

Tropanalkaloidbiosynthese in *Solanum*-Arten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Pharm. Anna-Carolin Freydank
geb. am 02.12.1977 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Ludger Wessjohann
3. Prof. Dr. Maike Petersen

Halle/Saale, den 17.12.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000015037

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015037>]

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | a |
| Abbildungsverzeichnis..... | d |
| Tabellenverzeichnis..... | e |
| Publikationen und wissenschaftliche Beiträge..... | f |
| A Einleitung..... | 1 |
| A 1 Calystegine..... | 1 |
| A 1.1 Struktur und Wirkung der Calystegine..... | 1 |
| A 1.2 Verbreitung der Calystegine..... | 3 |
| A 1.3 Physiologische Bedeutung der Calystegine..... | 4 |
| A 2 Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese..... | 5 |
| A 2.1 Regulation und Beeinflussung der Biosynthese..... | 7 |
| A 3 Modellierung von Proteinen..... | 9 |
| A 4 Aufgabenstellung..... | 11 |
| B Materialien und Methoden..... | 12 |
| B 1 Materialien..... | 12 |
| B 1.1 Pflanzenmaterial und Wurzelkulturen..... | 12 |
| B 1.2 Bakterien..... | 12 |
| B 1.3 Vektoren..... | 13 |
| B 1.4 Chemikalien und Standards..... | 13 |
| B 1.5 Puffer, Standardlösungen und Medien..... | 13 |
| B 1.6 Enzyme und Kits..... | 14 |
| B 1.7 Oligonukleotide und Sequenzierungen..... | 14 |
| B 2 Methoden..... | 16 |
| B 2.1 Analytische Methoden..... | 16 |
| B 2.1.1 Extraktion und Derivatisierung von Calysteginen..... | 16 |
| B 2.1.2 Extraktion von Intermediaten der Calysteginbiosynthese..... | 16 |
| B 2.1.3 Isolierung und Derivatisierung der Polyamine..... | 17 |
| B 2.1.4 Synthese von [¹³ C- <i>methyl</i>]-Tropinon..... | 17 |
| B 2.1.5 Applikation von [¹³ C- <i>methyl</i>]-Tropinon an <i>S. dulcamara</i> Wurzelkulturen..... | 19 |
| B 2.1.6 Extraktion von Aminosäuren und Intermediaten..... | 19 |
| B 2.1.7 Reinigung und Derivatisierung der Aminosäuren..... | 19 |
| B 2.1.8 Gaschromatographie (GC)..... | 20 |
| B 2.1.9 Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)..... | 21 |
| B 2.1.10 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)..... | 21 |
| B 2.1.11 Dünnschichtchromatographie..... | 22 |
| B 2.1.12 NMR..... | 23 |
| B 2.2 Molekularbiologische Methoden..... | 23 |
| B 2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe..... | 23 |
| B 2.2.2 cDNA-Synthese..... | 24 |
| B 2.2.3 PCR..... | 24 |
| B 2.2.4 Vervollständigung der cDNA Sequenzen..... | 25 |
| B 2.2.5 Kolonie-PCR..... | 26 |
| B 2.2.6 Klonierung..... | 26 |
| B 2.2.7 Rekombinante Expression in <i>E. coli</i> | 26 |
| B 2.3 Biochemische Methoden..... | 27 |
| B 2.3.1 Quantifizierung von Proteinen..... | 27 |
| B 2.3.2 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial..... | 27 |
| B 2.3.3 Proteinextraktion aus Bakterien..... | 28 |

| | |
|---|-----------|
| B 2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 28 |
| B 2.3.5 Enzymassay zur Bestimmung der Tropinonreduktase-Aktivität | 29 |
| B 2.3.6 Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Enzyme | 30 |
| B 2.4 <i>in silico</i> Methoden..... | 32 |
| B 2.4.1 Datenbanken..... | 32 |
| B 2.4.2 Komparative Modellierung | 33 |
| B 2.4.3 <i>in silico</i> Screening | 34 |
| B 2.4.4 Dockingstudien..... | 35 |
| C Ergebnisse | 36 |
| C 1 Tropanalkaloide und Tropinonreduktase-Aktivität in Solanum-Arten..... | 36 |
| C 1.1 Calystegin-Akkumulation..... | 36 |
| C 1.2 Akkumulation der Intermediate der Calysteginbiosynthese..... | 39 |
| C 1.3 Tropinonreduktase-Aktivität..... | 40 |
| C 1.4 Wurzelkulturen | 42 |
| C 1.5 Tropinonumsatz in Pflanzengeweben und Wurzelkulturen..... | 43 |
| C 2 Tropinonreduktase II – Solanum dulcamara | 44 |
| C 2.1 Isolierung einer <i>trII</i> homologen cDNA Sequenz aus <i>S. dulcamara</i> | 44 |
| C 2.2 Überexpression und Reinigung der <i>Sd-TRII</i> | 45 |
| C 2.3 Biochemische Charakterisierung und Modellierung der <i>Sd-TRII</i> | 46 |
| C 2.3.1 Charakterisierung der <i>Sd-TRII</i> mit C-terminalem His-Tag (C- <i>Sd-TRII</i>)..... | 46 |
| C 2.3.2 Charakterisierung der <i>Sd-TRII</i> mit N-terminalem His-Tag (N- <i>Sd-TRII</i>)..... | 48 |
| C 2.3.3 Entwicklung der Modellstruktur | 50 |
| C 2.4 Liganden-Dockingstudien mit <i>in vitro</i> getesteten Substanzen | 52 |
| C 2.5 <i>in silico</i> Screening zur Ligandensuche | 54 |
| C 2.6 Inhibitor Enzymtests <i>in vitro</i> | 56 |
| C 2.7 Inhibitor-Applikation an Wurzelkulturen von <i>S. dulcamara</i> | 58 |
| C 3 Tropinonreduktase I..... | 61 |
| C 3.1 Isolierung <i>trI</i> homologer cDNA-Sequenzen aus <i>S. dulcamara</i> und <i>S. nigrum</i> | 61 |
| C 3.2 Überexpression, Reinigung und Charakterisierung der TRI | 61 |
| C 4 Putrescin-N-methyltransferase | 64 |
| C 4.1 Analytik der Polyamine in <i>S. dulcamara</i> | 64 |
| C 4.2 Isolierung einer <i>pmt</i> homologen Sequenz aus <i>S. dulcamara</i> | 65 |
| C 4.3 Überexpression und Reinigung <i>Sd-PMT</i> | 67 |
| C 4.4 Biochemische Charakterisierung der <i>Sd-PMT</i> | 67 |
| C 5 [¹³ C-methyl]-Tropinon Umsatz in <i>S. dulcamara</i> Wurzelkulturen | 69 |
| D Diskussion | 72 |
| D 1 Calysteginakkumulation in Solanum-Arten..... | 72 |
| D 2 Tropinonreduktase-Aktivität in Solanum-Arten..... | 73 |
| D 3 Tropinonreduktase I in <i>S. dulcamara</i> und <i>S. nigrum</i> | 74 |
| D 4 Tropinonreduktase II in Solanum dulcamara | 75 |
| D 4.1 Katalytische Eigenschaften der <i>Sd-TRII</i> mit C-terminalem His-Tag (C- <i>Sd-TRII</i>) | 75 |
| D 4.2 Modell der <i>Sd-TRII</i> | 77 |
| D 4.3 Katalytische Eigenschaften der <i>Sd-TRII</i> mit N-terminalem His-Tag (N- <i>Sd-TRII</i>) | 78 |
| D 4.4 Liganden der <i>Sd-TRII</i> | 79 |
| D 5 Demethylierung – ein Biosyntheseschritt zu den Calysteginen | 80 |
| D 6 Putrescin-N-methyltransferase – Verbindung von Primär und Sekundärstoffwechsel . | 82 |
| D 6.1 Polyamine | 82 |
| D 6.2 Isolierung einer Putrescin-N-methyltransferase (PMT) aus <i>S. dulcamara</i> | 83 |
| D 6.3 Katalytische Eigenschaften der <i>Sd-PMT</i> | 83 |
| D 7 Ausblick | 85 |
| E Zusammenfassung | 87 |

| | |
|---|------------|
| F Literaturverzeichnis..... | 89 |
| G Anhang..... | 104 |
| G 1 Calystegin- und Intermediat-Akkumulation..... | 104 |
| G 1.1 Calystegin-Akkumulation | 104 |
| G 1.2 Intermediat-Akkumulation | 105 |
| G 1.3 Wurzelkulturen <i>S. dulcamara</i> | 106 |
| G 2 Kinetische Parameter und Tropinonreduktase-Aktivitätswerte | 106 |
| G 3 Vektorkarten..... | 108 |
| G 4 cDNA-Sequenzen aus <i>S. dulcamara</i> und <i>S. nigrum</i> | 109 |
| G 5 Substanzen aus der Ligandensuche | 112 |
| Danksagung..... | 127 |
| Lebenslauf..... | 129 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|---|
| % | Prozent |
| 3D | Dreidimensional |
| (18S) rRNA | ribosomale RNA (Untereinheit 18) |
| His-Tag | sechsfach fusionierter Histidinrest |
| A | Absorption |
| Abb. | Abbildung |
| <i>A. belladonna</i> , <i>Ab</i> | <i>Atropa belladonna</i> |
| ADC | Arginindecarboxylase |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BLOSUM | Blocks Substitutions Matrix |
| bp (kbp) | Basenpaare (Kilo-) |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| Cal | Calystegin |
| <i>C. sepium</i> , <i>Cs</i> | <i>Calystegia sepium</i> |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| <i>D. innoxia</i> , <i>Di</i> | <i>Datura innoxia</i> |
| <i>D. stramonium</i> , <i>Ds</i> | <i>Datura stramonium</i> |
| Da (kDa) | Dalton (Kilo-) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DFMA | DL- α -difluoromethylarginin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | desoxy-Nukleotidtriphosphat |
| DNTB | 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, Ellman`s Reagenz |
| EC | <i>enzyme classification</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMBL | <i>European Molecular Biology Laboratory</i> |
| <i>E. coli</i> <i>et al.</i> | <i>Escherichia coli</i> und andere |
| eV | Elektronenvolt |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| FM | Frischmasse |
| g (ng, μ g, mg) | Gramm (Nano-, Mikro-, Milli-) |
| Gamborg`s B5 | (-Medium) Nährmedium nach Gamborg 1968 |
| GC | Gaschromatographie |
| GC-MS | Gaschromatographie mit massenspezifischem Detektor |
| GOLD | <i>Genetic Optimized Ligand Docking</i> |
| h | Stunde(n) |
| <i>H. muticus</i> | <i>Hyoscyamus muticus</i> |
| <i>H. niger</i> , <i>Hn</i> | <i>Hyoscyamus niger</i> |
| H6H | Hyoscyamin-6 β -hydroxylase |
| HMDS | Hexamethyldisilazan |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| K | Kelvin |
| kat (μ kat, nkat) | Katal (Mikro-, Nano-) |
| Km | Michaelis-Menten-Konstante |
| kPa | Kilopascal |

| | |
|---------------------------|---|
| l (µl, ml) | Liter (Mikro-, Milli-) |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| <i>L. esculentum, Le</i> | <i>Lycopersicon esculentum</i> |
| LuxS | S-Ribosylhomocystein Lyase |
| m | (nm, mm, cm) Meter (Nano-, Milli-, Centi-) |
| M (µM, mM) | Mol (Mikro-, Milli-) |
| MCS | <i>Multiple Cloning Site</i> |
| min | Minute(n) |
| MLU | Martin-Luther Universität |
| MOE | <i>Molecular Operating Environment</i> |
| MPO | <i>N-Methylputrescinoxidase</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS | Murashige und Skoog Medium |
| N | Normal |
| <i>N. benthamiana</i> | <i>Nicotiana benthamiana</i> |
| <i>N. plumbaginifolia</i> | <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> |
| <i>N. sylvestris</i> | <i>Nicotiana sylvestris</i> |
| <i>N. tabacum</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADP+ | Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (oxidierte Form) |
| NADPH | Nicotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat (reduzierte Form) |
| Ni-NTA | Nickel-nitrilotriacetat |
| NMR | <i>Nuclear magnetic resonance</i> |
| ODC | Ornithindecaboxylase |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PDB | Protein Data Bank |
| <i>Pfu</i> -Polymerase | Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| <i>P. divaricata, Pd</i> | <i>Physalis divaricata</i> |
| PMT | Putrescin- <i>N</i> -methyltransferase |
| PND | Phosphor-Stickstoff-sensitiver Detektor |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| PROSA II | PROtein Structure Analysis |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RACE | Rapid Amplification of cDNA Ends |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | <i>RNA-interference</i> |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen/min |
| RT-PCR | Reverse Transcription -PCR |
| <i>S. dimidiatum</i> | <i>Solanum dimidiatum</i> |
| <i>S. kwebense</i> | <i>Solanum kwebense</i> |
| <i>S. nigrum, Sn</i> | <i>Solanum nigrum</i> |
| <i>S. dulcamara, Sd</i> | <i>Solanum dukcamara</i> |
| <i>S. muricatum</i> | <i>Solanum muricatum</i> |
| <i>S. melongena</i> | <i>Solanum melongena</i> |
| <i>S. sodomaeum</i> | <i>Solanum sodomaeum</i> |
| <i>S. tuberosum, St</i> | <i>Solanum tuberosum</i> |
| <i>S. nodiflorum</i> | <i>Solanum nodiflorum</i> |
| <i>S. sisymbriifolium</i> | <i>Solanum sisymbriifolium</i> |
| <i>S. rantonnettii</i> | <i>Solanum rantonnettii</i> |
| <i>S. mitlense</i> | <i>Solanum mitlense</i> . |
| SAH | S-Adenosyl-L-homocystein |
| SAM | S-Adenosyl-L-methionin |
| SDR | <i>short-chain dehydrogenase/reductase</i> |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde(n) |
| SPDS | Spermidinsynthase |
| Tab. | Tabelle |

| | |
|------------------------|--|
| <i>Taq</i> -Polymerase | Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TB-Medium | <i>Terrific Broth</i> Medium |
| TBON | 8-Thiabicyclo[3.2.1]-octan-3-on |
| TBOL | 8-Thiabicyclo[3.2.1]-octan-3-ol |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TM | Trockenmasse |
| T _m | Schmelztemperatur der Oligonukleotide |
| TR | Tropinonreduktase(n) |
| TRI | tropinformende Tropinonreduktase |
| TRII | pseudotropinformende Tropinonreduktase |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Units (Enzymeinheiten) |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| V/V | Volumen/Volumen |
| V _{max} | maximale Umsatzgeschwindigkeit |
| Vol | Volumenteile |
| z.B. | zum Beispiel |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abb. A- 1: Strukturformel der Calystegine | 1 |
| Abb. A- 2: Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese; | 6 |
| Abb. B- 1: Reaktionsschema zur Synthese von [¹³ C-methyl]-Tropinon | 17 |
| Abb. B- 2: Syntheseapparatur zur Darstellung von [¹³ C-methyl]-Tropinon | 18 |
| Abb. B- 3: Verwendete Substrate und Substratanaloga | 31 |
| Abb. B- 4: Schematische Darstellung der zwei definierten Pharmakophore | 35 |
| Abb. C- 1: Calystegingehalt in den <i>Solanum</i> -Arten <i>S. muricatum</i> und <i>S. dulcamara</i> | 37 |
| Abb. C- 2: Calystegingehalt in den <i>Solanum</i> -Arten <i>S. nigrum</i> , <i>S. sisymbriifolium</i> , <i>S. rantonnettii</i> , <i>S. nodiflorum</i> und <i>S. mitlense</i> | 38 |
| Abb. C- 3: Intermediatgehalt in den <i>Solanum</i> -Arten <i>S. muricatum</i> , <i>S. dulcamara</i> , <i>S. rantonnettii</i> , <i>S. nodiflorum</i> und <i>S. mitlense</i> | 39 |
| Abb. C- 4: Intermediatgehalt in den <i>Solanum</i> -Arten <i>S. sisymbriifolium</i> und <i>S. nigrum</i> | 40 |
| Abb. C- 5: Tropinonreduktase-Aktivität in <i>S. nigrum</i> | 41 |
| Abb. C- 6: a) Gesamtcalystegingehalt, b) Tropinonreduktase-Aktivität, c) Intermediatgehalt | 42 |
| Abb. C- 7: Vergleich der TRII-Proteinsequenzen von <i>S. dulcamara</i> (<i>Sd</i> -TRII, AM947940), <i>S. tuberosum</i> (<i>St</i> - TRII, AJ245634), <i>H. niger</i> (<i>Hn</i> -TRII, L20485) und <i>D. stramonium</i> (<i>Ds</i> -TRII, L20474) | 45 |
| Abb. C- 8: SDS-Gele nach Reinigung der <i>Sd</i> -TRII mit Nickelaffinitätschromatographie | 46 |
| Abb. C- 9: Bestimmung des pH-Optimums der Tropinonreduktion durch C- <i>Sd</i> -TRII | 47 |
| Abb. C- 10: Bestimmung des pH-Optimums der Tropinonreduktion durch N- <i>Sd</i> -TRII | 48 |
| Abb. C- 11: Molare katalytische Aktivität der C- <i>Sd</i> -TRII und N- <i>Sd</i> -TRII mit verschiedenen Substratanaloga | 50 |
| Abb. C- 12: a und c Modelle der <i>Sd</i> -TRII ohne His-Tag, b und d Modelle der <i>Sd</i> -TRII mit His-Tag und weiteren 5 Aminosäuren am C-Terminus | 52 |
| Abb. C- 13: Korrelation zwischen theoretisch und experimentell bestimmten Substrat-Affinitäten der N- <i>Sd</i> -TRII | 53 |
| Abb. C- 14: Pharmakophore erstellt im Programm MOE [®] aus Tropinon im aktiven Zentrum des <i>Sd</i> -TRII Modells | 54 |
| Abb. C- 15: Schematische Darstellung der Ligandensuche | 56 |
| Abb. C- 16: Inhibitoren getestet | 56 |
| Abb. C- 17: Konzentrationsabhängige Hemmung der <i>Sd</i> -TRII durch die Substanzen Nr.2 (a) und Nr. 4 (b) | 57 |
| Abb. C- 18: Strukturformeln der Substanzen Nr. 2 und Nr. 4 | 57 |
| Abb. C- 19: Aktive Zentrum der <i>Sd</i> -TRII mit den gedockten Substanzen: a) Nr. 2; b) Nr. 4; c) Tropinon | 58 |
| Abb. C- 20: <i>S. dulcamara</i> Wurzelkultur nach 3 Wochen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen | 59 |
| Abb. C- 21: Frisch- und Trockenmasse nach 7 Wochen Kultivierung der <i>S. dulcamara</i> Wurzelkultur mit 0,4 mM der Inhibitoren Nr. 2 und Nr. 4, mit 0,4 mM NaCl und normalem Gamborg's B5 Flüssigmedium | 60 |
| Abb. C- 22: a) Intermediatgehalt und b) Calystegingehalt in der Wurzelkultur von <i>S. dulcamara</i> 7 Wochen kultiviert mit 0,4 mM Substanz Nr. 2, Nr. 4, NaCl und in normalem Gamborg's B5 | 60 |
| Abb. C- 23: Identitätsvergleich der TRI-Proteinsequenzen von: <i>S. dulcamara</i> (<i>Sd</i> -TRI); <i>S. tuberosum</i> (<i>St</i> -TRI, AJ307584); <i>H. niger</i> (<i>Hn</i> -TRI, AB026544); <i>D. stramonium</i> (<i>Ds</i> -TRI, L20473) | 63 |
| Abb. C- 24: Polyamine in Geweben von <i>S. dulcamara</i> , a) Putrescin, b) Spermidin, c) N-Methylputrescin | 64 |
| Abb. C- 25: Partielles Alignment der Aminosäuresequenzen bekannter PMT | 66 |
| Abb. C- 26: SDS-Gel nach Reinigung der <i>Sd</i> -PMT mit C-terminalem His-Tag über Nickelaffinitätschromatographie | 67 |
| Abb. C- 27: Darstellung des aktiven Zentrums der <i>Ds</i> -PMT mit dem Substrat Putrescin und dem Cosubstrat SAM | 68 |
| Abb. C- 28: HSQC-NMR Spektrum eines Extraktes aus <i>S. dulcamara</i> Wurzelkultur nach 120 h Inkubation mit 7 mM [¹³ C-methyl]-Tropinon | 69 |
| Abb. C- 29 a-d: GC-MS Zerfallsmuster der Aminosäuren Glutaminsäure und Asparagin | 70 |
| Abb. D- 1: Schematische Darstellung des Citratzyklus | 81 |
| Abb. G- 1: a) <i>sd-trII</i> in pET-21d (Novagen), b) <i>sd-pmt</i> in pET-21d (Novagen), c) <i>sn-trI</i> in pQE-30 (Qiagen), d) <i>sd-trII</i> in pQE-30 (Qiagen) | 108 |
| Abb. G- 2: <i>sdtrII</i> cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz, | 109 |
| Abb. G- 3: Putative <i>sdtrI</i> cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz | 109 |
| Abb. G- 4: <i>sntrI</i> -cDNA aus <i>S. nigrum</i> mit korrespondierender Aminosäuresequenz, | 110 |
| Abb. G- 5: Putative <i>sntrI</i> cDNA aus <i>S. nigrum</i> mit korrespondierender Aminosäuresequenz, | 110 |
| Abb. G- 6: <i>sd-pmt</i> cDNA aus <i>S. dulcamara</i> mit korrespondierender Aminosäuresequenz, | 111 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tab. A- 1: Glycosidasehemmwirkung der Calystegine; kH=keine Hemmwirkung..... | 2 |
| Tab. B- 1: Verwendete Enzyme und Kits..... | 14 |
| Tab. B- 2: Primer..... | 15 |
| Tab. B- 3: Verwendete PCR-Bedingungent. | 25 |
| Tab. C- 1: Calysteginvorkommen in den <i>Solanum</i> -Arten | 36 |
| Tab. C- 2: Reaktionsprodukte des Inkubationsassays auf Tropinonreduktase-Aktivität..... | 41 |
| Tab. C- 3: Intermediatgehalt in Pflanzen und Wurzelkulturen von <i>S. dulcamara</i> | 43 |
| Tab. C- 4: Identitäten der Aminosäuresequenzen bekannter Tropinonreduktasen in % | 44 |
| Tab. C- 5: Km- und Vmax-Werte der C- <i>Sd</i> -TRII und N- <i>Sd</i> -TRII mit verschiedenen Substraten. | 49 |
| Tab. C- 6: Km-Werte der N- <i>Sd</i> -TRII bei verschiedenen pH-Werten..... | 50 |
| Tab. C- 7: Theoretisch berechnete Bewertungsparameter und experimentell bestimmte Substrat-Affinitäten der N- <i>Sd</i> -TRII | 53 |
| Tab. C- 8: Fitnesswerte, Substanznamen, Registriernummern und Molekulargewichte der 27 getesteten Substanzen | 55 |
| Tab. C- 9: Übersicht der TRI-Sequenzen aus <i>S. nigrum</i> und <i>S. dulcamara</i> | 61 |
| Tab. C- 10: Identitäten der Aminosäuresequenzen bekannter Tropinonreduktasen in % | 62 |
| Tab. C- 11: Identitäten der Aminosäuresequenzen bekannter Putrescin- <i>N</i> -methyltransferasen in % | 65 |
| Tab. C- 12: Km und Vmax Werte bestimmt mit colorimetrischem Enzymassay | 68 |
| Tab. G- 1: Calystegingehalte in den <i>Solanum</i> -Arten <i>S. muricatum</i> und <i>S. dulcamara</i> , <i>S. nigrum</i> , <i>S. sisymbriifolium</i> , <i>S. rantonnettii</i> , <i>S. nodiflorum</i> und <i>S. mitlense</i> | 104 |
| Tab. G- 2: Intermediatgehalte in den <i>Solanum</i> -Arten <i>S. muricatum</i> und <i>S. dulcamara</i> , <i>S. nigrum</i> , <i>S. sisymbriifolium</i> , <i>S. rantonnettii</i> , <i>S. nodiflorum</i> und <i>S. mitlense</i> | 105 |
| Tab. G- 3: Aktivität und Alkaloidgehalte der <i>S. dulcamara</i> Wurzelkultur..... | 106 |
| Tab. G- 4: a) pH-Optimum, b) Molare katalytische Aktivität in Kkat der <i>Sd</i> -TRII, c) Relative Aktivitäten nach Zusatz der 27 Substanzen in verschiedenen Konzentrationen..... | 106 |
| Tab. G- 5: Tropinonreduktase-Aktivität bestimmt aus <i>S. nigrum</i> | 107 |
| Tab. G- 6: Werte der Bestimmung der Km-Werte für verschiedene Substratanaloga mit C- <i>Sd</i> -TRII und N- <i>Sd</i> -TRII | 107 |
| Tab. G- 7: Substanzen nach Ligandensuche in der Naturstoffdatenbank, B = Registriernummer, aus Beilsteindatenbank, Summenformel und Molekulargewicht sind abgebildet..... | 112 |
| Tab. G- 8: Substanzen nach Ligandensuche in der MOE-Datenbank..... | 126 |

Publikationen und wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

- Bartholomeusz, T. A., Bhogal, R. K., Molinie, R., Felpin, F. X., Mathe-Allainmat, M., Meier, A. C., Dräger, B., Lebreton, J., Roscher, A., Robins, R. J., and Mesnard, F. 2005. Nicotine demethylation in *Nicotiana* cell suspension cultures: *N*'-formylnornicotine is not involved. *Phytochemistry* **66**, 2432-2440.
- Robins, R. J., Molinié, R., Kwiecień, R. A., Paneth, P., Lebreton, J., Bartholomeusz, T. A., Roscher, A., Dräger, B., Meier, A.-C., and Mesnard, F. 2007. Progress in understanding the *N*-demethylation of alkaloids by exploiting isotopic techniques. *Physiological Reviews* **6**, 51-63.
- Teuber, M., E.Azemi, M., Namjoyan, F., Meier, A.-C., Wodak, A., Brandt, W., and Dräger, B. 2007. Putrescine *N*-methyltransferases-a structure-function analysis. *Plant Molecular Biology* **63**, 787-801.
- Freydank, A.-C., Brandt, W., and Dräger, B. 2008. Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins: structure, function, bioinformatics* DOI: 10.1002/prot.21905.
- Freydank, A.-C., Brandt, W., and Dräger, B., in Vorbereitung, *In silico* screening and *in vitro* evaluation of ligands for tropinone reductase, a short-chain dehydrogenase

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen (Poster, Vortrag)

- Meier, A.-C.; Dräger, B. 2004. Tropinone reduction in *Solanum nigrum* L., *Deutsche Botanikertagung*, (Braunschweig) - Poster
- Bartholomeusz, T. A.; Molinié, R.; Roscher, A.; Meier, A.-C.; Lebreton, J.; Sonnet, P.; Dräger, B.; Robins, R. J.; Mesnard, F. 2006. A study of tropane alkaloid metabolism in *Solanum dulcamara* and *Pseudomonas* AT3-*Young Scientists Conference*, "Future Trends in Phytochemistry" (Olomouc) - Poster
- Meier, A.-C.; Bartholomeusz, T. A.; Roland Molinié, R.; Mesnard, F.; Brandt, W.; Dräger, B. 2006. Charakterisierung und Modellierung eines pseudotropinbildenden Enzyms aus *Solanum dulcamara* und metabolische Untersuchung des entstandenen Pseudotropins, *Deutsche Botanische Gesellschaft, Treffen der Sektion „Pflanzliche Naturstoffe“* (Kaub am Rhein) - Vortrag

A Einleitung

A 1 Calystegine

A 1.1 Struktur und Wirkung der Calystegine

Calystegine sind nicht veresterte Nortropanalkaloide, die durch 3 bis 5 Hydroxylgruppen am 8-Azabicyclo[3.2.1]octan-Grundgerüst gekennzeichnet sind (Abb. A- 1). Sie werden nach dem Hydroxylierungsgrad in die Gruppe der A-Calystegine (3 Hydroxylgruppen), B-Calystegine (4 Hydroxylgruppen) und C-Calystegine (5 Hydroxylgruppen) eingeordnet. Die Hydroxylgruppe in Position 1 bildet mit dem Brückenstickstoff eine Aminoketalfunktion. Ohne diese brückenständige Hydroxylgruppe werden hydroxylierte Nortropanalkaloide nicht als Calystegine bezeichnet. Insgesamt sind 14 verschiedene und zwei glycosilierte Calystegine bekannt [Asano et al., 1997b; Biastoff und Dräger, 2007]. Alle Calystegine und Dihydroxy- bzw. Trihydroxynortropanalkaloide sind wasserlöslich mit einem Octanol-Wasser Koeffizienten unter 0.

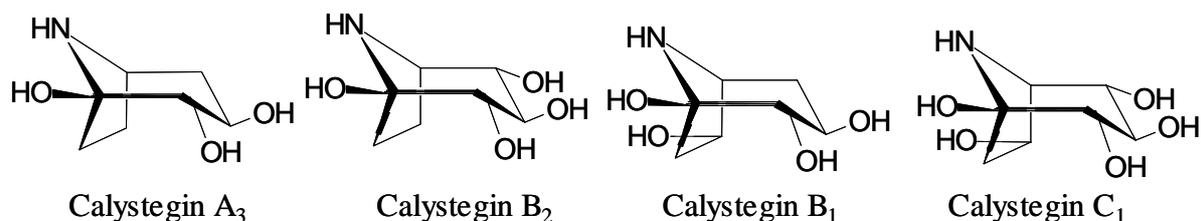


Abb. A- 1: Strukturformel der Calystegine

Calystegine wurden erstmals 1988 aus *Calystegia sepium* isoliert und erhielten so ihren Namen [Tepfer et al., 1988]. Die hydroxylierten Strukturen erinnern an andere Alkaloide mit Glycosidase-hemmenden Eigenschaften, wie Castanospermin, Swainsonin, Nojirimycin oder 1-Desoxynojirimycin. In lebenden Organismen katalysieren Glycosidasen lebenswichtige Reaktionen und kommen z.B. in der Biosynthese von Glycoproteinen, Glycolipiden, der Verdauung von Polysacchariden und als lysosomale Enzyme vor [Watson et al., 2001]. Eine Hemmung von α -Galactosidasen und β -Glucosidasen durch Calystegine der A- und B-Gruppe wurde gezeigt [Molyneux et al., 1993]. Calystegine hemmen die verschiedenen Glycosidasen (Tab. A-1) in der Regel kompetitiv [Asano et al., 1995; Molyneux et al., 1993]. Dabei ist die Inhibitorwirkung der Calystegine der A-Gruppe geringer als die der B-Gruppe. Calystegin B₂ fungiert als starker Inhibitor pflanzlicher α -Galactosidasen und β -Glucosidasen, inhibiert menschliche lysosomale Leberenzyme aber nur gering (Tab. A- 1) [Asano et al., 1997a]. Im Gegensatz dazu kann Calystegin B₁ keine α -Galactosidasen hemmen [Asano et al., 1995]. Mannosidasen werden, mit Ausnahme von Calystegin C₂ aus *D. leichhardtii*, von Calysteginen nicht gehemmt [Molyneux et al., 1993; Asano et al., 1995; Kato et al., 1997].

Tab. A- 1: Glycosidasehemmwirkung der Calystegine; kH=keine Hemmwirkung

| Enzym | Quelle | IC ₅₀ -Werte in µmol | | | |
|-----------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | Cal A ₃ | Cal B ₂ | Cal B ₁ | Cal C ₁ |
| β-Glucosidase | Mandel | 26 | 2,6 | 4 | 0,82 |
| α-Galactosidase | Kaffeebohnen | 160 | 1,9 | kH | 360 |
| α-Galactosidase | Aspergillus niger | 180 | 3,9 | kH | 440 |
| α-Galactosidase | Leber (Mensch) | 410 | 140 | kH | kH |
| β-Galactosidase | Leber (Rind) | 270 | 240 | 9,8 | 16 |
| β-Galactosidase | Darm (Ratte) | 110 | 7,8 | 2,6 | 0,38 |
| β-Glucosidase | Leber (Mensch) | kH | kH | 50 | 3 |
| Trehalase | Niere (Schwein) | 13 | 10 | kH | 270 |

Asano et al., 1995, 1997a

Die Eigenschaften der Calystegine hängen von deren Hydroxylierungsmuster ab. Eine effektive Hemmung ist an die Brückenkopfhydroxylgruppe gekoppelt [Garcia-Moreno et al., 2001]. Die Glycosilierung führt zur Abnahme des Hemmeffektes [Asano et al., 1997c].

Ein therapeutischer Einsatz von Glycosidaseinhibitoren, Calysteginen oder Calystegin-Analoga ist als Immunstimulans, Virusstatikum oder bei der Behandlung von Diabetes mellitus denkbar [Asano et al., 2000a]. Miglitol (*N*-(2-Hydroxyethyl)-1-deoxynojirimycin) (Diastabol[®]), entwickelt auf der Grundlage von Deoxynojirimycin [Ahr et al., 1997] und Acarbose (Glucobay[®]) als Pseudotetrasaccharid werden in der Behandlung von Diabetes mellitus eingesetzt. Sie verhindern durch α-Glucosidasehemmung den Blutglucoseanstieg nach der Nahrungsaufnahme [Asano et al., 2001a]. Eine Anwendung von Calysteginen für lysosomale Speicherkrankheiten wie Morbus Gaucher und Morbus Fabry wurde diskutiert [Asano 2003]. In Morbus-Fabry-Lymphoblasten kann 1-Deoxygalactonojirimycin, ein starker Inhibitor der lysosomalen α-Galactosidase A, als chemisches Chaperon die Aktivität der mutierten α-Galactosidase A erhöhen [Asano et al., 2000b]. Spätere Untersuchungen zeigten eine Aktivitätszunahme der mutierten Glucocerebrosidase (N370S) in Morbus-Gaucher-Fibroblasten nach Inkubation mit Calystegin A₃, B₁, B₂, C₁ und weiteren Inhibitoren [Chang et al., 2006]. Diese Ergebnisse bekräftigen die Theorie, dass Calystegine als niedermolekulare Chaperone des aktiven Zentrums dienen können [Ikeda et al., 2003]. Mit dem Derivat *N*-butyl-1-deoxynojirimycin (INN: Miglustat, ZavescaTM) als Inhibitor der Glucosyltransferase (EC 4.2.1.80), die Glucosylceramide bildet, steht eine neue Therapieform für Morbus Gaucher Typ I zur Verfügung [Cox et al., 2000, 2003; Platt et al., 1994].

Tiere zeigten nach dem Fressen verschiedener Solanaceen (*S. dimidiatum*, *S. kwebense*) neurologische Störungen. Die Pflanzen enthielten ein breites Spektrum an Calysteginen, wobei Calystegin B₂ vorherrschend war [Nash et al., 1993]. In vielen essbaren Früchten und Gemüsen konnten die Calystegine B₁, B₂ und C₁ detektiert werden. In Kartoffelkeimen wurden Calystegingehalte bis zu 1,2 mg/g FM nachgewiesen [Keiner et al., 2000]. Nach Gabe von Calystegin B₁, B₂, B₃ und C₁ an Ratten zeigten sich aber keine toxischen Effekte [Hueza et al., 2005]. Die Eignung des Tiermodells wird in diesem Zusammenhang von den Autoren kritisch diskutiert und Versuche an anderen Tierarten empfohlen.

A 1.2 Verbreitung der Calystegine

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten Calystegine nur in dikotylen Pflanzen und nicht in Mikroorganismen nachgewiesen werden. Sie wurden vor allem in solchen Pflanzen detektiert, die klassische Tropinester enthalten. Aber auch unterschiedliche Spezies der Convolvulaceen [Goldmann et al., 1990; Molyneux et al., 1993, 1995; Tepfer et al., 1988; Scholl et al., 2001; Schimming et al., 1998; 2005], Solanaceen [Keiner et al., 2000; Nash et al., 1993; Dräger et al., 1995; Molyneux et al., 1993; Tepfer et al., 1988; Asano et al., 1995; Bekkouche et al., 2001], Moraceen [Asano et al., 1994], Erythroxylaceen [Brock et al., 2005] und Brassicaceen [Brock et al., 2006] enthalten Calystegine. Calystegine treten fast ausschließlich als Gemische auf, in welchen Calystegin B₂ meist mengenmäßig überwiegt. Neben Calystegin A₃ und B₁ ist Calystegin B₂ am weitesten verbreitet [Dräger 2004]. Oft kommen Calystegine zusammen mit anderen Alkaloiden in der Pflanze vor. In vielen Arten der Solanaceen akkumulieren die Tropinester Hyoscyamin und Scopolamin gemeinsam mit Calysteginen [Dräger 2004]. Auch das parallele Auftreten mit Glycoalkaloiden [Friedman et al., 2003], Kokain [Brock et al., 2005] und Pyrrolizidinen [Jenett-Siems et al., 1993] wurde beschrieben. Über das Vorkommen der Calystegine innerhalb der Tropanalkaloid-produzierenden Pflanzenfamilien erstellten Griffin und Lin eine Übersicht [Griffin und Lin, 2000].

Aus 129 analysierten Arten der Convolvulaceen enthielten 62 Arten Calystegine [Schimming et al., 1998, 2005]. Die Solanaceen stehen in enger Verwandtschaft zu den Convolvulaceen. Mit 102 Gattungen und 2460 Arten sind die Solanaceen umfangreicher [Biastoff und Dräger, 2007]. Es existieren 6 Unterfamilien, wovon 5, darunter die Solanoideae, phytochemisch untersucht und die Informationen darüber zusammengefasst wurden [Hunziker 2001]. 9 Typen von Alkaloiden wurden detektiert. Darunter sind die Tropanalkaloide stark vertreten und in 5 Unterfamilien zu finden [Hunziker 2001]. Solanaceen sind in der Welt weit verbreitet, wobei die Gattungen *Lycium*, *Physalis* und *Solanum* kosmopolitisch vorkommen. Die Solanoide stellt die größte Unterfamilie mit 1925 Arten in 61 Gattungen dar [Hunziker 2001]. Die Gattung *Solanum* ist dabei mit 1250–1700 Arten vertreten [Olmstead und Palmer, 1997; Bohs und Olmstead, 1997]. Von den bekannten Arten wurden weniger als die Hälfte phytochemisch untersucht [Hunziker 2001]. Die Gattung *Solanum* besitzt 7 Untergattungen, wozu z.B. *Solanum* mit ca. 216 Arten (z.B. *S. nigrum*) und *Potatoe* mit ca. 282 Arten (z.B. *S. dulcamara*, *S. muricatum*) zählt. Darin sind annuelle Pflanzen (5-15 cm hoch) und oft hölzerne perennierende Pflanzen (1-10 m) zu finden. In Pflanzen der Gattung *Solanum* konnten nicht die typischen Tropanalkaloide wie Atropin, Hyoscyamin und Scopolamin, aber verschiedene Polyhydroxynortropanalkaloide detektiert werden [Griffin und Lin, 2000]. Die Calystegine A₃ und B₂ kommen gemeinsam in Blättern der *Solanum*-Arten *S. tuberosum*, *S. dulcamara*, *S. melongena* und in Herbarium-Pflanzen von *S. dimidatum* und *S. kwebense* vor [Griffin und Lin, 2000]. Calystegin B₂ und B₃ finden sich in Blättern von *S. sodomaeum* [Bekkouche et al., 2001]. Im Gegensatz zu den Convolvulaceen wurden die Solanaceen nicht systematisch nach Calysteginen erforscht. Nur vereinzelte medizinisch interessante Vertreter der Gattungen *Atropa* [Tepfer et al., 1988; Dräger et al., 1995], *Datura* [Nash et al., 1993], *Duboisia* [Kato et al., 1997], *Hyoscyamus* [Dräger et al., 1994, 1995; Asano et al., 1996b], *Mandragora* [Dräger et al., 1995], *Scopolia* [Asano et al., 1996a], *Nicandra* [Griffiths et al.,

1996], *Withania* [Bekkouche et al., 2001] und die aus der chinesischen Pharmakopoa bekannten *Physalis* [Asano et al., 1995] und *Lycium* [Asano et al., 1997c] wurden auf Calystegine untersucht. Weiterhin wurden in Pflanzen, die der menschlichen Ernährung dienen, wie *S. tuberosum*, *S. melongena* und *L. esculentum*, Calystegine nachgewiesen [Asano et al., 1997a, Keiner und Dräger, 2000]. In 13 Gattungen und 25 Arten der Solanaceen wurden Calystegine detektiert.

A 1.3 Physiologische Bedeutung der Calystegine

Die physiologische Bedeutung der Calystegine für den pflanzlichen Organismus ist bis heute nicht geklärt. Ein eindeutiger Zusammenhang der Calysteginakkumulation und der Pathogenabwehr oder des Pflanzenüberlebens konnte bisher nicht gezeigt werden. Versuche zur Verwundung von Kartoffelkeimen verursachten keine Erhöhung der Calysteginkonzentration [Keiner 2001]. Auch Fraßschäden an intakten *D. stramonium* Pflanzen zeigten keine Konzentrationserhöhung der Tropanalkaloide Scopolamin und Hyoscyamin [Shonle und Bergelson, 2000]. Eine Verwundung der Pflanze, wie sie durch Insektenfraß entsteht, verursacht erhöhte Jasmonatgehalte [Creelmann und Mullet, 1997]. Applikation von Methyljasmonat an Wurzelkulturen von *D. stramonium* [Zabetakis et al., 1999] und von *H. muticus* [Biondi et al., 2000] erhöhte die Hyoscyaminakkumulation. Aber nach Applikation von Methyljasmonat an *A. belladonna* Wurzelkulturen wurde kein Einfluss auf die Hyoscyamin- und Calysteginakkumulation festgestellt [Rothe et al., 2001]. Abscisinsäure, ein Vermittler der Pathogenabwehr [Pena-Cortes et al., 1995; Leung und Giraudat, 1998], zeigte keine direkte Auswirkung auf die Alkaloidakkumulation in *A. belladonna* [Rothe 2002]. Die Tropanalkaloidbiosynthese in *H. muticus* wurde allerdings vermindert [Vanhala et al., 1998].

Ein enger Zusammenhang zwischen calysteginmetabolisierenden Bakterien und calysteginproduzierenden Pflanzen wurde beschrieben und vermutet, dass Calystegine unter natürlichen Bedingungen als Nahrungsmediator fungieren [Goldmann et al., 1990; 1996]. Dabei können Calystegine als Stickstoff- und Kohlenhydratquelle für Bakterien dienen, die in der Rhizosphäre von calysteginhaltigen Pflanzen zu finden sind [Tepfer et al., 1988]. Von 44 getesteten Bakterienstämmen hatte nur *Rhizobium meliloti* 41 die Fähigkeit Calystegine zu katabolisieren. Dabei wurde Calystegin B₂ aber nicht das entsprechende *N*-Methylderivat umgesetzt [Goldmann et al., 1996; Tepfer et al., 1988]. *Rhizobium meliloti* kann Calystegine als einzige Kohlenstoff und Stickstoffquelle nutzen. In den Untersuchungen wurden vermehrt Bakterien, die ein Plasmid besitzen, welches die Katabolisierung von Calysteginen ermöglicht, in der Nähe von calysteginhaltigen Pflanzen gefunden [Goldmann et al., 1996; Guntli et al., 1999]. Eine Inhibierung der Keimung von *Medicago sativa* und ein reduziertes Wurzelwachstum der Haarwurzeln wurde unter dem Einfluss von Calystegin B₂ festgestellt [Goldmann et al., 1996]. Calystegine konnten weder das Wachstum endophytischer Pilze von *C. sepium* noch das Wachstum von für *C. sepium* pathologischen *Stagonospora* sp. hemmen. Infizierte Pflanzen zeigten keine erhöhten Calystegingehalte im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen. Allerdings wurde in der Studie eine Inhibierung der Invertase von *C. sepium*

durch Calystegin B₂ beobachtet. Dies könnte ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Calysteginen und dem Kohlenhydratstoffwechsel in Pflanzen sein [Höke und Dräger, 2004]. Ein verstärktes Angebot der Zucker Saccharose und Maltose erhöhte die Calysteginkonzentration in *A. belladonna* Wurzelkulturen, wohingegen die Hyoscyaminkonzentration sich nur wenig änderte [Rothe et al., 2001]. Eine Erhöhung der Saccharosekonzentration führte in Wurzelkulturen von *C. sepium* zur Steigerung der Calysteginmenge [Meier 2001]. In Wurzeln von transgenen Kartoffelpflanzen mit überexprimierter Invertase und mit supprimierter Saccharosesynthese konnten erhöhte Calysteginkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden [Richter et al., 2007]. Das Transkript der *st-trII* wurde in Kartoffelkeimen durch Trehalose und Raffinose induziert [Richter 2006]. In Wurzelkulturen von *Datura candida* x *Datura aurea* wurde eine gesteigerte Tropanalkaloidakkumulation in Abhängigkeit vom Glucoseangebot gezeigt [Nussbaumer et al., 1998]. Zuckern wird eine komplexe Bedeutung in Signalwegen zugeschrieben. Es wird ein Zusammenhang zwischen Stickstoffstoffwechsel und Zuckerangebot diskutiert [Sheen et al., 1999]. So sollen Zucker Gene für Nitrattransporter, Nitratreduktasen, Glutaminsynthasen und Asparaginsynthasen aktivieren [Jang und Sheen 1994; Koch 1996; Lam et al., 1998; Lejay et al., 1999; Sheen et al., 1999]. Hexokinasen können in der Signalübertragung eine wichtige Rolle spielen. So kann die Bindung von Glucose an Hexokinase eine Konformationsänderung des Enzyms verursachen, welche die Affinität zu ATP erhöht und so über nachfolgende Signalkaskaden metabolische Wege des Stoffwechsels beeinflusst [Sheen et al., 1999]. Eine Interaktion von Calysteginen, die zuckerähnliche Struktur besitzen, und pflanzlichen Hexokinasen sollte untersucht werden.

A 2 Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese

Den Beginn der Biosynthese bilden die Aminosäuren L-Arginin und L-Ornithin (Abb. A- 2). Je nach Organismus wird Putrescin durch Decarboxylierung von L-Ornithin mit der Ornithindecarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) und/oder durch Decarboxylierung von L-Arginin mit der Arginindecarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) über die Zwischenstufen Agmatin und *N*-Carbamoylputrescin gebildet. ODC Sequenzen sind z.B. aus den Solanaceen *N. tabacum* und *D. stramonium* bekannt [Imanishi et al., 1998; Michael et al., 1996]. ADC cDNA Sequenzen sind z.B. aus *Avena sativa* [Bell und Malmberg, 1990] und *Vitis vinifera* [Primikiris und Roubelakis-Angelakis, 1999] identifiziert. Aus *L. esculentum* wurden cDNA Sequenzen der ODC und ADC isoliert [Alabadi und Carbonell, 1998; Rastogi et al., 1993]. Für die Pflanze sind Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin wichtig für Wachstum, Entwicklung und Anpassung an Umweltstressfaktoren [Bouchereau et al., 1999; Kasukabe et al., 2004]. Putrescin fungiert als Metabolit in Primär- und Sekundärstoffwechsel. Aus Putrescin können die Polyamine Spermidin durch die Spermidinsynthese (SPDS, EC 2.5.1.16) und *N*-Methylputrescin durch die Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53) gebildet werden [Hibi et al., 1992]. Spermidinsynthese wurde z.B. aus *H. niger*, *N. sylvestris* und *S. tuberosum* isoliert [Hashimoto et al., 1998; Stenzel et al., 2006]. Spermin wird durch die Sperminsynthese (SPS, EC 2.5.1.22) aus Spermidin synthetisiert. Die PMT als erstes spezifisches Enzym der Tropanalkaloidbiosynthese konnte aus *N. tabacum* [Hibi et al., 1994],

A. belladonna, *H. niger* [Suzuki et al., 1999a], *S. tuberosum* [Stenzel et al., 2006] und weiteren Spezies [Teuber et al., 2007] isoliert werden. *N*-Methylputrescin wird durch oxidative Desaminierung der *N*-Methylputrescinoxidase (MPO, EC 1.4.3.6) zu Methylaminobutanal. Dieses zyklisiert zum *N*-Methylpyrrolinium-Kation und reagiert mit Acetoacetyl-CoA zu 4-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoat. Daraus entsteht durch anschließende Zyklisierung und Decarboxylierung Tropinon [Robins et al., 1997].

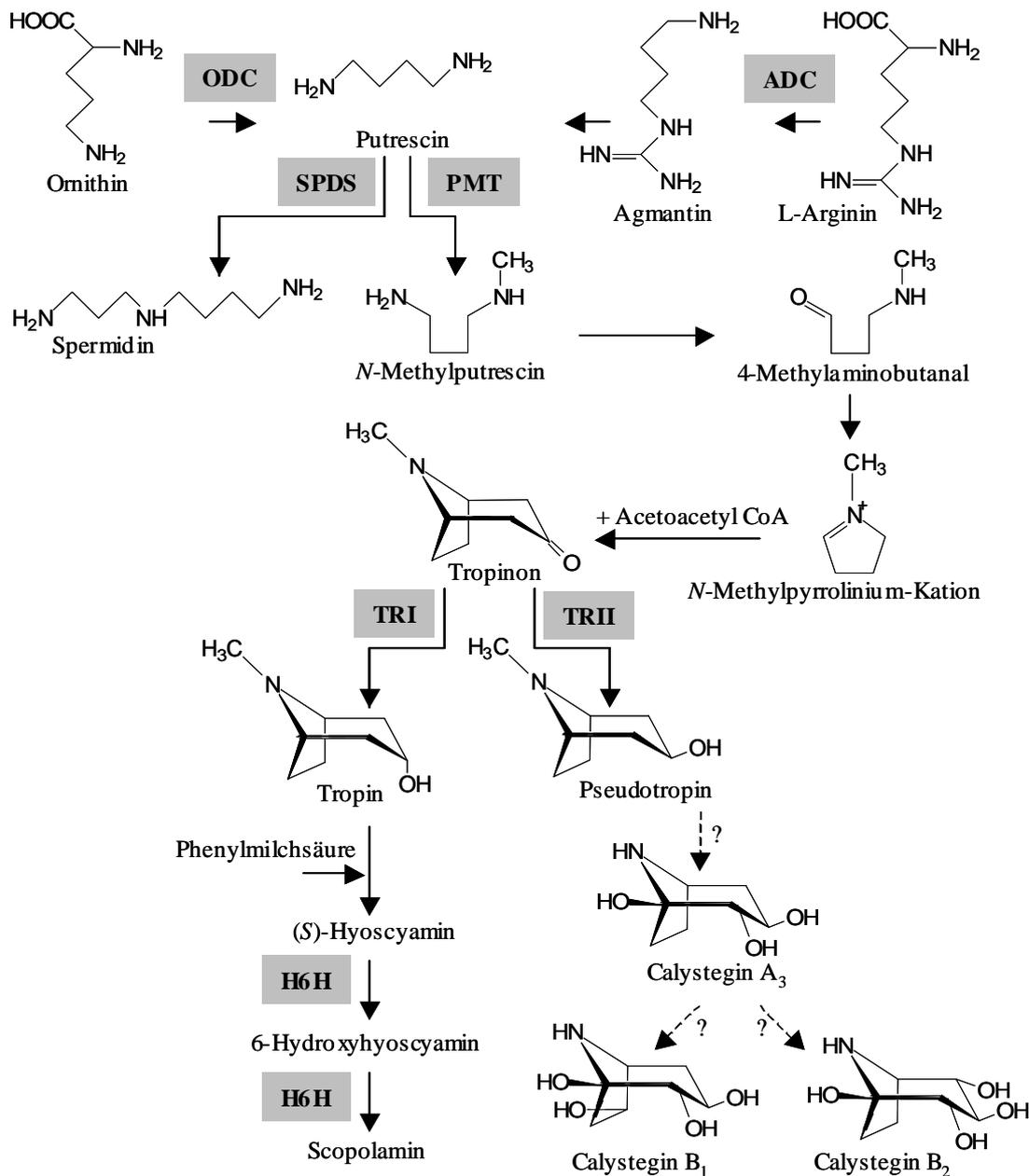


Abb. A- 2: Calystegin- und Tropanalkaloidbiosynthese;

ODC: Ornithindecarboxylase, ADC: Arginindecarboxylase, PMT: Putrescin-*N*-methyltransferase, SPDS: Spermidinsynthase, TRI: Tropinonreduktase I, TRII: Tropinonreduktase II, H6H: Hyoscyamin-6 β -hydroxylase

Tropinon stellt den Verzweigungspunkt der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese dar. Es kann mit dem Cosubstrat NADPH durch die Tropinonreduktase I (TRI; EC 1.1.1.206) zu 3 α -Hydroxytropan (Tropin) und durch die Tropinonreduktase II (TRII; EC 1.1.1.236) zu 3 β -Hydroxytropan (Pseudotropin) reduziert werden. Die Tropinonreduktasen sind NADPH-abhängige kurzkettige Dehydrogenasen (SDR) [Nakajima et al., 1994; Oppermann et al., 2003 ; Dräger 2006] und wurden erstmals als TRI aus *D. stramonium* [Koelen und Gross, 1982] und als TRII aus *H. niger* [Dräger et al., 1988] extrahiert. Die Enzymklasse der SDR besitzt charakteristische Sequenzmotive [Jörnvall et al., 1995]. Die TRI und TRII wurden nachfolgend aus *D. innoxia* [Couladis et al., 1991], *H. niger* [Hashimoto et al., 1992], *A. belladonna* [Dräger und Schaal, 1994] und *D. stramonium* [Portsteffen et al., 1994] gereinigt und die cDNA Sequenzen aus *D. stramonium* [Nakajima et al., 1993b], *H. niger* [Nakajima et al., 1993a, 1999b] und *S. tuberosum* [Keiner et al., 2002; Kaiser et al., 2006] isoliert. Mit Proteinkristallisation der TRI und TRII aus *D. stramonium* wurde die Proteinstruktur aufgeklärt [Nakajima et al., 1998]. Durch stereo- und substratspezifische Untersuchungen und verschiedene Mutationen der TR-Enzyme wurde der C-terminale Proteinteil der Substratbindungsstelle und der N-terminale Proteinteil der Cosubstratbindungsstelle zugewiesen [Nakajima et al., 1994; 1998; 1999a].

Die Ausbildung der Cosubstratbindungsstelle ordnen die Tropinonreduktasen zur NADPH akzeptierenden Klasse der SDR-Familie zu. Für den katalytischen Mechanismus ist eine katalytische Tetrade der Aminosäuren Asn-Ser-Tyr-Lys beschrieben [Filling et al., 2002]. Asn ist wichtig, um die Position von Lys zu stabilisieren und eine Protonenübertragung zu gewährleisten [Filling et al., 2002]. Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass Tyr als katalytische Basis fungiert, Ser das Substrat stabilisiert und Lys eine Wasserstoffbrücke zur Nicotinamidribose aufbaut. Dies erniedrigt den pKa Wert von Tyr-OH und ermöglicht einen Protonentransfer [Jörnvall et al., 1995]. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins dient, stabilisiert durch Lysin, als nucleophiler Katalysator bei der Übertragung eines Hydridions auf die Ketogruppe des Substrates [McKinley-McKee et al., 1991].

Tropin bildet die Vorstufe der klassischen Tropinester. Aus Pseudotropin entstehen über bisher unbekannte Zwischenstufen die Calystegine [Scholl et al., 2001; 2003]. Eine Demethylierung des Pseudotropins ist durch den Nachweis von Norpseudotropin in *C. sepium* wahrscheinlich [Sichhart 2003]. Das Vorkommen von Dihydroxynortropanen [Asano et al., 2001b] lässt eine schrittweise Hydroxylierung der Calystegine vermuten. Calystegine der A-Gruppe bilden wahrscheinlich die Vorstufe zur Bildung der Calystegine der B-Gruppe [Scholl et al., 2003].

A 2.1 Regulation und Beeinflussung der Biosynthese

Ein detailliertes Wissen von der Biosynthese pflanzlicher Sekundärstoffe ist von Interesse für die genetische Manipulation der Alkaloidproduktion [Millgate et al., 2004; Hashimoto et al., 2003; Oksmann-Caldentey und Inze, 2004]. Enzyme, die den metabolischen Fluss in der Alkaloidbiosynthese lenken und begrenzen, werden durch ihre kinetischen Eigenschaften wie Substratspezifität, Affinität und Umsatzgeschwindigkeit identifiziert. Über die regulativen Mechanismen der Biosynthesewege ist bisher wenig bekannt [Facchini 2001]. Es wird

vermutet, dass Alkaloidbiosynthesen an spezielle Pflanzenorgane und bestimmte Entwicklungsstadien gekoppelt sind und durch spezifische Genexpression kontrolliert werden [De-Luca und St Pierre, 2000]. Dabei können die Zwischenprodukte oder die Alkaloide in den Zellen akkumulieren und durch Transportprozesse in andere Organe oder Zellen gelangen [De-Luca und Laflamme, 2001; Facchini und St. Pierre, 2005].

Die Tropanalkaloide werden hauptsächlich in der Wurzel gebildet und über das Xylem in die oberirdischen Organe transportiert [Wink und Roberts, 1998; De-Luca und St Pierre, 2000]. Von einigen Enzymen der Tropanalkaloidbiosynthese konnten die cDNA-Sequenzen und Gene isoliert werden (A 2). Dies bildet die Grundlage für Lokalisationsstudien von Transkripten und korrespondierenden Proteinen in Pflanzen und Wurzelkulturen zur Aufklärung der Regulation der Alkaloidbiosynthese. In *A. belladonna* ist die Expression der PMT und H6H im Wurzelperizykel lokalisiert [Suzuki et al., 1999a, 1999b]. Die TRI in *H. niger* ist in der äußeren Rinde, sowie in der Wurzelendodermis zu finden. Die TRII ist im Perizykel, in der Endodermis und der inneren Rinde von *H. niger* lokalisiert [Nakajima et al., 1999b]. Dies macht einen Transport der Synthesemetabolite durch verschiedene Zellschichten notwendig. Als ein Regulationspunkt der Biosynthese wurde die PMT untersucht. Eine Überexpression der PMT sollte die Tropanalkaloid- bzw. Nicotinproduktion erhöhen [Sato et al., 2001; Rothe et al., 2003; Moyano et al., 2002; 2003]. Die Ergebnisse waren nicht einheitlich. So führte eine Überexpression der PMT in *A. belladonna* nicht zu erhöhten Tropanalkaloidgehalten [Rothe et al., 2003], aber in *N. sylvestris* bis zu 40 % mehr Nicotin in den Blättern [Sato et al., 2001]. Durch eine simultane Überexpression von PMT und H6H in Wurzelkulturen von *H. niger* wurde Scopolamin bis zu neunfach erhöht [Zhang et al., 2004]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der Biosynthese nicht an einer Pflanzenart untersucht und dann verallgemeinert werden kann. Als weiterer Regulationspunkt wurden die Tropinonreduktasen untersucht. Die Überexpression der TRI in *A. belladonna* Wurzelkulturen führte bis zu fünffachem Scopolamin- und bis zu dreifachem Hyoscyamingehalt. Um die Regulation der Calysteginbiosynthese durch die TRII zu analysieren, wurde die TRII in *A. belladonna* überexprimiert und die Calysteginakkumulation untersucht. Die erreichte Überexpression der TRII war wenig effektiv und führte nicht zu erhöhten Calysteginmengen [Richter et al., 2005].

Neben Überexpression von Enzymen kann die Regulation der Biosynthese auch durch Elicitoren oder Enzyminhibitoren in der Pflanze verfolgt werden. Zur Manipulation des Tropanalkaloidstoffwechsels wurden beispielsweise spezifische Enzyminhibitoren verwendet. Die Decarboxylaseinhibitoren DL- α -Difluoromethylarginin (DFMA) und DL- α -Difluoromethylornitin (DFMO) wurden zur spezifischen Hemmung der ADC und ODC eingesetzt [Robins et al., 1991b; Walton et al., 1990]. DFMA in *D. stramonium* Wurzelkulturen führte zur Verringerung der Putrescin- und *N*-Methylputrescingehalte [Robins et al., 1991b] sowie der Hyoscyaminkonzentration [Walton et al., 1990]. Eine Hemmung der ODC zeigte diese Effekte nicht. Dies weist darauf hin, dass der Biosyntheseweg in *D. stramonium* über die ADC bevorzugt wird. Nach Zufuhr von Tropinon an *D. stramonium* Wurzelkulturen akkumulierte viel Tropin und Pseudotropin. Das belegt eine hohe Tropinonreduktase-Aktivität. Der Zusatz von Tropin an *D. stramonium* Wurzelkulturen erniedrigte die Enzymaktivitäten der ODC, ADC, PMT und MPO [Robins et al., 1991a]. Der

Gehalt an freiem Tropin scheint den Fluss der Metabolite in und durch den Biosyntheseweg zu beeinflussen. Die Veresterung des Tropins wird als geschwindigkeitsbestimmend für die Bildung von Hyoscyamin angesehen [Robins et al., 1991a].

Die Regulation der Calystegine ist weitgehend unbekannt. Die Verteilung des Tropinons in den TRI bzw. TRII Weg der Tropanalkaloidbiosynthese scheint durch die Aktivität der Tropinonreduktasen beeinflusst zu sein [Dräger 2006]. Erste Hinweise wurden durch den Einsatz des schwefelhaltigen Substratanalogons TBON an *D. stramonium* Wurzelkulturen erhalten. TBON wird nur von der TRI als Substrat akzeptiert und wirkt in Konkurrenz mit Tropinon inhibitorisch auf die TRI. TBON führte in *D. stramonium* Wurzelkulturen zur vermehrten Bildung von Pseudotropin und zu verringerten Konzentrationen an Tropin, Acetyltropin und Hyoscyamin [Parr et al., 1991]. Die Reduktionsprodukte α -TBOL und β -TBOL wirken ebenfalls als starke Inhibitoren der TRI [Dräger et al., 1992]. Die Zufuhr von 1 bis 2 mM TBON oder β -TBOL zu Wurzelkulturen von *D. stramonium* veränderte das Verhältnis der TRII zu den TRI Produkten von 0,04 zu 0,31. In Kombination mit 2,5 mM Tropinon verstärkte sich dieser Effekt und führte bis zur zweifachen Menge an TRII Produkten. Nach 10tägiger TBON Applikation an Wurzelkulturen von *A. belladonna* verringerte sich die Hyoscyaminkonzentration und die Calystegin A₃-Konzentration war doppelt so hoch gegenüber der Kontrolle [Dräger et al., 1994; Dräger 2004].

A 3 Modellierung von Proteinen

Die Molekulare Modellierung trägt zum Verständnis für dreidimensionale Strukturen und ablaufende enzymatische Reaktionen bei. Unter dem Begriff Molecular Modelling versteht man die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von realistischen dreidimensionalen Molekülstrukturen und deren physikochemischen Eigenschaften [Böhm et al., 1996]. Die Kombination von theoretischen Vorhersagen und experimentellen Untersuchungen bietet die Möglichkeit, Experimente effektiver bzw. gezielter zu planen und durchzuführen. So können Veränderungen und Mutationen an Proteinen theoretisch am Modell vorhergesagt und anschließend experimentell überprüft werden.

In Proteindatenbanken (Swissprot: ca. 356000; TrEMBL: ca. 5,4 Mio) sind mehr Proteinsequenzen als Kristallstrukturen (PDB: ca. 45.000) eingetragen. Um Tertiär-Proteinstrukturen aus einer Aminosäuresequenz vorherzusagen, stellt das Molecular Modelling von Proteinen eine wichtige Methode dar. Während der Modellierung werden Sequenzvergleiche von Proteinen und Simulationen der Proteinfaltung erstellt. Zu Beginn einer Modellierung sollte die Kristallstruktur eines Proteins vorliegen, das mindestens 30 % Sequenzhomologie zum Zielprotein aufweist. Grundlage der homologen Modellierung ist die Annahme, dass Proteine mit ähnlichen Aminosäuresequenzen auch ähnliche dreidimensionale Strukturen aufweisen. Ein Strukturmodell wird aufgebaut durch ein Startmodell, das von der Vorlage eines kristallinen Proteins ausgeht. Anschließend wird das Modell analysiert und optimiert. Dabei kann die Qualität und das Faltungsmuster beurteilt werden. Es werden experimentell vorhandene Strukturen als Grundlage für den Modellbau verwendet, um realitätsbezogene Bedingungen zu schaffen.

Neben 3D-Proteinstrukturen können auch Bindungsstudien zwischen Ligand und Rezeptor erstellt werden. Neue Liganden können *in silico* gesucht werden. In der Ligandensuche werden Substanzen ausfindig gemacht, deren Molekülteile mit funktionellen Gruppen der Aminosäuren der Substrat- oder Cosubstratbindungsstelle des Rezeptors potentiell in Wechselwirkung treten können. Die Struktur der Bindungstasche legt fest, welche funktionellen Gruppen des niedermolekularen Liganden für eine Bindung bzw. Wechselwirkung erforderlich sind. Die Anordnung der funktionellen Gruppen wird als Pharmakophor bezeichnet. Bei einem Pharmakophor werden definierte sterische und chemische Funktionalitäten von Liganden eines Rezeptors abstrahiert. Dabei wird die räumliche Anordnung und Lage der Funktionalitäten zueinander bestimmt und festgelegt. Diese festgelegte Struktur kann für eine Suche nach Substanzen mit ähnlicher pharmakophorer Struktur eingesetzt werden. Zur Suche in Datenbanken nach einer entsprechenden pharmakophoren Struktur wird die festgelegte räumliche Struktur des Ausgangsliganden mit der räumlichen Anordnung der Funktionalitäten der in der Datenbank enthaltenen Verbindungen verglichen. Verbindungen, die ähnliche spezifische geometrische Funktionalitäten aufweisen, werden vom Programm erkannt und angezeigt. Dafür werden aus der 3D-Struktur der zu suchenden Verbindung verschiedene energetisch stabile Konformere erstellt und die geometrischen Verhältnisse, wie Distanzen und Winkel zwischen den funktionellen Gruppen berechnet und mit denen des Pharmakophors abgeglichen. Es kann eine Vorauswahl von potentiellen Liganden aus der Datenbank getroffen werden. Die erhaltenen Strukturen können für *in silico* Berechnungen bzw. für *in vitro* Tests verwendet werden. Von den Protein-Ligand-Wechselwirkungen können Bindungskonstanten und Wechselwirkungsenergien berechnet werden.

Mit Dockingstudien der Liganden kann die sterische und elektrostatische Passform, sowie gegebenenfalls die Ausbildung eines Wasserstoffbrückenbindungsmusters der Ligand-Rezeptor-Bindung beurteilt werden und auf die Substrat- und Produktspezifität hinweisen. Es können Vorhersagen von Ligand-Protein-Interaktionen getroffen werden. Zur Wirkstoffentwicklung und für die Suche nach neuen Liganden kann die Suche in 3D-Strukturdatenbanken sowie das strukturbasierte Liganden-Design oder De-novo-Design hilfreich sein.

A 4 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Tropanalkaloidbiosynthese an sieben Vertretern der Gattung *Solanum*. Die stereospezifische Reduktion des Tropinons ist die Vorstufe für die Bildung der klassischen Tropinester (Scopolamin, Hyoscyamin) und der Calystegine (Nortropanalkaloide).

Über die physiologische Bedeutung der Calystegine für die Pflanze ist bisher wenig bekannt. Für Hypothesen sind Informationen über die Organverteilung und das entwicklungsabhängige Vorkommen der Calystegine wichtig. Dazu sollte der Tropanalkaloid- und Calystegingehalt gewebespezifisch in den Pflanzen bestimmt werden.

Welche Eigenschaften besitzen in diesem Zusammenhang klonierte Tropinonreduktasen? Von ausgewählten Vertretern sollten dazu die Tropinonreduktasen kloniert und biochemisch charakterisiert werden.

Eine gezielte Unterdrückung der Calysteginbiosynthese durch spezifische Inhibitoren der TRII sollte versucht werden. Ziel war es, geeignete inhibitorische Substanzen mit einem erstellten 3D-Modell der TRII und *in silico* Suche in entsprechenden Datenbanken zu finden.

Die Schritte der Calysteginbiosynthese ausgehend von Pseudotropin bis zu den Calysteginen sind bisher noch nicht bekannt. Es sollte mit Einsatz von markiertem [¹³C-*methyl*]-Pseudotropin versucht werden, Zwischenstufen der Biosynthese aufzuklären.

B Materialien und Methoden

B 1 Materialien

B 1.1 Pflanzenmaterial und Wurzelkulturen

Das Pflanzenmaterial der *Solanum*-Arten *S. muricatum* L'Hérit. ex Ait., *S. nodiflorum* Jacq., *S. sisymbriifolium* Lam., *S. rantonnettii* Carr. ex Lescuy. und *S. mitlense* Dun. stammte aus dem Botanischen Garten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU). *S. dulcamara* L. Pflanzen- und Samenmaterial wurde im Innenhof des Institutes für Agrar- und Ernährungswissenschaften der MLU, Ludwig-Wucherer-Straße Nr. 2 in Halle gesammelt. Geerntet wurde im September. *S. nigrum* L. em. Mill. wurde im Kalthaus auf dem Gelände des Institutes für Agrar- und Ernährungswissenschaften in Mitscherlich-Gefäßen kultiviert. Das Samenmaterial für *S. nigrum* wurde freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ian T. Baldwin (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena) zur Verfügung gestellt. Sterile Pflanzen und Wurzelkulturen wurden aus Samen von *S. dulcamara* und *S. nigrum* angezogen. Dazu wurden die Samen 3 x 5 min in konzentrierter Natriumhypochlorit-Lösung und anschließend 5 min in sterilem Wasser geschüttelt. Zum Keimen wurden die Samen auf sterilen Agar (1 % in Wasser) ausgelegt und in verschlossenen Petrischalen im Dunkeln kultiviert. Nach der Keimung wurden die Keimlinge auf festes MS-Nährmedium (1,5 % Agar) umgesetzt [Murashige und Skoog, 1962] und unter Langzeitbedingungen (16 h hell, 8 h dunkel) bei 22 °C kultiviert. Zum Anlegen einer Wurzelkultur wurden Wurzeln der sterilen Keimlinge abgeschnitten, in 70 ml hormonfreies Gamborg's B5 Flüssignährmedium [Gamborg et al., 1968] mit 3 % Saccharose überführt und in 300 ml Erlenmeyerkolben unter sterilen Bedingungen im Dunkeln auf einem Rundschüttler mit 100 rpm kultiviert. Zur Rekultivierung wurden alle 35 Tage ca. 20 mg Wurzelmaterial in frisches Nährmedium überführt. Antibiotikum wurde nicht zugesetzt.

B 1.2 Bakterien

Die *Escherichia coli* Bakterienstämme wurden in TB- oder LB-Flüssigmedium [Sambrock et al., 1989] mit einer Ampicillinkonzentration von 100 mg/l bei 37 °C im Schüttelbrutschrank bei 150-240 rpm kultiviert. Bakterien wurden auf festem LB-Medium (15 g/l Agar) ausgestrichen, dem nach dem Autoklavieren 100 mg/l Ampicillin zugesetzt worden war und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

Bakterienstämme (*Escherichia coli*):

| | |
|--------------------------|---|
| XL1-Blue Competent Cells | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)], (Stratagene) |
| Top10 One Shot® | F-, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>araleu</i>) 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , (Str ^R), (Invitrogen) |
| M15 [pREP4] | <i>Nal^S</i> , <i>Str^S</i> , <i>Rif^S</i> , <i>Thi⁻</i> , <i>Lac⁻</i> , <i>Ara⁺</i> , <i>Gal⁺</i> , <i>Mtl⁻</i> , <i>F⁻</i> , <i>RecA⁺</i> , <i>Uvr⁺</i> , <i>Lon⁺</i> , (Qiagen) |
| SG13009 [pREP4] | <i>Nal^S</i> , <i>Str^S</i> , <i>Rif^S</i> , <i>Thi⁻</i> , <i>Lac⁻</i> , <i>Ara⁺</i> , <i>Gal⁺</i> , <i>Mtl⁻</i> , <i>F⁻</i> , <i>RecA⁺</i> , <i>Uvr⁺</i> , <i>Lon⁺</i> , (Qiagen) |
| BL21 CodonPlus® (DE3)-RP | F- <i>ompT hsdS(rB-mB-)</i> <i>dcm+</i> Tet ^r <i>gal λ(DE3) endA Hte</i> [<i>argU proL Cam^F</i>], (Stratagene) |

B 1.3 Vektoren

Die mögliche Lage der Anhänge (*Tag*) am C-Terminus (C) und am N-Terminus (N), sowie die Antibiotikaresistenz für Ampicillin (Amp) und Kanamycin (Kan) sind dargestellt.

| | | |
|---------------|--|--------------|
| pCR®2.1 Topo: | Amp ^r , Kan ^r , | (Invitrogen) |
| pET-21d : | Amp ^r , 6x His- <i>Tag</i> (C), T7- <i>Tag</i> (N), | (Novagen) |
| pQE-30 : | Amp ^r , 6x His- <i>Tag</i> (N), | (Qiagen) |

B 1.4 Chemikalien und Standards

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von den Firmen Roth, Sigma, Applichem, Fermentas, Gebu, Merck und Boehringer-Ingelheim bezogen. Die Standardsubstanzen der Calystegine A₃, A₅, B₁, B₂, B₃, B₄, C₁ und *N*-Methylcalystegin B₂ wurden freundlicherweise von Prof. Naoki Asano (Kanazawa, Japan) zur Verfügung gestellt. Nortropin und Nortropinon stammten von der Firma Boehringer-Ingelheim. Pseudotropin wurde nach Nickon und Fieser von Frau Prof. Birgit Dräger (MLU Halle-Wittenberg) synthetisiert [Nickon und Fieser, 1952].

B 1.5 Puffer, Standardlösungen und Medien

Die für diese Arbeit verwendeten Puffer, Standardlösungen und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, nach den Vorschriften von Sambrook und Mitarbeitern hergestellt [Sambrook et al., 1989].

B 1.6 Enzyme und Kits

Bei der Verwendung von Enzymen und Kits (Tab. B- 1) wurde, soweit nicht anders angegeben, nach den Vorschriften der Bezugfirmen gearbeitet.

Tab. B- 1: Verwendete Enzyme und Kits

| Enzym/Kit | Firma |
|--|---------------------|
| Glucose-6-phosphatdehydrogenase (aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>) | Sigma |
| Lysozym | Applichem |
| Ni-NTA Spin Kit | Qiagen |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (rekombinant) | Fermentas |
| QIAprep Spin Midiprep Kit | Qiagen |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen |
| QIAquick Nucleotide Removal Kit | Qiagen |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen |
| RACE-PCR Kit | GibcoBRL |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs |
| RNase H | Promega |
| SuperScript TM II Reverse Transkriptase | Invitrogen |
| SuperScript TM III Reverse Transkriptase | Invitrogen |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas |
| <i>Taq</i> -Polymerase (rekombinant) | Fermentas |
| Terminal Desoxynucleotidyl Transferase | Takara |
| TOPO Cloning [®] Kit | Invitrogen |
| TOPO TA Cloning [®] Kit | Invitrogen |

B 1.7 Oligonukleotide und Sequenzierungen

Die Oligonukleotide (Tab. B- 2) und DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Biotech AG, Martinsried angefertigt. Die PCR-Experimente sind nummeriert: für RT-PCR (1) verwendete Primer wurden zur Generierung eines ersten internen Amplifikates aus cDNA eingesetzt. Ausgehend vom internen Amplifikat und weiteren, während der RACE-PCR erhaltenen Amplifikate, wurden Primer für 5'-RACE Experimente (2) und 3'-RACE Experimente (3) abgeleitet. Für Klonierungen (4) wurden passende Endonuclease-Schnittstellen angefügt. Die Anwendungen sind unter B 2.2 erläutert.

Tab. B- 2: Primer; Nukleotide in Klammern kennzeichnen gewobbelte Bereiche. Eingefügte Sequenzen für Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Tm ist die vom Hersteller angegebene Schmelztemperatur der Primer. Anwendung: 1 = RT-PCR, 2 = 5'RACE, 3 = 3'RACE, 4 = Klonierung, Sd = *Solanum dulcamara*, Sn = *Solanum nigrum*

| Primer | Sequenz (5' → 3') | Tm |
|-----------------------------|--|------|
| 1 <i>trII-dir-int</i> | TGCACTGCCCTTGTTAC(CT)GGTGG | 65,1 |
| <i>trII-rev-int</i> | CCAGTGACATATGAAGCAGCAGG | 62,4 |
| 2 Sd- <i>trII-GSP1</i> | CTCATATGGTAGTGTGCA | 54,5 |
| Sd- <i>trII-GSP2</i> | CCTTTACTTCTCCATTGACTCAAAC | 59,7 |
| 3 Sd- <i>trII-GSP3</i> | CTTGTTACTGGTGGTTCTCGAGGCATC | 66,5 |
| Sd- <i>trII-GSP4</i> | CTGCAGCACTACCATATGAGGCTGTTTATG | 66,8 |
| 4 Sd- <i>trII-dir-NcoI</i> | <u>CCATGGCAGCAGGAAGGTGGAATC</u> | 66,1 |
| Sd- <i>trII-rev-NotI</i> | <u>GCGGCCGCGAAGCCACCATTAGCCATAAATCC</u> | 73,3 |
| Sd- <i>trII-dir-BamHI</i> | <u>GGATCCATGGCAGCAGGAAGGTGGAATC</u> | 69,5 |
| Sd- <i>trII-rev-SphI</i> | <u>GCATGCTTAGAAGCCACCATTAGCCATAAATCC</u> | 68,2 |
| 1 <i>trI-dir-int</i> | GCA(AT)(GC)AGT(AGT)TATACATGTTACG | 57,7 |
| <i>trI-rev-int</i> | GCACCTTTGG(AT)(AT)GC(AT)(GC)(AC)(AG)TAAA | 58,4 |
| 2 Sd- <i>trI-GSP1</i> | CATTCACATGCCAAGCTCTTTGTC | 61,0 |
| Sd- <i>trI-GSP2</i> | GAGAAGCCTTCAATAAAGGATAAGC | 59,7 |
| Sd- <i>trI-GSP3</i> | GAAATCTTTAGCATCCTTATGTATCG | 58,5 |
| 3 Sd- <i>trI-GSP4</i> | GTTGAAGGTTCTGTTTGTGACTTATTATCACACAC | 66,0 |
| Sd- <i>trI-GSP5</i> | CTTTATTCTGCTTCCAAAGGTGC | 58,9 |
| 4 Sd- <i>trI-dir-NcoI</i> | <u>CCATGGCAGGATTGAGAGAAAAATGGAGTC</u> | 66,8 |
| Sd- <i>trI-rev-XhoI</i> | <u>CTCGAGAAATGCACCATTAGCTGTGAATCCACC</u> | 69,5 |
| 2 Sn- <i>trI-GSP1</i> | CACCAGAATATTAAGCTTTCCATC | 57,6 |
| Sn- <i>trI-GSP2</i> | CATTTGTAACATTCTTCATAAGC | 53,5 |
| 3 Sn- <i>trI-GSP3</i> | CTCGGTGATACATAAAGGACGC | 59,8 |
| Sn- <i>trI-GSP4</i> | AGAAGAAATAGATAGTTTTGTGTCAAGACTCCT | 63,4 |
| 4 Sn- <i>trI-dir-NcoI</i> | <u>CCATGGCAGAAATTGAGAGAAAAATGGAGTC</u> | 65,4 |
| Sn- <i>trI-rev-XhoI</i> | <u>CTCGAGAAATCCACCATTAGCTGTGAATCCAC</u> | 68,2 |
| Sn- <i>trI-dir-BamHI</i> | <u>GGATCCATGGCAGAAATTGAGAGAAAAATGGAGTC</u> | 68,3 |
| Sn- <i>trI-rev-SphI</i> | <u>GCATGCTTAAAATCCACCATTAGCTGTGAATCCAC</u> | 68,3 |
| put.Sn- <i>trI-dir-NcoI</i> | <u>CCATGGAAGAATTGAGAGAAAAATGGAGTCTC</u> | 65,6 |
| put.Sn- <i>trI-rev-XhoI</i> | <u>CTCGAGCTTTTCCAGATTCATGAATGTCTC</u> | 65,4 |
| 1 <i>pmt-fwd-A</i> | AATGGTGGATTTCCATACAC | 53,2 |
| <i>pmt-rev-A</i> | GCTGCTTTGTGAATATCAGAG | 55,9 |
| <i>pmt-fwd-B</i> | AATGGTGGATTTCCATATAC | 51,2 |
| <i>pmt-rev-B</i> | GCTGCTTTATGAATATCAGAG | 54,0 |
| 2 Sd- <i>pmt-GSP1</i> | CTGCTTGGGTACATACAACTCC | 60,3 |
| Sd- <i>pmt-GSP2</i> | CTTTACAAATGCAGCTCCATCGTC | 61,0 |
| Sd- <i>pmt-GSP3</i> | CACCACGTCATCAATTTCAACGATG | 61,3 |
| Sd- <i>pmt-GSP4</i> | GATGGAACCAAGTGGTAGATGAACAATC | 63,7 |
| 3 Sd- <i>pmt-GSP5</i> | CATCGTTGAAATTGATGACGTGGTGGTTCGATG | 68,2 |
| Sd- <i>pmt-GSP6</i> | GACCAGGAGGAGTTGTATGTACCCAAGCAG | 69,5 |
| Sd- <i>pmt-GSP7</i> | GCCAGAAGTTGACTTCAAGAATCCAATTAATCC | 65,8 |
| 4 Sd- <i>pmt-dir-NcoI</i> | <u>CCATGGAAGTCATATCTAATCACA</u> | 57,6 |
| Sd- <i>pmt-rev-XhoI</i> | <u>CTCGAGAGACTCAATCAAACCTTCTGG</u> | 63,2 |
| Sd- <i>pmt-dir-BamHI</i> | <u>GGATCCATGGAAGTCATATCTAATCACAC</u> | 63,9 |
| Sd- <i>pmt-rev-SphI</i> | <u>GCATGCTTAAAGACTCAATCAAACCTTCTGG</u> | 63,9 |

B 2 Methoden

B 2.1 Analytische Methoden

B 2.1.1 Extraktion und Derivatisierung von Calysteginen

Das Pflanzenmaterial wurde gewogen und zweimal mit 10 ml/g FM eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1) mit dem Ultra Turrax (T25 Janke & Kunkel, IKA[®]-Labortechnik) homogenisiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (Sigma[®] 3K18) bei 4 °C und 5000 g wurde der Überstand abgenommen und mit dem Bodensatz die Extraktion wiederholt. Aus den vereinigten Überständen wurde Methanol bei 50 °C im Rotationsverdampfer (Heidolph VV 2000) entfernt. Der wässrige Extrakt wurde neutralisiert und auf einen sauren Kationenaustauscher (Ionenaustauscher I LAB Merck, Säulenvolumen 5-6 ml) gegeben. Dabei banden die Calystegine an die Kationenaustauschersäule unter Freisetzung von Protonen und Elution neutraler Verunreinigungen. Die Säule wurde mehrmals mit Aqua dest. gewaschen, bis der Durchfluss neutral reagierte. Danach wurden die an die Säule gebundenen Calystegine mit 2 N Ammoniak eluiert. Nach zweimaligem Nachwaschen der Säule mit 10 ml Aqua dest. wurden die Waschfraktionen mit dem Ammoniakeluat vereinigt und auf 1 ml/g FM mit dem Rotationsverdampfer bei 50 °C eingengt. Die Kationenaustauschersäule wurde mit 2 N Salzsäure regeneriert und neutral gewaschen. Der erhaltene Extrakt wurde in Gefäße für die Gaschromatographie (GC) gefüllt und darin gefriergetrocknet. Dem Lyophilisat wurden 30 µl Pyridin (Katalysator, Lösungsmittel), 40 µl Hexamethyldisilazan (HMDS) und 10 µl Trimethylchlorsilan (TMCS) als Silylierungsmittel zugegeben. Die Mischung wurde für 5-10 min im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend 20 min bei 75 °C inkubiert. Nach der Derivatisierung wurde Azobenzol (0,1 mg Azobenzol/ml silylierte Probenlösung) als innerer Standard zugesetzt. Die Proben wurden mit n-Hexan auf 500 µl aufgefüllt und per GC vermessen. Die Nachweisgrenze der Calystegine für die Quantifizierung lag bei 0,025 µg/µl. Zur Quantifizierung durch GC müssen Calystegine derivatisiert werden, um sie in flüchtige Verbindungen zu überführen. Es wurde eine Silylierung für hydrophile Alkaloide angewendet [Fleet et al., 1990]. Bei dieser milden Silylierung reagieren nur die Hydroxylgruppen, nicht aber die Brückenkopfaminogruppen.

B 2.1.2 Extraktion von Intermediaten der Calysteginbiosynthese

Die Proben wurden mit 10 ml eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1) je g FM mit dem Ultra Turrax (T25 Janke & Kunkel, IKA[®]-Labortechnik) homogenisiert und 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Mit dem Rückstand wurde der Extraktionsvorgang wiederholt und die vereinigten Überstände bei 50 °C im Rotationsverdampfer abrotiert. Die eingengte Probe wurde mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt und mit 100 µl konzentriertem Ammoniak alkalisiert. Die Lösung wurde auf eine 1 g Extrelut[®]-Säule (Merck) gegeben und nach 20 min wurden die auf der Säule gebundenen Stoffe mit 2 × 4 ml Chloroform und mit 1 × 4 ml eines Chloroform-Methanol-Gemisches (9:1) eluiert. Die vereinigten Eluate wurden bei 30 °C im Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingengt und der Rückstand in 150 µl Ethylacetat

aufgenommen. Davon wurden 90 µl abgenommen und mit Azobenzol als inneren Standard in einer Konzentration von 0,1 mg Azobenzol/ml Probenlösung versetzt. Anschließend wurden die Proben gaschromatographisch vermessen.

B 2.1.3 Isolierung und Derivatisierung der Polyamine

Die Pflanzengewebe wurden lyophilisiert, pulverisiert und je 50 mg wurden mit 1,5 ml 5%iger Perchlorsäure (V/V) versetzt, 2 h im Dunklen bei 4 °C inkubiert und danach 20 min bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) enthielt konjugierte und freie Polyamine.

Das Pellet, welches nur konjugierte Polyamine enthielt, wurde mit 1 ml 1 N Natronlauge resuspendiert. Vom Überstand (Ü1) und der Pelletsuspension wurden jeweils 250 µl mit 250 µl 12 N Salzsäure in zugeschmolzenen Braunglasampullen bei 110 °C im Trockenschrank für 18 h hydrolysiert. Im Anschluss wurde bei 14000 g über 5 min zentrifugiert, wobei die Hydrolyseüberstände aus dem Überstand Ü1 (Ü2) und der Pelletsuspension (Ü3) entstanden. Zur Analyse mit HPLC (B 2.1.10) wurden die Polyamine mit 5-(Dimethylamino)-naphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) derivatisiert [Smith und Davies, 1985]. Je 100 µl von den Überständen (Ü1, Ü2, Ü3) wurden mit 100 µl gesättigter Na₂CO₃-Lösung, 400 µl Dansylchloridlösung (7,5 mg/ml Aceton) bei 60 °C im Dunklen für 1 h inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Prolinlösung (100 mg/ml) zum Binden des überschüssigen Dansylchlorids für 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit.

Bei der Dansylierung bilden sich mono-, bi-, tri- und tetra substituierte Amonium-Verbindungen [Seiler und Knodgen, 1978]. Die Derivate können mit Fluoreszenzdetektoren nachgewiesen werden. Die dansylierten Polyamine wurden 3 mal mit 500 µl Toluol extrahiert und bei 37 °C zur Trockne eingeeengt. Für die Vermessung mit HPLC wurden die Proben in 800 µl Acetonitril gelöst.

B 2.1.4 Synthese von [¹³C-*methyl*]-Tropinon

[¹³C-*methyl*]-Tropinon wurde in Zusammenarbeit mit Roland Molinié und Trixie Ann Bartholomeusz aus der Arbeitsgruppe von François Mesnard (Laboratoire de Phytotechnologie, Université de Picardie, Amiens, Frankreich) aus Nortropinon und ¹³C-Iodmethan (Sigma Aldrich) in Anlehnung an Novák und Salemink [Novák und Salemink, 1989] synthetisiert.

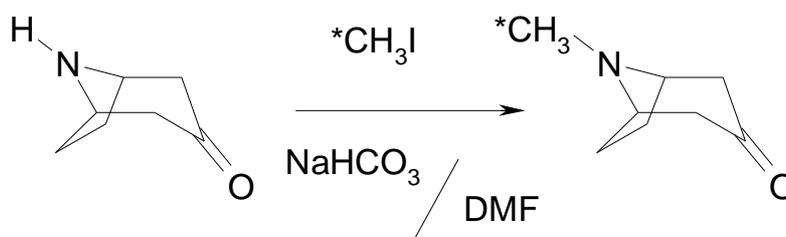


Abb. B- 1: Reaktionsschema zur Synthese von [¹³C-*methyl*]-Tropinon

Für die Reaktion wurden 3 Äquivalente NaHCO₃, 1 Äquivalent ¹³CH₃I und 1 Äquivalent Nortropinon eingesetzt. Vor der Synthese wurde 1 g Nortropinon gereinigt durch Lösen in 50

ml Aqua dest., Zugabe von Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion und 3fachem Ausschütteln mit 4 Vol Dichlormethan. Die zusammengeführten Dichlormethan-Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck bei 30 °C bis zur Trockne eingeengt. Ein Reaktionskolben wurde mit 1,5 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) und einem Magnetrührer gefüllt und mit einer Gummikappe verschlossen. Durch Zufuhr von Argon wurde die Luft im Reaktionskolben verdrängt (Abb. B- 2). 500 mg gereinigtes Nortropinon wurde in 4 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit einer Spritze durch die Gummikappe in den Reaktionskolben gebracht. 500 mg ^{13}C -Iodmethan ($^{13}\text{CH}_3\text{I}$) wurde unter Argonatmosphäre in 1 ml DMF gelöst. Während der Reaktionsansatz aus Nortropinon und Natriumhydrogencarbonat im Kolben durchmischt (Magnetrührer) und gekühlt wurde, wurde das gelöste $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ mit einer Spritze durch die Gummikappe des Reaktionskolbens gegeben. Während der Reaktion blieb die Verbindung des Reaktionskolbens zum mit Argon gefüllten Gummiballon bestehen. Nach 48 h wurde die Reaktion mit 1 Vol Aqua dest. abgestoppt und der Ansatz mit Salzsäure neutralisiert. Der wasserunlösliche Anteil des Reaktionsansatzes wurde mit angesäuertem Aqua dest. ausgeschüttelt. Die wässrigen Teile wurden vereinigt, mit Ammoniak alkalisiert und 3fach mit 4 Vol Dichlormethan ausgeschüttelt. Das Dichlormethan wurde unter vermindertem Druck bei 30 °C entfernt und der Rückstand in Ethylacetat gelöst. Im Rückstand fanden sich neben dem erwünschten [^{13}C -methyl]-Tropinon auch nicht umgesetztes Nortropinon und nicht näher charakterisierte Nebenprodukte.

Der gelöste Rückstand wurde über eine selbstgepackte Kieselgel 60-Säule (\varnothing 3,5 cm, Höhe 50 cm) mit fraktionierter Elution gereinigt. Als Fließmittel wurde Ethylacetat-Methanol-Ammoniak (28:11:1) verwendet und Fraktionen von je 15 ml aufgefangen. Die Reinheit der Tropinon-Fractionen wurde mit Dünnschichtchromatographie überprüft (B 2.1.11).

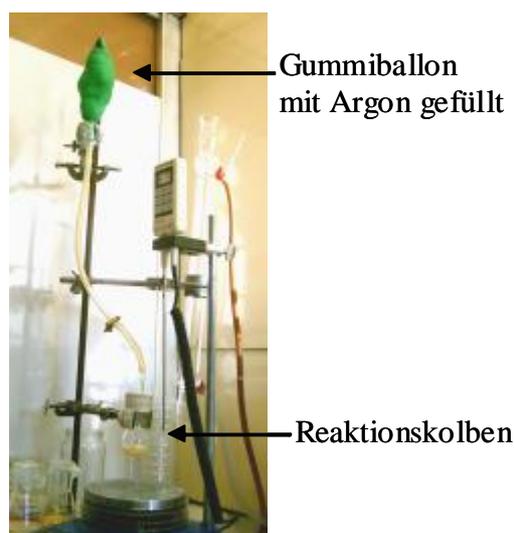


Abb. B- 2: Syntheseapparatur zur Darstellung von [^{13}C -methyl]-Tropinon

Detektionsmittel hierfür war 5 % Schwefelsäure in 96%igem Ethanol. Die Platten wurden bei 300 °C bis zur Sichtbarkeit der Banden erhitzt. Die nur [¹³C-*methyl*]-Tropinon enthaltenden Fraktionen wurden zusammengeführt, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Der kristalline Rückstand wurde mit GC-MS (B 2.1.9) und ¹H NMR (B 2.1.12) auf Reinheit und Grad der Markierung geprüft. Die Analysen zeigten eine Reinheit von > 98 % und eine Anreicherung von 99 % [Bartholomeusz 2007].

B 2.1.5 Applikation von [¹³C-*methyl*]-Tropinon an *S. dulcamara* Wurzelkulturen

Es wurde [¹³C-*methyl*]-Tropinon (B 2.1.4) in Konzentrationen von 5 mM und 7 mM an die Wurzelkultur appliziert und eine Kontrolle mit unmarkiertem Tropinon unter gleichen Bedingungen angelegt. Die Wurzelkulturen wurden wie unter B 1.1 beschrieben, allerdings in 20-70 ml flüssigem Gamborg's B5 Nährmedium kultiviert. Nach 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h Applikationszeit wurden die Wurzelkulturen geerntet und extrahiert (B 2.1.6). Die Extrakte wurden mit NMR und GC-MS auf markierte Metabolite der Biosynthese untersucht.

B 2.1.6 Extraktion von Aminosäuren und Intermediaten

Das Pflanzenmaterial wurde mit dem Ultra Turrax homogenisiert und mit 10 ml Ethanol 70 % (V/V) je g FM extrahiert und für 10 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert. Der Extraktionsvorgang wurde mit dem Bodensatz wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden lyophilisiert und für nachfolgende Untersuchungen verwendet.

B 2.1.7 Reinigung und Derivatisierung der Aminosäuren

Das Lyophilisat (B 2.1.6) wurde in Aqua dest. gelöst und über einen Kationenaustauscher (Dowex 50WX-8-100) mit 3 ml Säulenvolumen gegeben, um die Aminosäuren von Zuckern und anderen organischen Säuren zu trennen. Die Säule wurde zuvor mit 2 M HCl regeneriert und mit Aqua dest. gespült bis der Durchfluss neutral reagierte. Danach erfolgte die Aufgabe des Extrakts und ein Waschen mit 18 ml Aqua dest.. Die an das Säulenmaterial gebundenen Aminosäuren wurden mit 10 Säulenvolumen 2 N Ammoniak eluiert. Der Extrakt wurde lyophilisiert und mit Methylchlorformiat derivatisiert. Dazu wurden die Proben mit 1 ml Natronlauge (1 %) und 1 ml eines Methanol-Pyridin-Gemisches (5:1, V/V) versetzt. Anschließend wurde 100 µl Methylchlorformiat zugegeben. Die Mischung wurde 1 min stark geschüttelt (Vortex Genie 2). Der Vorgang wurde mit erneuter Zugabe von 100 µl Methylchlorformiat wiederholt. Die Mischung wurde 2 mal mit 1 ml Chloroform stark geschüttelt (Vortex Genie 2) und die erhaltene wässrige Phase verworfen. Die Chloroformphase, welche die derivatisierten Aminosäuren enthielt, wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Die Rückstände wurden in Ethylacetat gelöst und mit Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (GC-MS) vermessen.

B 2.1.8 Gaschromatographie (GC)

Die Calystegine und Intermediate der Biosynthese (Tropinon, Tropin, Pseudotropin) wurden mit Gaschromatographie (GC) quantifiziert. Identifiziert wurden die Peaks durch deren Retentionszeiten in Bezug auf Referenzsubstanzen. Die simultane Detektion und das Verhältnis der Peakflächen der Detektoren (PND/FID) dienen der weiteren Absicherung. Die Intermediate (B 2.1.2) wurden direkt vermessen. Die Calystegine wurden als Trimethylsilylderivate bestimmt und über die Fläche des FID quantifiziert.

Geräteparameter:

| | | | |
|-------------------|--|--------------------|----------|
| Typ: | Gaschromatograph Hewlett Packard 6890 | | |
| Detektoren: | Flammenionisationsdetektor (FID), Phosphor-Stickstoff-Detektor (PND) | | |
| Vorsäule: | 20 cm HP5-Säule | | |
| Säule: | HP5 (30 m x 320 µm x 0,25 µm) | | |
| Stationäre Phase: | 95 % Methylsiloxan; 5 % Phenylsiloxan | | |
| Mobile Phase: | Helium | | |
| Brenngase: | synthetische Luft, Wasserstoff | | |
| Flussrate: | 1 ml/min | Injektionsvolumen: | 1 - 3 µl |

GC-Temperaturprogramm zur Bestimmung der Calystegine:

| | |
|---------------------|---|
| Starttemperatur: | 160 °C, 2 min |
| Temperaturgradient: | 5 °C/min bis 240 °C 10 °C/min bis 300 °C |
| Injektion: | Split (1:20), 120 kPa, 250 °C |

| | | | | |
|--------------------------|---------------------------|---------|---------------------------|----------|
| Retentionszeiten: | Azobenzol | 7,5 min | | |
| (Durchschnittswerte) | Calystegin A ₃ | 9,0 min | Calystegin B ₂ | 13,4 min |

GC-Temperaturprogramm der Intermediate der Calysteginbiosynthese:

| | |
|---------------------|--|
| Starttemperatur: | 65 °C |
| Temperaturgradient: | 10 °C/min bis 120 °C, 2 min 15 °C/min bis 240 °C 10 °C/min bis 300 °C, 2 min |
| Injektion: | Pulsed Splitless; 250 °C, 200 kPa; 1,5 min |

| | | | | |
|--------------------------|----------|---------|--------------|----------|
| Retentionszeiten: | Tropinon | 8,8 min | Pseudotropin | 9,3 min |
| (Durchschnittswerte) | Tropin | 8,9 min | Azobenzol | 13,9 min |

Kalibriergeraden:

| | | |
|----------------|-------------------------|----------------|
| Tropinon: | $y = 1956,4 x - 7,5781$ | $R^2 = 0,9990$ |
| Tropin: | $y = 1559,4 x - 7,1167$ | $R^2 = 0,9923$ |
| Pseudotropin: | $y = 1765,5 x - 7,3190$ | $R^2 = 0,9997$ |
| A-Calystegine: | $y = 231,89 x$ | $R^2 = 0,9573$ |
| B-Calystegine: | $y = 275,24 x$ | $R^2 = 0,9794$ |

GC- Temperaturprogramm zur Trennung der Aminosäuren:

| | |
|---------------------|--|
| Starttemperatur: | 60 °C, 1 min |
| Temperaturgradient: | 10 °C/min bis 260 °C 260 °C, 10 min |
| Injektion: | Split (1:20), 120 kPa, 250 °C |

B 2.1.9 Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Massenspektrometrie wurde zur Identifizierung ^{13}C -markierter Verbindungen und zur Absicherung der analysierten Alkaloide verwendet. Es wurden die in B 2.1.8 aufgeführten Temperaturprogramme verwendet und ohne Split bei 250 °C und 120 kPa injiziert.

Geräteausstattung:

| | |
|-----------------------|--|
| Typ: | Gaschromatograph Hewlett Packard 5890, Serie II Plus |
| Säule: | DB-5 (30 m x Ø 320 µm x 0,25 µm) |
| Stationäre Phase: | 95 % Methylsiloxan; 5 % Phenylsiloxan |
| Mobile Phase: | Helium |
| Detektor: | HP 5972 Quadrupolmassenspektrometer |
| Ionisierungsspannung: | 30 – 70 eV |
| Flussrate: | 1 ml/min |
| Injektionsvolumen: | 1 - 5 µl |

Die massenmarkierten Aminosäuren wurde in Halle und in Amiens in Zusammenarbeit mit Trixie Ann Bartholomeusz (Laboratoire de Phytotechnologie, Université de Picardie, Amiens, Frankreich) analysiert.

Geräteausstattung im Laboratoire de Phytotechnologie:

| | |
|-----------------------|---|
| Typ: | Gaschromatograph Multi Automass MS (Finnigan) |
| Säule: | Restek [®] -5MS (30 m x Ø 0,25 mm x 0.25 µm) |
| Stationäre Phase: | Crossbond [®] ; 5 % Diphenyl-, 95 % Dimethylpolysiloxane |
| Mobile Phase: | Helium |
| Detektor: | Multi Automass III Quadrupolmassenspektrometer (Finnigan) |
| Ionisierungsspannung: | 30 – 70 eV |
| Flussrate: | 1 ml/min |
| Injektionsvolumen: | 1 µl; AS2000 Autosampler (Finnigan) |
| Injektionstemperatur: | 150 °C |

B 2.1.10 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde zur Analyse der Polyamine Putrescin, *N*-Methylputrescin und Spermidin eingesetzt. Die Polyamine wurden dansyliert (B 2.1.3) und mit HPLC vermessen, wobei mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten eluiert wurde [Marce et al., 1995]. Detektiert wurden die Polyamine mit einem Fluoreszenz-Detektor bei einer Excitationswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm und einem Diodenarray-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 220 nm. Bis 50 ng Polyamin pro Injektion wurde über den Fluoreszenz-Detektor und ab 50 ng pro Injektion mit dem Diodenarray-Detektor (Merck-Hitachi Model D-7000 Chromatography Data Station Software) ausgewertet. Die Polyamine wurden in Bezug auf die Retentionszeiten der Standardsubstanzen identifiziert. Zur Absicherung wurden die UV-Spektren mit denen der Standardsubstanzen verglichen.

Lösungsmittelgradient für die HPLC-Trennung:

| | | | |
|-----------|---------------|-------------|----------------------|
| Programm: | 0 min- 5 min | isokratisch | bei 65 % Acetonitril |
| | 5 min-15 min | steigend | auf 90 % Acetonitril |
| | 15 min-22 min | isokratisch | bei 90 % Acetonitril |
| | 22 min-24 min | fallend | auf 35 % Acetonitril |
| | 24 min-35 min | isokratisch | bei 35 % Acetonitril |

Geräteparameter:

| | |
|--------------------|---|
| Typ: | HPLC-System La Chrom (Merck-Hitachi) |
| Interface module: | D-7000 |
| Pumpe: | L-7100 |
| Autosampler: | L-7200 |
| Säulenofen: | Column-Thermostat Jetstream 2 Plus |
| Ofentemperatur: | 40 °C |
| Detektoren: | Dioden-Array Detektor L-7455, Fluoreszenz Detektor L-7480 |
| Säule: | RP18-Säule Hypersil ODS (Knauer) |
| Säulenparameter: | Maße: 250 mm x 4 mm, Partikelgröße: 5 µm |
| Flussrate: | 1 ml/min |
| Injektionsvolumen: | 40 µl |

Kalibriergeraden:

| Fluoreszenz-Detektor (bis 50 ng Polyamin pro Injektion) | | | Dioden-Array-Detektor (ab 50 ng Polyamin pro Injektion) | | |
|--|---------------|----------------|--|----------------|--|
| Putrescin: | $y = 352456x$ | $R^2 = 0,9991$ | $y = 11636x + 162120$ | $R^2 = 0,9885$ | |
| <i>N</i> -Methylputrescin: | $y = 161312x$ | $R^2 = 0,9866$ | $y = 5354x + 23237$ | $R^2 = 0,9843$ | |
| Spermidin: | $y = 190400x$ | $R^2 = 0,99$ | $y = 5837,3x - 5403,5$ | $R^2 = 0,9958$ | |

B 2.1.11 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde zum Nachweis der Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin verwendet. Aufgetragen wurde mit dem Linomat IV (Camag) und detektiert mit Dragendorff's Reagenz der Variation nach Munier.

Einstellungen:

| | |
|-------------------|--|
| Bandbreite: | 5 mm, Freiraum: 4mm, Volumen:70 µl, 4 sec je µl |
| mobile Phase: | Ethylacetat-Chloroform-Methanol-Ammoniak, (30:30:30:6) |
| stationäre Phase: | Kieselgel 60 F ₂₅₄ Schichtdicke 250 µm (Merck), |
| Plattengröße: | 200 mm |
| Laufzeit: | ca. 90 min |

Zusammensetzung des Dragendorff-Reagenz:

| | | |
|-------------------|-------|--|
| I. | 1,7 g | Bismutsubnitrat in 100 ml 20 % Weinsäure |
| II. | 16 g | Kaliumiodid in 40 ml Aqua dest. |
| I + II | | mischen und filtrieren = Stammlösung |
| Frisches Reagenz: | | Stammlösung 1:10 mit 20%iger Weinsäure verdünnen |

| | | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|
| R_f – Werte: | Tropin: | ca. 0,142 | Pseudotropin: | ca. 0,242 |
| (Durchschnittswerte) | Tropinon: | ca. 0,705 | Nortropin: | ca. 0,084 |

B 2.1.12 NMR

Die ^{13}C -markierten Substanzen wurden per NMR in Amiens in Zusammenarbeit mit Trixie Ann Bartholomeusz und François Mesnard (Laboratoire de Phytotechnologie, Université de Picardie, Amiens, Frankreich) analysiert. NMR-Spektren bei 500,13 MHz und 125,69 MHz wurden mit einem Bruker Avance 500 NMR-Spektrometer für ^1H bzw. ^{13}C aufgenommen, welches mit einem 5 mm Breitband-Probenkopf und einer z-Gradienten Schleife ausgestattet war. 2D HSQC Spektren wurden mit 2048 Datenpunkten für eine Spektralweite von 4496 Hz (8,99 ppm) in der ^1H Dimension mit einer Auflösung von 2,20 Hz aufgenommen. Die Spektralweite der ^{13}C Dimension war 21380 Hz (170 ppm), zentriert auf 95 ppm. Ein 2 ms trim Puls ging der 0,228 s dauernden Acquisitionsperiode voraus. Die Relaxationszeit betrug 2 s. Die Transfervverzögerung wurde für eine Kopplungskonstante von J_{CH} 145 Hz optimiert. ^{13}C wurde mit GARP Sequenz entkoppelt. 128 Aufnahmen erfolgten für eine Experimentalzeit von 20 h 32 min 20 s.

B 2.2 Molekularbiologische Methoden

B 2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe wurde nach einer geänderten Methode von Reinbothe isoliert [Reinbothe et al., 1992]. Es wurde mit RNase freien Materialien gearbeitet, und wässrige Pufferlösungen wurden nach Zusatz von 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) autoklaviert. Das Pflanzenmaterial (0,1 - 3 g) wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und mit je 6 ml NTES-Puffer und 6 ml Phenol/Chloroform (1:1) versetzt. Der Mörser wurde mit 4 ml NTES-Puffer und 4 ml Phenol/Chloroform (1:1) gespült. Zur Extraktion und Fällung der Proteine wurde das Gemisch 5 min stark geschüttelt (Vortex Genie 2) und 10 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde abgenommen und erneut mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, 1 min kräftig geschüttelt und 10 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert. Dies wurde so oft wiederholt, bis die Grenzschicht visuell klar war. Dann wurden aus der wässrigen Phase die Nukleinsäuren mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 3 Vol 96%igem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde bei 4 °C und 5000 g für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 5 ml DEPC-Wasser gelöst. Die RNA wurde über Nacht mit 5 ml 4 M Lithiumchloridlösung pH 5,2 gefällt und bei 5000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Pelletgröße in 20 - 1000 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Quantifiziert wurde photometrisch bei 260 nm mit dem Gene Quant II (Pharmacia Biotech). Verunreinigungen mit Proteinen wurden aus dem Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ bestimmt.

NTES-Puffer:

| | |
|-----------|------------------|
| 100 mM | NaCl |
| 1 mM | EDTA |
| 1 % (m/V) | SDS |
| 10 mM | Tris-HCl; pH 7,5 |

B 2.2.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese kamen 1-5 µg Gesamt-RNA (B 2.2.1) und SuperScript™ II bzw. SuperScript™ III Reverse Transkriptase (Invitrogen) zum Einsatz. Es wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung eines Oligo-dT₁₂₋₁₈ Primers gearbeitet. Die Synthese fand je nach verwendeter Transkriptase bei 42 °C bzw. 55 °C statt. Die cDNA wurde als Template für die PCR-Anwendungen (B 2.2.3, B 2.2.4) eingesetzt.

B 2.2.3 PCR

Zur Vervielfältigung von Nukleinsäurefragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Dies ist eine Technik zur Amplifikation eines DNA Fragmentes mit zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) und einer temperaturstabilen DNA-Polymerase [Mullis und Faloona, 1987]. Dabei wird ein zyklischer Prozess von Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation mehrfach durchlaufen. Standardmäßig wurde *Taq*-DNA Polymerase (Fermentas) verwendet. Für Anwendungen, bei denen eine besonders hohe Lesegenauigkeit erforderlich war, wurde *Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas) verwendet [Cline et al., 1996]. In dieser Arbeit wurde Plasmid-DNA oder cDNA als DNA-Template eingesetzt. Wird die cDNA aus RNA synthetisiert und als Template eingesetzt, heißt die Reaktion RT-PCR. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter B 1.7 aufgelistet. Die Amplifikate wurden elektrophoretisch im Agarosegel (1,5–2 %) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Für die Agarosegel-Elektrophorese wurde mit TAE-Puffer (0,04 M Tris-HCl, 0,02 M Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 7,5) gearbeitet. Amplifikate von Interesse wurden aus dem Agarosegel isoliert und mit einem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgearbeitet und kloniert (B 2.2.6). Nach Plasmidextraktion (QIAprep Spin Midiprep bzw. Miniprep Kit, Qiagen) wurde mit Sequenzierung (B 1.7) analysiert. Standardmäßig wurde für die PCR mit einem Reaktionsvolumen von 30-50 µl gearbeitet.

| | | |
|--|-----------------------|----------|
| Zusammensetzung eines Standardansatzes: | 10 x PCR-Puffer | 5 µl |
| | 2,5 mM dNTP-Mix | 4µl |
| | 10 pmol /µl Primer je | 1µl |
| | DNA-Template | 3 µl |
| | Polymerase | 1 U |
| | Aqua dest. | ad 50 µl |

Der Reaktionspuffer richtete sich nach der verwendeten DNA-Polymerase. Für die PCR-Reaktionen wurde ein Thermocycler T3 der Firma Biometra mit den folgend aufgeführten PCR-Bedingungen eingesetzt (Tab. B- 3).

Tab. B- 3: Verwendete PCR-Bedingungen; Die Annealingtemperatur (AT) in Schritt 3 wurde 5 °C unter der angegebenen Schmelztemperatur (Tm) der Primer gewählt.

| PCR-Bedingungen für: | <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | | <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase | |
|-----------------------------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| 1. Initiale Denaturierung | 4 min | 95 °C | 3 min | 94 °C |
| 2. Denaturierung | 60 s | 95 °C | 50 s | 94 °C |
| 3. Annealing | 50-70 s | AT | 50-70 s | AT |
| 4. Elongation | 60-90 s/1 kbp | 72 °C | 180 s/1 kbp | 73 °C |
| 5. 30-35 Zyklen von 2 bis 4 | | | | |
| 6. Elongation | 5-10 min | 72 °C | 5-10 min | 72 °C |

B 2.2.4 Vervollständigung der cDNA Sequenzen

Durch RT-PCR (B 2.2.3) wurden interne *tr*- bzw. *pmt*-homologe Amplifikate aus *S. dulcamara* und *S. nigrum* erhalten. Die cDNA Sequenzen wurden am 5`- und 3`-Ende mit RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA ends) [Frohman 1993] vervollständigt. Dazu wurden aus den erhaltenen internen cDNA Sequenzen spezifische Primer für 5`- und 3`-RACE Experimente abgeleitet (B 1.7). Es wurde ein RACE-PCR Kit (Gibco BRL) verwendet und nach Herstellerangaben gearbeitet. Für die 5`-RACE-PCR kam Gesamt-RNA (B 2.2.1) aus 14 Tage alten Wurzelkulturen (*S. dulcamara*) und aus Blattmaterial (*S. nigrum*) für die Erststrangsynthese zum Einsatz. Die Erststrangsynthese wurde mit den Primern Sd-*tr*II-GSP1, Sd-*tr*I-GSP1, Sd-*pmt*-GSP1, Sn-*tr*I-GSP1 (B 1.7) und SuperScriptTM II bzw. SuperScriptTM III Reverse Transkriptase (Invitrogen) ausgeführt. Gereinigt wurde die cDNA mit einem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Durch die terminale Desoxynukleotid-Transferase (TdT) wurden an das 3`-Ende der cDNA mehrere Cytosine angefügt. Diese bildeten die Angriffsstruktur für einen Anker-Primer (*Abridged Anchor Primer*) der eine Poly-G-Sequenz enthält. Dieser Ankerprimer wurde zusammen mit einem genspezifischen Primer für die erste PCR eingesetzt. Die PCR wurden unter Standardbedingungen (B 2.2.3) mit *Taq*-Polymerase angefertigt. Es folgte eine 2. PCR mit einem genspezifischen Primer und einem AUA-Primer (*Abridged Universal Amplification Primer*), eine sogenannte „nested PCR“. Als Template wurde dafür der erste PCR-Ansatz 1:50 verdünnt eingesetzt. Wenn nach Analyse der PCR mit Elektrophorese im Agarosegel keine deutlichen Banden detektiert werden konnten, wurde eine weitere „nested PCR“ durchgeführt.

Für die 3`-RACE-PCR kam cDNA umgeschriebener RNA aus 14 Tage alten Wurzelkulturen (*S. dulcamara*) und Blattmaterial (*S. nigrum*) zur Verwendung. Ein Merkmal von mRNA ist ein mehrfacher Adenosinhang am 3`-Ende. Diese Eigenschaft wird für die 3`-RACE-PCR genutzt. Für die Synthese der cDNA wurde ein Oligo-dT₁₂₋₁₈ Primer (Adapter Primer) und SuperScriptTM II Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Der Oligo-dT₁₂₋₁₈ Primer enthält zusätzlich eine spezifische Bindesequenz für einen AUA-Primer (*Abridged Universal Amplification Primer*). Die cDNA wurde für eine erste PCR unter Standardbedingungen mit einem genspezifischen Primer und einem AUA-Primer eingesetzt. Der PCR Ansatz wurde 1:50 verdünnt und als Template für „nested PCR“ eingesetzt. Wenn durch „nested PCR“ Amplifikate im Agarosegel detektiert werden konnten, wurden diese isoliert, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert und nach Klonierung (B 2.2.6) in einen pCR[®] 2.1-TOPO bzw. pCR[®] 2.1 Vektor mit Sequenzierung analysiert.

B 2.2.5 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde verwendet, um die Transformation in *E. coli* zu überprüfen. Dafür wurden einzelne Bakterienkolonien selektiert und in 20 µl sterilem Wasser aufgenommen. Dieser Ansatz diente als Template für eine Standard-PCR (B 2.2.3) mit *Taq*-Polymerase. Zu dem PCR-Reaktionsansatz wurden spezifische Primer für die in das Plasmid eingefügte Sequenz gegeben. Zum Aufschluss der Bakterien wurde die Zeit für die initiale Denaturierung (B 2.2.3) auf 10 min erhöht. Ausgewertet wurde mit Agarosegel Elektrophorese.

B 2.2.6 Klonierung

Die zur Klonierung verwendeten Standardmethoden orientierten sich an den Methoden von Sambrook und Mitarbeitern [Sambrook et al., 1989]. Die für die Klonierung in die jeweiligen Vektoren verwendeten Amplifikate wurden durch PCR (B 2.2.3, B 2.2.4) gewonnen. Als Kits für die Klonierung kamen das TOPO TA Cloning Kit[®] (Invitrogen) oder das TA Cloning Kit[®] (Invitrogen) zum Einsatz. Es wurden der pCR[®]2.1-TOPO bzw. der pCR[®]2.1 Vektor verwendet. Essentiell für diese Klonierung ist ein überhängendes Adenin am 3` Ende des Amplifikates. Bei Verwendung von *Pfu*-DNA-Polymerase wurde dem PCR-Ansatz nach beendeter Reaktion *Taq*-Polymerase zugefügt und für 10 min bei 72 °C inkubiert. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* (XL1-Blue, Top10 One Shot[®], B 1.2) verwendet. Es wurde nach der Hitzeschockmethode von Cohen und Mitarbeitern gearbeitet [Cohen et al., 1972]. Die nach der Transformation erhaltene Bakteriensuspension wurde auf LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin unter sterilen Bedingungen ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Kolonien wurden mit Kolonie-PCR (B 2.2.5) überprüft.

Für DNA-Sequenzen, die in Expressionsvektoren überführt werden sollten, wurden die Primer für die PCR mit den entsprechenden Schnittstellen generiert und das Amplifikat wie zuvor beschrieben kloniert. Nach positiver Transformation und Anzucht der Bakterien, wurde das Plasmid isoliert (QIAprep Spin Midi- bzw. Miniprep Kit, Qiagen) und eine Restriktion durchgeführt. Nach Aufreinigung wurde die DNA-Sequenz in den zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisierten Expressionsvektor ligiert. Als Expressionsvektoren kamen der pQE-30 Vektor (Qiagen) und der pET-21d Vektor (Novagen) zur Verwendung (B 1.3, Vektorkarte im Anhang). Für Restriktionen wurden die entsprechenden Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Fermentas) und für Ligationen T4-DNA-Ligase (Fermentas) eingesetzt.

B 2.2.7 Rekombinante Expression in *E. coli*

Für die bakterielle Expression der entsprechenden Gene kamen das pQE-30 Vektorsystem mit *E. coli* (SG13009) von Qiagen, welches die Sequenz für einen N-terminalen 6 x Histidin-Anhang (*His-Tag*) enthält, und das pET-21d Vektorsystem mit *E. coli* (BL21) von Novagen, welches die Sequenz für einen C-terminalen 6 x Histidin-Anhang (*His-Tag*) enthält, zur Verwendung. Die transformierten Bakterien wurden in TB- oder LB-Flüssigmedium unter Zusatz von 50 mg/l Carbenicillin bzw. 100 mg/l Ampicillin bei 37 °C und 150 rpm kultiviert.

Bei einer optischen Dichte $A_{600\text{nm}}$ von 0,7-0,9 wurde mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und eine Präinduktionskontrolle genommen.

IPTG stellt ein nicht metabolisierbares Analogon zu Galactose dar. Es bindet an den *lac*-Repressor und aktiviert so die *lac*-Operatorsequenz. Je nach exprimiertem Protein wurden verschiedene Induktionszeiten und Temperaturen gewählt, welche in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt sind. Nach der Induktion wurden die Bakterien bei 5000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und entsprechend B 2.3.3 aufgearbeitet.

B 2.3 Biochemische Methoden

B 2.3.1 Quantifizierung von Proteinen

Bei der Proteinquantifizierung nach Bradford bilden Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant Blau G 250 einen intensiv blaugefärbten Komplex. Dessen Absorption kann photometrisch bei 595 nm bestimmt werden. Dabei steigt die Absorption mit zunehmendem Proteingehalt linear an [Bradford 1976]. Für die Messungen wurde ein Zweistrahlphotometer UV 160A (Shimadzu) verwendet. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) in einem Bereich von 50 - 180 $\mu\text{g/ml}$ erstellt.

B 2.3.2 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Die Proteinextraktion wurde in Anlehnung an die Dissertation von A. Portsteffen [Portsteffen 1994] durchgeführt. Es wurde die gesamte Zeit auf Eis bzw. bei 4 °C gearbeitet.

Das bei -80 °C gelagerte bzw. frische Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff und unlöslichem Polyvinylpyrrolidon (0,2 g/g FM) intensiv gemörsert und in 3 ml/g FM Extraktions-Puffer aufgenommen, dem 16 % (V/V) einer Ascorbatlösung (2 g Ascorbat in 10 g Aqua dest., pH 7,8) zugesetzt waren. Dieses Extraktionsgemisch wurde sofort für 15 min bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert (Beckman GS-15 R). Der Überstand (Ü1) wurde mit pulverisiertem Ammoniumsulfat bis zur 40%igen Sättigung versetzt (0,243 g/ml Ü1) und 15 min auf Eis gerührt. Danach wurde für 30 min bei 14000 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand (Ü2) wurde mit Ammoniumsulfat bis zur 75%igen Sättigung (0,245 g/ml Ü2) versetzt und 15 min auf Eis gerührt und anschließend für 30 min bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert. Das erhaltene Proteinpellet wurde in Mess-Puffer suspendiert und enthielt die tropinonreduzierenden Proteine. Die Proteinkonzentration wurde nach B 2.3.1 bestimmt.

Extraktions-Puffer:

| | |
|-----------------------|--------|
| Kaliumphosphat | 0,1 M |
| Saccharose | 0,25 M |
| 1,4-Dithiothreitol | 3 mM |
| EDTA | 1 mM |
| in Aqua dest.; pH 7,8 | |

Mess-Puffer:

| | |
|---|------------|
| Kaliumphosphat | 20 mM |
| Saccharose | 0,2 M |
| 1,4-Dithiothreitol | 1 mM |
| Glycerol | 23 % (V/V) |
| in Aqua dest.; pH 7,1; 0,45 μm filtriert | |

B 2.3.3 Proteinextraktion aus Bakterien

Das Bakterienpellet (B 2.2.7) wurde in Lyse-Puffer resuspendiert und unter Zusatz von 1 mg/ml Lysozym und 0,1 % Triton X-100 für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden 10 ml bis 20 ml Lyse-Puffer je nach Kulturmedienvolumen verwendet. Nach der Inkubation wurden die Bakterienzellen für 3 x 30 sec (1 min Unterbrechung auf Eis) im Ultraschallbad aufgeschlossen, mit DNase (1 µg/ml) versetzt und für 40 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung verwendet (B 2.3.6).

| | | |
|---------------------|---|--------|
| Lyse-Puffer: | Imidazol | 10 mM |
| | NaCl | 300 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ ; pH 8,0 | 50 mM |

B 2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden durch denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt [Laemmli 1970]. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Proteinproben-Puffer [0,225 M Tris-HCl, pH 6,8; 50 % (V/V) Glycerin, 5 % (m/V) SDS; 0,05 % (m/V) Bromphenolblau; 0,25 % (m/V) 1,4-Dithiothreitol] im Verhältnis 1:1 gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Ladungsunterschiede der Proteine ausgeglichen. Die Proteine können dann im Gel nach der Größe aufgetrennt werden. Es wurde mit der Minikammer „PHERO-minivert“ (Biotech-Fischer) gearbeitet. Ein Gel bestand jeweils aus Sammelgel und Trenngel, welche sich im Vernetzungsgrad unterscheiden und so die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beeinflussten. Dabei wurden die Proteinproben bei 25 mA und 100 V im Sammelgel konzentriert und im Trenngel bei 40 mA und 150 V aufgetrennt. Als Größenmarker wurde der PageRuler™ Prestained Proteinmarker (Fermentas) und der Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) verwendet. Im Anschluss wurden die Proteine im Gel entweder mit Coomassie-Lösung oder nach der Silberfärbemethode [Heukeshoven et al., 1985] sichtbar gemacht. Abschließend wurden die Gele für 20 min in Trocknerlösung [6 % (V/V) Glycerol; 40 % (V/V) Methanol; 10 % (V/V) Essigsäure] inkubiert und in Folie (Biometra® Cellophanrolle D 60/2) aufbewahrt.

| | | |
|--------------------------------|-------------|--------|
| Elektrophorese-Puffer : | 192 mM | Glycin |
| | 0,1 % (m/V) | SDS |
| | 25 mM | Tris |

| | | | |
|-------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Sammelgel: | | Trenngel: | |
| 5 % (m/V) | Acrylamid/Bisacrylamid | 12,5 % (m/V) | Acrylamid/Bisacrylamid |
| 0,125 M | Tris-HCl; pH 6,8 | 0,375 M | Tris-HCl; pH 8,8 |
| 0,1 % (m/V) | SDS | 0,1 % (m/V) | SDS |
| 0,1 % (V/V) | TEMED | 0,1 % (V/V) | TEMED |
| 0,05 % (m/V) | APS | 0,05 % (m/V) | APS |

Coomassie-Färbung:

Zur Fixierung der Proteine im Gel wurde das Gel für 20 min in Fixierlösung [50 % (V/V) Methanol; 12 % (V/V) Essigsäure] inkubiert und danach 30 min mit Coomassie-Färbelösung [0,2 % (m/V) Coomassie Brilliant Blau R250, 42,5 % (V/V) Ethanol; 10 % (V/V) Essigsäure; 5 % (V/V) Methanol] gefärbt. Der Hintergrund des Gels wurde solange durch mehrmaliges Aufkochen in Entfärbelösung [25 % (V/V) Ethanol; 10 % (V/V) Essigsäure] in der Mikrowelle unter Zugabe eines Schaumgummiwürfels 1 x 1 cm aufgehellt bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden.

Silber-Färbung:

Das Proteingel wurde für 1 h in einer Fixierlösung [50 % (V/V) Methanol, 12 % (V/V) Essigsäure, 0,02 % (V/V) Formaldehyd] inkubiert und anschließend für 3 x 20 min in 50%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde es für 1 min in 0,02 % (m/V) Natriumthiosulfatlösung geschwenkt und 3 x 1 min mit Aqua dest. gewaschen. Das Gel wurde darauf für 20 min mit Imprägnierlösung [0,2 % (m/v) Silbernitrat; 0,025 % (V/V) Formaldehyd] behandelt und 3 x 1 min mit Aqua dest. gewaschen. Bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden wurde das Gel in Entwicklerlösung [6 % (m/V) Natriumcarbonat; 0,5 % (m/V) Natriumthiosulfat; 0,02 % (V/V) Formaldehyd] geschwenkt. Zum Abstoppen des Vorgangs wurde das Gel mit Stopplösung [50 % (V/V) Methanol; 12 % (V/V) Essigsäure] behandelt.

B 2.3.5 Enzymassay zur Bestimmung der Tropinonreduktase-Aktivität

Die Grundlage der enzymatischen Aktivitätsbestimmung bildet die Reduktion von Tropinon zu Pseudotropin oder Tropin unter NADPH-Verbrauch, wobei NADP^+ entsteht [Dräger et al., 1988; Koelen et al., 1982]. NADP^+ hat eine andere spezifische Extinktion als NADPH, wodurch der Abbau unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH mit $6,18 \times 10^2$ ($1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$) bei 340 nm und 30 °C quantifiziert werden konnte [Bergmeyer 1985]. Es wurde mit einem Zweistrahlphotometer UV 160A (Shimadzu) bei 340 nm im Messbereich von -1,00A bis +1,00A gearbeitet. Die Messungen fanden bei 30 °C über 3 - 6 min statt. Der Standardassay setzte sich aus 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,4), 0,2 mM NADPH, 5 mM Tropinon und je nach Aktivität 0,3-1000 µg Protein zusammen. Der Referenzassay hatte die gleiche Zusammensetzung, jedoch ohne Tropinon, um den unspezifischen NADPH-Verbrauch zu erfassen. Wenn Substratanaloga vermessen wurden, wurden diese anstelle von Tropinon dem Assay zugesetzt. Um die Umsetzungsprodukte nach der Messung anzureichern, wurde der Assay in ein NADPH-regenerierendes System überführt. Dieses System setzte sich aus 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,4), 1 mM Glucose-6-phosphat, 0,5 mM NADP, 0,4 U Glucose-6-phosphatdehydrogenase, 0,3 - 1000 µg Protein und 2,5 - 5 mM Tropinon zusammen. Es wurde mit einem Volumen von 1 - 1,5 ml bei 30 °C über 1-2 h gearbeitet. Die Reaktion wurde mit 100 µl Ammoniak abgestoppt und der Assay über Extrelut (Merck) nach B 2.1.2 gereinigt. Die Produkte wurden mit DC (B 2.1.11), GC (B 2.1.8) oder GC-MS (B 2.1.9) analysiert.

B 2.3.6 Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Enzyme

Die rekombinanten Enzyme enthielten durch die Expression im pET-21d Vektor (Novagen) bzw. im pQE-30 Vektor (Qiagen) einen His-Tag am C- bzw. N-Terminus (B 2.2.7). Die Histidengruppen bilden Chelate mit zweiwertigen Metallionen. Dies ermöglichte die Proteinreinigung mit Nickelaffinitätschromatographie. Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurde mit HiTrapTM Chelating SepharoseTM-Säulen (Säulenvolumen 5 ml, Amersham-Bioscience) am ÄKTATM Explorer 100 (Amersham-Bioscience) gearbeitet.

Vor dem Beladen der Säule wurde die Proteinlösung (B 2.3.3) durch einen Filter (Porengröße: 45 µm) filtriert. Die Säule wurde mit 4 Säulenvolumen Binde-Puffer äquilibriert. Dann wurde die filtrierte Proteinlösung (10-25 ml) mit einem Superloop auf die Säule gegeben. Nicht gebundenes Protein wurde mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer von der Säule gewaschen und mit einem Imidazolgradienten von 10-500 mM über 5 Säulenvolumen eluiert. Abschließend wurde die Säule mit Elutions-Puffer über 5 Säulenvolumen gespült. Die Fraktionen wurden mit einem Volumen von 2 ml aufgefangen und auf Proteingehalt (B 2.3.1), Enzymaktivität (B 2.3.5) und mit SDS-PAGE (B 2.3.4) untersucht.

| | | | | | |
|----------------------|--------|---|-------------------------|--------|---|
| Binde-Puffer: | 500 mM | NaCl | Elutions-Puffer: | 500 mM | NaCl |
| | 10 mM | Imidazol | | 500 mM | Imidazol |
| | 20 mM | Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,8 | | 20 mM | Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,8 |

B 2.3.6.1 Umpufferung mit PD-10 Säulen

Die gereinigten eluierten Proteinfractionen wurden über PD-10 Säulen (Amersham-Bioscience) vom Imidazol befreit. Dabei wurde das Volumen der Fraktionen mit Binde-Puffer auf 2,5 ml erhöht, auf eine mit Mess-Puffer äquilibrierte PD-10 Säule gegeben und mit 3,5 ml Mess-Puffer eluiert. Die entsalzten Fraktionen wurden auf Proteingehalt (B 2.3.1), Enzymaktivität (B 2.3.5) und mit SDS-PAGE (B 2.3.4) untersucht.

B 2.3.6.2 Bestimmung des pH Optimums

Die gereinigten und umpufferten Proteinfractionen (B 2.3.6.1) wurden für die Bestimmung des pH-Optimums der TR-Enzyme verwendet. Gemessen wurde mit dem photometrischen Standardassay (B 2.3.5). Zur Einstellung des pH-Bereiches von pH 3,5–4,5 wurde mit 0,1 M Glycin-Puffer, im pH-Bereich von 5,0-8,0 mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer und im pH-Bereich von 8,5-10 mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer gearbeitet. Alle Messungen waren 3 bis 4fach Bestimmungen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden angegeben.

B 2.3.6.3 Bestimmung von K_m und V_{max}

Für die Bestimmung von K_m und V_{max} wurde für die TR-Enzyme Tropinon im Konzentrationsbereich von 0,005-5 mM eingesetzt. Die Substratanaloga wurden je nach Umsatz im Konzentrationsbereich von 0,01-30 mM eingesetzt. Die Messungen wurden mit dem photometrischen Standardassay (B 2.3.5) bei pH 6,4 gemacht, um einen Vergleich zu bekannten TRII zu ermöglichen. Es wurde 3 bis 4fach bestimmt und Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Zur Auswertung wurden die Methoden von Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk [Lineweaver und Burk, 1934; Michaelis und Menten, 1913] und das Enzymkinetik-Modul der Software Sigma-Plot 9.0 verwendet.

B 2.3.6.4 Umsetzung mit Substratanaloga

Es wurde die Umsetzung der Enzyme mit Substratanaloga getestet. Gemessen wurde mit dem photometrischen Standardassay (B 2.3.5). Die Substrate wurden im Assay in Konzentrationen bis 30 mM eingesetzt. Alle Messungen wurden 3 bis 4fach wiederholt und Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

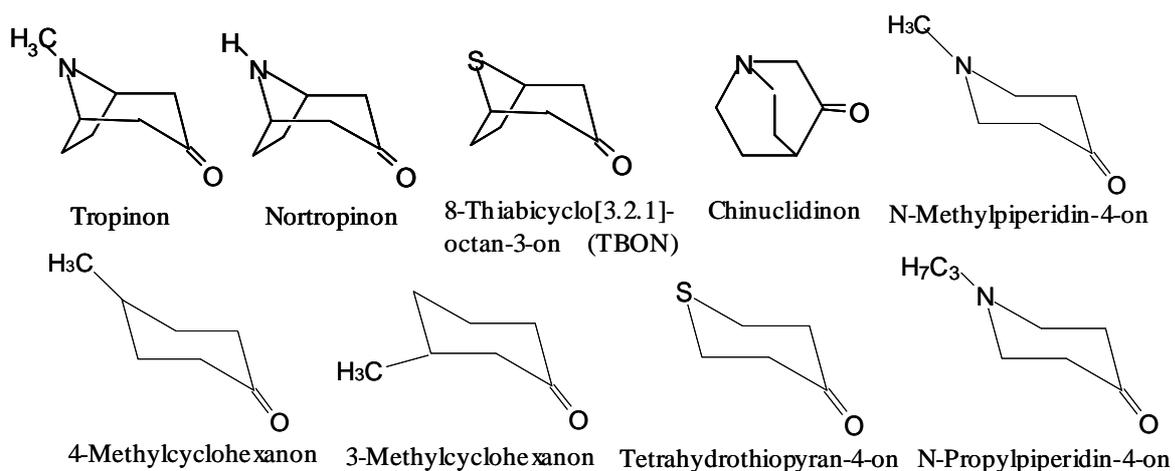


Abb. B- 3: Verwendete Substrate und Substratanaloga

B 2.3.6.5 Enzymhemmung

Zur Untersuchung der Hemmung der *Sd*-TRII wurden die aus B 2.4.3 ermittelten Substanzen verwendet und mit dem photometrischen Standardassay (B 2.3.5) gearbeitet. Die Aktivität des Enzyms wurde ohne und mit Zusatz an potentielltem Inhibitor bestimmt. Dem Assay wurde Tropinon als Substrat und die auf Inhibitorwirkung zu testende Substanz in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (Tab. C- 8). Die Substanzen wurden, wenn möglich in Wasser, ansonsten in DMSO gelöst. Alle Messungen wurden 3 bis 4fach wiederholt und Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

B 2.3.6.6 Colorimetrischer Enzymassay zur Bestimmung der PMT Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität der *Sd*-PMT wurde ein photometrischer Assay nach Biastoff eingesetzt [Biastoff et al., 2006]. Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT, E.C. 2.1.1.53) katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe auf Putrescin, wobei *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) als Cosubstrat dient und zu *S*-Adenosyl-L-homocystein (SAH) demethyliert wird. Aus SAH wird im Assay durch 5'-Methylthioadenosin Nukleosidase (MTAN, E.C. 3.2.2.9) und *S*-Ribosylhomocystein Lyase (LuxS, E.C. 4.4.1.21) Homocystein freigesetzt. Homocystein reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DNTB, Ellman's Reagenz) zu 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB), welches einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten bei 414 nm aufweist und so quantifiziert werden kann. Die Umsetzung wurde bei 414 nm im Microtiterplatten-Lesegerät (ThermoLabsystems Multiskan Ascent) verfolgt und mit der Software (Ascent Software Version 2.6) ausgewertet. Der Standardassay mit einem Volumen von 315 µl setzte sich aus 1-5 µg *Sd*-PMT, 17 µM LuxS, 0,3 µM MTAN, 3,8 mM Putrescin und 0,127 mM SAM in 100 mM HEPES-Puffer pH 8 zusammen. Diese Mischung wurde ohne SAM für 10 min bei 37 °C inkubiert (Thermomixer-Eppendorf). Dann wurde die Reaktion mit Zugabe von SAM gestartet. Es wurde 2-mal stark geschüttelt (Vortex Genie 2) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 60 µl abgenommen und mit 180 µl 244 µM DNTB gemischt. Dabei wurden jeweils 180 µl DNTB (244 µM) in den Kammern der Microtiterplatte vorgelegt. Nach 5 min bei 25 °C wurde bei 414 nm photometrisch vermessen.

B 2.4 *in silico* Methoden

B 2.4.1 Datenbanken

Um homologe 3D-Strukturen für die zu modellierenden Enzyme zu erhalten, wurde für Recherchen die Brookhaven Protein Data Bank ^(a) (PDB) eingesetzt [Dutta et al., 2007]. Die Protein Data Bank enthält dreidimensionale Strukturen von Proteinen und Nukleinsäuren [Henrick et al., 2008]. Es können Röntgenkristall-, NMR-Strukturen und homolog modellierte Strukturen abgefragt werden. Zur Suche homologer Nukleotid-Sequenzen und zur Sequenzanalyse kamen die biologischen Datenbanken Genbank ^(b) und EMBL ^(c) zum Einsatz. Es wurde mit der Software BLAST 2.2.2 ^(d), CLUSTAL W 1.83 ^(e) und FASTA 3.4t25 ^(f) gearbeitet. Die Datenbanken SWISSPROT ^(g) und BRENDA ^(h) wurden verwendet, da diese neben der Sequenz weitere Informationen, wie zum Beispiel Angaben über Proteinfamilien, Domänen und kinetische Enzymparameter enthalten [Bairoch und Apweiler, 2000; Schomburg et al., 2002].

(a) - (www.rcsb.org/pdb), (b) - (www.ncbi.nlm.nih.gov), (c) - (www.ebi.ac.uk);

(d) - (www.ebi.ac.uk/blast), (e) - (www.ebi.ac.uk/clustalw), (f) - (www.ebi.ac.uk/fasta),

(g) - (www.expasy.ch), (h) - (www.brenda.uni-koeln.de)

Für die *in silico* Untersuchung der Strukturähnlichkeit von Proteinen wird die Ähnlichkeit der Aminosäurepositionen über eine Substitutionsmatrix bestimmt. Solche Matrizen wurden aufbauend auf den Arbeiten von M. Dayhoff und S. Henikoff entwickelt [Dayhoff et al., 1978; Henikoff und Henikoff, 1992, 1993]. Die Substitutionsmatrix wird abhängig von der Ähnlichkeit der zu analysierenden Sequenzen und der zu bearbeiteten Thematik gewählt. Zur Identifizierung eines biologisch oder evolutionär konservierten Motivs, welches für Struktur- und Funktionsunterschiede verantwortlich ist, wird durch paarweises Alignment der zu analysierenden Sequenzen ein „phylogenetischer Baum“ erstellt. Mit dem erstellten Baum kann nach einem vorgegebenen Algorithmus ein multiples Alignment angefertigt werden. In dieser Arbeit wurde der BLAST⁽ⁱ⁾ Algorithmus genutzt [Corpet 1988; Altschul et al., 1990].

B 2.4.2 Komparative Modellierung

Für die Erstellung von Proteinmodellen der *Sd*-TRII wurde die Methode des Homologie-Modelling verwendet. Die Grundlage bildet dabei der Vergleich von Proteinen mit experimentell belegter 3D-Struktur (Röntgenkristall- oder NMR-Strukturen) mit der zu modellierenden Sequenz. Zum Auffinden homologer Proteine mit veröffentlichter 3D-Struktur wurde die Protein Data Bank (PDB) mit der zu modellierenden Proteinsequenz und BLAST-Suche durchsucht. Für die Strukturmodellierung wurde in freundlicher Kooperation mit PD Dr. Wolfgang Brandt (Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie, IPB, Halle) an *in Silicon*-Graphics Workstations mit der Software MOE[®] (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) und SYBYL[®] (SYBYL[®], Tripos Associates INC., St. Louis, MO; U.S.A.) gearbeitet. Die Software MOE[®] verwendet eine Datenbank-unterstützte Methode zur Entwicklung von Proteinmodellen. Dafür wird die 3D-Struktur eines Proteins mit bester Ähnlichkeit zum Zielprotein als Modellierungsvorlage (Template) verwendet. Zuerst wird durch die Software MOE[®] eine partielle Startgeometrie der zu modellierenden Sequenz initiiert, wobei Koordinaten von ausgewählten bzw. konservierten Sequenzbereichen des Templates kopiert werden. Das Programm kopiert alle Koordinaten von strukturell konservierten Regionen, ansonsten nur die Koordinaten des Peptidrückgrates. Anschließend folgt eine Boltzmann-Zufalls-Modellierungs-Prozedur zur möglichen Anpassung von Insertionen oder Deletionen [Levitt 1992]. Die Generierung einer frei wählbaren Anzahl von Startmodellen der Zielstruktur erfolgt unter Evaluierung von Peptidrückgrat, der Ausrichtung unpolarer Aminosäureseitenketten und potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen. Abschließend werden die Koordinaten des resultierenden Modells erstellt. Die Energie des Modells wird Kraftfeld abhängig minimiert und die Daten werden gespeichert. In dieser Arbeit wurden jeweils 10 Modelle berechnet und mit dem Charmm22-Kraftfeld optimiert [MacKerell et al., 1998]. Kraftfeld-Methoden können zur Vorhersage von Geometrie und Anordnung in großen Molekülen verwendet werden und ermöglichen die Berechnung von Konformations- und Wechselwirkungsenergien. Bei den hier vorgestellten Modellen wurde eine Optimierung ausgehend von der Templatestruktur und der Sekundärvorhersage vorgenommen.

(i) - (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

Wenn nötig wurde nachfolgend das optimierte Proteinrückgrat fixiert und ausgewählte Bereiche schrittweise optimiert. Begleitend wurde die stereochemische Qualität und die Geometrie der modellierten Proteinstruktur mit der Software PROCHECK (European Bioinformatics Institute, Cambridge, United Kingdom) evaluiert [Laskowski et al., 1993]. Das Programm zeigt an, ob in Aminosäuren unzulässige Geometrien in Torsionswinkeln, Bindungswinkeln und -längen oder sterische Behinderungen benachbarter Atome auftreten. Durch das Programm kann ein Ramachandran-Plot generiert werden, wobei die Torsionswinkel Φ und Ψ des Peptids gegeneinander aufgetragen werden [Laskowski et al., 1993]. Damit kann beurteilt werden, ob z.B. Diederwinkel in Aminosäuren unerlaubte Werte aufweisen und eventuell korrigiert werden sollten. Zur zusätzlichen Qualitätsbewertung der optimierten Modelle wurde das Programm PROSA II (PROtein Structure Analysis, Center Of Applied Molecular Engineering, Salzburg, Austria) verwendet [Sippl 1990; 1993]. Dies ist ein Programm zur Analyse und Abschätzung der Proteinfaltung. Es berechnet Konformationsenergien der Modellstrukturen und stellt diese als Energiegraph dar. Dabei korrelieren negative Energien mit stabilen Faltungsbereichen, und positive Energien weisen auf nicht nativ gefaltete Bereiche hin. Das Programm gibt die Energie mit einem z-score Wert an, der von der Sequenzlänge abhängig ist. Eine allgemeine Formel zur Berechnung der Energie eines nativ gefalteten Proteins ist: $y = -6,67 - 0,0141\chi$ (χ = Sequenzlänge). Starke positive Abweichungen der erhaltenen Werte für das modellierte Protein würden auf eine nicht nativ gefaltete Struktur hinweisen.

B 2.4.3 *in silico* Screening

Das *in silico* Screening wurde eingesetzt, um Strukturen in Datenbanken zu suchen, die potentiell mit dem aktiven Zentrum des Enzyms interagieren. Dafür wurde vom natürlichen Substrat Tropinon der TRII ein Pharmakophor abgeleitet und für die Suche eingesetzt.

Ausgehend vom Tropinon wurden mit MOE[®] zwei Pharmakophore erstellt, die sich aus der räumlichen Anordnung hydrophober Molekülbereiche, Protonendonator- und Protonenakzeptorregion ableiten (Abb. B- 4). Dabei bildet das Tropangrundgerüst die Angriffsfläche für hydrophobe Wechselwirkungen. An den entsprechenden Molekülbereichen wurden Sphären definiert. Die Position und Größe der hydrophoben Sphären wurde so gewählt, dass sie in den funktionalen Bereich des aktiven Zentrums ragen und potentiell Interaktionen eingehen könnten. Die geometrischen Funktionalitäten des Pharmakophors wurden weiterhin nach der räumlichen Anordnung der Protonendonator- (D) und Protonenakzeptorregion (A) definiert. Der Brückenstickstoff wurde als Protonendonator definiert, da Tropinon im Protein protoniert vorliegt. Da viele in der Datenbank vorhandene Verbindungen nicht im protonierten Zustand gespeichert waren und bei einer Testsuche nicht gefunden wurden, wurde ein zweites Pharmakophor mit Protonenakzeptor-Region am Brückenstickstoff definiert. Mit diesem Pharmakophor wurde Tropinon als natürliches Substrat in der Datenbank gefunden. Bei der eigentlichen Pharmakophorsuche wurde ein *Partial Match* mit mindestens 3 Merkmalen angewendet. Es wurden zwei hausinterne Datenbanken mit über 1 Million Strukturen durchsucht. Die ausgewählten Verbindungen wurden gedockt (B 2.4.4).

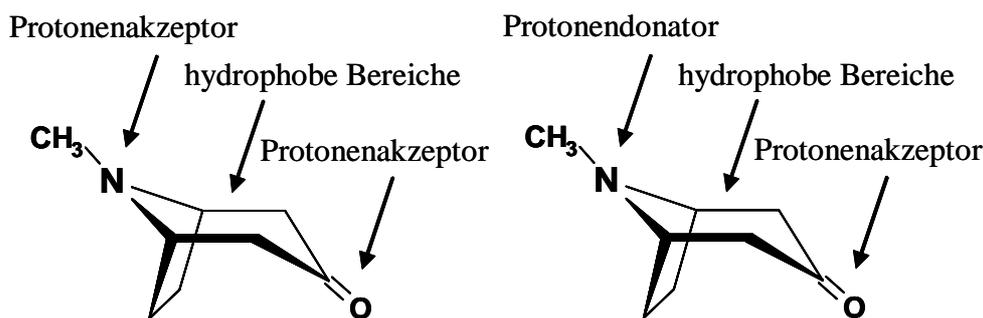


Abb. B- 4: Schematische Darstellung der zwei definierten Pharmakophore

B 2.4.4 Dockingstudien

Dockingstudien wurden in dieser Arbeit mit dem Programm GOLD (Genetic Optimization Ligand Docking, Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, United Kingdom) durchgeführt. Im Programm GOLD wird gezielt die pharmakophore Ligandenkonformation generiert. Dabei spielt die Startkonformation des Liganden eine weniger wichtige Rolle.

GOLD nutzt einen genetischen Algorithmus, um die passende Ligandenkonformation zu konfigurieren. Ein Parameter zur Beurteilung der Ligand-Protein-Interaktionen ist die GOLDScore Fitness Funktion. Diese Funktion beurteilt Wasserstoffbrückenbindungen sowie van der Waals Kontakte zwischen Ligand und Protein, interne Ligandenenergie und Liganden Torsionskräfte. Die Funktion wurde experimentell entwickelt [Jones et al., 1997].

Die Beurteilung oder Abschätzung der zu erwartenden Bindungsaffinität der Ligand-Protein-Interaktionen erfolgte über die Berechnung der Wechselwirkungsenergie der Liganden zum Protein. Die realen Wechselwirkungsenergien konnten nur abgeschätzt werden, da in der Berechnung durch Gold die Entropie-, Solvations- bzw. Desolvationseffekte unberücksichtigt blieben.

Um diese Effekte in die Beurteilung einzubeziehen, wurde das Programm SCORE verwendet [Wang et al., 1998; 2003]. Das Programm nutzt eine empirische Bewertungsfunktion, um die freie Bindungsenergie zu beschreiben. Diese Funktion beinhaltet Einzelterme für Desolvationseffekte, Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals Kontakte, Metall-Ligand-Bindungen und Deformationen, die während des Bindungsprozesses auftreten können. Die errechneten Werte geben die Bindungsaffinitäten eines Liganden zum Protein wieder. Dies würde für Enzyminhibitoren dem pK_i -Wert entsprechen. Die berechneten Werte können allerdings nicht für Substrate mit experimentell ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten gleichgesetzt werden, da die K_m -Werte nicht die reine Affinität des Liganden zum Protein wiedergeben.

Die Lage der Liganden wurde mit GOLD zusätzlich visuell evaluiert, um Verbindungen für *in vitro* Tests auszuwählen.

C Ergebnisse

C 1 Tropanalkaloide und Tropinonreduktase-Aktivität in *Solanum*-Arten

C 1.1 Calystegin-Akkumulation

Der Gehalt an Calysteginen und den Intermediaten der Calysteginbiosynthese: Tropinon, Tropin und Pseudotropin, sowie die Aktivität der Tropinonreduktion wurden gewebespezifisch in verschiedenen *Solanum*-Arten bestimmt. Ziel war es, Arten mit hohen Calystegingehalten, neuartigen Calysteginmustern bzw. sehr geringen Calystegingehalten zu detektieren, um später an ausgewählten Arten Unterschiede in der Biosynthese zu untersuchen. Dafür wurden *S. dulcamara* L., *S. mitlense* Dun., *S. muricatum* L'Hérit. ex Ait, *S. nigrum* L. em. Mill., *S. nodiflorum* Jacq., *S. rantonnettii* Carr. ex Lescuy. und *S. sisymbriifolium* Lam. verwendet (B 1.1). Die Pflanzen wurden in verschiedene Gewebe separiert und analysiert. Es konnten Unterschiede in der Höhe der Calysteginakkumulation festgestellt werden (Abb. C- 1, Abb. C- 2). So enthielten *S. dulcamara* und *S. muricatum* Calystegine bis ~16 $\mu\text{mol/g}$ TM. *S. mitlense*, *S. rantonnettii* und *S. sisymbriifolium* konnten Calystegine bis ~2,5 $\mu\text{mol/g}$ TM akkumulieren. Niedrigere Calystegingehalte wiesen *S. nodiflorum* und *S. nigrum* mit Maximalwerten von ~0,5 $\mu\text{mol/g}$ TM auf. *S. nigrum* zeigte den geringsten Calystegingehalt aller untersuchten Arten mit maximal ~0,2 $\mu\text{mol/g}$ TM in jungen Blättern.

Da in wild gesammelten *S. nigrum* und in kultivierten *S. nigrum* Pflanzen Calystegine nur in Spuren detektiert werden konnten, wurden Pflanzen vergleichend ungedüngt oder mit Harnstoff gedüngt analysiert. Die Anzucht erfolgte in genormten Mitscherlich-Gefäßen (\emptyset 20,5 cm, Höhe 17 cm) im Kalthaus des Institutes für Agrar- und Ernährungswissenschaften der MLU Halle-Wittenberg mit freundlicher Unterstützung durch Sven Freydanck. Gedüngt wurde mit einer einmaligen Harnstoffdosis von 1,3 g je Mitscherlich-Gefäß. Nach 4 Monaten wurden die Pflanzen analysiert. Calystegine konnten in *S. nigrum* nur in den gedüngten Pflanzen detektiert werden (Abb. C- 2).

Tab. C- 1: Calysteginvorkommen in den *Solanum*-Arten

| Spezies | Calystegine | | | | |
|---------------------------|-------------|----|----|----|----|
| | A3 | A5 | B1 | B2 | B3 |
| <i>S. dulcamara</i> | x | x | x | x | |
| <i>S. mitlense</i> | x | x | x | x | |
| <i>S. muricatum</i> | x | x | | x | |
| <i>S. nigrum</i> | x | | | | |
| <i>S. nodiflorum</i> | x | x | | x | |
| <i>S. rantonnettii</i> | | | x | x | x |
| <i>S. sisymbriifolium</i> | x | x | | x | |

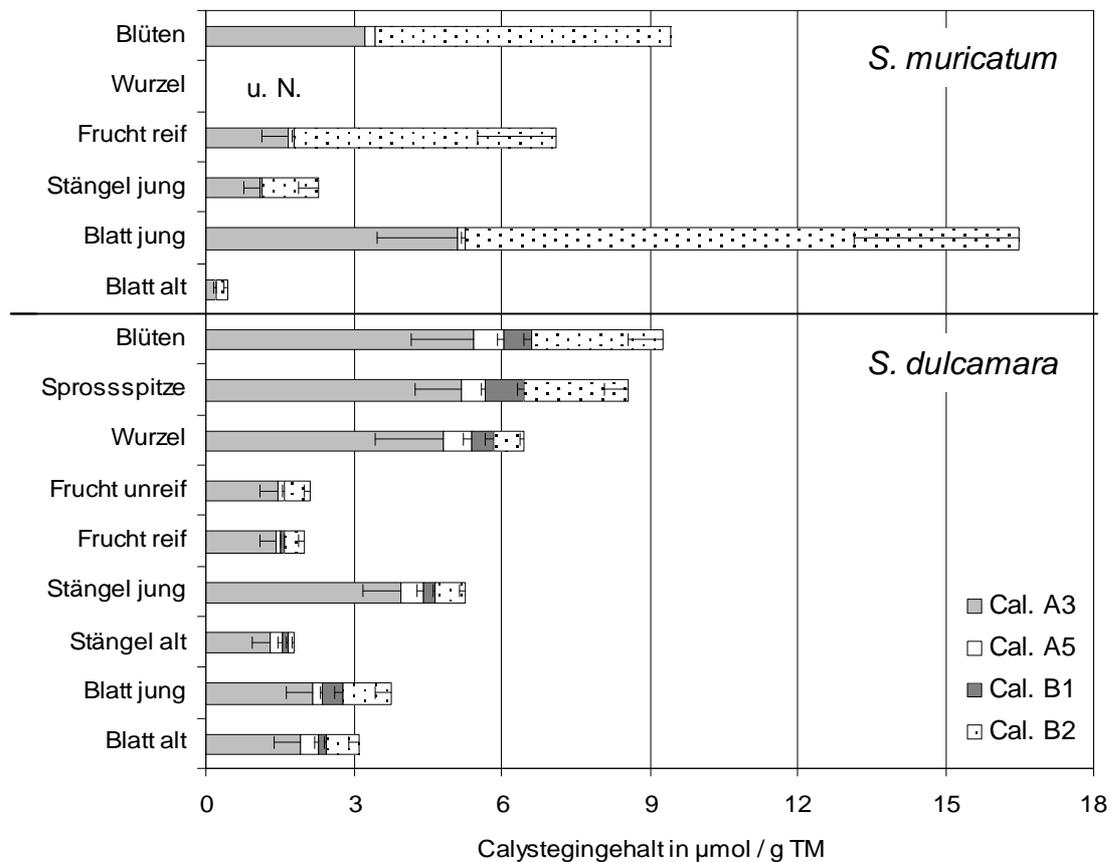


Abb. C- 1: Calystegingehalt in den *Solanum*-Arten *S. muricatum* und *S. dulcamara*, Werte sind Mittelwerte einer 3-9fach Bestimmung, Standardabweichung ist als Balken angegeben. Werte ohne Standardabweichung sind Mittelwerte aus einer 2fach Bestimmung. u. N. = Werte unter der Nachweisgrenze

Der Calystegingehalt und das Muster der quantifizierten Calystegine unterschieden sich in den *Solanum*-Arten (Abb. C- 1, Abb. C- 2, Tab. C- 1). *S. rantonnetii* wies nur Calystegine der B-Gruppe auf. In gedüngten *S. nigrum* konnte ausschließlich Calystegin A₃ nachgewiesen werden. Calystegine verschiedener Struktur wurden in *S. dulcamara* detektiert. Der höchste Gehalt an Calystegin A₃ mit bis zu ~5 µmol/g TM wurde in Blüten, Sprossspitzen und Wurzeln gefunden (Abb. C- 1).

In *S. dulcamara* überwiegt Calystegin A₃ in allen untersuchten Geweben. Das ist für *Solanum*-Arten ungewöhnlich. Bisher wurde Calystegin B₂ als dominantes Calystegin beschrieben [Keiner und Dräger, 2000], was sich in den Arten *S. mitlense*, *S. sisymbriifolium* und *S. muricatum* bestätigte. Die Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der Gattung *Solanum* Unterschiede in Gehalt und Muster der Calystegine vorhanden sind.

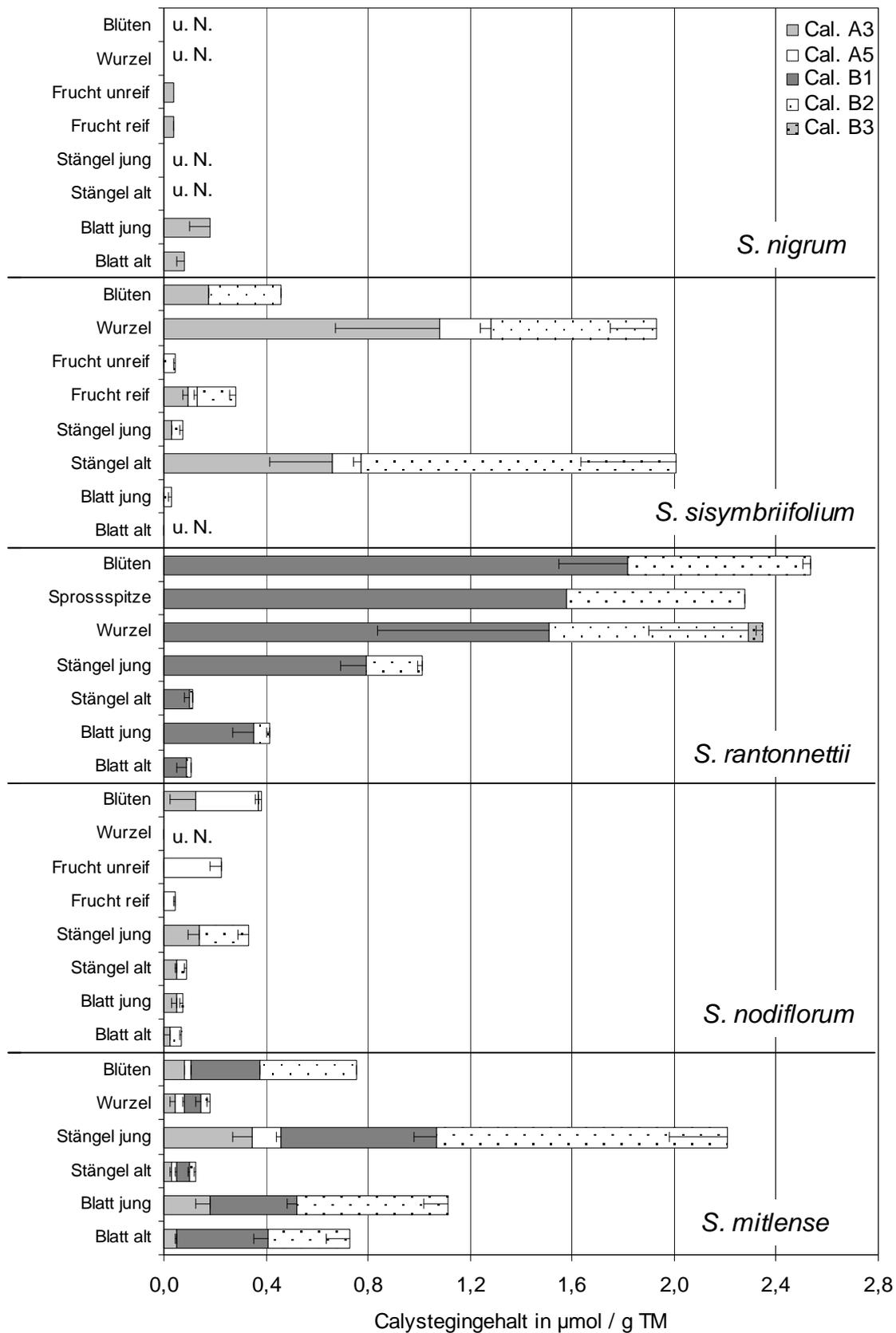


Abb. C- 2: Calystegingehalt in den *Solanum*-Arten *S. nigrum*, *S. sisymbriifolium*, *S. rantonnettii*, *S. nodiflorum* und *S. mitlense*, Werte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung. Standardabweichung ist als Balken angegeben. Werte ohne Standardabweichung waren Einzelbestimmungen oder Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

C 1.2 Akkumulation der Intermediate der Calysteginbiosynthese

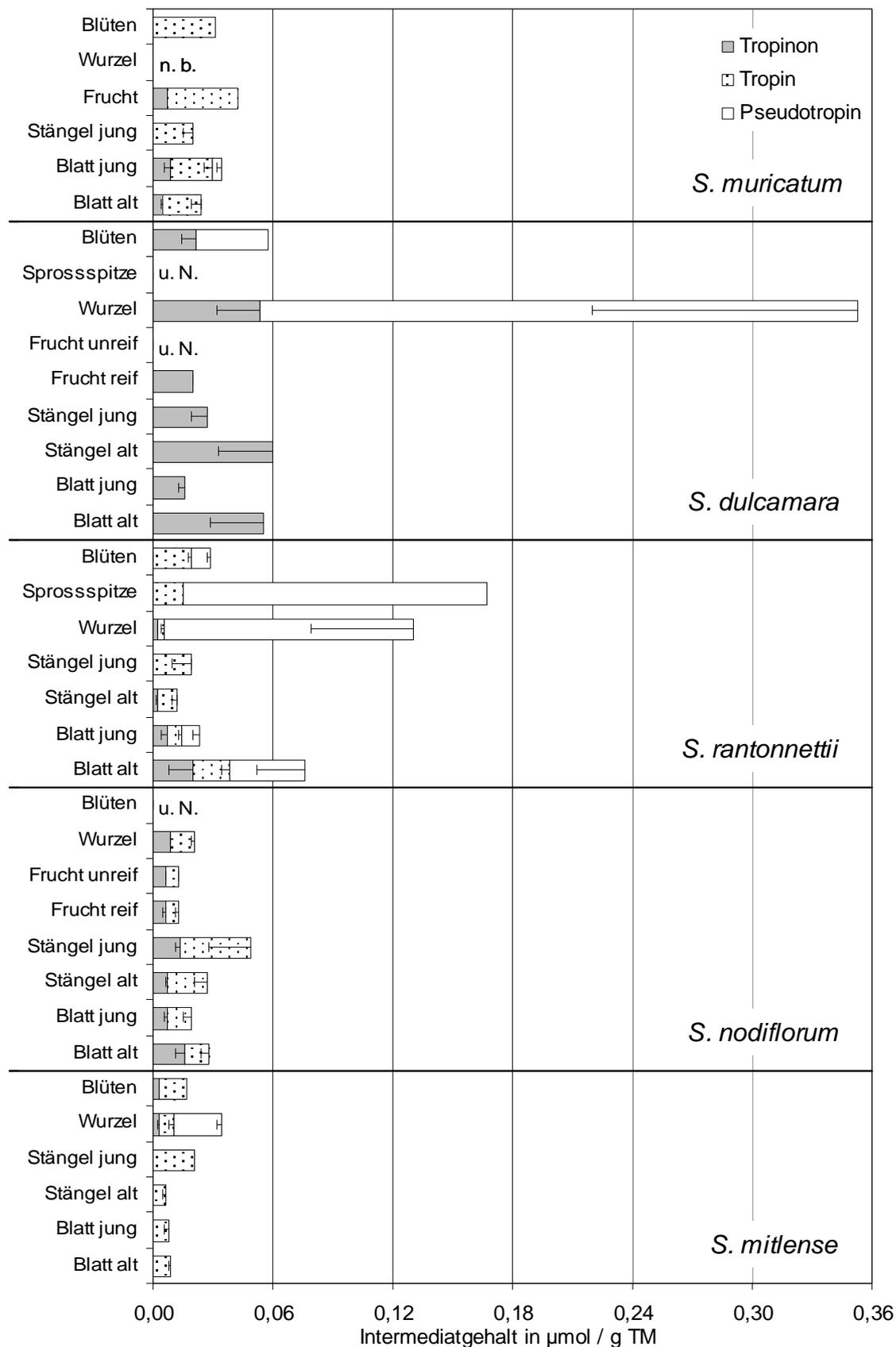


Abb. C- 3: Intermediatgehalt in den *Solanum*-Arten *S. muricatum*, *S. dulcamara*, *S. rantonnettii*, *S. nodiflorum* und *S. mitlense*, Werte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung. Standardabweichung ist als Balken angegeben. Werte ohne Standardabweichung stammen aus einer 1 bzw. 2fach Bestimmung.; n. b. = nicht bestimmt, u. N. = Werte unter der Nachweisgrenze

In den Geweben der unter C 1.1 aufgeführten Pflanzen wurden der Gehalt der Intermediate der Biosynthese Tropinon, Tropin und Pseudotropin bestimmt (Abb. C- 3, Abb. C- 4). Ein Gesamtintermediatgehalt bis zu $\sim 0,9 \mu\text{mol/g TM}$ konnte in *S. sisymbriifolium* detektiert werden. In *S. dulcamara* wurde Tropinon und Pseudotropin mit einem Gesamtgehalt bis $\sim 0,35 \mu\text{mol/g TM}$ nachgewiesen. *S. nigrum* akkumulierte als Intermediat nur Tropinon. Dabei wurde die Intermediat-Akkumulation der mit Harnstoff gedüngten Pflanzen mit den ungedüngten Pflanzen verglichen (C 1.1). Es zeigte sich in den Wurzeln eine bis zu 60fach höhere Tropinonkonzentration in der mit Harnstoff behandelten Variante (Abb. C- 4).

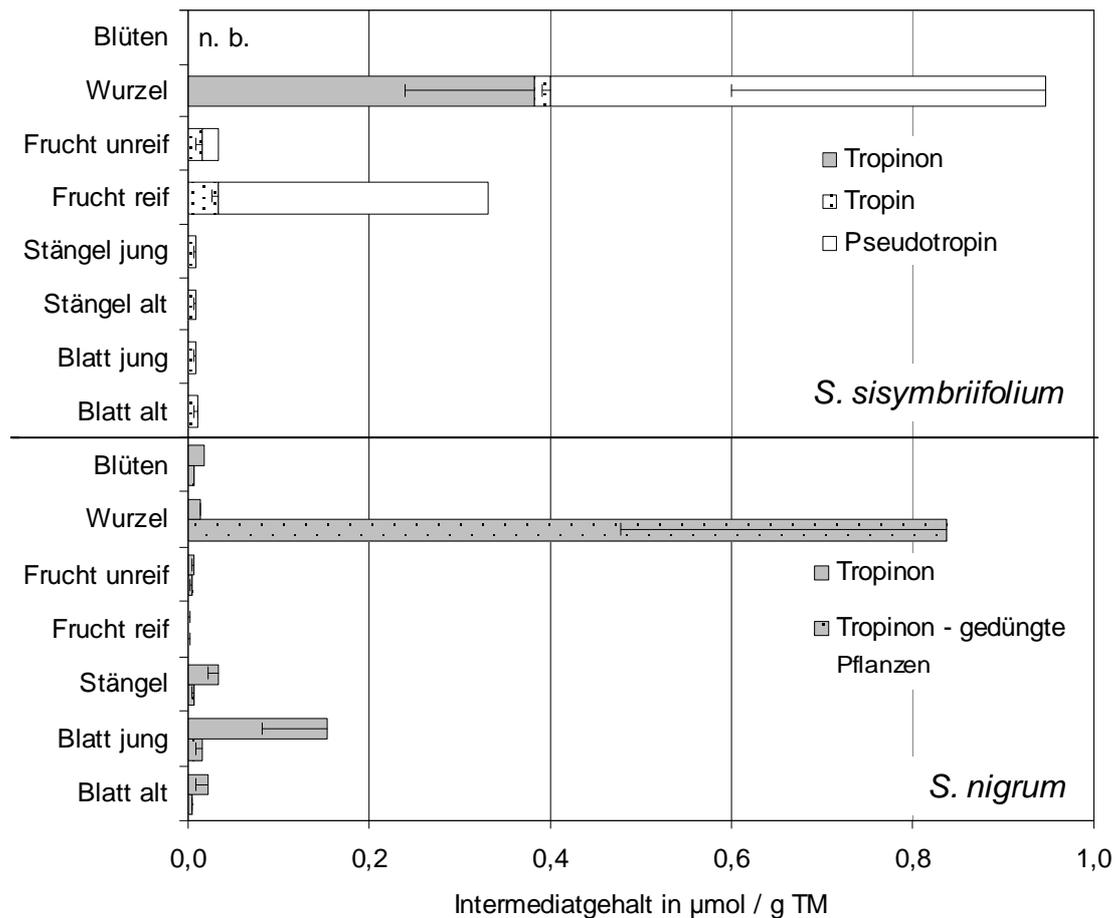


Abb. C- 4: Intermediatgehalt in den *Solanum*-Arten *S. sisymbriifolium* (Werte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung. Standardabweichung ist in Balken angegeben.) und *S. nigrum* (Werte sind Mittelwerte einer 5fach Bestimmung. Werte, die mehr als 50 % vom Mittelwert abwichen, wurden nicht mit in die Berechnung einbezogen. Standardabweichung ist als Balken angegeben.), n. b. = nicht bestimmt

C 1.3 Tropinonreduktase-Aktivität

Die Aktivität der Tropinonreduktion wurde gewebespezifisch in den *Solanum*-Arten (C 1.1) bestimmt (B 2.3.2, B 2.3.5). In einigen Geweben war die Tropinonreduktase-Aktivität so gering, dass sie nicht photometrisch erfasst werden konnte. Um dennoch Hinweise auf aktive Tropinonreduktasen im Gewebe zu erhalten, wurde mit einem NADPH-regenerierenden System (B 2.3.5) gearbeitet. So konnten auch bei einer geringen Tropinonreduktase-Aktivität die Reaktionsprodukte detektiert werden. Aus den Enzymassays wurden die

Reaktionsprodukte (B 2.1.2) extrahiert und mit Dünnschichtchromatographie analysiert (B 2.1.11). Pseudotropin weist auf eine aktive TRII und Tropin auf eine aktive TRI im Pflanzengewebe hin. Die stereospezifische Aktivität der Tropinonreduktion weist Unterschiede innerhalb der Gattung *Solanum* auf (Tab. C- 2).

Tab. C- 2: Reaktionsprodukte des Inkubationsassays auf Tropinonreduktase-Aktivität, Ti = Tropin, Ps = Pseudotropin, n. b. = nicht bestimmt, x = positives Signal mit DC, - = kein Signal mit DC

| <i>Solanum</i> -Art | <i>dulcamara</i> | | <i>muricatum</i> | | <i>nodiflorum</i> | | <i>rantonnettii</i> | | <i>sisymbriifolium</i> | | <i>mitlense</i> | | <i>nigrum</i> | |
|---------------------|------------------|----|------------------|----|-------------------|----|---------------------|-------|------------------------|-------|-----------------|-------|---------------|----|
| | Ps | Ti | Ps | Ti | Ps | Ti | Ps | Ti | Ps | Ti | Ps | Ti | Ps | Ti |
| Blatt alt | x | - | x | x | - | x | x | - | - | x | - | - | - | x |
| Blatt jung | x | - | x | x | - | x | x | x | - | x | - | - | - | x |
| Stängel alt | x | - | n. b. | | - | x | - | - | - | - | - | - | - | x |
| Stängel jung | x | - | x | - | - | x | x | x | - | - | - | - | - | x |
| Frucht reif | x | - | x | x | - | x | | n. b. | - | - | | n. b. | - | - |
| Frucht unreif | x | - | n. b. | | - | - | | n. b. | x | x | | n. b. | - | x |
| Wurzel | x | - | n. b. | | - | - | - | - | x | - | | n. b. | - | - |
| Sprossspitze | x | - | n. b. | | n. b. | | x | x | | n. b. | | n. b. | - | x |
| Blüten | x | - | n. b. | | - | x | x | - | - | x | | - | - | x |

In Enzymassays auf Tropinonreduktase-Aktivität mit Proteinextrakten aus *S. muricatum*, *S. rantonnettii* und *S. sisymbriifolium* wurde sowohl Pseudotropin als auch Tropin als Reaktionsprodukt detektiert. In *S. mitlense* konnte weder die Bildung von Tropin noch von Pseudotropin nachgewiesen werden. *S. dulcamara* wies ausschließlich Pseudotropin als Reaktionsprodukt auf. Im Gegensatz dazu wurde in *S. nigrum* und *S. nodiflorum* nur Tropin als Produkt nachgewiesen. Die Tropinonreduktase-Aktivität konnte in Geweben von *S. nigrum* photometrisch quantifiziert werden. Dabei zeigten die mit Harnstoff gedüngten Pflanzen (C 1.1) in den Stängeln eine bis zu 3fach höhere Tropinonreduktase-Aktivität (Abb. C- 5). Die übrigen Gewebe zeigten keine Unterschiede in der Höhe der Tropinonreduktase-Aktivität. Das alleinige Reaktionsprodukt Tropin weist darauf hin, dass die gemessene Aktivität nur auf eine TRI zurückzuführen ist.

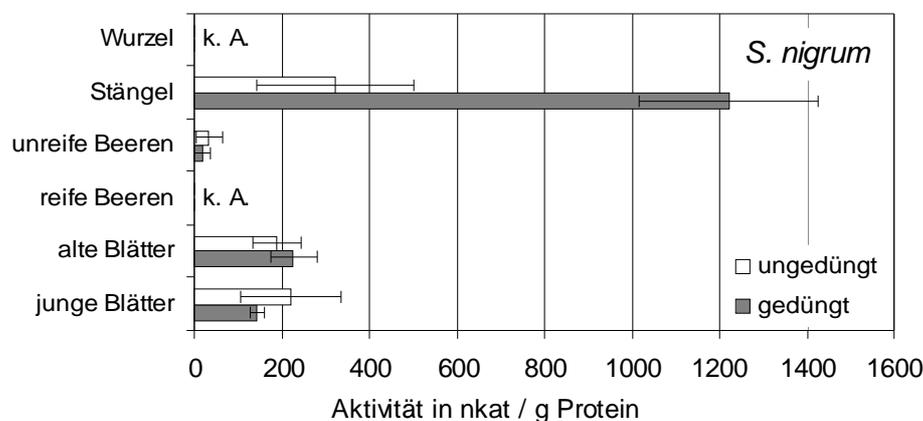


Abb. C- 5: Tropinonreduktase-Aktivität in *S. nigrum*, Die Werte sind Mittelwerte einer 3-4fach Bestimmung. Standardabweichung ist als Balken angegeben.; k. A. = keine Aktivität messbar

C 1.4 Wurzelkulturen

In den Arten *S. nigrum*, *S. nodiflorum* und *S. dulcamara* konnte jeweils nur eine der beiden stereospezifischen Tropinonreduktasen nachgewiesen werden. Die Calysteginakkumulation in *S. nigrum* war von allen untersuchten Arten am geringsten. *S. dulcamara* stellt eine Art mit hohen Calystegingehalten in jedem Gewebe dar. Aus diesem Grund wurden die Arten *S. nigrum* und *S. dulcamara* für weitere Untersuchungen an der Calysteginbiosynthese ausgewählt. Um ein stabiles experimentelles System für Fütterungsversuche zu erhalten, wurde jeweils eine Wurzelkultur angelegt (B 1.1) und auf Tropanalkaloid-Gehalt (B 2.1.1, B 2.1.2) und Tropinonreduktase-Aktivität (B 2.3.2, B 2.3.5) analysiert.

In der Wurzelkultur aus *S. nigrum* konnten weder Tropanalkaloide noch Tropinonreduktase-Aktivität detektiert werden. In der *S. dulcamara* Wurzelkultur konnten Calystegine, die Intermediate Tropinon und Pseudotropin, sowie Tropinonreduktase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. C- 6). Eine Tropinonreduktase-Aktivität wurde über einen Zeitraum von 35 Tagen detektiert (Abb. C- 6). Das als Reaktionsprodukt nachgewiesene Pseudotropin weist auf eine aktive TRII in der Wurzelkultur hin. Die Calysteginkonzentration liegt vom 7. Tag bis zum 35. Tag zwischen 3-7 $\mu\text{mol/g}$ Trockenmasse.

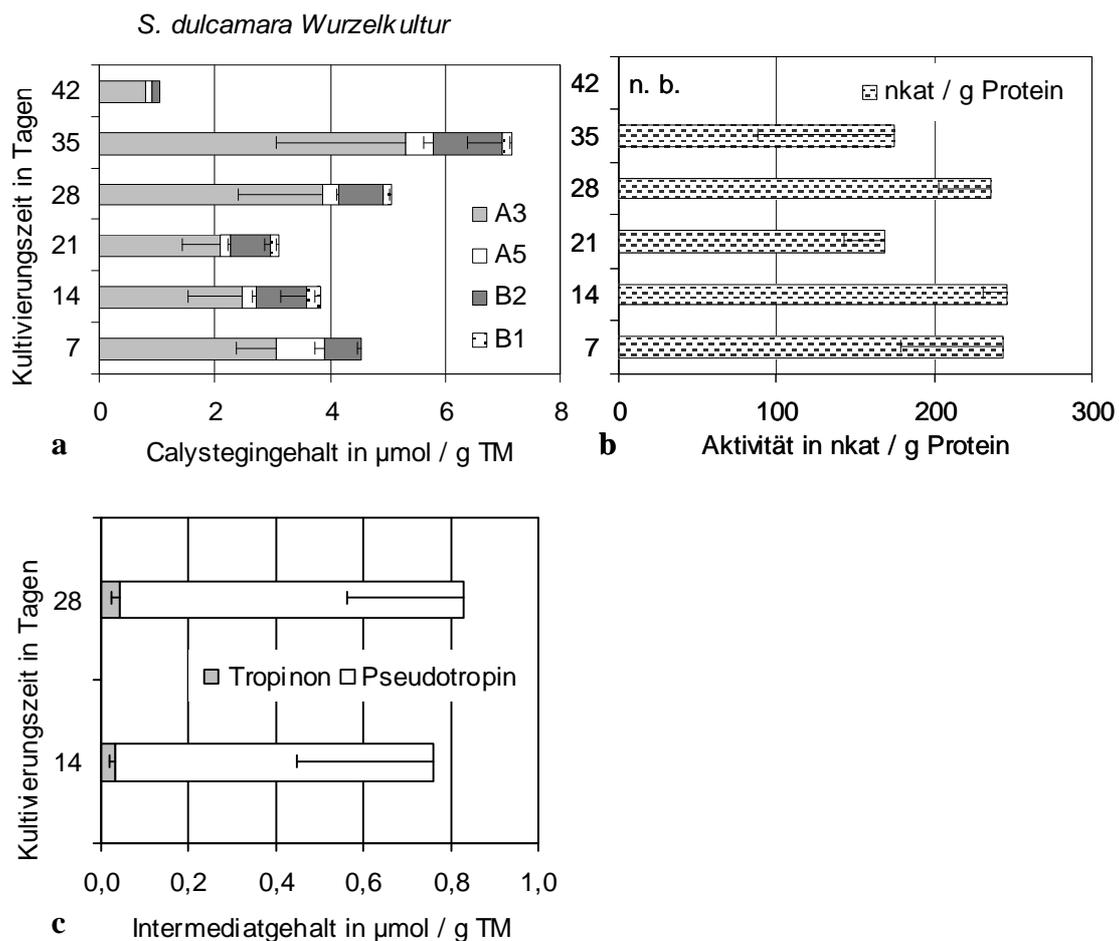


Abb. C- 6: a) Gesamtcalystegingehalt, Werte bei 42 Tagen sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung. b) Tropinonreduktase-Aktivität, c) Intermediatgehalt; Werte sind Mittelwerte aus 3-4 Bestimmungen. Standardabweichung ist als Balken angegeben.; n. b. = nicht bestimmt

Der Gehalt an Calystegin A₃ überwog zu jedem Zeitpunkt im Calystegingemisch. Zum 42. Tag sinkt der Calystegingehalt auf 1 µmol/g Trockenmasse ab (Abb. C- 6).

Die *S. dulcamara* Wurzelkultur zeigte sowohl eine stabile TRII Aktivität als auch eine stabile Synthese der Calystegine über einen Zeitraum von 35 Tagen und kann mit diesen Eigenschaften für weitere Experimente zur Calysteginbiosynthese eingesetzt werden. Die *S. nigrum* Wurzelkultur wurde aufgrund fehlender TR Aktivität und Tropanalkaloid-Akkumulation nicht für weitere Experimente der Tropanalkaloidbiosynthese verwendet.

C 1.5 Tropinonumsatz in Pflanzengewebe und Wurzelkulturen

Mit der Applikation von Tropinon an frisches Pflanzengewebe und Wurzelkulturen von *S. nigrum* und *S. dulcamara* wurde die stereospezifische Reduktion von Tropinon gewebespezifisch untersucht. Dazu wurde zu sterilen Pflanzen von *S. dulcamara* 10 ml wässrige 5 mM Tropinonlösung gegeben. Nach 14 Tagen wurde der Gehalt an Tropinon, Tropin und Pseudotropin im Pflanzengewebe bestimmt. Um die Produkte der Tropinonreduktion in der *S. dulcamara* Wurzelkultur zu analysieren, wurden 5 mM Tropinon und als Kontrolle 5 mM NaCl zum Nährmedium gegeben (B 1.1). Weiterhin wurde eine unbehandelte Kontrolle angelegt.

Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurde die Tropinonkonzentration im Nährmedium bestimmt. Die kontinuierliche Abnahme des Tropinons im Nährmedium, bis zu ~90 % des applizierten Tropinons nach 10 Tagen, belegte die Aufnahme in die Wurzelkultur. Die Gehalte an Pseudotropin und Tropinon in der Wurzelkultur weisen nur auf eine aktive TRII hin. Tropin als Reaktionsprodukt konnte nicht detektiert werden. In der intakten Pflanze konnten dagegen nach Tropinonapplikation auch geringe Mengen an Tropin bestimmt werden (Tab. C- 3). Dies weist auf eine, wenn auch geringe, TRI Aktivität in der Pflanze hin.

An Wurzelkulturen von *S. nigrum* wurde ebenfalls eine 5 mM Tropinonlösung appliziert. Es konnte eine Aufnahme des Tropinons in die Wurzelkultur beobachtet werden, jedoch konnten die Reduktionsprodukte Tropin und Pseudotropin nicht nachgewiesen werden. An oberirdisches Pflanzenmaterial (Blätter und Stängel) von *S. nigrum* wurde 5 mM Tropinonlösung appliziert. Als Reduktionsprodukt wurde nur Tropin nachgewiesen. Dies lässt auf eine aktive TRI im oberirdischen Pflanzengewebe schließen (Daten nicht gezeigt).

Tab. C- 3: Intermediatgehalt in Pflanzen und Wurzelkulturen von *S. dulcamara*, Werte sind aus 3-6fach Bestimmungen. Standardabweichung ist in Balken angegeben.; n. d. = nicht detektierbar

| Gehalt in <i>S. dulcamara</i> | sterile Pflanzen nach 14 tägiger Applikation von 5 mM Tropinon | | Pflanzen aus Wildsammlung | | Wurzelkultur nach 10 tägiger Applikation von 5 mM Tropinon | | Wurzel- kultur 10 Tage alt unbehandelt |
|----------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|-------------|--|------------|---|
| | Wurzeln | Oberirdisches Pflanzenmaterial | Wurzeln | Blatt alt | Tropinon | NaCl | |
| Tropinon | 6,7±1,8 | 1,3±0,72 | 0,054±0,022 | 0,055±0,026 | 1,41±0,23 | 0,96±0,029 | 0,049±0,025 |
| Tropin | 3,1±1,0 | 2,5±0,45 | n. d. | | n. d. | | n. d. |
| Pseudotropin | 337,8±25,4 | 78,8±11,1 | 0,299±0,133 | n. d. | 470,0±89,3 | 4,04±1,74 | 1,43±0,39 |

C 2 Tropinonreduktase II – *Solanum dulcamara*

C 2.1 Isolierung einer *trII* homologen cDNA Sequenz aus *S. dulcamara*

Da in Enzymassays mit nativ extrahiertem Protein und nach Tropinon-Applikation an *S. dulcamara* Wurzelkulturen Pseudotropin detektiert werden konnte, sollte eine aktive TRII in *S. dulcamara* vorhanden sein. Die cDNA Sequenz der Tropinonreduktase II wurde durch PCR mit degenerierten Primern aus cDNA umgeschriebener mRNA gewonnen. Die mRNA stammte aus einer 14 Tage alten *S. dulcamara* Wurzelkultur. Für die Generierung eines ersten Amplifikates wurden Primer eingesetzt, die aus homologen Bereichen bekannter Tropinonreduktasen [*S. tuberosum* (*St-trI*: AJ 307584, *St-trII*: AJ245634), *H. niger* (*Hn-trI*: D 88156/AB 026544, *Hn-trII*: L20485), *D. stramonium* (*Ds-trI*: L 20473, *Ds-trII*: L 20474)] abgeleitet wurden. Die hier verwendeten Primer wurden freundlicherweise von Dr. Yvonne Sichhart zur Verfügung gestellt [Sichhart 2003]. Mit der Primerkombination *trII-dir-int* und *trII-rev-int* konnte ein TRII ähnliches Amplifikat von 677 Nukleotiden Länge generiert werden (B 1.7), welches 93 % Identität zur *trII* aus *S. tuberosum* (AJ245634) zeigte. Vervollständigt wurde die Sequenz mit RACE-PCR (B 2.2.4). Die Primer *Sd-trII-GSP1* und *Sd-trII-GSP2* wurden für 5'-RACE und die Primer *Sd-trII-GSP3* und *Sd-trII-GSP4* für 3'-RACE jeweils mit den entsprechenden Ankerprimern verwendet (B 1.5). Der gesamte offene Leserahmen der TRII wurde mit den Primerpaaren *Sd-trII-dir-NcoI/Sd-trII-rev-NotI* und *Sd-trII-dir-BamHI/Sd-trII-rev-SphI* mit *Pfu*-DNA-Polymerase (B 1.7) aus der cDNA generiert. Die Sequenz zeigte auf Nukleotid- und Aminosäureebene hohe Identität zu bekannten Tropinonreduktasen (Tab. C- 4, Abb. C- 7). Die höchste Identität der Aminosäuresequenz besteht zur TRII aus *S. tuberosum* mit 98 %.

Das errechnete Molekulargewicht der *Sd*-TRII liegt bei 28,3 kDa und der errechnete isoelektrische Punkt bei pH 5,34. Die Werte wurden mit der ExpASY Datenbank und dem Programm ProtParam erstellt. Die Aminosäuresequenz der *Sd*-TRII ist in Abb. C- 7 aufgeführt.

Tab. C- 4: Identitäten der Aminosäuresequenzen bekannter Tropinonreduktasen in % erstellt mit CLUSTAL W (1.83)

| | aa | <i>Sd</i> - TRII | <i>St</i> - TRII | <i>Hn</i> - TRII | <i>Ds</i> - TRII | EMBL |
|-----------------|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|
| <i>Sd</i> -TRII | 261 | 100 | 98 | 94 | 91 | AM947940 |
| <i>St</i> -TRII | 261 | | 100 | 95 | 91 | AJ245634 |
| <i>Hn</i> -TRII | 260 | | | 100 | 93 | L20485 |
| <i>Ds</i> -TRII | 260 | | | | 100 | L20474 |

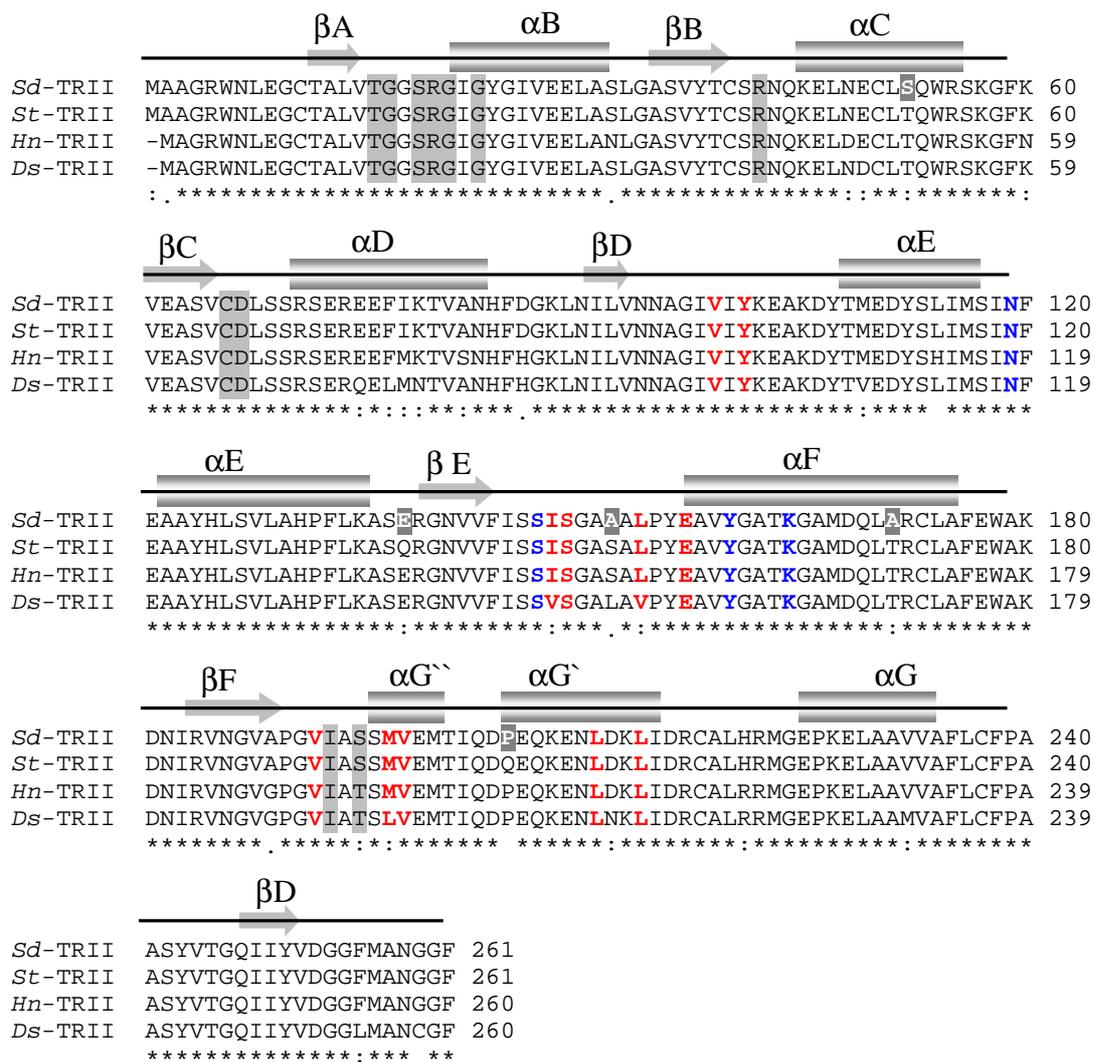


Abb. C- 7: Vergleich der TRII-Proteinsequenzen von *S. dulcamara* (*Sd*-TRII, AM947940), *S. tuberosum* (*St*-TRII, AJ245634), *H. niger* (*Hn*-TRII, L20485) und *D. stramonium* (*Ds*-TRII, L20474), erstellt mit CLUSTAL W (1.83), * identische AS; : ähnliche AS; . unterschiedliche AS, grau unterlegt: AS der NADPH-Bindungsstelle, blau: katalytische Tetrade, rot: AS der Substrat-Bindungsstelle, weiße Schrift grau unterlegt: unterschiedliche AS zwischen *Sd*-TRII und *St*-TRII; Tertiärstrukturdarstellung: a = Helix, b = Faltblatt

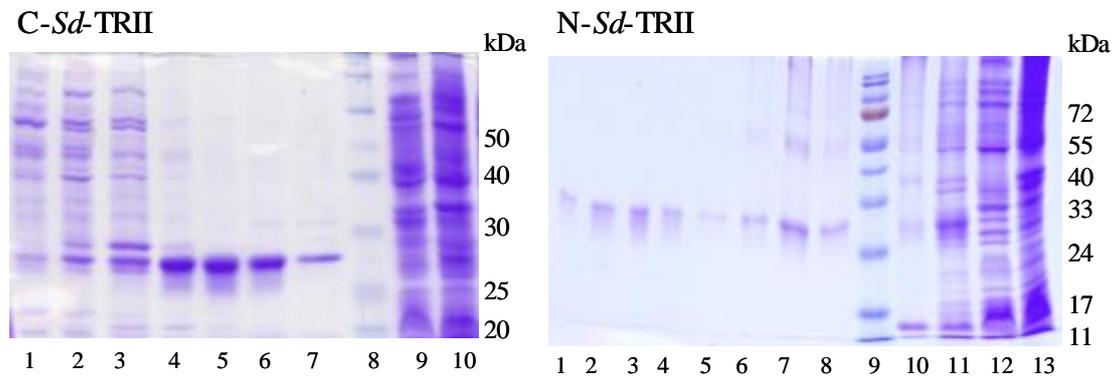
C 2.2 Überexpression und Reinigung der *Sd*-TRII

Zur Expression der Sequenz mit C-terminalem His-Tag (*C*-*Sd*-TRII) wurde der Vektor pET-21d (Novagen) und die Expressionszellen *E. coli* BL21 verwendet (B 1.2, B 1.3). Dazu wurde die *trII*-Sequenz zwischen die Schnittstellen *Nco*I und *Not*I der MCS von pET-21d eingesetzt.

Die Sequenz mit N-terminalem His-Tag (*N*-*Sd*-TRII) wurde mit dem pQE-30 Vektor (Qiagen) in SG13009 *E. coli* Zellen (B 1.2, B 1.3) exprimiert. Die *trII*-Sequenz befand sich zwischen den Schnittstellen *Bam*HI und *Sph*I der MCS von pQE-30 (B 2.2.6).

Die Überexpression erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 20 °C über 12-16 h (B 2.2.7). Die Bakterienlysate wurden über Nickel-Affinitätssäulen gereinigt, mit PD-10 Säulen

(Amersham-Bioscience) umgepuffert und mit SDS-PAGE analysiert (B 2.3.6, B 2.3.4). Die Ergebnisse der Reinigung sind in Abb. C- 8 dargestellt.



- 1-4 Fraktionen am Beginn der Proteinelution
 5-7 Fraktionen nach Reinigung vor PD10
 8 Proteinmarker (NEB)
 9 Bakterien transformiert mit Leervektor pET-21d
 10 Lysat der Bakterien transformiert mit *Sd-trII*-haltigem pET21-d Vektor nach 16 h IPTG Induktion

- 1-4 Fraktionen nach Reinigung nach PD10
 5-8 Fraktionen nach Reinigung vor PD10
 9 Proteinmarker (Fermentas)
 10 Bakterienlysate der induzierten Zellen
 11 Bakterien transformiert mit *Sd-trII*-haltigem pQE-30 Vektor nach 16 h IPTG Induktion
 12 Bakterien transformiert mit *Sd-trII*-haltigem pQE-30 Vektor ohne IPTG Induktion
 13 Bakterien transformiert mit Leervektor pQE-30

Abb. C- 8: SDS-Gele nach Reinigung der *Sd-TRII* mit Nickelaffinitätschromatographie, C-*Sd-TRII*: *Sd-TRII* exprimiert und gereinigt mit C-terminalem His-Tag, N-*Sd-TRII*: *Sd-TRII* exprimiert und gereinigt mit N-terminalem His-Tag

Die Proteinausbeute von 1 Liter Kultivierungsmedium nach Reinigung über Nickel-Affinitätsäulen und Umpufferung mit PD-10 Säulen betrug für die C-*Sd-TRII* ~4 mg und für die N-*Sd-TRII* ~6 mg. Das Enzym wurde mit dem photometrischen Assay (B 2.3.5) enzymkinetisch charakterisiert. Die GC-Analyse zeigte Pseudotropin als alleiniges Produkt. Tropin konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Produktspezifität zeigt, dass die cDNA für eine aktive TRII kodiert.

C 2.3 Biochemische Charakterisierung und Modellierung der *Sd-TRII*

C 2.3.1 Charakterisierung der *Sd-TRII* mit C-terminalem His-Tag (C-*Sd-TRII*)

Die gereinigten und umgepufferten Proteinfraktionen wurden nach Analyse mit SDS-PAGE für die biochemische Charakterisierung verwendet (B 2.3.6, B 2.3.4).

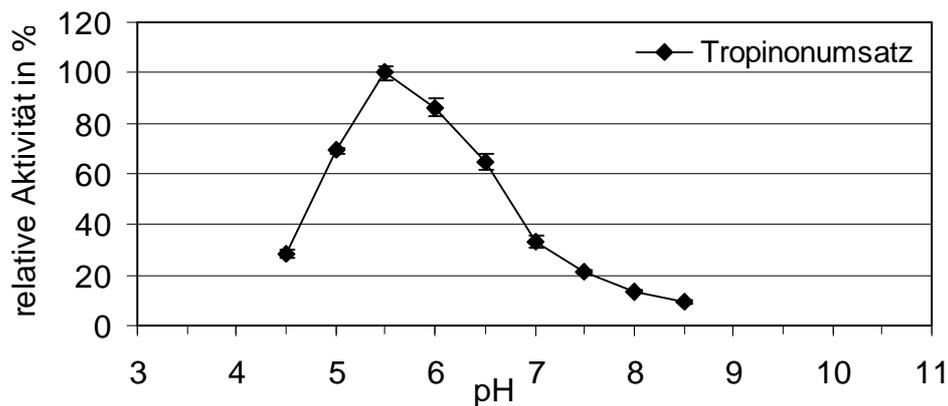


Abb. C- 9: Bestimmung des pH-Optimums der Tropinonreduktion durch C-Sd-TRII, Die Messpunkte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung. Die relative Standardabweichung ist als Balken dargestellt.

Für das pH-Optimum wurde im Bereich von pH 4,5 bis pH 8,5 die Tropinonreduktion mit dem photometrischen Standardassay bestimmt (B 2.3.6.2). Das Reduktionsoptimum der C-Sd-TRII liegt bei pH 5,5 und fällt zwischen pH 4,5 und pH 7 auf 30 % ab (Abb. C- 9). Das schmale pH-Optimum ist untypisch im Vergleich zu bekannten TRII aus Solanaceen [Dräger und Schaal, 1994; Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994; Sichhart 2003]. Eine mögliche Rückreaktion der Sd-TRII mit NADP^+ und Pseudotropin wurde im pH-Bereich von 4,5 bis 8,5 untersucht und nicht beobachtet.

Die K_m - und V_{max} -Werte für Tropinon und die Substratanaloga wurden soweit möglich mit der C-Sd-TRII bestimmt und mit Werten bekannter TRII verglichen (B 2.3.6.3, Tab. C- 5). Für Tropinonkonzentrationen unter 0,01 mM konnte kein Umsatz detektiert werden. 3-Methylcyclohexanon wurde von der C-Sd-TRII umgesetzt. Es konnte jedoch kein K_m -Wert bestimmt werden, da auch in Konzentrationen bis 40 mM keine Sättigung erhalten wurde.

Der K_m -Wert für Tropinon liegt im Vergleich zu charakterisierten TRII bis zu 10fach höher (Tab. C- 5). Die Affinität der C-Sd-TRII zum natürlichen Substrat Tropinon ist geringer als bei bekannten, charakterisierten TRII [Dräger und Schaal, 1994; Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994; Sichhart 2003]. Aus dem Sequenzvergleich (Abb. C- 7) konnten keine Unterschiede im Bereich der Substrat- und Cosubstrat-Bindungsstelle festgestellt werden, die derartige kinetische Unterschiede plausibel erschienen ließen. Es zeigten sich im Sequenzalignment nur 3 Aminosäuren (Ser^{52} , Ala^{152} , Ala^{171}), die unterschiedlich zu den verglichenen TRII und solitär in der Sd-TRII Sequenz zu finden waren. Allerdings wurde die Sd-TRII mit His-Tag exprimiert und charakterisiert. Die bisher charakterisierten TRII stammen entweder aus nativer Reinigung oder wurden rekombinant ohne His-Tag exprimiert (Tab. C- 5). Damit erhielt der C-terminale His-Tag Aufmerksamkeit und wurde auf eine mögliche Störung der Enzymaktivität untersucht.

C 2.3.2 Charakterisierung der *Sd*-TRII mit N-terminalem His-Tag (N-*Sd*-TRII)

Zur Überprüfung einer Störung der Enzymparameter durch einen C-terminalen His-Tag, wurde die *Sd*-TRII mit N-terminalem His-Tag exprimiert, gereinigt und charakterisiert (B 2.2.6, B 2.2.7, B 2.3.6). Die Ergebnisse zeigten eine bessere Affinität zum Substrat Tropinon und eine höhere Umsatzgeschwindigkeit (Tab. C- 5). Das Reduktionsoptimum für Tropinon der N-*Sd*-TRII lag bei pH 5 und fällt im sauren pH-Bereich von pH 4 auf 30 % ab (Abb. C- 10). Im basischen pH-Bereich fiel die Aktivität nicht so stark ab und beträgt bei pH 8,5 noch 50 % des Maximalumsatzes. Das breite pH-Optimum ist typisch für TRII [Dräger und Schaal, 1994; Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994; Sichhart 2003]. Das pH-Optimum für Nortropinon weist ein breiteres pH-Optimum von pH 5,0 - 6,0 auf und ist im Vergleich zu Tropinon nicht so stark ausgeprägt. Bis pH 10 wurde noch eine Aktivität von über 60 % des Maximalumsatzes festgestellt. Eine Rückreaktion der N-*Sd*-TRII mit NADP⁺ und Pseudotropin wurde getestet und konnte in keinem pH Bereich festgestellt werden.

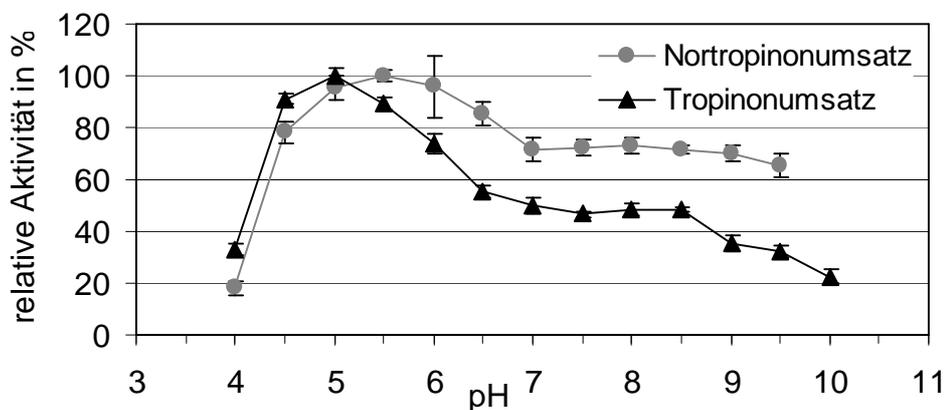


Abb. C- 10: Bestimmung des pH-Optimums der Tropinonreduktion durch N-*Sd*-TRII. Die Messpunkte sind Mittelwerte einer 4fach Bestimmung. Die relative Standardabweichung ist in Balken dargestellt.

Um die Spezifität der *Sd*-TRII zu bestimmen, wurden verschiedene Substratanaloga auf ihre Umsetzung durch die N-*Sd*-TRII getestet und, soweit möglich, K_m - und V_{max} -Werte bestimmt (B 2.3.6.3, B 2.3.6.4). Gemessen wurde bei pH 6,4, um die Vergleichbarkeit mit bekannten TRII zu gewährleisten. Die Enzymparameter der N-*Sd*-TRII zeigten starke Ähnlichkeit zu TRII aus *A. belladonna* [Dräger und Schaal, 1994], *C. sepium* [Sichhart 2003], *D. stramonium* [Portsteffen 1994], *H. niger* [Hashimoto et al., 1992] und *S. tuberosum* [Keiner et al., 2002]. Ein Umsatz mit 3-Chinuclidinon und TBON, zwei Substrate die nur von TRII akzeptiert werden, wurde nicht detektiert. Die Aktivität mit Tetrahydrothiopyran-4-on, *N*-Methyl- und *N*-Propylpiperidin-4-on war bis zu 3fach höher als der Umsatz mit dem natürlichen Substrat Tropinon. Die Affinität des Enzyms zu Tropinon war unter den getesteten Substanzen am stärksten. Die Cyclohexanone wurden nur mit einer Aktivität von ~35 – 40 % umgesetzt (Tab. C- 5).

Tab. C- 5: Km- und Vmax-Werte der C-Sd-TRII und N-Sd-TRII mit verschiedenen Substraten; Es wurde 4fach bestimmt und die Standardabweichung berechnet.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------|-----------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| | | C-Sd- TRII | D. s. TRII | H. n. TRII | A. b. TRII | S. t. TRII | N-Sd- TRII |
| Tropinon | Km in mM | 0,22 ± 0,0136 | 0,11 | 0,034 | 0,09 | 0,033 | 0,025 ± 0,0032 |
| | Vmax in % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % |
| | Vmax in nkat/mg | 107,2 ± 1,81 | 136 | 387 | 17,5 | 45,4 ± 2,54 | 485,71 ± 14,85 |
| Nortropinon | Km in mM | 0,77 ± 0,0357 | - | - | - | 0,025 - 0,1 | 0,099 ± 0,0064 |
| | Vmax in % | 98 % | - | - | - | 39 % | 95 % |
| | Vmax in nkat/mg | 104,6 ± 1,36 | - | - | - | 17,7 ± 1,8 | 461,1 ± 7,79 |
| N-Propylpiperidin-4-on | Km in mM | 0,54 ± 0,0456 | - | 0,27 | - | - | 0,245 ± 0,0212 |
| | Vmax in % | 181 % | 74 % | 530 % | 129 % | 84 % | 246 % |
| | Vmax in nkat/mg | 193,9 ± 4,35 | - | - | - | - | 1195,9 ± 26,85 |
| N-Methylpiperidin-4-on | Km in mM | 1,82 ± 0,3196 | 1,4 | 0,77 | 0,65 | - | 1,02 ± 0,0435 |
| | Vmax in % | 124 % | 180 % | 512 % | 313 % | 140 % | 239 % |
| | Vmax in nkat/mg | 132,8 ± 8,23 | - | - | - | - | 1162,1 ± 17,93 |
| Tetrahydrothiopyran-4-on | Km in mM | 3,86 ± 0,3379 | 2 | - | 0,38 | - | 9,11 ± 1,029 |
| | Vmax in % | 150 % | 115 % | - | 71 % | - | 316 % |
| | Vmax in nkat/mg | 160,8 ± 4,60 | - | - | - | - | 1536,1 ± 75,62 |
| 4-Methylcyclohexanon | Km in mM | 6,91 ± 1,5233 | 2,8 | 2,03 | - | - | 5,76 ± 0,821 |
| | Vmax in % | 17 % | 22 % | 113 % | - | 17 % | 32 % |
| | Vmax in nkat/mg | 18,5 ± 1,613 | - | - | - | - | 156,9 ± 7,71 |
| 3-Methylcyclohexanon | Km in mM | n. m. | - | 7,58 | - | - | 8,36 ± 1,494 |
| | Vmax in % | 21 % , 10 mM | - | 172 % | - | 13 % | 36 % |
| | Vmax in nkat/mg | 22,0 ± 0,953 | - | - | - | - | 176,6 ± 15,75 |

1 und 6) diese Arbeit, rekombinant mit His-Tag; 2) Portsteffen et al., 1994; nativ; 3) Hashimoto et al., 1992; nativ; 4) Dräger and Schaal ,1994; nativ; 5) Keiner et al., 2002; rekombinant ohne His-Tag, n.m. = nicht meßbar

Die Parameter wurden mit denen der C-Sd-TRII (Tab. C- 5) verglichen. Dabei wurde, mit Ausnahme von Tetrahydrothiopyran-4-on, eine Zunahme der Affinität festgestellt. Tropinon zeigte eine bis zu 10fach höhere Affinität zur N-Sd-TRII im Vergleich zur C-Sd-TRII. Die Ergebnisse zeigten, dass die Lage des His-Tag einen Einfluss auf die Substrat-Affinität ausübt. Die molare katalytische Aktivität (Abb. C- 11) der N-Sd-TRII war, abhängig vom eingesetzten Substrat, bis zu 9fach stärker im Vergleich zur C-Sd-TRII. Der Substratumsatz war schneller. Dies lässt darauf schließen, dass der His-Tag am C-Terminus zusätzlich die Umsatzgeschwindigkeit beeinflusst.

Die Km-Werte für Tropinon der N-Sd-TRII wurden für verschiedene pH-Werte bestimmt, zum einen für pH 5, dem ermittelten pH-Optimum der N-Sd-TRII, und zum anderen für pH 7,6, dem physiologischen pH-Bereich der Enzymreaktion (Tab. C- 6).

Tab. C- 6: Km-Werte der N-Sd-TRII bei verschiedenen pH-Werten

| | Km in mM | Vmax in nkat/mg |
|--------|-----------------|-----------------|
| pH 5,0 | 0,1451 ± 0,0062 | 776,19 ± 10,32 |
| pH 7,6 | 0,0302 ± 0,0047 | 362,1 ± 11,58 |

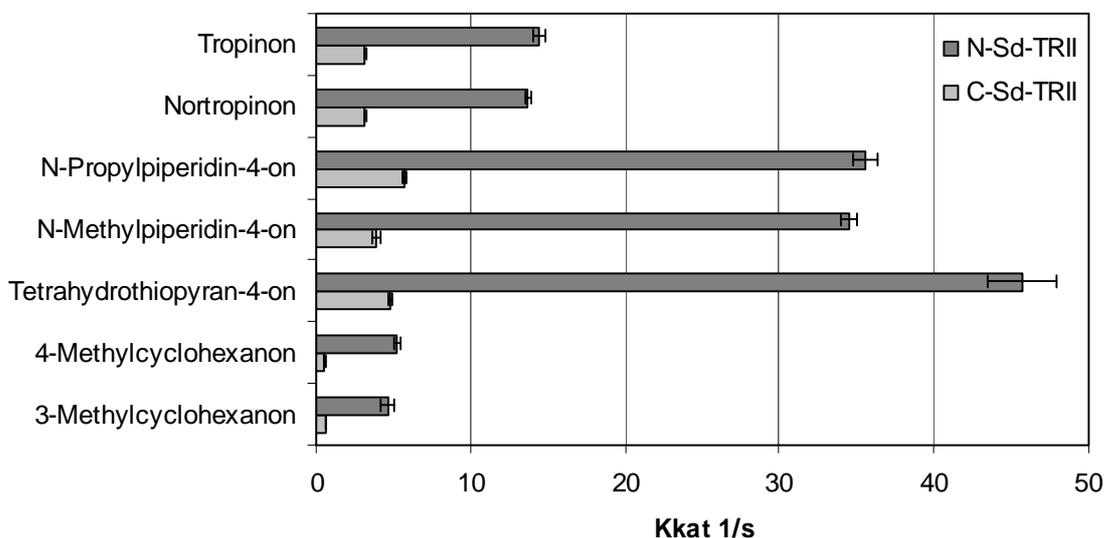


Abb. C- 11: Molare katalytische Aktivität der C-Sd-TRII und N-Sd-TRII mit verschiedenen Substratanaloga. Die Messwerte sind Mittelwerte einer 4fach Bestimmung. Die Standardabweichung ist in Balken angegeben.

C 2.3.3 Entwicklung der Modellstruktur

Anhand eines Proteinmodells der *Sd*-TRII sollte geprüft werden, ob die kinetischen Unterschiede der C-*Sd*-TRII und N-*Sd*-TRII erklärt werden können. Die Modellstruktur der *Sd*-TRII wurde mit homologer Modellierung (B 2.4.2) basierend auf der Struktur der TRII aus *D. stramonium* [Nakajima et al., 1998] (PDB-Eintrag: 2AE1, Sequenzidentität zur *Sd*-TRII 91 %) entwickelt. Es liegen Röntgenkristallstrukturen des Enzyms komplexiert mit NADPH (PDB-Eintrag: 1IPE), mit NADPH und Tropinon (PDB-Eintrag: 1IPF) sowie mit NADP⁺ und Pseudotropin (PDB-Eintrag: 2AE2) vor [Yamashita et al., 1999, 2003]. Für die Modellierung der *Sd*-TRII wurde das mit NADPH und Tropinon kristallisierte Protein als Template gewählt (PDB-Eintrag: 1IPF). Die Lage des natürlichen Substrates und Cosubstrates sollten in der Bindungstasche des zu modellierenden Enzyms nachgebildet werden. Unter Verwendung der Matrix BLOSUM90 und der Software MOE[®] wurde die *Sd*-TRII Sequenz mit der des Templates überlagert und eine Homologie der Sequenzen von 92,3 % angegeben. Durch das Programm MOE[®] wurde von einem ausgewählten Template-Bereich eine partielle Startgeometrie für die zu modellierende Sequenz generiert [Henikoff und Henikoff, 1992; 1993]. Es wurden 10 Gas-Phasen Modelle erstellt und unter Verwendung des Kraftfeldes Charmm22 [MacKerell et al., 1998] und Born-Solvation [Pellegrini und Field, 2002] die Energie der Modelle minimiert. Die stereochemische Qualität der Modelle wurde mit PROCHECK bei einer theoretischen Auflösung von 2,0 Å analysiert. Die Proteinfaltung wurde mit PROSA II überprüft (B 2.4.2). Das Modell mit den besten stereochemischen

Parametern wurde für die weitere Optimierung ausgewählt. Dafür wurden einzelne Aminosäuren manuell modifiziert und Moleküldynamik-Simulationen für ausgewählte Bereiche des Modells mit anschließender Energieminimierung durchgeführt.

Die Analyse des erhaltenen *Sd*-TRII Modells mit PROCHECK zeigte, dass die Werte für die Torsionswinkel Φ und Ψ in den erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots (90,4 % - meist bevorzugte Bereiche; 9,6 % - zusätzlich erlaubte Bereiche) lagen. Die sterischen Parameter für Bindungswinkel, Bindungslängen und Peptidbindungsplanarität waren innerhalb akzeptierter Bereiche, bezogen auf ein Protein mit einer Auflösung von 2.0 Å. Die Proteinfaltung wurde mit dem Programm PROSA II analysiert und zeigte für alle Modellbereiche eine negative Energie mit einem z -score von -10,06 (259 aa). Dieser liegt im akzeptierten Bereich für ein modelliertes Protein von 259 Aminosäuren. Die z -score Werte für die Templatestruktur (PDB-Eintrag: 1IPF) wurden mit -9,3 (259 aa) errechnet. Im Modell der *Sd*-TRII bildet sich das aktive Zentrum, wie auch in der Templatestruktur, aus einer Spalte zwischen der Kernregion der Rossmannfalte und einer Schlinge, die durch zwei α -Helices ($\alpha G'$ und $\alpha G''$) und deren Verbindungsstück geformt wird [Nakajima et al., 1998]. Die Substratbindungsregion im Modell und im Template zeigte keine Unterschiede, die das abweichende kinetische Verhalten begründen könnten. Um die Lage des *His-Tag* am C-Terminus des Modells zu berechnen, wurde das Gerüst des Modells fixiert und ab der Aminosäure Asp²⁵² eine Moleküldynamiksimulation mit 100 ps und 300 K berechnet. Die verschiedenen Startkonformationen für die Moleküldynamiksimulation wurden manuell erstellt und zufällig gewählt. Ein Rest von 11 Aminosäuren (FAAALEHHHHHH) konnte sich während der Moleküldynamiksimulation frei bewegen. Die 5 Aminosäuren (AAALE) stammen aus dem Vektor im Bereich der Schnittstellen. Die Energie der erhaltenen Strukturen wurde abschließend minimiert. Die Berechnungen zeigten die stabilste Konformation des *His-Tag* in einer Lage, die die Diffusion des Substrates zum aktiven Zentrum behindern würde. Umsatzgeschwindigkeit und Substrataffinität wären dadurch vermindert. Der hier postulierte Eingangsbereich des Substrates zum aktiven Zentrum wird durch den *His-Tag* sterisch verdeckt (Abb. C- 12). In dieser Lage wird er über Salzbrücken zwischen Glu²⁶⁶ und Lys¹⁰⁵ stabilisiert. Weiterhin bilden sich hydrophobe Interaktionen zwischen Phe²⁶¹, Leu²¹⁴, Leu²⁶⁵ und Tyr¹⁵⁶ sowie verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die sterische Passform des *His-Tag* in die Proteinspalte, die ohne *His-Tag* auf der Proteinoberfläche ausgebildet ist, ist nahezu ideal (Abb. C- 12) [Freydank et al., 2008]. Ein *His-Tag* am N-Terminus sollte zu keiner Beeinflussung der Substratdiffusion ins aktive Zentrum führen, da er entgegengesetzt der Diffusionsstelle liegt. Die Ergebnisse der Tab. C- 5 bekräftigen diese Theorie.

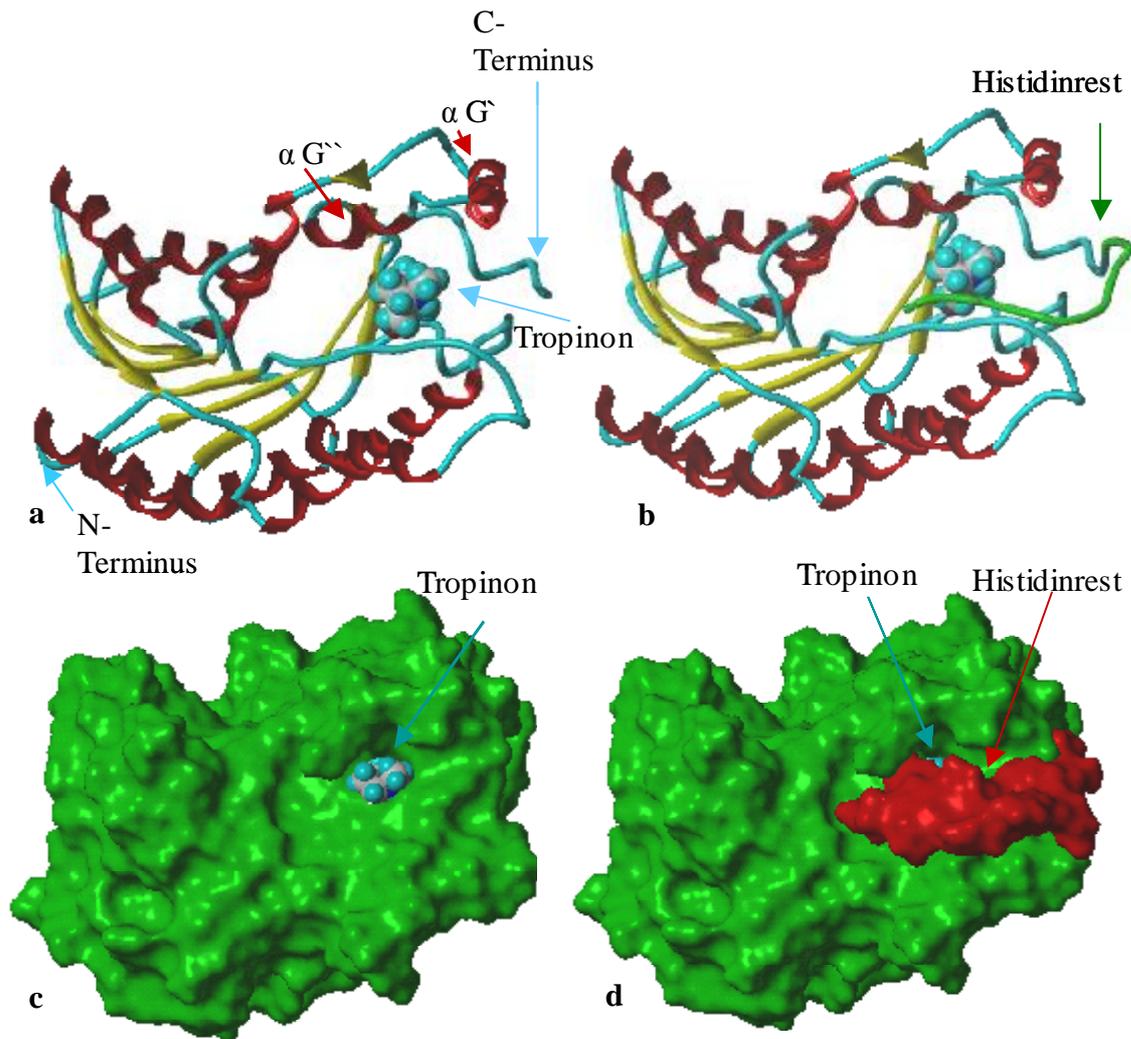


Abb. C- 12: a und c Modelle der *Sd*-TRII ohne *His-Tag*, b und d Modelle der *Sd*-TRII mit *His-Tag* und weiteren 5 Aminosäuren am C-Terminus; Der *His-Tag* ist im Modell b grün und im Modell d rot dargestellt.

C 2.4 Liganden-Dockingstudien mit *in vitro* getesteten Substanzen

Mit den Substratanaloga der Tab. C- 7 wurden Dockingstudien mit dem Programm GOLD (B 2.4.4) durchgeführt. Die experimentell ermittelten K_m -Werte (C 2.3) wurden mit den theoretischen Affinitätswerten aus den Dockingversuchen mit dem *Sd*-TRII Modell verglichen und auf eine Korrelation zwischen den theoretischen und den experimentellen Werten geprüft. Die im Programm SCORE [Wang et al., 1998; 2003] kalkulierten x-score Werte (K_d -Werte in Tab. C- 7) zeigten wie erwartet keine Korrelation zu den experimentellen K_m -Werten und wurden für die weitere Auswertung der Dockingexperimente nicht verwendet.

Die Verbindungen der Tab. C- 7 wurden in protonierter Form (protoniertes Brücken-Stickstoff-Atom bzw. protoniertes Stickstoff-Atom im Piperidylring) in das aktive Zentrum der modellierten *Sd*-TRII gedockt. Als Dockingbereich wurde ein Radius von 15 Å um die Carbonylgruppe des Glutamates 157 (Atomnummer: 2368 im *Sd*-TRII-Modell) verwendet, da

damit der Bereich des aktiven Zentrums erhalten wurde. Es wurden jeweils 10 Dockingordnungen pro Ligand berechnet. Die Passung des Liganden in die Docking-Region wird vom Programm beurteilt und als Fitness-Wert angegeben [Jones et al., 1997]. Die Interaktionsenergie des Rezeptor-Liganden-Komplexes wurde auf Grundlage der Gibbs-Helmholtz-Gleichung ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ und $\Delta G = -RT \ln K$) berechnet [$IE = E_{RL} - (E_R + E_L)$], IE - Interaktions-Energie, E_{RL} -Energie Rezeptor Ligand, E_R - Energie Rezeptor] und die Vorhersagekraft für den Km-Wert geprüft. Eine 100%ige Korrelation ist dabei für die Km-Werte nicht zu erwarten, da Km-Werte keiner direkten Affinität entsprechen, sondern der Substratumsatz mit berücksichtigt wird. Dies wäre nur für K_i -Werte von Inhibitoren zu erwarten, da dort nur die direkte Affinität ausgedrückt wird. Sowohl die Fitness-Werte als auch die berechneten Interaktionsenergien zeigten mit einem Bestimmtheitsmaß von über 0,75 eine Korrelation zu den experimentellen Km-Werten (Tab. C- 7, Abb. C- 13). Dies spricht für eine ausreichende Vorhersagekraft des Modells und der Methode.

Tab. C- 7: Theoretisch berechnete Bewertungsparameter und experimentell bestimmte Substrat-Affinitäten der N-Sd-TRII; IE = Interaktionsenergie, E_{RL} = Energie des Rezeptor-Liganden-Komplexes, E_L = Energie des Liganden, E_R = Energie des Rezeptors, Fitness = Bewertungsparameter im GOLDscore, K_d = theoretisch berechnet als x-score-Wert, n.d. = nicht detektierbar, - = nicht gemessen

| Substrat | E_{RL} kcal/mol | E_L kcal/mol | E_R kcal/mol | IE kcal/mol | Km M | Fitness | $-\log K_d$ | $-\log Km$ |
|--------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|----------------|-----------|---------|-------------|------------|
| Nortropinon | -581,4 | 14,613 | -559,9 | -36,075 | 0,00009 | 37,03 | 4,81 | 4,05 |
| Tropinon | -578,6 | 16,487 | -559,9 | -35,149 | 0,000023 | 40,34 | 4,77 | 4,64 |
| N-Methylpiperidin-4-on | -587,7 | 6,985 | -559,9 | -34,715 | 0,00102 | 37,06 | 4,26 | 2,99 |
| N-Propylpiperidin-4-on | -589,1 | 8,714 | -559,9 | -37,871 | 0,0002445 | 42,13 | 4,6 | 3,61 |
| 4-Methylcyclohexanon | -580,9 | 1,615 | -559,9 | -22,577 | 0,00576 | 28,82 | 4,79 | 2,24 |
| 3-Methylcyclohexanon 3 | -575,7 | 6,608 | -559,9 | -22,370 | 0,00781 | 29,12 | 4,76 | 2,1 |
| Cyclohexanon | -579,8 | 1,807 | -559,9 | -21,669 | - | 26,85 | 4,59 | - |
| Chinuclidinon | -567,5 | 13,882 | -559,9 | -21,444 | n.d. | 33,25 | 4,54 | - |
| Tetrahydrothiopyran-4-on | -580,7 | 0,455 | -559,9 | -21,217 | 0,00911 | 28,26 | 4,36 | 2,04 |
| TBON | -565,1 | 8,315 | -559,9 | -13,477 | n.d. | 30,59 | 4,71 | - |

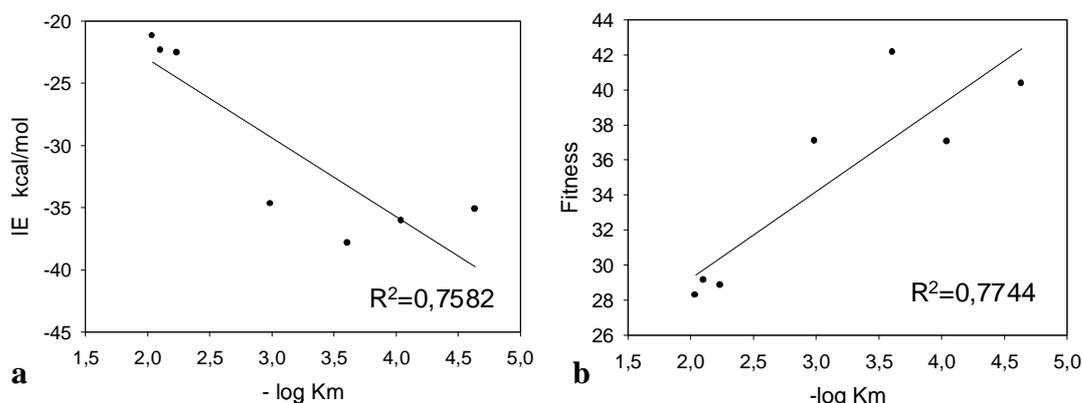


Abb. C- 13: Korrelation zwischen theoretisch und experimentell bestimmten Substrat-Affinitäten der N-Sd-TRII, a = Korrelation zwischen Interaktionsenergie IE und Km-Werten, b = Korrelation zwischen Fitness- und Km-Werten

C 2.5 *in silico* Screening zur Ligandensuche

Es wurde mit *in silico* Screening (B 2.4.3) und anschließenden Dockingstudien (B 2.4.4) nach neuen Substraten oder Inhibitoren der *Sd*-TRII gesucht. Dafür wurden die zwei im Programm MOE[®] erstellten Pharmakophore verwendet (B 2.4.3, Abb. C- 14). Zusätzlich wurde das aktive Zentrum der *Sd*-TRII räumlich durch definierte Volumeneinengungen für die Ligandensuche begrenzt. Dabei wurde die Position von NADPH als Cosubstrat berücksichtigt.

Für die Ligandensuche kamen eine Naturstoffdatenbank mit 140.000 Verbindungen und die MOE-Datenbank mit 950.000 potentiell kommerziell verfügbaren Verbindungen zum Einsatz. Schematisch ist die Ligandensuche in Abb. C- 15 dargestellt. Tropinon und die anderen Strukturen waren in der Naturstoffdatenbank in ihrer unprotonierten Form gespeichert. Tropinon konnte in zwei Testdurchläufen nur mit dem unprotonierten Pharmakophor erhalten werden. Aus diesem Grund wurde das unprotonierte Pharmakophor (Abb. C- 14a) für die Suche in der Naturstoffdatenbank verwendet. Die Strukturen in der MOE-Datenbank waren auch in ihrer protonierten Form berechnet, weswegen dort mit dem protonierten Tropinonpharmakophor (Abb. C- 14b) gesucht wurde. Die aus der Suche hervorgegangenen Verbindungen wurden mit dem Programm GOLD ins modellierte aktive Zentrum der *Sd*-TRII gedockt (Abb. C- 15). Da das Docking von Liganden mit dem Programm GOLD erkennbare Vorhersagekraft für die tatsächliche Bindung an das Enzymprotein (C 2.4) hatte, wurden die Dockingergebnisse entsprechend der Fitnesswerte ausgewertet. Zusätzlich wurde die Lage der gedockten Substanz im aktiven Zentrum visuell beurteilt.

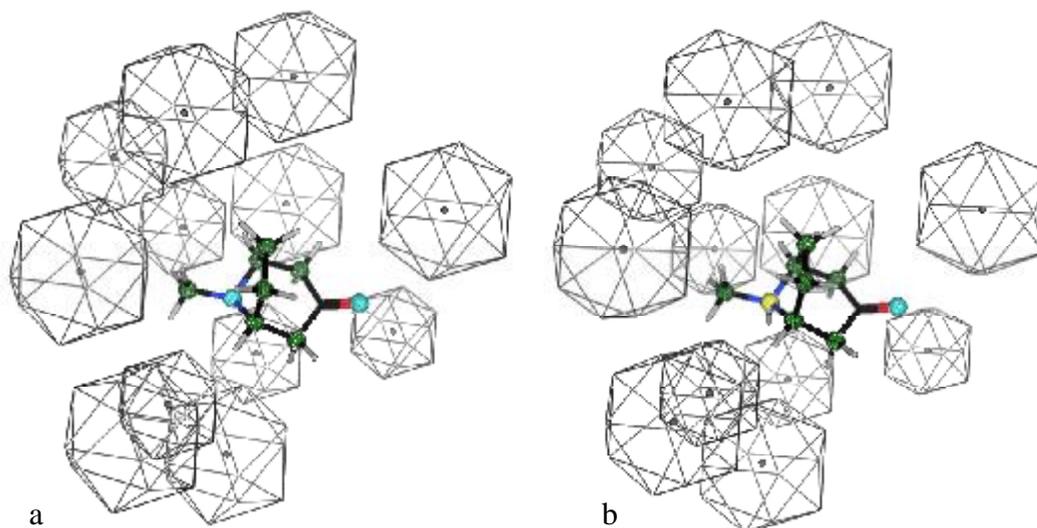


Abb. C- 14: Pharmakophore erstellt im Programm MOE[®] aus Tropinon im aktiven Zentrum des *Sd*-TRII Modells, jeweils 7 hydrophobe Bereiche (grün) und 12 Volumeneinengungen (grau) a) Es wurden die Carbonylgruppe und der Brückenstickstoff als Protonenakzeptoren (hellblau) definiert. b) Es wurde die Carbonylgruppe als Protonenakzeptor (hellblau) und der Brückenstickstoff als Protonendonator (gelb) definiert.

Der Fitnesswert von 40,34 des Tropinons wurde als grobe Orientierung für die Auswahl der Verbindungen anhand der Fitnesswerte verwendet (Tab. C- 7). Um auch Substanzen mit geringerer Passung zu erfassen, wurde entschieden, die aus der Suche in der MOE-Datenbank hervorgegangenen Verbindungen, deren Fitnesswerte nach dem Docking über 33 lagen und die im aktiven Zentrum nach visueller Prüfung passend schienen, auf Verfügbarkeit zu prüfen. Es waren 20 Substanzen käuflich und standen für *in vitro* Tests zur Verfügung. Aus der Naturstoffdatenbank wurden 88 Verbindungen (Anhang) mit Fitnesswerten über 33 selektiert und auf Verfügbarkeit geprüft. Davon waren nur vier Substanzen käuflich. Pseudotropin und Tropin wurden zur Testung auf Feedbackhemmung eingesetzt. 3-Aminotropan wurde aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum Substrat ausgewählt. Es wurden 27 Substanzen für *in vitro* Tests eingesetzt (Tab. C- 8).

Tab. C- 8: Fitnesswerte, Substanznamen, Registriernummern und Molekulargewichte der 27 getesteten Substanzen

| Nr | Fit-ness | Substanzname, Registriernummer (Quelle SciFinder, B = Registriernummer nach Beilstein, R = Registriernummer nach Chemical Abstracts Service), M = Molekulargewicht in g*mol ⁻¹ |
|----|----------|---|
| 1 | 52,74 | N- (5-Chloro-2-methoxybenzoyl)-N'-pentylguanidin-hydrochlorid R: 373638-82-5, M: 334,25 |
| 2 | 44,09 | 2-[[3-(4-Morpholinyl)propyl]amino]-5-nitro-benzonitril R: 451459-94-2, M: 261 |
| 3 | 40,82 | 4-Methyl-3-nitro-benzensulfonsäure (4-propylcyclohexyliden)hydrazid R: 386248-16-4, M: 353,44 |
| 4 | 36,54 | 7-Methoxy-N,N-dimethyldiprimido[4,5-b:5,4-f][1,4]thiazepin-4-amin R: 140430-01-9, M: 288,33 |
| 5 | 33,77 | α-Cyano-3-(3-methyl-1-piperidinyl)- 2-quinoxalinessigsäure-2-methoxyethylester R: 489403-25-0, M: 368,43 |
| 6 | 48,05 | 2-[[2-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-2-yl)carbonyl]amino]-benzoesäureethylester R: 304888-65-1, M: 327,33 |
| 7 | 42,81 | 5,7-Dibromo-N-[3-(dimethylamino)propyl]-2-benzofurancarboxamid R: 326866-76-6, M: 404 |
| 8 | 39,7 | N-[2-(1-cyclohexen-1-yl)ethyl]-2-(2,4-dibromo-6-methylphenoxy)acetamid R: 445409-12-1, M: 431,17 |
| 9 | 39,64 | 9-Methyl-9-aza-bicyclo[3.3.1]nonan-3-on, (Pseudopelleterine) R: 552-70-5, M: 153,22 |
| 10 | 50,53 | 2-Chloro-N-(4-hydroxybutyl)-5-nitro-benzamid R: 337468-45-8, M: 272,69 |
| 11 | 55,73 | N-(3-Fluorophenyl)-N'-[3-(4-morpholinyl)propyl]-ethandiamid R: 423729-77-5, M: 309,34 |
| 12 | 57,45 | Thiocarbamidsäure- 2-[(6-Amino-1H-purin-8-yl)amino]-ethylester R: 339197-92-1, M: 245 |
| 13 | 50,27 | 2-[[2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl]thio]-N-phenyl-acetamid R: 431997-42-1, M: 306,43 |
| 14 | 41,0 | 4-Methyl-3-nitro-benzensulfonsäure-(3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-ylidene)hydrazid R: 380479-52-7, M: 351 |
| 15 | 35,48 | Pseudotropin R: 135-97-7, M: 141 |
| 16 | 38,94 | 6-Hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]octan-3-on R: 5932-53-6, M: 155,20 |
| 17 | 40,21 | Tropin R: 120-29-6, M: 141 |
| 18 | 33,57 | 4-Methyl-1-piperazindithiocarbonsäure-2-[4-(aminocarbonyl)-1-piperidinyl]-2-oxoethylester R : 524057-88-3, M : 327 |
| 19 | 42,12 | α -3-Aminotropan R: 143920-98-3, M: 140 |
| 20 | 70,4 | [3-(Cyclopentylamino)-1-methyl-3-oxopropylidene] hydrazid-2-thiophenessigsäure R: 350495-38-4, M: 307,42 |
| 21 | 49,82 | 1-[(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-5-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-propanol R: 1843-82-9, M: 267,32 |
| 22 | 46,34 | 1,2,3,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-2,6-dioxo-7H-purin-7-acetamid R: 101099-99-4, M: 308 |
| 23 | 47,36 | DL-N-(2-Bromo-3-methylbutyl)-glycylglycin R: 94107-40-1, M: 295,14 |
| 24 | 39,08 | 9-Methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0 ^{2,4}]non-7-yl-hyoscinester R:51-34-3, M: 303,36 |
| 25 | 45,32 | 2-Chloro-N-[2-(4-morpholinyl)-2-(2-thienyl)ethyl]-5-nitro-benzamid R: 325745-07-1, M: 380,5 |
| 26 | 46,53 | N-[1,1-dimethyl-2-[methyl(1-methyl-4-piperidinyl)amino]ethyl]-2-thiophenesulfonamid R: 326879-02-1, M: 345 |
| 27 | 50,02 | 3-Hydroxy-2-phenyl-ptopinonsäure-6-hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl-ester, (6-Hydroxyhyoscyamin) B:287259 M: 305,37 |

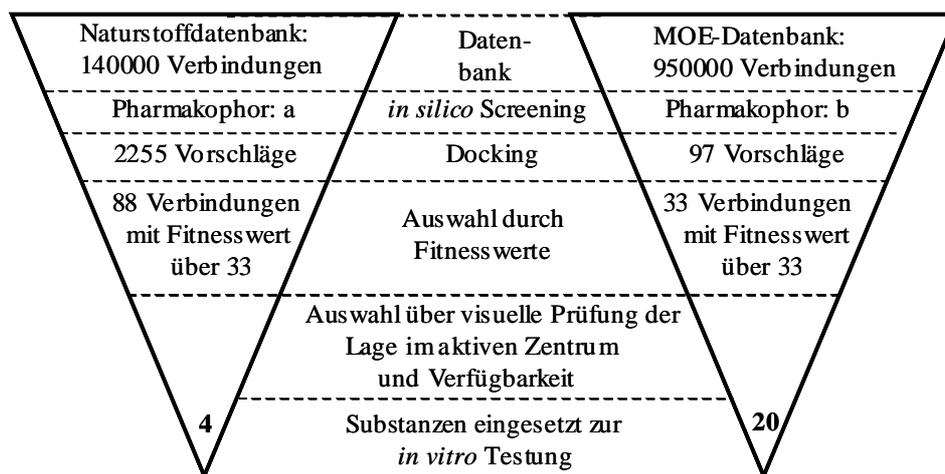


Abb. C- 15: Schematische Darstellung der Ligandensuche

C 2.6 Inhibitor Enzymtests *in vitro*

Die nach der Pharmakophorsuche und den Dockinguntersuchungen ausgewählten Substanzen wurden als Substrate und Inhibitoren der *Sd*-TRII untersucht. Dafür wurde der photometrische Standardassay (B 2.3.5) und die gereinigte N-*Sd*-TRII verwendet. Für die Hemmung der *Sd*-TRII wurde im Assay Tropinon als natürliches Substrat in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Diese Konzentration lag im Sättigungsbereich der *Sd*-TRII (C 2.3). Der potentielle Inhibitor wurde in 5facher Konzentration (2,5 mM) dem Enzymassay zugegeben und die Aktivität der *Sd*-TRII bestimmt. Die Aktivität relativ zum Umsatz von Tropinon allein wurde bestimmt (Abb. C- 16). Die Messungen zeigten für fünf Substanzen eine vollständige Hemmung der *Sd*-TRII. Durch weitere vier Substanzen wurde die Aktivität auf unter 50 % gemindert. Für sieben Substanzen wurde eine relative Restaktivität zwischen 60 % und 80 % ermittelt.

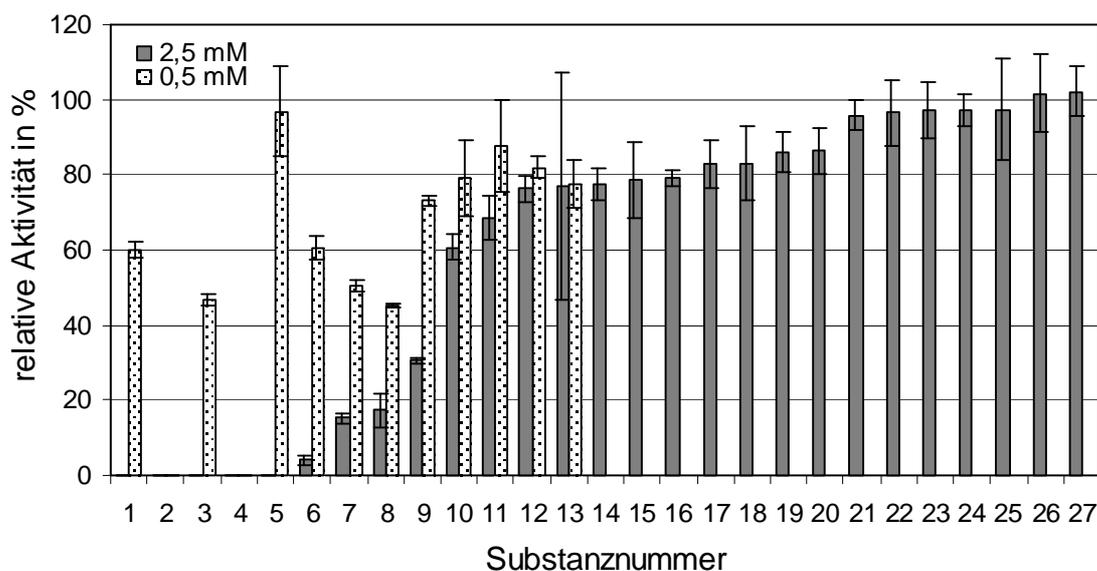


Abb. C- 16: Inhibitoren getestet (Tab. C- 8), Werte sind Mittelwerte einer 3-6fach Bestimmung. Standardabweichung ist in Balken dargestellt.

Danach wurden alle Substanzen, die die relative Aktivität auf unter 77 % herabsetzten, im Assay geringer konzentriert und die Hemmung untersucht. Tropinon und der potentielle Inhibitor wurden im Verhältnis 1:1 (0,5 mM Tropinon und 0,5 mM Testsubstanz) im Enzymassay eingesetzt (Abb. C- 16). Es wurde für zwei Substanzen (Nr. 2, Nr. 4) eine vollständige Hemmung der *Sd*-TRII festgestellt. Die 27 Substanzen wurden, bis auf Nr. 16, als Substrate der *Sd*-TRII auf Umsetzung getestet und wurden bis 5 mM im Assay eingesetzt. Es konnte bei keiner Substanz ein photometrisch messbarer Umsatz durch die *Sd*-TRII festgestellt werden.

Für die Substanzen Nr. 2 und Nr. 4 wurde versucht, eine Hemmkonzentration zu bestimmen. Dafür wurde die Konzentration der Substanzen im Assay kontinuierlich verringert und die relative Aktivität bei gleich bleibender Tropinonkonzentration (0,5 mM) bestimmt. Bei beiden Substanzen war ab einer Konzentration von 0,25 mM im Enzymassay keine *Sd*-TRII Aktivität mehr detektierbar (Abb. C- 17, Abb. C- 18). Bis zur Konzentration von 0,125 mM der Substanz Nr. 2 konnte noch eine relative Aktivität von 28 % festgestellt werden. Für Substanz Nr. 4 konnte bei einer Konzentration von 0,175 mM noch ~50 % der relativen Aktivität detektiert werden. Ab einer Konzentration von 0,2 mM wurden keine stabilen Messwerte mehr erhalten.

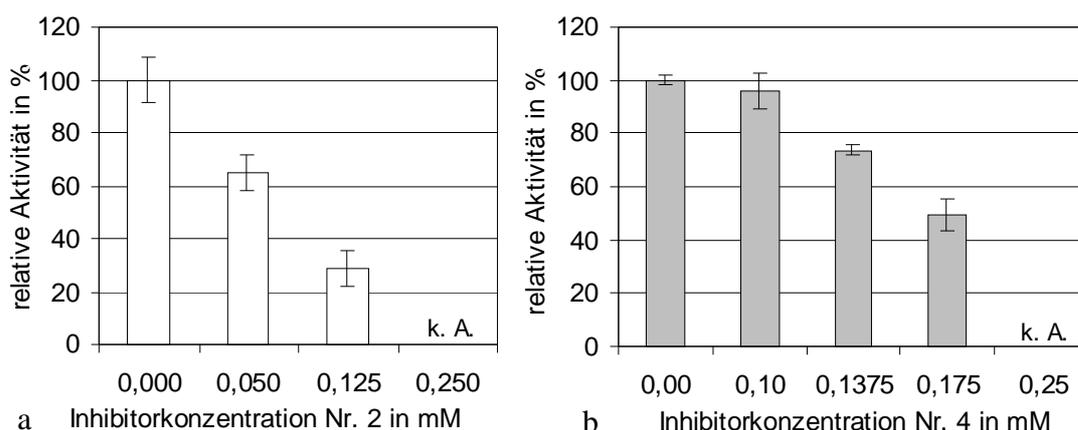


Abb. C- 17: Konzentrationsabhängige Hemmung der *Sd*-TRII durch die Substanzen Nr.2 (a) und Nr. 4 (b), Tropinonkonzentration im Enzymassay 0,5 mM, k. A. = keine Aktivität messbar

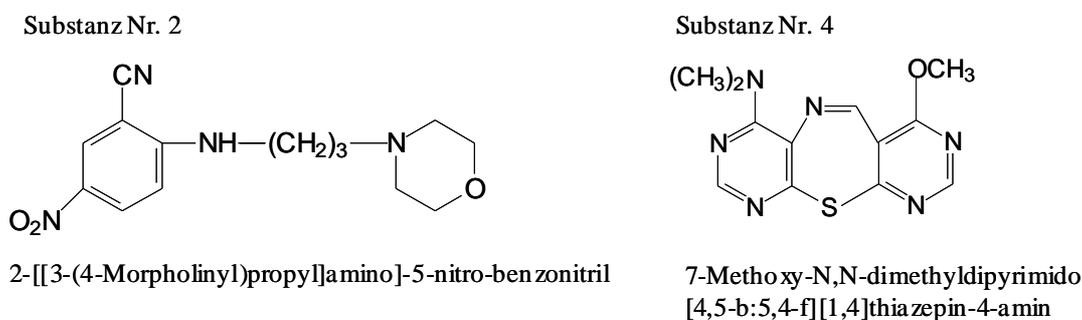


Abb. C- 18: Strukturformeln der Substanzen Nr. 2 und Nr. 4

Substanz Nr. 2 mit einem errechneten Fitnesswert von 44,09 und Substanz Nr. 4 mit einem Fitnesswert von 36,54 sind in den Bereich des aktiven Zentrums gedockt dargestellt (Abb. C-18, Abb. C-19). Dabei zeigte sich für Substanz Nr. 4 die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit Tyrosin¹⁶⁰. Substanz Nr. 2 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asparagin²¹⁰ aus und scheint zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums einzugehen. Durch Bindung der Substanzen in diesem Bereich des Enzyms würde die Reaktion mit Tropinon beeinträchtigt sein (Abb. C-19).

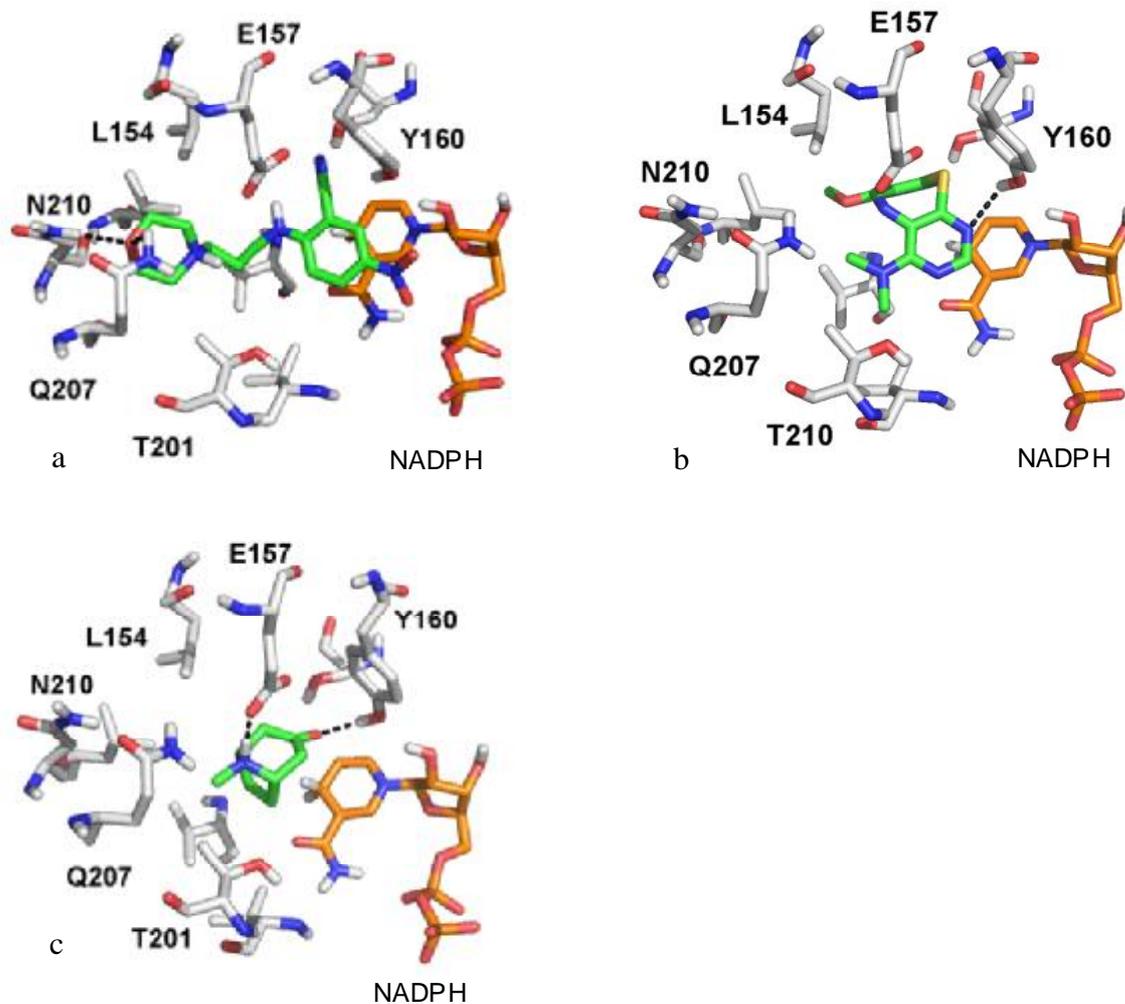


Abb. C-19: Aktive Zentrum der *Sd*-TRII mit den gedockten Substanzen: a) Nr. 2 (grün); b) Nr. 4 (grün); c) Tropinon (grün), NADPH (orange), Wasserstoffbrückenbindung (schwarz)

C 2.7 Inhibitor-Applikation an Wurzelkulturen von *S. dulcamara*

Die Substanzen Nr. 2 und Nr. 4 wurden an *S. dulcamara* Wurzelkulturen appliziert. Es sollte das Wachstum der Wurzelkulturen sowie der Intermediat- und Calystegingehalt nach der Inhibitor-Applikation bestimmt werden. Da beide Substanzen ab einer Konzentration von 0,25 mM im Enzymassay die Aktivität der *Sd*-TRII komplett hemmen, wurde dem Gamborg's B5 Nährmedium der Wurzelkulturen 0,4 mM der Substanzen zugegeben. Die Konzentration

von 0,4 mM stellte einen Kompromiss zwischen einer möglichst gut wirksamen Hemmkonzentration und der nur begrenzt verfügbaren Substanzmenge dar, die für weitere Applikations-Konzentrationen nicht ausreichte. Wegen geringer Mengen der zwei Testsubstanzen, wurden diese an *S. dulcamara* Wurzelkulturen in kleinem Maßstab appliziert. Die Wurzelkulturen wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Nährmedium kultiviert. Es wurden pro Substanz 3 Kolben angesetzt. Zur Kontrolle wurden je 3 Kolben mit 0,4 mM NaCl bzw. ohne Zusätze in Gamborg's B5 Flüssigmedium kultiviert. NaCl wurde verwendet, um gleiche osmotische Verhältnisse zu gewährleisten.

Es zeigten sich nach 3 Wochen optisch erkennbare Unterschiede im Wachstumsverhalten der Wurzelkulturen (Abb. C- 20). Da nach vier Wochen in den mit Inhibitor behandelten Ansätzen nicht genügend Wurzelmasse zur Analyse der Intermediate und Calystegine zur Verfügung stand, wurde der Kultivierungszeitraum verlängert. Nach 7 Wochen wurden die Frischmasse, Trockenmasse, Intermediat- und Calystegingehalte der Wurzelkulturen bestimmt.

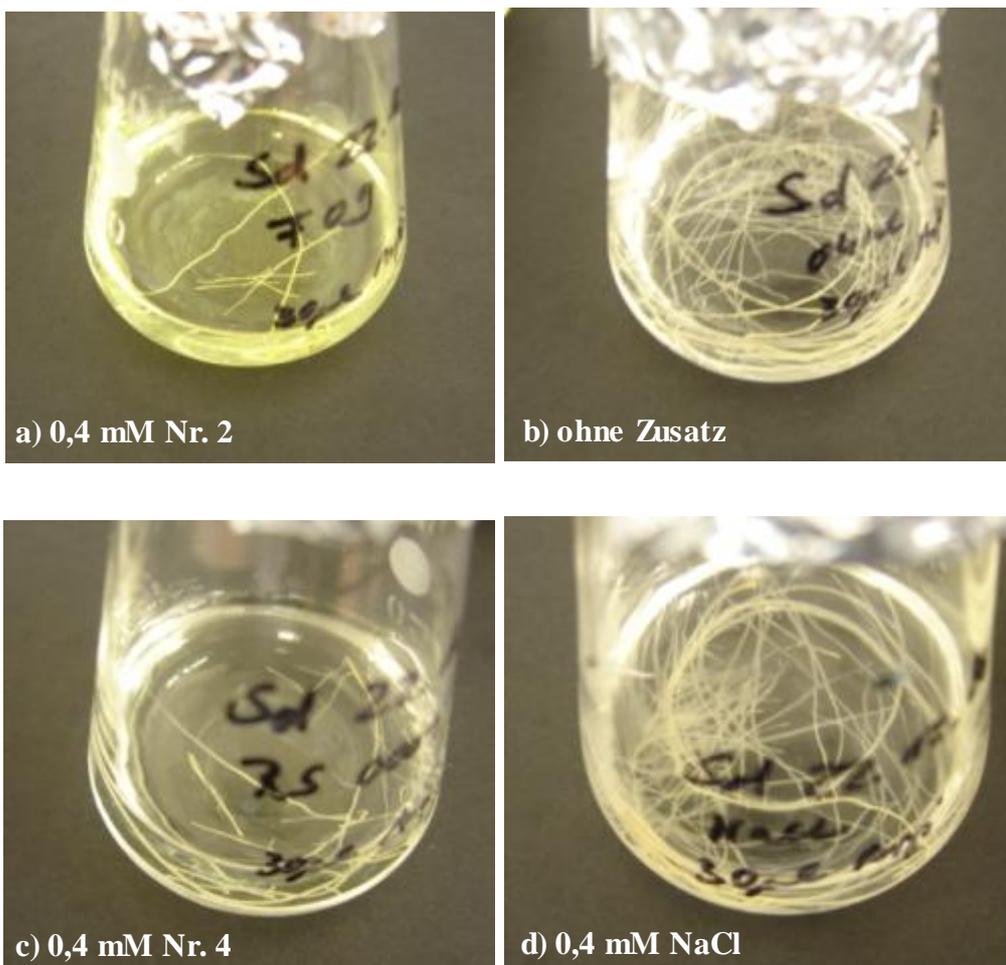


Abb. C- 20: *S. dulcamara* Wurzelkultur nach 3 Wochen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

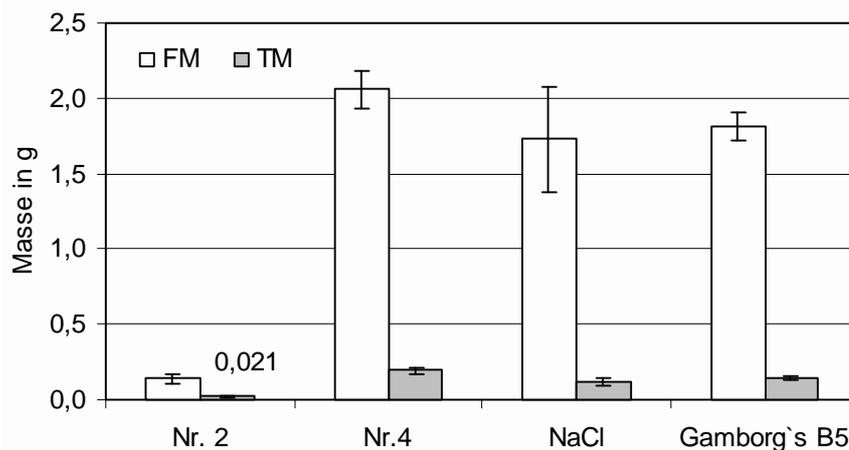


Abb. C- 21: Frisch- und Trockenmasse nach 7 Wochen Kultivierung der *S. dulcamara* Wurzelkultur mit 0,4 mM der Inhibitoren Nr. 2 und Nr. 4, mit 0,4 mM NaCl und normalem Gamborg's B5 Flüssigmedium. Werte sind Mittelwerte einer 3fach Bestimmung. Standardabweichung ist als Balken dargestellt. Die Werte mit normalem Gamborg's B5 Flüssigmedium stammen aus einer 2fach Bestimmung.

Es war nach Applikation von Substanz Nr. 2 ein stark hemmender Effekt auf das Wachstum festzustellen. Bei Substanz Nr. 4 und beiden Kontrollen gab es keine nennenswerten Unterschiede in der Ausbildung der Wurzelmasse nach 7 Wochen (Abb. C- 21). Die Analyse der Intermediate zeigte keinen hemmenden Einfluss der *in vitro* *Sd*-TRII inhibierenden Substanzen auf die Bildung von Pseudotropin oder den Calysteginen (Abb. C- 22). Da für die Analysen der Wurzelkulturen die mit Substanz Nr. 2 behandelt waren nur 0,021 g Trockenmasse zur Verfügung standen, war jeweils nur eine Einfachbestimmung möglich.

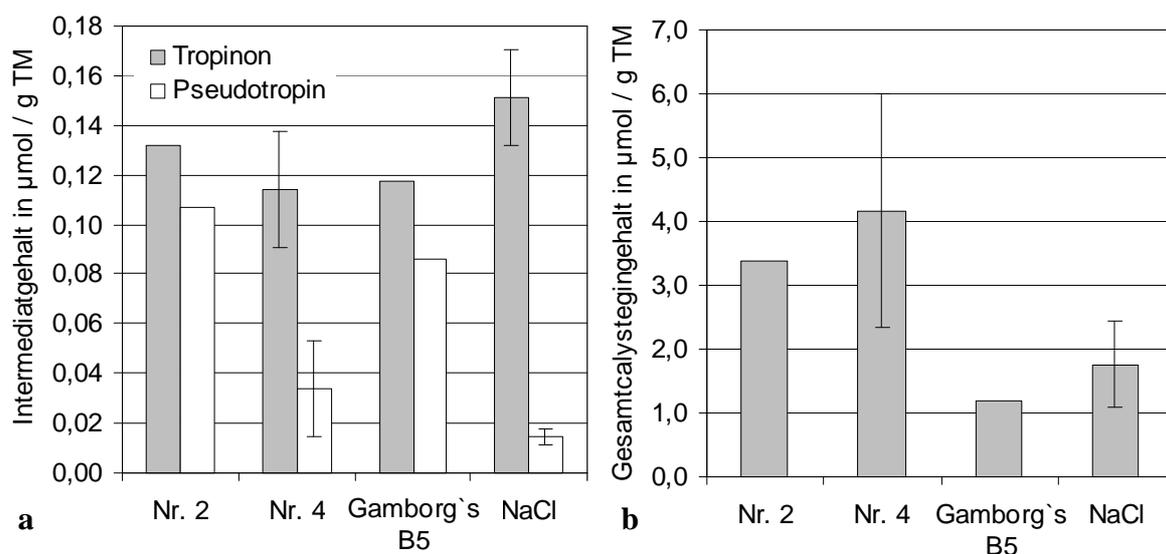


Abb. C- 22: a) Intermediatgehalt und b) Calystegingehalt in der Wurzelkultur von *S. dulcamara* 7 Wochen kultiviert mit 0,4 mM Substanz Nr. 2, Nr. 4, NaCl und in normalem Gamborg's B5. Für Nr. 2 war nur eine Bestimmung und für den Ansatz mit normalem Gamborg's B5 nur eine Doppelbestimmungen möglich, weswegen keine Standardabweichung angegeben ist.

C 3 Tropinonreduktase I

C 3.1 Isolierung *trI* homologer cDNA-Sequenzen aus *S. dulcamara* und *S. nigrum*

Die cDNA Sequenzen wurden durch PCR mit degenerierten Primern aus cDNA umgeschriebener RNA gewonnen. Die RNA stammte aus einer 14 Tage alten Wurzelkultur von *S. dulcamara* und aus jungem Blattmaterial von *S. nigrum*. Die Primer waren aus homologen Bereichen bekannter Tropinonreduktasen abgeleitet (C 2.1). Nach Generierung eines ersten Fragmentes mit der Primerkombination *trI-dir-int/trI-rev-int* und RACE-PCR (B 1.7, B 2.2.4) zur Vervollständigung der erhaltenen Amplifikate, wurden 2 cDNA Sequenzen aus *S. nigrum* und 1 cDNA Sequenz aus *S. dulcamara* isoliert. Es bestanden hohe Identitäten zu bekannten Tropinonreduktasen I. Aus *S. nigrum* wurde eine cDNA von 666 bp (put. *Sn-TRI*) und eine cDNA Sequenz von 792 bp (*Sn-TRI*) und aus *S. dulcamara* eine cDNA von 789 bp Länge (put. *Sd-TRI*) synthetisiert (Tab. C- 9). Bei der 3'-RACE-PCR für *S. nigrum* entstanden zwei unterschiedliche Amplifikate mit einem Stopp-Codon nach verschiedener Länge. Aus den erhaltenen cDNA-Sequenzen wurden Primer für die Generierung der Vollängen-Klone abgeleitet. Die Vollängen-Klone aus *S. nigrum* wurden mit den Primern put.*Sn-trI-dir-NcoI*/put.*Sn-trI-rev-XhoI*, *Sn-trI-dir-NcoI/Sd-trI-rev-XhoI* und *Sn-trI-dir-BamHI/Sn-trI-rev-SphI* mit *Pfu*-DNA-Polymerase generiert. Die Sequenz des Vollängen-Klons aus *S. dulcamara* wurde mit dem Primerpaar *Sd-trI-dir-NcoI/Sd-trI-rev-XhoI* und *Pfu*-DNA-Polymerase generiert.

C 3.2 Überexpression, Reinigung und Charakterisierung der TRI

Die cDNA-Sequenzen wurden mit den Schnittstellen *NcoI/XhoI* in den pET-21d Vektor kloniert, mit einem C-terminalen *His-Tag* fusioniert und in *E. coli* (BL21) transformiert. Die *Sn-TRI* Sequenz wurde zusätzlich mit den Schnittstellen *BamHI/SphI* in einen pQE-30 Vektor kloniert, mit einem N-terminalen *His-Tag* fusioniert und in *E. coli* (SG13009) transformiert. Eine Überexpression im pET-21d Vektor war nur für die kürzere *Sn-TRI* Sequenz erfolgreich, führte allerdings zu unlöslichem Protein. Deswegen war kein funktionaler Nachweis des Proteins möglich. Innerhalb der TRI Gruppe ist die Identität mit 84-93 % aber höher als zu der TRII Gruppe mit 61-66 % (Tab. C- 10). Deswegen wurde diese Sequenz putative *Sn-TRI* (put. *Sn-TRI*) genannt.

Tab. C- 9: Übersicht der TRI-Sequenzen aus *S. nigrum* und *S. dulcamara*

| Ressource | Sequenzlänge | | Name | Vektor | Exprimierbarkeit | Löslichkeit |
|---------------------|--------------|---------|--------------------|---------|------------------|-------------|
| | cDNA | Protein | | | | |
| <i>S. nigrum</i> | 666 bp | 222 | put. <i>Sn-TRI</i> | pET-21d | + | - |
| <i>S. nigrum</i> | 792 bp | 264 | <i>Sn-TRI</i> | pET-21d | - | |
| | | | | pQE-30 | + | + |
| <i>S. dulcamara</i> | 789 bp | 263 | put. <i>Sd-TRI</i> | pET-21d | - | |

Für die Sequenz der *Sd*-TRI und der *Sn*-TRI konnte keine Überexpression im pET-21d Vektor beobachtet werden (B 2.2.7). Das Variieren von Expressionszeit (1–24 h) und Expressionstemperatur (4 °C bis 37 °C) führte nicht zur erwünschten Überexpression. Da für die Sequenz aus *S. dulcamara* kein funktioneller Nachweis möglich war, wird die Sequenz aufgrund der hohen Identität zu bekannten TRI als putative *Sd*-TRI (put. *Sd*-TRI) bezeichnet. Die *Sn*-TRI konnte erfolgreich im pQE-30 Vektor in *E. coli* (SG13009) exprimiert werden. Die Überexpression erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 20 °C über 12-16 h (B 2.2.7). Das Bakterienlysat wurde über Ni-NTA (Ni-NTA Spin Kit, Qiagen) gereinigt und mit Tropinon im enzymatischen Standardassay eingesetzt (B 2.3.5). Nach Anreicherung der Reaktionsprodukte durch ein NADPH-regenerierendes System und Analyse mit DC (B 2.1.11), GC (B 2.1.8) und GC-MS (B 2.1.9) wurde nur Tropin als Reaktionsprodukt nachgewiesen. Pseudotropin konnte nicht detektiert werden. Diese Produktspezifität zeigt, dass diese cDNA für eine aktive TRI kodiert. Aus diesem Grund wird die Sequenz als *Sn*-TRI bezeichnet. Die Analyse der *Sn*-TRI auf Nukleotidebene und Aminosäureebene zeigte hohe Identität zu bekannten Tropinonreduktasen (Tab. C- 10, Abb. C- 23). Die höchste Identität besteht zur TRI aus *S. tuberosum* mit 93 %. Das errechnete Molekulargewicht der *Sn*-TRI liegt bei 28,7 kDa (ExpPASy Datenbank) und der isoelektrische Punkt bei pH 7,59 (Programm ProtParam). Die Molekulargewichte bekannter Tropinonreduktasen liegen in ähnlichen Größenordnungen.

Tab. C- 10: Identitäten der Aminosäuresequenzen bekannter Tropinonreduktasen in % erstellt mit CLUSTAL W (1.83)

| | aa | <i>Sd</i> - TRII | <i>St</i> - TRII | <i>Hn</i> - TRII | <i>Ds</i> - TRII | put. <i>Sd</i> - TRI | <i>St</i> - TRI | <i>Hn</i> - TRI | <i>Ds</i> - TRI | <i>Sn</i> - TRI | EMBL |
|---------------------|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|
| <i>Sd</i> -TRII | 261 | 100 | 98 | 94 | 91 | 62 | 64 | 62 | 65 | 62 | AM947940 |
| <i>St</i> -TRII | 261 | | 100 | 95 | 91 | 62 | 65 | 63 | 65 | 63 | AJ245634 |
| <i>Hn</i> -TRII | 260 | | | 100 | 93 | 63 | 65 | 63 | 66 | 63 | L20485 |
| <i>Ds</i> -TRII | 260 | | | | 100 | 60 | 62 | 62 | 64 | 61 | L20474 |
| put. <i>Sd</i> -TRI | 263 | | | | | 100 | 92 | 81 | 85 | 93 | |
| <i>St</i> -TRI | 264 | | | | | | 100 | 84 | 87 | 93 | AJ307584 |
| <i>Hn</i> -TRI | 274 | | | | | | | 100 | 86 | 83 | AB026544 |
| <i>Ds</i> -TRI | 273 | | | | | | | | 100 | 87 | L20473 |
| <i>Sn</i> -TRI | 264 | | | | | | | | | 100 | AM947942 |

C 4 Putrescin-N-methyltransferase

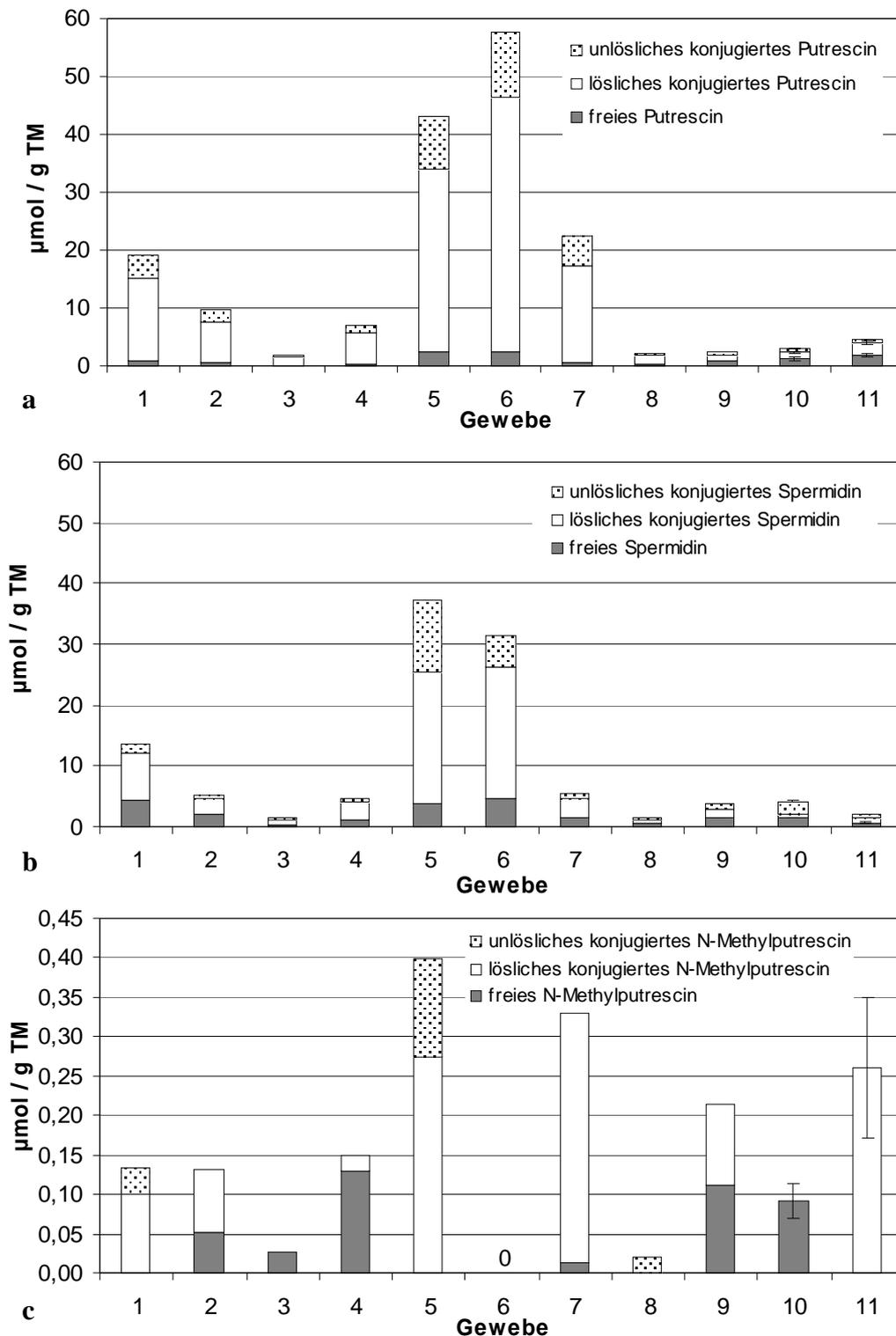
C 4.1 Analytik der Polyamine in *S. dulcamara*

Abb. C- 24: Polyamine in Geweben von *S. dulcamara*, a) Putrescin, b) Spermidin, c) N-Methylputrescin, Gewebe: 1- junge Blätter, 2- alte Blätter, 3- reife Beeren, 4- unreife Beeren, 5- Blüten, 6- Sprossspitzen, 7- junge Stängel, 8- alte Stängel, 9- Wurzel, 10- Wurzelkultur 11 Tage kultiviert, 11- Wurzelkultur 44 Tage kultiviert, Für die Gewebe 1-9 wurde eine Einfachbestimmung und für die Gewebe 10 und 11 eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Standardabweichung ist als Balken angegeben.

Die Polyamine Putrescin, Spermidin und *N*-Methylputrescin wurden in verschiedenen Geweben von *S. dulcamara* analysiert (B 2.1.3). Es wurden in allen Geweben, mit Ausnahme der Sprossspitzen, alle drei Polyamine nachgewiesen (Abb. C- 24). Der höchste Polyamingehalt wurde in Blüten und Sprossspitzen detektiert, wobei in Sprossspitzen kein *N*-Methylputrescin gefunden wurde. Die Wurzelkulturen enthielten im Alter von 11 Tagen bis zu 0,09 $\mu\text{mol/g}$ TM freies *N*-Methylputrescin. Im Alter von 44 Tagen konnte nur noch konjugiertes *N*-Methylputrescin bestimmt werden.

C 4.2 Isolierung einer *pmt* homologen Sequenz aus *S. dulcamara*

Da in den Wurzelkulturen und Pflanzengewebe freies und konjugiertes *N*-Methylputrescin nachgewiesen wurde, gibt dies Hinweis auf eine aktive Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53). Zur Amplifikation einer *pmt*-homologen Nukleotidsequenz wurde cDNA einer 14 Tage alten *S. dulcamara* Wurzelkultur verwendet, die durch Umschreiben isolierter mRNA gewonnen wurde (B 2.2.2). Ziel war, durch PCR mit degenerierten Primern Amplifikate zu erhalten, die Homologien zu bekannten *pmt* Sequenzen aufweisen. Putrescin-*N*-methyltransferasen zeigen eine bis zu 80%ige Homologie zu Spermidinsynthasen (SPDS, EC 2.5.1.16), weshalb die zu verwendenden Primer spezifisch an *pmt* homologe Bereiche binden sollten. Aus Sequenzvergleichen bekannter PMT und SPDS wurden in der Arbeitsgruppe durch M. Teuber 2 Primerpaare (*pmt*-fwd-A, *pmt*-rev-A; *pmt*-fwd-B, *pmt*-rev-B) für einen homologen Sequenzabschnitt der *pmt* abgeleitet, der sich von homologen Sequenzabschnitten der *spds* unterscheidet [Teuber et al., 2007]. Diese Primer wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Generierung eines ersten Amplifikates zur Verfügung gestellt. Es wurde eine PCR mit den Primern *pmt*-fwd-A, *pmt*-rev-A, *pmt*-fwd-B und *pmt*-rev-B in einem Ansatz durchgeführt und ein Amplifikat von 662 bp Länge erhalten. Vergleiche mit bekannten *pmt* zeigten hohe Identitäten und ein Fehlen von Nukleotiden am N- und C-Terminus der Sequenz. Zur Vervollständigung wurde mit RACE-PCR gearbeitet (B 2.2.4). Der Volllängen-Klon der *pmt*-homologen Sequenz wurde mit den Primerpaaren Sd-*pmt*-dir-*Nco*I/Sd-*pmt*-rev-*Xho*I und Sd-*pmt*-dir-*Bam*HI/Sd-*pmt*-rev-*Sph*I mit *Pfu*-DNA-Polymerase erhalten.

Tab. C- 11: Identitäten der Aminosäuresequenzen bekannter Putrescin-*N*-methyltransferasen in % erstellt mit CLUSTAL W (1.83)

| PMT | aa | <i>St</i> -PMT | <i>Di</i> -PMT1 | <i>Ds</i> -PMT | <i>Di</i> -PMT2 | <i>Pd</i> -PMT | <i>Hn</i> -PMT | <i>Ab</i> -PMT1 | <i>Le</i> -PMT | <i>Ab</i> -PMT2 | <i>Cs</i> -PMT1 | <i>Sd</i> -PMT | EMBL |
|-----------------|-----|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------|
| <i>St</i> -PMT | 340 | 100 | 88 | 90 | 87 | 88 | 84 | 81 | 81 | 82 | 80 | 91 | AJ605553 |
| <i>Di</i> -PMT1 | 340 | | 100 | 92 | 97 | 87 | 83 | 80 | 82 | 80 | 77 | 91 | AM177609 |
| <i>Ds</i> -PMT | 344 | | | 100 | 90 | 88 | 81 | 84 | 82 | 80 | 78 | 90 | AJ583514 |
| <i>Di</i> -PMT2 | 341 | | | | 100 | 85 | 81 | 79 | 82 | 79 | 76 | 90 | AM177610 |
| <i>Pd</i> -PMT | 344 | | | | | 100 | 79 | 82 | 80 | 80 | 76 | 87 | AM177611 |
| <i>Hn</i> -PMT | 338 | | | | | | 100 | 95 | 90 | 80 | 77 | 84 | AB018572 |
| <i>Ab</i> -PMT1 | 336 | | | | | | | 100 | 91 | 82 | 78 | 81 | AB018570 |
| <i>Le</i> -PMT | 340 | | | | | | | | 100 | 78 | 77 | 81 | AM177607 |
| <i>Ab</i> -PMT2 | 340 | | | | | | | | | 100 | 77 | 80 | AB018571 |
| <i>Cs</i> -PMT1 | 344 | | | | | | | | | | 100 | 80 | AM177608 |
| <i>Sd</i> -PMT | 340 | | | | | | | | | | | 100 | AM947941 |

| | | ▼ | ▼ | ▼ | Motiv 1 |
|-----------------|--|------|----|----|---------------|
| <i>Hn</i> -PMT | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 110 |
| <i>Ab</i> -PMT1 | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 108 |
| <i>Le</i> -PMT | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 115 |
| <i>St</i> -PMT | GWFSEFSALWPGEAFSVKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 111 |
| <i>Sd</i> -PMT | GWFSEFSALWPGEAFSVKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFS 111 |
| <i>Di</i> -PMT1 | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 111 |
| <i>Di</i> -PMT2 | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 111 |
| <i>Ds</i> -PMT | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 115 |
| <i>Pd</i> -PMT | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 115 |
| <i>Ab</i> -PMT2 | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDGAI | | | | QHTENGGFF 109 |
| <i>Cs</i> -PMT | GWFSEFSALWPGEAFSLKIEKLLFQGKSDYQDVMLFESATYGVKVLTLDRAI | | | | QHTENGGFF 117 |
| | ***** :*****:***:***** | | | | ***** |
| | | ▼▼ | ▼▼ | ▼▼ | Motiv 2 |
| <i>Hn</i> -PMT | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKYFP | | | | 170 |
| <i>Ab</i> -PMT1 | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPIDTIDIVEIDDVVVDVSRKYFP | | | | 168 |
| <i>Le</i> -PMT | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 175 |
| <i>St</i> -PMT | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 171 |
| <i>Sd</i> -PMT | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 171 |
| <i>Di</i> -PMT1 | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 171 |
| <i>Di</i> -PMT2 | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 171 |
| <i>Ds</i> -PMT | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 175 |
| <i>Pd</i> -PMT | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 175 |
| <i>Ab</i> -PMT2 | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDDVVVDVSRKFFP | | | | 169 |
| <i>Cs</i> -PMT | YTEMIVHPLPLGSIPSPKKVLIIGGGIGFTLFEVSRYPSTIEKIDIVEIDKVVVDVSRQFFP | | | | 177 |
| | ***** .*****:*** ** .:.*:***** .:*****:*** | | | | |
| | | ▼▼▼▼ | ▼ | ▼ | Motiv 4 |
| <i>Hn</i> -PMT | YLAAGFDDPRVTLIVGDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVTKAL | | | | 230 |
| <i>Ab</i> -PMT1 | YLAAGFDDPRVTLIVGDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 228 |
| <i>Le</i> -PMT | YLAAGFDDPRVTLIVGDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 235 |
| <i>St</i> -PMT | YLAANFNDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 231 |
| <i>Sd</i> -PMT | YLAANFNDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 231 |
| <i>Di</i> -PMT1 | YLAANFNDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 231 |
| <i>Di</i> -PMT2 | YLAANFNDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 231 |
| <i>Ds</i> -PMT | YLAANFNDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 235 |
| <i>Pd</i> -PMT | YLAANFNDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 235 |
| <i>Ab</i> -PMT2 | YLAAGFDDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKAL | | | | 229 |
| <i>Cs</i> -PMT | YLAGAGFEDPRVTLVLDGAAAFVKAAPGYDDAIIVDSSDPIGPAKDLFEMPFFEAVAKAL | | | | 237 |
| | **.*:*****: .:***** *: *****:*****:*****:*****:*** | | | | |
| | | ▼ | ▼ | | |
| <i>Hn</i> -PMT | RPGGVVCTQAESIWLHMHLIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 290 |
| <i>Ab</i> -PMT1 | RPGGVVCTQAESIWLHMHLIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 288 |
| <i>Le</i> -PMT | RPGGVVCTQAESIWLHMHLIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 295 |
| <i>St</i> -PMT | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 291 |
| <i>Sd</i> -PMT | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 291 |
| <i>Di</i> -PMT1 | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 291 |
| <i>Di</i> -PMT2 | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 291 |
| <i>Ds</i> -PMT | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 295 |
| <i>Pd</i> -PMT | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 295 |
| <i>Ab</i> -PMT2 | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIDNCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTKGP | | | | 289 |
| <i>Cs</i> -PMT | RPGGVVCTQAESIWLHMHIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTVPPTYPTGVIGYMLCSTEGP | | | | 297 |
| | *****:*****:*** ** .** *****:*****:*****:*** | | | | |

Abb. C- 25: Partielles Alignment der Aminosäuresequenzen bekannter PMT, ▼ = AS der Substrat- und Cosubstratbindestelle nach Korelev et al., 2002, grau unterlegt = AS der Substrat- und Cosubstratbindestelle postuliert nach *Ds*-PMT Modell, blau = postulierte Motive der Substrat- und Cosubstratbindung nach Teuber al., 2007, rot = Serin¹¹¹ aus *Sd*-PMT

Die Analyse der Sequenz zeigte für die Nukleotid- und Aminosäuresequenz hohe Identität zu bekannten Putrescin-*N*-methyltransferasen (Tab. C- 11). Die höchste Identität zeigte der Vergleich zur *St*-PMT aus *S. tuberosum* und zur *Di*-PMT1 aus *D. innoxia* mit 91 %. Das

errechnete Molekulargewicht der *Sd*-PMT liegt bei 37,3 kDa (ExpPASy Datenbank) und der errechnete isoelektrische Punkt bei pH 6,05 (Programm ProtParam).

C 4.3 Überexpression und Reinigung *Sd*-PMT

Die *Sd*-PMT mit C-terminalem His-Tag wurde mit pET-21d Vektor (Novagen) in *E. coli* Zellen (BL21) exprimiert. Dazu wurde die *sd-pmt* Sequenz mit den Schnittstellen *NcoI/XhoI* in den linearisierten Expressionsvektor kloniert und mit dem His-Tag fusioniert. Die Überexpression erfolgte bei 37 °C für 4-6 h. Die Bakterienlysate wurden 2fach über Nickelaffinitätssäulen (HiTrapTM Chelating SepharoseTM, Säulenvolumen 5 ml, Amersham-Bioscience) gereinigt (B 2.3.6) und mit SDS-PAGE (B 2.3.4) analysiert. Die gereinigten und umgepufferten Fraktionen wurden vereint und zur Bestimmung der Enzymkinetik mit dem colorimetrischem Enzymassay (B 2.3.6.6) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden zusätzlich per HPLC bestimmt (B 2.1.10). Es konnte *N*-Methylputrescin als Reaktionsprodukt identifiziert werden. Somit kodiert die cDNA für eine aktive PMT. Eine reproduzierbare Reinigung der *Sd*-PMT mit N-terminalem His-Tag (Vektor: pQE-30 Qiagen, *E. coli*: SG13009) über Nickelaffinitätssäulen (HiTrapTM Chelating SepharoseTM, Säulenvolumen 5 ml, Amersham-Bioscience) konnte nicht erreicht werden, da es zu keiner ausreichenden Anreicherung von PMT-haltigen Elutionsfraktionen kam. In Vorversuchen mit Ni-NTA Säulen (Ni-NTA Spin Kit, Qiagen) wurde die überexprimierte N-*Sd*-PMT im Durchfluss und in der Waschfraktion gefunden. Auch eine Verringerung der Imidazolkonzentration im Bindepuffer (von 20 mM auf 0 mM) und im Waschpuffer (auf 10 mM) brachte keine positiven Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde die C-*Sd*-PMT für die Charakterisierung verwendet.

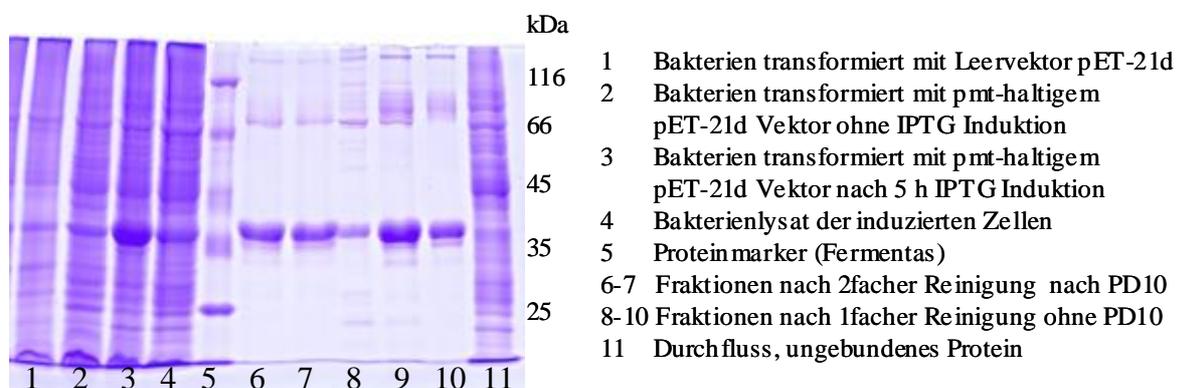


Abb. C- 26: SDS-Gel nach Reinigung der *Sd*-PMT mit C-terminalem His-Tag über Nickelaffinitätschromatographie

C 4.4 Biochemische Charakterisierung der *Sd*-PMT

Es wurde für Putrescin ein K_m -Wert von 167 μmol und für SAM ein K_m -Wert von 22,7 μmol bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war mit 3500-3700 pkat/mg 10mal niedriger (Tab. C- 12) als die der PMT aus *D. stramonium* (*Ds*-PMT). Der Vergleich zu den mit colorimetrischem Enzymassay (B 2.3.6.6) ermittelten K_m und V_{max} Werten der PMT aus *D. stramonium* [Biastoff et al., 2006] zeigte allerdings für die Enzymaffinität zu Putrescin und SAM ähnliche Werte.

Tab. C- 12: Km und Vmax Werte bestimmt mit colorimetrischem Enzymassay

| PMT | Putrescin | | S-Adenosyl-L-methionin | |
|----------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| | Km in μmol | Vmax in pkat/mg | Km in μmol | Vmax in pkat/mg |
| <i>Solanum dulcamara</i> | $167 \pm 21,1$ | $3540 \pm 135,1$ | $22,7 \pm 7,5$ | $3760 \pm 365,3$ |
| <i>Datura stramonium</i> * | 108 ± 17 | 45000 | 42 ± 11 | |

* Werte aus Biastoff et al., 2006

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der *Sd*-PMT (Abb. C- 25) zu bekannten PMT zeigte für die postulierten Sequenzbereiche der Substrat- und Cosubstratbindung nur eine unterschiedliche Aminosäure (Serin¹¹¹) im Motiv 1 [Korolev et al., 2002; Teuber et al., 2007]. Um zu klären, ob die Aminosäure Serin anstelle des sonst vorhandenen Prolins eine Auswirkung auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ausüben könnte, wurde ein Modell der *Ds*-PMT verwendet. Das Modell wurde von PD Dr. Wolfgang Brandt (IPB, Halle) erstellt und für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt [Teuber et. al., 2007].

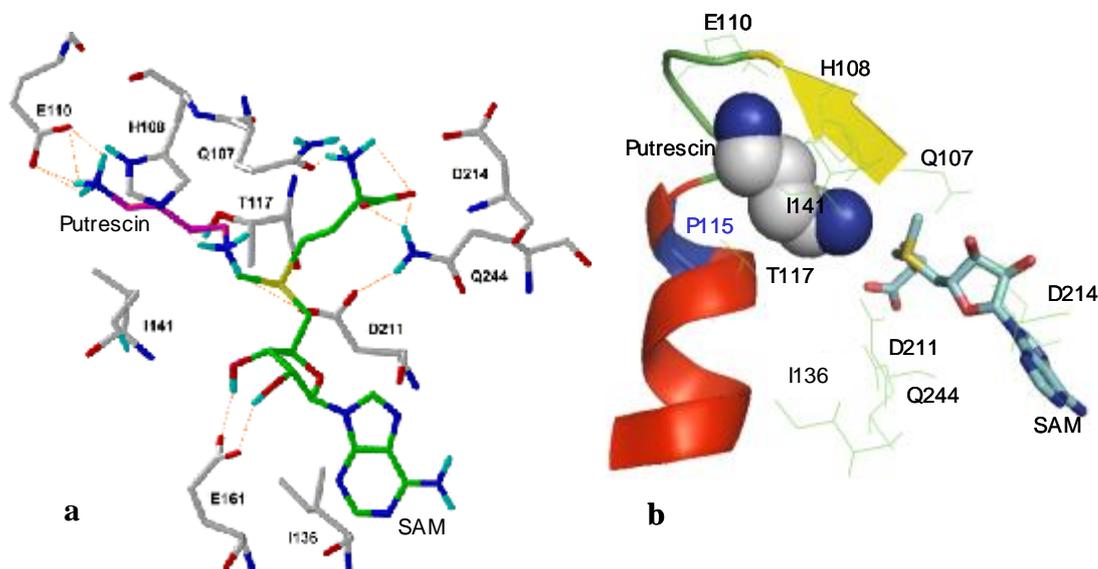


Abb. C- 27: a) Darstellung des aktiven Zentrums der *Ds*-PMT mit dem Substrat Putrescin (magenta) und dem Cosubstrat SAM (grün), Die rot gepunkteten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken dar. [Teuber et al., 2007], b) Darstellung des gleichen Modellabschnitts (a) als Sekundärstruktur, erstellt mit Pymol, α -Helix = rot, Faltblatt = gelb, Loop = grün, einzelne Aminosäuren = hellgrün, P¹¹⁵ (blau) befindet sich in *Sd*-PMT anstelle des S¹¹¹ in *DS*-PMT.

C 5 [^{13}C -methyl]-Tropinon Umsatz in *S. dulcamara* Wurzelkulturen

Nachdem TRII Aktivität in der *S. dulcamara* Wurzelkultur nachgewiesen wurde (C 1.4) und nach Tropinon-Applikation (C 1.5) nur Pseudotropin als Reduktionsprodukt detektiert werden konnte, wurde [^{13}C -methyl]-Tropinon appliziert mit dem Ziel, markiertes [^{13}C -methyl]-Pseudotropin zu synthetisieren und dessen Umsatz zu verfolgen.

Wurzelkulturen wurden nach Inkubation (12–120 h) mit 7 mM [^{13}C -methyl]-Tropinon oder 7 mM unmarkiertem Tropinon geerntet und extrahiert (B 2.1.5, B 2.1.6). Die lyophilisierten Extrakte wurden in D_2O gelöst und mit NMR vermessen. Dabei wurden die HSQC NMR Spektren der markierten Extrakte mit denen der unmarkierten Kontrolle verglichen. Im Extrakt der *S. dulcamara* Wurzelkultur nach 120 h Inkubation mit 7 mM [^{13}C -methyl]-Tropinon zeigten die NMR-Messungen [^{13}C -methyl]-Pseudotropin (39,3/2,76 ppm, Bezug nehmend auf $\text{N-}^{13}\text{CH}_3$).

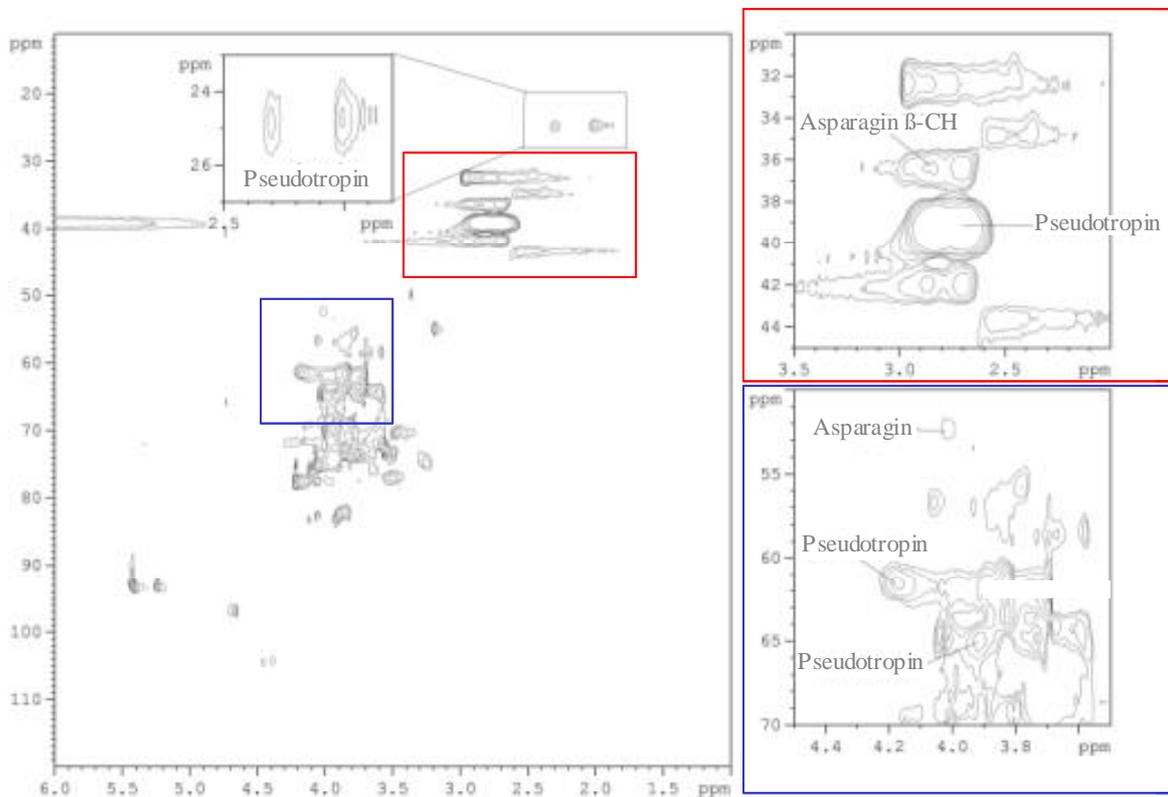


Abb. C- 28: HSQC-NMR Spektrum eines Extraktes aus *S. dulcamara* Wurzelkultur nach 120 h Inkubation mit 7 mM [^{13}C -methyl]-Tropinon

Die anderen Pseudotropin entsprechenden Kreuz-Signale bei 24,9/2,01 ppm, 25,0/2,3 ppm, 61,5/4,17 ppm und 64,5/3,91 ppm wurden ebenfalls detektiert (Abb. C- 28). Zusätzlich zum markierten Pseudotropin wurde die markierte Aminosäure Asparagin detektiert. Die Markierung war bei 36,6/2,85 ppm zu sehen. Im Vergleich zur unmarkierten Probe ist die Intensität des Kreuz-Signals größer und entspricht der C3-CH_2 Gruppe des Asparagins. Das Kreuz-Signal des C2-CH wurde bei 52,5/4,01 ppm ebenfalls detektiert, schien aber nicht markiert zu sein.

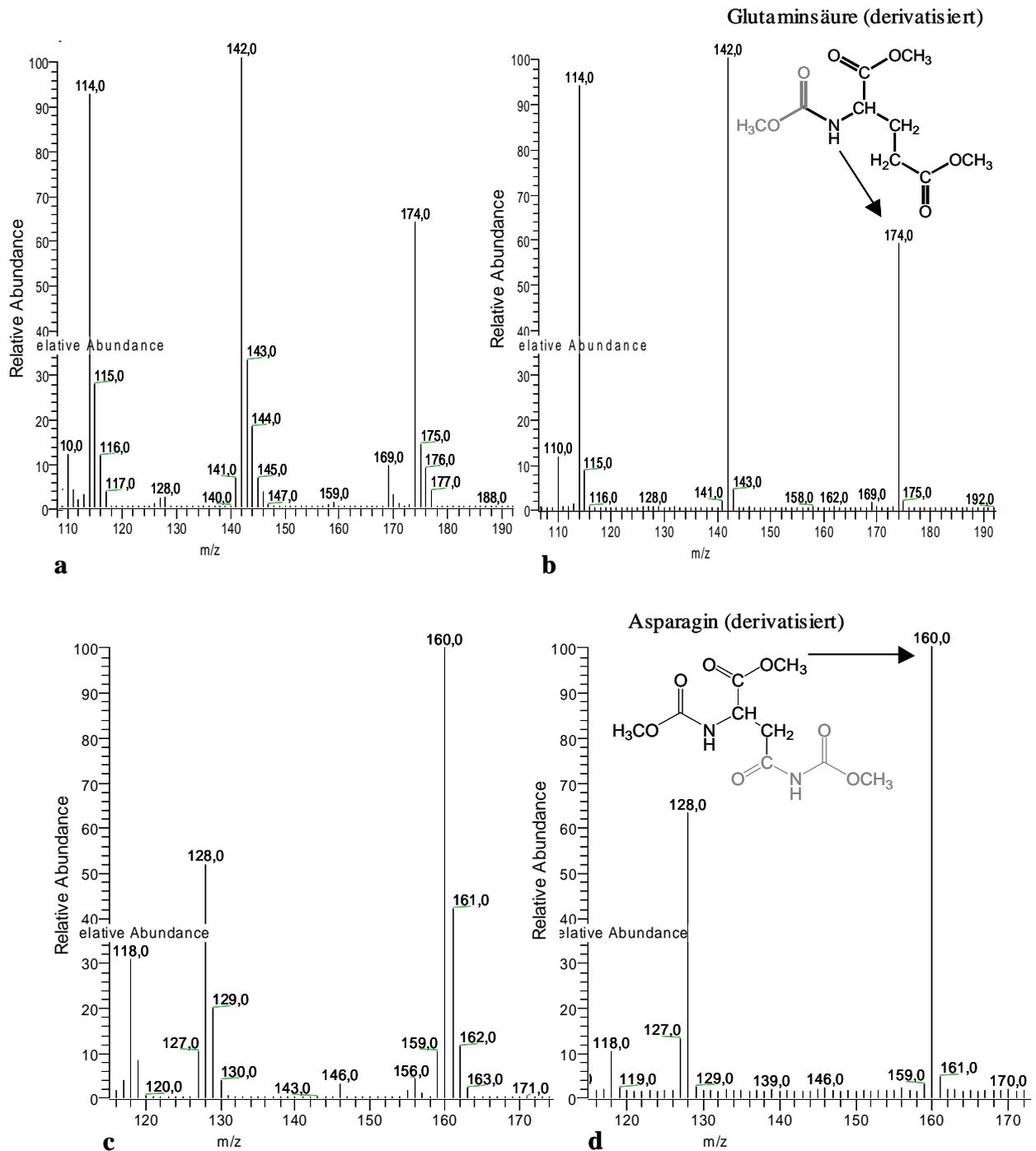


Abb. C- 29 a-d: GC-MS Zerfallsmuster der Aminosäuren Glutaminsäure und Asparagin, a) Glutaminsäure ^{13}C -markiert, b) Glutaminsäure unmarkiert, c) Asparagin ^{13}C -markiert, d) Asparagin unmarkiert

In Extrakten der Wurzelkultur nach kürzeren Inkubationszeiten konnten außer [^{13}C -methyl]-Tropinon und [^{13}C -methyl]-Pseudotropin keine weiteren markierten Verbindungen mit NMR gefunden werden.

Zur weiteren Analyse der Extrakte auf markierte Aminosäuren wurde die sensitivere Methode der GC-MS (B 2.1.9) eingesetzt. Die Derivatisierung mit Methylchloroformiat erzeugte 3fach-Derivate. Damit sollte auch die Anreicherung des ^{13}C im Asparagin bestimmt werden.

Für die GC-MS Messungen wurden die lyophilisierten Extrakte (B 2.1.7) in Ethylacetat gelöst und mit GC und GC-MS vermessen (B 2.1.8, B 2.1.9). Im Extrakt der *S. dulcamara* Wurzelkultur nach 120 h Inkubation mit 7 mM [¹³C-*methyl*]-Tropinon zeigten die GC-MS Messungen, dass Asparagin zu 21 % und Glutaminsäure zu 14 % markiert vorlagen (Abb. C-29 a-d). Grundlage für die Berechnung bildete für Glutaminsäure das Fragment 174 und für Asparagin das Fragment 160. Es wurde zur Berechnung des Anteils der Markierung die Formel $A = (M1-m1)/[m0+(M1-m1)]$ verwendet (A: Anteils der Markierung; m0: Isotopenverhältnis des Moleküls M der unmarkierten Probe; m1: Isotopenverhältnis des Moleküls M+1 der unmarkierten Probe; M1: Isotopenverhältnis des Moleküls M+1 der markierten Probe). Die natürliche Isotopenhäufigkeit ist dabei berücksichtigt. [¹³C-*methyl*]-Pseudotropin wurde ebenfalls mit GC-MS nachgewiesen [Bartholomeusz 2007].

D Diskussion

D 1 Calysteginakkumulation in *Solanum*-Arten

Calystegine wurden bisher in vielen Solanaceen-Arten detektiert, die klassische Tropanalkaloide wie Scopolamin und Hyoscyamin enthalten [Tepfer et al., 1988; Dräger et al., 1994, 1995; Nash et al., 1993; Asano et al., 1996b; Kato et al., 1997; Griffiths et al., 1996; Bekkouche et al., 2001]. *S. tuberosum*, eine Kulturpflanze der menschlichen Ernährung, akkumuliert nicht die klassischen Tropanester. Trotzdem wurden hohe Calystegingehalte in Kartoffelknollen (bis 1100 µg/g FM) und Kartoffelkeimen (bis 1200 µg/g FM) detektiert [Keiner und Dräger, 2000; Kaiser et al., 2006; Richter et al., 2007; Stenzel et al., 2006]. Ein Vergleich zeigte geringere Calystegingehalte in anderen Solanaceen wie in *A. belladonna* (bis 625 µg/g FM) und in *S. melongena* (bis 80 µg/g FM) [Asano et al., 1997a; Dräger et al., 1995].

Für Hypothesen über die physiologische Rolle der Calystegine sind Informationen über deren Organverteilung und das entwicklungsabhängige Vorkommen wichtig. Enthalten enge Verwandte zu *S. tuberosum*, die keine Knollen ausbilden, ebenfalls Calystegine und wie sind diese in der Pflanze verteilt? Dazu wurden in dieser Arbeit 7 Arten der Gattung *Solanum* bezüglich der Tropanalkaloid- und Calysteginakkumulation untersucht (C 1.1, C 1.2) und in allen Arten Calystegine und Tropanalkaloide nachgewiesen. Auffallend an der gewebespezifischen Analyse war die erhöhte Calysteginakkumulation in Wurzeln, Blüten, Sprossspitzen und jungen Geweben (Abb. C-1, Abb. C-2) bei nahezu allen untersuchten Arten. Nach bisherigen Beobachtungen akkumulieren Calystegine bevorzugt in metabolisch aktiven Geweben, wie Kartoffelkeimen, jungen Blättern und Blüten [Keiner und Dräger, 2000]. Pflanzen schützen besonders meristematische Gewebe gezielt gegen Fraßfeinde [Creelmann und Mullet, 1997]. Die Nicotinbiosynthese [Baldwin 1999] und die Glycoalkaloidbiosynthese [Percival et al., 1994] werden z.B. direkt durch Insektenfraß stimuliert und stehen damit der Pathogenabwehr zur Verfügung. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Calysteginakkumulation und der Pathogenabwehr oder des Pflanzenüberlebens konnte bisher nicht gezeigt werden (A 1.3). Da Calystegine hauptsächlich in meristematischen Geweben akkumulieren [Dräger et al., 1995] und glycosidasehemmende Eigenschaften besitzen, sollte eine Hemmbarkeit von Insektenglycosidasen durch Calystegine untersucht werden. Castanospermin, isoliert aus *Castanospermum australe* [Asano et al., 2000a], hemmte β-Glucosidasen aus Insekten [Fellows et al., 1992].

In den Arten *S. dulcamara*, *S. muricatum*, *S. mitlense* und in den Stängeln von *S. sisymbriifolium* war das Alkaloidverhältnis stark zu den TRII Alkaloiden verschoben (Abb. C- 1 - 3). *S. muricatum* und *S. dulcamara* zeigten innerhalb der untersuchten *Solanum*-Arten die höchsten Gesamtcalystegingehalte (Abb. C-1) und akkumulierten bis zu 5fach höhere Calysteginmengen verglichen zu den übrigen untersuchten Arten. Während der Analyse, zeigten die Gewebe des Bittersüßen Nachtschattens (*S. dulcamara* L.) die Calystegine A₃, A₅, B₁ und B₂. Der höchste Gehalt mit ca. 1500 µg Gesamtcalystegingehalt bezogen auf 1g Trockenmasse wurde in Sprossspitzen und Blüten detektiert. Calystegin A₃ überwog dabei im

Calystegingemisch in jedem untersuchten Gewebe (Abb. C-1). Dies ist untypisch für Calysteginmuster in Solanaceen. Als dominantes Calystegin wurde bisher Calystegin B₂ beschrieben [Dräger 2004; Dräger et al., 1995] und akkumuliert z.B. in *S. tuberosum* am stärksten [Keiner und Dräger, 2000]. Auch in vielen *Erythroxylum* Spezies war Calystegin B₂ vorherrschend [Brock et al., 2005]. Von den Calysteginen ist Calystegin B₂ am weitesten verbreitet und wurde in fast allen Pflanzen, die Calystegine produzieren, detektiert [Schimming et al., 1998]. Durch die 4 äquatorialen Hydroxylgruppen stellt es chemisch wahrscheinlich die stabilste Form in der Gruppe der B-Calystegine dar [Biastoff und Dräger, 2007]. Ein Muster mit überwiegender Calystegin A₃ Akkumulation wurde bisher nur in jungen Pflanzenteilen [Scholl et al., 2001] und Wurzelkulturen [Scholl et al., 2003] von *C. sepium* (Convolvulaceae) gefunden. Calystegin A₃ könnte eine besondere Funktion im pflanzlichen Metabolismus spielen. Experimente zeigten eine Abnahme des Larvengewichtes von *Phthorimaea operculella* (Zeller) auf Calystegin A₃-behandelten Kartoffelkalluskulturen in einem Beobachtungszeitraum von 9 Tagen [Musmeci et al., 1999]. Auffällig war das Fehlen von Calysteginen der A-Gruppe in *S. rantonnettii*. Diese Art könnte in weiterführenden vergleichenden Untersuchungen zur Bedeutung von Calystegin A₃ eingesetzt werden. Der geringste Gesamtcalystegingehalt wurde in *S. nodiflorum* detektiert (Abb. C- 2). In *S. nigrum* konnten keine Calystegine detektiert werden. Calystegine sind stickstoffhaltige Alkaloide. Erst durch Kultivierung mit zusätzlicher Stickstoffdüngung konnte Calystegin A₃ in *S. nigrum* nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis, dass die Calysteginbiosynthese durch variable Stickstoffzufuhr beeinflussbar ist.

Die Bedeutung der Calystegine muss nicht für alle Pflanzen einheitlich sein. Die Zusammensetzung der Calysteginmuster ist von der Art abhängig. Die Höhe der Akkumulation kann umweltabhängig angepasst werden. Zusammenfassend kann das unterschiedliche Calysteginmuster innerhalb der untersuchten *Solanum*-Arten auf die differenzierte Bedeutung der Calystegine für den pflanzlichen Organismus hinweisen.

D 2 Tropinonreduktase-Aktivität in Solanum-Arten

Der Tropanalkaloidstoffwechsel verzweigt sich mit der stereospezifischen Reduktion des Tropinons. TRI und TRII sind aus *A. belladonna* [Dräger und Schaal, 1994] *H. niger* [Hashimoto et al., 1992] und *D. stramonium* [Portsteffen et al., 1994] charakterisiert. Diese Pflanzen enthalten sowohl die klassischen TRI-Alkaloide wie Scopolamin und Hyoscyamin als auch die TRII-Alkaloide wie Calystegine.

In den hier untersuchten *Solanum*-Arten weist Tropin und/oder Pseudotropin auf Tropinonreduktasen hin (C 1.2). Tropinonreduktase-Aktivität konnte bereits in Pflanzenextrakten verschiedener Spezies von *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Physalis*, *Datura*, *Calystegia*, *Pysochlaina* und *Dubiosa* gemessen werden [Hashimoto et al., 1992; Meier 2001]. In Proteinpräparationen der Pflanzengewebe der 7 *Solanum*-Arten wurden TRI- und TRII-Aktivitäten nachgewiesen (Tab. C- 2). Das Muster der Aktivität war unterschiedlich in den untersuchten *Solanum*-Arten. In *S. muricatum*, *S. rantonnettii* und *S. sissymbriifolium* konnten beide TR-Aktivitäten nachgewiesen werden, wobei gewebespezifische Unterschiede in der Aktivitätsverteilung der TRI und TRII bestanden. Es zeigte sich, dass eine Reduktion

des Tropinons zu Pseudotropin und Tropin auch in oberirdischen Pflanzengewebe möglich und nicht auf die Wurzel beschränkt ist.

Für die native Extraktion von Enzymen aus dem Pflanzengewebe ist bekannt, dass die Enzyme oft durch mit extrahierte phenolische Verbindungen angegriffen bzw. zerstört werden können. Demzufolge kann mit dem Enzymassay die Aktivität von Tropinonreduktasen zwar bestimmt, aber nicht ausgeschlossen werden. In einigen Arten war nur eine spezifische Reduktion detektierbar (Tab. C-2). In *S. nigrum* und *S. nodiflorum* wurde nur TRI-Aktivität nachgewiesen (Tab. C-2). Ausschließlich TRII-Aktivität wurde in Proteinextrakten aus allen Pflanzengewebe von *S. dulcamara* nachgewiesen. In *S. nigrum* und *S. dulcamara* sollte allerdings die Reduktion zu Tropin und Pseudotropin möglich sein, da Tropin und Calystegine als Biosyntheseprodukte, wenn zum Teil auch nur in Spuren oder erst nach Tropinonapplikation, in beiden Arten detektiert wurden. Zur Absicherung wurden Applikationsversuche mit Tropinon durchgeführt. Die Zufuhr von Tropinon an oberirdisches Pflanzenmaterial von *S. nigrum* führte nur zur Bildung von Tropin (Tab. C- 2) und bestätigte die Aktivitätsmessungen. In Wurzeln von *S. nigrum* konnte keine TR-Aktivität gemessen werden und in Wurzelkulturen wurde Tropinon zwar aufgenommen, aber nicht umgesetzt. Durch die Untersuchungen konnten keine Hinweise auf eine detektierbare TRII-Aktivität in *S. nigrum* gefunden werden. Bei der Applikation von Tropinon an Wurzelkulturen von *S. dulcamara* wurde nur Pseudotropin detektiert. Eine Wurzelkultur von *S. dulcamara* zeigte eine konstante Calystegin-Akkumulation über 35 Tage und TR-Aktivität von 0,17-0,25 nkat/mg Protein (Abb. C- 6). Tropinonzusatz an intakte sterile Pflanzen von *S. dulcamara* zeigte neben der Bildung von Pseudotropin auch Spuren von Tropin (Tab. C- 3). Die geringe Menge an Tropin könnte auf eine schwache spezifische TRI-Aktivität hin deuten oder durch unspezifische Reduktion bei einem Überangebot von Tropinon durch andere Reduktasen verursacht sein. Um dies zu klären müssten die beteiligten Enzyme isoliert und charakterisiert werden.

D 3 Tropinonreduktase I in *S. dulcamara* und *S. nigrum*

Tropinonreduktase I ist für die stereospezifische Reduktion des Tropinons zu Tropin zuständig. Aus Tropin werden durch Veresterung die klassischen Tropanalkaloide, wie Scopolamin und Hyoscyamin gebildet. Aus Pflanzen, wie *H. niger* [Nakajima et al., 1999b] und *D. stramonium* [Nakajima et al., 1993b], die diese Alkaloide enthalten, sind TRI isoliert und charakterisiert worden. *S. dulcamara* und *S. nigrum* enthalten keine klassischen Tropinester, besitzen aber TRI ähnliche cDNA Sequenzen (C 3.1). Dies wurde ebenso für *S. tuberosum* gezeigt und eine TRI isoliert und charakterisiert. Trotz großer Sequenzähnlichkeit können starke Unterschiede in der Kinetik auftreten. Die *St*-TRI zeigte im Vergleich zu bekannten TRI [Nakajima et al., 1999a; Hashimoto et al., 1992] eine geringe katalytische Aktivität ($K_{\text{kat}} = 15 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) unter optimalen Bedingungen [Kaiser et al., 2006].

Die Abwesenheit von Tropin in den drei *Solanum*-Arten führt zu der Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser TRI ähnlichen Proteine für die Pflanzen. Möglicherweise sind die Proteine in einen anderen Metabolismus involviert und reduzieren Tropinon nur als

Nebenaktivität. Eine geringe Akkumulation von *St*-TRI-Protein in Geweben von *S. tuberosum*, die an der Tropanalkaloidbiosynthese beteiligt sind, unterstützt diese Theorie [Kaiser et al., 2006]. Die Autoren halten es für fraglich, die *St*-TRI der Tropanalkaloidbiosynthese zuzuordnen und schlagen eine detailliertere Studie der *St*-TRI vor, um die physiologische Bedeutung des Enzyms zu klären [Kaiser et al., 2006].

Die Expression und umfangreiche Charakterisierung der Sequenzen aus *S. nigrum* und *S. dulcamara* könnte helfen, die physiologische Bedeutung zu klären. Für kinetische Untersuchungen sollte ein erweitertes Spektrum an Substraten auf spezifischen Umsatz geprüft werden und ein Zusammenhang mit dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel analysiert werden. Als unterstützende Methode zu Auswahl mutmaßlicher physiologischer Substrate könnte die Molekulare Modellierung und *in silico* Datenbanksuche dienen.

Vorraussetzung für die hier vorgeschlagenen Untersuchungen ist die Expression eines aktiven Proteins. Dies konnte in dieser Arbeit nur für *Sn*-TRI im pQE-30 Vektor erzielt werden. Eine ausführliche Charakterisierung dieses Enzyms war aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es wäre interessant zu prüfen, ob sich die *Sn*-TRI ähnlich zu den 3 bekannten TRI aus *H. niger*, *S. tuberosum* und *D. stramonium* verhält. Die Sequenz zeigt keine Unterschiede zu den von Nakajima und Mitarbeitern für die Substrat- und Cosubstratbindung postulierten Aminosäuren [Nakajima et al., 1999a]. Interessant wäre auch die Analyse der put. *Sn*-TRI aus *S. nigrum*. Diese wurde im pET-21d Vektor in großen Mengen exprimiert, führte aber zu unlöslichem Protein. Deswegen konnte die Funktion des Proteins nicht geprüft werden. Wahrscheinlich ist eine Aggregation als *inclusion bodies*. Eine Ursache für diese Aggregation könnten fehlende oder nicht ausreichende Chaperone sein [Carrio et al., 2002]. Ebenfalls ist eine Zusammenlagerung ungefalteter Proteine denkbar, wenn diese exponierte hydrophobe Oberflächen besitzen [King et al., 1996]. Der Einsatz von Detergentien und eine nachträgliche Proteinfaltung wäre denkbar [Clark 1998; Lilie et al., 1998]. Da Tropinonreduktasen aber meist sehr instabile Enzyme darstellen und eine solche Behandlung zu geringen Ausbeuten und Aktivitätsverlust führen kann, wurde dies nicht versucht. Im pET-21d Vektor konnte weder eine Überexpression der *Sn*-TRI noch der *Sd*-TRI erreicht werden (Tab. C- 9). Die Wahl des Expressionssystems kann Einfluss auf die Expression des Proteins ausüben. Daher sollten bei Problemen der Expression immer mehrere Systeme versucht werden.

D 4 Tropinonreduktase II in Solanum dulcamara

D 4.1 Katalytische Eigenschaften der *Sd*-TRII mit C-terminalem His-Tag (C-*Sd*-TRII)

Der Volllängen-Klon der *sd-trII* wurde in *E. coli* mit 6fachem His-Tag am C-Terminus im pET-21d Vektor exprimiert. Das Klonieren von cDNA und die heterologe Expression, ist oft der einzig mögliche Weg, um genügend Protein für eine Charakterisierung zu erhalten [Bayer et al., 2004; Gerasimenko et al., 2004; Minami et al., 2007]. Affinitäts-Tags an Proteinen werden oft verwendet, weil sie die Möglichkeit bieten, große Mengen an heterolog exprimiertem Protein zu reinigen [Arnau et al., 2006]. Es gibt Methoden, Affinitäts-Tags durch den Einsatz von Proteasen und durch proteolytische Spaltung vor der Proteincharakterisierung zu entfernen. Diese Reaktionen dauern oft mehrere Stunden und

Nebenreaktionen können die Funktionalität des Proteins beeinträchtigen [Jenny et al., 2003]. Aus diesem Grund werden Affinitäts-*Tags*, wie beispielsweise der kurze Hexahistidinrest (*His-Tag*), oft am Protein gelassen, mit der Annahme, dass die Eigenschaften des Proteins dadurch nicht beeinträchtigt werden. Selbst zur Proteinkristallisation werden *His-Tags* zunehmend am Protein gelassen, da sich mehrfach zeigte, dass es kaum Effekte auf die Proteinstruktur gibt [Carson et al., 2007]. Häufig enthalten die Enzyme auch während der Charakterisierung einen *His-Tag* und werden nach heterologer Expression und Reinigung über Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) direkt vermessen [Ounaroon et al., 2003; Samanani et al., 2004; Koeduka et al., 2006; Springob et al., 2007]. Die katalytische Aktivität des exprimierten Enzyms *in vitro* wird dabei als Beweis gesehen, dass der *His-Tag* die Charakterisierung nicht stört.

Daraufhin wurde die *Sd*-TRII zunächst mit dem *His-Tag* am Carboxylterminus des Proteins charakterisiert (C 2.3.1). Die enzymkinetischen Parameter wichen allerdings von denen bekannter TRII ab (Tab. C- 5). Eine hohe Sequenzhomologie zu TRII grenzte die Sequenz aber von den TRI Enzymen ab (Tab. C- 10). Die zum Vergleich herangezogenen TRII waren unterschiedlichen Ursprungs. So stammte die TRII aus *S. tuberosum* ebenfalls aus heterologer Expression mit dem pET-21d Vektor in *E. coli*, enthielt allerdings keinen *His-Tag* [Keiner et al., 2002]. Die anderen TRII waren nativ aus Pflanzenmaterial gereinigt [Dräger und Schaal, 1994; Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994]. Von diesen Enzympräparationen wird angenommen, dass ein Teil der Aktivität verloren geht, da bei der Aufreinigung über meist mehrere Säulen ein Großteil des Enzyms degeneriert wird. Dennoch zeigten die nativ gereinigten TRII vergleichbare und sogar höhere spezifische Aktivitäten als die *C-Sd*-TRII, die mit *His-Tag* nur über eine Säule gereinigt wurde (Tab. C- 5). Für alle getesteten Substrate ergaben sich trotz hoher Sequenzhomologie der *C-Sd*-TRII geringere Aktivitäten bei Vorliegen höherer K_m -Werte. Schon ein Austausch von ähnlichen Aminosäuren in einem Enzym kann starke Änderungen des K_m -Wertes verursachen. So bedingte die Mutation einer Aminosäure des aktiven Zentrums in der Alkoholdehydrogenase einen 280%igen Anstieg des K_m -Wertes [Crosas et al., 2000].

Eine gründliche vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz der *Sd*-TRII zu den anderen TRII (Abb. C- 7) zeigte nur drei abweichende Aminosäuren (Ser⁵², Ala¹⁵², Ala¹⁷¹). Diese Aminosäuren liegen weder in der Substrat- noch in der Cosubstratbinderegion und sollten demzufolge keinen Einfluss auf die Affinität ausüben. Der einzige erkennbare Unterschied zu den bekannten TRII war, dass die *C-Sd*-TRII mit *His-Tag* exprimiert und charakterisiert wurde. Neben Berichten, dass ein Affinitäts-*Tag* die Proteineigenschaften kaum beeinflusst [Carson et al., 2007], gibt es Beobachtungen, dass essentielle Veränderungen der Proteineigenschaften, wie des Bindungsverhaltens [Chant et al., 2005] oder der Dimerisation [Amor-Mahjoub et al., 2006], durch *His-Tag* ausgelöst werden können. Von Unterschieden im Aktivitätsverhalten *His-Tag* tragender Proteine wurde ebenfalls berichtet [Araujo et al., 2000].

D 4.2 Modell der *Sd*-TRII

Mit dem Modell der *Sd*-TRII wurde abgeschätzt, ob die abweichenden Aminosäuren (Ser⁵², Ala¹⁵², Ala¹⁷¹) in ihrer Lage zum aktiven Zentrum Einfluss auf die Substratbindung und den Substratumsatz ausüben können. Als Template für die Modellierung wurde die Kristallstruktur der TRII aus *D. stramonium* (PDB Eintrag: 1IPF) verwendet [Yamashita et al., 2003]. Darauf basierend wurden zwei Modelle der *Sd*-TRII erstellt, ein Modell mit *His-Tag* und ein Modell ohne *His-Tag* (C 2.3.3). Die Substratbinderegion der *Sd*-TRII zeigte keine auffallenden Abweichungen zum Proteinmodell der *Ds*-TRII, welche die Unterschiede im kinetischen Verhalten erklären könnten. Eine Moleküldynamiksimulation des den *His-Tag* tragenden C-Terminus zeigte nach kurzer Zeit der Entspannung eine stabile Struktur mit der niedrigsten Energie. Der Carboxylterminus mit *His-Tag* lag dabei nicht geordnet vor, passte aber gut in eine Spalte auf der Proteinoberfläche. Diese Spalte bildet eine mögliche Eintrittsstelle des Liganden zum aktiven Zentrum. Die Ausbildung verschiedener Wasserstoffbrückenbindungen und die ideale Passform in die Spalte der Oberfläche, die im Protein ohne *His-Tag* ausgeprägt ist, machen diese Position des *His-Tag* als bevorzugte Lage sehr wahrscheinlich [Freydank et al., 2008]. Alle anderen Konformationen des *His-Tag* tragenden C-Terminus zeigten hohe Beweglichkeit während der Simulation mit höherer relativer Energie verglichen zu der zuvor beschriebenen Struktur. Der partielle Verschluss der Eintrittsstelle für die Substrate durch den künstlich angefügten *His-Tag* kann die katalytische Effizienz des Enzyms vermindern. Einfluss kann auch die Veränderung des isoelektrischen Punktes des Proteins haben. Der kalkulierte isoelektrische Punkt des nativen Enzyms von pH 5,3 erhöht sich auf pH 5,8 für das Enzym mit *His-Tag*.

Literaturberichten zufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass der *His-Tag* auch die Sekundärstruktur eines Proteins verändert, vor allem solche Strukturen, die nahe dem C-Terminus lokalisiert sind. Beim Vergleich der Circulären Dichromalen Spektren des *His-Tag* tragenden und des *His-Tag* freien Proteins wurde eine leichte Erhöhung des helikalen Anteils in der Struktur der Chlorocatechol 1,2-dioxygenase registriert [Araujo et al., 2000]. Weiterhin gibt es Veröffentlichungen, die native und *His-Tag* tragende Proteine vergleichen und Differenzen, meist ein verändertes Bindungsverhalten durch den *His-Tag*, aufzeigen. Ein abweichendes Dimerisationsverhalten von Hitzeschock Proteinen wurde beschrieben [Amor-Mahjoub et al., 2006]. Bei Zink-Finger Proteinen verursachte der *His-Tag* ein differentes Denaturierungsprofil, bei dem die Funktion und Bindungskonstante zur DNA aber unverändert schien [Chant et al., 2005]. Die Beeinträchtigung der Rezeptorbindung durch einen *His-Tag* wurde z.B. für den Cytokin Tumor Nekrose Faktor Alpha gezeigt [Fonda et al., 2002]. Die Position des *His-Tag* beeinflusste die Ausbildung von Cystein-Brücken, was zwar zur Veränderung der Konformation des N-terminalen Teils eines Rezeptor-Proteins führte, aber nicht das Bindungsverhalten störte [Klose et al., 2004].

D 4.3 Katalytische Eigenschaften der *Sd*-TRII mit N-terminalem His-Tag (N-*Sd*-TRII)

Als Konsequenz aus dem Enzymmodell wurde die cDNA der *Sd*-TRII in den Expressionsvektor pQE-30 kloniert und mit N-terminalem His-Tag exprimiert. Der N-Terminus ist ausreichend weit entfernt vom aktiven Zentrum lokalisiert. Diese Entfernung sollte das aktive Zentrum vor Interaktionen, die durch Bewegungen des His-Tags zustande kommen, schützen. Exprimiert und gereinigt wurde, wie unter C 3.2 beschrieben. Das gereinigte Enzym wurde exakt den gleichen Aktivitätstests ausgesetzt, wie die C-*Sd*-TRII. Das Optimum der Aktivität lag bei pH 5,0. Bei pH 9,0 beträgt die Aktivität der N-*Sd*-TRII noch 35 % der maximalen Aktivität und unterscheidet sich damit stark von der C-*Sd*-TRII, die in diesem pH Bereich keine Aktivität mehr zeigt (C 2.3.1, C 2.3.2). Ein breites pH-Optimum ist typisch für TRII. Die spezifische Aktivität mit Tropinon war bis 5fach höher und der Km-Wert war bis 10fach geringer. Dies bedeutet, dass die Affinität zu Tropinon, verglichen mit der C-*Sd*-TRII, bis 10fach höher war. Die kinetischen Konstanten der N-*Sd*-TRII für die Substratanaloga waren vergleichbar zu dem kinetischen Verhalten von His-Tag freien TRII anderer Pflanzen (Tab. C- 5). Ein Vergleich von K_{kat} für Tropinon und der anderen Substrate zeigte, dass der C-terminale His-Tag die katalytische Aktivität der *Sd*-TRII stark inhibieren kann (Abb. C- 11). Besonders der sehr schnelle Umsatz mit monocyclischen Substratanaloga, wie er mit Cyclohexanon oder Tetrahydrothiopyran mit den Wildtyp TRIIs anderer Pflanzen und mit der N-*Sd*-TRII erreicht wurde, war mit C-*Sd*-TRII nicht möglich. Es scheint, dass hier die Lokalisation des His-Tag am C-Terminus die Flexibilität des Proteins behindert, die notwendig für die Katalyse ist. Auch für die leichte Kette im Dynein wurde eine lokale Fixierung der Helix nahe des His-Tags durch ^1H - und ^{15}N -NMR Spektren postuliert [Song et al., 2007].

Eine Untersuchung, in der Substrat und Cosubstrat durch kontinuierlichen Fluss an die kristallisierte *Ds*-TRII herangeführt und mit Laue Diffraktionsmessungen verfolgt wurden, zeigte, dass sich sowohl die Lage der Aminosäuren der Bindungstasche als auch die Lage des Substrates im Verlauf der Katalyse ändern [Yamashita et al., 2003]. In der *Sd*-TRII ist die αG -Helix Teil der Substratbindestelle. Es wurde beschrieben, dass die Aminosäuren Leu²¹⁰ und Leu²¹³, die sich in dieser Helix befinden, sich während des Reduktionsprozesses bewegen [Yamashita et al., 2003]. Tyr¹⁵⁹, lokalisiert im Motiv YxxxK, tritt als Protonendonator auf. Während der Katalyse bewegt sich die Seitenkette der Glu¹⁵⁶ nach unten und bringt somit die Aminogruppe des Tropinons ebenfalls in diese Richtung. Unterstützend dazu wechselt die Lage des Ser¹⁴⁸ und die Aminosäuren Thr²⁰⁰, Leu²¹⁰ und Leu²¹³ schaffen durch eine seitliche Bewegung Raum für die sich nach unten bewegende Methylgruppe des Tropinons. Durch eine seitliche Schwingung der Seitenkette des Tyr¹⁵⁹ kann das Produkt Pseudotropin freigesetzt werden [Yamashita et al., 2003]. Wenn diese Aminosäuren an Beweglichkeit im His-Tag tragenden Enzym verlieren, ist eine Verringerung der spezifischen katalytischen Aktivität sehr wahrscheinlich.

D 4.4 Liganden der *Sd*-TRII

Es sollten neue Substrate oder spezifische Inhibitoren für die *Sd*-TRII gefunden werden. Dazu wurden die Methoden des *in silico* Screening und des Liganden-Docking angewendet. Die für die Suche eingesetzten Datenbanken enthielten sowohl Naturstoffe und als auch synthetische Verbindungen. Durch spezifische Inhibitoren wäre eine gezielte Hemmung der TRII möglich und die Calysteginbiosynthese könnte vermindert bzw. ganz unterdrückt werden. Es könnte zur Anreicherung bisher unbekannter Stoffwechselmetabolite kommen, die normalerweise schnell weiterreagieren. Inwieweit die gesamte Pflanze in ihrer Entwicklung und im Stoffwechsel durch Fehlen der Calystegine oder verminderte Calysteginproduktion beeinflusst wird, kann Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung der Calystegine geben. Das gezielte Ausschalten der TRII im Tropanalkaloidbiosyntheseweg wurde mit molekularbiologischen Methoden bisher vergeblich versucht [Rothe 2002, Richter et al., 2005]. Eine gentechnische Manipulation in Form von Antisense Transformation in *A. belladonna* brachte keinen Erfolg [Richter et al., 2005].

Ein Aspekt dieser Arbeit war, ausgewählte Inhibitoren der *Sd*-TRII an eine *S. dulcamara* Wurzelkultur zu applizieren, um die Calysteginbiosynthese gezielt zu unterdrücken. Zur Suche nach spezifischen Inhibitoren der TRII wurde das Modell der *Sd*-TRII eingesetzt. Es wurden nach Ligandensuche in zwei großen Datenbanken und Dockingstudien 24 Substanzen für die *in vitro* Testung ausgewählt (Tab. C- 8). Dockingmethoden werden neuerdings auch in der Struktur-Biologie mit verschiedenen Zielstellungen angewendet, z.B. zur Identifizierung von plausiblen Substraten für Proteine mit bisher unbekannter Funktion [Hermann et al., 2006; 2007]. Durch das hier angewendete Docking- und Bewertungsverfahren konnte in Vorversuchen eine Korrelation zwischen den experimentell bestimmten Substrat-Affinitäten und den theoretischen Bewertungsparametern beschrieben werden. Zur Auswahl der Substanzen wurden die Interaktionsenergie und die Fitness als Bewertungsparameter verwendet. Bei der *in vitro* Testung wurde für keine Substanz ein photometrisch messbarer Umsatz durch die *Sd*-TRII festgestellt. Dies war nicht überraschend, da Carbonylgruppen in den meisten Verbindungen Teil einer Ester- oder Amidfunktion waren. Somit stellten die Verbindungen keine Substrate für die SDR dar. Bei der *in vitro* Testung auf Hemmung der *Sd*-TRII zeigten fünf Substanzen eine vollständige Hemmung in einer Konzentration von 5 mM im Assay. Zwei Substanzen (Nr. 2, Nr. 4) hemmten die *Sd*-TRII-Aktivität noch bei einer Konzentration von 0,25 mM vollständig. Durch die angewendeten *in silico* Verfahren konnten Substanzen mit inhibitorischer Wirkung der TRII ermittelt werden. Die Substanzen zeigten allerdings keine Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat oder Produkt und stellen so keine möglichen physiologischen Substrate der TRII dar. Um physiologische Substrate zu identifizieren könnten in weiterführenden Arbeiten andere Docking- und Bewertungsverfahren eingesetzt werden. Dass es zu Unterschieden in den Ergebnissen durch verschiedene Docking- und Bewertungs-Protokolle kommt, wurde in einer Studie an kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen gezeigt [Favia et al., 2008].

Nach *in vitro* Enzymtests wurden zwei Substanzen (Nr. 2, Nr. 4) mit der ausgeprägtesten Hemmung der TRII an Wurzelkulturen von *S. dulcamara* appliziert (C 2.7). Dabei wurde der Versuchsumfang durch die verfügbare Menge an Hemmstoff begrenzt. Es wurde das

Wachstum der Wurzelkulturen sowie der Intermediat- und Calystegingehalt bestimmt. Nach 3 Wochen zeigten sich optisch erkennbare Unterschiede im Wachstumsverhalten, hervorgerufen durch den Zusatz der Substanzen Nr. 2 und Nr. 4 im Vergleich zu den Kontrollen. Nach 7 Wochen war nur noch für Substanz Nr. 2 ein stark hemmender Effekt auf das Wachstum festzustellen (Abb. C- 21). Bei Substanz Nr. 4 und den beiden Kontrollen gab es keine nennenswerten Unterschiede in der Ausbildung der Wurzelmasse. Die Wachstumshemmung könnte verschiedene Ursachen haben und z.B. durch die Beeinflussung anderer SDR, die verschiedene Funktionen im Primärstoffwechsel ausüben, verursacht worden sein. Auch eine allgemeine Toxizität der Substanzen ist möglich und bis jetzt nicht abschätzbar. Die Analyse der Intermediate zeigte keinen hemmenden Einfluss der *in vitro* Sd-TRII inhibierenden Substanzen auf die Bildung von Pseudotropin oder den Calysteginen (Abb. C- 22). Die Biosynthese konnte durch Applikation dieser Substanzen nicht gezielt unterdrückt werden. Dies könnte daran liegen, dass die Substanzen nicht spezifisch genug reagieren oder durch mangelnde Bioverfügbarkeit nicht zum Ort der Reaktion gelangen. In weiterführenden Arbeiten müssten diese Aspekte untersucht werden.

D 5 Demethylierung – ein Biosyntheseschritt zu den Calysteginen

Ein charakteristisches Merkmal der Calystegine ist die sekundäre Aminogruppe im Ring und der Verlust der *N*-Methylgruppe. Norpseudotropin in *Morus alba* Früchten [Kusano et al., 2002] und in *C. sepium* Wurzelkulturen [Sichhart 2003] legt nahe, dass die *N*-Demethylierung der nächste metabolische Schritt nach der Bildung von Pseudotropin ist. Durch [¹³C-*methyl*]-Tropinon sollte der metabolische Weg der *N*-Methylgruppe in *S. dulcamara* Wurzelkulturen verfolgt sowie Zwischenstufen und Metabolite der Biosynthese aufgeklärt werden (C 2). Nach kurzer Inkubationszeit wurden in den Extrakten der Wurzelkultur nur [¹³C-*methyl*]-Tropinon und [¹³C-*methyl*]-Pseudotropin, jedoch keine weiteren markierten Verbindungen gefunden. Nach 120 h Applikationszeit konnten dann ¹³C-markierten Metabolite in Form der Aminosäuren Asparagin und Glutaminsäure detektiert werden (C 5). Die Markierung in den Aminosäuren deutet darauf hin, dass die Methylgruppe abgespalten wird und im Primärstoffwechsel Verwendung findet. Eine ähnliche Beobachtung wurde nach Applikation von [¹³C-*methyl*]-Nicotin in *Nicotiana plumbaginifolia* Zellsuspensionskulturen gemacht [Mesnard et al., 2002]. Als markierte Aminosäuren wurden dort Serin, Methionin und ein Cysteinderivat detektiert. Es wurde postuliert, dass die Methylgruppe zunächst oxidativ abgespalten wird und die Übertragung des oxidierten Kohlenstoffs THF-abhängig sein könnte. Spezifische Metabolite, die diese These stützen würden, konnten in *S. dulcamara* nicht detektiert werden. Der ¹³C-markierte Kohlenstoff in der Glutaminsäure konnte anhand der Ionenfragmente in der GC-MS nicht bestimmt werden. Im Asparagin war nach NMR Analyse der C3-Kohlenstoff markiert.

In Pflanzen wird Asparagin aus Aspartat unter Katalyse der Asparagin-Synthase und Verwendung von Glutamin oder Ammoniak als Nitrat Ressource synthetisiert [Richards und Schuster, 1998]. Aspartat kann in den Tricarbonsäurezyklus eingebaut werden. In diesem Experiment wurden allerdings keine markierten Säuren des Tricarbonsäurezyklus detektiert.

Der Einbau der ^{13}C -Markierung in den C3-Kohlenstoff des Asparagins erscheint ungewöhnlich. Eine Markierung der anderen Kohlenstoffe konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Markierung am C4 könnte aus einer CO_2 Fixierung stammen und über den Tricarbonsäurezyklus eingebaut werden (Abb. D- 1). Die Abwesenheit von entsprechenden markierten Metaboliten weist darauf hin, dass die markierte Methylgruppe nicht als CO_2 freigelassen und refixiert wird. Dies könnte ein Hinweis sein, dass dort ein anderer Mechanismus der Demethylierung zu finden ist, welcher mit einem anderen Methylgruppenakzeptor verbunden ist. Untersuchungen zur Demethylierung des Nicotins führten zur Identifizierung einer Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenase (Familie CYP82E4), die als funktionelle Nicotin-Demethylase (CYP82E4v1) fungiert [Siminszky et al., 2005]. Die *N*-Demethylierung des Nicotins zu Nornicotin zeigt Ähnlichkeit zu der des Pseudotropins zu Norpseudotropin. Ein Cytochrom P450 abhängiger Mechanismus könnte hierfür ebenfalls postuliert werden. In höheren Pflanzen konnte eine Beteiligung von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen bei der oxidativen Demethylierung unterschiedlicher Xenobiotika gezeigt werden [Young et al., 1976; Dohn und Krieger, 1984]. Norpseudotropin konnte z.B. in *C. sepium* Wurzelkulturen nachgewiesen werden, die in Nährmedien mit erhöhtem Saccharosegehalt wuchsen [Sichhart 2003]. Für die Enzymgruppe der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen ist bekannt, dass sie durch Saccharose induziert werden können [Schröder et al., 1999].

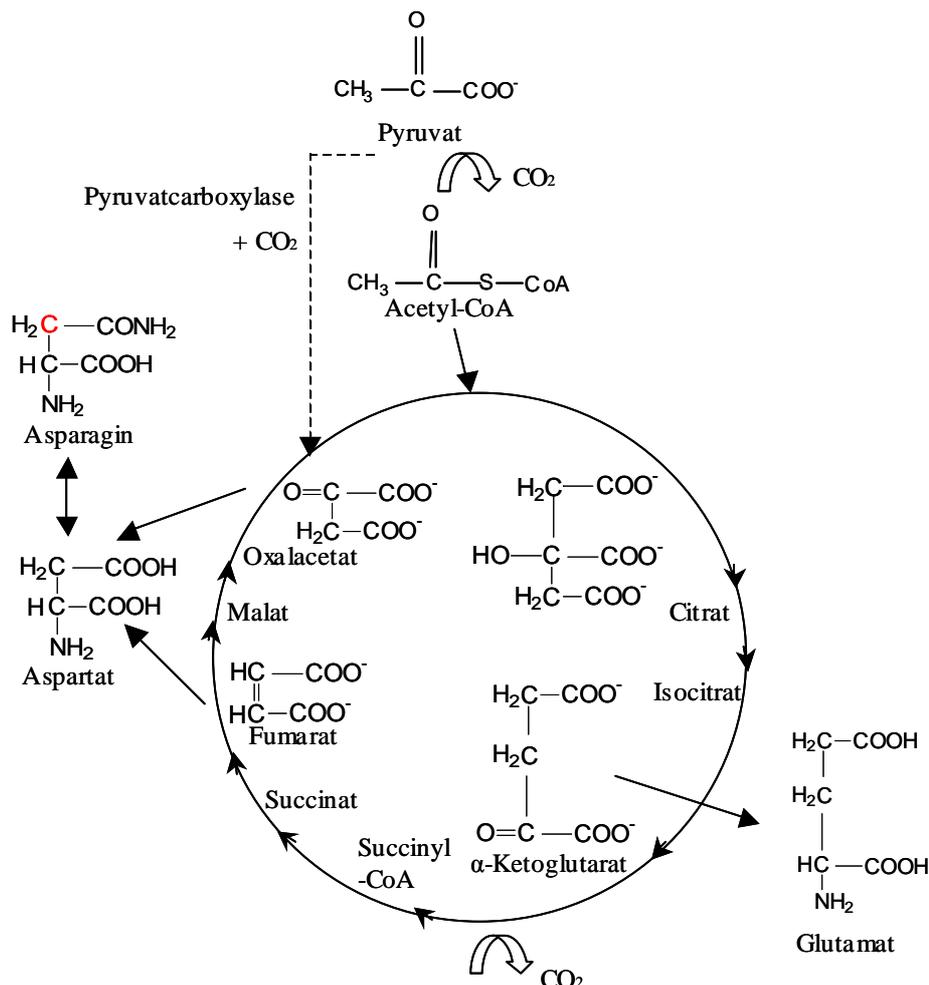


Abb. D- 1: Schematische Darstellung des Citratzyklus

D 6 Putrescin-N-methyltransferase – Verbindung von Primär und Sekundärstoffwechsel

D 6.1 Polyamine

Das Polyamin Putrescin stellt den Ausgangsstoff für die Calysteginbiosynthese dar.

Der Einbau der Markierung von ^{14}C -markiertem Putrescin in die Calystegine konnte an *C. sepium* Wurzelkulturen gezeigt werden [Goldmann et al., 1990]. Weiterhin sind Polyamine für viele biologische Prozesse wie Entwicklung, Wachstum und abiotische Stressabwehr von Bedeutung [Flores et al., 1989; Evans und Malmberg, 1989; Galston und Sawhney, 1990]. Untersuchungen an transformierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit verminderter Sperminkonzentration zeigten verringerte Zellwachstums- und Zellteilungsraten [Hanzawa et al., 2000, 2002], sowie Störungen in der Embryonalentwicklung [Imai et al., 2004]. Polyamine können aufgrund ihrer polykationischen Struktur an negativ geladene Moleküle der Zelle binden. Beschrieben sind Interaktionen mit Proteinen [Apelbaum et al., 1988], DNA [Basu et al., 1990] und Membranvesikeln [Tassoni et al., 1996]. In Pflanzen kommen Polyamine nicht nur in freier Form, sondern auch gebunden in konjugierter Form vor [Negrel 1989]. Putrescin kann z.B. durch die Putrescinhydroxycinnamoyltransferase konjugiert werden [Meurer-Grimes et al., 1989]. Freie Polyamine wurden in *S. tuberosum* im Zusammenhang mit der Knollenkeimung [Kaur-Sawhney et al., 1982; Mikitzel und Knowles, 1989] und der Knollenbildung [Protacio und Flores, 1992; Taylor et al., 1993] analysiert. Untersuchungen in *S. tuberosum* über die Verteilung von freien, löslichen und unlöslichen Polyaminen zeigten, dass der Anteil der konjugierten Polyamine an den Gesamtpolyaminen durchschnittlich 75 % betrug und bis zu 88 % ansteigen konnte [Stenzel 2005]. Es wurde eine erhöhte Polyaminkonzentration in proliferierenden Geweben beschrieben. Es kam zur Verdoppelung der Putrescin- und Spermidinkonzentration in Kartoffelaugen, deren Dormanz gebrochen war. Auch wurde eine hohe Gesamtpolyaminkonzentrationen in Blüten beschrieben [Stenzel 2005].

Untersuchungen in Tropanalkaloid- und Nortropanalkaloid enthaltenden Pflanzen zeigten, dass diese *N*-Methylputrescin akkumulieren. So wurde in einer *A. belladonna* Wurzelkultur bis 0,3 $\mu\text{mol/g}$ TM *N*-Methylputrescin (freies, konjugiertes und gebundenes) [Rothe et al., 2003] und in einer *H. albus* Wurzelkultur freies *N*-Methylputrescin bis 1,5 $\mu\text{mol/g}$ TM detektiert [Hashimoto et al., 1989]. Während in der *Solanum*-Art *S. tuberosum* *N*-Methylputrescin nur in Augen, deren Dormanz gebrochen war [1,05 $\mu\text{mol/g}$ TM], und in Kartoffelkeimern [0,75 $\mu\text{mol/g}$ TM], jedoch nicht in Wurzeln enthalten war [Stenzel 2005], wurde freies bzw. konjugiertes *N*-Methylputrescin in allen untersuchten Geweben von *S. dulcamara*, mit Ausnahme der Sprossspitzen, nachgewiesen. Dies ist ein Beleg für das Vorhandensein dieser biosynthetischen Vorstufe der Calystegine auch in oberirdischen Geweben. *N*-Methylputrescin könnte von der Wurzel aus in die Gewebe transportiert oder direkt dort gebildet werden. Die Induzierbarkeit von PMT in oberirdischem Pflanzenmaterial konnte bisher nur in *N. tabacum* gezeigt werden [Sachan und Falcone, 2002].

Alle Gewebe enthielten die Polyamine Putrescin und Spermidin, wobei Blüten und Sprossspitzen deren höchste Akkumulation aufwiesen. *N*-Methylputrescin akkumulierte in Blüten am stärksten. Dies könnte für eine Funktion der Polyamine in DNA-reichen Geweben,

wie Fruchtknoten und Pollen, sprechen. In den Blüten von *N. plumbaginifolia* wurde ebenfalls die höchste Gesamtpolyaminkonzentration festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen Polyaminkonzentration und DNA-Menge wurde aber nicht gezeigt [Figueras et al., 1990].

D 6.2 Isolierung einer Putrescin-N-methyltransferase (PMT) aus *S. dulcamara*

Beim Übergang des Primärstoffwechsels zum Sekundärstoffwechsel stellt die PMT das erste spezifische Enzym in der Tropanalkaloidbiosynthese dar. Die Expression der PMT läuft bevorzugt in der Wurzel ab [Teuber et al., 2007]. Aus Wurzeln von *N. tabacum* wurde erstmals eine PMT gereinigt und ihre Funktion in der Nicotinbiosynthese beschrieben [Mizusaki et al., 1971]. PMT wurde im Zusammenhang mit der Tropanalkaloidbiosynthese in *A. belladonna*, *H. albus* und anderen Solanaceen untersucht [Hibi et al., 1992; Suzuki et al., 1999a] und PMT-Aktivität nur in unterirdischem Pflanzenmaterial detektiert. Junge *S. dulcamara* Wurzelkultur enthielt *N*-Methylputrescin (Abb. C- 25) und wurde zur Gewinnung von Gesamt-RNA und entsprechender cDNA eingesetzt [Teuber et al., 2007]. Es konnte eine *pmt*-Sequenz isoliert werden. Auch oberirdische Gewebe von *S. dulcamara* enthielten *N*-Methylputrescin. Dies ist ungewöhnlich für Solanaceen. Die Möglichkeit die PMT gemeinsam mit dem Produkt *N*-Methylputrescin in den Geweben von *S. dulcamara* zu analysieren ist für Lokalisationsstudien interessant. Diese könnten weiterführend durchgeführt werden. Bisher konnte nur in *N. tabacum* die Induzierbarkeit von PMT in oberirdischem Pflanzenmaterial beobachtet werden [Sachan und Falcone, 2002].

Die *Sd*-PMT zeigte die höchste Identität zur PMT aus *S. tuberosum* (AJ605553) mit 91 %. Geringere Identitäten zwischen 80-84 % in der Gruppe der zu vergleichenden PMT bestanden zu *A. belladonna*, *H. niger* und *C. sepium*. Zu Spermidinsynthasen war die Sequenz mit 58-68 % identisch [Teuber et al., 2007]. Die hohen Identitäten zwischen PMT und SPDS führen auf eine enge Verwandtschaft der beiden Enzyme zurück. SAM-abhängige Methyltransferasen zeigen trotz größerer Unterschiede in der Primärstruktur eine hohe Übereinstimmung in der Sekundärstruktur, in welcher sich α -Helices mit β -Faltblättern abwechseln. Eine Spermidinsynthase bildete die Grundlage für ein Modell einer PMT [Teuber et al., 2007]. Die bekannten Methyltransferasen binden SAM in äquivalenter Position innerhalb der Sekundärstruktur. Die Bindungsstellen für das Substrat hingegen sind sehr unterschiedlich [Martin und McMillan, 2002]. Es wird vermutet, dass die PMT im Verlauf der Evolution aus der SPDS, einem Primärstoffwechsellenzym, entstanden ist [Hashimoto et al., 1998]. Die Entwicklung eines Primärstoffwechsellenzyms zu einem Sekundärstoffwechsellenzym wurde in der Entwicklung der Homospermidinsynthase (HSS) aus der Desoxyhypusinsynthase (DHS) beschrieben [Ober und Hartmann, 1999; Ober et al., 2000].

D 6.3 Katalytische Eigenschaften der *Sd*-PMT

PMT sind sehr spezifische Enzyme (A 2). Die PMT aus *S. tuberosum* setzte z.B. keine Substratanaloga wie 1,5-Diaminopentan, 1,6-Diaminohexan, 1,7-Diaminoheptan, Spermidin und *n*-Butylamin um und akzeptierte *dc*SAM nicht als Cosubstrat [Stenzel 2005]. Da in

Hemmversuchen mit den Substratanaloga die spezifische Aktivität herabgesetzt wurde, wird von einer Bindung der Substratanaloga im Enzym ausgegangen [Stenzel 2005]. Dabei war die Stärke der Hemmung von der Molekülgröße abhängig. Die spezifische Aktivität wurde durch kurzkettige Moleküle wie 1,5-Diaminopentan und n-Butylamin stärker herabgesetzt, als durch langkettige Substratanaloga wie Spermidin, 1,6-Diaminohexan und 1,7-Diaminoheptan [Stenzel 2005].

Die Charakterisierung der *Sd*-PMT mit dem colorimetrischen Assay erbrachte einen K_m -Wert von 167 μmol und ein V_{max} Wert von 3540 pkat/mg für Putrescin (C 5.4). Die Umsetzung erfolgte bei $\text{pH} = 8$, da dieser pH -Bereich in früheren Arbeiten als Optimum für die *N*-Methylierung des Putrescins beschrieben wurde [Hibi et al., 1992; Walton et al., 1994]. Der nichtphysiologische pH -Wert könnte zeigen, dass Putrescin in deprotonierter Form umgesetzt wird. Aminosäuren, die für die Deprotonierung essentiell sind, wurden beschrieben [Korolev et al., 2002]. Die Enzymaffinität der *Sd*-PMT zu Putrescin und SAM ist ähnlich hoch, wie in der charakterisierten PMT aus *D. stramonium* [Biastoff et al., 2006]. Die *Ds*-PMT zeigte allerdings eine bis zu 10fach höhere Geschwindigkeit der Substratumsetzung.

Im Bereich der postulierten Motive für die Substrat- und Cosubstratbindung besitzt die *Sd*-PMT verglichen zu bekannten PMT nur eine unterschiedliche Aminosäure, die sich im Motiv 1 befindet [Teuber et al., 2007]. An Stelle eines sonst konservierten Prolins enthält die *Sd*-PMT ein Serin¹¹¹. Mit einem Modell der *Ds*-PMT [Teuber et al., 2007] wurde versucht den Einfluss des Serin¹¹¹ zu erklären. Das Prolin¹¹⁵ in der *Ds*-PMT, welches eine äquivalente Position zu Serin¹¹¹ in der *Sd*-PMT einnimmt, liegt am Anfang einer Helix. Diese Helix stabilisiert laut Modellvorhersage einen Loop, der an der Fixierung des Substrates Putrescin beteiligt ist (Abb. C- 27). Im Loop ist Glutaminsäure in Position 110 integriert und fixiert Putrescin durch Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. C- 27). Prolin ist eine starre Aminosäure und kann die Flexibilität von Proteinketten reduzieren. Ein Serin an dieser Stelle würde die Flexibilität der Region erhöhen. Dadurch könnte das Substrat länger gehalten werden bzw. langsamer in und aus der Reaktionsposition diffundieren. Dies könnte die Ursache für die geringere maximale Reaktionsgeschwindigkeit der *Sd*-PMT darstellen.

D 7 Ausblick

Regulation der Biosynthese durch selektive inhibitorische Substanzen

Tropinonreduktasen gehören zur Enzymfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). SDR bilden eine große Gruppe von funktionell heterogenen Proteinen, die eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen katalysieren. Es sind ca. 3000 Primärsequenzen und ca. 30 3D-Proteinstrukturen bekannt. Trotz geringer Homologie der Primärsequenzen zeigt sich eine hohe Übereinstimmung in der Sekundärstruktur. Diese ist gekennzeichnet durch das α/β -Faltblattmuster mit einem zentralen β -Faltblatt für die typische Rossmannfaltung [Oppermann et al., 2003]. Eine computerbasierte Suche an einer Gruppe aus 27 SDR zur Identifizierung physiologischer Substrate wurde von Favia und Mitarbeitern durchgeführt [Favia et al., 2008]. Eine computerbasierte Suche kann auch zur Identifizierung spezifischer Inhibitoren eingesetzt werden. Spezifische Inhibitoren könnten als neue Regelungselemente für den Sekundärstoffwechsel dienen. Auch die Funktion weiterer Sekundärstoffenzyme könnten auf diese Weise untersucht werden.

Weiterführend von dieser Arbeit könnten auf Grundlage des Modells der *Sd*-TRII weitere Pharmakophore definiert werden, in denen z.B. NADPH als Cosubstrat integriert ist. Zusätzliche Datenbanken könnten mit den bestehenden Pharmakophoren für die Suche nach inhibitorisch wirksamen Substanzen oder physiologischen Substraten eingesetzt werden. Durch anschließende *in silico* Analyse könnten Substanzen selektiert und *in vitro* auf Aktivität getestet werden. Für nicht käufliche Verbindungen sollte eine mögliche Synthese geprüft und durchgeführt werden. Damit wäre das Spektrum potentieller aktiver Substanzen erweiterbar.

Regulation der Biosynthese durch gentechnische Veränderungen

Eine Verringerung oder Abschaltung einer Enzymaktivität kann durch RNAi-Transformation, *Cosuppression* oder *antisense*-Transformation erfolgen [Smith et al., 2000; Nakamura et al., 2006]. Durch die Isolation einer *pmt*, *trII* und putativen *trI* Sequenz aus *S. dulcamara* bzw. *S. nigrum* ist die Grundlage geschaffen worden, transgene Wurzelkulturen bzw. Pflanzen herzustellen. Die Gene von PMT, TRII und TRI könnten auch überexprimiert werden. Eine folgende Analyse der Biosynthesemetabolite und Endprodukte könnte den regulatorischen Einfluss der einzelnen Enzyme auf die Calysteginbiosynthese klären. Besonders die Überexpression und das totale Ausschalten der TRI wären interessant, um die Funktion für eine Pflanze ohne typische TRI-Alkaloide zu untersuchen. Die biochemische Charakterisierung und die Bestimmung der Spezifität der TRI wäre dafür ebenfalls wichtig. Mutanten mit supprimierter PMT und/oder TRII sollten wenig bzw. im Idealfall keine Calystegine enthalten. Die Analyse des Phänotyps und der Überlebensfähigkeit solcher Mutanten könnte Aufschluss über die Funktion der Calystegine für die Pflanze geben.

Aufklärung unbekannter Schritte der Calysteginbiosynthese

Bisher unbekannt sind die Schritte der Biosynthese vom Pseudotropin zu den Calysteginen. Eine Möglichkeit, diese Schritte zu identifizieren, ist die Suche nach beteiligten Genen.

Der Fund von Norpseudotropin in *Morus alba* Früchten [Kusano et al., 2002] und in *C. sepium* Wurzelkulturen [Sichart 2003] lässt eine *N*-Demethylierung des Pseudotropins vermuten. Die kürzlich klonierte Demethylase aus *N. tabacum* [Siminszky et al., 2005, Xu et al., 2007] katalysiert eine ähnliche Reaktion, nämlich die Nicotindemethylierung und ist eine P450 Monooxygenase. Wenn man annimmt, dass diese P450 Monooxygenase ähnlich dem Enzym ist, welches für die Demethylierung von Pseudotropin verantwortlich ist, könnte man aus der Sequenz Primer ableiten. Mit diesen Primern könnte in Pflanzen mit Tropanalkaloidstoffwechsel nach homologen Sequenzen gesucht werden.

Lokalisation der Biosynthese und der beteiligten Enzyme

Mit der Expression der TRII und PMT aus *S. dulcamara* ist die Grundlage für die rekombinante Gewinnung der Proteine in großer Menge gegeben. Mit spezifischen Antikörpern gegen die gereinigten Enzyme kann die Lokalisation und Induktion der Enzyme in verschiedenen Pflanzengeweben, besonders die Verteilung in oberirdischen und unterirdischen Geweben untersucht werden. PMT wurde bisher nur in Wurzeln und jungen Kartoffelkeimen nachgewiesen. In oberirdischem Material gibt es bisher nur einen Hinweis für die Induzierbarkeit der PMT. In Blättern von *N. tabacum* kam es nach Verwundung zur kurzzeitigen Expression [Sachan und Falcone, 2002]. Die genaue Kenntnis über den Ort und die Reihenfolge der Biosynthesestufen ist wichtig, um die Regulationsmechanismen der Calystegine aufzuklären. Wenn Calystegine lokal in jedem Gewebe produziert werden können, ist eine schnelle und direkte Regulation des Stoffwechsels denkbar. Es ist bekannt, dass Calystegine als chemische Chaperone spezifisch an der Proteinfaltung mitwirken können [Chang et al., 2006]. Somit wäre ein direkter Einfluss der Calystegine in die Regulation der Proteinfunktionen möglich. Eine Rolle der Calystegine als chemische Chaperone im pflanzlichen Stoffwechsel wäre in diesem Zusammenhang ein zukünftiger Forschungsansatz.

Charakterisierung rekombinanter Proteine

Die Charakterisierung rekombinanter Enzyme ist besonders für die Erforschung von Sekundärstoffbiosynthesen wichtig. Im Pflanzengewebe liegen viele Enzyme meist nur in geringer Konzentration vor. Während der nativen Reinigung kann es zu geringen Ausbeuten und zur Beeinträchtigung der Proteinfunktion durch mitextrahierte Stoffe kommen. Der Einsatz von Affinitäts-*Tags* zur Aufreinigung ist gängige Methode. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Position eines Affinitäts-*Tags* die Proteineigenschaften beeinflussen kann. Durch ein Modell wurden Erklärungsansätze für die veränderten Proteineigenschaften gefunden. Es ist zu empfehlen, vor der Expression neuer rekombinanter Proteine die Lage des aktiven Zentrums zum Affinitäts-*Tag*, z.B. durch ein Proteinmodell, abzuschätzen. Der Affinitäts-*Tag* sollte dann ausreichend entfernt vom aktiven Zentrum lokalisiert werden.

E Zusammenfassung

Die Biosynthese der Calystegine leitet sich in Pflanzen, die klassische Tropinester enthalten, von der Tropanalkaloidbiosynthese ab. Viele Arten der Gattung *Solanum* enthalten keine klassischen Tropinester, aber Calystegine. Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide mit Glycosidase-hemmenden Eigenschaften. Die physiologische Bedeutung für die Pflanze ist bisher nicht geklärt.

Im Blickpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der Calysteginbiosynthese an ausgewählten Vertretern der Gattung *Solanum* mit besonderer Fokussierung auf die Tropinonreduktion und deren Regulation.

- Die Tropanalkaloid- und Calysteginakkumulation wurde an 7 Vertretern der Gattung *Solanum* untersucht. Dabei wurden in jedem Vertreter Calystegine oder Intermediate der Calysteginbiosynthese nachgewiesen. Das Muster und die Höhe der Akkumulation war dabei von der Art abhängig und konnte umweltabhängig angepasst werden. Der Bittersüße Nachtschatten (*S. dulcamara* L.) stellte sich als Spezies mit hohem Alkaloidgehalt und einem besonderen Muster an Calysteginen heraus. Anders als für Solanaceen bekannt, war nicht Calystegin B₂ sondern Calystegin A₃ vorherrschend.
- Die Aktivität von Tropinonreduktasen wurde gewebespezifisch in den Arten bestimmt. Das Muster der Tropinonreduktion war in den Geweben unterschiedlich. In unter- und oberirdischen Geweben wurde Tropinonreduktase-Aktivität nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Tropinonreduktion nicht auf die Wurzel beschränkt ist.
- Von *S. dulcamara* wurde eine Wurzelkultur etabliert. Diese zeigte eine konstante Calystegin-Akkumulation über 35 Tage (C 1.5) und TR-Aktivität von 0,17-0,25 nkat/mg Protein. Damit steht ein stabiles experimentelles System zur Untersuchung der Calysteginbiosynthese zur Verfügung.
- Eine pseudotropinformende Tropinonreduktase (TRII) wurde aus *S. dulcamara* kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Trotz hoher Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zu bekannten TRII, zeigte die biochemische Charakterisierung ein abweichendes Verhalten zu charakterisierten TRII. Das abweichende Verhalten konnte der Position des His-Tag zugeordnet werden. Eine Modellierung der Proteinstruktur erklärte, wie ein His-Tag am C-Terminus jedoch nicht am N-Terminus die Katalyse beeinflusst. Es wird zum einen postuliert, dass der positiv geladene His-Tag durch seine Lage die Eintrittsstelle der Substrate zum aktiven Zentrum behindert. Dies zeigte sich in erhöhten Km-Werten für stickstoffhaltige Substrate. Zum anderen wird angenommen, dass ein His-Tag am C-Terminus die Beweglichkeit des aktiven Zentrums vermindert und so die Substratumsatzgeschwindigkeit verringert wird.

Durch den Wechsel der Position zum N-Terminus konnte dies behoben werden. Aus diesen Ergebnissen wird konsequent eine homologe Modellierung von Proteinen empfohlen, um den Einfluss eines Affinitäts-Tags in der Nähe des aktiven Zentrums abzuschätzen.

- Mit RT-PCR und degenerierten Primern wurden 3 *trI*-ähnliche Fragmente generiert. Nach RACE-PCR zur Vervollständigung wurden zwei *trI*-homologe cDNA-Sequenzen aus *S. nigrum* und eine *trI*-homologe cDNA-Sequenz aus *S. dulcamara* erhalten. Alle Sequenzen besitzen die typischen Merkmale der NADPH-abhängigen SDR. Aus *S. nigrum* konnte die cDNA als aktives Protein mit tropinbildenden Eigenschaften in *E. coli* exprimiert werden. Eine ausführliche Charakterisierung könnte die Bedeutung dieses Enzyms für eine Pflanze ohne klassische Tropinester klären.
- Mit homologer Modellierung auf Grundlage der kristallisierten TRII aus *D. stramonium* (PDB: 1IPF) wurde ein Modell der *Sd*-TRII erstellt. Mit dem Modell wurden zum einen die Enzymeigenschaften erklärt und zum anderen wurde es eingesetzt, um neue Liganden für die *Sd*-TRII zu finden.
- Mit Erstellung eines Pharmakophor und *in silico* Screening in zwei großen Datenbanken konnten 24 Substanzen zur *in vitro* Testung auf Aktivität mit der *Sd*-TRII ausgewählt werden. Mehrere Substanzen inhibierten die *Sd*-TRII. Zwei Substanzen mit der stärksten inhibitorischen Wirkung wurden einer Wurzelkultur von *S. dulcamara* zugeführt mit dem Ziel eine Hemmung der Calysteginbiosynthese zu untersuchen. Durch die Substanzen konnte ein Einfluss auf das Wachstum, jedoch nicht auf die Calysteginakkumulation festgestellt werden.
- Mit Markierungsexperimenten mit [¹³C-*methyl*]-Tropinon wurde der metabolische Weg von markiertem Pseudotropin aus verfolgt. Dabei entstanden die markierten Aminosäuren Glutaminsäure und Asparagin. Dies kann auf eine Wiederverwendung des markierten Kohlenstoffs im Primärstoffwechsel zurückzuführen sein. Eine *N*-Oxidation von Pseudotropin wird in diesem Zusammenhang vermutet.
- Polyamine wurden in allen Geweben von *S. dulcamara* nachgewiesen. *N*-Methylputrescin weist auf eine aktive PMT hin. Es wurde eine *pmt*-homologe cDNA aus *S. dulcamara* isoliert, kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Das Protein katalysierte den Umsatz von Putrescin zu *N*-Methylputrescin und stellt somit eine aktive PMT dar.

F Literaturverzeichnis

- Ahr, H. J., Boberg, M., Brendel, E., Krause, H. P., and Steinke, W. 1997. Pharmacokinetics of miglitol: Absorption, distribution, metabolism, and excretion following administration to rats, dogs, and man. *Arzneimittelforschung* **47**, 734-745.
- Alabadi, D. and Carbonell, J. 1998. Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiology* **118**, 323-328.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Amor-Mahjoub, M., Suppini, J. P., Gomez-Vrielyunck, N., and Ladjimi, M. 2006. The effect of the hexahistidine-tag in the oligomerization of HSC70 constructs. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **844**, 328-334.
- Apelbaum, A., Canellakis, Z. N., Applewhite, P. B., Kaur-Sawhney, R., and Galston, A. W. 1988. Binding of spermidine to a unique protein in thin-layer tobacco tissue culture. *Plant Physiology* **88**, 996-998.
- Araujo, A. P. U., Oliva, G., Henrique-Silva, F., Garratt, R. C., Caceres, O., and Beltramini, L. M. 2000. Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocalceol 1,2-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**, 480-484.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., and Pedersen, J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* **48**, 1-13.
- Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H., and Matsui, K. 1994. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* **259**, 243-255.
- Asano, N., Kato, A., Oseki, K., Kizu, H., and Matsui, K. 1995. Calystegins of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae). Structure determination and their glycosidase inhibitory activities. *European Journal of Biochemistry* **229**, 369-376.
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Watson, A. A., and Nash, R. J. 1996a. Calystegine B4, a novel trehalase inhibitor from *Scopolia japonica*. *Carbohydrate Research* **293**, 195-204.
- Asano, N., Kato, A., Yokoyama, Y., Miyauchi, M., Yamamoto, M., Kizu, H., and Matsui, K. 1996b. Calystegin N-1, a novel nortropane alkaloid with a bridgehead amino group from *Hyoscyamus niger*: Structure determination and glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* **284**, 169-178.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Hackett, L., Topping, J., and Winchester, B. 1997a. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology* **7**, 1085-1088.
- Asano, N., Kato, A., Miyauchi, M., Kizu, H., Tomimori, T., Matsui, K., Nash, R. J., and Molyneux, R. J. 1997b. Specific α -galactosidase inhibitors, N-methylcalystegines - structure/activity relationships of calystegines from *Lycium chinense*. *European Journal of Biochemistry* **248**, 296-303.
- Asano, N., Kato, A., Kizu, H., Matsui, K., Griffiths, R. C., Jones, M. G., Watson, A. A., and Nash, R. J. 1997c. Enzymatic synthesis of the glycosides of calystegines B1 and B2 and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research* **304**, 173-178.
- Asano, N. 2000. Alkaloidal sugar mimetics: biological activities and therapeutic applications. *Journal of Enzyme Inhibition* **15**, 215-234.
- Asano, N., Nash, R. J., Molyneux, R. J., and Fleet, G. W. 2000a. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry* **11**, 1645-1680.

- Asano, N., Ishii, S., Kizu, H., Ikeda, K., Yasuda, K., Kato, A., Martin, O. R., and Fan, J. Q. 2000b. In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal α -galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *European Journal of Biochemistry* **267**, 4179-4186.
- Asano, N., Kato, A., and Watson, A. A. 2001a. Therapeutic applications of sugar-mimicking glycosidase inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **1**, 145-154.
- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoke, D., Dräger, B., Watson, A. A., and Nash, R. J. 2001b. Dihydroxynortropine alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry* **57**, 721-726.
- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoke, D., Dräger, B., Watson, A. A., and Nash, R. J. 2001b. Dihydroxynortropine alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry* **57**, 721-726.
- Asano, N. 2003. Naturally occurring iminosugars and related compounds: Structure, distribution, and biological activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry (Sharjah, United Arab Emirates)* **3**, 471-484.
- Bairoch, A. and Apweiler, R. 2000. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research* **28**, 45-48.
- Baldwin, I. T. 1999. Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity. *Journal of Chemical Ecology* **25**, 3-30.
- Bartholomeusz, T. A. 2007. Etudes du métabolisme d' Alcaloïdes N-méthyles. Utilisation d' Analogues et d' Isopopes stables. *These*, Université de Picardie Jules Verne
- Basu, H. S., Schwietert, H. C., Feuerstein, B. G., and Marton, L. J. 1990. Effects of variation in the structure of spermine on the association with DNA and the induction of DNA conformational changes. *Biochemical Journal* **269**, 329-334.
- Bayer, A., Ma, X., and Stockigt, J. 2004. Acetyltransfer in natural product biosynthesis--functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 2787-2795.
- Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J., and Christen, P. 2001. Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry* **58**, 455-462.
- Bell, E. and Malmberg, R. L. 1990. Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia-coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Molecular & General Genetics* **224**, 431-436.
- Bergmeyer, H. U. 1985. Absorption coefficients of NAD(P)H, In: Methods of Enzymatic Analysis. *VCH-Verlag, Weinheim* **489**.
- Biastoff, S., Teuber, M., Zhou, Z. S., and Dräger, B. 2006. Colorimetric Activity Measurement of a Recombinant Putrescine N-Methyltransferase from *Datura stramonium*. *Planta Medica* **72**, 1136-1141.
- Biastoff, S. and Dräger, B. 2007. Calystegines. *The Alkaloids* **64**, 49-102.
- Biondi, S., Fornale, S., Oksman-Caldentey, K. M., Eeva, M., Agostani, S., and Bagni, N. 2000. Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell Reports* **19**, 691-697.
- Bohs, L. and Olmstead, R. G. 1997. Phylogenetic relationships in *Solanum* (*Solanaceae*) based on *ndhF* sequences. *Systematic Botany* **22**, 5-17.
- Boswell, H. D., Dräger, B., McLauchlan, W. R., Portsteffen, A., Robins, D. J., Robins, R. J., and Walton, N. J. 1999. Specificities of the enzymes of N-alkyltropine biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*. *Phytochemistry* **52**, 871-878.

- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., and Martin, T. J. 1999. Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Science* **140**, 103-125.
- Böhm, H.-J., Klebe, G., and Kubinyi, H. 1996. Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford*.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brock, A., Bieri, S., Christen, P., and Dräger, B. 2005. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. *Phytochemistry* **66**, 1231-1240.
- Brock, A., Herzfeld, T., Paschke, T., Koch, M., and Draeger, B. 2006. Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry* **67**, 2050-2057.
- Carrio, M. M. and Villaverde, A. 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of Biotechnology* **96**, 3-12.
- Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., and DeLucas, L. J. 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **63**, 295-301.
- Chang, H.-H., Asano, N., Ishii, S., Ichikawa, Y., and Fan, J.-Q. 2006. Hydrophilic iminosugar active-site-specific chaperones increase residual glucocerebrosidase activity in fibroblasts from Gaucher patients. *FEBS Journal* **273**, 4082-4092.
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C. M., Watkin, R., and Kneale, G. G. 2005. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expression and Purification* **39**, 152-159.
- Chen, Z., Jiang, J. C., Lin, Z. G., Lee, W. R., Baker, M. E., and Chang, S. H. 1993. Site-specific mutagenesis of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: Evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis. *Biochemistry* **32**, 3342-3346.
- Clark, E. D. B. 1998. Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 157-163.
- Cline, J., Braman, J. C., and Hogrefe, H. H. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **24**, 3546-3551.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., and Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2110-2114.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890.
- Couladis, M. M., Friesen, J. B., Landgrebe, M. E., and Leete, E. 1991. Enzymes catalyzing the reduction of tropinone to tropine and pseudotropine isolated from the roots of *Datura innoxia*. *Phytochemistry* **30**, 801-806.
- Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., van Weely, S., Hrebicek, M., Platt, F., Butters, T., Dwek, R., Moyses, C., Gow, I., Elstein, D., and Zimran, A. 2000. Novel oral treatment of Gaucher's disease with *N*-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* **355**, 1481-1485.
- Cox, T. M., Aerts, J. M. F. G., Andria, G., Beck, M., Belmatoug, N., Bembi, B., Chertkoff, R., Vom Dahl, S., Elstein, D., Erikson, A., Giralt, M., Heitner, R., Hollak, C., Hrebicek, M., Lewis, S., Mehta, A., Pastores, G. M., Rolfs, A., Miranda, M. C. S., and Zimran, A. 2003. The role of the iminosugar *N*-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type I (non-neuronopathic) Gaucher disease: A position statement. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **26**, 513-526.
- Creelmann, R. A. and Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 355-381.

- Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martinez, S. E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Pares, X., and Farres, J. 2000. Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenases: a conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 25180-25187.
- Dayhoff, M. O., Orcutt B.C., and Schwartz R. 1978. Atlas of protein sequence and structure. Ed.M.O.Dayhoff.
- De-Luca, V. and St-Pierre, B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *trends in plant science* **5**, 168-173.
- De-Luca, V. and Laflamme, P. 2001. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 225-233.
- Dohn, D. R. and Krieger, R. I. 1984. N-demethylation of p-Chloro-N-methylaniline catalized by subcellular fractions from Avocado pear (*Persea americana*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **231**, 416-423.
- Dräger, B., Hashimoto, T., and Yamada, Y. 1988. Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures. *Agricultural And Biological Chemistry* **52**, 2663-2667.
- Dräger, B., Portsteffen, A., Schaal, A., MacCabe, P. H., Peerless, A.-C. J., and Robins, R. J. 1992. Levels of tropinone-reductase activities influence the spectrum of tropane esters found in transformed root cultures of *Datura stramonium* L. *Planta* **188**, 581-586.
- Dräger, B. and Schaal, A. 1994. Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures. *Phytochemistry* **35**, 1441-1447.
- Dräger, B., Funck, C., Hoehler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A., and Schmidt, R. 1994. Calystegines as a new group of tropane alkaloids in Solanaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **38**, 235-240.
- Dräger, B., van Almsick, A., and Mrachatz, G. 1995. Distribution of calystegines in several Solanaceae. *Planta Medica* **61**, 577-579.
- Dräger, B. 2004. Chemistry and biology of calystegines. *Natural Product Reports* **21**, 211-223.
- Dräger, B. 2006. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* **67**, 327-337.
- Dutta, S., Berman, H. M., and F.Bluhm, W. F. 2007. Using the Tools and Resources of the RCSB Protein Data Bank. *Current Protocols in Bioinformatics* **20**, 1.9.1-1.9.24.
- Evans, P. T. and Malmberg, R. L. 1989. Do polyamines have roles in plant development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 235-269.
- Facchini, P. J. 2001. Alkaloid Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 29-66.
- Facchini, P. J. and St Pierre, B. 2005. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 657-666.
- Favia, A. D., Nobeli, I., Glaser, F., and Thornton, J. M. 2008. Molecular Docking for Substrate Identification: The Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Molecular Biology* **375**, 855-874.
- Fellows, L. E., Kite, G. C., Nash, R. J., Simmonds, M. S. J., and Scofield, A. M. 1992. Distribution and biological activity of alkaloidal glycosidase inhibitors from plants. *Proceedings of the phytochemical Society of Europe* **33**, 271-282.

- Figueras, X., Gendy, C. A., Pinol, M. T., Tran, T., V, and Tiburcio, A. F. 1990. Polyamine content in relation to ploidy level and to different organs of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant and Cell Physiology* **31**, 823-828.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., and Oppermann, U. 2002. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25677-25684.
- Fleet, G. W., Fellows, L. E., and Winchester, B. 1990. Plagiarizing plants: amino sugars as a class of glycosidase inhibitors. *Ciba Foundation Symposium* **154**, 112-125.
- Flores, H. E., Protacio, C. M., and Signs, M. W. 1989. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. *Recent advances in Phytochemistry* **23**, 329-393.
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P., and Menart, V. 2002. Attachment of Histidine Tags to Recombinant Tumor Necrosis Factor-Alpha Drastically Changes Its Properties. *The Scientific World JOURNAL* **2**, 1312-1325.
- Fonzo, V., Anfora, G., Cristofaro, M., Nash, R., and Arnone, S. 1999. Laboratory evaluation of effects of potato polyhydroxylate alkaloids on *Leptonotarsa decemlineata* Say. 14th Triennial Conference of the European Association for potato research. [Abstracts of Conference Papers, Posters and Demonstrations], 279-280.
- Freydank, A.-C., Brandt, W., and Dräger, B. 2008. Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins: structure, function, bioinformatics* DOI: 10.1002/prot.21905.
- Friedman, M., Roitman, J. N., and Kozukue, N. 2003. Glycoalkaloid and Calystegine Contents of Eight Potato Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2964-2973.
- Frohman, M. A. 1993. Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymology* **218**, 340-356.
- Galston, A. W. and Sawhney, R. K. 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* **94**, 406-410.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**, 151-158.
- Garcia-Moreno, M. I., Benito, J. M., Ortiz Mellet, C., and Garcia Fernandez, J. M. 2001. Synthesis and evaluation of calystegine B2 analogues as glycosidase inhibitors. *Journal of Organic Chemistry* **66**, 7604-7614.
- Gareth, J., Peter, W., Robert, C. G., Andrew, R. L., and Robin, T. 1997. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of Molecular Biology* **267**, 727-748.
- Gerasimenko, I., Ma, X. Y., Sheludko, Y., Mentele, R., Lottspeich, F., and Stockigt, J. 2004. Purification and partial amino acid sequences of the enzyme vinorine synthase involved in a crucial step of ajmaline biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 2781-2786.
- Goldmann, A., Milat, M. L., Ducrot, P. H., Lallemand, J. Y., Maille, M., Lepingle, A., Charpin, I., and Tepfer, D. 1990. Tropane derivatives from *Calystegia sepium*. *Phytochemistry* **29**, 2125-2128.
- Goldmann, A., Message, B., Tepfer, D., Molyneux, R. J., Duclos, O., Boyer, F. D., Pan, Y. T., and Elbein, A. D. 1996. Biological activities of the nortropane alkaloid, calystegine B2, and analogs: structure-function relationships. *Journal of Natural Products* **59**, 1137-1142.
- Griffin, W. J. and Lin, G. D. 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* **53**, 623-637.

- Griffiths, R. C., Watson, A. A., Kizu, H., Asano, N., Sharp, H. J., Jones, M. G., Wormald, M. R., Fleet, G.-W. J., and Nash, R. J. 1996. The isolation from *Nicandra physalodes* and identification of the 3-O-beta-D-glucopyranoside of 1-alpha,2-beta,3-alpha,6-alpha-tetrahydroxy-nor-tropine (Calystegine B-1). *Tetrahedron Letters* **37**, 3207-3208.
- Guntli, D., Heeb, M., Moenne-Loccoz, Y., and Defago, G. 1999. Contribution of calystegine catabolic plasmid to competitive colonization of the rhizosphere of calystegine-producing plants by *Sinorhizobium meliloti* Rm41. *Molecular Ecology* **8**, 855-863.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A. J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G., and Komeda, Y. 2000. ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO Journal* **19**, 4248-4256.
- Hanzawa, Y., Imai, A., Michael, A. J., Komeda, Y., and Takahashi, T. 2002. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **527**, 176-180.
- Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G., and Yamada, Y. 1992. Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiology* **100**, 836-845.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K., and Yamada, Y. 1998. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant and Cell Physiology* **39**, 73-79.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y., and Yamada, Y. 1989. Putrescine and putrescine *N*-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. I. Biochemical studies. *Planta* **178**, 123-130.
- Hashimoto, T. and Yamada, Y. 2003. New genes in alkaloid metabolism and transport. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 163-168.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10915-10919.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. G. 1993. Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins* **17**, 49-61.
- Henrick, K., Feng, Z., F. Bluhm, W. F., Dimitropoulos, D., Doreleijers, J. F., Dutta, S., Flippen-Anderson, J. L., Ionides, J., Kamada, C., Krissinel, E., Lawson, C. L., Markley, J. L., Nakamura, H., Newman, R., Shimizu, Y., Swaminathan, J., Velankar, S., Ory, J., Ulrich, E. L., Vranken, W., Westbrook, J., Yamashita, R., Yang, H., Young, J., Yousufuddin, M., Berman, H. M. 2008. Remediation of the protein data bank archive. *Nucleic Acids Research* **36**, D426-D433.
- Hermann, J. C., Ghanem, E. L. Y., Raushel, F. M., Irwin, J. J., and Shoichet, B. K. 2006. Predicting substrates by docking high-energy intermediates to enzyme structures. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15882-15891.
- Hermann, J. C., Marti-Arbona, R., Fedorov, A. A., Fedorov, E., Almo, S. C., Shoichet, B. K., and Raushel, F. M. 2007. Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *Nature* **448**, 775-779.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**, 103-112.
- Hibi, N., Fujita, T., Hatano, M., Hashimoto, T., and Yamada, Y. 1992. Putrescine *N*-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*: *n*-Butylamine as a potent inhibitor of the transferase both *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiology* **100**, 826-835.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T., and Yamada, Y. 1994. Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* **6**, 723-735.
- Höke, D. and Dräger, B. 2004. Calystegines in *Calystegia sepium* do not inhibit fungal growth and invertase activity but interact with plant invertase. *Plant Biology* **6**, 206-213.

- Hueza, I. M., Guerra, J. L., Haraguchib, M., Asanoc, N., and Gorniak, S. L. 2005. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: A study in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* **57**, 53-58.
- Hunziker, A. T. 2001. Genera Solanaceaeum. *A.R.G.Gantner Verlag, Rugell, Lichtenstein*.
- Ikeda, K., Kato, A., Adachi, I., Haraguchi, M., and Asano, N. 2003. Alkaloids from the Poisonous Plant *Ipomoea carnea*: Effects on Intracellular Lysosomal Glycosidase Activities in Human Lymphoblast Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7642-7646.
- Imai, R., Ali, A., Pramanik, M. H. R. M., Nakaminami, K., Sentoku, N., and Kato, H. 2004. A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *Journal of Plant Physiology* **161**, 883-886.
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y., and Nakamura, K. 1998. Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Molecular Biology* **38**, 1101-1111.
- Jang, J. C. and Sheen, J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**, 1665-1679.
- Jenett-Siems, K., Kaloga, M., and Eich, E. 1993. Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulaceae. *Phytochemistry* **34**, 437-440.
- Jenny, R. J., Mann, K. G., and Lundblad, R. L. 2003. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expression and Purification* **31**, 1-11.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez, D. R., Jeffery, J., and Ghosh, D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003-6013.
- Jörnvall, H., Hoog, J. O., and Persson, B. 1999. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Letters* **445**, 261-264.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., and Taylor, R. 1997. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of Molecular Biology* **267**, 727-748.
- Kaiser, H., Richter, U., Keiner, R., Brabant, A., Hause, B., and Dräger, B. 2006. Immunolocalisation of two tropinone reductases in potato (*Solanum tuberosum* L.) root, stolon, and tuber sprouts. *Planta* **225**, 127-137.
- Kasukabe, Y., He, L. X., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., and Tachibana, S. 2004. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 712-722.
- Kato, A., Asano, N., Kizu, H., Matsui, K., Suzuki, S., and Arisawa, M. 1997. Calystegine alkaloids from *Duboisia leichhardtii*. *Phytochemistry* **45**, 425-429.
- Kaur-Sawhney, R., Liu-Mei Shih, and Galston, A. W. 1982. Relation of Polyamine Biosynthesis to the Initiation of Sprouting in Potato Tubers. *Plant Physiology* **69**, 411-415.
- Keiner, R. and Dräger, B. 2000. Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science* **150**, 171-179.
- Keiner, R. 2001. Calystegine in *Solanum tuberosum* L. - Klonierung, Expression und Charakterisierung der Tropinonreduktasen I und II, putativer Enzyme des Tropanalkaloidstoffwechsels, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Keiner, R., Kaiser, H., Nakajima, K., Hashimoto, T., and Dräger, B. 2002. Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.). *Plant Molecular Biology* **48**, 299-308.
- King, J., Haase-Pettingell, C., Robinson, A. S., Speed, M., and Mitraki, A. 1996. Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates. *FASEB Journal* **10**, 57-66.
- Klose, J., Wendt, N., Kubald, S., Krause, E., Fechner, K., Beyermann, M., Bienert, M., Rudolph, R., and Rothmund, S. 2004. Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. *Protein Science* **13**, 2470-2475.
- Koch, K. E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 509-540.
- Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D. R., Vassao, D. G., Jackson, B. L., Kish, C. M., Orlova, I., Spassova, S. M., Lewis, N. G., Noel, J. P., Baiga, T. J., Dudareva, N., and Pichersky, E. 2006. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10128-10133.
- Koelen, K. J. and Gross, G. G. 1982. Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Medica* **44**, 227-230.
- Korolev, S., Ikeguchi, Y., Skarina, T., Beasley, S., Arrowsmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A., Pegg, A. E., and Savchenko, A. 2002. The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nature Structural Biology* **9**, 27-31.
- Kusano, G., Orihara, S., Tsukamoto, D., Shibano, M., Coskun, M., Guvenc, A., and Erdurak, C. S. 2002. Five New Nortropane Alkaloids and Six New Amino Acids from the Fruit of *Morus alba* LINNE Growing in Turkey. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **50**, 185-192.
- Kutchan, T. M. 1995. Alkaloid biosynthesis-the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* **7**, 1059-1070.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, H. M., Hsieh, M. H., and Coruzzi, G. 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 345-353.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 283-291.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. 1999. Molecular and functional regulation of two NO₃-uptake systems by N and C-status of *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* **18**, 509-519.
- Leung, J. and Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 199-222.
- Levitt, M. 1992. Accurate Modeling of Protein Conformation by Automatic Segment Matching. *Journal of Molecular Biology* **226**, 507-533.
- Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 497-501.
- Lineweaver, H. and Burk, D. 1934. Determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* **56**, 658-666.

- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., and Karplus, M. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 3586-3616.
- Malone, T., Blumenthal, R. M., and Cheng, X. 1995. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *Journal of Molecular Biology* **253**, 618-632.
- Marcé, M., Brown, D. S., Capell, T., Figueras, X., and Tiburcio, A. F. 1995. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* **666**, 329-335.
- Martin, J. L. and McMillan, F. M. 2002. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 783-793.
- McKinley-McKee, J. S., Winberg, J. O., and Pettersson, G. 1991. Mechanism of action of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase. *Biochemical International* **25**, 879-885.
- Meier, A.-C. 2001. Tropinonreduktasen in *Calystegia sepium*, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mesnard, F., Roscher, A., Garlick, A. P., Girard, S., Baguet, E., Arroo, R. R. J., Lebreton, J., Robins, R. J., and Ratcliffe, R. G. 2002. Evidence for the involvement of tetrahydrofolate in the demethylation of nicotine by *Nicotiana glauca* cell-suspension cultures. *Planta* **214**, 911-919.
- Meurer-Grimes, B., Berlin, J., and Strack, D. 1989. Hydroxycinnamoyl-CoA-putrescine hydroxycinnamoyltransferase in tobacco cell cultures with high and low levels of caffeoylputrescine. *Plant Physiology* **89**, 488-492.
- Michael, A. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J. C., and Burtin, D. 1996. Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochemical Journal* **314**, 241-248.
- Michaelis, L. and Menten, M. L. 1913. Kinetics of invertase action. *Biochemische Zeitschrift* **49**, 333-369.
- Mikitzel, L. J. and Knowles, N. R. 1989. Polyamine metabolism of potato seed-tubers during long-term storage and early sprout development. *Plant Physiology* **91**, 183-189.
- Millgate, A. G., Pogson, B. J., Wilson, I. W., Kutchan, T. M., Zenk, M. H., Gerlach, W. L., Fist, A. J., and Larkin, P. J. 2004. Analgesia: Morphine-pathway block in top1 poppies. *Nature* **431**, 413-414.
- Minami H., D. E. I. K. S. F. 2007. Functional Analysis of Norcochlorine Synthase in *Coptis japonica*. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 6274-6282.
- Mizusaki, S., Tanabe, Y., Noguchi, M., and Tamaki, E. 1971. Phytochemical studies on tobacco alkaloids. XIV. Occurrence and properties of putrescine N-methyltransferase in tobacco roots. *Plant and Cell Physiology* **12**, 633-640.
- Molyneux, R. J., Pan, Y. T., Goldmann, A., Tepfer, D. A., and Elbein, A. D. 1993. Calystegins, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **304**, 81-88.
- Molyneux, R. J., McKenzie, R. A., O'Sullivan, B. M., and Elbein, A. D. 1995. Identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B2 in weir vine (*Ipomoea* sp. Q6 [aff. calobra]) and correlation with toxicity. *Journal of Natural Products* **58**, 878-886.

- Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazon, J., Cusido, R. M., Pinol, M. T., Teeri, T. H., and Oksman-Caldentey, K. M. 2003. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 203-211.
- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R. M., Bagni, N., and Pinol, M. T. 2002. Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the pmt gene. *Phytochemistry* **59**, 697-702.
- Mullis K.B. and Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology* **155**, 335-350.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Musmecci, S., Sonnino, A., Fonzo, V., Nash, R., and Arnone, S. 1999. Invitro rearing of *Phthorimaea operculella* Zeller on potato callus as bioassays for testing chemical compounds. 14th Triennial Conference of the European Association for potato research. [Abstracts of Conference Papers, Posters and Demonstrations], 215-216.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., and Yamada, Y. 1993a. cDNA encoding tropinone reductase-II from *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiology* **103**, 1465-1466.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., and Yamada, Y. 1993b. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9591-9595.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., and Yamada, Y. 1994. Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 11695-11698.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., and Yamada, Y. 1998. Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4876-4881.
- Nakajima, K., Kato, H., Oda, J., Yamada, Y., and Hashimoto, T. 1999a. Site-directed mutagenesis of putative substrate-binding residues reveals a mechanism controlling the different stereospecificities of two tropinone reductases. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 16563-16568.
- Nakajima, K., Oshita, Y., Kaya, M., Yamada, Y., and Hashimoto, T. 1999b. Structures and expression patterns of two tropinone reductase genes from *Hyoscyamus niger*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **63**, 1756-1764.
- Nakamura, N., Fukuchi-Mizutani, M., Miyazaki, K., Suzuki, K., and Tanaka, Y. 2006. RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnology* **23**, 13-17.
- Nakanishi, M., Kaibe, H., Matsuura, K., Kakumoto, M., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., and Hara, A. 1997a. Site-directed mutagenesis of residues in coenzyme-binding domain and active site of mouse lung carbonyl reductase. *Advances in experimental medicine and biology* **414**, 555-561.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., and Hara, A. 1997b. Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2218-2222.
- Nash, R. J., Rothschild, M., Porter, E. A., Watson, A. A., Waigh, R. D., and Waterman, P. G. 1993. Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropus*). *Phytochemistry* **34**, 1281-1283.
- Negrel, J. 1989. The biosynthesis of cinnamoylputrescines in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **28**, 477-481.

- Nickon, A. and Fieser, L. F. 1952. Configuration of tropine and pseudotropine. *Journal of the American Chemical Society* **74**, 5566-5570.
- Novák, M. and Salemink, C. A. 1989. Novel rearrangements during pyrolysis of cocaine. *Tetrahedron* **45**, 4287-4292.
- Nussbaumer, P., Kapetanidis, I., and Christen, P. 1998. Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea*: Effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports* **17**, 405-409.
- Ober, D. and Hartmann, T. 1999. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14777-14782.
- Ober, D., Harms, R., and Hartmann, T. 2000. Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vulgaris*: a revision. *Phytochemistry* **55**, 305-309.
- Oksman-Caldentey, K. M. and Inze, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *trends in plant science* **9**, 433-440.
- Olmstead, R. G. and Palmer, J. D. 1997. Implications for the Phylogeny, Classification, and Biogeography of Solanum from cpDNA Restriction Site Variation. *Systematic Botany* **22**, 19-29.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., and Jörnvall, H. 2003. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* **143-144**, 247-253.
- Ounaroon, A., Decker, G., Schmidt, J., Lottspeich, F., and Kutchan, T. M. 2003. (R,S)-reticuline 7-O-methyltransferase and (R,S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum* - cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Journal* **36**, 808-819.
- Parr, A. J., Walton, N. J., Bensalem, S., McCabe, P. H., and Routledge, W. 1991. 8-Thiabicyclo(3.2.1)octan-3-one as a biochemical tool in the study of tropane alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **30**, 2607-2610.
- Pellegrini, E. and Field, M. J. 2002. A generalized-born solvation model for macromolecular hybrid-potential calculations. *Journal of Physical Chemistry A* **106**, 1316-1326.
- Pena-Cortes, H., Fisahn, J., and Willmitzer L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4106-4013.
- Percival, G. C., Dixon, G., and Sword, A. 1994. Glycoalkaloid concentration of potato tubers following continuous illumination. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **66**, 139-144.
- Persson, B., Krook, M., and Jörnvall, H. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases. *Advances in experimental medicine and biology* **372**, 383-395.
- Platt, F. M., Neises, G. R., Dwek, R. A., and Butters, T. D. 1994. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 8362-8365.
- Portsteffen, A., Dräger, B., and Nahrstedt, A. 1994. The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. *Phytochemistry* **37**, 391-400.
- Portsteffen, A. 1994. Reinigung und Charakterisierung einer tropinbildenden und einer pseudotropinbildenden Tropinonreduktase aus transformierten Wurzelkulturen von *Datura stramonium* L., Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Primikiriou, N. I. and Roubelakis-Angelakis, K. A. 1999. Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L-cell-suspension cultures. *Planta* **208**, 574-582.

- Protacio, C. M. and Flores, H. E. 1992. The role of polyamines in potato tuber formation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **28**, 81-86.
- Qin, L., Hiser, C., Mulichak, A., Garavito, R. M., and Ferguson-Miller, S. 2006. Identification of conserved lipid/detergent-binding sites in a high-resolution structure of the membrane protein cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16117-16122.
- Rastogi, R., Dulson, J., and Rothstein, S. J. 1993. Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiology* **103**, 829-834.
- Reinbothe, C., Tewes, A., Luckner, M., and Reinbothe, S. 1992. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *The Plant Journal* **2**, 917-926.
- Richards, N. G. J. and Schuster, S. M. 1998. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **72**, 145-198.
- Richter, U., Rothe, G., Fabian, A.-K., Rahfeld, B., and Dräger, B. 2005. Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *Journal of Experimental Botany* **56**, 645-652.
- Richter, U. 2006. Calystegine in *Solanum tuberosum* L. – Biosynthese und physiologische Bedeutung im Kohlenhydratstoffwechsel, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Richter, U., Sonnewald, U., and Dräger, B. 2007. Calystegines in potatoes with genetically engineered carbohydrate metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1603-1615.
- Robins, R. J., Parr, A. J., Bent, E. G., and Rhodes, M.-J. C. 1991a. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 1. Kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites. *Planta* **183**, 185-195.
- Robins, R. J., Parr, A. J., and Walton, N. J. 1991b. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 2. On the relative contributions of L-arginine and L-ornithine to the formation of the tropane ring. *Planta* **183**, 196-201.
- Robins, R. J., Abraham, T. W., Parr, A. J., Eagles, J., and Walton, N. J. 1997. The biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium*: the identity of the intermediates between *N*-methylpyrrolinium salt and tropinone. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 10929-10934.
- Rothe, G., Garske, U., and Dräger, B. 2001. Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation. *Plant Science* **160**, 1043-1053.
- Rothe, G. 2002. Regulation und Manipulation der Tropanalkaloidbiosynthese in *Atropa belladonna* L., Dissertation, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Rothe, G., Hachiya, A., Yamada, Y., Hashimoto, T., and Dräger, B. 2003. Alkaloids in plants and root cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine *N*-methyltransferase. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2065-2070.
- Sachan, N. and Falcone, D. L. 2002. Wound-induced gene expression of putrescine *N*-methyltransferase in leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **61**, 797-805.
- Samanani, N., Liscombe, D. K., and Facchini, P. J. 2004. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant Journal* **40**, 302-313.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. *A Laboratory Manual 2nd Edition* Cold Spring Harbour Laboratory Press, -Plainview, New York.

- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K. I., Choi, K. B., Morishige, T., Fujimoto, H., and Yamada, Y. 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 367-372.
- Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richter, A., Jenett-Siems, K., Dräger, B., Asano, N., Gupta, M. P., Correa, M. D., and Eich, E. 1998. Phytochemistry and chemotaxonomy of the Convolvulaceae. 6. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* **49**, 1989-1995.
- Schimming, T., Jenett-Siems, K., Mann, P., Tofern-Reblin, B., Milson, J., Johnson, R. W., Derooin, T., Austin, D. F., and Eich, E. 2005. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* **66**, 469-480.
- Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W., and Cheng, X. 1995. Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *Journal of Molecular Biology* **247**, 16-20.
- Scholl, Y., Höke, D., and Dräger, B. 2001. Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway. *Phytochemistry* **58**, 883-889.
- Scholl, Y., Schneider, B., and Dräger, B. 2003. Biosynthesis of calystegines: 15N NMR and kinetics of formation in root cultures of *Calystegia sepium*. *Phytochemistry* **62**, 325-332.
- Schomburg, I., Chang, A., and Schomburg, D. 2002. BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Research* **30**, 47-49.
- Schroeder, G., Unterbusch, E., Kaltenbach, M., Schmidt, J., Strack, D., De, L., V, and Schroeder, J. 1999. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: Tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Letters* **458**, 97-102.
- Seiler, N. and Knodgen, B. 1978. Determination of di- and polyamines by high performance liquid chromatographic separation of their 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl derivatives. *Journal of Chromatography* **145**, 29-39.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J.-C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 410-418.
- Shonle, I. and Bergelson, J. 2000. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution; international journal of organic evolution* **54**, 778-788.
- Sichhart, Y. 2003. Gene, Enzyme und Produkte der Calysteginbildung in *Calystegia sepium* (L.) R. Br., Dissertation, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Siminszky, B., Gavilano, L., Bowen, S. W., and Dewey, R. E. 2005. Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14919-14924.
- Sipl, M. J. 1990. Calculation of Conformational Ensembles from Potentials of Mean Force - An Approach to the Knowledge-Based Prediction of Local Structures in Globular-Proteins. *Journal of Molecular Biology* **213**, 859-883.
- Sipl, M. J. 1993. Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **7**, 473-501.
- Smith, M. A. and Davies, P. J. 1985. Separation and Quantitation of Polyamines in Plant Tissue by High Performance Liquid Chromatography of Their Dansyl Derivatives. *Plant Physiology* **78**, 89-91.
- Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., and Waterhouse, P. M. 2000. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
- Song, J. K. and Markley, J. L. 2007. Cautionary tail: The presence of an N-terminal tag on dynein light-chain Roadblock/LC7 affects its interaction with a functional partner. *Protein and Peptide Letters* **14**, 265-268.

- Springob, K., Samappito, S., Jindaprasert, A., Schmidt, J., Page, J. E., De Eknankul, W., and Kutchan, T. M. 2007. A polyketide synthase of *Plumbago indica* that catalyzes the formation of hexaketide pyrones. *FEBS Journal* **274**, 406-417.
- Stenzel, O. 2005. Putrescin-*N*-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L. - ein Enzym der Calysteginbiosynthese, Dissertation, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Stenzel, O., Teuber, M., and Dräger, B. 2006. Putrescine *N*-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta* **223**, 200-212.
- Suzuki, K., Yamada, Y., and Hashimoto, T. 1999a. Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant and Cell Physiology* **40**, 289-297.
- Suzuki, K., Yun, D. J., Chen, X. Y., Yamada, Y., and Hashimoto, T. 1999b. An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6beta-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Molecular Biology* **40**, 141-152.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., and Mitsui, Y. 1996. Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure* **4**, 33-45.
- Tassoni, A., Antognoni, F., and Bagni, N. 1996. Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. *Plant Physiology* **110**, 817-824.
- Taylor, M. A., Burch, L. R., and Davies, H. V. 1993. Changes in Polyamine Biosynthesis during the Initial Stages of Tuberisation in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Plant Physiology* **141**, 370-372.
- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Denarie, J., and Rosenberg, C. 1988. A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *Journal of Bacteriology* **170**, 1153-1161.
- Tepfer, D., Garcia-Gonzales, R., Mansouri, H., Seruga, M., Message, B., Leach, F., and Perica, M. C. 2003. Homology-dependent DNA Transfer from Plants to a Soil Bacterium Under Laboratory Conditions: Implications in Evolution and Horizontal Gene Transfer. *Transgenic Research* **12**, 425-437.
- Teuber, M., E. Azemi, M., Namjoyan, F., Meier, A.-C., Wodak, A., Brandt, W., and Dräger, B. 2007. Putrescine *N*-methyltransferases-a structure-function analysis. *Plant Molecular Biology* **63**, 787-801.
- Vanhala, L., Eeva, M., Lapinjoki, S., Hiltunen, R., and Oksman-Caldentey, K. M. 1998. Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Plant Physiology* **153**, 475-481.
- Walton, N. J., Robins, R. J., and Peerless, A.-C. J. 1990. Enzymes of *N*-methylputrescine biosynthesis in relation to hyoscyamine formation in transformed root cultures of *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*. *Planta* **182**, 136-141.
- Walton, N. J., Peerless, A.-C. J., Robins, R. J., Rhodes, M.-J. C., Boswell, H. D., and Robins, D. J. 1994. Purification and properties of putrescine *N*-methyltransferase from transformed roots of *Datura stramonium* L. *Planta* **193**, 9-15.
- Wang, R. X., Liu, L., Lai, L. H., and Tang, Y. Q. 1998. SCORE: A new empirical method for estimating the binding affinity of a protein-ligand complex. *Journal of Molecular Modeling* **4**, 379-394.
- Wang, R. X., Lu, Y. P., and Wang, S. M. 2003. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 2287-2303.
- Watson, A. A., Fleet, G. W., Asano, N., Molyneux, R. J., and Nash, R. J. 2001. Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry* **56**, 265-295.

- Wink, M. and Roberts, M. F. 1998. Compartmentation of alkaloid biosynthesis, transport, and storage. In *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications* (Roberts; M.F. and Wink, M., eds), Plenum Press, New York. 239-262.
- Xu, D., Shena, Y., Chappellb, J., Cuia, M., and Nielsena, M. 2007. Biochemical and molecular characterizations of nicotine demethylase in tobacco. *Physiologia Plantarum* **129**, 307-319.
- Yamashita, A., Kato, H., Wakatsuki, S., Tomizaki, T., Nakatsu, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., and Oda, J. 1999. Structure of tropinone reductase-II complexed with NADP⁺ and pseudotropine at 1.9 Å resolution: Implication for stereospecific substrate binding and catalysis. *Biochemistry* **38**, 7630-7637.
- Yamashita, A., Endo, M., Higashi, T., Nakatsu, T., Yamada, Y., Oda, J., and Kato, H. 2003. Capturing Enzyme Structure Prior to Reaction Initiation: Tropinone Reductase-II-Substrate Complexes. *Biochemistry* **42**, 5566-5573.
- Young, O. and Beevers, H. 1976. Mixed function oxidases from germinating castor bean endosperm. *Phytochemistry* **15**, 379-385.
- Zabetakis, I., Edwards, R., and O'Hagan, D. 1999. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* **50**, 53-56.
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K.-M., Xu, T., Pi, Y., Wang, Z., Zhang, H., Kai, G., Liao, Z., Xiaofen Sun, X., and Tang, K. 2004. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6786-6791.

G Anhang

G 1 Calystegin- und Intermediat-Akkumulation

G 1.1 Calystegin-Akkumulation

Tab. G- 1: Calystegingehalte in den *Solanum*-Arten *S. muricatum* und *S. dulcamara*, *S. nigrum*, *S. sisymbriifolium*, *S. rantonnettii*, *S. nodiflorum* und *S. mitlense*; Werte sind Mittelwerte einer 3-9fach Bestimmung. Werte ohne Standardabweichung waren Einzelbestimmungen oder Mittelwerte einer Doppelbestimmung.; u. N. = Werte unter der Nachweisgrenze

| Art | Gewebe | Calystegin A3 | | Calystegin A5 | | Calystegin B1 | | Calystegin B2 | | Calystegin B3 | |
|------------------------|---------------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| | | In µmol/g TM | | In µmol/g TM | | In µmol/g TM | | In µmol/g TM | | In µmol/g TM | |
| | | MW | Sd |
| <i>Solanum:</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>dulcamara</i> | Blatt alt | 1,924 | 0,518 | 0,342 | 0,069 | 0,182 | 0,029 | 0,643 | 0,179 | u. N. | |
| | Blatt jung | 2,171 | 0,525 | 0,203 | 0,041 | 0,393 | 0,142 | 0,992 | 0,336 | u. N. | |
| | Stängel alt | 1,322 | 0,373 | 0,234 | 0,069 | 0,098 | 0,027 | 0,131 | 0,047 | u. N. | |
| | Stängel jung | 3,941 | 0,763 | 0,461 | 0,107 | 0,250 | 0,043 | 0,624 | 0,152 | u. N. | |
| | Frucht reif | 1,415 | 0,317 | 0,107 | 0,020 | 0,073 | 0,014 | 0,404 | 0,102 | u. N. | |
| | Frucht unreif | 1,472 | 0,353 | 0,107 | 0,022 | u. N. | | 0,539 | 0,131 | u. N. | |
| | Wurzel | 4,814 | 1,372 | 0,571 | 0,163 | 0,439 | 0,157 | 0,640 | 0,110 | u. N. | |
| | Sprossspitze | 5,183 | 0,945 | 0,511 | 0,089 | 0,745 | 0,109 | 2,135 | 0,475 | u. N. | |
| | Blüten | 5,429 | 1,251 | 0,597 | 0,127 | 0,579 | 0,149 | 2,674 | 0,696 | u. N. | |
| <i>muricatum</i> | Blatt alt | 0,212 | 0,044 | u. N. | | u. N. | | 0,234 | 0,082 | u. N. | |
| | Blatt jung | 5,092 | 1,627 | 0,164 | 0,062 | u. N. | | 11,241 | 3,351 | u. N. | |
| | Stängel jung | 1,100 | 0,335 | 0,058 | 0,019 | u. N. | | 1,134 | 0,416 | u. N. | |
| | Frucht reif | 1,665 | 0,538 | 0,139 | 0,042 | u. N. | | 5,308 | 1,582 | u. N. | |
| | Blüten | 3,212 | | 0,204 | | u. N. | | 5,994 | | u. N. | |
| <i>mitlense</i> | Blatt alt | 0,053 | 0,010 | u. N. | | 0,357 | 0,059 | 0,321 | 0,095 | u. N. | |
| | Blatt jung | 0,180 | 0,053 | u. N. | | 0,343 | 0,038 | 0,593 | 0,097 | u. N. | |
| | Stängel alt | 0,030 | 0,006 | 0,019 | 0,005 | 0,052 | 0,007 | 0,025 | 0,005 | u. N. | |
| | Stängel jung | 0,345 | 0,077 | 0,111 | 0,014 | 0,613 | 0,091 | 1,138 | 0,223 | u. N. | |
| | Wurzel | 0,043 | 0,016 | 0,038 | 0,005 | 0,064 | 0,017 | 0,035 | 0,012 | u. N. | |
| | Blüten | 0,080 | | 0,030 | | 0,267 | | 0,376 | | u. N. | |
| <i>nodiflorum</i> | Blatt alt | 0,027 | 0,025 | u. N. | | u. N. | | 0,042 | 0,009 | u. N. | |
| | Blatt jung | 0,049 | 0,018 | u. N. | | u. N. | | 0,025 | 0,011 | u. N. | |
| | Stängel alt | 0,048 | 0,005 | u. N. | | u. N. | | 0,043 | 0,011 | u. N. | |
| | Stängel jung | 0,141 | 0,044 | u. N. | | u. N. | | 0,195 | 0,049 | u. N. | |
| | Frucht reif | u. N. | | 0,042 | 0,005 | u. N. | | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht unreif | u. N. | | 0,225 | 0,044 | u. N. | | u. N. | | u. N. | |
| | Blüten | 0,125 | 0,100 | 0,244 | 0,012 | u. N. | | 0,014 | 0,014 | u. N. | |
| <i>rantonnettii</i> | Blatt alt | u. N. | | u. N. | | 0,088 | 0,035 | 0,017 | | u. N. | |
| | Blatt jung | u. N. | | u. N. | | 0,350 | 0,081 | 0,065 | 0,013 | u. N. | |
| | Stängel alt | u. N. | | u. N. | | 0,103 | 0,020 | 0,012 | 0,002 | u. N. | |
| | Stängel jung | u. N. | | u. N. | | 0,794 | 0,102 | 0,217 | 0,014 | u. N. | |
| | Wurzel | u. N. | | u. N. | | 1,512 | 0,678 | 0,775 | 0,386 | 0,062 | 0,027 |
| | Sprossspitze | u. N. | | u. N. | | 1,580 | | 0,697 | | u. N. | |
| | Blüten | u. N. | | u. N. | | 1,820 | 0,270 | 0,716 | 0,032 | u. N. | |
| <i>sisymbriifolium</i> | Blatt jung | u. N. | | u. N. | | u. N. | | 0,028 | 0,009 | u. N. | |
| | Stängel alt | 0,659 | 0,241 | 0,114 | 0,031 | u. N. | | 1,237 | 0,375 | u. N. | |
| | Stängel jung | 0,034 | | u. N. | | u. N. | | 0,039 | 0,007 | u. N. | |
| | Frucht reif | 0,093 | 0,020 | 0,037 | 0,010 | u. N. | | 0,153 | 0,022 | u. N. | |
| | Frucht unreif | u. N. | | u. N. | | u. N. | | 0,046 | 0,007 | u. N. | |
| | Wurzel | 1,080 | 0,405 | 0,201 | 0,044 | u. N. | | 0,648 | 0,182 | u. N. | |
| | Blüten | 0,178 | | u. N. | | u. N. | | 0,281 | | u. N. | |
| <i>nigrum</i> | Blatt alt | 0,082 | 0,034 | u. N. | | u. N. | | u. N. | | u. N. | |
| | Blatt jung | 0,184 | 0,083 | u. N. | | u. N. | | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht reif | 0,039 | | u. N. | | u. N. | | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht unreif | 0,038 | | u. N. | | u. N. | | u. N. | | u. N. | |

G 1.2 Intermediat-Akkumulation

Tab. G- 2: Intermediatgehalte in den *Solanum*-Arten *S. muricatum* und *S. dulcamara*, *S. nigrum*, *S. sisymbriifolium*, *S. rantonnettii*, *S. nodiflorum* und *S. mitlense*; Werte sind Mittelwerte einer 3-9fach Bestimmung. Werte ohne Standardabweichung waren Einzelbestimmungen oder Mittelwerte einer Doppelbestimmung.; u. N. = Werte unter der Nachweisgrenze

| Art | Gewebe | Tropinon in $\mu\text{mol/g TM}$ | | Tropin in $\mu\text{mol/g TM}$ | | Pseudotropin in $\mu\text{mol/g TM}$ | |
|------------------------|---------------|----------------------------------|--------|--------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| | | MW | Sd | MW | Sd | MW | Sd |
| <i>Solanum:</i> | | | | | | | |
| <i>mitlense</i> | Blatt alt | u. N. | | 0,0091 | 0,0010 | u. N. | |
| | Blatt jung | u. N. | | 0,0082 | 0,0023 | u. N. | |
| | Stängel alt | u. N. | | 0,0065 | 0,0019 | u. N. | |
| | Stängel jung | u. N. | | 0,0206 | | u. N. | |
| | Wurzel | 0,0034 | 0,0007 | 0,0072 | 0,0027 | 0,0241 | 0,0024 |
| | Blüten | 0,0034 | | 0,0130 | | u. N. | |
| <i>nodiflorum</i> | Blatt alt | 0,0162 | 0,0052 | 0,0120 | 0,0040 | u. N. | |
| | Blatt jung | 0,0069 | 0,0011 | 0,0120 | 0,0037 | u. N. | |
| | Stängel alt | 0,0074 | 0,0012 | 0,0194 | 0,0064 | u. N. | |
| | Stängel jung | 0,0137 | 0,0028 | 0,0347 | 0,0208 | u. N. | |
| | Frucht reif | 0,0062 | 0,0011 | 0,0066 | 0,0019 | u. N. | |
| | Frucht unreif | 0,0062 | | 0,0066 | | u. N. | |
| | Wurzel | 0,0087 | 0,0002 | 0,0123 | 0,0017 | | |
| <i>rantonnettii</i> | Blatt alt | 0,0198 | 0,0117 | 0,0183 | 0,0037 | 0,0380 | 0,0242 |
| | Blatt jung | 0,0073 | 0,0034 | 0,0074 | 0,0022 | 0,0088 | 0,0036 |
| | Stängel alt | 0,0027 | 0,0010 | 0,0091 | 0,0021 | u. N. | |
| | Stängel jung | u. N. | | 0,0189 | 0,0097 | u. N. | |
| | Wurzel | 0,0025 | 0,0001 | 0,0031 | 0,0013 | 0,1249 | 0,0513 |
| | Sprossspitze | u. N. | | 0,0149 | | 0,1525 | |
| | Blüten | u. N. | | 0,0190 | 0,0012 | 0,0099 | 0,0016 |
| <i>dulcamara</i> | Blatt alt | 0,0554 | 0,0263 | u. N. | | u. N. | |
| | Blatt jung | 0,0162 | 0,0038 | u. N. | | u. N. | |
| | Stängel alt | 0,0597 | 0,0271 | u. N. | | u. N. | |
| | Stängel jung | 0,0274 | 0,0083 | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht reif | 0,0203 | 0,0000 | u. N. | | u. N. | |
| | Wurzel | 0,0537 | 0,0216 | u. N. | | 0,2992 | 0,1330 |
| | Blüten | 0,0212 | 0,0064 | u. N. | | 0,0364 | |
| <i>muricatum</i> | Blatt alt | 0,0051 | 0,0012 | 0,0189 | 0,0045 | u. N. | |
| | Blatt jung | 0,0087 | 0,0029 | 0,0211 | 0,0041 | 0,0043 | 0,0019 |
| | Stängel jung | u. N. | | 0,0200 | 0,0050 | u. N. | |
| | Frucht | 0,0074 | | 0,0350 | | u. N. | |
| | Blüten | u. N. | | 0,0310 | | u. N. | |
| <i>sisymbriifolium</i> | Blatt alt | u. N. | | 0,0100 | 0,0027 | u. N. | |
| | Blatt jung | u. N. | | 0,0081 | 0,0009 | u. N. | |
| | Stängel alt | u. N. | | 0,0086 | 0,0013 | u. N. | |
| | Stängel jung | u. N. | | 0,0098 | 0,0022 | u. N. | |
| | Frucht reif | u. N. | | 0,0343 | 0,0087 | 0,2970 | |
| | Frucht unreif | u. N. | | 0,0154 | 0,0055 | 0,0180 | |
| | Wurzel | 0,3821 | 0,1416 | 0,0188 | 0,0103 | 0,5458 | 0,3473 |
| <i>nigrum</i> | Blatt alt | 0,0051 | 0,0009 | u. N. | | u. N. | |
| gedüngt | Blatt jung | 0,0156 | 0,0069 | u. N. | | u. N. | |
| | Stängel | 0,0060 | 0,0009 | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht reif | 0,0020 | 0,0006 | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht unreif | 0,0035 | 0,0010 | u. N. | | u. N. | |
| | Wurzel | 0,8384 | 0,3597 | u. N. | | u. N. | |
| | Blüten | 0,0060 | 0,0008 | u. N. | | u. N. | |
| <i>nigrum</i> | Blatt alt | 0,0217 | 0,0132 | u. N. | | u. N. | |
| ungedüngt | Blatt jung | 0,1524 | 0,0692 | u. N. | | u. N. | |
| | Stängel | 0,0343 | 0,0119 | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht reif | 0,0026 | 0,0011 | u. N. | | u. N. | |
| | Frucht unreif | 0,0062 | 0,0017 | u. N. | | u. N. | |
| | Wurzel | 0,0140 | 0,0010 | u. N. | | u. N. | |
| | Blüten | 0,0173 | 0,0085 | u. N. | | u. N. | |

G 1.3 Wurzelkulturen *S. dulcamara*

Tab. G- 3: Aktivität und Alkaloidgehalte der *S. dulcamara* Wurzelkultur. Die Werte stammen aus 3–4fach Bestimmungen. Werte ohne Standardabweichung sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.; n. b.= nicht bestimmt, u. N. unter der Nachweisgrenze

| Zeit der Kultivierung in Tagen | Aktivität in nkat/g Protein | | Gehalt in $\mu\text{mol/g TM}$ | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|-------|--------------------------------|------|---------------|------|---------------|------|---------------|-------|----------|------|--------------|------|
| | | | Calystegin A3 | | Calystegin A5 | | Calystegin B2 | | Calystegin B1 | | Tropinon | | Pseudotropin | |
| | MW | Sd | MW | Sd | MW | Sd | MW | Sd | MW | Sd | MW | Sd | MW | Sd |
| 7 | 243,87 | 65,74 | 3,07 | 0,70 | 0,83 | 0,16 | 0,62 | 0,06 | u. N. | n. b. | n. b. | | n. b. | |
| 14 | 246,59 | 15,75 | 2,47 | 0,95 | 0,26 | 0,07 | 0,88 | 0,47 | 0,25 | 0,11 | 0,03 | 0,01 | 0,73 | 0,31 |
| 21 | 168,30 | 24,72 | 2,10 | 0,67 | 0,18 | 0,05 | 0,69 | 0,10 | 0,14 | 0,02 | n. b. | | n. b. | |
| 28 | 236,42 | 33,37 | 3,89 | 1,49 | 0,25 | 0,03 | 0,80 | 0,01 | 0,12 | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,79 | 0,27 |
| 35 | 174,55 | 86,04 | 5,31 | 2,24 | 0,48 | 0,17 | 1,21 | 0,59 | 0,18 | 0,05 | n. b. | | n. b. | |
| 42 | n. b. | | 0,81 | | 0,11 | | 0,13 | | u. N. | | n. b. | | n. b. | |

G 2 Kinetische Parameter und Tropinonreduktase-Aktivitätswerte

Tab. G- 4: a) pH-Optimum; Relative Aktivität der *Sd*-TRII: C-*Sd*-TRII = *Sd*-TRII mit C-terminalem His-Tag, Werte stammen aus einer 3fach Bestimmung; N-*Sd*-TRII = *Sd*-TRII mit N-terminalem His-Tag, Werte stammen aus einer 4fach Bestimmung. b) Molare katalytische Aktivität in Kkat der *Sd*-TRII: C-*Sd*-TRII = *Sd*-TRII mit C-terminalem His-Tag; N-*Sd*-TRII = *Sd*-TRII mit N-terminalem His-Tag, Werte stammen aus einer 4fach Bestimmung. c) Relative Aktivitäten nach Zusatz der 27 Substanzen in verschiedenen Konzentrationen, bezogen auf den Umsatz mit Tropinon; Werten stammen aus 3-6fach Bestimmungen.; k. A.= keine Aktivität, n. b. = nicht bestimmt

| PH | relative Aktivität der Reduktion in % | | | | | |
|------|---------------------------------------|---------|--------------------|---------|----------|---------|
| | C- <i>Sd</i> -TRII | | N- <i>Sd</i> -TRII | | | |
| | Tropinon | rel. Sd | Nortropinon | rel. Sd | Tropinon | rel. Sd |
| 4,0 | | | 18,38 | 2,74 | 33,11 | 2,54 |
| 4,5 | 28,52 | 1,38 | 78,13 | 4,42 | 90,99 | 1,96 |
| 5,0 | 69,34 | 1,21 | 95,37 | 4,38 | 100,00 | 2,95 |
| 5,5 | 100,00 | 2,65 | 100,00 | 2,67 | 89,22 | 1,98 |
| 6,0 | 86,22 | 3,40 | 95,90 | 11,79 | 73,98 | 4,09 |
| 6,5 | 64,73 | 3,26 | 85,06 | 4,64 | 55,66 | 2,38 |
| 7,0 | 33,12 | 2,15 | 71,26 | 4,55 | 50,08 | 2,82 |
| 7,5 | 21,17 | 0,93 | 72,34 | 3,38 | 46,58 | 1,29 |
| 8,0 | 13,60 | 0,52 | 73,11 | 2,87 | 48,21 | 2,26 |
| 8,5 | 9,47 | 0,67 | 71,83 | 1,51 | 48,32 | 0,69 |
| 9,0 | | | 69,99 | 3,08 | 35,33 | 3,39 |
| 9,5 | | | 65,66 | 4,52 | 32,53 | 2,17 |
| 10,0 | | | | | 22,54 | 2,64 |

a

| Substrate | Molare katalytische Aktivität in Kkat | | | |
|--------------------------|---------------------------------------|------|--------------------|------|
| | C- <i>Sd</i> -TRII | | N- <i>Sd</i> -TRII | |
| | MW | Sd | MW | Sd |
| 3-Methylcyclohexanon | 0,65 | 0,03 | 4,67 | 0,47 |
| 4-Methylcyclohexanon | 0,55 | 0,05 | 5,25 | 0,23 |
| Tetrahydrothiopyran-4-on | 4,76 | 0,14 | 45,67 | 2,25 |
| N-Methylpiperidin-4-on | 3,93 | 0,24 | 34,55 | 0,53 |
| N-Propylpiperidin-4-on | 5,74 | 0,13 | 35,56 | 0,80 |
| Nortropinon | 3,16 | 0,04 | 13,71 | 0,23 |
| Tropinon | 3,17 | 0,05 | 14,44 | 0,44 |

b

| Substanz Nnummer | relative Aktivität in % | | | |
|------------------|---------------------------------|---------|--------|---------|
| | Substanzkonzentration im Assay: | | | |
| | 2,5 mM | | 0,5 mM | |
| | MW | rel. Sd | MW | rel. Sd |
| 1 | k. A. | | 60,06 | 2,06 |
| 2 | k. A. | | 0,00 | 0,00 |
| 3 | k. A. | | 46,61 | 1,65 |
| 4 | k. A. | | 0,00 | 0,00 |
| 5 | k. A. | | 96,87 | 12,13 |
| 6 | 4,13 | 1,21 | 60,67 | 3,20 |
| 7 | 15,28 | 1,35 | 50,29 | 1,50 |
| 8 | 17,33 | 4,59 | 45,18 | 0,71 |
| 9 | 30,73 | 0,86 | 73,18 | 1,29 |
| 10 | 60,69 | 3,56 | 79,15 | 9,89 |
| 11 | 68,44 | 5,97 | 87,78 | 12,21 |
| 12 | 76,35 | 3,43 | 81,80 | 2,91 |
| 13 | 77,07 | 30,44 | 77,61 | 6,24 |
| 14 | 77,59 | 4,32 | n. b. | |
| 15 | 78,67 | 10,23 | n. b. | |
| 16 | 79,29 | 2,05 | n. b. | |
| 17 | 82,88 | 6,46 | n. b. | |
| 18 | 83,06 | 9,84 | n. b. | |
| 19 | 85,91 | 5,40 | n. b. | |
| 20 | 86,35 | 6,28 | n. b. | |
| 21 | 95,73 | 4,13 | n. b. | |
| 22 | 96,49 | 8,85 | n. b. | |
| 23 | 97,15 | 7,42 | n. b. | |
| 24 | 97,16 | 4,21 | n. b. | |
| 25 | 97,42 | 13,57 | n. b. | |
| 26 | 101,48 | 10,34 | n. b. | |
| 27 | 102,01 | 6,70 | n. b. | |

c

Tab. G- 5: Tropinonreduktase-Aktivität bestimmt aus *S. nigrum*. Werte stammen aus einer 3-4fach Bestimmung.

| <i>Solanum nigrum</i> | Aktivität in nkat/g Protein | | | |
|-----------------------|-----------------------------|--------|-----------|--------|
| | gedüngt | | ungedüngt | |
| Gewebe | MW | Sd | MW | Sd |
| junge Blätter | 144,09 | 14,67 | 221,23 | 116,10 |
| alte Blätter | 225,55 | 53,13 | 187,95 | 55,67 |
| reife Beeren | k. A. | | k. A. | |
| unreife Beeren | 20,22 | 18,26 | 33,84 | 30,27 |
| Stängel | 1221,15 | 203,27 | 321,37 | 180,32 |
| Wurzel | k. A. | | k. A. | |

Tab. G- 6: Werte der Bestimmung der Km-Werte für verschiedene Substratanaloga mit C-Sd-TRII und N-Sd-TRII.

| Substrat | C-Sd-TRII | | | | N-Sd-TRII | | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------|--------|--------|-----------|---------|---------|---------|---------|
| | Konz | nKat/mg | | | Konz | nKat/mg | | | |
| Tropinon | 0,02 | 6,30 | 6,61 | 6,74 | 0,01 | 101,21 | 66,64 | 100,77 | 68,69 |
| | 0,04 | 18,30 | 15,84 | 15,16 | 0,02 | 197,68 | 218,13 | 224,00 | 229,98 |
| | 0,08 | 28,99 | 29,94 | 26,74 | 0,04 | 349,45 | 355,78 | 314,54 | 302,87 |
| | 0,12 | 42,55 | 37,82 | 42,32 | 0,08 | 374,12 | 408,43 | 367,30 | 364,61 |
| | 0,25 | 53,32 | 54,26 | 63,17 | 0,16 | 397,99 | 410,09 | 442,56 | 470,70 |
| | 0,5 | 70,32 | 81,07 | 75,84 | 0,25 | 437,45 | 438,13 | 511,24 | 496,50 |
| | 1 | 83,41 | 83,01 | 84,81 | 2,5 | 432,32 | 485,84 | 411,17 | 422,69 |
| | 2,5 | 101,16 | 97,54 | 110,62 | | | | | |
| Nortropinon | 0,04 | 4,82 | 4,68 | 4,54 | 0,02 | 68,05 | 70,39 | 73,87 | 61,95 |
| | 0,1 | 10,75 | 10,94 | 11,21 | 0,04 | 141,86 | 123,78 | 122,98 | 135,29 |
| | 0,25 | 24,08 | 25,52 | 29,94 | 0,08 | 216,57 | 208,73 | 220,18 | 216,68 |
| | 0,5 | 38,48 | 39,97 | 41,91 | 0,16 | 261,40 | 273,35 | 266,75 | 268,22 |
| | 1 | 57,68 | 58,85 | 61,64 | 0,25 | 343,81 | 308,77 | 344,29 | 353,76 |
| | 2,5 | 81,66 | 82,25 | 79,83 | 0,6 | 385,69 | 405,11 | 467,81 | 421,93 |
| | 5 | 87,32 | 93,63 | 93,77 | 1,2 | 442,07 | 410,87 | 419,06 | 433,13 |
| | 10 | 101,40 | 93,02 | 92,63 | 2,5 | 442,07 | 410,87 | 419,06 | 433,13 |
| N-Propyl-piperidin-4-on | 0,06 | 20,48 | 23,29 | 19,30 | 0,06 | 232,52 | 271,48 | 200,13 | 264,82 |
| | 0,12 | 39,83 | 31,96 | 40,48 | 0,12 | 495,89 | 391,68 | 389,86 | 356,52 |
| | 0,25 | 62,44 | 68,63 | 69,67 | 0,25 | 706,32 | 617,38 | 650,25 | 619,97 |
| | 0,5 | 87,73 | 89,80 | 99,39 | 0,5 | 783,48 | 741,65 | 814,85 | 781,51 |
| | 1 | 129,26 | 103,57 | 117,95 | 1 | 865,68 | 898,44 | 922,23 | 772,63 |
| | 2,5 | 158,89 | 164,97 | 170,71 | 2,5 | 1169,75 | 1162,24 | 1160,60 | 1068,09 |
| | 5 | 164,44 | 158,44 | 183,68 | 5 | 1112,01 | 1173,58 | 1228,59 | 1121,71 |
| | 8 | 177,62 | 186,06 | 197,28 | | | | | |
| N-Methyl-piperidin-4-on | 0,12 | 9,12 | 11,61 | 10,82 | 0,06 | 61,86 | 80,91 | 82,68 | 83,27 |
| | 0,25 | 18,85 | 19,17 | 25,24 | 0,12 | 119,22 | 141,70 | 143,59 | 132,78 |
| | 0,5 | 26,00 | 22,62 | 36,16 | 0,25 | 243,89 | 224,29 | 193,27 | 220,74 |
| | 1 | 48,35 | 49,09 | 58,68 | 0,5 | 386,35 | 380,78 | 414,54 | 356,22 |
| | 2,5 | 65,52 | 67,41 | 67,64 | 1 | 537,00 | 577,13 | 616,31 | 565,73 |
| | 5 | 103,28 | 84,15 | 106,53 | 2,5 | 816,59 | 782,80 | 855,67 | 806,86 |
| | 8 | 94,79 | 121,97 | 117,74 | 5 | 954,07 | 1001,84 | 959,99 | 971,59 |
| | Tetrahydro-thiopyran-4-on | 0,5 | 21,59 | 22,27 | 18,62 | 0,5 | 78,70 | 77,91 | 93,13 |
| 1,0 | | 32,70 | 35,84 | 39,55 | 1 | 153,33 | 194,63 | 159,34 | 179,30 |
| 2,0 | | 50,09 | 52,95 | 54,47 | 2 | 306,92 | 280,87 | 278,60 | 324,88 |
| 5,0 | | 84,98 | 97,90 | 94,75 | 5 | 549,99 | 522,60 | 545,89 | 551,39 |
| 7,0 | | 92,72 | 104,47 | 104,72 | 7 | 761,54 | 660,83 | 694,45 | 666,33 |
| 14,0 | | 133,76 | 125,19 | 115,09 | 14 | 781,80 | 988,71 | 744,66 | 844,64 |
| 25,0 | | 145,55 | 147,85 | 130,61 | 25 | 1174,55 | 1224,04 | 1153,14 | 1153,14 |
| 4-Methyl-cyclohexanon | | 1 | 3,34 | 2,88 | 2,56 | 2 | 35,11 | 40,92 | 37,42 |
| | 2,5 | 3,76 | 5,41 | 4,74 | 4 | 64,14 | 57,96 | 57,97 | 53,18 |
| | 5 | 6,82 | 7,32 | 8,60 | 6 | 64,64 | 83,53 | 79,66 | 77,31 |
| | 7 | 8,81 | 8,68 | 9,29 | 8 | 95,41 | 83,83 | 97,70 | 92,41 |
| | 10 | 9,94 | 10,56 | 12,47 | 10 | 112,75 | 111,22 | 115,50 | 103,11 |
| | 15 | 11,30 | 17,00 | 12,20 | 14 | 120,47 | 129,41 | 113,20 | 118,28 |
| | 25 | 12,89 | 12,66 | 16,41 | 20 | 111,87 | 107,27 | 136,18 | 122,38 |
| | | | | | 30 | 107,28 | 111,63 | 149,04 | 126,71 |
| 3-Methyl-cyclohexanon | 10 | 20,88 | 23,21 | 22,01 | 2 | 32,32 | 32,27 | 36,63 | 36,46 |
| | | | | | 4 | 54,13 | 66,71 | 51,95 | 56,16 |
| | | | | | 6 | 68,23 | 75,47 | 72,07 | 91,80 |
| | | | | | 8 | 81,80 | 79,42 | 75,29 | 89,38 |
| | | | | | 10 | 112,45 | 94,34 | 88,57 | 91,92 |
| | | | | | 14 | 108,46 | 108,52 | 124,26 | 105,55 |

G 3 Vektorkarten

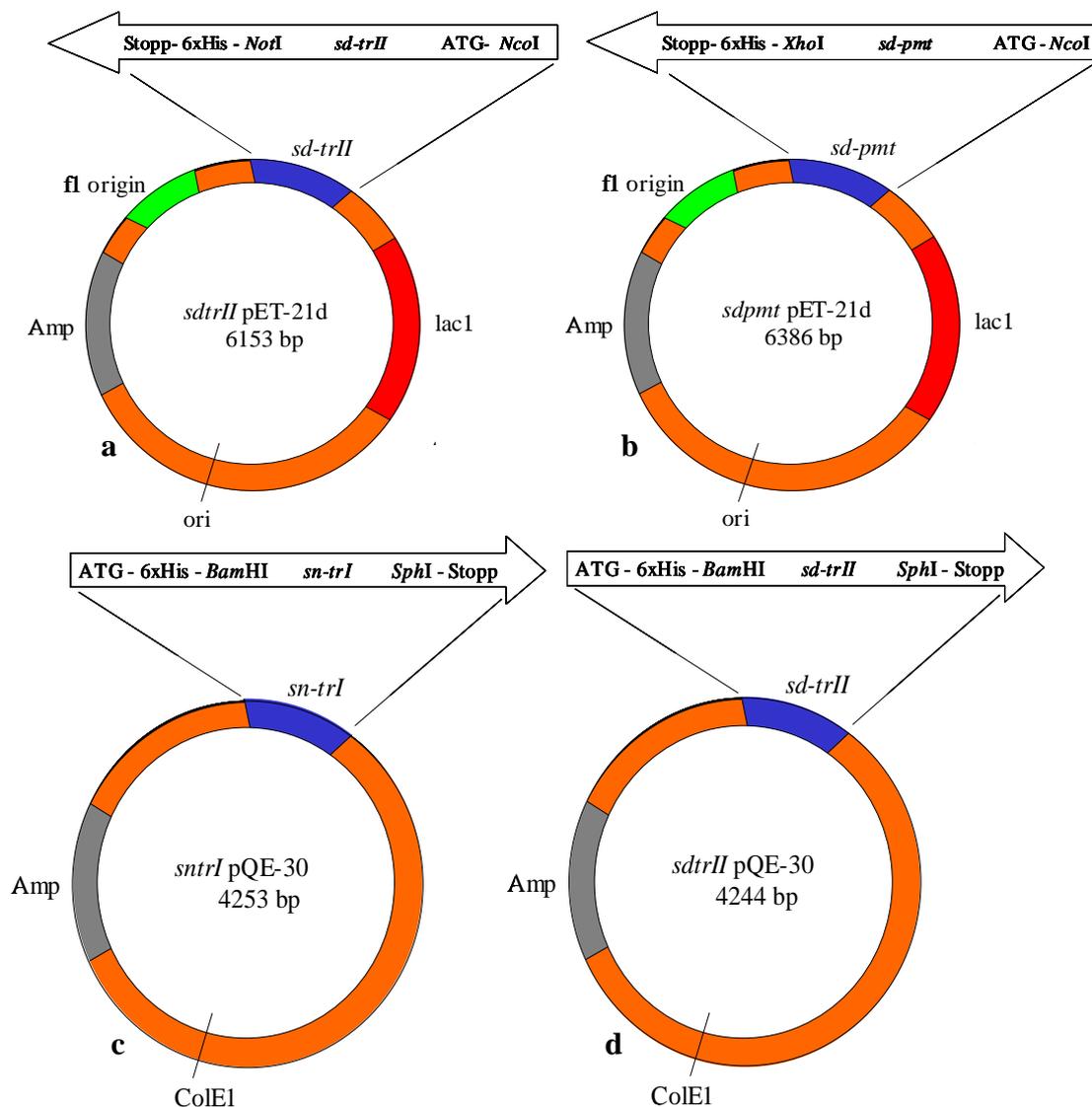


Abb. G- 1: a) *sd-trII* in pET-21d (Novagen), cDNA wurde so mit Schnittstellen *NcoI/NotI* in den Vektor eingefügt, dass der C-terminale His-Tag genutzt wird. b) *sd-pmt* in pET-21d (Novagen), cDNA wurde so mit Schnittstellen *NcoI/XhoI* in den Vektor eingefügt, dass der C-terminale His-Tag genutzt wird. c) *sn-trI* in pQE-30 (Qiagen), cDNA wurde so mit Schnittstellen *BamHI/SphI* in den Vektor eingefügt, dass der N-terminale His-Tag genutzt wird. d) *sd-trII* in pQE-30 (Qiagen), cDNA wurde so mit Schnittstellen *BamHI/SphI* in den Vektor eingefügt, dass der N-terminale His-Tag genutzt wird.

G 4 cDNA-Sequenzen aus *S. dulcamara* und *S. nigrum*

atggcagcaggaaggtggaatctggaaggctgcactgcccttgttactggtggttctcga
M A A G R W N L E G C T A L V T G G S R
ggcatcgggtatggaattgtagaggaactagcaggtcttggtgcatcagtttatacatgt
G I G Y G I V E E L A S L G A S V Y T C
tcacgtaatacaaaaagagcttaaatgaatgtttgagtcaatggagaagtaaagggttttaa
S R N Q K E L N E C L S Q W R S K G F K
gttgaagcttctgtttgatttatcatcaagatctgaaagagaagagtttatcaagact
V E A S V C D L S S R S E R E E F I K T
gttgtaatacattttgatggaaaactcaatattttggtaataatgctggtattgtcata
V A N H F D G K L N I L V N N A G I V I
tacaaggaagctaaagattacactatggaagattattctctgattatgagcattaacttt
Y K E A K D Y T M E D Y S L I M S I N F
gaggctgcttaccatttatctgtacttgcacaccctttttgaaagcatcagaaagggga
E A A Y H L S V L A H P F L K A S E R G
aatggtgtctttatctctatctttctggggctgcagcactaccatagaggctgtttat
N V V F I S S I S G A A A L P Y E A V Y
ggagcaacaaaaggagcaatggatcaactcgcaagatgcttggcgtttgagtgggcaaag
G A T K G A M D Q L A R C L A F E W A K
gacaacatcgtgtcaatgggtgtgcaccgggggttattgcatcttctatggtcgaaatg
D N I R N V N G V A P G V I A S S M V E M
actattcaagatccagaaacaaaagaaaacttggacaagctaattgatagatgtgctctc
T I Q D P E Q K E N L D K L I D R C A L
cacagaatgggagagcctaaagaacttgcagcagtggttgcattcctctgtttccctgct
H R M G E P K E L A A V V A F L C F P A
gcttcatatgtcactggcctaaattatataatggtgatggcggatttatggctaattggtggc
A S Y V T G Q I I Y V D G G F M A N G G
ttctaa 786
F -

**Abb. G- 2: *sdrII* cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz,
Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Nummer AM947940 eingetragen.**

atggcaggattgagagaaaaatggagctctcaaaggcaccactgcccttgctcactggtggc
M A G L R E K W S L K G T T A L V T G G
tccaaaggcataggggtatgctatagtggaagaattggcaaatgggagcaagagtatat
S K G I G Y A I V E E L A N F G A R V Y
acatggtcccgtaatgaaaaagaacttcaagaatgccttgaaatgggagaaaaaatgga
T C S R N E K E L Q E C L E I W R K N G
cttaaagttgaaggttctggttgacttattatcacacactgaacgtgaaaagccttatg
L K V E G S V C D L L S H T E R E K L M
aagaatgttacaatgtattttgatggaaagcttaataattctggtgaataatgcaggggtg
K N V T N V F D G K L N I L V N N A G V
gcatatacataaggatgctaaagatttcacaaaagaagattatgacataaattatgggaact
A I H K D A K D F T K E D Y D I I M G T
aatggagctgcttatcatttatctcaaattgcttatcctttattgaaggcttctcaa
N F E A A Y H L S Q I A Y P L L K A S Q
aatggaaatattatgttttcttattgctggattttcagcattgccctctctttct
N G N I I F V S S I A G F S A L P S L S
ctttattctgcttccaaaggtgctataaatcaaatgacaaagagcttggcatgtgaatgg
L Y S A S K G A I N Q M T K S L A C E W
gccaaagacaacattcgggtcaattcagttgctccagcagtcattttaaccccactcgtt
A K D N I R V N S V A P A V I L T P L V
gaaactgcaatgaaaaatcctcaacaaaaagaagaaataaacagttttattttcaagact
E T A M K N P Q Q K E E I N S F I F K T
cctatgggcccagccggaagcccgaagaagtctctgcagtaaatagcttttctttgcttc
P M G R A G K P E E V S A V I A F L C F
cctgctgcttcttattacgggccaatcatatgggcccgatggtggattcacagcta
P A A S Y I T G Q I I W A D G G F T A N
ggtgatttttaa-792
G A F -

Abb. G- 3: Putative *sdrI* cDNA mit korrespondierender Aminosäuresequenz

atggcagaattgagagaaaaatggagctctcaaaggcaccacagcccttgtcactgggtggc
M A E L R E K W S L K G T T A L V T G G
tccaaaggcatagggtatgctatagtggaagaattagcaaattttggagcaagagtatat
S K G I G Y A I V E E L A N F G A R V Y
acatgttcacgtaatgaaaaatgaacttcaagaatgcttagaaaatttggagaaaaaatgga
T C S R N E N E L Q E C L E I W R K N G
cttaaagttgaaggttctgtttgtgatttattatcacacactgaacgtgaaaagcttatg
L K V E G S V C D L L S H T E R E K L M
aagaatgttacaaatgtatttgatggaaagcttaaatattctgggtgaataatgcaggggtt
K N V T N V F D G K L N I L V N N A G V
gtgatacataaggatgctaaagattttacaaaagaagattacaatataattatgggaatt
V I H K D A K D F T K E D Y N I I M G I
aattttgaagctgcttatcatttatctcaaattgcttatcctttattgaaggcttctcaa
N F E A A Y H L S Q I A Y P L L K A S Q
aatggaaatattatTTTTCTTCTTCTattgctggattttcagcattgccttctgtttct
N G N I I F L S S I A G F S A L P S V S
ctttattctgcttccaaaggtgcaataaatcaattgacaaaagaacttggcatgtgaatgg
L Y S A S K G A I N Q L T K N L A C E W
gccaaagacaacattcgggtcaattcagttgctccagcagtcattttaacccactcatt
A K D N I R V N S V A P A V I L T P L I
gaaactgcaattaagaaaaatcctaacaacaaaagaagaatagatagttttggtgtcaag
E T A I K K N P K Q K E E I D S F V V K
actcctatgggcccgggcccgaagaagtctctgcaataatagcttttctttgc
T P M G R A G A G K P E E V S A I I A F L C
tttctgctgcttcttatattacggggccaaatcatatgggcccgatgggtgattcacagct
F P A A S Y I T G Q I I W A D G G F T A
aatgggtgattttaa-795
N G G F -

**Abb. G- 4: *sntrl*-cDNA aus *S. nigrum* mit korrespondierender Aminosäuresequenz,
Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Nummer AM947942 eingetragen.**

atggaagaattgagagaaaaatggagctctcaaaggcaccactgccccttgtcactgggtggc
M E E L R E K W S L K G T T A L V T G G
tccaaaggcatagggtatgctatagtggaagaattagcaaattttggagcaagagtatat
S K G I G Y A I V E E L A N F G A R V Y
acatgttcacgtaatgaaaaatgaacttcaagaatgcttagaaaatttggagaaaaaatgga
T C S R N E N E L Q E C L E I W R K N G
cttaaagttgaaggttgtgtttgtgatttattatcacatactgaacgtgaaaagcttatg
L K V E G C V C D L L S H T E R E K L M
aagaatgttacaaatgtatttgatggaaagcttaaatattctgggtgaataatgcaggctcg
K N V T N V F D G K L N I L V N N A G S
gtgatacataaggacgctaaagattttacaaaagaagattacaatataattatgggaatt
V I H K D A K D F T K E D Y N I I M G I
aattttgaagctgcttatcatttatctcaaattgcttatcctttattgaaggctcctcaa
N F E A A Y H L S Q I A Y P L L K A P Q
aatggaaatattatTTTTCTTCTTCTattgctggattttcagcattgccttctgtttct
N G N I I F L S S I A G F S A L P S V S
ctttattctgcttccaaaggtgcaataaatcaattgacaaaagaacttggcatgtgaatgg
L Y S A S K G A I N Q L T K N L A C E W
gccaaagacaacattcgggtcaattcagttgctccagcagtcattttaacccactcatt
A K D N I R V N S V A P A V I L T P L I
gaaactgcaattaagatacatcatgactatcttgattttattgagacattcatgaatctg
E T A I K I H H D Y L D F I E T F M N L
gaaaagtga-669
E K -

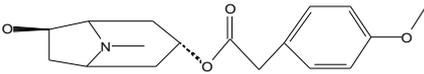
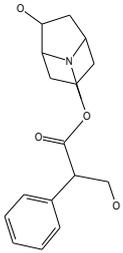
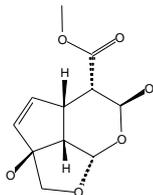
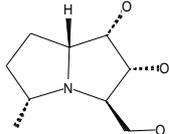
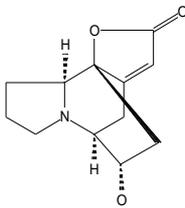
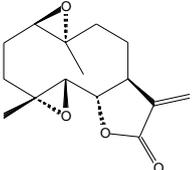
Abb. G- 5: Putative *sntrl* cDNA aus *S. nigrum* mit korrespondierender Aminosäuresequenz,

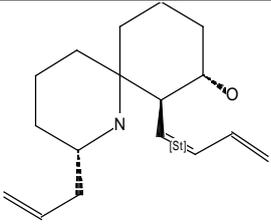
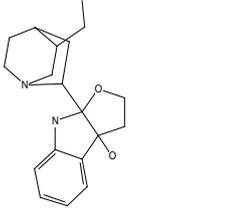
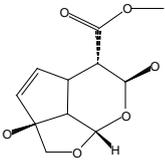
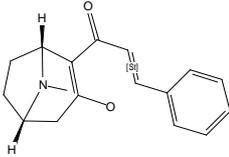
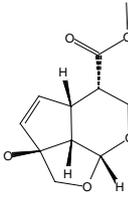
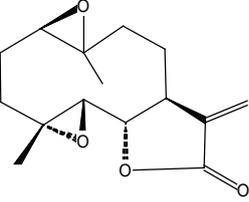
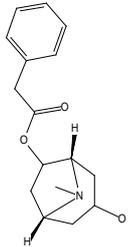
atggaagtcatatcctaatacacacaaatggctccgctcatcactatcaacggccaccatcac
M E V I S N H T N G S V I T I N G H H H
actaatggcaagtccgatcacccggaatggcgggtgttacagctcatgacaatggcaataag
T N G K S D H R N G G V T A H D N G N K
ctatcattggggagctacaactctattaagcccgggttggttttcagaatttagcgcgтта
L S L G S Y N S I K P G W F S E F S A L
tggccaggtgaagcattctcagtaaaaattgagaagttactatttcaaggaagtctgat
W P G E A F S V K I E K L L F Q G K S D
taccaagatgtcatgctctttgagtcagcaacttatggtaaagttcttacattgggatgga
Y Q D V M L F E S A T Y G K V L T L D G
gcaattcaacacacagaaaatgggtggattttcatatactgaaatgattgttcatctacca
A I Q H T E N G G F S Y T E M I V H L P
cttgggtccatcccaactccaaaaagggtgttgatcattgggtggaggaattgggtttaca
L G S I P T P K K V L I I G G G I G F T
ttatttgaagtactacgttattctaccatcgaaaaatagacatcgttgaaattgatgac
L F E V L R Y S T I E K I D I V E I D D
gtgggtgcgatgtgtctagaaaattttcccctacctcgcagctaattttaatgatcct
V V V D V S R K F F P Y L A A N F N D P
cgtgtaactctggttctcgacgatggagctgcatttgtaaaggcagcacaagcagggtat
R V T L V L D D G A A F V K A A Q A G Y
tatgatgctattatagtgactcctctgatcctattgggtccagcaaaagatttggttgaa
Y D A I I V D S S D P I G P A K D L F E
aggccattttttgaagcagtagccaaagctcttagaccaggaggagttgtatgtacccea
R P F F E A V A K A L R P G G V V C T Q
gcagaaagcatttggcttcatatgcatattattaacaaaatcattgctaattgtcgtcaa
A E S I W L H M H I I K Q I I A N C R Q
gttttcaagggttctgtcaactacgcttgactactgttccaacttatccaactgggtgta
V F K G S V N Y A W T T V P T Y P T G V
attggttacatgctttgctctactgaggggcccagaagttgacttcaagaatccaattaat
I G Y M L C S T E G P E V D F K N P I N
ccaattgacaaagattcaactcatgtcaagtcaaaataggaccactcaagttctacaac
P I D K D S T H V K S K L G P L K F Y N
tctgatattcataaagcagctttttatgttccatcttttgccagaagtttgattgagtct
S D I H K A A F I L P S F A R S L I E S
taa- 1023
-

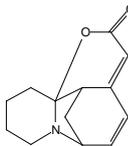
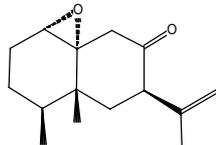
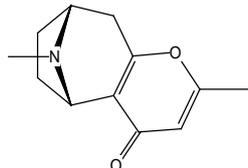
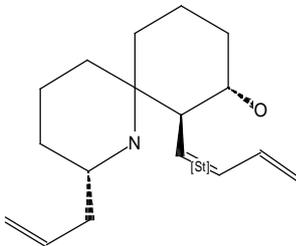
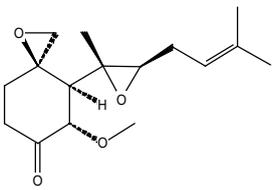
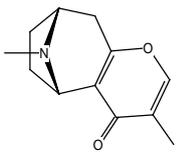
Abb. G- 6: *sd-pmt* cDNA aus *S. dulcamara* mit korrespondierender Aminosäuresequenz,
Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Nummer AM947941 eingetragen.

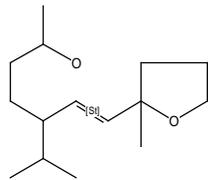
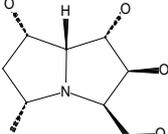
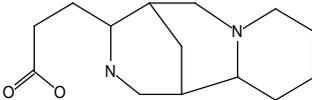
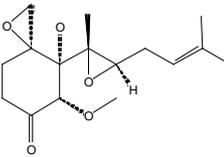
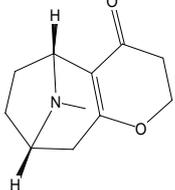
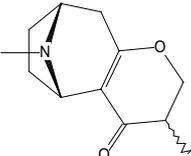
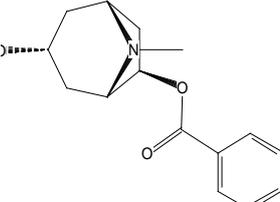
G 5 Substanzen aus der Ligandensuche

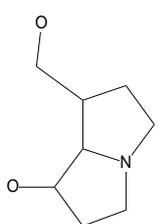
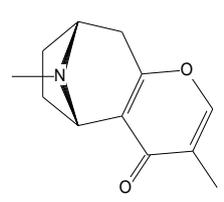
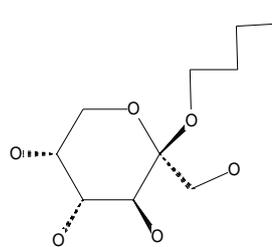
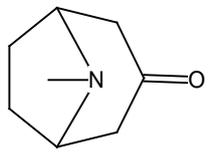
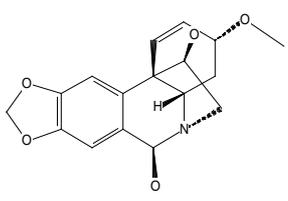
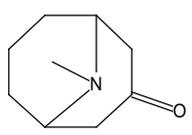
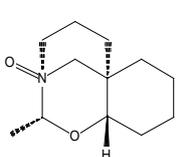
Tab. G- 7: Substanzen nach Ligandensuche in der Naturstoffdatenbank, B = Registriernummer aus Beilsteindatenbank, Summenformel und Molekulargewicht sind abgebildet.

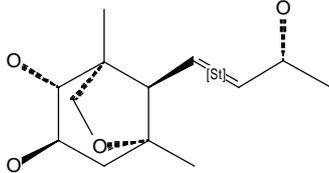
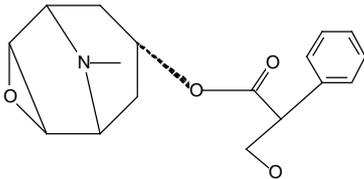
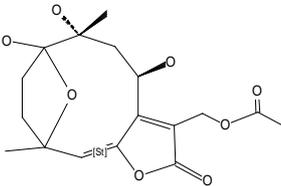
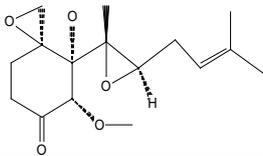
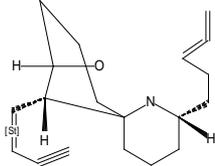
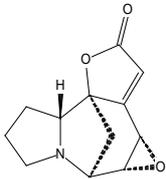
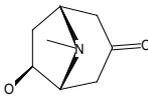
| Fit-ness | Name der Verbindung | Strukturformel | Summenformel Molekulargewicht in g/mol |
|----------|--|--|---|
| 60,40 | Physochlain (4-Methoxy-phenyl)-acetic acid 6-hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl ester |  | C17H23NO4 305.37 B:1484937 |
| 50,02 | 6-Hydroxyhyoscyamin 3-Hydroxy-2-phenyl-propionic acid 6-hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl ester |  | C17H23NO4 305.37 B:287259 |
| 48,90 | α -Gardiol 2a,6-Dihydroxy-2a,4a,5,6,7a,7b-hexahydro-2H-1,7-dioxacyclopenta[cd]inden-5-carboxylic acid methyl ester |  | C11H14O6 242.23 B:8267734 |
| 47,43 | Hyacinthacin A ₆ 3-Hydroxymethyl-5-methyl-hexahydro-pyrrolizin-1,2-diol |  | C9H17NO3 187.24 B:9419134 |
| 47,35 | Niruroidin |  | C12H15NO3 221.26 B:7482259 |
| 46,54 | Michelenolid |  | C15H20O4 264.32 B:8501321 |

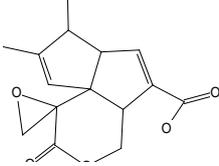
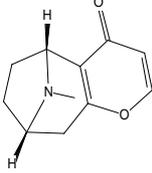
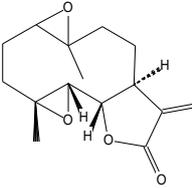
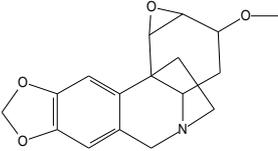
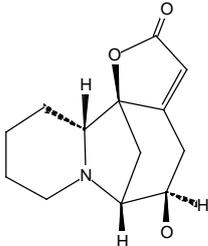
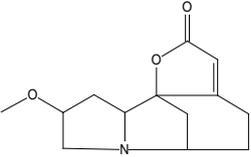
| | | | |
|-------|--|--|--------------------------------------|
| 46,54 | 2-Allyl-7-buta-1,3-dienyl-1-aza-spiro[5.5]undecan-8-ol |  | C17H27NO 261.41 B:4867111 |
| 45,19 | 8a-(5-Ethyl-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-2-yl)-2,3,8,8a-tetrahydro-furo[2,3-b]indol-3a-ol |  | C19H26N2O 2 314.43 B:323068 |
| 44,77 | <p>α-Gardiol</p> <p>2a,6-Dihydroxy-2a,4a,5,6,7a,7b-hexahydro-2H-1,7-dioxacyclopenta[cd]indene-5-carboxylic acid methyl ester</p> |  | C11H14O6 242.23 B:7000692 |
| 44,76 | <p>Chalcostrobamin</p> <p>1-(3-Hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-en-2-yl)-3-phenylpropenon</p> |  | C17H19NO2 269.34 B:6973582 |
| 44,59 | <p>Dunnisinin</p> <p>2a-Hydroxy-2a,4a,5,6,7a,7b-hexahydro-2H-1,7-dioxacyclopenta[cd]indene-5-carboxylic acid methyl ester</p> |  | C11H14O5 226.23 B:8555101 |
| 44,17 | <p>Michelenolid</p> <p>Bisoxireno[5,6:9,10]cyclodeca[1,2-b]furan-3(1bH)-on, decahydro-6a,9a-dimethyl-4-methylen-, [1aR(1aR*,1bS*,4aS*,6aR*,7aR*,9aR*)]</p> |  | C15H20O4 264.32 B:4261188 |
| 43,91 | <p>6-Phenylacetoxytropan-3-ol</p> <p>Phenyl-acetic acid 3-hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-6-yl ester</p> |  | C16H21NO3 275.35 B:6973177 |

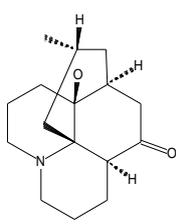
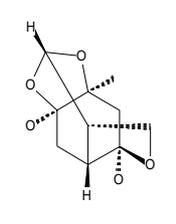
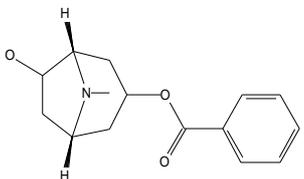
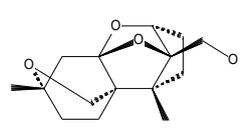
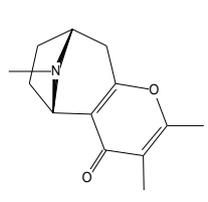
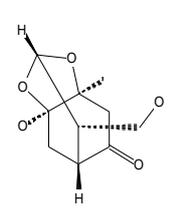
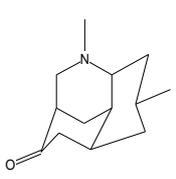
| | | | |
|-------|--|--|----------------------------------|
| 43,87 | Securinegin (4a,11a)-5,6,8,9,10,11-Hexahydro-4aH-4,6r-etheno-pyrano[2,3-i]indolizin-2-on |  | C13H15NO2 217.27 B:1118564 |
| 43,68 | 6,7-Epoxy-tropan-3-ol 9-Methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0 ^{2,4}]nonan-7-ol |  | C8H13NO2 155.20 B:606236 |
| 43,62 | 1 α ,10 α -Epoxyeremophil-7(11)-ene-8-on 6-Isopropenyl-4,4a-dimethyl-hexahydro-1-oxa-cyclopropa[d]naphthalen-7-on |  | C15H22O2 234.34 B:5940345 |
| 43,10 | (+)-Isobellendin (5S)-2,10-Dimethyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-5,8-epiazano-cyclohepta[b]pyran-4-on |  | C12H15NO2 205.26 B:4938298 |
| 42,37 | 2-Allyl-7-buta-1,3-dienyl-1-azaspiro[5.5]undecan-8-ol |  | C17H27NO 261.41 B:4867111 |
| 42,31 | 6-Oxo-6-deoxyfumagillol 5-Methoxy-4-[2-methyl-3-(3-methyl-but-2-enyl)-oxiranyl]-1-oxa-spiro[2.5]octan-6-on |  | C16H24O4 280.36 B:5439774 |
| 42,05 | (5S)-3,10-Dimethyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-5,8-epiazano-cyclohepta[b]pyran-4-on |  | C12H15NO2 205.26 B:4938268 |

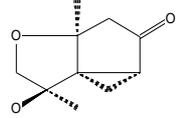
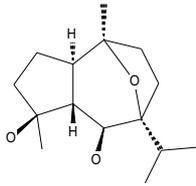
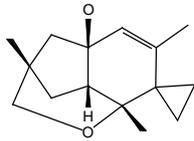
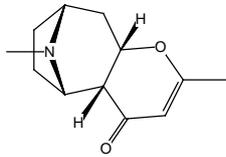
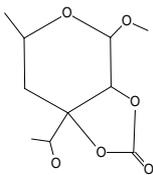
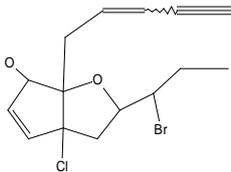
| | | | |
|-------|---|--|----------------------------------|
| 41,66 | 5-Isopropyl-7-(2-methyl-tetrahydro-furan-2-yl)-hept-6-en-2-ol |  | C15H28O2 240.38 B:1369640 |
| 41,35 | Hyacinthacin B ₆ 3-Hydroxymethyl-5-methyl-hexahydro-pyrrolizin-1,2,7-triol |  | C9H17NO4 203.24 B:9422036 |
| 41,02 | 3-(Decahydro-1,5-methano-pyrido[1,2-a][1,5]diazocin-4-yl)-propionic acid |  | C14H24N2O2 252.36 B:789078 |
| 40,80 | Graphinon 4-Hydroxy-5-methoxy-4-[2-methyl-3-(3-methyl-but-2-enyl)-oxiranyl]-1-oxa-spiro[2.5]octan-6-on |  | C16H24O5 296.36 B:1291996 |
| 40,56 | 9,10-Dihydrostrobilin 12-methyl-6-oxa-12-aza-tricyclo[7.2.1.0 ^{2,7}]dodec-2(7)-en-3-on |  | C11H15NO2 193.25 B:6968797 |
| 40,53 | 4,12-Dimethyl-6-oxa-12-aza-tricyclo[7.2.1.0 ^{2,7}]dodec-2(7)-en-3-on |  | C12H17NO2 207.27 B:4938108 |
| 40,32 | 6β-Benzoyloxytropan-3α-ol Benzoic acid 3-hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-6-yl ester |  | C15H19NO3 261.32 B:6600927 |

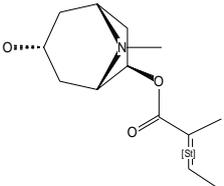
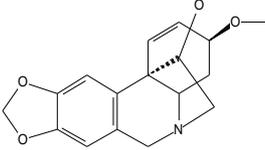
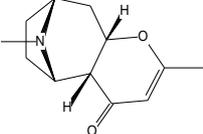
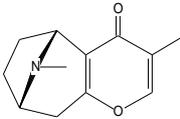
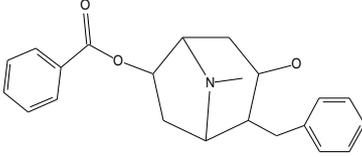
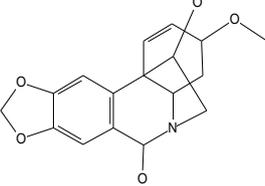
| | | | |
|-------|--|--|----------------------------------|
| 40,32 | 7-Hydroxymethyl-hexahydro-pyrrolizin-1-ol |  | C8H15NO2 157.21 B:107367 |
| 40,30 | (5S)-3,10-Dimethyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-5,8-epiazano-cyclohepta[b]pyran-4-on |  | C12H15NO2 205.26 B:4938268 |
| 40,06 | n-Butyl-β-D-fructopyranosid 2-Butoxy-2-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-3,4,5-triol |  | C10H20O6 236.26 B:1637520 |
| 39,74 | Tropinon 8-Methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-on |  | C8H13NO 139.20 B:2329 |
| 39,66 | 6-Hydroxy-crinamin Ent-(11S)-3β-methoxy-crin-1-en-6α,11-diol |  | C17H19NO5 317.34 B:5405055 |
| 39,64 | Pseudopellelerin 9-Methyl-9-aza-bicyclo[3.3.1]nonan-3-on |  | C9H15NO 153.22 B:3298 |
| 39,63 | Sibirinin 8-Methyl-7-oxa-9-aza-tricyclo[7.3.1.0 ^{1,6}]tridecane 9-oxid |  | C12H21NO2 211.30 B:5525579 |

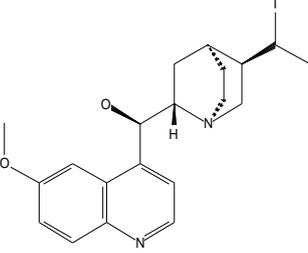
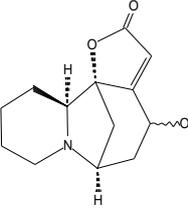
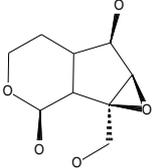
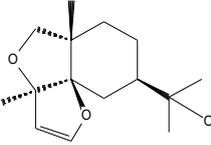
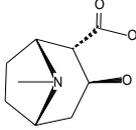
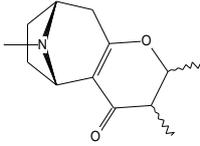
| | | | |
|-------|---|--|----------------------------------|
| 39,62 | Deglucosyl euphorbiosid A 8-(3-Hydroxy-but-1-enyl)-1,5-dimethyl-6-oxa-bicyclo[3.2.1]octan-2,3-diol |  | C13H22O4 242.31 B:9065863 |
| 39,47 | 3-Hydroxy-2-phenyl-propionic acid 9-methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0 ^{2,4}]non-7-yl ester |  | C17H21NO4 303.36 B:623090 |
| 39,45 | Piptocarphin D Acetic acid 8,10,11-trihydroxy-1,10-dimethyl-5-oxo-4,14-dioxatricyclo[9.2.1.0 ^{3,7}]tetradeca-2,6-dien-6-ylmethyl ester |  | C17H22O8 354.36 B:4576728 |
| 39,26 | Graphenon 4-Hydroxy-5-methoxy-4-[2-methyl-3-(3-methyl-but-2-enyl)-oxiranyl]-1-oxa-spiro[2.5]octan-6-on |  | C16H24O5 296.36 B:1588786 |
| 39,25 | 7-But-1-en-3-ynyl-2-penta-3,4-dienyl-1-aza-spiro[5.5]undecan-8-ol |  | C19H27NO 285.43 B:1478293 |
| 39,02 | 14,15-Epoxynorsecurinin |  | C12H13NO3 219.24 B:8492802 |
| 38,94 | 6Exo-hydroxy-tropan-3-on 6-Hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-on |  | C8H13NO2 155.20 B:81879 |

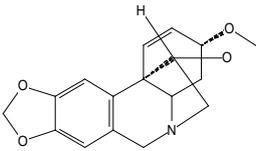
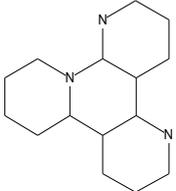
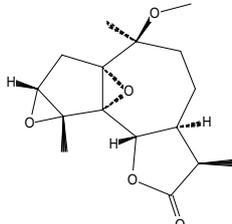
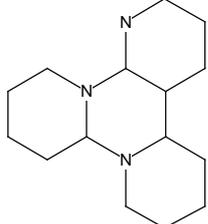
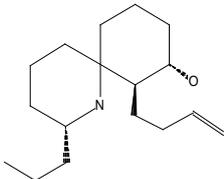
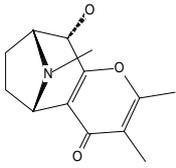
| | | | |
|-------|--|--|---|
| 38,62 | <p>Arenemycin E</p> <p>Spiro[oxiran-2,1'(2'H)-pentaleno[1,6a-c]pyran]-5'-carboxylic acid, 4',4'a,6'a,7'-tetrahydro-7',8'-dimethyl-2'-oxo-, (1'R,4'aR,6'aR,7'S,9'aS)- (9Cl)</p> |  | <p>C15H16O5</p> <p>276.29</p> <p>B:1689570</p> |
| 38,53 | <p>Strobilin</p> <p>12-Methyl-6-oxa-12-azatricyclo[7.2.1.0^{2,7}]dodeca-2(7),4-dien-3-on</p> |  | <p>C11H13NO2</p> <p>191.23</p> <p>B:6969150</p> |
| 38,46 | <p>Costunolid diepoxid</p> |  | <p>C15H20O4</p> <p>264.32</p> <p>B:6868796</p> |
| 38,29 | <p>Augustin</p> <p>Rel-1β,2β-epoxy-3α-methoxy-crinan</p> |  | <p>C17H19NO4</p> <p>301.34</p> <p>B:566654</p> |
| 38,11 | <p>Securinan-11-on</p> <p>Ent-15α-hydroxy-14,15-dihydro-(2α)-securinan-11-on</p> |  | <p>C13H17NO3</p> <p>235.28</p> <p>B:1080964</p> |
| 37,95 | <p>4-Methoxydihydronorsecurinin</p> <p>6,10b-Methano-10bH-furo[2,3-c]pyrrolo[1,2-a]azepin-2(4H)-on</p> |  | <p>C13H17NO3</p> <p>235.28</p> <p>B:4193481</p> |

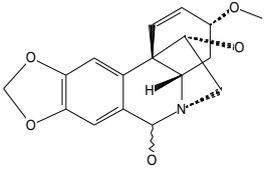
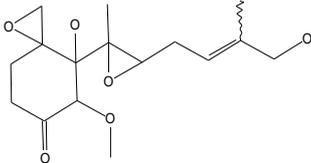
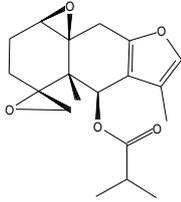
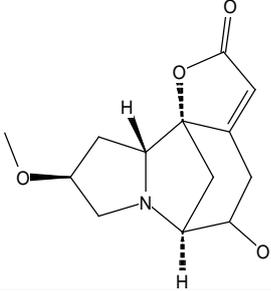
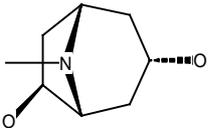
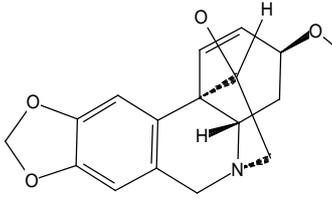
| | | | |
|-------|---|--|----------------------------------|
| 37,93 | (16R)-13-Hydroxy-16-methyl-lycopodan-5-on 6,10b-Methano-10bH-furo[2,3-c]pyrrolo[1,2-a]azepin-2(4H)-on |  | C16H25NO2 263.38 B:87171 |
| 37,76 | (+)-Paeonisuffral 6,2,5-(Epoxyethanylylidene)-1,3-benzodioxole-3a,6-diol, tetrahydro-7a-methyl-, (2S,3aR,5R,6R,7aS,10S)- (9CI) |  | C10H14O5 214.22 B:6138130 |
| 37,68 | 3-Benzoyloxytropan-6-ol Benzoic acid 6-hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl ester |  | C15H19NO3 261.32 B:6971295 |
| 37,67 | Sporol Trichothecan-13-ol, 9,15:11,12-diepoxy-, (9α,11β,12R)-(±)- (9CI) |  | C15H22O4 266.34 B:4682034 |
| 37,57 | Darlingin 4,5,12-Trimethyl-6-oxa-12-azatricyclo[7.2.1.0 ^{2,7}]dodeca-2(7),4-dien-3-on |  | C13H17NO2 219.28 B:4946578 |
| 37,56 | Paeonisuffral 8-Hydroxy-10-hydroxymethyl-3-methyl-2,9-dioxa-tricyclo[4.3.1.0 ^{3,8}]decan-5-on |  | C10H14O5 214.22 B:6142593 |
| 37,45 | Lucidulin 3,6-Dimethyl-3-azatricyclo[6.2.2.0 ^{4,9}]dodecan-11-on |  | C13H21NO 207.31 B:1528646 |

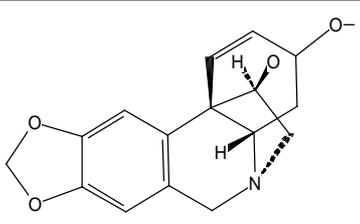
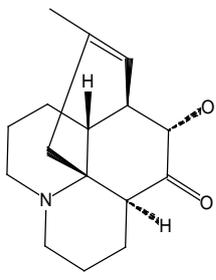
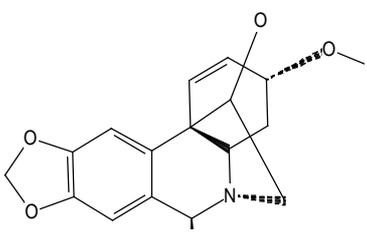
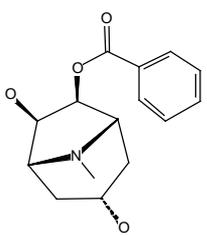
| | | | |
|-------|--|--|-------------------------------------|
| 37,26 | Paeonisothon 6-Hydroxy-3a,6-dimethyl-hexahydro-4-oxa-cyclopropa[c]pentalen-2-on |  | C10H14O3 182.22 B:6920143 |
| 37,05 | Orientalol E 8-Isopropyl-1,5-dimethyl-11-oxa-tricyclo[6.2.1.0 ^{2,6}]undecan-5,7-diol |  | C15H26O3 254.37 B:9713326 |
| 37,00 | Broderol Spiro[cyclopropan-1,8'(5'H)-[3,5]methano[2H-1]benzopyran]-5'-ol, 3',4',4'a,8'a-tetrahydro-3',7',8'a-trimethyl-, (3'α,4'aβ,5'β,8'aβ)-(-)- |  | C15H22O2 234.34 B:5535489 |
| 36,97 | 5,11-Dihydroisobellendin 5,12-Dimethyl-6-oxa-12-aza-tricyclo[7.2.1.0 ^{2,7}]dodec-4-en-3-on |  | C12H17NO2 207.27 B:4946524 |
| 36,96 | Methyl-aldgarosid B 7a-(1-Hydroxy-ethyl)-4-methoxy-6-methyl-tetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-2-on |  | C10H16O6 232.23 B:1315623 |
| 36,89 | Chondriol 2-(1-Bromo-propyl)-3a-chloro-6a-pent-2-en-4-ynyl-3,3a,6,6a-tetrahydro-2H-cyclopenta[b]furan-6-ol |  | C15H18BrClO2 345.66 B:1433780 |

| | | | |
|-------|--|--|---|
| 36,70 | <p>6β-Tigloyloxytropan-3α-ol</p> <p>2-Methyl-but-2-enoic acid 3-hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-6-yl ester</p> |  | <p>C13H21NO3</p> <p>239.31</p> <p>B:6598682</p> |
| 36,42 | <p>Hemanthamin</p> <p>Ent-(11S)-3α-methoxy-crin-1-en-11-ol</p> |  | <p>C17H19NO4</p> <p>301.34</p> <p>B:1088203</p> |
| 36,40 | <p>5,12-Dimethyl-6-oxa-12-azatricyclo[7.2.1.0^{2,7}]dodec-4-en-3-on</p> |  | <p>C12H17NO2</p> <p>207.27</p> <p>B:4946524</p> |
| 36,02 | <p>4,12-Dimethyl-6-oxa-12-azatricyclo[7.2.1.0^{2,7}]dodeca-2(7),4-dien-3-on</p> |  | <p>C12H15NO2</p> <p>205.26</p> <p>B:1214661</p> |
| 36,01 | <p>6-Benzoyloxy-2-benzyl-8-methylnortropan-3-ol</p> <p>Benzoic acid 2-benzyl-3-hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-6-yl ester</p> |  | <p>C22H25NO3</p> <p>351.44</p> <p>B:1547037</p> |
| 35,94 | <p>3-Epihaemanthidin</p> |  | <p>C17H19NO5</p> <p>317.34</p> <p>B:628191</p> |

| | | | |
|-------|--|--|--|
| 35,80 | [5-(1-Iodo-ethyl)-1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-2-yl]-(6-methoxy-quinolin-4-yl)-methanol |  | C20H25IN2O 2 452.33 B:6117791 |
| 35,77 | (2 α)-14 ξ -Hydroxy-14,15-dihydro-securinan-11-on |  | C13H17NO3 235.28 B:1080937 |
| 35,73 | 1a-Hydroxymethyl-octahydro-1,3-dioxacyclopropa[a]inden-2,6-diol |  | C9H14O5 202.21 B:8110982 |
| 35,58 | Phytuberol 2-(3a,5a-Dimethyl-5,5a,6,7,8,9-hexahydro-3aH-1,4-dioxacyclopenta[c]inden-8-yl)-propan-2-ol |  | C15H24O3 252.35 B:1247682 |
| 35,51 | (+)-Pseudoecgonin 3-Hydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]octan-2-carboxylic acid |  | C9H15NO3 185.22 B:83292 |
| 35,36 | (5S)-2 ξ ,3 ξ ,10-Trimethyl-2,3,6,7,8,9-hexahydro-5H-5r,8c-epiazano-cyclohepta[b]pyran-4-on |  | C13H19NO2 221.30 B:4946513 |

| | | | |
|-------|--|--|---|
| 35,25 | <p>Crinamin</p> <p>4,5,12-Trimethyl-6-oxa-12-aza-tricyclo[7.2.1.0^{2,7}]dodec-2(7)-en-3-on</p> |  | <p>C17H19NO4</p> <p>301.34</p> <p>B:626131</p> |
| 35,14 | <p>Hexadecahydro-1,5,12a-triaza-triphenylen</p> |  | <p>C15H27N3</p> <p>249.40</p> <p>B:7236</p> |
| 35,09 | <p>1α,5α;3α,4α-Bisepoxy-10β-methoxy-11αH-guaia-12,6α-olid</p> |  | <p>C16H22O5</p> <p>294.35</p> <p>B:5347668</p> |
| 35,01 | <p>Tetradecahydro-1,8a,12a-triaza-triphenylen</p> |  | <p>C15H27N3</p> <p>249.40</p> <p>B:102191</p> |
| 34,77 | <p>7-But-3-enyl-2-propyl-1-aza-spiro[5.5]undecan-8-ol</p> |  | <p>C17H31NO</p> <p>265.44</p> <p>B:4866476</p> |
| 34,76 | <p>10-Hydroxydarlingin</p> <p>8-Hydroxy-4,5,12-trimethyl-6-oxa-12-aza-tricyclo[7.2.1.0^{2,7}]dodeca-2(7),4-dien-3-on</p> |  | <p>C13H17NO3</p> <p>235.28</p> <p>B:8631059</p> |

| | | | |
|-------|--|--|---|
| 34,62 | <p>6-Hydroxy-crinamin</p> <p>Ent-(11S)-3β-methoxy-crin-1-en-6α,11-diol</p> |  | <p>C17H19NO5</p> <p>317.34</p> <p>B:5420674</p> |
| 34,58 | <p>12-Hydroxy-ovalicin</p> <p>4-Hydroxy-4-[3-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-2-methyl-oxiranyl]-5-methoxy-1-oxa-spiro[2.5]octan-6-on</p> |  | <p>C16H24O6</p> <p>312.36</p> <p>B:8335726</p> |
| 34,40 | <p>Spiro[oxirane-2,4'(4'aH)-[3H]oxireno[8,8a]naphtho[2,3-b]furan], propanoic acid deriv.</p> <p>Propanoic acid, 2-methyl-, 1'a,2',5',9'-tetrahydro-4'a,6'-dimethylspiro[oxiran-2,4'(4'aH)-[3H]oxireno[8,8a]naphtho[2,3-b]furan]-5'-yl ester, [1'aR-(1'aα,4'α,4'aβ,5'β,9'aS*)]- (9Cl)</p> |  | <p>C19H24O5</p> <p>332.40</p> <p>B:4762324</p> |
| 34,32 | <p>14-Hydroxy-4-methoxy-13,14-dihydronorsecurinin</p> |  | <p>C13H17NO4</p> <p>251.28</p> <p>B:6731640</p> |
| 34,31 | <p>(1S)-Tropan-3endo,6exo-diol</p> <p>8-Methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]octan-3,6-diol</p> |  | <p>C8H15NO2</p> <p>157.21</p> <p>B:80549</p> |
| 34,30 | <p>Hemanthamin</p> <p>Ent-(11S)-3α-methoxy-crin-1-en-11-ol</p> |  | <p>C17H19NO4</p> <p>301.34</p> <p>B:94062</p> |

| | | | |
|-------|---|---|----------------------------------|
| 34,23 | Crinamin Ent-(11S)-3-methoxy-crin-1-en-11-ol |  | C17H19NO4 301.34 B:4920761 |
| 34,21 | Lycoserramin-H |  | C16H23NO2 261.36 B:9575709 |
| 34,09 | 6-Hydroxycrinamin |  | C17H19NO5 317.34 B:7693949 |
| 33,99 | 6 β -Benzoyloxytropan-3 α ,7 β -diol Benzoic acid 3,7-dihydroxy-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-6-yl ester |  | C15H19NO4 277.32 B:6769880 |

Tab. G- 8: Substanzen nach Ligandensuche in der MOE-Datenbank

| Fitness | Substanzname | CAS-Nummer |
|---------|---|-------------|
| 70,4 | [3-(Cyclopentylamino)-1-methyl-3-oxopropylidene] hydrazid-2-thiophenessigsäure | 350495-38-4 |
| 57,45 | Thiocarbamidsäure- 2-[(6-Amino-1H-purin-8-yl)amino]-ethylester | 339197-92-1 |
| 55,73 | N-(3-Fluorophenyl)-N'-[3-(4-morpholinyl)propyl]-ethandiamid | 423729-77-5 |
| 53,4 | N-[3-(4-morpholinyl)propyl]-1H-Tetrazole-1-acetamid | 664977-66-6 |
| 52,74 | N- (5-Chloro-2-methoxybenzoyl)-N` -pentyguanidine-hydrochlorid | 373638-82-5 |
| 52,62 | 4-(Cyclohexylamino)-4-oxo-, (4-pyridinylmethylen)hydrazid-butansäure | 360770-04-3 |
| 51,66 | N-[[[2-(1-cyclohexen-1-yl)ethyl]amino]thioxomethyl]-3-(2-methoxyphenyl)-2-propenamid | 651013-24-0 |
| 51,32 | 3-(Hexahydro-1H-azepin-1-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon | 47001-66-1 |
| 50,53 | 2-Chloro-N-(4-hydroxybutyl)-5-nitro-benzamid | 337468-45-8 |
| 50,27 | 2-[[2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethyl]thio]-N-phenyl-acetamid | 431997-42-1 |
| 49,82 | 1-[(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-5-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-propanol | 1843-82-9 |
| 48,05 | 2-[[[2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-2-yl]carbonyl]amino]-benzoesäureethylester | 304888-65-1 |
| 47,36 | DL-N-(2-Bromo-3-methylbutyryl)-glycylglycin | 94107-40-1 |
| 46,53 | N-[1,1-dimethyl-2-[methyl(1-methyl-4-piperidinyl)amino]ethyl]-2-thiophenesulfonamid | 326879-02-1 |
| 46,34 | 1,2,3,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-2,6-dioxo-7H-purine-7-acetamid | 101099-99-4 |
| 45,32 | 2-Chloro-N-[2-(4-morpholinyl)-2-(2-thienyl)ethyl]-5-nitro-benzamid | 325745-07-1 |
| 44,68 | 4-(Cyclohexylamino)-4-oxo-, (1-naphthalenylmethylen)hydrazid-butansäure | 360770-06-5 |
| 44,61 | 3-Butyl-2-chloro-6-quinolincarboxylsäure | 305348-48-5 |
| 44,24 | N-[2-(Cyclohexylthio)ethyl]-4-methyl-3-nitro-benzamid | 446868-78-6 |
| 44,09 | 2-[[3-(4-Morpholinyl)propyl]amino]-5-nitro-benzonitril | 451459-94-2 |
| 42,81 | 5,7-Dibromo-N-[3-(dimethylamino)propyl]-2-benzofurancarboxamid | 326866-76-6 |
| 41,0 | 4-Methyl-3-nitro-benzensulfonsäure-(3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-ylidene)hydrazid | 380479-52-7 |
| 40,82 | 4-Methyl-3-nitro-benzensulfonsäure (4-propylcyclohexyliden) hydrazid | 386248-16-4 |
| 40,39 | N-(2-Chloroethyl)-4-cyclohexyl-benzensulfonamid | 385375-13-3 |
| 39,7 | N-[2-(1-cyclohexen-1-yl)ethyl]-2-(2,4-dibromo-6-methylphenoxy)acetamid | 445409-12-1 |
| 37,94 | 6-(Hydroxymethyl)-pentyldenhydrazid-3-Pyridincarboxylsäure | 318264-57-2 |
| 37,65 | N-Cycloheptyl-[[[4-methylphenyl)sulfonyl]amino]-benzenpropanamid | 318466-25-0 |
| 36,54 | 7-Methoxy-N,N-dimethyldipyrimido[4,5-b:5,4-f][1,4]thiazepin-4-amin | 140430-01-9 |
| 35,73 | 4-Methyl-3-nitro-, (3,3-dimethyl-5-oxocyclohexyliden)hydrazid-benzensulfonsäure | 386245-63-2 |
| 35,27 | 3-(1-Piperidinylsulfonyl)-(cyclohexylmethylen)hydrazidbenzoesäure | 392674-10-1 |
| 34,48 | 5-[(Ethyl dimethylsilyl)methyl]-6-hydroxy-2-[(2-oxo-2-phenylethyl)thio]-4(1H)-pyrimidinon | 440110-78-1 |
| 33,77 | α -Cyano-3-(3-methyl-1-piperidinyl)- 2-quinoxalinessigsäure-2-methoxyethylester | 489403-25-0 |
| 33,57 | 4-Methyl-1-piperazindithiocarbonsäure-2-[4-(aminocarbonyl)-1-piperidinyl]-2-oxoethylester | 524057-88-3 |

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie in der Abteilung Biogene Arzneistoffe angefertigt. Besonders bedanken möchte ich bei Frau Prof. Dräger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihre stetige fachliche und persönliche Unterstützung der Arbeit. Die kontinuierliche Diskussionsbereitschaft und der mir gegebene Freiraum in der Bearbeitung des Themas waren für die Arbeit sehr hilfreich.

Dr. habil. Wolfgang Brandt aus der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie (IPB, Halle) danke ich recht herzlich für die Einführung in die computerbasierten Methoden der Proteinmodellierung und des *in silico* Screening. Durch seine immer währende Diskussionsbereitschaft und vielen Anregungen machte die Arbeit sehr viel Freude. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Computerchemie für das gute Arbeitsklima, die Tipps und Hilfestellungen.

Für meinen Aufenthalt in Frankreich am Laboratoire de Phytotechnologie der Université de Picardie in Amiens danke ich Frau Prof. Dräger. Für die gute Zusammenarbeit vor Ort möchte ich mich bei Dr. Elke Aehle, Dr. Roland Molinié, Dr. Trixie Ann Bartholomeusz und Dr. François Mesnard bedanken. Dr. Elke Aehle danke ich in diesem Zusammenhang für die vielen gemeinsamen Erlebnisse mit denen sie mir Frankreich näher gebracht hat.

Eine schöne Zeit und viel Freude verdanke ich den Mitdoktoranden. Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biogene Arzneistoffe sowie bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Biologie möchte ich mich recht herzlich für die gute Zusammenarbeit, die Anregungen und Freude im Labor bedanken. Im technischen Bereich bedanke ich mich bei Frau Dorothea Watzka, Frau Beate Schöne, Frau Ursula Ködel, Frau Brigitte Marx und Frau Anja Wodak für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Für das Lektorat der Arbeit danke ich Dr. Yvonne Scholl und Stefan Biastoff recht herzlich.

Jana Böhme, Sandra Pröhl und Steffi Hermann danke ich sehr für die gelungene Zusammenarbeit im Rahmen von Diplomarbeiten.

Meinen Großeltern Ilse und Günter Meier möchte ich hiermit für die immer währende Unterstützung auf meinem Lebensweg danken. Besonders danke ich meiner Mutter Beate, die mir trotz ihrer schweren Krankheit das Studium ermöglichte und immer für mich da war. Ihr widme ich diese Arbeit.

Meinem Mann Sven danke ich für die anregenden Gespräche und die liebevollen Worte, die mich stets motiviert und aufgebaut haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Inhaltlich oder wörtlich entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde bisher keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle/Saale, 07.08.2008

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Anna-Carolin Freydank geb. Meier
Geburtsdatum: 02.12.1977
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg
Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Schulbildung:

1984-1991 Oberschule „Friedrich-Engels“ Lutherstadt Wittenberg
1991-1996 Gymnasium „Lucas-Cranach“ Lutherstadt Wittenberg
1996 Abitur

Studium/Praktika:

1996-2000 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
01/2001-06/2001 Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-Universität, Thema: Tropinonreduktasen in *Calystegia sepium*
09/2001-02/2002 Praktikum in der Richard-Wagner-Apotheke, Halle
05/2002 Approbation zur Apothekerin
seit 05/2002 Angestellte Apothekerin in der Richard-Wagner-Apotheke, Halle
11/2002-04/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-Universität in der Abteilung Biogene Arzneistoffe unter Leitung von Frau Prof. Dräger zur Erarbeitung einer Promotion
07/2005-12/2007 Gastwissenschaftlerin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie, Arbeitsthema: Strukturmodellierung und Dockinganalysen
10/2007-04/2008 Angestellte Apothekerin in der Apotheke Zur Rose, Halle
seit 04/2008 Elternzeit

Halle/Saale, 07.08.2008