

A Einleitung

A 1 Die Calystegine

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

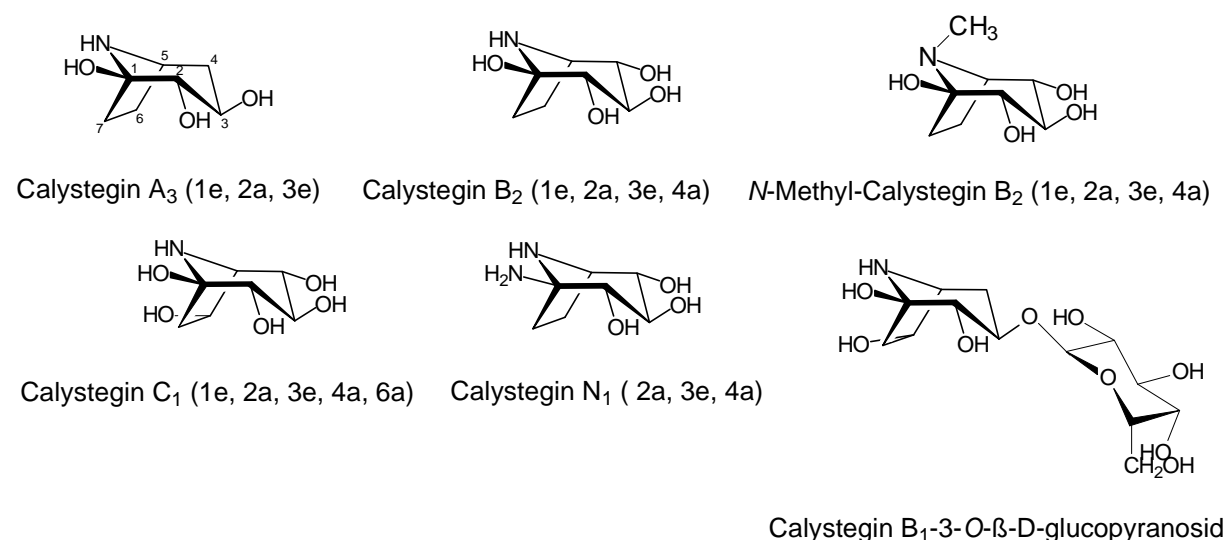


Abb. A-1: Strukturformeln ausgewählter Calystegine.

Tepfer und Mitarbeiter (1988a; 1988b) berichteten von der Entdeckung neuartiger Substanzen im Wurzelexudat von *Calystegia sepium*, *Convolvulus arvensis* (beide *Convolvulaceae*) und *Atropa belladonna* (*Solanaceae*). Die Strukturen der Calystegine A₃, B₁ und B₂ wurden mittels HPLC-MS und NMR aufgeklärt (Ducrot und Lallemand 1990; Goldmann *et al.* 1990). Ihr Trivialname leitet sich von *Calystegia sepium* ab, der Pflanze, in der sie zuerst entdeckt wurden. Allerdings wurde die Struktur von zwei Verbindungen (bezeichnet als Calystegin A₁ und A₂), die ein ähnliches Elutionsverhalten wie Calystegin A₃ aufwiesen, nicht bestimmt (Goldmann *et al.* 1990). Aus diesem Grund existieren auch keine Strukturen für die Calystegine A₁ und A₂. In späteren Untersuchungen wurde in *C. sepium* neben den Calysteginen B₁, B₂ und A₃ noch das Calystegin A₅ entdeckt (Schimming *et al.* 1998; Scholl *et al.*

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

A 1.1 Verbreitung der Calystegine

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

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

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

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

Die Calystegine treten in den einzelnen Pflanzenarten meist im Gemisch auf; in *Lycium chinense* (*Solanaceae*) wurden sogar 14 verschiedene Calystegine detektiert (Asano *et al.* 1997b). Darunter befinden sich zwei Calystegine vom Tropanyp, *N*-Methylcalystegin B₂ und C₁ (vgl. Abb. A-1). Neben Calystegin B₁ kommt in den Früchten von *Nicandra physaloides* ein 3-O- β -D-Glucopyranosyl-Calystegin B₁ vor (Griffiths *et al.* 1996).

Für das aus *Hyoscyamus niger* isolierte Calystegin N₁ (vgl. Abb. A-1) wurde in der Literatur diskutiert, daß es möglicherweise ein Artefakt der Isolierung ist. Es kann sich leicht in Calystegin B₂ umwandeln (Molyneux *et al.* 1996).

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

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

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

A 1.2 Glycosidasehemmstoffe

Die strukturelle Ähnlichkeit der Calystegine mit den Kohlenhydraten begründet ihre biologische Aktivität als Glycosidasehemmstoffe. Molyneux und Mitarbeiter (1993) berichten zum ersten Mal über die kompetitive Hemmung von α -Galactosidase und β -Glucosidase durch die Calystegine A₃, B₁ und B₂. In der Folgezeit wurden intensive Untersuchungen zur Hemmung der Glycosidasen durchgeführt (Asano *et al.* 1994a; 1995; 1996a; 1996b; 1997a; 1997b; 1997c; Kato *et al.* 1997). Einige markante Daten der Glycosidasehemmung sind in Tab. A-1 dargestellt. Mannosidasen werden durch Calystegine nicht gehemmt (Molyneux *et al.* 1993).

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

Tab. A-1: Calystegine als Glycosidasehemmstoffe. IC₅₀-Werte für ausgewählte Glycosidasen. kH: keine Hemmung. Die Werte entstammen Asano *et al.* 1995; 1997b.

Eine Korrelation zwischen der Stärke der Hemmung und der chemischen Struktur der Calystegine ist schwierig. Eine Zunahme der Hydroxylierung steigert die Hemmeigenschaften gegenüber einigen Enzymen (β -Glucosidase). Die dreifach hydroxylierten Calystegine haben keine (Calystegin A₅) oder nur geringe inhibitorische Eigenschaften (Asano *et al.* 1995). Calystegin C₁ ist ein potenter Inhibitor von β -Glucosidasen; gegenüber α -Galactosidasen ist seine Aktivität aber nur gering.

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

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

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

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

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

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

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

A 1.3 Tropanalkaloid-Biosynthese

Die Biosynthese der Tropanalkaloide und der Calystegine hat ihren Ursprung in den Aminosäuren (AS) L-Ornithin oder L-Arginin (vgl. Abb. A 2). Putrescin wird durch Decarboxylierung von L-Ornithin durch Ornithindecarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) und/oder durch Decarboxylierung von L-Arginin durch Arginindecarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) über das Zwischenprodukt Agmatin gebildet. Alle lebenden Organismen besitzen eine ODC, während den Säugetierzellen und vielen niederen Eukaryoten die ADC fehlt (Hashimoto und Yamada 1994). ODC und ADC-cDNA's wurden aus Tomate isoliert (Alabadi und Carbonell 1998; Rastogi *et al.* 1993).

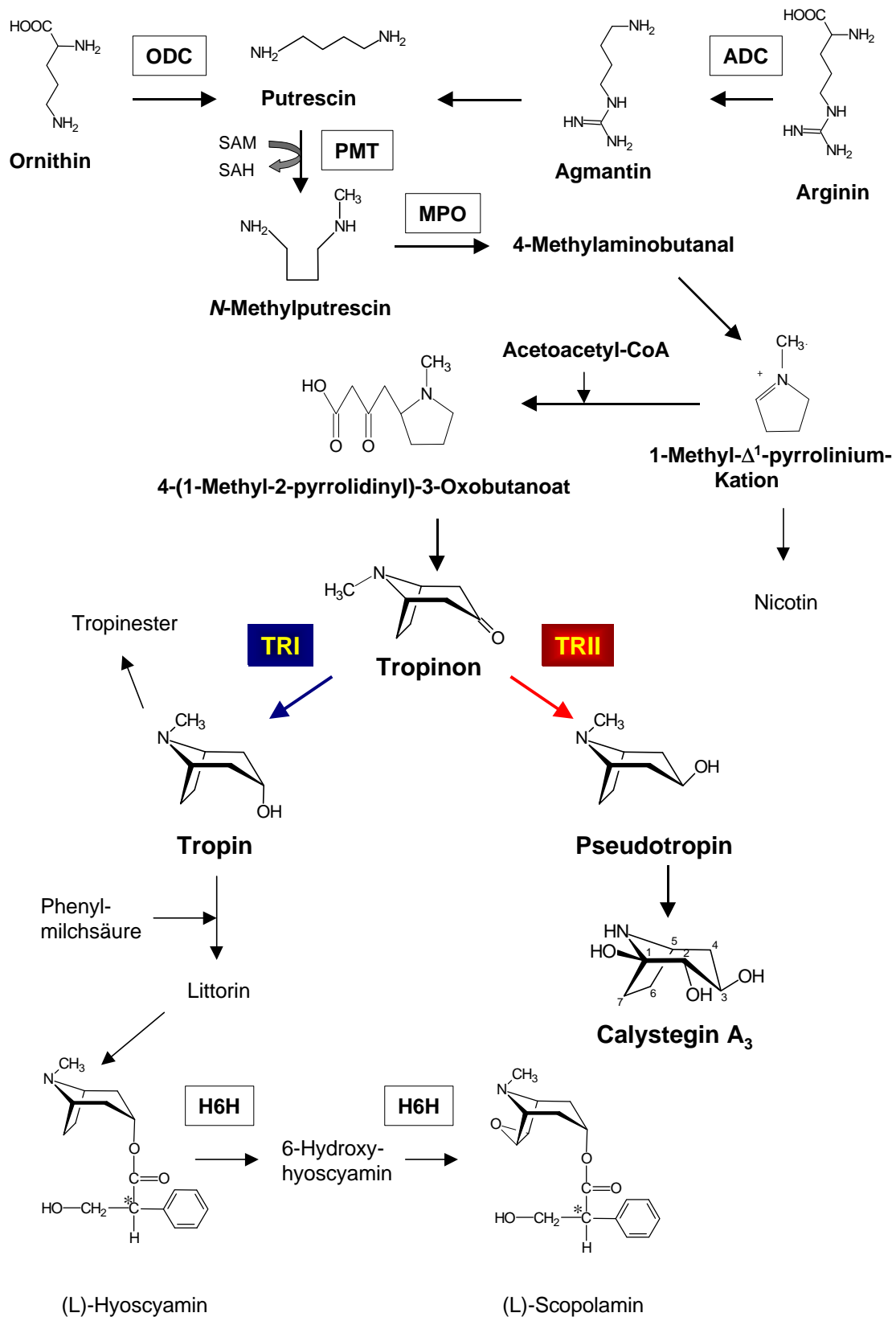


Abb. A-2: Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese. ODC: Ornithindecaboxylase; ADC: Arginindecaboxylase; PMT: Putrescin-*N*-Methyltransferase; MPO: Methylputrescin-Oxidase; TRI: tropinbildende Tropinonreduktase; TRII: pseudotropinbildende Tropinonreduktase; H6H: Hyoscyamin-6-Hydroxylase; SAM: S-Adenosyl-L-Methionin;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

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

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

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

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

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

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

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

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

Das Endprodukt der Tropanalkaloidbiosynthese Scopolamin, ein 6,7-Epoxid, wird aus Hyoscyamin über das Zwischenprodukt 6 β -Hydroxyhyoscyamin gebildet. Die Hyoscyamin-6-hydroxylase (H6H, EC 1.14.11.11) gehört zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Hashimoto und Yamada 1986). Sie katalysiert bifunktional beide Oxidationsreaktionen (Hashimoto *et al.* 1993; Hashimoto und Yamada 1987), wobei die Hydroxylierung Oxoglutarat als Co-Substrat, sowie Fe²⁺, Ascorbat und molekularen Sauerstoff benötigt. *H6H*-cDNA's wurde bisher aus *H. niger* und *A. belladonna* Wurzelkulturen isoliert (Matsuda *et al.* 1991; Suzuki *et al.* 1999b).

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

A 1.4 Regulation der Tropan- und Calysteginbiosynthese

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

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

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

(Hibi *et al.* 1994).

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

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

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

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

A 1.5 Die Analytik der Calystegine

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

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

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

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

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

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

A 2 Aufgabenstellung

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

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

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

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

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