

E Zusammenfassung

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide mit einer einzigartigen Aminoketalfunktion am Kohlenstoffbrückenatom. Aufgrund ihrer biologischen Aktivität als Glycosidasehemmstoffe sind sie von besonderem Interesse. Die Biosynthese der Calystegine leitet sich in den Pflanzenspezies, die klassische Tropanalkaloide enthalten, vom Tropanalkaloidstoffwechsel ab.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein Beitrag zur Untersuchung der Biosynthese der Calystegine und ihrer Verteilung in *S. tuberosum* erbracht werden. Es wurde gezeigt, daß auch in Pflanzen, die keine klassischen Tropanalkaloide akkumulieren, Enzyme der Tropanalkaloidbiosynthese vorhanden sind.

Im folgenden sind die Ergebnisse zusammengefaßt:

- Eine Akkumulation von Calysteginen in Kartoffeln findet sortenspezifisch und in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium statt. Calystegine akkumulieren in der Kartoffelknolle und in unterirdischen Geweben. Den höchsten Gehalt findet man in Keimaugen beim Keimstart. Er beträgt mehr als 0,44 % bezogen auf die Frischmasse. In oberirdischen Geweben akkumulieren weniger als 1/30 dieser Mengen. Kartoffelkeime, die ebenfalls große Mengen an Calysteginen speichern, sind ein ideales Material, um Calystegine in ausreichender Quantität zu isolieren. Die Bildung von Calysteginen läßt sich nicht durch Lichteinfluß und Verletzung induzieren.
- Mit der Reduktion von Tropinon zu Tropin bzw. Pseudotropin in *in vivo* Fütterungsversuchen in Kartoffel sowohl eine TRI- als auch eine TRII-Aktivität nachgewiesen werden. Die Bildung von Tropin war überraschend, da in Kartoffel keine klassischen Tropanalkaloide akkumulieren.
- Degenerierte Primer wurden von den bekannten *TR*-Sequenzen abgeleitet und mittels RT-PCR *TR*-homologe Fragmente amplifiziert. Diese bildeten die Grundlage, um mit RACE-PCR und dem Screenen von cDNA-Banken putative *TRI*- und *TRII*-cDNA-Sequenzen zu isolieren und sequenzieren. Dabei wurden aus zwei Kartoffelsorten 6 *TRII*-cDNA-Sequenzen isoliert, deren AS-Sequenz sich nur in wenigen AS unterscheidet. Eine cDNA aus den unterschiedlichen Sorten war identisch. Es wurden weiterhin drei putative *TRI*-cDNA-Sequenzen isoliert.
- *TRI*- und *TRII*-cDNA-Sequenzen zeigen die typischen Sequenzmotive der kurzketigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). Zu den bekannten *TR*-Sequenzen derselben Gruppe sind sie auf AS-Ebene mehr als 86 % homolog. Die *TR*-cDNA-Sequenzen, die für die aktiven TRI- bzw. TRII-Proteine codieren, sind in den für die Tropinonbindung postulierten AS konserviert.
- Drei *TRII*-cDNA-Sequenzen wurden ausgewählt, um die heterologe Expression

des TRII-Proteins in *E. coli* durchzuführen. Alle drei Proteine zeigten eine pseudotropinbildende Tropinonreduktaseaktivität. Von den zwei heterolog exprimierten putativen TRI-Proteinen zeigte das TRI-SE-Protein eine tropinbildende Tropinonreduktaseaktivität. Das zweite TRI-homologe Protein setzte kein Tropinon um. Mit anderen Substratanaloga wurden Enzymaktivitäten gemessen.

- Angereinigtes TRII-Protein verhielt sich in Hinsicht auf pH-Optimum und katalytische Parameter ähnlich den bekannten TRII-Enzymen der tropanalkaloidbildenden Spezies.
- TRI und TRII wurden als His-Tag-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert. Reinigungsschemata wurden entworfen, um Proteine für die Antikörperproduktion zu gewinnen.
- *TRI* und *TRII* liegen im Kartoffelgenom als *low-copy* bzw. *multi-copy* Gen vor. Es wird angenommen, daß es sich nicht um unterschiedliche Gene sondern um Allele handelt.
- Northern Blot Analysen zeigten eine unterschiedliche Verteilung der TRI- und der TRII-mRNA's. Erstmals konnte die Expression eines Genes eines in die Tropanalkaloidbiosynthese involvierten Enzyms in den Blättern gezeigt werden. Es wurden weiterhin Unterschiede zwischen der *TRII*-Transkript- und Calysteginakkumulation beobachtet. Diese lassen auf einen Transport von Calysteginen oder Intermediaten zwischen einzelnen Geweben der Kartoffelknolle schließen.