

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

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

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

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

Abbildungsverzeichnis

Abb. A-1: Strukturformeln ausgewählter Calystegine.	1
Abb. A-2: Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese.	5
Abb. B-1: Anatomischer Aufbau der Kartoffelknolle.	11
Abb. B-2: RACE-PCR-Schema.	22
Abb. B-3: Prinzip des photometrischen Enzymassays.	29
Abb. B-4: Strukturen von Tropinon-Substratanaloga für den Enzymassay.	32
Abb. C-1: Gaschromatogramme eines Kartoffelkeimextraktes.	34
Abb. C-2: GC-MS-Fragmentierungsmuster von Calystegin-TMS-Derivaten.	35
Abb. C-3: Gaschromatogramm mit Massenspektrum des Calystegins. B_1	37
Abb. C-4: Akkumulation der Calystegine in verschiedenen Kartoffelsorten.	39
Abb. C-5: Calysteginakkumulation in Knollen und Keimen.	41
Abb. C-6: Calysteginakkumulation in Pflanzen.	43
Abb. C-7: Prozentuales Trockenmasse/Frischmasse-Verhältnis.	44
Abb. C-8: Verteilung der Calystegine in ca. 120 mm langen Kartoffelkeimen.	45
Abb. C-9: Fütterung von Kartoffelkeimen und <i>in vitro</i> Pflanzen mit 5 mM Tropinon.	46
Abb. C-10: Gaschromatogramm (FID-Signal) nach Fütterungsversuchen.	48
Abb. C-11: GC-MS Fragmentierungsmuster des Tropins und Pseudotropins.	48
Abb. C-12: Aminosäurevergleich der TRII-Sequenzen.	54
Abb. C-13: Aminosäurevergleich der TRI-Sequenzen.	56
Abb. C-14: SDS-PAGE der TRII-Überexpression.	57
Abb. C-15: Chromatogramm des Anionenaustauschers Fractogel EMD-DEAE.	58
Abb. C-16: rekombinantes TRII-Protein nach FPLC Anreinigung.	59
Abb. C-17: Reinigungsschema für rekombinantes StTRII-His-Tag-Protein.	60
Abb. C-18: Reinigungsschema für rekombinantes StTRI-SE-His-Tag-Protein.	61
Abb. C-19: pH-Abhängigkeit der TRII-Reduktaseaktivität beim Umsatz von Tropinon.	62
Abb. C-20: Relative Aktivitäten für verschiedene Substratanaloga.	64
Abb. C-21: Nachweis der TRI- und TRII-Gene im Genom von <i>S. tuberosum</i> .	66
Abb. C-22: Expression von TRII in Kartoffelpflanzen und Knollen.	67
Abb. C-23: Expression von TRII in Wurzelkulturen und <i>in vitro</i> Pflanzen.	68
Abb. C-24: Expression von TRI in Kartoffelpflanzen und Knollen.	69
Abb. D-1: Aminosäurevergleich der TR's.	80
Abb. G-1: Eichgerade zur Calysteginbestimmung.	I
Abb. G-2: StTRI-SE-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	IV
Abb. G-3: StTRI-SS-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	V
Abb. G-4: StTRI-homologe cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	VI
Abb. G-5: StTRII-D1-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	VII
Abb. G-6: StTRII-D2-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	VIII
Abb. G-7: StTRII-D3-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	IX
Abb. G-8: StTRII-L1-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	X
Abb. G-9: StTRII-L2-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	XI
Abb. G-10: StTRII-L3-cDNA und korrespondierende Aminosäuresequenz.	XII
Abb. G-11: Vektorkarte TRII-cDNA pET21d.	XIII
Abb. G-12: Vektorkarte TRI-cDNA pET21d.	XIV
Abb. G-13: Gaschromatogramm der TRII-Tropinonumsetzung.	XV
Abb. G-14: Gaschromatogramm der TRII-Nortropinonumsetzung.	XV
Abb. G-15: Gaschromatogramm) der TRI-Tropinonumsetzung.	XV
Abb. G-16: Dünnschichtchromatogramm der Tropinonumsetzung.	XVI
Abb. G-17: TRII K_m und V_{max} Bestimmung des Tropinons.	XVII
Abb. G-18: Kinetische Parameter der TRII mit Nortropinon bei pH 6.4.	XVIII

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

Abkürzungsverzeichnis

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

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

Publikationen, aus denen Teile der vorliegenden Arbeit entnommen wurden:

Publikationen:

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

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen:

1. Vorträge:

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

2. Poster:

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