

Gene, Enzyme und Produkte der Calysteginbildung in *Calystegia sepium* (L.) R. Br.

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. Yvonne Sichhart
geb. am 03.06.1973 in Köthen

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Martin Luckner
3. Priv.-Doz. Dr. habil. Bernd Schneider

Halle (Saale), 14.11.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006037

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006037>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	a
Abbildungsverzeichnis.....	d
Tabellenverzeichnis	f
Publikationen und wissenschaftliche Beiträge	g
A EINLEITUNG.....	1
A 1 <i>CALYSTEZIA SEPIUM</i> (L.) R. BR.	1
A 2 CALYSTEGINE	1
A 2.1 Struktur und Vorkommen	1
A 2.2 Die Tropanalkaloidbiosynthese	3
A 2.2.1 Die Enzyme der Tropanalkaloidbiosynthese	3
A 2.2.2 Vom Pseudotropin zu den Calyستeginen.....	6
A 2.2.3 Die Regulation und Beeinflussung der Biosynthese.....	7
A 2.3 Die Analytik der Calyستegine und ihrer Intermediate.....	9
A 2.4 Physiologische Bedeutung der Calyستegine	9
A 2.5 Aufgabenstellung.....	12
B MATERIALIEN UND METHODEN.....	13
B 1 MATERIALIEN	13
B 1.1 Pflanzen und Wurzelkulturen	13
B 1.2 Bakterien.....	14
B 1.3 Vektoren.....	14
B 1.4 Oligonukleotide	14
B 1.5 Kits und Enzyme.....	16
B 1.6 Puffer, Standardlösungen und Medien.....	16
B 1.7 Chemikalien und Standards	16
B 1.8 Geräte und Hilfsmittel	17
B 2 METHODEN	18
B 2.1 Molekularbiologische Methoden	18
B 2.1.1 Isolierung von DNA.....	18
B 2.1.2 Isolierung von RNA.....	18
B 2.1.3 Herstellung von cDNA	19
B 2.1.4 PCR.....	19
B 2.1.5 Klonierung	22
B 2.1.6 Rekombinante Expression in <i>E. coli</i>	22
B 2.1.7 Rekombinante Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	22
B 2.1.8 Rekombinante Expression in <i>Pichia pastoris</i>	23
B 2.1.9 Northern Blot	24
B 2.1.10 Southern Blot	25
B 2.1.11 Sequenzierung.....	25
B 2.2 Biochemische Methoden.....	26
B 2.2.1 Quantifizierung von Proteinen.....	26
B 2.2.2 Bakterienlyse	26
B 2.2.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	26
B 2.2.4 Enzymassay zur Bestimmung der Tropinonreduktaseaktivität	27
B 2.2.5 Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten TRI als 6xHis-Fusionsprotein.....	28

B 2.2.6	Partielle Reinigung und Charakterisierung der nativen TRII	30
B 2.2.7	Proteinextraktion aus Blättern von <i>Nicotiana benthamiana</i>	31
B 2.3	Analytische Methoden	31
B 2.3.1	Extraktion und Derivatisierung von Calysteginen	31
B 2.3.2	Extraktion von Intermediaten der Calysteginbiosynthese	31
B 2.3.3	³ H-Pseudotropin	32
B 2.3.4	Extraktion und Analytik von Tritium-markierten Wurzelkulturen	33
B 2.3.5	Fütterungsversuche	33
B 2.3.6	Hemm- und Induktionsversuche an der Wurzelkultur	34
B 2.3.7	Gaschromatographie	34
B 2.3.8	Gaschromatographie mit Massenspektroskopie	36
B 2.3.9	Dünnschichtchromatographie	37
B 2.3.10	NMR	38
C	ERGEBNISSE	40
C 1	TROPINONREDUKTASE I	40
C 1.1	Isolierung einer trI-homologen cDNA-Sequenz	40
C 1.2	Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der TRI	43
C 1.3	Expressionsanalyse der trI-Transkripte	45
C 1.4	Genomische Struktur	47
C 1.5	Möglicher Umsatz von Tropin	47
C 2	TROPINONREDUKTASE II	49
C 2.1	Isolierung einer tr-homologen cDNA-Sequenz	49
C 2.2	Überexpressionsversuche in <i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i> und <i>N. benthamiana</i> ...	51
C 2.3	Isolierung und Anreicherung der nativen TRII	54
C 2.4	Biochemische Charakterisierung der TRII	56
C 3	DIE CALYSTEGINBIOSYNTHESE IN <i>CALYSTEGIA SEPIUM</i>	59
C 3.1	Akkumulation von Calysteginen in <i>Calystegia sepium</i>	59
C 3.2	¹⁵ N-Tropinonfütterung zum Nachweis des Einbaus in Calystegine und 2,7-Dihydroxynortropan	60
C 3.2.1	Massenspektroskopische Untersuchungen	60
C 3.2.2	NMR	62
C 3.3	Kinetischer Verlauf der Biosynthese	64
C 4	DIE INTERMEDIATE DER BIOSYNTHESE	66
C 4.1	Die Tropinonreduktion bei zusätzlicher Applikation von Tropinon	66
C 4.2	Akkumulation von Metaboliten in verschiedenen Pflanzenteilen	67
C 4.3	Norpseudotropin als weiterer Metabolit der Biosynthese	68
C 4.3.1	³ H-Markierung von Pseudotropin	68
C 4.3.2	Entwicklung eines AMD-Verfahrens	70
C 4.3.3	Der Nachweis der Norpseudotropinbildung	72
C 4.3.4	Hemm- und Induktionsversuche von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen	73
D	DISKUSSION	75
D 1	DIE TROPINONREDUKTASEN	75
D 1.1	Die Tropinonreduktion in der Pflanze und den Wurzelkulturen	75
D 1.2	Die Isolierung der Tropinonreduktasen	75
D 1.3	Tropinonreduktasen gehören zur Familie der SDR	78
D 1.4	Substratbindung und Stereospezifität der Tropinonreduktasen	79

D 1.4.1	Tropinonreduktase I.....	79
D 1.4.2	Die putative Tropinonreduktase.....	80
D 1.5	Katalytische Eigenschaften der Tropinonreduktasen	82
D 1.6	Die genomische Organisation und Expression der trI	83
D 1.7	Evolutionäre Betrachtungen	84
D 2	DIE BIOSYNTHESE DER CALYSTEGINE	85
D 2.1	Akkumulation von Calysteginen und ihrer Metabolite in <i>Calystegia sepium</i>	85
D 2.2	Calystegine werden aus Tropinon gebildet.....	87
D 2.3	Die Kinetik der Calysteginbildung	88
D 2.4	Die Akkumulation von 2,7-Dihydroxynortropan	90
D 2.5	Norpseudotropin als weiterer Biosynthesemetabolit	91
D 3	AUSBLICK	93
E	ZUSAMMENFASSUNG	95
F	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
G	ANHANG.....	1
G 1	CDNA-SEQUENZEN VON <i>CALYSTEGIA SEPIUM</i>	1
G 1.1	TRI-cDNA	1
G 1.2	Putative TR-cDNA	2
G 2	VERWENDETE PRIMER FÜR RT-PCR	3
G 3	VEKTORKARTEN	5
G 3.1	Vektorkarte der trI in pET21d	5
G 3.2	Vektorkarte der putativen tr in pET21d.....	5
G 3.3	Vektorkarte der putativen tr in pQE30	6
G 3.4	Vektorkarte der putativen tr in pQE60	6
G 3.5	Vektorkarte der putativen tr in pICH8371-2.....	7
G 3.6	Vektorkarte der putativen tr in pICZ A α	8
G 4	CHARAKTERISIERUNG DER TRI	9
G 4.1	Nachweis der Substratspezifität.....	9
G 4.2	pH-Optimum.....	9
G 4.3	Umsetzung von Substratanaloga.....	10
G 4.4	K _m -Wert und v _{max} -Bestimmung.....	11
G 5	CHARAKTERISIERUNG DER TRII	12
G 5.1	Nachweis der Substratspezifität.....	12
G 5.2	pH-Optimum.....	12
G 5.3	Umsetzung von Substratanaloga.....	13
G 5.4	K _m -Wert und v _{max} -Bestimmung.....	14
G 6	AKKUMULATION VON CALYSTEGINEN IN <i>C. SEPIUM</i>	15
G 7	AKKUMULATION VON METABOLITEN IN <i>C. SEPIUM</i>	15
G 8	FÜTTERUNG VON ¹⁵ N-TROPINON	16
G 9	KINETISCHER VERLAUF DER CALYSTEGINBIOSYNTHESE	16
G 10	TRENNUNG VON CALYSTEGINEN MIT AMD-TLC.....	17
G 11	TRENNUNG VON TROPINON, PSEUDOTROPIN, TROPIN UND NORTROPIN	17

Abkürzungsverzeichnis

6xHis	fusionierter sechsfacher Histidinanker
A	Absorption
<i>A. belladonna</i> , AB	<i>Atropa belladonna</i>
ABA	Abscisinsäure
ADC	Arginindecarboxylase
AMD-TLC	<i>automated multiple development-TLC</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARG	Arginase
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp (kbp)	Basenpaare (Kilo-)
bzw.	beziehungsweise
B5(-Medium)	Nährmedium nach Gamborg 1968
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
Cal.	Calystegin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ci (μCi, mCi)	Curie (Mikro-, Milli-)
d	Tag(e)
<i>D. stramonium</i> , DS	<i>Datura stramonium</i>
Da (kDa)	Dalton (Kilo-)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	<i>enzyme classification</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i> (ermittelte Nukleotidsequenz einer mRNA)
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
g (ng, μg, mg)	Gramm (Nano-, Mikro-, Milli-)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatograph(ie)
GC-MS	Gaschromatograph(ie) mit massenspezifischem Detektor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
gsHMBC	<i>gradient-selected heteronuclear multiple bond correlation</i>
h	Stunde(n)
<i>H. muticus</i>	<i>Hyoscyamus muticus</i>
<i>H. niger</i> , HN	<i>Hyoscyamus niger</i>
H6H	Hyoscyamin-6β-hydroxylase
HMDS	Hexamethyldisiloxan
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
i. D.	innerer Durchmesser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

K_m	Michaelis-Menten-Konstante
kPa	Kilopascal
l (μ l, ml)	Liter (Mikro-, Milli-)
LB	Luria-Bertani-Medium
m (nm, mm, cm)	Meter (Nano-, Milli-, Centi-)
M (μ M, mM)	Mol (Mikro-, Milli-)
MeJA	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MPO	<i>N</i> -Methylputrescinoxidase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Murashige & Skoog Medium
N	Normal
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NADP+	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (reduzierte Form)
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
kat (μ kat, nkat)	Katal (Mikro-, Nano-)
ODC	Ornithindecaboxylase
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p.A.	pro analysis
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMT	Putrescin- <i>N</i> -methyltransferase
PND	Phosphor-Stickstoff-sensitiver Detektor
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen/min
(18S) rRNA	ribosomale RNA (Untereinheit 18)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
s_d	Standardabweichung
SDR	<i>short-chain dehydrogenase/reductase</i> (kurzkettige Dehydrogenasen/ Reduktasen)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
<i>S. tuberosum</i> , ST	<i>Solanum tuberosum</i>
SPDS	Spermidinsynthese
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat- Puffer
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TM	Trockenmasse
TMSi	Trimethylsilyl-Gruppe
TR	Tropinonreduktase(n)
TRI	tropinformende Tropinonreduktase
TRII	pseudotropinformende Tropinonreduktase

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
UDP	Uridindiphosphat
UV	ultraviolett
var.	Varietät
vgl.	vergleiche
v_{\max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
Vol	Volumenteile
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. A-1: <i>Calystegia sepium</i> (L.) R. Br., aufgenommen in Halle, nahe der Saale.....	1
Abb. A-2: In <i>Calystegia sepium</i> (L.) R. Br. vorkommende Nortropanalkaloide	2
Abb. A-3: Die Biosynthese der Tropanalkaloide	5
Abb. A-4: Mögliche nachfolgende Biosyntheseschritte vom Pseudotropin zu den Calysteginen.	6
Abb. B-1: Schema zur 5'-RACE..	20
Abb. B-2: Schema zur 3'-RACE	21
Abb. B-3: Verwendete Substrate im Standardassay zur Charakterisierung der TRI und TRII	30
Abb. C-1: Homologievergleich der TRI-Proteinsequenzen von <i>D. stramonium</i> (DS), <i>H. niger</i> (HN), <i>S. tuberosum</i> (ST) und <i>C. sepium</i> (CS)	42
Abb. C-2: Bakterienlysat und Reinigungsfractionen von überexprimierter TRI in pET21d.....	43
Abb. C-3: Bestimmung des pH-Optimums der Reduktion des Tropinons und Oxidation des Tropins durch TRI	44
Abb. C-4: Relative Aktivität der CS-TRI mit verschiedenen Substratanaloga	45
Abb. C-5: Northern Blot Analyse der <i>Calystegia</i> -Gewebe.....	46
Abb. C-6: Southern Blot Analyse	47
Abb. C-7: A: GC-MS-Chromatogramm eines Wurzelkulturextraktes nach Fütterung mit 1 mM Tropin .	48
Abb. C-8: Homologievergleich der TRII-Proteinsequenzen von <i>D. stramonium</i> (DS), <i>H. niger</i> (HN), <i>S. tuberosum</i> (ST) und der putativen TR aus <i>C. sepium</i> (putCS).....	51
Abb. C-9: Überexpression von putTR im Vektor pQE30 in <i>E. coli</i> SG13009	53
Abb. C-10: Reinigung der TRII mit dem Anionenaustauscher Q Sepharose Fast Flow (1x10 cm)	55
Abb. C-11: Die angereinigte TRII	56
Abb. C-12: Bestimmung des pH-Optimums der TRII	57
Abb. C-13: Relative Aktivität der CS-TRII mit verschiedenen Substratanaloga.....	58
Abb. C-14: Akkumulation der Calystegine A ₃ und B ₂ in <i>Calystegia sepium</i> Pflanzen	59
Abb. C-15: Einbau von ¹⁵ N-Tropinon in die Calystegine A ₃ , B ₁ , B ₂ und in 2,7-Dihydroxynortropan	61
Abb. C-16: Vorgeschlagene Fragmentierung von 2,7-Dihydroxynortropan nach Silylierung	61
Abb. C-17: ¹⁵ N NMR Teilspektren der Extrakte der Wurzelkulturen von <i>C. sepium</i>	63
Abb. C-18: Der kinetische Verlauf der Bildung der einzelnen Calystegine nach Umsetzung komplett ¹⁵ N-markierter Wurzelkulturen auf ¹⁴ N-Medium.....	64
Abb. C-19: ¹⁵ N NMR Teilspektrum eines Extraktes einer auf ¹⁵ N-Nitrat gewachsenen <i>C. sepium</i> Wurzelkultur.	65
Abb. C-20: ¹⁵ N-HMBC-Teilspektrum eines Extraktes von Wurzelkulturen von <i>Calystegia sepium</i>	66
Abb. C-21: Akkumulation der Metabolite Tropinon, Tropin und Pseudotropin in <i>Calystegia sepium</i> Pflanzen und Wurzelkulturen.....	67
Abb. C-22: Schema zur enzymatischen Gewinnung von ³ H-Pseudotropin	69
Abb. C-23: AMD-Methoden.....	71
Abb. C-24: GC-MS-Spektrum einer 21 Tage alten <i>C. sepium</i> Wurzelkultur	73
Abb. D-1: Ausschnitt aus den TRI-Sequenzen von <i>D. stramonium</i> und <i>C. sepium</i>	80
Abb. D-2: Ausschnitt aus derTRII-Sequenz von <i>D. stramonium</i> und der putativen TR aus <i>C. sepium</i> ...	81
Abb. D-3: Ausschnitt aus der TRI-Sequenz von <i>D. stramonium</i> und der putativen TR aus <i>C. sepium</i>	81
Abb. D-4: Tropin- und Nortropinester aus <i>Convolvulus subhirsitus</i> und <i>Convolvulus krauseanus</i>	86
Abb. G-1: CS-TRI cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz.....	1
Abb. G-2: Putative CS-TR cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz	2

Abb. G-3: Alignment der TRI von <i>Datura stramonium</i> (DS), <i>Hyoscyamus niger</i> (HN) und <i>Solanum tuberosum</i> (ST)	4
Abb. G-4: TRI in pET21d (Novagen).....	5
Abb. G-5: Die putative tr in pET21d (Novagen)	5
Abb. G-6: Die putative tr in pQE30 (Qiagen).....	6
Abb. G-7: Die putative tr in pQE60 (Qiagen).....	6
Abb. G-8: Proektorsystem pICH8371-2 (Icon Genetics GmbH).....	7
Abb. G-9: Die putative tr in pICZ A α (Invitrogen).....	8
Abb. G-10: Gaschromatogram (FID-Signal) des Enzymumsatzes der rekombinant gewonnenen TRI mit Tropinon.....	9
Abb. G-11: K_m -Wert und v_{max} -Bestimmung von TRI.....	11
Abb. G-12: Gaschromatogram (FID-Signal) des Enzymumsatzes der nativen TRII mit Tropinon.....	12
Abb. G-13: K_m -Wert und v_{max} -Bestimmung von TRII	14

Tabellenverzeichnis

Tab. B-1: Verwendete Vektoren	14
Tab. B-2: Verwendete Primer	15
Tab. B-3: Verwendete Kits und Enzyme und deren Bezugsfirmen.	16
Tab. B-4: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsfirmen.	17
Tab. B-5: Verwendete Größenmarker und deren Bezugsfirmen.....	17
Tab. B-6: MS-Fragmentierung von Pseudotropin und der Nortropanalkaloide als TMSi-Derivate	37
Tab. C-1: Homologievergleich auf Nucleotidebene von CS-trI mit bekannten Tropinonreduktasen.....	41
Tab. C-2: Vergleich der Aminosäuren in TRI aus <i>D. stramonium</i> und <i>C. sepium</i> , die an der Ausbildung der Substratbindungsstelle beteiligt sind.....	42
Tab. C-3: Homologievergleich auf Nucleotidebene der putativen CS-tr zu bekannten Tropinonreduktasen.	49
Tab. C-4: Vergleich der Aminosäuren in TRII aus <i>D. stramonium</i> und <i>C. sepium</i> , die an der Ausbildung der Substratbindungsstelle beteiligt sind.....	50
Tab. C-5: Induktionsbedingungen und Bakterienlyse des Konstruktes pQE30-TR in <i>E. coli</i> SG13009. ...	52
Tab. C-6: Reinigungsschema für die Isolierung des TRII-Proteins.	55
Tab. C-7: R _f -Werte für Calystegine und deren putativen Precursoren.....	71
Tab. D-1: Homologievergleich der Tropinonreduktasen aus <i>C. sepium</i> mit den bekannten TRs der Solanaceen auf Nucleotid- und Aminosäurebasis	76
Tab. G-1: Direkte und reverse Primer für RT-PCR	3
Tab. G-2: Relative Aktivität der TRI bei unterschiedlichen pH-Werten	9
Tab. G-3: Relative Aktivität der TRI mit unterschiedlichen Substraten	10
Tab. G-4: Relative Aktivität der TRII bei unterschiedlichen pH-Werten	12
Tab. G-5: Relative Aktivität der TRII mit unterschiedlichen Substraten.....	13
Tab. G-6: Akkumulation von Calysteginen in <i>C. sepium</i>	15
Tab. G-7: Akkumulation der Metabolite Tropinon, Pseudotropin und Tropin in <i>C. sepium</i>	15
Tab. G-8: Einbau von ¹⁵ N-Tropinon in die Calystegine A ₃ , B ₁ , B ₂ und 2,7-Dihydroxynortropan.....	16
Tab. G-9: Kinetischer Verlauf der Calysteginbiosynthese nach Umsetzung komplett ¹⁵ N-markierter Wurzelkulturen auf ¹⁴ N-Medium	16

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Scholl,Y.; Asano,N.; Draeger,B., 2001, Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors, Journal of Chromatography A 928, 217-224.

Scholl,Y.; Draeger,B., 2001, Separation of calystegines and their biosynthetic precursors with AMD, Planar Chromatography 87, 10.

Scholl,Y.; Hoeke,D.; Draeger,B., 2001, Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway, Phytochemistry 58, 883-889.

Scholl,Y.; Schneider,B.; Draeger,B., 2003, Biosynthesis of calystegines: ¹⁵N NMR and kinetics of formation in root cultures of *Calystegia sepium*, Phytochemistry 62, 325-332.

Sichhart,Y.; Draeger,B., in Vorbereitung, Tropinone reductases of *Calystegia sepium*

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen (Poster)

Scholl,Y.; Draeger,B., 2001, The biosynthesis of calystegines: Feeding experiments with ¹⁵N-labelled precursors to *Calystegia sepium* root cultures, International Symposium “Lead compounds from higher plants”, Phytochemical Society of Europe, Lausanne.

Scholl,Y.; Schaaf,F.; Draeger,B., 2002, Tropinone reductases in *Calystegia sepium*, Deutsche Botanikertagung, Freiburg

A Einleitung

A 1 *Calystegia sepium* (L.) R. Br.

Calystegia sepium (L.) R. Br. gehört zur Familie der Windengewächse (Convolvulaceae), Tribus Convolvuleae, Ordnung Solanales und kommt in ganz Mitteleuropa in Hecken, Gärten, Gebüsch, an Zäunen und Ufern auf feuchten, nährstoff- und basenreichen Böden vor. Die 5-15 cm langen, herz- bis pfeilförmigen Laubblätter sind wechselständig am Stängel angeordnet und gestielt. Die weißen Blüten stehen einzeln in den Blattachseln und haben verwachsene Kronblätter. Die Blütezeit dauert von Juni bis September. Die Früchte sind eiförmige, 6-12 mm lange Kapseln, die mehrere Samen enthalten [Godet 1992]. *Calystegia sepium* bildet vom Spätsommer bis Herbst horizontal wachsende, der vegetativen Vermehrung und Ausbreitung dienende Ausläufer, die mit den Spitzen ins Erdreich eindringen. Dort wachsen sie 20 bis 30 cm weiter, werden weiß und chlorophyllfrei und verdicken sich. Diese unterirdischen Organe speichern große Mengen kleinkörniger Stärke und sind Kartoffelknollen in ihrem Bau sehr ähnlich, auch wenn sie eher eine schlanke Form besitzen [Neubauer 1988].



Abb. A-1: *Calystegia sepium* (L.) R. Br., aufgenommen in Halle, nahe der Saale.

A 2 *Calystegine*

A 2.1 Struktur und Vorkommen

Die Calystegine wurden erstmals 1988 aus der Pflanze *Calystegia sepium*, welche namensgebend für diese Stoffgruppe war, von Tepfer und Mitarbeitern isoliert [Tepfer et al. 1988]. Sie wurden zuerst als Wachstumsförderer von Bakterien der Rhizosphäre beschrieben [Goldmann et al. 1990].

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide. Sie werden entsprechend ihrem Hydroxylierungsgrad in die Gruppe der A-Calystegine (3 Hydroxylgruppen), B-Calystegine (4 Hydroxylgruppen) und C-Calystegine (5 Hydroxylgruppen) eingeteilt. Insgesamt wurden von Asano und Mitarbeitern 14 Calystegine isoliert und strukturell mit NMR aufgeklärt [Asano et al. 1994a; Asano et al. 1994b; Asano et al. 1995; Asano et al. 1996a; Kato et al. 1997]. Aus

Hyoscyamus niger wurde ein Trihydroxynortropan mit einer Brückenkopfaminogruppe anstelle der Hydroxylgruppe im Calystegin B₂ identifiziert und als Calystegin N₁ benannt, welches sich bei längerer Lagerung als nicht stabil erwies und zu Calystegin B₂ zerfiel [Asano et al. 1996b]. Des weiteren wurden N-Methylcalystegin B₂ und N-Methylcalystegin C₁ aus *Lycium chinense* isoliert [Asano et al. 1997c]. Als erstes glycosiliertes Calystegin wurde das 3-O-β-D-Glucopyranosid von Calystegin B₁ in *Nicandra physalodes* nachgewiesen [Griffiths et al. 1996]. Von Asano und Mitarbeitern wurden kürzlich Dihydroxynortropane isoliert, denen die für die Calystegine typische 3β-Hydroxylgruppe fehlt [Asano et al. 2001b].

Bisher wurden Calystegine in verschiedenen Vertretern der Solanaceen (z.B. *Solanum tuberosum* [Keiner et al. 2000; Nash et al. 1993], *Atropa belladonna* [Draeger et al. 1995; Molyneux et al. 1993; Tepfer et al. 1988], *Physalis alkekengi* [Asano et al. 1995], *Mandragora autumnalis* [Bekkouche et al. 2001]), der Moraceen (*Morus alba* [Asano et al. 1994a], *Morus bombycis* [Asano et al. 1994b]) und der Convolvulaceen (*Calystegia sepium*, *Convolvulus arvensis* [Goldmann et al. 1990; Molyneux et al. 1993; Tepfer et al. 1988], *Ipomoea* sp. Q6 aff. *calobra*) [Molyneux et al. 1995]) identifiziert. Schimming und Mitarbeiter wiesen in 30 von 65 untersuchten Convolvulaceen-Arten Calystegine nach [Schimming et al. 1998]. Eine Übersicht der Vorkommen der Calystegine innerhalb der Tropanalkaloid-produzierenden Pflanzenfamilien wird von Griffin und Lin gegeben [Griffin et al. 2000].

Die Calystegine kommen in den einzelnen Arten meist als Gemische, jedoch in unterschiedlicher Zusammensetzung vor. In vielen Gattungen (*Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*) treten sie gemeinsam mit den klassischen Tropanalkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin auf. Sie werden aber auch in Spezies synthetisiert, die strukturell andere Alkaloide als Sekundärstoffe produzieren, z.B. bei *Solanum tuberosum* gemeinsam mit Glycoalkaloiden [Friedman et al. 1997] oder bei *Ipomoea hederifolia* mit Pyrrolizidinen [Jenett-Siems et al. 1993].

In Wurzeln, Wurzelkulturen und oberirdischen Pflanzenteilen von *Calystegia sepium* akkumulieren die Calystegine A₃, A₅, B₁ und B₂ sowie 2,7-Dihydroxynortropan (Abb. A-2).

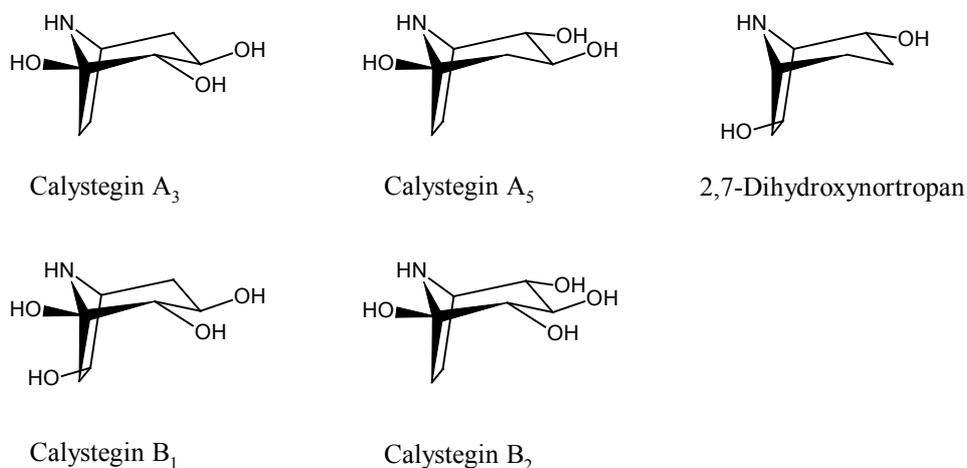


Abb. A-2: In *Calystegia sepium* (L.) R. Br. vorkommende Nortropanalkaloide

Die Reduktion des Tropinons stellt den Verzweigungspunkt zwischen den Tropan- und den Nortropanalkaloiden dar. Die Ketogruppe des Tropinons wird stereospezifisch zur 3 α - oder 3 β -Hydroxylgruppe der Tropanole reduziert. Die erste tropinbildende Tropinonreduktase (TRI, E.C. 1.1.1.206) wurde aus *Datura stramonium* isoliert [Koelen et al. 1982]. 1988 erfolgte die erste Beschreibung der pseudotropinformenden Reduktase (TRII, E.C. 1.1.1.236) [Draeger et al. 1988]. In *Datura innoxia* wurden beide Reduktasen anhand ihrer Aktivität nachgewiesen [Couladis et al. 1991]. cDNA-Klone der TRI und TRII aus *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger* und *Solanum tuberosum* wurden isoliert und in *E.coli* überexprimiert [Keiner et al. 2002; Nakajima et al. 1993a; Nakajima et al. 1993b; Nakajima et al. 1999c]. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass eine C-terminale Domäne von ca. 120 Aminosäuren für die Stereo- und Substratspezifität beider Enzyme verantwortlich sein muss [Nakajima et al. 1999b]. Die spezifische Bindung des Tropinons und die daraus folgende Stereospezifität der Reduktion wurde mit Kristallisationsstudien der beiden Enzyme aus *Datura stramonium* belegt [Nakajima et al. 1998]. Die Tropinonreduktasen gehören zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen (SDR, *short-chain dehydrogenases*) [Kallberg et al. 2002; Nakajima et al. 1993b]. Diese zeichnen sich durch eine Reihe hochkonservierter Aminosäuren und die Eigenschaft, NADPH oder NADH als Cofaktoren zu benutzen, aus [Jornvall et al. 1995; Kallberg et al. 2002; Persson et al. 1991].

Aus Tropin entsteht durch Veresterung mit Phenylmilchsäure Littorin [Ansarin et al. 1993; Robins et al. 1994]. Mit markierten Vorstufen ([3-²H]-Tropin, [2'-¹³C, 3-²H]-Littorin) wurde sowohl der Einbau von Tropin und Littorin in Hyoscyamin gezeigt [Duran-Patron et al. 2000] als auch der Einbau von Phenylalanin über Phenylmilchsäure abgesichert [Platt et al. 1984]. In einem bislang ungeklärten Prozess wird Littorin in Hyoscyamin überführt. Humphrey und O'Hagen halten eine von Coenzym B₁₂ vermittelte Isomerisierung für möglich [Humphrey et al. 2001]. Von Zabetakis und Mitarbeitern wird eine Beteiligung einer P450 abhängigen Monooxygenase nicht ausgeschlossen [Zabetakis et al. 1998]. Hyoscyamin wird in sein Epoxid Scopolamin durch 6 β -Hydroxylierung des Tropanringes mit anschließender Epoxidbildung überführt. Dieser Prozess wird von der Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase (H6H, E.C. 1.14.11.11) katalysiert, die eine 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenase ist [Hashimoto et al. 1987]. Die cDNA wurde aus *Hyoscyamus niger* [Hashimoto et al. 1993a; Matsuda et al. 1991] und *Atropa belladonna* [Yun et al. 1992] isoliert und in *E.coli* überexprimiert.

Aus Pseudotropin entstehen in bislang unbekanntem Schritten die Calystegine. Eine Demethylierung am Brückenstickstoff sowie verschiedene Hydroxylierungen sind notwendig. In welcher Reihenfolge die unterschiedlichen Hydroxylierungsstufen, also die unterschiedlichen Calystegingruppen, gebildet werden, ist ebenso unbekannt (vgl. A 2.2.2).

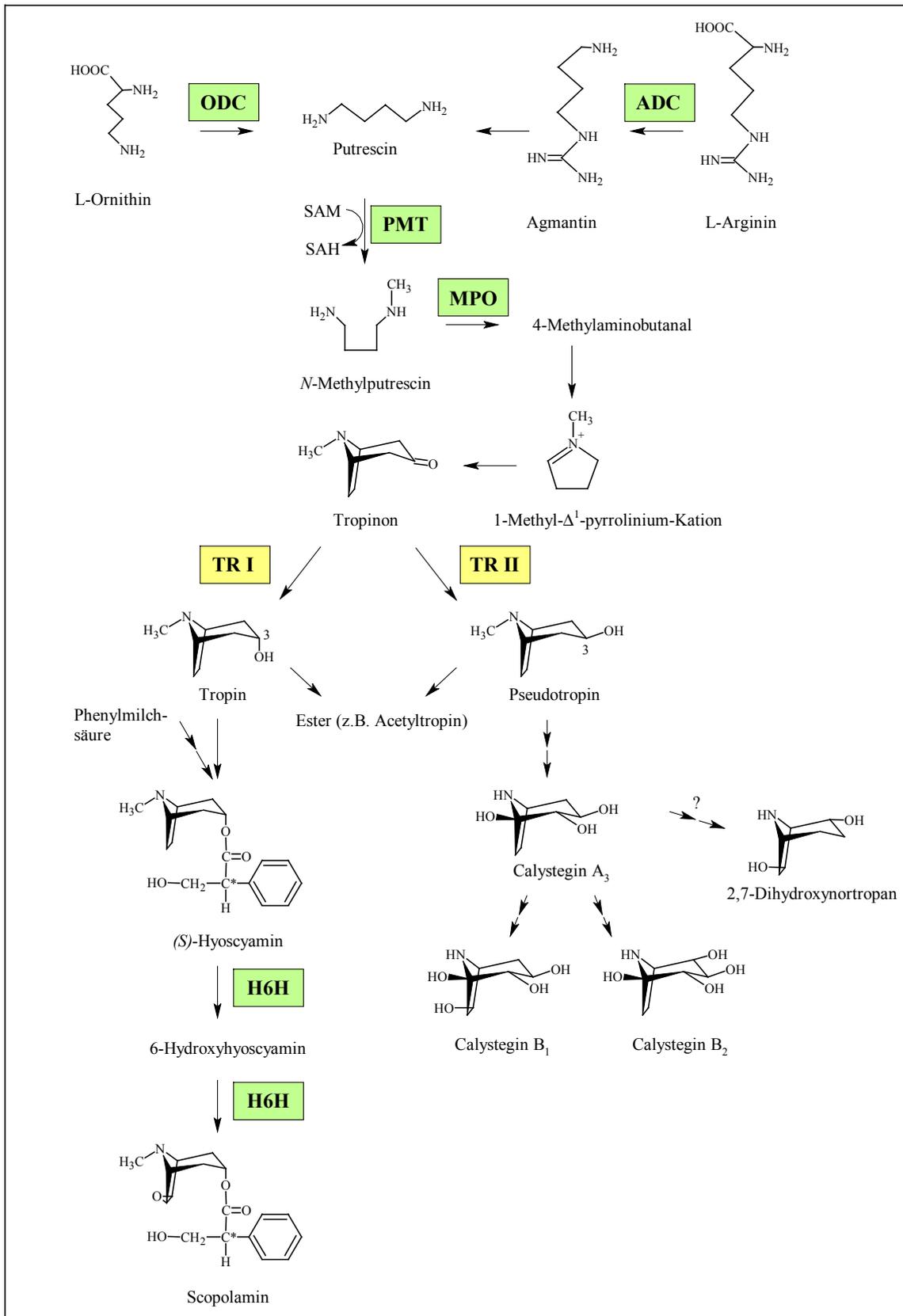


Abb. A-3: Die Biosynthese der Tropanalkaloide. Die Reihenfolge der gebildeten Calystegine stellt eine Möglichkeit dar. ODC: Ornithindecaboxylase, ADC: Arginindecaboxylase, PMT: Putrescin-*N*-Methyltransferase, MPO: *N*-Methylputrescinoxidase, TRI+II: Tropinon-reduktase I + II, H6H: Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase.

A 2.2.2 Vom Pseudotropin zu den Calysteginen

In der Biosynthese der Calystegine sind die Schritte vom Pseudotropin zu den Calysteginen bislang unaufgeklärt. Biochemisch müssen eine *N*-Demethylierung und Ringhydroxylierungen ablaufen (Abb. A-4). Welcher dieser beiden Schritte zuerst stattfindet, ist ebenso unbekannt.

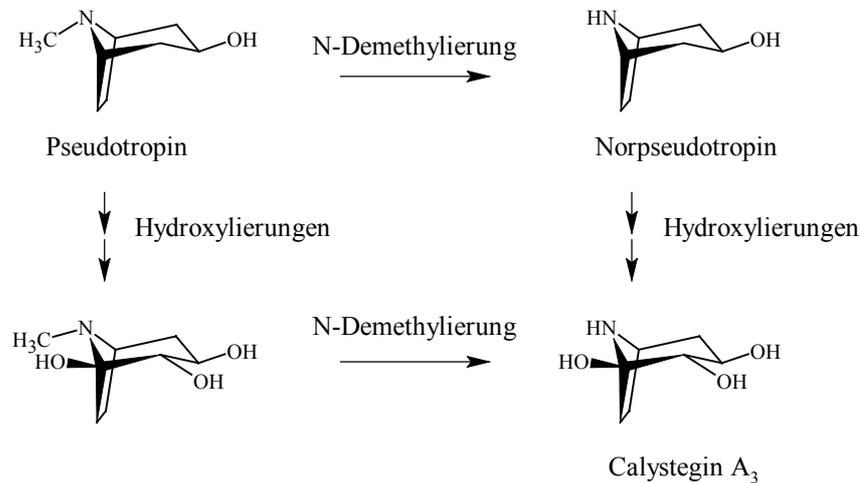


Abb. A-4: Mögliche nachfolgende Biosyntheseschritte vom Pseudotropin zu den Calysteginen. Modellhaft wird hier Calystegin A₃ dargestellt.

Als mögliches Enzym für die *N*-Demethylierung kommt eine Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase in Frage. Die Beteiligung von Cytochrom P450 in der oxidativen Demethylierung verschiedener Xenobiotika in höheren Pflanzen wird von [Young et al. 1976] und [Dohn et al. 1984] aufgezeigt. Die Demethylierung des Nicotin zum Nornicotin kann als ein Modellprozess für die Pseudotropin-Demethylierung angesehen werden, da es denkbar ist, dass durch Verwandtschaft der Alkaloidbiosynthesen hier ähnliche Enzyme beteiligt sind. Aber auch bei der Demethylierung des Nicotins sind noch Fragen offen.

Von Leete und Mitarbeitern wurde 1974 eine Nicotin-Demethylierung postuliert, die über eine Ringöffnung abläuft [Leete et al. 1974]. Chelvarajan und Mitarbeiter schlugen eine Beteiligung einer Cytochrom P450 Reduktase vor. Die *N*-Demethylierung verläuft hauptsächlich in Mikrosomenpräparationen ab, benötigt molekularen Sauerstoff und NADPH und lässt sich teilweise von Kohlenmonoxid und Tetracyclis hemmen [Chelvarajan et al. 1993]. Hao und Yeoman plädierten auch für eine oxidative Demethylierung, da verschiedene Methylgruppenakzeptoren keinen Einfluss auf die Reaktion zeigen, dafür NADPH und O₂ verbraucht werden. Allerdings wiesen sie Enzymaktivitäten im Zellüberstand nach, was gegen eine Beteiligung membranständiger P450 Enzyme spricht [Hao et al. 1996; Hao et al. 1998]. Als eine mögliche Übergangsform bei der *N*-Demethylierung wird durch stereospezifischen 5-trans-Wasserstoffverlust die Bildung eines Imminium-Iones diskutiert [Carlson et al. 1995]. Dazu im Widerspruch stehen die Arbeiten von Botte und Mitarbeitern, die durch Fütterung von [4',4',5',5'-²H₄]-Nicotin zeigten, dass weder Protonen am C-4' noch am C-5' entfernt werden und die Oxidation direkt an der Methylgruppe ablaufen muss [Botte et al. 1997]. Die abgespaltene

Methylgruppe wird in weiteren Fütterungsversuchen mit markierten N-Methylgruppen in Form von CO₂ und in Molekülen des Primärstoffwechsels (Serin, Methylmethionin, Cystein-Derivate) nachgewiesen [Mesnard et al. 2002]. Die Beteiligung von Tetrahydrofolat wird diskutiert.

Für die Ringhydroxylierungen am Pseudotropin sind 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen denkbar. Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase ist eine solche Dioxygenase, die nicht nur eine Hydroxylgruppe am Tropanring einführt, sondern gleich die Epoxidbildung zum Scopolamin katalysiert [Hashimoto et al. 1986; Hashimoto et al. 1987]. Weitere Beispiele für 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen sind die Desacetoxyvindolin-4-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* [Vazquez-Flota et al. 1997] oder die Gibberellin-2 β -Hydroxylase aus *Pisum sativum* [Smith et al. 1986].

Als weitere Enzymgruppe für die Hydroxylierungen kommen die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen in Betracht. Das bekannteste Beispiel ist sicherlich die Zimtsäure-4-Hydroxylase, die in verschiedenen Pflanzen charakterisiert wurde [Werck-Reichhart D. 1995].

A 2.2.3 Die Regulation und Beeinflussung der Biosynthese

Die Biosynthesen einiger Alkaloide sind weitgehend aufgeklärt, über deren Regulation ist allerdings meist wenig bekannt [Facchini 2001; Kutchan 1995]. Es wird davon ausgegangen, dass Alkaloidbiosynthesen keinen randomisierten Prozess darstellen, sondern gezielt in speziellen Pflanzenorganen in bestimmten Entwicklungsstadien, kontrolliert durch spezifische Genexpression in definierten Zellen oder Organellen der Pflanze, ablaufen [De Luca et al. 2000].

Zur Untersuchung der Regulation stehen neben der Beeinflussung der Pflanzen durch Applikation von Elicitoren und Inhibitoren auch molekularbiologische Methoden zur Verfügung. Die Expression der an der Biosynthese beteiligten Enzyme nach Induktion kann neben der Akkumulation der gebildeten Alkaloide untersucht werden. Transformationsexperimente, durch die gezielt Enzyme der Biosynthese an- oder ausgeschaltet werden können, stellen eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der Regulation dar.

Tropanalkaloide als auch Nicotin werden in der Nähe der Wurzelspitzen produziert, akkumulieren aber meist in den Vakuolen von Blättern und Wurzeln [Wink 1999]. Die histochemische Lokalisation der PMT in *A. belladonna* zeigt, dass die PMT im Perizykel der Wurzel, in Sprossen und Blüten exprimiert wird [Suzuki et al. 1999a]. Immunlokalisation [Hashimoto et al. 1991] und in-situ Hybridisierung [Suzuki et al. 1999b] lassen ebenso eine perizykel-spezifische Expression der H6H in der Wurzel erkennen. In *H. niger* wird die TRI dagegen im Perizykel, der Endodermis und der äußeren Rinde nachgewiesen [Nakajima et al. 1999a]. Ähnliche Ergebnisse werden histochemisch für die Expression der TRI und TRII aufgezeigt [Nakajima et al. 1999c]. Damit muss ein Transport der Intermediate innerhalb der Zellgewebe zwischen den einzelnen Biosyntheseschritten stattfinden. Durch Transformation der Pflanzen *A. belladonna*, *H. niger* und *N. tabacum* mit H6H wird durch einen histochemischen Nachweis der H6H in Wurzeln eine artabhängige zellspezifische Expression gezeigt [Kanegae

et al. 1994]. In *N. tabacum* kommt H6H nicht vor. Wird sie durch Transformation eingeführt, so wird sie nicht im Perizykel, sondern im Wurzelmeristem exprimiert.

Nährmedienvariationen von Wurzel- und Zellkulturen und Elicitoren können die Alkaloidakkumulation verändern. Osmotischer Stress führt in *D. stramonium* Pflanzen zu erniedrigten Putrescinnengen [Tiburcio et al. 1986b]. Eine Verringerung der Mineralienkonzentration bei gleicher Menge an Saccharose im Nährmedium bewirkt erhöhte Hyoscyamin-Werte bei Wurzelkulturen von *Datura*-Arten [Hilton et al. 1990]. Nussbaumer und Mitarbeiter beobachten eine höhere Biomassebildung bei erhöhter Zuckerkonzentration (5% Saccharose) im Medium [Nussbaumer et al. 1998]. Untersuchungen der Calysteginakkumulation in *A. belladonna* Wurzelkulturen zeigen stark erhöhte Calysteginmengen durch Erhöhung der Zuckerkonzentration bei gleichzeitiger Halbierung der Mineralienkonzentration im B5-Medium. Dagegen bleiben die Hyoscyamin- und Scopolaminmengen unverändert [Rothe et al. 2001]. Zuckrerhöhungen können zu einer Induktion von Alkaloidbiosynthesen führen [Schroeder et al. 1999]. Eine Induktion von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen wird in Betracht gezogen [Cabello-Hurtado et al. 1998; Ohta et al. 1997]. Induktion mit Methyljasmonat (MeJa) als bekanntem Signalmolekül führt zur Erhöhung von Nicotin in Tabak, ebenso wie Blattverletzung [Baldwin et al. 1997]. In *D. stramonium* wird eine Erhöhung von Hyoscyamin und Tropin nach MeJa-Gabe beobachtet [Zabetakis et al. 1999]. In Tabakzellkulturen induziert MeJa die ODC- und PMT-Expression [Imanishi et al. 1998]. Von Rothe wird in *A. belladonna* nach MeJa-Gabe keine Beeinflussung der Hyoscyamin- oder Calysteginakkumulation nachgewiesen [Rothe et al. 2001]. Ebenso hat die Applikation von Abscisinsäure (ABA) keine Auswirkung, welche allerdings die Tropanbiosynthese in *H. muticus* inhibiert [Vanhala et al. 1998].

Die Überexpression einzelner Gene der Biosynthese erlaubt, aus den beobachteten Veränderungen Rückschlüsse auf Regulationsmechanismen zu ziehen. So führt beispielsweise die Überexpression von ODC in *Nicotiana rustica* zu einer Erhöhung von Putrescin und Nicotin, allerdings in nicht sehr hohen Mengen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass ODC nicht der limitierende Schritt in der Nicotinbiosynthese ist [Hamill et al. 1990]. Die Überexpression von ADC in Tabak führt lediglich zu einer starken Anreicherung von Agmatin. Dadurch werden aber weder Polyamin- noch Nicotinmengen beeinflusst [Burtin et al. 1997]. Das zeigt deutlich, dass die alleinige Steigerung eines frühen Enzymes innerhalb einer vielstufigen Biosynthese noch keinen Einfluss auf die Bildung der Endprodukte hat. Die Transformation von H6H in *A. belladonna* führt zu einer stark gesteigerten Akkumulation von Scopolamin [Yun et al. 1992]. Diese Ergebnisse werden später in *H. muticus* bestätigt [Jouhikainen et al. 1999]. Die Überexpression von PMT in *A. belladonna* erhöht die Tropanalkaloidakkumulation nicht, in *N. sylvestris* dagegen führt die gleiche Überexpression zu einer Erhöhung des Nicotingehaltes in den Blättern um 40% [Sato et al. 2001]. Das zeigt, dass sehr kontroverse Ergebnisse durch Beeinflussung einzelner Schritte von Biosynthesen nach Transformationen möglich sind. Um weitere gezielte Aussagen über die Regulation von Biosynthesen zu erhalten sind sicherlich aufeinander folgende Transformationen verschiedener Gene einer Biosynthese nötig [Bourgaud et al. 2001].

A 2.3 Die Analytik der Calystegine und ihrer Intermediate

Die routinemäßige Quantifizierung der Calystegine und ihrer Intermediate Tropinon, Pseudotropin als auch Tropin erfolgt gaschromatographisch. Die hydrophilen Calystegine müssen dabei derivatisiert werden. Da eine komplette Derivatisierung mit Trimethylsilyl-Gruppen (TMSi-Gruppen) aller Hydroxylgruppen und des sekundären Stickstoffs zum teilweisen Abbau der Calystegine führt [Molyneux et al. 1993], wird unter milden Bedingungen mit Hexamethyldisiloxan und 10% Trichlorsiloxan derivatisiert [Draeger 1995]. Die leicht flüchtigen Intermediate können direkt vermessen werden oder ebenso wie die Calystegine derivatisiert aufgetrennt werden (vgl. B 2.3.1, die Derivatisierung ist natürlich nicht möglich mit Tropinon). Die Detektion erfolgt parallel mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Stickstoff-Phosphor-Detektor (PND). Durch Vergleich der alkaloidabhängigen Verhältnisse der beiden Signale ist eine eindeutige Zuordnung der Peaks möglich (Kap. B 2.3.7). Für die Quantifizierung wird das FID-Signal verwendet, da durch Abnutzungserscheinungen des PND-Detektors unterschiedliche Peakflächen resultieren. Eine weitere Detektion stellt die massenspektroskopische Analyse dar [Draeger 1995]. Für Polyhydroxyalkaloide, wie Homonojirimycin und Castanospermin, die den Calysteginen strukturell sehr ähnlich sind, wird eine direkte massenspektroskopische Detektion mit *Quadrupole Ion Trap* beschrieben [Kite et al. 1999].

Eine HPLC-Methode mit refraktometrischer Detektion wurde zur Identifizierung der Calystegine von Goldmann angewendet [Goldmann et al. 1990]. Eine geringe Sensitivität und unzufriedenstellende Trennung der einzelnen Calystegine innerhalb einer Gruppe sind die Nachteile dieser Analytik. Das fehlende Chromophor erlaubt keine UV-Detektion wie bei den klassischen Tropanalkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin, für die verschiedene Methoden beschrieben sind [Payne et al. 1987], Übersicht in [Woolley 1993] und [Draeger 2002].

Seit kurzem stehen Methoden zur kapillarelektrophoretischen Trennung der Calystegine zur Verfügung. Zum einen erfolgt die Detektion als Boratkomplex mit UV bei 191 nm [Daali et al. 2000], zum anderen kommt eine Detektion nach elektrochemischer Oxidation zum Einsatz [Ruettinger et al. 2001].

Ohne großen instrumentellen Aufwand wird weiterhin die Dünnschichtchromatographie speziell zum schnellen Vorabscreening als auch für radioaktiv markierte Proben eingesetzt (B 2.3.9.1). Eine bessere Trennung der Intermediate als auch der Calystegine wurde durch die Entwicklung einer automatischen Mehrfachentwicklung der DC-Platten erreicht [Scholl et al. 2001a]. Damit wird die Trennung von Calysteginen innerhalb einer Gruppe möglich.

A 2.4 Physiologische Bedeutung der Calystegine

Die meisten polyhydroxylierten Alkaloide hemmen reversibel Glycosidasen durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu den Zuckerresten der natürlichen Substrate und ihres Stickstoffatoms, der die positive Ladung des Glycosylkations repräsentiert [Asano et al. 2001a]. Glycosidasen katalysieren viele lebenswichtige Funktionen in allen lebenden Organismen, so z.B. die Verdauung von Polysacchariden, die Biosynthese von Glycoproteinen und Glycolipiden

und fungieren als lysosomale Enzyme [Watson et al. 2001]. Durch die Hemmung von Glycosidasen kann es zu toxischen Erscheinungen beim Menschen kommen.

Swainsonin und Castanospermin, die den Calysteginen in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, wurden als erste Glycosidasehemmstoffe aus *Swainsona canescens* und *Castanospermum australe* isoliert [Colegate et al. 1979; Hohenschutz et al. 1981]. Swainsonin hemmt α -Mannosidasen und führt damit zur Akkumulation von mannosereichen Oligosacchariden in Lysosomen. Es resultiert der sogenannte Locoismus mit axonaler Dystrophie, Verlust der Zellfunktion bis hin zum Tod [Dorling et al. 1978]. Castanospermin hemmt lysosomale α - und β -Glucosidasen, was zu lysosomalen Speicherkrankheiten (Morbus Pompe, Morbus Gaucher) führen kann [Molyneux et al. 1996; Saul et al. 1985]. Swainsonin wird beispielsweise in australischen und afrikanischen Convolvulaceen gefunden, die außerdem Calystegine enthalten [Molyneux et al. 1995]. Bei Ziegen, die von *Ipomoea carnea* gefressen haben, kann die lysosomale Speicherkrankheit im Gehirn nachgewiesen werden [de Balogh et al. 1999]. Neben Swainsonin enthält diese Convolvulaceae auch Calystegin B₂ und C₁. Ob die Toxizität der Ipomoea-Arten nur durch Swainsonin oder die Kombination aus diesem Indolizidinalkaloid und den Calysteginen hervorgerufen wird, ist zur Zeit noch nicht geklärt.

Von Calysteginen ist bekannt, dass sie verschiedene Glycosidasen hemmen [Asano et al. 1995; Asano et al. 1996b; Asano et al. 1996a; Asano et al. 1997a; Asano et al. 1997c; Kato et al. 1997]. Calystegin B₂ ist ein potenter Inhibitor pflanzlicher β -Glucosidasen und α -Galaktosidasen (K_i 1,2 und 0,86 μ M), hemmt aber nur in geringem Maße lysosomale Leberenzyme beim Menschen. Calystegin B₁ und C₁ sind starke Inhibitoren (K_i 10 und 1,5 μ M) der lysosomalen β -Glucosidase der menschlichen Leber [Asano et al. 1997b]. Die Calystegine der A-Gruppe sind gegenüber den bislang untersuchten Enzymen eher schwache Glycosidasehemmstoffe. Für Calystegin A₃ ist der K_i 20 μ M bei der β -Glucosidase von Mandel und 30 μ M bei der β -Galaktosidase von Rinderleber [Asano et al. 1995].

Garcia-Moreno und Mitarbeiter synthetisierten Calystegin B₂ Analoga und testeten diese bei verschiedenen Enzymen unterschiedlicher Organismen (α -Glucosidase aus Hefe, β -Glucosidase aus Mandeln und Rinderleber, α -Galaktosidase aus grünem Kaffee) auf ihre Glycosidasehemmwirkung. Die Ringstruktur wurde durch Einfügen eines Sauerstoffs und Bildung von 6-Oxacalystegin B₂ mit variierenden Substituenten am Ringstickstoff modifiziert. Eine hohe Selektivität zeigten die Derivate mit aromatischen Substituenten. Die bicyclische Struktur ist eine wichtige Voraussetzung für die β -Glucosidasehemmung. Die Brückenkopfhydroxylgruppe ist für eine gute Bindung an die zu hemmenden Enzyme wichtig [Garcia-Moreno et al. 2001].

Verschiedene Solanaceen (*S. dimidiatum*, *S. kwebense*) rufen bei Tieren, die davon gefressen haben, neurologische Störungen hervor. In diesen Arten kommt ein breites Spektrum an Calysteginen vor, besonders Calystegin B₂ [Nash et al. 1993]. Calysteginmengen bis zu 150 μ g/g FM sind in kleinen, noch wachsenden Kartoffelknollen zu finden, in den Keimen sogar bis zu 1,2 mg/g FM [Draeger et al. 1995; Keiner et al. 2000]. Viele andere essbare Früchte und Gemüse enthalten Calystegine, vor allem Calystegin B₁, B₂ und C₁, die potente Inhibitoren der lysosomalen Leber- β -Glucosidase des Menschen sind. Bei einer Applikation von 1 mM

dieser Calystegine an Fibroblastenzellkulturen des Menschen für 1 Woche trat keine lysosomale Speicherung ein. Calystegin B₂ als potenter Hemmstoff pflanzlicher β -Glucosidasen und α -Galaktosidasen zeigte keine oder nur geringe inhibitorische Wirkung an lysosomalen Leberenzymen des Menschen [Asano et al. 1997b]. Eine endgültige Klärung, ob Calystegine toxische Auswirkungen auf Mensch und Tier haben, kann nur durch direkte Applikation gereinigter Calystegine an Versuchstiere erfolgen. Bei normalen Essgewohnheiten sollten die verzehrten Alkaloidmengen allerdings kein Risiko für den Menschen darstellen. Zumindest akute Toxizität wäre auffällig geworden.

Ein therapeutischer Einsatz der Calystegine oder der Derivate ist zur Bekämpfung von Krebs, als Immunstimulans, bei der Behandlung von Diabetes mellitus und als Virustatika denkbar [Asano et al. 2000]. Als Beispiel kann Miglitol zur Behandlung von Diabetes genannt werden, welches aus Deoxynojirimycin entwickelt wurde [Ahr et al. 1997]. Bislang werden Deoxynojirimycin, 1-Deoxymannojirimycin, Swainsonin und Castanospermin getestet, da diese erhältlich sind. Bei Calysteginen besteht der Nachteil, dass sie nur schwer stereochemisch voneinander getrennt aus biologischem Material zu isolieren [Buettner 1998; Schunack 2000] bzw. ebenso schwierig zu synthetisieren sind [Boyer et al. 1994; Johnson et al. 1995; Skaanderup et al. 2001].

Tepfer und Mitarbeiter zeigen, dass Calystegine eine Stickstoff- und Kohlenstoffquelle für Bakterien darstellen, die in der Rhizosphäre von calysteginhaltigen Pflanzen leben [Tepfer et al. 1988]. Insgesamt wurden 44 Bakterienstämme auf ihre Fähigkeit getestet, Calystegine zu katabolisieren, nur *Rhizobium meliloti* 41 war dazu in der Lage: Calystegin B₂ wurde katabolisiert, sein N-Methyl-Derivat allerdings nicht [Goldmann et al. 1996; Tepfer et al. 1988].

A 2.5 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Tropinonreduktion in einer Convolvulaceae. Die Tropinonreduktion ist ein wichtiger Schritt innerhalb der Tropanalkaloidbiosynthese. Es wird postuliert, dass durch die stereospezifische Reduktion des Tropinons entweder die klassischen Tropanalkaloide (Hyoscyamin, Scopolamin) oder die Calystegine als Nortropanalkaloide entstehen.

Für die Untersuchungen wurde die Pflanze *Calystegia sepium* und deren Wurzelkultur als Vertreter der Convolvulaceen gewählt, die ein robustes Modellsystem mit einer hohen Calysteginproduktion darstellt.

Durch die Detektion von Tropin in *Calystegia sepium* stellte sich die Frage, ob bei der Reduktion des Tropinons ein unspezifisches oder zwei stereospezifische Enzyme beteiligt sind. Welche Eigenschaften weisen diese Enzyme auf? Durch die Beantwortung dieser Fragen könnten erstmals Tropinonreduktasen der Convolvulaceen mit den bekannten Tropinonreduktasen der Solanaceen verglichen werden. Es wären Aussagen über den evolutionären Ursprung dieser Enzymgruppe ableitbar.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob die Calystegine überhaupt über Tropinon gebildet werden und welche weiteren Biosyntheseschritte folgen. Für die Untersuchung der Biosynthese der Calystegine aus Tropinon sollte dieses ^{15}N -markiert an die Wurzelkulturen gefüttert werden. Die Analyse des Einbaus sollte sowohl gaschromatographisch als auch mit NMR erfolgen. Der bislang unbekannte Biosyntheseschritt, der vom Pseudotropin ausgehend zu den Calysteginen führt, sollte aufgeklärt werden. Ein weiterer Fokus lag auf der Untersuchung der Reihenfolge der Bildung der einzelnen Calystegine nach ihrem Hydroxylierungsgrad.

B Materialien und Methoden

B 1 Materialien

B 1.1 Pflanzen und Wurzelkulturen

Das Pflanzenmaterial von *Calystegia sepium* wurde in Halle, Standort Talstraße unweit der Saale in den Monaten Juli-August geerntet. Samenmaterial wurde ebenso in Halle in Saalenähe gesammelt und zur Anzucht von sterilem Pflanzenmaterial verwendet. Proben des Samenmaterials wurden eingelagert. Für die Sterilisierung wurden die Samen 3x je 5 min in konzentrierter Natriumhypochloridlösung und je 5 min in sterilem Wasser geschwenkt. Die Samen keimten auf sterilem Filterpapier in verschlossenen Petrischalen und wurden danach auf Perlit mit flüssiger Nährlösung 3MS nach Murashige und Skoog kultiviert [Murashige et al. 1962]. Die Pflanzen wuchsen unter Langtagbedingungen (16 h hell, 8 h dunkel) bei 23°C.

Die mit *Agrobacterium rhizogenes* 15834 transformierten Wurzelkulturen wurden uns von Dr. P. Bachmann vom Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig zur Verfügung gestellt. Sie wuchsen in Gamborg's B5 Medium mit 3% Saccharose in 300 ml Erlmeyerkolben mit 70 ml Medium auf einem Rundschüttler mit 100 rpm im Dunkeln [Gamborg et al. 1968]. Alle 28 Tage wurden ca. 50 mg Wurzelspitzen unter sterilen Bedingungen in neues Medium zur Rekultivierung überführt. Zum Schutz vor Bakterienbefall wurde zusätzlich Ampicillin in einer Konzentration von 0,5 mg/l zugesetzt.

Für Untersuchungen zum kinetischen Verlauf der Biosynthese (C 3.3) wurde Gamborg's B5 Medium dahingehend verändert, dass die üblichen 30 mM KNO₃ durch 30 mM K¹⁵NO₃ (99%, Deutero GmbH) ersetzt wurden. Das verwendete Medium pro Kultur reduzierte sich auf 30 ml in 100 ml Erlmeyerkolben.

Die Variation von Gamborg's B5 Medium mit 5% Saccharose enthielt von allen Mineralien und Vitaminen die halbe Konzentration, dafür 5% statt 3% Saccharose.

B 1.2 Bakterien

Verwendete Bakterienstämme:

BL21 CodonPlus[®] (DE3)-RP (Stratagene): F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal λ*(DE3) *endA* Hte [*argU proL Cam*^F]

OneShot Top10[®] (Invitrogen): F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

XL1-Blue (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F⁻ *proAB laqI*^qZΔM15 In10 (Tet^r)]

SG13009 [pREP4] (Qiagen): *nal*^S*Str*^S*rif*^S, *lac*⁻*ara*⁻*gal*⁻ *mtl*⁻F⁻*recA*⁻*uvr*⁺*lon*⁺

Flüssigkulturen: Die *E. coli* Bakterien der verschiedenen Stämme wurden in LB- oder TB-Medium [Sambrook et al. 1989] mit einer Antibiotikakonzentration von 50 mg/l bei 37°C über Nacht angezogen.

Agarplatten: Transformierte Bakterien wurden auf verfestigtem LB-Medium (15 g/l Agar), welchem 50 mg/l Antibiotikum nach dem Autoklavieren zugesetzt wurde, ausgestrichen und bei 37°C kultiviert.

B 1.3 Vektoren

Vektor	Charakteristika	Firma
pCR [®] 2.1 Topo TA	Amp ^r , Kan ^r	Invitrogen
pET21d	Amp ^r , 6xHis-Tag (C), T7-Tag (N)	Novagen
pQE30	Amp ^r , 6xHis-Tag (C)	Qiagen
pQE60	Amp ^r , 6xHis-Tag (N)	Qiagen
pICH8371-2	Amp ^r , Kan ^r	Icon Genetics GmbH
pPICZ Aα	Zeo ^r , α-Faktor-Tag (N)	Invitrogen

Tab. B-1: Verwendete Vektoren. Bei den Charakteristika ist jeweils die Antibiotikaresistenz und die Lage der Anhänge (Tag) angegeben, C = C-terminales Ende, N = N-terminales Ende, Amp = Ampicillin, Kan = Kanamycin, Zeo = Zeocin.

B 1.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech hergestellt. Nucleotide in Klammern stellen gewobbelte Stellen (Austausch dieser Nukleotide) innerhalb der Primer dar.

Anwendung	Primer	Sequenz 5'→3'	Schmelztemperatur °C
RT-PCR	DP1	TGC ACT GCC CTT GTT AC(CT) GGT GG	65,1
	DP2	CCA GTG ACA TAT GAA GCA GCA GG	62,4
	DP3	T(AT)G GGT A(CT)G C(AT)(AG) TAG TGG AAG AA	58,9
	DP4	GCA CCT TTG G(AT)(AT) GC(AT) (GC)(AC)(AG) TAA A	58,4
RACE-PCR TRI	RP1	CTT CCG CTG GAA TAA TCC CTG	59,8
	RP2	GTC GAA GAA GTT TCG TCG TTG G	60,3
	RP3	AAC TGA CAA AGG TGA AAT TGA AGC C	59,7
	RP4	CAA CTT CGT TTT GCT TTC GGG	57,9
	RP5	CGC ACT CAT CAA CTT CGT TTT GCT	61,0
RACE-PCR TR	RP6	GGC TCT ACC TGT GAC ATA TCA C	60,3
	RP7	CTC CGG AAA TGG AAG CAT AGT C	60,3
	RP8	GCC ATG AGG TTT GTT CCA ATC	57,9
	RP9	ATC CTC AGC GTT TAA ATT CAG AG	57,1
	RP10	TCG GCA TAA CCC TTC TCT TTC C	60,3
Klonierung	pET21- TRI-dir	<u>CCA TGG AAA TGA GCT TTG GAC AAG GA</u> <i>NcoI</i>	63,2
	pET21- TRI-rev	<u>GCG GCC GCA GGG AAA CCA GTA AT</u> <i>NotI</i>	65,9
	pET21-TR- dir	<u>GGA TCC TGG CTG GAA GGT GGT C</u> <i>BamHI</i>	65,8
	pET21-TR- rev	<u>CCC TCG AGG AGA CCA TAG CTT GT</u> <i>XhoI</i>	64,2
	pQE30-dir, pQE60-dir	<u>CGG GAT CCA TGG CTG GAA GGT GG</u> <i>BamHI</i>	67,8
	pQE30- rev, pICH- rev	<u>GCT GCA GTC AGA GAC CAT AGC TT</u> <i>PstI</i>	62,4
	pQE60-rev	<u>GAA GAT CTG AGA CCA TAG CTT GTT GC</u> <i>BglII</i>	63,2
	pICH-dir, pIHis-dir	<u>TCT AGA GGC TGG AAG GTG GTC</u> <i>XbaI</i>	62,1
	pIHis-rev	<u>CTG CAG TTA GTG ATG GTG ATG G</u> <i>PstI</i>	60,3
	pPICZ-dir	<u>CTC GAG GGC TGG AAG GTG</u> <i>XhoI</i>	60,5
pPICZ-rev	<u>TCT AGA TCA GAG ACC ATA GCT</u> <i>XbaI</i>	55,9	

Tab. B-2: Verwendete Primer. Nukleotide in Klammern stellen gewobbelte Stellen dar. Eingefügte Sequenzen für Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und benannt.

B 1.5 Kits und Enzyme

Kit/Enzym	Bezugsfirma
ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
ALFexpress AutoRead Sequencing Kit	Pharmacia
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen
High Prime DNA Labeling Kit	Roche
PeqGOLD RNAPure	Peqlab
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Peqlab
HotStar Taq-Polymerase (5 U/μl)	Qiagen
Pfu-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Promega
Superscript Preamplification System Kit	GibcoBRL
RACE-PCR Kit	GibcoBRL
EasySelect Pichia Expression Kit	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	NEB, Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
RNase H	Promega
T4 Ligase	Peqlab
Terminal Desoxynucleotidyl Transferase	Takara
Lysozym	Applichem
Hexokinase (aus Bäckerhefe)	Sigma
Glucose-6-phosphatdehydrogenase (<i>von Leuconostoc mesenteroides</i>)	Sigma

Tab. B-3: Verwendete Kits und Enzyme und deren Bezugsfirmen.

B 1.6 Puffer, Standardlösungen und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Standardlösungen und Medien basieren, wenn nicht anders angegeben, auf den Vorschriften von Sambrook und Mitarbeitern [Sambrook et al. 1989].

B 1.7 Chemikalien und Standards

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

Chemikalie	Bezugsfirma
Ampicillin	Gerbu
Carbenicillin	Gerbu
Zeocin	Invitrogen
Ficoll	Serva
[α - 32 P] dATP 3000 Ci/mmol	NEN
Enhance Spray NEF-970G	NEN
K 15 NO $_3$	Deutero GmbH
Hybond [®] N+-Membran	Amersham-Pharmacia
ATP	Biomol
NADPH	Gerbu
Glycin	ICN

Tab. B-4: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsfirmen.

Größenmarker	Bezugsfirma
1 kb DNA-Leiter	GIBCO BRL
100 bp DNA-Leiter	Peqlab
Protein Standard Mixture IV	Merck

Tab. B-5: Verwendete Größenmarker und deren Bezugsfirmen.

Die Calystegine A $_3$, A $_5$, B $_1$, B $_2$, B $_3$, B $_4$, C $_1$, das N-Methylcalystegin B $_2$ sowie 2,3-Dihydroxynortropin und 2,7-Dihydroxynortropin wurden freundlicherweise von Prof. N. Asano (Kanazawa, Japan) zur Verfügung gestellt. 15 N-Tropinon wurde von Henry D. Boswell und Prof. David J. Robins (Glasgow, England) synthetisiert und von Dr. Richard J. Robins (Nantes, Frankreich) zur Verfügung gestellt, Nortropin von der Firma Boehringer-Ingelheim, Tetcyclacis von der BASF AG. Pseudotropin wurde von Frau Prof. B. Dräger (MLU Halle-Wittenberg) gemäß Nickon und Fieser synthetisiert [Nickon et al. 1952]. Prof. M. Zenk (MLU Halle-Wittenberg) stellte freundlicherweise D- 3 H-Glucose zur Verfügung. Miconazol und Bifonazol waren ein Geschenk der Firma Salutas Pharma GmbH (Barleben). Phenobarbital-Natrium wurde von Dr. Peinhard (MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

B 1.8 Geräte und Hilfsmittel

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

B 2 Methoden

B 2.1 Molekularbiologische Methoden

B 2.1.1 Isolierung von DNA

3 g frisches Wurzelmaterial einer 21 Tage alten Wurzelkultur wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Die DNA wurde mit 6 ml Extraktionspuffer für 10 min bei 65°C extrahiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1,8 ml 5 M Kaliumacetatlösung bei einer Inkubation von 10 min im Eisbad. Nach Zentrifugation (10 min, 15000 g, 4°C) wurden die Proteine im Überstand mit 6 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gefällt und anschließend zentrifugiert (5 min, 12000 g, 4°C). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 0,7 Vol Isopropanol für ca. 2 h. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 g, 4°C) wurde das Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 200 µl Wasser aufgenommen. Die Gehaltsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm (Gene Quant II Pharmacia Biotech).

Extraktionspuffer: 100 mM Tris-HCl pH 8.0
50 mM EDTA
500 mM NaCl
1,5% SDS
10 mM Mercaptoethanol

B 2.1.2 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Zum einen wurde das Kit PeqGOLD RNAPure (B 1.5) benutzt. Zur Isolierung von größeren RNA-Mengen (z.B. für Northern Blot, B 2.1.9) wurde eine modifizierte Form des von Reinbothe und Mitarbeitern beschriebenen Protokolls verwendet [Reinbothe et al. 1992].

3 g Frischmasse des jeweiligen Pflanzenmaterials wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 6 ml NTES-Puffer extrahiert, bei gleichzeitigem Zusatz von 6 ml Phenol/Chloroform (1:1). Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Extraktion und Fällung der Proteine erfolgte durch 5 min starkes Schütteln (Vortex Genie 2) mit anschließender Zentrifugation (10 min, 5000 g, 4°C). Die wässrige Oberphase wurde erneut mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt und 5 min geschüttelt, dann zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis kein sichtbares Protein mehr ausfiel. Der nächste Schritt erfolgte nur mit Chloroform. Die wässrige Phase wurde mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 versetzt und die Nukleinsäuren mit 3 Vol 96%igem EtOH bei -20°C über Nacht gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min (5000 g, 4°C). Das Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert, bei RT getrocknet und in 5 ml sterilisiertem, mit DEPC behandeltem Wasser gelöst. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 5 ml 4 M LiCl pH 5,2 über Nacht. Nach Zentrifugation für 30 min bei 5000 g wurde das Pellet erneut gewaschen, bei RT getrocknet und in 100-300 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst. Die Gehaltsbestimmung erfolgte

photometrisch bei 260 nm (Gene Quant II Pharmacia Biotech). Die Reinheit der RNA wurde durch den Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ bestimmt und lag bei allen Proben $>1,6$.

NTES-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1% (m/v) SDS

B 2.1.3 Herstellung von cDNA

Die cDNA zum Amplifizieren von TR-ähnlichen Fragmenten, als Grundlage für RACE-PCR und der Klonierungen wurde aus 5 µg Gesamt-RNA verschiedener Gewebe mit Hilfe der Superscript Reversen Transkriptase (Superscript Preamplification System Kit, GibcoBRL) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Dazu wurde ein Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer verwendet. Zur Erststrangsynthese für 5'-RACE (B 2.1.4.2) des trI-Gens wurde der Primer RP3, für das tr-Gen der Primer RP8 benutzt (B 1.4).

B 2.1.4 PCR

B 2.1.4.1 RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zum Amplifizieren von cDNA-Fragmenten der tr-Gene eingesetzt. Ein Standardansatz von 50 µl war wie folgt zusammengesetzt:

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

Die *Taq*-Polymerase von Peqlab wurde für einfache PCRs verwendet. Für eine hohe Lesegenauigkeit wurde für die finale RT-PCR der einzelnen Gene und bei den Ausgangs-PCR für Klonierungen die *Pfu*-Polymerase (Promega) oder *HotStar-Taq*-Polymerase (Qiagen) eingesetzt.

Die PCR wurde im T3 Thermocycler (Biometra) unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

Bei Verwendung der *Taq*-Polymerase :

95°C 5 min, 35 x [95°C 1 min, 50-62°C 1 min, 72°C 1 min], 72°C 10 min

Bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase :

95°C 5 min, 30 x [95°C 1 min, 50-62°C 0,5-1 min, 72°C 3 min], 72°C 10 min

B 2.1.4.2 RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA ends*)

Die tr-homologen Amplifikate von 650 bp und 430 bp Länge (siehe C 1.1) wurden mit Hilfe der RACE-PCR sowohl am 5' als auch am 3'-Ende vervollständigt [Frohman 1993]. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des RACE-PCR Kits von Gibco-BRL (vgl. Abb. B-1, Abb. B-2).

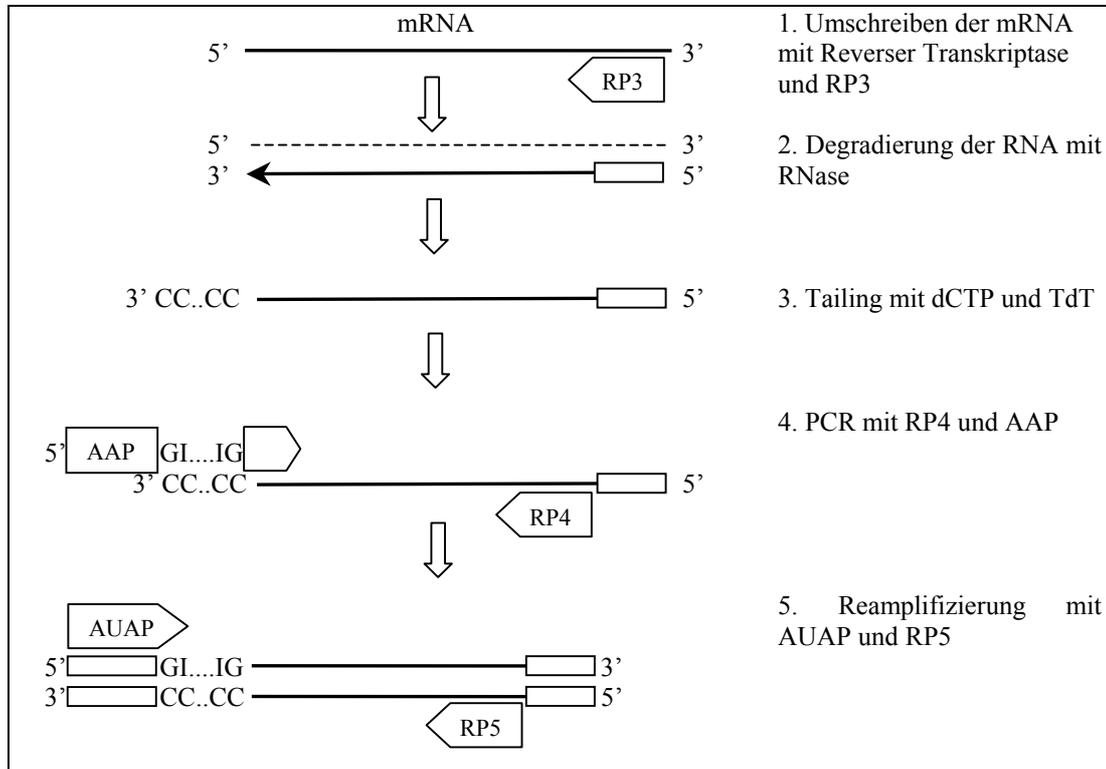


Abb. B-1: Schema zur 5'-RACE. RP3-5: genspezifische Primer für die Isolierung der trI, entsprechen den Primern RP8-10 für put-tr, TdT: Terminale Desoxynucleotid Transferase, AAP: *Abridged Anchor Primer*¹, AUAP: *Abridged Universal Amplification Primer*¹.

Für die 5'-RACE-PCR wurde Gesamt-RNA aus Wurzelkulturen für die Erststrangsynthese verwendet. Es wurden die Primer RP3 (für trI), RP8 (für put-tr) und SuperScript II Reverse Transkriptase (GibcoBRL) benutzt. Die so erhaltene cDNA wurde mit dem Qiaquick PCR Purification Kit gereinigt. Die terminale Desoxynucleotid Transferase (TdT) katalysiert das Einfügen von Desoxynucleosiden an das 3'-OH Ende der cDNA unter folgenden Bedingungen:

DEPC-Wasser	6,5 µl	
5x Tailing Buffer	5,0 µl	
2 mM dCTP	2,5 µl	
gereinigte cDNA	10 µl	3 min 94°C
		auf Eis
TdT	1 U	10 min 37°C
Inaktivierung der TdT		10 min 65°C

Das Anhängen der Cytosinreste ermöglicht die erste PCR mit Primer RP4 bzw. RP9 (10 µM) und dem *Abridged Anchor Primer*¹ (AAP, enthält Poly-G-Rest), 5 µl der cDNA und 2,5 U *Taq*-Polymerase (Peqlab) unter PCR-Standardbedingungen. Es folgt eine sogenannte „nested PCR“

¹ Es wurden die im RACE-PCR Kit von Gibco-BRL verwendeten Primernamen beibehalten. Auf eine Übersetzung wurde verzichtet.

mit den Primern RP5/RP10 (10 μ M) (Tab. B-2) und dem Primer AUAP¹ (10 μ M, *Abridged Universal Amplification Primer*) und 5 μ l der 1:100 verdünnten ersten PCR. Waren danach noch keine distinkten Banden mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar, wurde die „nested PCR“ unter stringenteren Bedingungen durchgeführt.

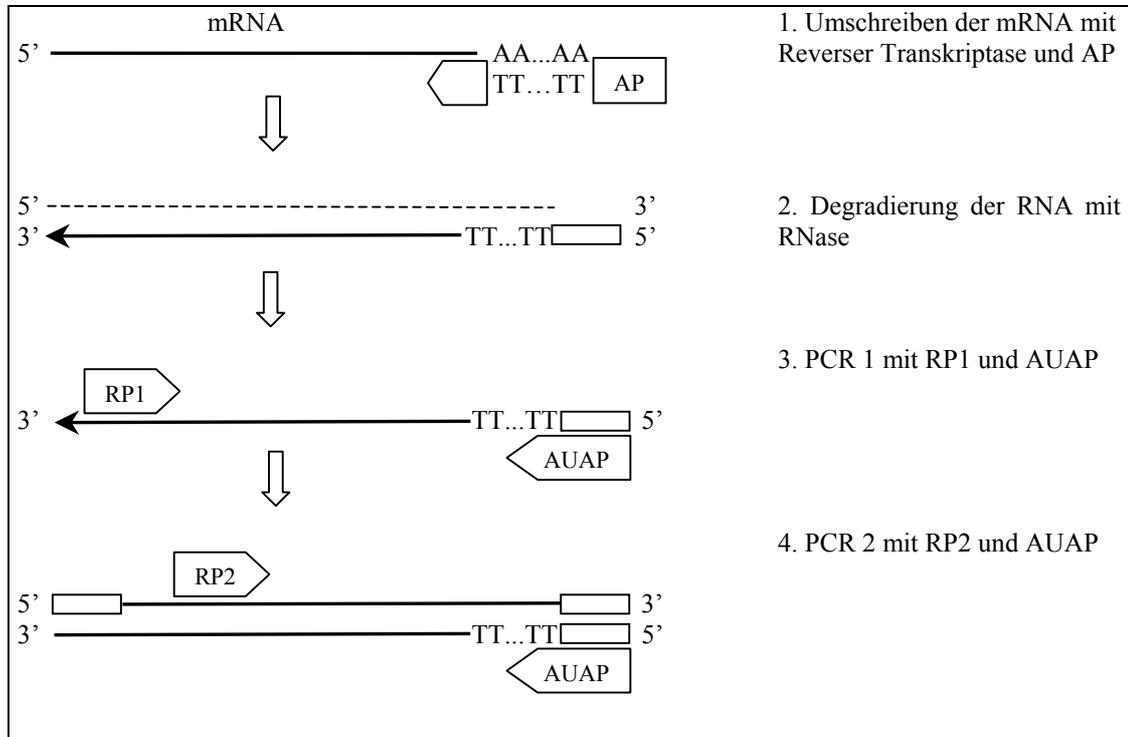


Abb. B-2: Schema zur 3'-RACE. RP1-2: genspezifische Primer für die Isolierung der trI, entsprechen den Primern RP6-7 für put-tr, AP: Adapter Primer (Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer), AUAP: *Abridged Universal Amplification Primer*¹.

Bei der 3'-RACE wurde die cDNA aus Gesamt-RNA von Wurzelkulturen (trI) sowie jungen Blättern (tr) verwendet. Ein Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (AP, Adapter Primer) und SuperScript II Reverse Transkriptase (GibcoBRL) wurden verwendet. Mit 2 μ l dieser cDNA wurde die erste PCR mit den Primern RP1/RP6 (10 μ M) (Tab. B-2) und AUAP (10 μ M) unter PCR-Standardbedingungen mit 2 U *Taq*-Polymerase (Peqlab) durchgeführt. Es folgte eine „nested PCR“ mit den Primern RP2/RP7 (10 μ M) (Tab. B-2) und AUAP (10 μ M) und 2 μ l der vorangegangenen PCR.

Die erhaltenen Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kit eluiert und sequenziert.

B 2.1.4.3 Colony-PCR

Die *Colony*-PCR wurde zur Überprüfung der Transformationseffizienz in *E. coli* angewendet. Dazu wurden Bakterienkolonien von LB-Platten abgenommen und in 20 μ l sterilem Wasser 10 min bei 99°C zerstört, um die Plasmide der PCR zugänglich zu machen. Danach erfolgte eine Standard-PCR mit den entsprechenden Primern des im Plasmid eingefügten Gens. Die PCR wurde mit Agarosegelelektrophorese ausgewertet.

B 2.1.5 Klonierung

Die Standardmethoden der Klonierung, wie Auftrennung von DNA im Agarosegel, Restriktionen von DNA, Ligationen und Plasmidisolierungen erfolgten nach den Methoden von Sambrook und Mitarbeitern [Sambrook et al. 1989]. Für einige dieser Arbeitsschritte standen Kits zur Verfügung, bei denen nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde (siehe B 1.5).

Für die Klonierung in die einzelnen Vektoren (B 1.3) wurde aus cDNA mit den entsprechenden Primern (B 1.4) das Amplifikat des Gens per Standard-PCR gewonnen. Das gereinigte PCR-Produkt wurde durch die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase, einen überhängenden Adenosin-Rest am Amplifikat zu erzeugen, in den Vektor pCR 2.1[®] (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert. Wurde *Pfu*-Polymerase eingesetzt, musste nach Reinigung des PCR-Produktes ein überhängendes Adenosin eingefügt werden, um eine Transformation in den Vektor pCR 2.1[®] zu ermöglichen. Dazu wurde das PCR-Produkt 15 min bei 72°C mit 10 x PCR-Puffer, 50 µM dATP und 2 U *Taq*-Polymerase inkubiert.

Nach Isolation des Plasmids aus den Top10[®]-Zellen erfolgte eine Restriktion über 5-16 h mit anschließender Ligation bei 16°C über Nacht. Nach Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 15 min wurden 2 µl des Ligationsansatzes in XL1-Blue-Zellen transformiert, positive Klone mittels *Colony*-PCR identifiziert (B 2.1.4.3), Plasmide präpariert und in die Expressionszellen (BL21 Codon plus oder SG13009, B 1.2) transformiert. Alle Transformationen erfolgten nach der Hitzeschockmethode von Cohen und Mitarbeitern [Cohen et al. 1972].

Die Klonierung in den Expressionsvektor pPICZAα wurde nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt.

B 2.1.6 Rekombinante Expression in *E.coli*

Die transformierten Bakterien wuchsen in LB-Medium unter Zugabe von 50 µg/ml Carbenicillin bei 37°C in Schüttlern bei 150 rpm bis zu einer optischen Dichte von $A_{600nm}=0,8-1$. Die Induktion der Proteinbiosynthese erfolgte mit 1 mM IPTG bei variablen Temperaturen und Zeiten (C 2.2). Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5000 g, 10 min, 4°C) und wie in Kap. B 2.2.2 beschrieben lysiert.

B 2.1.7 Rekombinante Expression in *Nicotiana benthamiana*

Für die Expression in *N. benthamiana* wurde ein Provektorsystem der Firma Icon Genetics GmbH verwendet. Es wurde ein virales Vektorsystem benutzt, das in einen 5'-Provektor und einen 3'-Provektor geteilt ist, welche über eine Integrase innerhalb der Pflanzenzellen zu einer funktionellen Einheit verbunden werden. Die Expression findet transient statt. Die putCS-tr wurde mit den Restriktasen *Xba*I und *Pst*I (Konstrukt 1 mit 6fach Histidinrest, Konstrukt 2 ohne einen Anhang) in den 3'-Provektor kloniert und über Elektroporation in Agrobakterien eingebracht. Die Elektroporation fand im Biorad Micropulser[®] bei 2 kV, 25 µF und 0,7 Ohm in Küvetten mit einer Wandstärke von 2 mm statt. 20 µl elektrokompenter Zellen wurden mit

10-100 ng DNA versetzt. Die Bakterien des Typs *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV 3101 stellte die Firma Icon Genetics GmbH zur Verfügung. Nach Elektroporation wurden diese mit Rifampicin 50 mg/l, Carbenicillin 50 mg/l und 100 µM Acetosyringon (optional) im LB-Medium bei 28°C 48 h inkubiert. 5 ml dieser Kulturen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4500 g, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 10 mM MES-Puffer aufgenommen.

Die Infiltration der Agrobakterien wurde auf Blättern von *N. benthamiana* vorgenommen, die noch nicht vollständig ausgewachsen waren. Pro Blatt wurden ca. 7 unabhängige Sektoren angeritzt und je 100 µl Bakteriensuspension mit einer Spritze infiltriert. Als Kontrolle wurden Blätter mit dem Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) ebenso behandelt. Nach Infiltration verblieben die Pflanzen im Gewächshaus (22°C, Lichtexpression 16 h), bis nach 8-12 Tagen die Kontrollpflanzen eine starke GFP-Expression im infiltrierten Gewebe aufwiesen. Dies wurde unter UV-Licht (UVP Upland black Raye Modell B) überprüft. Nach erkennbarer Expression wurden die infiltrierten Blätter geerntet und einer Proteinextraktion (B 2.2.7) oder *in-vivo* Tropinonumsetzung für 48 h (B 2.3.5) unterzogen.

B 2.1.8 Rekombinante Expression in *Pichia pastoris*

Die Expression der TR in *Pichia pastoris* erfolgte mit Hilfe des EasySelect® *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Dazu musste der Vektor zunächst linearisiert werden. Dies erfolgte durch Restriktion mit dem Enzym *SacI*. Die vollständige Linearisierung wurde mit einem Aliquot der Restriktion durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Der Restriktionsansatz wurde gefällt und für die Transformation in die beiden *Pichia pastoris* Stämme KM71H und GS115 verwendet. Beide Stämme können Methanol als einzige Kohlenstoffquelle katabolisieren, da *Pichia pastoris* eine methylotrophe Hefe ist. Sie unterscheiden sich in ihrem Phänotyp durch ein schnelles bzw. langsames Wachstum auf Methanol-Medium. Es wird empfohlen, beide Stämme zu transformieren, da die Transformationseffizienz sehr schwankend ist und von Gen zu Gen unterschiedlich sein kann.

Die transformierten Klone wuchsen für 4 Tage bei 30°C auf YPDS-Platten.

Im Anschluss wuchsen die Flüssigkulturen in 25 ml MMDH-Medium für 48 h. Die Hefe-DNA wurde daraus isoliert. Die Zellen wurden dazu per Zentrifugation (5 min, 5000 g, 4°C) pelletiert, in 500 µl Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Breaking Buffer resuspendiert und durchmischt (Vortex Genie 2). Zum Zerstören der Zellwände wurden etwa 0,3 g Quarzsand zugegeben und 3 min unter Zugabe von Phenol/Chloroform/-Isoamylalkohol (25:24:1) kräftig geschüttelt. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer wurde erneut geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 14000 g, 4°C). Die Nukleinsäuren im Überstand wurden mit 1 ml 96%igem EtOH gefällt und abzentrifugiert (5 min, 14000 g, 4°C). Das Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und mitisolierte RNA durch Zusatz von 3 µl DNase freier RNase A (1 mg/ml) 5 min bei 37°C zerstört. 10 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 wurden zugegeben, die DNA mit 1,2 ml 96%igem EtOH über 2 h gefällt und zentrifugiert (5 min, 14000 g, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und mit PCR analysiert.

Der Einbau des Gens wurde mit PCR und genspezifischen Primern überprüft. Positive Klone wuchsen zur Überexpression auf MGYH-Medien bis zu einer optischen Dichte von $A_{600nm}=2-4$ (30°C, 250 rpm). Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 g, 5 min, RT) und in BMMH-Medium, das 0,5% Methanol enthält, aufgenommen. Alle 24 h wurde erneut 0,5% Methanol zugegeben und je 1 ml zur Überprüfung der Überexpression mit SDS-PAGE (B 2.2.3) abgenommen. Die Überexpression erfolgte über 4 Tage.

Die Medien YPDS, MMDH, MGYH und BMMH wurden nach Angaben von Invitrogen hergestellt.

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

B 2.1.9 Northern Blot

Der Northern Blot dient dem Nachweis der Transkriptmenge eines Gens. In diesem Fall sollte die Transkriptmenge der trI in den einzelnen Pflanzengeweben untersucht werden.

Gesamt-RNA wurde isoliert (B 2.1.2) und in einem 1,2%igen denaturierenden Agarosegel bei 100 V aufgetrennt. Der verwendete Laufpuffer war 1 x MOPS [Sambrook et al. 1989]. Dazu wurden 20 µg RNA mit 3 Vol Probenpuffer und 0,1 Vol Stopppuffer 15 min bei 65°C erhitzt, um die RNA-Stränge zu denaturieren und anschließend 5 µl Ethidiumbromidlösung 0,1 mg/ml zugesetzt.

Das Gel wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA 10 min in 20 x SSC geschwenkt und über Nacht durch Kapillarwirkung auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond® N+, Amersham-Pharmacia) geblottet. Die RNA wurde durch UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker, Stratagene).

Als Sonden wurden zum einen die gesamte kodierende Sequenz der trI, zum anderen die 411 bp des 5'-Endes verwendet. Innerhalb der ersten 500 bp unterscheiden sich die beiden tr-Sequenzen am deutlichsten. Die gesamte kodierende Sequenz wurde durch PCR mit den Primern pET21-TRI-dir und pET21-TRI-rev und 10 ng des Plasmids TRI-pET21d als Template erhalten. Die kürzere Sonde wurde durch Restriktion des Plasmids TRI-pET21d mit den Restriktasen *NcoI* und *HindIII* erhalten. Die *NcoI*-Schnittstelle ist die Klonierungsstelle am 5'-Ende des Gens, die *HindIII*-Schnittstelle befindet sich nach 411 bp im Gen. Die Sonden wurden mit der *random primed* Methode nach Feinberg und Vogelstein mit 50 µCi α -[³²P]-dATP (High Prime DNA Labeling Kit, Roche) markiert [Feinberg et al. 1983]. Ungebundene Nukleotide wurden mit dem Qiaquick Nucleotid Removal Kit (Qiagen) entfernt.

Nach einer Vorhybridisierung über 4 h bei 42°C im Hybridisierungspuffer wurde die Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 16-18 h. Analog wurde mit der 18S rRNA-Sonde (aus *Lycopersicon esculentum*, [Dobrowolski 1987]) verfahren.

Nach abgeschlossener Hybridisierung und Entfernung der Hybridisierungslösung wurde die nicht gebundene Sonde mit verschiedenen SSC-Lösungen bei folgend angegebenem Temperaturschema entfernt.

2 x SSC + 0,1% (w/v) SDS	RT	1 min
1 x SSC + 0,1% (w/v) SDS	58°C	30 min
0,2 x SSC + 0,1% (w/v) SDS	58°C	30 min
0,1 x SSC + 0,1% (w/v) SDS	60°C	15 min

Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt und auf eine Phosphorimagerplatte (Fuji) oder Röntgenfilm X-Oma t[®] Blue XB-1 (Kodak, NEN) für mind. 20 h exponiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Phosphorimager (Fuji, BAS 1500).

Durch Behandlung mit kochender 0,1%iger SDS-Lösung für 30 min wurde die gebundene Sonde abgelöst, und die Membran stand für weitere Hybridisierungen zur Verfügung.

Hybridisierungspuffer:	50% (w/v) deionisiertes Formamid	50x Denhardt:	2% Ficoll
	5 x SSC		1% PVP
	5 x Denhardt		1% BSA
	1% (w/v) SDS		
	10% (w/v) Dextransulfat		
	50 µg/ml Heringssperma-DNA (denaturiert)		

B 2.1.10 Southern Blot

Der Southern Blot dient der Untersuchung der Anzahl von Kopien eines Gens im Genom [Southern 1975].

Je 30 µg genomische Wurzel-DNA (B 2.1.1) wurde einem Verdau mit den Restriktasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV oder *Kpn*I über Nacht bei 37°C unterzogen. Die DNA wurde gefällt und mit 0,1 Vol Ladebuffer (0,2 M EDTA pH 7,5; 50 % Glycerol; 0,2 % Bromphenolblau) versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 0,8%igen (w/v) Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid für 3-4 h bei einer Spannung von 100 V in TAE-Puffer (0,04 M Tris/HCl, 0,02 M Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,5). Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 2 x 15 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl) geschwenkt. Dann wurde die DNA über Nacht durch Kapillarwirkung auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond[®] N+, Amersham-Pharmacia) geblottet. Die DNA wurde durch UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker, Stratagene).

Als Sonden wurden die beiden unter B 2.1.9 beschriebenen Sonden der trI verwendet. Die Markierung der Sonden, die Hybridisierung und Auswertung erfolgten analog dem Northern Blot (B 2.1.9).

B 2.1.11 Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten nach den Methoden von Chen und Seeburg sowie Sanger und Mitarbeitern [Chen et al. 1985; Sanger et al. 1977]. Das A.L.F.-Sequenziergerät (Amersham-

Pharmacia) und der „ABI Prism 377DNA Sequencer“ (Perkin Elmer) wurden dazu benutzt. Für die A.L.F.-Sequenzierungen wurden Cy5-markierte Primer verwendet. Alle Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Dr. A. Peterson (Biozentrum, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software OMIGA 1.2 (Oxford Molecular Ltd.). Weitere Datenbankrecherchen und Auswertungen erfolgten mit Software, die vom *National Centre for Biotechnological Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) angeboten wird.

B 2.2 Biochemische Methoden

B 2.2.1 Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte spektrophotometrisch nach der Methode von Bradford mit dem Zweistrahlphotometer UV 160A (Shimadzu) [Bradford 1976]. Zur Ermittlung der Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin als Referenzprotein benutzt. Die Eichgerade ermöglichte eine Bestimmung im Bereich von 40-160 µg/ml Protein.

B 2.2.2 Bakterienlyse

Zur Reinigung und Charakterisierung der überexprimierten Proteine mussten diese aus den Bakterien aufgeschlossen werden.

Die zuvor zur Überexpression induzierten *E. coli*-Zellen (B 2.1.6) wurden abzentrifugiert (5000 g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde im Fall der TRI in Lysis-Puffer A (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Imidazol, pH 7,0), im Fall der TR in Lysis-Puffer B (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 3 mM DTT) unter Zugabe von 0,1% Triton X-100, und 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Potter-Homogenisator (Euro-ST D, IKA Labortechnik Staufen) bei 2000 rpm für 5 x 2 min mit 1 min Kühlung auf Eis. Nach Zentrifugation (14000 g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand zur Proteinquantifizierung, zum Enzymassay oder der nachfolgenden Proteinreinigung verwendet. Der Zusatz von 0,1 mM NADPH zur Proteinlösung erhöhte die Stabilität der Tropinon-reduktasen. Das verbliebene Pellet wurde im jeweiligen Lysis-Puffer (A oder B) resuspendiert und zur Untersuchung auf unlösliche Proteine für SDS-PAGE verwendet.

B 2.2.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur Detektion von überexprimiertem Protein sowie zur Überprüfung der einzelnen Proteinreinigungsschritte wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet [Laemmli 1970]. Die Proben wurden mit Probenpuffer (0,625 M Tris-HCl pH 6,8, 10% Glycerol, 2% (m/v) SDS, 4% α-Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proteinproben wurden im 5%igem Sammelgel bei einer Spannung von 100 V konzentriert und in einem 12,5%igem Trenngel bei

140 V in der Minikammer „PHERO-minivert“ (Biotech-Fischer) aufgetrennt. Als Größenstandard diente die Protein Standard Mixtur IV (Merck). Die Proteinbanden wurden entweder durch Schwenken in Coomassie-Färbelösung mit anschließender Entfärbung des Hintergrundes oder nach der Silber-Methode [Heukeshoven et al. 1985] angefärbt.

Coomassie-Färbung: Die Proteingele wurden für 20 min in der Fixierlösung (50% (v/v) MeOH, 12% (v/v) Essigsäure, 0,02% (v/v) Formaldehyd) zur Fixierung der Proteine inkubiert. Dann erfolgte die Färbung mit Coomassie-Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R250, 42,5% (v/v) EtOH, 10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) MeOH) für 30 min. Mit einer Lösung aus 25% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure wurde der Hintergrund so lange entfärbt, bis die aufgetrennten Proteine gut sichtbar waren.

Silber-Färbung: Die auf dem Gel aufgetrennten Proteine wurden für 1 h in der Fixierlösung (50% (v/v) MeOH, 12% (v/v) Essigsäure, 0,02% (v/v) Formaldehyd) fixiert. Nach einem 3 x 20 minütigem Waschen mit 50% (v/v) Ethanol wurde das Gel für 1 min mit 0,02% (m/v) Natriumthiosulfat behandelt. Es folgte ein dreimaliges, kurzes Waschen mit dest. Wasser. Das Gel wurde für 20 min mit (0,2% (m/v) Silbernitrat, 0,025% (v/v) Formaldehyd) imprägniert und anschließend erneut 3 x mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit (6% (m/v) Natriumcarbonat, 0,5% (m/v) Natriumthiosulfat, 0,02% (v/v) Formaldehyd), bis die Proteine sichtbar wurden. Dieser Vorgang wurde mit (50% (v/v) MeOH, 12% (v/v) Essigsäure) abgestoppt.

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

B 2.2.4 Enzymassay zur Bestimmung der Tropinonreduktaseaktivität

Die Umsetzung des Tropinons zu den Tropanolen Tropin und Pseudotropin erfolgt unter NADPH-Verbrauch [Draeger et al. 1988; Koelen et al. 1982]. Dieser kann photometrisch in einem Zweistrahlphotometer UV 160A (Shimadzu) bei 340 nm verfolgt werden. Gewöhnlich wurden die Messungen über 6 min bei 30°C durchgeführt. Für den Standardassay wurden 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,4, 0,2 mM NADPH, 5 mM Tropinon und je nach Aktivität 50-400 µl Proteinlösung verwendet. Die Referenzküvette enthielt außer Tropinon die gleiche Zusammensetzung, um den unspezifischen NADPH-Verbrauch zu erfassen. Die Aktivitätsberechnung erfolgte unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH mit $6,18 \times 10^2$ ($l \times mol^{-1} \times mm^{-1}$) bei 340 nm und 30 °C [Bergmeyer 1985].

Zur Überprüfung der Umsetzungsprodukte der TR mit Tropinon wurde der Assay über 1 h bei 30°C in einem Volumen von 1 ml mit einem NADPH regenerierenden System durchgeführt. Dazu wurden 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,4, 1 mM Glucose-6-phosphat, 0,5 mM NADP, 0,4 U Glucose-6-phosphatdehydrogenase, 50-400 µl Proteinlösung und 2,5 mM Tropinon inkubiert. Der Assay wurde durch Zugabe von 100 µl konzentriertem Ammoniak abgestoppt

und über Extrelutsäulen (Merck) gereinigt (siehe B 2.3.2). Die Analyse der Produkte erfolgte per DC (B 2.3.9.1) und GC (B 2.3.7).

Der Enzymassay zur Oxidation von Tropin enthielt entweder 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5-7,5) oder 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0-10,0), 5 mM Tropin, 0,2 mM NADP und 50-400 µl Proteinlösung und wurde bei 340 nm und 30°C im Zweistrahlphotometer UV 160A (Shimadzu) vermessen. Zum Nachweis des entstandenen Tropinons wurde ein Assay mit 2 mM NADP über 1 h bei 30°C inkubiert und analog zur Reduktion analysiert.

B 2.2.5 Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten TRI als 6xHis-Fusionsprotein

B 2.2.5.1 Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Die rekombinante TRI enthielt durch die Klonierung in den pET21d-Vektor einen 6fach Histidinrest am C-Terminus. Diese Histidingruppen ermöglichen die Chelatkomplexbildung mit zweiwertigen Metallionen, was als Grundlage für die Reinigung des rekombinanten Proteins genutzt wurde. Es wurden HiTrap Chelating Sepharose-Säulen mit 5 ml Säulenvolumen (Amersham-Pharmacia) verwendet. Die Säule wurde mit Nickelsulfat vor jeder Reinigung beladen und anschließend mit 50 ml Lysis-Puffer A (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Imidazol, pH 7,0) mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/h equilibriert.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt, um die Stabilität des Proteins zu gewährleisten. Aus 250 ml Bakterienkultur (B 2.1.6) wurden 5 ml Proteinlösung nach Bakterienlyse (B 2.2.2) erhalten. Die nach der Aufarbeitung oft sehr viskosen Proben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit Lysis-Puffer A verdünnt. Für die Aufgabe der Proben wurde die Fließgeschwindigkeit auf 30 ml/h zurückgesetzt, um die Bindungskapazität der Säule möglichst vollständig auszunutzen. Anschließend wurde mit 30 ml Waschpuffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, pH 7,0) gewaschen. Danach erfolgte die Elution (Elutionspuffer: 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM Imidazol, pH 7,0) des Fusionsproteins in einem Imidazol-Gradienten (20-250 mM). Anschließend erfolgte eine Elution mit 30 ml reinem Elutionspuffer. Sämtliche Eluate wurden in Fraktionen zu je 3 ml gesammelt, in welche je 1 ml Aufbewahrungspuffer (10 mM Kaliumphosphatpuffer, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 15% Glycerol, pH 7,0) vorgelegt wurde, um die Salzkonzentration zu verdünnen und damit das Protein zu stabilisieren.

Die Fraktionen wurden im Enzymassay (B 2.2.4) als auch mit SDS-PAGE (B 2.2.3) überprüft.

B 2.2.5.2 Konzentrierung des Proteins

Die aktiven, gereinigten Fraktionen (B 2.2.5.1) wurden vereinigt und mit Hilfe von Membranfiltern (Macrosep[®], PALL) durch Zentrifugation (5000 g, 20-40 min, 4°C) eingeeengt. Die Membranfilter wiesen eine Durchlässigkeit von 10 kDa auf, so dass Salze und H₂O entfernt wurden. Um eine Adsorption der Proteine an die Membran zu verhindern, wurde diese zuvor für

1 h mit 5% SDS (in Aqua dest.) abgesättigt. Es wurden die Enzymaktivität (B 2.2.4) und der Proteingehalt (B 2.2.1) bestimmt.

Die Membranfilter wurden mit 15 ml 0,5 M NaOH reaktiviert, mit 2 x 15 ml H₂O gewaschen und konnten danach wiederverwendet werden.

B 2.2.5.3 Bestimmung des pH-Optimums

Die eingeeingte Proteinlösung (B 2.2.5.2) wurde für die Bestimmung des pH-Optimums der Enzyme verwendet. Der Standardassay (B 2.2.4) wurde mit 0,1 M Glycinpuffer für pH 3,5-5,0, 0,1 M Kaliumphosphatpuffer im Bereich von pH 5,5-8,0 und 0,1 M Tris-HCl-Puffer für pH 8,0-9,0 benutzt. Das pH-Optimum für die Oxidation von Tropin zu Tropinon wurde in einem Bereich von pH 6,5-10 bestimmt. Dabei wurden ein 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5-7,5) und ein 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8-10) verwendet. Für alle Messungen wurden 3fach Bestimmungen aus einer Proteinlösung durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet.

B 2.2.5.4 K_m - und V_{max} -Bestimmung

Für die K_m - und V_{max} -Bestimmung der TRI mit Tropinon wurde das Substrat in einer Konzentration von 0,1-10 mM eingesetzt. Geringere Konzentrationen führten zu keinem messbaren Umsatz. Für die Messungen wurde der photometrische Standardassay (B 2.2.4) verwendet. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 6,4 durchgeführt, um die erhaltenen Werte mit den bekannten Werten der TRI der Solanaceen vergleichen zu können.

Die Konzentration bei der K_m - und V_{max} -Bestimmung für Tropinon für die TRII betrug 0,005-0,25 mM. Es wurde der Standardassay (B 2.2.4) bei einem pH-Wert von 5,5 verwendet, bei welchem das pH-Optimum (C 2.4) lag.

Für alle Messungen wurden 3fach Bestimmungen aus einer Proteinlösung durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet. Die Auswertung der Messwerte erfolgte nach den Methoden von Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk [Lineweaver et al. 1934; Michaelis et al. 1913].

B 2.2.5.5 Umsetzung von Substratanaloga

Die Umsetzung mit Substratanaloga erfolgte gemäß dem Standardassay (B 2.2.4). Die Substrate (Abb. B-3) wurden in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Für alle Messungen wurden 3fach Bestimmungen aus einer Proteinlösung durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet.

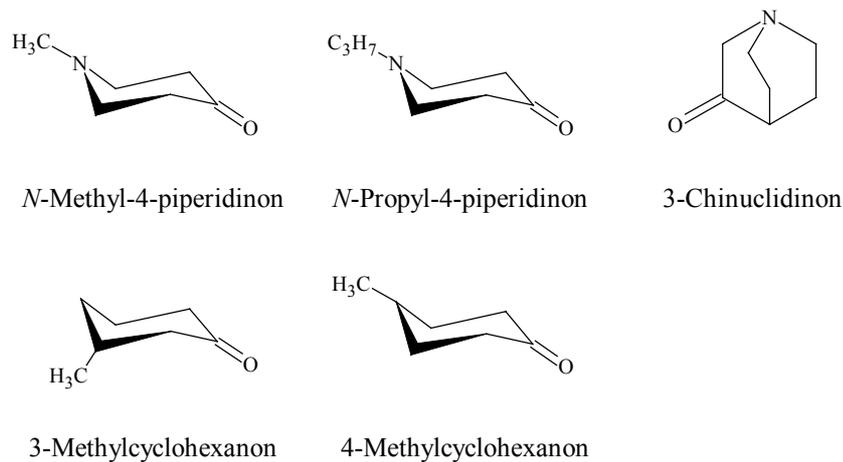


Abb. B-3: Verwendete Substrate im Standardassay zur Charakterisierung der TRI und TRII

B 2.2.6 Partielle Reinigung und Charakterisierung der nativen TRII

Die Wurzelkulturen wurden unter Stickstoff mit 0,2 g/g Frischmasse (FM) Polyvinylpyrrolidon (PVP) gemörsert und mit 2 ml/g FM 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 5 mM DTT und 0,1 g/g FM Ascorbat extrahiert. Nach Zentrifugation (20 min, 12000 g, 4°C) wurde der Überstand auf trockenes Sephadex G-50 (10 ml/g, Amersham-Pharmacia) zum Aufkonzentrieren gegeben. Nach einer Quellung von 1 h wurde die Gelsuspension zentrifugiert (30 min, 3000 g, 4°C). Die Proteine im Überstand wurden mit PEG 6000 fraktioniert gefällt. Die Fraktionen von 10-100% (w/v) zeigten Tropinonreduktaseaktivität und wurden über HR 10/10-Säulen (Amersham-Pharmacia) entsalzt. Elution erfolgte mit dem Puffer E mit niedriger Ionenstärke (20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 25% Glycerol, 0,2 M Saccharose, 1 mM DTT). Es folgte eine Reinigung über den Anionenaustauscher Q-Sepharose (Q = quartäre Ammoniumgruppen, Amersham-Pharmacia). Die Säulendimension betrug 10 x 100 mm, und es wurde mit Puffer E pH 7,1 equilibriert. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde mit ca. 50 ml Puffer E gewaschen und mit einem Gradienten von 0 bis 0,25 M NaCl eluiert (insgesamt 80 ml). In den Fraktionen wurde die Enzymaktivität bestimmt (B 2.2.4). Die vereinten, aktiven Fraktionen wurden 2fach mit Puffer E verdünnt und auf eine 10 x 100 mm SP Sepharose Säule (SP = Sulfopropylgruppen, Kationenaustauscher, Amersham-Pharmacia) gegeben, die mit Puffer E pH 5,5 equilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer E pH 5,5 gewaschen (Flussrate 1 ml/min). Die Waschfraktionen enthielten die TRII. Der pH-Wert der vereinten, aktiven Fraktionen wurde mit KOH auf pH 7,1 eingestellt, erneut auf die Q Sepharose Säule aufgegeben und mit einem NaCl-Gradienten im Bereich von 0,1-0,3 M eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereint und zur Charakterisierung der TRII verwendet.

Nach jedem Reinigungsschritt erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung (B 2.2.1) sowie der Nachweis der TRII-Aktivität mit dem Standardassay (B 2.2.4).

Für die Charakterisierung des Enzyms wurde das pH-Optimum (B 2.2.5.3) und die Umsetzung von Substratanaloga (B 2.2.5.5) untersucht. K_m - und V_{max} -Werte wurden am pH-Optimum bestimmt (B 2.2.5.4).

B 2.2.7 Proteinextraktion aus Blättern von *Nicotiana benthamiana*

Mit putCS-tr infiltrierte Tabakblätter und nicht infiltrierte Kontrollblätter der gleichen Pflanze wurden nach Überprüfen der GFP-Expression der parallelen Positivkontrolle geerntet (B 2.1.7). Ca. 2 g Blattmasse wurden unter Stickstoff und Zugabe von 0,4 g 20% PVP-Suspension (in Extraktionspuffer) gemörsert. Die Extraktion der Proteine erfolgte mit 6 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 (0,25 M Saccharose, 3 mM DTT, 1 mM EDTA) und 1 ml 20% (*m/v*) Ascorbatlösung pH 7,8. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die extrahierten Proteine wurden durch Zentrifugation (20 min, 12000 g, 4°C) abgetrennt und einer 40%igen Ammoniumsulfatfällung über 15 min unterzogen. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 12000 g, 4°C) wurden die im Überstand befindlichen Proteine mit 80% Ammoniumsulfat präzipitiert und erneut 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 (25% Glycerol, 0,2 M Saccharose, 1 mM DTT) aufgenommen. Mit 400 µl wurde der Standardassay für 1 h durchgeführt, 100 µl dienten der sofortigen photometrischen Aktivitätsmessung (B 2.2.4).

B 2.3 Analytische Methoden

B 2.3.1 Extraktion und Derivatisierung von Calysteginen

1 g Frischmasse des jeweiligen Pflanzengewebes wurde mit 2 x 10 ml 50% (*v/v*) MeOH und einem Ultra Turrax extrahiert. Die Zellreste wurden abzentrifugiert (10 min, 4500 g, 4°C) und erneut extrahiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die vereinten Überstände bis auf ein Volumen von ca. 3 ml bei 50°C im Vakuum eingeeengt und mit einem stark sauren Kationenaustauscher (Ionenaustauscher I LAB Merck, Säule: 10 x 100 mM, ca. 5 ml Austauschergel) gereinigt. Dazu wurde nach der Aufgabe der wässrigen Lösung die Säule so lange mit Wasser gewaschen, bis sie neutral reagierte. Die Elution erfolgte mit dem 2fachen Säulenvolumen mit 2 N NH₃. Es wurde mit Wasser nachgewaschen. Die vereinten Fraktionen der Elution und nachfolgender Waschschriffe wurden bis zu einem Volumen <1 ml bei 50°C im Vakuum eingeeengt und auf 1 g FM/ml mit Wasser aufgenommen.

Für die gaschromatographische Analyse müssen die Calystegine derivatisiert werden. Dies erfolgte unter milden Bedingungen nach Gefriertrocknung, wobei nur die Hydroxylgruppen der Calystegine mit Trimethylsilylgruppen derivatisiert wurden [Fleet et al. 1990]. Zum Lyophilisat wurden 50 µl n-Hexan, 40 µl Hexamethyldisiloxan (HMDS), 10 µl Trimethylchlorsiloxan (TMCS) gegeben, 15 min bei 70°C inkubiert und im Ultraschallbad homogenisiert. Als interner Standard wurden 50 µl Azobenzol (1 mg/ml in n-Hexan) dazugegeben und ad 500 µl mit n-Hexan aufgefüllt.

B 2.3.2 Extraktion von Intermediaten der Calysteginbiosynthese

1 g Frischmasse des jeweiligen Pflanzengewebes wurde mit 2 x 10 ml 50% (*v/v*) MeOH und einem Ultra Turrax extrahiert. Die Zellreste werden abzentrifugiert (10 min, 4500 g, 4°C) und

erneut extrahiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die vereinten Überstände bei 50°C im Vakuum bis auf ein Volumen von 1 ml eingengt und mit 50 µl konzentriertem NH₃ alkalisiert. Die Reinigung erfolgte über Extrelut® (Merck). Für 1 ml Probenvolumen wurden Säulen (30 mm x 8 mm) mit 1 g Extrelut® befüllt. Nach dem Aufgeben des Pflanzenextraktes oder dem inkubierten Enzymassay (welcher ebenso mit 50 µl konzentriertem NH₃ auf 1 ml alkalisiert wurde) auf die Säule verblieben diese 20 min im Säulenmaterial zur besseren Absorption von Wasser und darin gelöster Bestandteile und wurden dann mit 2 x 4 ml CHCl₃ und 1 x 4 ml CHCl₃/MeOH (9:1) eluiert. Die vereinten Eluate wurden bei 30°C im Vakuum zur Trockne eingedampft und mit 100-200 µl Ethylacetat aufgenommen. Diese Extrakte konnten dann per GC (B 2.3.7) oder DC (B 2.3.9) analysiert werden.

B 2.3.3 ³H-Pseudotropin

B 2.3.3.1 Markierung von ³H-Pseudotropin

Die Markierung von Pseudotropin mit Tritium in Position 3 erfolgte über die enzymatische Reduktion des Tropinons katalysiert durch die rekombinante TRII aus *S. tuberosum* und NADP³H als Cosubstrat. Die Markierung des NADP³H wurde durch Dehydrogenierung von Glucose-6-phosphat, katalysiert durch die Glucose-6-phosphatdehydrogenase, eingebracht. Die ³H-Glucose wurde zuvor mit Hexokinase und ATP phosphoryliert (siehe Abb. C-22A). Diese 3 enzymatischen Schritte liefen parallel bei einem pH-Wert von 7,0 in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer 1 h bei 30°C ab.

Die Zusammensetzung betrug:

³ H-Glucose	30*10 ⁶ cpm
ATP	5 mM
Hexokinase	25 U
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	2 U
NADP	5 mM
Tropinon	2 mM
ST-TRII	150 µg (=3,5kat)
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	0,1 M
Gesamtvolumen	320 µl

In Vorversuchen mit nicht markierter Glucose wurden die einzelnen Schritte analysiert. Die ST-TRII wurde wie bei Keiner und Mitarbeiter beschrieben überexprimiert und extrahiert [Keiner et al. 2002]. Der Waschschrift mit STE-Puffer der geernteten Bakterien wurde 2 x wiederholt, um anhaftendes LB-Medium, in welchem sich störende Glucose befinden würde, zu entfernen. Die rekombinante TRII wurde mit einer 40-75%igen Ammoniumsulfatfällung abgetrennt und als Proteingemisch ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

Die gesamte Enzymmischung wurde auf DC über eine Breite von 4 cm aufgetragen und im Laufmittel CHCl₃-MeOH-NH₃ (22:4,5:0,5) 2 x über eine Höhe von 8 cm entwickelt. In diesem Laufmittel verblieb Glucose am Startpunkt. Pseudotropin wies einen R_F-Wert von 0,2 auf. Parallel dazu wurde 1 µl des Gesamtgemisches neben unmarkiertem Pseudotropin entwickelt. Die DC wurde geteilt und auf der Seite mit dem unmarkierten Pseudotropin mit Dragendorffs

Reagenz nachgewiesen (B 2.3.9.3), um so die momentane Laufhöhe des Pseudotropins zu ermitteln. Markiertes Pseudotropin wurde auf der gleichen Höhe wie unmarkiertes Pseudotropin ausgekratzt, in 1 ml Scintillationsflüssigkeit (Aquasafe 300 Plus, Zinsser Analytik) gelöst und im Scintillator LS 6500 (Beckman) vermessen.

B 2.3.3.2 Applikation von ³H-Pseudotropin an die Wurzelkulturen

Die entwickelte DC-Platte mit dem getrennten Gesamtzymgemisch (B 2.3.3.1) wurde in gleiche Stücke zerschnitten und das Kieselgel in Höhe des Pseudotropins direkt in die Kolben der Wurzelkulturen abgekratzt. Die gute Löslichkeit des Pseudotropins aus dem Kieselgel in das Nährmedium wurde durch quantitative Voruntersuchungen mit unmarkiertem Pseudotropin überprüft. Die Wurzelkulturen wuchsen in 40 ml B5-Medium [Gamborg et al. 1968] mit 0,5 mg/l Ampicillinzusatz in 100 ml Erlmeyerkolben für 20 Tage. Vor Zugabe des ³H-Pseudotropins wurden 20 ml Medium entfernt, um eine höhere Konzentration im Medium zu erreichen. Zusätzlich zum markierten wurde unmarkiertes Pseudotropin in einer Endkonzentration von 25 µM zugegeben. Die Ernte erfolgte nach 12, 24, 48 und 72 h. Der Gesamtversuch einschließlich der Markierung von Pseudotropin und Applikation an die Wurzeln wurde 3 mal durchgeführt.

B 2.3.4 Extraktion und Analytik von Tritium-markierten Wurzelkulturen

Die geernteten Wurzeln (durchschnittlich 1 g Frischmasse) wurden unter Stickstoff gemörsert und mit 20 ml/g FM 50%igem (v/v) MeOH extrahiert. Die Zellbestandteile wurden durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wurde bei 50°C im Vakuum bis zu einem Volumen von ca. 200 µl eingengt. 2 µl des Extraktes wurden in 1 ml Scintillationslösung (Aquasafe 300 Plus, Zinsser Analytik) im Scintillator LS 6500 (Beckman) vermessen.

20-50 µl des Extraktes sowie die Standards Calystegin A₃, B₁, B₂, Pseudotropin und Nortropin wurden auf Dünnschichtplatten 60 (Schichtdicke 250 µm, 100 x 200 mm Glas, Merck) mit dem Linomat IV (Camag) aufgetragen und mit der Methode A (siehe B 2.3.9.2) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit dem Linear Analyzer LB284 (Tracemaster 20, Berthold) zur Messung ionisierender Strahlung unter Verwendung von Argongas. Des weiteren wurden die DC-Platten entweder mit den unter B 2.3.9.3 aufgeführten Detektionsmethoden angefärbt oder mit Enhance Spray NEF-970G (NEN) besprüht und mehrere Monate bei -80°C exponiert.

B 2.3.5 Fütterungsversuche

Für die Fütterung von Metaboliten zur Untersuchung der Calysteginbiosynthese wurden Wurzelkulturen und Pflanzenteile (junge Sprossspitzen = junge Blätter, alte Blätter, Sprossachse) verwendet. Für die Fütterung zum Nachweis der Überexpression der TR in *Nicotiana benthamiana* (B 2.1.7) wurden infiltrierte Blätter der Tabakpflanze benutzt.

Die Zugabe der Metabolite erfolgte stets in gepufferter Lösung pH 7,0. Alle Lösungen wurden vor Zugabe an Wurzelkulturen sterilfiltriert (Ausnahme ³H-Pseudotropin B 2.3.3.2). Die

Konzentrationen bei Tropinonfütterung betrug 1 und 5 mM (C 4.1), bei Pseudotropin und Tropin 1 mM (C 4.3.3, C 1.5) und bei ¹⁵N-Tropinon 0,5 mM (C 3.2).

Bei der Fütterung von Metaboliten an Pflanzenteile wurden diese in die entsprechende abgepufferte 1 mM Lösung gestellt. Die Inkubationen erfolgten über 24 und 48 h. Kontrollen wurden in 1 mM NaCl-Lösung gestellt. Danach erfolgte die Extraktion der zu untersuchenden Alkaloide (B 2.3.1, B 2.3.2) und Analyse per GC (B 2.3.7) oder DC (B 2.3.9).

B 2.3.6 Hemm- und Induktionsversuche an der Wurzelkultur

Als Hemmstoffe und Induktoren wurden Miconazol, Bifonazol, Tetcyclacis und Phenobarbital-Na eingesetzt. Die Konzentration betrug bei Tetcyclacis 0,1 mM, bei allen anderen je 1 mM. Bifonazol wurde in DMSO gelöst, Miconazol und Tetcyclacis in Methanol. Die Endkonzentration betrug 1,4% (v/v) Lösungsmittel pro Wurzelkulturmedium, bei Tetcyclacis (=MeOH) 0,7% (v/v). Phenobarbital-Na wurde in Wasser gelöst, sterilfiltriert und an die Wurzelkulturen appliziert. Entsprechenden Kontrollwurzeln wurde die gleiche Menge an Lösungsmitteln zugesetzt.

Die Hemmung bzw. Induktion erfolgte an 14 Tage alten Kulturen über 6 Tage, geerntet wurde nach 2, 4 und 6 Tagen. Die Wurzeln wurden auf akkumulierende Calystegine (B 2.3.1) und Metabolite (B 2.3.2) gaschromatographisch untersucht (B 2.3.7).

B 2.3.7 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie wurde zur standardmäßigen Quantifizierung der Calystegine und der Intermediate Tropinon, Tropin, Pseudotropin und Norpseudotropin verwendet. Die Calystegine wurden als TMSi-Derivate (B 2.3.1), die Intermediate direkt vermessen.

Die Identifizierung der Peaks erfolgte im Vergleich zu den Retentionszeiten von Referenzsubstanzen. Neben der simultanen Detektion per FID und PND stellte das Peakverhältnis der beiden Detektoren eine weitere Absicherung dar. Zur Quantifizierung wurden nur die Signale des FID genutzt. Mit Hilfe der Eichkurve von Nortropin erfolgte die Quantifizierung von Norpseudotropin, da dieses als Referenz nicht zur Verfügung stand.

Zur Quantifizierung wurden 3-5 unabhängige Proben herangezogen. Von diesen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Geräteparameter

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

Zur Trennung der Calystegine wurden zwei Temperaturprogramme benutzt: Programm 1 zur schnellen Quantifizierung der Calystegine. Mit Programm 2 wurden die mitderivatisierten Tropanole Tropin und Pseudotropin durch eine niedrigere Anfangstemperatur erfasst.

Trennprogramm für die Intermediate

Säulentemperatur:	65°C 10°C/min bis 120°C, 2 min 15°C/min bis 240°C 10°C/min bis 300°C
Injektion:	Gepulste Injektion ohne Split (200 kPa, 1,5 min, 250°C)

	Retentionszeiten in min (durchschnittlich)
Tropinon	8,7
Nortropin	9,0
Tropin	9,2
Norpseudotropin	9,4
Pseudotropin	9,6
Azobenzol (Standard)	14,1

Trennprogramm für Calystegine

- 1) Säulentemperatur: 160 °C, 2 min
5°C/min bis 240°C
10 °C/min bis 300 °C
Injektion: Split (1:20), 120 kPa, 250°C
- 2) Säulentemperatur: 100 °C
8°C/min bis 240°C
15°C/min bis 300 °C
Injektion: Split (1:20), 120 kPa, 250°C

	Retentionszeiten in min (durchschnittlich)	
	Programm 1	Programm 2
Tropin		5,9
Pseudotropin		6,4
Azobenzol (Standard)	6,3	10,7
Calystegin A ₅	7,4	11,8
Calystegin A ₃	7,8	12,1
Calystegin B ₁	10,4	14,1
Calystegin B ₂	11,9	16,2

Kalibriergeraden

Tropinon	$y = 1956,4x - 7,578, R^2 = 0,9990$
Tropin	$y = 1559,4x - 7,117, R^2 = 0,9923$
Pseudotropin	$y = 1765,5x - 7,319, R^2 = 0,9997$
Nortropin	$y = 1164,5x - 8,202, R^2 = 0,9958$
A-Calystegine	$y = 263,72x - 4,505, R^2 = 0,9768$
B-Calystegine	$y = 266,37x - 1,277, R^2 = 0,9809$

B 2.3.8 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie

Zur Identifizierung von enzymatischen Umsetzungsprodukten (B 2.2.4), zur Absicherung von analysierten Extrakten und zur Quantifizierung des Einbaus von Stickstoff-Isotopen wurde die Massenspektroskopie verwendet. Die Temperaturprogramme sind wie unter B 2.3.7 aufgeführt mit der Ausnahme, dass nach Injektion bei Programm 1 und 2 der Calystegintrennung ein Plateau von 2 min gehalten wurde. Die Injektionen erfolgten ohne Split bei einer Temperatur von 250°C und einem Druck von 120 kPa.

Geräteparameter

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

B 2.3.8.1 Quantitative Auswertung von ^{15}N -Markierungen

Zum Einbau des ^{15}N -Tropinons wurden die Calystegine A₃, B₁ und B₂ sowie Pseudotropin und 2,7-Dihydroxynortropan analysiert. Calystegin A₅ wurde detektiert, aber die akkumulierte Menge reichte für eine Quantifizierung der Fragmente nicht aus. Der Einbau des ^{15}N wurde bei den Calysteginen A₃ und B₂ im Fragment 156, bei Calystegin B₁ im Fragment 244, bei 2,7-Dihydroxynortropan im Molekularion 287 quantifiziert. Die Zerfallsmuster sind in Tabelle Tab. B-6 dargestellt.

Verbindung	Retentionszeit in min	Charakteristische Fragmente (relative Signalstärke in %)					
Pseudotropin	5.60	83 (100)	96 (55)	124 (13)	184 (15)	198 (10)	213 (8) ^a
2,7-Dihydroxynortropan	10.36	80 (68)	81 (71)	156 (18)	171 (36)	272 (2)	287 (10) ^{a,c}
Calystegin A ₃	14.91	101 (1) ^b	116 (1) ^b	156 (100) ^c	244 (8)	285 (3)	
Calystegin B ₁	18.40	101 (2) ^b	129 (16) ^b	244 (46) ^c	373 (8)		
Calystegin B ₂	20.04	156 (7) ^c	217 (100) ^b	244 (7)	373 (2)		

Tab. B-6: MS-Fragmentierung von Pseudotropin und der Nortropanalkaloide als TMSi-Derivate. Die Werte in Klammern stellen die relative Signalstärke des jeweiligen Fragmentes dar. Alle Fragmente außer denen mit ^b bezeichneten erhöhten ihre Masse um +1 nach ^{15}N -Tropinonfütterung. a: Molekularion, b: Fragment ohne Stickstoff, c: Fragmente, deren Mengen quantitativ bestimmt wurden.

Die Peakflächen des jeweiligen Fragmentes und die des +1-Fragmentes wurden ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden rechnerisch durch das natürliche Auftreten von 1,1% ^{13}C und 4,7% ^{29}Si korrigiert, wobei der prozentuale Anteil des jeweiligen Isotopes im Molekül berücksichtigt wurde [Cooper 1981].

Zur Kalkulation neu gebildeter Calystegine nach Umsetzen der Wurzelkulturen von ^{15}N -haltigem Medium auf ^{14}N -Medium wurde ebenso verfahren und die relativen Mengen neu gebildeter Calystegine auf die Trockenmasse und Zeit bezogen.

B 2.3.9 Dünnschichtchromatographie

B 2.3.9.1 Einfache Entwicklung

Die einfache Dünnschichtchromatographie wurde zum Nachweis der Calystegine bei der Aufreinigung von Calystegin A₃ (B 2.3.10.2) verwendet. Als verwendete DC-Platten wurden Aluminiumplatten mit 250 µm Schichtdicke Kieselgel 60 (Merck) verwendet. Die Proben wurden mit dem Linomat IV (Camag) aufgetragen. Das Laufmittel setzte sich aus Chloroform/Wasser/Methanol/Ammoniak 66:21:12:1 zusammen [Draeger 1995].

B 2.3.9.2 AMD-TLC (*Automated multiple development*)

Mit der automatischen Mehrfachentwicklung von DC-Platten wurden zwei Methoden zur Trennung der Intermediate der Biosynthese (Methode A) und zur Trennung der Calystegine (Methode B) entwickelt (siehe C 4.3.2). Es wurden Kieselgelplatten auf Glas mit einer Schichtdicke von 250 μm (Merck) benutzt. Die Proben wurden mit dem Linomat IV (Camag) aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit dem AMD 2 System (Camag). Bei Methode A wurde ein Gradient aus Methanol und Chloroform über 11 Schritte eingesetzt mit 2 min Trocknungszeit zwischen den einzelnen Entwicklungen. Bei Methode B verlief der Gradient über 15 Schritte mit der mobilen Phase bestehend aus Methanol, Ethanol und n-Propanol. Die Trocknungszeit betrug bei Schritt 1 bis 7 2 min, bei Schritt 8 bis 15 3 min. Wichtig erwies sich eine Kammersättigung mit 9 M Ammoniak (Methode A) bzw. 14 M Ammoniak (Methode B).

B 2.3.9.3 Detektionsmethoden

Zur Detektion der Calystegine wurde Silberreagenz als Tauchreagenz benutzt (Lösung 1: 0,2% AgNO_3 in Aceton, Entwicklungszeit 60 s; Lösung 2: 2% NaOH in EtOH, Entwicklungszeit 1-3 min). Die Nachweisgrenze liegt für trihydroxylierte Calystegine bei 400 ng, für tetra- und pentahydroxylierte Calystegine bei 200 ng.

Dragendorff's Reagenz variiert nach Munier als Sprühreagenz wurde zum Nachweis von Tropinon, Tropin, Pseudotropin und Nortropin verwendet [Baerheim Svendsen et al. 1983]. Die Nachweisgrenzen liegen für Tropinon bei 1 μg , für Tropin, Pseudotropin und Nortropin bei 0,5 μg .

Chlortoluidin-Reagenz als Sprühreagenz wurde für sekundäre Amine benutzt (Lösung 1: 0,8% NaOCl, kalt trocknen lassen; Lösung 2: 320 mg o-Toluidin in 30 ml Eisessig lösen, Wasser ad 500 ml, diese Lösung 1:1 mit 0,4% Kaliumjodidlösung mischen). Die Nachweisgrenze für Nortropin beträgt 50 ng, für Calystegine 100 ng.

B 2.3.10 NMR

B 2.3.10.1 Messverfahren

NMR-Analysen wurden mit dem NMR-Spektrometer Bruker AVANCE DRX 500 bei 500.13 MHz (^1H) und 50.66 MHz (^{15}N) in 1 M Kaliumphosphatpuffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1) pH 4.0 oder D_2O bei 310 K durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen des ^{15}N wurden im Vergleich zum internen Standard K^{15}NO_3 (δ 0.0) gemessen. [^{15}N] γ -Aminobuttersäure (δ -343.2; 50% ^{15}N) wurde als zusätzlicher interner Standard bei 2D Experimenten eingesetzt und TMS- d_4 (Trimethylsilylpropan sulfonsäure, δ 0.0) für ^1H NMR-Spektren der reinen Calysteginstandards. Eindimensionale ^{15}N NMR-Spektren wurden in einem 2,5 mm Breitband-Mikroprobenkopf unter folgenden Parametern aufgenommen: 25 KHz Sweepweite, 32 K Datenpunkte, Protonenentkopplung mit WALTZ-16 *composite pulse sequence*, 3600 Scans, *Relaxation delay* 2,0 s. ^1H NMR und ^{15}N *gradient-selected heteronuclear multiple bond correlation* NMR (^{15}N gsHMBC) Experimente wurden in einem 2,5 mm *inverse-detection* Gradienten-Mikroproben-

kopf durchgeführt. ^{15}N gsHMBC Spektren wurden ohne Entkopplung während der Datenaufnahme aufgenommen, bei 1 K Datenpunkten mit 256 Scans pro Inkrement und 80 Experimenten, Spektralweite 1750 Hz in F2 und 6540 Hz in F1, *Refocussing delay* 5,55 ms, Verzögerung bei Aufnahme über mehrere Bindungen 100 ms. Die Daten wurden mit der *shifted sine-bell square function* in beiden Dimensionen mit anschließender Fouriertransformation gefiltert.

B 2.3.10.2 Isolierung von ^{15}N -angereichertem Calystegin A_3

Frische Wurzelkulturen (insgesamt 16,7 g), welche ausschließlich auf B5-Medium mit K^{15}NO_3 als einziger Stickstoffquelle wuchsen, wurden analog B 2.3.1 extrahiert und mit Kationenaustauscherchromatographie gereinigt. Der wässrige Extrakt wurde lyophilisiert, in 1 ml gelöst und auf eine Chromatotron-Kieselgelplatte von 2 mm Schichtdicke aufgetragen. Die Calystegine der A-Gruppe wurden mit Hilfe des Chromatotrons 8924 (Harrison Research, USA) von der Gruppe der B-Calystegine mit dem Fließmittel Methanol/Chloroform/Ammoniak 50:50:0,01, Flussrate 2 ml/min abgetrennt. Die Fraktionen wurden per DC analysiert (B 2.3.9.1) und die mit Calystegin A angereicherten Fraktionen vereint und über eine präparative Dünnschichtchromatographie weiter gereinigt. Es wurde eine DC-Platte mit 2 mm Schichtdicke (Merck) benutzt. Das Fließmittel bestand aus Methanol/Wasser/Chloroform/Ammoniak im Verhältnis 22:7:4:0,3. Das ausgekrazte Kieselgel wurde mit Wasser erschöpfend gewaschen, filtriert, eingeengt und gefriergetrocknet. Der lyophilisierte Extrakt wurde per GC (B 2.3.7) analysiert. Die Reinheit betrug 44%, B-Calystegine wurden nicht detektiert.

Dieses ^{15}N -angereicherte Calystegin A_3 wurde als Referenz für die NMR-Messungen eingesetzt.

C Ergebnisse

C 1 *Tropinonreduktase I*

Durch den Nachweis des akkumulierenden Tropins und der Calystegine in *C. sepium* (siehe C 4.1, C 4.2 und C 3.1) als einem Vertreter der Convolvulaceen stellt sich die Frage, ob in dieser Pflanzenfamilie ebenso zwei stereospezifische Enzyme bei der Bildung von Tropin und Pseudotropin beteiligt sind oder ob es sich hier um ein unspezifisches Enzym handelt.

Die Tropinonreduktion stellt einen Verzweigungspunkt der Tropanalkaloidbiosynthese dar. In verschiedenen Solanaceen entstehen durch stereospezifische Reduktion des Tropinons und weiterer Biosyntheseschritte die Tropan- bzw. Nortropanalkaloide [Draeger et al. 1988; Draeger et al. 1994b; Hashimoto et al. 1993b; Portsteffen et al. 1992].

Das bzw. die an der Tropinonreduktion beteiligte(n) Enzym(e) sollte(n) isoliert und charakterisiert werden.

C 1.1 Isolierung einer trI-homologen cDNA-Sequenz

Das Ziel war, die cDNA-Sequenzen der Tropinonreduktasen mit Hilfe von PCR und degenerierten Primern und mit aus mRNA umgeschriebener cDNA zu isolieren. Dazu wurden verschiedene Primer durch Homologievergleiche der bekannten TR-Sequenzen von *Hyoscyamus niger*, *Datura stramonium* und *Solanum tuberosum* abgeleitet (B 1.4, Tab. G-1). Die PCR erfolgte wie in Kap. B 2.1.4.1 beschrieben. Insgesamt 16 direkte und reverse Primer wurden in verschiedenen Kombinationen angewandt. Nur zwei Kombinationen führten zu Amplifikaten.

Von der cDNA 14 Tage alter Wurzelkulturen wurden mit den Primerpaaren DP1 + DP2 (Größe 650 bp) und DP3 + DP4 (Größe 430 bp) zwei Fragmente erhalten, die beide nach der Sequenzierung Homologien zu den Tropinonreduktasen der Solanaceen zeigten. Im weiteren wird hier nur auf das Produkt der Größe 650 bp eingegangen, bei dem sich nach rekombinanter Expression im Enzymassay zeigte, dass es sich um eine TRI handelt (Abb. G-1). Die zweite Sequenz wird unter C 2.1 näher beschrieben.

Durch Homologievergleiche mit bekannten TRs wurde ermittelt, dass an dem 650 bp großen Amplifikat ca. 90 Basen am N-Terminus und ca. 80 Basen am C-Terminus fehlten. Die Vervollständigung der cDNA wurde mit RACE-PCR durchgeführt (B 2.1.4.2). Dazu wurden die Primer RP1-2 für 3'-RACE, Primer RP3-5 für 5'-RACE abgeleitet (vgl. Schema Abb. B-1, Abb. B-2)

Insgesamt resultierte eine cDNA von 1073 bp Länge, 789 bp kodierender Sequenz = 263 AS, 91 überhängenden Basen am 5'-Ende und 193 überhängenden Basen am 3'-Ende. Damit zeigte die CS-trI Ähnlichkeit zur trI aus *S. tuberosum*, die ebenfalls am 5'-Ende um 27 bzw. 30 bp verkürzt zu den trI von *D. stramonium* und *H. niger* ist.

Im 5'-untranslatierten Bereich befindet sich bei Position -45 bis -40 die Sequenz TATAAT (Abb. G-1), eine für eukaryotische mRNAs häufige TATA-Box, die ein regulatorisches Element

für die Transkription darstellt. TATA-Boxen bzw. TATA-Box-ähnliche Sequenzen wurden ebenso in den Promotorbereichen der trI und trII von *H. niger* gefunden [Nakajima et al. 1999c]. Weitere Bindungsstellen für regulatorische Proteine, wie die GC-Box oder CCAAT-Box, sind im untranslatierten Bereich der CStrI-Sequenz nicht zu finden. Dafür ist der Bereich mit 91 Basen nicht ausreichend groß. Weitere Promotorstudien sollten sich anschließen (vgl. D 3).

Die Homologieanalyse auf Nukleotidebene zu bekannten Tropinonreduktasen der Solanaceen ist in Tab. C-1 dargestellt. Die höchste Homologie besteht zur nicht aktiven TR aus *Datura stramonium* mit 67%. Aus der Sequenz ließ sich nicht entnehmen, welche Produktspezifität das Enzym hat. Diese wurde nach rekombinater Expression ermittelt (vgl. C 1.2).

	Accession number	CS-trI
<i>Datura stramonium</i> TRI	L 20473	64
<i>Hyoscyamus niger</i> TRI	D 88156 / AB 026544	62
<i>Solanum tuberosum</i> TRI	AJ 307584	63
<i>Datura stramonium</i> TRII	L 20474	62
<i>Hyoscyamus niger</i> TRII	L 20485 / AB 026545	62
<i>Solanum tuberosum</i> TRII	AJ 292343	62
<i>Calystegia sepium</i> TR putativ	AJ 540305	63
<i>Datura stramonium</i> 29kDa putativ	L 20475	67

Tab. C-1: Homologievergleich auf Nucleotidebene von CS-trI mit bekannten Tropinonreduktasen. Die Homologien wurden mit dem FASTA-Programm berechnet.

Eine Strukturanalyse der in Aminosäuren übersetzten Sequenz erfolgte im Vergleich zu den TRI der Solanaceen (Abb. C-1). Die an der Substrat- und Cosubstratbindung beteiligten Aminosäuren, ermittelt von Nakajima und Mitarbeitern an dem kristallisierten Protein der TRI aus *D. stramonium* [Nakajima et al. 1998], weichen in mehreren Positionen zu der CS-TRI ab (Tab. C-2). Innerhalb der Solanaceen sind diese hochkonserviert.

Das ermittelte Molekulargewicht der CS-TRI beträgt 28531,59 Da, der errechnete isoelektrische Punkt liegt bei 6,45. Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der *Accession number* AJ 427397 eingetragen.

Position in CS-TRI	AS in DS-TRI	AS in CS-TRI	Bemerkung
101	Valin	Isoleucin	beide AS unpolare aliphatische Seitenketten
103	Histidin	Prolin	positiv geladene versus unpolare aliphatische Seitenkette
150	Isoleucin	Valin	beide AS unpolare aliphatische Seitenketten
151	Alanin	Alanin	identisch
156	Leucin	Valin	beide AS unpolare aliphatische Seitenketten
159	Valin	Threonin	unpolare aliphatische versus polare ungeladene Seitenkette
194	Valin	Valin	identisch
199	Leucin	Leucin	identisch
200	Valin	Valin	identisch
213	Isoleucin	Isoleucin	identisch
216	Phenylalanin	Methionin	aromatische versus polare ungeladene Seitenkette

Tab. C-2: Vergleich der Aminosäuren in TRI aus *D. stramonium* und *C. sepium*, die an der Ausbildung der Substratbindungsstelle beteiligt sind.

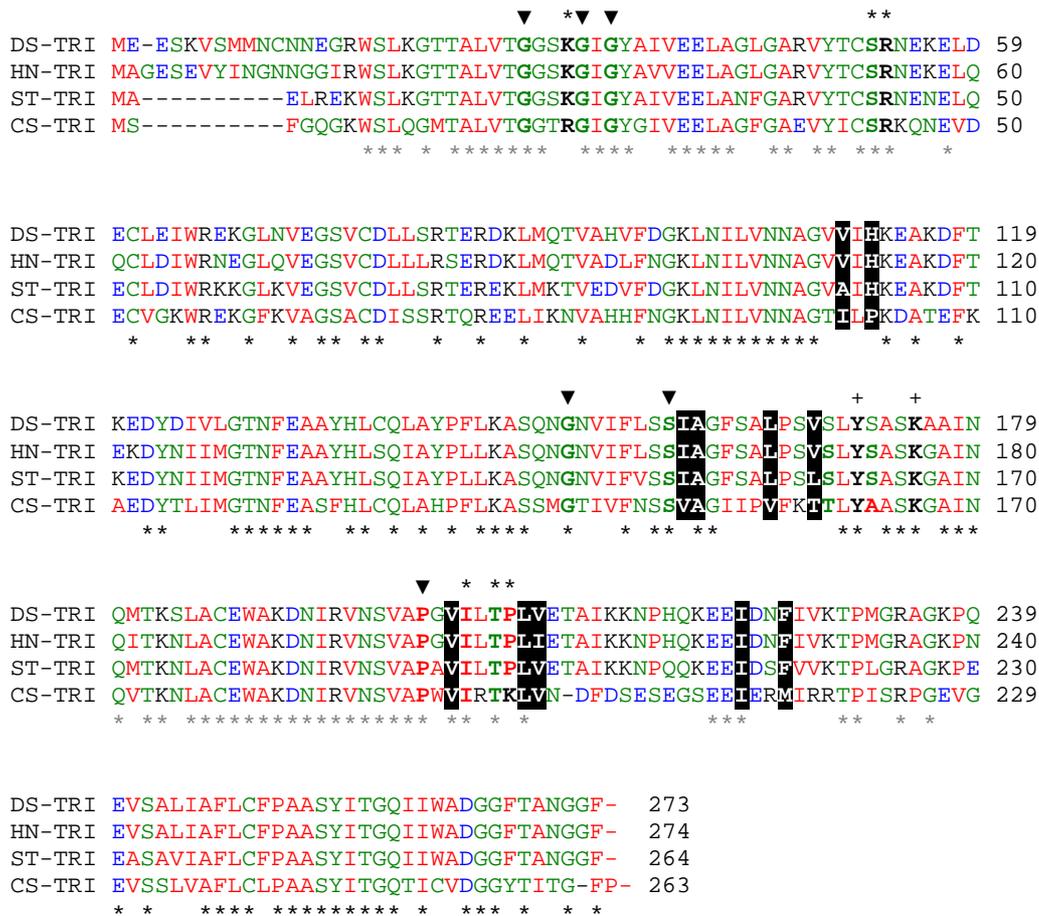


Abb. C-1: Homologievergleich der TRI-Proteinsequenzen von *D. stramonium* (DS), *H. niger* (HN), *S. tuberosum* (ST) und *C. sepium* (CS). Mit ▼ markierte AS sind konservierte Aminosäuren aus der SDR-Familie, * markiert die AS der NADPH-Bindungsstelle, + zeigt das katalytische Motiv YxxxK, schwarz unterlegte AS sind an der Substratbindungsstelle beteiligt.

C 1.2 Überexpression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der TRI

Die Überexpression erfolgte in dem Vektor pET21d (Novagen). Die *trI* wurde fusioniert mit einem 6fach Histidinrest am C-Terminus mit den Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* kloniert (siehe Vektorkarte Abb. G-4). Der Histidinrest sollte bei der anschließenden Reinigung die Bindung an Nickel-Affinitätssäulen bewirken. Die Überexpression fand in *E. coli* (BL21 Codon plus) bei 25°C über 16 h statt (siehe B 2.1.6). Die Bakterienlysate wurden per SDS-PAGE analysiert und über Nickel-Affinitätssäulen gereinigt (Abb. C-2).

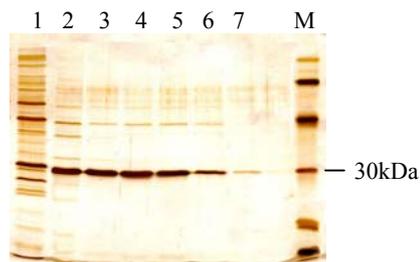


Abb. C-2: Bakterienlysate und Reinigungsfractionen von überexprimierter TRI in pET21d. Spur 1: ungereinigtes Bakterienlysate, Spur 2-7: Elutionsfraktionen der Nickel-HiTrap-Säule mit 250 mM Imidazolpuffer, M: Markerprotein.

Die vereinigten, gereinigten Fraktionen wurden zur biochemischen Charakterisierung der TRI verwendet. Als Standardassay wurde eine photometrische Bestimmung des verbrauchten NADPH bei 330 nm durchgeführt (B 2.2.4). Für die Analyse des Umsetzungsproduktes wurde anstelle von NADPH ein NADPH regenerierendes System (B 2.2.4) bei 30°C für 1 h eingesetzt. Der gereinigte Assay wurde per DC (B 2.3.9) oder GC (B 2.3.7) analysiert. Das entstandene Reduktionsprodukt war Tropin (Abb. G-10). Pseudotropin war nicht nachzuweisen. Damit kodiert dieses Gen für eine stereospezifische TRI.

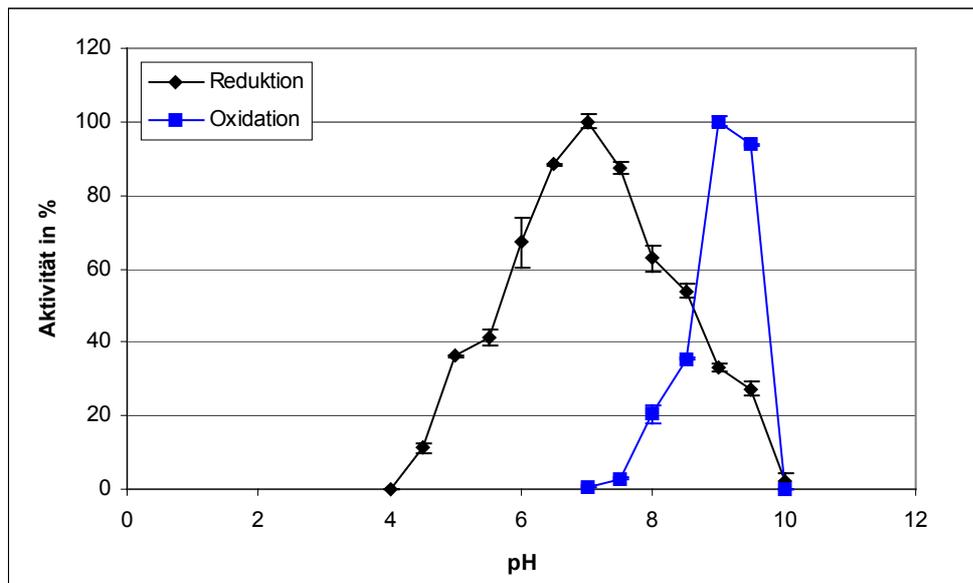


Abb. C-3: Bestimmung des pH-Optimums der Reduktion des Tropinons und Oxidation des Tropins durch TRI. Die Messpunkte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung, Standardabweichung in Balken (B 2.2.5.3).

Das pH-Optimum der Tropinonreduktion wurde im Bereich von 4,0 bis 8,5 bestimmt. Dazu wurden Glycin- und Kaliumphosphatpuffer verwendet (B 2.2.5.3). Das Optimum liegt bei pH 7,0 und fällt bereits zwischen pH 6,0 und 8,0 auf 50% ab, was den bekannten TRI der Solanaceen mit ihren ebenfalls sehr schmalen pH-Optima entspricht. Eine mögliche Rückreaktion des Enzyms – die Oxidation des Tropins zum Tropinon – wurde ebenfalls getestet. Diese war in basischen pH-Bereichen möglich. Das Optimum der Rückreaktion lag bei pH 9,0 (Abb. C-3) und ist vergleichbar mit der TRI von *D. stramonium* (pH 9,9) und *H. niger* (pH 7,6) [Portsteffen et al. 1994; Hashimoto et al. 1992]. Bei einem physiologischen pH-Wert von ca. 7,5 sollte vorrangig die Tropinonreduktion ablaufen. Bei Fütterungsversuchen mit Tropin wurde zwar kein Anstieg der Tropinonkonzentration beobachtet, allerdings erhöhte sich die akkumulierende Pseudotropinmenge im Vergleich zu Kontrollwurzeln (C 1.5).

Der K_m - und V_{max} -Wert wurde für Tropinon bei pH 6,4 bestimmt, um einen Vergleich mit bekannten TRs zu ermöglichen. Es wurde in dem Konzentrationsbereich von 0,1 mM bis 10 mM gemessen (B 2.2.5.4). Geringere Tropinonkonzentrationen führten zu keinem Umsatz. Bei 8 mM Substratkonzentration war V_{max} erreicht. Es ergab sich ein K_m -Wert von 5,88 mM \pm 0,70 und V_{max} mit 7,194 nkat/ μ g Protein \pm 0,78.

Die katalytische Konstante ergibt sich aus dem Verhältnis von V_{max} zu K_m . Sie beträgt für Tropinon 1223,47 [nkat/(mg*mM)]. Die katalytische Konstante ist ein Maß für die Umsetzungs- und Bindungseigenschaften.

Substratanaloga zum Tropinon wurden auf ihre Reduzierbarkeit durch die TRI bei pH 6,4 und einer Substratkonzentration von 5 mM getestet (B 2.2.5.5). 3-Chinuclidinon wurde von der TRI als Substrat reduziert, was einen typischen Unterschied zu allen TRII darstellt, die dieses Substrat nicht akzeptieren (Abb. C-4). Eine Vergrößerung des N-Substituenten begünstigt die

Substratumsetzung, der gänzliche Verlust des Stickstoffs im Ring führt sogar zu einem 6-8fachen Anstieg der Reaktion. Diese hohe relative Aktivität wurde weder bei der TRI von *H. niger* [Hashimoto et al. 1992] noch bei *D. stramonium* [Portsteffen et al. 1994] beobachtet. Bei beiden Reduktasen war kein Umsatz mit dem Substrat *N*-Propyl-4-piperidinon zu detektieren. Mit den Cyclohexanonen lag die Aktivität deutlich unter der des Tropinonumsatzes.

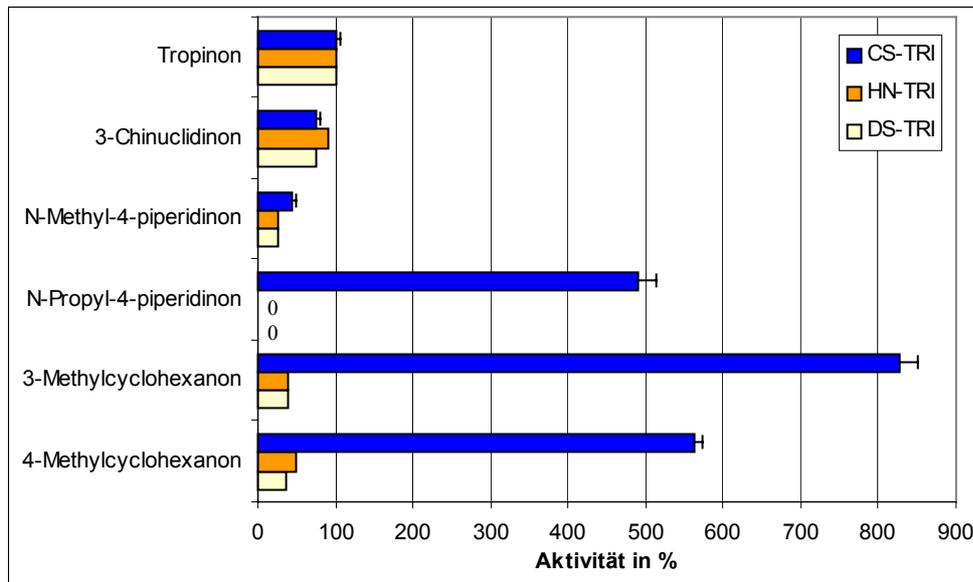


Abb. C-4: Relative Aktivität der CS-TRI mit verschiedenen Substratanaloga, verglichen mit *H. niger* [Hashimoto et al. 1992] und *D. stramonium* [Portsteffen et al. 1994], die Messpunkte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung, Standardabweichung in Balken.

C 1.3 Expressionsanalyse der trI-Transkripte

Die Expression des trI-Gens wurde mit Hilfe des Northern Blots analysiert (B 2.1.9). Dazu wurde aus den *Calystegia*-Pflanzen, unterteilt in junge Blätter, alte Blätter, Blüten, Sprossachse und Wurzeln, sowie aus der Wurzelkultur in verschiedenen Altersstufen (7, 14, 21 und 28 Tage) RNA isoliert (B 2.1.2). Zum Erhalt der Wurzeln und sterilen Blätter wurden Samen sterilisiert und daraus Pflanzen gezogen, die im Alter von 6 Wochen geerntet wurden. Die Anzucht von Pflanzen auf Substrat hatte den Vorteil, nicht die mit anderen Samenpflanzen vergesellschafteten Wurzeln der in der Saalenähe wachsenden Ackerzaunwinde ausgraben zu müssen. Um dem Befall mit Schädlingen vorzubeugen, erfolgte eine sterile Anzucht.

Als Sonden dienten zum einen die gesamte kodierende cDNA, zum anderen ein 411 bp langes Fragment des 5'-Endes. Die cDNA der trI und putativen tr (C 2.1) zeigen im Gegensatz zu anderen TRs in diesem Bereich Homologien, die unter 60% liegen. Anhand eines Dot Blots wurde die Spezifität der verkürzten Sonde getestet (ohne Abbildung). Die beiden trI-Sonden (gesamte cDNA, 411 bp des 5'-Endes) zeigten gleiche Hybridisierungsergebnisse (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle, dass gleiche Mengen RNA aufgetragen wurden, wurde eine 18S-Kontrollhybridisierung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde RNA von 3 mm langen Kartoffelkeimen verwendet.

In Abb. C-5 ist die Transkriptakkumulation der *trI* dargestellt. In den Wurzelkulturen wird die *trI* in allen Altersstadien exprimiert. Ein besonders starkes Signal wurde hier nach 21 Tagen erhalten. Ebenso akkumuliert eine hohe Transkriptmenge in den Wurzeln der intakten Pflanze. In den oberirdischen Geweben wurde nur bei den Sprossachsen ein schwaches Signal erhalten. Dies widerspricht der Fähigkeit der Pflanzen, auch in isolierten Blättern nach Zugabe von Tropin über 48 h Tropin zu akkumulieren (vgl. C 4.1). In wiederholten Northern Analysen konnte auch bei höheren RNA-Mengen von jungen Blättern kein Signal detektiert werden.

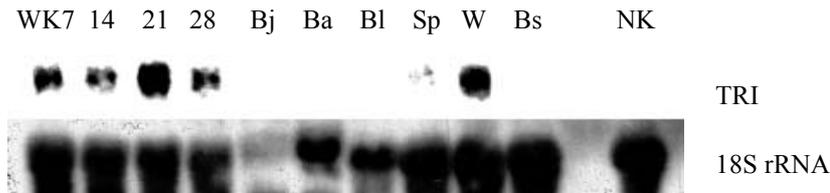


Abb. C-5: Northern Blot Analyse der *Calystegia*-Gewebe. Es wurden 20 µg Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer 411 bp langen Sonde des 5'-Endes von *trI* hybridisiert. Nach Abwaschen dieser Sonde erfolgte eine Kontrollhybridisierung mit 18S rRNA. Als Negativkontrolle wurde die RNA von 3 mm langen Kartoffelkeimen verwendet. WK7-28: CS-Wurzelkultur im Alter von 7, 14, 21, 28 Tagen; Bj: junge Blätter (max. die oberen 5); Ba: alte Blätter; Bl: Blüte; Sp: Sprossachse; W: Wurzel; Bs: sterile Blätter einer *in-vitro*-Pflanze; NK: Negativkontrolle Kartoffelkeime 3mm lang.

C 1.4 Genomische Struktur

Die Bestimmung der Kopienanzahl des trI-Gens im Genom von *Calystegia sepium* erfolgte mit der Southern Blot Analyse (B 2.1.10). Aus 20 Tage alten Wurzelkulturen wurde DNA isoliert und mit den Restriktasen *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* oder *KpnI* verdaut. Die cDNA der trI enthält keine dieser Restriktionsschnittstellen. Als Hybridisierungssonde diente ein 411 bp Fragment des 5'-Endes der trI (vgl. C 1.3).

In Abb. C-6 ist zu erkennen, dass 3-5 Hybridisierungssignale pro Restriktion entstanden sind. Das lässt auf ein *multi-copy* Gen schließen.

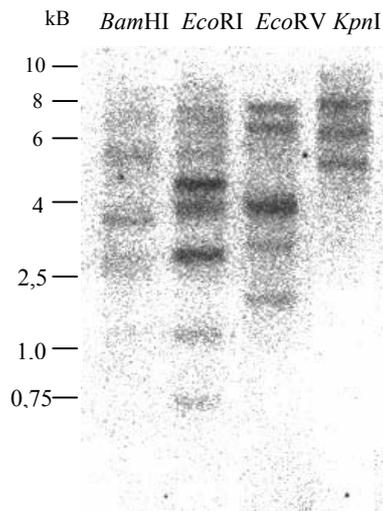


Abb. C-6: Southern Blot Analyse: 30 µg DNA wurden 16 h mit den Restriktasen *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV* oder *KpnI* verdaut, per Elektrophorese getrennt und auf eine Nylonmembran geblotet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer 411 bp langen Sonde des 5'-Endes von trI.

C 1.5 Möglicher Umsatz von Tropin

Calystegia sepium enthält keine klassischen Tropanalkaloide. Aus welchem Grund wird jedoch Tropin gebildet? Was geschieht damit in der Pflanze?

Sowohl in verschiedenen *Datura* Species als auch in *Convolvulus* Species, in *Brugmansia candida* x *aurea* hybrid, *Hyoscyamus muticus* und *Atropa belladonna* wurden verschiedene Ester der Tropanole gefunden [Evans et al. 1968; Hartmann et al. 1986; Jenett-Siems et al. 1998; Robins et al. 1990]. Die Enzyme Tropinacyl-CoA-Transferase, Pseudotropinacyl-CoA-Transferase [Boswell et al. 1999] und Pseudotropintigloyl-CoA-Transferase [Rabot et al. 1995] wurden charakterisiert.

Um die Möglichkeit solch einer Esterbildung zu untersuchen, wurde Tropin von außen an die Wurzelkultur appliziert. In Wurzelkulturen waren bislang keine Tropinester zu detektieren. An 14 Tage alte Wurzelkulturen wurde Tropin in einer Konzentration von 1 mM zugegeben für 48 h, die Kontrollen erhielten 1 mM NaCl. Die geernteten Wurzeln wurden zum einen auf ihre akkumulierte *Calystegien*menge untersucht, zum anderen wurde nach der Methode von [Witte et

al. 1987] nach gebildeten Estern gesucht. Die Messungen wurden per GC-MS (B 2.3.8) und DC (B 2.3.9.2) durchgeführt.

Bekannte Ester, wie Acetyltropin oder Tigloyltropin, wurden nicht detektiert. Dafür akkumulierte ein Metabolit mit den typischen Fragmenten des Tropins (140, 124, 96, 82) und einem scheinbaren Molpeak von 209 m/v (Abb. C-7). Diese Molmasse könnte auf einen Crotonsäureester hinweisen. Durch MS-MS Untersuchungen entstand als nächstes Fragment ein Bruchstück der Größe 191, was auf die Abspaltung von Wasser hindeutet, womit ein Crotonsäureester ausgeschlossen werden kann. Sowohl die Retentionszeit der GC als auch die Laufhöhe bei dünnschichtchromatographischer Untersuchung (Daten nicht gezeigt) indizieren deutlich die Möglichkeit eines Tropinesters. Eine nähere Identifizierung, z.B. durch NMR, war anhand der geringen akkumulierenden Mengen nicht möglich.

Tropinon akkumulierte in beiden Gruppen in vergleichbaren Mengen. Pseudotropin war in den gefütterten Wurzeln leicht erhöht, was auf die Oxidation des Tropins und der weiteren gesteigerten Reduktion des Tropinons zum Pseudotropin schließen lassen könnte. Die Quantifizierung der Calystegine zeigte keinen statistischen Unterschied zwischen den Kontroll- und den gefütterten Wurzeln.

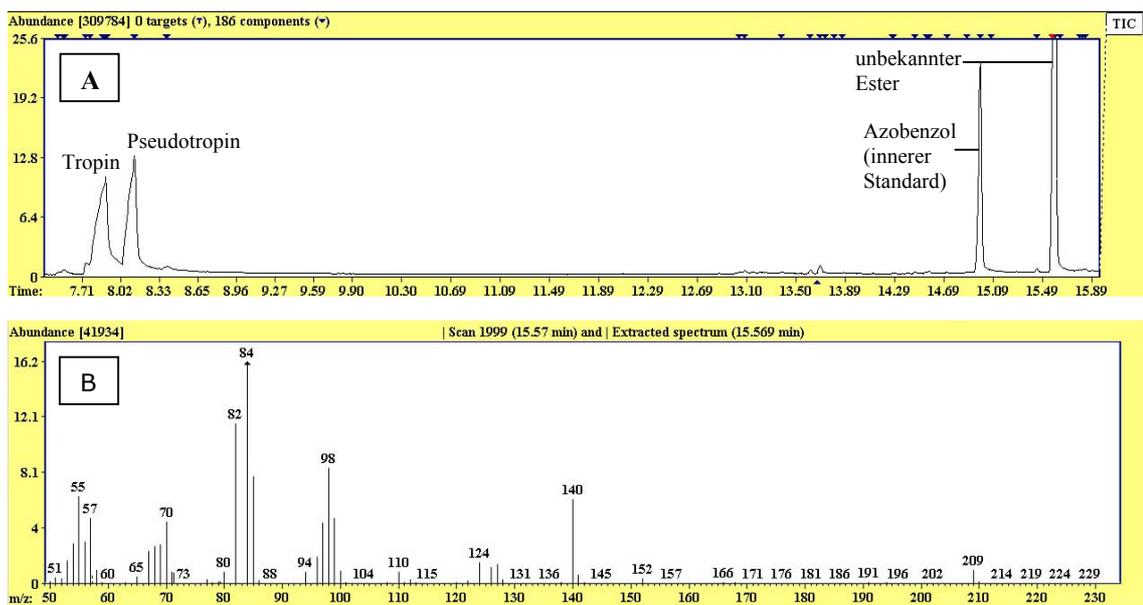


Abb. C-7: A: GC-MS-Chromatogramm eines Wurzelkulturextraktes nach Fütterung mit 1 mM Tropin über 48 h. Bei 15,57 min ist ein Peak zu detektieren, der in ungefütterten Kontrollen nur in Spuren vorkommt B: Zerfallsmuster des unbekanntes Tropinesters bei 15,57 min.

C 2 *Tropinonreduktase II*

Die Tropinonreduktase II katalysiert die Reduktion des Tropinons zum Pseudotropin, welches sich durch die äquatoriale Stellung der OH-Gruppe zum Tropin unterscheidet. Es wird postuliert, dass Pseudotropin über weitere Biosyntheseschritte zur Bildung der Calystegine führt.

C 2.1 Isolierung einer tr-homologen cDNA-Sequenz

Mit der Methode der RT-PCR sollte die kodierende cDNA-Sequenz der trII ermittelt werden. Nach Kombinationen verschiedener degenerierter Primer (Tab. G-1) wurde ein cDNA-Fragment mit 430 bp Länge und dem Primerpaar DP3+4 erhalten (vgl. Kap. C 1.1), welches sich von der cDNA der trI unterschied, aber ebenfalls hohe Homologien zu bekannten Tropinonreduktasen zeigte. Mit RACE-PCR wurden die fehlenden 63 bp am 5'-Ende und 284 bp am 3'-Ende erhalten (B 2.1.4.2). Für 3'RACE wurde RNA aus jungen Blättern und die Primer RP6 und RP7 verwendet (Abb. B-2). Parallel wurde auch RNA aus 15 Tage alten Wurzelkulturen verwendet, erbrachte aber keine Amplifikate. Die 5'RACE erfolgte mit RNA aus 28 Tage alten Wurzelkulturen und den Primern RP8, RP9 und RP10 (Abb. B-1). Es resultierte eine cDNA mit 774 Nukleinsäuren und 258 korrespondierenden Aminosäuren. Nach Ermittlung des ORF (*open reading frame*) enthält das 5'-Ende 21 überhängende Basenpaare, das 3'-Ende 29 bp (für die genaue Sequenz siehe Abb. G-2). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 27590,5 Da. Der isoelektrische Punkt wurde mit 5,97 berechnet. Die Gesamtsequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der *Accession number* AJ 540305 eingetragen.

Ein Homologievergleich auf Nukleotidebene zu bekannten Tropinonreduktasen I und II ergab durchschnittliche Übereinstimmungen von 60-63% (Tab. C-3).

	Accession number	putative CS-tr
<i>Datura stramonium</i> TRI	L 20473	62
<i>Hyoscyamus niger</i> TRI	D 88156 / AB 026544	63
<i>Solanum tuberosum</i> TRI	AJ 307584	61
<i>Calystegia sepium</i> TRI	AJ 427397	63
<i>Datura stramonium</i> TRII	L 20474	63
<i>Hyoscyamus niger</i> TRII	L 20485 / AB 026545	61
<i>Solanum tuberosum</i> TRII	AJ 292343	60
<i>Datura stramonium</i> 29kDa putativ	L 20475	63

Tab. C-3: Homologievergleich auf Nukleotidebene der putativen CS-tr zu bekannten Tropinonreduktasen. Die Homologien wurden mit dem FASTA-Programm berechnet.

Die Übersetzung der cDNA in Aminosäuren zeigt die Zugehörigkeit zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen durch eine vorhandene NADPH-Bindungsstelle und die hochkonservierten Aminosäuren dieser Familie (Abb. C-8). Der Vergleich der an der Substratbindungsstelle beteiligten Aminosäuren deutet eher auf eine Aktivität als TRII als einer TRI hin, wobei einschränkend bemerkt werden muss, dass auch bei diesem Protein ebenso wie beim Vergleich der CS-TRI starke Unterschiede, wie z.B. der Austausch vom Tyrosin¹⁰⁰ durch ein Prolin¹⁰⁰, auftreten (Tab. C-4). Zum Nachweis, dass es sich um eine TR handelt, muss das Protein nach rekombinanter Expression auf Aktivität und Substratspezifität geprüft werden.

Position in putCS-TR	AS in DS-TRII	AS in putCS-TR	Bemerkung
98	Valin	Isoleucin	beide AS unpolare aliphatische Seitenketten
100	Tyrosin	Prolin	aromatische versus unpolare aliphatische Seitenkette
147	Valin	Cystein	unpolare aliphatische versus polare, ungeladene Seitenkette
148	Serin	Alanin	polare, ungeladene versus unpolare, aliphatische Seitenkette
153	Valin	Valin	identisch
156	Glutamat	Histidin	negativ geladene versus positiv geladene Seitenkette
191	Valin	Alanin	beide AS unpolare aliphatische Seitenketten
196	Leucin	Leucin	identisch
197	Valin	Threonin	unpolare aliphatische versus polare, ungeladene Seitenkette
209	Leucin	Leucin	identisch
212	Leucin	Leucin	identisch

Tab. C-4: Vergleich der Aminosäuren in TRII aus *D. stramonium* und *C. sepium*, die an der Ausbildung der Substratbindungsstelle beteiligt sind.

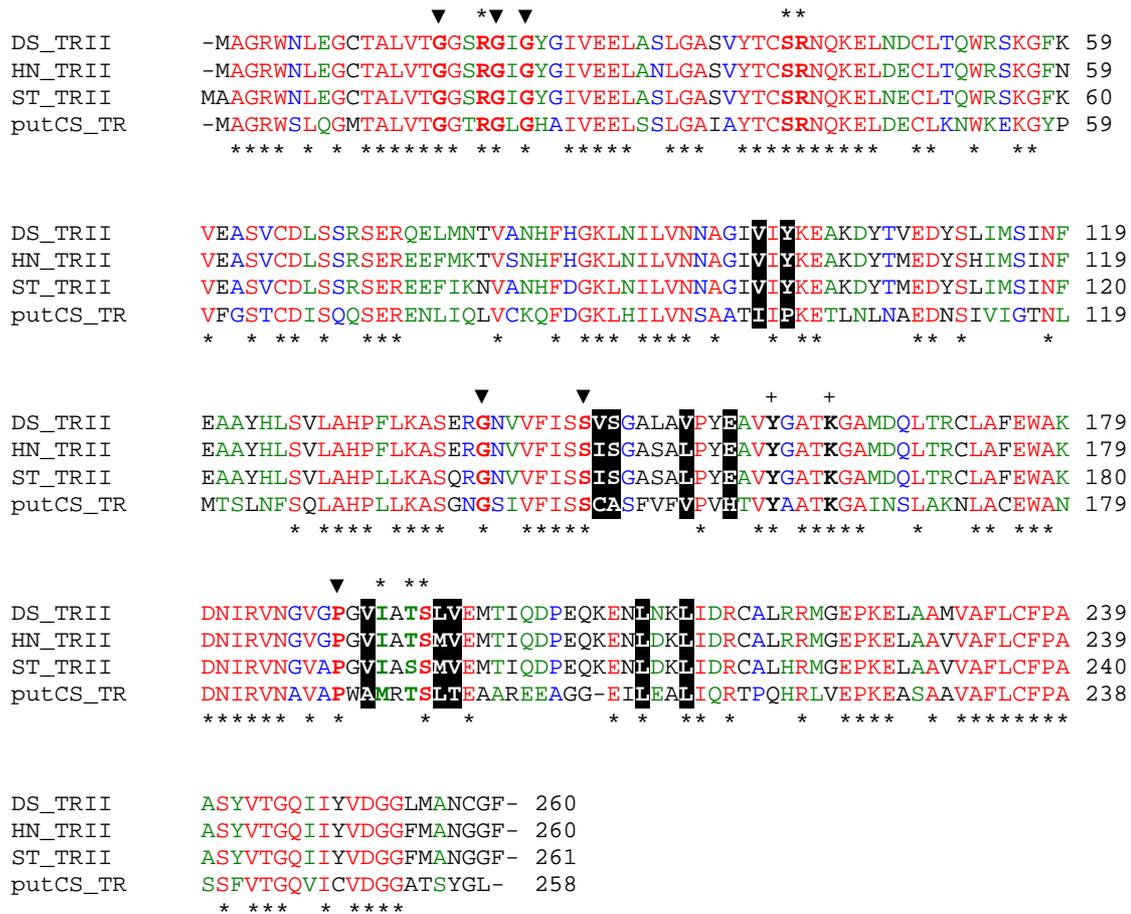


Abb. C-8: Homologievergleich der TRII-Proteinsequenzen von *D. stramonium* (DS), *H. niger* (HN), *S. tuberosum* (ST) und der putativen TR aus *C. sepium* (putCS). Mit ▼ markierte AS sind konservierte Aminosäuren aus der SDR-Familie, * markiert die AS der NADPH-Bindungsstelle, + zeigt das katalytische Motif YxxxK, schwarz unterlegte AS sind an der Substratbindungsstelle beteiligt.

C 2.2 Überexpressionsversuche in *E. coli*, *P. pastoris* und *N. benthamiana*

Zur Überexpression der tr wurden verschiedene Bakteriensysteme gewählt. Es wurden die Vektoren pQE30 (Qiagen), pQE60 (Qiagen) und pET21d (Novagen) verwendet.

Bei Vektor pQE30 wurde der 6fach Histidinrest am N-Terminus genutzt und die Restriktasen *Bam*HI und *Pst*I zum Klonieren verwendet (siehe Vektorkarte Abb. G-6). Die Überexpression erfolgte unter Induktion mit 1 mM IPTG über 16 h bei 25°C in *E. coli* (SG13009). Das Protein wurde in großen Mengen gebildet, war aber nicht löslich, sondern lag wahrscheinlich aggregiert in *inclusion bodies* vor. Diese entstehen, wenn bei der rekombinanten Genexpression nicht genügend Chaperone für eine korrekte Faltung zur Verfügung stehen [Carrio et al. 2002]. Bei einer hohen Proteinproduktion kann es, besonders bei exponierten hydrophoben Oberflächen, zu einer Zusammenlagerung der ungefalteten Proteine kommen [King et al. 1996]. Um diese Aggregation zu verhindern bzw. aufzulösen, wurden die Expressionsbedingungen und Bakterienlysemethoden variiert (Tab. C-5). Nach dem Zusatz von 1,5% *N*-Lauroylsarcosin zum Puffer für die Bakterienlyse war das Protein löslich, zeigte aber keine Aktivität weder im

photometrischen Assay noch nach einstündiger Inkubation und Analyse der Umsetzungsprodukte. Die Verringerung der Expressionstemperatur kann auch zur Verhinderung der Ausbildung von *inclusion bodies* führen [Chalmers et al. 1990], brachte aber auch über einen langen Zeitraum von 5 Tagen bei 4°C keine Veränderung im löslichen Proteinanteil.

Induktion			Aufarbeitung ²	Ergebnis
Dauer	Temperatur	Zusatz		
20 h	25°C	1 mM IPTG	Lysozym-Triton X-100	überexprimiert, unlöslich
20 h	25°C	0,1 mM IPTG	Lysozym-Triton X-100	überexprimiert, unlöslich
20 h	25°C	1 mM IPTG	Lysozym-Triton X-100 + 1,5% <i>N</i> -Lauroylsarcosin	überexprimiert, löslich, keine Aktivität
2 h	37°C	1 mM IPTG 0,1 mM Tropinon	Lysozym-Triton X-100	überexprimiert, unlöslich, lösl. Fraktion zeigt keine Aktivität
2 h	37°C	1 mM IPTG		
20 h	16°C	1 mM IPTG 0,1 mM Tropinon		
20 h	16°C	1 mM IPTG		
20 h	25°C	1 mM IPTG	Lysozym-Triton X-100 + 1,5% <i>N</i> -Lauroylsarcosin + 50 mM NADPH	überexprimiert, löslich, keine Aktivität
5 d	4°C	1 mM IPTG	Lysozym-Triton X-100	überexprimiert, unlöslich; lösl. Fraktion zeigt keine Aktivität

Tab. C-5: Induktionsbedingungen und Bakterienlyse des Konstruktes pQE30-TR in *E. coli* SG13009.

Neben einem Aufschluss mit Detergentien besteht auch die Möglichkeit der nachträglichen Proteinfaltung [Clark 1998; Lilie et al. 1998]. Davon wurde hier abgesehen, da Tropinonreduktasen sehr instabile Proteine sind. Meist werden nur geringe quantitative Ausbeuten bei der nachträglichen Faltung erzielt. Aufgrund dessen wurde nach einem günstigerem Expressionssystem gesucht.

Im Vektor pQE60 wurde mit den Restriktasen *Bam*HI und *Bgl*III die puttr-cDNA mit einem 6fach Histidinrest am C-Terminus kloniert (siehe Vektorkarte Abb. G-7). Der Vektor + Insert wurde in den *E.coli*-Zellen SG13009 unter Zugabe von 1 mM IPTG überexprimiert (B 2.1.6). Dies führte leider nicht zum gewünschten Erfolg. Die Expressionsbedingungen Temperatur, Dauer und Menge IPTG wurden analog den Versuchen nach Klonierung in den Vektor pQE30 variiert, trotzdem konnte kein überexprimiertes Protein weder im löslichen noch unlöslichen Proteinteil nachgewiesen werden.

Als drittes Bakteriensystem wurde die tr mit den Restriktasen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pET21d kloniert mit einem 6fach Histidinrest am C-Terminus und einem weiteren T7-tag von

² Die Bakterienlyse erfolgte wie in Kap. B 2.2.2 beschrieben, Lysozym-Triton X-100 steht hier für die Standardmethode.

13 Aminosäuren am N-Terminus (siehe Vektorkarte Abb. G-5). Die Überexpression erfolgte unter Induktion mit 1 mM IPTG in den *E. coli*-Zellen BL21 Codon plus (B 2.1.6). Das Protein wurde abermals in großen Mengen gebildet und war unlöslich. Von Änderungen der Expressionsbedingungen wurde abgesehen, da ähnliche Ergebnisse wie im Fall des Vektors pQE30 erwartet wurden.

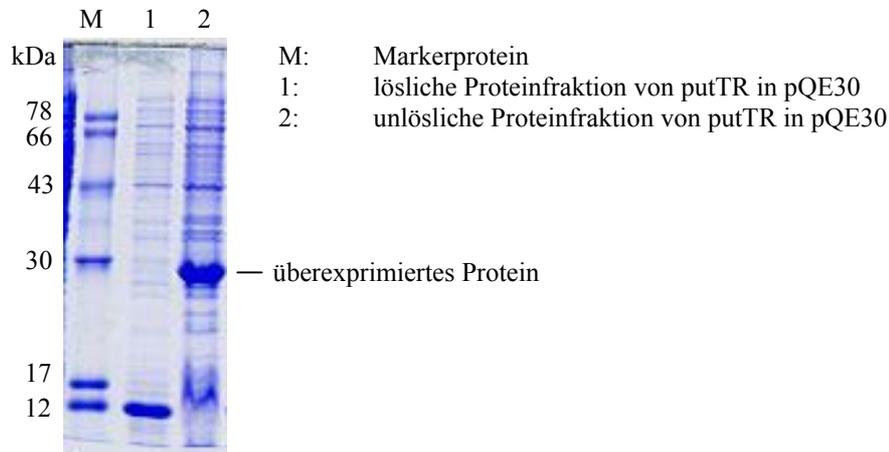


Abb. C-9: Überexpression von putTR im Vektor pQE30 in *E. coli* SG13009, SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung.

Da in Bakterien eine Überexpression nur als unlösliches Protein möglich war, wurde das Hefesystem *Pichia pastoris* eingesetzt. Es wurde der Vektor pPICZA α (Invitrogen) verwendet, welcher einen α -Faktor vor der Klonierungsstelle enthält, der die Ausschleusung des überexprimierten Proteins aus der Hefezelle ermöglichen soll (siehe Vektorkarte Abb. G-9). Dadurch umgeht man den schwierigen Hefeaufschluss, der bei empfindlichen Proteinen, wie den Tropinonreduktasen, zu Aktivitätsverlusten führen kann. Nach Klonierung und Überexpression (siehe Kap. B 2.1.8) konnte kein Protein im SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung nachgewiesen werden. Der Einbau des tr-Gens war per PCR mit isolierter Hefe-DNA als Template nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Damit war auch dieses System nicht zur Überexpression des Proteins geeignet.

In Kooperation mit der Icon Genetics GmbH wurde die tr in ein Vektorsystem kloniert, das auf der Grundlage des turnip vein-clearing Virus von der Firma entwickelt wurde. Zwei Vektorvarianten wurden konstruiert. Zum einen wurde die reine kodierende Sequenz der tr, zum anderen die kodierende Sequenz erweitert durch einen 6fach Histidinrest am C-Terminus in das Plasmid kloniert (siehe Vektorkarte Abb. G-8). Diese beiden Konstrukte plus einem weiteren Kontrollkonstrukt mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) wurden mit Hilfe von Agrobakterien in Blätter von *Nicotiana benthamiana* infiltriert (B 2.1.7). Nach einem Zeitraum von 10 Tagen konnte die Bildung des GFP in den befallenen Blättern visuell nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden ebenfalls die mit TR infiltrierten Blätter geerntet. Diese wurden zunächst einer Fütterung mit 1 mM Tropinon (B 2.1.7) über 48 h unterzogen und anschließend auf akkumulierte Reduktionsprodukte untersucht. Des Weiteren wurde das Gesamtprotein isoliert und ein Enzymassay durchgeführt (B 2.2.4). Es konnten weder

Reduktionsprodukte des Tropinons gemessen werden, noch war ein Umsatz des Tropinons im Assay nachzuweisen. Dies kann zum einen an nicht gebildetem Protein liegen, oder die gebildete Menge war so niedrig, dass weder *in vivo* noch *in vitro* ein Tropinonumsatz messbar war. Eine weitere Erklärung wäre, dass das isolierte Gen nicht für eine aktive Tropinonreduktase kodiert.

Eine zusätzliche Kontrolle des Pflanzenexpressionssystems wurde zu einem späteren Zeitpunkt mit der PMT aus *Nicotiana tabacum* durchgeführt, die zu nachweisbaren überexprimierten Enzymmengen führte [Sauer, in Vorbereitung].

C 2.3 Isolierung und Anreinigung der nativen TRII

Parallel zur Klonierung des Gens der putativen tr wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Viacheslav Reva (Universität Chisinau, Moldavien) versucht, das aktive TRII-Protein aus *Calystegia sepium* Wurzelkulturen zu isolieren. Die Wurzeln wurden nach der Ernte sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter Zusatz von unlöslichem PVP gemörsert (B 2.2.6). Der Zusatz soll die Bindung an Phenole bewirken, die wiederum zur Bindung und Deaktivierung von Proteinen führen können. Der sofort zugefügte Extraktionspuffer enthielt neben 5 mM DTT auch reduzierende Agentien wie Ascorbat (0,1 g/g FM).

Nach Abzentrifugieren der Zellbestandteile war in diesem Rohextrakt noch keine Enzymaktivität messbar. Dies wurde ebenso bei *D. stramonium* beobachtet [Portsteffen et al. 1994]. Wir gehen von einer Blockade des Enzyms, evtl. durch ein anderes Protein aus, denn nach der Konzentrierung mit Sephadex G-50 ist die TRII-Aktivität zum Teil, nach der Fällung mit PEG 6000 vollständig messbar (die Wiederfindungsrate wurde an dieser Stelle mit 100% definiert). Die analog zu Hashimoto [Hashimoto et al. 1992], Portsteffen [Portsteffen et al. 1994] und Dräger [Draeger et al. 1994b] angewandte Ammoniumsulfatfällung führte zu einer kompletten Inaktivierung des Proteins beim Arbeiten mit Proteinmengen von 150-200 mg. Bei kleinen Gewebemassen und Proteinmengen bis zu 5 mg kann die Ammoniumsulfatfällung jedoch angewendet werden [Meier 2001]. PEG 6000 dagegen hat nur eine geringe denaturierende Wirkung auf Proteine. Deshalb wurde mit einer 60%igen (w/v) PEG-Lösung das Protein gefällt (Fraktionen 10-100%) und eine Entsalzung mit HR10/10 angeschlossen. In allen weiter verwendeten Puffern wurde 0,2 M Saccharose und 25% Glycerol zugefügt, was zur Stabilisierung des TRII-Proteins beitrug.

Als nächster Reinigungsschritt folgte eine Anionenaustauschchromatographie mit Q Sepharose, die quartäre Ammoniumgruppen trägt. Bei pH 7,1 wurde die TRII gut gebunden und mit einem NaCl-Gradienten von 0-0,25 M eluiert (Abb. C-10). Der pH-Wert des Elutionspuffers liegt um 1-1,5 pH-Einheiten über dem vermuteten isoelektrischen Punkt der TRII, bei Solanaceen gewöhnlich zwischen 5,4 und 5,7. Durch die Reinigung mit diesem Anionenaustauscher wurden sehr viele Fremdproteine abgetrennt. Es entstand aber auch ein großer Verlust der spezifischen Aktivität (siehe Tab. C-6).

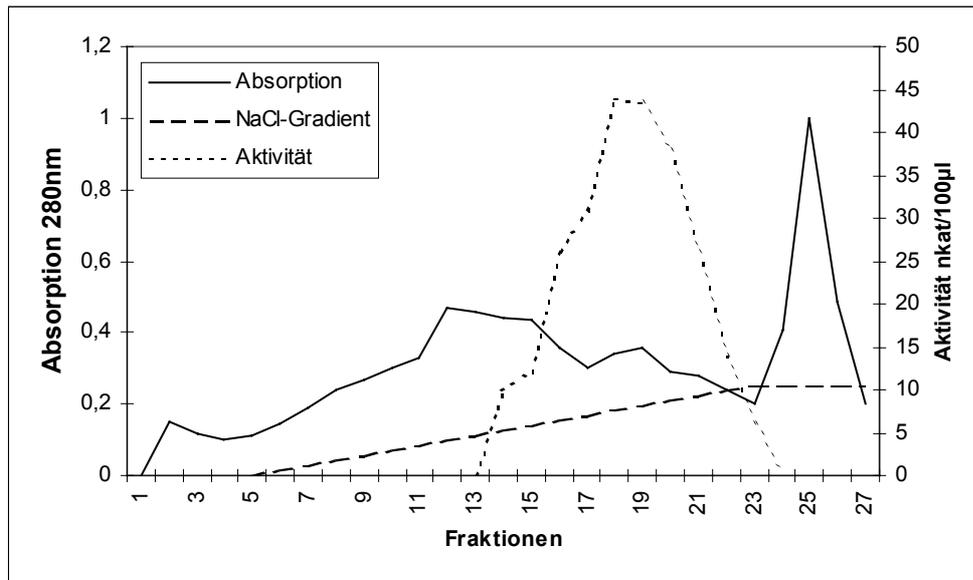


Abb. C-10: Reinigung der TRII mit dem Anionenaustauscher Q Sepharose Fast Flow (1x10 cm). Der NaCl-Gradient verlief von 0-0,25 M.

Die vereinten, aktiven Fraktionen wurden 2fach mit Startpuffer verdünnt, um die Salzkonzentration zu reduzieren und dabei der pH-Wert auf 5,5 eingestellt. Die Proteinlösung wurde auf eine SP Sepharose-Säule gegeben, die vorher ebenso mit Puffer auf pH 5,5 vorequiliert wurde. Die SP Sepharose enthält Sulphopropylgruppen als funktionelle Gruppen und stellt damit einen Kationenaustauscher dar. Bei einem pH-Wert von 5,5 bindet die TRII nicht, sondern erscheint im Durchfluss, wohingegen andere Proteine gebunden und damit abgetrennt werden. Die Durchflussfraktionen wurden gesammelt, der pH-Wert auf 7,1 eingestellt und erneut auf die Q Sepharose Säule aufgegeben und mit einem NaCl-Gradienten im Bereich von 0,1-0,3 M eluiert.

Es resultierten die vereinten, aktiven Fraktionen mit einer Gesamtmenge von 28,4 mg Protein und einer Aktivität von 431,9 nkat/mg. Die Werte der Reinigungstabelle stellen typische Ergebnisse einer Reinigung dar. Die Charakterisierung des Enzyms wurde mit einer so hergestellten Präparation vorgenommen (C 2.4).

Reinigungsschritt	Gesamtprotein mg	Gesamtaktivität µkat	Spezifische Aktivität nkat/mg	Wiederfindungsrate	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	180,0	0	0		
Sephadex G-50	170,4	19,53	114,6		
PEG 6000-Fällung 10-100%	124,0	65,46	527,9	100	1
Q Sepharose	35,8	12,81	357,8	19,6	0,67
SP Sepharose + Q Sepharose	28,4	12,27	431,9	18,7	0,82

Tab. C-6: Reinigungsschema für die Isolierung des TRII-Proteins.

Durch eine anschließende Gelfiltration über Sephacryl S 200HR konnte das TRII-Protein zwar sehr gut von weiteren Begleitproteinen abgetrennt werden, war dann aber inaktiv. Die Säulen mit Red Sepharose CL-6B und 2'5'ADP Sepharose 4B, beides Affinitätschromatographiematrices für Proteine, die NADP(H) als (Co)Substrat verwenden, führten ebenso zu einem kompletten Aktivitätsverlust.

Bei dieser Proteinreinigung wurde versucht, einen Kompromiss zwischen der Inaktivierung der sehr instabilen TRII und der Abtrennung der weiteren Proteine zu erhalten. Der sich verkleinernde Reinigungsfaktor spiegelt diese Tatsache wieder.

Eine Überprüfung auf TRI-Aktivität erfolgte während der gesamten Anreinigung, wurde aber nicht gefunden. Schon nach der Fällung mit PEG 6000 muss das Enzym inaktiv vorliegen oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden sein, so dass ein Umsatz nicht mehr detektierbar ist. Die Reinigung der rekombinanten TRI zeigte ebenso große Instabilität des Enzyms.

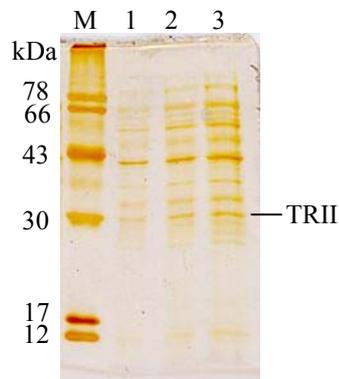


Abb. C-11: Die angereinigte TRII. SDS-PAGE angefärbt mit Silberreagenz, Spur 1-3: vereinte aktive Fraktionen nach SP Sepharose + Q Sepharose in unterschiedlichen Mengen (3 µg, 6 µg, 12 µg), M: Markerprotein.

C 2.4 Biochemische Charakterisierung der TRII

Mit der angereinigten TRII-Proteinlösung (vgl. C 2.3) wurde das pH-Optimum des Enzyms, die Spezifität durch Test auf Akzeptanz von Substratanaloga sowie die kinetischen Parameter K_m und V_{max} am pH-Optimum bestimmt. Die Aktivität der TRII wurde im photometrischen Assay über die Abnahme der Extinktion bei 330 nm durch den Verbrauch des Cosubstrates NADPH gemessen (B 2.2.4). Das Reduktionsprodukt des Tropinons wurde per GC und DC ausschließlich als Pseudotropin nachgewiesen (Abb. G-12).

Das pH-Optimum wurde in einem Bereich von pH 3,5-9,0 bestimmt (B 2.2.5.3). Bei pH 3,5 war keine Aktivität mehr messbar. Das Optimum liegt bei pH 5,5, wobei im Bereich von 4,5-6,0 nur ein geringer Aktivitätsabfall zu beobachten ist. Diese breite pH-Akzeptanz ist ähnlich zu der der TRII der Solanaceen [Draeger et al. 1994b; Hashimoto et al. 1992; Portsteffen et al. 1994]. Eine Rückreaktion, also die Oxidation des Pseudotropins unter Verwendung des Cosubstrates NADP, fand nicht statt, auch nicht in sehr hohen pH-Bereichen bis pH 10,0.

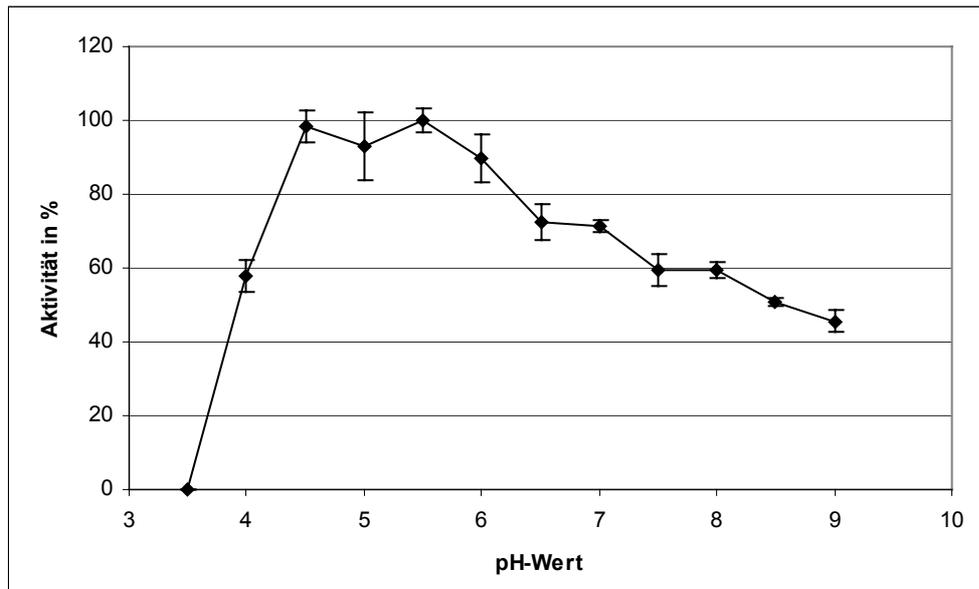


Abb. C-12: Bestimmung des pH-Optimums der TRII (B 2.2.5.3). Die Messpunkte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung, Standardabweichung in Balken.

Der K_m und V_{max} -Wert wurden für Tropinon beim pH-Optimum 5,5 bestimmt. Es wurde in den Konzentrationen von 0,005-0,5 mM gemessen (B 2.2.5.4). Bei 0,25 mM Substratkonzentration war V_{max} erreicht. Es ergab sich ein K_m -Wert von 0,071 mM \pm 0,011 und V_{max} mit 1,31 nkat/ μ g Protein \pm 0,042. Die katalytische Konstante beträgt für Tropinon 18,45 [nkat/(μ g*mM)].

Die Spezifität des Enzyms wurde anhand der Akzeptanz verschiedener Substratanaloga bestimmt. Die Umsetzung erfolgte bei pH 6,4 und einer Substratkonzentration von 5 mM. Die Ergebnisse wurden mit den bekannten TRII von *H. niger*, *D. stramonium*, *A. belladonna* und *S. tuberosum* verglichen (Abb. C-13). Ein Umsatz von 3-Chinuclidinon erfolgte nicht, es wird nur von den TRI-Enzymen akzeptiert (vgl. Abb. C-4). Die CS-TRII ist mit den Piperidinonen sehr aktiv, ca. 4-6fach mehr als mit Tropinon. Diese Aktivitätserhöhung ist doppelt so stark wie die der anderen TRII der Solanaceen. Die N-freien Ketone werden ähnlich schnell wie Tropinon umgesetzt. Nortropinon konnte als Substrat leider nicht getestet werden, da es nicht zur Verfügung stand.

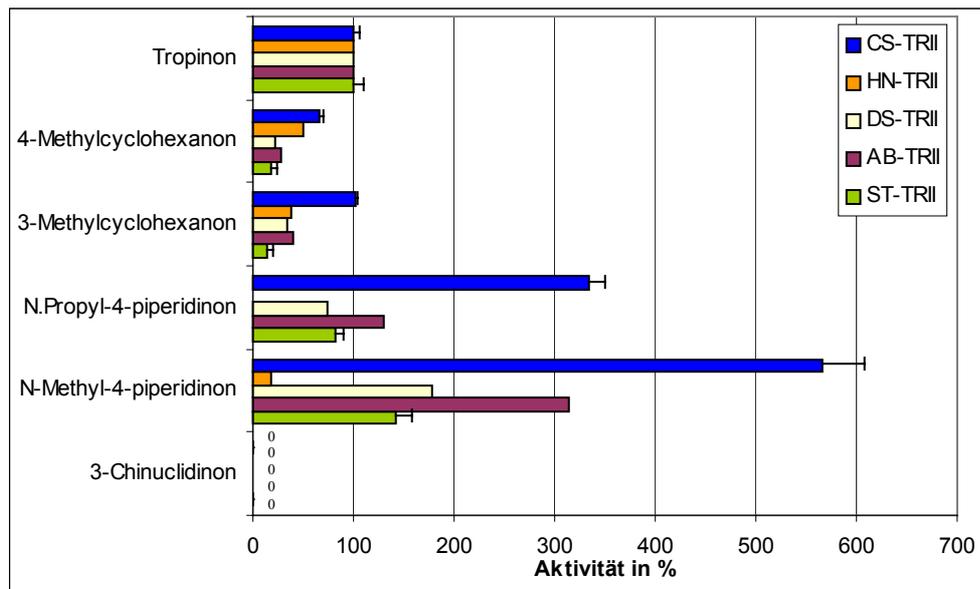


Abb. C-13: Relative Aktivität der CS-TRII mit verschiedenen Substratanaloga, verglichen mit *H. niger* [Hashimoto et al. 1992], *D. stramonium* [Portsteffen 1994], *A. belladonna* [Draeger et al. 1994b] und *S. tuberosum* [Keiner et al. 2002]. Die Messpunkte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung, Standardabweichung in Balken.

C 3 Die Calysteginbiosynthese in *Calystegia sepium*

C 3.1 Akkumulation von Calysteginen in *Calystegia sepium*

In *C. sepium* akkumulieren die Calystegine A₃, A₅, B₁ und B₂ in allen Pflanzenteilen. Die in Abb. C-14 dargestellten Werte entstanden in Zusammenarbeit mit Dirk Höke (Institut für Pharmazeutische Biologie, MLU Halle-Wittenberg) [Scholl et al. 2001b]. Das Calystegin A₃ stellt das Hauptalkaloid dar. Calystegin B₁ akkumuliert durchschnittlich mit 40-50% der Menge des Calystegin B₂. Es wurde ebenso wie Calystegin A₅, welches mit < 10 µg/g TM zu gering konzentriert ist für eine Quantifizierung, nicht mit erfasst.

Die höchsten Gehalte mit 5,7 mg/g Trockenmasse (Summe aus Calystegin A₃ + B₂) werden in jungen Keimlingen 4-5 Tage nach der Keimung gemessen (Daten nicht gezeigt). In einer Woche alten Pflanzenwurzeln ist der Gehalt weiterhin sehr hoch (5,4 mg/g TM) und nimmt mit zunehmendem Alter der Pflanze ab. Ebenso verhält es sich mit den gebildeten Blättern: junge Blätter der Sprossspitze weisen noch 2,3 mg/g TM auf, wohingegen in älteren Blättern nur noch durchschnittlich 150 µg/g TM zu finden sind. Die Sprossachse und Blüten enthalten annähernd gleiche Mengen. Der in den Sprossen enthaltene Milchsafte der Ackerzaunwinde wurde getrennt vom Gewebe aufgefangen und untersucht. Hier wurden nur Spuren von Calystegin A₃ und B₂ gefunden.

In den Wurzelkulturen akkumuliert das gleiche Spektrum an Calysteginen in vergleichbaren Verhältnissen. Die Gesamtcalysteginproduktion in den Wurzelkulturen verläuft parallel mit der Zunahme an Biomasse. Nach 16-18 Tagen akkumulieren maximal 1,5 mg/g TM [Boettcher 1997; Scholl et al. 2001b]. Damit stellt diese *In-vitro* Kultur eine gute Grundlage für Untersuchungen der Biosynthese dar.

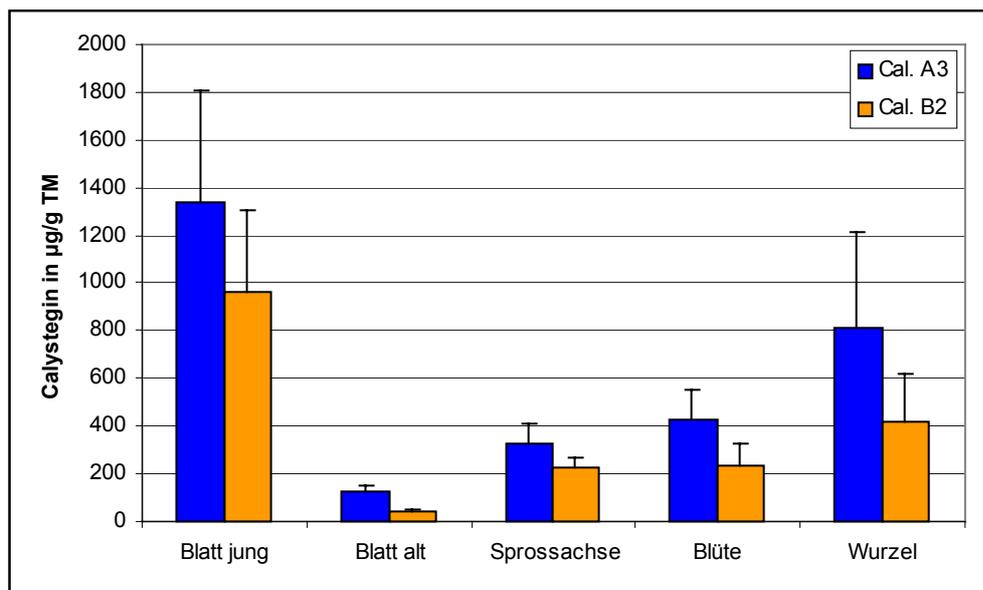


Abb. C-14: Akkumulation der Calystegine A₃ und B₂ in *Calystegia sepium* Pflanzen. Die Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Bestimmungen, Standardabweichung ist in Balken angegeben.

C 3.2 ¹⁵N-Tropinonfütterung zum Nachweis des Einbaus in Calystegine und 2,7-Dihydroxynortropan

Die Biosynthese der Calystegine über den Tropanalkaloidweg mit der Verzweigung nach der Tropinonreduktion in klassische Tropanalkaloide (Hyoscyamin, Scopolamin) und Nortropanalkaloide (Calystegine) wurde von Dräger et al. postuliert [Draeger et al. 1994a]. Zum Nachweis des Einbaus von Metaboliten in einer Biosynthese ist die Fütterung von markierten Vorstufen die Methode der Wahl. So wurden ¹⁴C-Putrescin an *C. sepium* Wurzelkulturen [Goldmann et al. 1990] als auch ¹⁵N-Tropinon an *A. belladonna* Wurzelkulturen [Draeger et al. 1994a] gefüttert. Die Markierungen wurden in den Calysteginen wiedergefunden.

¹⁵N-Tropinon wurde zum eindeutigen Nachweis des Einbaus in die Calystegine über die Stufe des Pseudotropins an *C. sepium* Wurzelkulturen in einer Konzentration von 0,5 mM gefüttert. Die Ernte erfolgte nach 2, 4 und 6 Tagen. Der qualitative und quantitative Nachweis erfolgte sowohl gaschromatographisch mit Massenspektroskopie (B 2.3.8) als auch per NMR (B 2.3.10).

C 3.2.1 Massenspektroskopische Untersuchungen

Die gereinigten, getrockneten Extrakte wurden mit Trimethylsilylgruppen zur gaschromatographischen Analyse derivatisiert (B 2.3.1). Der Einbau von ¹⁵N wurde in den repräsentativen Fragmenten von Calystegin A₃, B₁ und B₂ und in dem Molekularion von Pseudotropin und 2,7-Dihydroxynortropan quantitativ verfolgt (Abb. C-15).

Markiertes Pseudotropin war anhand des Molekularions *m/z* 213+1 (derivatisiert mit TMSi) zu detektieren. Durch die zugefütterte Menge an Tropinon war eine Differenzierung zu putativ vorliegendem Pseudotropin nicht möglich. Es wurde eine quantitative Zunahme von Erntetag 2 zu 4 beobachtet, die sich zum Tag 6 nicht steigerte. ¹⁵N-markiertes Tropin konnte nicht detektiert werden.

Das stickstoffhaltige Hauptfragment von Calystegin A₃ (156) war nach 6 Tagen fast vollständig durch das *m/z* +1-Fragment (157) ersetzt. Für Calystegin B₁ wurde die Zunahme im Fragment *m/z* 244+1 im Verhältnis zum Fragment *m/z* 244 gemessen. Das Hauptfragment aus Calystegin B₂ (*m/z* 217, (CH)₃-(O-TMSi)₂⁺ [Draeger 1995]) enthält keinen Stickstoff, deshalb wurde das Fragment *m/z* 156/157 analysiert (Fragmentierung siehe Tab. B-6). Der Anstieg der Markierung in beiden B-Calysteginen ist vergleichbar. Das Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem Fragment in Calystegin A₃ erhöht sich schneller als bei den B-Calysteginen, welches den Hinweis gibt, dass A-Calystegine vor B-Calysteginen gebildet werden könnten.

Der Einbau des ¹⁵N-Tropinons in 2,7-Dihydroxynortropan wird durch die Erhöhung des Molekularions +1 deutlich. Die Markierung innerhalb des Moleküls deutet den Ursprung dieser Verbindung aus dem Tropanstoffwechsel an. Mehrere biosynthetische Zwischenschritte müssen vom Tropinon ausgehend erfolgen, da die für Tropanalkaloide typische Hydroxylgruppe in Position 3 fehlt.

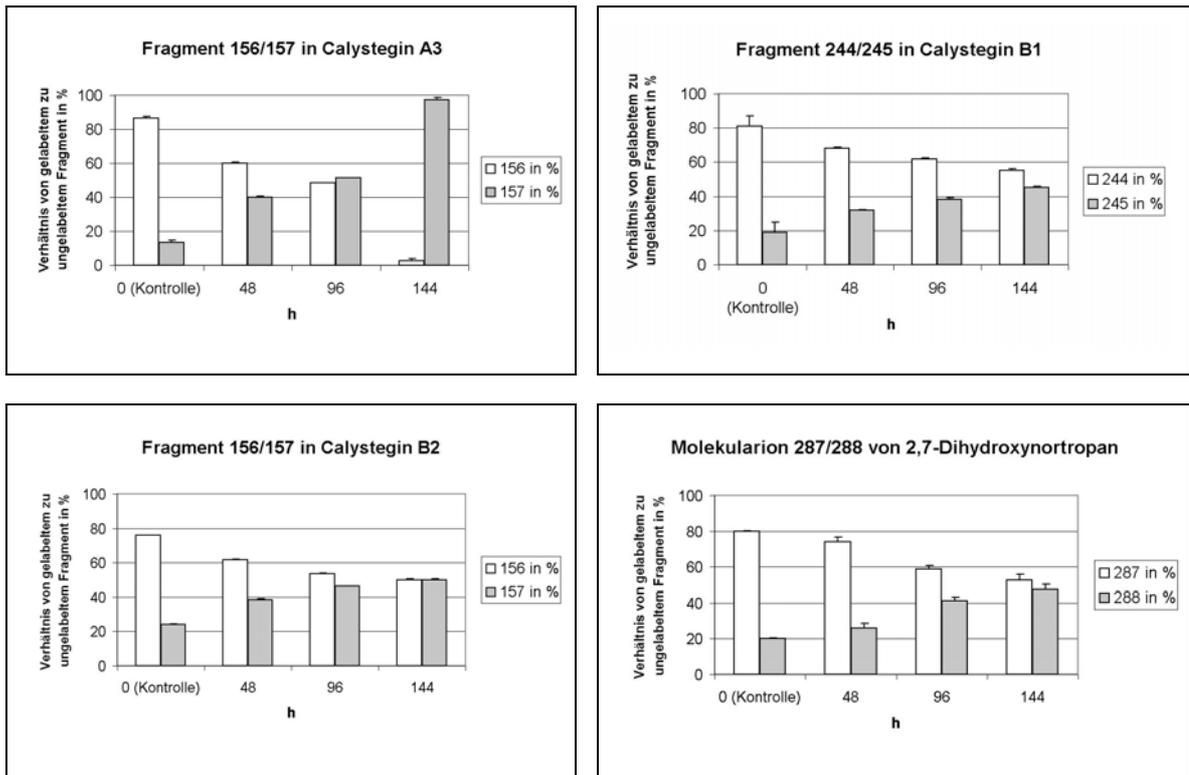


Abb. C-15: Einbau von ^{15}N -Tropinon in die Calystegine A₃, B₁, B₂ und in 2,7-Dihydroxynortropan. Die Messpunkte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung, Standardabweichung in Balken.

Für die in Tab. B-6 aufgeführten Fragmente des derivatisierten 2,7-Dihydroxynortropans sind in Abb. C-16 mögliche Erklärungen der entstandenen Molekülbruchstücke aufgezeigt.

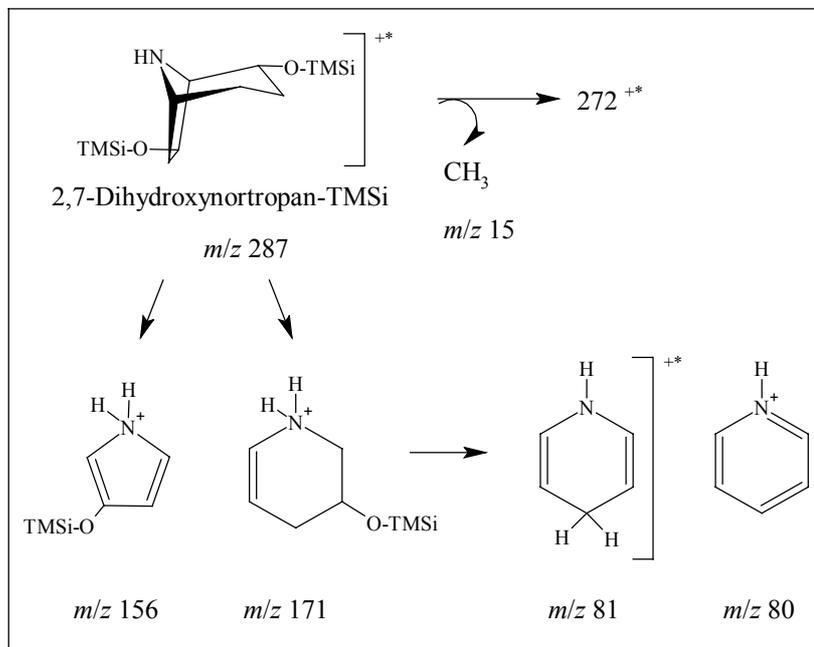


Abb. C-16: Vorgeschlagene Fragmentierung von 2,7-Dihydroxynortropin nach Silylierung, analysiert mit GC-MS (Programm 2, siehe B 2.3.8), TMSi: Trimethylsilylgruppen.

C 3.2.2 NMR

Als Grundlage für die Messungen zum Nachweis des Einbaus des markierten Stickstoffs musste die chemische Verschiebung von ^{15}N der Calystegine und derer biosynthetischer Vorstufen ermittelt werden. Die Daten von Calystegin B₂ (δ -298.6) und Pseudotropin (δ -304.6) wurden mit eindimensionaler ^{15}N NMR gegen die Referenzen K^{15}NO_3 (δ 0.0) und GABA (δ -343.2) als internem Standard gemessen. Mit ^{15}N HMBC-Messungen und [^{15}N]-GABA als internem Standard wurden diese Daten bestätigt. Die recht geringe Sensitivität von ^{15}N NMR-Spektroskopie mit einem natürlichen Vorkommen von ^{15}N mit 0,37% bedingte eine hohe Menge an unmarkierten Standardsubstanzen. Da Calystegin A₃ nicht in diesen Mengen zur Verfügung stand, wurde es aus ^{15}N -angereicherten Wurzelkulturen, die nur mit K^{15}NO_3 als einziger Stickstoffquelle gewachsen waren, isoliert (B 2.3.10.2). Das resultierende [^{15}N]-Calystegin A₃ war zu 98% markiert, was mit GC-MS-Messungen überprüft wurde. Die chemische Verschiebung des ^{15}N von Calystegin A₃ betrug -294.3.

Die ^{15}N -Resonanz der Calystegine war stark pH-abhängig, besonders in neutraler und leicht alkalischer Lösung und variierte abhängig von der Gesamtzusammensetzung des Probenmaterials. Verschiedene chemische Verschiebungen wurden unter normalen Bedingungen in D_2O gemessen, die sich bei einem pH-Wert < 5 stabilisierten. In diesem Bereich liegen die Calystegine am Stickstoff protoniert vor. Hierzu wurde 1 M Phosphatpuffer ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10) pH 4,0 verwendet.

Die getrockneten Wurzelextrakte der ^{15}N -Tropinonfütterung wurden unter diesen Bedingungen mit eindimensionaler ^{15}N -NMR vermessen (Abb. C-17). Drei eindeutige Signale wurden in der relevanten Region des ^{15}N -Spektrums der Wurzelextrakte nach zweitägiger Fütterung gemessen, welche den Calysteginen A₃ (δ -294.3), B₂ (δ -298.6) und Pseudotropin (δ -304.6) im Vergleich zu den Referenzen zugeordnet werden konnten. Die nähere Betrachtung des B₂-Peaks ergab eine weitere Resonanz (δ -298.7), die Calystegin B₁ zugeordnet wurde. Diese Zuordnung erfolgte auf der gemessenen Verschiebung, dem Verhältnis der Peakflächen von B₂ zu B₁ im Vergleich zu GC-MS-Messungen und späteren ^{15}N -gsHMBC-Experimenten. Alle Extrakte zeigten ein zusätzliches schwaches Signal bei δ -313.5 und weitere kleine Signale, die nur unregelmäßig zu detektieren waren. Dies könnten weitere Intermediate der Biosynthese als auch Abbauprodukte sein. Das schwache Signal neben Calystegin A₃ bei δ -294.3 könnte von Calystegin A₅ stammen. Dieses war in allen Extrakten per GC-MS nachweisbar, jedoch zu gering konzentriert, um in gsHMBC-Experimenten nachweisbar zu sein.

Die Messungen der Extrakte nach vier- und sechstägiger Fütterung zeigten eine Zunahme der Signalstärke (verglichen zum internen Standard [^{15}N] γ -GABA, δ -243.2 μg), lassen aber keine Ableitung des kinetischen Verlaufs der Biosynthese zu.

Die eindeutige Abstammung des Pseudotropins und der Calystegine aus ^{15}N -Tropinon wurde mit diesen Messungen nachgewiesen.

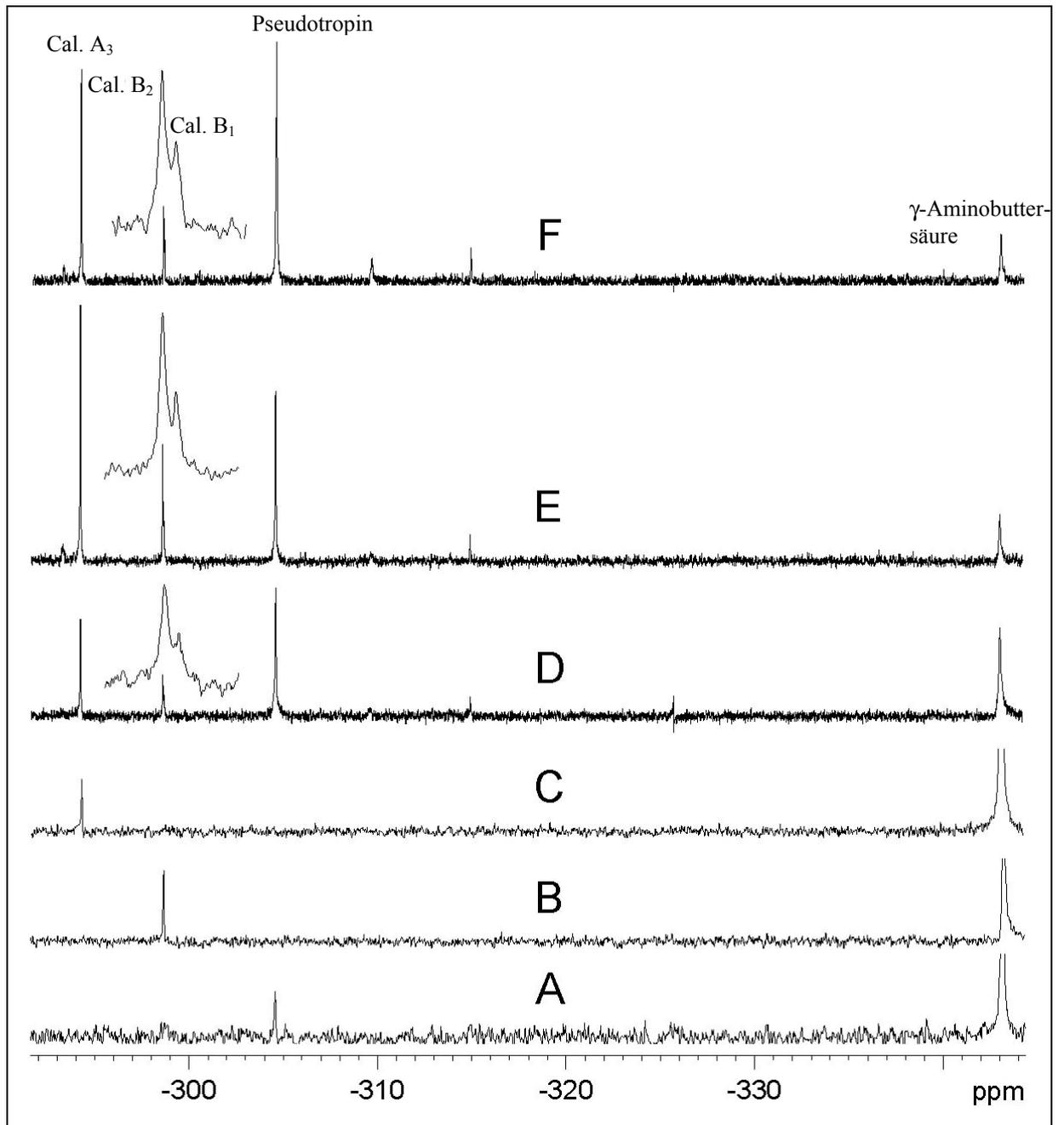


Abb. C-17: ^{15}N NMR Teilspektren der Extrakte der Wurzelkulturen von *C. sepium* erhalten nach (D) 2, (E) 4 und (F) 6 Tagen nach Zugabe von ^{15}N -Tropinon. Spektrum (A) Pseudotropin, (B) Calystegin B₂ und (C) Calystegin A₃ wurden als Standards vermessen. Die vergrößerte Region bei D-F zeigt die zum Teil getrennten Calystegine B₁ und B₂.

C 3.3 Kinetischer Verlauf der Biosynthese

Mit dem Ziel, Calystegin A₃ mit ¹⁵N zu markieren und in größeren Mengen als Standard zur Verfügung zu stellen, wurden Wurzelkulturen auf Medien herangezogen, die K¹⁵NO₃ als einzige Stickstoffquelle enthielten (B 1.1). Das Wurzelwachstum als auch die Sekundärstoffproduktion wurde davon nicht beeinträchtigt. Der hohe und reproduzierbare Einbau von ¹⁵N ermöglichte eine kinetische Betrachtung der Bildung der einzelnen Calystegine. Dazu wuchsen Wurzelkulturen 14 Tage auf B5-Medium mit K¹⁵NO₃. Danach wurden diese auf normales B5-Medium mit ¹⁴N-Nitrat überführt und für 0,5, 1, 2, 3, 6 und 9 Tage kultiviert.

Die Calysteginmenge erhöhte sich in diesem Zeitraum ebenso wie die Frischmasse. Für jedes Calystegin wurde zu jedem Zeitpunkt das Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem typischen Fragment mit GC-MS bestimmt (B 2.3.8.1). Auf diesem Verhältnis basierend wurde die Menge an neu gebildetem Calystegin nach Umsetzen auf ¹⁴N-Medium berechnet (Abb. C-18). Für Calystegin A₅ und 2,7-Dihydroxynortropan waren die akkumulierten Mengen zu klein, um signifikante Daten der einzelnen Fragmente zu liefern.

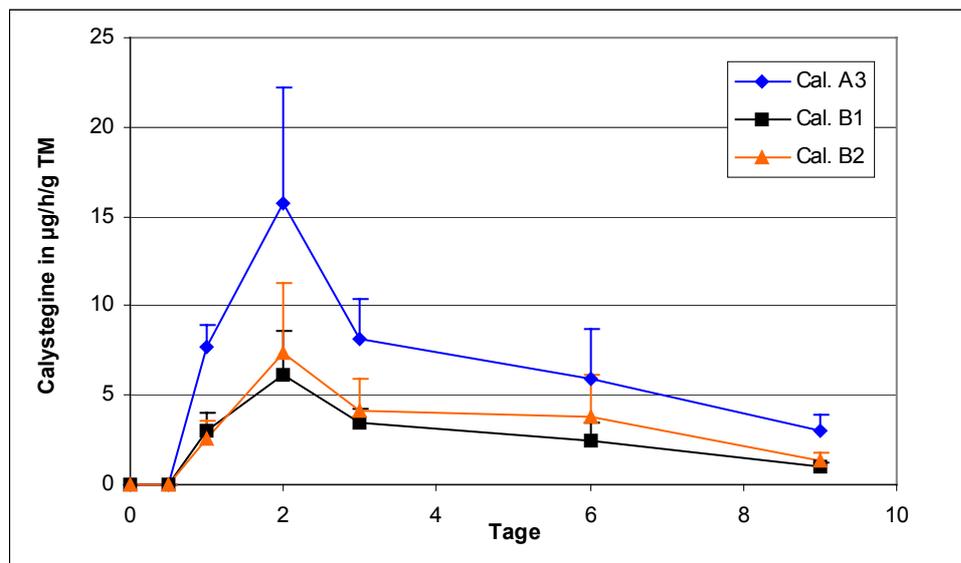


Abb. C-18: Der kinetische Verlauf der Bildung der einzelnen Calystegine nach Umsetzung komplett ¹⁵N-markierter Wurzelkulturen auf ¹⁴N-Medium. Die danach gebildete Menge an Calystegin wurde auf die Zeit (h) und Trockenmasse bezogen. Die Messpunkte sind Mittelwerte einer 4-6fach Bestimmung, Standardabweichung in Balken.

12 Stunden nach Umsetzung konnten noch keine unmarkierten Calystegine nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Vorstufen, z.B. Ornithin oder Putrescin, weiterhin aus bestehenden, komplett gelabelten Pools zur Verfügung gestellt werden. Weiterhin ist eine Adaptionsphase an das neue Medium vorstellbar, wodurch die Sekundärstoffproduktion erniedrigt ist. Die nachfolgende Bildung unmarkierter Moleküle verläuft parallel für alle Calystegine. Calystegin A₃ steigt nach 24 und 48 h stärker an, ist aber auch das mengenmäßig am meisten synthetisierte Calystegin. Die totale Menge an ungelabelten Calysteginen überschreitet auch nach 9 Tagen 75% nicht, die vor dem Umsetzen gebildeten Calystegine sind

weiterhin in den Wurzeln gespeichert. Das weist darauf hin, dass die Calystegine während des gesamten Wurzelwachstums weder ausgeschieden noch abgebaut werden.

Diese Daten wurden mit NMR-Messungen bestätigt. Die ^{15}N -NMR-Spektren der komplett markierten Extrakte zeigen die Signale von Calystegin A_3 , B_1 , und B_2 (Abb. C-19). Das Signal von Pseudotropin war schwer detektierbar und bewegte sich an der Nachweisgrenze. Das läßt auf eine geringe Akkumulation schließen. Dieses Spektrum zeigt sehr deutlich die Akkumulation von N-haltigen Komponenten innerhalb einer normal gewachsenen Wurzelkultur ohne den Einfluss eines zugefütterten Metaboliten. Weitere Signale, die von unbekanntem Intermediaten der Biosynthese stammen könnten, werden nicht nachgewiesen. Dies deutet auf einen sehr schnellen Umsatz des Pseudotropins und dessen Intermediate hin.

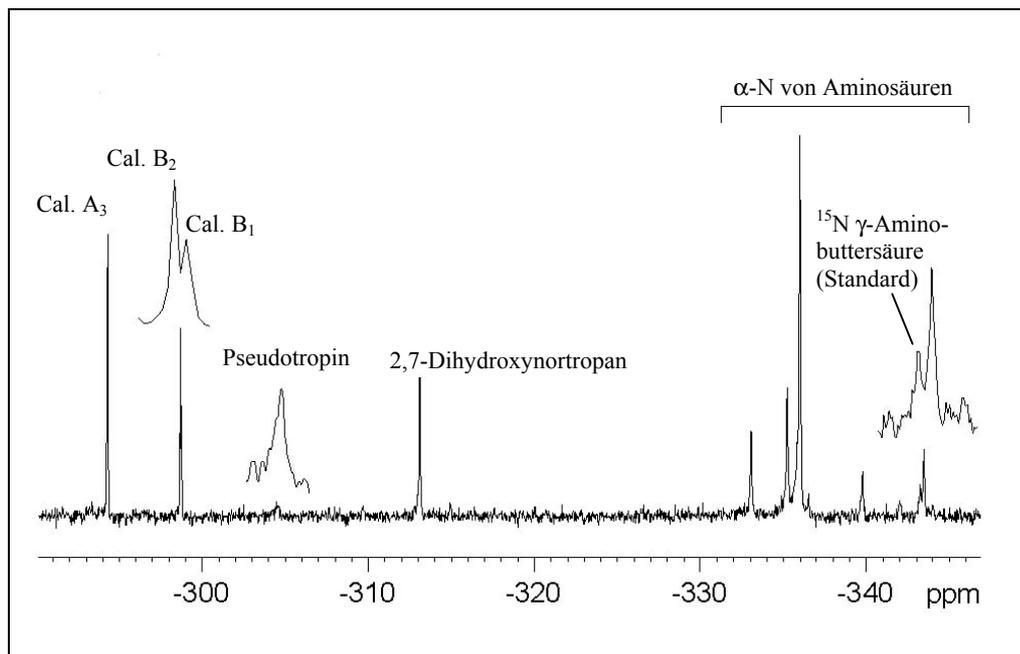


Abb. C-19: ^{15}N -NMR Teilspektrum eines Extraktes einer auf ^{15}N -Nitrat gewachsenen *C. sepium* Wurzelkultur. Vergrößerte Bereiche zeigen die Signale von Calystegin B_1 und B_2 , Pseudotropin (Linienverbreiterung 5 Hz) und ^{15}N -GABA, welches als interner Standard verwendet wurde.

Die ^{15}N -Signale größer δ -333 stammen von α -Aminogruppen von Aminosäuren und dem internen Standard [^{15}N]-GABA. Dies wurde bereits in *Datura stramonium* Wurzelkulturen gemessen [Ford et al. 1994]. Das Signal bei δ -313.5 wurde erneut detektiert (siehe C 3.2.2). Zur Überprüfung, ob es sich um 2,7-Dihydroxynortropan handelt, wurden ^{15}N -enthaltende Wurzelkulturen mit Kationenaustauscherchromatographie angereinigt (B 2.3.1). Diese konzentrierten Extrakte wurden mit ^{15}N -HMBC-Experimenten (*heteronuclear multiple bond correlation*) untersucht. Die von Asano [Asano et al. 1995; Asano et al. 2001b] publizierten ^1H -NMR-Daten von Calysteginen und anderen Nortropanmetaboliten wurden mit den ^{15}N -Resonanzwerten in dem 2D-Spektrum verglichen (Abb. C-20). Das ^1H -NMR-Spektrum des 2,7-Dihydroxynortropan zeichnet sich durch ein stark tieffeld-verschobenes Proton am C7 aus (δ_{H} 4,45, [Asano et al. 2001b]). Die anderen Calystegine haben Protonen im Bereich bis zu δ_{H} 4,11 [Asano et al. 1995]. Die ^1H - ^{15}N -Korrelation mit δ_{H} 4,45 (H-7) und 2,25 (H-6-endo) bestätigte

das Signal als 2,7-Dihydroxynortropan. Gleichzeitig konnte Calystegin B₁ durch die Signale H-6 (δ 4.18) und H-7endo (δ 2.62) (δ 4.11 und δ 2.52 in Asano et al., 2001) mit $\delta_{15\text{N}}$ -298.7 bestätigt werden. Kleine Abweichungen in der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$ von 0.1 ppm) zwischen bereits publizierten und hier gemessenen Daten entstehen durch pH- und Lösungsmiteleinflüsse. Der Nachweis der Messungen der Calystegine A₃ und B₂ im eindimensionalen ¹⁵N NMR-Spektrum wurden mit den ¹H-¹⁵N Kreuzsignalen im zweidimensionalen NMR-Spektrum bestätigt.

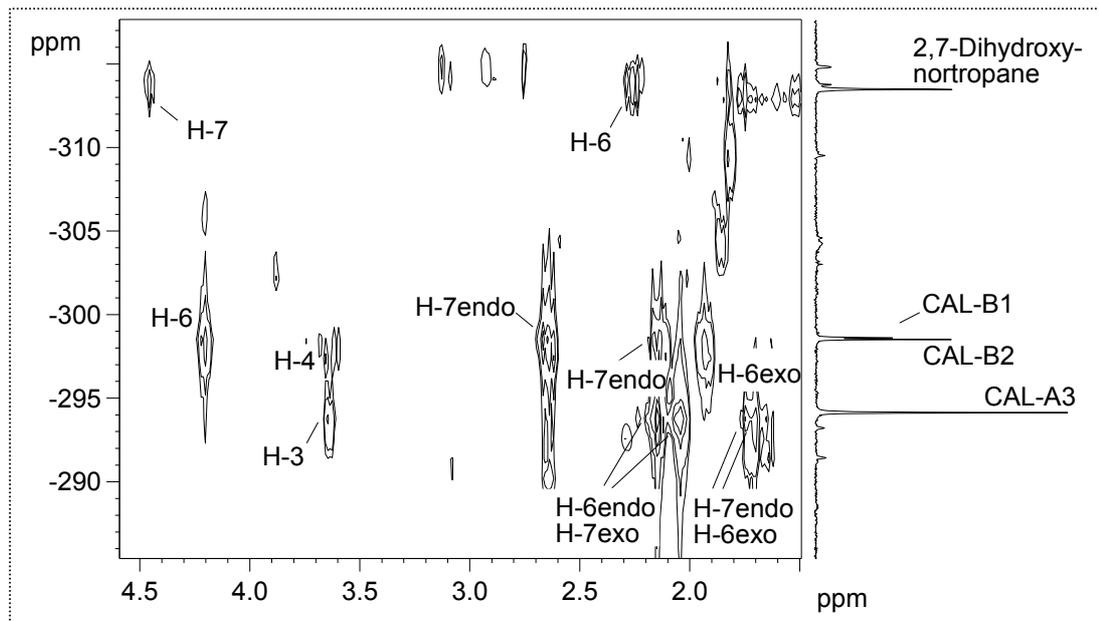


Abb. C-20: ¹⁵N-HMBC-Teilspektrum eines Extraktes von Wurzelkulturen von *Calystegia sepium* (gewachsen auf ¹⁵N-Nitrat). Die Calystegine A₃, B₁, B₂, and 2,7-Dihydroxynortropan wurden identifiziert durch ¹H-¹⁵N-Korrelationen.

C 4 Die Intermediate der Biosynthese

C 4.1 Die Tropinonreduktion bei zusätzlicher Applikation von Tropinon

Mit Fütterungsversuchen von Tropinon an oberirdische Pflanzenteile von *Calystegia sepium* und deren Wurzelkulturen sollte untersucht werden, in welchen Organen die Tropinonreduktion abläuft und welche Reaktionsprodukte akkumulieren. Es wurde Tropinon in den Konzentrationen 1 mM und 5 mM über 48 h verabreicht (siehe B 2.3.5). Die Proben wurden extrahiert (siehe B 2.3.2) und per DC und GC analysiert (B 2.3.7, B 2.3.9). Unerwartet akkumulierte Tropin neben Pseudotropin, auch wenn dies zeitverzögert oder erst nach höheren Gaben von Tropinon der Fall war. In den Wurzelkulturen, der Sprossachse und den jungen Blättern der Pflanzen war nach 24 h und 48 h Pseudotropin in deutlich erhöhten Konzentrationen (mind. 10fach) zur Kontrolle zu detektieren. Tropin erhöhte sich ebenfalls in den Sprossachsen und jungen Blättern nach 48 h, in Wurzelkulturen allerdings erst bei Zugabe von 5 mM Tropinon. Das Verhältnis von gebildetem Pseudotropin zum Tropin lag durchschnittlich bei 15:1.

C 4.2 Akkumulation von Metaboliten in verschiedenen Pflanzenteilen

Nach dem Nachweis der Tropinbildung sowohl in oberirdischen Pflanzenteilen als auch Wurzelkulturen von *Calystegia sepium* sollte die Metabolitenakkumulation von Tropinon, Tropin und Pseudotropin in allen Geweben bestimmt werden (B 2.3.2, B 2.3.7). Die Ergebnisse sind in Abb. C-21 dargestellt. Sowohl Tropin als auch Pseudotropin akkumulieren in oberirdischen Geweben in vergleichbaren Mengen. In der Wurzelkultur kann 3 mal soviel Pseudotropin wie Tropin nachgewiesen werden.

In den Wurzelkulturen akkumulieren im Alter von 7 Tagen ca. 750 μg Tropin/g TM [Meier 2001], wohingegen Pseudotropin nicht erhöht ist (Werte 7 Tage alter Wurzelkulturen sind nicht im dargestellten Mittelwert enthalten). Diese Beobachtung korreliert mit Messwerten der TRI-Aktivität in *D. stramonium*. 3-5 Tage alte Wurzeln zeigen hier eine erhöhte Aktivität gegenüber 14 Tage alten Wurzeln [Portsteffen et al. 1994].

Zusätzlich akkumuliert in den Wurzelkulturen 2,7-Dihydroxynortropan (vgl. C 3.2), von dem noch nicht bekannt ist, ob es eher ein Metabolit bei der Calysteginbildung oder deren Abbauprodukt ist. Die nachweisbaren Mengen sind mit denen des Calystegin A₅ vergleichbar (< 10 μg /g TM) und damit nicht reproduzierbar zu quantifizieren.

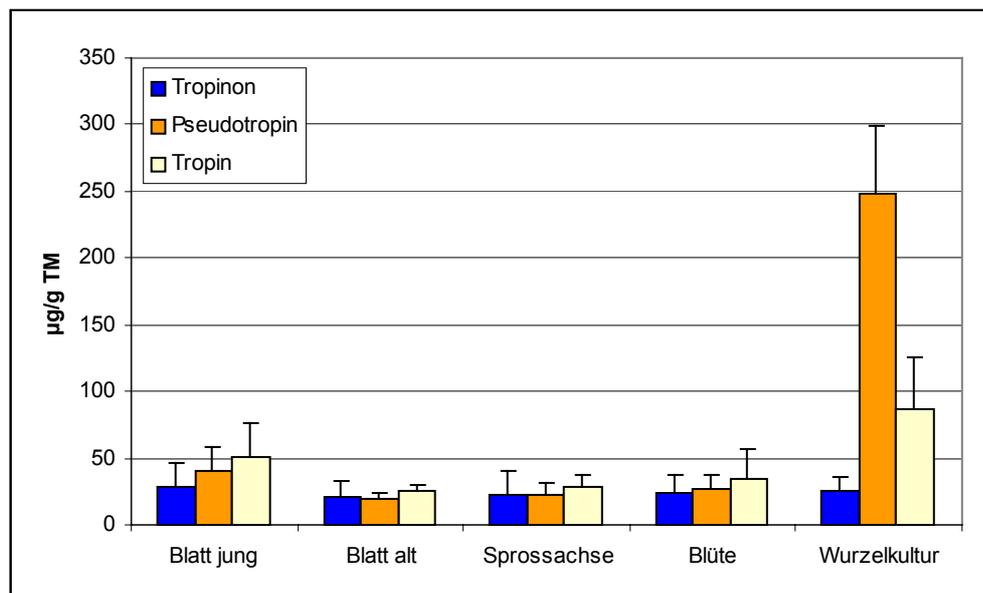


Abb. C-21: Akkumulation der Metabolite Tropinon, Tropin und Pseudotropin in *Calystegia sepium* Pflanzen und Wurzelkulturen. Die Werte sind Mittelwerte aus 3-4 unabhängigen Bestimmungen, die Werte der Wurzelkulturen stammen aus unterschiedlichen Altersstufen (n=8-10), Standardabweichungen sind in Balken angegeben.

C 4.3 Norpseudotropin als weiterer Metabolit der Biosynthese

Bei der Biosynthese der Calystegine über Pseudotropin müssen zwei wichtige Schritte erfolgen: zum einen die Demethylierung des Stickstoffs, zum anderen die einzelnen Hydroxylierungen am Ringgerüst. Die Reihenfolge dieser Schritte ist bislang unbekannt. Zum Auffinden unbekannter Intermediate sind Fütterungen der Vorstufen die Methode der Wahl. Im Idealfall sind die Vorstufen markiert und ermöglichen somit eine eindeutige Detektion der Herkunft des gebildeten Biosynthesemetaboliten.

Über Fütterung von ^3H -markiertem Pseudotropin sollte der nächste Biosyntheseschritt bei der Bildung der Calystegine aufgeklärt werden. Des weiteren erfolgte eine reverse Fütterung von unmarkiertem Pseudotropin an komplett ^{15}N -markierte Wurzelkulturen.

C 4.3.1 ^3H -Markierung von Pseudotropin

^3H -Pseudotropin wurde auf enzymatischem Weg aus Tropinon hergestellt. Dazu wurde aus $1\text{-}^3\text{H}$ -Glucose mit Hilfe von Hexokinase und ATP $1\text{-}^3\text{H}$ -Glucose-6-phosphat gebildet, das wiederum als Substrat für eine Glucose-6-phosphatdehydrogenase diente. Damit wurde NADP protoniert, welches das Cosubstrat der Tropinonreduktase II darstellt. Hier wurde die überexprimierte und angereinigte TRII aus *S. tuberosum* verwendet [Keiner et al. 2002]. Bei der Reduktion des Tropinons entstand Pseudotropin, welches das tritiierte Proton in 3 axialer Position enthielt (Abb. C-22A).

Das gebildete NADPH muss das Tritium in S-Konfiguration enthalten, da die Tropinonreduktasen zum Typ B der Oxidoreduktasen gehören [Hashimoto et al. 1992]. Glucose-6-phosphatdehydrogenasen (EC 1.1.1.49) sind B-stereospezifische Enzyme [You et al. 1978], die das Proton in S-Konfiguration auf NADP übertragen. Hier wurde die Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* verwendet. Alle 3 Reaktionen konnten in einem Ansatz bei einem pH von 7,0 durchgeführt werden (Annäherung an pH-Optima von Hexokinase 7,6, Glucose-6-phosphatdehydrogenase 7,8 und ST-TRII 5,0 [80% Aktivität bei pH 7,0]). Störende Glucose aus den Bakterien, die zur rekombinanten Expression der TRII genutzt wurden, musste entfernt werden. Durch die Ammoniumsulfatfällung des Proteins wurden diese als auch Glucose-6-phosphat abgetrennt. In Vorversuchen wurden Ausbeuten an gebildetem Pseudotropin zwischen 74% und 96% erreicht, bezogen auf eingesetzte Mol Glucose.

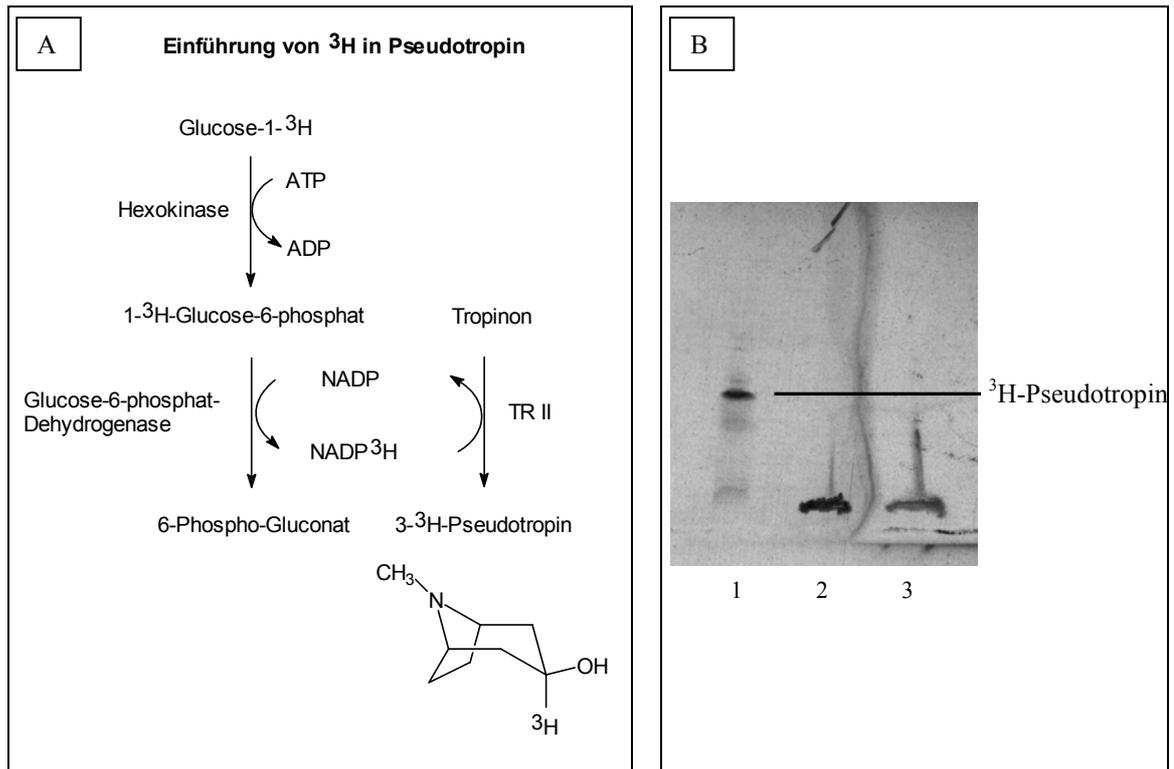


Abb. C-22A: Schema zur enzymatischen Gewinnung von ^3H -Pseudotropin, B: DC mit Extrakten von Wurzelkulturen, die mit ^3H -Pseudotropin für 24 h (Spur 1), 48 h (Spur 2) und 72 h (Spur 3) gefüttert wurden. In jeder Spur sind die Extraktmengen entsprechend 20000 cpm aufgetragen. In Spur 1 wurde ^3H -Pseudotropin anhand seines R_f -Wertes von 0,63 nachgewiesen. Spur 2 und 3 zeigen die Überladung der DC, was zu keiner Trennung führte. Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit Enhance Spray NEF-970G und Auflegen eines Röntgenfilms für 4 Monate bei -80°C .

Das so gebildete, tritiierte Pseudotropin wurde per DC gereinigt, ausgekratzt und an 20 Tage alte Wurzelkulturen für 12, 24, 48 und 72 h appliziert. Die eingesetzte Glucosemenge betrug 30×10^6 cpm ($\cong 22,7 \mu\text{Ci} = 100\%$). Die Ausbeute an gebildetem und aus dem Kieselgel eluiertem Pseudotropin lag zwischen 17% und 35%. Die parallel dazu durchgeführten untritiierten Kontrollen erbrachten Ausbeuten von bis zu 97%. Eine Diskriminierung der tritiierten Substrate durch die beteiligten Enzyme Hexokinase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und TRII wäre denkbar [Maitra et al. 1974; Plaut et al. 1970].

Bei der Extraktion der Calysteginbiosynthese-Intermediate ergaben pH-Veränderungen ± 2 pH-Einheiten einen Austausch des Tritiums gegen Wasserstoff. Somit war außer einer methanolisch-wässrigen Extraktion im Neutralen keine weitere Reinigung des erhaltenen Extraktes möglich. Auch Festphasenextraktion (über Extrelut B 2.3.2) führte zum vollständigen Verlust des Labels. Der so erhaltene, stark eingeeengte wässrige Extrakt erschwerte das Auftragen auf DC-Platten. Die mit automatischer Mehrfachentwicklung (siehe C 4.3.2) erhaltenen Dünnschichtchromatogramme wurden mit dem Scanner Linear Analyzer ausgewertet (B 2.3.4). Ferner wurden sie nach Besprühen mit Enhance Spray NEF-970G mehrere Monate bei -80°C auf einen Röntgenfilm exponiert. Es konnte in beiden Fällen nur das gelabelte Pseudotropin anhand seines R_f -Wertes ($\cong 0,63$, siehe C 4.3.2) nachgewiesen werden (Abb. C-22B). Mit der Auswertung auf Röntgenfilm wurde ein Schatten unterhalb des Pseudotropins

detektiert mit einem R_f -Wert von ca. 0,52, welcher vom Calystegin A₃ ($R_f=0,52$) oder Norpseudotropin ($R_f\approx 0,5$) stammen könnte.

C 4.3.2 Entwicklung eines AMD-Verfahrens

Die Dünnschichtchromatographie ist für die Analyse radioaktiv markierter Metabolite oder Extrakte ein geeignetes Verfahren. Da mit dem herkömmlichen Verfahren der einmaligen Entwicklung einer DC-Platte nur eine ungenügende Trennung der Intermediate der Calysteginbiosynthese möglich war, wurde nach einer Verbesserung der Methode gesucht.

Mit Hilfe der automatischen Mehrfachentwicklung (*automated multiple development*, AMD) wurden zwei Methoden zur Trennung der Metabolite als auch der Calystegine innerhalb ihrer Gruppen entwickelt. Methode A dient der besseren Trennung der Intermediate Tropinon, Tropin, Pseudotropin und Nortropin. Auch Calystegine werden hier bereits teilweise aufgetrennt. Methode B wurde zur Auftrennung der einzelnen Calystegine nach ihrem Hydroxylierungsgrad entwickelt. Damit wird ein schnelles Screening unbekannter Extrakte auf Calystegine möglich.

Bei der Optimierung einer AMD-Methode haben die Art und Mischung der Lösungsmittel, das Material und die Schichtdicke der DC-Platten, die Zahl der Entwicklungsschritte, die Trocknungszeit zwischen den einzelnen Entwicklungsschritten und die Vorkonditionierung der DC-Platten einen Einfluss. Für die Entwicklung der Methoden wurden DC-Platten einer Schichtdicke von 250 μm (10 x 20 cm, Glas) verwendet.

Ausgehend von der einfachen DC-Entwicklung zur Trennung von Tropinon und der Tropanole mit dem Lösungsmittelgemisch Methanol/Chloroform/Ammoniak [Keiner et al. 2000] wurden diese Lösungsmittel innerhalb eines Gradienten über 11 Schritte kombiniert (Abb. C-23A, Vergleich der einfachen Entwicklung mit der AMD-Methode siehe Anhang G 11). Weiterhin wurden n-Hexan, Ethylacetat und Acetonitril getestet, erbrachten aber keine Verbesserung. Einen wichtigen Einfluss auf die Trennung hat die Vorkonditionierung der DC-Platten mit 9 M Ammoniak. Dazu wird die zugeführte Gasphase (komprimierte Luft) für 6 sec durch eine Flasche mit Ammoniak geleitet, noch bevor die mobile Phase zugegeben wird. Bei geringeren Ammoniakkonzentrationen wurde eine Bandenverbreiterung und eine verschlechterte Trennung beobachtet. Bei höheren Konzentrationen resultierten insgesamt höhere R_f -Werte bei schlechterer Trennung. Die Trocknungszeit zwischen den einzelnen Entwicklungsschritten beträgt 2 min. Mit dieser Methode werden weiterhin die Calystegine A₃, A₅, B₁, B₂, B₃, B₄, C₁, 2,7-Dihydroxynortropan und 2,3-Dihydroxynortropan aufgetrennt (Tab. C-7). Calystegine zeigen generell niedrigere R_f -Werte als die Tropane. Eine gemeinsame Detektion ist nicht möglich, Tropane werden mit Dragendorff's Reagenz var. Munier [Baerheim Svendsen et al. 1983], Calystegine mit einer Silberfärbung nachgewiesen ([Draeger 1995], B 2.3.9.3). Durch Mehrfachauftragung und Trennung der entwickelten DC-Platten ist eine parallele Detektion möglich. Beide Reagenzien sind nur schwach sensitiv für Dihydroxynortropane. Chlortoluidin-Reagenz ist sehr sensitiv für alle sekundären Amine und weist diese sehr gut nach. Der Nachteil

besteht darin, dass viele Aminosäuren damit reagieren und somit falsch-positive Ergebnisse entstehen können.

Die Nachweisgrenzen für Dragendorff's Reagenz liegen für Tropinon bei 1 µg, für Tropin, Pseudotropin und Nortropin bei 0,5 µg. Mit Chlortoluidin liegt die Nachweisgrenze für Nortropin bei 50 ng, für Calystegine bei 100 ng. Mit dem Silberreagenz werden trihydroxylierte Calystegine bis 400 ng, tetra- und pentahydroxylierte Calystegine bis 200 ng nachgewiesen.

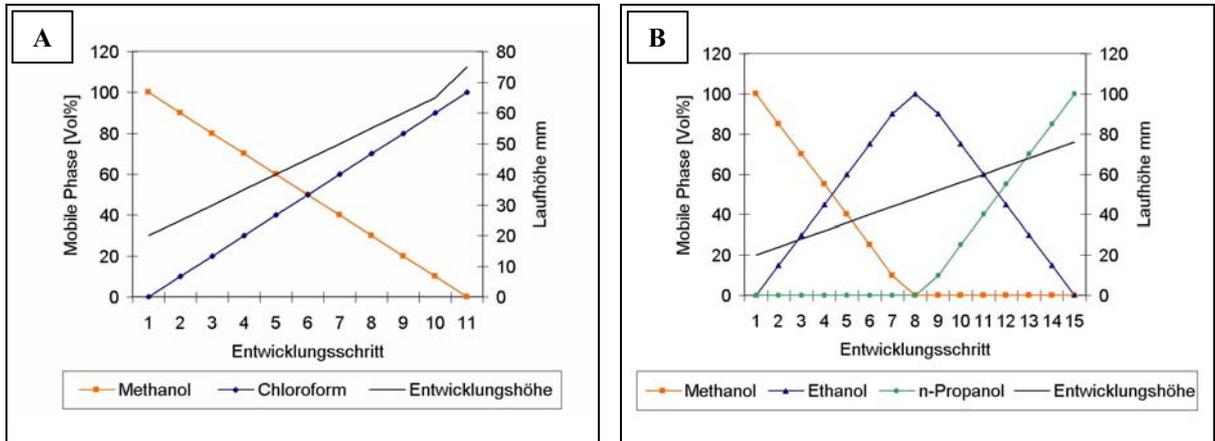


Abb. C-23: AMD-Methoden A: Trennung von Tropinon, Tropanolen und Calysteginen, B. Trennung von Calysteginen und Dihydroxynortropanen. Die Gradientenprofile der mobilen Phase und die Laufhöhe jedes Entwicklungsschrittes sind dargestellt.

	Methode A		Methode B	
	R _F -Werte	s _d	R _F -Werte	s _d
Tropinon	0,84	0,027		
Pseudotropin	0,63	0,029		
Tropin	0,53	0,034		
Nortropin	0,39	0,059		
2,7-Dihydroxynortropan	0,62	0,033	0,79	0,041
2,3-Dihydroxynortropan	0,57	0,043	0,69	0,058
Cal. A ₃	0,52	0,030	0,57	0,044
Cal. A ₅	0,55	0,029	0,63	0,033
Cal. B ₁	0,40	0,026	0,46	0,032
Cal. B ₂	0,35	0,025	0,39	0,031
Cal. B ₃	0,36	0,008	0,40	0,037
Cal. B ₄	0,38	0,026	0,41	0,040
Cal. C ₁	0,24	0,022	0,27	0,018

Tab. C-7: R_F-Werte für Calystegine und deren putativen Precursoren; n=6.

Bei der Methode B wurden spezielle Bedingungen für eine bessere Trennung der Calystegine zusammen mit den Dihydroxynortropanen entwickelt (Beispiel einer Anwendung siehe Anhang G 10). Als mobile Phase kommen hier Methanol, Ethanol und n-Propanol in einem Gradienten über 15 Schritte zum Einsatz (Abb. C-23B). Ein Gemisch von Propanol/Ethanol/Wasser (4:1:1, einfache Entwicklung) führt zu einer teilweisen Trennung der Calystegine, die R_F-Werte sind

sehr niedrig (R_f 0,05-0,3) [Asano et al. 1994b]. Die Vorkonditionierung erfolgt mit 14 M Ammoniak. Für Schritt 1-7 bei Verwendung eines Methanol-Ethanol-Gemisches sind 2 min Trocknungszeit ausreichend, mit steigenden Propanolkonzentrationen erhöht sich die Trocknungszeit auf 3 min. Die gesamte Entwicklung verläuft damit in 280 min.

Die Methoden sind auf Kieselgel 60 HPTLC-Platten (F_{254} , 200 μm Schichtdicke, 10 x 20 cm, Glas) übertragbar. Vorkonditionierungsbedingungen und Trocknungszeiten müssen wegen der dünneren Schichtdicke angepasst werden.

C 4.3.3 Der Nachweis der Norpseudotropinbildung

Bei der Charakterisierung der *Calystegia sepium* Wurzelkultur auf deren Intermediatakkumulation auf verschiedenen Nährmedien wurde in Zusammenarbeit mit Anna-Carolin Meier ein unbekannter Peak bei der Quantifizierung mittels GC (B 2.3.7) festgestellt. Weitere Untersuchungen wurden mit GC-MS angeschlossen. Der gefundene Metabolit fragmentierte identisch zum Nortropin (Abb. C-24), hatte aber eine Retentionszeit von 7,903 min, d.h. 0,41 min nach Nortropin (vgl. B 2.3.7). Es konnte sich nur um Norpseudotropin handeln, da dieses das gleiche Fragmentierungsmuster zeigt. Folgende Fragmente entstanden: 68 (100), 82 (58), 69 (34), 56 (25), 54 (19), 110 (17), 99 (16), 127 (2), in Klammern ist die relative Signalstärke angegeben.

Norpseudotropin akkumulierte in Wurzeln im Alter von 14-35 Tagen sowohl auf einfachem B5-Medium als auch auf verändertem B5-Medium (5% Saccharose, $\frac{1}{2}$ Mineralien, vgl. B 1.1). Diese Untersuchungen wurden zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Wurzeln wurden im Alter von 7, 14, 21, 28 und 35 Tagen geerntet und auf ihre Intermediatakkumulation untersucht (B 2.3.2). Zu diesem veränderten Zeitpunkt akkumulierte Norpseudotropin nur in den Wurzeln im Alter von 21 und 28 Tagen, die auf dem Medium mit erhöhtem Zuckergehalt gewachsen waren. Durchschnittliche Mengen ($n=5$) lagen bei 17,2 $\mu\text{g/g}$ FM (21 Tage) und 14,5 $\mu\text{g/g}$ FM (28 Tage).

Zum Nachweis der Bildung von Norpseudotropin aus Pseudotropin wurden Wurzelkulturen mit ^{15}N markiert, indem sie auf B5-Medium mit K^{15}NO_3 als einziger Stickstoffquelle wuchsen (B 1.1). Im Alter von 14 Tagen wurde ^{14}N -Pseudotropin in der Konzentration 1 mM zugesetzt. Den Kontrollwurzeln wurde 1 mM NaCl appliziert. Die Ernte erfolgte nach 24, 48 und 96 Stunden. Die Proben wurden wie unter B 2.3.2 beschrieben extrahiert und mit GC-MS analysiert (B 2.3.8). Pseudotropin wurde gut von den Wurzeln aufgenommen und akkumulierte in großen Mengen. Norpseudotropin war nur in einzelnen Proben nach 96 h Fütterung von Pseudotropin in geringen Mengen zu detektieren. Die gesamten N-haltigen Fragmente zeigten keinen $m+1$ -Effekt, was auf eine direkte Umsetzung aus dem zugefütterten Pseudotropin schließen lässt.

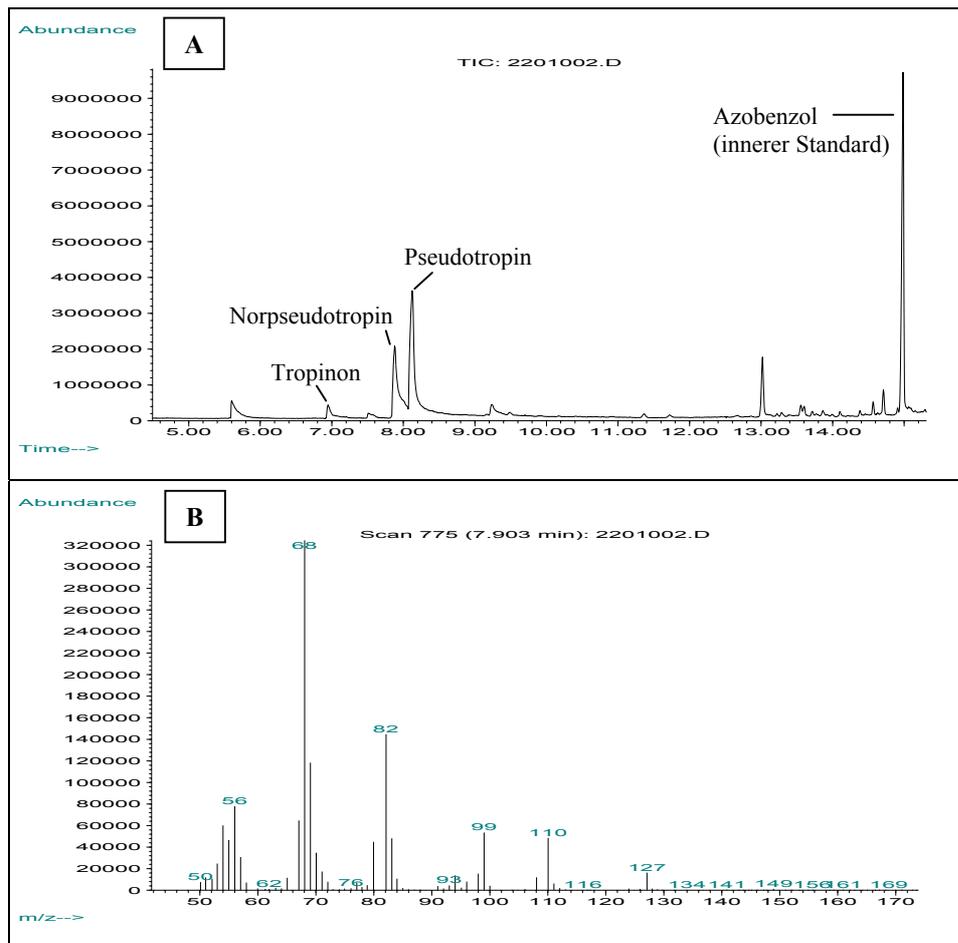


Abb. C-24A: GC-MS-Spektrum einer 21 Tage alten *C. sepium* Wurzelkultur, gewachsen auf B5-Medium mit 5% Saccharose und $\frac{1}{2}$ Mineralien (B 1.1), B: Fragmentierungsmuster von Norpseudotropin (Retentionszeit 7,903 min).

C 4.3.4 Hemm- und Induktionsversuche von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen

Welches Enzym katalysiert die Demethylierung am Stickstoff des Pseudotropins zum Norpseudotropin?

Eine große Enzymgruppe kommt in Frage: die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen. Durch Hemmung und Induktion dieser Enzymgruppe sollte an den Wurzelkulturen untersucht werden, ob sowohl die Calysteginbiosynthese als auch die akkumulierende Intermediatmenge beeinflusst werden kann. Damit sollten Rückschlüsse auf die Beteiligung von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen geschlossen werden.

Als Hemmstoffe wurden die Imidazole Miconazol und Bifonazol als auch Tetcyclacis, ein Norbornandiazetin-Derivat, eingesetzt (B 2.3.6). Mit Miconazol und Bifonazol wurden keine signifikanten Unterschiede im Calystegingehalt und im Muster der akkumulierten Intermediate festgestellt.

Die Gesamcalysteginmenge der Tetcyclacis behandelten Wurzeln reduzierte sich signifikant um 60-80%. Die akkumulierte Pseudotropinmenge verringerte sich ebenfalls um durchschnittlich 30%. Allerdings stagnierte die Zunahme der sonst üblichen Frischmassen bei den Tetcyclacis behandelten Wurzeln. Norpseudotropin wurde in beiden Gruppen nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

Zur Induktion von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen wurde Phenobarbital als Vertreter der Barbiturate eingesetzt. Wie von Haider et al. und Contin et al. gezeigt, ist Phenobarbital ein starker Induktor von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen [Contin et al. 1999; Haider et al. 1997]. Nach einer 6tägigen Applikation in einer Konzentration von 1 mM wurden keine Veränderungen im Calystegingehalt detektiert (Daten nicht gezeigt).

D Diskussion

D 1 Die Tropinonreduktasen

D 1.1 Die Tropinonreduktion in der Pflanze und den Wurzelkulturen

Die Reduktion des Tropinons stellt einen Verzweigungspunkt in der Tropan- und Nortropanbiosynthese dar, an dem stereospezifisch die beiden Tropanole Tropin (3α -Hydroxylgruppe) und Pseudotropin (3β -Hydroxylgruppe) gebildet werden.

Obwohl in *C. sepium* bisher keine klassischen Tropanalkaloide nachweisbar sind, weist die Akkumulation von Tropin neben Pseudotropin auf das Vorhandensein beider Tropinonreduktasen hin. In Fütterungsversuchen mit Tropinon an Sprossachsen, junge Blätter und Wurzelkulturen konnte gezeigt werden, dass die Reduktion zu beiden Tropanolen abläuft (C 4.1). Der Umsatz zum Pseudotropin ist deutlich stärker (15fach). Die Tropinbildung tritt zeitlich verzögert oder nach Applikation von hohen Mengen Tropinon (5 mM) ein. Das deutet darauf hin, dass das zusätzlich zur Verfügung gestellte Tropinon zuerst über die Bildung des Pseudotropins in die Biosynthese der Calystegine einfließt. Erst wenn dieser Weg abgesättigt oder überladen ist, wird Tropin gebildet.

In *S. tuberosum* wurde mit ähnlichen Fütterungsversuchen die Tropinonreduktion zum Pseudotropin in Sprossachsen, Blättern und Kartoffelkeimen nachgewiesen [Keiner et al. 2000]. Später wurde die daran beteiligte Tropinonreduktase II kloniert, exprimiert und charakterisiert [Keiner et al. 2002]. In Proteinextrakten aus jungen Blättern von *C. sepium* konnte TRI- als auch TRII-Aktivität gemessen werden [Meier 2001]. Hashimoto und Mitarbeiter wiesen ebenfalls Aktivitäten beider Reduktasen in Sprossen, Blättern und Blüten von *A. belladonna* und *D. stramonium* nach [Hashimoto et al. 1992]. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Tropinonreduktion in oberirdischen Geweben möglich ist.

D 1.2 Die Isolierung der Tropinonreduktasen

Mit RT-PCR und anschließender RACE-PCR zur Vervollständigung der erhaltenen PCR-Amplifikate wurden zwei cDNA isoliert, die hohe Homologien zu bekannten Tropinonreduktasen aufwiesen (C 1.1, C 2.1). Es resultierten für das trI-Gen eine cDNA von 1073 bp mit einem ORF von 789 bp, für das putative tr-Gen eine cDNA von 827 bp mit einem ORF von 774 bp. Daraus resultieren die korrespondierenden Proteine mit 263 und 258 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt für TRI 28,5 kDa, für die putative TR 27,6 kDa. Die Molekulargewichte der Proteine der bekannten Tropinonreduktasen liegen ebenfalls in dieser Größenordnung. Der Homologievergleich zu den TRI und TRII von *D. stramonium*, *H. niger* und *S. tuberosum* ergibt auf Nukleotidebene eine Übereinstimmung zwischen 60-67% und auf Aminosäureebene 50-59%, wobei die putative CS-TR im Vergleich der Aminosäuren eine geringere Übereinstimmung zeigt als die CS-TRI (Tab. D-1). Innerhalb der Solanaceen ist die Homologie sehr viel höher, sie liegt zwischen 84 und 94% auf Aminosäureebene. Diese

strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzenfamilien könnten darauf hinweisen, dass sich die Tropinonreduktasen innerhalb dieser polyphyletisch entwickelt haben. Um dazu nähere Aussagen machen zu können, sollten weitere TRs z.B. aus der Familie der Moraceen, isoliert werden (vgl. D 1.7).

	Nukleotide		Aminosäuren	
	CS-trI	putCS-tr	CS-TRI	putCS-TR
<i>Datura stramonium</i> TRI	64	62	59	52
<i>Hyoscyamus niger</i> TRI	62	63	57	50
<i>Solanum tuberosum</i> TRI	63	61	58	51
<i>Calystegia sepium</i> TRI		63		56
<i>Datura stramonium</i> TRII	62	63	56	52
<i>Hyoscyamus niger</i> TRII	62	61	55	50
<i>Solanum tuberosum</i> TRII	62	60	56	53
<i>Calystegia sepium</i> TRII	63		56	
<i>Datura stramonium</i> putativ 29kDa	67	63	66	56

Tab. D-1: Homologievergleich der Tropinonreduktasen aus *C. sepium* mit den bekannten TRs der Solanaceen auf Nukleotid- und Aminosäurebasis. Die Homologien wurden mit dem FASTA-Programm berechnet.

Beide TR-Enzyme sollten in Bakterien heterolog exprimiert werden. *E. coli* wurde schon bei TRs verschiedener Solanaceen erfolgreich als Expressionssystem genutzt [Keiner et al. 2002; Nakajima et al. 1993a; Nakajima et al. 1993b]. Die CS-TRI ließ sich mit einem 6fach Histidinrest am C-Terminus im Vektor pET21d unter Kontrolle eines *lac*-Promotors und Induktion mit IPTG sehr gut exprimieren (C 1.2).

Die putative CS-TR wurde im Vektor pQE30 mit 6fach Histidinrest am N-Terminus und im Vektor pET21d mit 6fach Histidinrest am C-Terminus in *E. coli* Zellen in großen Mengen exprimiert, lag hier aber nicht löslich, sondern wahrscheinlich aggregiert als *inclusion bodies* vor (C 2.2). Ursachen für diese Aggregation können fehlende oder mengenmäßig nicht ausreichend vorhandene Chaperone sein [Carrio et al. 2002]. Es ist vorstellbar, dass es zu einer Zusammenlagerung der ungefalteten Proteine kommen kann, wenn diese exponierte hydrophobe Oberflächen aufweisen [King et al. 1996]. Die Variation von Expressionsbedingungen und Methoden der Bakterienlyse (vgl.Tab. C-5) erbrachten keinen Erfolg. Durch Detergentienzusatz konnte die Aggregation des Proteins aufgelöst werden, zeigte aber im Enzymassay keine Aktivität mit Tropinon. Es ist anzunehmen, dass diese hohe Detergenzwirkung zum Aktivitätsverlust führte bzw. das Protein zwar gelöst aber nicht korrekt gefaltet vorlag. Eine nachträgliche Proteinfaltung hätte in diesem Fall angeschlossen werden können [Clark 1998; Lilie et al. 1998]. Von dieser wurde aber abgesehen, da Tropinonreduktasen sehr instabile Proteine sind und meist nur geringe quantitative Ausbeuten erzielt werden.

Verschiedene Methoden können die Bildung von *inclusion bodies* vermeiden. Eine Variante stellt die Verhinderung des Entstehens aggregierender Proteine durch ein „Stoppen“ der zu schnellen Proteinbiosynthese *in vivo* dar. Dies wird durch den Einbau eines Repressors

zusätzlich zum Promotor innerhalb des Vektors ermöglicht, der temperatursensitiv nach Entfernung des IPTG die Proteinbiosynthese runterreguliert [Carrio et al. 2001]. Eine weitere Möglichkeit zeigten Thomas und Mitarbeiter auf. Durch eine Co-Überexpression mit Chaperonen wird das Protein korrekt gefaltet und die Bildung von *inclusion bodies* verhindert. Der Nachteil daran ist, dass während einer ungenügenden Chaperonexpression schon gebildete Proteinaggregate nicht nachträglich von den Chaperonen gefaltet werden [Thomas et al. 1996].

Als weiterer Organismus zur heterologen Expression wurde die Hefe *Pichia pastoris* eingesetzt. Es konnte trotz per PCR belegter cDNA-Integration der putativen tr keine Überexpression nachgewiesen werden.

Da sich die rekombinante Expression dieses Pflanzengens in Bakterien und Hefe problematisch gestaltete, sollte eine Pflanze als Wirtsorganismus eingesetzt werden. Die Pflanze als Expressionssystem wird bereits durch stabile oder transiente Transformationstechniken für die Produktion verschiedener Proteine genutzt [Schillberg et al. 2002]. Die rekombinante Expression von z.B. Proteinen des Tragfadens der amerikanischen Goldseidenspinne *Nephila clavipes* wurde erfolgreich in mit diesen Genen transformierten Kartoffel- und Tabakpflanzen durchgeführt [Scheller et al. 2001]. Proteinbasierte tumor-spezifische Impfstoffe exprimierten McCormick und Mitarbeiter mit einem Vektorsystem des Tabakmosaikvirus in *N. benthamiana* [McCormick et al. 1999].

Das zu exprimierende Gen der putativen tr wurde in ein virales Provektorsystem kloniert und mit Hilfe von Agrobakterien in Blattzellen von *Nicotiana benthamiana* infiziert. Durch die Ausbreitung des Virengenoms wurde so ein gesamtes Blatt infiziert. Kontrollpflanzen wurden mit dem Gen des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) behandelt. Dessen Expression war visuell sichtbar. Parallel zum Zeitpunkt des exprimierten GFP-Proteins geerntet, zeigten die Proteinextrakte der mit der putativen tr behandelten Tabakblätter keine tropinonreduzierende Aktivität. Auch eine *in-vivo*-Aktivitätsüberprüfung über Fütterung von intakten Tabakblättern mit Tropinon erbrachte keine positiven Ergebnisse. Tropinon war in großen Mengen aufgenommen wurden. Wären auch nur geringe Mengen an aktivem Enzym vorhanden gewesen, hätte über den Zeitraum von 48 h Pseudotropin oder dessen Ester akkumulieren müssen, da in Tabak dieser Teil der Tropanbiosynthese nicht vorhanden ist.

Es muss ergänzt werden, dass sich dieses Pflanzensystem zu diesem Zeitpunkt noch in der Entwicklung befand. Später konnte die Expression von *Nicotiana tabacum* PMT in den Blättern gezeigt werden [Sauer, in Vorbereitung].

Da über Genisolierung und rekombinante Expression eine Charakterisierung der TRII nicht möglich war, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Viacheslav Reva (Universität Chisinau, Moldavien) das native Protein aus Wurzelkulturen isoliert und gereinigt (C 2.3). Eine vollständige Reinigung war aus Stabilitätsgründen nicht möglich, so dass anschließende Versuche, das Protein zu sequenzieren, zu keinem Erfolg führten. Das Enzym wurde hinsichtlich seiner biochemischen Eigenschaften und katalytischen Parameter charakterisiert (vgl. C 2.4, D 1.5).

Zusammenfassend bleibt die Frage offen, ob das isolierte Gen wirklich für eine Tropinonreduktase kodiert oder eine andere kurzkettige Dehydrogenase oder Reduktase aus *C. sepium* ist (siehe D 1.3). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass dieses Gen für eine evolutionäre Vorstufe einer TRII kodiert. Weiterführende Arbeiten sind an dieser Stelle notwendig und werden in Kapitel D 3 näher erläutert.

D 1.3 Tropinonreduktasen gehören zur Familie der SDR

Die kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (*short-chain dehydrogenases/reductases* SDR) stellen eine große Proteinfamilie dar, die in einer breiten Gruppe von Organismen vorkommen und sehr unterschiedliche Substrate katalysieren [Jornvall et al. 1995]. Durch Kristallstrukturanalysen wurden erste tertiäre Strukturen der $3\alpha/20\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [Ghosh et al. 1991; Ghosh et al. 1994] und der Dihydropteridinreduktase [Varughese et al. 1992] aufgeklärt. Damit wurde das zuvor vermutete katalytische Motiv YxxxK (x steht für beliebige Aminosäuren) in seiner Lage zum Substrat bestätigt. Durch anschließende Mutageneseexperimente wurde gezeigt, dass bei Austausch dieser Aminosäuren ein totaler Aktivitätsverlust entsteht [Albalat et al. 1992; Chen et al. 1993; Cols et al. 1993]. McKinley-McKee und Mitarbeiter postulierten den Reaktionsmechanismus, bei welchem die Hydroxylgruppe des Tyrosins, stabilisiert durch Lysin, als nucleophiler Katalysator bei der Übertragung eines Hydridions auf die Ketogruppe des Substrates fungiert [McKinley-McKee et al. 1991].

Tanaka und Mitarbeiter zeigten durch Röntgenkristallstrukturanalyse der 7α -Hydroxysteroiddehydrogenase die Bindung des NADH [Tanaka et al. 1996b]. Die dem Ser¹⁴⁹ (TRI) und dem Ser¹⁴⁶ (putTR) entsprechenden Aminosäuren sollen eine Wasserstoffbrückenbindung zum Cosubstrat eingehen und damit die Reaktion stabilisieren. Das Motiv GxxxGxG im N-terminalen Bereich ist hochkonserviert und trägt zur Bindung des Cosubstrates bei. Mutageneseexperimente des ersten Glycins an der Alkoholdehydrogenase von *Drosophila* zeigten den totalen Aktivitätsverlust bei Austausch mit anderen Aminosäuren [Chen et al. 1990]. Weitere hochkonservierte Aminosäuren sind Gly¹⁴², Ser¹⁴⁹ und Pro¹⁹² (Positionen bezogen auf CS-TRI).

Durch Kristallisation der TRII aus *D. stramonium* zusammen mit dem Cofaktor NADP⁺ wurde dessen Bindung genau bestimmt [Nakajima et al. 1998]. Die Carboxyamidgruppe des Nicotinamidringes wird vom Hauptkettenstickstoff und -sauerstoff der Aminosäure Ile¹⁹⁵ und des Seitenkettensauerstoffs von Thr¹⁹⁷ (bei TRI) gebunden. Damit entsteht eine Ausrichtung des Nicotinamidringes, der mit der vorher postulierten Spezifität für einen pro S-Protonentransfer bei beiden Tropinonreduktasen übereinstimmt [Hashimoto et al. 1992]. Arg²² und Arg⁴⁴ (TRI) sowie Arg¹⁹ und Arg⁴¹ (put-TR) bilden über ihre Seitenketten die Verbindung zum 2'-Phosphat des NADPH [Nakanishi et al. 1996; Tanaka et al. 1996a]. Diese Verbindung wird durch Ser⁴³ (TRI) bzw. Ser⁴⁰ (put-TR) stabilisiert. Befindet sich an dieser Stelle Asparagin, wechselt die Affinität des Cosubstrates von NADPH zu NADH, was durch gerichtete Mutagenese von Thr (welches dem Ser vergleichbar ist) zu Asp nachgewiesen wurde [Nakanishi et al. 1997].

Die TRI als auch die putative TR von *C. sepium* gehören zur Familie der SDR. Sowohl das katalytische als auch das glycinreiche Motiv GxxxGxG sowie weitere hochkonservierte Amino-

säuren sind vorhanden (Abb. C-1, Abb. C-8). Die für die Ausbildung der Cosubstratbindung beteiligten Bindungsstellen ordnen beide Enzyme in die NADPH als Cosubstrat akzeptierende Klasse dieser Familie ein.

D 1.4 Substratbindung und Stereospezifität der Tropinonreduktasen

Alle bisher bekannten Tropinonreduktasen weisen eine hohe Stereospezifität auf und katalysieren jeweils nur die Reduktion der Ketogruppe des Tropinons zur axialen oder äquatorialen Hydroxylgruppe. Die Substratbindungsstelle wurde jeweils in der C-terminalen Hälfte des Proteins vermutet, da dieser Teil geringere Homologien als der N-terminale Teil zeigte. Von Nakajima und Mitarbeitern wurden deshalb Chimere zwischen der TRI und TRII von *D. stramonium* konstruiert [Nakajima et al. 1994]. Sie wiesen nach, dass der für die Substratbindung verantwortliche Bereich innerhalb von 120 Aminosäuren im C-terminalen Bereich der Sequenz liegen muss. Durch nachfolgende Kristallisationsexperimente beider Enzyme von *D. stramonium* war anhand der entstehenden Bindungstasche die Lage des Tropinons ableitbar [Nakajima et al. 1998; Yamashita et al. 1999]. Es werden 11 Aminosäuren für die Bindung des Tropinons postuliert. In der TRII wird Tyr¹⁰⁰ mit seiner negativen Ladung für die Ausrichtung des Tropinons mit dem positiv geladenen Brückenstickstoff bestimmt. His¹¹² in TRI mit seiner positiven Ladung stößt den positiv geladenen Stickstoff eher ab, was zur entgegengesetzten Bindung des Tropinons führt. Mit gerichteter Mutagenese der 5 wichtigsten Aminosäuren zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass ein alleiniger Austausch von His¹¹² → Tyr keinen direkten Einfluss auf die Stereospezifität hat. Das Histidin spielt aber eine Rolle für eine effiziente Katalyse [Nakajima et al. 1999b].

In einer erneuten Kristallisation der DS-TRII mit Cosubstrat und Substrat, das durch kontinuierlichen Zufluss an das Enzym herangeführt wurde, konnte gezeigt werden, wie sich die Lage der Aminosäuren der Bindungstasche als auch das Substrat im Verlauf der Katalyse verändern. Es wurde bestätigt, dass Tyr¹⁵⁹ (aus dem YxxxK-Motif) als Protonendonator fungiert. Während der Katalyse bewegt sich die Seitenkette von Glu¹⁵⁶ nach unten, als ob sie die Aminogruppe des Tropinons nach unten drückt. Ser¹⁴⁸ wechselt seine Lage ebenso, die Bewegung des Glu¹⁵⁶ unterstützend. Thr²⁰⁰, Leu²¹⁰ und Leu²¹³ schwingen zur Seite, um der sich nach unten bewegenden Methylgruppe des Brückenstickstoffs Platz zu machen. Die Seitengruppe des Tyr¹⁵⁹ bewegt sich ebenfalls leicht zur Seite. Das Produkt Pseudotropin wird freigesetzt. Mit diesen Untersuchungen wurden die an der Substratbindungsstelle beteiligten wichtigen Aminosäuren bestätigt [Yamashita et al. 2003].

D 1.4.1 Tropinonreduktase I

Die Tropinonreduktase I aus *C. sepium* katalysiert stereospezifisch nur die Reduktion zum Tropin, weist allerdings sehr viele Unterschiede zu den von Nakajima und Mitarbeitern postulierten Aminosäuren auf, die an der Tropinonbindung beteiligt sind (vgl. Tab. C-2, Abb. D-1). Ala¹⁵¹, Val¹⁹⁴, Leu¹⁹⁹, Val²⁰⁰ und Ile²¹³ (die Positionsnummern beziehen sich auf CS-TRI) sind identisch. Val¹¹⁰ ist gegen Ile, Ile¹⁵⁹ gegen Val und Leu¹⁶⁵ gegen Val ausgetauscht, welche

alle Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten darstellen. Anstelle von Val¹⁶⁸ befindet sich bei der CS-TRI Thr, womit eine polare ungeladene Seitenkette eingeführt wird. Die Mutation von Val¹⁶⁸→Glu führt bei DS-TRI zu einer starken Erhöhung des K_m -Wertes bei minimaler Beeinflussung der Stereoselektivität [Nakajima et al. 1999b]. Das freie Elektronenpaar der Hydroxylgruppe der Threoninseitenkette könnte mit der negativen Ladung der Glutaminsäure verglichen werden und würde den bei der CS-TRI gemessenen hohen K_m -Wert erklären (C 2.4). His¹¹² ist gegen Pro ausgetauscht, womit die positive Ladung fehlt, die von Nakajima und Mitarbeitern als nicht für die Stereospezifität nötig, aber für die katalytische Effizienz notwendig beschrieben wird. Diese zweite starke Veränderung im Vergleich zu den bekannten TRI könnte die geringe katalytische Aktivität der CS-TRI erklären. Phe²²⁶ ist durch Met ersetzt, womit sich eine polare Seitenkette in räumlicher Nähe zu Pro¹⁰³ befindet. Trotz dieser starken Unterschiede zu den TRI der Solanaceen katalysiert dieses Enzym stereospezifisch die Reduktion vom Tropinon zum Tropin. Dieses Beispiel widerlegt das Postulat von Nakajima und Mitarbeitern, dass bei starker Abweichung in den wichtigen AS der Substratbindungsstelle eine Tropinonreduktion nicht stattfinden kann [Nakajima et al. 1999d].

DS-TRI	108-GVVIHKE-114	157-SSLAGFSALPSVSL-170
CS-TRI	99-GTILEKD-105	148-SSVAGIIPVFKITL-161
DS-TRI	201-PGVILTPLVETAIKKNPHQKEEIDNFIV-228	
CS-TRI	192-PWVIRTKLVN-DFDSESEGSEETERMIR-218	

Abb. D-1: Ausschnitt aus den TRI-Sequenzen von *D. stramonium* und *C. sepium*. Grün hervorgehoben sind die von Nakajima et. al an der Substratbindungsstelle postulierten beteiligten Aminosäuren [Nakajima et al. 1999b].

Zur Aufklärung der exakten Ausformung des Substratbindungsstelle können nur Kristallisationsstudien mit Substrat und Produkt oder Co-Kristallisation mit anschließender Infiltration des Substrates beitragen. Weiterhin wäre eine gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren mit anschließender Charakterisierung des rekombinanten Proteins sinnvoll.

D 1.4.2 Die putative Tropinonreduktase

Betrachtet man die anhand des Homologievergleiches mit bekannten TRII ermittelten Aminosäuren der putCS-TR, die an der Substratbindungsstelle beteiligt sein sollten, so lassen sich starke Unterschiede zwischen diesen feststellen (Tab. C-4, Abb. D-2). Die Substratbindungsstelle von DS-TRII ist von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (Val¹⁴⁷, Val¹⁹¹, Leu¹⁹⁶, Val¹⁹⁷, Leu²¹⁰, Leu²¹³) umgeben, durch welche die Orientierung des Tropinons durch van der Waals Kräfte zur C6-C7-Methylenbrücke und der Methylgruppe des Stickstoffs zustande kommt [Yamashita et al. 1999].

DS-TRII	96-GI	V	I	K	E-102	145-SS	V	S	G	A	L	A	P	Y	E	A	V-158									
CS-putTR	96-AT	I	I	K	E-102	145-SS	C	A	S	F	V	F	V	P	V	H	T	V-158								
DS-TRII	189-PG	V	I	A	T	S	L	V	E	M	T	I	Q	D	P	E	Q	K	E	N	I	N	K	L	I	D-215
CS-putTR	189-PW	A	M	R	T	S	L	T	E	A	A	R	E	E	A	G	G	-E	I	L	E	A	L	I	Q-214	

Abb. D-2: Ausschnitt aus derTRII-Sequenz von *D. stramonium* und der putativen TR aus *C. sepium*. Grün hervorgehoben sind die von Yamashita et. al an der Substratbindungsstelle postulierten beteiligten Aminosäuren [Yamashita et al. 1999].

In der putativen CS-TR sind einige dieser Aminosäuren identisch oder durch ähnliche Aminosäuren ersetzt, andere unterscheiden sich stark durch polare Seitenketten (Cys¹⁴⁷, Thr¹⁹⁷). Glu¹⁵⁶ von DS-TRII (in räumlicher Nähe zu Tyr¹⁰⁰) befindet sich in der Nähe des Brückenstickstoffs und bewirkt über elektrostatische Interaktion mit seiner negativen Carboxylgruppe die Bindung des Substrates über den positiv geladenen Stickstoff. Diese Vermutung wurde in jüngsten Kristallisationsstudien mit Cosubstrat und Substrat unter Durchflussbedingungen bestätigt [Yamashita et al. 2003]. An dieser Stelle (156) befindet sich in der putCS-TR ein Histidin mit einer positiven Ladung, was bei gleicher Faltung und Positionierung eher zu einer Abstoßung des Substrates führen sollte. Weiterhin sind die Aminosäuren Tyr¹⁰⁰ durch Pro und Ser¹⁴⁸ durch Alanin ersetzt. Für Veränderungen an diesen Stellen zusammen mit Glu¹⁵⁶ wird ein 90%iger Verlust der Stereospezifität bei *D. stramonium* beschrieben [Nakajima et al. 1999b].

Ein Vergleich mit den TRI der Solanaceen zeigt noch stärkere Abweichungen im Bereich der an der Substratbindungsstelle beteiligten Aminosäuren (Abb. D-3).

DS-TRI	108-GV	V	I	H	K	E-114	157-SS	L	A	G	F	S	A	L	P	S	V	S	L-170								
CS-putTR	96-AT	I	I	K	E-102	145-SS	C	A	S	F	V	F	V	P	V	H	T	V-158									
DS-TRI	201-PG	V	I	L	T	P	L	V	E	T	A	I	K	K	N	P	H	Q	K	E	E	I	D	N	F	I	V-228
CS-putTR	189-PW	A	M	R	T	S	L	T	E	A	A	R	E	E	A	G	G	--E	I	L	E	A	L	I	Q-214		

Abb. D-3: Ausschnitt aus der TRI-Sequenz von *D. stramonium* und der putativen TR aus *C. sepium*. Grün hervorgehoben sind die von Nakajima et. al an der Substratbindungsstelle postulierten beteiligten Aminosäuren [Nakajima et al. 1999b].

Diese Betrachtungen könnten zu dem Schluss führen, dass es sich beim korrespondierenden Protein der hier isolierten cDNA nicht um eine funktionstüchtige Tropinonreduktase handeln kann. Allerdings liegen bei der Ausbildung der Substratbindungsstelle innerhalb der CS-TRI ebenfalls starke Unterschiede vor. Dieses Enzym ist dagegen als Tropinonreduktase aktiv und stereospezifisch. Verschiedene Studien belegen, dass teilweise nur kleine Variationen in der Aminosäuresequenz erforderlich sind, um die Substratspezifität eines Enzyms zu verändern. So führt die Substitution nur einer Aminosäure in der Lactatdehydrogenase von *Bacillus stearothermophilus* dazu, das Enzym in eine Malatdehydrogenase zu verändern [Clarke et al. 1989]. Möglicherweise wurde hier eine Mutante isoliert, die bei der Evolution der Tropinon-

reduktasen entstanden ist. Eine eindeutige Aussage zur Funktionalität der putativen TR kann nur eine rekombinante Expression mit intaktem löslichen Protein bringen.

Der Homologievergleich mit anderen bisher in den Datenbanken als TR-ähnliche Proteine beschriebenen Sequenzen bringt keinen weiteren Aufschluss. Dazu wurden 11 Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, weitere aus *Lycopersicon esculentum* (AI484514), *Medicago truncatula* (AJ388821), *Glycine max* (BQ079995) und *Oryza sativa* (CA762155) mit der putCS-TR verglichen. Die Homologien auf Aminosäureebene liegen zwischen 46% und 53% und sind damit nicht höher als die der TRs der Solanaceen.

D 1.5 Katalytische Eigenschaften der Tropinonreduktasen

Tropinonreduktasen wurden bereits in *H. niger* [Hashimoto et al. 1992], *D. stramonium* [Koelen et al. 1982; Portsteffen et al. 1994], *A. belladonna* [Draeger et al. 1994b], *B. candida x aurea* [Boswell et al. 1999] und *S. tuberosum* [Keiner et al. 2002] charakterisiert. Für die heterolog exprimierte CS-TRI und die angereinigte native CS-TRII wurden das pH-Optimum, die Substratspezifität durch Test auf Akzeptanz von Substratanaloga und die katalytischen Parameter K_m und V_{max} für Tropinon als Substrat bestimmt (C 1.2, C 2.4).

Die TRI weist ein schmales pH-Optimum bei pH 7,0 auf, was typisch für die bereits bekannten TRI ist. In hohen pH-Bereichen zwischen pH 8-10 ist dieses Enzym in der Lage, die Rückreaktion – also die Oxidation des Tropins zum Tropinon – mit einem Optimum bei pH 9,0 zu katalysieren. Diese Eigenschaft wurde auch bei den TRI von *D. stramonium* und *H. niger* beobachtet [Hashimoto et al. 1992; Portsteffen et al. 1994]. Der K_m -Wert für Tropinon wurde bei pH 6,4 bestimmt und lag mit 5,88 mM sehr hoch. Die TRI der Solanaceen liegen im Bereich von 0,775 mM bis 1,560 mM. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) ist dagegen mit 7,194 nkat/ μ g Protein sehr hoch. Auch war bei Substratkonzentrationen $< 0,1$ mM keine Tropinonreduktion mehr messbar, was auf eine schlechte Substratbindung hinweist. Führt man die Betrachtungen zu den an der Ausbildung der Substratbindungsstelle beteiligten Aminosäuren (erhalten durch Homologievergleich mit der kristallisierten TRI aus *D. stramonium*, D 1.4.1) hinzu, ist die schlechte katalytische Aktivität ferner durch den Austausch von essentiellen Aminosäuren zu erklären [Nakajima et al. 1999b]. Des weiteren muss die heterologe Expression mit einem 6fach Histidinrest berücksichtigt werden, von welchem wir ohne den Vergleich einer nativen TRI nicht wissen, welchen Einfluss er auf die Faltung des Proteins und damit seiner Ausbildung des aktiven Zentrums hat. In der Literatur werden teilweise von starken Veränderungen der Proteineigenschaften durch additive Histidinreste berichtet [Araujo et al. 2000; Rumlova et al. 2001]. Andererseits wird diese Art der schnellen und einfachen Proteinreinigung bei vielen rekombinanten Expressionen erfolgreich angewandt, z.B. bei der Proteinexpression der SPDS von *Nicotiana glauca* [Hashimoto et al. 1998b]. Die kinetischen und physikalischen Untersuchungen der nativen Protoporphyrinogen-Oxidase des Menschen und des gleichen rekombinanten Enzyms mit einem Histidinanhang zeigen keine Unterschiede [Dailey et al. 1997].

Beim Test auf die Akzeptanz von Substratanaloga wiesen die Cyclohexanone die größten Aktivitäten mit einer 6-8fachen Erhöhung gegenüber Tropinon auf (Abb. C-4). Durch den Austausch von His¹⁰³ zu Pro fehlt die positive Ladung, die das Tropinon richtig in der Bindungstasche positionieren würde. Es ist vorstellbar, dass durch die fehlende Ladung die nicht polaren Cyclohexanone besser binden und damit schneller umgesetzt werden. Eine Vergrößerung des N-Substituenten beim 4-Piperidinon erhöht die Umsetzung ebenso. Mit *N*-Propyl-4-piperidinon wurde bei *H. niger* und *D. stramonium* gar kein Umsatz gemessen, hier lag er 5fach höher im Vergleich zum Tropinon. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass durch die hydrophobe Propylgruppe die Ladung des Stickstoffs abgeschirmt wird und durch die fehlende positive Ladung (Austausch His¹⁰³→Pro) auch hier eine bessere Bindung erfolgen kann. Damit unterscheidet sich die CS-TRI deutlich von den ansonsten in ihren Eigenschaften sehr ähnlichen TRI der Solanaceen.

Die native TRII zeigt ein breites pH-Optimum zwischen pH 4,5 und 5,5, wobei ein nur geringer Aktivitätsabfall bis pH 7,0 (ca. 70% der Optimalaktivität) zu beobachten ist (Abb. C-12). Damit ähnelt die CS-TRII der ST-TRII, die ebenso im saureren Bereich bei pH 5,0 ihr pH-Optimum hat, wohingegen die Optima der HN- und DS-TRII bei pH 6,2 liegen. Die breite pH-Akzeptanz lässt sich bei den bekannten TRII ebenso finden. Die Oxidation des Pseudotropins zum Tropinon wird nicht katalysiert, auch nicht in sehr hohen pH-Bereichen bis pH 10,0. Der K_m -Wert für Tropinon am pH-Optimum 5,5 wurde mit 0,071 mM bestimmt und liegt in der gleichen Größenordnung wie die der TRII der Solanaceen (0,034 mM – 0,176 mM). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit am pH-Optimum liegt mit 1310 nkat/mg sehr hoch und ist damit 3 - 30fach gegenüber den TRII der Solanaceen erhöht (45,4 nkat/mg – 387 nkat/mg) (C 2.4). Vergleichbare Schwankungen ergeben sich für die katalytischen Konstanten [Hashimoto et al. 1992; Keiner et al. 2002; Portsteffen et al. 1994].

Bei der Untersuchung der Akzeptanz auf Substratanaloga wurden die Piperidinone 3-6fach erhöht umgesetzt als Tropinon (Abb. C-13). Eine halb so starke Erhöhung konnte bei der TRII von *A. belladonna* beobachtet werden [Draeger et al. 1994b]. Die Reduktion der Cyclohexanone erfolgte im gleichen Größenbereich wie Tropinon. 3-Chinuclidinon wird nicht als Substrat akzeptiert, was ein gemeinsames Merkmal aller TRII ist. Die native CS-TRII ist damit in ihren katalytischen Eigenschaften den Tropinonreduktasen der Solanaceen sehr ähnlich.

D 1.6 Die genomische Organisation und Expression der trI

Die genomische Organisation der trI wurde mittels Southern Blot Analyse untersucht (C 1.4). Um Kreuzhybridisierung auszuschließen, wurde eine Sonde im 5'-Ende des Gens gewählt, in welchem die Homologie zur putCS-tr gering war. Durch Dot Blot Versuche wurde die Spezifität der Sonde gegenüber einer putCS-tr-Sonde geprüft (Daten nicht gezeigt). Es wurden nach Restriktion mit unterschiedlichen Enzymen 3-5 Signale erhalten (Abb. C-6). Das lässt auf eine Genfamilie innerhalb der trI schließen. Im Vergleich dazu wurden in *D. stramonium* 2-4 Signale für die trI erhalten [Nakajima et al. 1993b], für *A. belladonna* mindestens 2 [Nakajima et al. 1999c], in *S. tuberosum* 1-2 [Keiner 2001]. Einzig in *H. niger* wurde nur 1 Kopie der trI gefunden [Nakajima et al. 1999c]. Ähnlich verhält es sich mit den Kopienzahlen der trII.

Da eine Restriktion innerhalb der Intronstrukturen nicht ausgeschlossen werden kann, könnte es bei den kleineren Fragmenten zur Detektion von Teilen des Gens gekommen sein. Damit würde sich die Anzahl der Kopien reduzieren. Um das sicherzustellen, müsste die genomische DNA der trI isoliert und sequenziert werden. Auch das Screenen einer genomischen Bibliothek und die Charakterisierung der Klone würden zur Aufklärung der genomischen Organisation der Genfamilie beitragen.

Die Genexpression der trI wurde in den verschiedenen Pflanzenteilen und jeweiligen Entwicklungsstufen der Wurzelkultur untersucht (C 1.3). Als Sonde diente das gleiche wie für den Southern Blot verwendete 5'-Ende der cDNA. Positive Signale wurden in allen Altersstufen der Wurzelkultur, in der Pflanzenwurzel selbst und ein schwaches Signal in der Sprossachse der Pflanze erhalten (Abb. C-5). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Tropinonfütterung an junge Blätter (ganze Sprossspitzen, C 4.1), die zur Tropinbildung befähigt waren, wurde keine RNA-Akkumulation in den Blättern nachgewiesen, obwohl das Experiment mehrfach mit RNA unterschiedlicher Probenahmen wiederholt wurde. Damit ist *C. sepium* die zweite Pflanze nach *S. tuberosum*, in der eine oberirdische Transkription von Tropinonreduktasen nachgewiesen wird [Keiner et al. 2002].

In *S. tuberosum* akkumulieren zudem Transkripte der trII in den Keimen der Kartoffelknolle, Transkripte der trI auch in kleinen Knollen, im Gewebe um den Gefäßring in der Knolle, den dormanten Augen und den Keimen [Keiner 2001]. In *H. niger* wurden mittels Western Blot TR-Proteine in den Seitenwurzeln nachgewiesen [Nakajima et al. 1999a]. Eine unterschiedliche zellspezifische Lokalisation der einzelnen Enzyme wurde aufgezeigt. Während TRI hauptsächlich in der Endodermis und der äußeren Rinde vorkommt, befindet sich die TRII im Perizykel, der Endodermis und im inneren Rindenbereich. Die PMT in *A. belladonna* [Suzuki et al. 1999a] wird im Perizykel der Wurzel gefunden. Damit kann ein Transport der Intermediate zwischen den Zellschichten stattfinden.

Da in allen Pflanzenteilen Calystegine akkumulieren (C 3.1), besteht die Frage nach dem Ort der Biosynthese. Eine außerhalb der Wurzeln ablaufende Produktion kann nicht ausgeschlossen werden. Neben den akkumulierenden Transkriptmengen sollten ferner auch die Proteine selbst untersucht werden. Eine immunohistochemische Detektion mit Antikörpern innerhalb der Gewebe oder Western Blot mit aus dem Gewebe gewonnenem Protein wären die Methoden der Wahl.

D 1.7 Evolutionäre Betrachtungen

Über die evolutionäre Entstehung der Tropinonreduktasen gibt es nur wenige Untersuchungen und somit großen Raum für Spekulationen. Eine Theorie geht von einem TR-Protoenzym aus, das sich aus einem Gen der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen der Solanaceen monophyletisch durch Mutation gebildet hat. Dieses Protein besaß noch keine Stereospezifität. Es erlangte diese erst nach Genduplikationen mit anschließenden Mutationen in der Substratbindungsstelle, so dass zwei stereospezifische TRs entstanden [Nakajima et al. 1993b]. Diese mögliche Entwicklung bekräftigen Nakajima und Mitarbeiter nach der Struktur-

aufklärung der Tropinonreduktasen in *D. stramonium*, in der sie zeigen, dass beide Enzyme den gleichen strukturellen Aufbau/Faltung haben und nur Aminosäuren innerhalb der Substratbindungsstelle die Stereoselektivität beeinflussen [Nakajima et al. 1998]. Eine ähnliche Entstehung wird für Hydroxysteroiddehydrogenasen diskutiert [Bennett et al. 1997]. Eine andere Entwicklung wird z.B. für die stereospezifisch wirksamen D- und L-Lactatdehydrogenasen aus *Lactobacillus pentosus* angenommen, welche sich in ihrer Faltung sehr stark voneinander unterscheiden und zu unterschiedlichen Enzymgruppen gehören [Stoll et al. 1996].

Von der evolutionären Entwicklung innerhalb der Solanaceen weichen Nakajima und Mitarbeiter später ab, als auch in *Arabidopsis thaliana* und *Lycopersicon esculentum* TR-ähnliche Gene sequenziert werden. Sie gehen jetzt von der Möglichkeit aus, dass erst eine TR mit Stereospezifität für eine β -Konfiguration vorlag, aus der sich durch Verdopplung und Mutation die α -Konfiguration entwickelt hat. Pflanzen, die beide Biosynthesewege zu den Tropan- als auch den Nortropanalkaloiden entwickelt haben, könnten einen Vorteil daraus gezogen haben. Sie diskutieren, dass die TRII das ältere Enzym sein könnte, da bislang nur Pflanzen mit beiden oder nur aus dem TRII-Weg resultierenden Alkaloiden gefunden wurden [Nakajima et al. 1999b]. Dies würde für nur Calystegine produzierende Pflanzen, wie *C. sepium* und *S. tuberosum*, sprechen. In beiden Spezies wurde eine TRI nachgewiesen [Keiner 2001], die ein Vorbote für die Entwicklung weiterer Sekundärstoffe sein könnte. Andererseits deutet der Nachweis von Tropinestern in verschiedenen *Erythroxylum*-Spezies auf die Existenz von TRI in diesen Pflanzen hin [Chavez et al. 2002; Christen et al. 1995]. Dort wurden keine Nortropanalkaloide nachgewiesen. Damit ist fraglich, welche der beiden Reduktasen wohl die ältere ist.

Nach Betrachtung der isolierten TRI aus *C. sepium* mit ihren stark abweichenden Aminosäuren innerhalb der Substratbindungsstelle als auch im Grundgerüst des Proteins stellt sich die Frage, ob innerhalb der einzelnen Pflanzenfamilien eine polyphyletische Entwicklung der Tropinonreduktasen stattgefunden hat. Die Convolvulaceen sind nahe verwandt mit den Solanaceen. Eine Untersuchung von TRs in phylogenetisch weiter entfernt liegenden Pflanzenfamilien würde weitere Aufschlüsse bringen. Die Moraceen mit den Vertretern *Morus alba* oder *Morus bombycis*, in denen ebenfalls Calystegine nachgewiesen wurden [Asano et al. 1994a], könnten für diese Untersuchungen herangezogen werden.

D 2 Die Biosynthese der Calystegine

D 2.1 Akkumulation von Calysteginen und ihrer Metabolite in *Calystegia sepium*

Calystegine als Nortropanalkaloide wurden erstmals in dem Windengewächs *Calystegia sepium* entdeckt und identifiziert [Goldmann et al. 1990; Tepfer et al. 1988]. Allerdings wurde zum damaligen Zeitpunkt die Akkumulation nur in den Wurzeln aufgezeigt. Später wiesen Schimming und Mitarbeiter die Calystegine A₃, B₁ und B₂ in Blüten und Blättern, zusätzlich auch A₅ und B₃ in Blättern der Ackerzaunwinde nach [Schimming et al. 1998]. Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (in Zusammenarbeit mit Dirk Höke, Promotionsstudent am Institut für Pharmazeutische Biologie, MLU Halle-Wittenberg) belegen die Akkumulation von

Calystegin A₃, A₅, B₁ und B₂ in allen oberirdischen Pflanzenorganen mit Calystegin A₃ als Hauptalkaloid gefolgt von B₂ und B₁ (C 3.1). Calystegin B₃ konnte nicht nachgewiesen werden. Das Pflanzenmaterial bzw. die Samen zur Anzucht stammen aus Wildsammlungen, ebenso wie das Material von Schimming und Mitarbeitern. Junge meristematische Gewebe enthalten den höchsten Gehalt an Gesamcalystegin (5,5 mg/g TM in 4-5 Tage alten Keimlingen). Mit zunehmendem Alter der Pflanze nimmt dieser ab (vgl. Abb. C-14, [Scholl et al. 2001b]). Ähnliche Ergebnisse sind bei verschiedenen Vertretern der Solanaceen zu finden. So beträgt die Calysteginmenge in jungen Sprossspitzen von *A. belladonna* ca. 7 mg/g TM [Draeger et al. 1995]. Der in der Sprossachse von *C. sepium* enthaltene Milchsaft zeigt dagegen nur Spuren von Calysteginen.

Die transformierten Wurzelkulturen zeigen das gleiche Spektrum an Calysteginen wie die Pflanzen. Zusätzlich ist hier 2,7-Dihydroxynortropin nachzuweisen [Asano et al. 2001b]. Es akkumuliert allerdings nur in sehr geringen Mengen (< 10 µg/g TM), welche vergleichbar zu Calystegin A₅ sind. Die Gesamcalysteginproduktion in den Wurzelkulturen verläuft parallel mit der Zunahme an Biomasse und ist nach 16-18 Tagen maximal (1,5 mg/g TM) [Boettcher 1997; Scholl et al. 2001b]. Die Wurzelkulturen von *Atropa belladonna* zeigen ein ähnliches Akkumulationsverhalten (2 mg/g TM Gesamcalystegin [Rothe et al. 2001]).

Erstmals wurde die Akkumulation von Tropin in *C. sepium* gezeigt. In oberirdischen Teilen von *Convolvulus arvensis* wird ebenfalls Tropin nachgewiesen [Todd et al. 1995]. Verschiedene Tropinester werden von Convolvulaceen gebildet [Hegnauer 1989], z.B. Convolamin in *Convolvulus krauseanus* [Jagudaev et al. 1985] und Phyllalbin in *Convolvulus subhirsutus* [Sharova et al. 1980]. Des weiteren akkumulieren auch *N*-demethylierte Ester, wie Convolvin (Abb. D-4). Welche weiteren Alkaloide aus Tropin in *Calystegia* gebildet werden, ist unbekannt und konnte auch mit zusätzlicher Tropinfütterung nicht geklärt werden. Im Vergleich zu ungefütterten Kontrollen akkumulierte ein Metabolit, der anhand seines Fragmentierungsmusters nach GC-MS-Untersuchungen ein Tropinester sein sollte (C 1.5).

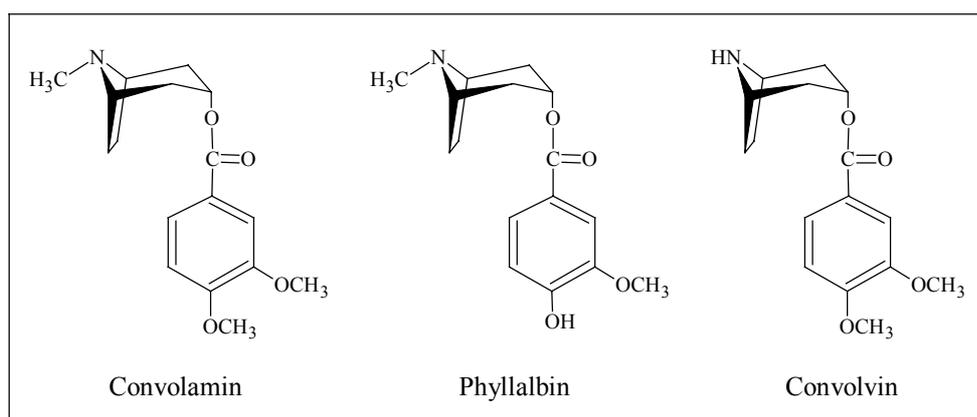


Abb. D-4: Tropin- und Nortropinester aus *Convolvulus subhirsutus* und *Convolvulus krauseanus*.

Die Metabolite Tropinon, Tropin und Pseudotropin konnten in allen Pflanzenorganen von *C. sepium* nachgewiesen werden (C 4.1). In den oberirdischen Geweben finden sich alle 3 Metabolite mit nahezu gleichem Gehalt, der zwischen 20-40 µg/g TM liegt. In den

Wurzelkulturen ist ca. 3 mal soviel Pseudotropin (250 µg/g TM) wie Tropin nachweisbar, Tropinon akkumuliert in nur geringem Maß (25 µg/g TM).

D 2.2 Calystegine werden aus Tropinon gebildet

Der Nachweis der Biosynthese der Calystegine aus Tropinon erfolgte durch eine Fütterung mit markiertem ^{15}N -Tropinon. Mit NMR und GC-MS-Untersuchungen konnte der Einbau der Markierung in dem Metaboliten Pseudotropin als auch in den Calysteginen qualitativ und quantitativ verfolgt werden (C 3.2).

Mit NMR-Spektroskopie nachweisbare stabile Isotope, wie ^2H , ^{13}C und ^{15}N , werden bei der Aufklärung von Pflanzenbiosynthesen und physiologischen Untersuchungen zahlreich eingesetzt [Martin 1985]. Obwohl ^{15}N Stickstoff eine niedrige Sensitivität in der NMR-Analyse aufweist, wurde er in verschiedenen Studien erfolgreich verwendet. Eindimensionale ^{15}N -NMR wurde in aminosäurehaltigen Extrakten zum Nachweis des Stickstoffmetabolismus im Phenylpropanstoffwechsel eingesetzt [Razal et al. 1996]. Ford und Mitarbeiter führten *in-vivo*-Messungen in Wurzelkulturen von *N. tabacum* und *D. stramonium* durch, nachdem diese auf ^{15}N -angereicherten Medien gewachsen waren. Sie untersuchten sowohl die Stoffe des Primärstoffwechsels als auch das Spektrum der akkumulierenden Alkaloide. Calystegine wurden in diesen Experimenten nicht detektiert. Später führten sie eine ^{15}N -Tropinonfütterung an *Datura* Wurzelkulturen durch und wiesen dort ^{15}N -Tropin und ^{15}N -Tropinester nach [Ford et al. 1996].

Eine deutliche Verbesserung der Sensitivität und der Auflösung von NMR-Spektren konnte durch den Einsatz von HMBC- (*heteronuclear multiple-bond-coherence*) und HSQC-Spektroskopie (*heteronuclear multiple-quantum-coherence*) erzielt werden, was bei der Messung von Metaboliten von Tabakzellkulturen angewandt wurde [Mesnard et al. 2000]. Die Entwicklung von Submikroprobenköpfen brachte eine weitere Steigerung der Sensitivität auch ohne ^{15}N -Anreicherung [Hadden et al. 1998]. Unter diesen Voraussetzungen konnten die Extrakte der *Calystegia* Wurzelkulturen nach erfolgter ^{15}N -Tropinonfütterung sowohl mit eindimensionaler ^{15}N -NMR als auch per HMBC-Verfahren vermessen werden (C 3.2.2). Probleme bei veränderten chemischen Verschiebungen zwischen den Referenzsubstanzen und Signalen der vermessenen Extrakte, die wie sich herausstellte pH-abhängig waren, konnten durch Pufferung mit 1 M Phosphatpuffer pH 4,0 beseitigt werden. Ähnliche pH-abhängige Verschiebungen wurden auch von Ford und Mitarbeitern bei ^{15}N -Tropinon beobachtet [Ford et al. 1994].

Tropinon wurde als biosynthetische Vorstufe für die weitere Synthese von Pseudotropin und den Calysteginen A₃, B₁ und B₂ nachgewiesen.

Der Einbau des markierten Tropinons wurde quantitativ per GC-MS anhand der typischen stickstoffhaltigen Fragmente der einzelnen Calystegine verfolgt (C 3.2.1). Pseudotropin war schon nach der ersten Ernte nach 2 Tagen vollständig markiert. Daraus kann man schließen, dass die vorhandenen Pseudotropinmengen innerhalb dieses Zeitraumes weiter metabolisiert wurden und somit nur das aus dem markierten Tropinon neu reduzierte Tropanol akkumulierte. Markiertes Tropin war nicht detektierbar, was mit Beobachtungen von früheren Tropinonfütterungen

übereinstimmt, in denen gezeigt wurde, dass Tropinon erst ab Konzentrationen von 5 mM zu einer erhöhten Tropinbildung führt (C 4.1). 0,5 mM Tropinon, wie hier bei der markierten Fütterung eingesetzt, wurde nur zum Pseudotropin metabolisiert.

Innerhalb der Calystegine war über 4 und 6 Tage ein stetiger Anstieg der Markierung nachweisbar, der im Calystegin A₃ im Vergleich zu den B-Calysteginen schon nach 4 Tagen 50% überstieg und nach 6 Tagen über 90% erreichte. Anhand dieses Ergebnisses kann spekuliert werden, dass aus den trihydroxylierten die tetrahydroxylierten Calystegine gebildet werden. Die Bildung von Calystegin B₁ und B₂ aus A₃ wäre durch eine jeweilige zusätzliche Hydroxylierung möglich.

Damit konnten frühere Experimente von Goldmann und Mitarbeitern bestätigt werden. Sie hatten ¹⁴C-Putrescin als einen frühen Metaboliten der Biosynthese an *C. sepium* Wurzelkulturen gefüttert, was in markierten Calysteginen resultierte [Goldmann et al. 1990]. Nach Fütterung von ¹⁵N-Tropinon an *A. belladonna* Wurzelkulturen konnte nur markiertes Calystegin A₃ nachgewiesen werden [Draeger et al. 1994b]. Von Hibi und Mitarbeitern wurde in Wurzelkulturen von *C. sepium* PMT-Aktivität gemessen, womit frühe Schritte der Calysteginbiosynthese in dieser Convolvulaceae nachgewiesen wurden [Hibi et al. 1992]. Die Biosynthese der Calystegine vom Tropinon ausgehend über eine Reduktion zum Pseudotropin wurde trotzdem immer wieder angezweifelt [Molyneux et al. 1996] und kann mit diesen Untersuchungen als gesichert gelten.

D 2.3 Die Kinetik der Calysteginbildung

Von der Beobachtung nach ¹⁵N-Tropinonfütterung an *C. sepium* Wurzelkulturen ausgehend, dass die A-Calystegine anscheinend vor denen der B-Gruppe gebildet werden, wurde die Kinetik der Calysteginbildung durch weitere Markierungsexperimente untersucht (C 3.3). Dazu wurden Wurzeln zuerst auf vollständig mit ¹⁵N-substituiertem Medium herangezogen, dann auf ¹⁴N-haltiges Medium umgesetzt und im Zeitraum von 12 Stunden bis 9 Tagen sowohl mit GC-MS als auch mit NMR auf ihre Calysteginakkumulation untersucht. Ähnliche Markierungen und Untersuchungen von Alkaloidbiosynthesen erfolgten bereits durch Ford und Mitarbeiter [Ford et al. 1994]. Sie zeigten, dass sowohl *D. stramonium* als auch *N. tabacum* Wurzelkulturen sehr gut auf Nährmedien mit substituiertem ¹⁵N-Nitrat und ¹⁵N-Ammonium wachsen und in ihrer Alkaloidbiosynthese nicht gestört sind.

¹⁵N-Nitrat wurde auch für sogenannte Pulse-Chase-Experimente z.B. in *Nicotiana repanda* zum Verfolgen der Nicotin-, Nornicotin- und N-Acylornicotin-Biosynthese verwendet [Laue et al. 2000]. Pulse-Chase-Experimente wurden z.B. angewandt, um die Aufnahme und Umwandlung von ¹⁴CO₂ in Polysaccharide und Stärke in Zellkulturen von Sojabohnen zu verfolgen [Lozovaya et al. 1996], den Purinmetabolismus durch Gabe von ¹⁴C-markierten Vorstufen in Mate-Pflanzen zu untersuchen [Ashihara 1993] oder in Kartoffelknollen transgener Pflanzen die Aktivität des hochregulierten Enzymes ADP-Glucose-Pyrophosphorylase zu bestätigen [Sweetlove et al. 1996].

Das Umsetzen der Wurzelkulturen von ^{15}N -haltigem auf normales ^{14}N -haltiges Medium erfolgte in dieser Reihenfolge, um ein normales Wachstum auf dem isotonenveränderten Medium sicherzustellen. Auch nach Umsetzung nahm die Biomasse parallel zur Gesamtcalysteginakkumulation zu. Nach 24 Stunden waren die ersten neu gebildeten Calystegine detektierbar, was nach 12 Stunden noch nicht der Fall war (Abb. C-18). Zum einen kann es sich hierbei um eine kurze Adaptionsphase an das neue Medium handeln, zum anderen könnten auch erst die Pools der vorhandenen Metabolite für die Biosynthese genutzt worden sein. Die als Ausgangsstoffe verwendeten Aminosäuren mussten ebenfalls neu nachgebildet werden. In vergleichbaren Pulse-Chase-Experimenten von Laue und Mitarbeitern, in denen der Fluss von $^{15}\text{NO}_3^-$ in Nicotin innerhalb der gesamten Tabakpflanze untersucht wird, wurden die ersten Markierungen im Nicotin nach 24 Stunden gemessen [Laue et al. 2000]. Auch hier mussten erst der Primär- und folgend der Sekundärstoffwechsel durchlaufen werden. Werden innerhalb von Biosynthesen Vorstufen gefüttert, können jedoch stündlich neu gebildete Biomoleküle detektiert werden, wie z.B. nach der Gabe von ^{14}C -Cadaverin an *Lupinus*-Arten zur Lupanin- und Sparteinbildung, die nach 4 h bereits messbar war [Wink 1987].

Innerhalb der folgenden 9 Tage wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen neu synthetisiertem Calystegin A_3 und den B-Calysteginen beobachtet. Die Biosynthese lief stetig ab, die gesamte Markierung überschritt 70% nicht. Damit konnte gezeigt werden, dass die zuvor gebildeten Nortropanalkaloide weiter in der Wurzel gespeichert und weder abgegeben noch abgebaut werden. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen des Nährmediums, in dem nur Spuren von Calysteginen gefunden wurden. Insgesamt wird durch das Umsetzen auf frisches Medium ein Biosyntheseschub nach 2 Tagen beobachtet, der danach wieder abflacht. Das kann mit dem Angebot an Nährstoffen und speziell mit der Konzentration an Saccharose zusammenhängen. Untersuchungen der Alkaloidakkumulation in *C. sepium* Wurzelkulturen zeigten bei Veränderung des Nährmediums (halbierte Konzentration der Minerale, 5% Saccharose, B 1.1) eine erhöhte Calysteginbildung [Meier 2001]. Ähnliches wurde auch bei Wurzelkulturen von *A. belladonna* beobachtet [Rothe et al. 2001]. Beim Umsetzen von Wurzelkulturen induziert Saccharose die Calysteginbiosynthese [Rothe 2002]. Solch eine Induktion wurde auch bei der Indolalkaloidbiosynthese in *Catharantus roseus* beobachtet [Schroeder et al. 1999].

Insgesamt kann festgestellt werden, dass mit diesem Pulse-Chase-Experiment keine Aussage über die Reihenfolge der gebildeten Calystegine gemacht werden kann. Die Calystegine der A- und B-Gruppe akkumulieren zum gleichen Zeitpunkt in ähnlichen Mengenverhältnissen. Die zeitlich eher stattfindende Akkumulation von Calystegin A_3 bei zugefüttertem Tropinon kann durch ein limitierendes Enzym zustande gekommen sein, das weitere Hydroxylierungen an A-Calysteginen vornimmt. Dies würde zu einer gleichmäßigen Bildung von A- und B-Calysteginen unter normalen metabolischen Bedingungen führen. Bei Fütterung von 0,5 mM Tropinon war eine absolute Calysteginerhöhung zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, entsteht aus Pseudotropin durch Demethylierung als nächster Metabolit Norpseudotropin (C 4.3.3). Anschließende Hydroxylierungen scheinen nicht limitierend zu sein, da keine dihydroxylierten Nortropane mit für Calystegine typischer äquatorialer 3-Hydroxylgruppe akkumulieren. Werden aus den Calysteginen A_3 und A_5 die B-

Calystegine gebildet, muss dieser Schritt unter normalen metabolischen Bedingungen sehr schnell ablaufen, da in dieser Untersuchung mit fortschreitender Zeit keine schnellere Verdünnung der Markierung im Pool der A-Calystegine zu messen war. Im Fall eine schnelle Einführung einer vierten Hydroxylgruppe stattfindet, so bleibt trotzdem mehr als die Hälfte des Calystegin A₃ unmetabolisiert. Das würde auf einen intrazellulären Abtransport, eventuell in die Vakuole, schließen lassen, wenn wir von einer cytosolischen Biosynthese ausgehen. Dies bedarf experimenteller Aufklärung. Das Modell einer regulierten Hydroxylierung mit anschließendem selektiven Transport würde das für jede calysteginhaltige Pflanze typische, aber unterschiedliche Akkumulationsmuster der verschiedenen Calystegine erklären. Das Auftreten der individuellen Calysteginzusammensetzungen ist zu konstant, um zufällige Hydroxylierungen zu postulieren.

D 2.4 Die Akkumulation von 2,7-Dihydroxynortropan

In den 80er Jahren wurden bereits in *Erycibe*-Arten (Convolvulaceae) Dihydroxynortropane, Baogongten C (2 β ,6 β -Dihydroxynortropan) und Erycibellin (2 β ,7 β -Dihydroxynortropan), nachgewiesen [Chen et al. 1986; Lu et al. 1986]. Asano und Mitarbeiter isolierten 2001 dihydroxylierte Nortropane aus den calysteginhaltigen Pflanzen *Calystegia soldanella* (2 α ,7 β - und 2 α ,3 β -Dihydroxynortropan) und *Duboisia leichhardtii* (3 α ,7 β -Dihydroxynortropan). Zwei dieser Nortropane tragen die für Calystegine typische Hydroxylgruppe in 3 äquatorialer Position nicht. Sie wurden in verschiedenen calysteginhaltigen Arten der Convolvulaceen und Solanaceen nachgewiesen, so auch in *Calystegia sepium* Wurzelkulturen. Akkumulieren in Pflanzenarten dieser beiden Familien keine Calystegine (*Ipomoea nil*, *Cestrum nocturnum*), so waren auch keine Dihydroxynortropane nachweisbar [Asano et al. 2001b].

Diese Beobachtung konnte nach Erhalt der isolierten Referenzsubstanz von uns bestätigt werden. 2 α ,7 β -Dihydroxynortropan akkumuliert in geringen Mengen (5-10 μ g/g FM) in den Wurzelkulturen. In oberirdischen Pflanzenteilen wurden Spuren detektiert.

Nach Fütterung von ¹⁵N-Tropinon wurde die Markierung auch im 2,7-Dihydroxynortropan nachgewiesen. Der Einbau verlief in analogen Mengenverhältnissen und gleicher Zeit wie der in die B-Calystegine (C 3.2). Damit entsteht dieses Nortropan aus Tropinon über bislang unbekannte Schritte. Es kann vermutet werden, dass es sich eher um ein Abbauprodukt als um ein Zwischenprodukt bei der Bildung der Calystegine handelt, da die vom Tropinon über Pseudotropin eingeführte 3 β -Hydroxylgruppe fehlt. Die Betrachtungen der Akkumulationskinetik sprechen auch eher für ein Abbau- als ein Zwischenprodukt. Bei den Pulse-Chase-Experimenten (C 3.3) wurde 2,7-Dihydroxynortropan nur in geringen Mengen nachgewiesen, in denen eine Quantifizierung der markierten Fragmente nicht möglich war.

Es könnte sich aber auch um ein Nebenprodukt der Biosynthese handeln.

D 2.5 Norpseudotropin als weiterer Biosynthesemetabolit

In der Biosynthese der Calystegine bestand bislang die Frage, welcher der nächste metabolische Schritt nach der Bildung des Pseudotropins ist. Wird dieses zuerst demethyliert oder erfolgen zunächst die nötigen Hydroxylierungsschritte?

Der erste Hinweis, dass zuerst die Demethylierung stattfindet, war der Nachweis akkumulierenden Norpseudotropins in den *C. sepium* Wurzelkulturen. Es wurde anhand seiner Retentionszeit und des Fragmentierungsmusters per GC-MS identifiziert (C 4.3.3). Als Referenz stand Nortropin zur Verfügung, welches identisch fragmentiert, aber eine frühere Retentionszeit aufweist (B 2.3.7).

Um den eindeutigen Nachweis der Entstehung des Norpseudotropins aus Pseudotropin zu erbringen, sollte Pseudotropin mit Tritium auf enzymatischem Weg markiert und an Wurzelkulturen gefüttert werden (C 4.3.1). Bei der praktischen Durchführung des Experimentes traten verschiedene Probleme auf. Zum einen waren die Ausbeuten beim Einbau des Tritiums in Pseudotropin sehr niedrig, welches im Widerspruch zu den erfolgten unmarkierten Vorversuchen stand. Bei diesen waren Einbauraten von bis zu 96% zu messen (Daten nicht gezeigt). Es wäre eine Diskriminierung der Substrate durch die beteiligten Enzyme denkbar, was z.B. bei der UDP-Galaktose-4-Epimerase (aus *E.coli*) und der UDP-Galakturonat-4-Epimerase (aus *Anabaena flos-aquae*) [Maitra et al. 1974] sowie der Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase [Sue et al. 1982] beobachtet wurde. Zum anderen traten hohe Verluste der Markierung bei dem Versuch der Reinigung des erhaltenen Wurzelextraktes auf. Da die Reinigung der Calystegine über einen stark sauren Kationenaustauscher (B 2.3.1) erfolgt, kann ein Austausch des Tritiums gegen Wasserstoff nicht ausgeschlossen werden. Tritium wird in wässrigen Lösungen teilweise sehr schnell mit Wasserstoff ausgetauscht [Woelfle et al. 1986]. Solche pH-abhängigen Verluste wurden bereits bei Untersuchungen der Funktionsweise der Riboflavinsynthetase mit markierten Substraten beobachtet [Plaut et al. 1970]. Sollte der Extrakt über Extrelut aufgereinigt werden (B 2.3.2), war das vorherige Einstellen eines sehr hohen pH-Wertes nötig, was nach Extraktion der Tropanole von dem Säulenmaterial ebenfalls zum kompletten Markierungsverlust führte. Durch ein fehlendes Reinigungsverfahren erwiesen sich das Auftragen des Rohextraktes auf DC und die anschließende Entwicklung sehr schwierig. Letztlich war nur markiertes Pseudotropin nachzuweisen (Abb. C-22B).

Das Problem wurde mit einem reversen Fütterungsversuch von unmarkiertem Pseudotropin an komplett mit ^{15}N -markierte Wurzelkulturen gelöst (C 4.3.3). Diese Methode hat den Vorteil, dass die lange und meist schwierige Herstellung eines markierten Substrates entfällt. Durch Verwendung eines stabilen Isotops war die Analyse per GC-MS möglich. Die Quantifizierung des Stickstoffgehaltes in den Fragmenten von Norpseudotropin ergab einen fast vollständigen Anteil von ^{14}N , womit das gebildete Intermediat direkt aus Pseudotropin gebildet worden sein muss.

Nun bestand die Frage nach dem an dieser *N*-Demethylierung beteiligten Enzym. Nach dem derzeitigen Stand der Kenntnis kommen für diese Demethylierung nur Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen in Frage. Die Beteiligung dieser in der oxidativen Demethylierung

verschiedener Xenobiotika höherer Pflanzen wird von [Young et al. 1976] und [Dohn et al. 1984] aufgezeigt. Ein der Bildung des Norpseudotropins aus Pseudotropin sehr ähnlicher Schritt stellt die *N*-Demethylierung des Nicotins zum Nornicotin dar. Auch diese enzymatische Katalyse ist noch nicht aufgeklärt, wird aber als P450 abhängig diskutiert [Chelvarajan et al. 1993; Mesnard et al. 2002].

Für den Nachweis einer Beteiligung von P450 Enzymen wurden starke Inhibitoren und Induktoren an Wurzelkulturen angewandt (C 4.3.4). Unter Einwirkung des Hemmstoffs Tetcyclacis kam es zu einer Senkung der akkumulierten Calysteginmenge. Pseudotropin verringerte sich aber ebenfalls wie auch die gesamte Frischmassezunahme im Gegensatz zu den Kontrollwurzeln stagnierte. Es wird angenommen, dass bei der Applikation des starken P450-Hemmstoffs an eine gesamte Kultur auch der Primärstoffwechsel gehemmt wird und folglich die Sekundärstoffproduktion erniedrigt ist. Die in der Literatur beschriebenen Hemmversuche wurden bislang immer an isolierten Mikrosomen und nicht an gesamten Pflanzen durchgeführt [Funk et al. 1994; Halkier et al. 1991]. Eine Mikrosomenisolierung aus den Wurzelzellen und die Etablierung eines Enzymassays müssten dafür entwickelt werden. Das zur Induktion eingesetzte Phenobarbital brachte keine Erhöhung der Calysteginmengen. Auch bei anderen P450 Enzymen zeigten nicht alle Barbiturate eine induzierende Wirkung [Haider et al. 1997].

Ein weiteres Problem der Untersuchung und Quantifizierung des Norpseudotropins stellt dessen ungleichmäßige Akkumulation dar. Dieser Fakt wird als Ursache angenommen, dass der Metabolit so lange unentdeckt blieb. In ersten Untersuchungen akkumulierte Norpseudotropin in Wurzeln, die auf normalem B5-Medium wuchsen. Einige Monate später war dies nicht der Fall. Der Nachweis erfolgte nur in älteren Wurzeln (> 21 Tage), die auf Medium mit erhöhtem Zuckergehalt gewachsen waren, und auch dort nur in sehr geringen Mengen (15-20 µg/g FM). Es ist bekannt, dass eine erhöhte Saccharosemenge im Medium zu einer gesteigerten Calysteginproduktion in *Calystegia* und *Atropa* führt [Meier 2001; Rothe et al. 2001]. Diese Beobachtung untermauert die Theorie der Beteiligung einer Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenase an der *N*-Demethylierung. Für diese Enzymgruppe wurde eine Induktion mit Saccharose beschrieben [Schroeder et al. 1999]. Eine Erklärung des Mechanismus des Saccharoseeffektes auf den Sekundärstoffwechsel gibt es noch nicht. Es ist aber bekannt, dass Saccharose neben Glucose nicht nur in der Funktion als metabolische Ressource, sondern auch in der Regulation von physiologischen Prozessen eine große Rolle spielt [Smeekens 2000]. Zuckermoleküle können Signalkaskaden aktivieren, so löst z.B. die Bindung von Glucose an Hexokinase eine Konformationsänderung mit erhöhter ATP-Affinität aus, die über weitere Signalkaskaden Stoffwechselvorgänge beeinflussen [Sheen et al. 1999].

D 3 Ausblick

Anhand der vorgestellten Ergebnisse leiten sich weitere Arbeiten sowohl zu den Tropinonreduktasen als auch zur Biosynthese der Calystegine ab. Die ermittelten Resultate bieten eine gute Grundlage, um folgende Fragestellungen weiter zu verfolgen:

Die Tropinonreduktasen

Für die in dieser Arbeit isolierte putative tr sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, um rekombinant erzeugtes Protein zu erhalten. Es sollte nach Überexpression in *E. coli* die nachträgliche Faltung der Proteine nach Auflösung der *inclusion bodies* erfolgen. Verschiedene Methoden werden dazu beschrieben [Clark 1998; Lilie et al. 1998]. Sollte das Protein Tropinon als Substrat nicht umsetzen, müssten andere reduzierbare Substrate getestet werden.

Falls die putative tr nicht für eine Tropinonreduktase kodiert, sollte die Protein- und/oder Gensequenz der trII ermittelt werden. Dazu könnte das Protein der TRII weiter gereinigt werden. Diese Reinigung sollte mehr auf Proteinhomogenität als Proteinaktivität ausgerichtet sein. Nach Verdau des Proteins könnten die Peptide sequenziert werden. Daraus ließen sich degenerierte Primer zur Isolierung der cDNA mit RT-PCR ableiten.

Zur Ermittlung der Gensequenz ohne Wissen der Proteinstruktur wäre im Gegensatz zur hier vorgestellten Vorgehensweise per RT-PCR mit degenerierten Primern die Herstellung und das Screening einer cDNA-Bank zu empfehlen. Dabei könnten Sonden von der putativen tr benutzt werden. Nach erfolgreicher rekombinanter Expression der TRII sollte das Protein gereinigt und seine biochemischen Eigenschaften bestimmt werden. Ich würde Bakterien als Expressionssystem vorschlagen, da zum einen alle bisher bekannten TRs in diesen sehr gut exprimiert wurden, zum anderen auftretende Probleme, wie die Ausbildung von *inclusion bodies*, experimentell lösbar sind. Die ermittelten katalytischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins könnten mit denen der nativen TRII verglichen werden. Im Fall der Verwendung eines *tags*, wie z.B. der 6fach Histidinrest zur einfacheren Reinigung des Proteins, könnte dessen Einfluss auf ein Protein durch Vergleich mit dem nativen Protein bestimmt werden. In Northern und Southern Blot Experimenten sollte die Akkumulation der Transkriptmengen und die genomische Organisation im Vergleich zur trI untersucht werden.

Im Vergleich zur gut untersuchten TRI aus *D. stramonium* sind einige an der Substratbindungsstelle in der TRI beteiligten korrespondierenden Aminosäuren stark abweichend. Durch Kristallisationsstudien mit Substrat, Cosubstrat und Produkt sollte die genaue Ausbildung der Substratbindungsstelle bestimmt werden. Gerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren mit anschließender rekombinanter Expression des mutierten Proteins und dessen Charakterisierung würden Aufschlüsse über die katalytischen Eigenschaften des Enzyms geben.

Durch die Ermittlung der Promotorsequenz beider Tropinonreduktasen kann über bestimmte regulatorische Sequenzen eine Induzierbarkeit abgeleitet werden. Beispiele dafür sind die

sogenannten G-Boxen (5'-CACGTG-3'), die über verschiedene Signale aktiviert werden. So wird z.B. die Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase (*rbc*s) mit Licht [Giuliano et al. 1988] oder die Alkoholdehydrogenase mit anäroben Stress induziert [Ferl et al. 1987], wohingegen Saccharose auf die *rbc*s von *Phaseolus vulgaris* hemmend wirken kann [Urwin et al. 1997]. Weiterhin nehmen spezielle Enhancer-Sequenzen auf die Transkriptionsrate von β -Galaktosidase als Reporter gen einen Einfluss [Walters et al. 1995].

Um genauere Aussagen zum Ort der Biosynthese zu erhalten, sollte ein immunohistochemischer Nachweis, speziell in den oberirdischen Geweben, erfolgen. Dazu müssten aus den gereinigten, rekombinanten Proteinen Antikörper hergestellt werden. Zum Nachweis des Ortes der Sekundärstoffproduktion sollten diese Untersuchungen auf weitere an der Biosynthese beteiligten Enzyme ausgeweitet werden, z. B. auf die Putrescin-*N*-Methyltransferase.

Die Calysteginbiosynthese

Die Identifizierung von Norpseudotropin, das durch *N*-Demethylierung aus Pseudotropin innerhalb der Calysteginbiosynthese entsteht, bildet die Grundlage zu weiteren Untersuchungen dieses biosynthetischen Schrittes. Eine Proteinextraktion mit anschließendem Enzymassay sollte etabliert werden. Wird von der Möglichkeit der Beteiligung einer Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenase ausgegangen, sollten die Mikrosomen der Zelle isoliert werden, da P450 Enzyme membranständig sind. Im Enzymassay sollten NADPH und O₂ als Cofaktor eingesetzt werden. Mit Hemm- und Induktionsversuchen im Assay kann die Beteiligung von P450 Enzymen belegt werden. Als typische Hemmstoffe kämen die reversible CO-Hemmung, die durch Licht aufhebbar ist, als auch Imidazol- und Triazolderivate in Frage [Donaldson et al. 1991].

Zur Charakterisierung des Enzyms stehen zwei Wege zur Verfügung. Zum einen kann das Protein isoliert werden, was wegen der Membranständigkeit sehr schwierig ist, aber in einigen Fällen erfolgreich gelang [Kahn et al. 1997; Stadler et al. 1993]. Zum anderen kann die cDNA isoliert und das Protein rekombinant erhalten werden. Dies bedingt eine Induzierbarkeit des Gewebes, aus welchem RNA isoliert wird, damit anschließend durch ein Differential Display die Vielzahl der P450-Gene eingegrenzt werden kann [Schopfer et al. 1998]. Microarrays mit subtraktiver Hybridisierung bieten zusätzliche methodische Ansatzpunkte [Byers et al. 2000].

Weitere Biosyntheseuntersuchungen würden die Hydroxylierungsschritte am Norpseudotropin betreffen. Reverse Fütterungsversuche an markierten Wurzelkulturen analog zum Nachweis des Norpseudotropins wären denkbar. Das oder die beteiligten Enzyme sollten extrahiert und im Enzymassay näher charakterisiert werden. 2-Oxoglutaratabhängige Dioxygenasen oder auch Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen kommen in Frage.

E Zusammenfassung

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide, die sich in ihrer Biosynthese von der Tropanalkaloidbiosynthese ableiten. Durch ihre Glycosidasehemmwirkung stellen sie potentielle Leitsubstanzen für einen vielfältigen therapeutischen Einsatz zur Bekämpfung von Krebs, bei der Behandlung von Diabetes mellitus oder als Virustatika dar. Da sie schwer synthetisch zugänglich sind und die Isolierung aus biologischem Material sehr aufwendig ist, kann das Verstehen der einzelnen biosynthetischen Schritte zu ihrer Gewinnung beitragen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der Calysteginbiosynthese in *Calystegia sepium* unter besonderer Berücksichtigung der Tropinonreduktion und anschließender Enzymschritte.

- Mit Hilfe von RT-PCR und degenerierten Primern wurden zwei TR-homologe Fragmente amplifiziert. Diese wurden mit RACE-PCR vervollständigt. Es resultierten eine trI- und tr-homologe cDNA-Sequenz.
- Beide Sequenzen zeigen die typischen Merkmale der kurzketigen Dehydrogenasen/Reduktasen. Auf Aminosäureebene ergaben sich 58% (TRI) bzw. 51% (putTR) Homologie zu den Tropinonreduktasen der Solanaceen. In den konservierten Aminosäuren der Substratbindungsstelle liegen teilweise starke Unterschiede vor.
- Die TRI wurde rekombinant in *E. coli* mit einem 6fach Histidinrest am C-Terminus der Sequenz exprimiert und gereinigt. Das Enzym ist in der Lage, nicht nur die Tropinreduktion sondern auch die Tropinoxidation bei höheren pH-Werten zu katalysieren. In dieser Eigenschaft sowie seinem pH-Optimum der Reduktion gleicht es den TRI der Solanaceen. Die Affinität zu Tropinon ist jedoch geringer als bei den bekannten TRI. Die Umsetzung der Cyclohexanone und teilweise der Piperidinone ist dagegen höher als Tropinon, was bei den TRI der Solanaceen nicht beobachtet wurde.
- Die Expressionsanalyse der trI in den einzelnen Pflanzenorganen ergab eine hohe Transkriptionsrate in der Pflanzenwurzel als auch in allen Entwicklungsstufen der Wurzelkultur. Ein schwaches Signal wurde in der Sprossachse detektiert. Damit ist dieses Enzym neben der trII in *S. tuberosum* ebenfalls in oberirdischen Geweben nachweisbar, was Fütterungsversuche mit Tropinon bestätigten.
- Die Untersuchung der genomischen Struktur der trI lässt auf eine Genfamilie mit mindestens 3 verschiedenen Genen schließen.
- Für die putative tr wurde für die rekombinante Expression neben *E. coli* auch ein Hefesystem und die Expression in Tabakpflanzen getestet. In keinem dieser Systeme gelang es, aktives Enzym zu erhalten. Aus diesem Grund wurde das native Protein der TRII aus Wurzelkulturen isoliert und angereinigt. In seinen katalytischen Eigenschaften, dem pH-Optimum und der Substratakzeptanz verhält es sich ähnlich den TRII der Solanaceen.

- Der Verlauf der Biosynthese vom Tropinon über Pseudotropin zu den Calysteginen wurde mit einer ^{15}N -Tropinonfütterung belegt. Der Einbau der Markierung wurde sowohl mit NMR als auch quantitativ mit GC-MS analysiert. 2,7-Dihydroxynortropin wurde ebenso wie die Calystegine bei dieser Fütterung markiert. Die biosynthetische Entstehung dieses Metaboliten ist bislang unbekannt.
- Mit Pulse-Chase-Experimenten und ^{15}N -Markierung der Wurzelkulturen wurden Untersuchungen zum kinetischen Verlauf der Calysteginbildung durchgeführt. Die Biosynthese verläuft durchschnittlich mit einer Rate von $15 \mu\text{g/h/g}$ Trockenmasse Gesamtcalysteginproduktion. Es wurde kein zeitlicher Unterschied in der Akkumulation der A- und B-Calystegine festgestellt.
- Die Metabolite Tropinon, Tropin und Pseudotropin akkumulieren in allen Pflanzenorganen. Bei einer Fütterung mit Tropinon wird dieses von den Wurzeln, der Sprossachse und jungen Blättern umgesetzt. Dabei ist die Fließrichtung zum Pseudotropin hin bevorzugt. Es akkumuliert ca. die 15fache Menge an Pseudotropin gegenüber Tropin nach Tropinonfütterung.
- Fütterungsversuche mit Tropin zur Untersuchung der weiteren Verstoffwechslung dieses Metaboliten ergaben keine Resultate. Ein bislang unbekannter Tropinester akkumulierte.
- Norpseudotropin konnte als weiterer Metabolit der Calysteginbiosynthese identifiziert werden. Der Nachweis der Entstehung dieses Metaboliten aus Pseudotropin gelang über eine reverse Fütterung dessen an komplett mit ^{15}N markierte Wurzelkulturen.
- Für die *N*-Demethylierung des Pseudotropins wird die Beteiligung von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen postuliert. Erste Hemm- und Induktionsversuche dieser Enzymgruppe an Wurzelkulturen erbrachten noch keine Bestätigung dieser Theorie und sollten an isolierten Mikrosomen wiederholt werden.
- Zur besseren dünnschichtchromatographischen Trennung sowohl der Intermediate der Calysteginbiosynthese als auch dieser selbst wurde ein Verfahren der Automatischen Mehrfachentwicklung (AMD, *automated multiple development*) von DC-Platten entwickelt.

F Literaturverzeichnis

- Ahr, H. J., Boberg, M., Brendel, E., Krause, H. P., and Steinke, W., **1997**, Pharmacokinetics of miglitol. Absorption, distribution, metabolism, and excretion following administration to rats, dogs, and man, *Arzneimittelforschung*. *47*, 734-745.
- Albalat, R., Gonzalez-Duarte, R., and Atrian, S., **1992**, Protein engineering of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. The hydroxyl group of Tyr152 is involved in the active site of the enzyme, *FEBS Lett.* *308*, 235-239.
- Ansarin, M and Woolley, J. G., **1993**, The obligatory role of phenyllactate in the biosynthesis of tropic acid, *Phytochemistry* *32*, 1183-1187.
- Araujo, A. P., Oliva, G., Henrique-Silva, F., Garratt, R. C., Caceres, O., and Beltramini, L. M., **2000**, Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *272*, 480-484.
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Griffiths, R. C., Jones, M. G., Watson, A. A., and Nash, R. J., **1997a**, Enzymatic synthesis of the glycosides of calystegines B1 and B2 and their glycosidase inhibitory activities, *Carbohydr.Res.* *304*, 173-178.
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Watson, A. A., and Nash, R. J., **1996a**, Calystegine B4, a novel trehalase inhibitor from *Scopolia japonica*, *Carbohydr.Res.* *293*, 195-204.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Hackett, L., Topping, J., and Winchester, B., **1997b**, The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases, *Glycobiology* *7*, 1085-1088.
- Asano, N., Kato, A., Miyauchi, M., Kizu, H., Tomimori, T., Matsui, K., Nash, R. J., and Molyneux, R. J., **1997c**, Specific alpha-galactosidase inhibitors, N-methylcalystegines-structure/activity relationships of calystegines from *Lycium chinense*, *Eur.J.Biochem.* *248*, 296-303.
- Asano, N., Kato, A., Oseki, K., Kizu, H., and Matsui, K., **1995**, Calystegines of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae) structure determination and their glycosidase inhibitory activities, *Eur.J.Biochem.* *229*, 369-376.
- Asano, N., Kato, A., and Watson, A. A., **2001a**, Therapeutic applications of sugar-mimicking glycosidase inhibitors, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* *1*, 145-154.
- Asano, N., Kato, A., Yokoyama, Y., Miyauchi, M., Yamamoto, M., Kizu, H., and Matsui, K., **1996b**, Calystegin N-1, a novel nortropane alkaloid with a bridgehead amino group from *Hyoscyamus niger*: Structure determination and glycosidase inhibitory activities, *Carbohydr.Res.* *284*, 169-178.
- Asano, N., Nash, R. J., Molyneux, R. J., and Fleet, G. W. J., **2000**, Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application, *Tetrahedron* *11*, 1645-1680.
- Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H., and Matsui, K., **1994a**, N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities, *Carbohydr.Res.* *259*, 243-255.
- Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H., and Matsui, K., **1994b**, Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*, *Carbohydr.Res.* *253*, 235-245.
- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoeke, D., Draeger, B., Watson, A. A., and Nash, R. J., **2001b**, Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants, *Phytochemistry* *57*, 721-726.

- Ashihara, H., **1993**, Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in mate leaves, *Phytochemistry* **33**, 1427-1430.
- Baerheim Svendsen, A. and Verpoorte, R., **1983**, Thin-layer chromatography, In: *Chromatography of alkaloids, Part A*, Elsevier, Amsterdam, 91-101.
- Baldwin, I. T., Zhang, Z. P., Diab, N., Ohnmeiss, T. E., McCloud, E. S., Lynds, G. Y., and Schmelz, E. A., **1997**, Quantification, correlations and manipulation of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*, *Planta* **201**, 397-404.
- Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J., and Christen, P., **2001**, Calystegine distribution in some solanaceous species, *Phytochemistry* **58**, 455-462.
- Bell, E. and Malmberg, R. L., **1990**, Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing, *Mol.Gen.Genet.* **224**, 431-436.
- Bennett, M. J., Albert, R. H., Jez, J. M., Ma, H., Penning, T. M., and Lewis, M., **1997**, Steroid recognition and regulation of hormone action: crystal structure of testosterone and NADP⁺ bound to 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase, *Structure.* **5**, 799-812.
- Bergmeyer, H. U., **1985**, Absorption coefficients of NAD(P)H, In: *Methods of Enzymatic Analysis*, VCH-Verlag, Weinheim, 489
- Boettcher, I., **1997**, Beobachtung einer *Calystegia sepium* Wurzelkultur im Hinblick auf Wachstum, Calystegin-Akkumulation und Veränderungen im Proteinmuster im Verlauf der Entwicklung der Wurzelkultur, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Boswell, H. D., Draeger, B., McLauchlan, W. R., Portsteffen, A., Robins, D. J., Robins, R. J., and Walton, N. J., **1999**, Specificities of the enzymes of N-alkyltropane biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*, *Phytochemistry* **52**, 871-878.
- Botte, M., Mabon, F., Le Mouillour, M., and Robins, R. J., **1997**, Biosynthesis of nornicotine in root cultures of *Nicotiana glauca* does not involve oxidation at C-5' of nicotine, *Phytochemistry* **46**, 117-122.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E., **2001**, Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science* **161**, 839-851.
- Boyer, F. D. and Lallemand, J. Y., **1994**, Enantioselective syntheses of polyhydroxylated nortropine derivatives: Total synthesis of (+) and (-)-calystegine B2, *Tetrahedron* **50**, 10443-10458.
- Bradford, M. M., **1976**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Buettner, F., **1998**, Isolierung von Calysteginen aus *Calystegia sepium* und *Solanum tuberosum* mittels Ionenaustauschern und Untersuchungen ihrer Wechselwirkung mit aus *C. sepium* isolierten Pilzen, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Burtin, D. and Michael, A. J., **1997**, Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants, *Biochem.J.* **325**, 331-337.
- Byers, R. J., Hoyland, J. A., Dixon, J., and Freemont, A. J., **2000**, Subtractive hybridization - genetic takeaways and the search for meaning, *Int.J Exp.Pathol.* **81**, 391-404.
- Cabello-Hurtado, F., Durst, F., Jorin, J. V., and Werck-Reichhart, D., **1998**, Coumarins in *Helianthus tuberosum*: characterization, induced accumulation and biosynthesis, *Phytochemistry* **49**, 1029-1036.

- Carlson, T. J., Jones, J. P., Peterson, L., Castagnoli, N. Jr, Iyer, K. R., and Trager, W. F., **1995**, Stereoselectivity and isotope effects associated with cytochrome P450-catalyzed oxidation of (S)-nicotine: The possibility of initial hydrogen atom abstraction in the formation of the delta-1',5'-nicotinium ion, *Drug Metabol.Dispos.* *23*, 749-756.
- Carrio, M. M. and Villaverde, A., **2001**, Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible, *FEBS Lett.* *489*, 29-33.
- Carrio, M. M. and Villaverde, A., **2002**, Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies, *J.Biotechnol.* *96*, 3-12.
- Chalmers, J. J., Kim, E., Telford, J. N., Wong, E. Y., Tacon, W. C., Shuler, M. L., and Wilson, D. B., **1990**, Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor, *Appl.Environ.Microbiol.* *56*, 104-111.
- Chavez, D., Cui, B., Chai, H. B., Garcia, R., Mejia, M., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., and Kinghorn, A. D., **2002**, Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*, *J Nat.Prod.* *65*, 606-610.
- Chelvarajan, R. L., Fannin, F. F., and Bush, L. P., **1993**, Study of nicotine demethylation in *Nicotiana otophora*, *J.Agric.Food Chem.* *41*, 858-862.
- Chen, E. Y. and Seeburg, P. H., **1985**, Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA, *DNA* *4*, 165-170.
- Chen, Z., Jiang, J. C., Lin, Z. G., Lee, W. R., Baker, M. E., and Chang, S. H., **1993**, Site-specific mutagenesis of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis, *Biochemistry* *32*, 3342-3346.
- Chen, Z., Lu, L., Shirley, M., Lee, W. R., and Chang, S. H., **1990**, Site-directed mutagenesis of glycine-14 and two "critical" cysteinyl residues in *Drosophila* alcohol dehydrogenase, *Biochemistry* *29*, 1112-1118.
- Chen, Z., Xu, P., and Yao, T., **1986**, *Zhongcaoyao* *17*, 386-387; *Chemical Abstracts* *106*, 153016s, 1987.
- Christen, P., Roberts, M. F., Phillipson, J. D., and Evans, W. C., **1995**, Alkaloids of *Erythroxylum monogynum* root-bark, *Phytochemistry* *38*, 1053-1056.
- Clark, E. D. B., **1998**, Refolding of recombinant proteins, *Curr.Opin.Biotechnol.* *9*, 157-163.
- Clarke, A. R., Atkinson, T., and Holbrook, J. J., **1989**, From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework. Part II, *Trends Biochem.Sci.* *14*, 145-148.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L., **1972**, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *69*, 2110-2114.
- Colegate, S. M., Dorling, P. R., and Huxtable, C. R., **1979**, A spectroscopic investigation of swainsonine: an α -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*, *Aust.J.Chem.* *32*, 2257-2264.
- Cols, N., Marfany, G., Atrian, S., and Gonzalez-Duarte, R., **1993**, Effect of site-directed mutagenesis on conserved positions of *Drosophila* alcohol dehydrogenase, *FEBS Lett.* *319*, 90-94.
- Contin, A., Collu, G., van der Heijden, R., and Verpoorte, R., **1999**, The effects of phenobarbital and ketoconazole on the alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, *Plant Physiol.Biochem.* *37*, 139-144.
- Cooper, T. G., **1981**, *Biochemische Arbeitsmethoden*, de Gruyter, Berlin.

- Couladis, M. M., Friesen, J. B., Landgrebe, M. E., and Leete, E., **1991**, Enzymes catalyzing the reduction of tropinone to tropine and pseudotropine isolated from the roots of *Datura innoxia*, *Phytochemistry* *30*, 801-806.
- Daali, Y., Bekkouche, K., Cherkaoui, S., Christen, P., and Veuthey, J. L., **2000**, Use of borate complexation for the separation of non-UV-absorbing calystegines by capillary electrophoresis, *J.Chromatogr.A* *903*, 237-244.
- Dailey, H. A. and Dailey, T. A., **1997**, Expression and purification of mammalian 5-aminolevulinatase synthase, *Methods Enzymol.* *281*, 336-340.
- Davies, H. M., Hawkins, D. J., and Smith, L. A., **1989**, Quinoprotein characteristics of *N*-Methylputrescine oxidase from tobacco roots, *Phytochemistry* *28*, 1573-1578.
- de Balogh, K. K., Dimande, A. P., van der Lugt, J. J., Molyneux, R. J., Naude, T. W., and Welman, W. G., **1999**, A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique, *J.Vet.Diagn.Invest.* *11*, 266-273.
- De Luca, V. and St Pierre, B., **2000**, The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis, *Trends Plant Sci.* *5*, 168-173.
- Dobrowolski, B., **1987**, Molekulare Klonierung und Charakterisierung genomischer ribosomaler DNA einer Zellsuspensionskultur von *Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Dohn, D. R. and Krieger, R. I., **1984**, N-demethylation of p-Chloro-N-methylaniline catalyzed by subcellular fractions from Avocado pear (*Persea americana*), *Arch.Biochem.Biophys.* *231*, 416-423.
- Donaldson, R. P. and Luster, D. G., **1991**, Multiple forms of plant cytochromes P450, *Plant Physiol.* *96*, 669-674.
- Dorling, P. R., Huxtable, C. R., and Vogel, P., **1978**, Lysosomal storage in Swainsona spp. toxicosis: an induced mannosidosis, *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* *4*, 285-295.
- Draeger, B., **1995**, Identification and quantification of calystegines, polyhydroxyl nortropane alkaloids, *Phytochem.Anal.* *6*, 31-37.
- Draeger, B., **2002**, Analysis of tropane and related alkaloids, *J.Chromatogr.A* *978*, 1-35.
- Draeger, B., Funck, C., Hoehler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A., and Schmidt, R., **1994a**, Calystegines as a new group tropane alkaloids in Solanaceae, *Plant Cell Tiss.Organ Cult.* *38*, 235-240.
- Draeger, B., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1988**, Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyascyamus niger* root cultures, *Agric.Biol.Chem.* *52*, 2663-2667.
- Draeger, B. and Schaal, A., **1994b**, Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures, *Phytochemistry* *35*, 1441-1447.
- Draeger, B., Van Almsick, A., and Mrachatz, G., **1995**, Distribution of calystegines in several Solanaceae, *Planta Med.* *61*, 577-579.
- Duran-Patron, R., O'Hagan, D., Hamilton, J. T. G., and Wong, C. W., **2000**, Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*, *Phytochemistry* *53*, 777-784.

- Evans, W. C. and Major, V. A., **1968**, The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. V. Alkaloids of *D. sanguinea* R. and P. and related esters of tropane-3 alpha, 6-beta, 7 beta-triol, *J.Chem.Soc.* *22*, 2775-2778.
- Facchini, P. J., **2001**, Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications, *Annu.Rev.Plant.Physiol.Plant.Mol.Biol.* *52*, 29-66.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., **1983**, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal.Biochem* *132*, 6-13.
- Ferl, R. J. and Nick, H. S., **1987**, In vivo detection of regulatory factor binding sites in the 5' flanking region of maize *Adh1*, *J.Biol.Chem.* *262*, 7947-7950.
- Feth, F. and Wagner, K. G., **1989**, Determination of ornithine, putrescine, N-methylputrescine and N-methylpyrroline pools in tobacco tissue by high-performance liquid chromatography, *Physiol.Plant.* *75*, 71-74.
- Fleet, G. W., Fellows, L. E., and Winchester, B., **1990**, Plagiarizing plants: amino sugars as a class of glycosidase inhibitors, *Ciba Found.Symp.* *154*, 112-122.
- Ford, Y. Y., Fox, G. G., Ratcliffe, R. G., and Robins, R. J., **1994**, In vivo ¹⁵N NMR studies of secondary metabolism in transformed root cultures of *Datura stramonium* and *Nicotiana tabacum*, *Phytochemistry* *36*, 333-339.
- Ford, Y. Y., Ratcliffe, R. G., and Robins, R. J., **1996**, In vivo NMR analysis of tropane alkaloid metabolism in transformed root and de-differentiated cultures of *Datura stramonium*, *Phytochemistry* *43*, 115-120.
- Friedman, M. and McDonald, G., **1997**, Potatoe glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety and plant physiology, *Crit.Rev.in Plant Science* *16*, 55-132.
- Frohman, M. A., **1993**, Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE, *Methods Enzymol.* *218*, 340-356.
- Funk, C. and Croteau, R., **1994**, Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: characterization of two cytochrome P450-dependent monooxygenases and an aldehyde dehydrogenase involved in abietic acid biosynthesis, *Arch.Biochem.Biophys.* *308*, 258-266.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K., **1968**, I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp.Cell Res.* *50*, 151-158.
- Garcia-Moreno, M. I., Benito, J. M., Ortiz Mellet, C., and Garcia Fernandez, J. M., **2001**, Synthesis and evaluation of calystegine B2 analogues as glycosidase inhibitors, *J.Org.Chemistry* *66*, 7604-7614.
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C. M., Duax, W. L., and Erman, M., **1994**, The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases, *Structure* *2*, 629-640.
- Ghosh, D., Weeks, C. M., Grochulski, P., Duax, W. L., Erman, M., Rimsay, R. L., and Orr, J. C., **1991**, Three-dimensional structure of holo 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *88*, 10064-10068.
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V. S., Timko, M. P., Scolnik, P. A., and Cashmore, A. R., **1988**, An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *85*, 7089-7093.
- Godet, J.-D., **1992**, Pflanzen Europas: Kräuter und Stauden, Arboris-Verlag, Bern.

- Goldmann, A., Message, B., Tepfer, D., Molyneux, R. J., Duclos, O., Boyer, F. D., Pan, Y. T., and Elbein, A. D., **1996**, Biological activities of the nortropane alkaloid, calystegine B2, and analogs: structure-function relationships, *J.Nat.Prod.* *59*, 1137-1142.
- Goldmann, A., Milat, M. L., Ducrot, P. H., Lallemand, J. Y., Maille, M., Lepingle, A., Charpin, I., and Tepfer, D., **1990**, Tropane derivatives from *Calystegia sepium*, *Phytochemistry* *29*, 2125-2128.
- Griffin, W. J. and Lin, G. D., **2000**, Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids, *Phytochemistry* *53*, 623-637.
- Griffiths, R. C., Watson, A. A., Kizu, H., Asano, N., Sharp, H. J., Jones, M. G., Wormald, M. R., Fleet, G.-W. J., and Nash, R. J., **1996**, The isolation from *Nicandra physalodes* and identification of the 3-O-beta-D-glucopyranoside of 1-alpha,2-beta,3-alpha,6-alpha-tetrahydroxy-nor-tropane (Calystegine B1), *Tetrahedron Lett.* *37*, 3207-3208.
- Hadden, C. E. and Martin, G. E., **1998**, Low-level long-range 1H-15N heteronuclear shift correlation at natural abundance using submicro NMR techniques, *J Nat.Prod.* *61*, 969-972.
- Haider, G., Kislinger, T., and Kutchan, T. M., **1997**, Barbiturate induced benzophenanthridine alkaloid formation proceeds by gene transcript accumulation in the California poppy, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *241*, 606-610.
- Halkier, B. A. and Moller, B. L., **1991**, Involvement of cytochrome P-450 in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Plant Physiol.* *96*, 10-17.
- Hamill, J. D., Robins, R. J., Parr, A. J., Evans, D. M., Furze, J. M., and Rhodes, M. J., **1990**, Over-expressing a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation, *Plant Mol.Biol.* *15*, 27-38.
- Hao, D. Y. and Yeoman, M. M., **1996**, Nicotine N-demethylase in cell-free preparations from tobacco cell cultures, *Phytochemistry* *42*, 325-329.
- Hao, D. Y. and Yeoman, M. M., **1998**, Evidence in favour of an oxidative N-Demethylation of nicotine in Tobacco cell cultures, *J.Plant Physiol.* *152*, 420-426.
- Hartmann, T., Witte, L., Oprach, F., and Toppel, G., **1986**, Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures, and cell suspension cultures, *Planta Med.* *0*, 390-395.
- Hashimoto, T., Hayashi, A., Amano, Y., Kohno, J., Iwanari, H., Usuda, S., and Yamada, Y., **1991**, Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root, *J.Biol.Chem.* *266*, 4648-4653.
- Hashimoto, T., Matsuda, J., and Yamada, Y., **1993a**, Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, *FEBS Lett.* *329*, 35-39.
- Hashimoto, T., Mitani, A., and Yamada, Y., **1990**, Diamine oxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*: Its function in tropane alkaloid biosynthesis, *Plant Physiol.* *93*, 216-221.
- Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G., and Yamada, Y., **1992**, Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*, *Plant Physiol.* *100*, 836-845.
- Hashimoto, T., Shoji, T., Mihara, T., Oguri, H., Tamaki, K., Suzuki, K. I., and Yamada, Y., **1998a**, Intraspecific variability of the tandem repeats in *Nicotiana putrescine* N-methyltransferases, *Plant Mol.Biol.* *37*, 25-37.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K., and Yamada, Y., **1998b**, Molecular cloning of plant spermidine synthases, *Plant Cell Physiol.* *39*, 73-79.

- Hashimoto, T. and Yamada, Y., **1986**, Hyoscyamine 6-beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures, *Plant Physiol.* *81*, 619-625.
- Hashimoto, T. and Yamada, Y., **1987**, Purification and characterization of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. Hydroxylase and epoxidase activities in the enzyme preparation, *Eur.J.Biochem.* *164*, 277-285.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y., and Yamada, Y., **1989**, Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*, *Planta* *178*, 123-130.
- Hashimoto, T., Yun, D. J., and Yamada, Y., **1993b**, Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures, *Phytochemistry* *32*, 713-718.
- Hegnauer, R., **1989**, Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, Band VIII, 322 - 329.
- Hemscheidt, T., **2000**, Tropane and related alkaloids, *Topics in Current Chemistry* *209*, 175-206.
- Hemscheidt, T. and Spenser, I. D., **1992**, Biosynthesis of 6beta-hydroxytropine in *Datura stramonium*: Nonregiospecific incorporation of [1,2-¹³C]acetate, *J.Amer.Chem.Soc.* *114*, 5472-5473.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R., **1985**, Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, *Electrophoresis* *6*, 103-112.
- Hibi, N., Fujita, T., Hatano, M., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1992**, Putrescine *N*-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*: *n*-Butylamine as a potent inhibitor of the transferase both *in vitro* and *in vivo*, *Plant Physiol.* *100*, 826-835.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1994**, Gene expression in tobacco low-nicotine mutants, *Plant Cell* *6*, 723-735.
- Hilton, M. G. and Rhodes, M. J., **1990**, Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* *33*, 132-138.
- Hohenschutz, L. D., Bell, E. A., Jewess, P. J., Lewirthy, D. P., Pryce, R. J., Arnold, E., and Clardy, J., **1981**, Castanospermine, a 1,6,7,8-tetrahydroxy-octahydroindolizidine alkaloid from seeds of *Castanospermum australe*, *Phytochemistry* *20*, 811-814.
- Humphrey, A. J. and O'Hagan, D., **2001**, Tropane alkaloid biosynthesis. A century old problem unresolved, *Nat.Prod.Rep.* *18*, 494-502.
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y., and Nakamura, K., **1998**, Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures, *Plant Mol.Biol.* *38*, 1101-1111.
- Jagudaev, M. R. and Aripova, S. F., **1985**, NMR-isedovanie alkaloidov, *Khim.Prirod.Soedin.*, 80-84.
- Jenett-Siems, K., Kaloga, M., and Eich, E., **1993**, Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulaceae, *Phytochemistry* *34*, 437-440.
- Jenett-Siems, K., Mann, P., Kaloga, M., Siems, K., Jakupovic, J., Witte, L., and Eich, E., **1998**, Tropane alkaloids with a unique type of acyl moiety from two Convolvulus species, *Phytochemistry* *49*, 1449-1451.
- Johnson, C. R. and Bis, S. J., **1995**, Enzymatic asymmetrization of 6-amino-2-cycloheptene-1,4-diol derivatives: synthesis of tropane alkaloids (+)- and (-)-calystegine A3, *J.Org.Chemistry* *60*, 615-623.

- Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez, Duarte R., Jeffery, J., and Ghosh, D., **1995**, Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), *Biochemistry*. *34*, 6003-6013.
- Jouhikainen, K., Lindgren, L., Jokelainen, T., Hiltunen, R., Teeri, T. H., and Oksman-Caldentey, K. M., **1999**, Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering, *Planta* *208*, 545-551.
- Kahn, R. A., Bak, S., Svendsen, I., Halkier, B. A., and Moller, B. L., **1997**, Isolation and reconstitution of cytochrome P450ox and in vitro reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from sorghum, *Plant Physiol.* *115*, 1661-1670.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H., and Persson, B., **2002**, Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes, *Protein Sci.* *11*, 636-641.
- Kanegae, T., Kajiya, H., Amano, Y., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1994**, Species-dependent expression of the hyoscyamine 6 beta-hydroxylase gene in the pericycle, *Plant Physiol.* *105*, 483-490.
- Kato, A., Asano, N., Kizu, H., Matsui, K., Suzuki, S., and Arisawa, M., **1997**, Calystegine alkaloids from *Duboisia leichhardtii*, *Phytochemistry* *45*, 425-429.
- Keiner, R., **2001**, Calystegine in *Solanum tuberosum* L.- Klonierung, Expression und Charakterisierung der Tropinonreduktasen I und II, putativer Enzyme des Tropanalkaloidstoffwechsels, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Keiner, R. and Draeger, B., **2000**, Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants, *Plant Science* *150*, 171-179.
- Keiner, R., Kaiser, H., Nakajima, K., Hashimoto, T., and Draeger, B., **2002**, Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.), *Plant Mol.Biol.* *48*, 299-308.
- King, J., Haase-Pettingell, C., Robinson, A. S., Speed, M., and Mitraki, A., **1996**, Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates, *FASEB J.* *10*, 57-66.
- Kite, G. C., Porter, E. A., Egan, M. J., and Simmonds, M. S. J., **1999**, Rapid detection of polyhydroxyalkaloid mono- and diglycosides in crude plant extracts by direct quadrupole ion trap mass spectrometry, *Phytochem.Anal.* *10*, 259-263.
- Koelen, K. J. and Gross, G. G., **1982**, Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*, *Planta Med.* *44*, 227-230.
- Kutchan, T. M., **1995**, Alkaloid biosynthesis: The basis for metabolic engineering of medicinal plants, *Plant Cell* *7*, 1059-1070.
- Laemmli, U. K., **1970**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* *227*, 680-685.
- Laue, G., Preston, C. A., and Baldwin, I. T., **2000**, Fast track to the trichome: Induction of *N*-acyl nornicotines precedes nicotine induction in *Nicotiana repanda*, *Planta* *210*, 510-514.
- Leete, E., **1962**, The Stereospecific Incorporation of Ornithine into the Tropine Moiety of Hyoscyamine, *J.Amer.Chem.Soc.* *84*, 55-57.
- Leete, E., **1990**, Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids, *Planta Med.* *56*, 339-352.
- Leete, E. and Chedekel, M. R., **1974**, Metabolism of Nicotine in *Nicotina glauca*, *Phytochemistry* *13*, 1853-1859.

- Liebisch, H.-W., Ramin, H., Schöffpinius, I., and Schütte, H. R., **1965**, Zur Biosynthese der Tropanalkaloide V, *Z.Naturforschung* *20*, 1183-1185.
- Liebisch, H.-W., Schütte, H. R., and Mothes, K., **1963**, Putrescin als mögliche Vorstufe des Pyrrolidin-Rings der Tropan-Alkaloide, *J.Liebig's Annalen der Chemie* *668*, 139-144.
- Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R., **1998**, Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*, *Curr.Opin.Biotechnol.* *9*, 497-501.
- Lineweaver, H. and Burk, D., **1934**, Determination of enzyme dissociation constants, *J.Amer.Chem.Soc.* *56*, 658-666.
- Lozovaya, V., Zabolina, O. A., and Widholm, J. M., **1996**, Synthesis and turnover of cell-wall polysaccharides and starch in photosynthetic soybean suspension cultures, *Plant Physiol.* *111*, 921-929.
- Lu, Y., Yao, T., and Chen, Z., **1986**, *Yaouxue Xuebao* *21*, 829; Chemical abstracts *106*, 153028x, 1987.
- Maitra, U. S., Gaunt, M. A., and Ankel, H., **1974**, The mechanism of uridine diphosphate-sugar-4-epimerase reactions. Isotope discrimination with 4-tritiated substrates, *J.Biol.Chem.* *249*, 3075-3078.
- Martin, F., **1985**, Monitoring plant metabolism by ¹³C, ¹⁵N nuclear magnetic resonance spectroscopy. A review of the applications to algae, fungi, and higher plants, *Physiologie Végétale* *23*, 463-469.
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1991**, Molecular cloning of Hyoscyamine 6b-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*, *J.Biolog.Chem.* *266*, 9460-9464.
- McCormick, A. A., Kumagai, M. H., Hanley, K., Turpen, T. H., Hakim, I., Grill, L. K., Tuse, D., Levy, S., and Levy, R., **1999**, Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *96*, 703-708.
- McGaw, B. A. and Woolley, J. G., **1978**, Stereochemistry of Tropane Alkaloid Formation in *Datura*, *Phytochemistry* *17*, 257-259.
- McGaw, B. A. and Woolley, J. G., **1979**, Metabolism of Hygrine in *Atropa*, *Hyoscyamus* and *Physalis*, *Phytochemistry* *18*, 189-190.
- McKinley-McKee, J. S., Winberg, J. O., and Pettersson, G., **1991**, Mechanism of action of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase, *Biochem.Int.* *25*, 879-885.
- Meier, A.-C., **2001**, Tropinonreduktasen in *Calystegia sepium*, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mesnard, F., Azaroual, N., Marty, D., Fliniaux, M. A., Robins, R. J., Vermeersch, G., and Monti, J. P., **2000**, Use of ¹⁵N reverse gradient two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to follow metabolic activity in *Nicotiana plumbaginifolia* cell-suspension cultures, *Planta* *210*, 446-453.
- Mesnard, F., Roscher, A., Garlick, A. P., Girard, S., Baguet, E., Arroo, R. R. J., Lebreton, J., Robins, R. J., and Ratcliffe, R. G., **2002**, Evidence for the involvement of tetrahydrofolate in the demethylation of nicotine by *Nicotiana plumbaginifolia* cell-suspension cultures, *Planta* *214*, 911-919.
- Michael, A. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J., and Burtin, D., **1996**, Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA, *Biochem.J.* *314*, 241-248.
- Michaelis, L. and Menten, M. L., **1913**, Kinetics of invertase action, *Biochem.Z.* *49*, 333-369.

- Molyneux, R. J., McKenzie, R. A., O'Sullivan, B. M., and Elbein, A. D., **1995**, Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in Weir vine (*Ipomoea sp. Q6* [aff. *calobra*]) and correlation with toxicity, *J.Nat.Prod.* *58*, 878-886.
- Molyneux, R. J., Nash, R. J., and Asano, N., **1996**, The chemistry and biological activity of calystegines and related nortropane alkaloids, In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Pelletier, S. W., Elsevier Science Ltd., Oxford, 303-343.
- Molyneux, R. J., Pan, Y. T., Goldmann, A., Tepfer, D., and Elbein, A. D., **1993**, Calystegines, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors, *Arch.Biochem.Biophys.* *304*, 81-88.
- Murashige, T. and Skoog, F., **1962**, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiol.* *15*, 473-479.
- Nakajima, K. and Hashimoto, T., **1999a**, Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns, *Plant Cell Physiol.* *40*, 1099-1107.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1993a**, cDNA encoding tropinone reductase-II from *Hyoscyamus niger*, *Plant Physiol.* *103*, 1465-1466.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1993b**, Two tropinone reductases with different stereospecificities are short- chain dehydrogenases evolved from a common ancestor, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *90*, 9591-9595.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1994**, Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites, *J.Biol.Chem.* *269*, 11695-11698.
- Nakajima, K., Kato, H., Oda, J., Yamada, Y., and Hashimoto, T., **1999b**, Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecificities of two tropinone reductases, *J.Biol.Chem.* *274*, 16563-16568.
- Nakajima, K., Oshita, Y., Kaya, M., Yamada, Y., and Hashimoto, T., **1999c**, Structures and expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyoscyamus niger*, *Biosci.Biotechnol.Biochem.* *63*, 1756-1764.
- Nakajima, K., Oshita, Y., Yamada, Y., and Hashimoto, T., **1999d**, Insight into the molecular evolution of two tropinone reductases, *Biosci.Biotechnol.Biochem.* *63*, 1819-1822.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., and Yamada, Y., **1998**, Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *95*, 4876-4881.
- Nakanishi, M., Kakumoto, M., Matsuura, K., Deyashiki, Y., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., and Hara, A., **1996**, Involvement of two basic residues (Lys-17 and Arg-39) of mouse lung carbonyl reductase in NADP(H)-binding and fatty acid activation: site-directed mutagenesis and kinetic analyses, *J.Biochem.* *120*, 257-263.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., and Hara, A., **1997**, Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid, *J.Biol.Chem.* *272*, 2218-2222.
- Nash, R. J., Rothschild, M., Porter, E. A., Watson, A. A., Waigh, R. D., and Waterman, P. G., **1993**, Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropus*), *Phytochemistry* *34*, 1281-1283.
- Neubauer, H. F., **1988**, The runners of *Calystegia sepium* (L.) R. Br. (Convolvulaceae), *Angewandte Botanik* *62*, 221-224.

- Nickon, A. and Fieser, L. F., **1952**, Configuration of tropine and pseudotropine, *J.Amer.Chem.Soc.* *74*, 5566-5570.
- Nussbaumer, P., Kapetanidis, I., and Christen, P., **1998**, Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea*: Effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis, *Plant Cell Reports* *17*, 405-409.
- Ohta, H., Suzuki, G., Awai, K., Masuda, T., Kato, T., Shibata, D., and Takamiya, D., **1997**, Distinct pathways for jasmonate- and elicitor-induced expressions of a cytochrome P450 gene in soybean suspension-cultured cells, *Physiol.Plant.* *100*, 647-652.
- Payne, J., Hamill, J. D., Robins, R. J., and Rhodes, M. J. C., **1987**, Production of hyoscyamine by "Hairy Root" cultures of *Datura stramonium*, *Planta Med.* *53*, 474-478.
- Persson, B., Krook, M., and Jornvall, H., **1991**, Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes, *Eur.J.Biochem.* *200*, 537-543.
- Platt, R., Opie, C. T., and Haslam, E., **1984**, Biosynthesis of flavan-3-ols and other secondary plant products from (2S)-phenylalanine, *Phytochemistry* *23*, 2211-2217.
- Plaut, G. W., Beach, R. L., and Aogaichi, T., **1970**, Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by riboflavin synthetase, *Biochemistry* *9*, 771-785.
- Portsteffen, A., **1994**, Reinigung und Charakterisierung einer tropinbildenden und einer pseudotropinbildenden Tropinonreduktase aus transformierten Wurzelkulturen von *Datura stramonium* L., Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Portsteffen, A., Draeger, B., and Nahrstedt, A., **1992**, Two tropinone reducing enzymes from *Datura stramonium* transformed root cultures, *Phytochemistry* *31*, 1135-1138.
- Portsteffen, A., Draeger, B., and Nahrstedt, A., **1994**, The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases, *Phytochemistry* *37*, 391-400.
- Rabot, S., Peerless, A.-C. J., and Robins, R. J., **1995**, Tigloyl-CoA:pseudotropine acyl transferase - An enzyme of tropane alkaloid biosynthesis, *Phytochemistry* *39*, 315-322.
- Rastogi, R., Dulson, J., and Rothstein, S. J., **1993**, Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening, *Plant Physiol.* *103*, 829-834.
- Razal, R. A., Ellis, S., Singh, S., Lewis, N. G., and Towers, G. H. N., **1996**, Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism, *Phytochemistry* *41*, 31-35.
- Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M., and Reinbothe, S., **1992**, Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis, *Plant J.* *2*, 917-926.
- Robins, R. J., Abraham, T. W., Parr, A. J., Eagles, J., and Walton, N. J., **1997**, The Biosynthesis of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium*: The Identity of the Intermediates between N-Methylpyrrolinium Salt and Tropinone, *J.Amer.Chem.Soc.* *119*, 10929-10934.
- Robins, R. J., Parr, A. J., Bent, E. G., and Rhodes, M.-J. C., **1991**, Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: I. Kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites, *Planta* *183*, 185-195.
- Robins, R. J., Parr, A. J., Payne, J., Walton, N. J., and Rhodes, M.-J. C., **1990**, Factors regulating tropane-alkaloid production in a transformed root culture of a *Datura candida* times *Datura aurea* hybrid, *Planta* *181*, 414-422.

- Robins, R. J., Woolley, J. G., Ansarin, M., Eagles, J., and Goodfellow, B. J., **1994**, Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures, *Planta* *194*, 86-94.
- Rothe, G., **2002**, Regulation und Manipulation der Tropanalkaloidbiosynthese in *Atropa belladonna* L., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rothe, G., Garske, U., and Draeger, B., **2001**, Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation, *Plant Science* *160*, 1043-1053.
- Ruettinger, H. H. and Draeger, B., **2001**, Pulsed amperometric detection of calystegines separated by capillary electrophoresis, *J.Chromatogr.A* *925*, 291-296.
- Rumlova, M., Benedikova, J., Cubinkova, R., Pichova, I., and Ruml, T., **2001**, Comparison of classical and affinity purification techniques of Mason-Pfizer monkey virus capsid protein: the alteration of the product by an affinity tag, *Protein Expr.Purif.* *23*, 75-83.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., **1989**, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., **1977**, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *74*, 5463-5467.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K., Choi, K.-B., Morishige, T., Fujimoto, H., and Yamada, Y., **2001**, Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *98*, 367-372.
- Sauer, A., in Vorbereitung, Diplomarbeit, in Vorbereitung, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Saul, R., Ghidoni, J. J., Molyneux, R. J., and Elbein, A. D., **1985**, Castanospermine inhibits alpha-glucosidase activities and alters glycogen distribution in animals, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *82*, 93-97.
- Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F., and Conrad, U., **2001**, Production of spider silk proteins in tobacco and potato, *Nat.Biotechnol.* *19*, 573-577.
- Schillberg, S., Emans, N., and Fischer, R., **2002**, Antibody molecular farming in plants and plant cells, *Phytochem.Reviews* *1*, 45-54.
- Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richter, A., Jenett-Siems, K., Draeger, B., Asano, N., Gupta, M. P., Correa, M. D., and Eich, E., **1998**, Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae, *Phytochemistry* *49*, 1989-1995.
- Scholl, Y., Asano, N., and Draeger, B., **2001a**, Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors, *J.Chromatogr.A* *928*, 217-224.
- Scholl, Y., Hoeke, D., and Draeger, B., **2001b**, Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway, *Phytochemistry* *58*, 883-889.
- Schopfer, C. R. and Ebel, J., **1998**, Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA, *Mol.Gen.Genet.* *258*, 315-322.
- Schroeder, G., Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmidt, J., Strack, D., De Luca, V., and Schroeder, J., **1999**, Light induced cytochrome P450-dependent enzyme in indol alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase, *FEBS Lett.* *458*, 97-102.
- Schunack, A.-K., **2000**, Präparative Gewinnung von Calysteginen, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Sharova, E. G., Aripova, S. F., and Junusov, S. J., **1980**, Alkaloidui *Convolvulus subhirsutus*, *Khim.Prirod.Soedin.*, 672-676.

- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J. C., **1999**, Sugars as signaling molecules, *Curr.Opin.Plant Biol.* **2**, 410-418.
- Skaanderup, P. R. and Madsen, R., **2001**, Short syntheses of enantiopure calystegine B2, B3, and B4, *Chem.Commun.*, 1106-1107.
- Smeekens, S., **2000**, Sugar-induced signal transduction in plants, *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **51**, 49-81.
- Smith, V. A. and Macmillan, J., **1986**, The partial purification and characterization of gibberellin 2-beta-hydroxylases from seeds of *Pisum sativum*, *Planta* **167**, 9-18.
- Southern, E. M., **1975**, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J.Mol.Biol.* **98**, 503-517.
- Stadler, R. and Zenk, M. H., **1993**, The purification and characterization of a unique cytochrome P-450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures, *J.Biol.Chem.* **268**, 823-831.
- Stoll, V. S., Kimber, M. S., and Pai, E. F., **1996**, Insights into substrate binding by D-2-ketoacid dehydrogenases from the structure of *Lactobacillus pentosus* D-lactate dehydrogenase, *Structure* **4**, 437-447.
- Sue, J. M. and Knowles, J. R., **1982**, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase: fate of the tritium label in [3]H]ribulose 1,5-bisphosphate during the enzyme-catalyzed reaction, *Biochemistry* **21**, 5404-5410.
- Suzuki, K., Yamada, Y., and Hashimoto, T., **1999a**, Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle, *Plant Cell Physiol.* **40**, 289-297.
- Suzuki, K., Yun, D. J., Chen, X. Y., Yamada, Y., and Hashimoto, T., **1999b**, An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6beta-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers, *Plant Mol.Biol.* **40**, 141-152.
- Sweetlove, L. J., Burrell, M. M., and ap Rees, T., **1996**, Starch metabolism in tubers of transgenic potatoe (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase, *Biochem.J.* **320**, 493-498.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., and Mitsui, Y., **1996a**, Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family, *Structure* **4**, 33-45.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., and Mitsui, Y., **1996b**, Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* **35**, 7715-7730.
- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Denarie, J., and Rosenberg, C., **1988**, A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegia sepium*, *J.Bacteriol.* **170**, 1153-1161.
- Thomas, J. G. and Baneyx, F., **1996**, Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-shock proteins, *J.Biol.Chem.* **271**, 11141-11147.
- Tiburcio, A. F. and Galston, A. W., **1986a**, Arginine decarboxylase as the source of putrescine for tobacco alkaloids, *Phytochemistry* **25**, 107-110.
- Tiburcio, A. F., Masdeu, M. A., Dumortier, F. M., and Galston, A. W., **1986b**, Polyamine metabolism and osmotic stress I. Relation to protoplast viability, *Plant Physiol.* **82**, 369-374.
- Todd, F. S., Stermitz, F. R., Schultheis, P., Knight, A. P., and Traub-Dargatz J., **1995**, Tropane alkaloids and toxicity of *Convolvulus arvensis*, *Phytochemistry* **39**, 301-303.

- Urwin, N. A. and Jenkins, G. I., **1997**, A sucrose repression element in the *Phaseolus vulgaris* rbcS2 gene promoter resembles elements responsible for sugar stimulation of plant and mammalian genes, *Plant Mol.Biol.* *35*, 929-942.
- Vanhala, L., Eeva, M., Lapinjoki, S., Hiltunen, R., and Oksman-Caldentey, K. M., **1998**, Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*, *J.Plant Physiol.* *153*, 475-481.
- Varughese, K. I., Skinner, M. M., Whiteley, J. M., Matthews, D. A., and Xuong, N. H., **1992**, Crystal structure of rat liver dihydropteridine reductase, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *89*, 6080-6084.
- Vazquez-Flota, F., De Carolis, E., Alarco, A. M., and De Luca, V., **1997**, Molecular cloning and characterization of desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Plant Mol.Biol.* *34*, 935-948.
- Walters, M. C., Fiering, S., Eidemiller, J., Magis, W., Groudine, M., and Martin, D. I., **1995**, Enhancers increase the probability but not the level of gene expression, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *92*, 7125-7129.
- Watson, A. A., Fleet, G. W., Asano, N., Molyneux, R. J., and Nash, R. J., **2001**, Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications, *Phytochemistry* *56*, 265-295.
- Werck-Reichhart D., **1995**, Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism, *Drug Metabol.Drug Interact.* *12*, 221-243.
- Wink, M., **1987**, Site of lupanine and sparteine biosynthesis in intact plants and in vitro organ cultures, *Z.Naturforsch.* *42c*, 868-872.
- Wink, M., **1999**, Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites., In: *Biochemistry of plant secondary metabolism*, Wink, M., Sheffield Academic Press, 1-16.
- Witte, L., Mueller, K., and Arfmann, H. A., **1987**, Investigation of the alkaloid pattern of *Datura innoxia* plants by capillary gas-liquid chromatography-mass spectrometry, *Planta Med.* *53*, 192-197.
- Woelfle, K., Michenfelder, M., Koenig, A., Hull, W. E., and Retey, J., **1986**, On the mechanism of action of methylmalonyl-CoA mutase. Change of the steric course on isotope substitution, *Eur.J.Biochem.* *156*, 545-554.
- Woolley, J. G., **1993**, Tropane alkaloids, In: *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, 133-173.
- Yamashita, A., Endo, M., Higashi, T., Nakatsu, T., Yamada, Y., Oda, J., and Kato, H., **2003**, Capturing Enzyme Structure Prior to Reaction Initiation: Tropinone Reductase-II-Substrate Complexes, *Biochemistry* *42*, 5566-5573.
- Yamashita, A., Kato, H., Wakatsuki, S., Tomizaki, T., Nakatsu, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., and Oda, J., **1999**, Structure of tropinone reductase-II complexed with NADP+ and pseudotropine at 1.9 Å resolution: implication for stereospecific substrate binding and catalysis, *Biochemistry* *38*, 7630-7637.
- You, K. S., Arnold, L. J., Allison, W. S., and Kaplan, N. O., **1978**, Enzyme stereospecificities for nicotinamide nucleotides, *Trends Biochem.Sci.*, 265-268.
- Young, O. and Beevers, H., **1976**, Mixed function oxidases from germinating castor bean endosperm, *Phytochemistry* *15*, 379-385.
- Yun, D. J., Hashimoto, T., and Yamada, Y., **1992**, Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition, *Proc.Natl.Acad.Sci.* *89*, 11799-11803.

Zabetakis, I., Edwards, R., Hamilton, J.-T. G., and O'Hagan, D., **1998**, The biosynthetic relationship between littorine and hyoscyamine in transformed roots of *Datura stramonium*, *Plant Cell Reports* *18*, 341-345.

Zabetakis, I., Edwards, R., and O'Hagan, D., **1999**, Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*, *Phytochemistry* *50*, 53-56.

G Anhang

G 1 *cDNA-Sequenzen von Calystegia sepium*

G 1.1 TRI-cDNA

```

ATATATCAGGCCAGCTAGCAGGTTGTGTCTTTTAAAGCTACTGGTGATATAATTAAGCTTT - 60
GGTCTGATCTTTGGTCCCTGAATAACAAGAAATGAGCTTTGGACAAGGAAAGTGGTCTCT - 120
                                     M S F G Q G K W S L
CCAGGGCATGACAGCTCTCGTGACTGGTGGTACTCGAGGCATTGGTTATGGAATTGTTGA - 180
Q G M T A L V T G G T R G I G Y G I V E
AGAGCTAGCAGGATTTGGAGCAGAGGTTTACATTTGTTCCCGAAAGCAAACGAAGTTGA - 240
E L A G F G A E V Y I C S R K Q N E V D
TGAGTGCCTGGGAAATGGAGGGAGAAAGGCTTCAAAGTTGCCGGATCTGCGTGCGACAT - 300
E C V G K W R E K G F K V A G S A C D I
TTCCTCAAGGACACAGAGAGAAGAGTTGATAAAAAATGTTGCCCATCACTTCAATGGAAA - 360
S S R T Q R E E L I K N V A H H F N G K
GCTCAATATCTTGGTGAATAATGCGGGAACGATACTGCCAAAGGACGCAACAGAGTTCAA - 420
L N I L V N N A G T I L P K D A T E F K
AGCTGAAGATTACACACTTATAATGGGAACCAACTTTGAGGCTTCATTTACCTTTGTCA - 480
A E D Y T L I M G T N F E A S F H L C Q
GTTGGCACATCCATTCCTCAAAGCTTCATCAATGGGAACCATAGTTTTCAATTCTTCGGT - 540
L A H P F L K A S S M G T I V F N S S V
CGCTGGAATCATCCCTGTATTTAAAACCACTCTCTATGCCGCATCCAAAGGAGCAATAAA - 600
A G I I P V F K T T L Y A A S K G A I N
TCAAGTGACAAAGAAGCTTAGCATGTGAGTGGGCCAAAGACAACATTCGTGTTAACTCGGT - 660
Q V T K N L A C E W A K D N I R V N S V
TGCACCTTGGGTCAATTCGGACCAAGCTCGTTAATGACTTCGATAGTGAGAGTGAAGGATC - 720
A P W V I R T K L V N D F D S E S E G S
AGAAGAAATCGAGCGAATGATCCGTCGGACCCCGATCAGCCGGCCAGGAGAAGTTGGAGA - 780
E E I E R M I R R T P I S R P G E V G E
AGTTTCGTCGTTGGTGGCGTTCTTGTGCTTGCCCTGCTGCATCATATATCACTGGACAAAC - 840
V S S L V A F L C L P A A S Y I T G Q T
TATCTGCGTAGATGGTGGATATACCATCACTGGTTTCCCATAAAAAATGTTACATTATTT - 900
I C V D G G Y T I T G F P
TCCTTCCAAATGTGATAATATAATAAATCTCTTTATATTTACTGGACGCCTGACCAGAGA - 960
ATAAATATTCAGAGACAAATTTAAACAAATAATGTAGCATTACTGTATGCTAATTGTTTT - 1020
AAGGATTGATGTTGTTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 1073

```

Abb. G-1: CS-TRI cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz. Start- und Stoppcodon sind unterstrichen. Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Nummer AJ 427397 eingetragen.

G 1.2 Putative TR-cDNA

```

CCAAACATTTAAGAATCAGCAATGGCTGGAAGGTGGTCTCTTCAAGGCATGACTGCTCTT - 60
                M A G R W S L Q G M T A L
GTTACTGGTGGTACACGTGGCCTTGGGCATGCAATAGTGAAGAAGCTTTCTAGCCTTGGC - 120
V T G G T R G L G H A I V E E L S S L G
GCGATTGCGTACACATGTTACGTAACCAGAAGGAGCTTGACGAGTGCCTCAAAAATTGG - 180
A I A Y T C S R N Q K E L D E C L K N W
AAAGAGAAGGTTATCCCGTTTTTGGCTCTACCTGTGACATATCACAACAATCAGAACGT - 240
K E K G Y P V F G S T C D I S Q Q S E R
GAAAATCTAATACAATTAGTCTGCAAACAGTTTTGATGGGAAACTCCACATCTTAGTAAAC - 300
E N L I Q L V C K Q F D G K L H I L V N
AGTGCGGCTACGATTATACCCAAAGAACTCTGAATTTAAACGCTGAGGATAACTCCATT - 360
S A A T I I P K E T L N L N A E D N S I
GTGATTGGAACAAACCTCATGACTTCATTGAACTTTAGCCAACCTGCACACCCATTATTG - 420
V I G T N L M T S L N F S Q L A H P L L
AAGGCCTCCGGAATGGAAGCATAGTCTTCATCTCTTCATGTGCTAGTTTTGTTTTCGTA - 480
K A S G N G S I V F I S S C A S F V F V
CCTGTTCATAACCGTCTATGCTGCAACCAAAGGTGCAATTAATTCCTAGCAAAGAAGCTTA - 540
P V H T V Y A A T K G A I N S L A K N L
GCATGCGAATGGGCAAATGACAACATTCGCGTCAATGCCGTTGCACCATGGGCCATGAGA - 600
A C E W A N D N I R V N A V A P W A M R
ACCTCCCTCACCAGGCCGCTAGAGAAGAAGCTGGGGGAGAAATACTAGAAGCATTGATC - 660
T S L T E A A R E E A G G E I L E A L I
CAAAGGACACCACAACACCGGCTTGTAGAGCCGAAAGAAGCTTCAGCGGCGGTTGCATTC - 720
Q R T P Q H R L V E P K E A S A A V A F
CTTTGCTTCCCAGCGTCTTCTTTTGTGACTGGTCAAGTCATTTGCGTAGATGGTGGAGCA - 780
L C F P A S S F V T G Q V I C V D G G A
ACAAGCTATGGTCTCTGATCAATGCCAAAATATGATTAATTAATGCC - 827
T S Y G L

```

Abb. G-2: Putative CS-TR cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz. Start- und Stoppcodon sind unterstrichen. Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Nummer AJ 540305 eingetragen.

G 2 Verwendete Primer für RT-PCR

Primer	Sequenz 5'→ 3'	Schmelz- temperatur in °C	Lage bezogen auf DS-TRI
Direkte Primer			
CS01Dir	TGG TGG CTC (CT)AA AGG (AC)AT (ACT)GG G	62,7	80-101
CS02Dir	GCA (AT)(GC)A GT(AGT) TAT ACA TGT TCA CG	57,7	135-157
CS03Dir	CAA TAT (CT)(CT)T GGT (AG)AA TAA TGC (ACT)GG	57,3	299-322
CS06Dir	GCG TAC TGC TGG TAT TGT CAT ATA C	61,3	311-335
CS10Dir = DP1	TGC ACT GCC CTT GTT AC(CT) GGT GG	65,1	64-86
CS14Dir	CTA ATG C(AC)G G(AGT)G TGG (CT)(AG)A TAC AT	60,3	313-335
CS15Dir = DP3	T(AT)G GGT A(CT)G C(AT)(AG) TAG TGG AAG AA	58,9	138-160
Reverse Primer			
CS04Rev = DP4	GCA CCT TTG G(AT)(AT) GC(AT) (GC)(AC)(AG) TAA A	58,4	501-522
CS05Rev	GGA A(GT)A AA(CT) AAA (AGT)A(CT) AAC ATT TCC	53,9	450-473
CS08Rev	CGC GAC CA(GT) AGA AG(AT) TGC AAT AAC	61,9	606-629
CS09Rev	TTT GGT TGC TCC ATA AAC AGC CTC	61,0	501-524
CS11Rev	TGC (AT)(AG)A AGC CCC (AG)GA AA(CT) (AG)GA AG	62,4	471-493
CS12Rev = DP2	CCA GTG ACA TAT GAA GCA GCA GG	62,4	750-772
CS13Rev	CCA C(AC)A TTA GCC ATA A(AG)T CCA CC	60,6	792-814
CS16Rev	CCC AA(CT) (GCT)(AT)G TGG GGT TAA AAT GAC	61,3	606-629
CS17Rev	TTT GGA AGC (AT)GA (AG)TA AAG AGA AA(GC)	56,7	501-524

Tab. G-1: Direkte und reverse Primer für RT-PCR. Die Lage der Primer wurde auf die DS-TRI-Sequenz bezogen. Die Ableitung erfolgte auf Homologievergleichen von TRI und TRII der Solanaceen. Nukleotide in Klammern stellen gewobbelte Stellen dar.

```

DS-TRI      ATGGAAGAATCAAAAGTGTCCATGATGAATTGCAACAATGA-AGGA--AGATGGAGTCTC  57
ST-TRI      -----ATGGCAGAATTGAGAGAA--AAATGGAGTCTT  30
HN-TRI      ATGGCCGGAGAATCAGAAGTTTACATTAATGGCAACAATGGAGGAATTAGATGGAGTCTC  60
                ** ** * ** * * * **

```

Primer DP1 Primer DP3

```

DS-TRI      AAAGGCACCACAGCCCTTGTACTGGTGGCTCTAAAGGCAATGGGTATGCAATAGTGGAA 117
ST-TRI      AAAGGCACCACTGCACTTGTACTGGTGGCTCCAAAGGCATAGGGTACGCTATAGTGGAA  90
HN-TRI      AAAGGCACAACCTGCCCTTGTACTGGTGGCTCTAAAGGCATGGGTATGCAGTAGTGGAA 120
                ***** ** ** *****

```

```

DS-TRI      GAATTGGCAGGTCTTGGAGCAAGAGTATATACATGTTACGTAATGAAAAGAACTGGAC 177
ST-TRI      GAATTGGCAAATTTGGAGCAAGAGTATATACATGTTACGTAATGAAAAGAACTTCAA 150
HN-TRI      GAACTAGCAGGTCTTGGTGAAGAGTATATACATGTTACGTAATGAAAAGAACTCAA 180
                *** * ** * ** * **

```

DS-TRI	GAATGCCTTGAAATTTGGAGAGAAAAGGACTTAATGTTGAAGGTTCTGTTTGTGACTTA	237
ST-TRI	GAATGCCTTGATATTTGGAGAAAAAGGGACTTAAAGTGAAGGTTCTGTTTGTGACTTA	210
HN-TRI	CAATGCCTTGATATTTGGAGAAATGAAGGACTTCAAGTTGAAGGTTCTGTTTGTGATTA ***** * * * * *	240
DS-TRI	TTATCACGTAAGCTGAACGTGATAAGCTTATGCAGACTGTTGCACATGATTTTGTGAAAG	297
ST-TRI	TTATCTGTAAGCTGAACGTGATAAGCTTATGCAGACTGTTGAAGATGATTTTGTGAAAG	270
HN-TRI	TTACTGCGCTCTGAACGTGACAACTTATGCAGACTGTTGCAGATTTATTTAATGAAAG *** ** * * * * *	300
DS-TRI	CTCAATATTTTGGTGAATAATGCCGGGTGGTGATACATAAGGAAGCTAAAGATTTTCA	357
ST-TRI	CTTAATATTTTGGTGAATAATGCAGGAGTGGCAATACATAAGGAAGCTAAAGATTTTCA	330
HN-TRI	CTCAATATTTTGGTGAATAATGCAGGTGTGGTGATACATAAGGAAGCTAAAGATTTTCA ** * * * * *	360
DS-TRI	GAAAAAGATTACAACATAATTATGGGAACTAATTTTGAAGCAGCTTATCATTTATCTCAA	417
ST-TRI	AAAGAAGATTACAATAATAATTATGGGAACTAATTTTGAAGCTGCTTATCATTTATCTCAA	390
HN-TRI	AAAGAAGATTACGACATCGTATTGGGCACTAATTTTGAAGCAGCTTATCATTTATCTCAA ** * * * * *	420
DS-TRI	ATTGCTTATCCATTATGAAGGCTTCTCAAATGGAATGTTATTTTCTCTTCTTCTATT	477
ST-TRI	ATTGCTTATCCTTTATGAAGGCTTCTCAAATGGAATGTTATTTTGTCTTCTTCTATT	450
HN-TRI	CTTGCTTATCCTTTTGAAGGCACTCAAATGGCAATGTTATTTTCTCTTCTTCTATA ***** * * * * *	480
	Primer DP4	
DS-TRI	GCTGGATTTTTCAGCACTGCCTTCTGTTTCTCTTACTCAGCTTCCAAGGTGCAATAAT	537
ST-TRI	GCTGGATTTTTCAGCATTGCCCTCTCTTTCTCTTACTCTGCTTCCAAGGTGCAATAAT	510
HN-TRI	GCTGGATTTTTCAGCACTGCCTTCTGTTTCTCTTTATCTGCTTCCAAGGTGCAATAAT ***** * * * * *	540
DS-TRI	CAAATGACAAAGAGTTTGGCTTGTGAATGGGCTAAAGACAACATTCGGGTCAATTCAGTT	597
ST-TRI	CAAATGACAAAGAACTTGGCATGTGAATGGGCAAGGACAATTCGGGTCAATTCAGTT	570
HN-TRI	CAAATAACGAAGAAGTTGGCATGTGAATGGGCAAGGACAACATTCGGGTCAATTCAGTT ***** * * * * *	600
DS-TRI	GCTCCGGGAGTCATTTAACCCTCACTGGTTGAACTGCAATTAAGAAAAATCCTCATCAA	657
ST-TRI	GCTCCAGCAGTCATTTAACCCTCACTCGTTGAACTGCAATTAAGAAAAATCCTCATCAA	630
HN-TRI	GCTCCAGGAGTCATTTAACCCTCACTATTGAACTGCAATTAAGAAAAATCCTCATCAA ***** * * * * *	660
DS-TRI	AAAGAAGAAATAGACAATTTTATTGTCAAGACTCCTATGGGCCGGCCGGAAAGCCCCAA	717
ST-TRI	AAAGAAGAAATGATAGTTTGTGTTAAGACTCCTTGGGCCGGCCGGAAAGCCCTGAA	690
HN-TRI	AAAGAAGAAATAGACAATTTTATTGTCAAGACTCCTATGGGCCGGCCGGAAAGCCCCAA ***** * * * * *	720
	Primer DP2	
DS-TRI	GAAGTTTCTGCACTAATAGCTTTTCTTTGCTTCCCAGCTGCTTCATATATTACGGGCAG	777
ST-TRI	GAAGTTTCTGCACTAATAGCTTTTCTTTGCTTCCCAGCTGCTTCTTATATTACGGGCCAA	750
HN-TRI	GAAGTTTCTGCACTAATAGCTTTTCTTTGCTTCCCAGCTGCTTCTTATATTACTGGGCCAA **** * * * * *	780
DS-TRI	ATCATATGGGCTGACGGTGGATTACAGCTAATGGTGGGTTTAA	822
ST-TRI	ATTATATGGGCGGATGGTGGATTACAGCTAATGGTGGGTTTAA	795
HN-TRI	ATTATATGGGCTGATGGTGGATTACAGCTAATGGTGGGTTTGA ** * * * * *	825

Abb. G-3: Alignment der TRI von *Datura stramonium* (DS), *Hyoscyamus niger* (HN) und *Solanum tuberosum* (ST). Die Lage der Primer, die mit RT-PCR zu Amplifikaten führten, sind farbig markiert und basierten sowohl auf einem TRI- als auch TRII-Alignment (hier wurde exemplarisch das TRI-Alignment dargestellt). DP1+2 (grün) ergaben ein Amplifikat für die CS-trI, DP3+4 (blau) ergaben ein Amplifikat für die putative CS-tr.

G 3 Vektorkarten

G 3.1 Vektorkarte der trI in pET21d

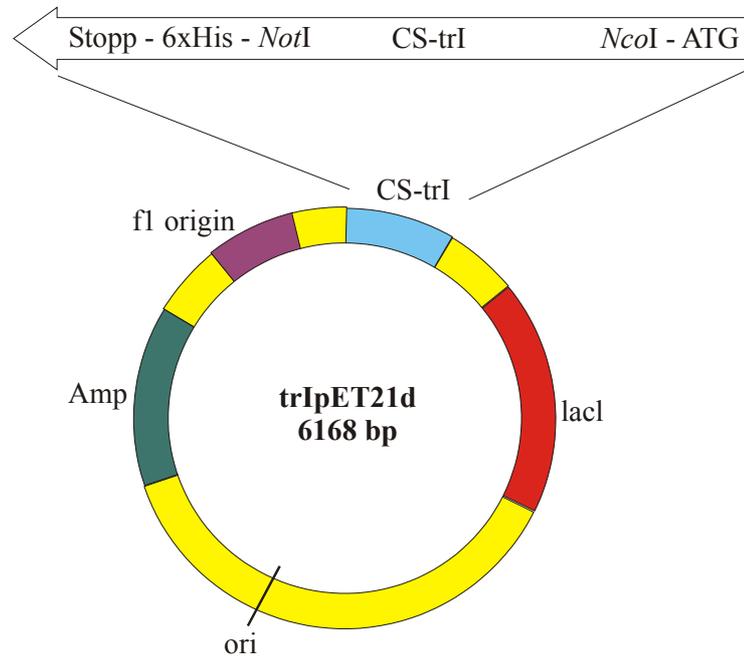


Abb. G-4: TRI in pET21d (Novagen). Die cDNA wurde mit den Schnittstellen *NcoI* und *NotI* so eingefügt, dass der C-terminale 6fach Histidinrest genutzt wird.

G 3.2 Vektorkarte der putativen tr in pET21d

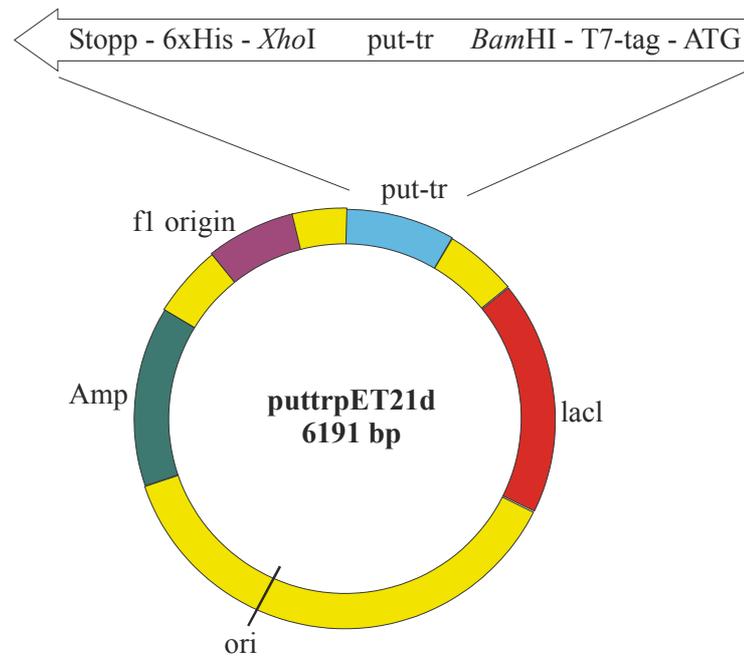


Abb. G-5: Die putative tr in pET21d (Novagen). Die cDNA wurde mit den Schnittstellen *BamHI* und *XhoI* so eingefügt, dass der C-terminale 6fach Histidinrest genutzt wird.

G 3.3 Vektorkarte der putativen tr in pQE30

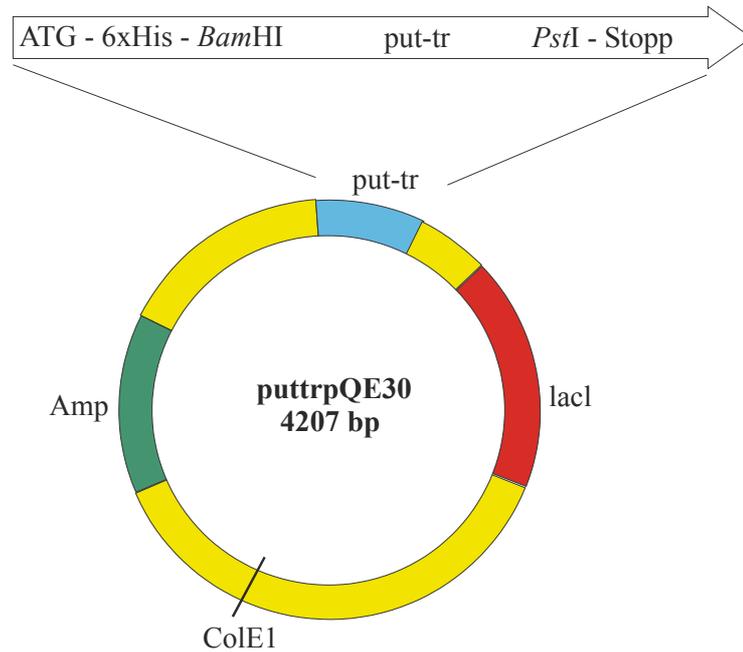


Abb. G-6: Die putative tr in pQE30 (Qiagen). Die cDNA wurde mit den Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*I so eingefügt, dass der N-terminale 6fach Histidinrest genutzt wird.

G 3.4 Vektorkarte der putativen tr in pQE60

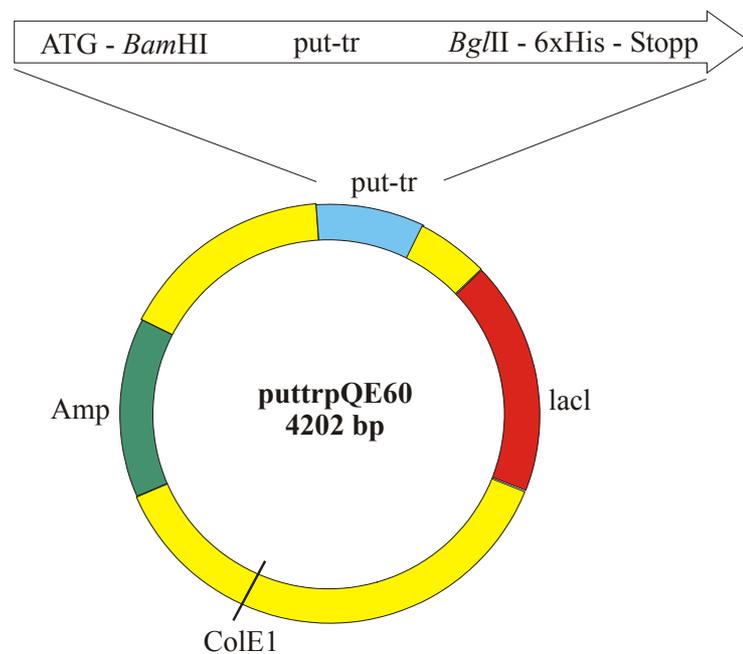


Abb. G-7: Die putative tr in pQE60 (Qiagen). Die cDNA wurde mit den Schnittstellen *Bam*HI und *Bg*/II so eingefügt, dass der C-terminale 6fach Histidinrest genutzt wird.

G 3.5 Vektorkarte der putativen tr in pICH8371-2

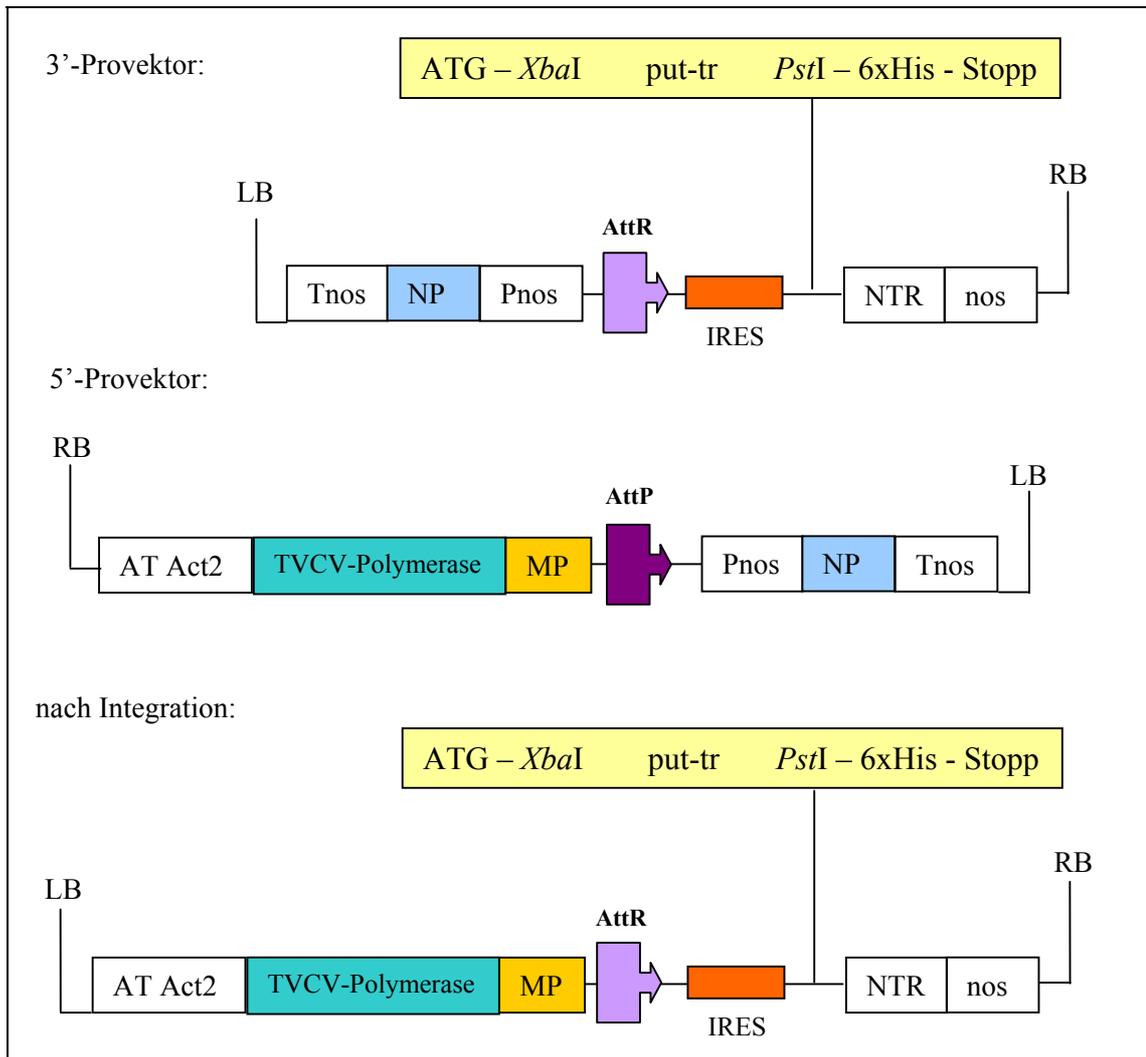


Abb. G-8: Provektorsystem pICH8371-2 (Icon Genetics GmbH). Jeder Provektor ist ca. 6 kb groß und enthält eine Kanamycin-Resistenz. LB: *left border*, RB: *right border*, NTR: Nicht-translatierende Region, IRES: Interne Ribosomenbindungsstelle, nos: Nos-Terminator, AttR: *attached RNA*, AT Act2: Actin2 aus *Arabidopsis thaliana*, TVCV: *Turnip vein-clearing vector*, MP: *Movement Protein*. Die cDNA wurde mit den Schnittstellen *XbaI* und *PstI* mit einem C-terminalen 6fach Histidinrest eingefügt. Eine weitere Klonierungsvariante enthielt nur die cDNA ohne Histidinrest.

G 3.6 Vektorkarte der putativen tr in pICZ A α

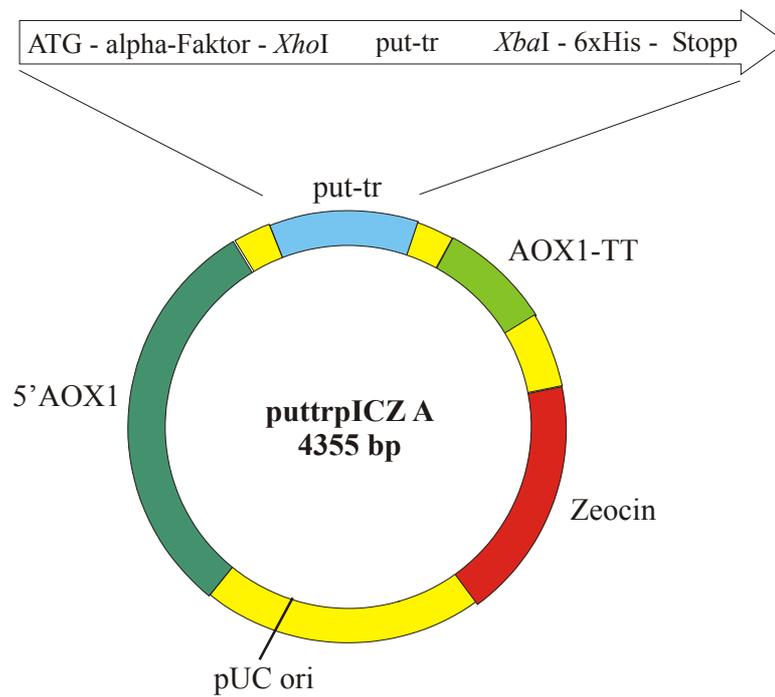


Abb. G-9: Die putative tr in pICZ A α (Invitrogen). Die cDNA wurde mit den Schnittstellen *XhoI* und *XbaI* so eingefügt, dass der C-terminale 6fach Histidinrest genutzt wird. Der α -Faktor dient dem Ausschleusen des Proteins aus der Hefezelle.

G 4 Charakterisierung der TRI

G 4.1 Nachweis der Substratspezifität

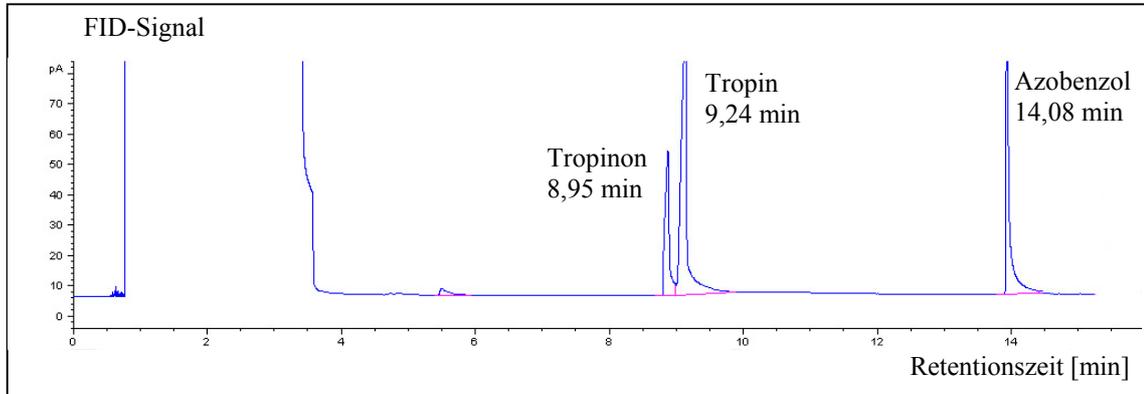


Abb. G-10: Gaschromatogram (FID-Signal) des Enzymumsatzes der rekombinant gewonnenen TRI mit Tropinon.

G 4.2 pH-Optimum

pH-Wert	Reduktion		Oxidation	
	relative Aktivität in %	relative s_d	relative Aktivität in %	relative s_d
4,0	0,0	0,0		
4,5	11,2	1,1		
5,0	36,3	0,3		
5,5	41,4	2,1		
6,0	67,1	6,8		
6,5	88,3	0,2		
7,0	100,0	1,9	0,6	0,3
7,5	87,3	1,7	2,9	0,1
8,0	62,8	3,5	20,4	2,7
8,5	53,9	1,9	35,5	0,3
9,0	33,3	1,1	100,0	1,4
9,5	27,4	1,7	93,7	0,3
10,0	2,2	2,1	0,0	0,0

Tab. G-2: Relative Aktivität der TRI bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

G 4.3 Umsetzung von Substratanaloga

	relative Aktivität in %			relative s_d
	DS-TRI	HN-TRI	CS-TRI	CS-TRI
4-Methylcyclohexanon	36	50	562	10,7
3-Methylcyclohexanon	38	40	827	24,5
N-Propyl-4-piperidinon	0	0	491	22,1
N-Methyl-4-piperidinon	25	25	44	4,6
3-Chinuclidinon	76	90	76	5,1
Tropinon	100	100	100	6,6

Tab. G-3: Relative Aktivität der TRI mit unterschiedlichen Substraten. DS: *Datura stramonium*, HN: *Hyoscyamus niger*, CS: *Calystegia sepium*. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

G 4.4 K_m -Wert und v_{max} -Bestimmung

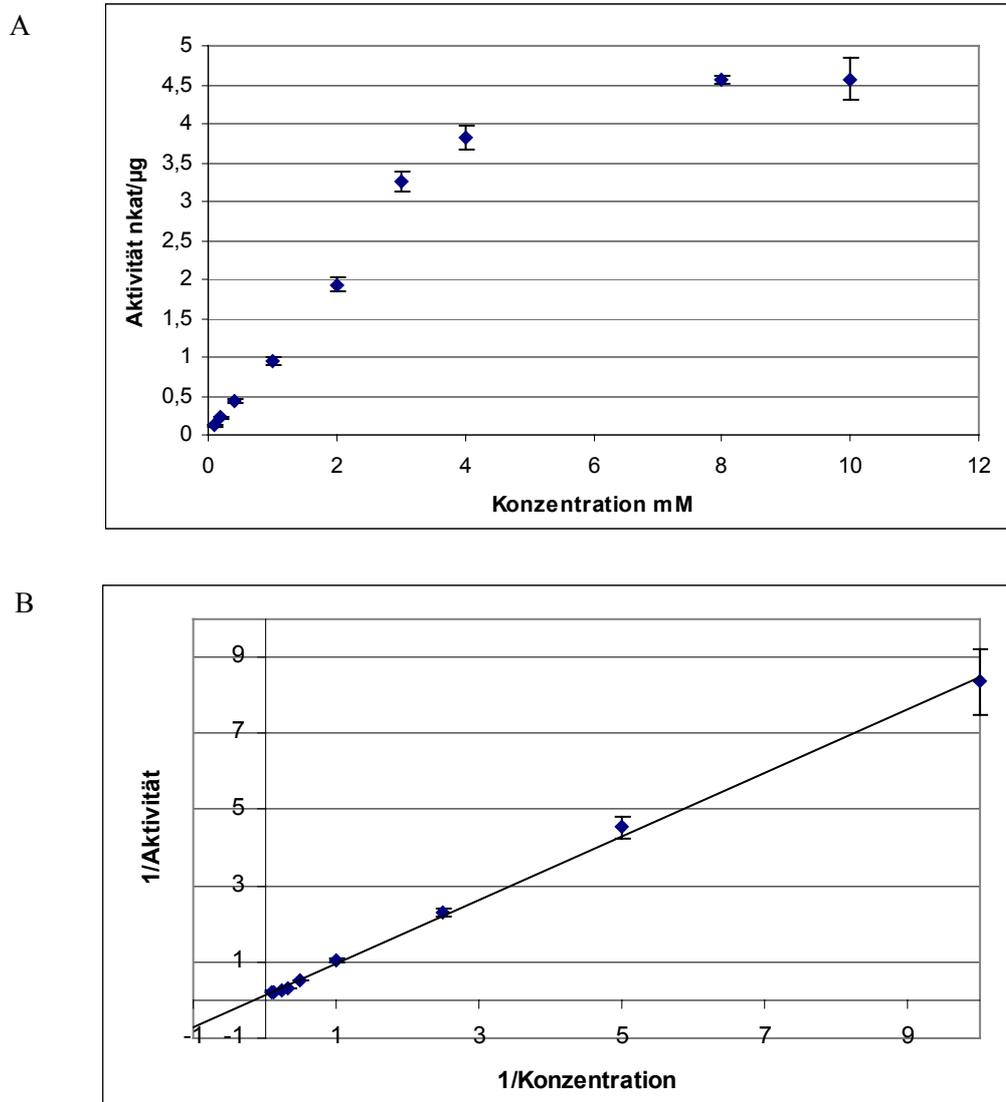


Abb. G-11: K_m -Wert und v_{max} -Bestimmung von TRI bei pH 6,4. A: Michaelis-Menten-Kinetik B: Lineweaver-Burk-Darstellung im Konzentrationsbereich von 0,1 – 10 mM. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

G 5 Charakterisierung der TRII

G 5.1 Nachweis der Substratspezifität

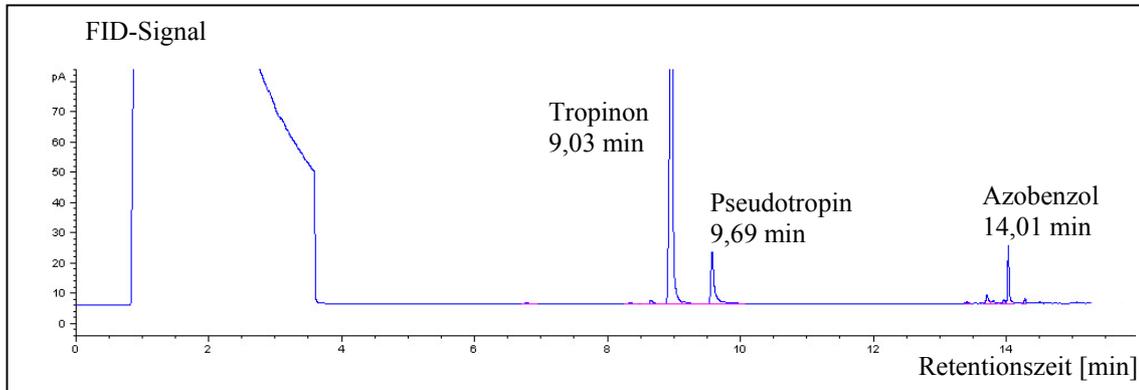


Abb. G-12: Gaschromatogram (FID-Signal) des Enzymumsatzes der nativen TRII mit Tropinon.

G 5.2 pH-Optimum

pH-Wert	relative Aktivität in %	relative s_d
3,5	0,0	0,0
4,0	57,8	4,2
4,5	98,3	4,4
5,0	92,9	9,3
5,5	100,0	3,3
6,0	89,7	6,6
6,5	72,3	4,9
7,0	71,4	1,6
7,5	59,5	4,2
8,0	59,5	2,1
8,5	50,6	1,1
9,0	45,7	2,8

Tab. G-4: Relative Aktivität der TRII bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

G 5.3 Umsetzung von Substratanaloga

Substrate	relative Aktivität in %					relative s_d CS-TRII
	HN-TRII	DS-TRII	AB-TRII	ST-TRII	CS-TRII	
Tropinon	100	100	100	100	100	5,4
4-Methylcyclohexanon	50	22	28	17	67	3,0
3-Methylcyclohexanon	38	33	39	13	101	2,7
N-Propyl-4-piperidinon	0	73	129	83	335	15,9
N-Methyl-4-piperidinon	19	178	313	142	566	41,4
3-Chinuclidinon	0	0	0	0	0	0

Tab. G-5: Relative Aktivität der TRII mit unterschiedlichen Substraten. HN: *Hyoscyamus niger*, DS: *Datura stramonium*, AB: *Atropa belladonna*, ST: *Solanum tuberosum*, CS: *Calystegia sepium*. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

G 5.4 K_m -Wert und v_{max} -Bestimmung

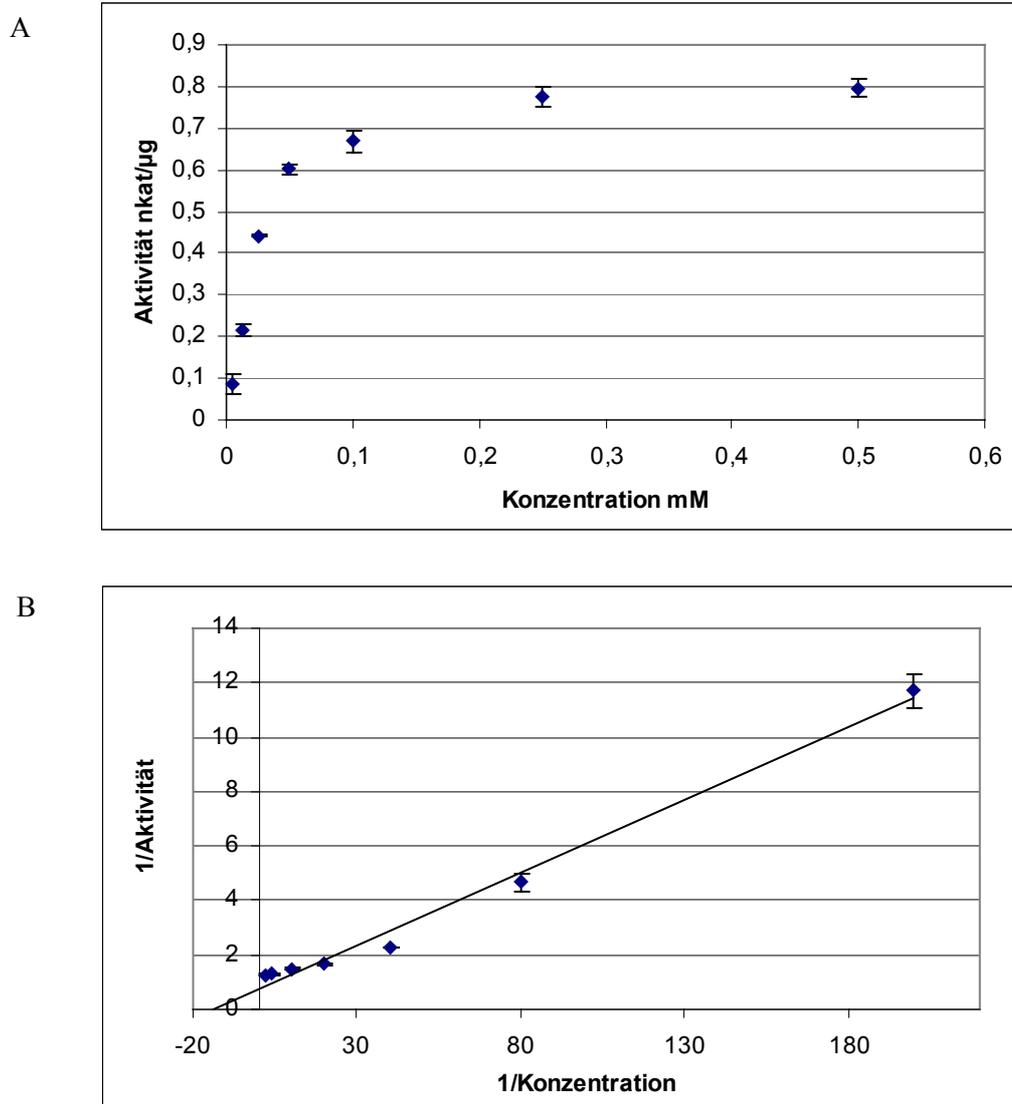


Abb. G-13: K_m -Wert und v_{max} -Bestimmung von TRII bei pH 5,5. A: Michaelis-Menten-Kinetik B: Lineweaver-Burk-Darstellung im Konzentrationsbereich von 0,005 – 0,5 mM. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

G 6 *Akkumulation von Calysteginen in C. sepium*

	Calystegin A ₃		Calystegin B ₂	
	Mittelwert µg/g TM	S _d	Mittelwert µg/g TM	S _d
Blatt jung	1343	467,0	966	337,0
Blatt alt	122	28,2	40	9,0
Sprossachse	330	82,9	222	48,4
Blüte	424	126,8	237	86,2
Wurzel	809	401,1	418	198,1

Tab. G-6: Akkumulation von Calysteginen in *C. sepium*. Die Mittelwerte sind aus mind. 5 unabhängigen Messwerten berechnet.

G 7 *Akkumulation von Metaboliten in C. sepium*

	Tropinon		Pseudotropin		Tropin	
	Mittelwert µg/g TM	S _d	Mittelwert µg/g TM	S _d	Mittelwert µg/g TM	S _d
Blatt jung	29	16,8	41	17,8	51	25,3
Blatt alt	21	11,5	19	5,3	26	3,5
Sprossachse	23	17,7	23	8,7	29	9,2
Blüte	24	13,4	27	10,1	35	21,4
Wurzelkultur	25	10,3	248	52,0	87	38,6

Tab. G-7: Akkumulation der Metabolite Tropinon, Pseudotropin und Tropin in *C. sepium*. Die Mittelwerte sind aus 3-5 unabhängigen Messwerten berechnet.

G 8 Fütterung von ¹⁵N-Tropinon

Alkaloid	Fragment/s _d	Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem Fragment in %			
		0 (Kontrolle)	48 h	96 h	144 h
Calystegin A ₃	156	86,4	60,1	48,6	2,7
	s _d	1,26	0,68	0,06	1,28
	157	13,6	39,9	51,4	97,3
	s _d	1,26	0,68	0,06	1,28
Calystegin B ₁	244	80,9	68,1	61,6	55,1
	s _d	6,05	0,54	0,85	0,83
	245	19,1	31,9	38,4	44,9
	s _d	6,05	0,54	0,85	0,83
Calystegin B ₂	156	75,9	61,5	53,6	49,9
	s _d	0,20	0,51	0,14	0,71
	157	24,1	38,5	46,4	50,1
	s _d	0,20	0,51	0,14	0,71
2,7-Dihydroxy-nortropan	287	79,9	74,1	58,8	52,6
	s _d	0,30	2,70	1,90	3,05
	288	20,1	25,9	41,2	47,4
	s _d	0,30	2,70	1,90	3,05

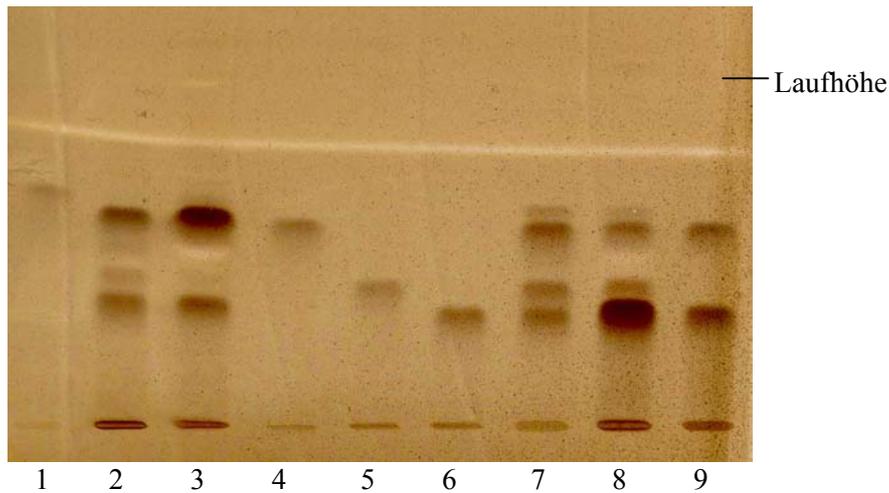
Tab. G-8: Einbau von ¹⁵N-Tropinon in die Calystegine A₃, B₁, B₂ und 2,7-Dihydroxynortropan. Die Mittelwerte sind aus 3-5 unabhängigen Messwerten berechnet.

G 9 Kinetischer Verlauf der Calysteginbiosynthese

Tage	Calystegin A ₃		Calystegin B ₁		Calystegin B ₂	
	µg/h/g TM	s _d	µg/h/g TM	s _d	µg/h/g TM	s _d
0	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0
1	7,71	1,26	3,01	1,01	2,56	1,07
2	15,69	6,51	6,14	2,50	7,32	4,00
3	8,13	2,20	3,42	0,84	4,16	1,75
6	5,91	2,81	2,41	1,08	3,80	2,29
9	2,96	0,90	0,99	0,28	1,34	0,44

Tab. G-9: Kinetischer Verlauf der Calysteginbiosynthese nach Umsetzung komplett ¹⁵N-markierter Wurzelkulturen auf ¹⁴N-Medium. Die danach gebildete Menge an Calystegin wurde auf die Zeit (h) und Trockenmasse bezogen. Die Mittelwerte sind aus 4-6 unabhängigen Messwerten berechnet.

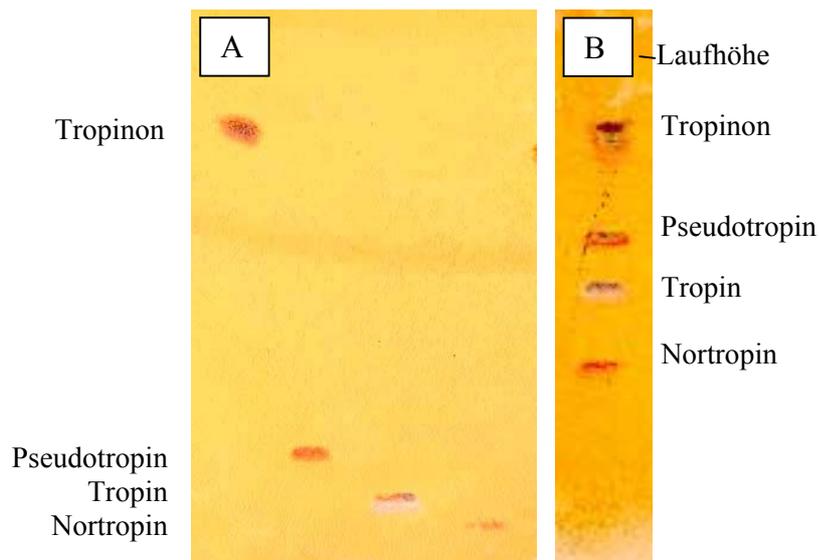
G 10 Trennung von Calysteginen mit AMD-TLC



- 1 Calystegin A₅, 1 µg
- 2 Extrakt aus *C. sepium* Wurzelkultur
- 3 Extrakt aus *A. belladonna* Wurzelkultur
- 4 Calystegin A₃, 1 µg
- 5 Calystegin B₁, 1 µg
- 6 Calystegin B₂, 1 µg
- 7 Gemisch aus 1, 4 – 6, je 1 µg
- 8 Extrakt aus *H. muticus* Wurzeln
- 9 Extrakt aus *S. tuberosum* Keimen

Die DC wurde mit AMD, Methode B (C 4.3.2) entwickelt und mit Silberreagenz angefärbt (B 2.3.9.3).

G 11 Trennung von Tropinon, Pseudotropin, Tropin und Nortropin



A Die Trennung erfolgte mit einfacher Entwicklung, Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 22:4,5:0,5

B Die Trennung erfolgte mit AMD, Methode A (C 4.3.2)

Von jedem Standard wurden 5 µg aufgetragen. Beide Dünnschichtplatten wurden mit Dragendorff's Reagenz var. Munier angefärbt (B 2.3.9.3).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie des Fachbereiches Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. B. Dräger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihre stetige fachliche und persönliche Unterstützung und Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Für eine freundliche und fördernde Arbeitsatmosphäre mit stets guter Laune sorgte die gesamte Arbeitsgruppe bestehend aus Dirk Höke, Dr. Ronald Keiner, Dr. Grit Rothe, Olaf Stenzel, Heike Kaiser, Antje-Kristin Schunack, Andrea Brock, Margret Hentzschel, Michael Teuber und Dr. Bettina Rahfeld. Danke für die schöne Zeit am Institut und im Privaten! Mein herzlicher Dank gilt ebenso Frau Ködel, Frau Schöne, Frau Watzka, Frau Marx und Frau Wodak für die ständige und hilfsbereite Unterstützung im technischen Bereich.

Ich möchte mich bei Priv.-Doz. Dr. habil. B. Schneider vom Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena für die zahlreichen NMR-Messungen und seine theoretischen Hilfestellungen recht herzlich bedanken.

Bei Anna-Carolin Meier und Franziska Schaaf bedanke ich mich sehr herzlich für die gelungene Zusammenarbeit im Rahmen von Diplomarbeiten.

Großer Dank gilt meinen beiden wichtigsten Lektorinnen Dr. Bettina Rahfeld und Dr. Grit Rothe für ihre hilfreichen kritischen Bemerkungen.

Ich bedanke mich bei der Icon Genetics GmbH für die freundliche Bereitstellung des Vektorsystems und die Möglichkeit der Durchführung der Proteinexpression in Tabakpflanzen. Mein besonderer Dank gilt Dr. Mario Gils für seine hilfreiche Unterstützung.

Für die gute Zusammenarbeit bei der schwierigen Isolierung des TRII-Proteins danke ich Dr. S. Reva von der Universität Chisinau, Moldavien.

Dr. A. Peterson vom Biozentrum der Martin-Luther-Universität gilt mein besonderer Dank für die Durchführung zahlreicher DNA-Sequenzierungen.

Weiterhin möchte ich meinen Dank Steffi Rau vom Max-Planck-Institut für Enzymologie und Proteinfaltung für die Einführung in die zweidimensionale Gelelektrophorese und Frau Dr. A. Schierhorn vom Fachbereich Biochemie/Biotechnologie für die Bemühungen der Proteinsequenzierung äußern.

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

Meinem Mann Stephan und meiner Familie möchte ich mit dieser Arbeit für jegliche Unterstützung auf dem Weg bis hierher danken.

Erklärung

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

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

Halle (Saale), 03.06.2003

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Yvonne Sichhart, geb. Scholl
Geburtsdatum: 03.06.1973
Geburtsort: Köthen / Anhalt
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

Oberschule „Käthe Kollwitz“ Quellendorf 1980 - 1990
Gymnasium in der Wallstraße Köthen 1990 - 1992

Studium/Praktika:

Pharmaziestudium an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1992 - 1997

Diplomarbeit in der Bayer Bitterfeld GmbH
Thema: Erarbeitung einer Methode zur quantitativen
Bestimmung von Wirkstoffen in Tabletten mittels
NIR-Spektroskopie April - September 1997

Praktikum in der August-Bebel-Apotheke Halle Oktober 1997 - März 1998

Approbation zur Apothekerin April 1998

Praktikum in der Qualitätssicherung der Bayer
Healthcare Company Ltd. Beijing/China Mai - Oktober 1998

Promotion:

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe
von Frau Prof. Dr. B. Dräger seit Februar 1999

Halle (Saale), 3. Juni 2003