

Regulation und Manipulation der Tropanalkaloidbiosynthese in *Atropa belladonna* L.

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

vorgelegt der

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

von

Frau Dipl.-Pharm. Grit Rothe geboren am 23.04.1973 in Merseburg

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Birgit Dräger
- 2. Prof. Dr. Maike Petersen
- 3. Prof. Dr. Martin Luckner

Halle (Saale), den 26.07.02

urn:nbn:de:gbv:3-000003766 [http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003766]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsver	zeichnis	a
Abkürzun	gsverzeichnis	e
Abbildung	gs- und Tabellenverzeichnis	h
Publikatio	nen und wissenschaftliche Beiträge	k
A EINLE	EITUNG	1
Δ1 Du	E PELANZE ATROPA BELLADONNA I	1
A 1 1	SYSTEMATIK UND MORPHOLOGIE	1
A12	INHALTSSTOFFE	1
A2 TR	OPANALKALOIDE	3
A 2.1	Sekundärstoff Alkaloid	3
A 2.2	TROPANALKALOIDBIOSYNTHESE	4
A 2.3	ANALYTIK DER TROPANALKALOIDE	7
A 2.4	PHARMAZEUTISCHE BEDEUTUNG DER TROPANALKALOIDE	8
A 2.4.1	TRI-Alkaloide (Klassische Tropanalkaloide)	8
A 2.4.2	TRII-Alkaloide (Nortropanalkaloide)	8
A 2.5	REGULATION DER TROPANALKALOIDAKKUMULATION	9
A 2.5.1	Direkte Beeinflussung durch Transformation	9
A 2.5.2	Indirekte Beeinflussung durch Kultivierung	10
A 3 AL	JFGABENSTELLUNG	12
		4 6
		15
B1 MA	ATERIAL	15
B 1.1	PFLANZEN	15
B 1.1.1	Samensterilisation	15
B 1.1.2	Kultivierung	15
B 1.1.2.1	Becherglas	15
B 1.1.2.2	Klimakammer	15
B 1.1.2.3	Gewächshaus	15
B 1.1.3	Regeneration transformierter Pflanzen	16
B 1.2	WURZELKULTUREN	16
B 1.2.1	Hairy roots	16
B 1.2.1.1	Gewinnung und Kultivierung	16
B 1.2.1.2	Nährmediummodifikation	16
B 1.2.1.3	Kohlenhydrate und Zusätze	17
B 1.2.1.4	Elicitor- und Phytohormonzusatz	17
B 1.2.1.5	Präcursorzusatz	17
B 1.2.2	PMT-Wurzelkulturen	18
B 1.2.2.1	Gewinnung und Kultivierung	18
B 1.2.3	TR-Wurzelkulturen	18
B 1.2.3.1	Regeneration und Kultivierung	18
B 1.3	BAKTERIEN	18
B 1.3.1	Escherichia coli	18
B 1.3.1.1	Kultivierung und Transformation	18
B 1.3.2	Agrobakterien	19
B 1.3.2.1	Stämme und Kultivierung	19
B 1.3.2.2	Herstellung kompetenter Zellen	19
		~~

B 1.3.2.4	Pflanzentransformation	
B 1.4	KLONIERUNGSVEKTOREN	
B 1.5	OLIGONUKLEOTIDE	
B 1.6	KITS UND ENZYME	
B 1.7	PUFFER, STANDARDLÖSUNGEN UND MEDIEN	
B 1.8	CHEMIKALIEN UND STANDARDS	
B 1.9	GERÄTE UND HILFSMITTEL	22
B2 ME	THODEN	
B 2.1	ANALYTISCHE METHODEN	22
B 2.1.1	Isolierung der Intermediate	
B 2.1.2	Isolierung der TRI-Alkaloide	
B 2.1.3	Isolierung und Derivatisierung der TRII-Alkaloide	
B 2.1.4	AMD-TLC	
B 2.1.5	GC	
B 2.1.6	GC-MS	
B 2.2	BIOCHEMISCHE METHODEN	
B 2.2.1	TR-Bestimmung	
B 2.2.1.1	Extraktion und Präzipitation	
B 2.2.1.2	Enzymassay	
B 2.2.1.3	Proteinbestimmung	
B 2.2.2	GUS-Test	
B 2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	
B 2.3.1	DNA-Präparation	
B 2.3.1.1	Genomische DNA	
B 2.3.1.2	Plasmid-DNA aus Escherichia coli	29
B 2.3.1.3	Plasmid-DNA aus Agrobakterien	29
B232	Agarosegelelektrophorese	29
B 2.3.2.1	Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese	29
B2322	Flution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
B 2 3 3	Klonierung	29
B2331	Restriktion	29
B2332	Ligation	29
B 2 3 4	PCR	
B2341	Plasmid-PCR	
B2342	Kolonie-PCR	
B 2 3 4 3	Selektions-PCR	30
B 2 3 5	Sequenzierung	31
B236	Dot Blot Analyse	
B2361	Vorbereitung	۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰۰
B2362	Radioaktive Sondenmarkierung	
B 2 3 6 3	Radioaktive Hybridisierung	
B 2 3 7	DNA Drängration	
B238	Agarosegelelektronborese	
D 2.3.0 B 2 3 8 1	Ayarosegelelektrophorese	
D 2.0.0.1	Northern Blot Analyse	ວ2 ວາ
D 2.3.3 D 7 7 0 4	Transfor	20کې
D 2.3.9.1	Dadioaktivo Sondonmarkiarung	ა2 იი
D 2.3.9.2	Radioaktive Sullutilliaikituliy	22ع مور
D 2.3.9.3	Rauluakuve mybriulsielülly	
<u>C ERGE</u>	BNISSE	<u></u>

C 1	TROPANALKALOIDE	
C 2	BEEINFLUSSUNG DER REGULATION DURCH TRANSFORMATION	35
C 2.1	REGULATIONSPUNKT PUTRESCIN-N-METHYLTRANSFERASE	35

C 2.1.1	Pflanzen	35
C 2.1.1.1	PMT-sense-Pflanzen	35
C 2.1.1.1.1	PMT-Transkription	36
C 2.1.1.1.2	2 Tropanalkaloidakkumulation	37
C 2.1.1.2	PMT-antisense-Pflanzen	40
C 2.1.2	Wurzelkulturen	42
C 2.1.2.1	PMT-sense-Wurzelkulturen	42
C 2.1.2.1.1	PMT-Transkription	42
C 2.1.2.1.2	2 Tropanalkaloidakkumulation	43
C 2.2	REGULATIONSPUNKT TROPINONREDUKTASEN	45
C 2.2.1	Konstrukte	45
C 2.2.2	Pflanzen	46
C 2.2.3	Wurzelkulturen	46
C 2.2.3.1	Wildtyp- und Vektorkontrollwurzelkulturen	
C_{2232}	TRI-sense-Wurzelkulturen	48
C_{22321}	Transformationsnachweis und Transkription	48
C_{22322}	2 Intermediate und Tropanalkaloide	48
C 2 2 3 3	TRI-antisense-Wurzelkulturen	10 51
C 2 2 3 3 1	Transformationsnachweis	51
C 2 2 3 3 2	Intermediate und Tropanalkaloide	51 51
$C_{2,2,3,3,2}$		51 52
$C_{2,2,3,4}$	Transformationspachwois	JZ 52
C 2.2.3.4.1	Indisionations and Transpolycoloida	52 52
C 2.2.3.4.2		33 EA
	CINFLUSSUNG DER REGULATION DURCH RULTIVIERUNG	34 54
		34 54
$C_{3.1.1}$	Wulzeikultuleii	54 54
$C_{3,1,1,1}$	Nanrmediumbestanotelle	54
$C_{3,1,1,1,1}$	Mediumkonzentration.	54
0 3.1.1.1.2		58
03.1.1.2		61
C 3.1.1.2.1	Elicitoren Methyljasmonat und Abscisinsaure	61
C 3.1.1.2.2	Phytohormone Auxin und Cytokinin	63
C 3.1.1.2.3	Präcursor Tropinon	64
C 3.2	REGULATIONSFAKTOR UMGEBUNG	65
C 3.2.1	Wurzelkulturen	65
C 3.2.1.1	Belichtung	65
<u>D DISKU</u>	SSION	68
-		
	EKTE BEEINFLUSSUNG DER TROPANALKALOIDBIOSYNTHESE DURCH	~~
IRANSFOR		68
D 1.1	AGROBAKTERIEN UND VEKTOREN	68
D 1.1.1	A. tumetaciens LBA 4404	68
D 1.1.2	A. rhizogenes 15834	69
D 1.2		70
D 1.2.1	PMT-sense-Ptlanzen	70
D 1.2.2	PMI-antisense-Ptlanzen	72
D 1.2.3	PMT-sense-Wurzelkulturen	73
D 1.3	BIOSYNTHESEENZYME TRI UND TRII	74
D 1.3.1	TRI- <i>sense</i> -Wurzelkulturen	74
D 1.3.2	TRI-antisense- und TRII-sense-Wurzelkulturen	74
D 1.3.3	TR von A. belladonna	75
D 1.4	PMT UND TR IN DER TROPANALKALOIDBIOSYNTHESE	76
D 1.4.1	Expression und Lokalisation	76

D 1.4.2	2 Bedeutung in der Regulation	77
D 2	INDIREKTE BEEINFLUSSUNG DER TROPANALKALOIDBIOSYNTHESE DURCH	
KULTIN	/IERUNG	79
D 2.1	NÄHRMEDIUMMODIFIKATION	79
D 2.2	KOHLENHYDRAT	80
D 2.3	ELICITOREN UND PHYTOHORMONE	81
D 2.4	Präcursor	83
D 2.5	LICHT	83
D 3	AUSBLICK	84
<u>e</u> zu	SAMMENFASSUNG	

AN	HANG	<u></u>
	INTERMEDIAT- UND ALKALOIDBESTIMMUNG	I
.1	INTERMEDIATE	I
.2	TRI-ALKALOIDE (KLASSISCHE TROPANALKALOIDE)	II
.3	TRII-ALKALOIDE (NORTROPANALKALOIDE)	IV
2	TRANSFORMATION	V
2.1	РМТ	V
2.1.1	PMT- <i>sense</i> - Pflanzen	V
2.1.2	PMT- <i>antisense</i> -Pflanzen	VI
2.1.3	PMT-sense- Wurzelkulturen	VI
2.2	TR	VII
2.2.1	TRI- <i>sense</i> -Wurzelkulturen	VII
2.2.2	2. TRI- <i>antisense</i> -Wurzelkulturen	VII
2.2.3	TRII-sense-Wurzelkulturen	VIII
3		IX
3.1	NÄHRMEDIUMBESTANDTEILE UND -ZUSÄTZE	IX
3.1.1	Mediumkonzentration	IX
3.1.2	2. Kohlenhydratquelle und Zuckersignal	IX
3.1.3	Elicitoren	X
3.1.4	Phytohormone	XI
3.2	UMGEBUNGSFAKTOR LICHT	XI
	ANI 1.1 1.2 1.3 2.1.1 2.1.2 2.2.1 2.2.1 3.1.2 2.2.3 3.1.1 3.1.3 3.1.4 3.1.4 3.2	ANHANG. INTERMEDIAT- UND ALKALOIDBESTIMMUNG 1.1 INTERMEDIATE 2 TRI-ALKALOIDE (KLASSISCHE TROPANALKALOIDE) 1.3 TRII-ALKALOIDE (NORTROPANALKALOIDE) 2.4 PMT 2.1 PMT-sense- Pflanzen 2.1.2 PMT-antisense-Pflanzen 2.1.3 PMT-sense- Wurzelkulturen 2.2 TR 2.1.1 TRI-sense-Wurzelkulturen 2.1.2 PMT-antisense-Pflanzen 2.1.3 PMT-sense- Wurzelkulturen 2.2 TR 2.1.1 TRI-sense-Wurzelkulturen 2.2 TRI-antisense-Wurzelkulturen 2.2.1 TRI-sense-Wurzelkulturen 2.2.2 TRI-antisense-Wurzelkulturen 3.1 NÄHRMEDIUMBESTANDTEILE UND -ZUSÄTZE 3.1.1 Mediumkonzentration 3.1.2 Kohlenhydratquelle und Zuckersignal 3.1.3 Elicitoren 3.1.4 Phytohormone 3.2 UMGEBUNGSFAKTOR LICHT

Abkürzungsverzeichnis

A. belladonna	Atropa belladonna
A. rhizogenes	Agrobacterium rhizogenes
A. tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
ABA	Abscisinsäure
ADC	Arginindecarboxylase
AMD-TLC	automated multiple development-TLC
antisense	3`-5`Orientierung einer cDNA
ARG	Arginase
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BA	<i>N</i> ⁶ -Benzyladenin
bp (kbp)	Basenpaare (Kilo-)
bzw.	beziehungsweise
B5(-Medium)	Nährmedium nach Gamborg 1968
1⁄2 B5	B5-Medium mit halber Konzentration
°C	Grad Celsius
CaMV 35S-Promotor	cauliflower mosaic virus 35S-Promotor
cDNA	complementary DNA
Ci (µCi, mCi)	Curie (Mikro-, Milli-)
d	Tag(e)
D. stramonium	Datura stramonium
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTR	Datura stramonium TR
DTRI	Datura stramonium TRI
DTRII	Datura stramonium TRII
EC	enzyme classification
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
g (ng, µg, mg)	Gramm (Nano-, Mikro-, Milli-)
GC	Gaschromatograph(ie)
GC-MS	Gaschromatograph(ie) mit massenspezifischem Detektor
GUS	ß-Glukuronidase
h	Stunde(n)
H. muticus	Hyoscyamus muticus
H. niger	Hyoscyamus niger
H6H	Hyoscyamin-6ß-hydroxylase
H11	Tabak-PMT-cDNA überexprimierende Linie
H11/2	Tabak-PMT-cDNA überexprimierende Linie Nummer 2
H11/3	Tabak-PMT-cDNA überexprimierende Linie Nummer 3
HPLC	high performance liquid chromatography
IBA	Indol-3-buttersäure
kPa	Kilopascal

l (µl, ml)	Liter (Mikro-, Milli-)
LB	<i>left border</i> (linke T-DNA-Grenze)
M (µM, mM)	Mol (Mikro-, Milli-)
MeJA	Methyljasmonat
min	Minute(n)
mOsmol/kg	Milliosmol/Kilogramm
MPO	N-Methylputrescinoxidase
mRNA	messenger RNA
mS/cm	Millisiemens pro Zentimeter
Ν	Normal
<i>N. tabacum /</i> Nt	Nicotiana tabacum
NADP⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (reduzierte Form)
nkat/g	Nanokatal/Gramm
nptll	Neomycin-Phosphotransferase-II-Gen (Kanamycinresistenzgen)
OD ₆₀₀	optische Dichte (bezogen auf 1 cm Küvettenbreite) bei 600 nm
ODC	Ornithindecarboxvlase
PCR	polymerase chain reaction
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMT	Putrescin-N-methyltransferase
PND	Phosphor-Stickstoff-sensitiver Detektor
RB	right border (rechte T-DNA-Grenze)
Ri-Plasmid	Plasmid aus A. rhizogenes
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen/min
(18S) rRNA	ribosomale RNA (Untereinheit 18)
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SD	standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
sense	5`-3`-Orientierung einer cDNA
SPDS	Spermidinsynthase
SPS	Sperminsynthase
T-DNA	Transfer-DNA, Abschnitt auf dem Ti-/Ri-Plasmid
Ti-Plasmid	Plasmid aus <i>A. tumefaciens</i>
TLC	thin layer chromatography
ТМ	Trockenmasse
TR	Tropinonreduktase(n)
TRI	tropinformende Tropinonreduktase
TRII	pseudotropinformende Tropinonreduktase
T1, T2 etc.	1., 2. Tochtergeneration
U	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
UDP	Uridindiphosphat
uidA	Glukuronidasegen
UV	ultraviolett
var.	Varietät

VC	Vektor
vgl.	vergleiche
<i>vir</i> -Gene	Virulenzgene
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung A.1 Atropa belladonna L	2
Abbildung A.2 Atropa belladonna var. lutea L	2
Abbildung A.3 Tropanalkaloidbiosynthese	5
Abbildung A.4 Untersuchungen der vorliegenden Arbeit	14
Abbildung C.1 In verschiedenen Atropageweben reproduzierbar quantifizierte TRII-Alkaloide	34
Abbildung C.2 Tabak-PMT-Transkriptakkumulation in Blättern	36
Abbildung C.3 Alkaloidakkumulation verschiedener Gewebe unterschiedlicher A. belladonna-	
Pflanzen, 3 Monate alt	39
Abbildung C.4 Alkaloidakkumulation verschiedener Gewebe unterschiedlicher A. belladonna-	
Pflanzen, 7 Monate alt	40
Abbildung C.5 Schematische Darstellung der A. belladonna-PMT-Konstruktion im binären Vekto	or
pBI121	41
Abbildung C.6 Atropa belladonna-Pflanzen nach antisense-Transformation mit homologer PMT	_
cDNA	41
Abbildung C.7 Transkriptakkumulation der Tabak- und Atropa-PMT in Wurzelkulturen	43
Abbildung C.8 Alkaloidakkumulation unterschiedlicher Wurzelkulturen nach Kultivierung auf	
verschiedenen B5-Medien	44
Abbildung C.9 Schematische Darstellung der D. stramonium TRI-Konstrukte: (A) sense-	
Konstruktion, (B) antisense-Konstruktion im binären Vektor pBI121	45
Abbildung C.10 Wurzelbildung an einem mit DTRII-sense-Konstrukt transformierten Blatt	46
Abbildung C.11 Charakteristisches Wachstum zweier DTRII-sense-Wurzelkulturen	47
Abbildung C.12 Intermediatakkumulation von DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt	50
Abbildung C.13 Alkaloidakkumulation von DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt	50
Abbildung C.14 Stärkeeinlagerung bei unterschiedlich kultivierten hairy roots	55
Abbildung C.15 Alkaloidakkumulation unterschiedlich alter hairy roots auf B5-Medium	56
Abbildung C.16 Alkaloidakkumulation unterschiedlich alter hairy roots auf B5-Medium mit 5 %	
Saccharose	57
Abbildung C.17 Alkaloidakkumulation unterschiedlich alter hairy roots auf ½ B5-Medium mit 5 %	6
Saccharose	57
Abbildung C.18 Alkaloidakkumulation von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung auf verschieden	en
Kohlenhydratquellen	59
Abbildung C.19 Alkaloidakkumulation nach 4-tägiger Kultivierung mit und ohne Zusatz des	
Hexokinaseinhibitors N-Acetylglucosamin	60
Abbildung C.20 Alkaloidakkumulation nach Zusatz von MeJA und ABA	62
Abbildung C.21 Alkaloidakkumulation nach 4-tägiger Kultivierung unter Phytohormonzusatz	63
Abbildung C.22 Alkaloidakkumulation von hairy roots, mit und ohne Licht kultiviert	66

Abbildung C.23 Wurzelquerschnitte von hairy roots, mit und ohne Licht kultiviert	67
Abbildung D.1 Schematische Darstellung der Lokalisation von PMT, TRI und TRII in verschieden	en
Zellschichten der Wurzeln	77
Abbildung G.1 Eichgerade zur Berechnung des Tropinongehaltes	1
Abbildung G.2 Eichgerade zur Berechnung des Tropingehaltes	1
Abbildung G.3 Eichgerade zur Berechnung des Pseudotropingehaltes	11
Abbildung G.4 Eichgerade zur Berechnung des 6-Hydroxyhyoscyamingehaltes	11
Abbildung G.5 Eichgerade zur Berechnung des Hyoscyamingehaltes	. 111
Abbildung G.6 Eichgerade zur Berechnung des Scopolamingehaltes	. 111
Abbildung G.7 Eichgerade zur Berechnung der Calystegingehalte der A-Gruppe	. IV
Abbildung G.8 Eichgerade zur Berechnung der Calystegingehalte der B-Gruppe	. IV

<u>Tabellenverzeichnis</u>

Tabelle B.1 Verwendete Plasmidvektoren	. 20
Tabelle B.2 Oligonukleotidprimer	. 21
Tabelle B.3 Verwendete Kits und Enzyme	. 21
Tabelle B.4 Chemikalien, die von anderen Firmen bezogen wurden	. 22
Tabelle C.1 Gesamtalkaloidakkumulation unterschiedlicher, im Becherglas (auf B5-Medium ohne	е
Saccharose) kultivierter Pflanzen	. 38
Tabelle C.2 Intermediat- und Alkaloidverhältnisse von DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt	. 49
Tabelle C.3 Gesamtintermediatakkumulation von DTRI-antisense-Wurzelkulturen, 28 d alt	. 51
Tabelle C.4 Gesamtalkaloidakkumulation von DTRI-antisense-Wurzelkulturen, 28 d alt	. 52
Tabelle C.5 Gesamtintermediatakkumulation von DTRII-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt	. 53
Tabelle C.6 Gesamtalkaloidakkumulation von DTRII-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt	. 53
Tabelle C.7 Gesamtalkaloidakkumulation verschieden kultivierter hairy roots am 27. Tag	. 56
Tabelle C.8 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung a	uf
verschiedenen Kohlenhydratquellen	. 59
Tabelle C.9 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung	
unter Hexokinaseinhibitorzusatz	. 60
Tabelle C.10 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots nach 1- und 2-tägiger	
Kultivierung unter MeJA- oder ABA-Zusatz	. 62
Tabelle C.11 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung	auf
Saccharose oder Sorbitol unter Phytohormonzusatz	. 64
Tabelle C.12 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 14- und 28-tägiger	
Kultivierung auf B5-Medium mit oder ohne Licht	. 66
Tabelle E.1 Beeinflussung der Tropanalkaloidbiosynthese in A. belladonna-Wurzelkulturen	. 87
Tabelle G.1 Klimakammerkultivierung (3 Monate)	V
Tabelle G.2 Gewächshauskultivierung (7 Monate)	V
Tabelle G.3 Kanamycinresistente Pflanzen nach der Transformation mit dem PMT-antisense-	
Konstrukt	VI

Tabelle G.4 Alkaloidakkumulation verschieden kultivierter, 28 d alter PMT-sense-Wurzelkulturen	ı. VI
Tabelle G.5 Mit dem Datura-TRI-sense-Konstrukt transformierte Wurzelkulturen	. VII
Tabelle G.6 DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt	. VII
Tabelle G.7 Mit dem Datura-TRI-antisense-Konstrukt transformierte Wurzelkulturen	. VII
Tabelle G.8 DTRI-antisense-Wurzelkulturen, 28 d alt	VIII
Tabelle G.9 Mit dem Datura-TRII-sense-Konstrukt transformierte Wurzelkulturen	VIII
Tabelle G.10 DTRII-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt	VIII
Tabelle G.11 Nährmediummodifikation (hairy roots)	IX
Tabelle G.12 Kohlenhydratvariation, 4-tägige Kultivierung (hairy roots)	IX
Tabelle G.13 4-tägige Kultivierung von hairy roots auf unterschiedlichen Kohlenhydratquellen, m	nit
und ohne Hexokinaseinhibitorzusatz	X
Tabelle G.14 4-tägige Kultivierung von hairy roots auf unterschiedlichen Kohlenhydratquellen, m	nit
und ohne Kalziumkanalblockerzusatz	X
Tabelle G.15 Inkubation mit Signalstoffen (hairy roots)	X
Tabelle G.16 4-tägige Phytohormoninkubation (hairy roots)	XI
Tabelle G.17 Belichtung (hairy roots)	XI

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen, in denen Teile der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurden:

- Rothe, G., Garske, U., Dräger, B., 2001. Calystegines in root cultures of Atropa belladonna respond to sucrose, not to elicitation, <u>Plant Science</u> **160**, 1043-1053.
- Rothe, G., Dräger, B., 2002. Tropane alkaloids metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *A. belladonna*, bei Plant Science im Druck.

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen (Poster und Postervorstellung):

- Rothe, G., Böttcher, I., Dräger, B., 1998. Tropane alkaloids in hairy roots of Atropa belladonna and Calystegia sepium, PSE-Symposium "Future trends in Phytochemistry", Rolduc, Netherland.
- Rothe, G., Dräger, B., 2000. *Atropa belladonna* overexpressing PMT, Joint Meeting of GA, DPhG and German Botanical Society, Halle, Germany.

A 1 DIE PFLANZE ATROPA BELLADONNA L.

A 1.1 Systematik und Morphologie

Die Pflanze Atropa belladonna, die wegen der starken Giftwirkung der Beeren und deren Ähnlichkeit mit Kirschen den deutschen Namen Tollkirsche erhielt, ist dem Subtribus Lyciinae (Tribus Solaneae, Familie Solanaceae) zugeordnet (Hegnauer 1990). Der Gattungsname Atropa geht auf eine der drei griechischen Schicksalsgöttinen zurück, mit belladonna wird in der italienischen Sprache eine schöne Frau beschrieben. Letzteres bezieht sich auf das frühere Schönheitsideal großer Pupillen, die durch Eintropfen des pupillenerweiternd wirkenden Tollkirschensaftes in die Augen erzeugt werden können.

A. belladonna ist eine mehrjährige, 0,5 bis 2 m hohe Staude, die in Europa, Westasien sowie Nordafrika beheimatet ist. Auf Grund ihrer Bevorzugung von nährstoffreichen humosen Ton- und Lehmböden ist sie an Waldrändern, lichten Buchenwäldern und Kahlschlägen anzutreffen. Die Pflanze besitzt einen dicken, verzweigten Wurzelstock und wechselständig angeordnete, eiförmig lanzettliche Laubblätter. Die gestielten Blüten stehen einzeln oder als Wickel in den Blattachseln der Stängel (Sitte *et al.* 1998). Die glockige Blütenkrone ist violett bis braun oder im Fall der selten vorkommenden *lutea*-Varietät blassgelb (siehe Abbildung A.1 und Abbildung A.2). Der sich bei der Fruchtreife vergrößernde, sternförmig ausbreitende, fünfspaltige Kelch umschließt die kirschgroße, zunächst grüne Frucht. Bei der *lutea*-Varietät entwickelt sich daraus eine gelbe, bei der weiter verbreiteten, dunkleren Tollkirsche eine schwarzglänzende, saftige Beere (Dörfler und Roselt 1990).

A 1.2 Inhaltsstoffe

Alle Teile der Pflanze enthalten in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium, Standort und klimatischen Bedingungen ein hochwirksames Alkaloidgemisch wechselnder Zusammensetzung. Wie die meisten Vertreter der *Lyciinae*, die 14 Gattungen beinhaltet, enthält *A. belladonna* hauptsächlich Tropanalkaloide. Zu den Hauptalkaloiden zählen das L-Hyoscyamin als Vertreter der klassischen Tropanalkaloide (TRI-Alkaloide) und das Calystegin A₃ als Vertreter der Nortropanalkaloide (TRII-Alkaloide). Atropin, das Razemat des Hyoscyamins, wurde bereits 1833 aus der Wurzel von *A. belladonna* isoliert (Mein 1833). Die hydrophilen Nortropanalkaloide wurden erst 155 Jahre später nachgewiesen (Tepfer *et al.* 1988). Zu den weiteren nachgewiesenen Tropanalkaloiden gehören beispielsweise das Apoatropin (entsteht durch nichtenzymatische Wasserabspaltung aus Atropin), Belladon-

nin (Apoatropindimer), Cuskhygrin, Scopolamin sowie weitere Calystegine der A- und B-Gruppe. Ferner wurden in Blättern Spuren von Cumarinen (Scopolin), Flavonglykosiden, Gerbstoffen und organischen Säuren (z.B. Bernsteinsäure) identifiziert (Stahl und Schild 1981).



Abbildung A.1 Atropa belladonna L.



Abbildung A.2 Atropa belladonna var. lutea L. Die Bilder wurden auf einem Versuchsfeld der Firma Plantapharm, Artern aufgenommen.

A 2 TROPANALKALOIDE

A 2.1 Sekundärstoff Alkaloid

Pflanzen produzieren neben den lebensnotwendigen Primärstoffen eine Vielzahl von Sekundärstoffen, die innerhalb der verschiedenen Familien des Pflanzenreiches häufig unterschiedlich verteilt sind. Das Wissen über ihre biologische Bedeutung ist jedoch weitgehend begrenzt. Bei der Anpassung von Pflanzen an wechselnde ökologische Bedingungen spielen sie offenbar eine wichtige Rolle. So konnte für einige Sekundärstoffe eine Wirkung bei der Abwehr von pathogenen Organismen und Insekten nachgewiesen werden, andere zeigten eine Schutzwirkung bei Umweltstress (Kutchan 1995). Verschiedene Daten weisen ferner auf eine Signalwirkung der Sekundärstoffe innerhalb der pflanzlichen Entwicklung hin (Kutchan 2001). Die Feststellung, dass Produktion und Akkumulation von Sekundärstoffen räumlich und zeitlich begrenzt sind, spricht für diese Theorie (De Luca und St Pierre 2000). Weiterhin können direkte und indirekte Faktoren wie Phytohormone oder Licht die Sekundärstoffbildung beeinflussen (Hashimoto *et al.* 1985, Yazaki *et al.* 1999).

Zu den am besten untersuchten, in etwa 20 % aller Pflanzenarten nachgewiesenen stickstoffhaltigen, zumeist heterozyklischen Sekundärstoffen zählen die Alkaloide (De Luca und Laflamme 2001). Bisher konnten mehr als 12000 der natürlich und in einer enormen strukturellen Vielfalt vorkommenden Alkaloide isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden (Wink 1999). Wegen den teilweise überaus komplizierten Strukturen, die chemisch nicht oder wirtschaftlich nur unrentabel herstellbar sind, werden sie in den meisten Fällen aus Pflanzen isoliert. Auf Grund ihrer pharmakologischen Wirkungen werden viele Alkaloide seit Jahrhunderten als Gifte, Narkotika und Medikamente angewendet (Kutchan 1995). Mindestens ebenso lange ist die Verwendung alkaloidhaltiger Pflanzen als Farbstoffe oder Gewürze bekannt.

Die Alkaloide der Tropangruppe, bei denen es sich um Esteralkaloide bestehend aus einem bizyklischen Aminoalkohol (Alkamin) und einer aromatischen oder aliphatischen Säure handelt, verfügen über eine recht unterschiedliche Verteilung im Pflanzenreich. Die Tropasäureester des Tropins scheinen nur in Solanaceen vorzukommen. Alkaloide mit einem Tropangerüst wurden hingegen in verschiedenen Pflanzenfamilien wie z.B. Convolvulaceen, Erythroxylaceen, Moraceen oder Proteaceen nachgewiesen (Woolley 1993, Asano *et al.* 1997). Mittlerweile wurden mehr als 200 verschiedene Tropanalkaloide isoliert oder synthetisiert.

A 2.2 Tropanalkaloidbiosynthese

In der Tropanalkaloidbiosynthese bildet Putrescin das Bindeglied zwischen dem Primärund dem Sekundärstoffwechsel. Über diese Verbindung werden die Tropanalkaloide, Nikotin sowie die Polyamine Spermidin und Spermin gebildet (Hashimoto und Yamada 1993). Letztere zeichnen sich durch ihr ubiquitäres Vorkommen sowie durch ihre Beteiligung an zahlreichen regulatorischen Prozessen in allen Lebewesen aus (Galston *et al.* 1997, Bouchereau *et al.* 1999). Zum einen entsteht Putrescin durch Decarboxylierung von L-Ornithin durch das Enzym Ornithindecarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) und/oder zum anderen durch Decarboxylierung von L-Arginin durch das Enzym Arginindecarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) über die Zwischenprodukte Agmatin und *N*-Carbamoylputrescin (vgl. Abbildung A.3). Aus Arginin kann aber auch direkt durch das Enzym Arginase (ARG, EC 3.5.3.1) Ornithin gebildet werden. Die ODC kommt in allen lebenden Organismen vor. Von den Solanaceen *Datura stramonium* und *Nicotiana tabacum* wurden die cDNA-Sequenzen bereits identifiziert (Michael *et al.* 1996, Imanishi *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu fehlt den Säugetierzellen und vielen niederen Eukaryoten die ADC, deren cDNA beispielsweise aus *Lycopersicon esculentum* bekannt ist (Rastogi *et al.* 1993).

Mit der *N*-Methylierung des Putrescins erfolgt der erste spezifische Schritt innerhalb der Alkaloidbiosynthese (Leete 1990). Diese S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) abhängige Methylierung wird durch das Enzym Putrescin-*N*-methyltransferase katalysiert (PMT, EC 2.1.1.53). PMT-cDNA-Sequenzen, die bisher aus *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana sylvestris*, *Hyoscyamus niger* und *Atropa belladonna* isoliert wurden, zeigen hohe Homologien zu bekannten Spermidinsynthase-cDNA-Sequenzen (SPDS, EC 2.5.1.16) von Mensch, Maus und *Escherichia coli* (Hibi *et al.* 1994, Hashimoto *et al.* 1998a, Suzuki *et al.* 1999a). Kürzlich isolierte SPDS-cDNA-Sequenzen von *Nicotiana sylvestris*, *Hyoscyamus niger* und *Arabidopsis thaliana* weisen auf Aminosäureebene eine höhere Homologie zur Tabak-PMT als zu den oben genannten SPDS auf (Hashimoto *et al.* 1998b). Auf der Grundlage von phylogenetischen Analysen festigte sich die Meinung, dass die PMT evolutionär aus der SPDS hervorgegangen ist.

Das *N*-Methylputrescin wird nachfolgend durch die *N*-Methylputrescinoxidase (MPO, EC 1.4.3.6) oxidativ zum 4-Aminobutanal desaminiert (Hashimoto *et al.* 1990). Dieses zyklisiert spontan zum *N*-Methylpyrroliniumkation. Zunächst wurde die nachfolgende Bildung von Hygrin und dessen anschließende Zyklisierung zum Tropinon vermutet, enzymatische Schritte konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Leete 1990). Neuere Untersuchungen deuten auf 4-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-3-Oxobutanoat als Vorstufe des Tropinons hin (Robins *et al.* 1997).

Tropinon, das einen wichtigen Verzweigungspunkt innerhalb der Biosynthese darstellt, besitzt als erstes Intermediat dieser Biosynthese den Tropanring (vgl. Abbildung A.3).



Abbildung A.3 Tropanalkaloidbiosynthese

ODC: Ornithindecarboxylase; ADC: Arginindecarboxylase; ARG: Arginase; SPDS: Spermidinsynthase; SPS: Sperminsynthase; PMT: Putrescin-*N*-methyltransferase; MPO: *N*-Methylputrescinoxidase; TRI: Tropinonreduktase I; TRII: Tropinonreduktase II; H6H: Hyoscyamin-6*B*-hydroxylase; SAM: S-Adenosyl-L-Methionin; SAH: S-Adenosyl-L-Homocystein. Enzyme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind farblich unterlegt. Das Schema stellte freundlicherweise Herr Dr. R. Keiner zur Verfügung. NADPH-abhängig reduziert die Tropinonreduktase I (TRI, EC 1.1.1.206) Tropinon zu Tropin (Tropan-3α-ol, axiale Stellung der OH-Gruppe). TRI wurde erstmals in *D. stramo-nium*-Wurzelkulturen nachgewiesen (Koelen und Gross 1982). Die stereospezifische Reduktion des Tropinons durch die Tropinonreduktase II (TRII, EC 1.1.1.236) führt zur Bildung des Pseudotropins (Tropan-3*ß*-ol, äquatoriale Stellung der OH-Gruppe). Dräger und Mitarbeiter identifizierten diese TR in Wurzelkulturen von *H. niger* (Dräger *et al.* 1988). Die Tropinonreduktasen gehören zur Klasse der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR), die durch bestimmte Sequenzmotive charakterisiert sind (Jörnvall *et al.* 1995). Auf Grund der hohen Sequenzhomologie der TR-cDNA's wurde ein direktes Verwandschaftsverhältnis postuliert (Nakajima *et al.* 1993). Anhand stereo- und substratspezifischer Untersuchungen der TR-Enzyme sowie verschiedener TR-Mutanten konnten der C-terminalen Domäne die Substratbindungsstelle und der N-terminalen Region die NADPH-Bindungsstelle zugeordnet werden (Nakajima *et al.* 1994, 1998, 1999a).

Fütterungsversuche ergaben, dass Tropasäure bei der Bildung des L-Hyoscyamins nicht beteiligt ist. Stattdessen erfolgt die Veresterung von Tropin mit Phenylmilchsäure, deren Synthese vom Phenylalanin ausgeht. Dies führt zur Bildung von Littorin, das sich in einem bisher ungeklärten Mechanismus zum L-Hyoscyamin umlagert (Ansarin und Woolley 1993, Robins *et al.* 1994a). In einer zweistufigen enzymatischen Reaktion wird aus L-Hyoscyamin das 6,7-Epoxid L-Scopolamin gebildet. Sowohl die 6*ß*-Hydroxylierung des Tropanringes als auch die intramolekulare Epoxidbildung wird von der 2-oxoglutaratabhängigen Dioxygenase Hyoscyamin-6*ß*-hydroxylase (H6H, EC 1.14.11.11) katalysiert (Hashimoto und Yamada 1986, 1987). Dieses Enzym benötigt für seine Wirkung zudem Eisenionen, Ascorbat und molekularen Sauerstoff. Die erste H6H-cDNA wurde aus *H. niger*, später die aus *A. belladonna* isoliert (Matsuda *et al.* 1991, Suzuki *et al.* 1999b).

Pseudotropin ist das erste spezifische Intermediat auf dem Biosyntheseweg der Calystegine. Diese polyhydroxylierten Nortropanderivate sind Aminoketale, die ausschließlich in der bizyklischen Form vorliegen (Molyneux *et al.* 1996). Die Calystegine werden nach der Anzahl der Hydroxylgruppen in folgende Gruppen eingeteilt: die A-Gruppe beinhaltet trihydroxylierte, die B-Gruppe tetrahydroxylierte, die C-Gruppe pentahydroxylierte Nortropanderivate. Neben diesen klassischen Calysteginen existieren auch weniger typische Calystegine mit einem Tropanalkaloidgrundgerüst (N-Methylgruppe) und dihydroxylierte Nortropanalkaloide, denen die typische Aminoketalfunktion am Brückenkohlenstoffatom fehlt (Asano *et al.* 2001). Der Trivialname der Calystegine leitet sich von der Pflanze *Calystegia sepium* ab, in deren Wurzelexsudat diese Substanzen erstmalig nachgewiesen wurden (Tepfer *et al.* 1988). Fütterungen von Wurzelkulturen mit C¹⁴-markiertem Putrescin oder N¹⁵-markiertem Tropinon bewiesen den bis dahin vermuteten Einbau in die Calystegine (Goldmann *et al.* 1990, Dräger *et al.* 1994, Scholl *et al.* 2001b). Weitere Biosyntheseschritte, insbesondere die Demethylierung am Stickstoff und die Hydroxylierungen, sind bisher nicht aufgeklärt. Ersteres könnte durch Cytochrom P450-Enzyme und letzteres durch oxoglutaratabhängige Dioxygenasen katalysiert werden (Keiner 2001).

Weiterhin sind Acetyl- und Tigloylester, die auf enzymatischem Wege gebildet werden, sowohl von Tropin als auch von Pseudotropin bekannt. Bis auf das Acetyltropin in *D. stramonium*-Wurzelkulturen findet man diese Ester jedoch häufig nur in Spuren oder nach künstlicher Erhöhung der Tropinolmengen (Dräger *et al.* 1992).

A 2.3 Analytik der Tropanalkaloide

Die Alkaloide können mit Hilfe verschiedener chromatographischer Methoden qualitativ und quantitativ reproduzierbar erfasst werden. Unterschiedliche Polaritäten der Intermediate (Tropinon, Tropin und Pseudotropin), der lipophilen TRI-Alkaloide und der hydrophilen TRII-Alkaloide bedingen die getrennte Aufarbeitung der Proben und die Wahl unterschiedlicher Methoden für die Routinemessung (vgl. Abbildung A.3, siehe Kapitel B 2.1).

Für ein schnelles, sensitives Vorabscreening verschiedener Pflanzenextrakte und Proben bietet sich für die Alkaloide als auch für die Intermediate die AMD-TLC (*Automated Multiple Development - Thin Layer Chromatography*) an (siehe Kapitel B 2.1.4). Optimierte Methoden sind verfügbar (Scholl *et al.* 2001a).

Zur quantitativen Bestimmung werden die genannten Substanzen zumeist mittels Gaschromatographie (GC) getrennt, simultan stickstoffsensitiv (PND) und durch Flammenionisation (FID) detektiert (siehe Kapitel B 2.1.5). Die Tropanole und die TRI-Alkaloide zeichnen sich durch eine ausreichend hohe Flüchtigkeit aus, so dass eine direkte Vermessung möglich ist (Woolley 1993, Dräger 1995). Sie können jedoch auch in Analogie zu den TRII-Alkaloiden, die nicht flüchtig sind und somit derivatisiert werden müssen, vor der Vermessung einer milden Silylierung unterzogen werden (Molyneux *et al.* 1993). GC-MS-Messungen ermöglichen sichere und reproduzierbare Quantifizierungen unter Verwendung eines einzelnen Detektors.

HPLC-Trennungen der TRI-Alkaloide scheiterten zunächst an der Detektion, da sie sich auf Grund ihrer geringen UV-Absorption nicht für eine UV-Detektion eignen (Bogusz und Erkens 1994). Gegenwärtig werden die Proben elektrochemisch, amperometrisch, konduktometrisch oder massenspektrometrisch detektiert (Übersicht in Dräger 2002). Bei den TRII-Alkaloiden sind bisher weniger selektive HPLC-Messungen mit refraktometrischer Detektion beschrieben (Goldmann *et al.* 1990). Eine elektrochemische oder massenspektrometrische Detektion wäre auch hier empfehlenswert (Dräger 2002). Vor etwa 4 Jahren wurden die TRI-Derivate erstmals kapillarelektrophoretisch getrennt (Altria 1998). Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor. Zur Messung wurden nur geringe Probenvolumina benötigt (im Nanoliterbereich). Mittlerweile wurden viele unterschiedliche Methoden publiziert (Mateus *et al.* 2000). Auch die TRII-Alkaloide wurden bereits kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und mit einer gepulsten amperometrischen Detektion analysiert (Rüttinger und Dräger 2001). Die Tropanole sind auf diese Weise jedoch nicht bestimmbar.

A 2.4 Pharmazeutische Bedeutung der Tropanalkaloide

A 2.4.1 TRI-Alkaloide (Klassische Tropanalkaloide)

L-Hyoscyamin bzw. dessen Razemat Atropin und L-Scopolamin zählen wegen ihrer anticholinergen Wirkungen noch immer zu den wichtigsten Parasympatholytika. Bereits antike und mittelalterliche Heilkräuterbücher enthielten Hinweise zur medizinischen Anwendung von *A. belladonna*-Pflanzenauszügen (Dräger 1995).

Sowohl die peripheren als auch die zentralhemmenden Wirkungen von Atropin werden pharmazeutisch genutzt. Die parasympatholytischen Wirkungen, die zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur führen, begründen den Einsatz bei Krämpfen des Verdauungstraktes, der Harnblase sowie der Bronchien. Derzeitig wird es hauptsächlich zur Narkoseeinleitung bei Operationen, als Antidot bei Vergiftungen mit Alkylphosphaten sowie bei Überdosierungen mit Parasympathomimetika verwendet. Die Anwendung als Mydriatikum ist auf Grund der tagelang währenden Pupillenerweiterung mit aufgehobener Akkommodation obsolet. Die zentralerregenden Wirkungen treten bei Überdosierungen unter anderem in Form von Schleimhauttrockenheit, beschleunigtem Puls, Mydriasis und Halluzinationen bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen wie Delirien, klonischen Krämpfen mit anschließender Bewusstlosigkeit und Atemstillstand auf (Mutschler 1991).

L-Scopolamin razemisiert im Alkalischen weniger schnell als L-Hyoscyamin. Es wirkt im Zentralnervensystem ausschließlich dämpfend. In Form eines transdermalen therapeutischen Systems (TTS) wird Scopolamin daher zur antiemetischen Behandlung von Kinetosen eingesetzt. *N*-Butylscopolamin, das als quartäre Ammoniumverbindung nur peripher wirkt, wird als Spasmolytikum angewendet. Im Vergleich zum Atropin sind die peripheren Scopolaminwirkungen stärker mydriatisch und sekretionshemmend, jedoch schwächer spasmolytisch und herzfrequenzsteigernd ausgeprägt (Mutschler 1991).

A 2.4.2 TRII-Alkaloide (Nortropanalkaloide)

Ebenso wie die physiologische Wirkung ist die pharmazeutische Bedeutung dieser Substanzen noch nicht geklärt. Die strukturelle Ähnlichkeit der polyhydroxylierten Nortropanderivate zu Kohlenhydraten bedingt deren biologische Aktivität als Glykosidasehemmstoffe (vgl. Abbildung A.3). Für die Calystegine A₃, B₁ und B₂ wurde eine inhibitorische Wirkung auf α -Galaktosidasen und β -Glykosidasen, jedoch kein Effekt auf Mannosi-

dasen nachgewiesen (Molyneux *et al.* 1993). Zahlreiche nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass die Calystegine der A-Gruppe keine oder nur geringe Inhibitoreigenschaften besitzen (Asano *et al.* 1995). Für die Calystegine der C-Gruppe wurde ein differenziertes Hemmpotential gegenüber den verschiedenen Enzymen festgestellt. Die Glykosidasen sind ein fester Bestandteil wichtiger biologischer Prozesse. Sie spielen bei der intestinalen Verdauung, posttranslationalen Veränderung von Glykoproteinen oder dem Iysosomalen Abbau von Glykokonjugaten eine wesentliche Rolle (Asano *et al.* 2000). Die zumeist genetisch bedingten Enzymausfälle führen beim Menschen zu verschiedenen Speicherkrankheiten wie der Fabry- oder Gaucher-Krankheit. Die TRII-Alkaloide eröffnen als Modellsubstanzen Möglichkeiten zur Untersuchung künstlich ausgelöster Enzymmodifikationen oder -blockierungen. Diese könnten erheblich zum allgemeinen Verständnis der Wirkmechanismen der Speicherkrankheiten beitragen und zu Lösungsansätzen führen. Weiterhin besitzen die Glykosidasehemmstoffe durch ihre Struktur das Potential zu antidiabetischen, antiviralen und Antitumorwirkungen (Übersicht in Asano *et al.* 2000). Ein therapeutischer Einsatz der TRII-Alkaloide wäre damit denkbar.

A 2.5 Regulation der Tropanalkaloidakkumulation

A 2.5.1 Direkte Beeinflussung durch Transformation

Seit den 70er Jahren wurden Enzyme des Tropanalkaloidstoffwechsels identifiziert, isoliert und charakterisiert (Mizusaki et al. 1971). Mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Verfahren konnten 20 Jahre später die cDNA-Sequenzen und Gene einiger dieser Enzyme isoliert werden (vgl. Kapitel A 2.2). Diese ermöglichen Lokalisationsstudien der Transkripte und der korrespondierenden Proteine in Wurzelkulturen oder gesamten Pflanzen sowie Transformationsexperimente zur Erforschung der Regulation der Alkaloidbiosynthese. So können durch spezifische Genexpressionsveränderungen Enzymaktivitäten modifiziert werden. Erhöhungen oder Verringerungen einzelner Enzymaktivitäten können Einblicke in die Biosyntheseregulation gewähren, die ansonsten nicht möglich sind. Unter diesen Bedingungen können unbekannte oder bis dato nur vermutete Zwischenstufen eines Syntheseweges akkumulieren, die unter normalen Umständen unmittelbar nach ihrer Bildung in nachfolgende Verbindungen umgewandelt würden. Durch Überexpression ausgewählter Biosyntheseenzyme sollen Transformanten mit einer in vivo gesteigerten Gesamtenzymaktivität erhalten werden. Die Verringerung oder im Idealfall totale Ausschaltung einer Enzymaktivität kann durch antisense-Transformation, Cosuppression oder RNAi-Transformation erreicht werden (Smith et al. 2000). Cosuppression tritt häufig als Begleiterscheinung von Überexpressionen auf. Für eine effiziente Manipulation müssen die eingebrachten cDNA-Sequenzen in einer geeigneten Menge exprimiert werden. Ne-

ben dem am häufigsten eingesetzten, konstitutiv exprimierenden CaMV 35S-Promotor können auch organspezifische, wie der blattspezifische St-LS1-Promotor (*Solanum tube-rosum light-inducible organ-specific gene,* Eckes *et al.* 1986) oder induzierbare wie der glucocorticoidinduzierbare Promotor (Aoyama und Chua 1997) zur Anwendung kommen. Bei der Transformation wird durch das Konstrukt außer dem Kernstück Promotor - homo-loge/ heterologe cDNA-Sequenz - Terminator ein Selektionsmarker übertragen. In den meisten Fällen werden so Antibiotikumresistenzen erzeugt, die während des Regenerationsprozesses eine einfache Unterscheidung zwischen untransformierten und transformierten Subjekten gestattet.

Die Transformation der Pflanzen mit dem Konstrukt basiert auf natürlichen (z.B. Bakterien oder Viren), chemischen (z.B. Polyethylenglycol) oder physikalischen Mechanismen (z.B. Elektroporation oder particle bombardment). Die Eigenschaften der Pflanze und weniger die der zu übertragenden DNA bestimmen die Wahl der Transformationsmethode. Am häufigsten ist der Gentransfer mittels Agrobakterieninfektion von Blättern und Sprossen beschrieben (Yun et al. 1992). Bei einer solchen Agrobakterieninfektion wird ein Teil des Ti- oder Ri-Plasmids, die T-DNA, in die pflanzliche DNA integriert. Bei diesem Vorgang kommen den T-DNA-Grenzsequenzen (LB und RB) sowie den Virulenzgenen (vir-Gene) eine besondere Bedeutung zu. Der Infektionsprozess an sich stellt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Ereignisse dar (Tinland 1996). Die transformierten Pflanzenzellen bilden neue, für das jeweilige Plasmid spezifische Metabolite - die Opine -, die von den Bakterien verstoffwechselt werden. Durch Bestimmung der Opine wurde eine einfache Kategorisierung der Agrobakterienstämme möglich (Petit et al. 1983). Den verschiedenen Opintypen konnten nachfolgend charakteristische Virulenzeigenschaften zugeordnet werden (Melchers et al. 1990). So werden Agrobakterien vom Agropintyp auf Grund der stärkeren Virulenz häufiger zu Transformationen eingesetzt als die vom Mannopintyp (Oksman-Caldentey und Hiltunen 1996). Viele Solanaceen wie z.B. Lycopersicon esculentum, Nicotiana tabacum und Solanum tuberosum konnten seit Beginn der 80er Jahre sehr effizient mit dieser Methode transformiert werden. Zur Atropa belladonna-Transformation kann neben diploidem auch haploides Ausgangsmaterial eingesetzt werden (Yoshimatsu et al. 1997).

A 2.5.2 Indirekte Beeinflussung durch Kultivierung

Neben der Regulation auf genetischer Ebene wird die Entwicklung von Pflanzen und Organkulturen durch verschiedene, meist simultan wirkende Umweltfaktoren beeinflusst. In alkaloidbildenden Individuen äußert sich die Anpassung an die Umwelt bzw. verschiedene Stresssituationen oft in einer veränderten Alkaloidakkumulation (Baldwin 1999, St Pierre *et al.* 1999). Häufig werden Alkaloide, an denen wegen ihrer vielfältigen Verwen-

dungsmöglichkeiten großes Interesse besteht (siehe Kapitel A 2.1), unter normalen Umweltbedingungen nur in geringen Mengen gebildet. Zur Verbesserung von Ausbeuten als auch aus Sicht der biochemischen Grundlagenforschung wurde den oben genannten Erkenntnissen zur Regulation der Sekundärstoffbiosynthese besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht.

In tropanalkaloidbildenden Suspensions- und Wurzelkulturen konnte durch Elicitierung, Zusatz von Präcursoren oder Phytohormonen, Nährstoffzusammensetzung und Licht die Sekundärstoffproduktion wesentlich beeinflusst werden.

Biotische Elicitierung mittels Zellwandfragmenten von Phytophthora megasperma führte z.B. zur 5fachen Steigerung der Hyoscyaminakkumulation in D. stramonium-Suspensionskulturen (Ballica et al. 1993). Nach abiotischer Elicitierung von D. stramonium-Wurzelkulturen mit geringen Cadmium-Konzentrationen wurde ebenfalls eine gesteigerte Tropanalkaloidproduktion beobachtet (Ionkova et al. 1998). Die Verwundung von Pflanzen durch Insektenfraß oder mechanische Beschädigung führt zu erhöhten endogenen Jasmonatmengen (Creelmann und Mullet 1997, Wasternack und Parthier 1997). Jasmonsäure und Methyljasmonat (MeJA) stimulieren eine Vielzahl von Sekundärstoffbiosynthesen, deren Metabolite zu Abwehr von Insekten und Pathogenen führen sollen (Blechert et al. 1995). Exogene Jasmonatapplikation verursachte beispielsweise in Blättern und Wurzeln von Nicotiana sylvestris eine Steigerung der Nikotinbiosynthese (Baldwin et al. 1994 und 1996). Bisher beschriebene Auswirkungen auf die Tropanalkaloidbiosynthese sind uneindeutig (Memelink et al. 2001). Abscisinsäure stellt einen wichtigen Vermittler bei der Pflanzenabwehr dar (Pena-Cortes et al. 1995, Leung und Giraudat 1998). Diese Substanz wirkt auf Alkaloidbiosynthesen sowohl induzierend als auch inhibierend (Mahady et al. 1998, Vanhala et al. 1998).

Phytohormone wie Auxine oder Cytokinine induzieren und regulieren Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Pflanzen und Organkulturen (Coenen und Lomax 1997, Mok und Mok 2001). Zudem beeinflussen sie konzentrationsabhängig den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel. Durch Auxinzusatz wurde die Tropanalkaloidbiosynthese in verschiedenen Wurzelkulturen sowohl positiv als auch negativ beeinflusst (Hashimoto *et al.* 1985, Robins *et al.* 1991b, Vanhala *et al.* 1998). In Untersuchungen mit Cytokininen konnten dagegen keine signifikanten Änderungen der Alkaloidbildung nachgewiesen werden (Vanhala *et al.* 1998).

Die Alkaloidbiosynthese wird durch Präcursorzusatz unterschiedlich beeinflusst (konzentrationsabhängig). Verschiedene Experimente mit Organkulturen von *D. stramonium* konnten dies für die Tropanalkaloidbiosynthese belegen und lieferten zusätzlich Informationen zur Limitation bestimmter Biosyntheseschritte (Robins *et al.* 1991a, Ballica *et al.* 1993).

Für Wachstum und Sekundärstoffproduktion von Wurzel- und Suspensionskulturen spielt die Nährmediumzusammensetzung, insbesondere die Kohlenhydratquelle eine wichtige Rolle (Gertlowski und Petersen 1993). Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen bestätigten deren Bedeutung für den Alkaloidstoffwechsel (Merillon et al. 1984, Nussbaumer et al. 1998). Zucker - insbesondere Glucose und Saccharose - dienen nicht nur als metabolische Ressource und Vorstufe für Strukturelemente, sondern regulieren viele Entwicklungs- und physiologische Prozesse. Durch Interaktion eines Zuckermoleküls mit einem Sensorprotein wird ein Signal erzeugt (Smeekens 2000). So verursacht beispielsweise die Bindung von Glucose an das Enzym Hexokinase eine Konformationsänderung, die die Affinität des Enzyms für ATP steigert und somit ein Signal auslöst (Sheen et al. 1999). Dieses Signal kann verschiedene Signalkaskaden initiieren, die zu einer Veränderung von Genexpression und Enzymaktivität führen (Koch 1996, Smeekens 2000). Die Existenz multipler pflanzlicher Zuckersignalwege wird in Analogie zum gut untersuchten Hefesystem vermutet (Halford et al. 1999, Sheen et al. 1999). Die Expression der durch Zucker regulierbaren Gene kann darüber hinaus durch verschiedene andere Umweltfaktoren wie Licht (Sheen 1990) oder Phytohormone (De Wald et al. 1994, Zhou et al. 1998) beeinflusst werden. Interaktionen verschiedener Signaltransduktionswege sind somit vorprogrammiert.

Licht dient ähnlich wie Zucker als Energiequelle und hat einen wesentlichen Einfluss auf die pflanzliche Entwicklung und Sekundärstoffproduktion. Auf Alkaloidbiosynthesen von Suspensions- und Wurzelkulturen wirkt es vorrangig induzierend (St Pierre *et al.* 1999, Schröder *et al.* 1999).

A 3 AUFGABENSTELLUNG

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Frage nach der Regulation der Tropanalkaloidbiosynthese und deren gezielter Manipulierbarkeit in Pflanzen und Wurzelkulturen von *A. belladonna.*

Durch veränderte Expression von PMT, TRI und TRII (Enzyme, die an Verzweigungspunkten der Tropanalkaloidbiosynthese lokalisiert sind) sollten mittels Modifikation der Enzymaktivität Fragen zu deren regulatorischem Beitrag beantwortet werden. Veränderungen des Biosyntheseflusses wurden durch Bestimmung der Alkaloidakkumulation bezüglich Gehalt und Muster charakterisiert. Durch zusätzliche Variation von Alter und Kultivierungsbedingungen sollte geprüft werden, welchen Einfluss direkte Faktoren (Transformation) in Kombination mit indirekten Faktoren (Kultivierung) auf die Alkaloidbiosynthese ausüben.

Mit Hilfe von Wurzelkulturen, die auf Grund des robusten Wachstums und der hohen Alkaloidakkumulation geeignete Untersuchungsmodelle darstellen, wurde ermittelt, inwie-

fern Modifikationen des Nährmediums, Phytohormon-, Präcursor- oder Elicitorzusatz sowie Licht die Tropanalkaloidbiosynthese in *A. belladonna* beeinflussen. Wurzelkulturen besitzen gegenüber ganzen Pflanzen sowohl methodische als auch morphologische Vorteile. Zu den methodischen Vorteilen zählen die schnelle Kultivierung und die Möglichkeit der einfachen Systembeeinflussung durch Präcursorzusatz oder Nährmediumvariation. Eine veränderte Tropanalkaloidbiosynthese sollte deutlich erkennbar sein, da in diesem isolierten Organsystem ein Transport von Alkaloiden in andere Organe nicht möglich ist. Bei den Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob und unter welchen Bedingungen der Weg zu den TRI-Alkaloiden (klassische Tropanalkaloide) oder der TRII-Alkaloidweg (Nortropanalkaloide) bevorzugt wird.

Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen zur Regulation und Manipulation der Tropanalkaloidbiosynthese in *Atropa belladonna* L. sind schematisch in Abbildung A.4 zusammengefasst.



Abbildung A.4 Untersuchungen der vorliegenden Arbeit

B Material und Methoden

B1 MATERIAL

B 1.1 Pflanzen

B 1.1.1 Samensterilisation

Prof. Hashimoto (Naist Institute Nara, Japan; Hachiya 1997) stellte für Untersuchungen freundlicherweise *A. belladonna*-Samen folgender Pflanzen zur Verfügung:

- Wildtyp
- Vektor pGA482 (T2-Generation)
- H11/2 (Tabak-PMT-überexprimierend, T2-Generation)
- H11/3 (Tabak-PMT-überexprimierend, T2-Generation).

Die Samen wurden dreimal jeweils für 15 min in konzentrierter Natriumhypochloridlösung und für 5 min in sterilem Wasser geschwenkt. Anschließend wurden die Samen auf Petrischalen mit verfestigtem (15 g/l Agar) B5-Medium (Gamborg *et al.* 1968) ausgelegt, die mit Parafilm[®] verschlossen wurden. Zur Selektion enthielt das B5-Medium der transgenen Samen 100 mg/l Kanamycin.

B 1.1.2 Kultivierung

B 1.1.2.1 Becherglas

Die sterilen Pflanzen wuchsen auf verfestigtem (15 g/l Agar) B5-Medium ohne Saccharose. Als Kultivationsgefäße dienten mit Aluminiumfolie verschlossene Bechergläser. Die 3- bzw. 7-monatige Kultivierung erfolgte bei 23 °C unter einem 16 h Hell-/ 8 h Dunkelrhythmus.

B 1.1.2.2 Klimakammer

Sterile Keimlinge wurden auf Erde überführt und 3 Monate in einer Klimakammer bei einer Temperatur von 23 °C, 80 %iger Luftfeuchtigkeit unter einem 16 h Hell-/ 8 h Dunkelrhythmus kultiviert (Biozentrum der Universität).

B 1.1.2.3 Gewächshaus

Die aus sterilen Keimlingen angezogenen Pflanzen wurden auf Erde überführt und 7 Monate im Gewächshaus bei einer Temperatur von 23 °C kultiviert. In den Morgen- und Abendstunden wurden die Pflanzen zusätzlich belichtet, um eine Lichtphase von 16 h zu gewährleisten (Kultivierung im Herbst/Winter, Biozentrum der Universität). Während der Kultivierung war eine 3malige Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln notwendig. Diese richteten sich gegen die Schädlinge Blattlaus (*Myzus persicae*) und Weiße Fliege (*Trialeu-rodes vaporariorum* Westwood).

B 1.1.3 Regeneration transformierter Pflanzen

Die ersten Kalli bildeten sich auf M2-Medium durchschnittlich 1-2 Monate nach der Transformation. Nach 1 Monat hatten sich Schösslinge entwickelt, die vom Kallus abgetrennt und in ein neues Medium (M3) eingesetzt wurden. Etwa 2-3 Monate später waren die Transformanten (PMT-*antisense*, TRII-*sense* und Vektorkontrolle) zu vollständigen Pflanzen herangewachsen. Diese wurden nachfolgend auf kanamycinhaltigem (100 mg/l), verfestigten B5-Medium ohne Zucker kultiviert (Gamborg *et al.* 1968).

M2-Medium:	M3-Medium:
MS-Medium	MS-Medium
Vitamine des B5-Mediums	Vitamine des B5-Mediums
0,1 mg/l <i>N⁶-</i> Benzyladenin (BA)	0,1 mg/l BA
0,1 mg/l Naphthylessigsäure (NAA)	3,0 % (w/v) Saccharose
3,0 % (w/v) Saccharose	1,5 % (w/v) Agar
1,5 % (w/v) Agar	pH 5,8
pH 5,8	

nach dem Autoklavieren: M2 = 250 mg/l Kanamycin und 500 mg/l Carbenicillin (sterilfiltriert) und M3 = 250 mg/l Kanamycin (steril filtriert)

B 1.2 Wurzelkulturen

B 1.2.1 Hairy roots

B 1.2.1.1 Gewinnung und Kultivierung

Diese *A. belladonna*-Wurzelkultur war 1992 durch Transformation mit *A. rhizogenes* Stamm LBA 9402 erzeugt und freundlicherweise für Untersuchungen zur Verfügung gestellt worden (Dr. Rhodes, Institute for Food Research Norwich, UK). Die *hairy roots* wurden submers in 300 ml Erlenmeyerkolben, die 70 ml B5-Medium enthielten, bei 23 °C unter Lichtausschluss auf einem Rundschüttler (90 rpm) kultiviert. Aller 28 d wurden von den Wurzeln 50 mg Spitzen abgetrennt und zur weiteren Kultivierung in neues Medium überführt. Zum Schutz vor bakteriellem Befall wurde dem Medium vor dem Überimpfen das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 10 mg/l zugesetzt. Lichtkultivierte Wurzeln unterlagen einem 16 h Hell-/ 8 h Dunkelrhythmus.

B 1.2.1.2 Nährmediummodifikation

Die *hairy roots* wuchsen üblicherweise auf dem von Gamborg und Mitarbeitern optimierten B5-Medium (Gamborg *et al.* 1968). Es enthält anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, 3 % Saccharose (88 mM) als Kohlenhydratquelle und Wasser. Das Medium wies folgende Kenndaten auf: Osmolalität: 123 mOsmol/kg (Knauer-Osmometer), pH-Wert: 5,5-6,0; Leitfähigkeit: 4,5 mS/cm (ohne Ampicillinzusatz).

Für Untersuchungen wurde das B5-Medium folgendermaßen verändert:

- ¹/₂ B5 mit 3 % Saccharose (88 mM; Osmolalität 116 mOsmol/kg)
- B5 mit 5 % Saccharose (146 mM; Osmolalität: 181 mOsmol/kg)
- ¹/₂ B5 mit 5 % Saccharose (146 mM; Osmolalität: 163 mOsmol/kg)
- 1/2 B5 mit 8 % Saccharose (234 mM; Osmolalität: 256 mOsmol/kg).

Die Massezunahme und die Alkaloidakkumulation wurden über einen 28-tägigen Zeitraum aller 2 d bestimmt. Daten zum Intermediatgehalt und zur TR-Gesamtenzymaktivität wurden aller 7 d erhoben.

B 1.2.1.3 Kohlenhydrate und Zusätze

Die verschiedenen Kohlenhydrate (Fructose, Glucose, Mannose, 3-O-Methylglucose, Sorbitol), der Hexokinaseinhibitor *N*-Acetylglucosamin, die Kalziumkanalblocker Verapamilhydrochlorid und Lanthannitrat wurden in Wasser gelöst und sterilisiert, bevor sie zum B5-Medium ohne Kohlenhydratquelle zugegeben wurden. Die Konzentration im Medium war: Kohlenhydrate 100 mM, Mischung Glucose/Fructose jeweils 50 mM, Hexokinaseinhibitor 10 mM und Kalziumkanalblocker jeweils 0,4 mM.

14 d alte *hairy roots* wurden in diese Medien umgesetzt. Nach 1 und 4 d wurden die Massezunahmen und Alkaloidgehalte der Wurzelkulturen sowie Kenndaten der Medien (Osmolalität, pH-Wert, Leitfähigkeit) ermittelt.

B 1.2.1.4 Elicitor- und Phytohormonzusatz

MeJA und ABA wurden in 96 %igem Ethanol gelöst und direkt zum Medium 14 d alter *hairy roots* zugesetzt (Konzentration im Medium: 5 mM). Der Zusatz von 17,5 µl reinem Ethanol wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Nach 1- und 2-tägiger Inkubation wurden die Trockenmassen und die Alkaloidakkumulationen bestimmt.

Die Phytohormone IBA und BA (Konzentration im Medium: 1 μ M) wurden wie die Kohlenhydrate Saccharose und Sorbitol (Konzentration im Medium: 88 mM) sterilisiert und zu den B5-Medien ohne Kohlenhydratquelle zugesetzt. 14 d alte *hairy roots* wurden in diese Medien umgesetzt. Nach 1 und 4 d wurden die Massezunahmen und Alkaloidgehalte erfasst.

B 1.2.1.5 Präcursorzusatz

Den *hairy roots*, die auf B5-Medium oder ½ B5 mit 5 % Saccharose wuchsen, wurde am Tag 13 und 27 sterile, neutralisierte Tropinonlösung (Konzentration im Medium: 5 mM)

zugeführt. Den Kontrollwurzeln wurde Natriumchlorid (Konzentration im Medium: 5 mM) appliziert. Die Trockenmassen, Intermediat- und Alkaloidgehalte sowie TR-Gesamtenzymaktivitäten wurden nach 1 bzw. 3-tägiger Inkubation ermittelt.

B 1.2.2 PMT-Wurzelkulturen

B 1.2.2.1 Gewinnung und Kultivierung

Durch Abtrennen der Wurzel von jeweils einer sterilen Wildtyppflanze und kanamycinresistenten T2- Pflanze von Vektor, H11/2 und H11/3 wurden Wurzelkulturen angelegt. In den ersten Passagen wurde dem Nährmedium IBA (Konzentration im Medium: 1 μ M) zugesetzt, um die Etablierung der Wurzelkulturen zu erleichtern. Nach Stabilisierung der Wurzeln war eine Kultivierung auf B5-Medium ohne Phytohormonzusatz möglich.

B 1.2.3 TR-Wurzelkulturen

B 1.2.3.1 Regeneration und Kultivierung

An Blättern, die mit *A. rhizogenes* transformiert und auf M1-Medium kultiviert wurden, zeigten sich durchschnittlich 1-2 Monate nach der Transformation Wurzelansätze. Nach Abtrennung von den Blättern wurden die Wurzeln zunächst in B5-Medium mit Antibiotikazusatz kultiviert (20 mg/l Kanamycin und 250 mg/l Carbenicillin). Zur Abtötung der Agrobakterien wurden die Wurzelkulturen aller 2 d über einen Zeitraum von 21 d abwechselnd mit Carbenicillin (500 mg/l) und Ampicillin (350 mg/l) inkubiert. Anschließend wurden die regenerierten Wurzelkulturen analog den *hairy roots* kultiviert (siehe B 1.2.1.1). Durch den Zusatz von 20 bzw. 40 mg/l Kanamycin wurden die Kulturen auf ihre Antibiotikumresistenz getestet.

M1-Medium:

MS-Medium Vitamine des B5-Mediums 0,1 mg/l Naphthylessigsäure (NAA) 1,5 % (w/v) Agar nach dem Autoklavieren: 50 oder 100 mg/l Kanamycin und 500 mg/l Carbenicillin (sterilfiltriert)

B 1.3 Bakterien

B 1.3.1 Escherichia coli

B 1.3.1.1 Kultivierung und Transformation

Für Transformationsexperimente wurden One Shot[™] Competent Cells ("TOPO[™] TA Cloning[®] Kit", Invitrogen) verwendet. Die transformierten Bakterien wurden auf verfestig-

tem (15 g/l Agar) LB-Medium bei 37 °C unter Zusatz von 50 mg/l Kanamycin kultiviert. Die Anzucht als Flüssigkultur erfolgte in LB-Medium unter Schütteln (150 rpm). Die Transformation (Kälte-Hitze-Schock) wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll des Kits "TO-PO[™] TA Cloning[®] Kit"(Invitrogen) durchgeführt.

LB-Medium (Luria-Bretani-Medium):

1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Natriumchlorid 0,5 % (w/v) Saccharose pH 7,0 nach dem Autoklavieren: 50 mg/l Kanamycin (sterilfiltriert)

B 1.3.2 Agrobakterien

B 1.3.2.1 Stämme und Kultivierung

Für die Transformation wurden *A. tumefaciens* Stamm LBA 4404 (Hoekema *et al.* 1983) und *A. rhizogenes* Stamm 15834 (White and Nester 1980) eingesetzt. Die Kultivierung der transformierten Bakterien erfolgte in YEB-Medium (unter Schütteln bei 200 rpm) bzw. auf verfestigtem YEB-Medium (15 g/l Agar) bei 26 °C unter Zusatz von 50 mg/l Kanamycin.

YEB-Medium (yeast-broth-Medium):

0,5 % (w/v) *beef extract* 0,1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Saccharose 2 mM Magnesiumsulfat nach dem Autoklavieren: 50 mg/l Kanamycin (sterilfiltriert)

B 1.3.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Eine Bakterienkultur (50 ml) mit einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6 wurde für 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (3000 rpm, 4 °C, 10 min). Das Pellet wurde in 10 ml TFB-Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (3000 rpm, 4 °C, 5 min). Anschließend wurde das Pellet in TFB-Puffer (3 ml) mit Dimethylsulfoxid (DMSO, 140 µl) gelöst, aliquotiert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C gelagert (Dr. H. Maucher, IPB Halle).

TFB-Puffer:

10 mM 1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES) 15 mM Kalziumchlorid Aqua dest. pH auf 6,7 einstellen und danach 250 mM Magnesiumchlorid zugeben

B 1.3.2.3 Transformation

200 μl kompetente Agrobakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,5-1 μg Plasmid-DNA versetzt. Die Plasmide enthielten folgende cDNA-Fragmente:

- A. belladonna PMT1-cDNA (accession number: AB018570, kodierende Sequenz; K. Suzuki, Naist Institute Nara)
- *D. stramonium* TRI-cDNA (*accession number*: L20473) oder TRII-cDNA (*accession number*: L20474) (kodierende Sequenzen; K. Nakajima, Naist Institute Nara).

Die Mischung wurde für jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz von 1 ml YEB-Medium wurde für 1-3 h bei 26 °C und 200 rpm geschüttelt. 200 µl des Transformationansatzes wurden auf kanamycinhaltigem (50 mg/l), verfestigten (15 g/l) YEB-Medium ausplattiert und für 2 d bei 26 °C inkubiert (Höfgen und Willmitzer 1988).

B 1.3.2.4 Pflanzentransformation

Von sterilen, durchschnittlich 2 Monate alten *A. belladonna*-Pflanzen (Japan-Wildtyp) wurden vorsichtig Blätter abgetrennt, mit einem Skalpell eingeritzt, auf Petrischalen mit M0-Medium ausgelegt, mit Parafilm[®] verschlossen und 16 h im Licht bei 23 °C inkubiert. Zur Transformation wurden die Blätter für dreimal 5 min in einer 50 ml Bakterienkultur (rekombinante *A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes*) mit einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt, trockengetupft und auf antibiotikahaltigem (50 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Carbenicillin) M0-Medium ausgelegt. Nach 24 h wurden die transformierten Blätter vierbis sechsmal für jeweils 5 min in carbenicillinhaltigem (500 mg/l) B5-Medium gewaschen. Bei starkem Bakterienbefall wurde diese Prozedur täglich über einen Zeitraum von maximal 7 d durchgeführt. Nach 10 d wurden die *A. tumefaciens*-transformierten Blätter auf M1-Medium (siehe Kapitel B 1.2.3.1) und die *A. tumefaciens*-transformierten Blätter auf M2-Medium (siehe Kapitel B 1.1.3) ausgelegt.

M0-Medium:

MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) Vitamine des B5-Mediums (Gamborg *et al.* 1968) 1,5 % (w/v) Agar

B 1.4 Klonierungsvektoren

Folgende Plasmidvektoren wurden eingesetzt:

Plasmidvektor	Antibiotikaresistenz	Verwendungszweck	Referenz
pCR [®] 2.1	Amp ^r , Kan ^r	Standardklonierung	Invitrogen
pBI121	Kan ^r	Pflanzentransformation	Clontech

Tabelle B.1 Verwendete Plasmidvektoren

B 1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotidprimer synthetisierten die Firmen Pharmacia und MWG-Biotech:

Primer	Sequenz (5`-3`)	Funktion
Kana1	ATG ATT GAA CAA GAT GGA TT	Nachweis des nptll-Gens
Kana2	GTC AAG AAG GCG ATA GAA	(Kan ^r)
PMT-Start	ATG GAA GTC ATA TCT ACC AA	Nt-PMT-Fragment als
PMT-Stop	TTA AGA CTC GAT CAT ACT TCT	Sonde für Northern Blot Analyse
PI-s-for	GGA TCC ATG GAA GAA TCA A	DTRI-sense-Fragment mit
PI-s-rev	GAG CTC TTA AAA CCC ACC	BamHI- und Sacl-Schnittstellen
PI-as-for	GAG CTC ATG GAA GAA TCA A	DTRI-antisense-Fragment mit
PI-as-rev	GGA TCC TTA AAA CCC ACC	BamHI- und Sacl-Schnittstellen
PII-s-for	GGA TCC ATG GCT GGA AG	DTRII-sense-Fragment mit
PII-s-rev	GAG CTC TTA AAA ACC ACA ATT AG	BamHI- und Sacl-Schnittstellen
PII-as-for	GAG CTC ATG GCT GGA AG	DTRII-antisense-Fragment mit
PII-as-rev	GGA TCC TTA AAA ACC ACA ATT	BamHI- und Sacl-Schnittstellen
PMT-as-for	GAG CTC ATG GAA GTC ATA TC	PMT-antisense-Fragment mit
PMT-as-rev	GGA TCC TTA AGA CTC GAT CAT	BamHI- und Sacl-Schnittstellen
35S-Start-for	CTG CAG GTC CCC AGA	
35S-Mitte-for	AAA CCT CCT CGG ATT CCA	Nachweis des CaMV-35S-Promotors
35S-Ende-rev	GTG TTC TCT CCA AAT GAA ATG	
TRI-I (for)	ATG GAA GAA TCA AAA GTG TCC	
TRI-II (rev)	TTA AAA CCC ACC ATT AGC TGT	Nachweis des DTRI-Fragmentes
TRI-Mitte-rev	TTC CTT ATG TAT CAC CAC CC	
TRII-1 (for)	ATG GCT GGA AGG TGG AAT	
TRII-2 (rev)	ACA ATT AGC CAT AAG TCC ACC	Nachweis des DTRII-Fragmentes
TRII-Mitte-rev	TTT GAA CCC CTT ACT TCT CC	

Tabelle B.2 Oligonukleotidprimer

Der Zusatz for (*forward*) kennzeichnet die 5`-3`Richtung und rev (*revers*) die 3`-5`Richtung des jeweiligen cDNA-Fragmentes.

B 1.6 Kits und Enzyme

Kits und Enzyme	Herkunft
High Prime DNA Labeling Kit	Roche
peqGold RNAPure TM Kit	peqlab
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	NEB, Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
T4 Ligase	peqlab
Taq-Polymerase	peqlab
TOPO [™] TA Cloning Kit	Invitrogen

Tabelle B.3 Verwendete Kits und Enzyme

B 1.7 Puffer, Standardlösungen und Medien

Alle verwendeten und nicht extra aufgeführten Puffer, Standardlösungen sowie Medien wurden entsprechend den Vorschriften von Sambrook und Mitarbeitern hergestellt (Sambrook *et al.* 1989).

B 1.8 Chemikalien und Standards

Die verwendeten Chemikalien besaßen einen analytischen Reinheitsgrad und wurden hauptsächlich von den Firmen AppliChem, Merck, Roth und Sigma bezogen.

Chemikalien	Herkunft
1 kbp DNA-Marker	GIBCO BRL
100 bp DNA-Marker	peqlab
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Carbenicillin	Boehringer Mannheim
Kanamycin	Boehringer Mannheim
dATP α-[³² P]	NEN
Hybond TM N+ (Membran)	Amershan

Tabelle B.4 Chemikalien, die von anderen Firmen bezogen wurden

Verschiedene Calystegine wurden freundlicherweise von Prof. Asano (Kanazawa, Japan) als Referenzsubstanzen zur Verfügung gestellt. 6-Hydroxyhyoscyamin, Pseudotropin und Scopolamin wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie, MLU Halle-Wittenberg synthetisiert (Prof. Dr. B. Dräger, O. Stenzel, A. Wodak).

B 1.9 Geräte und Hilfsmittel

Die wichtigsten Geräte und Hilfsmittel sind in den entsprechenden Kapiteln bei ihrer Anwendung aufgeführt.

B2 METHODEN

B 2.1 Analytische Methoden

B 2.1.1 Isolierung der Intermediate

Für die qualitative und quantitative Bestimmung der Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin wurde das Gewebe (Blatt, Wurzel) zweimal mit je 10 ml/g Frischmasse (FM) einer Methanol-Wasser-Mischung (1:1) extrahiert. Die Überstände wurden nach Zentrifugation (4500 rpm, 4 °C, 10 min) vereinigt und im Vakuumrotationsverdampfer (Heidolph VV 2000) bei 50 °C auf ein Volumen < 1 ml eingeengt. Mit destilliertem Wasser wurde das Volumen auf 1 ml aufgefüllt, 100 µl Ammoniaklösung (2 N) zugesetzt und auf eine Säule, die mit 1 g Extrelut (Merck) gefüllt war, gegeben. Nach 15 min wurde zweimal mit je 4 ml Chloroform und einmal mit 4 ml einer Chloroform-Methanol-Mischung (9:1) eluiert. Die Eluate wurden vereinigt, unter Vakuum bei 30 °C bis zur Trockne eingedampft und in destilliertem Ethylacetat (120 μ l) aufgenommen. Diese Lösung konnte direkt mittels AMD-TLC, GC und/oder GC-MS untersucht werden (Kapitel B 2.1.4, B 2.1.5 und B 2.1.6).

Inkubierte Enzymassaylösung (vgl. Kapitel B 2.2.1.2) wurde nach dem Zusatz von konzentrierter Ammoniaklösung direkt auf eine Extrelutsäule aufgegeben und entsprechend der oben beschriebenen Prozedur behandelt.

B 2.1.2 Isolierung der TRI-Alkaloide

Lyophilisiertes Gewebe wurde dreimal mit 1 ml/g FM einer Ethanol-Ammoniak (28 %ig)-Mischung (19:1) mittels Ultra-Turrax extrahiert und zentrifugiert (4500 rpm, 4 °C, 10 min). Die vereinigten alkoholischen Phasen wurden im Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Salzsäure (0,1 N) gelöst und filtriert. Von dem Filtrat wurde 1 ml mit 0,2 ml eines Na₂CO₃-NaHCO₃-Puffer (1 M, pH 10) alkalisiert. 1 ml dieser Lösung wurde auf eine Extrelutsäule (vgl. B 2.1.1) appliziert. Nach 5 min wurden die TRI-Alkaloide Hyoscyamin, 6-Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin mit 5 ml Chloroform eluiert. Unter Vakuum wurde der Chloroformextrakt bei 35 °C bis zur Trockne eingedampft und in 120 µl destilliertem Ethylacetat aufgenommen (Prof. Hashimoto, Naist Institut Nara, Japan). Diese Lösung konnte direkt mit AMD-TLC, GC und/oder GC-MS analysiert werden.

B 2.1.3 Isolierung und Derivatisierung der TRII-Alkaloide

Zur Ermittlung der Calystegingehalte und -zusammensetzung wurde das Pflanzengewebe zweimal mit je 10 ml/g FM einer Methanol-Wasser-Mischung (1:1) homogenisiert und extrahiert. Die Überstände wurden nach Zentrifugation (4500 rpm, 4 °C, 10 min) vereinigt und unter Vakuum bei 50 °C auf ein Volumen von 1,5-2 ml eingedampft. Dieser wässrige Extrakt wurde auf eine mit einem stark sauren Kationenaustauscher gefüllten Säule (Ionenaustauscher I Merck, Säule: 100 mm lang, Durchmesser 10 mm, ca. 5 ml Austauschergel) gegeben. Zunächst wurde die Säule mit destilliertem Wasser bis zum Erreichen des neutralen pH-Wertes gewaschen. Nachfolgend wurde mit einer Ammoniaklösung (2 N) eluiert. Die Waschfraktionen wurden mit dem alkalischen Eluat vereinigt, im Vakuumrotationsverdampfer bei 50 °C eingeengt und mit Wasser auf 1 mg/ml FM aufgefüllt. Dieser Extrakt konnte direkt mit der AMD-TLC untersucht werden.

Für die Quantifizierung mittels GC musste der Extrakt derivatisiert werden. Dazu wurde ein Aliquot des Extraktes lyophilisiert und silyliert (Fleet *et al.* 1990). Zum Lyophilisat wurden 30 µl wasserfreies Pyridin, 40 µl Hexamethyldisiloxan (HMDS) und 10 µl Trimethylchlorsiloxan (TMCS) gegeben, mittels Ultraschall durchmischt (5 min) und für 15 min bei 90 °C inkubiert. Abschließend wurde zu der Probe 50 µl einer Azobenzollösung (1 mg/ml Azobenzol in n-Hexan, innerer Standard bei GC-Messung) gegeben und mit n-Hexan auf ein Gesamtprobenvolumen von 500 µl aufgefüllt.

B 2.1.4 AMD-TLC

Scholl und Mitarbeiter hatten für Untersuchungen von Probengemischen verschiedene Methoden am AMD 2 System (Camag, Schweiz) entwickelt. Die Intermediate und TRI-Alkaloide wurden mit derselben Methode aufgetrennt, für die TRII-Alkaloide wurde ein anderes Trennprogramm verwendet (Scholl *et al.* 2001a). Als stationäre Phase wurden Kieselgelplatten (250 µm Schichtdicke, 10 x 20 cm, Glas, Merck) eingesetzt. Der Probenauftrag erfolgte mit dem Linomat IV (Camag, Schweiz).

Die Intermediate und TRI-Alkaloide wurden mit Dragendorffs Reagenz variiert nach Munier detektiert (Baerheim-Svendsen und Verpoorte 1983). Zur Detektion der TRII-Alkaloide wurde die Kieselgelplatte zunächst für 1 min in eine Silbernitratlösung (2 mg/ml Aceton) und anschließend für 1 min in eine ethanolische Natronlauge (2 %ig) getaucht (Dräger 1995).

B 2.1.5 GC

Die Identität der Intermediate und Alkaloide wurde zum einen durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen entsprechender Referenzsubstanzen und zum anderen durch das jeweils charakteristische PND/FID-Verhältnis bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte auf Grund einer höheren Basisliniengenauigkeit mit dem FID-Signal. Die Eichgeraden sind in Kapitel G 1 dargestellt. Bei allen Messungen diente eine Azobenzollösung als innerer Standard (Endkonzentration 0,1 mg/ml). Die Intermediate und TRI-Alkaloide wurden direkt, die TRII-Alkaloide als Trimethylsilylderivate (TMS-Derivate) vermessen (Kapitel B 2.1.3). Zur Quantifizierung wurden durchschnittlich 3-5 unabhängige Proben aufgearbeitet, die Konzentrationen bestimmt und ein Mittelwert berechnet. Dabei wurden Werte, die mehr als +/- 30 % von dem Mittelwert abwichen, als Ausreißer betrachtet und nicht mit in die Berechnung einbezogen (Methode nach Nalimov, Kaiser und Gottschalk 1972).

GC-Ausstattung:

Bezeichnung:	Gaschromatograph Hewlett Packard 6890
Detektoren:	Flammenionisationsdetektor (FID)
(simultane Detektion)	Phosphor-Stickstoff-Detektor (PND)
Vorsäule:	20 cm HP5-Säule
Säule:	HP5
Parameter:	30 m x 320 µm x 0,25 µm
Stationäre Phase:	95 % Methylsiloxan, 5 % Phenylsiloxan
Mobile Phase:	Helium
--------------------------------	--------------------------
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	1 µl
Split:	120 kPa, 250 °C
Gepulste Injektion ohne Split:	200 kPa, 1,5 min, 250 °C

GC-Programm zur Intermediatbestimmung:

Starttemperatur: Temperaturgradient 1: Plateau 1: Temperaturgradient 2: Temperaturgradient 3:	65 °C 7 °C/min bis 120 °C 2 min (120 °C) 15 °C/min bis 240 °C 10 °C/min bis 300 °C
Injektion:	ohne Split, gepulste Injektion
Retentionszeiten: (durchschnittlich)	8,9 min Tropinon 9,1 min Tropin 9,6 min Pseudotropin 15,4 min Azobenzol

GC-Programm zur TRI-Alkaloidbestimmung:

Starttemperatur:	150 °C
Temperaturgradient 1:	10 °C/min bis 160 °C
Plateau 1:	3 min (160 °C)
Temperaturgradient 2:	10 °C/min bis 245 °C
Plateau 2:	5 min (245 °C)
Temperaturgradient 3:	10 °C/min bis 300 °C
Injektion:	Split (1:10)
Retentionszeiten:	6,6 min Azobenzol

6,6 min Azobenzol10,8 und 11,7 min Apoatropin13,2 min Hyoscyamin14,6 min Scopolamin15,7 min 6-Hydroxyhyoscyamin

GC-Programm zur TRII-Alkaloidbestimmung:

Starttemperatur:
Plateau 1:
Temperaturgradient 1:
Temperaturgradient 2:

(durchschnittlich)

160 °C 2 min (160 °C) 5 °C/min bis 240 °C 10 °C/min bis 300 °C

Injektion:

Retentionszeiten: (durchschnittlich) Split (1:20)

6,3 min Azobenzol 7,4 min Calystegin A₅

7,8 min Calystegin A₃
9,6 min Calystegin B₄
10,1 min Calystegin B₃
10,4 min Calystegin B₁
11,9 min Calystegin B₂

B 2.1.6 GC-MS

Die Identität der Intermediate und Tropanalkaloide wurde bei einigen Proben zusätzlich durch Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion bestätigt. Die Messungen wurden mit den unter Kapitel A 2.1.5 aufgeführten Temperaturprogrammen durchgeführt. Die Injektionen erfolgten im Gegensatz zu den dort aufgeführten Angaben ohne Split bei einem Druck von120 kPa und einer Temperatur von 250 °C.

GC-MS-Ausstattung:

Bezeichnung:	Gaschromatograph Hewlett Packard 5890 Serie II Plus
Detektor:	HP 5972 Quadrupolmassenspektrometer
Ionisierungsspannung	30-70 eV
Säule:	HP5
Parameter:	30 m x 320 μm x 0,25 μm
Stationäre Phase:	95 % Methylsiloxan, 5 % Phenylsiloxan
Mobile Phase:	Helium
Flussrate:	1 ml/min
Iniektionsvolumen:	1 ul

B 2.2 Biochemische Methoden

B 2.2.1 TR-Bestimmung

B 2.2.1.1 Extraktion und Präzipitation

Tief gekühltes Pflanzengewebe wurde in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend mit 0,2 g/g FM einer Mischung aus Quarzsand und unlöslichem Polyvinylpyrrolidon (PVP) (1:1) in einem Mörser im Kühlraum verrieben. Zu dem Pulver wurden 2 ml/g FM einer gekühlten Mischung aus Extraktionspuffer und Ascorbinsäurelösung (3:1) gegeben, 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (11000 rpm, 4 °C, 15 min). Dem Überstand wurde auf Eis unter vorsichtigem Rühren Ammoniumsulfat bis zur 40 %igen Sättigung zugesetzt (0,243 g/ml) und zentrifugiert (11000 rpm, 4 °C, 30 min). Zum Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zur 80 %igen Sättigung (0,285 g/ml) gegeben. Nach dem Zentrifugieren (11000 rpm, 4 °C, 30 min) wurde der Niederschlag in 2 ml gekühltem Messpuffer gelöst (Portsteffen 1994, Dräger 1995).

Extraktionspuffer:

0,10 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 0,25 M Saccharose 3 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Messpuffer:

0,02 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 0,25 M Saccharose 1 mM DTT 25 % (v/v) Glycerol

B 2.2.1.2 Enzymassay

Die enzymatische Reduktion des Tropinons besitzt eine absolute Spezifität für das Cosubstrat NADPH (Koelen und Gross 1982, Dräger *et al.* 1988). Die UV-photometrische Erfassung des NADPH-Verbrauches bei 333 nm und 30 °C bildet das Messprinzip bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Tropinonreduktasen. Mit einem Zweistrahlphotometer (UV-160A, Shimadzu) wurde die Probe über einen Zeitraum von 6 min vermessen. Die Messküvette enthielt:

Proteinpräparation	100-400 µl
Kaliumphosphatpuffer pH 6,2	0,1 M
Tropinon	5,0 mM
NADPH	0,2 mM
Aqua dest.	ad 1 ml

Um einen unspezifischen NADPH-Abbau auszuschließen, wurde gegen eine Vergleichsküvette, die bis auf Tropinon die gleiche Zusammensetzung wie die Messküvette besaß, vermessen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. Kapitel B 2.2.1.3) wurde die Enzymaktivität in nkat/g Protein ermittelt. Die Aktivitätsberechnung basiert auf der spezifischen Extinktion von NADPH bei 333 nm ($\epsilon = 6.2 \times 10^3$).

Die Identität der Reduktionsprodukte wurde durch einen Enzymassay mit einem NADPH-regenerierenden System nachgewiesen. Der Ansatz:

Proteinpräparation	100-400 µl
Glucose-6-phosphat	1,0 mM
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	2,0 U
NADP ⁺	0,5 mM
Kaliumphosphatpuffer pH 6,2	0,1 M
Tropinon	1 mM
Aqua dest.	ad 1 ml

wurde für 1 h bei 30 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 50 µl einer Ammoniaklösung (25 %ig) zugesetzt. Der Inkubationsansatz wurde analog der Intermediatisolierung aufgearbeitet und vermessen (vgl. Kapitel B 2.1.1).

Ascorbinsäurelösung: 1 mg/ml Ascorbinsäure pH 7,65 (eingestellt mit Natriumhydroxid)

B 2.2.1.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Präparation wurde spektrometrisch nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Mit der Referenz Rinderserumalbumin (BSA) wurde eine Eichgerade im Bereich von 40-150 µg/ml erstellt.

B 2.2.2 GUS-Test

Das Pflanzenmaterial (Blätter oder Wurzeln der Vektorkontrolle pBI121) wurde durch Einritzen mit einem Skalpell leicht verletzt und ohne Veränderung der Materialtransparenz für mindestens 4 bis maximal 12 h bei 37 °C in frisch hergestellter GUS-Lösung inkubiert (Jefferson *et al.* 1987).

GUS-Lösung:

1 mM 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-*B*-D-glucuronid (X-Gluc) 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0

B 2.3 Molekularbiologische Methoden

B 2.3.1 DNA-Präparation

B 2.3.1.1 Genomische DNA

500 mg stickstoffgemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml DNA-Extraktionspuffer homogenisiert und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Kaliumacetat (3 M, pH 4,8) wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 10 min). Der wässrige Überstand wurde mit 0,7 Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) versetzt und zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 5 min). Nach der Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol wurde erneut zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 5 min). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst (Dr. S. Rosahl, IPB Halle).

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrometrisch bei 260 nm (Gene Quant II Pharmacia Biotech). Über das Verhältnis A_{260 nm}/A_{280 nm} wurde die Verunreinigung der Probe mit Protein ermittelt.

DNA-Extraktionspuffer:

100 mM Tris(hydroxymethyl-)aminomethan-Salzsäure (Tris-HCl) pH 8,0
500 mM Natriumchlorid
50 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) pH 8,0
1,5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

B 2.3.1.2 Plasmid-DNA aus Escherichia coli

Eine 2-5 ml Bakterienübernachtkultur (LB-Medium und Antibiotikum) wurde zur Präparation kleinerer Mengen und eine 50 ml Bakterienübernachtkultur zur Präparation größerer Plasmidmengen bei 37 °C und 150 rpm angezogen. Die Aufarbeitung erfolgte entweder nach dem Protokoll des Kits "QIAprep Spin Miniprep Kit" oder des Kits "QIAprep Spin Midiprep Kit" (Qiagen).

B 2.3.1.3 Plasmid-DNA aus Agrobakterien

Eine für 2 d bei 26 °C in 10 ml YEB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin inkubierte Agrobakterienkultur wurde nach dem Protokoll von Weber *et al.* 1998 aufgearbeitet. Die Isolation erfolgte mit Hilfe des Kits "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen).

B 2.3.2 Agarosegelelektrophorese

B 2.3.2.1 Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese

Nach dem Zusatz von 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer zur DNA-Lösung wurde diese auf ein nichtdenaturierendes Agarosegel aufgetragen. Es wurden je nach Größe der zu erwartenden Fragmente unterschiedliche Größenmarker eingesetzt (siehe Kapitel B 1.8).

B 2.3.2.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das entsprechende DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgetrennt und entsprechend dem Protokoll des Kits "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) eluiert.

B 2.3.3 Klonierung

B 2.3.3.1 Restriktion

Zur Konstruktion und Klonierung von Plasmiden wurden Restriktionsendonukleasen verschiedener Firmen verwendet (siehe B 1.6). Die Standardmethoden wurden entsprechend der Protokolle von Sambrook und Mitarbeitern durchgeführt (Sambrook *et al.* 1989).

B 2.3.3.2 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-Ligase nach Herstellerangaben verwendet (peqlab). PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Kits "TOPO[™] TA Cloning[®] Kit" (Invitrogen) laut dem Herstellerprotokoll in den Vektor pCR[®] 2.1 kloniert.

B 2.3.4 PCR

Die PCR (Polymerasekettenreaktion) wurde zur Amplifizierung verschiedener Nukleotidsequenzen verwendet. Als DNA-Matrize wurden Plasmid-DNA, Bakterienklone sowie genomische DNA eingesetzt. Die PCR wurde mit der *Taq*-Polymerase (peqlab) durchgeführt. Die Größe des zu amplifizierenden Fragmentes bestimmte die jeweilige Zyklenanzahl und Dauer der einzelnen Schritte. Die Schmelztemperaturen der eingesetzten Oligonukleotidprimer legten die Annealingtemperatur fest (G: Guanin, C: Cytosin):

Schmelztemperatur = 69,3 °C + (0,41 x % GC-Gehalt) – 650 / Oligonukleotidlänge Annealingtemperatur = Schmelztemperatur – 2 °C.

Standard-PCR-Ansatz:

Matrize	1-3 µl oder 1 Bakterienkolonie
10xPCR-Puffer	5 µl
dNTP`s (2,5 mM)	4 µl
Oligonukleotid 1 (50 pM)	1 µl
Oligonukleotid 2 (50 pM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U
Aqua dest.	ad 50 µl

Standard-PCR-Temperaturprogramm:

Schritt 1	95 °C, 5 min
Schritt 2 (30 Zyklen)	95 °C, 1 min
	Annealingtemperatur, 30 sec-1 min
	72 °C, 1-2 min
Schritt 3	72 °C, 10 min

B 2.3.4.1 Plasmid-PCR

Die Plasmid-PCR kam bei der Klonierung und Herstellung der Hybridisierungssonde zum Einsatz (Oligonukleotidprimer Kapitel B 1.5).

B 2.3.4.2 Kolonie-PCR

Zum Nachweis positiver rekombinanter Bakterienklone (Kolonien) wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Um den Zellaufschluss sicherzustellen, wurde der Ansatz (Kolonie in Wasser) vor dem PCR-Experiment 10 min bei 95 °C inkubiert.

B 2.3.4.3 Selektions-PCR

Mittels PCR wurde die genomische DNA transgener Pflanzen und Wurzelkulturen auf die Existenz des *uidA*-Gens (Kanamycinresistenz) und der jeweiligen cDNA in *sense*-oder *antisense*-Orientierung geprüft (Oligonukleotidprimer Kapitel B 1.5).

Selektions-PCR-Temperaturprogramm:

Schritt 1	85 °C, 2 min
Schritt 2 (40 Zyklen)	94 °C, 40 sec
	Annealingtemperatur, 1 min
	72 °C, 2 min
Schritt 3	72 °C, 5 min

B 2.3.5 Sequenzierung

DNA-Fragmente wurden mit dem A.L.F.-Sequenziergerät (Pharmacia) sequenziert und analysiert (Dr. A. Peterson, Biozentrum der Universität). Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche erfolgten mittels verschiedener Programme (BLAST), die unter anderem vom *National Centre for Biotechnological Information* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) angeboten werden.

B 2.3.6 Dot Blot Analyse

B 2.3.6.1 Vorbereitung

Von einer Probe wurden verschiedene DNA-Mengen im Bereich von 0,5-5,0 µg auf eine Membran aufgetragen (HybondTM N+, Amershan). Anschließend wurde die Membran jeweils für 5 min in Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung und 20xSSC-Lösung inkubiert (Sambrook *et al.* 1989). Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker, Stratagene).

B 2.3.6.2 Radioaktive Sondenmarkierung

Zur Herstellung der CaMV 35S-Sonde wurden 25 ng des cDNA-Fragmentes (siehe Kapitel B 2.3.4.1 und B 2.3.2.2) nach dem *random prime*-Verfahren mit 50 μ Ci α -[³²P]-dATP ("High Prime DNA Labeling Kit", Roche) markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe des Kits "QIAgen PCR Purification Kit" (Qiagen) von der Sondenlösung abgetrennt.

B 2.3.6.3 Radioaktive Hybridisierung

Die Hybridisierungsbedingungen entsprachen denen des *Northern Blots* (siehe Kapitel B 2.3.9.3).

B 2.3.7 RNA-Präparation

Mit dem "peqGOLD RNAPureTM Kit" (peqlab) wurde aus verschiedenen Pflanzengeweben entsprechend dem Herstellerprotokoll Gesamt-RNA isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrometrisch bei 260 nm (Gene Quant II Pharmacia Biotech). Über das Verhältnis A_{260 nm}/A_{280 nm} wurde die Verunreinigung mit Protein ermittelt.

B 2.3.8 Agarosegelelektrophorese

B 2.3.8.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zu 20 µg Gesamt-RNA wurden 2 Volumen RNA-Probenpuffer und 0,1 Volumen RNA-Stoppuffer gegeben, 15 min bei 65 °C und nachfolgend 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zusatz von 2 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) wurde die Probe auf ein 1,2 %iges, denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Die RNA wurde in 1xMOPS-Puffer (Laufpuffer) elektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook *et al.* 1989).

B 2.3.9 Northern Blot Analyse

B 2.3.9.1 Transfer

Nach der Elektrophorese wurde das denaturierende Agarosegel kurz in Diethylaminoethylwasser (DEPC-Wasser) und für 10 min in 20xSSC-Lösung inkubiert. Die RNA wurde durch einen Kapillar-Blot auf eine positiv geladene Nylonmembran (HybondTM N+, Amershan) überführt. Durch UV-Bestrahlung wurde die RNA kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker, Stratagene).

B 2.3.9.2 Radioaktive Sondenmarkierung

Zur Herstellung der PMT-Sonde (kodierende Sequenz; N. Hibi, Naist Institute Nara Japan, Hibi *et al.* 1994) wurden 25 ng des cDNA-Fragmentes (siehe Kapitel B 2.3.4.1 und B 2.3.2.2) nach dem *random prime*-Verfahren mit 50 μ Ci α -[³²P]-dATP ("High Prime DNA Labeling Kit", Roche) markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Säule des Kits "QIAgen PCR Purification Kit" (Qiagen) aus der Sondenlösung entfernt. Analog wurden die SPDS-Sonde (300 bp großes Fragment; O. Stenzel, MLU Halle-Wittenberg) und die 18S rRNA-Sonde (aus *Lycopersicon esculentum*, Dobrowolski 1987) markiert.

B 2.3.9.3 Radioaktive Hybridisierung

Die RNA-haltige Membran wurde für 4 h bei 42 °C in 20 ml Hybridisierungslösung prähybridisiert. Danach wurde die Membran in 10 ml Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Sonde (siehe Kapitel B 2.3.9.2), die nach der Markierung 10 min bei 95 °C denaturiert und auf einem Ethanol-Eis-Gemisch rasch abgekühlt wurde, für 16 h bei 42 °C inkubiert. Nach Entfernung der Hybridisierungslösung wurde die Membran in verschieden konzentrierten SSC-Lösungen (Sambrook *et al.* 1989) bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert:

- 2xSSC und 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), Raumtemperatur, 5 min
- 1xSSC und 0,1 % (w/v) SDS, 58 °C, 30 min
- 0,2xSSC und 0,1 % (w/v) SDS, 58 °C, 30 min
- 0,1xSSC und 0,1 % (w/v) SDS, 60 °C, 15 min.

Zum Nachweis der radioaktiv markierten Fragmente wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm X-Oma tTM Blue XB-1 (Kodak, NEN) für 24 bzw. 72 h inkubiert. Durch eine 30-minütige Inkubation der Membran in kochender 0,1 %iger SDS-Lösung wurde die radioaktive Sonde vollständig entfernt. Anschließend wurde die Membran nacheinander mit den anderen radioaktiv markierten Sonden (vgl. Kapitel B 2.3.9.2) rehybridisiert.

Hybridisierungslösung:

50 % (v/v) Formamid 5xSSC 5xDenhard 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % (w/v) Dextransulfat 50 µg/ml Heringssperma-DNA (hitzedenaturiert)

C Ergebnisse

C1 TROPANALKALOIDE

Im Vordergrund der Experimente stand die Erfassung von Hyoscyamin als Vertreter der TRI-Alkaloide und der Calystegine als Vertreter der TRII-Alkaloide. Die routinemäßige Analytik erfolgte mittels GC (vgl. Kapitel B 2.1.5).

Hyoscyamin war in jedem untersuchten Gewebe detektierbar und wurde in den Experimenten als TRI-Alkaloid bezeichnet. Scopolamin wurde dagegen nur in einigen Pflanzengeweben oder transgenen Wurzelkulturen nachgewiesen und gesondert gekennzeichnet. Die gaschromatographische Detektionsgrenze für Hyoscyamin lag bei 3 ng/µl und für Scopolamin bei 5 ng/µl injizierter Lösung. Eine reproduzierbare Quantifizierung der TRIals auch der TRII-Alkaloide war ab 10 ng/µl Injektionslösung möglich.

Der angegebene TRII-Alkaloidwert (TRII-Alkaloide) stellt die Summe aus dem Hauptcalystegin A₃ sowie den Calysteginen A₅ und B₂ dar (siehe Abbildung C.1). Das Verhältnis von A₃ zu A₅ war durchschnittlich 1:0,5, das von A₃ zu B₂ 1:0,3. Es konnten weiterhin die Calystegine B₁, B₃ und B₄ identifiziert werden. Diese Werte lagen meist an der Nachweisgrenze (1 ng/µl Injektionslösung). Sie wurden registriert, aber quantitativ nicht berücksichtigt. Das Vorkommen weiterer Calystegine, z.B. dihydroxylierter Calystegine kann nicht ausgeschlossen werden.



Abbildung C.1 In verschiedenen Atropageweben reproduzierbar quantifizierte TRII-Alkaloide

Innerhalb einiger Experimente wurden zusätzlich die Intermediate Tropinon, Tropin, Pseudotropin sowie die Enzymaktivitäten von TRI und TRII als Gesamtwert bestimmt. Im Nährmedium konnten zu keinem Zeitpunkt Intermediate oder Tropanalkaloide nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

C 2 BEEINFLUSSUNG DER REGULATION DURCH TRANSFORMATION

C 2.1 Regulationspunkt Putrescin-N-methyltransferase

Die PMT-Enzymaktivität reguliert über die Bildung von *N*-Methylputrescin den metabolischen Fluss zwischen dem Primärstoffwechsel der Polyamine und dem Sekundärstoffwechsel der Tropanalkaloide (Abbildung A.3). Mit den nachfolgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob durch Veränderung der PMT-Transkription die Tropanalkaloidbiosynthese modifiziert wird.

C 2.1.1 Pflanzen

C 2.1.1.1 PMT-sense-Pflanzen

Zu Regulationsuntersuchungen der Tropanalkaloidbiosynthese wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Hashimoto (Naist Institute Nara, Japan) PMT-überexprimierende *A. belladonna*-Pflanzen hergestellt (Hachiya 1997). Die Überexpression erfolgte mit der PMTcDNA von *N. tabacum* (*accession number:* D28506, Hibi *et al.* 1994). Die Transgenität der T1-Generation wurde anhand von *Northern Blot* Analysen nachgewiesen. Ungeachtet der erhöhten PMT-Transkript- und *N*-Methylputrescinmengen enthielten die transgenen Linien ähnliche Mengen an TRI-Alkaloiden wie die Wildtyp- und die Vektorpflanzen (Sato *et al.* 2001). Die Akkumulation der TRII-Alkaloide wurde nicht bestimmt. Die PMT-Enzymaktivität wurde indirekt durch das ansonsten in Blättern nicht vorkommende *N*-Methylputrescin nachgewiesen, eine direkte Bestimmung der Enzymaktivität in Blatt oder Wurzel erfolgte nicht.

Aus regulatorischer Sicht erschien eine Untersuchung des PMT-Transformationseffektes auf die Gesamtalkaloidakkumulation einiger potenter (stark überexprimierender) transgener Pflanzen in der nächsten, der T2-Generation sinnvoll. Für diese Zwecke stand Samen folgender *A. belladonna*-Pflanzen zur Verfügung:

- Wildtyp
- Vektor pGA482
- H11/2 (Tabak-PMT-cDNA überexprimierend)
- H11/3 (Tabak-PMT-cDNA überexprimierend).

In *Northern Blot* Analysen waren bei den transgenen H11/2 und H11/3-Pflanzenwurzeln der T1-Generation starke, miteinander vergleichbare PMT-Transkriptmengen detektiert worden (Hachiya 1997).

C 2.1.1.1.1 PMT-Transkription

Die PMT wird wie die meisten anderen Enzyme des Tropanstoffwechsels fast ausschließlich in der Pflanzenwurzel transkribiert (Suzuki *et al.* 1999a). Im Unterschied dazu erfolgt die Transkription der Tabak-PMT durch die Regulation des konstitutiv wirkenden CaMV 35S-Promotors in allen Pflanzengeweben. Demnach veranschaulichen *Northern Blot* Analysen der Blätter den transgenen Status der jeweiligen T2-Generation. Abbildung C.2 zeigt die PMT-Transkriptakkumulation, die in Blättern verschiedener Pflanzenlinien reproduzierbar detektiert wurde (Vierfachbestimmung). In den Blättern von Wildtyp- und Vektorpflanzen konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Die transgenen H11-Linien zeigten deutliche Unterschiede in der Stärke der Transkriptionssignale. In Blättern von H11/2-Pflanzen akkumulierten wesentlich geringere Transkriptmengen als in Blättern von H11/3-Pflanzen. Darüber hinaus trat bei H11/2 häufig ein zusätzliches, spezifisches Signal etwas geringerer Größe und Intensität auf (Dreifachbestimmung, ohne Abbildung), das in verschiedenen *Northern Blot* Analysen, die mit unterschiedlicher RNA durchgeführt wurden, bestätigt werden konnte.





20 µg Gesamt-RNA wurde aus Blättern (Klimakammerkultivierung) isoliert: WT (Wildtyp), VC (Vektor), H11/2 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/2), H11/3 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/3), Nt (*N. tabacum*) als zusätzliche Negativkontrolle. Die Hybridisierung erfolgte mit einem radioaktiv markierten 1128 bp großen Fragment der Tabak-PMT-cDNA (kodie-rende Sequenz) (A). Für die Kontrollhybridisierung wurde eine radioaktiv markierte 18S rRNA-Sonde aus *Lycopersicon esculentum* verwendet (B).

Nach Detektion mit der Tabak-PMT-Sonde wurden die Signale vollständig von der Membran entfernt. Danach wurde diese Membran mit einem radioaktiv markierten 300 bp großen Spermidinsynthasefragment aus *Solanum tuberosum* hybridisiert (vgl. Kapitel B 2.3.9). Dies erfolgte zum Ausschluss von Kreuzhybridisierungen, da in Solanaceen eine unmittelbare Verwandtschaft zwischen der ubiqitär vorkommenden SPDS und der PMT besteht (Hibi *et. al.* 1994, Hashimoto *et al.* 1998b). Im Gegensatz zur PMT-Hybridisierungen

C Ergebnisse

wurde hier in allen Pflanzenlinien ein untereinander vergleichbares quantitatives Transkriptionssignal detektiert (ohne Abbildung). Somit wurde eine spezifische Bindung beider Sonden nachgewiesen. Abschließend erfolgte eine Kontrollhybridisierung mit einer 18S rRNA-Sonde.

Northern Blot Analysen der Pflanzenwurzeln geben Auskunft über Unterschiede in der Transkriptionsstärke der PMT zwischen Transformanten und Wildtypwurzeln. Unter Verwendung der gleichen Tabak-PMT-Sonde zeigten sich in einer ersten Untersuchung etwa gleich schwache Transkriptionssignale der nativen PMT im Wildtyp und in Vektorpflanzen. H11/3 wies die insgesamt höchste Transkriptakkumulation auf. Das H11/2-Signal lag in seiner Stärke zwischen den Signalen von Wildtyp und H11/3. Auch hier wurde das beschriebene 2. Signal schwach detektiert (ohne Abbildung).

C 2.1.1.1.2 Tropanalkaloidakkumulation

Die T1-Generation der transgenen *A. belladonna*-Pflanzen wies im Vergleich zum Wildtyp eine unveränderte Akkumulation an TRI-Alkaloiden auf (Sato *et al.* 2001). Durch Gehaltsbestimmung der TRI- als auch der TRII-Alkaloide sollte geklärt werden, welchen Einfluss die PMT-*sense*-Transformation auf die Bildung aller Alkaloide ausübt und ob Unterschiede zu den ermittelten Alkaloidwerten der T1-Generation auftreten. Weiterhin sollte geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß Kultivierungsbedingungen die Alkaloidakkumulationen der jeweiligen Pflanzenlinien beeinflussen. Dazu erfolgte eine Bestimmung der Gesamtalkaloide in verschiedenen Geweben von Wildtyp- und Pflanzen der T2-Generation, die unter folgenden Bedingungen kultiviert wurden:

- 3 Monate steril, auf B5-Medium ohne Zucker
- 7 Monate steril, auf B5-Medium ohne Zucker
- 3 Monate in einer Klimakammer, auf Erde
- 7 Monate im Gewächshaus, auf Erde.

In Pflanzen, die 3 und 7 Monate unter sterilen Bedingungen gewachsen waren, konnten mit einer Ausnahme nur in den Blättern reproduzierbare Mengen an Alkaloiden identifiziert werden (Ausnahme: 3 Monate alte Pflanzen der H11/3-Linie, Tropanalkaloide wurden nur in den Wurzeln detektiert). In der Tabelle C.1 sind die Alkaloidgehalte und -muster dargestellt. Bei den 3 Monate alten Pflanzen akkumulierte der Wildtyp die höchste Gesamtalkaloidemenge mit einem nahezu ausgeglichenen Muster an TRI- und TRII-Alkaloiden. Die transgenen Linien zeigten geringere Gesamtalkaloidgehalte mit einer deutlichen Tendenz zur Akkumulation von TRI-Alkaloiden. Nach weiteren 4 Monaten wandelte sich das Bild komplett. Der Alkaloidgehalt sank im Wildtyp um 27 %, in den H11-Linien stieg er dagegen um 74-183 %. In den Vektorpflanzen verzehnfachte er sich. Das Alkaloidmuster verschob sich in allen transgenen Linien analog zum Wildtyp zugunsten der TRII-Alkaloide.

Alter in Monaten	Pflanzenlinie	Gesamtalkaloide in µmol/g TM	TRI-/TRII-Alkaloide
	WT	14,3	1:1,3
3	VC	2,2	1:0,0
	H11/2	7,0	1:0,5
	H11/3	7,0	1:0,0
-	-	-	-
	WT	10,4	1:4,6
7	VC	27,0	1:24,8
	H11/2	19,8	1:16,8
	H11/3	12,3	1:13,4

Tabelle C.1 Gesamtalkaloidakkumulation unterschiedlicher, im Becherglas (auf B5-Medium ohne Saccharose) kultivierter Pflanzen

Es wurden verschieden alte Pflanzen der Linien WT (Wildtyp), VC (Vektor), H11/2 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/2) sowie H11/3 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/3) untersucht. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen. Die Standardabweichungen lagen zwischen 15 und 25 %.

Pflanzen, die in einer Klimakammer kultiviert wurden, offenbarten deutliche Mengenunterschiede der Gesamtalkaloide zwischen Wildtyp und Transformanten (Abbildung C.3). Signifikante Änderungen der Alkaloidmuster waren dagegen nicht erkennbar. In Wachstum und Aussehen der Einzelpflanzen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Pro Gesamtpflanze berechnet, betrug die durchschnittliche Alkaloidakkumulation in der Wildtyplinie 44 µmol/g TM, der Vektorlinie 22 µmol/g TM, der H11/2-Linie 12 µmol/g TM und der H11/3-Linie 16 µmol/g TM. Die H11-Linien enthielten nur 27-36 % des Wildtypalkaloidgehaltes. In allen untersuchten Pflanzen enthielten die oberen Blätter die höchsten Alkaloidmengen, dicht gefolgt von den Mengen im Spross. In den Wurzeln wurden geringe und in den unteren Blättern mit Abstand die geringsten Alkaloidgehalte detektiert. Pflanzen der Wildtyplinie akkumulierten in allen untersuchten Geweben die höchsten Alkaloidmengen, wobei das Verhältnis von TRI- zu TRII-Alkaloiden ausgeglichen war (Ausnahme Wurzel). Dieses Muster fand sich überwiegend auch bei Pflanzen der H11/2-Linie (1:0,9). Im Fall der Vektorpflanzen war das Verhältnis schwach zugunsten der TRI-Alkaloide (1:0,7), in dem der H11/3-Linie leicht zugunsten der TRII-Alkaloide verschoben (1:1,3).

Von Wildtyp- und H11/2-Pflanzen wurden stichprobenartig weitere Daten zum Tropanstoffwechsel erfasst (ohne Abbildung, Bunschuch 2001). Die höchste Intermediatakkumulation (Tropinon, Tropin, Pseudotropin) und die maximalen Tropinonreduktaseaktivitäten wurden in den Pflanzenwurzeln beider Linien detektiert. Trotz vergleichbarer TR-Enzymaktivitäten wurden in allen Geweben der Wildtyppflanzen 50 bis 100 % höhere Intermediatmengen nachgewiesen. Diese lagen in den Wildtypwurzeln bei maximal 6 µmol Tropin oder Pseudotropin pro g TM, die höchste Tropinonakkumulation betrug 1 µmol/g TM (ohne Abbildung). Damit entsprach das Verhältnis der ersten spezifischen Vorstufen der Tropanalkaloide - Tropin zu Pseudotropin - dem der Endprodukte.



Abbildung C.3 Alkaloidakkumulation verschiedener Gewebe unterschiedlicher A. belladonna-Pflanzen, 3 Monate alt

Kultivierung in einer Klimakammer (vgl. Kapitel B 1.1.2.2): WT (Wildtyp), VC (Vektor), H11/2 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/2) sowie H11/3 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/3). Die Gruppe "obere Blätter" beinhaltet die obersten 5 Blätter einer Pflanze, die Gruppe "untere Blätter" die restlichen 5-7 Blätter. Der TRI-Alkaloidwert setzt sich aus Hyoscyamin und Scopolamin zusammen. Die Werte sind Mittelwerte aus 3-6 unabhängigen Bestimmungen. Die Standardabweichungen lagen zwischen 15 und 30 %.

Pflanzen, die im Gewächshaus kultiviert wurden, wiesen ein verändertes Alkaloidmuster auf. Bei den 7 Monate alten Pflanzen wurde nur in den oberen Wildtypblättern und H11/2-Wurzeln ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von TRI- zu TRII-Alkaloiden nachgewiesen (Abbildung C.4). In den anderen Geweben (untere Blätter, Wurzeln) und Linien hatte es sich deutlich in Richtung der TRI-Alkaloide, insbesondere zum Hyoscyamin hin verschoben. Der Wildtyp akkumulierte die höchste Gesamtalkaloidmenge (25,7 µmol/g TM). Die H11-Linien erreichten bei vergleichbarem Wachstum nur 57-61 % des Wildtypalkaloidgehaltes (14,7-15,7 µmol/g TM). Geringe Scopolaminmengen wurden in den Blättern aller Linien detektiert. Es ist vorstellbar, dass für die Verschiebung des Alkaloidmusters weniger das höhere Alter der Pflanzen als der Befall mit den Schädlingen Blattlaus (*Myzus persicae*) und Weiße Fliege (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) verantwortlich war. Ein differenzierter Schädlingsbefall der Linien wurde nicht festgestellt.



Abbildung C.4 Alkaloidakkumulation verschiedener Gewebe unterschiedlicher A. belladonna-Pflanzen, 7 Monate alt

Kultivierung im Gewächshaus (Kapitel B 1.1.2.3): WT (Wildtyp), H11/2 (transgene PMTsense-Linie H11/2) sowie H11/3 (transgene PMT-sense-Linie H11/3). Daten zu Vektorpflanzen und Sprossgeweben waren nicht verfügbar. Die Gruppe "obere Blätter" beinhaltet die obersten 5 Blätter einer Pflanze, die Gruppe "untere Blätter" die restlichen 7-10 Blätter. Der TRI-Alkaloidwert setzt sich aus Hyoscyamin und Scopolamin zusammen. Die Werte sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Bestimmungen. Die Standardabweichungen lagen zwischen 20 und 30 %.

C 2.1.1.2 PMT-antisense-Pflanzen

Häufig werden nach *sense*-Transformation mit einem Gen Pflanzen regeneriert, die anstelle einer Überexpression eine *Cosuppression* dieses Gens aufweisen. Nach der PMT*sense*-Transformation zeigte jedoch keine einzige transgene Pflanzenlinie eine reduzierte Transkriptakkumulation (persönliche Mitteilung Prof. Hashimoto). Eine gezielte *antisense*-Transformation war demnach notwendig, um Pflanzen mit einer verringerten PMT-Transkription zu erhalten.

Die *antisense*-Transformation wurde unter Verwendung einer homologen PMT-cDNA mittels *A. tumefaciens* durchgeführt (vgl. Kapitel B 1.3.2). Das verwendete Konstrukt ist in Abbildung C.5 dargestellt.



Abbildung C.5 Schematische Darstellung der A. belladonna-PMT-Konstruktion im binären Vektor pBI121

Die Abkürzungen stehen für: RB: *right border* der T-DNA; LB: *left border* der T-DNA; CaMV 35S Promotor: *cauliflower mosaic virus* 35S-Promotor; nos-Pro oder -Ter: Nophalinsynthase-Promotor oder -Terminator.

Die Transformation von 55 Blättern führte nach durchschnittlich 5 Monaten zur Regeneration von 64 sterilen Pflanzen (vgl. Kapitel B 1.1.3). 20 % dieser Pflanzen wiesen eine Kanamycinsensitivität auf (Abbildung C.6). Von den kanamycinresistenten, potentiellen Transformanten dieser T0-Generation wurden 6 Linien mit jeweils 1-16 Pflanzen selektiert (vgl. Kapitel G 2.1.2). Phänotypische Veränderungen oder Wachstumseinschränkungen waren nicht erkennbar.



Abbildung C.6 Atropa belladonna-Pflanzen nach antisense-Transformation mit homologer PMT-cDNA

Die Selektion erfolgte mittels 100 mg/l Kanamycin im B5-Medium ohne Zucker. Links sind die typischen Symptome einer kanamycinsensitiven Pflanze zu sehen: ausgeblichene Blätter und Absterben. Die rechte Pflanze ist kanamycinresistent.

Von stichprobenartig ausgewählten Pflanzen wurde genomische DNA isoliert, die als Matrize für PCR-Experimente eingesetzt wurde. Die genetische Voraussetzung zur Kanamycinresistenz, die Existenz des *nptll*-Gens, konnte in allen untersuchten Pflanzen bestätigt werden (ohne Abbildung). PCR-Experimente, die das Vorhandensein des PMT- Gens in *antisense*-Orientierung mittels vektor- und insertspezifischen Primern klären sollten, verliefen uneindeutig (ohne Abbildung). Weitere Untersuchungen stehen aus.

Parallel zu den PMT-*antisense*-Pflanzen konnten 2 Linien von Vektorkontrollpflanzen, die mit dem Originalplasmid pBI121 (Jefferson *et al.* 1987) transformiert wurden, selektiert werden. Bei 2 von bisher 4 untersuchten Vektorkontrollpflanzen konnte mit einem histochemischen Test die Existenz des *uidA*-Gens, das für eine ß-Glukuronidase kodiert, nachgewiesen werden (ohne Abbildung, vgl. Kapitel B 2.2.2)

C 2.1.2 Wurzelkulturen

Pfropfungsversuche in den 30er Jahren hatten eindrucksvoll gezeigt, dass die TRI-Alkaloide in *A. belladonna* in intakten Pflanzenwurzeln gebildet werden (Mothes 1969). Unter etablierten Zellkulturen von Suspensions-, Spross- und Wurzelkulturen waren vorwiegend nur die Wurzelkulturen zur Bildung von Tropanalkaloiden befähigt (Hashimoto *et al.* 1983). Zudem wurden die meisten der derzeit bekannten tropanalkaloidbildenden Enzyme aus Wurzelkulturen isoliert (Hashimoto *et al.* 1987 und 1992, Suzuki *et al.* 1999a). Im Vergleich zum System Pflanze handelt es sich bei den Wurzelkulturen um ein isoliertes Organsystem, in dem sich eine Veränderung der PMT-Transkription besonders deutlich in der Tropanalkaloidakkumulation niederschlagen sollte (vgl. Kapitel A 3).

C 2.1.2.1 PMT-sense-Wurzelkulturen

Diese Wurzelkulturen wurden nicht durch eigenständige Transformation mittels *A. rhizogenes*, sondern durch Abtrennen der Wurzel von einer sterilen Wildtyppflanze und jeweils einer sterilen kanamycinresistenten T2-Pflanze der Vektorlinie, H11/2 und H11/3 angelegt. Für alle transgenen Wurzelkulturen wurde eine maximale Kanamycinresistenz von 50 mg/l nachgewiesen (ohne Abbildung).

C 2.1.2.1.1 PMT-Transkription

In *Northern Blot* Analysen zeigten erwartungsgemäß alle Wurzelkulturen bei Verwendung der Tabak-PMT-Sonde ein Transkriptionssignal (Zweifachbestimmung, Abbildung C.7). Bei den detektierten Transkripten von Wildtyp- und Vektorpflanzen handelte es sich um die native *A. belladonna*-PMT, die mit 86 % eine hohe Sequenzhomologie zur Tabak-PMT aufweist. Im Vergleich zu den H11-Linien zeichneten sich diese Signale durch eine geringere Größe und Intensität aus. Die Größendifferenz resultiert zum einem aus unterschiedlich lang kodierenden PMT-Sequenzen (Start-Stop, 117 bp). Darüber hinaus besitzt die Tabak-PMT im Gegensatz zur Atropa-PMT eine N-terminale Erweiterung von 132 bp. Diese DNA-Sequenz weist eine *tandem-repeat*-Struktur auf (33 bp, viermal wiederholt). Über deren Funktion wird bisher nur spekuliert (Hibi *et al.* 1994, Suzuki *et al.* 1999a).



Abbildung C.7 Transkriptakkumulation der Tabak- und Atropa-PMT in Wurzelkulturen

20 µg Gesamt-RNA wurde aus 14 d alten, auf B5-Medium kultivierten Wurzelkulturen isoliert: WT (Wildtyp), VC (Vektor), H11/2 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/2), H11/3 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/3), Nt (Blatt *N. tabacum*, Negativkontrolle). Die Hybridisierung erfolgte mit einem radioaktiv markierten 1128 bp großen Fragment der Tabak-PMT-cDNA (kodierende Sequenz) **(A)**. Für die Kontrollhybridisierung wurde eine radioaktiv markierte 18S rRNA-Sonde verwendet **(B)**.

Die Transkriptionssignale der H11-Linien waren qualitativ und quantitativ vergleichbar. Damit ergaben sich Unterschiede in der PMT-Transkription zwischen Wurzelkulturen und Pflanzen der transgenen H11-Linien (vgl. Abbildung C.2). Zum Ausschluss einer Kreuzhybridisierung wurde nach Entfernung der PMT-Sonde mit dem SPDS-Fragment hybridisiert (ohne Abbildung). In diesem Fall bestätigte sich das gleichmäßige Muster der Transkriptionssignale, das bei der SPDS-Hybridisierung der Blätter detektiert wurde. Zur Sicherstellung, dass gleiche RNA-Mengen aufgetragen wurden, erfolgte eine Kontrollhybridisierung mit einer 18S rRNA-Sonde.

C 2.1.2.1.2 Tropanalkaloidakkumulation

Die Wurzelkulturen wurden auf Alkaloidakkumulation und -muster untersucht. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob die Nährmediumzusammensetzung die Bildung der Tropanalkaloide beeinflusst. Die 4 verschiedenen Wurzelkulturlinien wurden für diese Untersuchungen über einen Zeitraum von 28 Tagen auf folgenden Medien kultiviert:

- B5-Medium (3 % Saccharose)
- B5-Medium mit 1 µM IBA (Indol-3-buttersäure)
- 1/2 B5-Medium mit 5 % Saccharose.

Im Wachstum zeigten die unterschiedlich kultivierten Wurzelkulturen des Wildtyps und der H11-Linien keine Unterschiede (durchschnittlich 5 g FM). Die Vektorwurzeln wuchsen

hingegen schlecht (durchschnittlich 2,5 g FM). Wurzelkulturen, die 28 d auf B5-Medium gewachsen waren, wiesen vergleichbare Alkaloidgehalte und -muster auf (Abbildung C.8). Bei den auxinkultivierten Wurzeln enthielten die Wildtyp- und Vektorlinie geringere Gesamtalkaloidmengen als die PMT-*sense*-Transformanten, die in den Medien mit und ohne Auxinzusatz ähnliche Alkaloidgehalte akkumulierten. In den Wildtypwurzeln war die TRII-Akkumulation um 38 % und in den Vektorwurzeln um 60 % gegenüber dem B5-Medium ohne Auxinzusatz reduziert. Die TRI-Alkaloidakkumulation war beim Wildtyp nicht und bei den Vektorwurzeln mit 10 % nur geringfügig beeinträchtigt. Das TRI-/TRII-Alkaloidverhältnis war bei den Wurzeln von Wildtyp und Vektor 1:2, bei den H11-Wurzelkulturen 1:4. Der in verschiedenen Publikationen beschriebene negative Einfluss von Auxinen auf die Tropanalkaloidbiosynthese wurde somit bestätigt (Hashimoto *et al.* 1985).



Abbildung C.8 Alkaloidakkumulation unterschiedlicher Wurzelkulturen nach Kultivierung auf verschiedenen B5-Medien

Die Wurzelkulturen waren zum Erntezeitpunkt 28 d alt: WT (Wildtyp), VC (Vektor), H11/2 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/2) sowie H11/3 (transgene PMT-*sense*-Linie H11/3). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken sichtbar.

Die Modifikation des Nährmediums (½ B5-Medium mit 5 % Saccharose) führte in den Wurzelkulturen von Wildtyp und Vektorlinie zu einer sichtbaren Erhöhung des Gesamtalkaloidgehaltes. Im Vergleich zur Alkaloidakkumulation auf dem unveränderten B5-Medium waren die H11-Linien auf diesem Medium nur zu einer geringfügigen Steigerung der Gesamtalkaloidmenge fähig.

Ferner wurden Alkaloidbestimmungen der Wurzelkulturen auf allen 3 Medien im Alter von 7, 14 und 21 d durchgeführt. Charakteristische Unterschiede im Verlauf der Gesamtalkaloidakkumulationen wurden nicht beobachtet (ohne Abbildung).

C 2.2 Regulationspunkt Tropinonreduktasen

Nach der Bildung von *N*-Methylputrescin stellt die Tropinonreduktion den nächsten wichtigen, regulatorischen Verzweigungspunkt in dieser Alkaloidbiosynthese dar. Von den 2 Enzymen TRI und TRII werden 2 verschiedene Reduktionsprodukte - Tropin und Pseudotropin - gebildet. TRI- und TRII-Transformanten sollten Informationen zur Verteilung der Vorstufe Tropinon und Regulation der verschiedenen Alkaloide liefern.

C 2.2.1 Konstrukte

Der binäre Vektor pBI121 (Jefferson *et al.* 1987) wurde als Grundlage für die Konstruktion der spezifischen Plasmide verwendet (siehe Abbildung C.9). Das *uidA*-Gen wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sac*I aus dem Vektor entfernt. An diese Stelle wurde die jeweilige DTR-cDNA durch Ligation eingebracht. Die mittels PCR angefügten Schnittstellen legten die *sense*- oder *antisense*-Orientierung der cDNA im Vektor fest.



Abbildung C.9 Schematische Darstellung der D. stramonium TRI-Konstrukte: (A) sense-Konstruktion, (B) antisense-Konstruktion im binären Vektor pBI121

Die *D. stramonium*-TRII-Konstrukte wurden analog hergestellt. Die Abkürzungen bedeuten: RB: *right border* der T-DNA; LB: *left border* der T-DNA; CaMV 35S- Promotor: *cau-liflower mosaic virus* 35S-Promotor; nos-Pro oder -Ter = Nophalinsynthase-Promotor oder -Terminator.

Mit den Konstrukten wurden kompetente *Escherichia coli-*Zellen transformiert. Durch Restriktionsspaltung und Sequenzierung der Plasmid-DNA rekombinanter Bakterienklone wurde die Orientierung des Gens im Vektor überprüft. Nach der Transformation von den Agrobakterien wurde analog verfahren. Ferner wurde der Originalvektor pBI121 zur Transformation eingesetzt. Diese Transformanten stellen die Vektorkontrollen dar.

C 2.2.2 Pflanzen

Nach wiederholter, methodisch variierter Transformation mit den 4 verschiedenen DTR-Plasmiden konnten nur 2 kanamycinresistente DTRII-*sense*-Pflanzenlinien mit 2 bzw. 6 Pflanzen regeneriert werden. Es wurden weder phänotypische Veränderungen noch Beeinträchtigungen des Pflanzenwachstums beobachtet. Die TRII-Transkription, Intermediatund Alkaloidakkumulation wurden bisher nicht untersucht.

C 2.2.3 Wurzelkulturen

Nach den *A. rhizogenes*-Transformationen konnten zahlreiche Wurzelkulturen regeneriert werden (vgl. Kapitel B 1.2.3). 1-2 Monate nach der Transformation hatten sich an einigen Stellen der inokulierten Blätter Wurzeln gebildet (Abbildung C.10).



Abbildung C.10 Wurzelbildung an einem mit DTRII-sense-Konstrukt transformierten Blatt

Zu den Transformationen wurden Blätter steriler *A. belladonna-*Pflanzen (Japan-Wildtyp) verwendet. Das DTRII-*sense*-Konstrukt war mittels *A. rhizogenes* 15834 (White und Nester 1980) in das Blatt inokuliert worden.

Nach der Abtrennung von den Blättern wurden die Wurzeln unter Schütteln für 1-2 Passagen in flüssigem B5-Medium mit Kanamycinzusatz zur Selektion, Carbenicillinzusatz zur Abtötung der Agrobakterien, aber ohne Phytohormonzusätze kultiviert. Die regenerierten Wurzelkulturen zeigten im Wesentlichen 2 charakteristische, in Abbildung C.11 dargestellte Wachstumsformen.

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Wurzelkulturen, d.h. <u>Is-B-a</u> bedeutet: transformiert mit DTRI-*sense*-Konstrukt, Blatt B, Wurzel a. Die unterschiedliche Bezeichnung der Wurzelkulturen mit Buchstaben und Ziffern beruht auf zeitlich verschiedenen Transformationsexperimenten.



Abbildung C.11 Charakteristisches Wachstum zweier DTRII-sense-Wurzelkulturen

Die linke Kultur zeichnet sich durch eine dünne, fasrige Wurzelstruktur, eine hellgelbe Farbe und dem Hochwachsen an der Kolbenwand aus. Die rechte Kultur besitzt eine dicke, fleischige, durchscheinende Wurzelstruktur, zum Teil eine bräunliche Farbe und wächst knäuelförmig. Beide Wurzelkulturen wachsen auf B5-Medium ohne Kanamycin-, Carbenicillin- oder Phytohormonzusatz.

Von allen kanamycinresistenten regenerierten Wurzelkulturen (insgesamt 66 Stück) wurde genomische DNA isoliert, die für verschiedene PCR-Experimente als Matrize verwendet wurde. Dadurch konnten erste Hinweise zur Existenz der heterologen TR-cDNA und des *nptll*-Gens gewonnen werden. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt. Zum Teil wurden erhaltene PCR-Produkte zur weiteren Identitätsermittlung einer Sequenzierung unterzogen (ohne Abbildung, Richter 2002).

C 2.2.3.1 Wildtyp- und Vektorkontrollwurzelkulturen

Nach Wurzelabtrennung von einer sterilen *A. belladonna*-Pflanze (Japan-Wildtyp) wurde diese Wildtypwurzelkultur als nicht transformierte Vergleichskultur angelegt (vgl. Abschnitt C 2.1.2.1). Im Alter von 28 d besaß diese Wurzelkultur eine durchschnittliche Frischmasse von 5-6 g.

Bei der *A. rhizogenes*-vermittelten Transformation von 25 Blättern mit dem Originalvektor pBI121 wurden 5 unabhängige Vektorkontrollwurzelkulturen erzeugt. Die Existenz des *uidA*-Gens konnte mit dem GUS-Test nur bei einer Wurzelkultur nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Starker Agrobakterienbefall vernichtete später alle 5 Vektorkontrollen. Eine Abgrenzung der allein durch den Transformationsprozess verursachten Änderungen der Tropanalkaloidbiosynthese ist jedoch unbedingt erforderlich. Aus diesem Grund wurde von kanamycinresistenten Vektorkontrollpflanzen, die nach *A. tumefaciens*-Transformation mit dem pBI121-Vektor regeneriert worden waren, wie oben beschrieben Wurzelkulturen angelegt.

C 2.2.3.2 TRI-sense-Wurzelkulturen

Von etwa 50 mit dem DTRI-*sense*-Konstrukt transformierten Blättern wurde wegen des starken Agrobakterienbefalls wenig Blattmaterial mit Wurzelansätzen gewonnen. Nach mehrfacher, regelmäßiger Behandlung mit hohen Carbenicillinkonzentrationen war der Bakterienbefall weitgehend eingegrenzt, so dass die Wurzelkulturen nachfolgend ohne dieses Antibiotikum kultiviert werden konnten. Von 5 Blättern wurden insgesamt 20 verschiedene Wurzelkulturen erhalten (siehe Kapitel G 2.2.1) Die Kulturen wuchsen zur Ermittlung der maximal verträglichen Antibiotikumkonzentration auf 20-40 mg/l Kanamycin. Kanamycinresistente Transformanten wuchsen unter diesem Zusatz langsamer als ohne Zusatz, kanamycinsensitive Transformanten gar nicht. Bei 20 mg/l wiesen 9 Wurzelkulturen, bei 40 mg/l nur noch 2 Wurzelkulturen ein akzeptables Wachstum auf. 28 d alte, auf 20 mg/l Kanamycin kultivierte Wurzeln zeigten Frischmassen zwischen 4,1-9,5 g. Ohne diesen Antibiotikumzusatz erreichten die Wurzelkulturen innerhalb des gleichen Zeitraumes Frischmassen von 8,9-15,8 g.

C 2.2.3.2.1 Transformationsnachweis und Transkription

Das Vorhandensein des *nptll*-Gens konnte unter Verwendung spezifischer Primer (vgl. Kapitel B 1.5) nur in einer Wurzelkultur eindeutig bestätigt werden (Is-D-d). Ferner wurde mittels *Dot Blot* Analysen bei mindestens 13 Transformanten die Existenz des CaMV 35S-Promotors nachgewiesen (ohne Abbildung, Richter 2002). Zum Nachweis der heterologen TRI wurden 3 verschiedene Primerkombinationen verwendet (Kapitel B 1.5). 2 Wurzelkulturen (Is-D-d und Is-1-1) lieferten in jedem dieser PCR-Experimente Produkte der richtigen Größe. Sequenzierungen verschiedener PCR-Produkte bestätigten die Existenz der DTRI in den Wurzelkulturen.

In *Northern Blot* Analysen zeigten 8 Transformanten sehr hohe DTRI-Transkriptmengen und 7 eine sichtbare Transkriptakkumulation. Bei Wildtyp, Vektorkontrolle und 3 transgenen Wurzelkulturen wurde unter diesen Bedingungen keine Transkriptakkumulation nachgewiesen (Richter 2002).

C 2.2.3.2.2 Intermediate und Tropanalkaloide

Von 5 DTRI-*sense*-Wurzelkulturen wurden erste Intermediat- und Alkaloiddaten bestimmt. Nachfolgende Untersuchungen bestätigten hier dargestellte Ergebnisse (Richter 2002). Der Wildtyp und die Vektorkontrolle waren ohne, die Is-Transformanten unter Kanamycinzusatz 28 d auf B5-Medium gewachsen. Die ermittelten Akkumulationen der Intermediate Tropin und Pseudotropin sind in Abbildung C.12 dargestellt. Die Tropinongehalte, die bei allen Wurzelkulturen im Bereich von 0,07-0,20 µmol/g TM lagen, wurden wegen der geringen Größe nicht in der Abbildung berücksichtigt. Im Gegensatz zum Wild-

C Ergebnisse

typ und zur Vektorkontrolle wurden in den 5 Is-Transformanten deutlich höhere Tropin- als Pseudotropinmengen nachgewiesen. Die Tropin/Pseudotropinverhältnisse können der Tabelle C.2 entnommen werden. Die Gesamtintermediatgehalte der Is-Wurzeln waren im Vergleich zu dem des Wildtyps bis auf eine Ausnahme (Is-E-d) minimal um 90 und maximal um 417 % erhöht. Das Vorkommen weiterer Tropinprodukte, wie z.B. Tigloyl-ester, wurde bisher nicht geprüft. Bei der Bildung der klassischen Tropanalkaloide ist die Veresterung des Tropins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Robins *et al.* 1991a). Aus diesem Grund waren die Auswirkungen der DTRI-Überexpression bei den Is-Wurzeln in Form der gesteigerten Tropinakkumulation gut erkennbar. Die Unterschiede zwischen Wildtyp, Vektorkontrolle und den Is-Transformanten wurden zudem auf Enzymebene bestätigt. Während 14 d alte Wildtyp- und Vektorkontrollwurzeln vergleichbare Gesamtaktivitäten aufwiesen (80 nkat/g Gesamtprotein), wurde beispielsweise bei der TR-Wurzel Is-Ba eine 12fach und bei Is-1-3 eine 8fach höhere Gesamtaktivität gemessen (ohne Abbildung, Richter 2002).

Die Tropanalkaloidakkumulation der Is-Transformanten unterschied sich bezüglich Menge und Muster deutlich von der des Wildtyps (Abbildung C.13 und Tabelle C.2). Die Vektorkontrolldaten ordneten sich dazwischen ein. Bei den TRI-Alkaloiden wurde eine getrennte Darstellung von Hyoscyamin und Scopolamin gewählt, um den DTRI-*sense*-Transformationseinfluss auf die einzelnen TRI-Alkaloide hervorzuheben. Dabei fällt ein variables, nicht unmittelbar von der Höhe der Hyoscyaminakkumulation abhängiges Verhältnis von Hyoscyamin zu Scopolamin auf. In den Is-Transformanten wurde neben diesen Alkaloiden erstmals 6-Hydroxyhyoscyamin reproduzierbar detektiert (vgl. Abbildung A.3). Dieses TRI-Alkaloid, das in Mengen von 1-2 µmol/g TM akkumulierte, wurde in Abbildung C.13 nicht berücksichtigt.

Wurzelkultur	Tropin/Pseudotropin	TRI-/TRII-Alkaloide
WT	1:0,74	1:3,1
VC	1:0,63	1:1,5
ls-B-a	1:0,04	1:0,2
ls-D-d	1:0,12	1:0,9
ls-E-c	1:0,06	1:0,3
Is-E-d	1:0,07	1:0,7
ls-1-3	1:0,04	1:0,7

Tabelle C.2 Intermediat- und Alkaloidverhältnisse von DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Wurzelkulturen: **Is-B-a** \rightarrow transformiert mit DTRI-*sense*-Konstrukt, Blatt B, Wurzel a. Die dargestellten Verhältnisse beziehen sich auf die Werte der nachfolgenden Abbildungen C.12 und C.13.



Abbildung C.12 Intermediatakkumulation von DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt



Abbildung C.13 Alkaloidakkumulation von DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt

In der oberen als auch in der unteren Abbildung sind keine Standardabweichungen eingetragen, da diese (mittlerweile reproduzierte und statistisch abgesicherte) Werte einer Einzelbestimmung repräsentieren.

C 2.2.3.3 TRI-antisense-Wurzelkulturen

Nach der DTRI-*antisense*-Transformation von insgesamt 75 Blättern bildeten 6 Blätter 21 Wurzelansätze. Davon konnten nur 10 Wurzelkulturen regeneriert werden (siehe Kapitel G 2.2.2). Damit wurde bei dieser Transformation die insgesamt niedrigste Ausbeute an transgenen Wurzelkulturen erzielt. Unter dem Zusatz von 20 mg/l Kanamycin im Medium wuchsen 8, auf 40 mg/l noch 6 Wurzelkulturen. Die Frischmassen 28 d alter, auf der geringeren Kanamycinkonzentration gewachsener Wurzelkulturen schwankten recht stark (1,9-10,4 g). Für die nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurden 5 Wurzelkulturen, die 28 d auf kanamycinhaltigem B5-Medium kultiviert wurden, verwendet.

C 2.2.3.3.1 Transformationsnachweis

Die genetische Voraussetzung der Kanamycinresistenz konnte für alle 5 untersuchten las-Wurzelkulturen mittels PCR-Experimenten gezeigt werden. Die mit 2 verschiedenen Primerkombinationen durchgeführten PCR-Experimente zum Nachweis der DTRI und deren *antisense*-Orientierung erbrachten bisher keine eindeutigen Ergebnisse.

C 2.2.3.3.2 Intermediate und Tropanalkaloide

Bis auf eine Ausnahme (las-1-1) akkumulierten die kanamycinresistenten Wurzelkulturen minimal 4 und maximal 57 % der Intermediatgehalte von Wildtyp und Vektorkontrolle (siehe Tabelle C.3). Die Reduktion der Gesamtintermediatmenge spricht allerdings nicht gegen eine spezifische Verringerung der TRI-Aktivität, die eine Pseudotropinbildung begünstigen sollte.

Wurzelkultur	Gesamtintermediatgehalt in µmol/g TM	Tropin/Pseudotropin
WT	7,5	1:0,7
VC	7,6	1:0,6
las-B-c	2,2	1:1,1
las-B-d	0,3	1:0,5
las-1-1	10,6	1:1,4
las-1-3	3,7	1:1,0
las-3-a	4,3	1:0,9

Tabelle C.3 Gesamtintermediatakkumulation von DTRI-antisense-Wurzelkulturen, 28 d alt

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Wurzelkulturen: **Ias-3-a** → transformiert mit DTRI-*antisense*-Konstrukt, Blatt 3, Wurzel a. Die unterschiedliche Bezeichnung der Wurzelkulturen mit Buchstaben und Ziffern beruht auf zeitlich verschiedenen (3) Transformationsansätzen. Die dargestellten Werte repräsentieren eine Einfachbestimmung und bedürfen zur Absicherung einer wiederholten Erfassung.

Die las-Transformanten enthielten höhere Gesamtalkaloidmengen als der Wildtyp und die Vektorkontrolle (Ausnahme Ias-3-a). Im Vergleich zu den anderen DTR-Transformationen akkumulierten diese Wurzelkulturen allerdings die geringsten Alkaloidgehalte (Ausnahme: Ias-B-c). Die Ias-Transformanten enthielten mehr TRII- als TRI-Alkaloide. Das TRI-/TRII-Alkaloidverhältnis des Wildtyps wurde von keiner transgenen Wurzelkultur erreicht. Eine transformationsbedingte unspezifische Reduktion beider TR kann nicht ausgeschlossen werden. Enzymmessungen sollten dies klären.

Wurzelkultur	Gesamtalkaloidgehalt in µmol/g TM	TRI-/TRII-Alkaloide
WT	37,6	1:3,1
VC	48,2	1:1,5
las-B-c	121,7	1:1,7
las-B-d	66,8	1:1,5
las-1-1	50,4	1:1,0
las-1-3	57,0	1:1,1
las-3-a	40,1	1:1,8

Tabelle C.4 Gesamtalkaloidakkumulation von DTRI-antisense-Wurzelkulturen, 28 d alt Die dargestellten Werte resultieren aus einer Einfachbestimmung und bedürfen zur Absicherung einer wiederholten Erfassung.

C 2.2.3.4 TRII-sense-Wurzelkulturen

Nach der Transformation von 50 Blättern mit dem DTRII-*sense*-Konstrukt bildeten sich bei 13 Blättern 42 Wurzelansätze. Davon wurden 29 Wurzelkulturen regeneriert (siehe Kapitel G 2.2.3). Von diesen demonstrierte ein Sechstel bei 20 mg/l und ein Drittel bei 40 mg/l Kanamycinsensitivität. Die Frischmassen 28 d alter, auf kanamycinhaltigem Medium (20 mg/l) kultivierter Wurzeln bewegten sich zwischen 3,8 und 11,1 g. Für die nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurden 5 Wurzelkulturen, die 28 d auf kanamycinhaltigem B5-Medium kultiviert wurden, verwendet.

C 2.2.3.4.1 Transformationsnachweis

Bei allen IIs-Wurzelkulturen wurde in PCR-Experimenten die Existenz des *nptll*-Gens bestätigt. Durch Verwendung 2 verschiedener vektor- und DTRII-cDNA-spezifischer Primerkombinationen konnten bisher bei 4 von 5 Wurzelkulturen Produkte in der jeweils erwarteten Größe nachgewiesen werden. Sequenzierungen dieser PCR-Produkte stehen noch aus.

C 2.2.3.4.2 Intermediate und Tropanalkaloide

In jeder der 5 kanamycinresistenten Wurzelkulturen wurde ein niedrigerer Pseudotropingehalt als im Wildtyp oder in der Vektorkontrolle nachgewiesen. Die Summe der Intermediate erreichte minimal 17 und maximal 74 % des Wildtyps (siehe Tabelle C.5). Die Intermediatgehalte der IIs-Transformanten glichen denen der Ias-Transformanten (vgl. Kapitel C 2.2.3.3.2).

3 IIs-Transformanten akkumulierten 2-2,5fach höhere Gesamtalkaloidmengen als der Wildtyp und die Vektorkontrolle. Eine Wurzelkultur enthielt nur 65 % der Wildtypalkaloidmenge. Keine der IIs-Wurzelkulturen zeigte eine klare Verschiebung des Alkaloidmusters in Richtung der TRII-Alkaloide (siehe Tabelle C.6). Auch in diesem Punkt traten Parallelen zu den Ias-Wurzeln auf. Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zueinander, da beide Transformationen die Pseudotropinbildung begünstigen sollten.

Wurzelkultur	Gesamtintermediatgehalt in µmol/g TM	Tropin/Pseudotropin
WT	7,5	1:0,7
VC	7,6	1:0,6
lls-B-c	5,6	1:0,1
lls-G-a	3,0	1:0,5
lls-H-a	1,3	1:0,3
lls-J-a	2,1	1:0,5
lls-J-b	4,6	1:0,2

Tabelle C.5 Gesamtintermediatakkumulation von DTRII-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Wurzelkulturen: **IIs-4-c** \rightarrow transformiert mit DTRII-*sense*-Konstrukt, Blatt 4, Wurzel c. Die unterschiedliche Bezeichnung der Wurzel-kulturen mit Buchstaben und Ziffern beruht auf zeitlich verschiedenen (2) Transformationsansätzen.

Wurzelkultur	Gesamtalkaloidgehalt in µmol/g TM	TRI-/TRII-Alkaloide
WT	37,6	1:3,1
VC	48,2	1:1,5
IIs-B-c	81,2	1:1,4
lls-G-a	95,5	1:1,1
lls-H-a	95,4	1:1,7
lls-J-a	42,0	1:0,6
lls-J-b	24,6	1:1,0

Tabelle C.6 Gesamtalkaloidakkumulation von DTRII-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt

Bei den sowohl in der oberen als auch in der unteren Tabelle dargestellten Werten handelt es sich um Einfachbestimmungen, die eine vorläufige Aussage zum Einfluss der Transformation auf die jeweilige Akkumulation geben sollten. Die Daten bedürfen zur Absicherung einer wiederholten Erfassung.

C 3 BEEINFLUSSUNG DER REGULATION DURCH KULTIVIERUNG

C 3.1 Regulationsfaktor Nährmedium

Pflanzen und Organkulturen reagieren bei einer Veränderung des Nährmediums, insbesondere der Kohlenhydrat- und Mineralstoffkonzentration sowie bei Zusatz von Phytohormonen oder Präcursoren häufig mit einer Wachstumskorrektur und Modifikation der Sekundärstoffakkumulation.

C 3.1.1 Wurzelkulturen

In den nachfolgend dargestellten Experimenten wurde eine Wurzelkultur *hairy roots*, die mittels Transformation von *A. belladonna* mit *A. rhizogenes* Stamm LBA 9402 erzeugt wurde, verwendet (vgl. Kapitel B 1.2.1)

C 3.1.1.1 Nährmediumbestandteile

C 3.1.1.1.1 Mediumkonzentration

Die Erhöhung des Saccharoseangebotes führt bei vielen Kulturen zu einer Steigerung der Sekundärstoffakkumulation, insbesondere der Alkaloide (Nussbaumer *et al.* 1998, Schröder *et al.* 1999). Die Auswirkungen von erhöhter Zuckerkonzentration und verringertem Mineralstoffgehalt im B5-Medium auf Wachstum und Tropanalkaloidbiosynthese von *A. belladonna*-Wurzelkulturen sollten ermittelt werden. Die *hairy roots* wuchsen über einen Zeitraum von 27 d auf folgenden Medien:

- B5 (88 mM Saccharose)
- ¹⁄₂ B5 (88 mM Saccharose)
- B5 mit 5 % Saccharose (146 mM)
- ¹⁄₂ B5 mit 5 % Saccharose.

Weiterhin wurden *hairy roots* auf ½ B5 mit 8 % Saccharose kultiviert. Diese Wurzelkulturen waren durch schlechtes Wachstum, stagnierende Alkaloidakkumulation und bräunliche Verfärbung gekennzeichnet (ohne Abbildung). Dieses Mediums wies die 2fache Osmolalität des unveränderten B5-Mediums auf (siehe Kapitel B 1.2.1.2). Auf eine weitergehende Datenerfassung dieser Wurzelkulturen wurde verzichtet.

Über einen Zeitraum von 4 Wochen wurden aller 2 d die Massezunahmen und die Alkaloidakkumulationen der auf den verschiedenen Medien kultivierten *hairy roots* bestimmt (Übersicht in Garske 1999). Die Intermediatakkumulationen und Tropinonreduktaseaktivitäten wurden aller 7 d ermittelt (Übersicht in Bunschuch 2001).

Das Wachstum der auf den veränderten Medien kultivierten Wurzeln unterschied sich kaum von denen der Kontrollen (ohne Abbildung). 5 anstelle 3 % Saccharose verursachte

C Ergebnisse

eine geringfügige Verringerung der Frischmassen, die Trockenmassen pro Kolben waren gegenüber den Kontrollen leicht erhöht. Die zusätzliche Halbierung der Mineralkonzentration bewirkte eine im Vergleich zu den Kontrollen 40 %ige Reduktion der Frischmassen, die Trockenmassen unterschieden sich nicht. Das unter 5 % Saccharose verringerte Frisch-/Trockenmasseverhältnis kam durch eine höhere Stärkeeinlagerung gegenüber den Kontrollen auf 3 % Saccharose zustande (Abbildung C.14). Die alleinige Halbierung der Mineralkonzentration des B5-Mediums verursachte nur geringfügige Veränderungen der Frisch- und Trockenmassen als auch der Alkaloidakkumulationen (ohne Abbildung). Auf Grund dessen wurden keine weiteren Daten zu diesen *hairy roots* erhoben.



Abbildung C.14 Stärkeeinlagerung bei unterschiedlich kultivierten hairy roots

Die dargestellten Querschnitte stammen von 27 d alten *hairy roots* (100fache Vergrößerung). Das linke Bild präsentiert die nach 10 min mittels Kaliumjodid angefärbte, eingelagerte Stärke einer auf B5-Medium und das rechte Bild einer auf ½ B5, 5 % Saccharose kultivierten Wurzel.

Bei Betrachtung der Intermediate der unterschiedlich kultivierten *hairy roots* wurden keine signifikanten Unterschiede in Gehalt, Muster oder Verlauf festgestellt (ohne Abbildung). Die durchschnittlich ermittelten Gehalte aller Wurzelkulturen bewegten sich während der gesamten Kultivierungsperiode bei 18 µmol Tropin /g TM, 3,5 µmol Pseudotropin pro g TM und 0,07 µmol Tropinon pro g TM.

Die Gesamtaktivität der Tropinonreduktasen nahm mit zunehmendem Alter in allen Kulturen ab. 7 d alte Kontrollwurzeln zeigten mit 400 nkat/g Gesamtprotein die insgesamt höchste Aktivität. Nach 27 d hatte sich die TR-Enzymaktivität aller Kulturen dem ermittelten Mindestwert von 35 nkat/g Gesamtprotein angenähert. Bei den auf ½ B5 5 % Saccharose kultivierten *hairy roots* wurden zu jedem Analysezeitpunkt die geringsten Tropinonreduktaseaktivitäten detektiert (ohne Abbildung).

In Abbildung C.15 sind die Alkaloidakkumulationen ausgewählter Kontrollwurzelkulturen dargestellt. Die Erhöhung des Saccharosegehaltes auf 5 % führte zu einer geringen Steigerung der Akkumulation des TRI-Alkaloids und ab dem 11. d zu einer signifikanten Steigerung der TRII-Alkaloidakkumulation (Abbildung C.16). Kulturen, die auf ½ B5 mit 5 % Saccharose gewachsen waren, zeigten eine noch deutlichere Induktion der TRII-Alkaloide (Abbildung C.17), insbesondere des Calystegins A_3 (ohne Abbildung). In Tabelle C.7 ist die Alkaloidakkumulation gleich alter aber unterschiedlich kultivierter Wurzelkulturen zum Vergleich dargestellt.



Abbildung C.15 Alkaloidakkumulation unterschiedlich alter hairy roots auf B5-Medium

Bei dieser Abbildung wurden zur Veranschaulichung der wachstumsbedingten Akkumulationsveränderungen alle quantifizierbaren Tropanalkaloide als Einzelwerte dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Bestimmungen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken sichtbar. Die Trockenmassen sind in mg, als Zahl rechts neben der jeweiligen Datengruppe angegeben.

Kultivierung	Gesamtalkaloidgehalt in µmol/g TM	TRI-/TRII-Alkaloide
В5	19,7	1:1
B5, 5% Saccharose	35,9	1:4
1/2 B5, 5% Saccharose	47,7	1:6

Tabelle C.7 Gesamtalkaloidakkumulation verschieden kultivierter hairy roots am 27. Tag

Der Wert Gesamtalkaloidgehalt wurde aus 3-5 unabhängigen Bestimmungen ermittelt und bezieht sich auf die Abbildung C.15. Die rechte Spalte beschreibt das Verhältnis der Alkaloide.









Die dargestellten Werte der oberen und unteren Abbildung sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

C 3.1.1.1.2 Kohlenhydrate und Zuckersignal

Mit den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob die Monomere Glucose und/oder Fructose die wachstumsfördernden und spezifischen tropanalkaloidinduzierenden Wirkungen des Disaccharids Saccharose ersetzen können. Gleichzeitig wurde durch Verwendung von nachfolgend kurz in ihrer Wirkung beschriebenen Monosacchariden geprüft, ob die Steigerung der Alkaloidgehalte durch eine Verbesserung der metabolischen Situation oder durch eine Signalwirkung zustande kommt. Vitrac und Mitarbeiter wiesen in *Vitis vinifera*-Suspensionskulturen eine zuckersignalinduzierte Steigerung der Anthocyanidinbildung sowie die Beteiligung des Enzyms Hexokinase und von Kalziumionen an dieser Signaltransduktion nach (Vitrac *et al.* 2000).

- <u>3-O-Methylglucose</u>: Transport in die Zellen, nicht metabolisierbar, nicht durch Hexokinase phosphorylierbar
- <u>Mannose</u>: Transport in die Zellen, nicht metabolisierbar, durch Hexokinase phosphorylierbar
- Sorbitol: Funktion als Osmotikum.

In allen Experimenten wurden 14 d alte, auf B5-Medium kultivierte *hairy roots* auf neues B5-Medium mit der jeweiligen Kohlenhydratquelle umgesetzt (Konzentration im Medium: 100 mM). Nach 1 und 4 d wurden die Massezunahme und Alkaloidakkumulation der Wurzelkulturen bestimmt. Veränderungen der Tropanalkaloidakkumulation waren nach 4 d stärker als nach 1 d ausgeprägt. Aus diesem Grund wurden nur die Ergebnisse der längeren Kultivierung abgebildet und diskutiert.

Die auf Saccharose kultivierten Wurzeln (Kontrollen) wiesen das beste Wachstum und mit einer Steigerung der Trockenmassen um 240 % die höchste Trockenmassezunahme auf (siehe Abbildung C.18). Die Kultivierung auf den monosaccharidhaltigen Medien führte zu einem schlechteren Kulturenwachstum und einer geringeren Trockenmassezunahme. Die auf Glucose kultivierten Wurzelkulturen erreichten unter den monosaccharidkultivierten *hairy roots* mit einer Trockenmasseerhöhung um 180 % die maximale Zunahme. Es folgten die Kombination Glucose/Fructose mit einer Trockenmassezunahme um 120 % und Fructose mit 80 %. An letzter Stelle standen die Glucoseanaloga mit einer Steigerung der Trockenmassen um 40 und 60 %.

In Analogie zum Wachstumsverhalten erreichte keine der monosaccharidkultivierten hairy roots die auf Saccharose akkumulierten absoluten Alkaloidmengen (Tabelle C.8). In allen Wurzelkulturen hatte sich das Alkaloidmuster in Richtung der TRII-Alkaloide verschoben. Die glucosekultivierten Wurzeln wiesen das größte (1:3) und die mannosekultivierten *hairy roots* das kleinste absolute Alkaloidverhältnis (1:14) auf.



Abbildung C.18 Alkaloidakkumulation von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung auf verschiedenen Kohlenhydratquellen

Start kennzeichnet die Alkaloidsituation 14 d alter Kulturen zum Zeitpunkt des Umsatzes. Die Kohlenhydratkonzentration war im B5-Medium 100 mM, bei der Mischung aus Glucose und Fructose jeweils 50 mM. Die Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die Trockenmassen sind in mg und als Zahlen über dem TRI-Alkaloidwert angegeben.

Kohlenhydrat	Gesamtalkaloidgehalt in µmol	TRI-/TRII-Alkaloide
Start	0,27	1:1
Saccharose	2,33	1:5
Fructose + Glucose	1,50	1:9
Fructose	1,26	1:5
Glucose	1,77	1:3
3-O-Methylglucose	0,74	1:9
Mannose	1,66	1:14
Sorbitol	0,99	1:10

Tabelle C.8 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung auf verschiedenen Kohlenhydratquellen

Die dargestellten Werte beziehen sich auf die obere Abbildung C.18.

C Ergebnisse

Hairy roots, die auf der nicht metabolisierbaren aber phosphorylierbaren Mannose kultiviert wurden, akkumulierten bei schwachem Wachstum hohe Alkaloidmengen, die vorwiegend aus TRII-Alkaloiden bestanden. Diesen Ergebnissen zufolge scheint an der zuckerinduzierten Steigerung der TRII-Alkaloide eine hexokinasevermittelte Zuckersignalwirkung beteiligt zu sein. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde nachfolgend - unter den gleichen Bedingungen wie im vorherigen Experiment - die Wirkung des Hexokinaseinhibitors *N*-Acetylglucosamin auf die Alkaloidakkumulation bestimmt (Abbildung C.19).



Abbildung C.19 Alkaloidakkumulation nach 4-tägiger Kultivierung mit und ohne Zusatz des Hexokinaseinhibitors N-Acetylglucosamin

Die Zucker wurden dem B5-Medium in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt. Das - bedeutet ohne Zusatz, das + einen Zusatz von *N*-Acetylglucosamin (10 mM Endkonzentration). Die Kontrollwerte (-) entsprechen denen aus Abbildung C.18. Die Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Kultivierung	Gesamtalkaloidgehalt in µmol	TRI-/TRII-Alkaloide
Inhibitor	0,52	1:8
Saccharose +	1,82	1:11
Mannose +	1,02	1:3

Tabelle C.9 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung unter Hexokinaseinhibitorzusatz

Die Gesamtalkaloidgehalte beziehen sich auf die obere Abbildung C.19. Die Wurzelkulturen auf den Medien 3-O-Methylglucose und Sorbitol zeigten nach Inhibitorzusatz eine Steigerung der Alkaloidgehalte und wurden deshalb nicht in dieser Tabelle berücksichtigt.
C Ergebnisse

Das Wachstum der Wurzelkulturen wies nach dem Zusatz von *N*-Acetylglucosamin zu den verschiedenen Kohlenhydraten keine zusätzlichen Änderungen auf (siehe Abbildung C.18).

Die simultane Verabreichung von Mannose und Hexokinaseinhibitor führte in den Wurzeln zu einer 40 %igen Reduktion der absoluten TRII-Alkaloidmenge und zu einer Induktion des absoluten TRI-Alkaloidgehaltes um 141 %. Dieser Effekt war 1 d nach Umsatz noch stärker ausgeprägt (ohne Abbildung). In den saccharosekultivierten Kontrollen wurde nach Zusatz des Inhibitors eine Reduktion der absoluten TRI-Alkaloidmenge um 60 % und des absoluten TRII-Alkaloidgehaltes um 15 % beobachtet. Im Gegensatz dazu verursachte die *N*-Acetylglucosamingabe zu den *hairy roots*, die auf den nicht durch Hexokinase phosphorylierbaren Monosacchariden 3-*O*-Methylglucose, Sorbitol oder ohne Zucker (Wert Inhibitor allein) kultiviert worden waren, eine Induktion der TRII-Alkaloidbiosynthese. Wurzelkulturen ohne Medienerneuerung zeigten nach 4-tägiger Inhibitorinkubation eine vergleichbare Reaktion (ohne Abbildung).

Die Beteiligung von Kalzium an der Tropanalkaloidinduktion wurde durch Zusatz eines Kalziumkanalblockers geprüft (Tabelle G.14). Zu diesem Zweck wurde den Medien mit Saccharose oder Sorbitol analog zu den vorherigen Experimenten Verapamilhydrochlorid (Endkonzentration 0,4 mM) zugesetzt, was in allen Fällen zu einer Reduktion des Wachstums führte. 4 d nach Verapamilzusatz war in den saccharosekultivierten Wurzeln die TRII-Alkaloidmenge um 65 % reduziert, die Tropanalkaloidmenge blieb unverändert. In den sorbitolkultivierten Wurzeln wurde unter diesen Bedingungen eine nahezu identische Reduktion beider Alkaloidgruppen um 40 % nachgewiesen. Experimente mit einem weiteren Kalziumkanalblocker - Lanthannitrat 0,4 mM - führten zu vergleichbaren Ergebnissen (ohne Abbildung).

C 3.1.1.2 Nährmediumzusätze

C 3.1.1.2.1 Elicitoren Methyljasmonat und Abscisinsäure

Mit dem nachfolgenden Experiment sollte geprüft werden, ob die Signalstoffe Methyljasmonat (MeJA) oder Abscisinsäure (ABA) die Tropanalkaloidbiosynthese von *A. belladonna*-Wurzelkulturen beeinflussen. Den B5-Medien 14 d alter *hairy roots* wurde MeJA bzw. ABA (Endkonzentration 5 μ M) für 1 und 2 d zugesetzt (Abbildung C.20).

Das Wachstum der Kulturen war vergleichbar, die Trockenmassen unterschieden sich nur geringfügig. Die Applikation von Ethanol, MeJA oder ABA führte nach beiden Tagen zu einer Reduktion der absoluten Gesamtalkaloidgehalte (um 19, 52 oder 34 %). Während das TRI-/TRII-Alkaloidverhältnis der verschieden kultivierten Wurzelkulturen nach 1 d nahezu dem der Kontrollen entsprach, hatte es sich in den Ethanol- und MeJA-Wurzeln

nach 2 d in Richtung des TRI-Alkaloids verschoben (Tabelle C.10). Die Reduktion der TRII-Alkaloide war im Besonderen durch die Abnahme des Hauptcalystegins A_3 gekennzeichnet (ohne Abbildung).



Abbildung C.20 Alkaloidakkumulation nach Zusatz von MeJA und ABA

MeJA und ABA wurden dem Medium in einer Endkonzentration von 5 μ M zugesetzt. Die gleiche Menge Ethanol (17,5 μ I) wurde dem Medium als Lösungsmittelkontrolle verabreicht. Die als Kontrolle bezeichneten Kulturen hatten keinen Zusatz erhalten. Die Werte sind Mittelwerte aus 4-5 Bestimmungen, die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken angegeben.

Wurzelkulturen	Vurzelkulturen Gesamtalkaloidgehalt in µmol			
1 d Kontrolle	1,30	1:6		
1 d Ethanol	1,05	1:7		
1 d MeJA	0,62	1:7		
1 d ABA	0,86	1:6		
-	-	-		
2 d Kontrolle	2,01	1:6		
2 d Ethanol	0,99	1:4		
2 d MeJA	1,20	1:3		
2 d ABA	0,86	1:6		

Tabelle C.10 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots nach 1- und 2tägiger Kultivierung unter MeJA- oder ABA-Zusatz

Die Gesamtalkaloidgehalte beziehen sich auf die obere Abbildung C.20. Die rechte Spalte spiegelt das Alkaloidverhältnis wider.

C 3.1.1.2.2 Phytohormone Auxin und Cytokinin

Um Aufschluss über die regulierende Wirkung der Phytohormone auf die Tropanalkaloidbiosynthese mit und ohne Zuckereinfluss zu erhalten, wurde dem B5-Medium zum einen Saccharose und zum anderen Sorbitol zugesetzt. 14 d alte *hairy roots* wurden für 4 d unter folgenden Bedingungen kultiviert:

- ohne Phytohormon
- 1 µM IBA (Indol-3-buttersäure)
- 1 μM BA (N⁶-Benzyladenin).

Sowohl die auxin- als auch die cytokininkultivierten Wurzelkulturen wiesen nach 4 d ein vergleichbar gutes Wachstum auf. Gegenüber der Saccharosekontrolle steigerte die Gabe von IBA die Trockenmasse der *hairy roots* um 44 %, die von BA um 38 %. Bei den Sorbitolmedien wurden die Trockenmassen der Wurzelkulturen durch jedes der Phytohormone im Vergleich zu den Kontrollen mindestens verdoppelt.



Abbildung C.21 Alkaloidakkumulation nach 4-tägiger Kultivierung unter Phytohormonzusatz

Die B5-Medien enthielten 88 mM Saccharose oder Sorbitol. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Beim Wert Saccharose ist die Standardabweichung auf Grund ihrer Kleinheit nicht erkennbar. Die Trockenmassen wurden in mg und als Zahl über dem TRI-Alkaloidwert der jeweiligen Kultur angegeben.

Kultivierung	Gesamtalkaloidgehalt in µmol	TRI-/TRII-Alkaloide	
Saccharose	2,16	1:12	
+ IBA	2,15	1:5	
+ BA	2,84	1:5	
-	-	-	
Sorbitol	1,74	1:3	
+ IBA	4,60	1:6	
+ BA	4,07	1:6	

Tabelle C.11 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 4-tägiger Kultivierung auf Saccharose oder Sorbitol unter Phytohormonzusatz

Die Gesamtalkaloidgehalte beziehen sich auf die Abbildung C.21. Die rechte Spalte gibt das Alkaloidverhältnis an.

In Analogie zum Wachstum übten IBA und BA auf die Tropanalkaloidbiosynthese der *hairy roots* annähernd gleiche Wirkungen aus. Abbildung C.21 zeigt, dass die Art der Zuckerkomponente über das Ausmaß der Phytohormonwirkung entschied. Während die Kombination Saccharose/Auxin zu einer Reduktion der Gesamtalkaloidakkumulation führte, verursachte die Kombination mit Sorbitol eine gesteigerte Gesamtalkaloidakkumulation. Der absolute Alkaloidgehalt der saccharosekultivierten Wurzelkulturen wurde durch den Zusatz von Auxin nicht und von Cytokinin um 31 % gesteigert (Tabelle C.11). Im Gegensatz zur Saccharosekontrolle wiesen die phytohormonkultivierten Wurzelkulturen erhöhte TRI- und erniedrigte TRII-Alkaloidmengen auf. In den sorbitolkultivierten Wurzelkulturen um 164 (IBA) bzw. 134 % (BA). Im Vergleich zur Sorbitolkontrolle und den Saccharose/Phytohormonwurzeln wurde eine verringerte TRI- und eine gesteigerte TRII-Alkaloidakkumulation hormonwurzeln wurde eine verringerte TRI- und eine gesteigerte TRII-Alkaloidakkumulation hormonwurzeln wurde eine verringerte TRI- und eine gesteigerte TRII-Alkaloidakkumulation hormonwurzeln wurde eine verringerte TRI- und eine gesteigerte TRII-Alkaloidakkumulation hormonwurzeln wurde eine verringerte TRI- und eine gesteigerte TRII-Alkaloidakkumulation hormonwurzeln (Abbildung C.21).

In allen phytohormonkultivierten Wurzelkulturen wurde unabhängig von der verwendeten Zuckerkomponente ein ähnliches Alkaloidmuster identifiziert (Tabelle C.11).

C 3.1.1.2.3 Präcursor Tropinon

Durch die Erhöhung des Tropinonangebotes sollte geklärt werden, wie diese Vorstufe auf die beiden TR-Wege verteilt wird. Dazu wurde den *hairy roots*, die entweder auf B5-Medium oder ½ B5 mit 5 % Saccharose wuchsen, am 13. und 27. Tag Tropinon appliziert (Endkonzentration 5 mM, pH 7,0). Den Kontrollwurzeln wurde analog Natriumchlorid verabreicht. Die Intermediate, Alkaloide sowie Tropinonreduktaseaktivitäten wurden nach 1 und 3 d Inkubation bestimmt (ohne Abbildung, Übersicht in Bunschuch 2001). Die Wurzelkulturen hatten den Präcursor zu jedem Analysezeitpunkt aufgenommen und in den Wurzeln angereichert (15-800fach). Das zusätzliche Tropinonangebot führte zu einer Erhöhung der Tropin- (maximal 7fach) und Pseudotropinakkumulation (maximal 23fach).

C Ergebnisse

Diese erhöhten Intermediatmengen beeinflussten weder die TRI- noch die TRII-Alkaloidbildung. Die Gesamtalkaloidakkumulationen glichen denen der Kontrollen. Die Tropinonapplikation verursachte nach 1 d eine Reduktion und nach 3 d eine komplette Hemmung der Tropinonreduktaseaktivitäten. Bei den Kontrollwurzeln konnte keine Beeinträchtigung der Tropinonreduktasen nachgewiesen werden.

C 3.2 Regulationsfaktor Umgebung

Die Umwelt, wie z.B. Licht, übt in den meisten Fällen einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung von intakten Pflanzen und Organkulturen aus. Da sich diese im Gegensatz zu anderen Lebewesen nicht durch einen Platzwechsel an ihre Umgebung anpassen können, reagieren sie mit einem veränderten Verlauf ihrer Entwicklung und der Sekundärstoffproduktion.

C 3.2.1 Wurzelkulturen

C 3.2.1.1 Belichtung

H. muticus-Wurzelkulturen zeigten nach Belichtung ein verlangsamtes Wachstum und eine erhöhte Akkumulation von 6-Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin (Sauerwein *et al.* 1992). Mit diesem Experiment sollten die Auswirkungen von Licht auf Wachstum und Tropanalkaloidakkumulation von *A. belladonna*-Wurzelkulturen ermittelt werden. *Hairy roots* wurden über einen Zeitraum von 28 d auf B5-Medium mit und ohne Licht kultiviert.

Nach 14 d waren die lichtkultivierten Wurzelkulturen am besten gewachsen und hatten die höheren Alkaloidgehalte akkumuliert (Abbildung C.22 und Tabelle C.12). Der absolute Alkaloidgehalt stagnierte mit zunehmenden Alter. Die unter Lichtausschluss kultivierten Wurzelkulturen wiesen nach 28 d die stärkste Wachstumszunahme und die maximale absolute Alkaloidakkumulation auf. Das Alkaloidmuster hatte sich unabhängig von den Lichtverhältnissen gleichermaßen verändert. Die bevorzugte TRII-Alkaloidakkumulation hatte mit zunehmenden.

Darüber hinaus waren bei den im Licht gewachsenen Kulturen zytologische Wurzelveränderungen erkennbar. Im Bereich der Cortex hatte sich ein grün gefärbter Zellring mit grünen Plastiden, deren photosynthetische Aktivität nicht nachgewiesen wurde, herausgebildet (Abbildung C.23). Morphologische Veränderungen waren nicht erkennbar.



Abbildung C.22 Alkaloidakkumulation von hairy roots, mit und ohne Licht kultiviert

Die Wurzeln wurden auf B5-Medium kultiviert. Bei den unter Licht kultivierten Wurzeln handelte es sich um die 3. Generation der im Licht wachsenden *hairy roots*. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. Die Trockenmassen wurden in mg und als Zahl über dem TRI-Alkaloidwert der jeweiligen Kultur angegeben.

Kultivierung	Gesamtalkaloidgehalt in µmol	µmol TRI-/TRII-Alkaloide		
14 d ohne Licht	1,82	1:9		
14 d Licht	4,32	1:9		
-	-	-		
28 d ohne Licht	11,23	1:3		
28 d Licht	4,75	1:3		

Tabelle C.12 Gesamtalkaloidakkumulation pro Kolben von hairy roots bei 14- und 28tägiger Kultivierung auf B5-Medium mit oder ohne Licht

Die Gesamtalkaloidgehalte beziehen sich auf die obere Abbildung C.22. Die rechte Spalte gibt das Verhältnis der Tropanalkaloide an.



Abbildung C.23 Wurzelquerschnitte von hairy roots, mit und ohne Licht kultiviert

Die dargestellten Querschnitte stammen von 28 d alten *hairy roots* (200fache Vergrößerung). Das linke Bild präsentiert eine Wurzel, die unter Lichtausschluss kultiviert wurde. Das rechte Bild zeigt die durch Lichteinfluss verursachte zytologische Veränderung einer Wurzel. Im gefärbten Cortexbereich (C) sind einzelne grüne Plastide (PI) erkennbar. Die übrigen Buchstaben kennzeichnen Zellschichten des Zentralzylinders X: Xylem, P: Perizykel, E: Endodermis.

D 1 DIREKTE BEEINFLUSSUNG DER TROPANALKALOIDBIOSYNTHESE DURCH TRANSFORMATION

Bei den mittels Blattstücktransformation (*leaf-disk*) gewonnenen Transformanten wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Konstrukt und Agrobakterienstamm unterschiedliche Transformationseffizienzen und Alkaloidakkumulationen ermittelt.

D 1.1 Agrobakterien und Vektoren

D 1.1.1 A. tumefaciens LBA 4404

Nach der Transformation mit Bakterien des zur Familie des Nopalintyps gehörenden Stammes LBA 4404 (Hoekema et al. 1983) konnten nur bei 3 von 6 eingesetzten Konstrukten (PMT-antisense, DTRII-sense und Vektorkontrolle) transgene Pflanzen regeneriert werden. Es ist vorstellbar, dass eine Inkubation des vorbereiteten Blattmaterials mit phenolischen Verbindungen wie z.B. α-Hydroxyacetosyringon oder Methylsyringat vor der Transformation mit diesen Bakterien zu höheren Transformationsausbeuten geführt hätte (Mathews et al. 1990, Sunilkumar et al. 1999). Für die genannten phenolischen Verbindungen, die eine Anlockung von Agrobakterien bedingen können, konnten in Experimenten mit A. belladonna-Wurzelkulturen vir-genexpressionsaktivierende und somit transformationseffizienzsteigernde Wirkungen nachgewiesen werden (Song et al. 1990 und 1991). Die direkte Transformation von A. belladonna-Blättern mit A. tumefaciens scheint bei Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse keine optimale Methode zu sein. Die geringe Zahl an Publikationen zu vergleichbar gewonnen Transformanten unterstützt diese Vermutung. Die meisten der bisher beschriebenen transgenen A. belladonna-Pflanzen wurden nach Protoplasten- oder Sprosstransformation mit A. tumefaciens bzw. aus transformierten Wurzelkulturen (hairy roots) regeneriert (Aoki et al. 1997).

Untersuchungen von LBA 4404-transformierten Kontrollwurzelkulturen, die durch Wurzelabtrennung von pBI121-Kontrollpflanzen angelegt worden waren, wiesen gegenüber den Tropanalkaloidakkumulationen untransformierter Pflanzenwurzeln geringfügig gesteigerte Alkaloidgehalte und eine Musterverschiebung in Richtung der TRI-Alkaloide auf (vgl. Abbildung C.13). Anders gestaltete sich das Bild bei der Transformation mit dem Vektor pGA482, der im Gegensatz zum Vektor pBI121 und den sequenzspezifischen Konstrukten keine exprimierbare Sequenz (Promotor - cDNA - Terminator) enthält. Auf Grund dessen ist die Verwendung des Vektors pGA482 als Kontrolle nicht ganz korrekt, was bei der Diskussion der jeweiligen Ergebnisse durch die Bezeichnung als Vektor und nicht als Vek-

torkontrolle berücksichtigt wird. Yun und Mitarbeiter hatten unter diesen Bedingungen im Vergleich zu Wildtyppflanzen eine mäßige Reduktion der TRI-Alkaloide beobachtet (Yun *et al.* 1992). Später untersuchte analog transformierte T2-Vektorpflanzen enthielten nur noch die Hälfte der Gesamtalkaloidmengen der Wildtyppflanzen (Kapitel C 2.1.1.1.2). Das Konstrukt hatte ohne biosynthesespezifische cDNA-Sequenz allein durch seine Beschaffenheit die Alkaloidakkumulation, nicht jedoch das Alkaloidmuster der Transformanten verändert. Die Lokalisation und Anzahl der integrierten cDNA-Kopien können zusätzliche Veränderungen bewirken. Die zum Transfer verwendeten Bakterien vom *A. tumefaciens*-Stamm LBA 4404 verursachten dagegen in keinem Fall eine sichtbare Modifikation der Alkaloidgehalte oder -muster.

D 1.1.2 A. rhizogenes 15834

Von den ursprünglich 5 zur Transformation eingesetzten Konstrukten konnten in 4 Fällen zahlreiche transgene Wurzelkulturen regeneriert werden. Diese hohen Transformationsausbeuten resultierten aus der hohen Virulenz dieses Bakterienstammes vom Agropintyp (Oksman-Caldentey und Hiltunen 1996). In den transgenen Wurzelkulturen wurden erwartungsgemäß hohe Tropanalkaloidkonzentrationen nachgewiesen. Die DTR-sensetransformierten Wurzelkulturen akkumulierten Alkaloidmengen, die durchschnittlich zweifach höher als die Alkaloidgehalte ganzer Wildtyppflanzen lagen. Bereits 1986 wurde gezeigt, dass hairy root cultures von A. belladonna Tropanalkaloide in Mengen akkumulieren, die ansonsten nur von Pflanzen produziert werden (Kamada et al. 1986). Diese Ergebnisse konnten in zahlreichen nachfolgenden Untersuchungen reproduziert werden (Saito et al. 1992, Aoki et al. 1997). Experimente mit verschieden erzeugten A. belladonna-Wurzelkulturen belegten, dass die Integration der rol A, B, C-Gene des Ri-Plasmids in das pflanzliche Genom für die Ausprägung des hairy root-Phänotyps, das gute Wachstum und die hohe Akkumulation von Metaboliten und Sekundärstoffen verantwortlich ist (Bonhomme et al. 2000). So konnte in den transgenen DTRI-sense-Wurzelkulturen das TRI-Alkaloid 6-Hydroxyhyoscyamin quantifiziert werden, das in der Wildtypwurzelkultur zu keinem Zeitpunkt detektierbar war. Diese rol-Gen-Wirkungen wurden auch bei anderen Wurzelkulturen nachgewiesen, z.B. wurden sie als Auslöser für die gesteigerte Nikotinproduktion in Tabakwurzelkulturen identifiziert (Palazón et al. 1997). Die rol-Gene kodieren für Enzyme der Auxin- und Cytokininsynthese: dem rol A-Gen wird ein möglicher anti-Auxineffekt zugesprochen, das rol B-Gen kodiert für eine Indol-ß-glykosidase und das rol C-Gen für eine Cytokinin-N-glykosidase (Michael und Spena 1995). Vermutungen, dass die rol-Gene Alkaloidakkumulationen über eine Veränderung des Polyaminpools induzieren, konnten nicht bestätigt werden (Altabella et al. 1995). Darüber hinaus testeten Jaziri und Mitarbeiter, ob mit Hilfe von Doppeltransformationen eine weitere Erhöhung von Me-

tabolit- und Tropanalkaloidakkumulationen erreicht werden kann (Jaziri *et al.* 1994). Steigerungen gegenüber den Einfachtransformationen waren jedoch nicht nachweisbar. Als Ursache wurde eine Begrenzung des Vorstufen- und Cofaktorenpools sowie eine limitierte Aktivitätsinduktion verschiedener Biosyntheseenzyme diskutiert.

Ebenso wie die in verschiedenen Publikationen beschriebenen Vorteile, stellten sich die aufgezeigten Schwierigkeiten bei der Entfernung der Agrobakterien während der Etablierung der Wurzelkulturen ein (Vanhala *et al.* 1995). Das starke Bakterienwachstum war für den vollständigen Verlust der DTRII-*antisense*-Wurzelkulturen und nachfolgend der Vektorkontrollen verantwortlich. Aus diesem Grund ist eine Einschätzung des alleinigen Konstrukteinflusses (pBI121) auf die Alkaloidakkumulation und -muster unter diesen Transformationsbedingungen nicht möglich.

Falls für weitergehende Untersuchungen anstelle der DTR-Wurzelkulturen Pflanzen benötigt werden, bieten diese *hairy root cultures* optimale Voraussetzungen für eine Pflanzenregeneration (Jaziri *et al.* 1994, Aoki *et al.* 1997). Es bleibt jedoch zu prüfen, ob der Regenerationsprozess zu positiven oder negativen Veränderungen der Alkaloidakkumulation führt. In der Literatur fanden sich zur Alkaloidbildung der aus *hairy root cultures* regenerierten Pflanzen gegensätzliche Angaben (Jung and Tepfer 1987, Oksman-Caldentey *et al.* 1991).

D 1.2 Biosyntheseenzym PMT

D 1.2.1 PMT-sense-Pflanzen

Bei den PMT-überexprimierenden, phänotypisch unveränderten *A. belladonna*-Pflanzen der T2-Generation wurde in Blättern ektopische PMT-Transkription nachgewiesen. In den Wurzeln dieser Transformanten wurden höhere PMT-Transkriptakkumulationen als in den Wildtyp- und Vektorpflanzenwurzeln detektiert (Kapitel C 2.1.1.1.1). Während die T1-Pflanzen H11/2 und H11/3 identische Transkriptionssignale gezeigt hatten (Hachiya 1997), akkumulierten T2-Pflanzen dieser Linien unterschiedliche Transkriptmengen. Die Nachkommen der H11/2-Pflanze enthielten in Blatt und Wurzel deutlich weniger PMT-Transkript als die der H11/3. Es wurde daraufhin vermutet, dass sich die beiden Linien in der Anzahl und/oder Lokalisation der integrierten Tabak-PMT-cDNA-Kopien unterscheiden. *Southern Blot* Analysen, die gegenwärtig durchgeführt werden, könnten bestehende genetische Differenzen belegen.

Zur Zygotie der H11-Linien dieser Generation können keine gesicherten Aussagen getroffen werden. In der T1-Generation wies die H11-Linie eine 75 %ige Kanamycinresistenz auf, die T2-Generation zeigte eine 100 %ige Resistenz. Dies kann sowohl eine Homozygotie als auch Heterozygotie beider Linien bedeuten (dominantes *nptll*-Gen). Des weiteren kann eine Mehrfachinsertion in das Genom der Transformanten bisher nicht ausgeschlossen werden.

Die Linien Wildtyp, Vektor, H11/2 und H11/3 wiesen in Abhängigkeit von Alter und Kultivierung unterschiedliche Alkaloidakkumulationen und -muster auf (Kapitel C 2.1.1.1.2). Unter sterilen Bedingungen steigerten die Transformanten mit zunehmendem Alter die Alkaloidakkumulation, der Wildtyp fiel durch einen stagnierenden absoluten Alkaloidgehalt auf. Die jüngeren Pflanzen bildeten bevorzugt TRI-Alkaloide (Ausnahme Wildtyp), während die älteren Pflanzen höhere TRII-Alkaloidmengen enthielten. Daten aus vergleichbaren Untersuchungen sind nicht bekannt. Nach der Klimakammerkultivierung wurden in den Pflanzen der verschiedenen Linien bei gleichen Alkaloidmustern (nahezu 1:1) unterschiedliche Alkaloidgehalte ermittelt. Die gewächshauskultivierten, 7 Monate alten Pflanzen wiesen einen Schädlingsbefall auf. In allen Geweben und Linien wurde eine hohe Hyoscyaminakkumulation nachgewiesen. Die Ergebnisse stehen mit Daten anderer Untersuchungen im Einklang. In verschiedenen Solanaceen wurde durch mechanische Beschädigung und Befall mit Fraßschädlingen eine signifikante Steigerung der Hyoscyaminakkumulation ausgelöst (Khan et al. 1990, Shonle und Bergelson 2000). Dies deutet auf eine Verknüpfung von TRI-Alkaloiden und Pflanzenabwehr hin. Ferner wurden bei den befallenen Pflanzen des Wildtyps und der H11-Linien deutliche Unterschiede in TRII-Alkaloidakkumulation und Gesamtalkaloidgehalt festgestellt.

Die Tabak-PMT-Überexpression hatte in T1-Pflanzen von N. sylvestris die N-Methylputrescinmenge und Nikotinakkumulation im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (Sato et al. 2001). In parallel hergestellten PMT-überexprimierenden T1-Pflanzen von A. belladonna wurde zwar ein erhöhter N-Methylputrescingehalt, jedoch keine gesteigerte TRI-Alkaloidakkumulation nachgewiesen. Untersuchungen der T2-Pflanzen konnten die Ergebnisse auf Alkaloidebene nicht bestätigen. Trotz unterschiedlicher, nur begrenzt miteinander vergleichbarer Wachstumsbedingungen zeichneten sich bei Betrachtung der Gesamtalkaloidgehalte in jedem der 4 Experimente deutliche Differenzen zwischen Wildtyp und Transformanten ab. Zum überwiegenden Teil - in 3 von 4 Untersuchungen - akkumulierte der Wildtyp im direkten Vergleich mit den jeweiligen transgenen T2-Pflanzen höhere und nur einmal geringere Gesamtalkaloidmengen (7 Monate alt, steril kultiviert). Es stellte sich die Frage, warum der Biosynthesefluss in den T2-Linien reduziert war. Das Eintreten einer Cosuppression als eine Form des posttranskriptionalen Gene silencing (PTGS) kann auf Grund der nachgewiesenen PMT-Transkription ausgeschlossen werden (Vaucheret et al. 1998). Verschiebungen des Translationsrasters (Leseraster), Effekte negativer Translationskontrollen z.B. durch Translationsrepressorproteine als auch posttranslationale Modifikationen, die zu einer Behinderung der Tabak-PMT-Translation führen könnten, scheinen auf Grund der erfolgreichen Translation in den T1-Pflanzen und der Beeinträchtigung

der normalen Alkaloidakkumulation nicht als Ursachen in Frage zu kommen. Mittels PMT-Enzymaktivitätsmessung oder Bestimmung des N-Methylputrescingehaltes in Blatt und Wurzel sollte ein näheres Eingrenzen der alkaloidreduzierenden Ursache möglich sein. So ist im Fall nicht messbarer Enzymaktivität und Akkumulation einer hohen N-Methylputrescin- und Hygrinmenge eine Feedbackhemmung von ODC, ADC und PMT sowie eine Inhibierung von MPO vorstellbar. Daten aus der Literatur, wo nach Zusatz von 2 mM N-Methylputrescin zum Nährmedium von D. stramonium-Wurzelkulturen eine 50 %ige Reduktion von ADC- und PMT-Aktivität beobachtet worden war, stützen diese Vermutungen (Robins et al. 1991a). Der hemmende Einfluss scheint auf die genannten Enzyme begrenzt zu sein, da nachfolgende tropanalkaloidbildende Enzyme wie die TR keiner negativen Beeinflussung unterlagen (Bunschuch 2001). Eine toxische Wirkung hoher endogener N-Methylputrescinkonzentrationen kann in Analogie zur Vorstufe Putrescin nicht ausgeschlossen werden (Masgrau et al. 1997). Der Nachweis von hoher PMT-Gesamtenzymaktivität und minimaler N-Methylputrescinakkumulation könnte dagegen auf die Synthese neuartiger Metabolite hinweisen. Dies wurde beispielsweise nach der Überexpression der Tyrosindecarboxylase in Kartoffel beobachtet (Landtag et al. 2002).

Weiterhin wird der übermäßige PMT-Putrescinverbrauch das Polyamingleichgewicht erheblich beeinträchtigen. Das kann bei Unterschreitung einer bestimmten Konzentration zu einer Gegensteuerung des Polyaminstoffwechsels z.B. auf Genexpressions- und/oder Zellteilungsebene führen, da die Polyamine bedeutende Primärstoffwechselprodukte darstellen, die in zahlreiche lebenswichtige Regulationen integriert sind (Bouchereau *et al.* 1999).

D 1.2.2 PMT-antisense-Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit waren auf Grund der langen Regenerationsphase der transgenen PMT-*antisense*-Pflanzen nur erste, richtungsweisende molekularbiologische Untersuchungen möglich (vgl. Kapitel C 2.1.1.2). Als nächstes sollten *Northern Blot* Analysen der Pflanzenblätter und -wurzeln durchgeführt werden, die quantitative Aussagen zur Transkription der nativen und der *antisense*-PMT erlauben. Die Bestimmung der Akkumulationen der Polyamine und Tropanalkaloide sollten Informationen zur Beeinflussung dieser Primär- und Sekundärstoffwechselprodukte liefern. Daten zur PMT-*antisense*-Transformation anderer Solanaceen sind in der Literatur nicht verfügbar.

D 1.2.3 PMT-sense-Wurzelkulturen

Transkriptuntersuchungen der von T2-Pflanzenwurzeln angelegten Wurzelkulturen erbrachten den Nachweis der deutlich stärkeren Gesamt-PMT-Transkription der H11-Linien im Vergleich zur Wildtyp- und Vektorlinie, bei denen nur schwache Signale detektiert wurden (vgl. Abbildung C. 7). Im Gegensatz zu den verschiedenen Transkriptionssignalen der H11-Linien in Pflanzen wiesen die Wurzelkulturen beider Linien miteinander vergleichbare PMT-Transkriptakkumulationen auf. Als mögliche Ursache werden unterschiedliche Transkriptionskontrollmechanismen in den verschiedenen Systemen Pflanze und Wurzelkultur vermutet.

Trotz unterschiedlicher PMT-Transkription akkumulierten die angelegten Wurzelkulturen des Wildtyps und der T2-Transformanten nach B5-Kultivierung vergleichbare Alkaloidgehalte und -muster (vgl. Kapitel C 2.1.2.1.2). Ähnliche Ergebnisse wurden von PMT-überexprimierenden Duboisia-Wurzelkulturen erhalten (Moyano *et al.* 2002a). Die 2-4fache Erhöhung des *N*-Methylputrescinpools führte hier zu keiner signifikanten Erhöhung der Tropan- oder Pyridinalkaloidmengen. In anderen Solanaceen-Wurzelkulturen wurde hingegen durch diese Überexpression eine Steigerung der Tropanalkaloidakkumulation erreicht (Moyano *et al.* 2002b).

In allen *A. belladonna*-Wurzelkulturen wurden hohe Alkaloidgehalte detektiert, die nahezu denen 3 Monate alter, klimakammerkultivierter Wildtyppflanzen entsprach. Im Gegensatz zu den Pflanzen wurde kein ausgeglichenes TRI-/TRII-Alkaloidverhältnis nachgewiesen, eine Bevorzugung des TRII-Weges wurde ersichtlich. Dies entspricht älteren Untersuchungen von *A. belladonna*-Wurzelkulturen (Dräger 1995). Die B5-Modifikation von Kohlenhydrat- und Mineralgehalt führte in Wildtyp- und Vektorwurzeln zu einer deutlichen Steigerung der Gesamtalkaloidakkumulation. Die transgenen H11-Linien zeigten nur leicht erhöhte Alkaloidakkumulationen. Demnach war in den PMT-Transformanten die Induktion der Tropanalkaloidbiosynthese durch Nährmediummodifikation gegenüber den Kontrollen eingeschränkt (vgl. Kapitel D 2.1). Bei der Kultivierung auf B5-Medium mit Auxinzusatz war die Auxinrepression in den transgenen Linien H11/2 und H11/3 durch die PMT-Überexpression weniger ausgeprägt. Veränderungen der Tropanalkaloidbiosynthese waren nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu reduzierte der Auxinzusatz durch Modifikation der PMT-Transkription die Tropanalkaloidbiosynthese - insbesondere die der TRII-Alkaloide - in Wildtyp- und Vektorwurzeln (siehe Kapitel D 2.3).

D 1.3 Biosyntheseenzyme TRI und TRII

D 1.3.1 TRI-sense-Wurzelkulturen

Die TRI-Überexpression führte zu einer spezifischen Verschiebung des Intermediatund Alkaloidmusters in Richtung des TRI-Weges (vgl. Kapitel C 2.2.3.2). Bereits 1992 wurde mit der H6H-Überexpression die Manipulierbarkeit der TRI-Alkaloidbildung in *A. belladonna* demonstriert (Yun *et al.* 1992). Nachfolgende Transformationsexperimente bestätigten dies für eine weitere tropanalkaloidbildende Spezies (Jouhikainen *et al.* 1999). Ferner wurde in TRI- und H6H-exprimierenden *N. tabacum*-Pflanzen nach Präcursorzusatz die Akkumulation des TRI-Produktes Tropin oder der TRI-Alkaloide 6-Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin beobachtet (Rocha-Salavarrieta 2000).

In den TRI-Transformanten wurde die hohe Tropinakkumulation von einer geringen Pseudotropinmenge begleitet. Es ist vorstellbar, dass neben der erhöhten TRI-Gesamtenzymaktivität auch die Lokalisation des DTRI-Enzyms durch eine bessere Tropinonverfügbarkeit zu der erhöhten Tropinbildung beigetragen hat (vgl. Kapitel D 1.4.1). Der sichtbare Anstieg des TRI-Produktes stützt die Aussagen von Robins und Mitarbeitern, dass der metabolische Schritt nach der Tropinbildung der geschwindigkeitsbestimmende bei der TRI-Alkaloidbildung ist (Robins *et al.* 1991a).

Die Überexpression führte zu einem Anstieg der Gesamtalkaloidakkumulation.

D 1.3.2 TRI-antisense- und TRII-sense-Wurzelkulturen

Mit den 2 verschiedenen Transformationen sollte durch eine erhöhte Pseudotropinbildung die TRII-Alkaloidakkumulation gesteigert werden. In den bisher (einmal) untersuchten kanamycinresistenten las- und IIs-Wurzelkulturen wurde jedoch weder eine Steigerung der Pseudotropin- noch der TRII-Alkaloidakkumulation festgestellt. Es ist möglich, dass in den unterschiedlichen Transformanten gleiche Ursachen für dieses Verhalten verantwortlich sind. Die Umsetzung des Pseudotropins scheint innerhalb der TRII-Alkaloidbiosynthese nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, da zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Anstieg der Pseudotropinmengen sichtbar war. Demnach ist es vorstellbar, dass anstelle des Pseudotropins ein bisher nicht identifizierter Metabolit in nachweisbaren Mengen akkumuliert. Die Detektion und Identifizierung einer solchen Zwischenstufe könnte zur schrittweisen Aufklärung der TRII-Alkaloidbiosynthese beitragen. Enzymmessungen der las- und der IIs-Transformanten sollten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Falls bei den verschiedenen Wurzeln vergleichbar niedrige Enzymaktivitäten gemessen werden, könnte dies ein Hinweis auf eine Feedbackhemmung sein. Es kann momentan nur spekuliert werden, dass die Bildung von Pseudotropinestern (Dräger et al. 1992, Robins et al. 1994b) sowie anderer Metabolite in hohen Konzentrationen zu

einer Hemmung verschiedener Enzyme führen könnte. Die Bestimmung von Pseudotropinestern bedarf einer gesonderten (sauren) Aufarbeitung (Witte *et. al.* 1987). TRII-Transkriptionsstudien sollten Hinweise liefern, warum keine erhöhte Bildung von Pseudotropin nachweisbar war.

Die TRI-*antisense*-Transformation von *H. muticus* (L. Zeef, John Innes Centre Norwich, UK) führte zu weniger deutlichen Ergebnissen auf Intermediat- und Alkaloidebene. Die mittels *Northern Blot* Analysen geprüften T1-Transformanten enthielten in Blatt und Wurzel geringere Tropinonkonzentrationen als der Wildtyp, die nahezu ausgeglichenen Tropin- und Pseudotropinakkumulationen unterschieden sich nicht (Untersuchungen in Kooperation mit L. Zeef, nicht publiziert). Das Vorkommen von Estern wurde nicht geprüft. Die *particle bombardment*-vermittelte Transformation (Zeef *et al.* 2000) verursachte analog zur Agrobakterien-vermittelten Transformation eine Erhöhung der Gesamtalkaloidmengen. Wider Erwarten war die Akkumulation beider TR-Alkaloidgruppen in den Transformanten deutlich höher als im Wildtyp. Vergleichbare Transformationsexperimente, die zu einer Erklärung dieser Ergebnisse beitragen könnten, sind bisher nicht bekannt. Es ist vorstellbar, dass der Einsatz von RNAi-Konstrukten anstelle von *antisense*-Konstrukten zu klareren Ergebnissen führen könnte (Smith *et al.* 2000).

D 1.3.3 TR von A. belladonna

Von den 2 Atropa-Putrescin-N-methyltransferasen sind im Gegensatz zu den Tropinonreduktasen die Nukleotid- und Aminosäureseguenzen vollständig bekannt (Suzuki et al. 1999a). Die TR-Nukleotidsequenzen sind nur teilweise bekannt und nicht in der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Datenbank eingetragen. Erste Untersuchungen wiesen auf die Existenz mehrerer TR-Gene hin (K. Nakajima, persönliche Mitteilung). Das Screenen genomischer DNA mit Datura-TR-Sonden führte zur Identifizierung von 2 TRI-Genen, 1 Pseudo-TRI-Gen (fehlende Exonteile) und 3 TRII-Genen. Durch spezielle PCR-Experimente wurden 4 ähnliche TRI-Sequenzen und mehrere TRII-Sequenzen erhalten, die eine hohe Homologie zu den Datura-TR-Sequenzen zeigten. Diese cDNA-Sequenzen stimmten jedoch nicht mit den partiell sequenzierten Genen überein (K. Nakajima, unveröffentlicht). Die Tetraploidie von Atropa scheint für das Vorkommen der TR-Genfamilien mitverantwortlich zu sein. Des Weiteren könnten die TR-Gene einen gemeinsamen Ursprung haben, wobei das Gen für das pseudotropinbildende Enzym das ältere und weiter verbreitete sein soll (Nakajima et al. 1993). Es wurde ferner postuliert, dass sich die Chromosomenzahl diploider A. belladonna-Pflanzen im Laufe der Evolution verdoppelt hat. Die Chromosomenzahl (n = 36) widerspricht Hypothese nicht (Suzuki et al. 1999b).

Die Atropa-TRII wurde erfolgreich gereinigt und charakterisiert. Bei der TRI war dies wegen Stabilitätsproblemen bisher nicht möglich (Dräger und Schaal 1994).

D 1.4 PMT und TR in der Tropanalkaloidbiosynthese

D 1.4.1 Expression und Lokalisation

Die klimakammerkultivierten *A. belladonna*-Pflanzen akkumulierten in den oberen Blättern die höchsten Alkaloidmengen (vgl. Kapitel C 2.1.1.1.2). Das führte zu der Vermutung, dass insbesondere die TRII-Alkaloide, die ebenso hoch konzentriert in oberirdischen Pflanzengeweben anderer Familien wie z.B. in Convolvulaceen vorkommen, auf Grund ihrer Eigenschaft als Glykosidasehemmstoffe junge Gewebe gegen Fraßfeinde schützen (Dräger 1995, Scholl *et al.* 2001b). Im Spross wurden die zweithöchsten und in der Wurzel jeweils die zweitniedrigsten Alkaloidgehalte detektiert. Die Ergebnisse kommen durch den xylemsaftvermittelten Transport der Alkaloide von den Wurzeln als Biosyntheseort der Tropanalkaloide in oberirdische Gewebe zustande (Luckner 1990, De Luca und St Pierre 2000).

Mittels GUS-Reporter-Analysen bzw. immunohistochemischen Lokalisationsstudien wurde eine unterschiedliche zellspezifische Verteilung einiger tropanalkaloidbildender Enzyme innerhalb der Wurzel nachgewiesen (Abbildung D.1). Untersuchungen verschiedener Solanaceen offenbarten darüber hinaus, dass gleiche Biosyntheseenzyme pflanzenspezifisch unterschiedlich lokalisiert sein können. In *A. belladonna* wurde die PMT als frühes Enzym und die H6H als spätes Enzym der Tropanalkaloidbiosynthese nur im Perizykel nachgewiesen (Suzuki *et al.* 1999a und 1999b). Dies begünstigt den Transport der gebildeten Tropanalkaloide in oberirdische Gewebe (Hashimoto *et al.* 1991). Die *Nicotiana sylvestris*-PMT als frühes Enzym der Nikotinbiosynthese wurde hingegen im Xylem, der Endodermis und in äußeren Rindenschichten identifiziert (Shoji 2001). Die *H. niger*-TR`s sind in verschiedenen Zellschichten lokalisiert (Nakajima und Hashimoto 1999).

Auf Grund der Lokalisationsunterschiede wurde vermutet, dass während der Tropanalkaloidbiosynthese ein Intermediattransport zwischen den verschiedenen Zellschichten stattfindet (Nakajima und Hashimoto 1999). Ein interzellulärer Intermediattransport wurde auf Grund ähnlicher Bedingungen ebenso für die Indolalkaloidbiosynthese vorgeschlagen (St Pierre *et al.* 1999). Ferner kann spekuliert werden, dass das TRII-Enzym wegen seiner unmittelbaren Nähe zur PMT einen Substratvorteil hat. Das sollte die Bildung von TRII-Weg-Produkten (Pseudotropin und TRII-Alkaloide) begünstigen. Diese Kompartimentierung kann zur räumlichen Regulation der Tropanalkaloidbiosynthese beitragen.

Weiterhin ist es möglich, dass die in *A. belladonna* nachgewiesenen Genduplikate tropanalkaloidbildender Enzyme die Flexibilität der Regulation erhöhen (K. Nakajima persönliche Mitteilung, Suzuki *et al.* 1999a und b). Aus verschiedenen Biosynthesewegen ist bekannt, dass Genduplikate auf unterschiedliche direkte und indirekte Signale reagieren können (Enjuto *et al.* 1994, Bohlmann *et al.* 1998). Das ermöglicht eine größere intrinsische Kontrolle der Enzymaktivitäten.



Abbildung D.1 Schematische Darstellung der Lokalisation von PMT, TRI und TRII in verschiedenen Zellschichten der Wurzeln

In den farblich dunkler dargestellten Zellschichten wurde die Lokalisation der unterschiedlichen tropanalkaloidbildenden Enzyme in verschiedenen Wurzelkulturen nachgewiesen.

Ferner gibt es Hinweise, die für eine zusätzliche oberirdische Biosynthese der Tropanalkaloide in *A. belladonna* sprechen. PMT-Transkription wurde im Spross und in Blüten, in denen ebenfalls H6H-Transkripte nachgewiesen wurden, detektiert (Suzuki *et al.* 1999a und 1999b). TRII-Enzymaktivität wurde in Blättern, Blüten und im Spross gemessen (Hashimoto *et al.* 1992). Eigene Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse (ohne Abbildung, Bunschuch 2001). Tropinonfütterung (1 mM) an Blätter und Spross führte nach 24 h zu einer Steigerung der Pseudotropinakkumulation (ohne Abbildung), die Gabe noch höherer Tropinonmengen (5 mM) verursachte zudem eine Erhöhung der Tropinakkumulation (Dräger 1995). In *Solanum tuberosum*-Blättern wurde TRI- und TRII-Transkription nachgewiesen (Keiner 2001). Das oberirdische Vorkommen dieser für die Tropanalkaloidbiosynthese wichtigen Enzyme ermöglicht demnach prinzipiell eine "Vor-Ort-Bildung" von Tropanalkaloiden, wenn die Substrate und nachfolgende Enzyme vorhanden sind.

D 1.4.2 Bedeutung in der Regulation

Eine Betrachtung der PMT-Untersuchungen lässt den Schluss zu, dass Wildtyppflanzen und Wurzelkulturen von *A. belladonna* über eine hohe native PMT-Enzymaktivität verfügen. In der Literatur aufgeführte Daten zu PMT-Enzymaktivitäten in Wurzelkulturen von 5-34 nkat/g Gesamtprotein bestätigen dies (Walton *et al.* 1990, Hibi *et al.* 1992). Da eine

PMT-Überexpression in *A. belladonna* nicht zu einer Erhöhung der Alkaloidakkumulation führte, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym innerhalb der Tropanalkaloidbiosynthese nicht limitierend wirkt. Im Gegensatz dazu deutet die mittels PMT-Überexpression gesteigerte Nikotinakkumulation eine limitierende Wirkung dieses Enzyms innerhalb der Nikotinbiosynthese an (Sato *et al.* 2001). Die PMT stellt somit für die Nikotinbiosynthese ein (limitierendes) Schlüsselenzym dar. Auf die Tropanalkaloidbiosynthese trifft diese Aussage nicht zu. Die Ergebnisse weisen demnach auf eine pflanzenspezifische Regulation des gleichen Biosyntheseenzyms hin.

Der Vergleich der Alkaloidakkumulationen von Wildtyp- und PMT-*sense*-Pflanzen offenbarte Mengenunterschiede. Die Bildungskapazitäten wurden durch direkte Faktoren wie z.B. durch Genexpression selektiver Biosynthesegene und Intermediatverfügbarkeit bestimmt. Die Alkaloidmuster hingegen unterlagen hauptsächlich der Regulation durch indirekte Faktoren der Kultivierung. Darüber hinaus wurden Unterschiede zwischen den Systemen Pflanze und Wurzelkultur deutlich. Während das System Wurzelkultur transformationsbedingte Veränderungen des Putrescinpools ohne Auswirkungen auf die Alkaloidakkumulation tolerieren konnte, lösten diese Modifikationen im System Pflanze durch Eingriffe in bestehende Regulationen eine Reduktion der Tropanalkaloidakkumulation aus.

Pflanzen und Wurzelkulturen von *A. belladonna* verfügen über hohe TR-Enzymaktivitäten. In *hairy roots* wurden 110 nkat/g Gesamtprotein TRI-Aktivität und 170 nkat/g Gesamtprotein TRII-Aktivität gemessen (Hashimoto *et al.* 1992). Diese Aktivitäten liegen 3-5fach höher als die PMT-Aktvität. Es ist daher anzunehmen, dass die TR-Enzymaktivitäten weder die Biosynthese der TRI- noch der TRII-Alkaloide limitieren. Demnach regulieren die Menge an verfügbarem Tropinon und die Lokalisation der TR-Enzyme die Bildung der nachfolgenden Metabolite und Alkaloide. Die räumlich engere Lokalisation zur PMT und die höhere TRII-Enzymaktivität begünstigen unter nativen Umständen den TRII-Weg. Durch TRI-Überexpression konnte die Benachteiligung des TRI-Weges reduziert werden. Es wurde vermutet, dass dies eher auf die lokalisationsbedingte Verbesserung der Tropinonverfügbarkeit als auf die erhöhte TRI-Aktivität zurückzuführen ist. Das sollte mittels Lokalisationsstudien geprüft werden. Ferner bleibt abzuwarten, ob eine TRII*antisense*-Transformation zu entsprechenden Veränderungen führt. Bisherigen Ergebnissen zufolge konnte weder durch die TRI-*antisense*-Transformation noch durch die TRII-Überexpression die nativ bevorzugte Bildung der TRII-Alkaloide weiter erhöht werden.

Die Transformation erhöhte zudem unabhängig vom verwendeten genspezifischen Konstrukt die TRI-Produktbildung.

D 2 INDIREKTE BEEINFLUSSUNG DER TROPANALKALOIDBIOSYNTHESE DURCH KULTIVIERUNG

D 2.1 Nährmediummodifikation

Die Erhöhung der Saccharosekonzentration im B5-Medium führte bei einem unveränderten Wachstum der *hairy roots* zu einer annähernden Verdopplung des Tropanalkaloidgehaltes und zu einer Verschiebung des Alkaloidmusters (vgl. Kapitel C 3.1.1.1.1). Die zusätzliche Halbierung des Mineralgehaltes verstärkte diesen Effekt. Allerdings wiesen diese Kulturen eine deutlich reduzierte Massezunahme auf. Der Einfluss solcher Nährmediummodifikationen auf die Bildung der TRI-Alkaloide verschiedener Solanaceen-Wurzelkulturen ist aus der Literatur bekannt, TRII-Alkaloiddaten wurden in keinem dieser Experimente erhoben (Hilton *et a*l. 1990, Nussbaumer *et al.* 1998).

Die Reduktion der Mineralkonzentration als alleinige Änderung des B5-Mediums löste eine deutlich geringere Steigerung der Tropanalkaloidakkumulation als die alleinige Saccharoseerhöhung aus. Demnach wurde die Induktion der Tropanalkaloidproduktion vor allem durch Veränderung der Saccharosekonzentration im Medium verursacht, die Mineralkonzentration spielte eine untergeordnete Rolle. Nach Erhöhung der Saccharosekonzentration auf 8 % und Halbierung der Mineralkonzentration wurde eine Beeinträchtigung des Wachstums und keine Stimulation der Tropanalkaloidbiosynthese festgestellt.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Zuckerkonzentration die osmotischen Verhältnisse im Medium beeinflusst, kann eine Beteiligung osmotischer Effekte an der Induktion der Alkaloidbildung nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen zu osmotischen Stresswirkungen auf *A. belladonna*-Suspensionskulturen stützen diese Vermutung. Der Zusatz von 1,5 % Mannitol (Osmotikum) zum saccharosehaltigen Medium (3 %ig) steigerte die Biosynthese der TRI-Alkaloide um 82 %, höhere oder niedrigere Mannitolapplikationen reduzierten die Tropanalkaloidbildung (Saker *et al.* 1997). Es wurde weiterhin gezeigt, dass osmotischer Stress in *D. stramonium*-Blättern eine Änderung der Putrescinkonzentration auslöst (Tiburcio *et al.* 1986).

Im vorliegenden Fall führten die Mediumveränderungen zu einer unterschiedlich starken Induktion der Produktbildung des TRI- und TRII-Weges. Während die TRI-Alkaloidmenge nur leicht erhöht wurde, stieg die TRII-Alkaloidakkumulation deutlich an. Eine ähnlich differenzierte Zuckerwirkung wurde im Phenolstoffwechsel von *Vitis vinifera-*Zellkulturen nachgewiesen (Larronde *et al.* 1998). Die Akkumulation der Anthocyanidine, die mittels Chalkonsynthase gebildet werden, wurde stark induziert und die Menge an Stilbenen, die mittels Stilbensynthase hergestellt werden, nur schwach gesteigert. Die Veränderung der TRII-Alkaloide und deren strukturelle Ähnlichkeit zu Monosacchariden legt die Vermutung nahe, dass sie bei der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels von Bedeutung sein könnten.

Die erhöhten Tropanalkaloidakkumulationen wurden nicht durch zuckerinduzierte Aktivitätssteigerungen der TR-Enzyme hervorgerufen (Bunschuch 2001). Zudem konnte in Promotorsequenzen von *A. belladonna*-PMT, *H. niger*-TRI und -TRII sowie *A. belladonna*-H6H das von Maeo und Mitarbeitern nachgewiesene zuckerinduzierbare Motiv (SURE) nicht identifiziert werden (Maeo *et al.* 2001). Die unveränderten Intermediatakkumulationen der unterschiedlich kultivierten *hairy roots* schließen zusätzlich eine Beteiligung der Tropinonreduktasen an der Induktion der Alkaloidbiosynthese aus. Demnach müssen die nachfolgenden Reaktionen von Tropin zu Hyoscyamin schwach und von Pseudotropin zu den Calysteginen stark zuckerinduzierbar sein. Die erhaltenden Ergebnisse sind insbesondere für die Biosynthese der TRII-Alkaloide bedeutsam. Bisher sind die Enzyme, die die Umwandlungen vom Pseudotropin zu den Calysteginen vollziehen, nicht bekannt. Eine Beteiligung von Enzymen des Cytochrom P450-Komplexes wird vermutet, von denen einige Enzyme zuckerinduzierbar sind (Cabello-Hurtado *et al.* 1998). Die mittels Saccharose realisierbare Stimulation dieser Produkte könnte zur Aufklärung der Nortropanalkaloidbiosynthese auf Genexpressions-, Protein- sowie auf Intermediatebene beitragen.

D 2.2 Kohlenhydrat

Die Monomere Glucose und Fructose erreichten die wachstumsfördernden Wirkungen des Disaccharids Saccharose weder einzeln noch in Kombination (vgl. Kapitel C 3.1.1.1.2). *Hairy roots*, die auf diesen monosaccharidhaltigen Medien angezogen wurden, zeichneten sich ebenfalls durch ein schlechtes Wachstumsverhalten aus (ohne Abbildung). Darüber hinaus akkumulierten die saccharosekultivierten Kontrollwurzeln deutlich höhere Alkaloidmengen als die monomerenkultivierten Wurzeln. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Untersuchungen von *D. stramonium*-Wurzelkulturen erhalten (Payne *et al.* 1987). Die Erneuerung des Mediums führte bei allen Wurzelkulturen zu einer Steigerung der TRII-Alkaloidakkumulation und bis auf eine Ausnahme (Glucose) zu einer Reduktion des TRI-Alkaloids. Diese Ergebnisse sprechen für eine spezifische Zuckerinduktion des TRII-Weges. Der Alkaloidgehalt sorbitolkultivierter Wurzeln stützt die bereits im vorigen Kapitel geäußerte Vermutung, dass osmotische Effekte an dieser Wirkung beteiligt sind. Des weiteren spielt die Art der Kohlenhydratquelle eine wichtige Rolle, was durch die Unterschiede im TRI-/TRII-Alkaloidverhältnis deutlich wird.

Die auffällig hohe TRII-Alkaloidakkumulation der mannosekultivierten Wurzelkulturen wies auf eine hexokinasevermittelte Zuckersignalinduktion der Produkte des TRII-Weges hin. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde der Hexokinaseinhibitor *N*-Acetylglucosamin

appliziert. In einer Konzentration von 10 mM hatte diese Substanz eine 73 %ige Hemmung der in vitro Hexokinaseaktivität von Lycopersicon peruvianum-Suspensionskulturen verursacht. 100 mM führten zu einer vollständigen Hemmung, während die gleiche Konzentration des häufiger verwendeten Hexokinaseinhibitors Mannoheptulose diese Wirkung nicht erzielen konnte (Hofmann und Roitsch 2000). Der Zusatz von 10 mM N-Acetylglucosamin resultierte in einer prägnanten Reduktion der TRII-Alkaloide. Damit wurde die Vermutung bestätigt, dass bei der TRII-Alkaloidbildung eine hexokinasevermittelte Signalwirkung von Zucker beteiligt ist. Diese Ergebnisse sind von großer Bedeutung, da bisher kaum Untersuchungen von Zuckersignalwirkungen auf den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel bekannt sind. Über die Existenz hexokinasevermittelter Zuckersignaltransduktion in heterotrophen Organkulturen wurde dagegen bereits mehrfach berichtet (Graham et al. 1994, Übersicht in Smeekens 2000). Der reduzierende Effekt war bei den sorbitolkultivierten hairy roots stärker als bei den saccharosekultivierten ausgeprägt. Es ist vorstellbar, dass die Saccharose beispielsweise über Disaccharidtransporter als intaktes Molekül in die Zellen gelangt (Lalonde et al. 1999), mittels Saccharosesynthase in Fructose und UDP-Glucose gespalten wird und somit weniger sensitiv auf eine Hemmung der Hexokinase reagiert. Die simultane Kultivierung der Wurzeln von Inhibitor, nicht verstoffwechselbarer und phosphorylierbarer Kohlenhydratquelle (ohne Zucker, 3-O-Methylglucose, Sorbitol) führte zur entgegengesetzten Reaktion - zur Induktion der TRII-Alkaloidbiosynthese. Die Wirkmechanismen sind nicht bekannt.

In Analogie zur zuckerinduzierten Steigerung der Anthocyanidinbildung in *Vitis vinifera*-Suspensionskulturen (Vitrac *et al.* 2000) konnte in den *A. belladonna*-Wurzelkulturen durch Applikation von Kalziumkanalblockern eine Beteiligung von Kalziumionen an der Zuckerinduktion der TRII-Alkaloidbildung nachgewiesen werden. Die durch Blockierung des Kalziumeinstromes verursachte Reduktion der Gesamtalkaloide der sorbitolkultivierten Wurzelkulturen wies darauf hin, dass Kalziumionen an weiteren bedeutenden metabolischen und regulatorischen Mechanismen (Bush 1995) beteiligt sind. So wurde beispielsweise in Untersuchungen an *D. stramonium*-Wurzelkulturen eine kalziumkonzentrationsabhängige Aktivität einer Peroxidase, die an dem Abbau der Tropanalkaloide beteiligt ist, nachgewiesen (Pinol *et al.* 1999).

D 2.3 Elicitoren und Phytohormone

Während die Applikation von MeJA oder ABA die Akkumulation des TRI-Alkaloids nicht oder nur geringfügig beeinflusste, war die der TRII-Alkaloide deutlich reduziert (vgl. Kapitel C 3.1.1.2.1). Die inhibitorische Wirkung von ABA auf die Tropanalkaloidbiosynthese ist aus Untersuchungen von *H. muticus*-Wurzelkulturen bekannt (Vanhala *et al.* 1998). Nach MeJA-Behandlung tropanalkaloidproduzierender Wurzelkulturen war bisher nur eine induzierende Wirkung beobachtet worden, z.B. in Wurzelkulturen von *D. stramonium* oder *H. muticus* (Zabetakis *et al.* 1999, Biondi *et al.* 2000). Auf Grund der Tatsache, dass dieser Effekt zum einen in maximaler Form erst nach 4 d und zum anderen nur nach Applikation hoher Jasmonatmengen (500 μM) verursacht wurde, kann eine direkte MeJA-Wirkung als Ursache ausgeschlossen werden. In Tabaksuspensionskulturen führte die externe Jasmonatbehandlung bereits nach 1 h zur Induktion der mRNA von Schlüsselenzymen und nach 12 h zu einer gesteigerten Nikotinakkumulation (Imanishi *et al.* 1998). In intakten Tabakpflanzen wird dieser Signalstoff von den Blättern zu den Wurzeln transportiert, in denen nach ein paar Stunden entsprechende Effekt auf die Tropanalkaloidbiosynthese schneller und intensiver sein. Darüber hinaus konnten in Promotoranalysen von *A. belladonna*-PMT, *H. niger*-TRI und -TRII keine jasmonatinduzierbaren Motive, sogenannte G-Boxen nachgewiesen werden (Hashimoto *et al.* 1998a, Suzuki *et al.* 1999a, Nakajima *et al.* 1999b).

In den sorbitolkultivierten Wurzelkulturen wurde nach Phytohormonapplikation - egal ob Auxin oder Cytokinin - sowohl eine Zunahme der Trockenmassen als auch eine Steigerung der Gesamtalkaloidakkumulation beobachtet (vgl. Kapitel C 3.1.1.2.2). Letzteres kann wahrscheinlich auf osmotische Effekte zurückgeführt werden. Bezüglich des Wachstums kann nur spekuliert werden, dass das Osmotikum Sorbitol in Gegenwart von Phytohormonen nach Aktivierung entsprechender Gene verstoffwechselt wird. Untersuchungen an Selleriesuspensionskulturen (*Apium graveolens*) lieferten erste Hinweise, dass Osmotika entgegen bisheriger Vorstellungen metabolisierbare und phosphorylierbare Kohlenhydratquellen darstellen können (Stoop und Pharr 1993). Die Tropanalkaloide zeigten unter diesen Bedingungen ein konträres Verhalten. Während die TRII-Alkaloidakkumulation stark induziert war, wurde die Akkumulation des TRI-Alkaloids reduziert.

Der Phytohormonzusatz verbesserte das Wachstum der saccharosekultivierten Wurzeln. Trotz höherer Trockenmasse wiesen die Wurzelkulturen, die auf der Kombination Saccharose/Auxin kultiviert wurden, geringere Gesamtalkaloidgehalte als die Saccharosekontrollen auf. Die Ursachen sind bekannt. Unter analogen Bedingungen wurden in verschiedenen Solanaceen-Wurzelkulturen verminderte Enzymaktivitäten von ADC, ODC, PMT und MPO nachgewiesen (Hashimoto *et al.* 1986, Robins *et al.* 1991b). 12 bzw. 20 h nach Auxinapplikation wurde eine signifikante Reduktion der PMT-Expression beobachtet (Robins *et al.* 1991b, Hibi *et al.* 1994). Ferner reduzierte Auxin die methyljasmonatinduzierte Genexpression von ODC und SAMS (Imanishi *et al.* 1998). Die Kombination der in alleiniger Form alkaloidinduzierend wirkender Substanzen Saccharose und Auxin führt zu einer negativen Beeinflussung der Tropanalkaloidbiosynthese. Über den Auxin/Zuckerantagonismus und dessen Ursachen wurde mehrfach berichtet (Übersicht in Koch 1996). So wurden beispielsweise Gene mit zucker- und auxinsensitiver Expression identifiziert (De Wald *et al.* 1994). Ferner wird eine Überschneidung der Signaltransduktionswege als Ursache diskutiert. Die Kombination Saccharose/Cytokinin reduzierte die Gesamtalkaloidkonzentration nicht signifikant. Diese Ergebnisse stehen mit früheren Untersuchungen (Sauerwein *et al.* 1992, Vanhala *et al.* 1998) und beschriebenen überlappenden Cytokinin/Zuckerwirkungen im Einklang (Koch 1996, Smeekens 2000).

D 2.4 Präcursor

Durch Inkubation mit dem Präcursor Tropinon wurde weder die Alkaloidakkumulation noch das -muster beeinflusst. Das zugesetzte Tropinon wurde anteilig zu Tropin und Pseudotropin reduziert (vgl. Kapitel C 3.1.1.2.3). Experimente mit niedrigeren Tropinonkonzentrationen (1 mM) ergaben ähnliche Ergebnisse (Dräger 1995). Unabhängig vom Analysezeitpunkt oder Medium wurde unter diesen Bedingungen die Pseudotropinakkumulation stärker stimuliert. Die Ergebnisse sprechen für ein aktiveres TRII- als TRI-Enzym und bestätigen Untersuchungen, in denen durch Enzymmessungen unbehandelter A. belladonna-Wurzelkulturen analoge TR-Aktivitätsunterschiede gezeigt wurden (Hashimoto et al. 1992). Die Reduktion und spätere Hemmung der gesamten TR-Aktivität wurde entweder durch die unphysiologisch hohe Tropinonkonzentration (5 mM) oder durch den starken Anstieg der Tropin- oder Pseudotropinakkumulation (Feedbackhemmung) hervorgerufen. Darüber hinaus kann eine Beeinträchtigung weiterer tropanalkaloidbildender Enzyme nicht ausgeschlossen werden. In Untersuchungen von D. stramonium-Wurzelkulturen wurde nach Tropinapplikation eine Reduktion von ODC, ADC, PMT und MPO sowie eine Abnahme der Tropanalkaloidakkumulation nachgewiesen (Robins et al. 1991a). Auf Grund der Tatsache, dass die erhöhten Intermediatkonzentrationen nicht zu einer Änderung der Alkaloidgehalte führten, wurde eine Hemmung von Enzymen, die nach den TR an der Alkaloidbiosynthese beteiligt sind, postuliert.

D 2.5 Licht

Die Kultivierung im Licht beeinflusste die Alkaloidakkumulation, jedoch nicht das Alkaloidmuster. Die unter Lichtausschluss kultivierten *hairy roots* waren nach 28 d 1,3fach besser als die lichtkultivierten Wurzeln gewachsen und enthielten eine 2,4fach höhere Alkaloidmenge (vgl. Kapitel C 3.2.1.1). Der zunächst induzierende Effekt von Licht auf Wachstum und Tropanalkaloidakkumulation war nach 28 d nicht mehr nachweisbar. Die lichtkultivierten Wurzeln fielen wegen ihrer Färbung auf, die durch grüne in der Cortex lokalisierte Plastide hervorgerufen wurde. Es ist vorstellbar, dass in diesen Plastiden photosynthetische Prozesse ablaufen (Flores *et al.* 1993), die mit den metabolischen Vorgängen der extern saccharoseversorgten Wurzelkulturen interagieren können. Das kann indirekt die Tropanalkaloidbiosynthese beeinflussen. Zahlreiche Untersuchungen, die sich mit Interaktionen von Licht und Zucker beschäftigten, offenbarten deren enge Verknüpfung auf der Ebene der Signaltransduktion und der Genexpression (Cheng *et al.* 1992, Yanovsky *et al.* 1998).

D 3 AUSBLICK

Aus den vorgestellten Ergebnissen verschiedener Experimente ergaben sich recht unterschiedliche Ansatzpunkte für weitere Versuche. Zukünftig sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

Oberirdische Gen- und Proteinexpression tropanalkaloidbildender Enzyme

Verschiedene Untersuchungen lieferten Hinweise, dass die Tropanalkaloide in oberirdischen Geweben gebildet werden können (Kapitel D 1.4.1). Es ist vorstellbar, dass auf Grund der starken Transkription der PMT-, TRI- und TRII-Gene in der Wurzel eine in Blatt und Spross vorhandene, geringe Transkriptakkumulation übersehen wurde. Die gültige Lehrmeinung, dass die Tropanalkaloide ausschließlich in der Wurzel gebildet werden, könnte erklären, warum keine intensiveren Untersuchungen folgten. Zunächst sollten Blätter und Sprosse verschiedener Entwicklungsstadien gründlich auf das Vorhandensein von Transkriptakkumulation oben genannter Gene geprüft werden. Variierende Kultivierungsbedingungen könnten zusätzlich schwache Genexpressionsintensitäten induzieren. Durch *in situ Hybridisierung* (mRNA-Lokalisation) und immunohistochemische Detektion der Proteine sollte zudem geklärt werden, wo die Enzyme in oberirdischen Geweben lokalisiert sind. Mit diesen Untersuchungen könnte die Frage, welche Blatt- und Sprosszellschichten funktionell den Wurzelzellschichten Perizykel und der Endodermis (in denen die tropanalkaloidbildenden Enzyme lokalisiert sind) entsprechen, beantwortet werden.

Mechanismen der Zuckerinduktion von TRII-Alkaloiden

Zum detaillierten Verständnis der Kohlenhydratwirkung auf den Tropanalkaloidmetabolismus sind verschiedene Untersuchungen notwendig. Eine Zuckersignalwirkung deutete sich an, wurde jedoch nicht ausreichend bewiesen. Dazu sollte die Genexpression von Zuckermetabolismusenzymen, z.B. der Saccharoseinvertase und bekannten Signalproteinen z.B. von Calmodulin, Proteinkinasen und -phosphatasen untersucht werden. Die Transkriptakkumulation von PMT, TRI und TRII muss parallel bestimmt werden. Die Ergebnisse zur Metabolisierbarkeit von Sorbitol unter Phytohormoneinfluss sollten in gleicher Weise weiter verfolgt werden (*Northern Blot* Analysen).

TRII-Alkaloidbiosynthese

Die Biosyntheseschritte, die zwischen der Pseudotropin- und der Calysteginbildung liegen, sind nicht bekannt. Durch Identifizierung von Metaboliten könnte der Biosyntheseweg aufgeklärt werden. Aus diesem Grund sollten die TRI-*antisense*- sowie TRII-*sense*-Transformanten (Wurzelkulturen) und die Vektorkontrolle mit unterschiedlichen chromatographischen Methoden vermessen werden (AMD-TLC, GC-MS, HPLC). Die Subtraktion der Daten könnte weitere Vorstufen der Calystegine offenbaren.

Zum Nachweis unbekannter Biosyntheseenzyme könnten Untersuchungen auf Proteinebene in Form eines *protein differential display* (Proteinmusterbestimmung) durchgeführt werden. Diesen Versuchen sollte die nachgewiesene Zuckerinduzierbarkeit der TRII-Alkaloidbiosynthese zu Grunde liegen. Von unterschiedlich alten *hairy roots*, die 14 d entweder auf 3 oder 5 % Saccharose kultiviert wurden, sollten in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D PAGE, O`Farrall 1975) die Proteine aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert werden. Spots unterschiedlicher Intensität könnten anschließend durch hochsensitive Massenspektrometrie oder kombinierte Messmethoden, z.B. Tandemmassenspektrometrie analysiert werden (Arnott *et al.* 1998)

Physiologische Bedeutung der TRI- und der TRII-Alkaloide

Es ergaben sich Hinweise, dass zwischen Schädlingsbefall und erhöhter Hyoscyaminakkumulation (TRI-Alkaloid) ein Zusammenhang besteht. An TRI-*sense*- und TRI-*antisense*-Transformanten sollte geprüft werden, ob diese unterschiedlich auf einen Schädlingsbefall reagieren. Dazu sollten Enzymmessungen und *Northern Blot* Analysen (PMT, TRI, TRII) sowie Intermediat- und Alkaloidquantifizierungen durchgeführt werden.

Auf Grund der Eigenschaft als Glykosidasehemmstoffe und dem Vorkommen in jungen Geweben wurde vermutet, dass die TRII-Alkaloide eine Rolle bei der Abwehr von Fraßfeinden spielen. An TRII-*sense*-Transformanten könnte beispielsweise getestet werden, ob Insekten auf diesen Pflanzen weniger an Gewicht zunehmen als solche, die auf Kontrollpflanzen fressen. Zudem sollte die Transkription der PMT-, TR-Gene und H6H-Gene in den befallenen Geweben bestimmt werden (zum Nachweis möglicher Induktionen).

E Zusammenfassung

Die Regulation der Alkaloidbildung in Pflanzen ist von grundsätzlichem Interesse. Kenntnisse zur Biosyntheseregulation sind von praktischer Bedeutung, um die Bildung dieser Sekundärstoffe gezielt zu steigern, zu verändern oder deren physiologische Bedeutung zu verstehen. Solanaceen stellen auf Grund ihres Alkaloidgehaltes und des robusten Wachstums geeignete Untersuchungsmodelle dar. Die Regulation und Manipulation der Tropanalkaloidbiosynthese in Pflanzen und Wurzelkulturen von *A. belladonna* stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Untersuchungen verschiedener Transformanten zeigten, dass der Tropanalkaloidstoffwechsel durch unterschiedliche <u>Transformationsparameter</u> beeinflusst wird. Durch die alleinige Verwendung des *A. rhizogenes* Stamm 15834 wurde die Alkaloidakkumulation gesteigert, insbesondere die der TRI-Alkaloide. Die Beschaffenheit des verwendeten Vektors (mit oder ohne genspezifische Sequenz) spielte ebenfalls eine wichtige Rolle. Der Vektor pGA482 bewirkte eine Reduktion und der Vektor pBI121 eine Induktion der Alkaloidbiosynthese. In den Systemen Pflanze und Wurzelkultur lösten gleiche Transformationen unterschiedliche Reaktionen aus. Es wurde deutlich, dass die mittels Transformation erreichbaren Veränderungen begrenzt sind. Alle Schritte von der Transkription bis hin zum aktiven Enzym scheinen weiteren, koordinierten Regulationen zu unterliegen.

Durch Überexpressionsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass die <u>Putrescin-</u> <u>N-methyltransferase</u> in der Alkaloidbiosynthese von *A. belladonna* nicht limitierend wirkt. In phänotypisch unauffälligen T2-Pflanzen führte diese genetische Veränderung zu einer negativen Beeinflussung der Tropanalkaloidakkumulation. Durch indirekte Faktoren der Kultivierung wurde zusätzlich das Alkaloidmuster modifiziert (Becherglas, Klimakammer, Gewächshaus). Die PMT-*sense*-Wurzelkulturen zeigten nach Auxinapplikation und Nährmediummodifikation ein von den Kontrollwurzeln abweichendes Biosyntheseverhalten.

Die <u>Tropinonreduktasen</u> konkurrieren um die limitiert verfügbare Tropinonmenge. Durch TRI-Überexpression (in Wurzelkulturen) wurde die nativ benachteiligte Tropinbildung begünstigt. Dies führte zu einer deutlich erhöhten TRI-Alkaloidbildung und der Akkumulation der Zwischenstufe 6-Hydroxyhyoscyamin. Bei ersten Untersuchungen von TRI-*antisense*und TRII-*sense*-Wurzelkulturen wurden im Gegensatz dazu nur geringfügige Veränderungen des TRII-Weges festgestellt.

In <u>Wurzelkulturen</u> konnte die Tropanalkaloidbiosynthese durch verschiedene Faktoren manipuliert werden:

Beeinflussung	Tropanalkaloide		Anmerkungen
	Akkumulation	Muster	
direkt			durch Transformation
PMT	-	-	Überexpression vermindert Auxinrepression
TRI	++	++	Vektor-, Agrobakterieneinfluss
TRII	+	+	Vektor-, Agrobakterieneinfluss
indirekt			durch Kultivierung
Tropinon	-	-	stärkere TRII-Produktbildung
Licht	+	-	reduziert Alkaloidakkumulation
IBA	+	+	Kohlenhydratquelle bestimmt Induktion/Reduktion
BA	+	+	Kohlenhydratquelle bestimmt Induktion/Reduktion
MeJA	+	+	reduziert Alkaloidakkumulation
ABA	+	+	reduziert Alkaloidakkumulation
Saccharose	++	++	bevorzugte Induktion der TRII-Alkaloide

Tabelle E.1 Beeinflussung der Tropanalkaloidbiosynthese in A. belladonna-Wurzelkulturen

Veränderungen wurden mit einem +, besonders starke durch ++ gekennzeichnet. Wurden keine Veränderungen beobachtet, wurden diese mit - dargestellt.

<u>Saccharose</u> stimulierte das Wachstum und die Alkaloidakkumulation von Wurzelkulturen am stärksten. Die Monomere Glucose und Fructose konnten die Wirkungen weder einzeln noch in Kombination ersetzen. Demnach wirkte Saccharose bei allen Wurzelkulturen (transgene und *hairy roots*) sowohl als Nährstoff als auch als spezifisches Signal.

Die Biosynthese der <u>TRI- und TRII-Alkaloide</u> wurde unterschiedlich, häufig gegensätzlich induziert. 7 Monate alte, mit Schädlingen befallene Pflanzen zeigten eine erhöhte Akkumulation des TRI-Alkaloids Hyoscyamin. Die TRII-Alkaloidbiosynthese wurde hingegen durch Kohlenhydrate, insbesondere Saccharose induziert. Hexokinase und Kalzium waren an dieser Induktion beteiligt.

F Literaturverzeichnis

- Altabella, T., Angel, E., Biondi, S., Palazón, J., Bagni, N., Pinol, M. T., 1995 Effect of the *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* on polyamine metabolism in tobacco roots, <u>Physiol. Plant.</u> 95, 479-485
- Altria, K. D., 1998 High performance capillary electrophoresis: theory, techniques and application, Khalidi, M. G. (ed.), Wiley Interscience New York
- Ansarin, M., Woolley, J. G., 1993 The obligatory role of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid, <u>Phytochemis-</u> <u>try</u> **32**, 1183-1187
- Aoki, T., Matsumoto, H., Asako, Y., Matsunaga, Y., Shimomura, K., 1997 Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834, <u>Plant Cell Rep.</u> **16**, 282-286
- Aoyama, T., Chua, N.-H., 1997 A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants, <u>Plant J.</u> **11**, 605-612
- Arnott, D., O`Connell, K., King, K. L., Stults, J. T., 1998 An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy, <u>Anal. Biochem</u>. **258**, 1-18
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Hackett, L., Topping, J., Winchester, B., 1997
 The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases, <u>Glycobiology</u> 7, 1085-1088
- 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, <u>Eur. J. Biochem.</u> **229**, 369-376
- Asano, N., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Fleet, G. W. J., 2000 Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutical application, <u>Tetrahedron: Asymmetry</u> **11**, 1645-1680
- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Höke, D., Dräger, B., Watson, A. A., Nash, R. J., 2001
 Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants, <u>Phytochemistry</u> 57, 721-726

Baerheim-Svendsen, A., Verpoorte, R., 1983 Chromatography of alkaloids, Part A: Thin-layer chromatography, Journal of Chromatography Library, Vol. 23, Elsevier Scientific Publikations, Amsterdam Oxford New York Baldwin, I. T., 1999

Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity, <u>J. Chem. Ecol.</u> **25**, 3-30

 Baldwin, I. T., Schmelz, E. A., Ohnmeiss, T. E., 1994
 Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* Spegazzini and Comes, <u>J. Chem.</u> <u>Ecol.</u> 20, 2139-2157

Baldwin, I. T., Schmelz, E. A., Zhang, Z.-P., 1996 Effects of octadecanoid metabolites and inhibitors on induced nicotine accumulation in *Nicotiana sylvestris*, <u>J. Chem. Ecol.</u> 22, 61-74

- Ballica, R., Ryu, D. D. Y., Kado, C. I., 1993 Tropane alkaloid production in *Datura stramonium* suspension cultures: elicitor and precursor effects, <u>Biotechnology Bioengineering</u> 41, 1075-1081
- Biondi, S., Fornalé, 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, <u>Plant Cell Rep.</u> **19**, 691-697

 Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Mueller, M. J., Xia, Z.-Q., Zenk, M. H., 1995
 The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> 92, 4099-4105

Bogusz, M., Erkens, M., 1994 Reversed-phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use, <u>J. Chromatogr. A</u> 674, 97-126

- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R., 1998 Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis, <u>Proc.</u> <u>Natl. Acad. Sci. USA</u> **95**, 4126-4133
- Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M.-A., Jacquin-Dubreuil, A., 2000 Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 *and Agrobacterium tumefaciens* containing *rol A, B, C* genes only, <u>J. Biotechnol.</u> **81**, 151-158

Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J., 1999 Polyamines and environmental challenges: recent development, <u>Plant Sci.</u> **140**, 103-125

Bradford, M. M., 1976

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, <u>Anal. Biochem.</u> **72**, 248-254

Bunschuch, A., 2001

Sind die Tropinonreduktasen in *Atropa belladonna* induzierbar?, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg

Bush, D. S., 1995

Calcium regulation in plant cells and its role in signaling, <u>Annu. Rev. Plant Physiol.</u> <u>Plant Mol. Biol.</u> **46**, 95-122

- Cabello-Hurtado, F., Durst, F., Jorrin, J. V., Werck-Reichhart, D., 1998 Coumarins in *Helianthus tuberosus*: characterization, induced accumulation and biosynthesis, <u>Phytochemistry</u> **49**, 1029-1036
- Cheng, C.-L., Acedo, G. N., Cristinsin, M., Conkling M. A., 1992 Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> 89, 1861-1864
- Coenen, C., Lomax, T. L., 1997 Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools, <u>Trends</u> <u>Plant Sci.</u> **2**, 351-356
- Creelmann, R. A., Mullet, J. E., 1997 Biosynthesis and action of jasmonates in plants, <u>Annu. Rev. Plant Physiol. Plant</u> <u>Mol. Biol.</u> **48**, 355-381
- De Luca, V., Laflamme, P., 2001 The expanding universe of alkaloid biosynthesis, <u>Curr. Opin. Plant Biol.</u> **4**, 225-233
- De Luca, V., St Pierre, B., 2000 The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis, <u>Trends Plant Sci.</u> **5**, 168-173
- De Wald, D. B., Sadka, A., Mullet, J. E., 1994 Sucrose modulation of soybean *Vsp* gene expression is inhibited by auxin, <u>Plant</u> <u>Physiol.</u> **104**, 439-444
- Dobrowolski, B., 1987

Molekulare Klonierung und Charakterisierung genomischer ribosomaler DNA einer Zellsuspensionskultur von *Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus, Dissertation an der MLU Halle-Wittenberg

- Dörfler, H.-P., Roselt, G., 1990 Tollkirsche in: Heilpflanzen, Urania-Verlag Leipzig Jena Berlin, 54-55
- Dräger, B., 1995

Tropinonreduktion in Solanaceen, Habilitationsschrift, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Dräger, B., 2002

Chromatographic analysis of secondary plant metabolites: tropane alkaloids, eingereicht bei J. Chromatogr. A

Dräger, B., Funck, C., Höhler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A., Schmidt, R., 1994 Calystegines as a new group of tropane alkaloids in Solanaceae, <u>Plant Cell Tiss.</u> <u>Org. Culture</u> **38**, 235-240

Dräger, B., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1988 Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures, <u>Agric. Biol. Chem</u>. **52**, 2663-2667

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., <u>Planta</u> **188**, 581-586

- Dräger, B., Schaal, A., 1994 Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures, <u>Phytochemistry</u> **35**, 1441-1447
- Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J., Willmitzer, L., 1986 Isolation and characterization of a light-inducible, organic-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots, <u>Mol. Gen. Genet.</u> **205**, 14-22
- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M., Boronat, A., 1994 *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of enzyme, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> **91**, 927-931
- Fleet, G. W., Fellows, L. E., Winchester, B., 1990 Plagiarizing plants: amino sugars as a class of glycosidase inhibitors, Bioactive Compounds from Plants, Ciba Foundation Symposium 154, 112-125
- Flores, H. E., Dai, Y., Cuello, J. L., Maldonado-Mendoza, I. E., Loyola-Vargas, V. M., 1993 Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ, <u>Plant Physiol.</u> **101**, 363-371
- Galston, A. W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T., Tiburcio, A. F., 1997 Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress, <u>Bot. Acta</u> **110**, 197-207
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K., 1968 Plant cell culture: I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, <u>Exp. Cell Res.</u> **50**, 151-158
- Garske, U., 1999

Atropa belladonna-Wurzelkulturen: Variation des Nährmediums Gamborg B5 in Mineralien- und Saccharosegehalt, Untersuchung der Auswirkung auf Wachstum, Calystegin- und Hyoscyaminakkumulation, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg

Gertlowski, C., Petersen, M., 1993 Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of Coleus blumei, <u>Plant Cell Tiss. Org. Cult.</u> **34**, 183-190

Gibson, S. I., 2000

Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web, <u>Plant Physiol.</u> **124**, 1532-1539

- 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
- Graham, I. A., Denby, K. J., Leaver, C. J., 1994 Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber, <u>Plant Cell</u> 6, 761-772

Hachiya, A., 1997

Manipulation of alkaloid biosynthetic capacity in transgenic plants, Japanese master thesis, Naist Institut Nara, Japan

- Halford, N. G., Purcell, P. C., Hardie, D. G., 1999 Is hexokinase really a sugar sensor in plants?, <u>Trends Plant Sci</u>. **4**, 117-120
- Hashimoto, T., Hayashi, A., Amano, Y., Kohno, J., Yamada, Y., 1991
 Hyoscyamine 6^ß-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root, <u>J. Biol. Chem.</u> 266, 4648-4653
- Hashimoto, T., Mitani, A., Yamada, Y., 1990 Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*, its funktion in tropane alkaloid biosynthesis, <u>Plant Physiol.</u> **93**, 216-221
- Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G., Yamada, Y., 1992
 Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*, <u>Plant Physiol.</u> 100, 836-845
- Hashimoto, T., Shoji, T., Mihara, T., Oguri, H., Tamaki, K., Suzuki, K., Yamada, Y., 1998a Intraspecific variability of the tandem repeats in *Nicotiana* putrescine *N*methyltransferases, <u>Plant Mol. Biol.</u> **37**, 25-37
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K., Yamada, Y., 1998b Molecular cloning of plant spermidine synthases, <u>Plant Cell Physiol.</u> **39**, 73-79
- Hashimoto, T., Yamada, Y., 1983 Scopolamine production in suspension cultures and redifferentiated roots of *Hyos-cyamus niger*, <u>Planta Med.</u> 47, 195-199
- Hashimoto, T., Yamada, Y., 1986 Hyoscyamine-6*B*-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures, <u>Plant Physiol</u>. **81**, 619-625
- Hashimoto, T., Yamada, Y., 1987
 Purification and characterization of hyoscyamine 6^ß-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L., hydroxlase and epoxidase activities in the enzyme preparation, <u>Eur. J. Biochem.</u> 164, 277-285
- Hashimoto, T., Yamada, Y., 1993 Nicotine and tropane alkaloids in: Methods in plant biochemistry, Band 9, 369-379
- Hashimoto, T., Yukimune, Y., Yamada, Y., 1985 Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures, <u>J. Plant Physiol.</u> **124**, 61-75
- Hegnauer, R., 1990 Solanaceae in: Chemotaxonomie der Pflanzen, Verlag Birkhäuser Basel Stuttgart, 567-600
- Hibi, N., Fujita, T., Hatano, M., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1992 Putrescine *N*-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*, <u>Plant Phy-</u> <u>siol</u>. **100**, 826-835
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1994 Gene expression in tobacco low-nicotine mutants, <u>Plant Cell</u> **6**, 723-735

Hilton, M. G., Rhodes, M. J. C., 1990 Growth and hyoscyamine production of `hairy root` cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor, <u>Appl. Microbiol. Biotechnol.</u> **33**, 132-138

- Höfgen, R., Willmitzer, L., 1988
 Storage of competent cells for Agrobacterium transformation, <u>Nucleic Acids Res.</u>
 16, 9877
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., Schilperoort, R. A., 1983 A binary plant vector strategy based on separation of *vir-* and T-region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-Plasmid, <u>Nature</u> **303**, 179-180
- Hofmann, M., Roitsch, T., 2000 The hexokinase inhibitor glucosamine exerts a concentration dependent dual effect on protein kinase activity *in vitro*, <u>J. Plant Physiol</u>. **157**, 13-16
- 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, <u>Plant Mol. Biol.</u> 38, 1101-1111
- Ionkova, I., Demeyer, K., Witte, L., Alfermann, A. W., 1998 Effect of cadmium on the formation of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Datura stramonium* L., 46th Annual Congress of the Society for Medical Plant Research Vienna, Poster
- Jaziri, M., Yoshimatsu, K., Homès, J., Shimomura, K., 1994 Traits of transgenic Atropa belladonna doubly transformed with different Agrobacterium rhizogenes strains, <u>Plant Cell Tiss. Org. Culture</u> 38, 257-262
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W., 1987 GUS fusions: *B*-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, <u>EMBO J.</u> **6**, 3901-3907
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzàlez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D., 1995 Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), <u>Biochem</u>. **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, <u>Planta</u> 208, 545-551

Jung, G., Tepfer, D., 1987 Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown in vitro, <u>Plant Sci.</u> **50**, 145-151

- Kaiser, R., Gottschalk, G., 1972 Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten, Biblographisches Institut Mannheim Wien Zürich, BI Wissenschaftsverlag
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H., Shimomura, K., 1986 Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*, <u>Plant Cell Rep.</u> 5, 239-242
- Keiner, R., 2001 Calystegine in *Solanum tuberosum* L. – Klonierung, Expression und Charakterisie-

rung der Tropinonreduktasen I und II, putativer Enzyme des Tropanalkaloidstoffwechsels, Dissertation an der MLU Halle-Wittenberg

Khan, M. B., Harborne, J. B., 1990

Induced alkaloid defence in *Atropa acuminata* in response to mechanical and herbivore leaf damage, <u>Chemoecology</u> **1**, 77-80

Koch, K. E., 1996

Carbohydrate-modulated gene expression in plants, <u>Annu. Rev. Plant Physiol.</u> <u>Plant Mol. Biol.</u> **47**, 509-540

- Koelen, K. J., Gross, G. G., 1982 Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cutures of *Datura stramonium*, <u>Planta Med.</u> 44, 227-230
- Kutchan, T. M., 1995 Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants, <u>Plant Cell</u> **7**, 1059-1070
- Kutchan, T. M., 2001

Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism, <u>Plant Physiol.</u> **125**, 58-60

Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W., Frommer, W. B., Ward, J. M., 1999 The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing, <u>Plant Cell</u> **11**, 707-726

Landtag, J., Baumert, A., Degenkolb, T., Schmidt, J., Wray, V., Scheel, D., Strack, D., Rosahl, S., 2002 Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase, angenommen bei <u>Phytochemistry</u>

- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Chèze, C., Deffieux, G., Merillon, J. M., 1998 Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars, <u>Plant Cell Rep.</u> **17**, 946-950
- Leete, E., 1990 Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids, <u>Planta Med.</u> 56, 339-352
- Leung, J., Giraudat, J., 1998 Abscisic acid signal transduction, <u>Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol</u>. **49**, 199-222
- Luckner, M., 1990

Compartmentalization and channeling in: Luckner M. (Ed.), Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong, 31-39

Maeo, K., Tomiya, T., Hayashi, K., Akaike, M., Morikami, A., Ishiguro, S., Nakamura, K., 2001
 Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for *B*-amylase of sweet potato, Plant Mol. Biol. 46, 627-637

Mahady, G. B., Liu, C., Beecher, C. W. W., 1998

Involvement of protein kinase and G-proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis, <u>Phytochemistry</u> **48**, 93-102

Masgrau, C., Altabella, T., Farrás, R., Flores, D., Thompson, A. J., Besford, R. T., Tiburcio, A. F., 1997
 Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants, <u>Plant J.</u> 11, 465-473

- Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., Oksman-Caldentey, K.-M., 2000 Simultaneous determination of scopolamine, hyoscyamine and littorine in plants and different hairy root clones of *Hyoscyamus muticus* by micellar electrokinetic chromatography, <u>Phytochemistry</u> **54**, 517-523
- Mathews, H., Bharathan, N., Litz, R. E., Narayanan, K. R., Rao, P. S., Bhatia, C. R., 1990 The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Atropa belladonna* L. by acetosyringone, <u>J. Plant Physiol</u>. **136**, 404-409
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1991 Molecular cloning of hyoscyamine 6^B-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*, <u>J. Biol. Chem.</u> **266**, 9460-9464
- Mein, K., 1833 Ueber die Darstellung des Atropins in weissen Krystallen, <u>Annalen der Pharmazie</u> **6**, 67-72
- Melchers, L. S., Maroney, M. J., den Dulk-Ras, A., Thompson, D. V., van Vuuren, H. A., Schilperoort, R. A., Hooykaas, P. J., 1990
 Octopine and nopaline strains of *Agrobacterium tumefaciens* differ in virulence; molecular characterization of the *virF* locus, <u>Plant Mol. Biol</u>. **14**, 249-259
- Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, J. W., 2001 ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism, <u>Trends Plant Sci.</u> **6**, 212-219
- Merillon, J. M., Rideau, M., Chenieux, J. C., 1984 Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro*, <u>Planta Med.</u> 50, 497-501
- Michael, A. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J. C., Burtin, D., 1996 Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA, <u>Biochem. J.</u> **314**, 241-248

Michael, T., Spena, A., 1995
The plant oncogenes *rol* A, B and C from *Agrobacterium rhizogenes*, in: Gartland, K. M. A. and Davey, M. R. (ed), Methods in molecular biology, Volume 44: Agrobacterium protocols, Humana Press inc. Totowa, NJ, 207-222

Mizusaki, S., Tanabe, Y., Noguchi, M., Tamaki, E., 1971 Phytochemical studies on tobacco alkaloids XIV. The occurrence and properties of putrescine *N*-methyltransferase in tobacco roots, <u>Plant Cell Physiol.</u> **12**, 633-640

Mok, D. W. S., Mok, M. C., 2001 Cytokinin metabolism and action, <u>Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.</u> 52, 89-118 Molyneux, R. J., Nash, R. J., Asano, N., 1996

The chemistry and biological activity of calystegines and related *nor*tropane alkaloids in: Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives 11, 303-343

Molyneux, R. J., Pan, Y. T., Goldmann, A., Tepfer, D. A., Elbein, A. D., 1993 Calystegines, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors, <u>Arch. Biochem. Bi-ophys</u>. **304**, 81-88

Mothes, K., 1969

Biologie der Alkaloide, in: Mothes, K., Schütte, H. R. (Hrsg.), Biosynthese der Alkaloide, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1-20

Moyano, E., Fornale, S., Palazón, J., Cusidó, R. M., Bagni, N., Pinol, M. T., 2002a Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the *pmt* gene, <u>Phytochemistry</u> 59, 697-702

 Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazón, J., Cusidó, R. M., Pinol, M. T., Teeri, T. H., Oksman-Caldentey, K.-M., 2002b
 Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*, eingereicht bei J. Exp. Bot.

- Murashige, T., Skoog, F., 1962 A revisted medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, <u>Plant Physiol.</u> **15**, 473-479
- Mutschler, E., 1991 Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Nakajima, K., Hashimoto, T., 1999 Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns, <u>Plant Cell Physiol.</u> **40**, 1099-1107

- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1993 Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> **90**, 9591-9595
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1994 Opposite stereospecifity of two tropinone reductases is conferred by the substratebinding sites, <u>J. Biol. Chem.</u> 269, 11695-11698

Nakajima, K., Kato, H., Oda, J., Yamada, Y. Hashimoto, T., 1999a Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecifities of two tropinone reductases, <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> 274, 16563-16568

Nakajima, K., Oshita, Y., Kaya, M., Yamada, Y., Hashimoto, T., 1999b Structures and expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyos-cyamus niger*, <u>Biosci. Biotechnol. Biochem</u>. **63**, 1756-1764

Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., Yamada, Y., 1998
Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> **95**, 4876-4881

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, <u>Plant Cell Rep.</u> **17**, 405-409

O`Farrall, P. H., 1975 High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, <u>J. Biol. Chem.</u> **250**, 4007-4021

- Ohto, M., Hayashi, K., Isobe, M., Nakamura, K., 1995 Involvement of Ca²⁺-signalling in the sugar-inducible expression of genes coding for sporamin and *B*-amylase of sweet potato, <u>Plant J.</u> **7**, 297-307
- Oksman-Caldentey, K.-M., Hiltunen, R., 1996 Transgenic crops for improved pharmaceutical products, <u>Field Crop Res.</u> **45**, 57-69
- Oksman-Caldentey, K.-M., Kivelä, O., Hiltunen, R., 1991 Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*, <u>Plant Sci.</u> **78**, 129-136
- Palazón, J., Cusidó, R. M., Roig, C., Pinol, M. T., 1997 Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures, <u>Plant. Physiol. Biochem.</u> **35**, 155-162
- Payne, J., Hamill, J. D., Robins, R. J., Rhodes, M. J. C., 1987 Production of hyoscyamine by `Hairy Root` cultures of *Datura stramonuim*, <u>Planta</u> <u>Med.</u> 53, 474-478
- Pena-Cortes, H., Fisahn, J., Willmitzer L., 1995 Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> 92, 4106-4013
- Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., Tempé, J., 1983 Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation, <u>Mol. Gen. Genet.</u> 190, 204-214
- Pinol, M. T., Palazón, J., Cusidó, R. M., Ribó, M., 1999 Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots, <u>Plant Sci</u>. **141**, 41-49

Portsteffen, A., 1994

Reinigung und Charakterisierung einer tropinbildenden und einer pseudotropinbildenen Tropinon Reduktase aus transformierten Wurzelkulturen von *Datura stramonium* L., Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

- Rastogi, R., Dulson, J., Rothstein, S. J., 1993 Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening, <u>Plant Physiol.</u> **103**, 829-834
- Richter, U., 2002

Tropanalkaloidbiosynthese in TRI-überexprimierenden *A. belladonna*-Wurzelkulturen, Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg

- 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, <u>J. Am. Chem. Soc.</u> 119, 10929-10934
- Robins, R. J., Bachmann, P., Peerless, A. C. J., Rabot, S., 1994b Esterification reactions in the biosynthesis of tropane alkaloids in transformed root cultures, <u>Plant Cell Tiss. Org. Culture</u> 38, 241-247
- Robins, R. J., Bent, E. G., Rhodes, M. J. C., 1991b
 Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 3. The relationship between morphological integrity and alkaloid biosynthesis, <u>Planta</u> 185, 385-390
- Robins, R. J., Parr, A. J., Bent, E. G., Rhodes, M. J. C., 1991a
 Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 1. Kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites, <u>Planta</u> 183, 185-195
- 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, <u>Planta</u> 194, 86-94
- Rocha-Salavarrieta, P. J., 2000 Engineering secondary metabolite production in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Hyoscymus muticus* and isolation of MYB sequences from *Catharanthus roseus*, Dissertation, John Innes Centre Norwich, UK
- Rüttinger, H.-H., Dräger, B., 2001 Pulsed amperometric detection of calystegines separated by capillary electrophoresis, <u>J. Chromatogr. A</u> **925**, 291-296
- Saito, K., Yamazaki, M., Murakoshi, I., 1992 Transgenic medicinal plants: Agrobacterium-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites, <u>J. Nat. Prod.</u> **55**, 149-162
- Saker, M. M., Rady, M. R., Ghanem, S. A., 1997 Elicitation of tropane alkaloids in suspension cultures of *Hyoscyamus*, *Datura* and *Atropa* by osmotic stress, <u>Fitoterapia</u>**LXVIII**, 338-342
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989 Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K., Choi, K.-B., Morishige, T., Fujimoto, H., Yamada, Y., 2001
 Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> 98, 367-372
- Sauerwein, M., Wink, M., Shimomura, K., 1992 Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*, <u>J. Plant Physiol.</u> **140**, 147-152

- Scholl, Y., Asano, N., Dräger, B., 2001a Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors, <u>J. Chromatogr. A</u> **928**, 217-224
- Scholl, Y., Höke, D., Dräger, B. 2001b Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway, <u>Phy-</u> <u>tochemistry</u> **58**, 901-906
- Schröder, G., Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmidt, J., Strack, D., De Luca, V., Schröder, J., 1999
 Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase, <u>FEBS Lett.</u> 458, 97-102
- Sheen, J., 1990 Metabolic repression of transcription in higher plants, <u>Plant Cell</u> **2**, 1027-1038
- Sheen, J., Zhou, L., Jang, J.-C., 1999 Sugars as signaling molecules, <u>Curr. Opin. Plant Biol</u>. **2**, 410-418
- Shoji, T., 2001 Regulation of nicotine biosynthetic genes, Dissertation, Naist Institute Nara, Japan
- Shonle, I., Bergelson, J., 2000 Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae), <u>Evol.</u> 54, 778-788
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A., 1998 Strasburger – Lehrbuch der Botanik (begründet von Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W.) 34. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart Jena Lübeck Ulm
- Smeekens, S., 2000 Sugar-induced signal transduction in plants, <u>Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.</u> <u>Biol</u>. **51**, 49-81
- Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., Waterhouse, P. M., 2000
 Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, <u>Nature</u> 407, 319-320
- Song, Y.-N., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U., 1990 Hydroxyacetosyringone is the major virulence gene activating factor in belladonna hairy root cultures, and inositol enhances its activity, <u>Chem. Pharm. Bull.</u> 38, 2063-2065
- Song, Y.-N., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Sankawa, U., 1991 Synergistic action of phenolic signal compounds and carbohydrates in the induction of virulence gene expression of *Agrobacterium tumefaciens*, <u>Chem. Pharm.</u> <u>Bull.</u> **39**, 2613-2616
- Stahl, E., Schild, W., 1981 Pharmazeutische Biologie, Drogenanalyse II, Inhaltsstoffe und Isolierungen, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart Jena Lübeck Ulm, 63-67

Stoop, J. M. H., Pharr, D. M., 1993 Effect of different carbon sources on relative growth rate, internal carbohydrates, and mannitol 1-oxidoreductase activity in celery suspension cultures, <u>Plant Physiol.</u> **103**, 1001-1008

- St Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A., De Luca, V., 1999 Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate, <u>Plant Cell</u> **11**, 887-900
- Sunilkumar, G., Vijayachandra, K., Veluthambi, K., 1999 Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction, <u>Plant Sci.</u> **141**, 51-58
- Suzuki, K., Yamada, Y., Hashimoto, T., 1999a Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle, <u>Plant Cell Physiol.</u> **40**, 289-297
- Suzuki, K., Yun, D.-J., Chen, X.-Y., Yamada, Y., Hashimoto, T., 1999b An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6*β*-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers, <u>Plant. Mol. Biol.</u> **40**, 141-152
- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Dénarié, J., Rosenberg, C., 1988
 A plasmid of *Rhizobium melioti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegia sepium*, <u>J. Bacteriol</u>. **170**, 1153-1161
- Tiburcio, A. F., Masdéu, M. A., Dumortier, F. M., Galston, A. W., 1986 Polyamine metabolism and osmotic stress I. Relation to protoplast viability, <u>Plant</u> <u>Physiol.</u> **82**, 369-374
- Tinland, B., 1996 The integration of T-DNA into plant genomes, <u>Trends Plant Sci.</u> **1**, 178-184
- Vanhala, L., Eeva, M., Lapinjoki, S., Hiltunen, R., Oksman-Caldentey, K.-M., 1998 Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*, <u>J.</u> <u>Plant Physiol.</u> **153**, 475-481
- Vanhala, L., Hiltunen, R., Oksman-Caldentey, K.-M., 1995 Virulence of different Agrobacterium strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*, <u>Plant Cell Rep.</u> 14, 236-240
- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.-B., Mourrain, P., Palauqui, J.-C., Vernhettes, S., 1998
 Transgene-induced gene silencing in plants, <u>Plant J.</u> 16, 651-659
- Vitrac, X., Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G., Mérillon, J.-M., 2000 Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins, <u>Phytochemistry</u> **53**, 659-665
- Walton, N. J., Robins, R.J., Peerless, A. C. J., 1990 Enzymes of *N*-methylputrescine biosynthesis in relation to hyoscyamine formation in transformed root cultures of *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*, <u>Planta</u> **182**, 136-141
- Wasternack, C., Parthier, B., 1997 Jasmonate-signalled plant gene expression, <u>Trends Plant Sci.</u> **2**, 302-307

Weber, S., Horn, R., Friedt, W., 1998

Isolation of a low-copy plasmid from agrobacterium using QIAprep[®] technology, <u>Qiagen News</u> **5**, 11-12

White, F. F., Nester, E. W., 1980 Hairy root: plasmid encodes virulence traits in Agrobacterium rhizogenes, <u>J. Bacte-riol.</u> **141**, 1134-1141

Wink, M., 1999

Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites in: Wink, M. (ed), Biochemistry of plant secondary metabolism, Sheffield Academic Press, 1-16

Witte, L., Müller, K., Arfmann, H.-A., 1987 Investigation of the alkaloid pattern of *Datura innoxia* plants by capillary gas-liquidchromatography-mass spectrometry, <u>Planta Med.</u> 53, 192-197

Woolley, J. G., 1993

Tropane alkaloids in: Methods in Plant Biochemistry 8, Academic Press, 133-173

Yanovsky, M. J., Alconada-Magliano, T. M., Mazzella, M. A., Gatz, C., Thomas, B., Casal, J. J., 1998

Phytochrome A affects stem growth, anthocyanin synthesis, sucrose-phosphatesynthase activity and neighbour detection in sunlight-grown potato, <u>Planta</u> **205**, 235-241

- Yazaki, K., Matsuoka, H., Ujihara, T., Sato, F., 1999 Shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*: light-induced negative regulation of secondary metabolism, <u>Plant Biotechnol.</u> **16**, 335-342
- Yoshimatsu, K., Jaziri, M., Kamada, H., Shimomura, K., 1997 Production of diploid and haploid transgenic *Atropa belladonna* plants: morphological traits and tropane alkaloid production, <u>Belg. Journ. Bot.</u> **130**, 38-46
- Yun, D.-J., Hashimoto, T., Yamada, Y., 1992 Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic Atropa belladonna with an improved alkaloid composition, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> 89, 11799-11803
- Zabetakis, I., Edwards, R., O`Hagan, D., 1999 Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*, <u>Phytochemistry</u> **50**, 53-56
- Zeef, L. A. H., Christou, P., Leech, M. J., 2000 Transformation of the tropane alkaloid-producing medicinal plant *Hyoscyamus muticus* by particle bombardment, <u>Trans. Res.</u> 9, 163-168
- Zhang, Z.-P., Baldwin, I. T., 1997 Transport of [2-¹⁴C] jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*, <u>Planta</u> **203**, 436-441
- Zhou, L., Jang, J.-C., Jones, T. L., Sheen, J., 1998 Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant, <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> **95**, 10294-10299

G Anhang

G 1 INTERMEDIAT- UND ALKALOIDBESTIMMUNG

G 1.1 Intermediate

Für nachfolgende Eichgeraden wurden 6 Messpunkte im Bereich von 0,01-0,1 mg/ml GC-Probe aufgenommen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung dar. Als innerer Standard wurde Azobenzol in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Eichgeraden wurden freundlicherweise von Frau A. Bunschuch zur Verfügung gestellt.



Abbildung G.1 Eichgerade zur Berechnung des Tropinongehaltes



Abbildung G.2 Eichgerade zur Berechnung des Tropingehaltes



Abbildung G.3 Eichgerade zur Berechnung des Pseudotropingehaltes

G 1.2 TRI-Alkaloide (Klassische Tropanalkaloide)

Im Bereich von 0,01-0,2 mg/ml GC-Probe wurden 7 Messpunkte aufgenommen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung dar. Als innerer Standard wurde Azobenzol in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Eichgerade für 6-Hydroxyhyoscyamin wurde von Frau U. Richter im Bereich von 0,1 bis 0,8 mg/ml GC-Probe aufgenommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.



Abbildung G.4 Eichgerade zur Berechnung des 6-Hydroxyhyoscyamingehaltes



Abbildung G.5 Eichgerade zur Berechnung des Hyoscyamingehaltes



Abbildung G.6 Eichgerade zur Berechnung des Scopolamingehaltes

G 1.3 TRII-Alkaloide (Nortropanalkaloide)

Für die Eichgerade der Calystegine wurde A₃ als Vertreter der A-Gruppe und B₂ als Vertreter der B-Gruppe verwendet. Es wurden 4 Messpunkte in einer Vierfachbestimmung im Bereich von 0,01 bis 0,2 mg/ml GC-Probe aufgenommen. Azobenzol (1 mg/ml) wurde als innerer Standard verwendet. Herr D. Höke stellte die Eichgeraden freundlicherweise zur Verfügung.



Abbildung G.7 Eichgerade zur Berechnung der Calystegingehalte der A-Gruppe



Abbildung G.8 Eichgerade zur Berechnung der Calystegingehalte der B-Gruppe

G 2 TRANSFORMATION

G 2.1 <u>PMT</u>

Zur sense-Transformation wurde die cDNA der *Nicotiana tabacum*-PMT1 (*accession number:* D28506, Hibi *et al.* 1994) und zur *antisense*-Transformation die cDNA der *Atropa belladonna*-PMT1 (*accession number:* AB018570, Suzuki *et al.* 1999a) verwendet.

Gewebe	Kulturen	TRI-Alkaloide in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM
	WT	8,05	8,87
obere Blätter	VC	4,65	2,65
	H11/2	2,50	2,64
	H11/3	1,78	1,49
	WT	2,94	3,42
untere Blätter	VC	0,93	1,21
	H11/2	0,39	0,26
	H11/3	0,35	1,05
	WT	6,23	7,31
Spross	VC	5,57	2,86
	H11/2	1,88	2,12
	H11/3	2,53	3,42
	WT	4,85	2,29
Wurzel	VC	2,27	1,44
	H11/2	1,52	0,87
	H11/3	2,16	3,03

G 2.1.1 PMT-sense- Pflanzen

 Tabelle G.1 Klimakammerkultivierung (3 Monate)

Die angegebenen Werte entsprechen den in Abbildung C.3 dargestellten Mittelwerten, die aus 3-6 unabhängigen Bestimmungen ermittelt wurden. Die Standardabweichungen lagen zwischen 15 und 30 %.

Gewebe	Kulturen	TRI-Alkaloide in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	TRI/TRII
	WT	7,11	9,53	1:1,3
obere Blätter	H11/2	7,39	1,39	1:0,4
	H11/3	7,98	1,91	1:0,2
	WT	6,83	1,42	1:0,2
untere Blätter	H11/2	3,92	0,00	1:0,0
	H11/3	3,74	0,73	1:0,2
	WT	0,69	0,36	1:0,5
Wurzel	H11/2	0,70	0,56	1:0,8
	H11/3	1,51	0,20	1:0,1

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Bestimmungen und sind in Abbildung C.4 dargestellt. Die Standardabweichungen lagen zwischen 15 und 25 %. In der rechten Spalte (TR/TRII) ist das jeweilige TRI-/TRII-Alkaloidverhältnis angegeben.

Linie	Anzahl unabhängiger Pflanzen
PMT-AS-I-2	16
PMT-AS-I-3	15
PMT-AS-II-1	1
PMT-AS-III-3	5
PMT-AS-V-1	4
PMT-AS-VI-1	3

G 2.1.2 PMT-antisense-Pflanzen

Tabelle G.3 Kanamycinresistente Pflanzen nach der Transformation mit dem PMTantisense-Konstrukt

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Pflanzen: z.B. bedeutet **PMT-AS-II-1-1** \rightarrow transformiert mit PMT-*antisense*-Konstrukt, Blatt II, Kallus 1, Pflanze 1. Alle aufgeführten Pflanzen zeigten auf Medium mit 100 mg/l Kanamycin ein gutes Wachstum.

SD TRI in SD TRII in Nährmedium Kulturen **TRI-Alkaloid in TRII-Alkaloide in** µmol/g TM µmol/g TM µmol/g TM µmol/g TM 1,28 1,76 WT 9,06 28,73 B5 2,00 5,03 VC 7,06 36,89 2,35 4,19 H11/2 8.27 28.85 2,04 4,24 H11/3 7,51 28,91 0,82 4,61 WT 8,96 18,00 1,70 5,88 B5, 1µM IBA VC 6,37 14,79 1,00 5,21 H11/2 7,96 30,72 H11/3 0,31 4,30 7,16 33,58 0,76 2,48 WT 6,68 39,33 1/2 B5 2,91 9,82 VC 12,59 55,57 2,11 9,82 5 % Saccharose 31,52 H11/2 9,75 H11/3 12,10 2,66 34,42 8,79

G 2.1.3 PMT-sense- Wurzelkulturen

Tabelle G.4 Alkaloidakkumulation verschieden kultivierter, 28 d alter PMT-sense-Wurzelkulturen

Die Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Kulturen und in Abbildung C.8 dargestellt. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

G 2.2 <u>TR</u>

Zur Transformation wurde die cDNA der TRI (*accession number*. L20473) und die cDNA der TRII (*accession number*. L20474) von *Datura stramonium* verwendet (Nakajima *et al.* 1993).

Linie	regenerierte Wurzelkulturen
ls-B	a, b, d
ls-C	a, b, c, d
ls-D	a, b, c, d, e
ls-E	a, b, c, d, e
ls-1	1, 2, 3

G 2.2.1 TRI-sense-Wurzelkulturen

Tabelle G.5 Mit dem Datura-TRI-sense-Konstrukt transformierte Wurzelkulturen

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Wurzelkulturen: **Is-B-a** \rightarrow transformiert mit DTRI-*sense*-Konstrukt, Blatt B, Wurzel a. Die unterschiedliche Bezeichnung der Wurzel-kulturen mit Buchstaben und Ziffern beruht auf zeitlich verschiedenen Transformationsansätzen (2).

Kultur	Tropinon in µmol/g TM	Tropin in µmol/g TM	Pseudotropin in µmol/g TM	Hyoscyamin in µmol/g TM	Scopolamin in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM
WT	0,20	4,30	3,20	9,06	0,00	28,54
VC	0,16	4,84	2,80	15,15	3,96	29,06
ls-B-a	0,14	28,09	1,22	80,28	5,84	17,33
ls-D-d	0,12	12,81	1,50	34,60	7,16	36,85
ls-E-c	0,14	18,44	1,11	36,71	9,44	15,88
ls-E-d	0,09	4,50	0,31	37,89	3,96	28,85
ls-1-3	0,09	37,30	1,51	34,91	9,87	32,67

Tabelle G.6 DTRI-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt

Die angegebenen Einzelwerte sind in den Abbildungen C.12 und C.13 dargestellt.

G 2.2.2 TRI-antisense-Wurzelkulturen

Linie	regenerierte Wurzelkulturen
las-B	b, c, d
las-E	b
las-1	1, 2, 3
las-3	a, b, c

Tabelle G.7 Mit dem Datura-TRI-antisense-Konstrukt transformierte Wurzelkulturen

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Wurzelkulturen: **Ias-3-a** \rightarrow transformiert mit DTRI-*antisense*-Konstrukt, Blatt 3, Wurzel a. Die unterschiedliche Bezeichnung der Wurzelkulturen mit Buchstaben und Ziffern beruht auf zeitlich verschiedenen (3) Transformationsansätzen.

Kultur	Tropinon in umol/a TM	Tropin in umol/a TM	Pseudotropin in umol/g TM	Hyoscyamin in umol/g TM	Scopolamin	TRII-Alkaloide
WT	0.20	4.30	3.20	9.06	0.00	28.54
VC	0.16	4.84	2.80	15.15	3.96	29.06
las-B-c	1.58	1.04	1.12	38.54	6.44	76.73
las-B-d	0.08	0.20	0.09	21.45	4.82	40.55
las-1-1	0.16	4.45	6.14	20.83	4.98	24.61
las-1-3	0.16	1.84	1.89	20.80	5.74	30.48
las-3-a	0,12	2,24	2,08	13,29	2,97	23,88

Tabelle G.8 DTRI-antisense-Wurzelkulturen, 28 d alt

Die Einzelwerte beziehen sich auf die Tabellen C.3 und C.4.

G 2.2.3 TRII-sense-Wurzelkulturen

Linie	regenerierte Wurzelkulturen
IIs-B	a, b, c
lls-C	a, b, d
lls-E	a, b, c
lls-G	a, b, c, d, e
lls-H	a, b, c, d, e
lls-J	a, b, c, d, e
lls-1	a, b, c
lls-4	a, b, c

Tabelle G.9 Mit dem Datura-TRII-sense-Konstrukt transformierte Wurzelkulturen

Die Namen kennzeichnen den Ursprung der Wurzelkulturen: **IIs-4-c** \rightarrow transformiert mit DTRII-*sense*-Konstrukt, Blatt 4, Wurzel c. Die unterschiedliche Bezeichnung der Wurzel-kulturen mit Buchstaben und Ziffern beruht auf zeitlich verschiedenen (2) Transformationsansätzen.

Kultur	Tropinon in µmol/g TM	Tropin in µmol/g TM	Pseudotropin in µmol/g TM	Hyoscyamin in µmol/g TM	Scopolamin in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM
WT	0,20	4,30	3,20	9,06	0,00	28,54
VC	0,16	4,84	2,80	15,15	3,96	29,06
lls-B-c	0,14	5,50	0,35	25,87	7,88	47,43
lls-G-a	0,10	2,87	1,31	36,21	9,84	49,45
lls-H-a	0,09	1,21	0,38	28,37	6,73	60,30
lls-J-a	0,06	2,03	1,11	22,87	3,37	15,72
lls-J-b	0,06	4,49	0,72	9,33	2,70	12,56

Tabelle G.10 DTRII-sense-Wurzelkulturen, 28 d alt

Die Einzelwerte beziehen sich auf die Tabellen C.5 und C.6.

G 3 KULTIVIERUNG

G 3.1 Nährmediumbestandteile und -zusätze

Nährmedium	Alter in d	TRI-Alkaloid in µmol/g TM	SD TRI in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	SD TRII in µmol/g TM
	5	0,00	0,00	2,10	1,07
B5	11	0,52	0,21	6,65	0,32
	17	2,08	0,14	8,98	0,64
	23	4,80	0,90	7,91	0,49
	27	9,45	0,25	10,29	0,31
	7	2,75	0,19	0,00	0,00
B5	11	4,21	1,79	9,59	4,26
5 % Saccharose	17	5,01	0,39	17,26	1,46
	23	5,31	1,20	18,13	0,75
	27	7,10	2,70	28,82	7,00
	7	0,82	0,24	0,00	0,00
1/2 B5	11	1,11	0,00	11,90	0,87
5 % Saccharose	17	2,66	0,62	14,20	1,93
	23	6,47	1,27	34,10	2,45
	27	6,46	1,05	41,24	6,62

G 3.1.1 Mediumkonzentration

Tabelle G.11 Nährmediummodifikation (hairy roots)

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen und in den Abbildungen C.15, C.16 und C.17 dargestellt. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

G 3.1.2 Kohlenhydratquelle und Zuckersignal

Kohlenhydrat	TM in mg	TRI-Alkaloid in µmol/g TM	SD TRI in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	SD TRII in µmol/g TM
Start	50	2,91	0,78	2,55	0,69
Saccharose	170	2,24	0,65	11,47	1,52
Fructose + Glucose	110	1,26	0,53	13,27	1,48
Fructose	90	2,16	0,26	11,83	2,90
Glucose	140	2,96	0,16	9,69	0,00
3-O-Methylglucose	70	1,05	0,23	9,56	0,74
Mannose	80	1,41	0,39	19,31	3,88
Sorbitol	70	1,28	0,27	12,92	0,20

Tabelle G.12 Kohlenhydratvariation, 4-tägige Kultivierung (hairy roots)

Zum Zeitpunkt des Umsatzes waren die Kulturen 14 d alt. Die Kohlenhydratkonzentration im Medium betrug 100 mM, bei der Kombination Glucose/Fructose jeweils 50 mM. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen und in Abbildung C.18 dargestellt. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

Kohlenhydrat +/- Hexokinaseinhibitor	TM in mg	TRI-Alkaloid in µmol/g TM	SD TRI in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	SD TRII in µmol/g TM
Inhibitor allein	90	0,82	0,08	6,67	1,98
Saccharose -	170	2,24	0,65	11,47	1,52
Saccharose +	170	0,89	0,02	9,81	2,01
Mannose -	80	1,41	0,39	19,31	3,88
Mannose +	70	3,89	0,13	13,12	2,09
3-O-Methylglucose -	70	1,05	0,23	9,56	0,74
3-O-Methylglucose +	70	0,90	0,04	13,20	0,89
Sorbitol -	190	1,28	0,27	12,92	0,20
Sorbitol +	160	3,16	1,05	22,20	2,91

Tabelle G.13 4-tägige Kultivierung von hairy roots auf unterschiedlichen Kohlenhydratquellen, mit und ohne Hexokinaseinhibitorzusatz

Zum Zeitpunkt des Umsatzes waren die Wurzelkulturen 14 d alt. Die Kohlenhydratkonzentration im Medium betrug 100 mM, die des Hexokinaseinhibitors10 mM. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen und in der Abbildung C.19 dargestellt. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

Kohlenhydrat +/- Kalziumkanalblocker	TM in mg	TRI-Alkaloid in µmol/g TM	SD TRI in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	SD TRII in µmol/g TM
Saccharose	320	1,13	0,28	13,69	2,65
+ Verapamilhydrochlorid	210	1,19	0,09	7,10	0,29
Sorbitol	190	1,72	0,20	15,77	0,99
+ Verapamilhydrochlorid	210	0,94	0,06	9,11	1,95

Tabelle G.14 4-tägige Kultivierung von hairy roots auf unterschiedlichen Kohlenhydratquellen, mit und ohne Kalziumkanalblockerzusatz

Zum Zeitpunkt des Umsatzes waren die Wurzelkulturen 14 d alt. Die Kohlenhydratkonzentration im Medium war 100 mM, die des Kalziumkanalblockers 0,4 mM. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

G 3.1.3 Elicitoren

Kultivierung	Inkubations- dauer in d	TRI-Alkaloid in µmol/g TM	SD TRI in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	SD TRII in µmol/g TM
Kontrolle		2,05	0,14	13,23	2,52
EtOH	1	1,56	0,11	11,67	3,51
MeJA		1,07	0,03	7,11	2,69
ABA		1,72	0,12	9,65	2,11
Kontrolle		2,05	0,23	13,19	2,74
EtOH	2	2,07	0,46	9,15	2,25
MeJA		2,30	0,19	7,05	3,05
ABA		1,31	0,18	7,45	2,52

Tabelle G.15 Inkubation mit Signalstoffen (hairy roots)

Zum Zeitpunkt des Umsatzes waren die Kulturen 14 d alt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen und in Abbildung C.20 dargestellt. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

Kohlenhydrat + Phytohormon	TM in mg	TRI-Alkaloid in µmol/g TM	SD TRI in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	SD TRII in µmol/g TM
Saccharose	160	1,01	0,03	12,47	2,55
+ Auxin IBA	230	1,44	0,38	7,91	1,06
+ Cytokinin BA	220	2,01	0,55	10,90	3,67
Sorbitol	90	4,38	0,83	14,98	1,05
+ Auxin IBA	180	3,70	1,34	21,83	5,30
+ Cytokinin BA	200	2,89	0,55	17,48	4,62

G 3.1.4 Phytohormone

Tabelle G.16 4-tägige Phytohormoninkubation (hairy roots)

Zum Zeitpunkt des Umsatzes waren die Kulturen 14 d alt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen und in Abbildung C.21 dargestellt. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

G 3.2 Umgebungsfaktor Licht

Kultivierung	Alter in d	TM in mg	TRI-Alkaloid in µmol/g TM	SD TRI in µmol/g TM	TRII-Alkaloide in µmol/g TM	SD TRII in µmol/g TM
ohne Licht	14	110	1,69	0,50	14,81	2,09
Licht		210	2,09	0,22	18,47	2,43
ohne Licht	28	400	7,37	1,74	20,70	4,29
Licht		300	4,16	0,59	11,66	1,55

Tabelle G.17 Belichtung (hairy roots)

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4-5 unabhängigen Bestimmungen und in Abbildung C.22 dargestellt. In den Spalten SD TRI und SD TRII sind die Standardabweichungen der TR-Alkaloide angegeben.

Danksagung

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

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Möglichkeit zu freien, ungehinderten Untersuchungen möchte ich Frau Prof. Dr. Birgit Dräger danken. Meine Forschungszeit hat sie mit Aufmerksamkeit verfolgt und fachlichen sowie persönlichen Kommentaren bereichert.

Ein Dank gilt meinen ehemaligen Diplomandinnen Frau Uta Garske, Frau Andrea Bunschuch und Frau Ute Richter, deren Forschungstätigkeiten dem Fortgang der vorliegenden Arbeit dienlich waren.

Ein großes Dankeschön geht an meine wichtigsten Lektorinnen Frau Dr. Bettina Rahfeld und Frau Dipl.-Pharm. Yvonne Scholl.

Meinem Lebensgefährten Silvio danke ich für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertationsschrift, insbesondere für die Hilfe bei graphischen Problemen.

Bei Frau Dr. Sabine Rosahl und Herrn Dr. Dietmar Schlote möchte ich mich für die Einstiegshilfen in das Gebiet der Molekularbiologie bedanken. Mit Methodenhinweisen und kritischer Diskussionsbereitschaft haben sie zum Erhalt der Ergebnisse beigetragen.

Ferner möchte ich es nicht versäumen, der DFG und JSPS für den 10-wöchigen Forschungsaufenthalt in Japan (Naist Institute Nara) zu danken.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei: Dirk, Tino, Ron, Yvonne, Olaf, Heike, Antje-Kristin, Bettina, Birgit, Antje, Stefan sowie den Laborantinnen Frau Ködel, Frau Schöne, Frau Wodak, Frau Watzka und Frau Marx für die gute, ausgesprochen freundschaftliche Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft sowie für die unterhaltsame Freizeitgestaltung. In dieser Atmosphäre habe ich gern gearbeitet und gelebt.

Meiner Familie möchte ich mit dieser Arbeit für jegliche Unterstützung und Hilfe auf meinem bisherigen Lebensweg danken.

Erklärung

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

Halle (Saale), den 02.06.02

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Grit Rothe			
Geburtsdatum/Geburtsort:	23. April 1973 in Merseburg			
Familienstand:	ledig			
<u>Schulbildung:</u>				
1979 - 1989	Zehnklassige Allgemeinbildende Polytechnische Ober- schule in Schafstädt			
1989 - 1992	Berufsausbildung (BMSR-Technik) mit Abitur im VEB Chemische Werke Buna in Schkopau			
Studium:				
1992 - 1996	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg			
Okt. 1996 - März 1997	Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg, Thema: " <i>Atropa belladonna</i> -Wurzelkulturen: Untersuchung von Wachstum, Calysteginakkumulation und Proteinmuster"			
April 1997 - Sep. 1997	Pharmaziepraktikantin in der Domapotheke zum Rauten- kranz in Merseburg			
Nov. 1997	Erteilung der Approbation als Apothekerin			
Promotion:				
Okt. 1997 - Sep. 2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharma- zeutische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. B. Dräger			
<u>derzeitige Tätigkeit:</u>	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzen- biochemie Halle (Saale) in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie			