

D Diskussion

D 1 Die Calystegine

D 1.1 Verbreitung und Verbreitung der Calystegine

Calystegine kommen in einer Reihe wichtiger Kulturpflanzen vor, wie der Kartoffel (*Solanum tuberosum*), der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) (Asano *et al.* 1997a). Neben diesen als Gemüse verwendeten Nahrungsmitteln wurden Calystegine auch in eßbaren Früchten gefunden (Asano *et al.* 1997a). Da die Calystegine potente Inhibitoren von β -Glucosidasen und α -Galactosidasen (vgl. Kap. A 2.3) sind, stellt sich die Frage nach deren Akkumulation in Nahrungsmitteln. Eine quantitative Bestimmung der Calystegine in unterschiedlichen Geweben wurde bisher aber nur von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Darstellung der Calysteginakkumulation in *S. tuberosum* var. Liu während der gesamten Kultivierungsperiode und in den Kartoffelknollen gezeigt (vgl. Kap. C 1.2). Calystegine akkumulieren hauptsächlich in metabolisch aktiven Geweben wie Kartoffelkeimen, jungen Blättern und Blüten. Für die in der Kartoffel vorkommenden Glycoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin wurde eine ähnliche Verteilung bestimmt (Friedman und Mc Donald 1997a). In der Knolle finden sich hohe Glycoalkaloid- und Calysteginkonzentration in den Kartoffelaugen und geringe Konzentrationen im Mark (vgl. Kap. C 1.2.2.1) (Lampitt *et al.* 1943; Wünsch und Munzert 1989). Im Unterschied zu den Knollen enthalten die oberirdischen Gewebe mehr Glycoalkaloide als Calystegine.

Nash und Mitarbeiter (1993) gaben den Gehalt an Calysteginen in *S. tuberosum* var. Estima mit 100 $\mu\text{g/g}$ FM (0,01 %) in der Korkhaut und 10 $\mu\text{g/g}$ FM (0,001 %) für das restliche Knollengewebe an. Asano und Mitarbeiter (1997a) hingegen beschrieben den Gehalt der Knolle mit 3,39 bzw. 7 $\mu\text{g/g}$ FM für zwei nicht näher bezeichnete Varietäten. In unseren Untersuchungen zeigte sich je nach Erntezeitpunkt ein Gehalt zwischen 400 und 1500 $\mu\text{g/g}$ FM in der Korkhaut sowie 80 und 140 $\mu\text{g/g}$ FM im Mark. Schließt man die Unterschiede im Calystegingehalt in den Keimen der Sorten Arcula, Adretta und Liu (vgl. Kap. C 1.2.1) in die Betrachtung ein, ist der Calystegingehalt unterschiedlich in den untersuchten Sorten und abhängig vom Zeitpunkt der Entwicklung. Auch der Glycoalkaloidgehalt schwankt in den Kartoffeln verschiedener Sorten ebenfalls (Valkonen *et al.* 1996; Jadhav *et al.* 1991).

Weiteren Aufschluß über die Verteilung der Calystegine könnte die Untersuchung von Wildkartoffeln geben. Auch hier finden sich in verschiedenen Kartoffelsorten bei den Glycoalkaloiden Unterschiede von 500 – 4860 $\mu\text{g/g}$ FM, z. B. in den Blättern (Valkonen *et al.* 1996). Erste Hinweise auf solche Unterschiede bei den Calysteginen berichteten Arnone und Mitarbeiter (1999), die in somatischen Hybriden von *S.*

tuberosum (+) *S. pinnatisectum* in der Korkhaut bis zu 3,89 % Calystegine bezogen auf die Trockenmasse gefunden haben. Bezogen auf die Frischmasse sind das ca. 0,67 % oder 6700 µg/g FM. Diese hohen Werte wurden von uns zu keinem Zeitpunkt in den untersuchten *S. tuberosum* Sorten gefunden. Der Maximalwert der Calystegine betrug 4403 µg/g FM (0,44 %) in den Kartoffelaugen beim Keimstart fünf Monate nach der Ernte.

In anderen Solanaceen, wie z. B. in den oberen Blättern von *A. belladonna* (625 µg/g FM) oder der Frucht von *S. melongena* (73 µg/g FM), ist der Höchstgehalt an Calysteginen wesentlich geringer als der in Kartoffeln (Asano *et al.* 1997a; Dräger *et al.* 1995c). Kartoffelkeime stellen damit ein ausgezeichnetes Material dar, um Calystegine für biologische Tests zu isolieren.

D 1.2 Die physiologische Bedeutung der Calystegine

Über die physiologische Bedeutung der Calystegine gibt es in der Literatur nur wenige Angaben. Eine Induktion der Alkaloidbiosynthese durch Tageslicht, wie es für die Glycoalkaloide beobachtet wurde (Jadhav *et al.* 1991), konnte für die Calysteginbiosynthese der untersuchten Kartoffelsorte Liu in unseren Versuchsbedingungen nicht gezeigt werden (vgl. Kap. C 1.2.1). Allerdings kann eine Induktion der Biosynthese stark von der verwendeten Lichtquelle abhängig sein. In Abhängigkeit von der verwendeten Spektralzusammensetzung des Lichtes wurde bei der Glycoalkaloidbiosynthese eine Steigerung der Glycoalkaloidakkumulation um das 0,6 - 4fache erreicht (Percival 1999). Es ist nicht auszuschließen, daß die Calysteginbiosynthese durch die Verwendung anderer Lichtquellen induzierbar wäre. Andere Alkaloidbiosynthesen, wie z. B. die der Indolalkaloide, sind ebenfalls durch Licht induzierbar (Schroeder *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu wird die Shikonin-Biosynthese in *Litospermum erythrorhizon* reprimiert (Yazaki *et al.* 1999).

Insektenfraß verursacht eine Verwundung der Pflanze. Diese führt in den Pflanzen zu einem erhöhten Jasmonat Spiegel (Creelman und Mullet 1997), wobei Methyljasmonat (MeJa) als Signalmolekül dient. Es induziert die Biosynthese von Proteinen, die in Abwehrreaktionen bei Schädlingsbefall involviert sind (Memelink *et al.* 2001). Aber nicht alle verwundungs-responsiven Gene sind Jasmonat-reguliert (Titarenko *et al.* 1997). Insektenfraß kann auch die Biosynthese von Alkaloiden stimulieren, wie am Beispiel von Nicotin (Baldwin 1999) und den Glycoalkaloiden gezeigt worden ist (Percival *et al.* 1994). Die Verwundung von Kartoffelkeimen führte zu keiner Erhöhung der Calysteginakkumulation (vgl. Kap. C 1.2.2.4). Die Calysteginbiosynthese wird nicht durch den Stressfaktor Verletzung induziert.

D. stramonium Pflanzen, die von Pflanzenfressern beschädigt wurden, haben keinen erhöhten Gehalt an Hyoscyamin und Scopolamin (Shonle und Bergelson 2000). Allerdings läßt sich mit der Produktbestimmung keine Aussage treffen, inwieweit die Expression einzelner Gene der Biosynthese induziert ist. In Tabak z. B. wurde nach mechanischer Verwundung (Entfernung der Sproßspitze) eine erhöhte

PMT-Transkriptmenge innerhalb von 2 h festgestellt (Riechers und Timko 1999). Die *PMT*-Expression ist durch exogenes MeJa in Tabakzellkulturen und in *Nicotiana sylvestris* Wurzeln induzierbar (Imanishi *et al.* 1998; Shoji *et al.* 2000). Die erhöhte Transkriptakkumulation der Ornithindecaboxylase (*ODC*) durch MeJa innerhalb einer Stunde wurde in Tabakzellkulturen beobachtet (Imanishi *et al.* 1998).

Die Untersuchung der Promotorregionen der *TRI* und *TRII* aus *H. niger* ergaben bisher keinen Hinweis auf Jasmonat-induzierte Motive, sogenannte G-Boxen (Nakajima *et al.* 1999c).

Zur Induzierbarkeit der Tropanalkaloidakkumulation durch MeJa gibt es unterschiedliche Daten. In Wurzelkulturen von *D. stramonium* wird die Hyoscyaminakkumulation angeregt (Zabetakis *et al.* 1999), während es bei *H. muticus* erst nach Applikation hoher Konzentrationen von MeJa zu einer geringfügigen Erhöhung kommt (Biondi *et al.* 2000). Kürzlich wurde gefunden, daß die Calysteginbiosynthese in Wurzelkulturen von *A. belladonna* nicht durch Methyljasmonat und Abscisinsäure induzierbar ist (Rothe *et al.* 2001).

Ein erhöhtes Zuckerangebot (Saccharose und Maltose) hingegen stimuliert die Calysteginakkumulation in Wurzelkulturen von *A. belladonna*, der Hyoscyamingehalt ändert sich hingegen nur wenig (Rothe *et al.* 2001). Die Biosynthese der klassischen Tropanalkaloide und der Calystegine verläuft bis zur Reduktion des Tropinons, gleich. Deshalb ist die Regulation des metabolischen Flusses der Calysteginbiosynthese bei erhöhtem Zuckerangebot an dieser Stelle der Biosynthese bzw. im späteren Verlauf wahrscheinlich (vgl. Abb. A-2). Ein Einfluß von unterschiedlichen Zuckerangebot auf die Transkription der *TR*'s und andere bekannter Enzyme der Calysteginbiosynthese könnte durch *Northern Blot* Analysen geklärt werden. Eine gesteigerte Tropanalkaloidakkumulation durch ein erhöhtes Angebot an Glucose wurde in Wurzelkulturen von *Datura candida* x *Datura aurea* gezeigt (Nussbaumer *et al.* 1998).

Die Bedeutung des Zuckers in Signalwegen ist umfangreich und komplex. Zucker als Signalstoff ist in der Literatur z. B. bei der Anthocyanbiosynthese beschrieben worden (Vitrac *et al.* 2000). Unter anderem wird eine Verbindung des Zuckerangebotes zum Stickstoffstoffwechsel der Pflanzen diskutiert (Sheen *et al.* 1999). So kann Zucker Gene aktivieren, die für Nitrattransporter, Nitratreduktasen, Asparaginsynthasen und Glutaminsynthasen codieren (Jang und Sheen 1994; Koch 1996; Lam *et al.* 1998; Lejay *et al.* 1999; Sheen *et al.* 1999). Bei der Signalübertragung können Hexokinasen eine wichtige Rolle spielen, die durch Bindung an Zuckermoleküle ihrer Konformation ändert (Sheen *et al.* 1999). Der Einfluß von Zucker auf die Calysteginbiosynthese ist bis jetzt noch nicht untersucht worden.

Calystegine akkumulieren in *S. tuberosum* und in anderen Solanaceen hauptsächlich in meristematischen Geweben (vgl. Kap. C 1.2) (Dräger *et al.* 1995c). Die Akkumulation der Calystegine und ihre Eigenschaft als Glycosidasehemmstoffe läßt eine fraßhemmende Wirkung der Calystegine vermuten. Bekannte Glycosidasehemmstoffe, wie Castanospermin, welches u. a. aus *Castanospermum australe*

isoliert wurden ist (Asano 2000a), sind potente Hemmer von β -Glucosidasen in Insekten (Fellows *et al.* 1992). Um das Potential der Calystegine als Fraßschutz zu testen, wäre es notwendig, die Calystegine auch auf ihre Hemmbarkeit gegen Glycosidasen von Insekten zu untersuchen.

Musmeci und Mitarbeiter (1999) fanden die Abnahme des Larvengewichtes von *Phthorimaea operculella* (Zeller) auf Calystegin A₃-behandelten Kartoffelkalluskulturen nach 9 Tagen. Weiterhin wurde ein Einfluß auf das Larvengewicht und die Überlebensrate von *Leptinotarsa decemlineata* (Say) beobachtet. Die Erhöhung des Calystegin B₂-Gehaltes um 0,5 % auf Kartoffelblättern verringerte die Überlebensrate um 50 % (Fonzo *et al.* 1999). Die in den Studien verwendeten Calystegine wurden als Einzelsubstanzen appliziert, denkbar wäre aber auch ein synergistischer Effekt im Gemisch und/oder zusammen mit den Glycoalkaloiden. Weitere Versuche sind nötig, um die Fraßschutzhemmung der Calystegine gegenüber Pflanzenschädlingen zu bestätigen. *In vitro* Kartoffelpflanzen var. Désirée, die keine Calystegine in den Blättern enthalten, wären ein geeignetes Untersuchungsobjekt. Es könnten definierte Mengen Calystegine als Einzelsubstanzen oder im Gemisch auf die Blätter appliziert werden. Interessant wären hier Untersuchungen mit weniger spezialisierten Pflanzenschädlingen.

Calystegine spielen eine Rolle als Mediatoren bei der Ernährung von bestimmten Bodenbakterien. Tepfer und Mitarbeiter (1988a; 1988b) zeigten, daß nur bestimmte Bakterien, wie *Rhizobium meliloti*, in der Lage sind, Calystegine zu katabolisieren (Cac⁺). Sie können Calystegine als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwenden. In der Umgebung von calysteginakkumulierenden Pflanzen wurden vermehrt Cac⁺ Bakterien gefunden, die ein Plasmid tragen, welches die Katabolisierung ermöglicht (Goldmann *et al.* 1996; Guntli *et al.* 1999).

D 1.3 Calystegine und ihre Bedeutung für den Menschen

Es wurde diskutiert, daß bei Vergiftung durch Kartoffelkeime bei der Nahrungsaufnahme der Gehalt an Glycoalkaloiden zu gering gewesen sei, um Vergiftungssymptome auszulösen (Baker *et al.* 1991). Es wäre daher möglich, daß Calystegine als potente Glycosidasehemmstoffe (vgl. Kap. A 2.3) Vergiftungserscheinungen hervorrufen oder verstärken können. Vergiftungen bei Tieren mit *Convolvulus arvensis* wurden mit Tropin- und Pseudotropinderivaten in Zusammenhang gebracht (Schultheiss *et al.* 1995; Todd *et al.* 1995). Zwei Ipomoea-Spezies, die den Mannosidaseinhibitor Swainsonin und Calystegine enthalten, sind für neurologische Störungen bei Weidevieh verantwortlich (de Balogh *et al.* 1999; Molyneux *et al.* 1995). Dabei wurde vermutet, das Calystegine an der Ausprägung der Symptome beteiligt sein könnten (Molyneux *et al.* 1995). Über die Toxizität der Calystegine ist noch nichts bekannt, da sie für die Testung noch nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Für Swainsonin, einen anderen Glycosidasehemmstoff, wurde ein Maximalgehalt von 0,001 % in Futternahrung

diskutiert, um Intoxikationen zu vermeiden (Molyneux *et al.* 1994). Auch bei einem niedrigen Gehalt im Futter akkumuliert Swainsonin innerhalb der Lysosomen, wo es aufgrund des niedrigen pH-Wertes protoniert wird und sich anreichert (Chotai *et al.* 1983).

Beispiele für die Anwendung von Glycosidasehemmstoffen sind in der Einleitung beschrieben (vgl. Kap A 1.2).

D 1.4 Tropinon-Fütterungsversuche – Hinweise auf die Biosynthese

Fütterungsversuche von Tropinon an Kartoffelkeime ergaben erste Hinweise zum Vorkommen von tropinonreduzierenden Enzymen in *S. tuberosum* (vgl. Kap. C 2). Die Bildung von Tropin und Pseudotropin erfolgt durch zwei spezifische Enzyme, eine Isomerisierung von Tropin zu Pseudotropin oder umgekehrt erfolgt nicht (Nakajima *et al.* 1993a; Portsteffen *et al.* 1994). Es konnten deutliche Unterschiede in der Tropin- und Pseudotropinakkumulation nach Tropinonfütterung festgestellt werden. Da die tropin- und die pseudotropinbildenden TR's um dasselbe Substrat, das Tropinon, konkurrieren, könnte die verringerte Tropinakkumulation mit der unterschiedlichen Substratspezifität der Enzyme zum Tropinon zusammenhängen. Auf der anderen Seite könnte aber auch eine unterschiedliche Verfügbarkeit des Substrates in den verschiedenen Zellschichten verantwortlich sein. Die *Immunoblot* Analyse der TRI und TRII in den Wurzeln von *H. niger* zeigte eine unterschiedliche, zellspezifische Akkumulation der TR-Proteine (Nakajima und Hashimoto 1999d). TRI-Protein wurde in der Endodermis und der Cortex, bevorzugt in den äußeren Zellschichten, detektiert. Das TRII-Protein akkumuliert im Perizykel, der Endodermis und den inneren Schichten der Cortex (Nakajima und Hashimoto 1999d). Frühe Enzyme der Biosynthese z. B. die PMT sind ebenfalls im Perizykel lokalisiert (Suzuki *et al.* 1999a). Die PMT katalysiert die Bildung von *N*-Methylputrescin, eine Vorstufe des Tropinons. Die Lokalisation dieser Tropinonvorstufen und des TRII-Enzyms im selben Gewebe (Perizykel), weist auf eine schnelle Substratumsetzung des Tropinons durch das TRII-Enzym hin. Für die Bildung des Tropins durch die TRI müsste Tropinon oder seine Vorstufen in die Endodermis oder in die Cortex transportiert werden.

S. tuberosum akkumuliert keine klassischen Tropanalkaloide. Deshalb war das Auffinden von Tropin als Metabolit nach Fütterungsversuchen in Keimen und in *in vitro* Kartoffelknollen überraschend (vgl. Kap. C 2). Da Tropin in *S. tuberosum* nicht in Hyoscyamin oder Scopolamin umgewandelt wird, wäre es denkbar, daß eine Umwandlung zu Tropinestern erfolgt. In der Literatur sind 3-Tigloyltropin in *A. belladonna* und in verschiedenen *Datura*- und *Hyoscyamus*-Spezies beschrieben wurden (Doerk *et al.* 1994; Dräger *et al.* 1992; Robins *et al.* 1994b). Die Tropan-3a-ol Ester Consiculin und Consabatin sind in *Convolvulus*-Spezies bekannt (Jenett *et al.* 1998).

Transgene *N. tabacum*-Pflanzen, die TRI aus *H. niger* exprimieren, akkumulieren Tropin und 3-Acetyltropin nach Tropinonfütterung (Rocha-Salavarieta 2000). In der Literatur wird beschrieben, daß die Veresterung durch spezifische Enzyme gesteuert wird (Rabot *et al.* 1995; Robins *et al.* 1991c). Die Spezifität zum alkoholischen Akzeptor ist groß, aber die Acetyltransferasen verestern entweder Tropin (TAT) oder Pseudotropin (PAT) mit unterschiedlichen aliphatischen Estern.

Mit der beschriebenen neutralen Extraktionsmethode (vgl. Kap. B 2.1.4) konnten keine Tropinester in den gefütterten Geweben von *S. tuberosum* nachgewiesen werden. Der Versuch sollte mit einer größeren Biomasse wiederholt werden, um sicherzustellen, daß auch geringe Mengen an Estern erfaßt werden können. Sinnvoll erscheint auch ein Fütterungsversuch mit Tropin, um der Pflanze ausreichend Substrat zur Verfügung zu stellen. Bei der Extraktion sollte die in der Literatur beschriebene saure Extraktion verwendet werden, da es wenig Information zur Stabilität der Ester bei neutraler Extraktion gibt (Doerk *et al.* 1994). Die fehlende Akkumulation von Tropinestern in Kartoffelkeimen korreliert aber mit den Ergebnissen von Robins und Mitarbeiter (1994b) und unveröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe in *S. tuberosum*-Wurzelkulturen.

Weitere Hinweise, daß sich die Calysteginbiosynthese von dem Tropanalkaloidstoffwechsel ableitet, beschreiben Dräger und Mitarbeiter (1994b) sowie Rothe und Mitarbeiter (2001). Bei Blockade des TRI-Enzyms mit 8-Thiabicyclo[3,2,1]octan-3on (TBON) wurde in *A. belladonna* Wurzelkulturen eine erhöhte Akkumulation von Calysteginen beobachtet.

Weiterhin konnte sowohl der Einbau von ¹⁴C-markiertem Putrescin als auch der von N¹⁵-markiertem Tropinon in die Calystegine gezeigt werden (Dräger *et al.* 1994b; Goldmann *et al.* 1990).

Die Hypothese zur Calysteginbiosynthese wird durch die Amplifikation eines *PMT*-homologen cDNA-Fragmentes aus Kartoffel gestützt (Stenzel, unveröffentlicht). Dieses Fragment zeigt die für *PMT*-Sequenzen typischen Motive.

Über die der Tropinonreduktion nachfolgenden Biosyntheseschritte auf dem Weg zu den Calysteginen ist nichts bekannt. Nötig sind die Demethylierung des Stickstoffs und Hydroxylierungen am Tropangerüst. Welche Reaktion zuerst abläuft und welche Enzyme daran beteiligt sind, ist unklar. N-Demethylierungen könnten durch Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen katalysiert werden. N-Demethylasen, die pflanzeigene Stoffe umsetzen, sind allerdings kaum bekannt. Zwar wurde die N-Demethylierung des Nicotins mit einem P-450 Enzym in Verbindung gebracht, die Ergebnisse waren aber nicht eindeutig (Chelvarajan *et al.* 1993). Für die N-Demethylierung von Xenobiotica in Pflanzen gibt es eine Reihe von Beispielen (Durst und Benveniste 1993). Ein P450 Enzym aus Avocado ist in der Lage, verschiedene N-Methylaniline zu demethylieren (Cottrell *et al.* 1990; Dohn und Krieger 1984). Hydroxylierungen sind durch oxoglutaratabhängige Dioxygenasen möglich. Beispiele sind die Hyoscyamin-6-Hydroxylase aus *H. niger* oder die Desacetoxyvindolin-4-hydroxylase aus *Catharantus roseus* (Hashimoto und Yamada

1986; Vazquez-Flota *et al.* 1997). Für die Hydroxylierung kommen aber auch Cytochrom P-450 Enzyme in Frage. Tabersonin-16-Hydroxylase aus *Catharantus roseus* ist ein solches Beispiel (Schroeder *et al.* 1999).

D 2 Die Tropinonreduktasen

D 2.1 Tropinonreduktasen in Kartoffel

TR-Enzymaktivitäten wurden in verschiedenen *Hyoscyamus*-, *Atropa*- und *Duboisiaspezies* sowie in Wurzelkulturen von *C. sepium* gemessen (Hashimoto *et al.* 1992). In *S. tuberosum* zeigten die Fütterungsversuche eine Umsetzung zu Tropin und Pseudotropin. In Proteinpräparationen aus Kartoffelkeimen konnte aber keine TR-Enzymaktivität im photometrischen Assay gemessen werden. Das lag an der Instabilität der TR-Enzyme in den Proteinpräparationen. Kartoffeln akkumulieren phenolische Verbindungen (Friedman 1997b). Solche Polyphenole, Derivate der Chlorogensäure, können Proteine inaktivieren.

Mit modernen Methoden der Molekularbiologie konnten die cDNA-Sequenzen der *TRI* und *TRII* aus Kartoffel kloniert werden (vgl. Kap. C 3 und C 4). Die Isolierung der *TRII*-cDNA mittels RACE-PCR bereitete durch die geringe Amplifikation bei der 3'RACE-PCR Schwierigkeiten und erforderte einen zusätzlichen PCR-Schritt. Eine abschließende RT-PCR wurde nötig, um cDNA-Sequenzen zu isolieren, die den gesamten codierenden Bereich umfaßten (vgl. Kap. C 3.2). Um Informationen über die nichttranslatierten Bereiche der *TRII*-cDNA-Sequenzen in *S. tuberosum* zu gewinnen und Unterschiede innerhalb verschiedener Varietäten zu erkennen, wurde eine cDNA-Bank gescreent. Die Unterschiede der *TRII*-cDNA-Sequenzen zwischen den Kartoffelsorten Liu und Désirée sind gering, eine Sequenz ist identisch.

Warum beim Screening nach der *TRI*-Sequenz aus der Kartoffelaugen-cDNA-Bank nur die *StTRI*-homologe Sequenz isoliert wurde, ist unklar. Möglicherweise waren die beiden anderen *TRI*-Klone *StTRI-SE* und *StTRI-SS* in der Bank unterrepräsentiert. Über den Entwicklungszustand der Kartoffelaugen, die für die Herstellung der cDNA-Bank verwendet worden waren, lagen keine Informationen vor. Auf das erneute Screenen einer repräsentativen Phagenmenge wurde verzichtet. Angenommen wurde, daß die Expression der *TRI* in den Keimaugen zu diesem Zeitpunkt zu gering war. Eine unterschiedliche Expression in den Augen, abhängig vom Entwicklungszustand, bestätigte sich später in *Northern Blot* Analysen. Die anschließende RT-PCR, bei der zwei *TRI*-Klone isoliert wurden, mußte mit cDNA aus Keimen, 10 Monate nach der Ernte, durchgeführt werden. In diesem Gewebe sind *TRI*-Transkripte stark exprimiert (vgl. Kap. C 9.2).

Die *TRI*- und *TRII*-Sequenzen aus *S. tuberosum* sind auf Nukleotidebene 72 %, auf Aminosäureebene 66 % zueinander homolog. Innerhalb jeder *TR*-Gruppe ist die Homologie noch höher (86-95 % auf AS-Ebene, vgl. Tab. D-1). Betrachtet man den Homologievergleich der *TRI* und *TRII*-Sequenzen aus *S. tuberosum* zu den *TR*-

Sequenzen aus *D. stramonium* und *H. niger*, verstärkt sich die Hypothese, daß sich die TR-Enzyme von einem gemeinsamen Vorfahren ableiten (Nakajima *et al.* 1999a).

Enzym	Nukleotide		Aminosäuren	
	<i>StTRII</i>	<i>StTRI</i>	<i>StTRII</i>	<i>StTRI</i>
<i>D. stramonium TRII</i>	91 %	71 %	92 %	63 %
<i>H. niger TRII</i>	92 %	72 %	95 %	65 %
<i>D. stramonium TRI</i>	73 %	90 %	67 %	90 %
<i>H. niger TRI</i>	72 %	87 %	64 %	86 %

Tab. D-1: Homologievergleich der *StTRI* und *StTRII*-Sequenzen zu bekannten *TR*-Sequenzen aus *D. stramonium* und *H. niger*. Die Homologien wurden mit den FASTA-Programm erstellt (Pearson und Lipman 1988).

D 2.2 Die TR gehören zur Familie der SDR-Enzyme

Die Aminosäuresequenzen der TRI und TRII aus Kartoffel wurden auf ihre Zugehörigkeit zur SDR-Enzymfamilie geprüft. Typische Motive finden sich in beiden AS-Sequenzen (vgl. Abb. C-12 und C-13). Das katalytische Tyrosin in der Sequenz YxxxK (x steht für jede beliebige AS) findet sich in der Position 160 (TRII) bzw. 162 (TRI). Durch Röntgenstrukturanalyse und gerichtete Mutagenese zeigte sich dieses Motiv als essentiell (Chen *et al.* 1993; Persson *et al.* 1995; Tanaka *et al.* 1996a; Nakanishi *et al.* 1997a). Tyr ist das katalytische Zentrum, während Lys durch Wasserstoffbrückenbindung mit den beiden Hydroxylgruppen der Nicotinamid-Ribose eine wichtige Rolle bei der Co-Substratbindung spielt. Außerdem stabilisiert es die Position der OH-Gruppe im Tyrosin. Tanaka und Mitarbeiter (1996a; 1996b) beziehen bei der Betrachtung der Röntgenkristallstruktur der 7 α -Hydroxysteroiddehydrogenase die Ser¹⁴⁷ (TRII) bzw. Ser¹⁴⁹ (TRI) äquivalente Position in die Katalysebetrachtung ein. Ser bildet eine Wasserstoffbrücke zum Substrat und stabilisiert gleichzeitig den katalytischen Übergang.

Arg²⁰ und Arg⁴² (TRII) bzw. Lys²² und Arg⁴⁴ (TRI) verleihen den Enzymen durch Interaktion mit der Phosphatgruppe eine höhere Bindungsaffinität zum NADPH (Nakanishi *et al.* 1996). Threonin äquivalent zur Position 41 (TRII) bzw. 43 (TRI) der Kartoffelsequenzen ist für die NADPH-Bindung notwendig. Gerichtete Mutagenese, bei der Thr gegen Asp ausgetauscht wurde, veränderte die Co-Substratspezifität eines SDR-Enzyms vom NADPH zum NADH (Nakanishi *et al.* 1997b). In allen isolierten TRI und TRII-Sequenzen aus Kartoffel ist diese Position mit Ser besetzt, welches ähnliche Eigenschaften wie Thr hat und somit die Bindung von NADPH als Co-Substrat ermöglicht. Das in den SDR-Enzymen konservierte GxxxGxG Motiv findet sich auch in den TR-Enzymen von *S. tuberosum* an den Positionen 17 bzw. 19 (TRII und TRI) (Jörnvall *et al.* 1995).

Für die TRI aus *D. stramonium* beschreiben Nakajima und Mitarbeiter (1998) eine Anlagerung der Carboxylamidgruppe des Nicotinamidringes an das Stickstoff- und Sauerstoffatom der Ile¹⁹⁵ äquivalenten Position und an den Sauerstoff der Seitenkette

des Thr¹⁹⁷ (vgl. Abb. C-13). Bei der TRII-Röntgenkristallstruktur aus *D. stramonium* wurde zusätzlich zu den Kartoffel-TRII-äquivalenten Positionen Ile¹⁹³ und Thr¹⁹⁵ die Position Ser¹⁹⁶ als polarer Interaktionspartner zum Pyrophosphatteil des NADP⁺ genannt (Yamashita *et al.* 1999). In der StTRII ist dieses Thr¹⁹⁵ durch Ser ausgetauscht (vgl. Abb. C-12).

Die Konservierung der Strukturmerkmale weist darauf hin, daß der in der SDR-Enzymfamilie verbreitete Reaktionsmechanismus auch für die TR-Enzyme aus *S. tuberosum* gilt. Der konzertierte Übergang des pro-S-Hydrid-Ions vom NADPH und eines Protons vom Tyr¹⁶⁰ bzw. Tyr¹⁶² (TRII bzw. TRI) erfolgt zum 3-Kohlenstoff- und Carbonyl-Sauerstoff-Atom des Tropinons (Nakajima *et al.* 1998).

D 2.3 Die Stereospezifität der Tropinonreduktasen I und II

Bedingt durch die ausgeprägte Konservierung der AS des katalytischen Zentrums und der Co-Substratbindungsstelle muß die stereospezifische Reduktion des Tropinons durch die Orientierung des Substrates im Enzym-Substratkomplex gegeben sein (Nakajima *et al.* 1998). Für die Bindung des Substrates sind hauptsächlich 11 AS verantwortlich, die größtenteils im C-Terminus der AS-Sequenz liegen. Durch Röntgenkristallstrukturanalyse und gerichtete Mutagenese der TRI und TRII-Enzyme aus *D. stramonium* wurden 5 AS bezeichnet, die bei der Reduktion mitwirken (Nakajima *et al.* 1998; 1999b; Yamashita *et al.* 1998; 1999). Allerdings wurde eine Änderung der Stereospezifität durch Einzelmutation nur in der 157 bzw. 159 äquivalenten Position erreicht (Nakajima *et al.* 1999b). Mehrfachmutationen änderten die Spezifität fast zu 100 %. Im folgenden werden diese Aminosäuren im Hinblick auf die Kartoffel-TR-Enzyme diskutiert.

Bei der TRI werden vor allem hydrophobe Wechselwirkungen als Bindungseigenschaften postuliert (Nakajima *et al.* 1999b). Durch Mutagenese der DsTRI konnte gezeigt werden, daß bei der zur StTRI äquivalenten Position His¹⁰³ nicht die positive Ladung für die Stereospezifität entscheidend ist (Nakajima *et al.* 1999b).

Leu¹⁵⁹ ersetzt in allen Kartoffel-TRI-Sequenzen Val (vgl. Abb. C-13). Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften sollte es ebensolche hydrophoben Interaktionen mit der C6-C7 Brücke des Tropinons eingehen. Ala¹⁵¹, Ile¹¹⁴ und Phe¹¹⁷ sind bei den StTRI-SE und StTRI-SS-Klonen, der DsTRI und HnTRI konserviert. Das TRI-homologe Protein (StTRI-homologe) besitzt an Position 117 ein Ile, welches ähnliche hydrophobe Eigenschaften wie Phe hat. Aus den genannten Positionen läßt sich nicht klären, warum das TRI-homologe Enzym Tropinon als Substrat nicht umsetzt. Andere ähnliche Substrate wurden vom TRI-homologen Enzym akzeptiert (vgl. Kap. C 7.2).

Betrachtet man die anderen AS, für die eine Tropinoninteraktion postuliert wurde, sind Ile¹⁵⁰, Leu¹⁵⁶ und Val¹⁹⁴ wiederum konserviert. Der Austausch von Ala¹⁰¹ gegen Valin sollte keinen großen Einfluß auf die Bindung des Tropinons ausüben (vgl. Abb. C-13). Val/Ile²⁰⁰ ist variabel innerhalb aller bekannter TRI-Enzyme. Gln¹⁹⁹, das vor

allem polare Eigenschaften hat und Wasserstoffbrücken ausbilden kann, ist gegen Leu ausgetauscht, das mit seiner Kohlenwasserstoffseitenkette hydrophobe Bindungen ausüben kann. Es wäre interessant, ob mit der gerichteten Mutagenese Q199L eine tropinbildende TRI-Aktivität des TRI-homologen Enzyms zu erreichen wäre.

Bei allen bekannten TRII-Sequenzen sind die für die Tropinonbindung postulierten AS konserviert. Dies sind die zur StTRII äquivalenten Positionen Val⁹⁹, Tyr¹⁰¹, Val/Ile¹⁴⁸, Ser¹⁴⁹, Val/Leu¹⁵⁴, Glu¹⁵⁷, Val¹⁹², Met/Leu¹⁹⁷, Val¹⁹⁸ sowie Leu²¹¹ und Leu²¹⁴ (vgl. Abb. C-12). Die negativ geladene Glu¹⁵⁷ übt eine elektrostatische Interaktion auf das positive Stickstoffatom des Tropinons aus (Yamashita *et al.* 1999). Diese AS ist für die Orientierung des Tropinons richtungweisend und macht damit eine Reduktion zur 3-e OH-Gruppe möglich. Die Orientierung des Tropinons im TRII-Enzym-Substratkomplex ist genau entgegengesetzt zum TRI-Enzym. Die Unterschiede zwischen TRI und TRII in den AS mit hydrophoben Interaktionen dienen zur Feineinstellung der Substratlage.

D 2.4 Die evolutionäre Entwicklung der Tropinonreduktasen

Verschiedene Theorien über die Abstammung der *TR*-Gene werden immer wieder diskutiert. So wird vermutet, daß sich der Prototyp der *TR*-Gene aufgrund der hohen Homologie zu anderen Enzymen der SDR-Familie und durch Konservierung wichtiger AS innerhalb dieser Familie (vgl. Kap. D 2.2) aus einem *SDR*-Gen entwickelt haben muß (Nakajima *et al.* 1993a; 1999a). In der Vergangenheit wurde durch Datenbankvergleich mit *TR*-homologen Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* und *Lycopersicon esculentum* gezeigt, daß zwischen den Sequenzen eine hohe Übereinstimmung über die gesamte Proteinsequenz besteht (Nakajima *et al.* 1999a). In den AS, die für die Substratbindung verantwortlich sind, bestanden aber Unterschiede. Es wurde postuliert, daß diese Enzyme andere Substrate umsetzen (Nakajima *et al.* 1999a).

Ein neuer Homologievergleich von *StTR*-cDNA-Sequenzen in Datenbanken brachte eine erstaunliche Anzahl von homologen Sequenzen hervor. Auf AS-Ebene lag die Homologie bei 40 – 60 % u. a. zu 18 Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, verschiedenen EST-Sequenzen aus *Lycopersicon esculentum*, deren größtmöglicher ORF in AS übersetzt wurde, zu einer Sequenz aus *Thermotoga maritima* sowie zu einer humanen Sequenz. 9 *Arabidopsis*-Sequenzen haben in der zur TRII-äquivalenten Position 41 ein Asp, was auf eine höhere Bindungsaffinität zum NADH hindeutet (vgl. Kap. D 2.2). In Abb. D-1 ist der Aminosäurevergleich aller bekannten *TR*-Sequenzen mit ausgewählten homologen Sequenzen abgebildet. An den 11 AS-Positionen (rot gekennzeichnet), die in die Tropinonbindung involviert sind, wird nochmals die Spezifität zwischen TRI und TRII deutlich. Im Fall der DsP29x *TR*-homologen Sequenz zeigen sich Unterschiede an diesen Positionen, so daß klar wird, daß dieses Enzym ein anderes Substrat umsetzt (Nakajima *et al.* 1999a).

		▼ *▼▼	**	
DsTRI	ME-ESKVSMMNCNNEGRWSLKGTTALVTGGSKGIGYAVEELAGLGARVYTCsrNEKELD			59
HnTRI	MAGESEVYINGNNGGIRWSLKGTTALVTGGSKGIGYAVEELAGLGARVYTCsrNEKELQ			60
StTRI-SE	MA-----ELREKWSLKGTTALVTGGSKGIGYAVEELANFGARVYTCsrNENELQ			50
StTRI-homolog	MA-----ELREKWCLKGTTALVTGGSKGIGYAVEELANFGARVYTCsrNENELQ			50
DsP29x	MAG----REIGGGDRRWSLRGTMALVTGGTRGIGYAVEELANFGAEVYTCsrSQNDLD			55
DsTRII	-----MAGRWNLEGTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCsrNQKELN			47
HnTRII	-----MAGRWNLEGTALVTGGSRGIGYGIVEELANLGASVYTCsrNQKELD			47
StTRII-D3	-----MAAGRWNLEGTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCsrNQKELN			48
Le-BE451326	-----RWNLEGTALVTGGSKGIGYGIVEELASHGASVYTCsrNQKELN			44
At-Q9LHTO	-----METDKRWSLAKGTALVTGGTRGIGRAVVEELAKFGAKVHTCSrNQEELN			49
Hs-Q9H3N5	-----MASSGMTRRDPLANKVALVTASTDGIGFAIARRLAQDGAHVVSsrKQONVD			52
Tm-Q9WYS2	-----MKEVFDLGRVALVTGGSRGLGFGIAQGLAEAGCSVVVASrNLEEAS			47
DsTRI	ECLEIWRK-GLNVEGSVCDLLSRTERDKLMQTVAHVFDGKLNILVNNAGVVIHKEAKDF			118
HnTRI	QCLDIWRNE-GLQVEGSVCDLLSRERDKLMQTVADLFNGKLNILVNNAGVVIHKEAKDF			119
StTRI-SE	ECLDIWRKK-GLKVEGSVCDLLSRTEREKLMTVEDVFDGKLNILVNNAGVAIHKEAKDF			109
StTRI-homolog	ECLDIWRKK-GLKVEGSVCDLLSRTEREKLMTIEDVFDGKLNILVNNAGVAIHKEAKDF			109
DsP29x	ECLEKWRK-GFKVSGPVCVSSISQRQTLMESVTSSFNGLKLNILINNAGTTIPKEATNF			114
DsTRII	DCLTQWRSK-GFKVEASVCDLSSRSERQELMNTVANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY			106
HnTRII	ECLTQWRSK-GFNVEASVCDLSSRSEREEMKTVSNHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY			106
StTRII-D3	ECLTQWRSK-GFKVEASVCDLSSRSEREFIKVNANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY			107
Le-BE451326	ECLIQWRNK-GFKVEASVCDLSSRSEREFIKTVANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDY			103
At-Q9LHTO	ACLNDWKAN-GLVVSGSVCDASVRDQREKLIQEASSAFSGKLNILINNVTNRKPTVEY			108
Hs-Q9H3N5	QAVATLQGE-GLSVTGTVCHVGKAEDRERLVATAVKLHGGIDILVSNAAVNPFFGSIMDV			111
Tm-Q9WYS2	EAAQKLTEKYGVETMAFRCDVSNYEEVKLLLEAVKEKF-GKLDTVVNAAGINRRHPAEEF			106
		▼ ▼	+ +	
DsTRI	TEKDYNIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFLSSIAG-FSALPSVSLYSASKGA			177
HnTRI	TKEDYDIVLGTNFEAAYHLCQLAYPFLKASQNGNVIFLSSIAG-FSALPSVSLYSASKAA			178
StTRI-SE	TKEDYNIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFVSSIAG-FSALPSLSLYSASKGA			168
StTRI-homolog	TKEDYNIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFVSSIAG-FSALPSLSLYSASKGA			168
DsP29x	TAEDYSIIMGTNFEASYNLCQLAHPLLKASGNASIVFNSSAAG-VIAVPLSSIIYAASKGA			173
DsTRII	TVEDYSLIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASERGNVVFISVSG-ALAVPYEAVYGATKGA			165
HnTRII	TMEDYSHIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASERGNVVFISVSG-ASALPYEAVYGATKGA			165
StTRII-D3	TMEDYSLIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASQRGNVVFISVSG-ASALPYEAVYGATKGA			166
Le-BE451326	TMEDYSLIMSNFEAAYHLSVLAHPFLKASHRGNVVFISVSG-ASALPYEAVYGATKGA			162
At-Q9LHTO	SSEYAKIMSTNLESAFHLSQIAHPLKASGVGSIVFISVAG-LVHLSSGSIYGATKGA			167
Hs-Q9H3N5	TEEVWDKTLDINVKAPALMTKAVVPEMEKRGGSVVIVSSIAA-FSPSPGFSPYVNSKTA			170
Tm-Q9WYS2	PLDEFQRQVIEVNLFGTYVYVCREAFSLLRESDNPSIINIGSLTVEEVTMPNISAYAAASKGG			166
		▼ * **		
DsTRI	INQMTKSLACEWAKDNIRVNSVAPGVILTPLVETAIKKNPHQKEEIDNFIIVKTPMGRAGK			237
HnTRI	INQITKNLACEWAKDNIRVNSVAPGVILTPLIETAIKKNPHQKEEIDNFIIVKTPMGRAGK			238
StTRI-SE	INQMTKNLACEWAKDNIRVNSVAPAVILTPLVETAIKKNPQKKEEIDSFVVKTPMGRAGK			228
StTRI-homolog	INQMTKNLACEWAKDNIRVNSVAPAVILTPQIETAIKKNPQKKEEIDSIIVKTPMGRAGK			228
DsP29x	INQVTKSLACEWAKDSIRVNAVAPWIIINTPIIEAACQ-VPSQKKNIESLIGRAPMKRAGE			232
DsTRII	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVGPVVIATSLVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALRRMGE			224
HnTRII	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVGPVVIATSMVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALRRMGE			224
StTRII-D3	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVAPGVVIASSMVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALHRMGE			225
Le-BE451326	MDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVAPGVVIASSMVEMTIQ-DPEQENLNKLDKIDRCALH---			217
At-Q9LHTO	LNQLTRNLACEWASDNIRTNVAPWYIKTSLVETLLE---KKEFVEAVVSRTPMGRVGE			223
Hs-Q9H3N5	LLGLTKTLAIELAPRNIRVNCLAPLIKTSFSRMLWM---DKEKESMKETLRIRRLGE			226
Tm-Q9WYS2	VASLTKALAKEWGRYGRVNVVAPGVWYRTKMTAEVFS---DPEKLDYMLKRIPLGRGTG			222
DsTRI	PQEVSAIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF----- 273			
HnTRI	PNEVSAIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF----- 274			
StTRI-SE	PEEASAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF----- 264			
StTRI-homolog	PEEVSAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGAF----- 264			
DsP29x	PSEVSSLVTYLCLPTASYITGQIICVDGGYTVNGFI----- 268			
DsTRII	PKELAAMVAFLCFPAASYVTGQIIYVDGGGLMANCGF----- 260			
HnTRII	PKELAAMVAFLCFPAASYVTGQIIYVDGGFMANGGF----- 260			
StTRII-D3	PKELAAMVAFLCFPAASYVTGQIIYVDGGFMANGGF----- 261			
Le-BE451326	-----			
At-Q9LHTO	PEEVSSLVAFLCLPASSYITGQVLSVDGGFTVNGFSYAMKP 264			
Hs-Q9H3N5	PEDCAGIVSFLCSEDASYITGETVVVGGGTPSRL----- 260			
Tm-Q9WYS2	PEDLKGVAVFLASEEAKYVTGQIIFVDGGWTAN----- 255			

Abb. D-1: Aminosäurevergleich der TR aus *D. stramonium* (DsTRI und DSTRII), *H. niger* (HnTRI und HnTRII) und *S. tuberosum* (StTRI-SE und StTRII-D3) mit homologen

Sequenzen aus *D. stramonium* (DsP29x), *S. tuberosum* (StTRI-homolog), *L. esculentum* (Le-BE451326, Datenbankeintrag: BE451326), *A. thaliana* [At-Q9LHT0, Datenbankeintrag: AP002030, (Tabata *et al.* 2000)], aus *Homo sapiens* (Hs-Q9H3N5, Datenbankeintrag: AB045131, Retinoldehydrogenase-Reduktase, unveröffentlicht) und der Sequenz aus *Thermotoga maritima* [Tm-Q9WYS2, Datenbankeintrag: AE001722, (Nelson *et al.* 1999)]. Der AS-Vergleich wurde mit CLUSTALW erstellt (Thompson *et al.* 1994). Grau unterlegte AS sind in mindestens 9 Sequenzen konserviert; rot gekennzeichnete AS markieren die Substratbindungsstelle der TR; * markiert AS, die in der SDR-Enzymfamilie konserviert sind, * markiert die Bindung des Co-Substrates; + das katalytische Zentrum der TR.

Besonders interessant ist der EST-Klon aus Tomate. Die höchste AS-Homologie besteht zur TRII aus Kartoffel, sie beträgt 96 %. Er zeigt die typischen Strukturmerkmale einer TRII. Unterschiede bestehen nur in AS, die nicht in die Bindung des Substrates und Co-Substrates involviert sind. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieses putative TRII-Enzym aus Tomate Tropinon zu Pseudotropin, der Vorstufe der Calystegine, umsetzen kann. Dies korreliert mit der Detektion von Calystegin A₃ und B₂ in Tomate (Asano *et al.* 1997a). Der EST-Klon wurde aus Tomatenwurzeln gewonnen, ein typisches Gewebe, in dem *TRII* exprimiert wird (vgl. Kap. C 9.1).

Die Sequenzen aus *Arabidopsis*, dem Menschen und aus dem Bakterium *Thermotoga maritima* sind in den 11 AS-Positionen der Tropinonbindung variabel (vgl. Abb. D-1). Sie benutzen wahrscheinlich andere Substrate in verschiedenen Stoffwechselwegen. Für das menschliche Enzym wurde eine All-Trans-Retinalreduktaseaktivität festgehalten (Datenbankeintrag).

Bisher wurde angenommen, daß die Verbreitung der TRII-Enzyme größer als die der TRI-Enzyme ist (Nakajima *et al.* 1999b). Durch die Klonierung einer *TRI*-cDNA aus Kartoffel, einer Pflanze, die keine klassischen Tropanalkaloide enthält, wird die Fragestellung nach der Verbreitung der TR erneut diskutiert.

Bei den *Convolvulaceen*, einer phylogenetisch nahen Familie, gibt es erste Hinweise, daß auch in *C. sepium* zwei TR-Enzyme vorhanden sind (Scholl, persönliche Mitteilung).

Interessant wäre, ob die Calysteginbiosynthese in den *Moraceen* über dieselbe enzymatische Reduktion des Tropinons verläuft. Die Isolierung von Tropinonreduktasen aus dieser phylogenetisch entfernten Familie würde weiteren Aufschluß über die Evolution geben. Aus der genetischen Sequenz der *TR*'s könnten sich Hinweise auf eine mono- oder polyphylogenetische Abstammung ergeben.

Nicht immer haben sich katalytisch verwandte Enzyme aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt, wie das Beispiel der D- und L-Lactatdehydrogenase aus *Lactobacillus plantarum* beweist (Taguchi und Ohta 1991). Sie besitzen keine signifikanten Homologien.

Nakajima und Mitarbeiter (1999b) stellten die interessante Hypothese auf, daß das „Ur-TR-Enzym“ eine zufällige Stereospezifität hatte. Da die Umsetzung zur 3 α - oder 3 ϵ -OH Gruppe in den *trI/II*-Mischmutanten stark von der Substratkonzentration

abhängig, hat das „Ur-TR-Enzym“ möglicherweise nur ein Stereoisomer produziert. Erst durch weitere Mutationen könnte im Verlauf der Evolution eine selektive Umwandlung des Tropinons entstanden sein.

Wie sich die Spezifität von Enzymen durch Mutation an wenigen AS ändern kann, beweist das Beispiel der humanen Lipoxygenasen. Der Austausch einer für die Substratbindung konservierten AS ändert die Oxidationseigenschaften der 15-Lipoxygenase. Wie die 12-Lipoxygenase bildet das mutierte Enzym zu 50 % 12-Hydroperoxide (Sloane *et al.* 1991).

Weitere Beispiele für die selektive Entwicklung von Enzymen im Laufe der Evolution sind die PMT und die Homospermidin-Synthase. Die Spermidin-Synthase gilt als evolutionärer Vorläufer der PMT (Hashimoto *et al.* 1998a). Die Homospermidinsynthase (HSS) entwickelte sich im Laufe der Evolution aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS), einem Enzym des Primärstoffwechsels. Es ist interessant, daß die DHS beide Enzymeigenschaften trägt, während die HSS nur die Aminobutylgruppe des Spermidins auf Putrescin übertragen kann (Ober und Hartmann 1999a; 1999b; 2000).

D 2.5 Katalytische Eigenschaften der TR

Daten über die katalytischen Eigenschaften sind für die TRI aus *D. stramonium*, *H. niger* und einem *Brugmansia candida x aurea* Hybrid verfügbar (Hashimoto *et al.* 1992; Koelen und Gross 1982; Boswell *et al.* 1999a; Portsteffen *et al.* 1994). Für die ausführliche Charakterisierung der TRI aus *S. tuberosum* war im Rahmen dieser Arbeit keine Zeit mehr. Es wurde die Reduktion des Tropinons zum Tropin nachgewiesen. Interessant ist, ob sich die StTRI ähnlich zu den beiden bekannten TRI-Enzymen verhält. Ein geringes pH-Optimum deutet sich bereits an, da es bei der Verwendung eines Puffers mit pH 8,0 bei der Reinigung mit His-Tag-Fusion zum Aktivitätsverlust kam. Portsteffen und Mitarbeiter (1994) geben ein enges pH-Optimum bei pH 6,4 für die DsTRI an; bei der HnTRI liegt es bei pH 6,1.

Eine Abschätzung der K_m -Werte für das TRI-Enzym aus *S. tuberosum* ist anhand der AS-Sequenz schwierig, da bereits ein Austausch von AS mit ähnlichen Eigenschaften zu großen Änderungen des K_m -Wertes führen kann. Für eine menschliche Alkoholdehydrogenase wurde beschrieben, daß schon ein einfacher Austausch einer AS, die in die Substratbindung involviert ist, zu einer Erhöhung des K_m -Wertes um 280 % führte. Im Beispiel wurden Val und Ala durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht (Crosas *et al.* 2000).

Ds und HnTRI können die Rückreaktion, die Oxidation, katalysieren. Bei der StTRI steht dieser Nachweis noch aus.

Für die TRII sind neben den in dieser Arbeit erstellten katalytischen Daten für *S. tuberosum* Daten der TRII-Enzyme aus *D. stramonium*, *H. niger*, *A. belladonna* und aus dem *Brugmansia candida x aurea* Hybrid bekannt (vgl. Kap. C 7.1) (Dräger *et al.*

1988, Dräger und Schaal 1994a; Hashimoto *et al.* 1992; Portsteffen *et al.* 1994; Boswell *et al.* 1999a). Das pH-Optimum zeigt für die Ds-, Hn-, Ab- und St-TRII-Enzyme eine ausgeprägte Breite von pH 4,5 - 8,5. Allerdings weicht das Optimum der StTRII mit pH 5,0 von dem der anderen TRII-Enzyme ab, die ihr Optimum bei einem pH-Wert von 6,2 haben. Für die BcaTRII liegen keine Daten vor.

Neben der Umsetzung des Tropinons werden Piperidin-4-on Derivate mit einer hohen Aktivität umgesetzt. Nortropinon wird von der TRII aus Kartoffel und Ds umgesetzt (für die anderen Enzyme gibt es keine Daten). Die relative Aktivität beträgt aber nur ca. 20 %. Die Effizienz der Umwandlung ist beim Tropinon besser (vgl. Kap. C 7.1.2). Die Frage nach dem natürlichen Substrat kann nicht endgültig beantwortet werden.

In vitro und *in vivo* Versuche zeigten die Umsetzung von *N*-Alkylnortropinon-derivaten durch TRI und TRII von Ds und Bca (Boswell *et al.* 1999a; 1999b). Das unterstreicht die beträchtliche Flexibilität der TR-Aktivitäten in bezug auf die Substrat-analoga.

Die K_m -Werte der verschiedenen TRII variieren bei pH 6,4 im Bereich von 33 μ M (StTRII) bis 160 μ M (BcaTRII).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die TRII neben ihrer hohen Sequenz-homologie auch über gemeinsame katalytische Eigenschaften verfügen. Diese unterscheiden sich aber grundlegend von den TRI-Enzymen. Eine Ausnahme zeigt das TRII-Enzym des *Brugmansia candida x aurea* Hybriden, welches Chinuclidin-3-on mit einer 46%igen relativen Aktivität umsetzt. Alle anderen TRII-Enzyme sind nicht in der Lage, Chinuclidin-3-on umzusetzen.

D 2.6 Die TR-Gene im Kartoffelgenom

Die genomische Organisation der TR-Sequenzen ist in den einzelnen Spezies unterschiedlich. In der *Southern Blot* Analyse ergab sich für *H. niger* jeweils eine *single-copy* Gencodierung. Dies wurde bei der Isolierung genomischer TRI und TRII-Klone bestätigt (Nakajima *et al.* 1993a). In Kartoffel und *A. belladonna* werden die TR's von einem *low-copy* bzw. *multi-copy* Gen codiert (vgl. Kap. C 8 und persönliche Mitteilung Nakajima).

Es ist wahrscheinlich, daß es sich in der Kartoffel innerhalb der jeweiligen TR-Gruppe nicht um unterschiedliche Gene, sondern um Allele handelt. Kartoffel ist eine heterozygote autotetraploide Art, die Gene von mindestens 11 verschiedenen *Solanum*-Arten trägt (Ross 1986; Soltis und Solitis 1993). Mehrfacher Allelismus ist nicht ungewöhnlich. In der Vergangenheit wurden verschiedene Allele für eine Reihe von Genen in *S. tuberosum* gefunden, wie z. B. ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (Ballicora *et al.* 1998), UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (Sowokinos *et al.* 1997) und Stärke-Synthase (Abel *et al.* 1996; Marshall *et al.* 1996). Es wurde gezeigt, daß z. B. die Allele des stärkekorngelassenen Stärke-Synthasegenes (*GBSS1*) eine

Homologie von bis zu 99 % innerhalb der codierenden Sequenz aufwiesen, hingegen in ihren Promotorsequenzen eine höhere Abweichung vorlag (van de Wal *et al.* 2001). Die Zusammensetzung der *GBSSI*-Allele im Genom verschiedener *S. tuberosum* Varietäten hat einen Einfluß auf die *GBSSI*-Enzymaktivität (van de Wal *et al.* 2001). Die *StTR*-Sequenzen haben innerhalb der *TRI*- bzw. *TRII*-Gruppe eine ähnlich hohe Homologie in den codierenden Sequenzen. Über die Unterschiede innerhalb der Promotorsequenzen der *StTR*-Gene ist noch nichts bekannt, so daß ein unterschiedlicher Einfluß der einzelnen *StTR*-Allele auf die Bildung der TR-Enzyme nicht ausgeschlossen werden kann.

D 2.7 Expression und Lokalisation der Tropinonreduktasen

Es wurde nachgewiesen, daß die Biosynthese der Tropanalkaloide in den Wurzeln stattfindet und die Produkte, die klassischen Tropanalkaloide, im Xylem in die Blätter transportiert werden (Wink und Roberts 1998).

Für die *PMT* und die *H6H* wurde eine Expression vorwiegend in den Wurzeln verschiedener Spezies beschrieben (Hashimoto *et al.* 1991; Hibi *et al.* 1994; Matsuda *et al.* 1991; Suzuki *et al.* 1999a). Suzuki und Mitarbeiter (1999b) konnten zusätzlich eine Lokalisation der *H6H*-mRNA und des Proteins in den Antheren von *A. belladonna* Pflanzen zeigen.

Die TR-Proteine wurde bisher nur in *H. niger*-Pflanzen im *Western Blot* untersucht (Nakajima und Hashimoto 1999d). *TRI*- und *TRII*-Proteine wurden in hoher Konzentration hauptsächlich in den Seitenwurzeln detektiert. Schwache Signale in jungen oberirdischen Geweben wurden mit der unvollständigen Separation der Wurzeln von den Pflanzen erklärt (Nakajima und Hashimoto 1999d).

In unseren Analysen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die *TR*-Gene auch in oberirdischen Geweben exprimiert sind (vgl. Kap. C 9). In den Geweben der Kartoffel akkumulieren oberirdisch *TR*-Transkripte vorwiegend in den Blüten (*TRI*), unteren Blättern (*TRI* und *TRII*) und in jungen Blättern (*TRII*). In den Blättern gibt es funktionell kein Gewebe, welches der Wurzelendodermis und dem Perizykel äquivalent ist. Das sind die Zellschichten, in denen die TR-Proteine von Nakajima lokalisiert wurden. Die Lokalisation der TR-mRNA's und der Proteine in den Zellschichten der unterschiedlichen Gewebe muß noch geklärt werden. Methoden der Wahl sind *in-situ Hybridisierung* (mRNA-Lokalisation) bzw. eine immunohistochemische Detektion der Proteine mit Antikörpern. Die Erstellung eines Reinigungsschemas sowohl für die *TRI* als auch für die *TRII* als His-Tag-Fusionsproteine schafft die Grundlage für die Gewinnung ausreichender Proteinmengen zur Gewinnung von Antikörpern (vgl. Kap. C 6.2 und C 6.3).

Auf die unterschiedliche zellspezifische Verteilung innerhalb der Wurzel wurde bereits in Kap. D 1.4 hingewiesen. Interessant dabei ist, daß sich TR-Proteine zum Teil in anderen Zellschichten befinden als es für die *PMT*, ein frühes Enzym der Tropanalkaloidsynthese, beschrieben wurde. Diese ist in *A. belladonna* aus-

schließlich im Perizykel lokalisiert (Suzuki *et al.* 1999a). Die H6H, ein spätes Enzym, wurde im Perizykel lokalisiert (Hashimoto *et al.* 1991). Die Lokalisationsunterschiede lassen auf einen Transport von Intermediaten zwischen den Zellschichten schließen (Nakajima und Hashimoto 1999d). Eine unterschiedliche Kompartimentierung wurde auch für den Indolalkaloidmetabolismus von *C. roseus* herausgefunden (St Pierre *et al.* 1999; Vazquez-Flota *et al.* 2000).

Die *TRI*-Transkriptakkumulation in Kartoffeln unterscheidet sich wesentlich von der der *TRII*. Neben starken Transkriptsignalen beider mRNA's in den Wurzeln und einigen Knollensprossstadien wurde die *TRI*-mRNA vor allem in den Stolonen, der Blüte und dem Gefäßring in der Knolle exprimiert. Die fehlende Expression der *TRI* in den meisten Blattgeweben erklärt auch die fehlende Bildung von Tropin nach Tropinonfütterungsversuchen in den Pflanzen. Pseudotropin hingegen wurde gebildet. Trotz der schwachen *TRII*-mRNA-Expression in den Blättern ist *TRII*-Aktivität messbar vorhanden.

Ohne detailliertes Wissen über weitere Enzyme, die in die Calysteginbiosynthese involviert sind, ist es schwierig, eine Korrelation zwischen *TR*-Transkriptakkumulation und einer möglichen metabolischen Regulation aufzuzeigen. Zwischen der Calysteginakkumulation und *TRII*-mRNA Expression gibt es Unterschiede. Die *TRII*-Transkriptakkumulation in der späten Keimentwicklung deutet auf einen Transport von Intermediaten bzw. Calysteginen aus der Rinde der Kartoffelknolle in die Augen hin. In den Kartoffelaugen wurde beim Keimstart kein *TRII*-Transkript detektiert; hier findet man aber die höchsten Calysteginkonzentrationen.

Kartoffelwurzelkulturen akkumulieren *TRII*-Transkripte und sind in der Lage, Tropinon in Pseudotropin umzuwandeln. Sie bilden aber keine Calystegine. Das weist darauf hin, daß die Biosynthese in einem der folgenden Schritte unterbrochen ist. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die folgenden Biosyntheseschritte nicht in den Wurzeln stattfinden und statt dessen die Calystegine in intakten Pflanzen in die Wurzeln transportiert werden. Ein Transport von Tropanalkaloiden von den Blättern in die Wurzel wurde durch Fütterung mit ¹⁴C-markierten Atropin in *D. myoporoides* nachgewiesen (Kitamura *et al.* 1991).

Die Reduktion des Tropinons durch die *TRII* ist in der Biosynthese der Calystegine nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da Tropinon in keinem der untersuchten Gewebe akkumuliert.

D 3 Ausblick

Durch die genaue Bestimmung der Calysteginakkumulation einerseits und der Klonierung der *TRI* und der *TRII* aus Kartoffel andererseits sind gute Voraussetzungen geschaffen worden, um weitere Untersuchungen zur Biosynthese der Calystegine und ihrer Regulation anzuschließen. Dabei könnten folgende Fragen im Mittelpunkt stehen:

- Biosynthese und Bedeutung der Calystegine für die Pflanze

Die Herstellung von transgenen Pflanzen mit den entsprechenden *TR-sense* und *antisense* Konstrukten kann den abschließenden Nachweis erbringen, ob die Calysteginbiosynthese über die Reduktion des Tropinons verläuft. *TRI-sense* Pflanzen könnten darüber hinaus Hinweise über den metabolischen Fluß im des Tropins in der Kartoffel geben.

Auch für die Frage nach der Bedeutung der Calystegine für die Pflanze sind transgene Pflanzen geeignete Modelle, z. B. für Versuche zur Fraßhemmung oder zur Erforschung ihrer Auswirkung auf die Keimung.

Ausgehend vom Vorkommen beider *TR*'s in Kartoffel scheint es sinnvoll, nach anderen möglichen Enzymen der Calysteginbiosynthese in der Kartoffel zu suchen (vgl. Kap. D 1.4). Dabei sollten frühe (PMT) wie auch spätere (Hydroxylierung und Demethylierung) Schritte der Biosynthese einbezogen werden.

- Ort der Biosynthese und ihre Regulation

Zur Herstellung von Antikörpern ist es nötig, die Reinigungsschemata auf größere Proteinmengen zu übertragen. Mit spezifischen Antikörpern gegen die *TRI/II*-Proteine könnte die Lokalisation der Proteine in den Zellschichten der Pflanzengewebe der Kartoffel untersucht werden. Interessant ist die Verteilung in oberirdischen Geweben.

Mit dem gereinigten *TRI*-Protein ist die Bestimmung der kinetischen Parameter möglich, Unterschiede und Ähnlichkeiten zu den bekannten *TRI*-Enzymen könnten deutlich gemacht werden.

Wichtig ist die Frage der Regulation der *TR*-Proteinbiosynthese. Dazu sollten die Strukturen der *TR*-Gene, die Promotorsequenz und Exon/Intronstruktur aufgeklärt werden. In vielen Pflanzengenomen befinden sich sogenannte regulative Elemente, G-Boxen, die im Pflanzenreich ubiquitär vorkommen (Menkens *et al.* 1995). Enhancer-Sequenzen können die Transkription stimulieren. Callis und Mitarbeiter (1987) beschreiben anhand einer Alkoholdehydrogenase aus Mais, daß pflanzliche Introns die Genexpression stimulieren können. Durch die genomischen Sequenzen würde man außerdem weitere Informationen über Unterschiede zwischen den einzelnen Allelen erhalten.

Ausgehend von den Hinweisen über die Induktion der Calysteginbiosynthese durch Zucker und der Beeinflussung der Transkription einzelner Enzyme der

Calysteginbiosynthese durch MeJa und Verwundung sollte in *Northern Blot* Analysen ein möglicher Zusammenhang mit der TR-mRNA-Transkriptakkumulation untersucht werden.

▪ Bedeutung der Calystegine für den Menschen

Unter Berücksichtigung des Wissens über die höchste Calysteginakkumulation in Kartoffelgeweben ist es möglich, Calystegine aus diesen Geweben (Kartoffelkeime) zu isolieren. Dies ist Voraussetzung für die Testung z. B. gegen maligne Zellen.

Das ist auch die Grundlage für die Abschätzung der Toxizität neben den in Kartoffel vorkommenden Glycoalkaloiden.