

B Material und Methoden

B 1 Materialien

B 1.1 Pflanzenmaterial

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

B 1.2 Keimungsbedingungen, Pflanzenanzucht und Probennahme

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

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

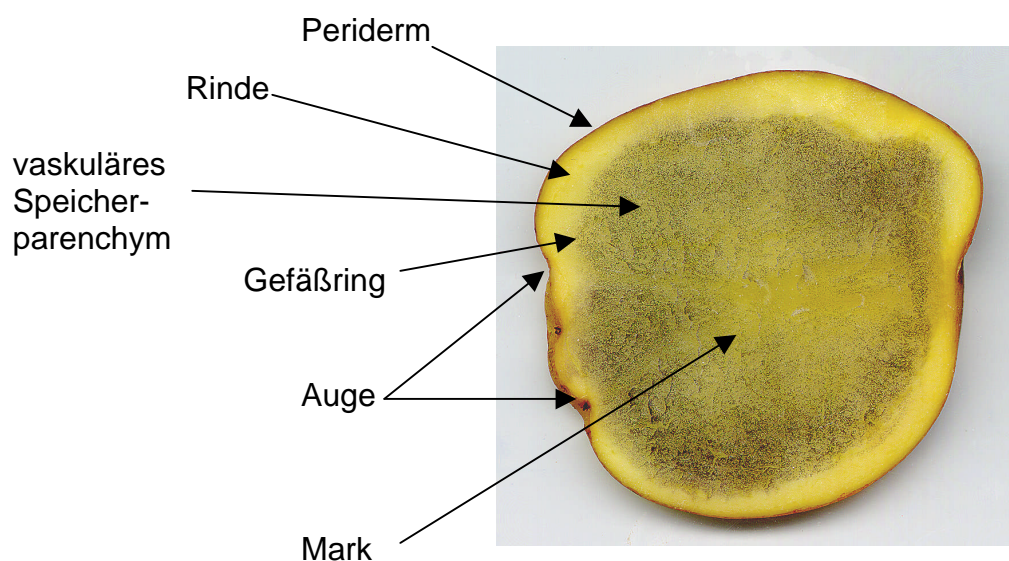


Abb. B-1: Anatomischer Aufbau der Kartoffelknolle nach International Potato Center, Peru, Bull. **6** (1986). Teile des Querschnittes wurden zur besseren Erkennung der Strukturen angefärbt.

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

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

B 1.3 Bakterienstämme

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

B 1.4 Plasmide und Vektoren

pCR® 2.1 TOPO TA	Amp ^r (Invitrogen)
pBluescript SK(+)	Amp ^r (Stratagene)
pET 21d	Amp ^r (Novagen)

B 1.5 cDNA-Banken

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

B 1.6 Oligonukleotide

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

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

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

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

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

B 1.7 Puffer, Standardlösungen und Medien

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

B 1.8 Kits und Enzyme

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

B 1.9 Chemikalien und Standards

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

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

Calysteginreferenzsubstanzen (A₅, A₃, B₁, B₂, B₃, B₄, C₁ und *N*-Methylcalystegin B₂) sowie zwei dihydroxylierte Nortropanalkaloide [bezeichnet als Alkaloid I und II, (Asano *et al.* 2001)] wurden von Prof. Naoki Asano (Kanazawa, Japan) zur Verfügung gestellt..

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

B 2 Methoden

B 2.1 Methoden der Analytik

B 2.1.1 Isolierung und Derivatisierung der Calystegine

Zur Quantifizierung der Calystegine in den Pflanzengewebe wurden 1 – 5 g Frischmasse verwendet. Die Gewebe wurden lyophilisiert (Heto FD 1.0) und anschließend zweimal mit 10 ml/g FM MeOH/H₂O (50 Vol%) extrahiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm wurden die Überstände vereinigt, unter Vakuum auf 40 % des Volumens eingengt und anschließend neutralisiert. Der eingengte Überstand wurde auf eine mit einem stark sauren Kationenaustauscher (Merck Ionenaustauscher I) gefüllte Säule (Länge 100 mm, d = 10 mm, ca. 5 ml Gel) gegeben. Gewaschen wurde mit H₂O entsprechend dem 3 - 4fachen Säulenvolumen und anschließend mit 2 N NH₄OH eluiert, bis das Eluat einen basischen pH-Wert hatte. Das Eluat wurde neutralisiert, unter Vakuum auf 1 ml/g FM eingengt und ein

Aliquot für die Derivatisierung lyophilisiert.

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

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

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

B 2.1.2 Calysteginbestimmung in verletzten Kartoffelkeimen

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

B 2.1.3 Fütterungsversuche mit Tropinon

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

B 2.1.4 Isolierung der Metabolite und der Reaktionsprodukte des Enzymassays

2 g Pflanzengewebe aus den Fütterungsversuchen (vgl. Kap. B 2.1.3) wurde mit dem Mörser homogenisiert, mit 700 µl MeOH/H₂O (50 Vol%) extrahiert und zentrifugiert (5 min, 12000 rpm, 4 °C). 950 µl des Überstandes bzw. 950 µl des Enzymassays bei der Untersuchung der Reaktionsprodukte (vgl. Kap. B 2.3.2) wurden mit 50 µl konzentriertem Ammoniak versetzt und auf Säulen, die mit 1 g Extrelut (Merck) gefüllt waren, gegeben. Nach 15 min wurde zweimal mit je 6 ml Chloroform eluiert. Das Eluat wurde unter Vakuum eingedampft und in 100 µl Ethylacetat aufgenommen. Diese Lösungen konnten direkt mittels GC und AMD-TLC untersucht werden (vgl. Kap. B 2.1.5).

B 2.1.5 Gaschromatographie

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

wurde Calystegin B₂ verwendet (vgl. Anhang Kap. G 1), als interner Standard diente Azobenzol. Die Quantifizierung aller Calystegine mit Hilfe der Calystegin B₂ Eichgerade war möglich, da der Unterschied in den Peakflächen der verschiedenen Calystegine bei gleicher Konzentrationen 5 % war. Pseudotropin, Tropin und Norpseudotropin wurden gewöhnlich als freie Alkohole analysiert. In silylierten Proben konnten sie aber auch als TMS-Derivate detektiert werden.

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

Geräteausstattung:

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

GC-Temperaturprogramme für die Calysteginbestimmung:

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

Programm 1:

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

Programm 2:

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

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

GC-Temperaturprogramm für Tropinon und dessen Metabolite:

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

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

B 2.1.6 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie

Geräteausstattung:

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

GC-MS-Temperaturprogramm für Calystegine

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

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

GC-MS-Temperaturprogramm für Tropinon und dessen Metabolite:

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

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

AMD-Dünnschichtchromatographie wurde verwendet, um Tropinon und dessen Metabolite aufzutrennen. Für die von Scholl und Mitarbeiter (2001) entwickelte Trennmethode wurde das AMD 2 System (Camag, Schweiz) verwendet. Als stationäre Phase kamen Kieselgel-Platten (250 µm Schichtdicke, 10 x 20 cm, Glas, Merck) zum Einsatz. Die Proben wurden mit dem Linomat IV (Camag, Schweiz) aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte über 11 Stufen, beginnend mit einer mobilen Phase aus MeOH/CHCl₃ (100 : 0 Vol%) und einer Trennung über 20 mm. Die Kammer wurde vor jeder Trennstufe für 6 s mit komprimierter Luft konditioniert, die durch eine Flasche mit 9 M Ammoniak geleitet wurde. Die Trockenzeit zwischen den Läufen betrug 2 min. In den weiteren Stufen wurde das Laufmittelverhältnis jeweils um 10 Vol% verändert und die Trennstrecke um 5 mm bis auf 75 mm Gesamttrennstrecke erhöht (Ausnahme Lauf 10 und 11: Erhöhung Trennstrecke um 8 bzw. 7 mm).

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

B 2.2 Methoden der Molekularbiologie

B 2.2.1 Klonierung und Sequenzierung

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

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

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

schlägigen Tools wie FASTA3 und BLASTN durchgeführt. Diese Anwendungen sind unter http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html zusammengefaßt.

B 2.2.2 Isolierung von RNA

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

3 – 5 g Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff zerrieben und mit 6 ml Extraktionspuffer [10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (m/v) SDS] und 6 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25 : 24 : 1) für 5 min unter kräftigem Schütteln (Vortex Genie 2) extrahiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 rpm wurde die wäßrige Phase mit 1 Volumen PCI gemischt, für 5 min geschüttelt und wiederum für 10 min zentrifugiert. Die Fällung der Proteine wurde sooft wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr sichtbar war. Die in der wäßrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren wurden mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 3 Volumenanteilen Ethanol (96 %) über Nacht bei –20 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 5000 rpm wurde das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet auf Eis in 5 ml DEPC-H₂O gelöst. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte mit 1 Volumen 4 M LiCl-Lösung (in 20 mM Natriumacetat, pH 5,2) mindestens 4 h auf Eis. Nach Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 5000 rpm wurde das Pellet bei RT getrocknet, in 2 ml DEPC-H₂O gelöst und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 3 Volumenanteilen Ethanol (96 %) über Nacht bei –20 °C gefällt. Die RNA wurde nach Sedimentation (45 min, 4 °C, 5000 rpm) mit Ethanol (70 %) gewaschen, bei RT getrocknet und anschließend in 300 – 500 µl DEPC-H₂O gelöst.

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

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

B 2.2.3 Erststrangsynthese von cDNA

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

B 2.2.4 Isolierung von cDNA durch PCR Techniken

B 2.2.4.1 RT-PCR

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

Standard-PCR Ansatz:

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

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

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

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

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

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

Qiaquick (Qiagen) gereinigtes PCR-Produkt	6 μ l
Ampli Taq 10 x PCR-Puffer	1 μ l
dATP 2 mM	1 μ l
Ampli Taq 2 U/ μ l (Perkin Elmer)	1 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1 μ l

B 2.2.4.2 RACE-PCR

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

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

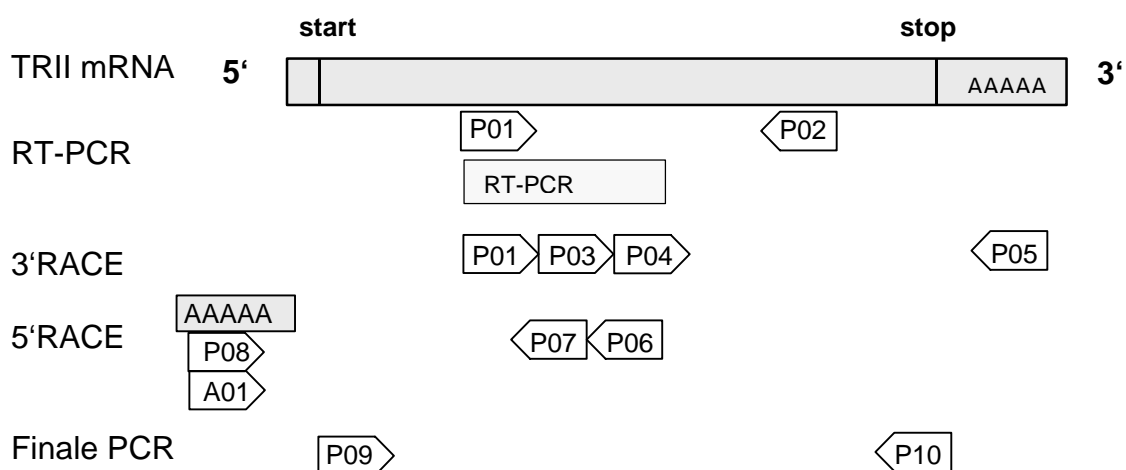


Abb. B-2: Schematische Darstellung der RACE-PCR.

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

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

Dazu wurde ein Ansatz von:

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

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

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

Das Temperaturprogramm war wie folgt:

94 °C	5 min	} 1 Zyklus
55 °C	5 min	
72 °C	40 min	

94 °C	1 min	} 35 Zyklen
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	

72 °C 10 min

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

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

B 2.2.4.3 Plasmid-PCR

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

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

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

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

B 2.2.4.4 PCR zur Selektion

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

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

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

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

B 2.2.5 Screening von cDNA-Banken

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

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

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

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

Plaques, denen positive Signale auf beiden Membranen zuzuordnen waren, wurden in 500 µl SM-Puffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,1 % Gelatine, pH 7,5) gelöst und unter Zugabe von 20 µl Chloroform 2 h bei RT geschüttelt. Diese Phagenpools wurden wie unter B 2.2.4.4 beschrieben mittels PCR untersucht.

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

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

B 2.2.6 Isolierung von genomischer DNA

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

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

B 2.2.7 Southern Blot Analyse

Mit Hilfe von *Southern Blot* Analysen wurde die Kopienzahl der *TR*-Gene im Genom von *S. tuberosum* untersucht (Southern 1975). Je 20 µg genomische DNA (vgl. Kap. B 2.2.6) wurde in verschiedenen Ansätzen mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII* und *XbaI* (100 U, 12 h bei 37 °C) vollständig gespalten. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0,8%igen Agarosegel wurde das Gel 15 min mit 0,25 M HCl behandelt. Es folgten eine Inkubation für 30 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und nach kurzem Spülen mit H₂O eine zweimalige Inkubation für je 15 min in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,4). Der Kapillartransfer der Nukleinsäuren (Sambrook *et al.* 1989) erfolgte auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) in 20 x SSC (vgl. Kap. B 2.2.5), die Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran mit UV-Licht (120 mJ, Stratalinker, Stratagene).

Für die Vorhybridisierung (4 h) und die Hybridisierung (20 h) bei 42 °C wurde ein Puffer aus 50 % (v/v) Formamid, 5 x SSPE (0,05 M NaH₂PO₄ 2H₂O/NaOH pH 7,0, 0,75 M NaCl, 0,005 M EDTA) 0,1 % (m/v) SDS, 0,2 % (m/v) BSA, Ficoll und PVP und 120 µg/ml Heringssperma-DNA verwendet. Als Hybridisierungssonde kam beim *TRI Southern Blot* ein 210 bp großes C-terminales Fragment zum Einsatz, welches durch Restriktionsspaltung des *TRI*-pET 21d Vektors (Insertation der *TRI*-homologen-cDNA zwischen der *NcoI* und der *BamHI* Schnittstelle des Vektors) mit *BsaI* und *BamHI* gewonnen wurde. Radioaktiv markiert wurde nach der beim cDNA-Bank-Screening beschriebenen Methode (vgl. Kap. B 2.2.5). Nach dem Waschen [zweimal für 15 min mit 3 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS bei RT und zweimal für 25 min bei 60 °C] wurde die Membran in Folie eingeschweißt und ein Autoradiogramm durch Auflegen eines „Cyclone™ Storage Phosphor Screens“ (Multipurpose, Packard) erstellt. Entwickelt wurde nach 48 h mit dem „Cyclone™ Phosphorimager“ (Packard). Nach dem vollständigen Abwaschen der Radioaktivität [zweimal 15 min mit 0,1 % (m/v) SDS bei 95 °C] wurde die Membran mit der *TRII*-Hybridisierungssonde (786 bp), gewonnen mittels Plasmid-PCR (Primer: P09 und P10), unter oben genannten Bedingungen rehybridisiert, gewaschen und entwickelt.

B 2.2.8 Northern Blot Analyse

Je 20 µg Gesamt-RNA der unterschiedlichen Gewebe wurde nach 10 min Denaturierung bei 65 °C in einem 1,2%igen Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt (Sambrook *et al.* 1989). Nach dem Waschen des Gels (zweimal 25 min mit DEPC-H₂O und 15 min mit 20 x SSC) wurden die Nukleinsäuren durch Kapillartransfer (Sambrook *et al.* 1989) auf eine Hybond N+ (Amersham) Membran über Nacht transferiert und mit UV-Licht (120 mJ, Stratlinker, Stratagene) auf der Membran fixiert. Für die Vorhybridisierung (4 h) und die Hybridisierung (20 h) bei 42 °C wurde ein Puffer aus 50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 5 x Denhard`s (Sambrook *et al.* 1989), 1 % (m/v) SDS, 10 % (m/v) Dextransulfat und 50 µg/ml Heringssperma-DNA verwendet. Hybridisiert wurde mit [α -³²P]dATP markierter *TRI*- oder *TRII*-Sonde (je 400 bp langes C-terminales Fragment durch Plasmid PCR gewonnen; *TRI*: Primer P16 und P12; *TRII*: Primer P15 und P10). Nach dem Waschen [zweimal für 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS bei RT, einmal für 30 min bei 58 °C mit 1 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS und zweimal für 20 min bei 58 °C mit 0,2 x SSC, 0,1 % (m/v) SDS] wurde ein Autoradiogramm wie unter B 2.2.7 beschrieben erstellt. Nach dem vollständigen Abwaschen der Radioaktivität (vgl. Kap. B 2.2.7) wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten 18S rRNA-Sonde aus *L. esculentum* unter oben genannten Bedingungen rehybridisiert, gewaschen und entwickelt.

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

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

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

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

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

Die Anzucht der transformierten Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0. Die Induktion der Expression erfolgte IPTG (1 mM) und wurde für die TRI 6 h bei 37 °C, 150 rpm und für die TRII 18 h bei 25 °C, 150 rpm fortgeführt. Nach Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet mit STE-Puffer (Sambrook *et al.* 1989) gewaschen und rezentrifugiert. Das im Lysepuffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 3 mM DTT, 0,2 % Triton X-100, 0,001 % Lysozym) suspendierte Pellet wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und dreimal bei - 80 °C eingefroren und aufgetaut. Der Zellaufschluß wurde mit dem Potter-Homogenisator (Glass Col, USA) viermal 2 min bei 1000 rpm/min auf Eis durchgeführt. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 rpm, 4 °C) wurden die Überstände zur Proteinreinigung und für den Enzymassay verwendet.

B 2.3 Methoden der Biochemie

B 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)

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

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

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

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Heukhofen und Dernick (1988) durchgeführt. Nach Fixierung [1 h mit 50 % (v/v) MeOH, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,02 % (v/v) Formaldehyd] wurde dreimal für 20 min mit Ethanol (50 %) gewaschen und anschließend das Gel für 1 min mit einer 0,02 % (m/v) Natriumthiosulfatlösung behandelt. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit Wasser und eine Imprägnierung [0,2 % (m/v) Silbernitrat, 0,025 % (v/v) Formaldehyd] über 20 min. Entwickelt wurde nach dreimaligem Waschen (H₂O) mit Entwicklungslösung [6 % (m/v) Natriumcarbonat, 0,5 % (m/v) Natriumthiosulfat, 0,02 % (v/v) Formaldehyd] bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Reaktion mit [50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure] abgestoppt.

B 2.3.2 Enzymassay

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

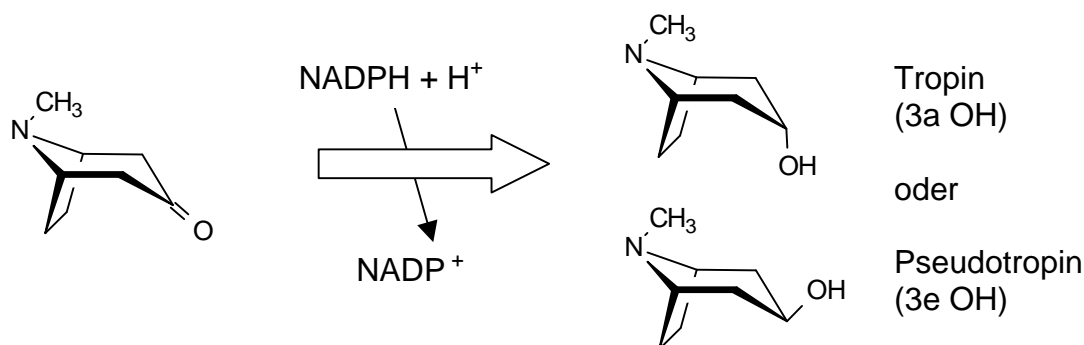


Abb. B-3: Prinzip des photometrischen Enzymassays: Reduktion des Tropinons.

Der Ansatz in der Meßküvette:

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

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

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

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

B 2.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

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

B 2.3.4 Partielle Reinigung und Charakterisierung der StTRII

B 2.3.4.1 Partielle Reinigung der TRII mittels FPLC

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

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

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

Geräteausstattung FPLC:

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

B 2.3.4.2 Konzentrierung des TRII-Proteins

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

B 2.3.4.3 pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

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

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

B 2.3.4.4 K_m und V_{max} Bestimmung

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

B 2.3.4.5 Testung von Substratanaloga

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

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

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

Die Bakterienpellets aus 50 ml Expressionskulturen (vgl. Kap. B 2.2.9, Expressionsbedingungen) wurden in 1 ml Lysepuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, 1 mg/ml Lysozym, 3 μl gesättigte PMSF-Lösung) suspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Homogenisierung mit dem Potter-Homogenisator (Glass Col, USA) viermal für 2 min auf Eis und anschließender Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand über eine equilibrierte „Ni-NTA Spin“ Säulen (Qiagen) gegeben und zentrifugiert (2 min, 700 g, 4 °C). Zweimal wurde mit 600 μl Waschpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) gewaschen und unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Eluiert

wurde zweimal mit 200 μl Elutionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 250 mM Imidazol, pH 8,0).

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

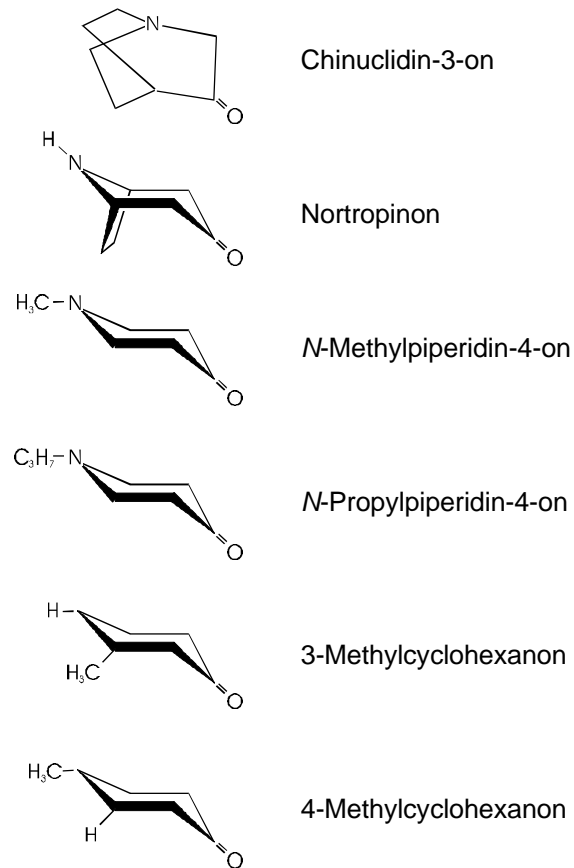


Abb. B-4: Strukturen von Tropinon-Substratanaloga für den Enzymassay.