) viermal für 2 min auf Eis und anschließender Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand über eine equilibrierte „Ni-NTA Spin“ Säulen (Qiagen) gegeben und zentrifugiert (2 min, 700 g, 4 °C). Zweimal wurde mit 600  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) gewaschen und unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Eluiert

wurde zweimal mit 200  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM  $\text{NaCl}$ , 250 mM Imidazol, pH 8,0).

Im Falle des TRI-Enzyms wurden alle Puffer auf einen pH von 7,0 eingestellt, da sonst nach der Elution keine Aktivität zu messen war.



**Abb. B-4:** Strukturen von Tropinon-Substratanaloga für den Enzymassay.

## C Ergebnisse

### C 1 Analytik und Akkumulation der Calystegine in *S. tuberosum*

#### C 1.1 Analytik der Calystegine

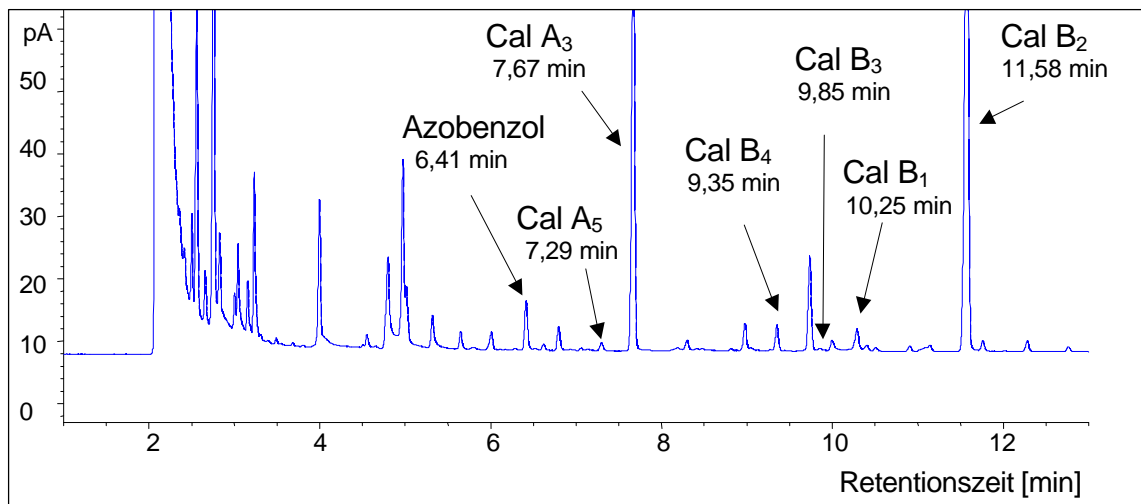
Um Calystegine in Geweben von *S. tuberosum* bestimmen zu können, war es nötig, die Rohextrakte mit einem stark sauren Kationenaustauscher aufzureinigen (vgl. Kap. B 2.1.1). Der Nachweis und die Quantifizierung der Calystegine erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit mittels Gaschromatographie (GC) (Dräger 1995a) und GC mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) (Dräger 1995a; Molyneux *et al.* 1996).

##### C 1.1.1 Quantifizierung von Calysteginen mittels GC

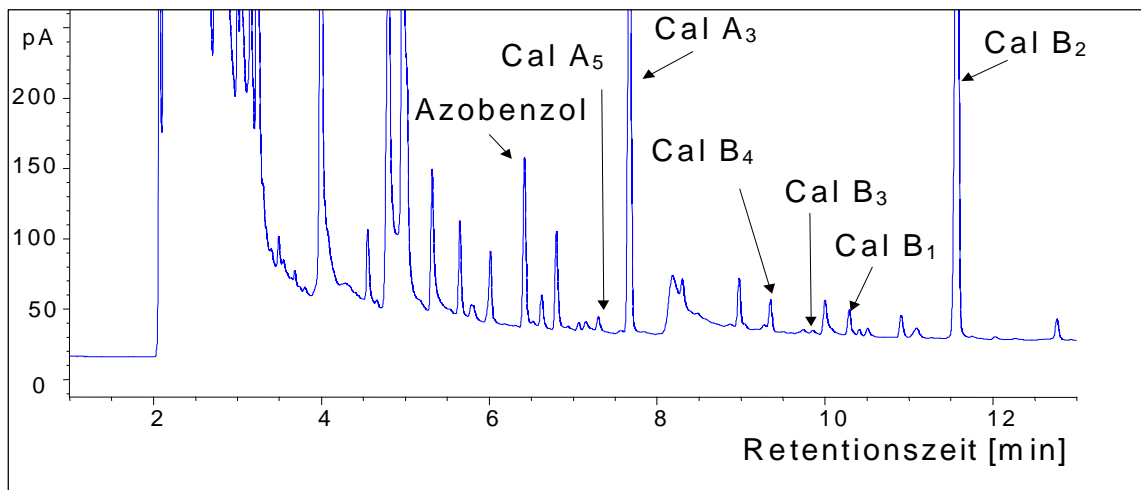
Calystegine sind nichtflüchtige Verbindungen. Sie müssen für die gaschromatographische Untersuchung einer Derivatisierung unterzogen werden (vgl. Kap. B 2.1.1). Mit einem Gemisch aus Hexamethyldisiloxan (HMDS) und Trimethylchlor-siloxan (TMCS) erfolgte eine „milde“ Silylierung, d. h. die Calystegine wurden an den Hydroxylgruppen, nicht dagegen an der sekundären Aminogruppe silyliert (Dräger 1995a). Abb. C-1 zeigt die Chromatogramme eines Kartoffelkeimextraktes mit simultaner Flammenionisationsdetektion (FID) und stickstoffsensitiver Detektion (PND).

Die Zuordnung der Signale erfolgte durch die Retentionszeiten im Vergleich zu reinen Calysteginen als Referenzsubstanzen und dem Verhältnis zwischen PND und FID. Die Quantifizierung wurde mit dem FID-Signal durchgeführt, da dieses über eine höhere Basisliniengenauigkeit verfügt. Calystegin B<sub>2</sub> diente zur Kalibrierung. (vgl. Anhang Abb. G-1). Die Detektionsgrenze für Calystegine im Extrakt lag bei  $\approx 1 \mu\text{g/ml}$  Probe. Eine zuverlässige Quantifizierung war bei Konzentrationen  $> 10 \mu\text{g/ml}$  Probe möglich. Das entspricht der unter Kap. B 2.1.1 beschriebenen Aufarbeitungsmethode  $\approx 5 - 10 \mu\text{g}$  Calystegin/g FM in Abhängigkeit von der verwendeten Frischmasse (FM) pro Probe. Die Calystegine A<sub>5</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>1</sub> konnten nur in wenigen Proben detektiert werden (siehe Kap. C 1.2.2.1). Die Konzentration des Calystegines A<sub>5</sub> war  $< 10 \mu\text{g/ml}$  Probe, im Fall der Calystegine B<sub>1</sub> und B<sub>3</sub>  $< 5 \mu\text{g/ml}$  Probe. Erschwerend kam hinzu, daß bei der Retentionszeit von Calystegin B<sub>1</sub> (10,25 min) ein weiteres Signal auftrat, das keinem Calystegin zuzuordnen war. Weitere Calystegine in Konzentrationen  $< 5 \mu\text{g/g}$  FM können nicht ausgeschlossen werden (siehe auch Kap. C 1.1.2).

A



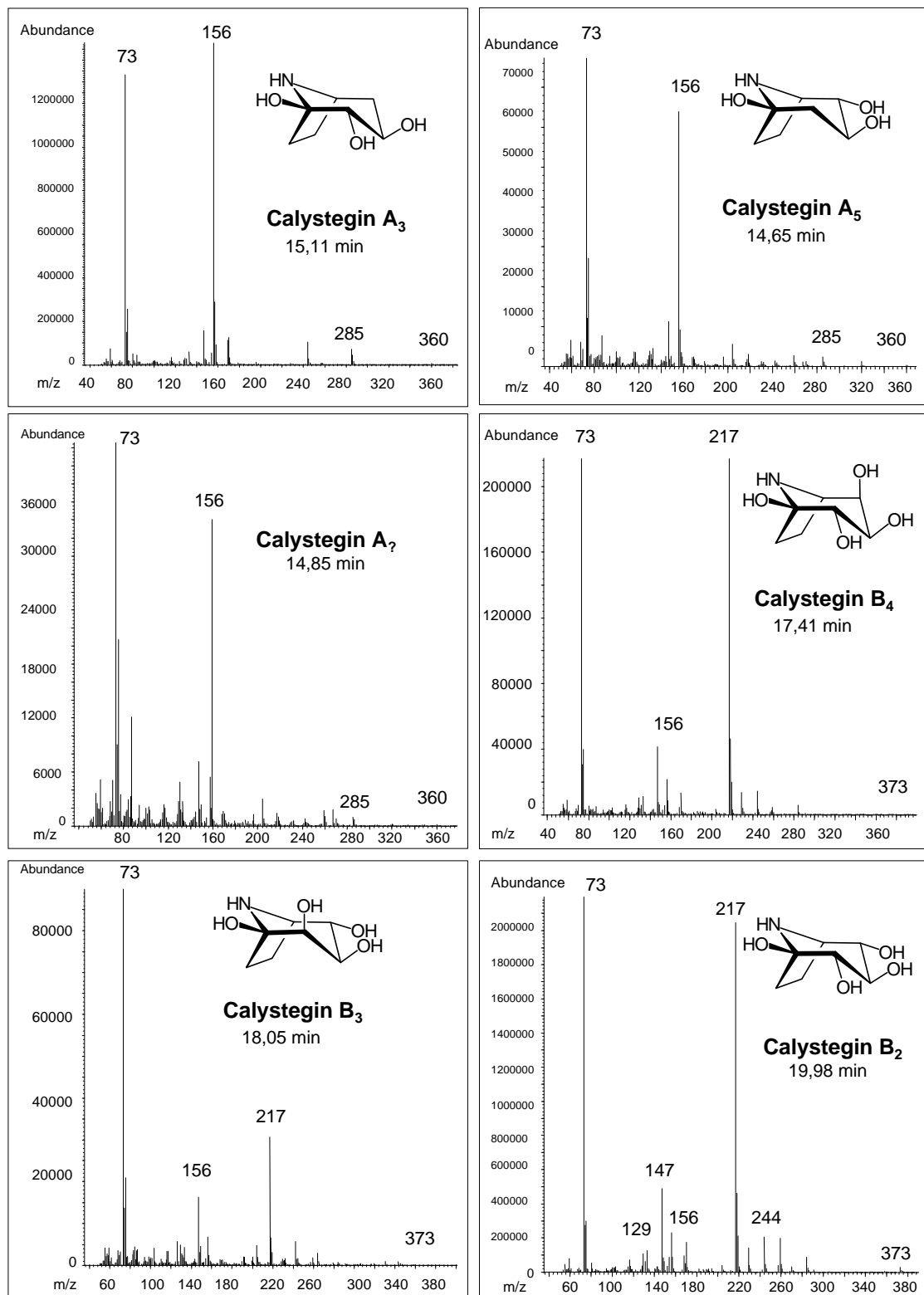
B



**Abb. C-1:** Gaschromatogramme eines Extraktes aus 3 mm Keimen von *S. tuberosum*, var. Liu nach Silylierung. Gemessen wurde im GC-Temperaturprogramm 1 (vgl. Kap. B 2.1.5) Abb. A: FID-Signal. Abb. B: PND-Signal. Bei der Retentionszeit des Calystegines B<sub>1</sub> (10,25 min) ist die Coretention mit einem unbekanntem Stoff zu sehen.

### C 1.1.2 Identifizierung von Calysteginen mit GC-MS

Silylierte Proben (vgl. Kap. B 2.1.1) aus Extrakten von *S. tuberosum* der verschiedenen Entwicklungsstadien wurden zusätzlich mittels GC mit massenspektrometrischer Detektion untersucht. Das Temperaturprogramm wurde so gewählt, daß auch Metabolite des Tropinons detektiert werden konnten (GC-MS Temperaturprogramm für Calystegine, vgl. Kap. B 2.1.6). Die Massenspektren wurden mit denen der Referenzsubstanzen verglichen. Sie zeigen die in der Literatur beschriebenen typischen Fragmentierungsmuster für Tropanalkaloide (Blossey *et al.* 1964) und Calystegine (Dräger 1995a). In Abb. C-2 sind die Fragmentierungsmuster von Calystegin-TMS-Derivaten dargestellt.



**Abb. C-2:** GC-MS-Fragmentierungsmuster von Calystegin-TMS-Derivaten (Calystegin A<sub>3</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>7</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>) eines Extraktes aus 3 mm Keimen von *S. tuberosum*, var. Liu nach Silylierung. Es wurde das GC-MS Temperaturprogramm für Calystegine (vgl. Kap. B 2.1.6) verwendet.

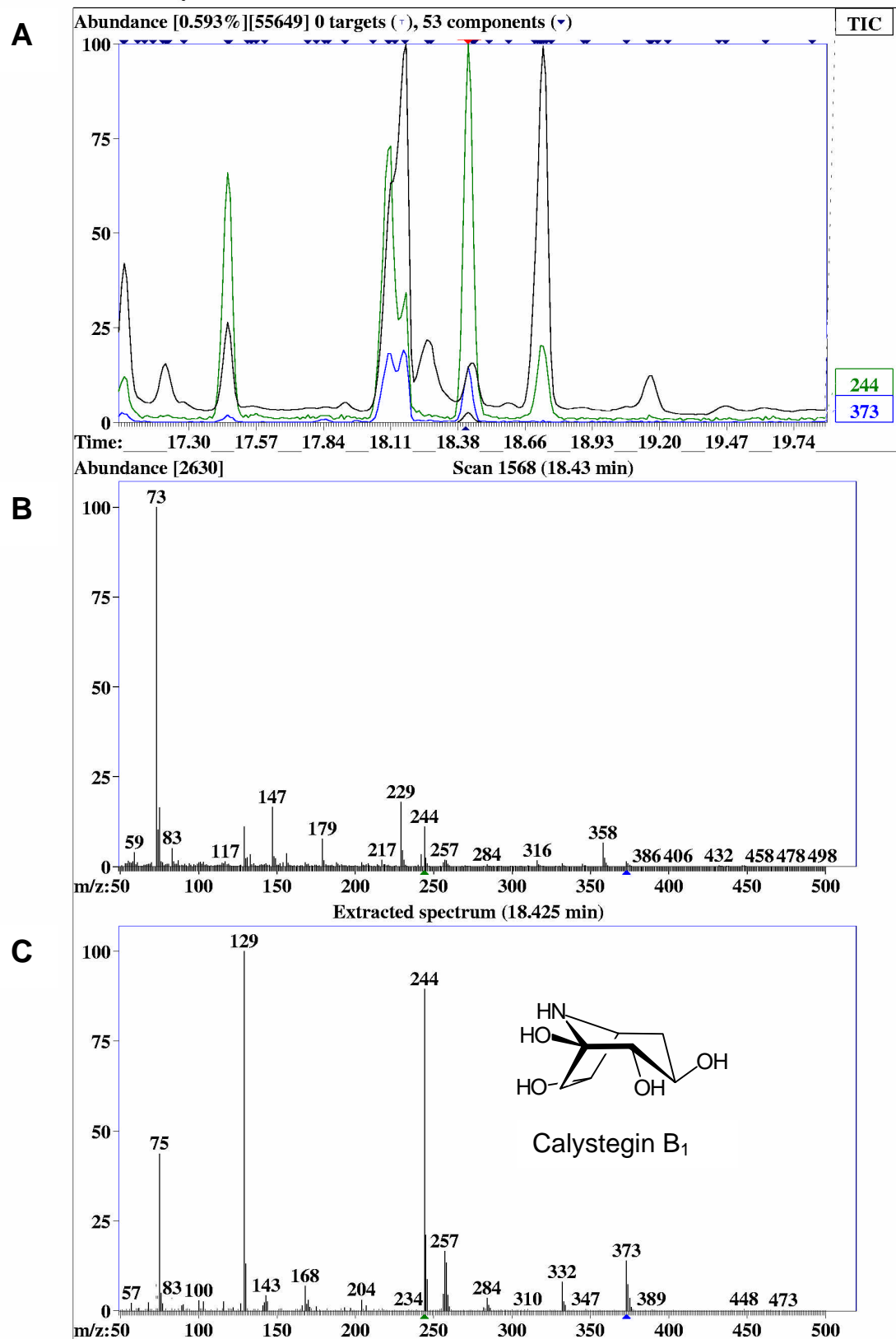
Typische Fragmente der in Kartoffelextrakten gefundenen Calystegine und ihre relative Signalstärke sind in Tab. C-1 zusammengefaßt.

	Retention [min]	Charakteristische Ionen [m/z] und in Klammern angegeben: relative Signalstärke [%]					
		101 (1)	116 (2)	156 (100)	244 (6)	285 (4)	360(0,3)
Calystegin A <sub>3</sub>	15,11	101 (1)	116 (2)	156 (100)	244 (6)	285 (4)	360(0,3)
Calystegin A <sub>5</sub>	14,65	101 (2)	116 (2)	156 (100)	244 (5)	285 (4)	360 (1)
Calystegin A <sub>7</sub>	14,85		116 (2)	156 (100)	244 (2)	285 (4)	360 (1)
Calystegin B <sub>1</sub>	18,38			129	244		373
Calystegin B <sub>2</sub>	19,98		156 (9)	217 (100)	244 (8)		373 (1)
Calystegin B <sub>3</sub>	18,05		156	217	244		373
Calystegin B <sub>4</sub>	17,41		156 (7)	217 (100)	244 (6)		373 (1)

**Tab. C-1:** Typische Fragmente der Calystegin-TMS-Derivate und ihre relative Signalstärke. Für die Calystegine B<sub>1</sub> und B<sub>3</sub> konnte die relative Signalstärke nicht angegeben werden, da die Konzentrationen in den Proben zu gering waren. Die relative Signalstärke ist der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung.

Bei allen Fragmentierungen sind unter den gewählten GC-MS-Bedingungen die zugehörigen Molekülionen M<sup>+</sup> (Calystegin A-Gruppe: m/z 375; B-Gruppe m/z 463) im Spektrum nicht sichtbar.

Calystegin A<sub>3</sub> und A<sub>5</sub> und ein weiteres potentiell Calystegin der A-Gruppe (hier bezeichnet mit Calystegin A<sub>7</sub>, Retentionszeit: 14,85 min) zeigten ein Fragment mit m/z 360, für das eine Abspaltung einer CH<sub>3</sub>-Gruppe vom TMS-Calysteginderivat postuliert wurde (Dräger 1995a). Allerdings war das m/z 360 Signal in allen Calysteginen der A-Gruppe nur sehr schwach. Die stärksten charakteristischen Signale waren das m/z 285 (Abspaltung einer HO-TMS-Gruppe) und das m/z 156, ein postuliertes 2-TMS-Ether-substituiertes Pyrroliniumion (Dräger 1995a). Die Zuordnung des Calystegin A<sub>7</sub> zur A-Gruppe erfolgte auf Grund der Retentionszeit, die zwischen dem Calystegin A<sub>5</sub> (14,65 min) und A<sub>3</sub> (15,11 min) lag. Die genaue Positionierung der Hydroxylgruppen im Calystegin A<sub>7</sub> war nicht möglich, da die entsprechenden Referenzsubstanzen fehlten. Es ist anzunehmen, daß eine Hydroxylgruppe, wie bei allen bisher beschriebenen Calysteginen in Position 1 vorhanden ist (Asano *et al.* 2000a). Auf Grund des m/z 156 Fragmentes des 2-TMS-Ether-substituierten Pyrroliniumions sollten zwei weitere Hydroxylierungen in Positionen 2, 3 oder 4 zu finden sein. Bis jetzt sind Calystegin A<sub>7</sub> (1, 2e, 4a-OH) aus *Lycium chinense* (Solanaceae) (Asano *et al.* 1997b) und Calystegin A<sub>8</sub> (1, 2a, 3e-OH) aus *Scopolia japonica* (Solanaceae) (Asano *et al.* 2000a) mit solchen Hydroxylierungen beschrieben worden.



**Abb. C-3:** Gaschromatogramm mit Massenspektrum des Calystegins B<sub>1</sub> eines Extraktes aus 3 mm Keimen von *S. tuberosum*, var. Liu nach Silylierung. A: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm (schwarze Linie) mit den relativen Ionenstärken des m/z 373 Fragmentes (blaue Linie) und des m/z 244 Fragmentes (grüne Linie); B: Massenspektrum des Cal B<sub>1</sub> mit Überlagerungen; C: Extrahiertes Spektrum (AMDIS-Software). Es wurde das GC-MS-Temperaturprogramm für Calystegine (vgl. Kap. B 2.1.6) verwendet.



Die Calystegine B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> hatten als Hauptsignale das Fragment m/z 217, ein TMSO-CH=CH-CH<sup>+</sup>-OTMS Ion und das Fragment m/z 156. Das Ion mit m/z 373 wurde unter Abspaltung einer HO-TMS-Gruppe gebildet, war aber nur als sehr schwaches Signal sichtbar. Die Identifizierung von Calystegin B<sub>1</sub> (Retentionszeit 18,38 min) erwies sich als schwierig, da auch mit dem Temperaturprogramm für die GC-MS keine klare Trennung erzielt werden konnte. Mit Hilfe der AMDIS GC-MS Auswertungssoftware (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, DTRA/NIST, USA) war es möglich, bei sich überlappenden und sehr schwachen Signalen die „wahren“ Fragmente aus dem Spektrum zu extrahieren. So konnten die für Calystegin-B<sub>1</sub>-typischen Fragmente, das m/z 373 Ion (Abspaltung einer HO-TMS-Gruppe vom silylierten Calystegingerüst), das m/z 244 Ion, welches einem 2,4-Di-TMS-Ether-substituierten Pyrrolonium zuzuordnen ist, und das Fragment mit m/z 129 nachgewiesen werden (Abb. C-3, Tab. C-1).

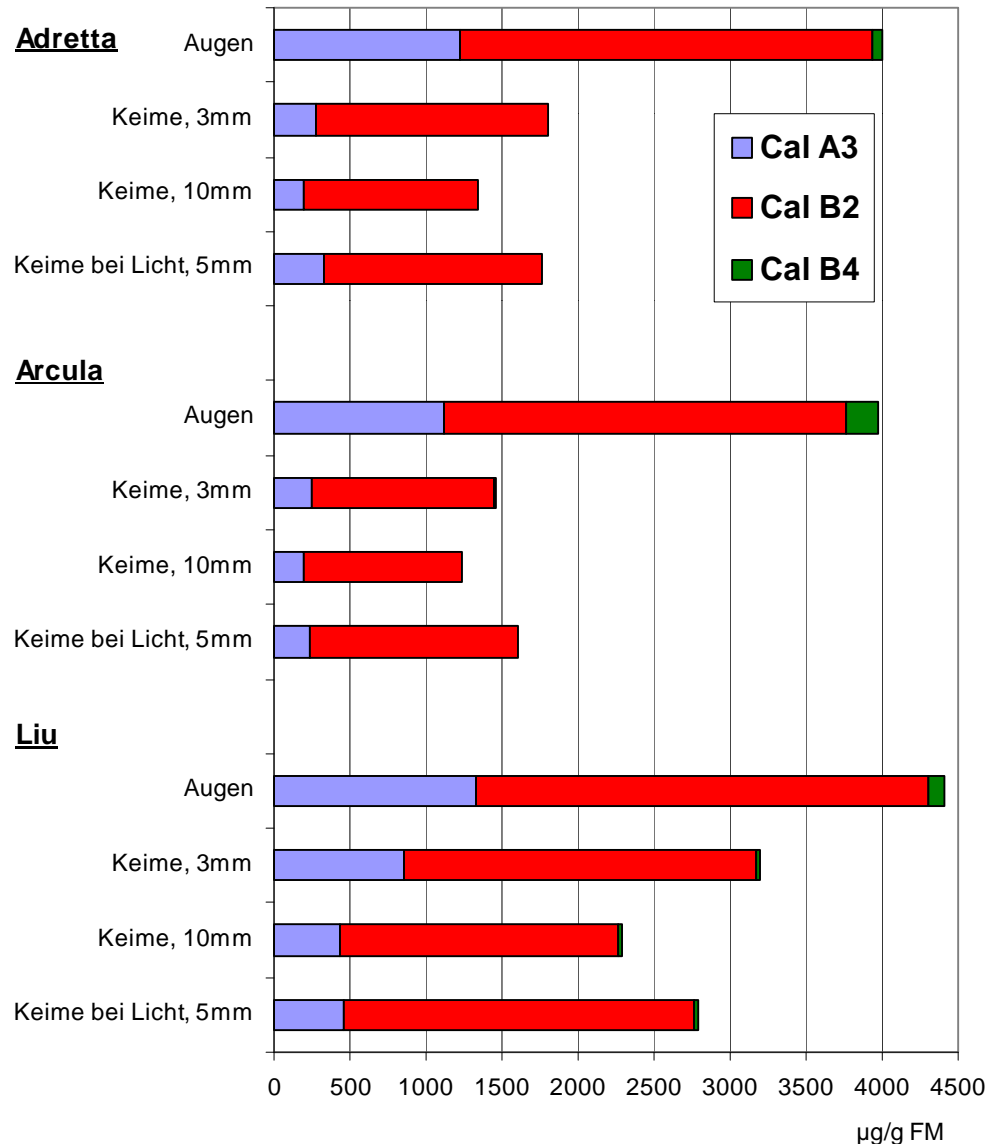
Kürzlich beschriebene Dihydroxytropine aus calysteginakkumulierenden Pflanzen wurden in Kartoffel nicht gefunden (Asano *et al.* 2001). Tropin und Pseudotropin, Metabolite des Tropinons, und deren Ester konnten in den Kartoffelextrakten nicht detektiert werden.

## C 1.2 Akkumulation der Calystegine in *S. tuberosum*

In *Solanum tuberosum* wurden Calystegine in Blättern und der Schale beschrieben (Nash *et al.* 1993). Höhere Konzentrationen wurden in Kartoffelkeimen gefunden (Dräger *et al.* 1995c). Ausgehend von der Hypothese, daß sich die Calystegine aus dem Tropanalkaloidstoffwechsel (vgl. Abb. A-2) ableiten, wurde die Akkumulation der Calystegine zunächst in ausgesuchten Geweben verschiedener Sorten von *S. tuberosum* bestimmt. Im Anschluß wurde eine detaillierte Untersuchung in Geweben einer Sorte während des gesamten Kultivierungsprozesses durchgeführt. Für spätere Fütterungsversuche sollte ein calysteginreiches Gewebe gefunden werden.

### C 1.2.1 Calystegine in verschiedenen Sorten von *S. tuberosum*

Kartoffeln var. Arcula (Reifezeitklassifizierung: sehr früh), Adretta (früh bis mittelfrüh) und Liu (mittelfrüh) wurden auf Calysteginakkumulation in Kartoffelkeimen und in den Kartoffelaugen untersucht (Abb. C-4). Der größte Unterschied im Calystegingehalt zwischen den verschiedenen Kartoffelsorten wurde in 3 mm-Keimen gemessen, hier unterschied sich der Gehalt von der var. Liu um bis zu 120 % im Vergleich zur Sorte Arcula. Die Gesamtcalysteginmenge war in allen untersuchten Geweben in der Sorte Liu am höchsten. Mit 3971 µg/g FM (Arcula) bis 4403 µg/g FM (Liu) Gesamtcalystegin wurde der höchste Gehalt in den Keimäugen beim Keimstart gefunden. Erfolgte die Keimung unter Lichteinfluß war keine wesentliche Änderung der Calysteginakkumulation zu beobachten. Gleiches gilt für die Schale von Kartoffelknollen, die im Licht mehrere Tage inkubiert wurde (ohne Abbildung).



**Abb. C-4:** Akkumulation der Calystegine in den Kartoffelgeweben der Sorten Adretta, Arcula und Liu 5 Monate nach der Ernte. Die Augen wurden beim Keimstart mit einer Größe von 2 x 2 x 2 mm geerntet. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 - 6 unabhängigen Bestimmungen.

### C 1.2.2 Calystegine in Geweben der Sorte Liu

Für differenzierte Untersuchungen wurden Gewebeproben der Sorte Liu während des gesamten Kultivierungsprozesses verwendet, da diese den höchsten Gehalt an Calysteginen zeigten (Kap. C 1.2.1).

#### C 1.2.2.1 Calysteginverteilung in Knollen und Keimen

Die Akkumulation der Calystegine in Knollen und Keimen von *S. tuberosum* var. Liu wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Direkt nach der Ernte

waren die Knollen dormant (Wiltshire und Cobb 1996). Sie keimten nicht, wenn sie bei Raumtemperatur für mehrere Wochen gelagert wurden. Nach fünfmonatiger Lagerung bei 4 °C keimten die Knollen bei Raumtemperatur nach einer Woche. Weitere Gewebe wurden nach 8 Monaten Lagerung bei 4 °C und bei Keimung unter natürlichen Bedingungen im Boden untersucht.

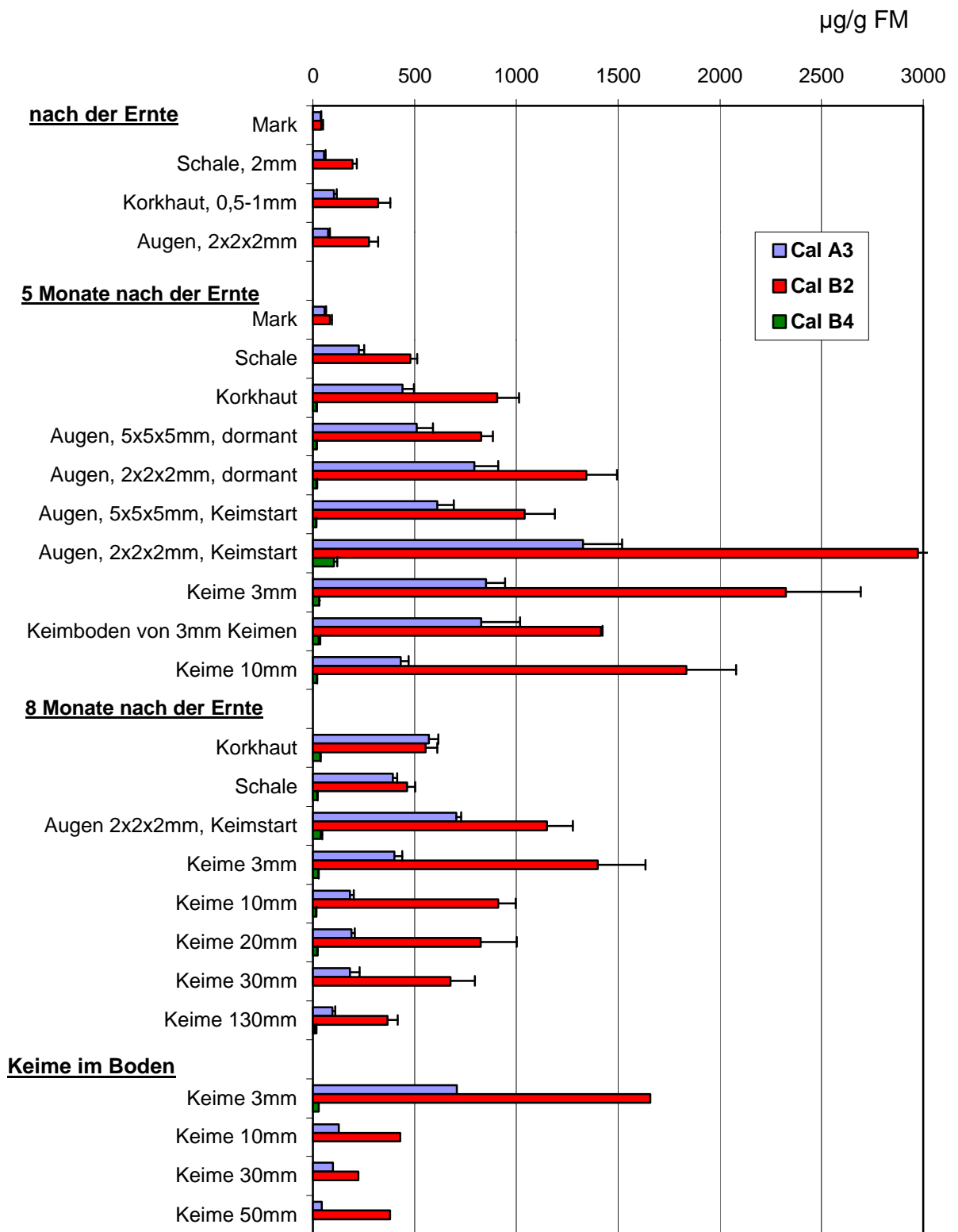
In den untersuchten Geweben (vgl. Kap. B 1.2) waren Calystegin A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> die Hauptvertreter der Nortropanalkaloide, sie konnten in allen Geweben quantifiziert werden (Abb. C-5). Die Calystegine A<sub>5</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>1</sub> und vermutlich ein weiteres Calystegin der A-Gruppe (vgl. Kap. C 1.1.2) konnten nur in den Augen beim Keimstart und in 3 – 10 mm-Keimen detektiert werden (< 10 µg/g FM).

Innerhalb der vier Entwicklungsphasen wurde die höchste Akkumulation der Calystegine in den klein ausgeschnittenen Augen beim Keimstart, 5 Monate nach der Ernte, registriert. Alle Gewebe enthielten zu diesem Zeitpunkt mehr Calystegine als dormante Knollen direkt nach der Ernte. Die Korkhaut, die das Periderm umfaßt, enthielt dreimal mehr Calystegine als 5 Monate zuvor. Die Akkumulation konzentriert sich in diesem Entwicklungsstadium in den klein ausgeschnittenen Augen beim Keimstart, die im Vergleich zu den größer ausgeschnittenen Augen die dreifache Menge Calystegine aufwiesen.

Acht Monate nach der Ernte war die Calysteginakkumulation in Augen beim Keimstart und in kleinen Keimen ungefähr halb so groß wie nach 5 Monaten.

Bei Kartoffeln, die in Erde gepflanzt wurden, war der Calystegingehalt in 3 mm-Keimen etwa vergleichbar mit den Keimen, die unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur gebildet wurden. Im weiteren Verlauf nahm deren Gehalt im Boden verhältnismäßig stark ab. Es konnte nicht geklärt werden, ob dies im Zusammenhang mit einer mechanischen Beanspruchung im Boden und/oder mit der niedrigeren Bodentemperatur zusammenhängt. Das Verhältnis von Calystegin B<sub>2</sub> zu A<sub>3</sub> ist in den Keimen relativ konstant, im Mark ist es zugunsten von Calystegin A<sub>3</sub> verschoben.

Der Calystegingehalt bezogen auf eine Standardkartoffel von ca. 120 g mit einer elliptischen Grundfläche von 6 x 4,5 cm wurde berechnet. Dabei zeigte sich, daß die Calystegine in der Kartoffel während der Lagerung gebildet werden. Nach der Ernte akkumulierten 11,9 mg Gesamt-Calystegine. Nach fünf Monaten hatte sich der Gehalt mit 25,6 mg mehr als verdoppelt. Acht Monate nach der Ernte stieg der Gehalt sogar auf 29,8 mg.



**Abb. C-5:** Calysteginakkumulation in Knollen und Keimen von *S. tuberosum* var. Liu. Die Korkhaut umfaßt das Periderm, die Schale das Periderm und Bereiche des Rindengewebes. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 - 10 Bestimmungen, Standardabweichungen sind in Balken angegeben. Für Keime im Boden wurden 2 Bestimmungen durchgeführt.

### C 1.2.2.2 Calysteginverteilung in Pflanzen

Gewebe von Kartoffelpflanzen var. Liu wurden in 3 Entwicklungsstadien untersucht (Abb. C-6). Die Hauptcalystegine waren wiederum A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>. Calystegin B<sub>4</sub> konnte zwar detektiert werden, der Gehalt war aber zu gering, um ihn zu quantifizieren.

Die Werte in oberirdischen Geweben waren sehr viel geringer als in keimenden Kartoffelknollen. Der Gehalt in jungen Blättern betrug ca. 1/30 des Gehaltes in den Augen beim Keimstart (vgl. Abb. C-5).

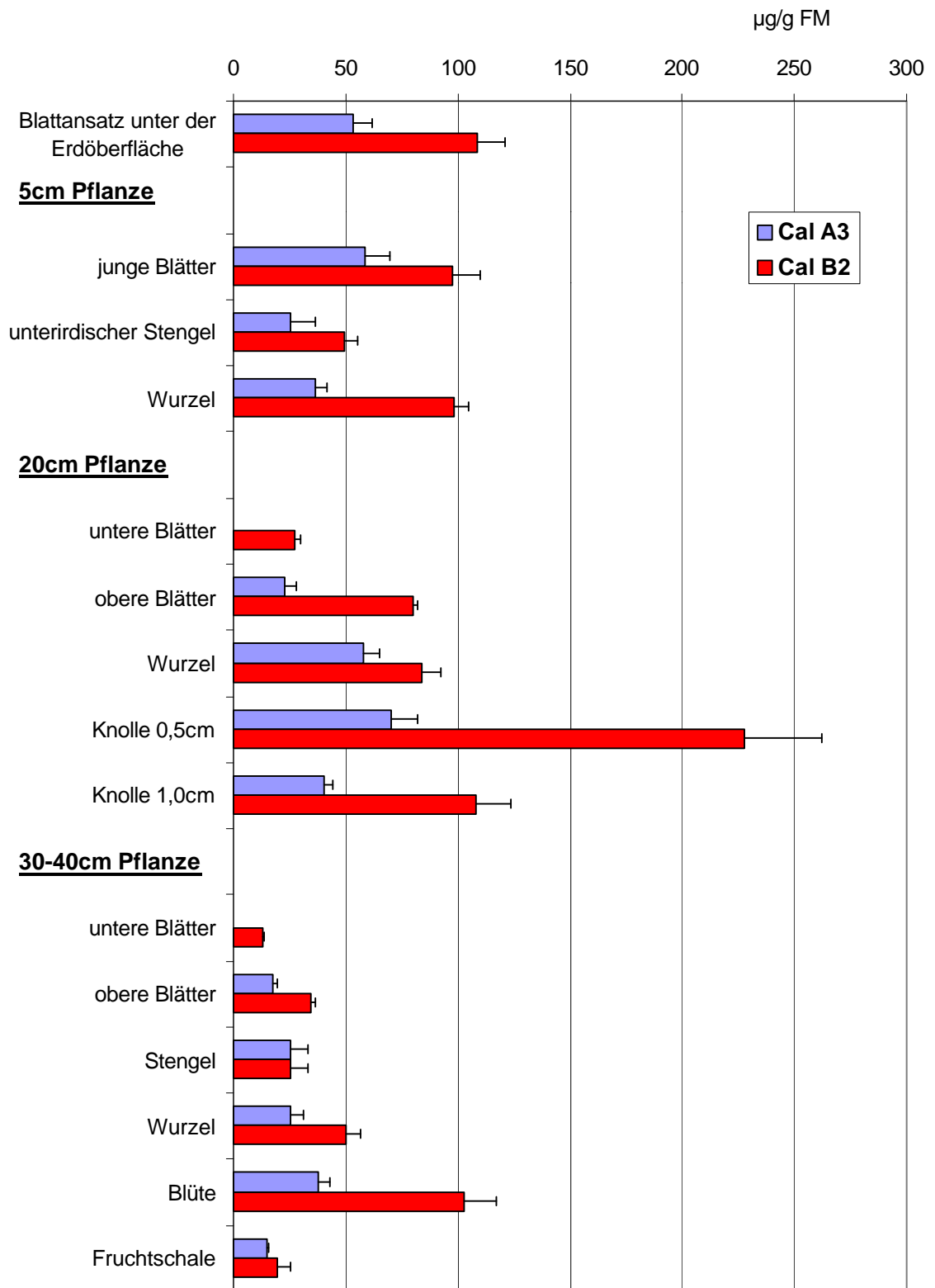
Die ersten oberirdischen Blätter im Frühjahr (junge Blätter) hatten einen ähnlichen Calystegingehalt wie die Blattansätze direkt unter der Erdoberfläche und die Wurzeln 5 cm großer Pflanzen. Der Calystegingehalt in Wurzeln 20 cm großer Pflanzen blieb konstant, während sich der in Blättern schrittweise verringerte. Junge Blätter hatten einen höheren Gehalt an Calysteginen als obere und untere Blätter von 20 und 40 cm großen Pflanzen. In der Literatur wurde dieser Befund auch für andere Solanaceen beschrieben (Dräger *et al.* 1995c). In den unteren Blättern war das Calystegin A<sub>3</sub> nicht mehr nachweisbar.

Pflanzen von 20 cm Größe bilden Stolone, aus denen Kartoffelknollen entstehen. In den Stolonen akkumulierten 38 µg/g FM Calystegine (ohne Abbildung). Kartoffelknollen (d = 0,5cm) zeigten eine deutlich höhere Calysteginkonzentration (ca. 300 µg/g FM) als alle anderen Gewebe in den Kartoffelpflanzen. Wenn sich der Durchmesser der kleinen Knollen auf 1,0 cm verdoppelt hatte, war deren Calystegingehalt nur noch halb so groß.

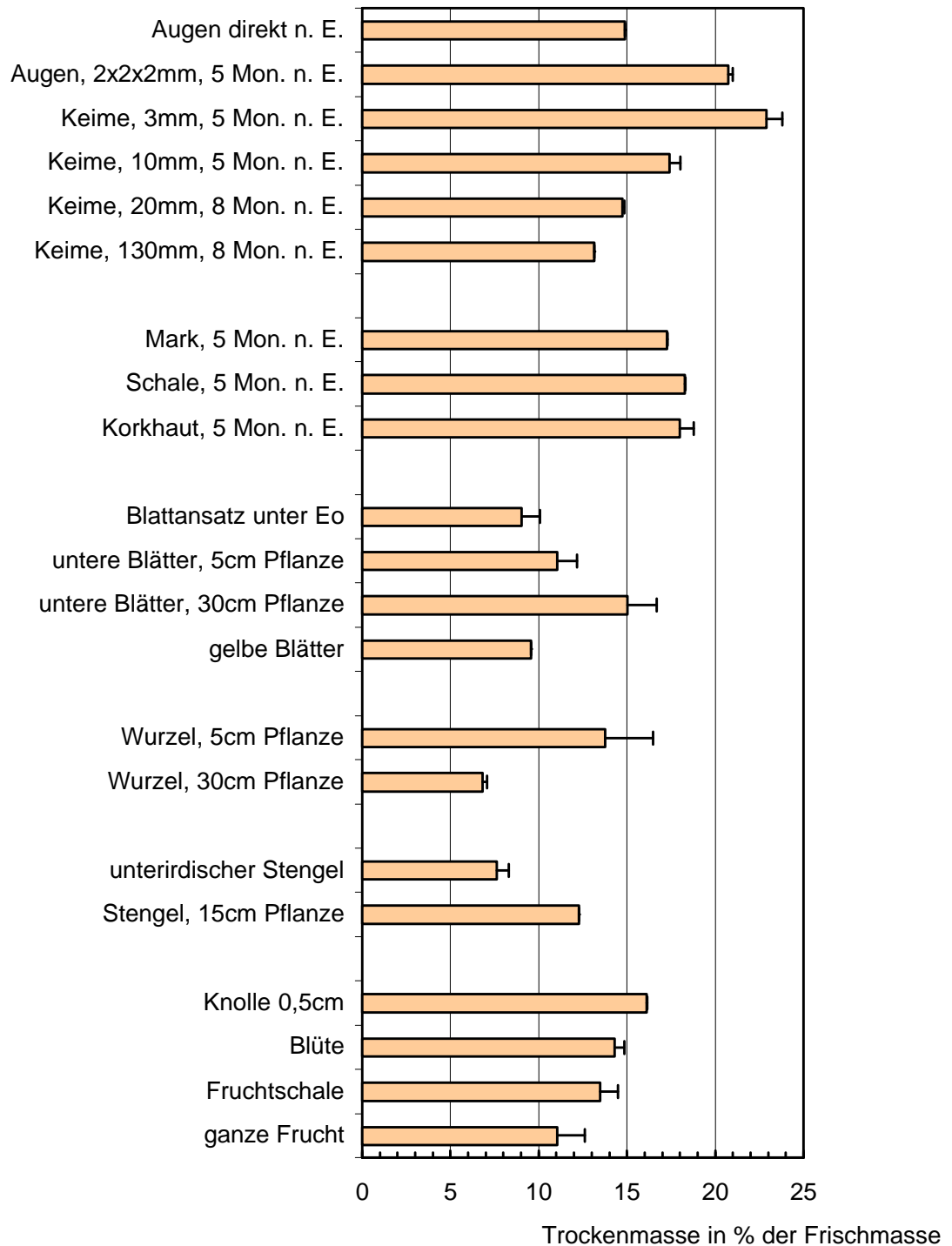
Pflanzen von 30 – 40 cm Größe blühen, die unteren Blätter färben sich gelb und beginnen zu welken. Blüten, als Ganzes extrahiert, akkumulierten ca. 150 µg/g FM Calystegine, welche neben jungen Blättern den höchsten Gehalt an Calysteginen in oberirdischen Geweben aufwiesen. Interessant ist, daß zu diesem Zeitpunkt der Gehalt in den Blüten fast doppelt so hoch war wie in den Wurzeln.

Neben den in Abb. C-6 gezeigten Werten wurden noch weitere Gewebe älterer Pflanzen untersucht, wie z. B. gelbe und verwelkte Blätter, gelbe Stengel sowie Samen. Der Calystegingehalt war zu gering, um gemessen zu werden (< 5 µg/g FM).

Der Gehalt an Calysteginen ist in den Abbildungen auf Frischmassebasis angegeben. Es wurden aber auch die Trockenmassen für jede Probe bestimmt. Typische prozentuale Verhältnisse sind in Abb. C-7 dargestellt. Das Trockenmasse/Frischmasse-Verhältnis war in den oberirdischen Geweben niedriger als in den Knollengeweben. Dies alleine erklärt aber nicht den geringeren Gehalt an Calysteginen. Auf Trockenmassebasis bezogen ist der Gehalt an Calysteginen in oberirdischen Geweben ebenfalls geringer.



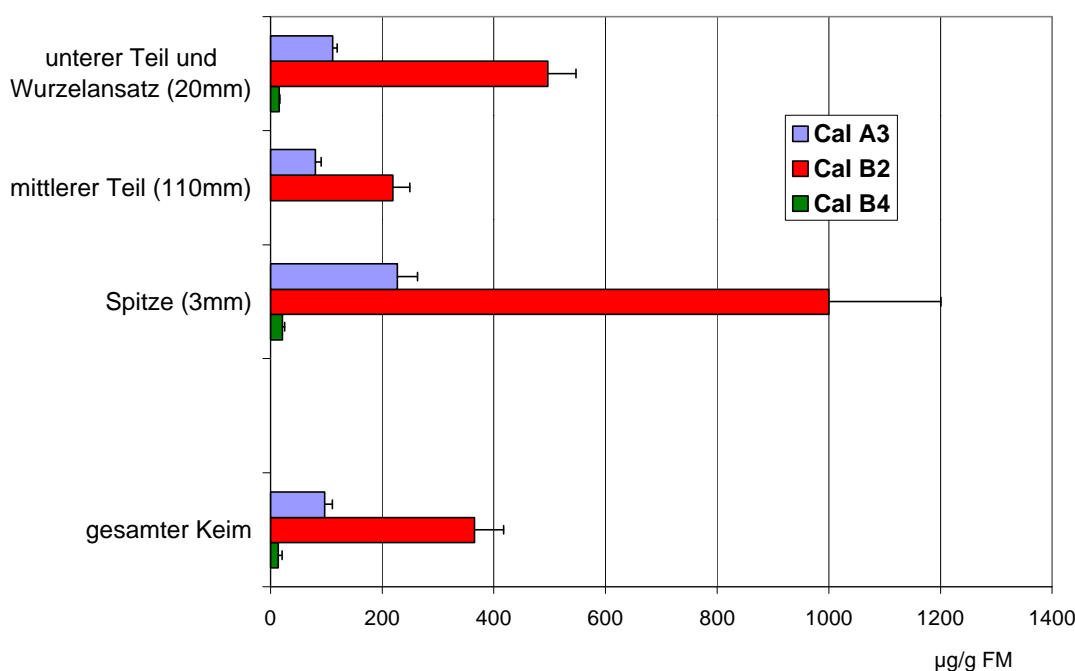
**Abb. C-6:** Calysteginakkumulation in Pflanzen von *S. tuberosum* var. Liu. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 - 9 Bestimmungen, die Standardabweichung ist in Fehlerbalken angegeben.



**Abb. C-7:** Prozentuales Trockenmasse/Frischmasse-Verhältnis in typischen Kartoffelgeweben. n. E.: nach der Ernte; Eo: Erdoberfläche. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 - 10 Bestimmungen, die Standardabweichungen sind in Fehlerbalken angegeben. Bei einigen Geweben ist die Standardabweichung so klein, daß sie im Diagramm nicht sichtbar ist.

### C 1.2.2.3 Verteilung der Calystegine innerhalb der Kartoffelkeime

Kartoffelkeime wurden auf die Verteilung der Calystegine innerhalb des Keims untersucht (Abb. C-8). Die Calystegine akkumulieren überwiegend in den Keimspitzen. Der erhöhte Gehalt im unteren Teil des Keimes beruht wahrscheinlich auf der Akkumulation in den Wurzelansätzen. Hohe Calysteginkonzentrationen in den Spitzen wurden wiederholt in Keimen > 100 mm gemessen. Im Gegensatz dazu konnte in Keimen von 20 mm Größe kein Unterschied zwischen den Spitzen und dem mittleren Teil festgestellt werden (ohne Abbildung).



**Abb. C-8:** Verteilung der Calystegine in ca. 120 mm langen Kartoffelkeimen. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 - 6 Bestimmungen, die Standardabweichungen sind in Fehlerbalken angegeben.

### C 1.2.2.4 Calysteginakkumulation nach Verletzung

Calystegine scheinen verstärkt in jungen meristematischen Geweben zu akkumulieren. Das führt zu der Frage der biologischen Bedeutung der Calystegine. Sie könnten als Abwehrsubstanzen agieren, wie es für andere Glycosidasehemmerstoffe diskutiert wird (Fellows *et al.* 1992). Es sollte getestet werden, ob die Calysteginbiosynthese infolge von mechanischer induziert werden können (Kumar *et al.* 1991). Eine Verwundung der Kartoffelknolle führte zu einer höheren Akkumulation von Glycoalkaloiden innerhalb weniger Tage (Friedman und Mc Donald 1997a).

3 cm lange Kartoffelkeime wurden, wie unter Kap. B 2.1.2 beschrieben, verletzt. Innerhalb von 6 Tagen nach Verletzung formte sich an den verletzten Stellen ein



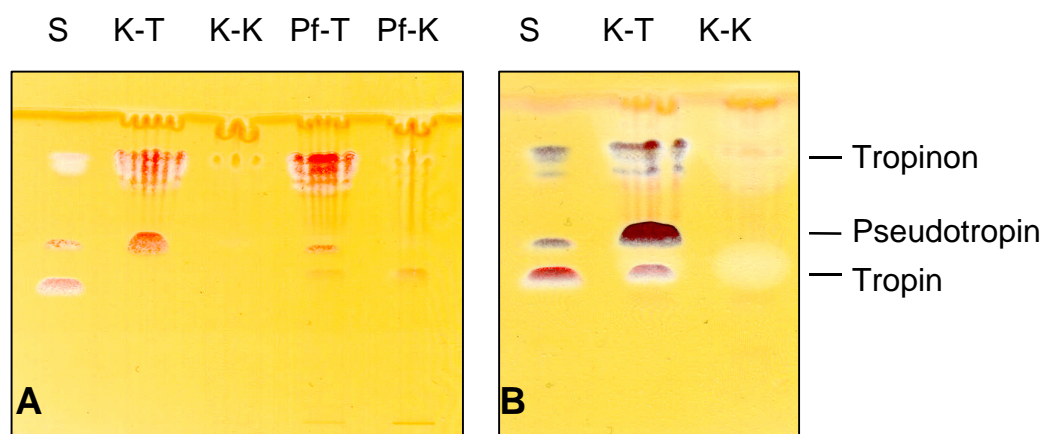
brauner Kork, Seitentriebe begannen sich zu entwickeln. Es konnte keine signifikante Veränderung der Calysteginakkumulation beobachtet werden (ohne Abbildung).

## C 2 Fütterung von Tropinon an Kartoffelgewebe

Um die Hypothese zu untermauern, daß sich die Calysteginbiosynthese vom Tropanalkaloidstoffwechsel ableitet (vgl. Abb. A-2), wurden Fütterungsversuche mit Tropinon an intakten Geweben durchgeführt. Es sollte der erste putative Biosyntheseschritt auf dem Weg zu den Calysteginen, die Reduktion von Tropinon, untersucht werden (vgl. Kap. B 2.1.3).

3 mm-Keime enthielten fast doppelt so viel Calystegine wie 20 mm-Keime. Sie lassen sich aber durch ihre geringe Größe im Fütterungsversuch schlecht handhaben. Deshalb wurden 20 – 30 mm große Keime verwendet, die ca. 1000 µg/g FM Calystegine enthalten (Abb. C-5). Sie sind ein geeignetes Gewebe für die mögliche Umsetzung von Tropinon. *In vitro* Kartoffelpflanzen var. Désirée und deren Knollen, die keine Calystegine enthalten (unveröffentlichte Ergebnisse Scholl und Dräger), Blätter von Gewächshauspflanzen var. Liu und Tabakblätter sollten ebenfalls untersucht werden.

Nach 24 Stunden Inkubation mit Tropinon wurde Pseudotropin neben nichtmetabolisiertem Tropinon sowohl in den Keimen als auch in *in vitro* Pflanzen und deren Knollen (ohne Abbildung) detektiert, während in den Kontrollen keiner der Metabolite zu finden war (Abb. C-9).



**Abb. C-9:** Fütterung von Kartoffelkeimen und *in vitro* Pflanzen mit 5 mM Tropinon. Die Kontrollen wurden mit 5 mM KCl behandelt. Abb. A: 24 h nach Inkubation, Abb. B: 48 h nach Inkubation. Dünnschichtchromatographische Auswertung der Umsetzungsprodukte. S: Standards (Tropinon [R<sub>f</sub>: 0,84], Pseudotropin [R<sub>f</sub>: 0,63] und Tropin [R<sub>f</sub>: 0,53]); K-T: Keim, mit Tropinon gefüttert; K-K: Keim, Kontrolle; Pf-T: *in vitro* Pflanze, Tropinon gefüttert; Pf-K: *in vitro* Pflanze, Kontrolle.

Nach 48 Stunden wurde in den Keimen neben nichtmetabolisiertem Tropinon und Pseudotropin auch Tropin detektiert. *In vitro* Pflanzen zeigten keine Umwandlung zum Tropin nach 48 Stunden (ohne Abbildung), was auf eine gewebespezifische Expression der Tropinonreduktasen hinweist.

Der Fund von Tropin nach Fütterung war unerwartet, da die Reduktion von Tropinon zu Pseudotropin und Tropin spezifisch durch zwei unterschiedliche Enzyme erfolgt (Nakajima *et al.* 1993a; 1994). Die Bildung von Tropin neben Pseudotropin würde sowohl auf eine TRI- als auch auf eine TRII-Aktivität in Kartoffel hinweisen.

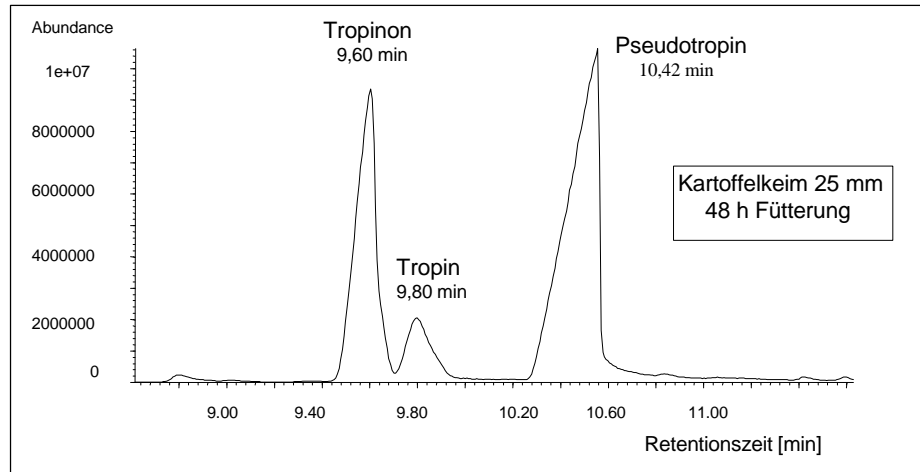
In Tabakblättern wurde nach Inkubation mit Tropinon die Aufnahme von Tropinon beobachtet, eine Umsetzung zum Pseudotropin oder Tropin fand nicht statt (ohne Abbildung). Da *Nicotiana tabacum* (*Solanaceae*) keine Calystegine und klassischen Tropanalkaloide enthält, wurde hier auch keine Reduktion des Tropinons erwartet.

Die Auswertung der Fütterungsversuche mit GC und GC-MS (vgl. Kap. B 2.1.5) gab Aufschluß über das Verhältnis der akkumulierenden Metabolite (Abb. C-10). In Kartoffelkeimen lag das Verhältnis von Pseudotropin zu Tropin 48 h nach Inkubation mit Tropinon 6,5 : 1, in den Knollen von *in vitro* Pflanzen 0,5 : 1. Das Verhältnis von Pseudotropin zu Tropin kann aber nur bedingt Auskunft über die Geschwindigkeit ihrer Bildung geben, da über die sich anschließenden Biosyntheseschritte noch nichts bekannt ist. Die stereospezifische Reduktion von Tropinon zu Pseudotropin und Tropin scheint gewebespezifisch zu sein und mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abzulaufen.

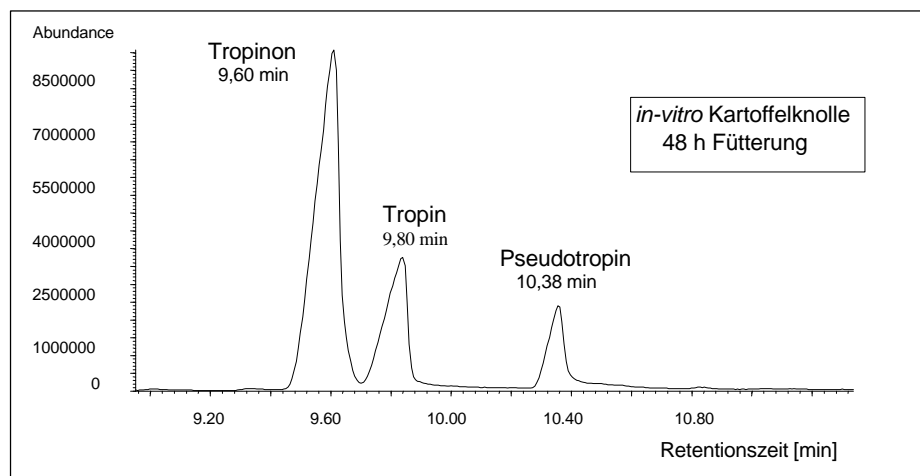
Pseudotropin und Tropin wurden mittels GC mit massenspektrometrischer Detektion identifiziert. Ihre Fragmentierungsmuster zeigten die in der Literatur beschriebenen Ionen, die mit denen der Referenzsubstanzen korrelieren (Abb. C-11) (Witte *et al.* 1987). Tropin und Pseudotropin zeigten identische Zerfallsmuster, konnten aber anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten identifiziert werden.

Die Bestimmung der TR-Enzymaktivität mittels photometrischen Enzymassay aus Pflanzenlysaten war trotz Zugabe von Stabilisatoren (Polyclar AT, Antioxidantien und Proteaseinhibitoren) nicht möglich. Die Zugabe von Proteinpräparationen aus *Atropa belladonna*, in denen eine TR-Aktivität gemessen wurde, führte zur Inaktivierung der TR-Aktivität im Gemisches. In Pflanzenlysaten aus den Kartoffelgeweben sind Stoffe, wie z. B. Polyphenole oder Proteasen enthalten, die die TR's deaktivieren.

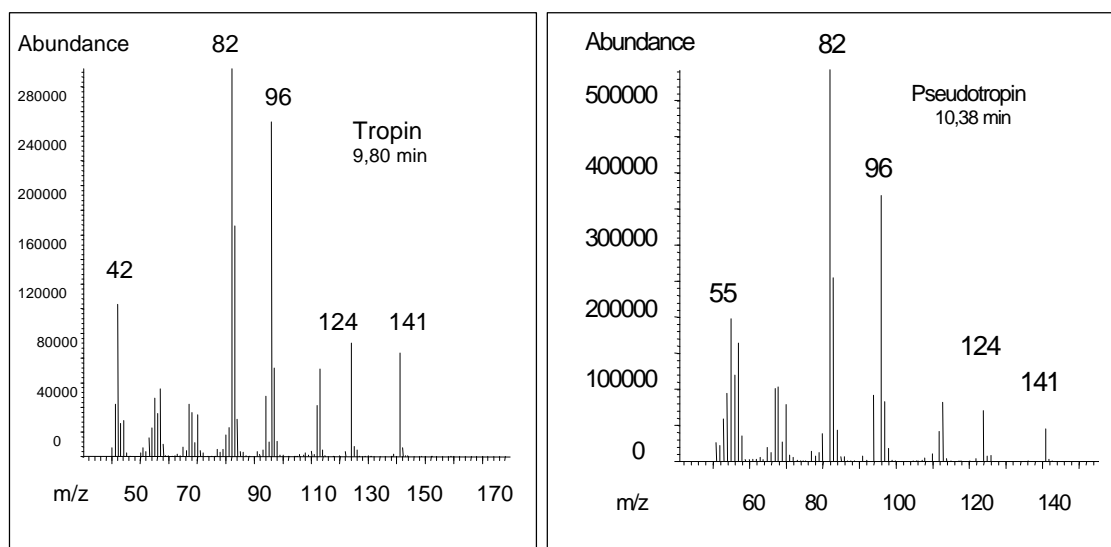
A



B



**Abb. C-10:** Gaschromatogramm (FID-Signal) nach Fütterungsversuchen mit 5 mM Tropinon über 48 h. Abb. A: Kartoffelkeime var. Liu; Abb. B: *in vitro* Kartoffelknollen var. Désirée.



**Abb. C-11:** GC-MS Fragmentierungsmuster des Tropins und Pseudotropins. Da anhand der Fragmentierungsmuster keine Unterscheidung möglich ist, erfolgte die Zuordnung anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten.

### C 3 Isolierung *TRII*-homologer cDNA-Sequenzen aus *S. tuberosum*

RT-PCR Technik (vgl. Kap. B 2.2.4.1) wurde eingesetzt, um ein *TRII*-homologes cDNA-Fragment zu isolieren. Die vollständigen, korrespondierenden Klone wurden mit RACE-PCR und aus einer  $\lambda$ ZAP cDNA-Bank (Stratagene) isoliert.

#### C 3.1 Isolierung eines *TRII*-cDNA-Fragmentes

Degenerierte Primer wurden von den homologen Regionen der Nukleinsäuresequenzen der bekannten Tropinonreduktasen von *Datura stramonium* und *Hyoscyamus niger* abgeleitet (EMBL-Datenbank Nr.: L20473, D88156, L20474, L20485) (Nakajima *et al.* 1993a; 1993b; 1999a). Außerdem wurden Nukleinsäuresequenzen von Enzymen der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) einbezogen, zu deren Familie die Tropinonreduktasen gehören (Jörnvall *et al.* 1995; Persson *et al.* 1991).

Kartoffelkeime von 3 mm Länge der Sorte Liu wurden zur Isolation von Gesamt-RNA verwendet, da diese große Mengen an Calysteginen akkumulieren (vgl. Kap. C 1.2.2.1). Nach reverser Transkription (vgl. Kap. B 2.2.3) wurde die cDNA als Matrix für RT-PCR benutzt (vgl. Kap. B 2.2.4.1). Mit dem *sense* Primer P01 und dem *antisense* Primer P02 (vgl. Tab. B-1) wurde ein 430 bp großes Fragment amplifiziert und teilweise sequenziert. Die so erhaltenen 261 bp zeigten im Sequenzvergleich mit der EMBL-Datenbank eine hohe Homologie zu den *TRII*-Sequenzen von *D. stramonium* und *H. niger*.

#### C 3.2 Isolierung einer *TRII*-homologen cDNA mit RACE-PCR

Zur Vervollständigung der codierenden *TRII*-cDNA-Sequenz wurde eine 3'- und 5'-RACE-PCR durchgeführt, die im wesentlichen dem von Nakajima und Mitarbeitern (1999a) beschriebenen Protokoll folgten. Allerdings waren einige Modifikationen nötig (vgl. Kap. B 2.2.4.2, Abb. B-2).

##### C 3.2.1 3'-RACE-PCR

Für die 3'-RACE-PCR wurde die cDNA mit einem Oligo-dT Primer aus mRNA von 3 mm langen Keimen gewonnen (vgl. Kap. B 2.2.2 und B 2.2.3). Im Gegensatz zu Nakajima und Mitarbeiter (1999a) waren 3 Runden PCR mit *nested* (eingerückten) Primern nötig (vgl. Abb. B-2). Die beiden *sense* Primer P01 und P03 wurden von dem gefundenen *TRII*-homologen cDNA-Fragment (vgl. Kap. C 3.1) abgeleitet. Der P04 *sense* Primer basierte auf der *DsTRII*-Nukleinsäuresequenz (vgl. Tab. B-1). Der Oligo-dT Primer P05 fungierte als *antisense* Primer in allen 3 PCR's.

Die amplifizierten, ca. 600 bp großen PCR-Produkte wurden nach Restriktionsspaltung in den pBluescript SK(+) Vektor (Stratagene) kloniert (vgl. Kap. B 2.2.1). Fünfzehn Klone wurden sequenziert, die eine Homologie von mehr als 85 % zu den bekannten *TRII*-cDNA-Sequenzen aufwiesen.

### C 3.2.2 5'-RACE-PCR

Für die 5'-RACE-PCR wurde die cDNA mit dem genspezifischen Primer P02 synthetisiert. Nach der Synthese eines Oligo-dA Abschnittes an das 3'-OH Ende der cDNA (vgl. Kap. B 2.2.4.2) wurden zwei Runden PCR mit den genspezifischen *antisense* Primern (P06 und P07) und einem Oligo-dT Primer P08 durchgeführt (vgl. Tab. B-1). Zur besseren Amplifikation wurde ein Adapterprimer A01 verwendet. Die ca. 400 bp großen PCR-Amplifikate wurden wie unter. B 2.2.4.2 beschrieben kloniert. Fünf Klone wurden sequenziert, sie zeigten ebenfalls alle eine hohe Homologie zu *TRII*-cDNA-Sequenzen.

### C 3.2.3 Finale PCR

Nach Sequenzanalyse zeigten die übereinandergelegten Sequenzen der 3'- und 5'-RACE-PCR, daß zur Vervollständigung der *TRII*-cDNA-Sequenz im zentralen Bereich 27 bp fehlten. Auf Grund der schwachen Amplifikation beim 3'-RACE war eine dritte PCR nötig geworden. Dabei wurde ein *sense* Primer verwendet, der außerhalb der initialen Sequenz lag und deshalb von *DsTRII* abgeleitet worden war (vgl. Abb. B-2 und Kap. B 2.2.4.2).

Mit dem Primerpaar P09 und P10 (die das Start- und Stop-Codon einschließen) wurde eine finale PCR durchgeführt, um einen cDNA-Klon zu erhalten, der vollständig den codierenden Bereich umfaßt. Durch Integration von Restriktionsschnittstellen in die Primer (vgl. Tab. B-1) konnten die Amplifikate nach Restriktionsspaltung in einen pET 21d Vektor (Novagen) ligiert und anschließend sequenziert werden (vgl. Kap. B 2.2.4.2). 21 positive Klone ließen sich in 3 Gruppen einteilen (*StTRII*-L1 - L3) (vgl. Anhang Kap. G 3.2.2). Unterschiede innerhalb der Nukleinsäuresequenz wurden in 21 Positionen gefunden.

Eine RT-PCR, die mit Primern durchgeführt wurde, die vom 5'- bzw. 3'-Ende der nichtcodierenden Bereiche abgeleitet wurden, führte zu keinem Produkt. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, daß diese Primer von unterschiedlichen *StTRII*-Genen abgeleitet wurden (vgl. Kap. C 5.1).

## C 3.3 Isolierung einer *TRII*-homologen cDNA-Sequenz durch Screening einer cDNA-Bank

Das Screening einer cDNA-Bank der Kartoffelsorte Désirée sollte die durch RACE-PCR isolierten *StTRII*-cDNA-Sequenzen (vgl. Kap. C 3.2) bestätigen und zusätzlich Aufschluß über die Unterschiede der *TRII*-Sequenzen in den Kartoffelsorten Liu und Désirée geben.

Als Pool standen sowohl eine cDNA-Bank aus Kartoffelaugen, die freundlicherweise von Herrn Prof. L. Willmitzer, Max-Planck-Institut Golm, zur Verfügung gestellt wurde, und eine cDNA-Bank aus 3 mm-Keimen, die von Herrn Olaf Stenzel (Institut

für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle) hergestellt worden war, zur Verfügung. Eine Kontroll-PCR mit dem Primerpaar P01 und P02, die aus den homologen Regionen der bekannten *TRI*- und *TRII*-Sequenzen abgeleitet wurden, führte in beiden cDNA-Banken zur Amplifizierung eines entsprechenden Produktes. Mit dem *TRII*-spezifischen Primerpaar P09 und P10 konnte hingegen nur in der cDNA-Bank aus 3 mm langen Keimen ein Produkt amplifiziert werden. Die Sequenzierung des Amplifikates aus der cDNA der Keimaugen ergab eine überraschend hohe Homologie zu den bekannten *TRI*-Sequenzen. Die Isolierung einer *TRI*-homologen cDNA-Sequenz ist in Kap. C 4 beschrieben.

Insgesamt wurden  $1,5 \times 10^5$  pfu der Phagen-cDNA-Bank aus 3 mm-Keimen *S. tuberosum* var. Désirée mit der radioaktiv markierten *TRII*-Sonde (786 bp der *StTRII-L1*-Sequenz) hybridisiert (vgl. Kap. B 2.2.5). Fünfzehn Doppelsignale wurden erhalten, die mit PCR unter Verwendung der genspezifischen Primer P09 und P10 auf *StTRII*-Sequenz untersucht wurden (vgl. Kap. B 2.2.4.4). Zusätzlich wurden PCR-Produkte, die mit den vektorspezifischen Primern T7-Promotor und Rev gewonnen wurden, im *Southern Blot* gegen ein radioaktiv markiertes C-terminales Fragment des *StTRII-L1*-Klons hybridisiert (ohne Abbildung). Sieben Primärklone zeigten sowohl in der *TRII*-spezifischen PCR als auch in der *Southern Blot* Analyse positive Signale.

Die Signale des *Southern Blots* erlauben eine Identifizierung nach der Größe der Phagen-Inserte.

Vier Primärklone mit den größten Phagen-Insertionen wurden einem Sekundär- und Tertiärscreening unterzogen. Durch *in vivo* Excision der entsprechenden Einzelphagen wurden die korrespondierenden pBluescript-Phagemide isoliert. Nach Sequenzierung der Plasmidinsertionen und Sequenzauswertung mit dem *ClustalW* Programm konnten drei verschiedene cDNA-Klone (*StTRII-D1* - *D3*) bestimmt werden (vgl. Anhang G 3.2.1). In der Sequenz des Klones *StTRII-D2* fehlte das translationale Start-Methionin am N-Terminus des offenen Leserahmens (ORF).

#### C 4 Isolierung einer *TRI*-homologen cDNA-Sequenz

Beim Screening der cDNA-Bank aus Keimaugen der Kartoffelsorte Désirée wurden insgesamt  $6 \times 10^5$  pfu der Phagen-cDNA-Bank mit dem radioaktiv markierten *TRI*-homologen Fragment, das bei der PCR der cDNA-Bank gewonnen wurde, hybridisiert (siehe Kap.C 3.3). Es wurden drei Primärklone mit Doppelsignalen erhalten, die nach Überprüfung mittels PCR mit den Primern P01 und P02 einem Sekundär- und Tertiärscreening unterzogen wurden. Nach dem Tertiärscreening wurde ein positiver Klon erhalten. Nach Isolierung und Sequenzierung des korrespondierenden Plasmids ergab der Datenbankvergleich eine hohe Homologie zu den bekannten *TRI*-Sequenzen. Diese Sequenz wird im folgenden als *StTRI*-homologe Sequenz (*StTRI*-homolog) bezeichnet. Da sich nach Überexpression des *StTRI*-homologen Enzyms in *E. coli* keine tropinonreduzierende Aktivität feststellen ließ

(siehe unten), wurde eine Kontroll-RT-PCR durchgeführt.

Diese RT-PCR wurde mit den *TRI*-spezifischen Primerpaaren P11 und P12 sowie P11 und P13 mit *Pfu* DNA-Polymerase (Promega) durchgeführt, wobei cDNA aus 3 mm-Keimen 10 Monate nach der Ernte als Matrix verwendet wurde. Die Amplifikate umfaßten entsprechend dem Primerdesign ca. 800 bzw. 930 bp. Nach Anhängen eines „überstehenden“ Adenins (Kap. B 2.2.4.1) wurden die cDNA`s in den pCR 2.1 Vektor (Invitrogene) kloniert und sequenziert. Auch hier zeigte sich eine hohe Homologie zu *TRI*-Sequenzen, aber auch Unterschiede zur bereits gefundenen *StTRI*-homologen cDNA-Sequenz. Die Unterschiede innerhalb der putativen *StTRI*-Sequenzen werden in Kap. C 5.2 beschrieben. Die so gewonnen Sequenzen werden im folgenden als *StTRI-SS* und *StTRI-SE* bezeichnet.

## C 5 Charakterisierung der Tropinonreduktase Sequenzen

### C 5.1 Charakterisierung der *StTRII*-Sequenzen

Die *TRII*-cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Liu (*StTRII-L1 - L3*) umfassen den codierenden Bereich, 786 bp einschließlich des Stop-Codons (vgl. Anhang G 3.2.2). Der ORF codiert für ein Protein von 261 Aminosäuren.

Die Struktur der *TRII*-cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Désirée sind in Tab. C-2 dargestellt. Der größte ORF codiert ebenfalls für ein Protein von 261 Aminosäuren. Die *StTRII-D2* ist unvollständig, hier fehlen die Nukleotide, die für das erste translatierte Start-Methionin und zwei folgende Aminosäuren codieren. Alle *TRII*-cDNA`s sind im Anhang (vgl. Anhang G 3.2.1). dargestellt.

Die sich überschneidenden Bereiche der cDNA-Sequenzen *StTRII-D3* von Désirée und *StTRII-L3* von Liu sind identisch, sie werden im folgenden als *StTRII-L3/D3* Sequenz bezeichnet. Das errechnete theoretische Molekulargewicht liegt zwischen 28373 Da (für *StTRII-D3/L3*) und 28425 Da (für *StTRII-D1* und *L1*), der isoelektrische Punkte zwischen pH 5,4 (für *StTRII-L1* bis *L3/D3*) und pH 5,6 (für *StTRII-D1*) (Bjellqvist *et al.* 1993).

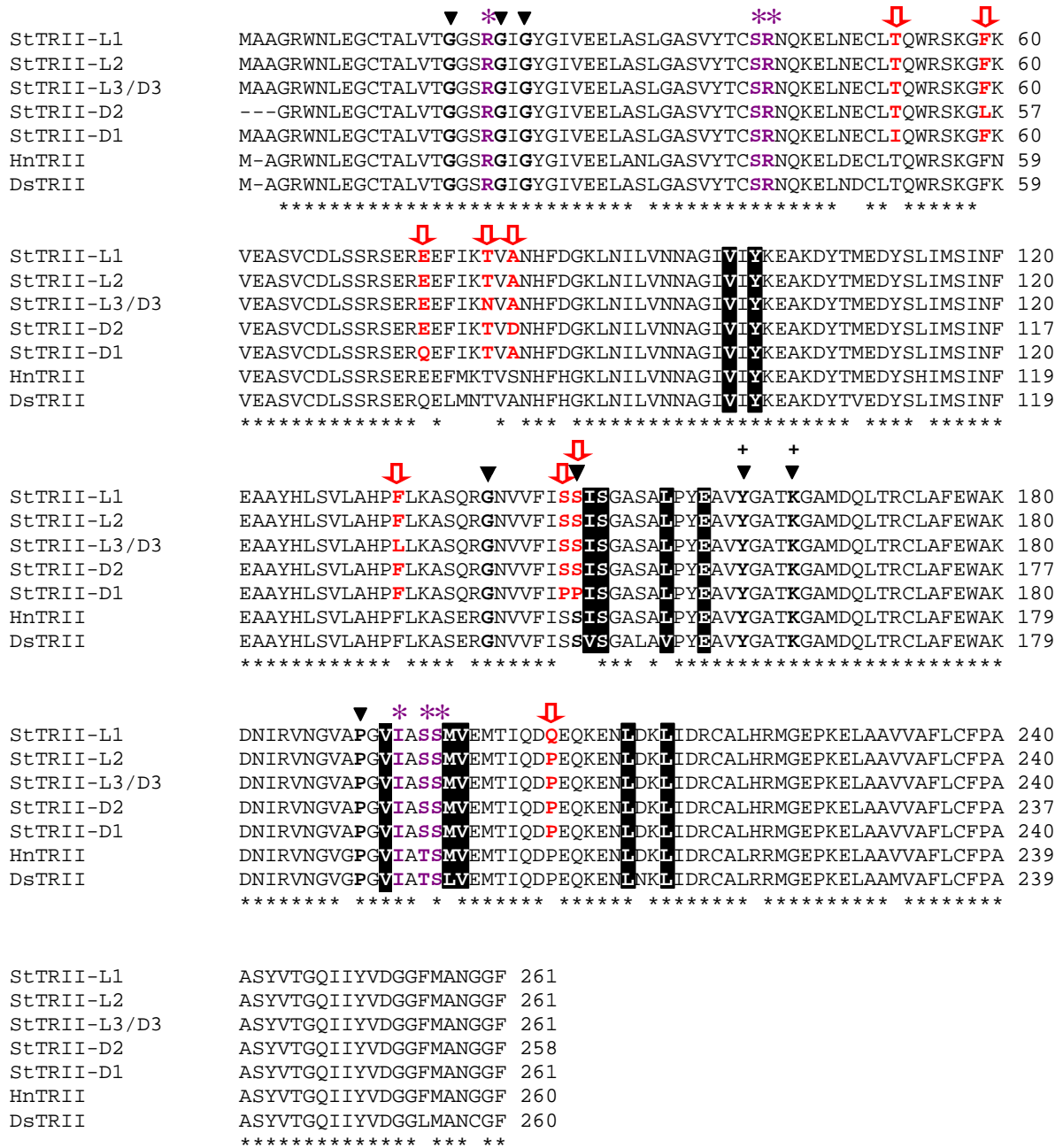
	Länge [bp]	codierender Bereich [bp]	5'-nichttranslatierter Bereich [bp]	3'-nichttranslatierter Bereich [bp]
<i>StTRII-D1</i>	960	786	35	139
<i>StTRII-D2</i>	866	777	fehlt	89
<i>StTRII-D3</i>	969	786	8	175

**Tab. C-2:** Strukturvergleich der *StTRII*-cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Désirée. Der 5'-nichttranslatierte Bereich des *StTRII-D3* Klon ist unvollständig.

Die Aminosäuresequenz der Tropinonreduktasen wurde aus den korrespondierenden Nukleotidsequenzen abgeleitet. Der Aminosäurevergleich aller bekannten TRII-Sequenzen ist in Abb. C-12 dargestellt. Alle fünf StTRII-Sequenzen unterscheiden sich an 9 Aminosäure-positionen: 52: Ile oder Thr, 59: Phe oder Leu, 75: Gln oder Glu, 80: Asn oder Thr, 82: ALa oder Asp, 133: Phe oder Leu, 146: Ser oder Pro, 147: Ser oder Pro and 205: Pro oder Gln. Durch Kristallstrukturanalyse der DsTRII wurde gezeigt, daß keine dieser Positionen als Substrat- oder Co-Faktor-bindungsstelle vermutet wird (Nakajima *et al.* 1998). 247 bis 249 Aminosäuren (95 %) der Kartoffel-TRII sind homolog zu HnTRII und 239 bis 241 Aminosäuren (92 %) zu DsTRII. In Position 2 haben die Kartoffel-TRII-Sequenzen eine zusätzliche Aminosäure, Alanin. Die Isolierung von 3 verschiedenen cDNA-Sequenzen aus jeder der untersuchten Kartoffelsorten zeigt, daß es mehr als ein *TRII*-Gen in Kartoffel gibt. Dies wurde mit *Southern Blot* Analyse bestätigt (vgl. Kap. B 2.2.7). Diskussion zu Sequenzcharakteristika der SDR-Familie erfolgt in Kap. D 2.2.

Zwei StTRII-cDNA-Sequenzen, *StTRII-L1*, die für die rekombinante TRII-Expression und katalytische Charakterisierung verwendet wurde, und *StTRII-D3* wurden in die EMBL-Datenbank mit den Nummern AJ245634 und AJ292343 eingetragen.





**Abb. C-12:** Aminosäurevergleich der TRII-Sequenzen aus *S. tuberosum*, *D. stramonium* und *H. niger* wurde mit CLUSTALW erstellt (Thompson *et al.* 1994). Rot und mit Pfeil gekennzeichnete AS bezeichnen Unterschiede innerhalb der StTRII-Sequenzen, schwarz unterlegte AS gehören zur Substratbindungsstelle, mit \* und violett gekennzeichnete AS bezeichnen die NADPH-Bindungsstellen, + zeigt das katalytische YxxxK Motiv, und sind weitere konservierte AS innerhalb der SDR-Familie.

## C 5.2 Charakterisierung der *StTRI*-Sequenzen

Der Strukturvergleich der putativen *TRI*-cDNA-Sequenzen ist in Tab. C-3 und die entsprechenden Sequenzen sind im Anhang (vgl. Kap. G 3.1) dargestellt. Die *TRI*-cDNA-Sequenzen aus der Kartoffelsorte Désirée besitzen den längsten ORF, der für ein Protein von 264 AS codiert. Damit sind die putativen TRI aus der Kartoffel im Vergleich zur DsTRI und HnTRI um 9 bzw. 10 Aminosäuren am N-Terminus verkürzt (vgl. Abb. C-13). Im Homologievergleich sind 232 von 258 der sich überlappenden Aminosäuren (90 %) der putativen StTRI-homolog-Sequenz zu DsTRI und 222 Aminosäuren (86 %) zu HnTRI homolog.

Das errechnete theoretische Molekulargewicht liegt zwischen 28690 Da (StTRI-SE) und 28790 Da (StTRI-SS), die isoelektrischen Punkte zwischen pH 6,75 (StTRI-SE und StTRI-homolog) und pH 7,57 für das StTRI-SS-Protein (Bjellqvist *et al.* 1993).

	Länge [bp]	codierender Bereich [bp]	5'-nichttranslatierter Bereich [bp]	3'-nichttranslatierter Bereich [bp]
StTRI-SS	795	795	fehlt	fehlt
StTRI-SE	926	795	fehlt	131
StTRI- homolog	976	795	29	152

**Tab. C-3:** Strukturvergleich der *StTRI*-cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Désirée.

Unterschiede auf Aminosäureebene bestehen bei den 3 putativen StTRI-Sequenzen an 7 Positionen; 9: Ser oder Cys, 157: Pro oder Leu, 183: Asp oder Gly, 199: Leu oder Gln, 200: Val oder Ile, 217: Phe oder Ile und 263 Gly oder Ala.

Die Aminosäuren Leu<sup>199</sup>, Ile/Val<sup>200</sup> und Phe<sup>217</sup> sind für die Substratbindung postuliert worden (Nakajima *et al.* 1998). An den Positionen 199 und 217 unterscheidet sich die StTRI-homologe Sequenz zu HnTRI und DsTRI. Ile/Val<sup>200</sup> ist innerhalb der TRI-Sequenzen variabel. Die zwei Aminosäuren Val<sup>101</sup> und Val<sup>159</sup>, die ebenfalls für die Substratbindung postuliert wurden, sind in allen drei putativen StTRI-Sequenzen im Vergleich zu HnTRI und DsTRI unterschiedlich. Val<sup>101</sup> ist gegen Ala und Val<sup>159</sup> gegen Leu ausgetauscht.

Die cDNA-Sequenzen *StTRI-SE* und *StTRI-homolog* wurden in die EMBL Datenbank mit den Nummern AJ307584 und AJ400815 eingetragen.

DsTRI	ME-ESKVSMMNCNNEGRWSLKGTTALVTGGSKGIGYAIVEELAGLGARVYTC <b>SR</b> NEKELD	59
HnTRI	MAGESEVYINGNNGGIRWSLKGTTALVTGGSKGIGYAVVEELAGLGARVYTC <b>SR</b> NEKELQ	60
StTRI-SE	MA-----ELREKWSLKGTTALVTGGSKGIGYAIVEELANFGARVYTC <b>SR</b> NENELQ	50
StTRI-SS	MA-----ELREKWSLKGTTALVTGGSKGIGYAIVEELANFGARVYTC <b>SR</b> NENELQ	50
TRI homolog	MA-----ELREKWSLKGTTALVTGGSKGIGYAIVEELANFGARVYTC <b>SR</b> NENELQ	50
StTRII-L1	MA-----AGRWNLEGCTALVTGGS <b>RG</b> IGYGIVEELASLGASVYTC <b>SR</b> NQKELN	48
DsTRI	ECLEIWRKGLNVEGSVCDLLSRTERDKLMQTVAHVFDGKLNILVNNAGV <b>V</b> IHK <b>EAKDFT</b>	119
HnTRI	QCLDIWRNEGLQVEGSVCDLLRSEKDKLMQTVADLFNGKLNILVNNAGV <b>V</b> IHK <b>EAKDFT</b>	120
StTRI-SE	ECLDIWRKKGLKVEGSVCDLLSRTEREKLMKTVEDVFDGKLNILVNNAGV <b>V</b> IHK <b>EAKDFT</b>	110
StTRI-SS	ECLDIWRKKGLKVEGSVCDLLSRTEREKLMKTVEDVFDGKLNILVNNAGV <b>V</b> IHK <b>EAKDFT</b>	110
TRI homolog	ECLDIWRKKGLKVEGSVCDLLSRTEREKLMKTIEDVFDGKLNILVNNAGV <b>V</b> IHK <b>EAKDFT</b>	110
StTRII-L1	ECLTQWRSKGFKVEASVCDLSSRSEREEFIKTVANHFVDGKLNILVNNAG <b>V</b> I <b>Y</b> KEAKDYT	108
DsTRI	EKDYNIIIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFLSS <b>I</b> AGFSAL <b>P</b> SVLSY <b>S</b> ASK <b>G</b> AIN	179
HnTRI	KEDYDIVLGTNFEAAYHLCQLAYPFLKASQNGNVIFLSS <b>I</b> AGFSAL <b>P</b> SVLSY <b>S</b> ASK <b>A</b> AIN	180
StTRI-SE	KEDYNIIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFVSS <b>I</b> AGFSAL <b>P</b> SVLSY <b>S</b> ASK <b>G</b> AIN	170
StTRI-SS	KEDYNIIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFVSS <b>I</b> AGFSAL <b>L</b> SVLSY <b>S</b> ASK <b>G</b> AIN	170
TRI homolog	KEDYNIIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFVSS <b>I</b> AGFSAL <b>P</b> SVLSY <b>S</b> ASK <b>G</b> AIN	170
StTRII-L1	MEDYSLIMSINFEAAYHLSVLAHPFLKASQRGNVVFIS <b>S</b> ISGASAL <b>P</b> YEAVY <b>G</b> AT <b>K</b> GAM <b>D</b>	168
DsTRI	QMTKSLACEWAKDNIRVNSVAPGV <b>I</b> L <b>T</b> P <b>L</b> VETAIKKNPHQKEE <b>I</b> DNFIVKTPMGRAGKPQ	239
HnTRI	QITKNLACEWAKDNIRVNSVAPGV <b>I</b> L <b>T</b> P <b>L</b> VETAIKKNPHQKEE <b>I</b> DNFIVKTPMGRAGKPN	240
StTRI-SE	QMTKNLACEWAK <b>D</b> NIRVNSVAPAV <b>I</b> L <b>T</b> P <b>L</b> VETAIKKNPQ <b>Q</b> KEE <b>I</b> DS <b>F</b> VVKTPLGRAGKPE	230
StTRI-SS	QMTKNLACEWAK <b>G</b> NIRVNSVAPAV <b>I</b> L <b>T</b> P <b>L</b> VETAIKKNPQ <b>Q</b> KEE <b>I</b> DS <b>F</b> VVKTPLGRAGKPE	230
TRI homolog	QMTKNLACEWAK <b>D</b> NIRVNSVAPAV <b>I</b> L <b>T</b> P <b>L</b> VETAIKKNPQ <b>Q</b> KEE <b>I</b> DS <b>F</b> VVKTPLGRAGKPE	230
StTRII-L1	QLTRCLAFEWAKDNIRVNGVAPGV <b>I</b> AS <b>S</b> ME <b>M</b> ETIQ-DQE <b>Q</b> EN <b>L</b> DK <b>L</b> IDRCALHRMG <b>E</b> PK	227
DsTRI	EVSALIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF-	273
HnTRI	EVSALIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF-	274
StTRI-SE	EASAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANG <b>G</b> F-	264
StTRI-SS	EVSAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANG <b>G</b> F-	264
TRI homolog	EVSAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANG <b>A</b> F-	264
StTRII-L1	ELAAVVAFLCFPAASYVTGQIIYVDGGFMANGGF-	261

**Abb. C-13:** Aminosäurevergleich der TRI-Sequenzen aus *D. stramonium* und *H. niger* mit den putativen TRI-Sequenzen aus *S. tuberosum* und der *StTRII-L1* aus *S. tuberosum*. Der AS-Vergleich wurde mit CLUSTAL W erstellt (Thompson *et al.* 1994). Rot und mit Pfeil gekennzeichnete AS bezeichnen Unterschiede innerhalb der putativen StTRI-Sequenzen; schwarz unterlegte AS gehören zur Substratbindungsstelle, mit \* und violett gekennzeichnete AS bezeichnen die NADPH-Bindungsstellen, + zeigt das katalytische YxxxK Motiv, und sind weitere konservierte AS innerhalb der SDR-Familie. Die mit O bezeichneten AS markieren Unterschiede aller putativen StTRI-Sequenzen zu HnTRI und DsTRI in der Substratbindungsstelle.

## C 6 Überexpression und Reinigung der Tropinonreduktasen

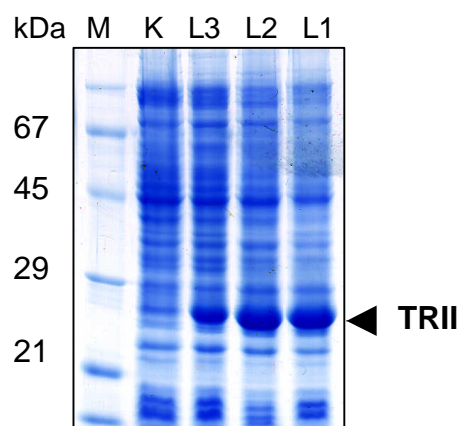
### C 6.1 Expression und Reinigung der StTRII für die katalytische Charakterisierung

Nach der RACE-PCR lagen drei cDNA-Sequenzen der *S. tuberosum* *TRII* (*StTRII-L1* - *L3*) in dem Expressionsvektor pET 21d (Novagen) vor (vgl. Kap B 2.2.4.2). Sie wurden über die durch PCR eingefügten Schnittstellen *NcoI* am Translationsstart und *BamHI* am 3'-Ende der codierenden *TRII*-cDNA-Sequenz in den Vektor kloniert, so daß sie im Leserahmen für die Transkription waren (vgl. *TRII*-Vektormappe, Anhang Abb. G-11). Wegen des Erhalts des Stop-Codons wurde die Möglichkeit des pET-Vektors einer C-terminalen Fusion des *TRII*-Proteins mit einem Histidin-Anker nicht genutzt. Das rekombinante Protein sollte der nativen Form möglichst ähnlich sein, um bei der Charakterisierung mit den bekannten Enzymen aus *H. niger*, *A. belladonna* und *D. stramonium* verglichen werden zu können. Der Anhang eines Histidin-Ankers würde den isoelektrischen Punkt des *TRII*-Enzyms um pH 0,58 Einheiten ändern.

#### C 6.1.1 Expression der StTRII in *E. coli*

Nach Transformation der entsprechenden Plasmide (vgl. Kap. C 6.1) in den *E. coli* BL21 (DE3) Stamm wurde die Translation der *TRII*-Proteine mit IPTG (Isopropylgalactosid) induziert. Dabei steht die Transkription unter Kontrolle des Bakteriophagen T7 Promotors.

Der Aufschluß der Zellen erfolgte unter nativen Bedingungen unter Verwendung von Lysozym (vgl. Kap. B 2.2.9). Nicht lösliches Protein und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt.



**Abb. C-14:** Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel mit den löslichen Bestandteilen der Bakterien-Proteinextrakte nach 18 h Induktion mit 1 mM IPTG bei 25 °C. M: Proteinmarker; K: *E. coli* (pET 21d); L1 - L3: *E. coli* (pET 21d mit den korrespondierenden STTRII-L1 - L3 cDNA-Sequenzen).

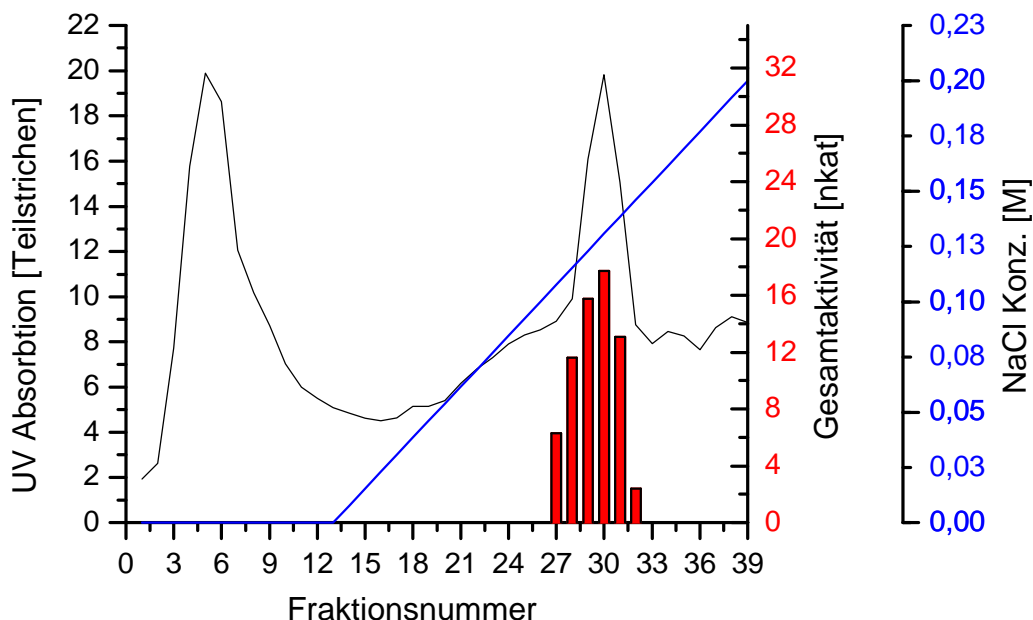
Im Überstand wurde die Expression mit SDS-PAGE (Abb. C-14) und photometrischem Enzymassay überprüft.

Während bei den Proteinextrakten der TRII-Klone (Abb. C-14, Spur L1-L3) eine verstärkte Proteinbande bei etwa 28 kDa auf die Induktion der TRII-Translation hinweist, zeigt die Kontrolle (Spur K) keine entsprechende Bande. Die Größe der verstärkt gebildeten Proteine entspricht dem errechneten Molekulargewicht der StTRII. Im photometrischen Enzymassay (vgl. Kap. B 2.3.2) zeigten alle Bakterienlysate, in denen TRII-Proteine gebildet wurden, eine pseudotropiniforme Tropinonreduktaseaktivität, während die Kontrolle keine Aktivität zeigte. Das Reaktionsprodukt des Assays, Pseudotropin, wurde mit GC und GC-MS nachgewiesen. Tropin konnte nicht detektiert werden.

### C 6.1.2 Partielle Reinigung der StTRII mittels FPLC

Die partielle Reinigung der StTRII mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) und deren katalytische Charakterisierung wurden in Zusammenarbeit mit Frau Heike Kaiser in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Für diese Arbeiten wurde der StTRII-L1-Klon ausgewählt.

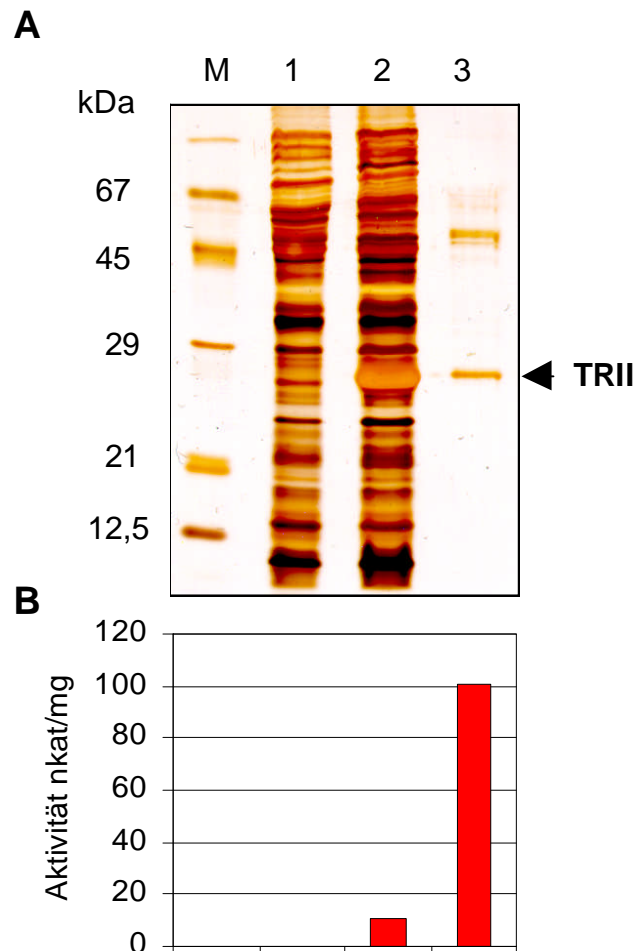
Zur partiellen Reinigung wurde nach dem Entsalzen der löslichen Bestandteile der Bakterienlysate ein basischer Anionenaustauscher, Fractogel EMD-DEAE 650(M) (Merck) verwendet (vgl. Kap. B 2.3.4.1). Abb. C-15 zeigt das Chromatogramm des Elutionsprofils und die korrespondierenden TRII-Enzymaktivitäten.



**Abb. C-15:** FPLC-Elutionsprofil des rekombinanten TRII-Protein-Bakterienlysates unter Verwendung eines Anionenaustauschers Fractogel EMD-DEAE. Die Fraktionsgröße beträgt jeweils 5 ml; die Fließgeschwindigkeit 1ml/min. Die Fraktionen 27 - 32 mit den hohen TRII-Enzymaktivitäten wurden zur Charakterisierung der StTRII verwendet.

Die Elution des TRII-Proteins begann bei einer NaCl-Konzentration von 0,1 M und erstreckte sich über 6 Fraktionen. Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden dialysiert und für katalytische Untersuchungen verwendet (vgl. Kap. C 7.1).

In Abb. C-16 ist die Anreicherung des TRII-Proteins nach FPLC im SDS-PAGE Gel und die zugehörigen Enzymaktivitäten zu sehen. Die Aktivität konnte um den Faktor 10 angereichert werden.

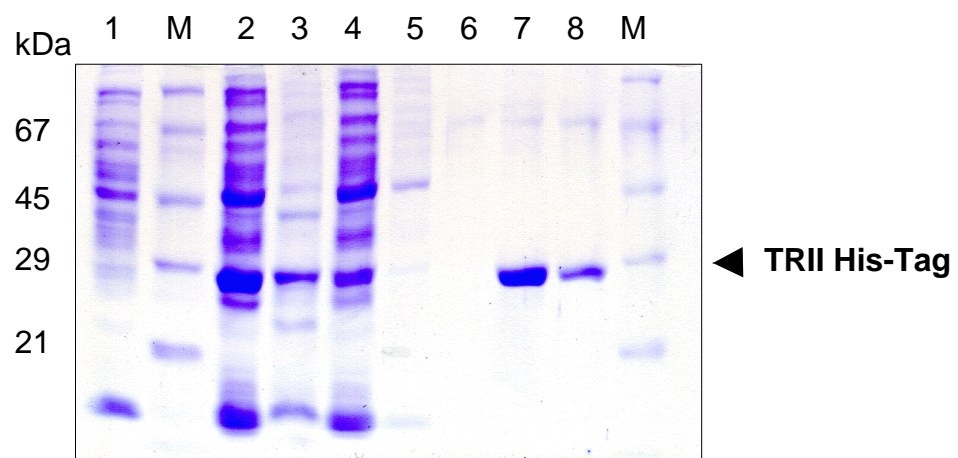


**Abb. C-16:** Abb. A: silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel mit Bakterienextrakten. M: Proteinmarker; Spur 1: lösliche Bestandteile des *E. coli* (pET 21d/StTRII-L1) Lysates ohne IPTG Induktion; Spur 2: lösliche Bestandteile des *E. coli* (pET 21d/StTRII-L1) Lysates 18 h nach Induktion der TRII-Proteinsynthese; Spur 3: rekombinantes TRII-Protein nach FPLC-Reinigung und anschließender Dialyse. Abb. B: Enzymaktivitäten für die Extrakte in Abb. A.

## C 6.2 Expression und Reinigung der StTRII für die Gewinnung von Antikörpern

Rekombinantes Protein soll für die Gewinnung von StTRII-Antisera in ausreichender Menge zur Verfügung stehen (vgl. Kap. D 3). Die Herstellung von rekombinantem StTRII-Protein mit Fusion eines vektor-vermittelten 6xHistidin-Restes erleichtert die Reinigung.

Zur Subklonierung der *StTRII-L1*-cDNA in den pET 21d Vektor wurden durch PCR mit dem Primerpaar P09 und P14 eine *NcoI* Schnittstelle am Start-Codon und eine *XhoI* Schnittstelle am Ende der codierenden Sequenz eingeführt (vgl. Tab. B-1; Kap. B 2.2.4.3). Dabei wurde das Stop-Codon zerstört, so daß das rekombinante TRII-Enzym am C-Terminus einen Histidin-Anker trägt. Nach erfolgreicher Ligation wurde das Plasmid in *E. coli* Stamm BL21 (DE3) überführt. Die Überexpression wurde unter gleichen Bedingungen wie für die Isolierung der TRII ohne Histidin-Anker durchgeführt. Der nach Zelllyse gewonnene Überstand wurde für die Affinitätschromatographie mit einer Nickel-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen) verwendet. Die Enzymaktivität wurde nach Elution im photometrischen Enzymassay bestimmt, sie betrug in den vereinigten Eluaten 23 nkat/mg Protein.



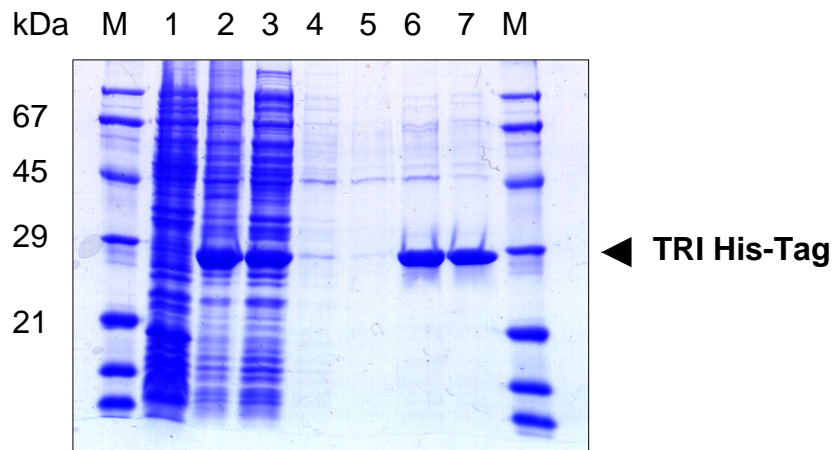
**Abb. C-17:** Reinigungsschema für rekombinantes *StTRII*-His-Tag-Protein. Coomassiegefärbtes SDS-PAGE Gel; M: Proteinmarker; Spur 1 nicht induziertes Bakterienlysat; Spur 2: lösliche Bestandteile des *E. coli* (pET 21d/*StTRII-L1*-His-Tag) Lysates 18 h nach Induktion der TRII-Proteinsynthese; Spur 3: unlösliche Bestandteile des *E. coli* (pET 21d/*StTRII-L1*-His-Tag) Lysates 18 h nach Induktion der TRII-Proteinsynthese, diese wurden im Ausgangsvolumen des Puffers resuspendiert; Spur 4: nicht an die Ni-NTA-Agarose gebundene Proteine; Spur 5/6 Waschschritt mit 20 mM Imidazol Puffer; Spur 7/8: Elution des rekombinanten TRII-Proteins mit 250 mM Imidazolpuffer.

### C 6.3 Expression und Reinigung der putativen TRI

Die *StTRI-SE* und die *StTRI-homologe* cDNA-Sequenzen wurden ausgewählt, um in *E. coli* die korrespondierenden Proteine zu exprimieren. Die Subklonierung in den Expressionsvektor pET 21d erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für die *StTRII* mit His-Tag (vgl. Kap. B 2.2.4.3; Vektorkarte *StTRI-SE* siehe Anhang Abb. G-12). Auch hier sollte mittels Fusion mit einem vektorvermittelten Histidin-Anker die Reinigung erleichtert werden.

Die Überexpression der rekombinanten putativen TRI-Enzyme erfolgte nach Induktion mit IPTG bei 37 °C für 6 h. Die nach Lyse gewonnenen Proteinextrakte wurden über eine Nickel-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen) gereinigt. In Abb. C-18 ist die

Reinigung am Beispiel des StTRI-SE-Proteins dargestellt. Für das StTRI-homologe Protein wurden eine ähnliche Expressionsrate und Reinigung erzielt (ohne Abbildung). Die Enzymaktivität wurde nach Elution bestimmt, sie betrug für das StTRI-SE-Enzym in den vereinigten Eluaten 2,653 nkat/mg Protein. Das TRI-homologe Protein besaß keine Tropinreduktase-Aktivität (vgl. Kap. C 7.2)



**Abb. C-18:** Reinigungsschema für rekombinantes StTRI-SE-His-Tag-Protein. Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel; M: Proteinmarker; Spur 1 nicht induziertes Bakterienlysat; Spur 2: lösliche Bestandteile des *E. coli* (pET 21d/StTRI-SE-His-Tag) Lysates 5 h nach Induktion der TRI-Proteinsynthese; Spur 3: nicht an die Ni-NTA-Agarose gebundene Proteine; Spur 4/5 Waschschritt mit 20 mM Imidazol Puffer; Spur 6/7: Elution des rekombinanten TRI-Proteins mit 250 mM Imidazolpuffer.

## C 7 Biochemische Charakterisierung der Tropinonreduktasen

### C 7.1 Katalytische Charakterisierung der StTRII

Zur Charakterisierung der katalytischen Parameter der StTRII wurden die in Kap. C 6.1.2 beschriebenen Dialysate verwendet.

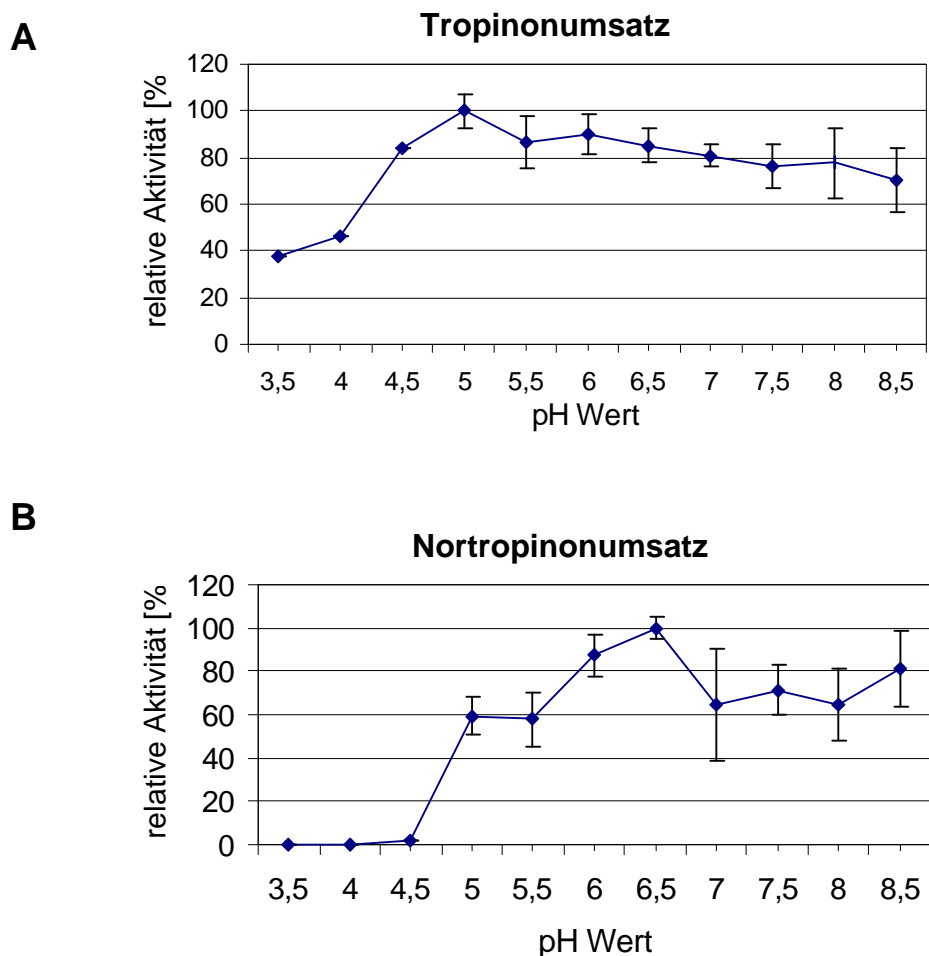
Im photometrischen Enzymassay wurde die Aktivität der Tropinonreduktasen über die Abnahme der Extinktion durch den Verbrauch des Co-Substrates NADPH gemessen. Es wurde festgestellt, daß das rekombinante StTRII-Enzym NADPH verwendet, aber nicht NADH. Die StTRII war nicht in der Lage, die Rückreaktion d. h. eine Oxidation, zu katalysieren.

Da die Biosynthese der Calystegine über den Tropanalkaloidstoffwechsel noch nicht in allen einzelnen Schritten bekannt ist, kann man Nortropinon als natürliches Substrat für die Tropinonreduktase nicht ausschließen. Deshalb sollte für die Untersuchung des pH-Optimums und der katalytischen Faktoren neben Tropinon auch Nortropinon einbezogen werden. Die spezifischen Reduktionsprodukte Pseudotropin und Norpseudotropin wurden mittels GC und GC-MS identifiziert, wenn Tropinon bzw. Nortropinon als Substrat eingesetzt wurden (vgl. Anhang Kap. G 6.1). Tropin und Nortropin wurden nicht geformt.



### C 7.1.1 Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Reduktaseaktivität

Die pH-Abhängigkeit der Reduktaseaktivität wurde im Bereich von pH 3,5 bis 8,5 bestimmt (Abb. C-19). Für Tropinon als Substrat lag der optimale pH-Wert bei 5,0. Im sauren Bereich fällt die Aktivität steil unter 40 % bei pH 3,5 ab. Im basischen Bereich sank die Aktivität langsamer ab, bis auf 70 % bei pH 8,5. Die Reduktion von Nortropinon fand ihr Optimum bei pH 6,5 und fiel dann nach beiden Seiten gleichmäßig ab. Im sauren Bereich ab pH 4,5 erfolgte keine Umsetzung mehr. Wie die StTRII zeigten die anderen bekannten TRII-Enzyme ein breites pH-Optimum, während TRI-Enzyme ein schmaleres pH-Optimum bei 6,2 besitzen (Nakajima *et al.* 1999b; Portsteffen *et al.* 1994).



**Abb. C-19:** pH-Abhängigkeit der TRII-Reduktaseaktivität beim Umsatz von Tropinon (Abb. A) und Nortropinon (Abb. B). Abgebildet sind Mittelwerte; zwischen pH 5 und 8,5 wurde jede Messung 3 - 5mal wiederholt, bei pH 3 - 4,5 wurde nur eine Meßreihe durchgeführt. Die relativen Aktivitäten in Prozent beziehen sich jeweils auf den Mittelwert der Aktivitäten. Standardabweichungen sind in Balken angegeben.

### C 7.1.2 Bestimmung katalytischer Parameter

$K_m$  und  $V_{max}$  Werte wurden für Tropinon bei 3 verschiedenen pH-Werten bestimmt (vgl. Kap. B 2.3.4.4), pH 5,0, dem Umsatzoptimum, pH 6,4, dem pH-Wert des Standardenzymassays und pH 7,6, welches dem physiologischen pH-Wert des Wurzel-Cytoplasmas entspricht (Ford *et al.* 1996).

Für Nortropinon wurde der  $K_m$  und  $V_{max}$  nur bei pH 6,4 bestimmt, da nur sehr wenig Ausgangssubstanz zur Verfügung stand. Eine akkurate Bestimmung war hier nicht möglich, da Nortropinon nur eine geringe Reinheit (ca. 90 %) besaß und das Substanzgemisch eine hohe Eigenabsorption aufwies. Bei 0,25 mM Substratkonzentration scheint  $V_{max}$  bereits erreicht, eine weitere Erhöhung der Nortropinonkonzentration führt bereits zu einem Aktivitätsabfall (vgl. Anhang Abb. G-18). Unter Berücksichtigung des Konzentrationsbereiches von 0,01562 mM bis 0,25 mM ergibt sich ein  $K_m$  von 0,025 mM und ein  $V_{max}$  von 12 nkat/mg. Im Substratbereich von 0,01562 bis 0,0625 mM, bei dem der Verlauf der Lineweaver-Burk Darstellung linear verläuft, ergibt sich ein  $K_m$  von 0,1 mM und ein  $V_{max}$  von 20 nkat/mg (vgl. Anhang Abb. G-18). Die  $V_{max}$  Werte des Nortropinons sind mindestens um die Hälfte geringer als die des Tropinons.

pH-Wert	Tropinon		Nortropinon	
	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [nkat/mg] $\pm$ SD	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [nkat/mg]
5,0	0,111	72,02 $\pm$ 7,72		
6,4	0,033	45,40 $\pm$ 2,54	0,025-0,1	12-20
7,6	0,052	48,83 $\pm$ 3,11		

**Tab. C-4:**  $K_m$  und  $V_{max}$  Werte für Tropinon und Nortropinon.

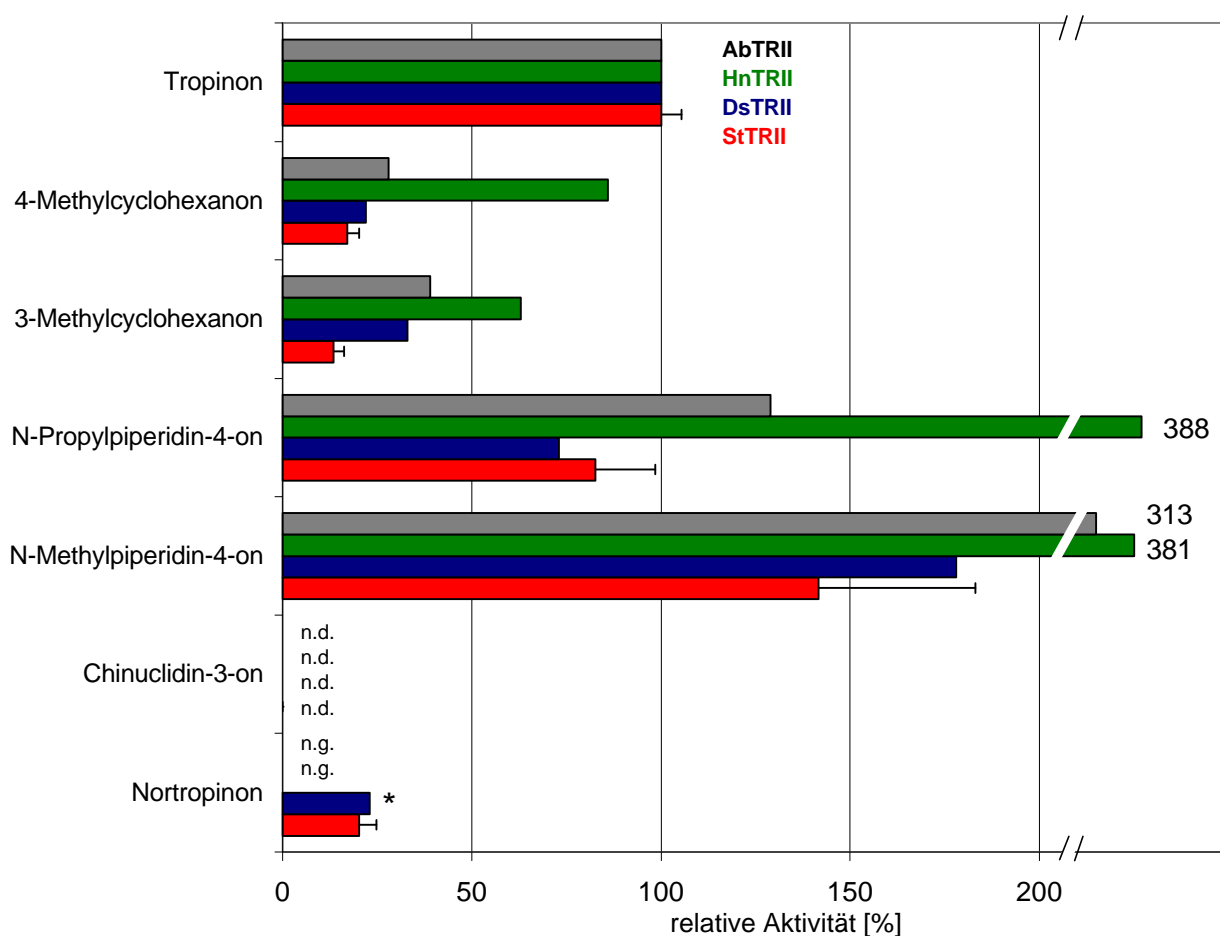
Die katalytische Konstante ergibt sich aus dem Verhältnis von  $V_{max}$  zu  $K_m$ . Sie beinhaltet die Umsetzungs- und Bindungseigenschaften. Ein größerer Wert, wie er sich für Tropinon als Substrat ergibt, spiegelt jeweils günstigere Eigenschaften wieder. Das Umsetzungsvermögen der StTRII für Nortropinon liegt bei diesem Parameter bei maximal einem Drittel im Vergleich zum Tropinon.

	katalytische Konstante [nkat/(mg · mM)]	Verhältnis der katalytischen Konstante [%]
Tropinon	1377	100
Nortropinon	200 (1) 480 (2)	14 35

**Tab. C-5:** Katalytische Konstante und prozentuales Verhältnis der katalytischen Konstante für Tropinon und Nortropinon als Substrate. (1) berechnet auf die obere Grenze des  $K_m$  und  $V_{max}$  Wertes, (2) untere Grenze der  $K_m$  und  $V_{max}$  Werte.

### C 7.1.3 StTRII-Umsetzung mit Substratanaloga

Mögliche strukturanaloge Ketone (vgl. Abb. B-4), die durch die StTRII im photometrischen Enzymassay (vgl. Kap. B 2.3.2) umgesetzt werden können, wurden getestet und mit den Literaturdaten für HnTRII, AbTRII und DsTRII verglichen (Abb. C-20). Die Messungen wurden bei pH 6,4 und einer Substratkonzentration von 5 mM durchgeführt. Bei den untersuchten Substraten zeigten sich ähnliche relative Aktivitäten aller vier Tropinonreduktasen II, wobei DsTRII und StTRII sich noch ähnlicher sind. Chinuclidin-3-on wird von keiner TRII umgesetzt, hingegen akzeptieren die bekannten TRII Enzyme dieses Substrat (Hashimoto *et al.* 1992). Umsetzungsversuche mit Nortropinon wurden für die AbTRII und HnTRII nicht beschrieben.



**Abb. C-20:** Relative Aktivitäten für verschiedene Substratanaloga. Die Werte für die *S. tuberosum* TRII-Umsetzung werden mit den Werten von *D. stramonium* TRII (Portsteffen *et al.* 1994), *A. belladonna* (Dräger und Schaal 1994a) und *H. niger* TRII (Hashimoto *et al.* 1992) verglichen. \*: der Wert für die Umsetzung von Nortropinon durch DsTRII wurde aus (Boswell *et al.* 1999a) entnommen. Standardabweichungen für StTRII ist in Balken angegeben. n. d.: nicht detektiert; n. g.: nicht gemessen.

## C 7.2 Katalytische Charakterisierung der StTRI

Bei der katalytischen Charakterisierung der putativen TRI-Enzyme wurden erste Vorversuche unternommen. Enzymaktivitäten wurden mit dem photometrischen Standardassay (vgl. Kap. B 2.3.2) in den löslichen Bestandteilen der Bakterienlysate gemessen. Das StTRI-SE-Enzym reduzierte Tropinon zum Tropin, das StTRI-homologe Enzym (StTRI-homolog) war hingegen nicht in der Lage, Tropinon zu reduzieren (Tab. C-6). Im Fall des StTRI-SE-Enzyms konnte das Reduktionsprodukt als Tropin mit AMD-TLC und GC nachgewiesen werden (vgl. Anhang Kap. G 6.2). Pseudotropin wurde nicht gebildet. Beim StTRI-homologen Enzym fand keine Umsetzung des Tropinons statt.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten des StTRI-SE-Enzyms für verschiedene Substratanaloga soll in eine weiterführende Aufgabenstellung einbezogen werden. Dazu sollen größere Mengen rekombinantes TRI-Enzym über Nickel-NTA-Agarose gereinigt werden.

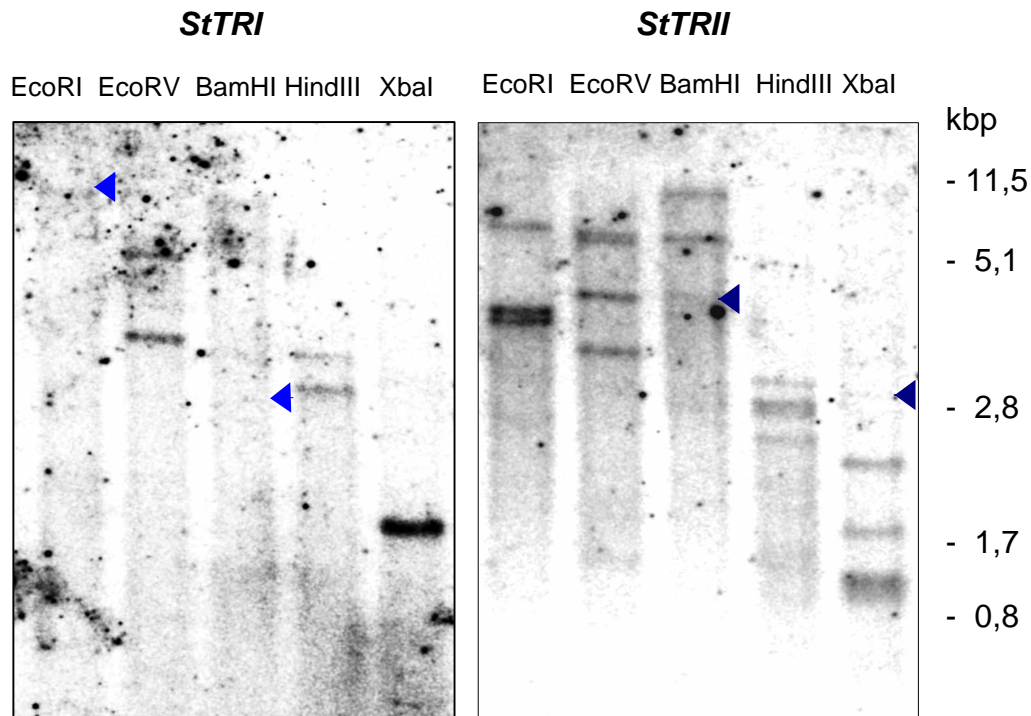
Substrat	StTRI-Homologes	StTRI-SE
	Aktivität [pkat/mg Protein] ± SD	
Tropinon	n. d.	1120 ± 75
3-Methylcyclohexanon	7123 ± 536	n. b.
4-Methylcyclohexanon	2438 ± 101	n. b.
N-Propylpiperidin-4on	n. d.	n. b.
N-Methylpiperidin-4on	n. d.	n. b.
Chinuclidin-3-on	496 ± 20	n. b.
Nortropinon	n. d.	n. b.

**Tab. C-6:** Enzymaktivitäten des StTRI-SE-Proteins und des StTRI-homologen aus den löslichen Bestandteilen der Bakterienlysate. Beide Proteine sind mit einem Histidin-Anker fusioniert. n. d.: nicht detektiert. Für StTRI-SE-Protein wurde bisher nur Tropinon als Substrat verwendet; n. b.: nicht bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Bestimmungen.

## C 8 Genomische Southern Blot Analyse

Zur Abschätzung der Kopienzahl der zu den StTRII- und StTRI-Proteinen korrespondierenden Gene wurde eine *Southern Blot* Analyse durchgeführt. Genomische DNA aus *S. tuberosum* var. Désirée wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII* und *XbaI* gespalten und in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer der Nukleinsäuren auf eine positiv geladene Nylon-

membran wurde mit einem radioaktiv markierten *StTRII*-Fragment hybridisiert (vgl. Kap. B 2.2.7). Nach der Detektion wurden die Signale vollständig von der Membran gewaschen und anschließend mit einem radioaktiv markierten *StTRI*-Fragment, hybridisiert. Die Ergebnisse indizieren, daß die *TRI* und *TRII* von einem *low-copy* bzw. *multi-copy* Gen codiert werden (Abb. C-21).



**Abb. C-21:** Nachweis der *TRI*- und *TRII*-Gene im Genom von *S. tuberosum* var. Désirée. 20 µg DNA wurden mit den indizierten Restriktionsenzymen gespalten. Für die Hybridisierung wurde als *TRI*-Sonde ein 210 bp großes C-terminales Fragment verwendet, als *TRII*-Sonde die codierende Sequenz des *StTRII-L1*-Klones. Schwache Signale sind mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet. *HindIII* und *XbaI* besitzen eine Erkennungsstelle innerhalb der korrespondierenden cDNA-Sequenzen aller *StTRII*.

## C 9 Akkumulation der *TR*-Transkripte in Pflanzen

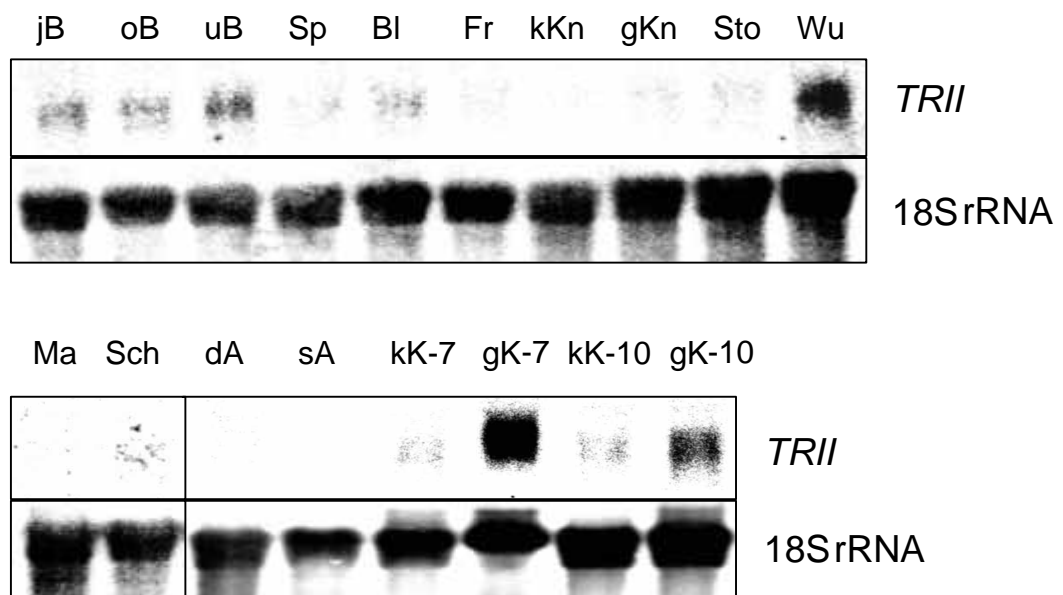
Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Pflanzengeweben der Kartoffel var. Liu isoliert (vgl. Kap. B 2.2.2), um die *TR*-mRNA-Akkumulation mittels *Northern Blot* Analyse nachzuweisen. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die Gewebe gerichtet, in denen eine Calysteginakkumulation zu finden ist (vgl. Kap. C 1.2.2).

Zum *Northern Blot* wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA in einem 1,2%igen denaturierenden Formaldehyd/Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran entweder mit einem 400 bp großen, radioaktiv markierten Fragment der *TRI* oder *TRII* hybridisiert (vgl. Kap. B 2.2.8). Zur Sicherstellung, daß gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden, wurde mit einer 18S rRNA Sonde eine Kontrollhybridisierung durchgeführt.

### C 9.1 Expression von *TRII*

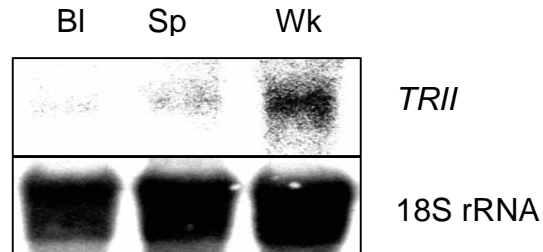
Die Dot-Plot Analyse (ohne Abbildung, OMIGA-Software) der StTRI- und StTRII-cDNA-Sequenzen weist in der codierenden Sequenz eine höhere Homologie am N-Terminus auf. Große Bereiche des C-Terminus zwischen 450 und 750 bp haben eine geringere Homologie als 60 % auf Nukleotidebene. Deshalb wurden in den *Northern Blot* Analysen jeweils C-terminale Sonden verwendet, um eine Kreuzhybridisierung zu vermeiden (vgl. Kap. B 2.2.8). Die unterschiedlichen Expressionssignale zeigten die Spezifität der Sonden.

Abb. C-22 zeigt die *TRII*-Transkriptakkumulation in Pflanzen und Knollen. In den Wurzeln und 10 mm-Keimen wurden die stärksten Signale detektiert. Geringere Transkriptmengen wurden in 3 mm-Keimen, der Schale, Blättern und den Blüten gefunden. In den keimenden Kartoffelaugen (sA), in denen die Akkumulation der Calystegine am höchsten war, wurde kein *TRII*-Transkript detektiert. Es läßt sich vermuten, daß die Calystegine von der Rinde in die Augen transportiert werden. Neben den abgebildeten Geweben wurden auch noch das Gewebe um den Gefäßring in der Knolle und der Keimgrund von 3 mm-Keimen untersucht (ohne Abbildung). Hier konnte kein Transkript nachgewiesen werden.



**Abb. C-22:** Expression von *TRII* in verschiedenen Geweben von Kartoffelpflanzen und Knollen. Gesamt-RNA wurde isoliert aus: jungen Blättern (jB); oberen Blättern (oB); unteren Blättern (uB); der Sproßachse (Sp); den Blüten (Bl); der Frucht (Fr); kleinen, wachsenden Knollen, d = 0,5 cm (kKn); größeren, wachsenden Knollen, d = 1,0 cm (gKn); Stolonen (Sto); Wurzeln (Wu); Mark (Ma); Schale (Sch); dormanten Augen (dA); Augen beim Keimstart (sA); kleine Keime, 3 mm, 7 Monate nach der Ernte (kK-7); große Keime, 10 mm, 7 Monate nach der Ernte (gK-7); kleine Keime, 3 mm, 10 Monate nach der Ernte (kK-10); große Keime, 10 mm, 10 Monate nach der Ernte (gK-10). Die Hybridisierung erfolgte mit einem radioaktiv markierten 400 bp großen *TRII*-Fragment des C-Terminus. Als Kontrollhybridisierung wurde eine 18S rRNA Sonde verwendet.

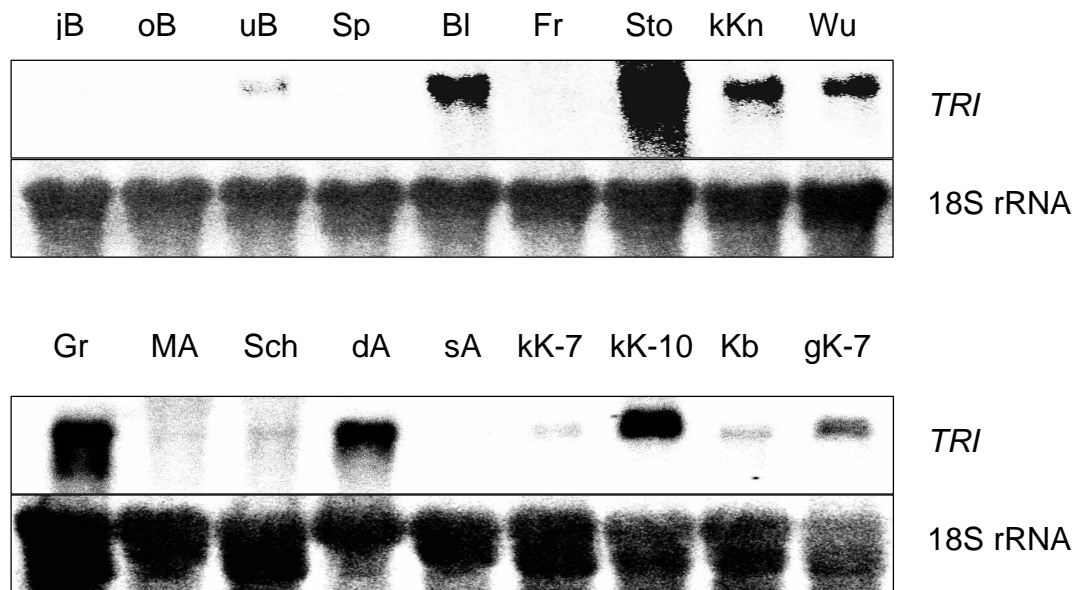
Kartoffel-Wurzelkulturen var. Désirée zeigten eine hohe *TRII*-Transkriptakkumulation, die Sproßachse von *in vitro* Pflanzen var. Désirée eine geringe (Abb. C-23).



**Abb. C-23:** Expression von *TRII* in Wurzelkulturen und *in vitro* Pflanzen. Blätter (*BI*), Sproßachse (*Sp*) und Wurzelkultur (*Wk*). Die Hybridisierung erfolgte mit einem radioaktiv markierten 400 bp großen Fragment des C-Terminus. Als Kontrollhybridisierung wurde eine 18S rRNA Sonde verwendet.

## C 9.2 Expression von *TRI*

Abb. C-24 zeigt die Transkriptakkumulation der *TRI* in Kartoffelpflanzen und Knollen. Sie unterscheidet sich grundlegend von der Akkumulation des *TRII*-Transkriptes (vgl. Kap. C 9.1). Größte Transkriptmengen wurden in Stolonen, im Gewebe um den Gefäßring in der Knolle, in dormanten Augen und in 3 mm-Keimen 10 Monate nach der Ernte detektiert. Wurzeln, Blüten und kleine wachsende Knollen zeigten ebenfalls noch starke Signale, während in jungen und oberen Blättern sowie in keimenden Augen kein Transkript festgestellt werden konnte.



**Abb. C-24:** Expression von *TRI* in verschiedenen Geweben von Kartoffelpflanzen und Knollen. Gesamt-RNA wurde isoliert aus: jungen Blättern (*jB*); oberen Blättern (*oB*); unteren Blättern (*uB*); der Sproßachse (*Sp*); den Blüten (*Bl*); der Frucht (*Fr*); Stolonen (*Sto*); kleinen, wachsenden Knollen,  $d = 0,5$  cm (*kKn*); Wurzeln (*Wu*); Gewebe um den Gefäßring in der Knolle (*Gr*); Mark (*Ma*); Schale (*Sch*); dormanten Augen (*dA*); Augen beim Keimstart (*sA*); kleine Keime, 3 mm, 7 Monate nach der Ernte (*kK-7*); kleine Keime, 3 mm, 10 Monate nach der Ernte (*kK-10*); Gewebe an der Keimbasis von 3 mm Keimen, 10 Monate nach der Ernte (*Kb*); große Keime, 10 mm, 7 Monate nach der Ernte (*gK-7*). Die Hybridisierung erfolgte mit einem radioaktiv markierten 400 bp großen *TRI*-Fragment des C-Terminus. Als Kontrollhybridisierung wurde eine 18S rRNA Sonde verwendet.



## D Diskussion

### D 1 Die Calystegine

#### D 1.1 Verbreitung und Verbreitung der Calystegine

Calystegine kommen in einer Reihe wichtiger Kulturpflanzen vor, wie der Kartoffel (*Solanum tuberosum*), der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) (Asano *et al.* 1997a). Neben diesen als Gemüse verwendeten Nahrungsmitteln wurden Calystegine auch in eßbaren Früchten gefunden (Asano *et al.* 1997a). Da die Calystegine potente Inhibitoren von  $\beta$ -Glucosidasen und  $\alpha$ -Galactosidasen (vgl. Kap. A 2.3) sind, stellt sich die Frage nach deren Akkumulation in Nahrungsmitteln. Eine quantitative Bestimmung der Calystegine in unterschiedlichen Geweben wurde bisher aber nur von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Darstellung der Calysteginakkumulation in *S. tuberosum* var. Liu während der gesamten Kultivierungsperiode und in den Kartoffelknollen gezeigt (vgl. Kap. C 1.2). Calystegine akkumulieren hauptsächlich in metabolisch aktiven Geweben wie Kartoffelkeimen, jungen Blättern und Blüten. Für die in der Kartoffel vorkommenden Glycoalkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin wurde eine ähnliche Verteilung bestimmt (Friedman und Mc Donald 1997a). In der Knolle finden sich hohe Glycoalkaloid- und Calysteginkonzentration in den Kartoffelaugen und geringe Konzentrationen im Mark (vgl. Kap. C 1.2.2.1) (Lampitt *et al.* 1943; Wünsch und Munzert 1989). Im Unterschied zu den Knollen enthalten die oberirdischen Gewebe mehr Glycoalkaloide als Calystegine.

Nash und Mitarbeiter (1993) gaben den Gehalt an Calysteginen in *S. tuberosum* var. Estima mit 100  $\mu\text{g/g}$  FM (0,01 %) in der Korkhaut und 10  $\mu\text{g/g}$  FM (0,001 %) für das restliche Knollengewebe an. Asano und Mitarbeiter (1997a) hingegen beschrieben den Gehalt der Knolle mit 3,39 bzw. 7  $\mu\text{g/g}$  FM für zwei nicht näher bezeichnete Varietäten. In unseren Untersuchungen zeigte sich je nach Erntezeitpunkt ein Gehalt zwischen 400 und 1500  $\mu\text{g/g}$  FM in der Korkhaut sowie 80 und 140  $\mu\text{g/g}$  FM im Mark. Schließt man die Unterschiede im Calystegingehalt in den Keimen der Sorten Arcula, Adretta und Liu (vgl. Kap. C 1.2.1) in die Betrachtung ein, ist der Calystegingehalt unterschiedlich in den untersuchten Sorten und abhängig vom Zeitpunkt der Entwicklung. Auch der Glycoalkaloidgehalt schwankt in den Kartoffeln verschiedener Sorten ebenfalls (Valkonen *et al.* 1996; Jadhav *et al.* 1991).

Weiteren Aufschluß über die Verteilung der Calystegine könnte die Untersuchung von Wildkartoffeln geben. Auch hier finden sich in verschiedenen Kartoffelsorten bei den Glycoalkaloiden Unterschiede von 500 – 4860  $\mu\text{g/g}$  FM, z. B. in den Blättern (Valkonen *et al.* 1996). Erste Hinweise auf solche Unterschiede bei den Calysteginen berichteten Arnone und Mitarbeiter (1999), die in somatischen Hybriden von *S.*

*tuberosum* (+) *S. pinnatisectum* in der Korkhaut bis zu 3,89 % Calystegine bezogen auf die Trockenmasse gefunden haben. Bezogen auf die Frischmasse sind das ca. 0,67 % oder 6700 µg/g FM. Diese hohen Werte wurden von uns zu keinem Zeitpunkt in den untersuchten *S. tuberosum* Sorten gefunden. Der Maximalwert der Calystegine betrug 4403 µg/g FM (0,44 %) in den Kartoffelaugen beim Keimstart fünf Monate nach der Ernte.

In anderen Solanaceen, wie z. B. in den oberen Blättern von *A. belladonna* (625 µg/g FM) oder der Frucht von *S. melongena* (73 µg/g FM), ist der Höchstgehalt an Calysteginen wesentlich geringer als der in Kartoffeln (Asano *et al.* 1997a; Dräger *et al.* 1995c). Kartoffelkeime stellen damit ein ausgezeichnetes Material dar, um Calystegine für biologische Tests zu isolieren.

## D 1.2 Die physiologische Bedeutung der Calystegine

Über die physiologische Bedeutung der Calystegine gibt es in der Literatur nur wenige Angaben. Eine Induktion der Alkaloidbiosynthese durch Tageslicht, wie es für die Glycoalkaloide beobachtet wurde (Jadhav *et al.* 1991), konnte für die Calysteginbiosynthese der untersuchten Kartoffelsorte Liu in unseren Versuchsbedingungen nicht gezeigt werden (vgl. Kap. C 1.2.1). Allerdings kann eine Induktion der Biosynthese stark von der verwendeten Lichtquelle abhängig sein. In Abhängigkeit von der verwendeten Spektralzusammensetzung des Lichtes wurde bei der Glycoalkaloidbiosynthese eine Steigerung der Glycoalkaloidakkumulation um das 0,6 - 4fache erreicht (Percival 1999). Es ist nicht auszuschließen, daß die Calysteginbiosynthese durch die Verwendung anderer Lichtquellen induzierbar wäre. Andere Alkaloidbiosynthesen, wie z. B. die der Indolalkaloide, sind ebenfalls durch Licht induzierbar (Schroeder *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu wird die Shikoninbiosynthese in *Litospermum erythrorhizon* reprimiert (Yazaki *et al.* 1999).

Insektenfraß verursacht eine Verwundung der Pflanze. Diese führt in den Pflanzen zu einem erhöhten Jasmonat Spiegel (Creelman und Mullet 1997), wobei Methyljasmonat (MeJa) als Signalmolekül dient. Es induziert die Biosynthese von Proteinen, die in Abwehrreaktionen bei Schädlingsbefall involviert sind (Memelink *et al.* 2001). Aber nicht alle verwundungs-responsiven Gene sind Jasmonat-reguliert (Titarenko *et al.* 1997). Insektenfraß kann auch die Biosynthese von Alkaloiden stimulieren, wie am Beispiel von Nicotin (Baldwin 1999) und den Glycoalkaloiden gezeigt worden ist (Percival *et al.* 1994). Die Verwundung von Kartoffelkeimen führte zu keiner Erhöhung der Calysteginakkumulation (vgl. Kap. C 1.2.2.4). Die Calysteginbiosynthese wird nicht durch den Stressfaktor Verletzung induziert.

*D. stramonium* Pflanzen, die von Pflanzenfressern beschädigt wurden, haben keinen erhöhten Gehalt an Hyoscyamin und Scopolamin (Shonle und Bergelson 2000). Allerdings läßt sich mit der Produktbestimmung keine Aussage treffen, inwieweit die Expression einzelner Gene der Biosynthese induziert ist. In Tabak z. B. wurde nach mechanischer Verwundung (Entfernung der Sproßspitze) eine erhöhte

*PMT*-Transkriptmenge innerhalb von 2 h festgestellt (Riechers und Timko 1999). Die *PMT*-Expression ist durch exogenes MeJa in Tabakzellkulturen und in *Nicotiana sylvestris* Wurzeln induzierbar (Imanishi *et al.* 1998; Shoji *et al.* 2000). Die erhöhte Transkriptakkumulation der Ornithindecaboxylase (*ODC*) durch MeJa innerhalb einer Stunde wurde in Tabakzellkulturen beobachtet (Imanishi *et al.* 1998).

Die Untersuchung der Promotorregionen der *TRI* und *TRII* aus *H. niger* ergaben bisher keinen Hinweis auf Jasmonat-induzierte Motive, sogenannte G-Boxen (Nakajima *et al.* 1999c).

Zur Induzierbarkeit der Tropanalkaloidakkumulation durch MeJa gibt es unterschiedliche Daten. In Wurzelkulturen von *D. stramonium* wird die Hyoscyaminakkumulation angeregt (Zabetakis *et al.* 1999), während es bei *H. muticus* erst nach Applikation hoher Konzentrationen von MeJa zu einer geringfügigen Erhöhung kommt (Biondi *et al.* 2000). Kürzlich wurde gefunden, daß die Calysteginbiosynthese in Wurzelkulturen von *A. belladonna* nicht durch Methyljasmonat und Abscisinsäure induzierbar ist (Rothe *et al.* 2001).

Ein erhöhtes Zuckerangebot (Saccharose und Maltose) hingegen stimuliert die Calysteginakkumulation in Wurzelkulturen von *A. belladonna*, der Hyoscyamingehalt ändert sich hingegen nur wenig (Rothe *et al.* 2001). Die Biosynthese der klassischen Tropanalkaloide und der Calystegine verläuft bis zur Reduktion des Tropinons, gleich. Deshalb ist die Regulation des metabolischen Flusses der Calysteginbiosynthese bei erhöhtem Zuckerangebot an dieser Stelle der Biosynthese bzw. im späteren Verlauf wahrscheinlich (vgl. Abb. A-2). Ein Einfluß von unterschiedlichen Zuckerangebot auf die Transkription der *TR*'s und andere bekannter Enzyme der Calysteginbiosynthese könnte durch *Northern Blot* Analysen geklärt werden. Eine gesteigerte Tropanalkaloidakkumulation durch ein erhöhtes Angebot an Glucose wurde in Wurzelkulturen von *Datura candida* x *Datura aurea* gezeigt (Nussbaumer *et al.* 1998).

Die Bedeutung des Zuckers in Signalwegen ist umfangreich und komplex. Zucker als Signalstoff ist in der Literatur z. B. bei der Anthocyanbiosynthese beschrieben worden (Vitrac *et al.* 2000). Unter anderem wird eine Verbindung des Zuckerangebotes zum Stickstoffstoffwechsel der Pflanzen diskutiert (Sheen *et al.* 1999). So kann Zucker Gene aktivieren, die für Nitrattransporter, Nitratreduktasen, Asparaginsynthasen und Glutaminsynthasen codieren (Jang und Sheen 1994; Koch 1996; Lam *et al.* 1998; Lejay *et al.* 1999; Sheen *et al.* 1999). Bei der Signalübertragung können Hexokinasen eine wichtige Rolle spielen, die durch Bindung an Zuckermoleküle ihrer Konformation ändert (Sheen *et al.* 1999). Der Einfluß von Zucker auf die Calysteginbiosynthese ist bis jetzt noch nicht untersucht worden.

Calystegine akkumulieren in *S. tuberosum* und in anderen Solanaceen hauptsächlich in meristematischen Geweben (vgl. Kap. C 1.2) (Dräger *et al.* 1995c). Die Akkumulation der Calystegine und ihre Eigenschaft als Glycosidasehemmstoffe läßt eine fraßhemmende Wirkung der Calystegine vermuten. Bekannte Glycosidasehemmstoffe, wie Castanospermin, welches u. a. aus *Castanospermum australe*

isoliert wurden ist (Asano 2000a), sind potente Hemmer von  $\beta$ -Glucosidasen in Insekten (Fellows *et al.* 1992). Um das Potential der Calystegine als Fraßschutz zu testen, wäre es notwendig, die Calystegine auch auf ihre Hemmbarkeit gegen Glycosidasen von Insekten zu untersuchen.

Musmeci und Mitarbeiter (1999) fanden die Abnahme des Larvengewichtes von *Phthorimaea operculella* (Zeller) auf Calystegin A<sub>3</sub>-behandelten Kartoffelkalluskulturen nach 9 Tagen. Weiterhin wurde ein Einfluß auf das Larvengewicht und die Überlebensrate von *Leptinotarsa decemlineata* (Say) beobachtet. Die Erhöhung des Calystegin B<sub>2</sub>-Gehaltes um 0,5 % auf Kartoffelblättern verringerte die Überlebensrate um 50 % (Fonzo *et al.* 1999). Die in den Studien verwendeten Calystegine wurden als Einzelsubstanzen appliziert, denkbar wäre aber auch ein synergistischer Effekt im Gemisch und/oder zusammen mit den Glycoalkaloiden. Weitere Versuche sind nötig, um die Fraßschutzhemmung der Calystegine gegenüber Pflanzenschädlingen zu bestätigen. *In vitro* Kartoffelpflanzen var. Désirée, die keine Calystegine in den Blättern enthalten, wären ein geeignetes Untersuchungsobjekt. Es könnten definierte Mengen Calystegine als Einzelsubstanzen oder im Gemisch auf die Blätter appliziert werden. Interessant wären hier Untersuchungen mit weniger spezialisierten Pflanzenschädlingen.

Calystegine spielen eine Rolle als Mediatoren bei der Ernährung von bestimmten Bodenbakterien. Tepfer und Mitarbeiter (1988a; 1988b) zeigten, daß nur bestimmte Bakterien, wie *Rhizobium meliloti*, in der Lage sind, Calystegine zu katabolisieren (Cac<sup>+</sup>). Sie können Calystegine als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwenden. In der Umgebung von calysteginakkumulierenden Pflanzen wurden vermehrt Cac<sup>+</sup> Bakterien gefunden, die ein Plasmid tragen, welches die Katabolisierung ermöglicht (Goldmann *et al.* 1996; Guntli *et al.* 1999).

### D 1.3 Calystegine und ihre Bedeutung für den Menschen

Es wurde diskutiert, daß bei Vergiftung durch Kartoffelkeime bei der Nahrungsaufnahme der Gehalt an Glycoalkaloiden zu gering gewesen sei, um Vergiftungssymptome auszulösen (Baker *et al.* 1991). Es wäre daher möglich, daß Calystegine als potente Glycosidasehemmstoffe (vgl. Kap. A 2.3) Vergiftungserscheinungen hervorrufen oder verstärken können. Vergiftungen bei Tieren mit *Convolvulus arvensis* wurden mit Tropin- und Pseudotropinderivaten in Zusammenhang gebracht (Schultheiss *et al.* 1995; Todd *et al.* 1995). Zwei Ipomoea-Spezies, die den Mannosidaseinhibitor Swainsonin und Calystegine enthalten, sind für neurologische Störungen bei Weidevieh verantwortlich (de Balogh *et al.* 1999; Molyneux *et al.* 1995). Dabei wurde vermutet, das Calystegine an der Ausprägung der Symptome beteiligt sein könnten (Molyneux *et al.* 1995). Über die Toxizität der Calystegine ist noch nichts bekannt, da sie für die Testung noch nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Für Swainsonin, einen anderen Glycosidasehemmstoff, wurde ein Maximalgehalt von 0,001 % in Futternahrung

diskutiert, um Intoxikationen zu vermeiden (Molyneux *et al.* 1994). Auch bei einem niedrigen Gehalt im Futter akkumuliert Swainsonin innerhalb der Lysosomen, wo es aufgrund des niedrigen pH-Wertes protoniert wird und sich anreichert (Chotai *et al.* 1983).

Beispiele für die Anwendung von Glycosidasehemmstoffen sind in der Einleitung beschrieben (vgl. Kap A 1.2).

## D 1.4 Tropinon-Fütterungsversuche – Hinweise auf die Biosynthese

Fütterungsversuche von Tropinon an Kartoffelkeime ergaben erste Hinweise zum Vorkommen von tropinonreduzierenden Enzymen in *S. tuberosum* (vgl. Kap. C 2). Die Bildung von Tropin und Pseudotropin erfolgt durch zwei spezifische Enzyme, eine Isomerisierung von Tropin zu Pseudotropin oder umgekehrt erfolgt nicht (Nakajima *et al.* 1993a; Portsteffen *et al.* 1994). Es konnten deutliche Unterschiede in der Tropin- und Pseudotropinakkumulation nach Tropinonfütterung festgestellt werden. Da die tropin- und die pseudotropinbildenden TR's um dasselbe Substrat, das Tropinon, konkurrieren, könnte die verringerte Tropinakkumulation mit der unterschiedlichen Substratspezifität der Enzyme zum Tropinon zusammenhängen. Auf der anderen Seite könnte aber auch eine unterschiedliche Verfügbarkeit des Substrates in den verschiedenen Zellschichten verantwortlich sein. Die *Immunoblot* Analyse der TRI und TRII in den Wurzeln von *H. niger* zeigte eine unterschiedliche, zellspezifische Akkumulation der TR-Proteine (Nakajima und Hashimoto 1999d). TRI-Protein wurde in der Endodermis und der Cortex, bevorzugt in den äußeren Zellschichten, detektiert. Das TRII-Protein akkumuliert im Perizykel, der Endodermis und den inneren Schichten der Cortex (Nakajima und Hashimoto 1999d). Frühe Enzyme der Biosynthese z. B. die PMT sind ebenfalls im Perizykel lokalisiert (Suzuki *et al.* 1999a). Die PMT katalysiert die Bildung von *N*-Methylputrescin, eine Vorstufe des Tropinons. Die Lokalisation dieser Tropinonvorstufen und des TRII-Enzyms im selben Gewebe (Perizykel), weist auf eine schnelle Substratumsetzung des Tropinons durch das TRII-Enzym hin. Für die Bildung des Tropins durch die TRI müsste Tropinon oder seine Vorstufen in die Endodermis oder in die Cortex transportiert werden.

*S. tuberosum* akkumuliert keine klassischen Tropanalkaloide. Deshalb war das Auffinden von Tropin als Metabolit nach Fütterungsversuchen in Keimen und in *in vitro* Kartoffelknollen überraschend (vgl. Kap. C 2). Da Tropin in *S. tuberosum* nicht in Hyoscyamin oder Scopolamin umgewandelt wird, wäre es denkbar, daß eine Umwandlung zu Tropinestern erfolgt. In der Literatur sind 3-Tigloyltropin in *A. belladonna* und in verschiedenen *Datura*- und *Hyoscyamus*-Spezies beschrieben wurden (Doerk *et al.* 1994; Dräger *et al.* 1992; Robins *et al.* 1994b). Die Tropan-3a-ol Ester Consiculin und Consabatin sind in *Convolvulus*-Spezies bekannt (Jenett *et al.* 1998).

Transgene *N. tabacum*-Pflanzen, die TRI aus *H. niger* exprimieren, akkumulieren Tropin und 3-Acetyltropin nach Tropinonfütterung (Rocha-Salavarieta 2000). In der Literatur wird beschrieben, daß die Veresterung durch spezifische Enzyme gesteuert wird (Rabot *et al.* 1995; Robins *et al.* 1991c). Die Spezifität zum alkoholischen Akzeptor ist groß, aber die Acetyltransferasen verestern entweder Tropin (TAT) oder Pseudotropin (PAT) mit unterschiedlichen aliphatischen Estern.

Mit der beschriebenen neutralen Extraktionsmethode (vgl. Kap. B 2.1.4) konnten keine Tropinester in den gefütterten Geweben von *S. tuberosum* nachgewiesen werden. Der Versuch sollte mit einer größeren Biomasse wiederholt werden, um sicherzustellen, daß auch geringe Mengen an Estern erfaßt werden können. Sinnvoll erscheint auch ein Fütterungsversuch mit Tropin, um der Pflanze ausreichend Substrat zur Verfügung zu stellen. Bei der Extraktion sollte die in der Literatur beschriebene saure Extraktion verwendet werden, da es wenig Information zur Stabilität der Ester bei neutraler Extraktion gibt (Doerk *et al.* 1994). Die fehlende Akkumulation von Tropinestern in Kartoffelkeimen korreliert aber mit den Ergebnissen von Robins und Mitarbeiter (1994b) und unveröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe in *S. tuberosum*-Wurzelkulturen.

Weitere Hinweise, daß sich die Calysteginbiosynthese von dem Tropanalkaloidstoffwechsel ableitet, beschreiben Dräger und Mitarbeiter (1994b) sowie Rothe und Mitarbeiter (2001). Bei Blockade des TRI-Enzyms mit 8-Thiabicyclo[3,2,1]octan-3on (TBON) wurde in *A. belladonna* Wurzelkulturen eine erhöhte Akkumulation von Calysteginen beobachtet.

Weiterhin konnte sowohl der Einbau von <sup>14</sup>C-markiertem Putrescin als auch der von N<sup>15</sup>-markiertem Tropinon in die Calystegine gezeigt werden (Dräger *et al.* 1994b; Goldmann *et al.* 1990).

Die Hypothese zur Calysteginbiosynthese wird durch die Amplifikation eines *PMT*-homologen cDNA-Fragmentes aus Kartoffel gestützt (Stenzel, unveröffentlicht). Dieses Fragment zeigt die für *PMT*-Sequenzen typischen Motive.

Über die der Tropinonreduktion nachfolgenden Biosyntheseschritte auf dem Weg zu den Calysteginen ist nichts bekannt. Nötig sind die Demethylierung des Stickstoffs und Hydroxylierungen am Tropangerüst. Welche Reaktion zuerst abläuft und welche Enzyme daran beteiligt sind, ist unklar. N-Demethylierungen könnten durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen katalysiert werden. N-Demethylasen, die pflanzeigene Stoffe umsetzen, sind allerdings kaum bekannt. Zwar wurde die N-Demethylierung des Nicotins mit einem P-450 Enzym in Verbindung gebracht, die Ergebnisse waren aber nicht eindeutig (Chelvarajan *et al.* 1993). Für die N-Demethylierung von Xenobiotica in Pflanzen gibt es eine Reihe von Beispielen (Durst und Benveniste 1993). Ein P450 Enzym aus Avocado ist in der Lage, verschiedene N-Methylaniline zu demethylieren (Cottrell *et al.* 1990; Dohn und Krieger 1984). Hydroxylierungen sind durch oxoglutaratabhängige Dioxygenasen möglich. Beispiele sind die Hyoscyamin-6-Hydroxylase aus *H. niger* oder die Desacetoxyvindolin-4-hydroxylase aus *Catharantus roseus* (Hashimoto und Yamada

1986; Vazquez-Flota *et al.* 1997). Für die Hydroxylierung kommen aber auch Cytochrom P-450 Enzyme in Frage. Tabersonin-16-Hydroxylase aus *Catharantus roseus* ist ein solches Beispiel (Schroeder *et al.* 1999).

## D 2 Die Tropinonreduktasen

### D 2.1 Tropinonreduktasen in Kartoffel

TR-Enzymaktivitäten wurden in verschiedenen *Hyoscyamus*-, *Atropa*- und *Duboisiaspezies* sowie in Wurzelkulturen von *C. sepium* gemessen (Hashimoto *et al.* 1992). In *S. tuberosum* zeigten die Fütterungsversuche eine Umsetzung zu Tropin und Pseudotropin. In Proteinpräparationen aus Kartoffelkeimen konnte aber keine TR-Enzymaktivität im photometrischen Assay gemessen werden. Das lag an der Instabilität der TR-Enzyme in den Proteinpräparationen. Kartoffeln akkumulieren phenolische Verbindungen (Friedman 1997b). Solche Polyphenole, Derivate der Chlorogensäure, können Proteine inaktivieren.

Mit modernen Methoden der Molekularbiologie konnten die cDNA-Sequenzen der *TRI* und *TRII* aus Kartoffel kloniert werden (vgl. Kap. C 3 und C 4). Die Isolierung der *TRII*-cDNA mittels RACE-PCR bereitete durch die geringe Amplifikation bei der 3'RACE-PCR Schwierigkeiten und erforderte einen zusätzlichen PCR-Schritt. Eine abschließende RT-PCR wurde nötig, um cDNA-Sequenzen zu isolieren, die den gesamten codierenden Bereich umfaßten (vgl. Kap. C 3.2). Um Informationen über die nichttranslatierten Bereiche der *TRII*-cDNA-Sequenzen in *S. tuberosum* zu gewinnen und Unterschiede innerhalb verschiedener Varietäten zu erkennen, wurde eine cDNA-Bank gescreent. Die Unterschiede der *TRII*-cDNA-Sequenzen zwischen den Kartoffelsorten Liu und Désirée sind gering, eine Sequenz ist identisch.

Warum beim Screening nach der *TRI*-Sequenz aus der Kartoffelaugen-cDNA-Bank nur die *StTRI*-homologe Sequenz isoliert wurde, ist unklar. Möglicherweise waren die beiden anderen *TRI*-Klone *StTRI-SE* und *StTRI-SS* in der Bank unterrepräsentiert. Über den Entwicklungszustand der Kartoffelaugen, die für die Herstellung der cDNA-Bank verwendet worden waren, lagen keine Informationen vor. Auf das erneute Screenen einer repräsentativen Phagenmenge wurde verzichtet. Angenommen wurde, daß die Expression der *TRI* in den Keimaugen zu diesem Zeitpunkt zu gering war. Eine unterschiedliche Expression in den Augen, abhängig vom Entwicklungszustand, bestätigte sich später in *Northern Blot* Analysen. Die anschließende RT-PCR, bei der zwei *TRI*-Klone isoliert wurden, mußte mit cDNA aus Keimen, 10 Monate nach der Ernte, durchgeführt werden. In diesem Gewebe sind *TRI*-Transkripte stark exprimiert (vgl. Kap. C 9.2).

Die *TRI*- und *TRII*-Sequenzen aus *S. tuberosum* sind auf Nukleotidebene 72 %, auf Aminosäureebene 66 % zueinander homolog. Innerhalb jeder *TR*-Gruppe ist die Homologie noch höher (86-95 % auf AS-Ebene, vgl. Tab. D-1). Betrachtet man den Homologievergleich der *TRI* und *TRII*-Sequenzen aus *S. tuberosum* zu den *TR*-

Sequenzen aus *D. stramonium* und *H. niger*, verstärkt sich die Hypothese, daß sich die TR-Enzyme von einem gemeinsamen Vorfahren ableiten (Nakajima *et al.* 1999a).

Enzym	Nukleotide		Aminosäuren	
	<i>StTRII</i>	<i>StTRI</i>	<i>StTRII</i>	<i>StTRI</i>
<i>D. stramonium TRII</i>	91 %	71 %	92 %	63 %
<i>H. niger TRII</i>	92 %	72 %	95 %	65 %
<i>D. stramonium TRI</i>	73 %	90 %	67 %	90 %
<i>H. niger TRI</i>	72 %	87 %	64 %	86 %

**Tab. D-1:** Homologievergleich der *StTRI* und *StTRII*-Sequenzen zu bekannten *TR*-Sequenzen aus *D. stramonium* und *H. niger*. Die Homologien wurden mit den FASTA-Programm erstellt (Pearson und Lipman 1988).

## D 2.2 Die TR gehören zur Familie der SDR-Enzyme

Die Aminosäuresequenzen der TRI und TRII aus Kartoffel wurden auf ihre Zugehörigkeit zur SDR-Enzymfamilie geprüft. Typische Motive finden sich in beiden AS-Sequenzen (vgl. Abb. C-12 und C-13). Das katalytische Tyrosin in der Sequenz YxxxK (x steht für jede beliebige AS) findet sich in der Position 160 (TRII) bzw. 162 (TRI). Durch Röntgenstrukturanalyse und gerichtete Mutagenese zeigte sich dieses Motiv als essentiell (Chen *et al.* 1993; Persson *et al.* 1995; Tanaka *et al.* 1996a; Nakanishi *et al.* 1997a). Tyr ist das katalytische Zentrum, während Lys durch Wasserstoffbrückenbindung mit den beiden Hydroxylgruppen der Nicotinamid-Ribose eine wichtige Rolle bei der Co-Substratbindung spielt. Außerdem stabilisiert es die Position der OH-Gruppe im Tyrosin. Tanaka und Mitarbeiter (1996a; 1996b) beziehen bei der Betrachtung der Röntgenkristallstruktur der 7 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase die Ser<sup>147</sup> (TRII) bzw. Ser<sup>149</sup> (TRI) äquivalente Position in die Katalysebetrachtung ein. Ser bildet eine Wasserstoffbrücke zum Substrat und stabilisiert gleichzeitig den katalytischen Übergang.

Arg<sup>20</sup> und Arg<sup>42</sup> (TRII) bzw. Lys<sup>22</sup> und Arg<sup>44</sup> (TRI) verleihen den Enzymen durch Interaktion mit der Phosphatgruppe eine höhere Bindungsaffinität zum NADPH (Nakanishi *et al.* 1996). Threonin äquivalent zur Position 41 (TRII) bzw. 43 (TRI) der Kartoffelsequenzen ist für die NADPH-Bindung notwendig. Gerichtete Mutagenese, bei der Thr gegen Asp ausgetauscht wurde, veränderte die Co-Substratspezifität eines SDR-Enzyms vom NADPH zum NADH (Nakanishi *et al.* 1997b). In allen isolierten TRI und TRII-Sequenzen aus Kartoffel ist diese Position mit Ser besetzt, welches ähnliche Eigenschaften wie Thr hat und somit die Bindung von NADPH als Co-Substrat ermöglicht. Das in den SDR-Enzymen konservierte GxxxGxG Motiv findet sich auch in den TR-Enzymen von *S. tuberosum* an den Positionen 17 bzw. 19 (TRII und TRI) (Jörnvall *et al.* 1995).

Für die TRI aus *D. stramonium* beschreiben Nakajima und Mitarbeiter (1998) eine Anlagerung der Carboxylamidgruppe des Nicotinamidringes an das Stickstoff- und Sauerstoffatom der Ile<sup>195</sup> äquivalenten Position und an den Sauerstoff der Seitenkette



des Thr<sup>197</sup> (vgl. Abb. C-13). Bei der TRII-Röntgenkristallstruktur aus *D. stramonium* wurde zusätzlich zu den Kartoffel-TRII-äquivalenten Positionen Ile<sup>193</sup> und Thr<sup>195</sup> die Position Ser<sup>196</sup> als polarer Interaktionspartner zum Pyrophosphatteil des NADP<sup>+</sup> genannt (Yamashita *et al.* 1999). In der StTRII ist dieses Thr<sup>195</sup> durch Ser ausgetauscht (vgl. Abb. C-12).

Die Konservierung der Strukturmerkmale weist darauf hin, daß der in der SDR-Enzymfamilie verbreitete Reaktionsmechanismus auch für die TR-Enzyme aus *S. tuberosum* gilt. Der konzertierte Übergang des pro-S-Hydrid-Ions vom NADPH und eines Protons vom Tyr<sup>160</sup> bzw. Tyr<sup>162</sup> (TRII bzw. TRI) erfolgt zum 3-Kohlenstoff- und Carbonyl-Sauerstoff-Atom des Tropinons (Nakajima *et al.* 1998).

### D 2.3 Die Stereospezifität der Tropinonreduktasen I und II

Bedingt durch die ausgeprägte Konservierung der AS des katalytischen Zentrums und der Co-Substratbindungsstelle muß die stereospezifische Reduktion des Tropinons durch die Orientierung des Substrates im Enzym-Substratkomplex gegeben sein (Nakajima *et al.* 1998). Für die Bindung des Substrates sind hauptsächlich 11 AS verantwortlich, die größtenteils im C-Terminus der AS-Sequenz liegen. Durch Röntgenkristallstrukturanalyse und gerichtete Mutagenese der TRI und TRII-Enzyme aus *D. stramonium* wurden 5 AS bezeichnet, die bei der Reduktion mitwirken (Nakajima *et al.* 1998; 1999b; Yamashita *et al.* 1998; 1999). Allerdings wurde eine Änderung der Stereospezifität durch Einzelmutation nur in der 157 bzw. 159 äquivalenten Position erreicht (Nakajima *et al.* 1999b). Mehrfachmutationen änderten die Spezifität fast zu 100 %. Im folgenden werden diese Aminosäuren im Hinblick auf die Kartoffel-TR-Enzyme diskutiert.

Bei der TRI werden vor allem hydrophobe Wechselwirkungen als Bindungseigenschaften postuliert (Nakajima *et al.* 1999b). Durch Mutagenese der DsTRI konnte gezeigt werden, daß bei der zur StTRI äquivalenten Position His<sup>103</sup> nicht die positive Ladung für die Stereospezifität entscheidend ist (Nakajima *et al.* 1999b).

Leu<sup>159</sup> ersetzt in allen Kartoffel-TRI-Sequenzen Val (vgl. Abb. C-13). Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften sollte es ebensolche hydrophoben Interaktionen mit der C6-C7 Brücke des Tropinons eingehen. Ala<sup>151</sup>, Ile<sup>114</sup> und Phe<sup>117</sup> sind bei den StTRI-SE und StTRI-SS-Klonen, der DsTRI und HnTRI konserviert. Das TRI-homologe Protein (StTRI-homologe) besitzt an Position 117 ein Ile, welches ähnliche hydrophobe Eigenschaften wie Phe hat. Aus den genannten Positionen läßt sich nicht klären, warum das TRI-homologe Enzym Tropinon als Substrat nicht umsetzt. Andere ähnliche Substrate wurden vom TRI-homologen Enzym akzeptiert (vgl. Kap. C 7.2).

Betrachtet man die anderen AS, für die eine Tropinoninteraktion postuliert wurde, sind Ile<sup>150</sup>, Leu<sup>156</sup> und Val<sup>194</sup> wiederum konserviert. Der Austausch von Ala<sup>101</sup> gegen Valin sollte keinen großen Einfluß auf die Bindung des Tropinons ausüben (vgl. Abb. C-13). Val/Ile<sup>200</sup> ist variabel innerhalb aller bekannter TRI-Enzyme. Gln<sup>199</sup>, das vor

allem polare Eigenschaften hat und Wasserstoffbrücken ausbilden kann, ist gegen Leu ausgetauscht, das mit seiner Kohlenwasserstoffseitenkette hydrophobe Bindungen ausüben kann. Es wäre interessant, ob mit der gerichteten Mutagenese Q199L eine tropinbildende TRI-Aktivität des TRI-homologen Enzyms zu erreichen wäre.

Bei allen bekannten TRII-Sequenzen sind die für die Tropinonbindung postulierten AS konserviert. Dies sind die zur StTRII äquivalenten Positionen Val<sup>99</sup>, Tyr<sup>101</sup>, Val/Ile<sup>148</sup>, Ser<sup>149</sup>, Val/Leu<sup>154</sup>, Glu<sup>157</sup>, Val<sup>192</sup>, Met/Leu<sup>197</sup>, Val<sup>198</sup> sowie Leu<sup>211</sup> und Leu<sup>214</sup> (vgl. Abb. C-12). Die negativ geladene Glu<sup>157</sup> übt eine elektrostatische Interaktion auf das positive Stickstoffatom des Tropinons aus (Yamashita *et al.* 1999). Diese AS ist für die Orientierung des Tropinons richtungweisend und macht damit eine Reduktion zur 3-e OH-Gruppe möglich. Die Orientierung des Tropinons im TRII-Enzym-Substratkomplex ist genau entgegengesetzt zum TRI-Enzym. Die Unterschiede zwischen TRI und TRII in den AS mit hydrophoben Interaktionen dienen zur Feineinstellung der Substratlage.

## D 2.4 Die evolutionäre Entwicklung der Tropinonreduktasen

Verschiedene Theorien über die Abstammung der *TR*-Gene werden immer wieder diskutiert. So wird vermutet, daß sich der Prototyp der *TR*-Gene aufgrund der hohen Homologie zu anderen Enzymen der SDR-Familie und durch Konservierung wichtiger AS innerhalb dieser Familie (vgl. Kap. D 2.2) aus einem *SDR*-Gen entwickelt haben muß (Nakajima *et al.* 1993a; 1999a). In der Vergangenheit wurde durch Datenbankvergleich mit *TR*-homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* und *Lycopersicon esculentum* gezeigt, daß zwischen den Sequenzen eine hohe Übereinstimmung über die gesamte Proteinsequenz besteht (Nakajima *et al.* 1999a). In den AS, die für die Substratbindung verantwortlich sind, bestanden aber Unterschiede. Es wurde postuliert, daß diese Enzyme andere Substrate umsetzen (Nakajima *et al.* 1999a).

Ein neuer Homologievergleich von *StTR*-cDNA-Sequenzen in Datenbanken brachte eine erstaunliche Anzahl von homologen Sequenzen hervor. Auf AS-Ebene lag die Homologie bei 40 – 60 % u. a. zu 18 Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, verschiedenen EST-Sequenzen aus *Lycopersicon esculentum*, deren größtmöglicher ORF in AS übersetzt wurde, zu einer Sequenz aus *Thermotoga maritima* sowie zu einer humanen Sequenz. 9 *Arabidopsis*-Sequenzen haben in der zur TRII-äquivalenten Position 41 ein Asp, was auf eine höhere Bindungsaffinität zum NADH hindeutet (vgl. Kap. D 2.2). In Abb. D-1 ist der Aminosäurevergleich aller bekannten *TR*-Sequenzen mit ausgewählten homologen Sequenzen abgebildet. An den 11 AS-Positionen (rot gekennzeichnet), die in die Tropinonbindung involviert sind, wird nochmals die Spezifität zwischen TRI und TRII deutlich. Im Fall der DsP29x *TR*-homologen Sequenz zeigen sich Unterschiede an diesen Positionen, so daß klar wird, daß dieses Enzym ein anderes Substrat umsetzt (Nakajima *et al.* 1999a).

	▼ *▼▼	**	
DsTRI	ME-ESKVSMMNCNNEGRWSLKGTTALVTGGSKGIGYAVEELAGLGRVYTCRSNEKELD	59	
HnTRI	MAGESEVYINGNNGGIRWSLKGTTALVTGGSKGIGYAVEELAGLGRVYTCRSNEKELQ	60	
StTRI-SE	MA-----ELREKWSLKGTTALVTGGSKGIGYAVEELANFGARVYTCRSNENELQ	50	
StTRI-homolog	MA-----ELREKWLKGGTTALVTGGSKGIGYAVEELANFGARVYTCRSNENELQ	50	
DsP29x	MAG----REIGGGDRRWSLRGTMALVTGGTRGIGYAVEELANFGAEVYTCRSRQNDLD	55	
DsTRII	-----MAGRWNLEGTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCRSRQKELN	47	
HnTRII	-----MAGRWNLEGTALVTGGSRGIGYGIVEELANLGASVYTCRSRQKELD	47	
StTRII-D3	-----MAAGRWNLEGTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCRSRQKELN	48	
Le-BE451326	-----RWNLEGTALVTGGSKGIGYGIVEELASHGASVYTCRSRQKELN	44	
At-Q9LHTO	-----METDKRWSLAKGTALVTGGTRGIGRAVVEELAKFGAKVHTCSRQEEELN	49	
Hs-Q9H3N5	-----MASSGMTRRDPLANKVALVTASTDGIGFAIARRLAQDGAHVVSRRKQONVD	52	
Tm-Q9WYS2	-----MKEVFDLGRVALVTGGSRGLGFGIAQGLAEAGCSVVVASRNLEEAS	47	
DsTRI	ECLEIWRK-GLNVEGSVCDLLSRTERDKLMQTVAHVFDGKLNILVNNAGVVIHKEAKDF	118	
HnTRI	QCLDIWRNE-GLQVEGSVCDLLSRTERDKLMQTVADLFNGKLNILVNNAGVVIHKEAKDF	119	
StTRI-SE	ECLDIWRKK-GLKVEGSVCDLLSRTEREKLMTVEDVFDGKLNILVNNAGVAIHKEAKDF	109	
StTRI-homolog	ECLDIWRKK-GLKVEGSVCDLLSRTEREKLMTIEDVFDGKLNILVNNAGVAIHKEAKDF	109	
DsP29x	ECLEKWRK-GFKVSGPVCVSSISQRQTLMESVTSSFNGLKLNILINNAGTTIPKEATNF	114	
DsTRII	DCLTQWRSK-GFKVEASVCDLSSRSERQELMNTVANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY	106	
HnTRII	ECLTQWRSK-GFNVEASVCDLSSRSEREEMKTVSNHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY	106	
StTRII-D3	ECLTQWRSK-GFKVEASVCDLSSRSEREFIKVNANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY	107	
Le-BE451326	ECLIQWRNK-GFKVEASVCDLSSRSEREFIKTVANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY	103	
At-Q9LHTO	ACLNDWKAN-GLVVSGSVCDASVRDQREKLIQEASSAFSGKLNILINNVTNRKPTVEY	108	
Hs-Q9H3N5	QAVATLQGE-GLSVTGTVCHVGKAEDRERLVATAVKLHGGIDILVSNAAVNPFFGSIMDV	111	
Tm-Q9WYS2	EAAQKLTEKYGVETMAFRCDVSNYEEVKLLLEAVKEKF-GKLDTVVNAAGINRRHPAEEF	106	
	▼ ▼ + +		
DsTRI	TEKDYNIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFLSSIAG-FSALPSVSLYSASKGA	177	
HnTRI	TKEDYDIVLGTNFEAAYHLCQLAYPFLKASQNGNVIFLSSIAG-FSALPSVSLYSASKAA	178	
StTRI-SE	TKEDYNIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFVSSIAG-FSALPSLSLYSASKGA	168	
StTRI-homolog	TKEDYNIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFVSSIAG-FSALPSLSLYSASKGA	168	
DsP29x	TAEDYSIIMGTNFEASYNLCQLAHPPLKASGNASIVFNSSAAG-VIAVPLSSIIYAASKGA	173	
DsTRII	TVEDYSLIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASERGNVVFISSVSG-ALAVPYEAVYGATKGA	165	
HnTRII	TMEDYSHIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASERGNVVFISSISG-ASALPYEAVYGATKGA	165	
StTRII-D3	TMEDYSLIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASQRGNVVFISSISG-ASALPYEAVYGATKGA	166	
Le-BE451326	TMEDYSLIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASHRGNVVFISSISG-ASALPYEAVYGATKGA	162	
At-Q9LHTO	SSEYAKIMSTNLESAFHLSQIAHPLKASGVGSIVFISVAG-LVHLSSGSIYGATKGA	167	
Hs-Q9H3N5	TEEVWDKTLDINVKAPALMTKAVVPEMEKRGGSVVIVSSIAA-FSPSPGFSPYVNSKTA	170	
Tm-Q9WYS2	PLDEFQRQVIEVNLFGTYVYVCREAFSLLRESDNPSIINIGSLTVEEVTMPNISAYAAASKGG	166	
	▼ * **		
DsTRI	INQMTKSLACEWAKDNIRVNSVAPGVILTPLVETAIKKNPHQKEEIDNFIIVKTPMGRAGK	237	
HnTRI	INQITKNLACEWAKDNIRVNSVAPGVILTPLIETAIKKNPHQKEEIDNFIIVKTPMGRAGK	238	
StTRI-SE	INQMTKNLACEWAKDNIRVNSVAPAVILTPLVETAIKKNPQKKEEIDSFVVKTPMGRAGK	228	
StTRI-homolog	INQMTKNLACEWAKDNIRVNSVAPAVILTPQIETAIKKNPQKKEEIDSIIVKTPMGRAGK	228	
DsP29x	INQVTKSLACEWAKDSIRVNAVAPWIIINTPIIEAACQ-VPSQKKNIESLIGRAPMKRAGE	232	
DsTRII	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVGPVVIATSLVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALHRMGE	224	
HnTRII	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVGPVVIATSMVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALHRMGE	224	
StTRII-D3	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVAPGVVIASSMVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALHRMGE	225	
Le-BE451326	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVAPGVVIASSMVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALH---	217	
At-Q9LHTO	LNQLTRNLACEWASDNIRTNVAPWYIKTSLVETLLE---KKEFVEAVVSRTPMGRVGE	223	
Hs-Q9H3N5	LLGLTKTLAIELAPRNIRVNCLAPLIKTSFSRMLWM---DKEKESMKETLRIRRLGE	226	
Tm-Q9WYS2	VASLTKALAKEWGRYGRVNVVAPGVWYRTKMTAEVFS---DPEKLDYMLKRIPLGRGTG	222	
DsTRI	PQEVSAIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF----- 273		
HnTRI	PNEVSAIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF----- 274		
StTRI-SE	PEEASAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF----- 264		
StTRI-homolog	PEEVSAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGAF----- 264		
DsP29x	PSEVSSLVTYLCLPTASYITGQIICVDGGYTVNGFI----- 268		
DsTRII	PKELAAMVAFVLCFPAASYVTGQIIYVDGGGLMANCGF----- 260		
HnTRII	PKELAAMVAFVLCFPAASYVTGQIIYVDGGFMANGGF----- 260		
StTRII-D3	PKELAAMVAFVLCFPAASYVTGQIIYVDGGFMANGGF----- 261		
Le-BE451326	-----		
At-Q9LHTO	PEEVSSLVAFVLCFPASSYITGQVLSVDGGFTVNGFSYAMKP 264		
Hs-Q9H3N5	PEDCAGIVSFLCSEDASYITGETVVVGGGTPSRL----- 260		
Tm-Q9WYS2	PEDLKGVAVFLASEEAKYVTGQIIFVDGGWTAN----- 255		

Abb. D-1: Aminosäurevergleich der TR aus *D. stramonium* (DsTRI und DSTRII), *H. niger* (HnTRI und HnTRII) und *S. tuberosum* (StTRI-SE und StTRII-D3) mit homologen

Sequenzen aus *D. stramonium* (DsP29x), *S. tuberosum* (StTRI-homolog), *L. esculentum* (Le-BE451326, Datenbankeintrag: BE451326), *A. thaliana* [At-Q9LHT0, Datenbankeintrag: AP002030, (Tabata *et al.* 2000)], aus *Homo sapiens* (Hs-Q9H3N5, Datenbankeintrag: AB045131, Retinoldehydrogenase-Reduktase, unveröffentlicht) und der Sequenz aus *Thermotoga maritima* [Tm-Q9WYS2, Datenbankeintrag: AE001722, (Nelson *et al.* 1999)]. Der AS-Vergleich wurde mit CLUSTALW erstellt (Thompson *et al.* 1994). Grau unterlegte AS sind in mindestens 9 Sequenzen konserviert; rot gekennzeichnete AS markieren die Substratbindungsstelle der TR; \* markiert AS, die in der SDR-Enzymfamilie konserviert sind, \* markiert die Bindung des Co-Substrates; + das katalytische Zentrum der TR.

Besonders interessant ist der EST-Klon aus Tomate. Die höchste AS-Homologie besteht zur TRII aus Kartoffel, sie beträgt 96 %. Er zeigt die typischen Strukturmerkmale einer TRII. Unterschiede bestehen nur in AS, die nicht in die Bindung des Substrates und Co-Substrates involviert sind. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieses putative TRII-Enzym aus Tomate Tropinon zu Pseudotropin, der Vorstufe der Calystegine, umsetzen kann. Dies korreliert mit der Detektion von Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> in Tomate (Asano *et al.* 1997a). Der EST-Klon wurde aus Tomatenwurzeln gewonnen, ein typisches Gewebe, in dem *TRII* exprimiert wird (vgl. Kap. C 9.1).

Die Sequenzen aus *Arabidopsis*, dem Menschen und aus dem Bakterium *Thermotoga maritima* sind in den 11 AS-Positionen der Tropinonbindung variabel (vgl. Abb. D-1). Sie benutzen wahrscheinlich andere Substrate in verschiedenen Stoffwechselwegen. Für das menschliche Enzym wurde eine All-Trans-Retinalreduktaseaktivität festgehalten (Datenbankeintrag).

Bisher wurde angenommen, daß die Verbreitung der TRII-Enzyme größer als die der TRI-Enzyme ist (Nakajima *et al.* 1999b). Durch die Klonierung einer *TRI*-cDNA aus Kartoffel, einer Pflanze, die keine klassischen Tropanalkaloide enthält, wird die Fragestellung nach der Verbreitung der TR erneut diskutiert.

Bei den *Convolvulaceen*, einer phylogenetisch nahen Familie, gibt es erste Hinweise, daß auch in *C. sepium* zwei TR-Enzyme vorhanden sind (Scholl, persönliche Mitteilung).

Interessant wäre, ob die Calysteginbiosynthese in den *Moraceen* über dieselbe enzymatische Reduktion des Tropinons verläuft. Die Isolierung von Tropinonreduktasen aus dieser phylogenetisch entfernten Familie würde weiteren Aufschluß über die Evolution geben. Aus der genetischen Sequenz der *TR*'s könnten sich Hinweise auf eine mono- oder polyphylogenetische Abstammung ergeben.

Nicht immer haben sich katalytisch verwandte Enzyme aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt, wie das Beispiel der D- und L-Lactatdehydrogenase aus *Lactobacillus plantarum* beweist (Taguchi und Ohta 1991). Sie besitzen keine signifikanten Homologien.

Nakajima und Mitarbeiter (1999b) stellten die interessante Hypothese auf, daß das „Ur-TR-Enzym“ eine zufällige Stereospezifität hatte. Da die Umsetzung zur 3 $\alpha$ - oder 3 $\epsilon$ -OH Gruppe in den *tr/II*-Mischmutanten stark von der Substratkonzentration

abhängig, hat das „Ur-TR-Enzym“ möglicherweise nur ein Stereoisomer produziert. Erst durch weitere Mutationen könnte im Verlauf der Evolution eine selektive Umwandlung des Tropinons entstanden sein.

Wie sich die Spezifität von Enzymen durch Mutation an wenigen AS ändern kann, beweist das Beispiel der humanen Lipoxygenasen. Der Austausch einer für die Substratbindung konservierten AS ändert die Oxidationseigenschaften der 15-Lipoxygenase. Wie die 12-Lipoxygenase bildet das mutierte Enzym zu 50 % 12-Hydroperoxide (Sloane *et al.* 1991).

Weitere Beispiele für die selektive Entwicklung von Enzymen im Laufe der Evolution sind die PMT und die Homospermidin-Synthase. Die Spermidin-Synthase gilt als evolutionärer Vorläufer der PMT (Hashimoto *et al.* 1998a). Die Homospermidinsynthase (HSS) entwickelte sich im Laufe der Evolution aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS), einem Enzym des Primärstoffwechsels. Es ist interessant, daß die DHS beide Enzymeigenschaften trägt, während die HSS nur die Aminobutylgruppe des Spermidins auf Putrescin übertragen kann (Ober und Hartmann 1999a; 1999b; 2000).

## D 2.5 Katalytische Eigenschaften der TR

Daten über die katalytischen Eigenschaften sind für die TRI aus *D. stramonium*, *H. niger* und einem *Brugmansia candida x aurea* Hybrid verfügbar (Hashimoto *et al.* 1992; Koelen und Gross 1982; Boswell *et al.* 1999a; Portsteffen *et al.* 1994). Für die ausführliche Charakterisierung der TRI aus *S. tuberosum* war im Rahmen dieser Arbeit keine Zeit mehr. Es wurde die Reduktion des Tropinons zum Tropin nachgewiesen. Interessant ist, ob sich die StTRI ähnlich zu den beiden bekannten TRI-Enzymen verhält. Ein geringes pH-Optimum deutet sich bereits an, da es bei der Verwendung eines Puffers mit pH 8,0 bei der Reinigung mit His-Tag-Fusion zum Aktivitätsverlust kam. Portsteffen und Mitarbeiter (1994) geben ein enges pH-Optimum bei pH 6,4 für die DsTRI an; bei der HnTRI liegt es bei pH 6,1.

Eine Abschätzung der  $K_m$ -Werte für das TRI-Enzym aus *S. tuberosum* ist anhand der AS-Sequenz schwierig, da bereits ein Austausch von AS mit ähnlichen Eigenschaften zu großen Änderungen des  $K_m$ -Wertes führen kann. Für eine menschliche Alkoholdehydrogenase wurde beschrieben, daß schon ein einfacher Austausch einer AS, die in die Substratbindung involviert ist, zu einer Erhöhung des  $K_m$ -Wertes um 280 % führte. Im Beispiel wurden Val und Ala durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht (Crosas *et al.* 2000).

Ds und HnTRI können die Rückreaktion, die Oxidation, katalysieren. Bei der StTRI steht dieser Nachweis noch aus.

Für die TRII sind neben den in dieser Arbeit erstellten katalytischen Daten für *S. tuberosum* Daten der TRII-Enzyme aus *D. stramonium*, *H. niger*, *A. belladonna* und aus dem *Brugmansia candida x aurea* Hybrid bekannt (vgl. Kap. C 7.1) (Dräger *et al.*

1988, Dräger und Schaal 1994a; Hashimoto *et al.* 1992; Portsteffen *et al.* 1994; Boswell *et al.* 1999a). Das pH-Optimum zeigt für die Ds-, Hn-, Ab- und St-TRII-Enzyme eine ausgeprägte Breite von pH 4,5 - 8,5. Allerdings weicht das Optimum der StTRII mit pH 5,0 von dem der anderen TRII-Enzyme ab, die ihr Optimum bei einem pH-Wert von 6,2 haben. Für die BcaTRII liegen keine Daten vor.

Neben der Umsetzung des Tropinons werden Piperidin-4-on Derivate mit einer hohen Aktivität umgesetzt. Nortropinon wird von der TRII aus Kartoffel und Ds umgesetzt (für die anderen Enzyme gibt es keine Daten). Die relative Aktivität beträgt aber nur ca. 20 %. Die Effizienz der Umwandlung ist beim Tropinon besser (vgl. Kap. C 7.1.2). Die Frage nach dem natürlichen Substrat kann nicht endgültig beantwortet werden.

*In vitro* und *in vivo* Versuche zeigten die Umsetzung von *N*-Alkylnortropinon-derivaten durch TRI und TRII von Ds und Bca (Boswell *et al.* 1999a; 1999b). Das unterstreicht die beträchtliche Flexibilität der TR-Aktivitäten in bezug auf die Substrat-analoga.

Die  $K_m$ -Werte der verschiedenen TRII variieren bei pH 6,4 im Bereich von 33  $\mu\text{M}$  (StTRII) bis 160  $\mu\text{M}$  (BcaTRII).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die TRII neben ihrer hohen Sequenz-homologie auch über gemeinsame katalytische Eigenschaften verfügen. Diese unterscheiden sich aber grundlegend von den TRI-Enzymen. Eine Ausnahme zeigt das TRII-Enzym des *Brugmansia candida x aurea* Hybriden, welches Chinuclidin-3-on mit einer 46%igen relativen Aktivität umsetzt. Alle anderen TRII-Enzyme sind nicht in der Lage, Chinuclidin-3-on umzusetzen.

## D 2.6 Die TR-Gene im Kartoffelgenom

Die genomische Organisation der TR-Sequenzen ist in den einzelnen Spezies unterschiedlich. In der *Southern Blot* Analyse ergab sich für *H. niger* jeweils eine *single-copy* Gencodierung. Dies wurde bei der Isolierung genomischer TRI und TRII-Klone bestätigt (Nakajima *et al.* 1993a). In Kartoffel und *A. belladonna* werden die TR's von einem *low-copy* bzw. *multi-copy* Gen codiert (vgl. Kap. C 8 und persönliche Mitteilung Nakajima).

Es ist wahrscheinlich, daß es sich in der Kartoffel innerhalb der jeweiligen TR-Gruppe nicht um unterschiedliche Gene, sondern um Allele handelt. Kartoffel ist eine heterozygote autotetraploide Art, die Gene von mindestens 11 verschiedenen *Solanum*-Arten trägt (Ross 1986; Soltis und Solitis 1993). Mehrfacher Allelismus ist nicht ungewöhnlich. In der Vergangenheit wurden verschiedene Allele für eine Reihe von Genen in *S. tuberosum* gefunden, wie z. B. ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (Ballicora *et al.* 1998), UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (Sowokinos *et al.* 1997) und Stärke-Synthase (Abel *et al.* 1996; Marshall *et al.* 1996). Es wurde gezeigt, daß z. B. die Allele des stärkekorngelundenen Stärke-Synthasegenes (*GBSS1*) eine

Homologie von bis zu 99 % innerhalb der codierenden Sequenz aufwiesen, hingegen in ihren Promotorsequenzen eine höhere Abweichung vorlag (van de Wal *et al.* 2001). Die Zusammensetzung der *GBSSI*-Allele im Genom verschiedener *S. tuberosum* Varietäten hat einen Einfluß auf die *GBSSI*-Enzymaktivität (van de Wal *et al.* 2001). Die *StTR*-Sequenzen haben innerhalb der *TRI*- bzw. *TRII*-Gruppe eine ähnlich hohe Homologie in den codierenden Sequenzen. Über die Unterschiede innerhalb der Promotorsequenzen der *StTR*-Gene ist noch nichts bekannt, so daß ein unterschiedlicher Einfluß der einzelnen *StTR*-Allele auf die Bildung der TR-Enzyme nicht ausgeschlossen werden kann.

## D 2.7 Expression und Lokalisation der Tropinonreduktasen

Es wurde nachgewiesen, daß die Biosynthese der Tropanalkaloide in den Wurzeln stattfindet und die Produkte, die klassischen Tropanalkaloide, im Xylem in die Blätter transportiert werden (Wink und Roberts 1998).

Für die *PMT* und die *H6H* wurde eine Expression vorwiegend in den Wurzeln verschiedener Spezies beschrieben (Hashimoto *et al.* 1991; Hibi *et al.* 1994; Matsuda *et al.* 1991; Suzuki *et al.* 1999a). Suzuki und Mitarbeiter (1999b) konnten zusätzlich eine Lokalisation der *H6H*-mRNA und des Proteins in den Antheren von *A. belladonna* Pflanzen zeigen.

Die TR-Proteine wurde bisher nur in *H. niger*-Pflanzen im *Western Blot* untersucht (Nakajima und Hashimoto 1999d). *TRI*- und *TRII*-Proteine wurden in hoher Konzentration hauptsächlich in den Seitenwurzeln detektiert. Schwache Signale in jungen oberirdischen Geweben wurden mit der unvollständigen Separation der Wurzeln von den Pflanzen erklärt (Nakajima und Hashimoto 1999d).

In unseren Analysen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die *TR*-Gene auch in oberirdischen Geweben exprimiert sind (vgl. Kap. C 9). In den Geweben der Kartoffel akkumulieren oberirdisch *TR*-Transkripte vorwiegend in den Blüten (*TRI*), unteren Blättern (*TRI* und *TRII*) und in jungen Blättern (*TRII*). In den Blättern gibt es funktionell kein Gewebe, welches der Wurzelendodermis und dem Perizykel äquivalent ist. Das sind die Zellschichten, in denen die TR-Proteine von Nakajima lokalisiert wurden. Die Lokalisation der TR-mRNA's und der Proteine in den Zellschichten der unterschiedlichen Gewebe muß noch geklärt werden. Methoden der Wahl sind *in-situ Hybridisierung* (mRNA-Lokalisation) bzw. eine immunohistochemische Detektion der Proteine mit Antikörpern. Die Erstellung eines Reinigungsschemas sowohl für die *TRI* als auch für die *TRII* als His-Tag-Fusionsproteine schafft die Grundlage für die Gewinnung ausreichender Proteinmengen zur Gewinnung von Antikörpern (vgl. Kap. C 6.2 und C 6.3).

Auf die unterschiedliche zellspezifische Verteilung innerhalb der Wurzel wurde bereits in Kap. D 1.4 hingewiesen. Interessant dabei ist, daß sich TR-Proteine zum Teil in anderen Zellschichten befinden als es für die *PMT*, ein frühes Enzym der Tropanalkaloidsynthese, beschrieben wurde. Diese ist in *A. belladonna* aus-

schließlich im Perizykel lokalisiert (Suzuki *et al.* 1999a). Die H6H, ein spätes Enzym, wurde im Perizykel lokalisiert (Hashimoto *et al.* 1991). Die Lokalisationsunterschiede lassen auf einen Transport von Intermediaten zwischen den Zellschichten schließen (Nakajima und Hashimoto 1999d). Eine unterschiedliche Kompartimentierung wurde auch für den Indolalkaloidmetabolismus von *C. roseus* herausgefunden (St Pierre *et al.* 1999; Vazquez-Flota *et al.* 2000).

Die *TRI*-Transkriptakkumulation in Kartoffeln unterscheidet sich wesentlich von der der *TRII*. Neben starken Transkriptsignalen beider mRNA's in den Wurzeln und einigen Knollensprossstadien wurde die *TRI*-mRNA vor allem in den Stolonen, der Blüte und dem Gefäßring in der Knolle exprimiert. Die fehlende Expression der *TRI* in den meisten Blattgeweben erklärt auch die fehlende Bildung von Tropin nach Tropinonfütterungsversuchen in den Pflanzen. Pseudotropin hingegen wurde gebildet. Trotz der schwachen *TRII*-mRNA-Expression in den Blättern ist *TRII*-Aktivität messbar vorhanden.

Ohne detailliertes Wissen über weitere Enzyme, die in die Calysteginbiosynthese involviert sind, ist es schwierig, eine Korrelation zwischen *TR*-Transkriptakkumulation und einer möglichen metabolischen Regulation aufzuzeigen. Zwischen der Calysteginakkumulation und *TRII*-mRNA Expression gibt es Unterschiede. Die *TRII*-Transkriptakkumulation in der späten Keimentwicklung deutet auf einen Transport von Intermediaten bzw. Calysteginen aus der Rinde der Kartoffelknolle in die Augen hin. In den Kartoffelaugen wurde beim Keimstart kein *TRII*-Transkript detektiert; hier findet man aber die höchsten Calysteginkonzentrationen.

Kartoffelwurzelkulturen akkumulieren *TRII*-Transkripte und sind in der Lage, Tropinon in Pseudotropin umzuwandeln. Sie bilden aber keine Calystegine. Das weist darauf hin, daß die Biosynthese in einem der folgenden Schritte unterbrochen ist. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die folgenden Biosyntheseschritte nicht in den Wurzeln stattfinden und statt dessen die Calystegine in intakten Pflanzen in die Wurzeln transportiert werden. Ein Transport von Tropanalkaloiden von den Blättern in die Wurzel wurde durch Fütterung mit <sup>14</sup>C-markierten Atropin in *D. myoporoides* nachgewiesen (Kitamura *et al.* 1991).

Die Reduktion des Tropinons durch die *TRII* ist in der Biosynthese der Calystegine nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da Tropinon in keinem der untersuchten Gewebe akkumuliert.



### D 3 Ausblick

Durch die genaue Bestimmung der Calysteginakkumulation einerseits und der Klonierung der *TRI* und der *TRII* aus Kartoffel andererseits sind gute Voraussetzungen geschaffen worden, um weitere Untersuchungen zur Biosynthese der Calystegine und ihrer Regulation anzuschließen. Dabei könnten folgende Fragen im Mittelpunkt stehen:

- Biosynthese und Bedeutung der Calystegine für die Pflanze

Die Herstellung von transgenen Pflanzen mit den entsprechenden *TR-sense* und *antisense* Konstrukten kann den abschließenden Nachweis erbringen, ob die Calysteginbiosynthese über die Reduktion des Tropinons verläuft. *TRI-sense* Pflanzen könnten darüber hinaus Hinweise über den metabolischen Fluß im des Tropins in der Kartoffel geben.

Auch für die Frage nach der Bedeutung der Calystegine für die Pflanze sind transgene Pflanzen geeignete Modelle, z. B. für Versuche zur Fraßhemmung oder zur Erforschung ihrer Auswirkung auf die Keimung.

Ausgehend vom Vorkommen beider *TR*'s in Kartoffel scheint es sinnvoll, nach anderen möglichen Enzymen der Calysteginbiosynthese in der Kartoffel zu suchen (vgl. Kap. D 1.4). Dabei sollten frühe (PMT) wie auch spätere (Hydroxylierung und Demethylierung) Schritte der Biosynthese einbezogen werden.

- Ort der Biosynthese und ihre Regulation

Zur Herstellung von Antikörpern ist es nötig, die Reinigungsschemata auf größere Proteinmengen zu übertragen. Mit spezifischen Antikörpern gegen die *TRI/II*-Proteine könnte die Lokalisation der Proteine in den Zellschichten der Pflanzengewebe der Kartoffel untersucht werden. Interessant ist die Verteilung in oberirdischen Geweben.

Mit dem gereinigten *TRI*-Protein ist die Bestimmung der kinetischen Parameter möglich, Unterschiede und Ähnlichkeiten zu den bekannten *TRI*-Enzymen könnten deutlich gemacht werden.

Wichtig ist die Frage der Regulation der *TR*-Proteinbiosynthese. Dazu sollten die Strukturen der *TR*-Gene, die Promotorsequenz und Exon/Intronstruktur aufgeklärt werden. In vielen Pflanzengenomen befinden sich sogenannte regulative Elemente, G-Boxen, die im Pflanzenreich ubiquitär vorkommen (Menkens *et al.* 1995). Enhancer-Sequenzen können die Transkription stimulieren. Callis und Mitarbeiter (1987) beschreiben anhand einer Alkoholdehydrogenase aus Mais, daß pflanzliche Introns die Genexpression stimulieren können. Durch die genomischen Sequenzen würde man außerdem weitere Informationen über Unterschiede zwischen den einzelnen Allelen erhalten.

Ausgehend von den Hinweisen über die Induktion der Calysteginbiosynthese durch Zucker und der Beeinflussung der Transkription einzelner Enzyme der

Calysteginbiosynthese durch MeJa und Verwundung sollte in *Northern Blot* Analysen ein möglicher Zusammenhang mit der TR-mRNA-Transkriptakkumulation untersucht werden.

▪ Bedeutung der Calystegine für den Menschen

Unter Berücksichtigung des Wissens über die höchste Calysteginakkumulation in Kartoffelgeweben ist es möglich, Calystegine aus diesen Geweben (Kartoffelkeime) zu isolieren. Dies ist Voraussetzung für die Testung z. B. gegen maligne Zellen.

Das ist auch die Grundlage für die Abschätzung der Toxizität neben den in Kartoffel vorkommenden Glycoalkaloiden.

## E Zusammenfassung

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide mit einer einzigartigen Aminoketalfunktion am Kohlenstoffbrückenatom. Aufgrund ihrer biologischen Aktivität als Glycosidasehemmstoffe sind sie von besonderem Interesse. Die Biosynthese der Calystegine leitet sich in den Pflanzenspezies, die klassische Tropanalkaloide enthalten, vom Tropanalkaloidstoffwechsel ab.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein Beitrag zur Untersuchung der Biosynthese der Calystegine und ihrer Verteilung in *S. tuberosum* erbracht werden. Es wurde gezeigt, daß auch in Pflanzen, die keine klassischen Tropanalkaloide akkumulieren, Enzyme der Tropanalkaloidbiosynthese vorhanden sind.

Im folgenden sind die Ergebnisse zusammengefaßt:

- Eine Akkumulation von Calysteginen in Kartoffeln findet sortenspezifisch und in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium statt. Calystegine akkumulieren in der Kartoffelknolle und in unterirdischen Geweben. Den höchsten Gehalt findet man in Keimaugen beim Keimstart. Er beträgt mehr als 0,44 % bezogen auf die Frischmasse. In oberirdischen Geweben akkumulieren weniger als 1/30 dieser Mengen. Kartoffelkeime, die ebenfalls große Mengen an Calysteginen speichern, sind ein ideales Material, um Calystegine in ausreichender Quantität zu isolieren. Die Bildung von Calysteginen läßt sich nicht durch Lichteinfluß und Verletzung induzieren.
- Mit der Reduktion von Tropinon zu Tropin bzw. Pseudotropin in *in vivo* Fütterungsversuchen in Kartoffel sowohl eine TRI- als auch eine TRII-Aktivität nachgewiesen werden. Die Bildung von Tropin war überraschend, da in Kartoffel keine klassischen Tropanalkaloide akkumulieren.
- Degenerierte Primer wurden von den bekannten *TR*-Sequenzen abgeleitet und mittels RT-PCR *TR*-homologe Fragmente amplifiziert. Diese bildeten die Grundlage, um mit RACE-PCR und dem Screenen von cDNA-Banken putative *TRI*- und *TRII*-cDNA-Sequenzen zu isolieren und sequenzieren. Dabei wurden aus zwei Kartoffelsorten 6 *TRII*-cDNA-Sequenzen isoliert, deren AS-Sequenz sich nur in wenigen AS unterscheidet. Eine cDNA aus den unterschiedlichen Sorten war identisch. Es wurden weiterhin drei putative *TRI*-cDNA-Sequenzen isoliert.
- *TRI*- und *TRII*-cDNA-Sequenzen zeigen die typischen Sequenzmotive der kurzketigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). Zu den bekannten *TR*-Sequenzen derselben Gruppe sind sie auf AS-Ebene mehr als 86 % homolog. Die *TR*-cDNA-Sequenzen, die für die aktiven TRI- bzw. TRII-Proteine codieren, sind in den für die Tropinonbindung postulierten AS konserviert.
- Drei *TRII*-cDNA-Sequenzen wurden ausgewählt, um die heterologe Expression

des TRII-Proteins in *E. coli* durchzuführen. Alle drei Proteine zeigten eine pseudotropinbildende Tropinonreduktaseaktivität. Von den zwei heterolog exprimierten putativen TRI-Proteinen zeigte das TRI-SE-Protein eine tropinbildende Tropinonreduktaseaktivität. Das zweite TRI-homologe Protein setzte kein Tropinon um. Mit anderen Substratanaloga wurden Enzymaktivitäten gemessen.

- Angereinigtes TRII-Protein verhielt sich in Hinsicht auf pH-Optimum und katalytische Parameter ähnlich den bekannten TRII-Enzymen der tropanalkaloidbildenden Spezies.
- TRI und TRII wurden als His-Tag-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert. Reinigungsschemata wurden entworfen, um Proteine für die Antikörperproduktion zu gewinnen.
- *TRI* und *TRII* liegen im Kartoffelgenom als *low-copy* bzw. *multi-copy* Gen vor. Es wird angenommen, daß es sich nicht um unterschiedliche Gene sondern um Allele handelt.
- Northern Blot Analysen zeigten eine unterschiedliche Verteilung der TRI- und der TRII-mRNA's. Erstmals konnte die Expression eines Genes eines in die Tropanalkaloidbiosynthese involvierten Enzyms in den Blättern gezeigt werden. Es wurden weiterhin Unterschiede zwischen der *TRII*-Transkript- und Calysteginakkumulation beobachtet. Diese lassen auf einen Transport von Calysteginen oder Intermediaten zwischen einzelnen Geweben der Kartoffelknolle schließen.

## F Literaturverzeichnis

- Abel, G. J., Springer, F., Willmitzer, L., Kossmann, J. 1996. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **10**, 981-991.
- Alabadi, D., Carbonell, J. 1998. Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol.* **118**, 323-328.
- Alabadi, D., Carbonell, J. 1999. Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant Mol. Biol.* **39**, 933-943.
- Ansarin, M., Woolley, J. G. 1993. The obligatory role of phenyllactate in biosynthesis of tropic acid. *Phytochemistry* **32**, 1183-1187.
- Ansarin, M., Woolley, J. G. 1994. The rearrangement of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid. *Phytochemistry* **35**, 935-939.
- Arnone, S., Fonzo, V., Furlan, L., Musmeci, S., Nash, R., Schilde-Rentschler, L., Turnock, J., Watson, A., Sonnino, A. 1999. Investigation on 8 *S. tuberosum* (+) *S. pinnatisectum* potato somatic hybrids in relation to resistance to potato pests and some allelochemical content. 14<sup>th</sup> Triennial Conference of the European Association for potato research. [Abstracts of Conference Papers, Posters and Demonstrations], 122-123.
- Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H., Matsui, K. 1994a. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* **259**, 243-255.
- Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H., Matsui, K. 1994b. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.* **253**, 235-245.
- Asano, N., Kato, A., Oseki, K., Kizu, H., Matsui, K. 1995. Calystegins on *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae): Structure determination and their glycosidase inhibitory activities. *Eur. J. of Biochem.* **229**, 369-376.
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J. 1996a. Calystegine B-4, a novel trehalase inhibitor from *Scopolia japonica*. *Carbohydr. Res.* **293**, 195-204.
- Asano, N., Kato, A., Yokoyama, Y., Miyauchi, M., Yamamoto, M., Kizu, H., Matsui, K. 1996b. Calystegin N-1, a novel nortropane alkaloid with a bridgehead amino group from *Hyoscyamus niger*. Structure determination and glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* **284**, 169-178.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Hackett, L., Topping, J., Winchester, B. 1997a. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology* **7**, 1085-1088.

- Asano, N., Kato, A., Miyauchi, M., Kizu, H., Tomimori, T., Matsui, K., Nash, R. J., Molyneux, R. J. 1997b. Specific alpha-galactosidase inhibitors, *N*-methylcalystegines: Structure/activity relationships of calystegines from *Lycium chinense*. *Eur. J. of Biochem.* **248**, 296-303.
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Griffiths, R. C., Jones, M. G., Watson, A. A., Nash, R. J. 1997c. Enzymatic synthesis of the glycosides of calystegines B-1 and B-2 and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* **304**, 173-178.
- Asano, N. 2000a. Alkaloidal sugar mimetics: biological activities and therapeutic applications. *J. Enzyme Inhib.* **15**, 215-234.
- Asano, N., Ishii, S., Kizu, H., Ikeda, K., Yasuda, K., Kato, A., Martin, O. R., Fan, J. Q. 2000b. In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1- deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *Eur. J. Biochem* **267**, 4179-4186.
- Asano, N., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Fleet, G. W. 2000c. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutical application. *Tetrahedron Asymmetry* **11**, 1645-1680.
- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoke, D., Drager, B., Watson, A. A., Nash, R. J. 2001. Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry* **57**, 721-726.
- Baerheim Svendsen, A., Verporte, R. 1983. Chromatography of Alkaloids, Part A: Thin Layer Chromatography. Elsevier Scientific Publications.
- Baker, D. C., Keeler, R. F., Gaffield, W. 1991. Toxicology of Plant and Fungal Compounds, Dekker, New York.
- Baldwin, I. T. 1999. Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity. *J. Chem. Ecol.* **25**, 3-30.
- Ballicora, M. A., Fu, Y., Nesbitt, N. M., Preiss, J. 1998. ADP-Glucose pyrophosphorylase from potato tubers. Site-directed mutagenesis studies of the regulatory sites. *Plant Physiol.* **118**, 265-274.
- Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J.-L., Christen, P. 2001. Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry.* **58**, 455-462.
- Belbahri, L., Chevalier, L., Bensaddek, L., Gillet, F., Fliniaux, M. A., Boerjan, W., Inze, D., Thomas, D., Thomasset, B. 2000. Different expression of an S-adenosylmethionine synthetase gene in transgenic tobacco callus modifies alkaloid biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 11-20.
- Bergmeyer, H. U. 1985. Absorption coefficients of NAD(P)H. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol. XII, Kapitel 4, pp. 489, VCH-Verlag, Weinheim.
- Biondi, S., Fornale, S., Oksman-Caldentey, K. M., Eeva, M., Agostani, S., Bagni, N. 2000. Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and

- conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell Reports* **19**, 691-697.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. Ch., Frutiger, S., Hochstrasser, D. F. 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023-1031.
- Blossey, E. C., Buzikiewicz, H., Ohashi, M., Fodor, G., Djerassi, C. 1964. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. *Tetrahedron* **20**, 585-595.
- Boswell, H. D., Dräger, B., McLauchlan, W. R., Portsteffen, A., Robins, D. J., Robins, R. J., Walton, N. J. 1999a. Specificities of the enzymes of *N*-alkyltropane biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*. *Phytochemistry* **52**, 871-878.
- Boswell, H. D., Dräger, B., Eagles, J., McClintock, C., Parr, A., Portsteffen, A., Robins, D. J., Robins, R. J., Walton, N. J., Wong, C. 1999b. Metabolism of *N*-alkyldiamines and *N*-alkylnortropinones by transformed root cultures of *Nicotiana* and *Brugmansia*. *Phytochemistry* **52**, 855-869.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**, 103-125.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandstädter, J., Rossbach, C., Theres, K. 1993. The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta* **192**, 69-74.
- Burtin, D. Michael, A. J. 1997. Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants. *Biochem. J.* **325**, 331-337.
- Büttner, F. 1998. Isolierung von Calysteginen aus *Calystegia sepium* und *Solanum tuberosum* mittels Ionenaustauschern und Untersuchungen ihrer Wechselwirkungen mit aus *C. sepium* isolierten Pilzen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 13-16.
- Callis, J., Fromm, M., Walbot, V. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**, 1183-1200.
- Chelvarajan, R. L., Fannin, F. F., Bush, L. P. 1993. Study of nicotine demethylation in *Nicotiana otophora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 858-862.
- Chen, E. J. Seeburg, P. S. 1985. Supercoiling sequencing: A simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Chen, Z., Jiang, J. C., Lin, Z. G., Lee, W. R., Baker, M. E., Chang, S. H. 1993. Site-specific mutagenesis of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis. *Biochemistry* **32**, 3342-3346.

- Chotai, K., Jennings, C., Winchester, B., Dorling, P. R. 1983. The uptake of swainsonine, a specific inhibitor of  $\alpha$ -D-mannosidase, into normal human fibroblasts in culture. *J. Cell. Biochem.* **21**, 107-117.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2110.
- Cottrell, S., Hartman, G. C., Lewis, D. F., Parke, D. V. 1990. Studies on the cytochrome P-450 of avocado (*Persea [corrected] americana*) mesocarp microsomal fraction. *Xenobiotica* **20**, 711-726.
- Creelman, R. A., Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355-381.
- Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martinez, S. E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Pares, X., Farres, J. 2000. Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenases: a conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol oxidation. *J. Biol. Chem.* **275**, 25180-25187.
- Daali, Y., Bekkouche, K., Cherkaoui, K., Christen, P., Veuthey, J.-L. 2000. Use of borate complexation for the separation of non-UV-absorbing calystegines by capillary electrophoresis. *J. Chromatography A* **903**, 237-244
- Daniell, H., Streatfield, S. J., Wycoff, K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* **6**, 219-226.
- De-Eknamkul, W., Zenk, M. H. 1992. Purification and properties of 1,2-dehydroreticuline reductase from *Papaver somniferum* seedlings. *Phytochemistry* **31**, 813-821.
- de Balogh, K. K., Dimande, A. P., van der Lugt, J. J., Molyneux, R. J., Naude, T. W., Welman, W. G. 1999. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**, 266-73.
- De Luca, V., St-Pierre, B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **5**, 168-173.
- Dennis, J. W., Koch, K., Yousefi, S., VanderElst, I. 1990. Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine. *Cancer Res.* **50**, 1867-1872.
- Doerk, S. K., Witte, L., Alfermann, A. W. 1994. Tropane alkaloid patterns in plants and hairy roots of *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry* **35**, 107-110.
- Dohn, D. R., Krieger, R. I. 1984. *N*-demethylation of *p*-chloro-*N*-methylaniline catalyzed by subcellular fractions from the avocado pear (*Persea americana*). *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 416-423.
- Donaldson, M. J., Broby, H., Adlard, M. W., Bucke, C. 1990. High pressure liquid chromatography and pulsed amperometric detection of castanospermine and related alkaloids. *Phytochem. Anal.* **1**, 18-21.



- Dräger, B., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1988. Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2663-2668.
- Dräger, B., Portsteffen, A., Schaal, A., McCabe, P. H., Peerless, A. C. J., Robins, R. J. 1992. Levels of tropinone-reductase activities influence the spectrum of tropane esters found in transformed root cultures of *Datura stramonium* L. *Planta* **188**, 581-586.
- Dräger, B. and Schaal, A. 1994a. Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures. *Phytochemistry* **35**, 1441-1447.
- Dräger, B., Funck, C., Hoehler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A., Schmidt, R. 1994b. Calystegines as a new group tropane alkaloids in *Solanaceae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **38**, 235-240.
- Dräger, B. 1995a. Identification and quantification of calystegines, polyhydroxyl nortropane alkaloids. *Phytochem. Anal.* **6**, 31-37.
- Dräger, B. Tropinonreduktion in Solanaceen - Enzyme und Produkte. 1995b. Habilitation, *Westfälische Wilhelms-Universität, Münster*.
- Dräger, B., Van Almsick, A., Mrachatz, G. 1995c. Distribution of calystegines in several *Solanaceae*. *Planta Med.* **61**, 577-579.
- Ducrot, P. H., Lallemand, J. Y. 1990. Structure of the *Calystegines*: new alkaloids of the nortropane family. *Tetrahedron* **31**, 3879-3882.
- Duran, P. R., O' Hagan, D., Hamilton-John, T. G., Wong, C. W. 2000. Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. *Phytochemistry* **53**, 777-784.
- Durst, F. and Benveniste, I. 1993. Cytochrome P450 in plants. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (J. B. Schenkman and H. Greim, Eds.), pp. 293-310. Springer Verlag.
- Fan, J. Q., Ishii, S., Asano, N., Suzuki, Y. 1999. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* **5**, 112-115.
- Fellows, L. E., Kite, G. C., Nash, R. J., Simmonds, M. S. J., Scofield, A. M. 1992. Distribution and biological activity of alkaloid glycosidase inhibitors from plants. *Proceedings of the phytochemical Society of Europe* **33**, 271-282.
- Ferreira-Jorge, F. S., Duke, S. O., Vaughn, K. C. 1998. Histochemical and immunocytochemical localization of tropane alkaloids in *Erythroxylum coca* var. and *E. novogranatense* var. novogranatense. *Int. J. Plant Sci.* **159**, 492-503.
- Finsterbusch, A., Lindemann, P., Grimm, R., Eckerskorn, C., Luckner, M. 1999. Delta(5)-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. - a multifunctional enzyme in steroid metabolism? *Planta* **209**, 478-486.

- Fischer, P. B., Collin, M., Karlsson, G. B., James, W., Butters, T. D., Davis, S. J., Gordon, S., Dwek, R. A., Platt, F. M. 1995. The alpha-glucosidase inhibitor *N*-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunodeficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. *J. Virol.* **69**, 5791-5797.
- Fonzo, V., Anfora, G., Cristofaro, M., Nash, R., Arnone, S. 1999. Laboratory evaluation of effects of potato polyhydroxylate alkaloids on *Leptonotarsa decemlineata* Say. 14<sup>th</sup> Triennial Conference of the European Association for potato research. [Abstracts of Conference Papers, Posters and Demonstrations], 279-280.
- Ford, Y. Y., Ratcliffe, R. G., Robins, R. J. 1996. In vivo NMR analysis of tropane alkaloid metabolism in transformed root and de-differentiated cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* **43**, 115-120.
- Friedman, M., Mc Donald, G. M. 1997a. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 55-132.
- Friedman, M. 1997b. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 1523-1540.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158.
- Goldmann, A., Milat, M. L., Ducrot, P. H., Lallemand, J. Y., Maille, M., Lepingle, A., Charpin, I., Tepfer, D. 1990. Tropane derivatives from *Calystegia sepium*. *Phytochemistry* **29**, 2125-2128.
- Goldmann, A., Message, B., Tepfer, D., Molyneux, R. J., Duclos, O., Boyer, F. D., Pan, Y. T., Elbein, A. D. 1996. Biological activities of the nortropane alkaloid, calystegine B<sub>2</sub>, and analogs: structure-function relationships. *J. Nat. Prod.* **59**, 1137-42.
- Griffin, W. J., Lin, G. D. 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* **53**, 623-637.
- Griffiths, R. C., Watson, A. A., Kizu, H., Asano, N., Sharp, H. J., Jones, M. G., Wormald, M. R., Fleet, G. W. J., Nash, R. J. 1996. The isolation from *Nicandra physalodes* and identification of the 3-O-beta-D-glucopyranoside of 1 alpha,2 beta,3 alpha,6 alpha-tetrahydroxy-nor-tropane (Calystegine B<sub>1</sub>). *Tetrahedron Letters* **37**, 3207-3208.
- Guntli, D., Heeb, M., Moenne Loccoz, Y., Defago, G. 1999. Contribution of calystegine catabolic plasmid to competitive colonization of the rhizosphere of calystegine-producing plants by *Sinorhizobium meliloti* Rm41. *Molecular Ecology* **8**, 855-863.
- Hakomori, S. 1985. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.* **45**, 2405-2414.
- Hashimoto, T., Yamada, Y. 1986. Hyoscyamine 6-beta-Hydroxylase, a 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase, in Alkaloid-Producing Root Cultures. *Plant Physiol.*

81, 619-625.

- Hashimoto, T., Yamada, Y. 1987. Purification and characterization of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. Hydroxylase and epoxidase activities in the enzyme preparation. *Eur. J. Biochem.* **164**, 277-285.
- Hashimoto, T., Mitani, A., Yamada, Y. 1990. Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. Its function in tropane alkaloid biosynthesis. *Plant Physiol.* **93**, 216-221.
- Hashimoto, T., Hayashi, A., Amano, Y., Kohno, J., Iwanari, H., Usuda, S., Yamada, Y. 1991. Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *J. Biol. Chem.* **266**, 4648-4653.
- Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G., Yamada, Y. 1992. Two Tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol.* **100**, 836-845.
- Hashimoto, T., Matsuda, J., Yamada, Y. 1993. Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 beta-hydroxylase. *FEBS Lett.* **329**, 35-39.
- Hashimoto, T., Yamada, Y. 1994. Alkaloid Biogenesis: Molecular aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 257-285.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K., Yamada, Y. 1998a. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol.* **39**, 73-79.
- Hashimoto, T., Shoji, T., Mihara, T., Oguri, H., Tamaki, K., Suzuki Ken, I., Yamada, Y. 1998b. Intraspecific variability of the tandem repeats in *Nicotiana* putrescine *N*-methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **37**, 25-37.
- Hegnauer, R. 1973. *Solanaceae*. In *Chemotaxonomie der Pflanzen* pp. 403-452. Birkenhäuser Verlag, Basel, Stuttgart.
- Hegnauer, R. 1990. *Solanaceae*. In *Chemotaxonomie der Pflanzen* pp. 567-600. Birkenhäuser Verlag, Basel, Stuttgart.
- Herbers, K., Sonnewald, U. 1999. Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 163-168.
- Heukhofen, J., Dernick, R. 1988. Improved silver stain procedure for fast staining in Phastsystem development unit; staining of sodium dodecylsulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Hibi, N., Fujita, T., Hatano, M., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1992. Putrescine *N*-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*: *N*-Butylamine as a potent inhibitor of the transferase both in vitro and in vivo. *Plant Physiol.* **100**, 826-835.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1994. Gene expression in

- tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* **6**, 723-735.
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y., Nakamura, K. 1998. Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Mol. Biol.* **38**, 1101-1111.
- Jadhav, S. J., Kumar, A., Chavan, J. K. 1991. Glycoalkaloids. In *Potato: Production, Processing, and Products* pp. 203-243. CRC- Press.
- Jang, J. C., Sheen, J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**, 1665-1679.
- Jenett, S. K., Mann, P., Kaloga, M., Siems, K., Jakupovic, J., Witte, L., Eich, E. 1998. Tropane alkaloids with a unique type of acyl moiety from two *Convolvulus* species. *Phytochemistry* **5**, 1449-1451.
- Jörnvall, H., Hoog, J. O., Persson, B. 1999. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.* **445**, 261-264.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003-6013.
- Jouhikainen, K., Lindgren, L., Jokelainen, T., Hiltunen, R., Teeri, T. H., Oksman-Caldentey, K. M. 1999. Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta* **208**, 545-551.
- Kaiser, R., Gottschalk, G. 1972. Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten. Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, BI Wissenschaftsverlag.
- Kanegae, T., Kajiya, H., Amano, Y., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1994. Species-dependent expression of the hyoscyamine 6-beta-hydroxylase gene in the pericycle. *Plant Physiol.* **105**, 483-90.
- Kato, A., Asano, N., Kizu, H., Matsui, K., Suzuki, S., Arisawa, M. 1997. Calystegine alkaloids from *Duboisia leichhardtii*. *Phytochemistry* **45**, 425-429.
- Kitamura, Y., Matuo, N., Takashi, T., Miura, H. 1991. The characteristics of atropine transport in seedlings and regenerated plantlets of *Duboisia myoporoides*. *Plant Physiol.* **137**, 613-618.
- Koch, K. E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 509-540.
- Koelen, K. J., Gross, G. G. 1982. Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med.* **44**, 227-230.
- Kumar, A., Jadhav, S. J., Saluhnke, D. K. 1991. Phytoalexins. In *Potato: Production, Processing and Products* pp. 247-267. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, H. M., Hsieh, M. H., Coruzzi, G. 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 345-353.
- Lampitt, L. H., Bushill, J. H., Rooke, H. S., Jackson, E. M. 1943. Solanine, glycoside of the potato. II. Distribution in the potato plant. *J. Soc. Chem. Ind.* **62**, 48.
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M. 1994. Prinzipien der Biochemie. Spektrum Verlag.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A. 1999. Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub>-uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J.* **18**, 509-519.
- Lounasmaa, M., Tamminen, T. 1993. The Tropane Alkaloids. *The Alkaloids* **44**, 1-114.
- Luckner, M. 1990. Compartmentalization and Channeling. In *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals* (M. Luckner, Ed.), pp. 31-39. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Luo, G., An, G., Wu, R. A. 1994. PCR differential screening method for rapid isolation of clones from a cDNA library. *Biotechniques* **16**, 670-675.
- Marshall, J., Sidebottom, C., Debet, M., Martin, C., Smith, A. M., Edwards, A. 1996. Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell* **8**, 1121-1135.
- Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., Veuthey, J. L. 1998. Capillary electrophoresis for the analysis of tropane alkaloids: pharmaceutical and phytochemical applications. *J Pharm. Biomed. Anal.* **18**, 815-25.
- Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., Veuthey, J. L. 1999. Capillary electrophoresis-diode array detection-electrospray mass spectrometry for the analysis of selected tropane alkaloids in plant extracts. *Electrophoresis* **20**, 3402-3409.
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1991. Molecular cloning of hyoscyamine 6-beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J. Biol. Chem.* **266**, 9460-9464.
- Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, J. W. 2001. Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.* **6**, 212-219.
- Menkens, A. E., Schindler, U., and Cashmore, A. R. 1995. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 506-510.
- Michael, A. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J., Burtin, D. 1996. Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem. J.* **314**, 241-248.

- Molyneux, R. J., Pan, Y. T., Goldmann, A., Tepfer, D. A., Elbein, A. D. 1993. Calystegins, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **304**, 81-88.
- Molyneux, R. J., James, L. F., Ralphs, M. H., Pfister, J. A., Panter, K. E., Nash, R. 1994. Polyhydroxylated glycosidase inhibitors from poisonous plants of global distribution: analysis and identification. In *Plant-Associated Toxins-Agricultural, Phytochemical and Ecological Aspects*. (S. M. Colegate and P. R. Dorling, Eds.), pp. 107-112. CAB International, Wallingford, UK.
- Molyneux, R. J., McKenzie, R. A., BM, O. S., Elbein, A. D. 1995. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea* sp. Q6 [aff. calobra]) and correlation with toxicity. *J. Nat. Prod.* **58**, 878-86.
- Molyneux, R. J., Nash, R. J., Asano, N. 1996. The chemistry and Biological Activity of Calystegines and Related Nortropane alkaloids. *Alkaloids: Chemical and Biological perspectives* **11**, 303-343.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473-479.
- Musmeci, S., Sonnino, A., Fonzo, V., Nash, R., Arnone, S. 1999. In vitro rearing of *Phthorimaea operculella* Zeller on potato callus as bioassays for testing chemical compounds. 14<sup>th</sup> Triennial Conference of the European Association for potato research. [Abstracts of Conference Papers, Posters and Demonstrations], 215-216.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1993a. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 9591-9595.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1993b. cDNA encoding tropinone reductase-II from *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol.* **103**, 1465-1466.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1994. Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites. *J. Biol. Chem.* **269**, 11695-11698.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda Jun, i., and Yamada, Y. 1998. Crystal structures of two tropinone reductases: Different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4876-4881.
- Nakajima, K., Oshita, Y., Yamada, Y., Hashimoto, T. 1999a. Insight into the molecular evolution of two tropinone reductases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1819-1822.
- Nakajima, K., Kato, H., Oda, J., Yamada, Y., Hashimoto, T. 1999b. Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecificities of two tropinone reductases. *J. Biol. Chem.* **274**, 16563-16568.
- Nakajima, K., Oshita, Y., Kaya, M., Yamada, Y., Hashimoto, T. 1999c. Structures and

- expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyoscyamus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1756-1764.
- Nakajima, K., Hashimoto, T. 1999d. Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant Cell Physiol.* **40**, 1099-1107.
- Nakanishi, M., Kakumoto, M., Matsuura, K., Deyashiki, Y., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., Hara, A. 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. *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 257-263.
- Nakanishi, M., Kaibe, H., Matsuura, K., Kakumoto, M., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., Hara, A. 1997a. Site-directed mutagenesis of residues in coenzyme-binding domain and active site of mouse lung carbonyl reductase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 555-561.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., Hara, A. 1997b. Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid. *J. Biol. Chem.* **272**, 2218-2222.
- Nash, R. J., Rothschild, M., Porter, E. A., Watson, A. A., Waigh, R. D., Waterman, P. G. 1993. Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropus*). *Phytochemistry* **34**, 1281-1283.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., Fraser, C. M. 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-329.
- Nickon, A., Fieser, L. F. 1952. Configuration of tropine and pseudotropine. *J. Am. Chem. I. Soc.* **74**, 5566-5570.
- Nussbaumer, P., Kapetanidis, I., Christen, P. 1998. Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea*: Effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports* **17**, 405-409.
- Ober, D., Hartmann, T. 1999a. Deoxyhypusine synthase from tobacco. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **274**, 32040-32047.
- Ober, D., Hartmann, T. 1999b. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14777-14782.
- Ober, D., Hartmann, T. 2000. Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* **44**, 445-450.

- Olden, K., Breton, P., Grzegorzewski, K., Yasuda, Y., Gause, B. L., Oredipe, O. A., Newton, S. A., White, S. L. 1991. The potential importance of swainsonine in therapy for cancers and immunology. *Pharmacol. Ther.* **50**, 285-290.
- Pearson, W. R., Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2444-2448.
- Percival, G. C., Dixon, G., Sword, A. 1994. Glycoalkaloid concentration of potato tubers following continuous illumination. *J. Sci. Food Agric.* **66**, 139-144.
- Percival, G. C. 1999. The Influence of light upon glycoalkaloid and chlorophyll accumulation in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science* **145**, 99-107.
- Persson, B., Krook, M., Jörnvall, H. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* **200**, 537-543.
- Persson, B., Krook, M., Jörnvall, H. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 383-395.
- Portsteffen, A., Dräger, B., Nahrstedt, A. 1994. The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. *Phytochemistry* **37**, 391-400.
- Rabot, S., Peerless, A. C. J., Robins, R. J. 1995. Tigloyl-CoA:pseudotropine acyl transferase - An enzyme of tropane alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **39**, 315-322.
- Rastogi, R., Dulson, J., Rothstein, S. J. 1993. Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* **103**, 829-834.
- Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M., Reinbothe, S. 1992. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *The Plant Journal* **2**, 917-926.
- Riechers, D. E., Timko, M. P. 1999. Structure and expression of the gene family encoding putrescine N-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: New clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Mol. Biol.* **41**, 387-401.
- Robins, R. J., Parr, A. J., Walton, N. J. 1991a. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 2. On the relative contributions of L-arginine and L-ornithine to the formation of the tropane ring. *Planta* **183**, 196-201.
- Robins, R. J., Parr, A. J., Bent, E. G., Rhodes, M.-J. C. 1991b. 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 Med.* **183**, 185-195.
- Robins, R. J., Bachmann, P., Robinson, T., Rhodes, M. J. C., Yamada, Y. 1991c. The formation of 3-alpha- and 3-beta-acetoxytropanes by *Datura stramonium* transformed root cultures involves two acetyl-CoA-dependent



- acyltransferases. *FEBS Lett.* **292**, 293-297.
- Robins, R. J., Woolley, J. G., Ansarin, M., Eagles, J., Goodfellow, B. J. 1994a. Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures. *Planta* **194**, 86-94.
- Robins, R. J., Bachmann, P., Peerless, A. C. J., Rabot, S. 1994b. Esterification reactions in the biosynthesis of tropane alkaloids in transformed root cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **38**, 241-247.
- Robins, R. J., Abraham, T. W., Parr, A. J., Eagles, J., Walton, N. J. 1997. The biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium*: The identity of the intermediates between *N*-methylpyrrolinium salt and tropinone. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 10929-10934.
- Rocha-Salavarrieta, P. J. 2000. Engineering secondary metabolite production in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Hyoscyamus muticus* and Isolation of MYB sequences from *Cataranthus roseus*. *Dissertation, John Innes Centre, Norwich, UK.*
- Ross, H. 1986. Potato breeding: problems and perspectives. *Fortschr. Pflanzenzücht.* **13**.
- Rothe, G., Garske, U., Dräger, B. 2001. Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation. *Plant Science* **160**, 1043-1053.
- Rüttinger, H. H., Dräger, B. 2001. Pulsed amperometric detection of calystegines separated by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **925**, 291-296.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **74**, 5463-5467.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K., Choi, K.-B., Morishige, T., Fujimoto, H., Yamada, Y. 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 367-372.
- Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richer, A., Jenett Siems, K., Dräger, B., Asano, N., Gupta, M. P., Correa, M. D., Eich, E. 1998. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the *Convolvulaceae*. *Phytochemistry* **49**, 1989-1995.
- Schmitt, J., Hess, H., Stunneberg, H. G. 1993. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* **18**, 223-230.
- Scholl, Y., Asano, N., Dräger, B. 2001. Automated Multiple Development Thin Layer Chromatography for Calystegines and their biosynthetic precursors. *J. Chromatogr. A*, **928**, 217-224.

- Scholl, Y., Höke, D., Dräger, B. 2001. Calystegines in *Calystegia sepium* derive from tropane alkaloid pathway. *Phytochemistry* **58**, 883-889.
- Schroeder, G., Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmidt, J., Strack, D., De Luca, V., Schroeder, J. 1999. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: Tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Letters* **458**, 97-102.
- Schultheiss, P. C., Knight, A. P., Traub-Dargatz, J. L., Todd, F. G., Stermitz, F. R. 1995. Toxicity of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) to mice. *Vet. Hum. Toxicol.* **37**, 452-4.
- Sheen, J., Zhou, L., Jang, J. C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 410-418.
- Shoji, T., Yamada, Y., Hashimoto, T. 2000. Jasmonate induction of putrescine *N*-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 831-839.
- Shonle, I. , Bergelson, J. 2000. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (*Solanaceae*). *Evolution* **54**, 778-788.
- Sloane, D. L., Leung, R., Craik, C. S., Sigal, E. 1991. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature* **354**, 149-152.
- Soltis, D. E., Solitis, P. S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit. Rev. Plant Sci.* **12**, 243-273.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Sowokinos, J. R., Thomas, C., Burrell, M. M. 1997. Pyrophosphorylases in potato. Allelic polymorphism of UDP-glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold. *Plant Physiol.* **113**, 511-517.
- St Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A., De, L., V 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell* **11**, 887-900.
- Sulkowski, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* **3**, 1-7. 1985.
- Suzuki, K., Yamada, Y., Hashimoto, T. 1999a. Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol.* **40**, 289-97.
- Suzuki, K., Yun, D. J., Chen, X. Y., Yamada, Y., Hashimoto, T. 1999b. An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6beta-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Mol. Biol.* **1999**, 141-152.
- Tabata, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Kotani, H., Kato, T., Asamizu, E., Miyajima, N., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakayama, S., Nakazaki, N., Naruo,

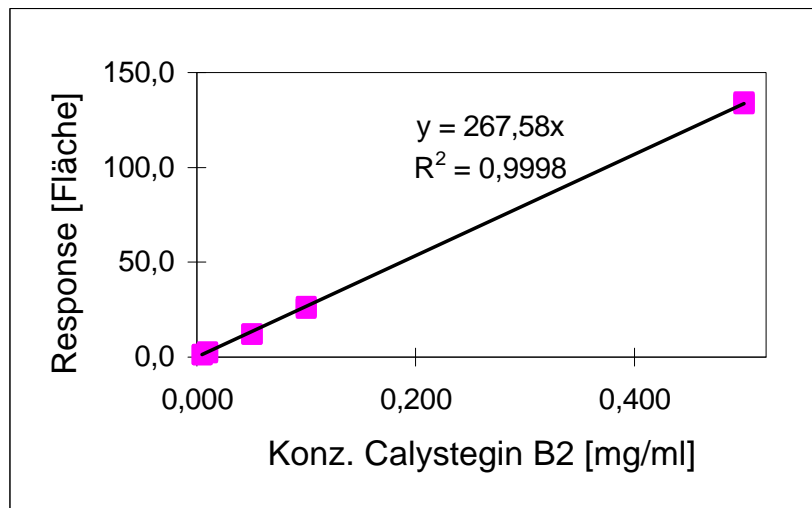
- K., Okumura, S., Shinpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Sato, S., de la, B. M., Huang, E., Spiegel, L., Gnoj, L., O'Shaughnessy, A., Preston, R., Habermann, K., Murray, J., Johnson, D., Rohlfing, T., Nelson, J., Stoneking, T., Pepin, K., Spieth, J., Sekhon, M., Armstrong, J., Becker, M., Belter, E., Cordum, H., Cordes, M., Courtney, L., Courtney, W., Dante, M., Du, H., Edwards, J., Fryman, J., Haakensen, B., Lamar, E., Latreille, P., Leonard, S., Meyer, R., Mulvaney, E., Ozersky, P., Riley, A., Strowmatt, C., Wagner-McPherson, C., Wollam, A., Yoakum, M., Bell, M., Dedhia, N., Parnell, L., Shah, R., Rodriguez, M., See, L. H., Vil, D., Baker, J., Kirchoff, K., Toth, K., King, L., Bahret, A., Miller, B., Marra, M., Martienssen, R., McCombie, W. R., Wilson, R. K., Murphy, G., Bancroft, I., Volckaert, G., Wambutt, R., Dusterhoft, A., Stiekema, W., Pohl, T., Entian, K. D., Terry, N., Hartley, N., Bent, E., Johnson, S., Langham, S. A., McCullagh, B., Robben, J., Grymonprez, B., Zimmermann, W., Ramsperger, U., Wedler, H., Balke, K., Wedler, E., Peters, S., van Staveren, M., Dirkse, W., Mooijman, P., Lankhorst, R. K., Weitzenegger, T., Bothe, G., Rose, M., Hauf, J., Berneiser, S., Hempel, S., Feldpausch, M., Lamberth, S., Villarroel, R., Gielen, J., Ardiles, W., Bents, O., Lemcke, K., Kolesov, G., Mayer, K., Rudd, S., Schoof, H., Schueller, C., Zaccaria, P., Mewes, H. W., Bevan, M., Fransch, P. 2000. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 823-826.
- Taguchi, H., Ohta, T. 1991. D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* **266**, 12588-12594.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Mitsui, Y. 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**, 33-45.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Mitsui, Y. 1996b. Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 7715-7730.
- Taylor, D. L., Sunkara, P. S., Liu, P. S., Kang, M. S., Bowlin, T. L., Tyms, A. S. 1991. 6-O-butanoylcastanospermine (MDL 28,574) inhibits glycoprotein processing and the growth of HIVs. *AIDS* **5**, 693-698.
- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Denarie, J., Rosenberg, C. 1988a. A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *J. of Bacteriology* **170**, 1153-1161.
- Tepfer, D., Goldmann, A., Fleury, V., Maille, M., Message, B., Pamboukdjian, N., Boivin, C., Denarie, J., Rosenberg, C., Lallemand, J. Y., Descoins, C., Charpin, I., Amarger, N. 1988b. Calystegins, Nutritional Mediators in Plant-Microb Interactions. In *Molecular Genetics Of Plant/Microbe Interactions* (R. Palacios and D. Yerma, Eds.), pp. 139-144. APS Press, St. Paul.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **22**, 4673-4680.
- Titarenko, E., Rojo, E., León, J., Sanchez-Serrano, J. J. 1997. Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**, 817-826.
- Todd, F. G., Stermitz, F. R., Schultheis, P., Knight, A. P., Traub Dargatz, J. 1995. Tropane alkaloids and toxicity of *Convolvulus arvensis*. *Phytochemistry* **39**, 301-303.
- Valkonen, J. P. T., Keskitalo, M., Vasara, T., Pietilä, L. 1996. Potato glycoalkaloids: a burden or blessing? *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 1-20.
- van de Wal, M. H., Jacobsen, E., and Visser, R. G. 2001. Multiple allelism as a control mechanism in metabolic pathways: GBSSI allelic composition affects the activity of granule-bound starch synthase I and starch composition in potato. *Mol.Genet.Genomics* **265**, 1011-1021.
- Vazquez-Flota, F., De-Carolis, E., Alarco, A. M., De Luca, V 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 Mol. Biol.* **34**, 935-948.
- Vazquez-Flota, F. A., St Pierre, B., De Luca, V 2000. Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry* **55**, 531-536.
- Vitrac, X., Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G., Merillon, J. M. 2000. Sugar sensing and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* **53**, 659-665.
- Watson, A. A., Fleet, G. W., Asano, N., Molyneux, R. J., Nash, R. J. 2001. Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry* **56**, 265-295.
- Wiltshire, J. J. J. and Cobb, A. H. 1996. A review of physiology of potato tuber dormancy. *Ann. Appl. Biol.* **129**, 553-569.
- Wink, M., Roberts, M. F. 1998. Compartmention of alkaloid synthesis, transport, and storage. In *Alkaloids, Biochemistry, Ecology and Medicinal Application* (M. F. Roberts and M. Wink, Eds.), pp. 239-262. Plenum Press, New York.
- Wink, M. 1999. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In *Biochemistry of plant secondary metabolim.* (M. Wink, Ed.), pp. 1-16. Sheffield Academic Press.
- Witte, L., Mueller, K., Arfmann, H. A. 1987. Investigation of the alkaloid pattern of *Datura inoxia* plants by capillary gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Planta Med.* **53**, 192-197.

- Wünsch, A., Munzert, M. 1989. Spatial distribution of glycoalkaloids of different potato varieties throughout the potato tuber. *Potato Res.* **37**, 3-10.
- Yamashita, A., Nakajima, K., Kato, H., Hashimoto, T., Yamada, Y., Oda, J. 1998. Crystallization and preliminary crystallographic study of tropinone reductase II from *Datura stramonium*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 1405-1407.
- Yamashita, A., Kato, H., Wakatsuki, S., Tomizaki, T., Nakatsu, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., Oda, J. 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**, 7630-7637.
- Yazaki, K., Matsuoka, H., Ujihara, T., Sato, F. 1999. Shikonin Biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*: Light-induced Negative Regulation of Secondary Metabolism. *Plant Biotechnology* **16**, 335-342.
- Yun, D. J., Hashimoto, T., Yamada, Y. 1993. Transgenic Tobacco Plants with Two Consecutive Oxidation Reactions Catalyzed by Hyoscyamine 6β-Hydroxylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 502-503.
- Zabetakis, I., Edwards, R., Hamilton, J. T. G., O'Hagan, D. 1998. The biosynthetic relationship between littorine and hyoscyamine in transformed roots of *Datura stramonium*. *Plant Cell Reports* **18**, 341-345.
- Zabetakis, I., Edwards, R., and O'Hagan, D. 1999. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* **50**, 53-56.

## G Anhang

### G 1 Kalibrierung der Calysteginbestimmung



**Abb. G-1:** Eichgerade zur Calysteginbestimmung. Als Eichsubstanz wurde Calystegin B<sub>2</sub> verwendet. Innerer Standard war Azobenzol. Die Eichgerade wurde von Herrn D. Höke zur Verfügung gestellt. Es wurden 5 Meßpunkte im Bereich von 0,005 mg/ml bis 0,500 mg/ml aufgenommen, wobei jeder Meßpunkt einer Doppelbestimmung unterzogen wurde. Der Konzentrationsbereich in den zu messenden Proben lag zwischen 0 und 0,1 mg/ml Probe.

### G 2 Calysteginbestimmung in Kartoffelgeweben

Sorte		Cal A <sub>3</sub> [µg/g FM]	Cal B <sub>2</sub> [µg/g FM]	Cal B <sub>4</sub> [µg/g FM]	Summe [µg/g FM]
Liu	Keime bei Licht, 5mm	458	2299	38	2795
	Keime, 10mm	430	1835	19	2284
	Keime, 3mm	850	2323	30	3203
	Augen	1327	2973	103	4403
Arcula	Keime bei Licht, 5mm	238	1361	7	1606
	Keime, 10mm	198	1039	0	1237
	Keime, 3mm	253	1198	3	1454
	Augen	1121	2639	211	3971
Adretta	Keime bei Licht, 5mm	333	1429	0	1762
	Keime, 10mm	199	1138	0	1337
	Keime, 3mm	277	1527	0	1804
	Augen	1222	2713	63	3998

**Tab. G-1:** Mittelwerte der Calysteginbestimmung in verschiedenen Kartoffelsorten.

Zeitpunkt	Gewebe	Cal A <sub>3</sub>	Cal B <sub>2</sub>	Cal B <sub>4</sub>	SD	SD	SD	[n]
		[µg/g FM]			Cal A <sub>3</sub>	Cal B <sub>2</sub>	Cal B <sub>4</sub>	
nach der Ernte	Mark	38	41		3	9		4
	Schale, 2 mm	56	193		6	22		4
	Korkhaut, 0,5-1 mm	104	322		13	60		6
	Augen, 2x2x2 mm	75	274		9	47		4
5 Monate nach der Ernte	Mark	58	84		6	9		8
	Schale	226	479		26	33		5
	Korkhaut	440	906	17	56	107	3	5
	Augen, 5x5x5 mm, dormant	511	826	16	79	58	2	6
	Augen, 2x2x2 mm, dormant	793	1345	18	117	150	3	8
	Augen, 5x5x5 mm, Keimstart	611	1039	14	81	150	3	10
	Augen, 2x2x2 mm, Keimstart	1327	2973	103	193	404	17	10
	Keime 3 mm	850	2324	31	94	369	1	6
	Keimboden von 3 mm Keimen	826	1417	28	192	5	7	4
Keime 10 mm	431	1836	20	40	245	2	5	
8 Monate nach der Ernte	Korkhaut	570	553	36	46	58	3	4
	Schale	393	462	23	21	41	2	4
	Augen 2x2x2 mm, Keimstart	703	1151	39	25	126	6	4
	Keime 3 mm	400	1401	26	39	233	4	8
	Keime 10 mm	182	911	15	18	85	2	7
	Keime 20 mm	189	825	21	17	176	4	7
	Keime 30 mm	182	675		49	122		7
	Keime 130 mm	97	366	9	14	52	7	6
Keime im Boden	Keime 3 mm	707	1657	29				2
	Keime 10 mm	127	430					2
	Keime 30 mm	97	224		19	34		5
	Keime 50 mm	44	378					2

**Tab. G-2:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Calystegingehaltes in Keimen und Knollen.

Gewebe	Cal A <sub>3</sub>	Cal B <sub>2</sub>	Cal B <sub>4</sub>	SD	SD	SD	Messungen [n]
	[µg/g FM]			Cal A <sub>3</sub>	Cal B <sub>2</sub>	Cal B <sub>4</sub>	
gesamter Keim	96,5	365,5	13,7	14,0	51,8	7	6
Spitze (3 mm)	227,1	1000,6	21,6	36,4	200,6	4	2
mittlerer Teil (110 mm)	79,7	219,2	0,0	11,1	30,0		4
unterer Teil und Wurzelansatz (20 mm)	111,4	497,0	15,0	7,3	50,1	1	4

**Tab. G-3:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Calystegingehaltes innerhalb der Keime.

Zeitpunkt	Gewebe	Cal A <sub>3</sub>	Cal B <sub>2</sub>	SD Cal A <sub>3</sub>	SD Cal B <sub>2</sub>	[n]
		[µg/ gFM]				
	Blattansatz unter der Erdoberfläche	53,67	108,56	8,04	12,3	4
5 cm Pflanze	junge Blätter	58,70	97,71	10,99	12,3	8
	unterirdischer Stengel	25,63	49,68	10,75	5,74	8
	Wurzel	36,66	98,41	4,74	6,55	4
20 cm Pflanze	untere Blätter	0,00	27,22		2,41	4
	obere Blätter	22,76	79,77	5,52	2,41	4
	Wurzel	58,17	83,82	7,15	8,9	4
	Knolle 0,5 cm	70,28	227,49	11,73	34,78	6
	Knolle 1,0 cm	40,32	108,17	4,14	15,38	5
30 - 40 cm Pflanze	untere Blätter	0,00	13,16		0,25	3
	obere Blätter	17,88	34,23	1,74	2,09	4
	Stengel	25,56	25,45	7,31	7,81	4
	Wurzel	25,30	50,43	6,22	6	6
	Blüte	37,44	102,71	5,43	14,35	9
	Fruchtschale	14,73	19,68	0,75	5,84	5

**Tab. G-4:** Mittelwerte und Standardabweichungen des Calystegingehaltes in Kartoffelpflanzen.

Gewebe	TM/FM [%]	SD	Messungen [n]
ganze Frucht	11,1	1,55	8
Fruchtschale	13,5	1,01	5
Blüte	14,3	0,55	9
Knolle 0,5 cm	16,1	0,02	6
Stengel, 15 cm Pflanze	12,3	0	8
unterirdischer Stengel	7,62	0,7	9
Wurzel, 30 cm Pflanze	6,81	0,27	8
Wurzel, 5 cm Pflanze	13,8	2,71	6
gelber Blätter	9,56	0,03	4
untere Blätter, 30 cm Pflanze	15	1,65	3
untere Blätter, 5 cm Pflanze	11	1,14	6
Blattansatz unter EO	9,04	1,03	8
Korkhaut, 5 Mon. n. E.	18	0,81	6
Schale, 5 Mon. n. E.	18,3	0,01	6
Mark, 5 Mon. n. E.	17,3	0,02	12
Keime, 130 mm, 8 Mon. n. E.	13,2	0	6
Keime, 20 mm, 8 Mon. n. E.	14,7	0,12	5
Keime, 10 mm, 5 Mon. n. E.	17,4	0,58	10
Keime, 3 mm, 5 Mon. n. E.	22,9	0,88	8
Augen, 2x2x2 mm, 5 Mon. n. E.	20,7	0,27	5
Augen direkt n. E.	14,9	0,01	6

**Tab. G-5:** Mittelwerte und Standardabweichungen der TM/FM-Verhältnisse ausgesuchter Kartoffelgewebe.



### G 3 *S. tuberosum* TR-cDNA-Sequenzen

#### G 3.1 TRI-cDNA-Sequenzen

```

1 - ATGGCAGAATTGAGAGAAAAATGGAGTCTTAAAGGCACCACTGCACTTGTACTGGTGGC - 60
  - M A E L R E K W S L K G T T A L V T G G
61 - TCCAAAGGCATAGGGTACGCTATAGTGAAGAATTGGCAAATTTTGGAGCAAGAGTATAT - 120
  - S K G I G Y A I V E E L A N F G A R V Y
121 - ACATGTTTACGTAATGAAAATGAACTTCAAGAAATGCCTTGATATTTGGAGAAAAAGGGA - 180
  - T C S R N E N E L Q E C L D I W R K K G
181 - CTTAAAGTCGAAGGTTCTGTTTGTGACTTATTATCTCGTACTGAACGTGAAAACTTATG - 240
  - L K V E G S V C D L L S R T E R E K L M
241 - AAGACTGTTGAAGATGTATTTGATGGAAAGCTTAATATTCTGGTGAATAATGCAGGAGTG - 300
  - K T V E D V F D G K L N I L V N N A G V
301 - GCAATACATAAGGAAGCTAAAGATTTACAAAAGAAGATTACAATATAATTATGGGAACT - 360
  - A I H K E A K D F T K E D Y N I I M G T
361 - AATTTTGAAGCTGCTTATCATTTATCTCAAATGCTTATCCTTTATTGAAGGCTTCTCAA - 420
  - N F E A A Y H L S Q I A Y P L L K A S Q
421 - AATGGAAATGTTATTTTTGTTTCTTCTATTGCTGGATTTTCAGCATTGCCCTCTCTTTCT - 480
  - N G N V I F V S S I A G F S A L P S L S
481 - CTTTACTCTGCTTCCAAAGGTGCAATAAAATCAAATGACAAAAGAAGCTTGGCATGTGAATGG - 540
  - L Y S A A S K G A I N Q M T K N L A C E W
541 - GCCAAGGACAATATTCGGGTCAATTCTGTTGCTCCAGCAGTCATTTTAACCCCACTCGTT - 600
  - A K D N I R V N S V A P A V I L T P L V
601 - GAAACTGCAATTAAGAAAAATCCTCAACAAAAAGAAGAAATTGATAGTTTTGTTGTTAAG - 660
  - E T A I K K N P Q Q K E E I D S F V V K
661 - ACTCCTTTGGGCCGGGCCGAAAAGCCTGAAGAAGCTTCAGCAGTAATAGCTTTTCTTTTGC - 720
  - T P L G R A G K P E E A S A V I A F L C
721 - TTCCAGCTGCTTCTTATATTACGGGCCAAATTATATGGGCCGATGGTGGATTTACAGCT - 780
  - F P A A S Y I T G Q I I W A D G G F T A
781 - AATGGTGGGTTTTTAAGTGTTATTTTCTTTGGGCTTTGTAATCTTTTTTCTATTTTTTGTAA - 840
  - N G G F *
841 - TTTGTATTTTGGGCCATTATATCGGCCATTATGCTTTGAACAATTTCTATGTCCATGTGC - 900

901 - TTGTGTTTCATCAACGACACACTTCCA - 926

```

**Abb. G-2:** *StTRI-SE*-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Der codierende Bereich der Sequenz ist in der EMBL-Datenbank unter der Nummer AJ307584 eingetragen. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

```

1 - ATGGCAGAATTGAGAGAAAAATGGAGTCTTAAAGGCACCACTGCACTTGTACTGGTGGC - 60
  - M A E L R E K W S L K G T T A L V T G G
61 - TCCAAAGGCATAGGGTACGCTATAGTGGAAGAAATGGCAAATTTTGGAGCAAGAGTATAT - 120
  - S K G I G Y A I V E E L A N F G A R V Y
121 - ACATGTTACGTAATGAAAATGAACTTCAAGAATGCCTTGATATTTGGAGAAAAAAGGGA - 180
  - T C S R N E N E L Q E C L D I W R K K G
181 - CTTAAAGTCGAAGGTTCTGTTTGTGACTTATTATCTCGTACTGAACGTGAAAACTTATG - 240
  - L K V E G S V C D L L S R T E R E K L M
241 - AAGACTGTTGAAGATGTATTTGATGGAAAGCTTAATATTCTGGTGAATAATGCAGGAGTG - 300
  - K T V E D V F D G K L N I L V N N A G V
301 - GCAATACATAAGGAAGCTAAAGATTTCAAAAAAGAAGATTACAATATAAATTATGGGAACT - 360
  - A I H K E A K D F T K E D Y N I I M G T
361 - AATTTTGAAGCTGCTTATCATTTATCTCAAATGCTTATCCTTTATTGAAGGCTTCTCAA - 420
  - N F E A A Y H L S Q I A Y P L L K A S Q
421 - AATGGAAATGTTATTTTTGTTTCTTCTATTGCTGGATTTTCAGCATTGCTCTCTCTTTCT - 480
  - N G N V I F V S S I A G F S A L L S L S
481 - CTTTACTCTGCTTCCAAAGGTGCAATAAATCAAATGACAAAGAACTTGGCATGTGAATGG - 540
  - L Y S A S K G A I N Q M T K N L A C E W
541 - GCCAAGGGCAATATTCGGGTCAATTCTGTTGCTCCAGCAGTCATTTTAACCCCACTCGTT - 600
  - A K G N I R V N S V A P A V I L T P L V
601 - GAAACTGCAATTAAGAAAAATCCTCAACAAAAAGAAGAAATTGATAGTTTTTGTGTTAAG - 660
  - E T A I K K N P Q Q K E E I D S F V V K
661 - ACTCCTTTGGGCCGGGCCGAAAGCCTGAAGAAGTTTCAGCAGTAATAGCTTTTCTTTGC - 720
  - T P L G R A G K P E E V S A V I A F L C
721 - TTCCCAGCTGCTTCTTATATTACAGGCCAAATTTATATGGGCCGATGGTGGATTTACAGCT - 780
  - F P A A S Y I T G Q I I W A D G G F T A
781 - AATGGTGCGTTTAA - 795
  - N G A F *

```

**Abb. G-3:** *StTRI*-SS-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

```

1 - GCACGAGAAAATAATAATAAAAAACCAGAAATGGCAGAATTGAGAGAAAAATGGTGTCTTA - 60
-                                     M A E L R E K W C L K
61 - AAGGCACCCTGCACTTGTACTGGTGGCTCCAAAGGCATAGGGTACGCTATAGTGAAG - 120
-   G T T A L V T G G S K G I G Y A I V E E
121 - AATTGGCAAATTTTGGAGCAAGAGTATATACATGTTTACGTAATGAAAATGAACTTCAAG - 180
-   L A N F G A R V Y T C S R N E N E L Q E
181 - AATGCCTTGATATTTGGAGAAAAAAGGACTTAAAGTCGAAGTTCTGTTTGTGACTTAT - 240
-   C L D I W R K K G L K V E G S V C D L L
241 - TATCTCGTACTGAACGTGAAAACTTATGAAGACTATTGAAGATGTATTTGATGGAAAGC - 300
-   S R T E R E K L M K T I E D V F D G K L
301 - TTAATATTCTGGTGAATAATGCAGGAGTGGCAATACATAAGGAAGCTAAAGATTTTCAAA - 360
-   N I L V N N A G V A I H K E A K D F T K
361 - AAGAAGATTACAATATAATTATGGGAACTAATTTTGAAGCTGCTTATCATTATCTCAAA - 420
-   E D Y N I I M G T N F E A A Y H L S Q I
421 - TTGCTTATCCTTTATTGAAGGCTTCTCAAAATGGAAATGTTATTTTTGTTTCTTCTATTG - 480
-   A Y P L L K A S Q N G N V I F V S S I A
481 - CTGGATTTTCAGCATTGCCCTCTCTTTCTTTACTCTGCTTCCAAAGGTGCAATAAATC - 540
-   G F S A L P S L S L Y S A S K G A I N Q
541 - AAATGACAAAAGAACTTGGCATGTGAATGGGCCAAGGACAATATTCGGGTCAATTCTGTTG - 600
-   M T K N L A C E W A K D N I R V N S V A
601 - CTCCAGCAGTCATTTTAAACCCACAAAATTGAAACTGCAATTAAGAAAAATCCTCAACAAA - 660
-   P A V I L T P Q I E T A I K K N P Q Q K
661 - AAGAAGAAATTGATAGTATTGTTGTTAAGACTCCTTTGGGCCGGGCCGAAAGCCCGAAG - 720
-   E E I D S I V V K T P L G R A G K P E E
721 - AGGTTTCAGCAGTAATAGCTTTTCTTTGCTTCCCAGCTGCTTCTTATATTACGGGCCAAA - 780
-   V S A V I A F L C F P A A S Y I T G Q I
781 - TCATATGGGCCGATGGTGGATTTACAGCTAATGGTGCCTTTTAAAGTGTATTTTTCTTTGG - 840
-   I W A D G G F T A N G A F *
841 - GCTTTGTAATCTTTTTTCTATTTTTTGTAAATTTGCATTTTGGGCCTATTATCGGCCATTA - 900

901 - TGCTTTGAACAATTTCTATGTCCATGTGCTTGTGTTTCATCAACGACACACTTCCATTTTA - 960

961 - AAAAAAAAAAAAAAAAAA - 976

```

**Abb. G-4:** *StTRI-homologe* cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

## G 3.2 *TRII*-cDNA-Sequenzen

### G 3.2.1 *TRII*-cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Désirée

```

1 - GCATTTTTCAAGTCTTGTGCACTAGGCTAGTAGTTATGGCAGCAGGAAGATGGAATCTTG - 60
  -                                     M A A G R W N L E
61 - AAGGCTGCACTGCCCTTGTACCGGTGGTCTAGAGGCATAGGGTATGGGATAGTAGAGG - 120
  - G C T A L V T G G S R G I G Y G I V E E
121 - AACTAGCAAGTCTTGGTGCATCAGTTTATACATGTTCCACGTAATCAAAGGAGCTTAATG - 180
  - L A S L G A S V Y T C S R N Q K E L N E
181 - AGTGTGTTGATTCAATGGAGAAGTAAAGGTTTTAAAGTTGAAGCTTCTGTTTGTGATTTAT - 240
  - C L I Q W R S K G F K V E A S V C D L S
241 - CATCTAGATCTGAAAGACAGGAGTTTATCAAGACTGTTGCTAATCATTTTGATGGAAAAC - 300
  - S R S E R Q E F I K T V A N H F D G K L
301 - TCAATATTTTGGTTAATAATGCTGTATTGTTCATATACAAAGAAGCTAAAGATTACACTA - 360
  - N I L V N N A G I V I Y K E A K D Y T M
361 - TGGAAAGATTACTCTCTAATTATGAGTATCAACTTTGAGGCTGCTTATCACTTATCTGTAC - 420
  - E D Y S L I M S I N F E A A Y H L S V L
421 - TAGCACACCCCTTTTTGAAAGCATCACAAAGGGGCAATGTTGTCTTTATTCCTCCTATTT - 480
  - A H P F L K A S Q R G N V V F I P P I S
481 - CTGGGGCTTCAGCATTACCATATGAAGCTGTTTATGGAGCAACCAAAGGAGCAATGGATC - 540
  - G A S A L P Y E A V Y G A T K G A M D Q
541 - AACTCACAAGATGCTTGGCGTTTGAATGGGCAAAGGACAACATTCGTGTCAATGGCGTTG - 600
  - L T R C L A F E W A K D N I R V N G V A
601 - CACCGGGGGTTATTGCATCTTCTATGGTCGAAATGACTATTCAAGATCCAGAACAAAAAG - 660
  - P G V I A S S M V E M T I Q D P E Q K E
661 - AAAATTTGGACAAGTTGATTGATAGATGTGCTCTACATAGAATGGGAGAGCCATAAGAAC - 720
  - N L D K L I D R C A L H R M G E P K E L
721 - TTGCAGCAGTTGTTGCATTTCTCTGTTTTCTGCTGCTTCATATGTCACTGGCCAAATTA - 780
  - A A V V A F L C F P A A S Y V T G Q I I
781 - TATATGTTGATGGTGGATTTATGGCTAATGGTGGCTTTTAAATCATCCTTTAATTAATTTG - 840
  - Y V D G G F M A N G G F *
841 - TCTATGGTTTTGTAAGTTTATCAAATAATTATTTAGAGTAATCTTTTTTTATAAGAATTA - 900

901 - TTATGTCAGGTGAATTGCTTAAGTCCATATAAATTCAGAAGAATTTTAAATTAATAAAAAA - 960

961 - AAAAAAA - 967

```

**Abb. G-5:** *StTRII-D1*-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

```

1 - GGG AAG ATG GAAT CTT GAAG GCT GCA CTG CCCT TGT TACT GGT GGT TCT AGAG GCAT AGG - 60
  - G R W N L E G C T A L V T G G S R G I G
61 - GTAT GGG ATAG TAGAG GAA CTAG CAAG TCT TGG TGC ATC AGT TTT ATA CAT GTT CAC GTAA - 120
  - Y G I V E E L A S L G A S V Y T C S R N
121 - TCAAA AGG AGC TTA ATG AGT GTT TAA CTCA ATGG AGA AGTAA AGG TTT AAA AGT TGA AGC - 180
  - Q K E L N E C L T Q W R S K G L K V E A
181 - TTCT GTT TGT GAT TTT ATCAT CAAG ATCTG AAA GAG AGG AGT TTT ATCA AGACT GTT GATA A - 240
  - S V C D L S S R S E R E E F I K T V D N
241 - TCAT TTT GAT GGAAA CTCA ATAT TTT TGG TTA ATA ATG CTGG TATT GTCAT ATACA AGGA - 300
  - H F D G K L N I L V N N A G I V I Y K E
301 - AGCT AAA GAT TAC ACTAT GGAA GATT ACTCT CTA ATTAT GAG TAT CAAC TTT GAG GCT GC - 360
  - A K D Y T M E D Y S L I M S I N F E A A
361 - TTAC CACTT ATCTGT ACTTGC ACACCC CTTTT TGA AAG CATC ACA AAGGG GCAAT GTTGT - 420
  - Y H L S V L A H P F L K A S Q R G N V V
421 - CTTT ATTT CTCT ATTT CTGG GGCTT CAG CATT ACC ATAT GAAG CTG TTT ATG GAG CAAC - 480
  - F I S S I S G A S A L P Y E A V Y G A T
481 - CAAAG GACA ATGG ATCA ACTC ACA AGATG CTTAG CGTTT GAATGG GCAA AGGACA ACAT - 540
  - K G A M D Q L T R C L A F E W A K D N I
541 - TCGT GTCA ATGG CGTTG CACCG GGGG TTTAT TGC ATCTT CTAT GGT CGAA ATG ACTATT CA - 600
  - R V N G V A P G V I A S S M V E M T I Q
601 - AGAT CCAGA ACAAAAA GAAAA TTTGG ACAAG TTG ATTG ATAG ATGTG CTCTAC ATAGA AT - 660
  - D P E Q K E N L D K L I D R C A L H R M
661 - GGGAG AGCCT AAA GA ACTTGC AGCAG TTGTT GCAT TTTCT TTTG TTTT CCTG CTGCTT CATA - 720
  - G E P K E L A A V V A F L C F P A A S Y
721 - TGTC ACTGG CCAA TTATAT ATGTTG ATGG TGGAT TTTAT GGCTA ATGGT GGCTTTT TAATC - 780
  - V T G Q I I Y V D G G F M A N G G F *
781 - ATCAT TTAAT TAAT TTTG TCTAT GGT TTTTGT AAGT TAA TCAA ATAATT ATCTAG AGTAAT - 840

841 - CTTT TAAATA ATGG TGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 874

```

**Abb. G-6:** *StTRII-D2*-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Das Start-Codon fehlt; das Stop-Codon ist unterstrichen.

```

1 - TAGTAGTTATGGCAGCAGGAAGATGGAATCTTGAAGGCTGCACTGCCCTTGTTACCGGTG - 60
-   M A A G R W N L E G C T A L V T G G
61 - GTTCTAGAGGCATAGGGTATGGGATAGTAGAGGAAGTAGCAAGTCTTGGTGCATCAGTTT - 120
-   S R G I G Y G I V E E L A S L G A S V Y
121 - ATACATGTTACGTAATCAAAAGGAGCTTAATGAGTGTTTAACTCAATGGAGAAGTAAAG - 180
-   T C S R N Q K E L N E C L T Q W R S K G
181 - GTTTTAAAGTTGAAGCTTCTGTTTGTGATTTATCATCAAGATCTGAAAGAGAGGAGTTTA - 240
-   F K V E A S V C D L S S R S E R E E F I
241 - TCAAGAATGTTGCTAATCATTTTGATGGAAAACCTCAATATTTTGGTTAATAATGCTGGAA - 300
-   K N V A N H F D G K L N I L V N N A G I
301 - TTGTCATATACAAAGAAGCTAAAAGATTACACTATGGAAGATTACTCTCTAATTATGAGTA - 360
-   V I Y K E A K D Y T M E D Y S L I M S I
361 - TCAACTTTGAGGCTGCTTACCACTTATCTGTACTTGACACCCCCTTATTGAAAGCATCAC - 420
-   N F E A A Y H L S V L A H P L L K A S Q
421 - AAAGGGGCAATGTTGTCTTTATTTCTTCTATTTCTGGGGCTTCAGCATTACCATATGAAG - 480
-   R G N V V F I S S I S G A S A L P Y E A
481 - CTGTTTATGGAGCAACCAAGGAGCAATGGATCAACTCACAAGATGCTTAGCGTTTGAAT - 540
-   V Y G A T K G A M D Q L T R C L A F E W
541 - GGGCAAAGGACAATATTCGTGTCAATGGTGTGACCCGGGGGTTATTGCATCTTCTATGG - 600
-   A K D N I R V N G V A P G V I A S S M V
601 - TCGAAATGACTATTCAAGATCCAGAACAAAAAGAAAAATTTGGACAAGTTGATTGATAGAT - 660
-   E M T I Q D P E Q K E N L D K L I D R C
661 - GTGCTTTACATAGAATGGGTGAGCCTAAAGAACTTGCAGCAGTTGTTGCATTTCTCTGTT - 720
-   A L H R M G E P K E L A A V V A F L C F
721 - TTCCTGCTGCTTCATATGTCACTGGCCAAATTATATATGTTGATGGTGGATTTATGGCTA - 780
-   P A A S Y V T G Q I I Y V D G G F M A N
781 - ATGGTGGCTTTTAAATCATCCTTTAATTAATTTGTCTATGGTTTTGCAAGTTTATCAAATA - 840
-   G G F *
841 - ATTATTTAGAGTAATCTTTTTTATAAAGGATTATTATGTGCGGGTGAATTGCCTAAGTCCA - 900

901 - TATAATTCTAGAAGAATTTTAAATTCGACTTTGTGCTAGTATATGTAAGAATTTTAAGTG - 960

961 - TGAAAAAAAAAAAAA - 974

```

**Abb. G-7:** *StTRII-D3*-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

## G 3.2.2 TRII-cDNA-Sequenzen der Kartoffelsorte Liu

```

1 - ATGGCAGCAGGAAGATGGAATCTTGAAGGCTGCACTGCCCTTGTTACTGGTGGCTCTAGA - 60
   - M A A G R W N L E G C T A L V T G G S R
61 - GGAATTGGGTATGGGATAGTAGAAGAATTAGCAAGTCTTGGTGCATCAGTTTATACATGT - 120
   - G I G Y G I V E E L A S L G A S V Y T C
121 - TCACGTAATCAAAAAGGAGCTTAATGAGTGTTTAACTCAATGGAGAAGTAAAGGTTTTAAA - 180
   - S R N Q K E L N E C L T Q W R S K G F K
181 - GTTGAAGCTTCTGTTTGTGATTTATCATCAAGATCTGAAAGAGAGGAGTTTATCAAGACT - 240
   - V E A S V C D L S S R S E R E E F I K T
241 - GTTGCTAATCATTTTGATGGAAAACCAATATTTTGGTTAATAATGCTGGTATTGTCATA - 300
   - V A N H F D G K L N I L V N N A G I V I
301 - TACAAGGAAGCTAAAGATTACACTATGGAGGATTACTCTCTAATTATGAGTATCAACTTT - 360
   - Y K E A K D Y T M E D Y S L I M S I N F
361 - GAGGCTGCTTACCACCTTATCTGTACTAGCACACCCCTTTTTAAAAGCATCACAAAGGGGC - 420
   - E A A Y H L S V L A H P F L K A S Q R G
421 - AATGTTGCTTTTATTTCTTCTATTTCTGGGGCTTCAGCATTACCATATGAAGCTGTTTAT - 480
   - N V V F I S S I S G A S A L P Y E A V Y
481 - GGAGCAACCAAAGGAGCAATGGATCAACTCACAAAGATGCTTAGCGTTTGAATGGGCAAAG - 540
   - G A T K G A M D Q L T R C L A F E W A K
541 - GACAACATTCGTGTCAATGGCGTTGCACCAGGGGTTATTGCATCTTCTATGGTCGAAATG - 600
   - D N I R V N G V A P G V I A S S M V E M
601 - ACTATTCAAGATCAAGAACAAAAAGAAAATTTGGACAAGTTGATTGATAGATGTGCTCTA - 660
   - T I Q D Q E Q K E N L D K L I D R C A L
661 - CATAGAATGGGAGAGCCTAAAGAACTTGCAGCAGTTGTTGCATTTCTTTGTTTTCCCTGCT - 720
   - H R M G E P K E L A A V V A F L C F P A
721 - GCTTCATATGTCACTGGCCAAATTATATATGTTGATGGTGGATTTATGGCTAATGGTGGC - 780
   - A S Y V T G Q I I Y V D G G F M A N G G
781 - TTTTAA - 786
   - F *

```

**Abb. G-8:** *StTRII-L1*-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

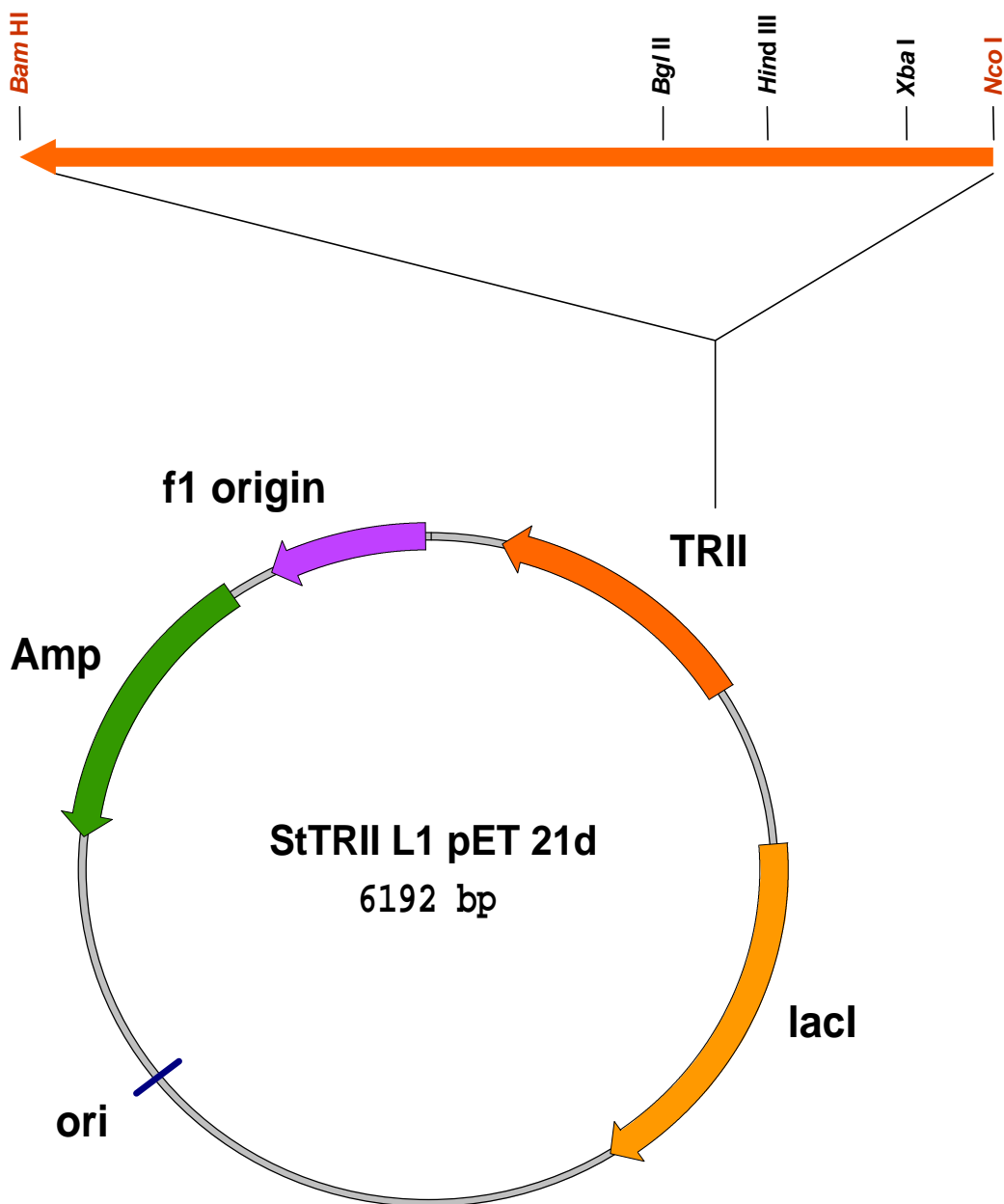
1 - ATGGCAGCAGGAAGATGGAATCTTGAAGGCTGCACTGCCCTTGTTACTGGTGGCTCTAGA - 60  
 - M A A G R W N L E G C T A L V T G G S R  
 61 - GGAATTGGGTATGGGATAGTAGAAGAATTAGCAAGTCTTGGTGCATCAGTTTATACATGT - 120  
 - G I G Y G I V E E L A S L G A S V Y T C  
 121 - TCACGTAATCAAAAAGGAGCTTAATGAGTGTTTAACTCAATGGAGAAGTAAAGGTTTTAAA - 180  
 - S R N Q K E L N E C L T Q W R S K G F K  
 181 - GTTGAAGCTTCTGTTTGTGATTTATCATCAAGATCTGAAAGAGAGGAGTTTATCAAGACT - 240  
 - V E A S V C D L S S R S E R E E F I K T  
 241 - GTTGCTAATCATTTTGATGGAAAACCAATATTTTGGTTAATAATGCTGGTATTGTCATA - 300  
 - V A N H F D G K L N I L V N N A G I V I  
 301 - TACAAGGAAGCTAAAAGATTACACTATGGAGGATTACTCTCTAATTATGAGTATCAACTTT - 360  
 - Y K E A K D Y T M E D Y S L I M S I N F  
 361 - GAGGCTGCTTACCACTTATCTGTACTAGCACACCCCTTTTTAAAAGCATCACAAAGGGGC - 420  
 - E A A Y H L S V L A H P F L K A S Q R G  
 421 - AATGTTGTCTTTATTTCTTCTATTTCTGGGGCTTCAGCATTACCATATGAAGCTGTTTAT - 480  
 - N V V F I S S I S G A S A L P Y E A V Y  
 481 - GGAGCAACCAAAGGAGCAATGGATCAACTCACAAGATGCTTAGCGTTTGAATGGGCAAAG - 540  
 - G A T K G A M D Q L T R C L A F E W A K  
 541 - GACAATATTCGTGTCAATGGTGTGCACCGGGGTTATTGCATCTTCTATGGTCGAAATG - 600  
 - D N I R V N G V A P G V I A S S M V E M  
 601 - ACTATTCAAGATCCAGAACAAAAAGAAAATTTGGACAAGTTGATTGATAGATGTGCTTTA - 660  
 - T I Q D P E Q K E N L D K L I D R C A L  
 661 - CATAGAATGGGTGAGCCTAAAGAACTTGCAGCAGTTGTTGCATTTCTCTGTTTTCTGCT - 720  
 - H R M G E P K E L A A V V A F L C F P A  
 721 - GCTTCATATGTCACTGGCCAAATTATATATGTTGATGGTGGATTTATGGCTAATGGTGGC - 780  
 - A S Y V T G Q I I Y V D G G F M A N G G  
 781 - TTTTAA - 786  
 - F \*

**Abb. G-9:** *StTRII-L2*-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

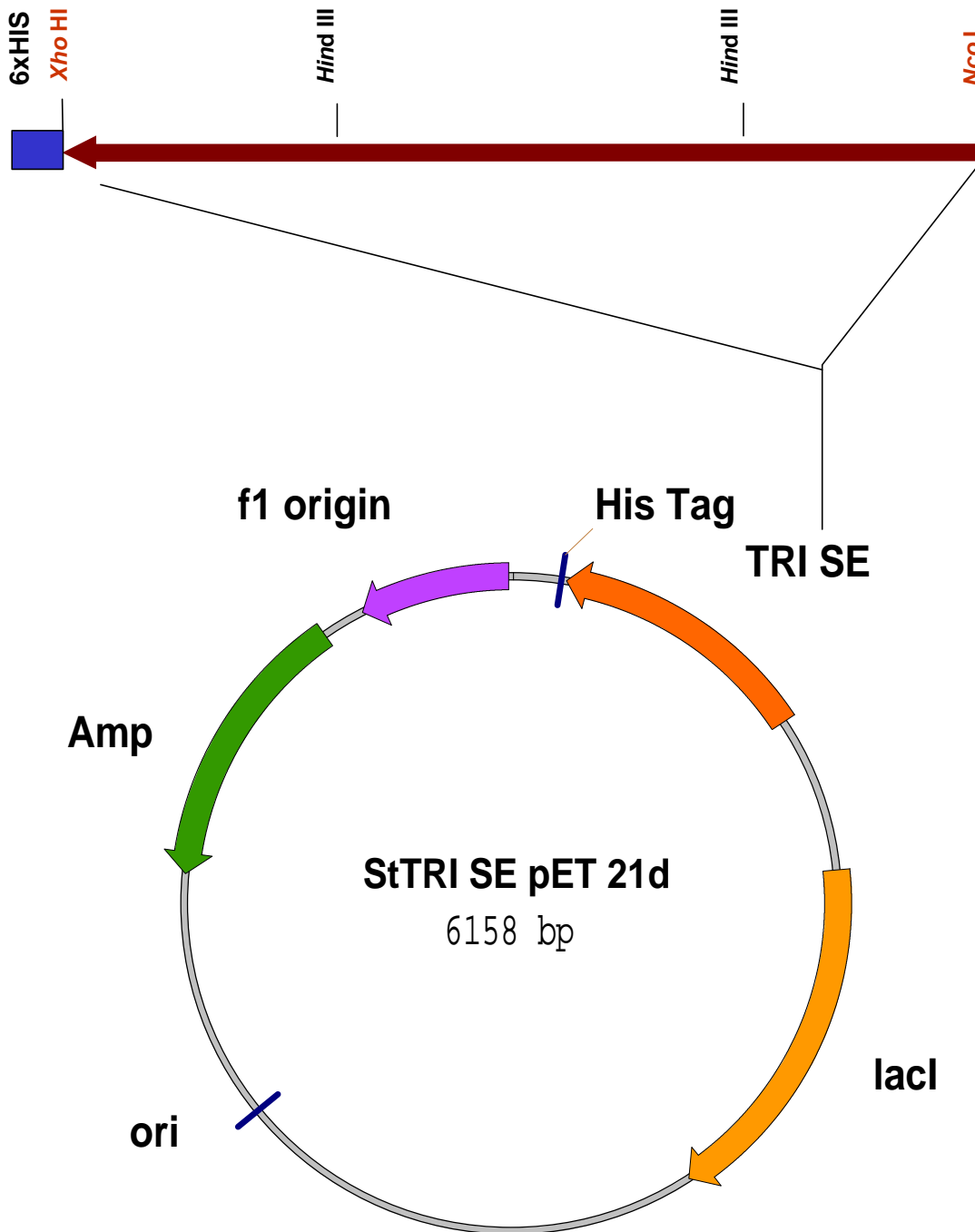


1 - ATGGCAGCAGGAAGATGGAATCTTGAAGGCTGCACTGCCCTTGTACCGGTGGTTCTAGA - 60  
 - M A A G R W N L E G C T A L V T G G S R  
 61 - GGCATAGGGTATGGGATAGTAGAGGAACTAGCAAGTCTTGGTGCATCAGTTTATACATGT - 120  
 - G I G Y G I V E E L A S L G A S V Y T C  
 121 - TCACGTAATCAAAAAGGAGCTTAATGAGTGTTTAACTCAATGGAGAAGTAAAGGTTTTAAA - 180  
 - S R N Q K E L N E C L T Q W R S K G F K  
 181 - GTTGAAGCTTCTGTTTGTGATTTATCATCAAGATCTGAAAGAGAGGAGTTTATCAAGAAT - 240  
 - V E A S V C D L S S R S E R E E F I K N  
 241 - GTTGCTAATCATTTTGATGGAAAACCAATATTTTGGTTAATAATGCTGGAATTGTCATA - 300  
 - V A N H F D G K L N I L V N N A G I V I  
 301 - TACAAAGAAGCTAAAAGATTACACTATGGAAGATTACTCTCTAATTATGAGTATCAACTTT - 360  
 - Y K E A K D Y T M E D Y S L I M S I N F  
 361 - GAGGCTGCTTACCACTTATCTGTACTTGCACACCCCTTATTGAAAGCATCACAAAGGGGC - 420  
 - E A A Y H L S V L A H P L L K A S Q R G  
 421 - AATGTTGTCTTTATTTCTTCTATTTCTGGGGCTTCAGCATTACCATATGAAGCTGTTTAT - 480  
 - N V V F I S S I S G A S A L P Y E A V Y  
 481 - GGAGCAACCAAAGGAGCAATGGATCAACTCACAAGATGCTTAGCGTTTGAATGGGCAAAG - 540  
 - G A T K G A M D Q L T R C L A F E W A K  
 541 - GACAATATTCTGTCAATGGTGTGACCCGGGGTTATTGCATCTTCTATGGTCGAAATG - 600  
 - D N I R V N G V A P G V I A S S M V E M  
 601 - ACTATTCAAGATCCAGAACAAAAAGAAAATTTGGACAAGTTGATTGATAGATGTGCTTTA - 660  
 - T I Q D P E Q K E N L D K L I D R C A L  
 661 - CATAGAATGGGTGAGCCTAAAGAACTTGCAGCAGTTGTTGCATTTCTCTGTTTTCTGCT - 720  
 - H R M G E P K E L A A V V A F L C F P A  
 721 - GCTTCATATGTCACTGGCCAAATTATATATGTTGATGGTGGATTTATGGCTAATGGTGGC - 780  
 - A S Y V T G Q I I Y V D G G F M A N G G  
 781 - TTTTAA - 786  
 - F \*

**Abb. G-10:** *StTRII-L3*-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz. Start-Codon und Stop-Codon sind unterstrichen.

G 4 Vektorkarte *StTRII*-pET 21d

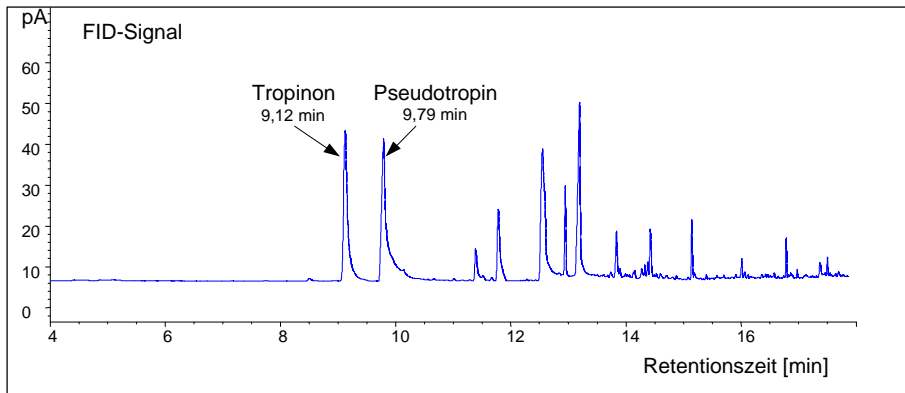
**Abb. G-11:** Die *Solanum tuberosum* *TRII*-cDNA (*StTRII*-L1, 786 bp des codierenden Bereiches) ist eingefügt zwischen der *Nco*I und der *Bam*HI Restriktionsschnittstelle des pET21d Vektors (Novagen). Die Möglichkeit einer C-terminalen 6xHis-Fusion wurde hier nicht genutzt.

G 5 Vektorkarte *StTRI*-His-pET 21d

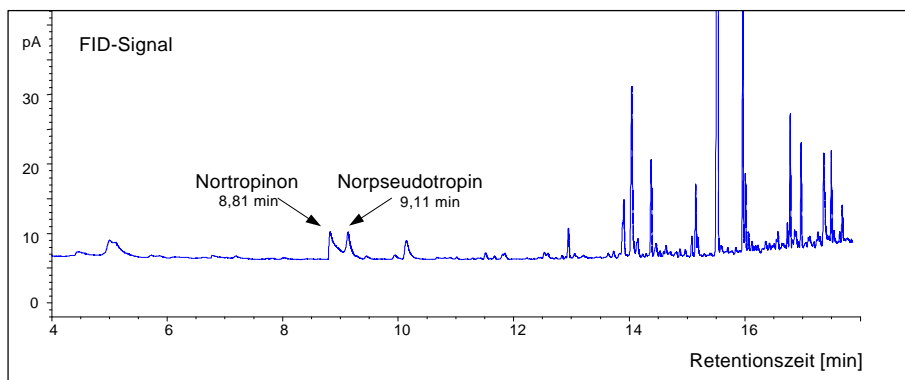
**Abb. G-12:** Die *Solanum tuberosum*-*TRI*-cDNA (*StTRI*-SE, 795 bp des codierenden Bereiches) ist eingefügt zwischen der *Nco*I und der *Xho*I Restriktionsschnittstelle des pET21d Vektors (Novagen). Die Möglichkeit einer C-terminalen 6xHis-Fusion wurde genutzt.

## G 6 Umsetzungsprodukte des Enzymassay

### G 6.1 Umsetzungsprodukte des StTRII-Enzyms

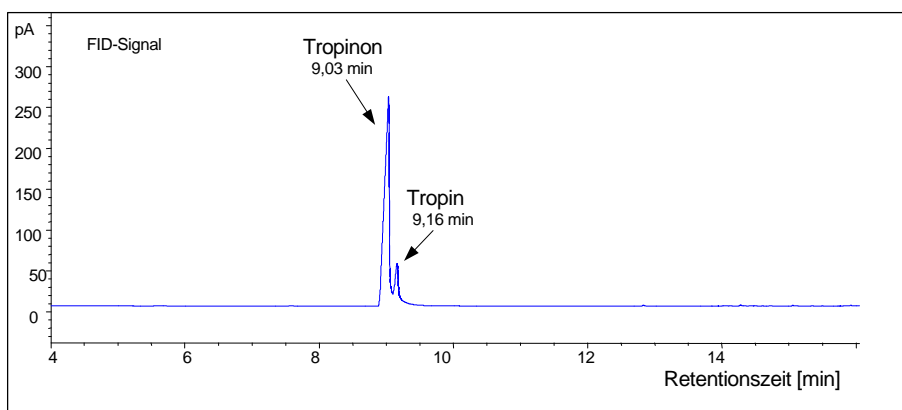


**Abb. G-13:** Gaschromatogramm (FID-Signal) der Tropinonumsetzung durch StTRII-L1 (rekombinantes Enzym).

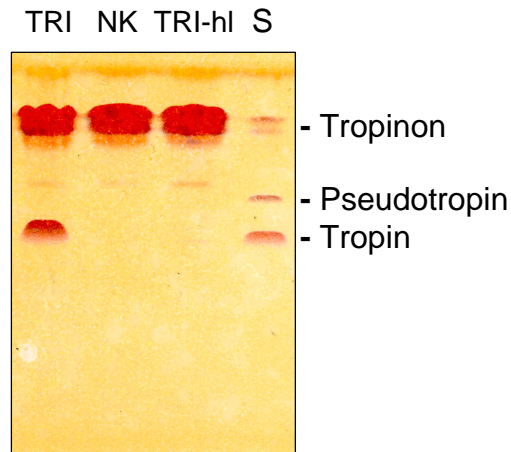


**Abb. G-14:** Gaschromatogramm (FID-Signal) der Nortropinonumsetzung durch StTRII-L1 (rekombinantes Enzym).

### G 6.2 Umsetzungsprodukte des StTRI und des StTRI-homologen Enzyms



**Abb. G-15:** Gaschromatogramm (FID-Signal) der Tropinonumsetzung durch StTRI-SE rekombinantes Enzym.



**Abb. G-16:** Dünnschichtchromatogramm der Tropinonumsetzung durch rekombinate TRI Enzyme. TRI: StTRI-SE; NK: Negativkontrolle, TRI-hl: StTRI-homologes Protein; S: Standardsubstanzen (Tropinon [ $R_f$ : 0,84], Pseudotropin [ $R_f$ : 0,63] und Tropin [ $R_f$ : 0,53]).

## G 7 Charakterisierung des TRII-Enzyms

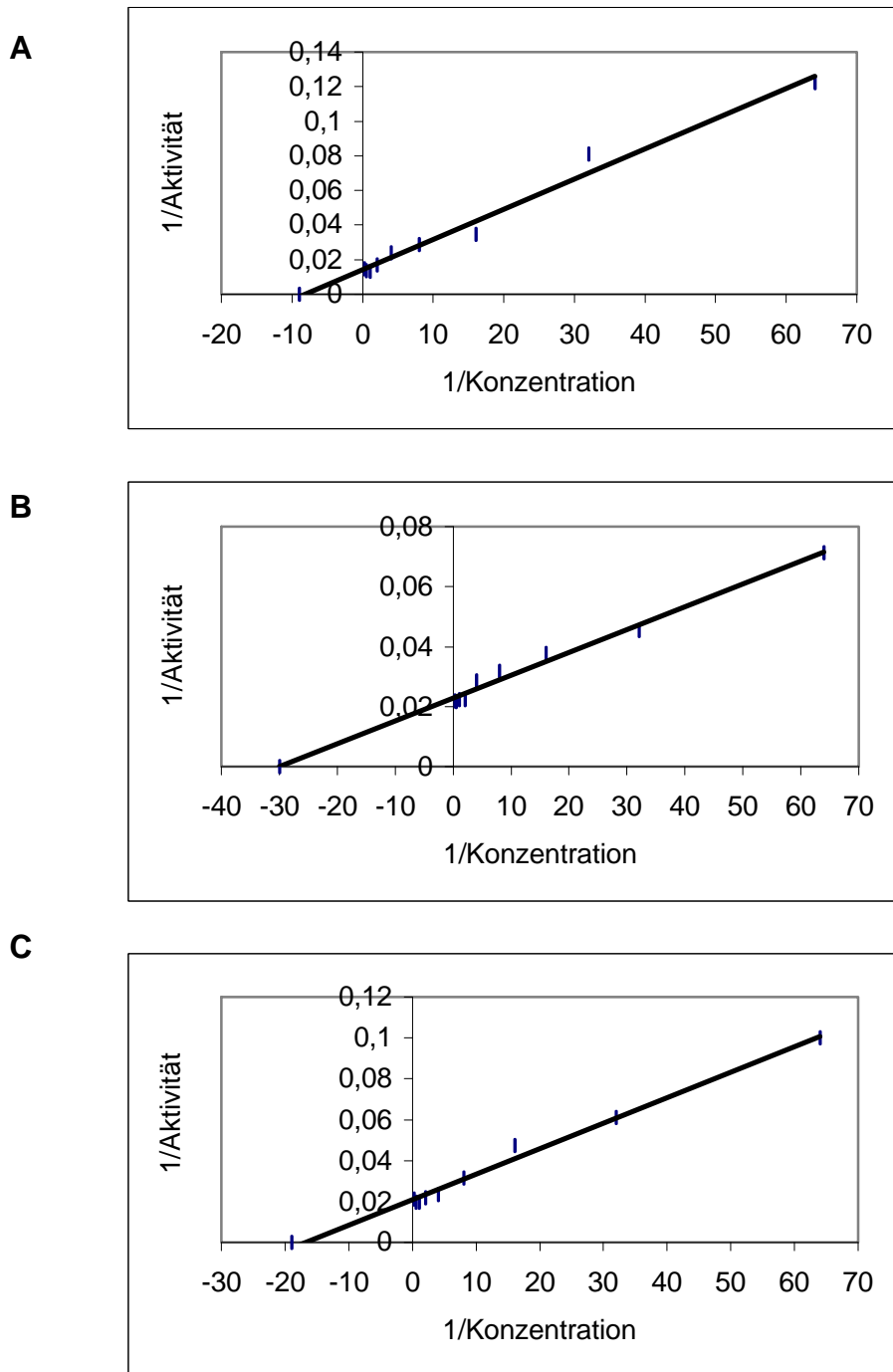
### G 7.1 pH-Abhängigkeit der TRII-Aktivität

pH-Wert	MW Aktivität [pkat]	relative Aktivität [%]	SD	relative SD [%]	Messungen n
3,5	138,3	38			1
4,0	168,4	46			1
4,5	310,0	84			1
5,0	368,4	100	26,4	7,2	5
5,5	319,1	87	36,5	11,4	5
6,0	331,4	90	29,6	8,9	5
6,5	313,5	85	22,7	7,2	5
7,0	297,9	81	14,4	4,8	5
7,5	281,5	76	27,4	9,7	5
8,0	286,0	78	40,4	15,2	4
8,5	258,4	70	35,7	13,8	5

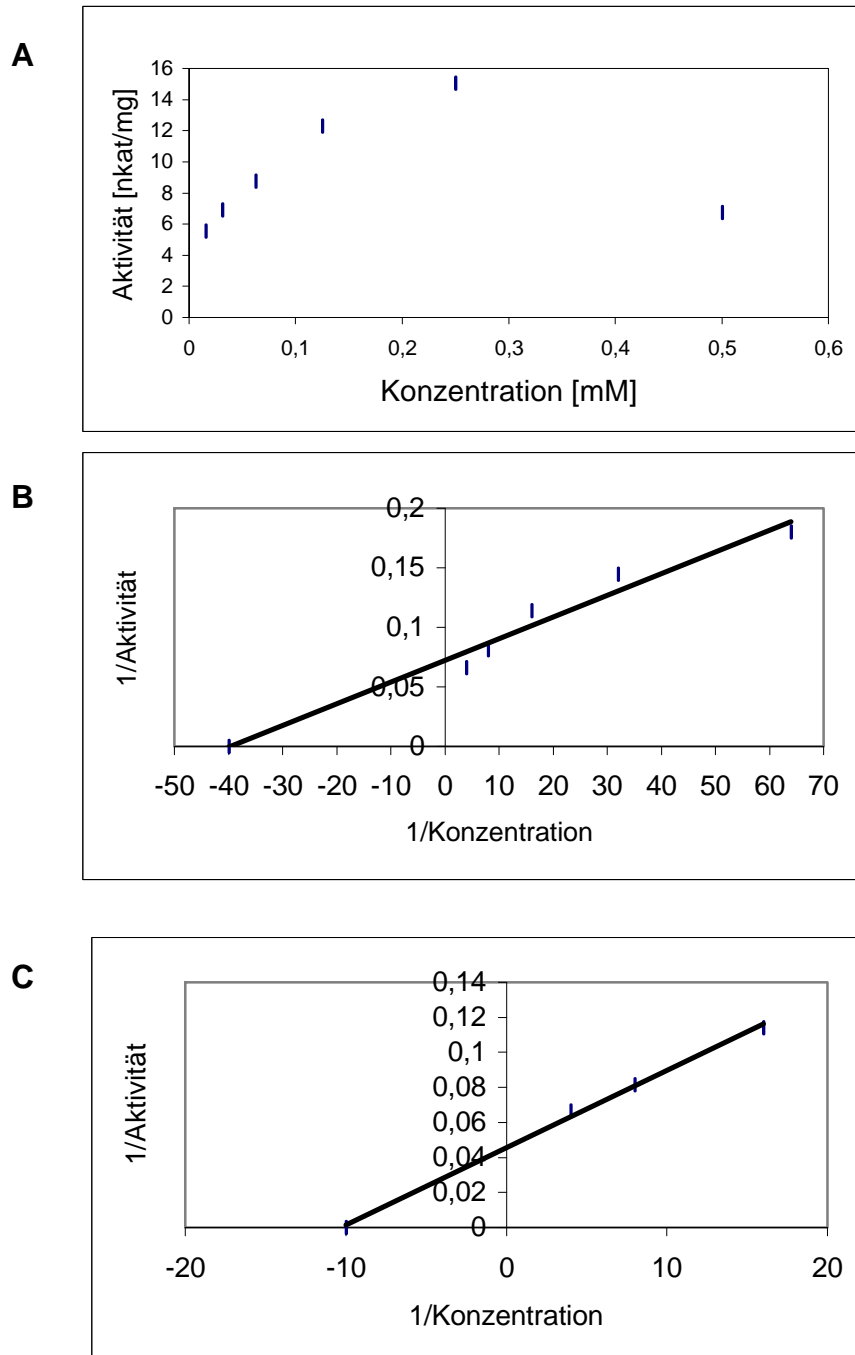
**Tab: G-6:** pH-Abhängigkeit der Tropinonumsetzung durch rekombinante TRII.

pH-Wert	MW Aktivität [pkat]	relative Aktivität [%]	SD	relative SD [%]	Messungen n
3,5	0	0			1
4,0	0	0			1
4,5	0,7	1,8			1
5,0	23,5	59,4	2,1	9,0	3
5,5	22,8	57,8	2,8	12,4	3
6,0	34,5	87,4	3,4	10,0	3
6,5	39,5	100,0	2,0	5,1	3
7,0	25,6	64,8	6,7	26,1	3
7,5	28,1	71,2	3,3	11,6	3
8,0	25,4	64,4	4,2	16,4	3
8,5	31,9	80,9	5,6	17,5	3

**Tab. G-7:** pH-Abhängigkeit der Nortropinonumsetzung durch rekombinantes TRII.

G 7.2  $K_m$  und  $V_{max}$  Bestimmung

**Abb. G-17:**  $K_m$  und  $V_{max}$  Bestimmung der TRII bei der Umsetzung von Tropinon. Lineweaver-Burk Darstellung. A: pH 5,5; B: pH 6,4 und C: pH 7,6.



**Abb. G-18:** Kinetische Parameter der TR11 bei der Umsetzung von Nortropinon bei pH 6.4. A: Michaelis-Menten Kinetik; B: Lineweaver-Burk Darstellung im Konzentrationsbereich von 0,01562 bis 0,25 mM; C: Lineweaver-Burk Darstellung im Konzentrationsbereich von 0,01562 bis 0,0625 mM

### G 7.3 Umsetzung von Substratanaloga

Substrat	relative Aktivität [%]	SD
Tropinon	100,0	5,4
Nortropinon	20,2	4,6
Chinuclidin-3-on	0,0	0,0
<i>N</i> -Methylpiperidin-4-on	141,6	41,4
<i>N</i> -Propylpiperidin-4-on	82,6	15,9
3-Methylcyclohexanon	13,4	2,7
4-Methylcyclohexanon	17,2	3,0

**Tab. G-8:** Mittelwerte und Standardabweichungen der StTRII-Umsetzung verschiedener Substratanaloga.



## Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie des Fachbereiches Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Meinen besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Birgit Dräger für die Überlassung der sehr interessanten Thematik sowie für die stete Unterstützung, Förderung und Diskussionsbereitschaft aussprechen.

Frau Prof. Birgit Dräger und Herrn Prof. Takashi Hashimoto danke ich für die Schaffung der Möglichkeit eines 10wöchigen Forschungsaufenthaltes an der *Graduate School of Biological Sciences* des *Nara Institute of Science and Technology* (NAIST), Nara (Japan). Zu großem Dank bin ich Herrn Keiji Nakajima (NAIST) für die anschauliche Einführung in die Techniken der Molekularbiologie und für die intensive Zusammenarbeit verpflichtet, die wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Heike Kaiser danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der partiellen Reinigung der TRII und deren Charakterisierung. Großer Dank gilt Grit Rothe, Yvonne Scholz, Heike Kaiser, Dirk Höke, Olaf Stenzel und Tino Galgon für ihre Unterstützung, die fachlichen Diskussionen und das außergewöhnlich hilfsbereite und freundschaftliche Arbeitsklima.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter des Institutes für Pharmazeutische Biologie, die durch ihre Anregungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, hervorheben möchte ich Frau Ursula Ködel und Frau Beate Schöne. Mit ihren Erfahrungen und technischer Unterstützung waren sie als „gute Geister“ eine große Hilfe bei der Laborarbeit. Frau Brigitte Marx und Herrn Dr. Peter Lindemann danke ich für die Aufnahme der Massespektren.

Bei Frau Dr. A. Peterson, Biozentrum Halle, möchte ich mich für die Durchführung der DNA-Sequenzierungen am A.L.F.-Sequenziergerät bedanken.

Julia Petters, Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, danke ich für den Technologietransfer bei der Durchführung des Southern Blot Experimentes.

Herrn Naoki Asano, Kanazawa University, Kanazawa (Japan), möchte ich für die Überlassung der Calysteginstandards und für die gewährte Gastfreundschaft danken.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Gärtnerei für die Pflege der Kartoffelpflanzen.

Teile der Arbeit wurden im Rahmen eines JSPS/DFG-Projektes (446 JAP-113/190/0) angefertigt. Für die gewährte finanzielle Unterstützung während des Forschungsaufenthaltes am NAIST-Institut in Japan danke ich.

Für die Gewährung eines Stipendiums nach Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt möchte ich mich ebenfalls bedanken.

## Curriculum vitae

### Ronald Keiner

Apotheker  
geb. 03.03.1970 in Jena

Familienstand:  
ledig; keine Kinder

### Schulbildung

1976-1986 Polytechnische Oberschule in Jena/Thüringen  
1986-1988 Erweiterte Oberschule in Jena/Thüringen (Hochschulreife)

### Studium & Berufserfahrung

1988-1989 Nord Apotheke Jena  
Vorbereitungspraktikum für das Pharmazie Studium  
1989-1993 Studium der Pharmazie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle  
10/1993-06/1994 Universidad Nacional de la Libertad, Institut für Toxikologie  
Trujillo/Peru  
6 Monate Praktikum im Rahmen des praktischen Jahres  
10/1994-03/1995 Palmen Apotheke, Berlin  
Praktikum im Rahmen des praktischen Jahres  
12.05.1995 Approbation zum Apotheker  
06/1995-10/1995 Reil Apotheke, Halle  
Tätigkeit als Apotheker  
11/1995-12/1996 Studienreise durch Asien  
mehrwöchige Tätigkeit als Volontär bei Calcutta Rescue Clinic  
Kalkutta/Indien

### wissenschaftliche Tätigkeiten

02/1997-08/2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,  
AG Frau Prof. Dr. Birgit Dräger, Erarbeitung einer  
Promotionsarbeit  
Thema: Calystegine in *Solanum tuberosum* L. - Klonierung,  
Expression und Charakterisierung der Tropinonreduktasen I  
und II, putativer Enzyme des Tropanalkaloidstoffwechsels.  
seit 08/2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Merck KGaA, Darmstadt

Halle, den 28.10.2001

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 28.10 2001