

Modifikation des Nortropanalkaloid-Stoffwechsels in  
*Solanum tuberosum* L. durch Knockdown und Überexpression  
von Biosynthesegenen

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften**

**der Martin-Luther Universität  
Halle-Wittenberg**

vorgelegt von

Frau Diplom-Pharmazeutin

**Nadine Küster**

geboren am 19.10.1985 in Halle (Saale)

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Dierk Scheel
3. Prof. Dr. Uwe Sonnewald

Halle (Saale), 26.07.2016



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>XII</b>
<b>A 1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>A 1.1. <i>Solanum tuberosum</i> L. – wirtschaftliche Bedeutung, Genom und Sekundärmetaboliten</b> .....	<b>1</b>
<b>A 1.2. Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese</b> .....	<b>3</b>
A 1.2.1 Allgemeine Übersicht .....	3
A 1.2.2 Wichtige Enzyme der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese.....	8
A 1.2.3 Regulation der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese .....	9
A 1.2.4 Modifikation der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese .....	11
<b>A 1.3. Spezifische Eigenschaften der Tropinonreduktasen</b> .....	<b>13</b>
<b>A 1.4. Calystegine</b> .....	<b>17</b>
A 1.4.1 Struktur und Vorkommen .....	17
A 1.4.2 Eigenschaften und mögliche natürliche Funktion.....	18
<b>A 1.5. Ziele der Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>B 2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
<b>B 2.1 Material</b> .....	<b>23</b>
B 2.1.1 <i>Solanum tuberosum</i> L. ....	23
B 2.1.2 <i>Phytophthora infestans</i> .....	23
B 2.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	23
B 2.1.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
B 2.1.5 Chemikalien, Oligonukleotide, Enzyme und Kits.....	24
B 2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen .....	24
B 2.1.7 Datenbanken und Internetprogramme .....	27
<b>B 2.2 Kultivierung, Transformation und Selektion der Organismen</b> .....	<b>27</b>
B 2.2.1 Kultivierung von <i>P. infestans</i> .....	27
B 2.2.2 Kultivierung von <i>S. tuberosum</i> .....	27
B 2.2.3 <i>A. tumefaciens</i> -vermittelte, stabile Transformation von <i>S. tuberosum</i>	28
B 2.2.4 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	29
B 2.2.5 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen .....	29
<b>B 2.3 Phänotypische Untersuchungen der transgenen Pflanzen</b> .....	<b>30</b>

B 2.3.1	Pflanzenwachstum.....	30
B 2.3.2	Kartoffelknollen .....	30
B 2.3.3	Kartoffelkeime .....	30
<b>B 2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>31</b>
B 2.4.1	RNA-Isolation (Trizol-Methode) .....	31
B 2.4.2	DNase Verdau .....	31
B 2.4.3	cDNA Synthese .....	32
B 2.4.4	DNA-Isolation (für Southern-Blot) .....	32
B 2.4.5	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> Bakterien .....	32
B 2.4.6	Plasmidpräparation aus <i>A. tumefaciens</i> Bakterien .....	33
B 2.4.7	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33
B 2.4.8	Klonierungen.....	33
B 2.4.9	Restriktionsverdau von Vektoren .....	34
B 2.4.10	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Elektrophorese .....	34
B 2.4.11	PCR mit Plasmid-DNA, cDNA.....	34
B 2.4.12	Kolonie-PCR für <i>E. coli</i> .....	34
B 2.4.13	Kolonie-PCR für <i>A. tumefaciens</i> .....	35
B 2.4.14	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) zur Transkriptmengenquantifizierung .....	35
B 2.4.15	Southern-Blot.....	36
B 2.4.16	Northern-Blot .....	36
B 2.4.17	Southern- und Northern-Hybridisierungen .....	37
<b>B 2.5</b>	<b>Bioassays.....</b>	<b>38</b>
B 2.5.1	Infektion von Kartoffelblättern mit <i>P. infestans</i> und Biomassebestimmung durch q-PCR .....	38
B 2.5.2	Sporenkeimungsassay mit <i>P. infestans</i> und Calysteginen sowie Keimextrakten von <i>StTRII</i> RNAi Pflanzen .....	38
<b>B 2.6</b>	<b>Isolation und Analytik pflanzlicher Sekundärstoffe .....</b>	<b>39</b>
B 2.6.1	Fütterungsversuche mit Tropinon .....	39
B 2.6.2	Extraktion von Tropinon, Tropin und Pseudotropin .....	39
B 2.6.3	GC-MS Analyse von Tropinon, Tropin, Pseudotropin.....	39
B 2.6.4	Extraktion von Polyaminen .....	40
B 2.6.5	Dansylierung von Polyaminen .....	41
B 2.6.6	HPLC-Analyse von Polyaminen.....	41
B 2.6.7	Extraktion von Calysteginen .....	42
B 2.6.8	Silylierung von Calysteginen.....	43
B 2.6.9	GC-MS Analyse von Calysteginen .....	43

B 2.6.10 Extraktion von Jasmonaten .....	44
B 2.6.11 UPLC-MS/MS Analyse von Jasmonaten.....	44
B 2.6.12 Herstellung des Cucurbinsäure-Standards .....	45
<b>C 3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
<b>C 3.1 Expression der <i>DsPMT</i> in <i>S. tuberosum</i>.....</b>	<b>46</b>
C 3.1.1 Insertionsereignisse und Transkriptabundanz in <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien.....	46
C 3.1.2 Polyamin-Gehalt der <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien .....	47
C 3.1.3 Intermediate der Calysteginbiosynthese und Calystegine .....	50
C 3.1.4 Wachstum von <i>P. infestans</i> auf den <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien ..	52
<b>C 3.2 Modulierung der <i>StTRI</i>-Expression in <i>S. tuberosum</i>.....</b>	<b>53</b>
C 3.2.1 Herstellung und Charakterisierung der <i>StTRI</i> RNAi Linien und <i>StTRI</i> Überexpressionslinien.....	53
C 3.2.2 Tropinon-Fütterung an <i>StTRI</i> RNAi- und <i>StTRI</i> ÜE Linien.....	55
C 3.2.3 Calystegin-Gehalt der <i>StTRI</i> ÜE Linien.....	58
C 3.2.4 <i>StTRII</i> -Transkriptabundanz der <i>StTRI</i> RNAi Linien.....	59
C 3.2.5 Calystegin-Gehalt der <i>StTRI</i> RNAi Linien .....	60
C 3.2.6 <i>StPin2</i> -Transkriptabundanz in <i>StTRI</i> RNAi Linien nach Verwundung.	60
C 3.2.7 Quantifizierung von Jasmonaten in <i>StTRI</i> RNAi- und <i>StTRI</i> ÜE Linien .....	62
C 3.2.8 Methyljasmonat-Fütterung an <i>StTRI</i> ÜE Linien.....	65
<b>C 3.3 Reduktion der <i>StTRII</i>-Expression in <i>S. tuberosum</i>.....</b>	<b>66</b>
C 3.3.1 Herstellung und Charakterisierung der <i>StTRII</i> RNAi Linien .....	66
C 3.3.2 <i>StTRI</i> -Transkriptabundanz der <i>StTRII</i> RNAi Linien.....	67
C 3.3.3 Tropinon-Fütterung an <i>StTRII</i> RNAi Linien .....	68
C 3.3.4 Calystegin-Gehalt der <i>StTRII</i> RNAi Linien .....	69
<b>C 3.4 Sporenkeimungsassays mit <i>P. infestans</i> und Calystegin B<sub>2</sub> sowie       Extrakten aus <i>StTRII</i> RNAi Linien.....</b>	<b>71</b>
<b>C 3.5 Untersuchungen zum Phänotyp der transgenen Pflanzen .....</b>	<b>72</b>
C 3.5.1 Pflanzenwachstum.....	73
C 3.5.2 Kartoffelknollen .....	74
C 3.5.3 Kartoffelkeime .....	75
<b>C 3.6 Genomische Organisation der <i>StTRI</i>, <i>StTRII</i>, <i>StPMT</i> und <i>StSPDS</i>.....</b>	<b>78</b>
C 3.6.1 Genvarianten und Häufigkeiten.....	78
C 3.6.2 Genomische Strukturen .....	79
C 3.6.3 Proteinvergleiche .....	80
C 3.6.3.1 Tropinonreduktasen.....	81

C 3.6.3.2	Putrescin- <i>N</i> -methyltransferasen und Spermidinsynthesen.....	84
<b>D 4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>87</b>
<b>D 4.1</b>	<b><i>DsPMT</i> exprimierende Pflanzen .....</b>	<b>87</b>
D 4.1.1	Polyamine, Intermediate und Calystegine .....	87
D 4.1.2	<i>P. infestans</i> und <i>N</i> -Methylputrescin .....	91
<b>D 4.2</b>	<b><i>StTRI</i>- und <i>StTRII</i>-Modifikationen .....</b>	<b>92</b>
D 4.2.1	Einfluss der <i>StTRI</i> -Aktivität auf den Calystegin-Biosyntheseweg.....	92
D 4.2.2	Tropinon-Umsatz der <i>StTRI</i> und <i>StTRII</i> <i>in vivo</i> .....	94
D 4.2.3	Umsatz von Jasmonsäure .....	98
D 4.2.4	Pflanzen mit reduziertem Calystegin-Gehalt .....	101
D 4.2.5	Calystegine bei der Pathogenabwehr.....	103
<b>D 4.3</b>	<b>Genomische Organisation der Gene für Tropinonreduktasen, Putrescin-<i>N</i>-methyltransferasen und Spermidinsynthesen .....</b>	<b>106</b>
<b>E 5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>110</b>
<b>F 6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>113</b>
<b>F 6.1</b>	<b>Konstrukte, Primer und Sonden.....</b>	<b>113</b>
F 6.1.1	Konstrukte und transgene Linien .....	113
F 6.1.2	Primer für Konstrukte .....	113
F 6.1.3	Primer und Sonden für qRT-PCR .....	114
<b>F 6.2</b>	<b>Vektorenkarten.....</b>	<b>115</b>
F 6.2.1	pENTR™/D-Topo® .....	115
F 6.2.2	pCR®8/GW/Topo® .....	116
F 6.2.3	pHELLSGATE8.....	117
F 6.2.4	pGWB14 .....	118
<b>F 6.3</b>	<b>Sequenzen für RNAi-Konstrukte in pHELLSGATE8.....</b>	<b>119</b>
F 6.3.1	<i>StTRI</i> .....	119
F 6.3.2	<i>StTR</i> -homolog.....	119
F 6.3.3	<i>StTRII</i> .....	120
F 6.3.4	Nukleotid-Alignment der <i>StTRI</i> RNAi- und <i>StTRII</i> RNAi Fragmente..	120
<b>F 6.4</b>	<b>Sequenzen für (Über)expressions-Konstrukte in pGWB14.....</b>	<b>121</b>
F 6.4.1	<i>DsPMT</i> .....	121
F 6.4.2	<i>StTRI</i> , amplifiziert aus Knollen-cDNA .....	121
<b>F 6.5</b>	<b>Southern-Blots.....</b>	<b>122</b>
<b>F 6.6</b>	<b>Sequenzvergleiche und Phylogenetische Analysen.....</b>	<b>125</b>
F 6.6.1	Nukleotidvergleich von <i>TR</i> -, <i>PMT</i> - und <i>SPDS</i> -Sequenzen.....	125

F 6.6.2	Proteinsequenzen zur Erstellung phylogenetischer Bäume .....	126
<b>F 6.7</b>	<b>Chromatogramme und Massenspektren .....</b>	<b>127</b>
F 6.7.1	GC-MS Chromatogramme und Massenspektren Tropinon und Derivate .....	127
F 6.7.2	GC-MS Chromatogramme und Massenspektren TMS-Calystegine..	130
F 6.7.3	HPLC Chromatogramme Polyamine .....	133
F 6.7.4	UPLC-MS/MS Chromatogramme Cucurbinsäure.....	134
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>136</b>
<b>WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE .....</b>		<b>157</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>		<b>158</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>		<b>159</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>		<b>160</b>

## Abkürzungsverzeichnis

12-OH-JA	12-Hydroxyjasmonat
Abb.	Abbildung
<i>A. belladonna</i> , <i>Ab</i>	<i>Atropa belladonna</i>
ADC	Arginindecarboxylase
<i>A. thaliana</i> , <i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CA	engl. cucurbitic acid - Cucurbinsäure
ca.	circa
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
ct	engl. <i>threshold cycle</i>
cv.	engl. <i>cultivar</i>
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dcSAM	decarboxyliertes S-Adenosyl-L-methionin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
<i>D. stramonium</i> , <i>Ds</i>	<i>Datura stramonium</i>
<i>DsPMT Ex</i>	<i>DsPMT</i> exprimierende <i>S. tuberosum</i> Pflanzen
EC	engl. <i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	engl. <i>electron impact</i> - Elektronenstoßionisation
ESI	engl. <i>electrospray ionisation</i> - Elektronensprayionisation
et al.	lat. <i>und andere</i>
EV	Leervektor, <i>S. tuberosum</i> mit leerem Vektor transformiert
eV	Elektronenvolt
Exp.	Experiment
FM	Frischmasse
for	engl. <i>forward</i>
g (ng, µg, mg)	Gramm (Nano-, Mikro-, Milli-)
GC-MS	Gaschromatografie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde (n)
VI	



H6H	Hyoscyamin-6-hydroxylase
HMDS	Hexamethyldisiloxan
<i>H. niger, Hn</i>	<i>Hyoscyamus niger</i>
HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>
IPB	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin
kb	Kilobase (n)
$K_{cat}$	Katalytische Effizienz
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
konz.	konzentriert
l (µl, ml)	Liter (Mikro-, Milli-)
LB	Luria-Bertani-Medium
m (nm, µm, cm)	Meter (Nano-, Mikro-, Zenti-)
M (µM, mM)	Molar (Mikro-, Milli-); Molare Masse
MeJA	Methyljasmonat
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MLU	Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MPO	<i>N</i> -Methylputrescinoxidase
mRNA	engl. <i>messenger</i> RNA
MS	Murashige-Skoog Medium; Massenspektrometrie
m/V, m/z	Masse/Volumen, Masse/Ladungszahl
n	Anzahl
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
n.b.	nicht bestimmt
NMP	<i>N</i> -Methylputrescin
<i>N. tabacum, Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ODC	Ornithindecaboxylase
OPDA	12-Oxophytodiensäure
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PGSC	Potato Genome Sequencing Consortium
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMT	Putrescin- <i>N</i> -Methyltransferase
qRT-PCR	quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

## Abkürzungsverzeichnis

---

rev.	engl. <i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
ROX	5-Carboxyrhodamin-X
RT	Raumtemperatur
Rt	Retentionszeit
s	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDR	engl. <i>short-chain dehydrogenase/reductase</i> - kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	engl. <i>super optimal broth</i>
SOC	engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SPDS	Spermidinsynthase
SPE	engl. <i>solid phase extraction</i>
SPMS	Sperminsynthase
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
<i>S. tuberosum, St</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SWATH	engl. <i>sequential windowed acquisition of all theoretical MS</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBON	8-Thiabicyclo(3.2.1)octan-3-one
TIC	engl. <i>total ion current</i> - Totalionenstrom
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl-
TR	Tropinonreduktase
TRL	engl. <i>tropinone reductase-like</i> - Tropinonreduktase-ähnlich
TRI	Tropinonreduktase I
TRII	Tropinonreduktase II
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	engl. <i>unit(s)</i>
ÜE	Überexpression
UPLC	engl. <i>ultra performance liquid chromatography</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
YEB	engl. <i>yeast extract broth</i>
VIII	

## Abbildungsverzeichnis

Abb. A- 1: Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese.....	4
Abb. A- 2: Immunolokalisation der StTRI und StTRII in Wurzel und Stolon .....	9
Abb. A- 3: Reduktion von Jasmonsäure .....	16
Abb. C- 1: Nachweis der Integration des <i>DsPMT</i> -Expressionskonstrukts in das Genom von <i>S. tuberosum</i> .....	46
Abb. C- 2: <i>DsPMT</i> -Transkriptabundanz in verschiedenen Linien.....	47
Abb. C- 3: Polyamine in <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien (1. Exp.).....	49
Abb. C- 4: Polyamine in <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien (2. Exp.).....	50
Abb. C- 5: Gehalt von Tropin, Tropinon, Pseudotropin der <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien....	51
Abb. C- 6: Calystegin-Gehalt der <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien .....	51
Abb. C- 7: <i>P. infestans</i> Biomasse in <i>DsPMT</i> exprimierenden Linien.....	53
Abb. C- 8: <i>StTRI</i> -Transkriptabundanz in verschiedenen Linien .....	54
Abb. C- 9: <i>StTRI</i> -Transkriptabundanz in <i>StTRI</i> RNAi Linien .....	55
Abb. C- 10: Gehalt von Tropinon, Tropin, Pseudotropin in <i>StTRI</i> RNAi- und <i>StTRI</i> ÜE Linien nach Tropinon-Fütterung.....	58
Abb. C- 11: Calystegin-Gehalt der <i>StTRI</i> ÜE Linien.....	58
Abb. C- 12: <i>StTRII</i> -Transkriptabundanz in Keimen und Wurzeln von <i>StTRI</i> RNAi Linien.....	59
Abb. C- 13: Calystegin-Gehalt der <i>StTRI</i> RNAi Linien .....	60
Abb. C- 14: <i>StPin2</i> -Transkriptabundanz in <i>StTRI</i> RNAi Linien.....	61
Abb. C- 15: Gehalt von Jasmonaten in Blättern von <i>StTRI</i> RNAi- und <i>StTRI</i> ÜE Linien (1. Exp.).....	63
Abb. C- 16: Gehalt von Jasmonaten in Blättern von <i>StTRI</i> RNAi- und <i>StTRI</i> ÜE Linien (2. Exp.).....	64
Abb. C- 17: Gehalt von Jasmonsäure und Cucurbinsäure in <i>StTRI</i> ÜE Linien .....	65
Abb. C- 18: <i>StTRII</i> -Transkriptabundanz in Keimen und Wurzeln von <i>StTRII</i> RNAi Linien.....	67
Abb. C- 19: <i>StTRI</i> -Transkriptabundanz in Blättern und Wurzeln von <i>StTRII</i> RNAi Linien.....	68
Abb. C- 20: Gehalt von Tropin und Pseudotropin in <i>StTRII</i> RNAi Linien nach Tropinon- Fütterung.....	69
Abb. C- 21: Calystegin-Gehalt der <i>StTRII</i> RNAi Linien .....	70
Abb. C- 22: <i>P. infestans</i> Sporenkeimung nach verschiedenen Behandlungen .....	72
Abb. C- 23: Habitus der <i>StTRII</i> RNAi Pflanzen .....	74
Abb. C- 24: Knollenmasse der <i>StTRII</i> RNAi Linien .....	75
Abb. C- 25: Keimmasse der <i>StTRII</i> RNAi Linien .....	76
Abb. C- 26: Keimung von Kartoffelknollen der <i>StTRII</i> RNAi Linien .....	77
Abb. C- 27: Sequenzvergleich der TR-Proteinsequenzen (PGSC, 2011) mit StTRI und StTRII (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002).....	82

Abb. C- 28: Phylogenetischer Baum der TRs aus Solanaceae und TRLs aus <i>A. thaliana</i> ....	83
Abb. C- 29: Sequenzvergleich der PMT- und SPDS-Proteinsequenzen (PGSC, 2011) mit StPMT und StSPDS (Stenzel et al., 2006).....	85
Abb. C- 30: Phylogenetischer Baum der SPDSs und PMTs .....	86
Abb. F- 1: Vektorkarte pENTR™/D-Topo® (Invitrogen).....	115
Abb. F- 2: Vektorkarte pCR®8/GW/Topo® (Invitrogen).....	116
Abb. F- 3: Vektorkarte pHELLSGATE8 .....	117
Abb. F- 4: Rekombinationskassette pHELLSGATE8.....	117
Abb. F- 5: Vektorkarte pGWB14 .....	118
Abb. F- 6: Rekombinationskassette pGWB14 .....	118
Abb. F- 7: <i>StTRI</i> -Nukleotidsequenz (AJ307584, 795 bp, Kaiser et al., 2006) .....	119
Abb. F- 8: <i>StTR-homologe</i> Nukleotidsequenz (AJ400815, 795 bp, Keiner, 2001) .....	119
Abb. F- 9: <i>StTRII</i> -Nukleotidsequenz (AJ292343, 786 bp, Keiner et al., 2002) .....	120
Abb. F- 10: Nukleotid-Alignment der <i>StTRI</i> RNAi- und <i>StTRII</i> RNAi Fragmente .....	120
Abb. F- 11: <i>DsPMT</i> -Nukleotidsequenz (AJ583514, 1035 bp, Teuber et al., 2007) .....	121
Abb. F- 12: <i>StTRI</i> -Nukleotidsequenz, amplifiziert aus Knollen-cDNA (795 bp) .....	122
Abb. F- 13: <i>StTRI</i> -Aminosäuresequenz .....	122
Abb. F- 14: Southern-Blot <i>DsPMT</i> Ex .....	122
Abb. F- 15: Southern-Blots <i>StTRI</i> ÜE .....	123
Abb. F- 16: Southern-Blots <i>StTRI</i> RNAi.....	124
Abb. F- 17: Southern-Blots <i>StTRII</i> RNAi.....	125
Abb. F- 18: GC-MS Chromatogramm Tropinon-, Tropin- und Pseudotropin-Standard .....	127
Abb. F- 19: GC-MS Chromatogramm Acetyltropin-Standard .....	127
Abb. F- 20: Massenspektrum Tropinon .....	128
Abb. F- 21: Massenspektrum Tropin .....	128
Abb. F- 22: Massenspektrum Pseudotropin .....	128
Abb. F- 23: Massenspektrum Acetyltropin .....	129
Abb. F- 24: GC-MS Chromatogramm Blätter <i>S. tuberosum</i> Wildtyp .....	129
Abb. F- 25: GC-MS Chromatogramm Blätter <i>StTRI</i> RNAi Linie M .....	129
Abb. F- 26: GC-MS Chromatogramm Blätter <i>StTRI</i> Überexpressionslinie R .....	130
Abb. F- 27: GC-MS Chromatogramm Blätter <i>StTRII</i> RNAi Linie O.....	130
Abb. F- 28: GC-MS Chromatogramm für TMS-Calystegine A <sub>3</sub> , B <sub>4</sub> und B <sub>2</sub> .....	131
Abb. F- 29: Massenspektrum TMS-Calystegin A <sub>3</sub> .....	131
Abb. F- 30: Massenspektrum TMS-Calystegin B <sub>4</sub> .....	131
Abb. F- 31: Massenspektrum TMS-Calystegin B <sub>2</sub> .....	132
Abb. F- 32: GC-MS Chromatogramm TMS-Calystegine <i>S. tuberosum</i> Wildtyp .....	132
Abb. F- 33: GC-MS Chromatogramm TMS-Calystegine <i>StTRII</i> RNAi Linie O .....	132

Abb. F- 34: HPLC Chromatogramm dansylierte Polyamin-Standards .....	133
Abb. F- 35: HPLC Chromatogramm Blätter <i>S. tuberosum</i> Wildtyp.....	133
Abb. F- 36: HPLC-Chromatogramm Blätter <i>DsPMT</i> exprimierende Linie K.....	134
Abb. F- 37: UPLC-MS Chromatogramm Cucurbinsäure-Standard .....	134
Abb. F- 38: MS/MS Spektrum Cucurbinsäure-Standard .....	135

## Tabellenverzeichnis

Tab. A- 1: Katalytische Parameter von Tropinonreduktasen .....	15
Tab. B- 1: Chemikalien, durch Synthese oder Extraktion gewonnen .....	24
Tab. B- 2: Zusammensetzung Medien und Lösungen zur Pflanzenkultur .....	25
Tab. B- 3: Zusammensetzung Puffer und Lösungen .....	26
Tab. B- 4: Datenbanken und Internetprogramme .....	27
Tab. B- 5: GC-MS Geräteparameter GCMS 2010 .....	40
Tab. B- 6: HPLC-Geräteparameter zur Polyaminquantifizierung.....	42
Tab. B- 7: GC-MS Geräteparameter zur Calystegin-Analytik .....	43
Tab. F- 1: Konstrukte und transgene Linien .....	113
Tab. F- 2: Primer für Konstrukte .....	113
Tab. F- 3: Primer und Sonden für qRT-PCR .....	114
Tab. F- 4: Nukleotidvergleich <i>TRs</i> , <i>PMTs</i> , <i>SPDSs</i> aus <i>S. tuberosum</i> .....	125
Tab. F- 5: Accession-Nummern (UniProtKB) der Proteinsequenzen zur Erstellung phylogenetischer Bäume mit MEGA6.06 (Tamura et al., 2013).....	126

## **A 1. Einleitung**

### **A 1.1. *Solanum tuberosum* L. – wirtschaftliche Bedeutung, Genom und Sekundärmetaboliten**

Die Kartoffel, *Solanum tuberosum* L., ist eine wirtschaftlich bedeutsame Nutzpflanze und wird in die Familie der *Solanaceae* (Nachtschattengewächse) eingeordnet, zu der auch Tomate (*Solanum lycopersicum*), Tollkirsche (*Atropa belladonna*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) gehören. Sie ist eine einjährige, krautige Pflanze und vermehrt sich vegetativ durch unterirdische Sprossknollen, die aus Stolonen gebildet werden. Nach der Blüte bildet die Kartoffelpflanze zweikammerige, hellgrüne Beeren mit zahlreichen Samen. Seit dem 18. Jahrhundert wird die Kartoffel als Kulturpflanze großflächig in Deutschland angebaut (Jäger et al., 2008). Insgesamt sind weit über 7.000 Kartoffelsorten bekannt (<http://cipotato.org>). Die Kartoffel gehört heute neben Reis, Mais und Weizen zu den bedeutendsten Grundnahrungsmitteln der Welt mit einer Produktion von 385 Millionen Tonnen im Jahr 2014 (<http://www.fao.org>). Die Pflanze zeigt eine optimale Anpassung an das gemäßigte Klima, sie wird aber auch in der (sub)-tropischen Klimazone in den Wintermonaten oder im Gebirge angebaut (Hijmans, 2001). Die heute kultivierten Kartoffelsorten stammen ursprünglich aus Gebieten der Anden in Südamerika wie Chile, Peru, Bolivien und Argentinien (Hosaka and Hanneman, 1988).

Krankheiten wie Kraut- und Knollenfäule, übertragen durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* oder Fraßschäden, verursacht durch den Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* führen zu erheblichen Ernteaufschlägen. Jährlich entstehen durch Krautfäule Kosten von ca. 6,7 Billionen US-Dollar (Haverkort et al., 2008). Die Züchtung von neuen Kartoffelsorten soll zur Reduktion des Schädlingsbefalls beitragen sowie die Ertragseigenschaften und Anpassungsfähigkeit der Pflanze verbessern. Mit Hilfe neuer Strategien der Molekulargenetik kann die konventionelle Züchtungszeit von 10 Jahren für eine neue Sorte wesentlich verkürzt werden. Dazu gehört die durch genetische Marker gesteuerte Selektion vermehrungsrelevanter Pflanzen (Hirsch et al., 2014; Slater et al., 2014). In Datenbanken wird der Genotyp einer Kartoffellinie mit Merkmalen des Phänotyps verknüpft. So können Funktionen von Genen zugeordnet, Marker für merkmalsrelevante Gene gesucht, Sequenzvarianten und Genexpression verglichen und für eine schnellere und effizientere Züchtung neuer Sorten eingesetzt werden (Hirsch et al., 2014).

Auch genetische Manipulationen haben das Ziel, den Schädlingsbefall zu reduzieren. Die Protoplastenfusion der Kartoffel-Wildart *Solanum bulbocastanum* mit *S. tuberosum* und folgende Rückkreuzung erzielte Resistenz gegenüber Schädlingen wie *P. infestans*, Blattläusen (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*) und des Kartoffel-Y-Virus (*Potato virus Y*) (Davis et al., 2012). Durch die Expression des für die Larven des Kartoffelkäfers toxischen Proteins Cry3A in *S. tuberosum* konnte ebenso eine drastische Reduktion des Larvenbefalls erreicht werden (Perlak et al., 1993; Zhou et al., 2012).

Die meisten Kartoffelsorten sind in ihrem Genom stark heterozygot und autotetraploid. Das Genom zweier Varietäten wurde 2011 durch das Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC) veröffentlicht. Dazu wurde eine doppelt monoploide Sorte *Solanum tuberosum* Gruppe Phureja (DM1-3 516R44) und eine heterozygote diploide Züchtungslinie *Solanum tuberosum* Gruppe Tuberosum (RH89-039-16) sequenziert. Das Genom umfasst 12 Chromosomen mit über 39.000 codierenden Genen, wobei zwei Genomduplikationen postuliert werden (PGSC, 2011; Sharma et al., 2013). Es konnten 755 Genloci von Resistenz-Genen identifiziert werden, für deren Proteine eine Beteiligung an der Pathogeninteraktion wahrscheinlich ist (Bakker et al., 2011; Jupe et al., 2013).

Die Kartoffelknolle enthält Stärke, Proteine, Vitamine, Elektrolyte, Antioxidantien und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Steroidalkaloide ( $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin) und Calystegine (Burlingame et al., 2009; Dräger et al., 1995). Steroidalkaloide hemmen das Enzym Acetylcholinesterase und können konzentrationsabhängig auf Mikroorganismen, Insekten, Tiere und den Menschen toxisch wirken (Friedman, 2006). Sie akkumulieren in allen Teilen der Kartoffelpflanze, besonders aber in Geweben mit hoher metabolischer Aktivität (Barceloux, 2009), und werden durch Lagerung der Knollen am Licht und durch Verwundung vermehrt gebildet (Griffiths et al., 2000; Petersson et al., 2013). Die Eigenschaften der zu den Nortropanalkaloiden zählenden Calystegine, die besonders stark in den Keimen der Kartoffelpflanze akkumulieren (Keiner and Dräger, 2000) und deren Funktion noch unbekannt ist, werden detailliert in Kapitel A 1.4 beschrieben.



## A 1.2. Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese

### A 1.2.1 Allgemeine Übersicht

Tropanalkaloide und Calystegine werden ausgehend von den Aminosäuren L-Ornithin und L-Arginin gebildet (Abb. A- 1). Aus Ornithin entsteht durch das Enzym Ornithindecaboxylase (ODC, EC 4.1.1.19) Putrescin. Nahezu alle lebenden Organismen besitzen eine ODC (Hashimoto and Yamada, 1994), mit Ausnahme von *Arabidopsis thaliana* und dem Protozoen *Trypanosoma cruzi* (Bagni et al., 2006; Hanfrey et al., 2001). ODCs wurden bisher aus Pflanzen (*Datura stramonium*, Michael et al., 1996), Bakterien (*Escherichia coli*, Kashiwagi et al., 1991), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, Fonzi and Sypherd, 1987), Insekten (*Drosophila melanogaster*, Rom and Kahana, 1993) und dem Menschen (Moshier et al., 1990) isoliert.

Putrescin kann in Pflanzen ebenso durch Decarboxylierung von Arginin durch Arginindecaboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) über Agmatin gebildet werden. Säugetiere und niedere Eukaryoten besitzen im Gegensatz zu Pflanzen keine ADC (Hashimoto and Yamada, 1994). Die erste ADC wurde aus Hafer (*Avena sativa*) kloniert (Bell and Malmberg, 1990). Agmatin wird durch das Enzym Agmatinimidohydrolase (AIH, EC 3.5.3.12) zu *N*-Carbamoylputrescin umgesetzt, welches dann durch *N*-Carbamoylputrescinamidohydrolase (CPA, EC 3.5.1.53) zu Putrescin hydrolysiert (Fuell et al., 2010). AIH und CPA wurden aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und aus *A. thaliana* charakterisiert (Janowitz et al., 2003; Nakada and Itoh, 2003; Piotrowski et al., 2003). In vielen Pflanzen kann Putrescin sowohl ausgehend von Ornithin über die ODC als auch ausgehend von Arginin über die ADC synthetisiert werden. In *N. tabacum* wird Putrescin verstärkt über die ODC gebildet (Dewey and Xie, 2013), in *Erythroxylum coca* wird Putrescin sowohl über die ODC als auch über die ADC synthetisiert (Docimo et al., 2012). Für *S. tuberosum* und Tomate (*Solanum lycopersicum*) wurde eine verstärkte ODC-Aktivität in meristematischen Geweben im Vergleich zur ADC gemessen (Cohen et al., 1982). Die ODC ist in Kartoffelkeimen sehr aktiv und wird als limitierendes Enzym für die Polyaminbiosynthese diskutiert (Kaur-Sawhney et al., 1982). Durch Kältestress findet eine Induktion von ADC-Transkripten in Blättern von Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée statt (Oufir et al., 2008).

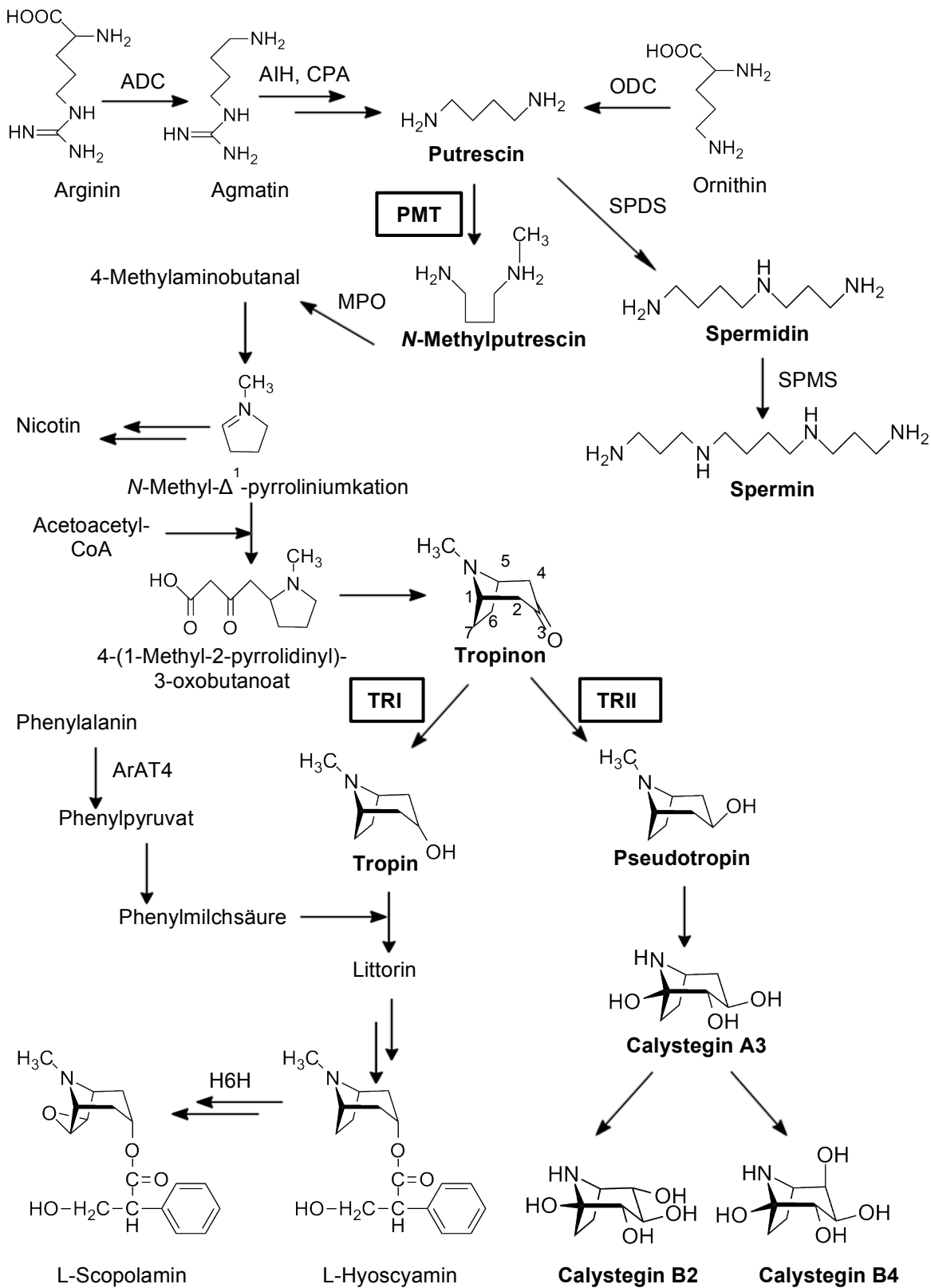


Abb. A- 1: Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese

ADC: Arginyldecarboxylase (EC 4.1.1.19), AIH: Agmatinimidohydrolase (EC 3.5.3.12), CPA: *N*-Carbamoylputrescinamidohydrolase (EC 3.5.1.53), ODC: Ornithindecaboxylase (EC 4.1.1.19), PMT: Putrescin-*N*-Methyltransferase (EC 2.1.1.53), MPO: Methylputrescinoxidase (EC 1.4.3.6), TRI: Tropinonreduktase I (EC 1.1.1.201), TRII: Tropinonreduktase II (EC 1.1.1.236), H6H: Hyoscyamin-6-Hydroxylase (EC 1.14.11.11), SPDS: Spermidinsynthase (EC 2.5.1.16), SPMS: Sperminsynthase (EC 2.5.1.22).

Das Diamin Putrescin stellt eine Verbindung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel in Pflanzen dar. Im Primärstoffwechsel wird Putrescin durch das Enzym Spermidinsynthase (SPDS, EC 2.5.1.16) zu Spermidin und weiter durch Sperminsynthase (SPMS, EC 2.5.1.22) zu Spermin umgesetzt. Als Aminopropylgruppen-Überträger fungiert bei beiden Reaktionen das Co-Substrat decarboxyliertes S-Adenosyl-Methionin (dcSAM). Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin kommen in nahezu allen lebenden Organismen vor (Gill and Tuteja, 2010). In Pflanzen sind Polyamine wichtige regulatorische Signalmoleküle und an der Toleranz gegenüber abiotischem Stress und an Entwicklungsprozessen beteiligt (Minocha et al., 2014; Tiburcio et al., 2014).

Als Eingangsreaktion in den Sekundärstoffwechsel wird Putrescin durch Putrescin-*N*-Methyltransferase (PMT, EC 2.1.1.53) zu *N*-Methylputrescin (NMP) methyliert. S-Adenosyl-Methionin (SAM) überträgt als Co-Substrat die Methylgruppe. Die PMT ist das Eingangsenzym zu den Tropanalkaloiden, Calysteginen und Nikotin (Hashimoto and Yamada, 1994). Die cDNA der PMT wurde bisher aus einigen Solanaceae und einer Convolvulaceae kloniert: *Datura stramonium* und *Datura innoxia*, *S. lycopersicum* (Teuber et al., 2007), *Atropa belladonna* und *Hyoscyamus niger* (Suzuki et al., 1999a), *S. tuberosum* (Stenzel et al., 2006), *N. tabacum* (Hibi et al., 1994), *Nicotiana sylvestris* (Hashimoto et al., 1998a), *Anisodus acutangulus* (Kai et al., 2009b), *Anisodus tanguticus* (Liu et al., 2005b) und *Calystegia sepium* (Teuber et al., 2007). Über die Evolution des Sekundärstoffwechsellenzym PMT wird die Entstehung aus dem Primärstoffwechsellenzym SPDS durch Mutation und Funktionswechsel postuliert (Hashimoto et al., 1998b; Minguet et al., 2008, Biastoff et al., 2009). Diese Theorie konnte erstmals *in vitro* durch Mutagenese von nur wenigen Aminosäuren der SPDS Co-Substrat-Bindestelle nachvollzogen werden: PMT-Aktivität wurde durch Mutation von zwei Aminosäuren in *D. stramonium* SPDS1 erzeugt. In *A. thaliana* SPDS gelang es nach Mutation von einer bis drei Aminosäuren eine SPDS- und PMT-Doppelaktivität und nach Mutation von vier Aminosäuren ausschließlich PMT-Aktivität zu generieren (Junker et al., 2013).

Im nachfolgenden Biosyntheseschritt wird NMP zu 4-Methylaminobutanal durch *N*-Methylputrescinoxidase (MPO, EC 1.4.3.6) oxidativ desaminiert. MPO-Aktivität wurde erstmals in *N. tabacum* Wurzelkulturen nachgewiesen (Mizusaki et al., 1972), später in *Nicotiana rustica* (Haslam and Young, 1992). Eine cDNA der MPO wurde bisher nur aus *N. tabacum* kloniert (Heim et al., 2007; Katoh et al., 2007).

4-Methylaminobutanal zyklisiert spontan zum instabilen *N*-Methylpyrroliniumsalz (Hashimoto and Yamada, 1994), das auch in die Biosynthese von Nikotin eingeht (Leete, 1967). Acetoacetat reagiert mit dem *N*-Methylpyrroliniumsalz zu 4-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoat, das wiederum zu 2-Carboxytropinon zyklisiert und durch Decarboxylierung Tropinon bildet (Robins et al., 1997).

Tropinon stellt den Verzweigungspunkt zwischen Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese dar. Tropinonreduktase I (TRI, EC 1.1.1.201) und Tropinonreduktase II (TRII, EC 1.1.1.236) reduzieren Tropinon stereospezifisch unter Verwendung von NADPH als Co-Substrat. Die TRI bildet Tropin (3 $\alpha$ -Hydroxytropan) als ersten Metabolit zu den Tropanalkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin, die TRII bildet Pseudotropin (3 $\beta$ -Hydroxytropan) als Vorstufe der Calystegine. Tropin und Pseudotropin sind nicht ineinander umwandelbar (Dräger and Schaal, 1994). cDNA-Sequenzen der *TRI* und *TRII* wurden aus *S. tuberosum* (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002), *H. niger* und *D. stramonium* (Nakajima et al., 1993; Nakajima et al., 1999b) sowie *A. acutangulus* (Kai et al., 2009a) kloniert. Zusätzlich wurden *TRI*-Sequenzen in den Solanaceae *Withania coagulans* und *Withania somnifera* (Kushwaha et al., 2013a; Kushwaha et al., 2013b) identifiziert. Erstmals wurden aus der Orchidaceae *Dendrobium nobile*, die weder Tropanalkaloide noch Calystegine bildet, eine *TRI*-Sequenz kloniert und charakterisiert (Chen et al., 2013). *TRI*- und *TRII*-Proteine wurden bisher aus Wurzeln oder Wurzelkulturen von *D. stramonium* (Koelen and Gross, 1982; Portsteffen et al., 1994), *H. niger* (Dräger et al., 1988; Hashimoto et al., 1992) und *D. innoxia* (Couladis et al., 1991) sowie *TRII*-Protein aus *A. belladonna* (Dräger and Schaal, 1994) isoliert. Eine Tropinonreduktase aus der Brassicaceae *Cochlearia officinalis* (CoTR) ist in der Lage, Tropinon sowohl zu Tropin als auch zu Pseudotropin zu reduzieren. *Cochlearia officinalis* enthält Calystegine und das Tropanalkaloid Cochlearin (Brock et al., 2006).

Auf dem Weg zu den Tropanalkaloiden erfolgt die Kondensation von Tropin mit Phenylmilchsäure zu Littorin (Robins et al., 1994b; Robins et al., 1994c). Phenylmilchsäure wird in *A. belladonna* aus Phenylalanin über Phenylpyruvat gebildet, indem eine Phenylalanin-4-Hydroxyphenylpyruvat-Aminotransferase (ArAT4, GenBank Nummer: KC954706) die Transaminierung von Phenylalanin katalysiert (Bedewitz et al., 2014). Aus Littorin wird durch Oxidation und Umlagerung durch das Cytochrom-P-450 Enzym CYP80F1 Hyoscyaminaldehyd gebildet (Li et al., 2006; Nasomjai et al., 2009), das eine noch unbekannte Reduktase zu Hyoscyamin

reduziert. Die Reaktion zu Scopolamin wird durch Hydroxylierung und Epoxidierung mit Hilfe der Hyoscyamin-6-hydroxylase (H6H, EC 1.14.11.11) katalysiert. Dabei ist die Hydroxylase-Aktivität des Enzyms 40-fach höher als seine Epoxidase-Aktivität (Hashimoto et al., 1993). Die cDNA der H6H wurde bereits aus *H. niger* (Matsuda et al., 1991), *A. belladonna*, (Suzuki et al., 1999b), *A. tanguticus* (Liu et al., 2005a), *Atropa baetica* (Jaber-Vazdekis et al., 2009), *Datura metel* (Pramod et al., 2010) und *A. acutangulus* (Kai et al., 2011) kloniert.

Pseudotropin als Vorstufe der Calystegine wird durch die TRII gebildet, die erstmals aus *H. niger* gereinigt wurde (Dräger et al., 1988). Für die nachfolgenden Schritte der Demethylierung von Pseudotropin und der Einführung von Hydroxylgruppen sind sowohl die Enzyme, als auch die Reihenfolge der Biosyntheseschritte unbekannt. Da in *C. sepium* Wurzelkulturen und in *Morus alba* Norpseudotropin nachgewiesen wurde, ist eine Tropinon-Demethylierung als erste Reaktion wahrscheinlich (Kusano et al., 2002; Scholl, 2003). Auch in *N. tabacum* wird Nornikotin aus Nikotin über eine Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase (Nikotin-*N*-Demethylase, EC 1.14.13.B3) durch *N*-Demethylierung gebildet (Siminszky et al., 2005; Xu et al., 2007). Für die Calysteginbiosynthese wird eine schrittweise Hydroxylierung vermutet, sodass tetrahydroxylierte Calystegine aus trihydroxylierten Calysteginen hervorgehen könnten (Scholl, 2003). Diese Hydroxylierungen des Tropanrings könnten Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYPs) oder 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen (2OGDs) katalysieren. Zu den CYPs im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen gehören z.B. Geraniol-10-hydroxylase (Sung et al., 2011), Isoflavon-2-hydroxylase (Liu et al., 2003) und Abscisinsäure-8-hydroxylase (Okamoto et al., 2006), zu den pflanzlichen 2OGDs werden Feruloyl-CoA Hydroxylase, Salicylsäure-3-hydroxylase und H6H zugeordnet (Kawai et al., 2014).

Fütterungsexperimente mit markierten Vorstufen bestätigten deren Einbau in die Calystegine. Die Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Putrescin führte zum Einbau in die Calystegine bei *C. sepium* Wurzelkulturen (Goldmann et al., 1990). Die Fütterung von Pseudotropin verdreifachte den Calystegin-Gehalt in *A. belladonna* Wurzelkulturen. Nach  $^{15}\text{N}$ -Tropinon-Fütterung wurde dessen Einbau in die Calystegine bewiesen (Dräger et al., 1994). Darüber hinaus konnte an *C. sepium* Wurzelkulturen gezeigt werden, dass  $^{15}\text{N}$ -Tropinon in Pseudotropin, Calystegine und Dihydroxynortropane eingebaut wird (Scholl et al., 2001; Scholl et al., 2003). Dihydroxynortropane als

mögliche Intermediate zwischen Pseudotropin und den Calysteginen wurden aus Convolvulaceae, Moraceae und Solanaceae identifiziert (Asano et al., 2001b; Kusano et al., 2002). Da die vom Pseudotropin stammende Hydroxylgruppe an Position C3 fehlt, werden sie als Nebenprodukte der Calysteginbildung eingeordnet (Scholl et al., 2001).

### A 1.2.2 Wichtige Enzyme der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese

Unterschiedliche Pflanzenorgane und Zelltypen nehmen an der Biosynthese und Akkumulation von Alkaloiden teil. Ein inter- und intrazellulärer Transport von Intermediaten, Produkten und Biosyntheseenzymen ist dafür nötig (Facchini and St-Pierre, 2005). Der Biosyntheseort der Tropanalkaloide ist die Wurzel, von der sie über das Xylem in die Blätter transportiert werden (De Luca and St Pierre, 2000; Khanam et al., 2000; Wink and Roberts, 1998). Für *S. tuberosum* werden die Wurzel und die Keime als Organe der Biosynthese von Calysteginen angenommen (Richter et al., 2007).

Das Vorkommen von Transkripten und Enzymen für PMT, TRI, TRII und H6H wurde bereits in verschiedenen Zelltypen der Wurzel von *Solanaceae* festgestellt, so dass ein Transport der Biosynthese-Intermediate zwischen den Zellschichten wahrscheinlich ist. Die *PMT* ist in der Rinde, der Endodermis und im Xylem der Wurzel von *N. sylvestris* exprimiert (Shoji et al., 2000). In *N. tabacum* ist *PMT*-Enzymaktivität besonders hoch in jungen Wurzeln (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005). Die Expression der *PMT* und *H6H* in *A. belladonna* wurde im Perizykel der Wurzel festgestellt (Suzuki et al., 1999a; Suzuki et al., 1999b). In *S. tuberosum* wurde starkes *PMT*-Transkript in den Augen der Knolle bei Keimstart und in kurzen Keimen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde *PMT*-Proteinaktivität in kurzen Keimen detektiert (Stenzel et al., 2006). Da das Vorkommen von Transkripten für *StPMT* und *StTRII* mit gleichzeitigem Calystegin-Vorkommen in der Wurzel der Kartoffelpflanze korreliert, wird die Biosynthese der Calystegine in der Wurzel und ein anschließender Transport zu den Knollen postuliert. Zu Beginn der Keimung werden Calystegine aus der Knollenschale in die keimenden Augen transportiert und weiter in die heranwachsenden Keime. Dort wird die Nachbildung durch *StPMT* und *StTRII* vermutet (Richter et al., 2007).

Das Vorkommen von *TRI*- und *TRII*-Transkripten und die Lokalisation der Proteine sind für *H. niger* und *S. tuberosum* untersucht. In *H. niger* wurde die Expression der *TRI* und *TRII* in der Endodermis und im Perizykel der Wurzel nachgewiesen

(Nakajima et al., 1999b). TRI-Protein wurde in der äußeren Rinde und Endodermis detektiert, TRII-Protein in der inneren Rinde, der Endodermis und im Perizykel (Nakajima and Hashimoto, 1999). Für *S. tuberosum* wurde *TRI*-Transkript in Wurzeln, Knollen, Stolonen und Blüten nachgewiesen, *TRII*-Transkript in Wurzeln und Keimen (Keiner, 2001). TRI-Protein wird nur sehr schwach in Knollen, Keimen und Stolonen gebildet, TRII-Protein kommt stärker im Phloemparenchym der Wurzel, Stolone und Keime vor. In Rindenzellen von Wurzel und Stolon sowie im Perizykel der Wurzel konnte TRII-Protein ebenfalls detektiert werden. Die Immunlokalisation der StTRI und StTRII für Wurzel und Stolone der Kartoffelpflanze wird durch Abb. A- 2 veranschaulicht (Kaiser et al., 2006).

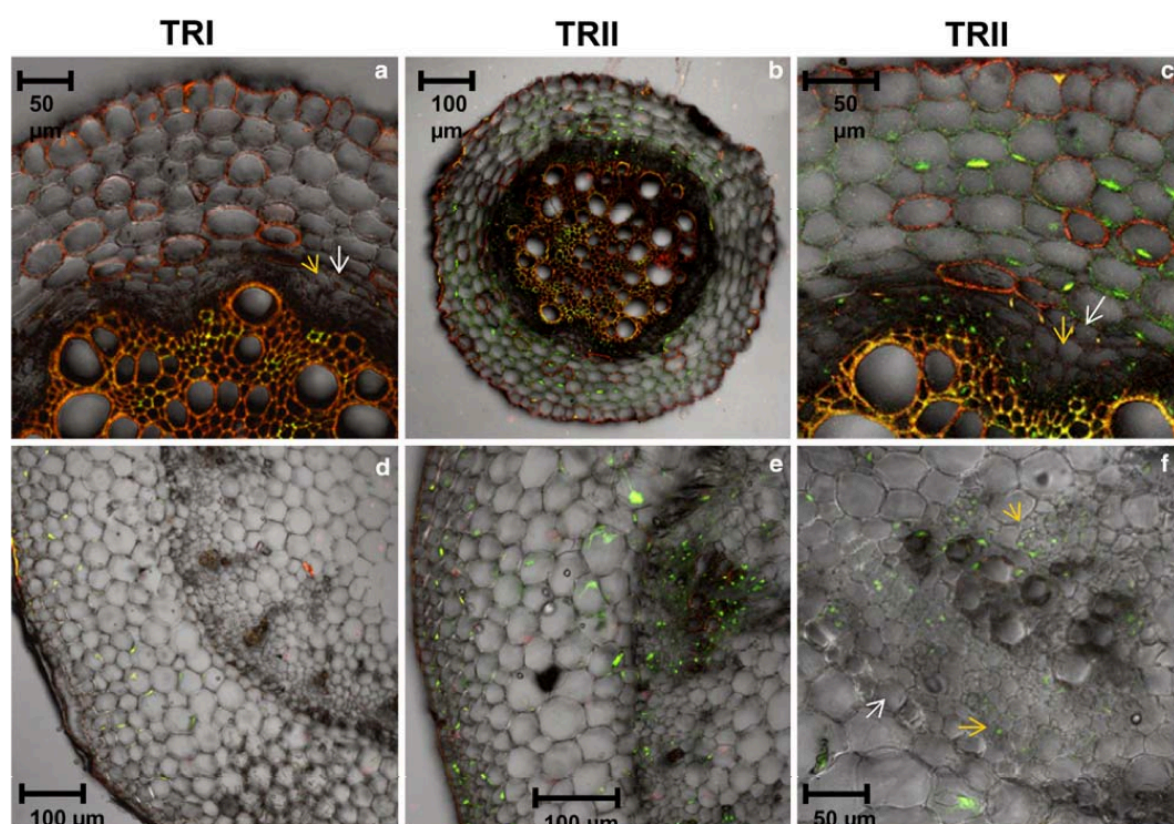


Abb. A- 2: Immunolokalisation der StTRI und StTRII in Wurzel und Stolon

Die Abbildung ist entnommen aus Kaiser et al. (2006). StTRI- und StTRII-Protein wurde durch sekundäre IgG-Antikörper, gekoppelt an das grün fluoreszierende Protein visualisiert. a-c: *S. tuberosum* Wurzelquerschnitte, weiße Pfeile=Endodermis, gelbe Pfeile=Perizykel, d-f: *S. tuberosum* Stolonquerschnitte, weißer Pfeil=Endodermis, gelbe Pfeile=Phloem.

### A 1.2.3 Regulation der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese

Über die Regulation der Gene der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese ist noch wenig bekannt. Für *N. tabacum* und *N. benthamiana* wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren (NtORC1, NtJAP1, NbbHLH1 und NbbHLH2) identifiziert, die

am *PMT*-Promoter binden und positive Regulatoren der Nikotinbiosynthese sind (De Sutter et al., 2005; Todd et al., 2010).

Vielfach untersucht ist, dass sich das Pflanzenhormon Methyljasmonat positiv auf die Biosynthese von Tropanalkaloiden auswirkt. Methyljasmonat induzierte die Bildung von Tropanalkaloiden in *H. niger* Wurzelkulturen, dabei sind *PMT*- und *H6H*-Aktivität erhöht (Jaremicz et al., 2014; Zhang et al., 2007). Auch in *A. acutangulus* Wurzeln und Wurzelkulturen wurde die Tropanalkaloid-Produktion durch Methyljasmonat gesteigert (Kai et al., 2012; Luo et al., 2012). Für *D. stramonium* wurde die Induktion von *PMT*-Transkriptmengen und eine Zunahme der Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin sowie der Tropanalkaloide nach Methyljasmonat-Behandlung beschrieben (Deng, 2005; Zabetakis et al., 1999). Methyljasmonat führte zu einer Induktion von *ODC*- und *PMT*-Transkripten und steigerte die *NMP*- und Nikotin-Synthese in *N. tabacum* (Imanishi et al., 1998). In *N. sylvestris* wurde die *PMT*-Expression durch Methyljasmonat-Behandlung in den Wurzeln verstärkt (Shoji et al., 2000).

Tropinonreduktase-Transkripte lassen sich durch Hormone und Verwundung induzieren. Die Expression einer *TRI* aus *W. somnifera* wurde durch Salicylsäure, Methyljasmonat und durch Verwundung gesteigert (Kushwaha et al., 2013b). *TRI*- und *TRII*-Transkripte in *A. acutangulus* wurden in Wurzel, Sprossachse und Blättern unterschiedlich stark nach Methyljasmonat-Zugabe induziert (Kai et al., 2009a), sodass eine differenzierte Regulation beider Tropinonreduktasen postuliert werden kann.

Bei *A. belladonna* Wurzelkulturen wurden Veränderungen der Calystegine durch verschiedene Elicitoren erzeugt, deren Mechanismen größtenteils unbekannt sind. Methyljasmonat verringerte den Gehalt an Calystegin A<sub>3</sub> um mehr als die Hälfte nach 48 h, Abscisinsäure-Behandlung zeigte einen schwächeren Rückgang der Calysteginsynthese. Das Schwefelanalogon des Tropinons, Thiabicyclooctanon (TBON), als bekannter Hemmstoff der *TRI* verschob die Biosynthese auf die Seite von *TRII*-Produkten, indem Pseudotropin und Calystegine anstiegen (Rothe et al., 2001). Eine Steigerung der Calysteginproduktion wurde durch 5 % Saccharose im Kulturmedium erzeugt (Rothe et al., 2001; Rothe et al., 2003). Auch die Zugabe des Zuckers Mannose zum Medium der Wurzelkultur führte zu einem Anstieg des Calystegin-Gehalts. Eine Kombination aus Sorbitol und Auxinen steigerte die



Calysteginsynthese nochmals, während Saccharose kombiniert mit Auxinen den Calystegin-Gehalt leicht zurückgehen ließ (Rothe and Dräger, 2002).

In *S. tuberosum* veränderte sich der Gehalt an Calysteginen nach Modifikation des Kohlenhydratstoffwechsels. Bei transgenen Pflanzen mit supprimierter Saccharose-Synthase und erhöhtem Glucose- und Fructosegehalt in den Knollen wurde auch ein erhöhter Gehalt an Calysteginen in den Keimen, der Schale und den Augen der Knolle sowie in der Wurzel detektiert. Die Expression der cytosolischen Hefe-Invertase führte zu einem schnelleren Abbau von Calysteginen in der Knollenschale bei Lagerung (Richter et al., 2007).

Die Beeinflussung der Calysteginbildung durch abiotischen Stress wurde bei zwei von 13 untersuchten Kartoffelsorten nachgewiesen, sodass eine sortenspezifische Regulation vermutet werden kann. Die Sorte Désirée reagierte auf Verwundung und Lichtstress mit einer zwei- bis dreifachen Erhöhung des Calystegin-Gehalts in den Keimen. Auch die Sorte Melody zeigte nach Lichtstress einen zweifach erhöhten Calystegin-Gehalt (Petersson et al., 2013). Nach Verwundung von Kartoffelkeimen der Sorte Liu konnte keine Erhöhung des Calystegin-Gehalts festgestellt werden. Auch die Lagerung und Keimung unter Lichteinstrahlung veränderte den Gehalt an Calysteginen in den Keimen und in der Knollenschale nicht (Keiner, 2001; Keiner and Dräger, 2000).

#### A 1.2.4 Modifikation der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese

Kommerzielles Interesse galt bisher einer gesteigerten Produktion von Tropanalkaloiden, besonders Scopolamin, da Derivate dieses Alkaloids für die Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krämpfen der glatten Muskulatur, chronisch obstruktiver Bronchitis oder Reiseübelkeit eingesetzt werden (<http://www.rote-liste.de>). Die Blätter von *Duboisia*-Spezies (Solanaceae) besitzen einen besonders hohen Gehalt an Alkaloiden von meist 2-4 %, davon 60 % Scopolamin und 30 % Hyoscyamin, und werden in Australien, Brasilien und Ecuador zur Scopolaminproduktion kultiviert (Palazon et al., 2008). Calystegine sind keine pharmazeutisch genutzten Wirkstoffe, daher ist das Interesse an einer gesteigerten Produktion durch chemische Synthese, Produktion durch *in vitro* Kulturen oder Extraktion aus pflanzlichem Material gering. Dennoch liefern einige Studien Informationen zum Calystegin-Gehalt nach Modifikation von Enzymen der Tropanalkaloid- und Calysteginbiosynthese.

Bisher wurden PMT und H6H einzeln oder in Kombination in Wurzelkulturen verschiedener Solanaceae unter Kontrolle des 35S-Promoters exprimiert. Dabei wurden abhängig von der untersuchten Art verschiedene Ergebnisse zu Veränderungen des Gehalts von NMP und Tropanalkaloiden registriert. Die alleinige Expression der *N. tabacum* PMT (*NtPMT*) führte in *A. belladonna* Wurzelkulturen weder zur Erhöhung der Alkaloid- noch der Calysteginmenge. Trotz Erhöhung des Gehalts an NMP blieben Polyamine und die Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin unverändert (Rothe et al., 2003). Erst durch die kombinierte Expression der *NtPMT* und der *H. niger* H6H (*HnH6H*) wurde der Scopolamin- und Hyoscyamin-Gehalt in der Wurzelkultur 5-fach und 11-fach erhöht (Long et al., 2013; Yang et al., 2011). In *H. niger* Wurzelkulturen steigerte sich der Scopolamin-Gehalt bei gleichzeitiger *NtPMT*- und *HnH6H*-Expression um das 10-fache. Die alleinige *HnH6H*-Expression zeigte nur eine 5-fache Erhöhung des Scopolamin-Gehalts (Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2007). Weitere Untersuchungen nach alleiniger *NtPMT*-Expression in *H. niger* hatten nur einen Anstieg des NMPs zur Folge. Tropanalkaloide waren unverändert und Polyamine wie Spermidin und Spermin leicht reduziert (Zhang et al., 2007). Ein NMP-Anstieg bei der Expression von *NtPMT* wurde auch bei *Duboisia*-Hybriden gemessen ohne Veränderungen des Gehalts an Tropanalkaloiden, Polyaminen oder Nikotin (Moyano et al., 2002). Nur bei *Datura metel*, *Hyoscyamus muticus* und *Scopolia parviflora* verursachte schon die alleinige Expression der *NtPMT* einen Anstieg der Tropanalkaloide (Lee et al., 2005; Moyano et al., 2003). Zur Modifikation des Nikotin-Gehalts in Tabak-Wurzelkulturen wurde das Gen *MPO* überexprimiert und durch RNAi herunterreguliert. Die RNAi-Linien produzierten weniger Nikotin und Nornikotin, in den *MPO*-Überexpressionslinien steigerte sich der Nikotingehalt um das 10-fache (Hashimoto and Kato, 2007).

Die Tropinonreduktasen *TRI* und *TRII* wurden bisher nur in Wurzelkulturen von *A. belladonna* und *A. acutangulus* unter Kontrolle des 35S-Promoters exprimiert. Die Expression der *D. stramonium TRI* (*DsTRI*) in *A. belladonna* führte zu einem erhöhten Tropin- und Tropanalkaloidgehalt sowie zu vermindertem Pseudotropin- und Calystegin-Gehalt. Nach Expression von *DsTRII* zeigte sich eine Erhöhung von Pseudotropin und Calysteginen nur in einer von acht Linien. Tropanalkaloidveränderungen wurden nicht detektiert (Richter et al., 2005). In *A. acutangulus* Wurzelkulturen wurde durch Überexpression der endogenen *TRI*

(*AaTRI*) und der *H6H* (*AaH6H*) einzeln und in Kombination eine Erhöhung der Tropanalkaloide erzielt (Kai et al., 2012; Kai et al., 2009b).

In verschiedenen transgenen Pflanzen der Solanaceae wurde der Gehalt an Tropanalkaloiden und Intermediaten nach Expression der *NtPMT*, *HnH6H*, *HnTRI* unter Kontrolle des 35S-Promoters untersucht. Abhängig von Pflanze und Konstrukt wurde ein konstanter oder gesteigerter Gehalt der Metaboliten detektiert. Bei der kombinierten Expression der *NtPMT* und *HnH6H* gelang die Steigerung des Scopolamingehalts in *A. belladonna* bis auf das 7-fache (Liu et al., 2010; Wang et al., 2011). In *N. tabacum* wurden *HnTRI* und *HnH6H* exprimiert und Blätter mit den Intermediaten Tropinon und Hyoscyamin gefüttert. Die Tropinon-gefütterten *HnTRI* exprimierenden Blätter akkumulierten Tropin, Acetyltropin, Nikotin und Derivate des Nikotins. Die Hyoscyamin-Fütterung bei den mit *HnH6H* transformierten Pflanzen zeigte einen leichten Anstieg von Scopolamin und 6 $\beta$ -Hydroxyhyoscyamin (Rocha et al., 2002). Die Expression der *NtPMT* führte in *A. belladonna* zu einem NMP-Anstieg und in *N. sylvestris* zu einer NMP- und Nikotinakkumulation (Sato et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnte von Rothe und Mitarbeitern (2003) keine Erhöhung von Tropinon, Tropin, Pseudotropin und Tropanalalkaloiden nach *NtPMT*-Expression in *A. belladonna* festgestellt werden. Es wurde geschlossen, dass ein limitierender Biosyntheseschritt zwischen NMP und Tropinon lokalisiert sein kann.

Ein Zusammenhang zwischen der Calysteginproduktion und biotischem Stress wurde für *Calystegia arvensis* untersucht. Die Expression des *crypt*-Gens des Oomyceten *Phytophthora cryptogea* in *C. arvensis* resultierte in einer Erhöhung des Calystegin-Gehalts um 30 % in Blättern und um 40 % in den Wurzeln der Pflanze. Das sekretierte Protein  $\beta$ -Cryptogein fungierte als Elicitor und simulierte den Angriff des Pathogens auf die Pflanze (transgenes Mimikry), was zu einer gesteigerten Produktion von Sekundärstoffen führte (Chaudhuri et al., 2009).

### **A 1.3. Spezifische Eigenschaften der Tropinonreduktasen**

Tropinonreduktasen gehören zu der Enzymgruppe der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (short-chain dehydrogenases/reductases, SDR) (Jörnvall et al., 1995; Nakajima et al., 1998). SDRs kommen in hoher Anzahl in Pflanzen, aber auch in Tieren, dem Menschen, Bakterien und Pilzen vor. Die Enzyme besitzen die typische Rossmann-Faltung bei niedriger Aminosäure-Sequenzidentität von 15-30 %. Sie oxidieren NADPH oder NADH als Co-Substrate (Jörnvall et al., 1999; Kallberg et al., 2002; Moummou et al., 2012; Oppermann et al.,

2003). Im N-terminalen Bereich der Proteinsequenz befindet sich die Co-Substratbinderegion mit glycinreichen Motiven, C-terminal sind die Aminosäuren der katalytischen Tetrade (Serin, Tyrosin, Lysin, Asparagin) lokalisiert (Filling et al., 2002; Kallberg et al., 2002; Oppermann et al., 2003). Serin fixiert das Substrat über eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-Sauerstoff. Das Substrat, Tyrosin, Lysin, die Nikotinamid-Ribose von NADPH/NADH, Asparagin und ein Wassermolekül sind in einem „Protonen-Relay-System“ über Wasserstoffbrücken hintereinander geschaltet, sodass Tyrosin ein Proton auf den Carbonyl-Sauerstoff überträgt (Filling et al., 2002). Folgend wird das 4S-Hydrid des reduzierten Nikotinamidrings auf den Carbonyl-Kohlenstoff übertragen. Der Reaktionsmechanismus der SDRs wird als geordneter bi-bi-Mechanismus beschrieben. Dabei bindet das Co-Substrat zuerst und wird auch als letztes aus dem Enzym entlassen (Kavanagh et al., 2008).

TRI- und TRII-Enzyme unterscheiden sich *in vitro* in den Eigenschaften Substratspezifität, Substrataffinität ( $K_m$ ), Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und pH-Optimum. TRI-Enzyme reduzieren Tropinon stereospezifisch zu Tropin und oxidieren Tropin zurück zu Tropinon, während TRII-Enzyme nur die Reduktion von Tropinon katalysieren (Dräger, 2006). Einzig für die TRII aus *H. niger* (HnTRII) wurde die Fähigkeit zur Oxidation von Pseudotropin belegt, jedoch nur mit minimaler Aktivität, die 1,3 % der Reduktion entspricht (Hashimoto et al., 1992). Die Akzeptanz von Substratanaloga unterschiedlicher Größe und Ladung unterscheidet TRI von TRII-Enzymen. *In vitro* reduzieren TRI und TRII auch dem Tropinon strukturell ähnliche Carbonylverbindungen als Substrate: zyklische lipophile Ketone (3- und 4-Methylcyclohexanon), N-Methylpiperidone, Chinuclidinon, das Schwefel-Analogen des Tropinons (8-Thiabicyclo(3.2.1)octan-3-on, TBON) und demethyliertes Tropinon (Nortropinon). Die Molekülladung der Substrate ist entscheidend für die Umsetzung entweder durch TRI oder durch TRII. So werden das ungeladene TBON und Chinuclidinon nicht von TRII-Enzymen, aber von TRI-Enzymen reduziert. 4-Piperidone werden sehr gut von TRII- und kaum von TRI-Enzymen umgesetzt (Dräger, 2006; Hashimoto et al., 1992; Portsteffen et al., 1994). TRII-Enzyme sind charakterisiert durch höhere Substrataffinitäten zu Tropinon als TRI-Enzyme. TRI-Enzyme hingegen setzen durch eine schwächere Substrat- und Produkt-Fixierung mit schnellerer Reaktionsgeschwindigkeit um. Sie kennzeichnet ein enges pH-Optimum, meist pH 6,0-6,4 (Reduktion), im Vergleich zu TRII-Enzymen mit breiterem Optimum zwischen pH 5,0-6,25 (Reduktion) (Dräger, 2006). Bevorzugtes Co-

Substrat der Tropinonreduktasen ist NADPH, wobei die Affinität zu NADPH immer höher ist als zum Substrat Tropinon. NADH als Co-Substrat besitzt eine niedrigere Affinität als NADPH und wird nicht von allen bekannten Tropinonreduktasen akzeptiert. Einen Überblick über die katalytischen Parameter von TR-Enzymen wird in Tab. A- 1 gegeben.

Tab. A- 1: Katalytische Parameter von Tropinonreduktasen

*Ds* - *Datura stramonium*, *Hn* - *Hyoscyamus niger*, *St* - *Solanum tuberosum*, *Ws* - *Withania somnifera*, *Ab* - *Atropa belladonna*, n.b. - nicht bestimmt

Enzym	K <sub>m</sub> (μM)		K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)		pH Optimum Red./Ox.	Referenz
	Tropinon	NADPH		Tropin/ Pseudo-tropin	NADP		
DsTRI	775 <sup>a</sup> pH 5,9	58 <sup>c</sup>	25,6 <sup>b</sup> pH 7,0	180 <sup>c</sup>	105 <sup>c</sup>	6,4/9,9 <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Nakajima et al., 1994 <sup>b</sup> Nakajima et al., 1999a <sup>c</sup> Portsteffen et al., 1994
HnTRI	1010 pH 5,9	11,3	n.b.	2600	41,5	6,1/7,6	Hashimoto et al., 1992
StTRI	188 pH 6,0	n.b.	0,015 pH 6,0	n.b.	n.b.	6,0/n.b.	Kaiser et al., 2006
WsTRI	1270 pH 6,7	0,43	19,03	114949	96,15	6,7/n.b.	Kushwaha et al., 2013b
DsTRII	176 <sup>a</sup> pH 5,9	16 <sup>c</sup>	2,73 <sup>b</sup> pH 7,0	-	-	6,25 <sup>c</sup> breit/-	<sup>a</sup> Nakajima et al., 1994 <sup>b</sup> Nakajima et al., 1999a <sup>c</sup> Portsteffen et al., 1994
HnTRII	34 pH 5,9	6,1	n.b.	687	251	5,9 breit/n.b.	Hashimoto et al., 1992
StTRII	33 <sup>a</sup> pH 6,4	20 <sup>c</sup>	9,4 <sup>b</sup>	n.b.	n.b.	5,0 <sup>a</sup> breit/n.b.	<sup>a</sup> Keiner et al., 2002 <sup>b</sup> Kaiser et al., 2006 <sup>c</sup> Dräger, 2006
AbTRII	90 pH 6,25	21	n.b.	-	-	6,25 breit/-	Dräger and Schaal, 1994

TRI- und TRII-Enzyme aus *D. stramonium*, *A. belladonna*, *H. niger* und *S. tuberosum* besitzen eine Übereinstimmung von 64-65 % auf Aminosäureebene. Um die Proteinstruktur und die Substrat- und Co-Substrat-Bindung zu bestimmen, wurden die TRI und TRII aus *D. stramonium* kristallisiert. Beide Enzyme sind Dimere. Die Stereospezifität von TRI und TRII wird durch eine Umkehr der Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum erreicht, wobei die Position von NADPH unverändert bleibt: In TRII wird Tropinon durch ionische Wechselwirkung des Stickstoffs an Glutaminsäure fixiert, was eine hohe Affinität zur Folge hat. In TRI wird die Tropinon-Positionierung durch eine Abstoßung zwischen dem Stickstoff und einem positiv geladenen Histidin möglich. Diese schwächere Interaktion erklärt die niedrigere Affinität von Tropinon zu TRI-Enzymen (Nakajima et al., 1998; Yamashita et al.,

1999). Bei *in vitro* Mutationsstudien mit nur fünf ausgetauschten Aminosäuren konnte in DsTRI- und DsTRII-Enzymmutanten jeweils eine Umkehr der Stereospezifität erzeugt werden (Nakajima et al., 1999a). Zur Evolution von Tropinonreduktasen wird die Theorie verfolgt, dass in Tropanalkaloid-produzierenden Pflanzen ein unspezialisiertes TR-Enzym an der Substratbindestelle mutiert ist und dadurch die Tropinonbindung ermöglicht wurde (Nakajima et al., 1999c).

In einer vorangegangenen Arbeit von Dr. N. Reinhardt (MLU Halle-Wittenberg) wurde die Substratazeptanz Tropinonreduktase-ähnlicher Enzyme (TRLs) aus *A. thaliana* und der StTRI aus *S. tuberosum* untersucht (Reinhardt, 2014; Dr. N. Reinhardt, unveröffentlichte Ergebnisse): Die rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Einige der AtTRL-Enzyme und die StTRI sind in der Lage, *in vitro* verschiedene Jasmonate als Substrate zu akzeptieren. Hierbei wurde die Reduktion von (-)-Jasmonsäure, (±)-Jasmonsäure und der unpolarenen Methylester (±)-Methyljasmonat und (±)-Methyldihydrojasmonat mit der StTRI untersucht. Der Umsatz der bei der Reduktion gebildeten Produkte wurde durch GC-MS Analyse ausgewertet. Produkte aus der Reduktion von Jasmonaten an der Carbonylfunktion an Position C6 sind Cucurbinsäure-Derivate (CA). Nach Reduktion von (-)-Jasmonsäure sind zwei Stereoisomere als Produkte (*6-epi-7-iso* CA, *7-iso* CA) möglich. Aus racemischer Jasmonsäure entstehen vier mögliche Produkte (Enantiomerenpaar 1: *7-iso* CA/*6-epi-3-iso* CA, Enantiomerenpaar 2: *3-iso* CA/*6-epi-7-iso* CA (Abb. A- 3).

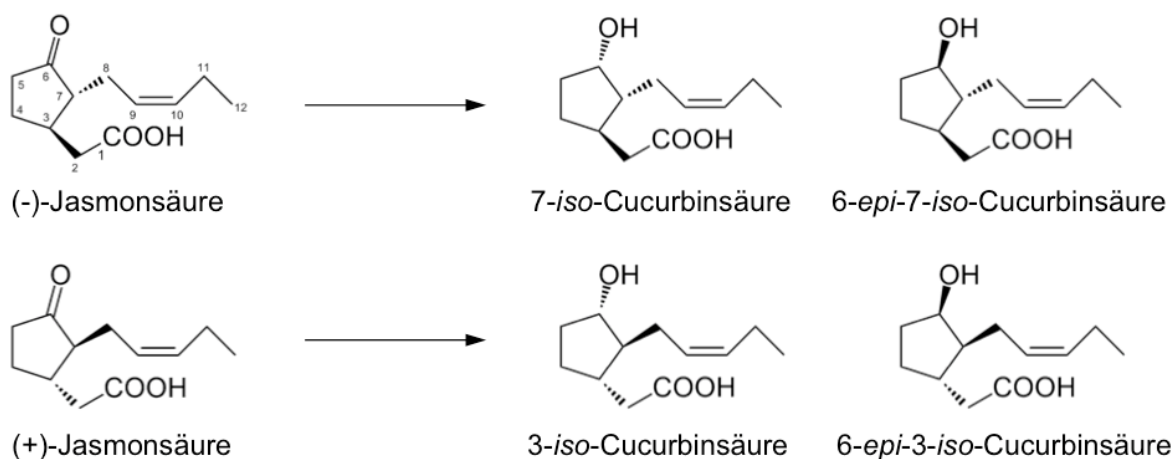


Abb. A- 3: Reduktion von Jasmonsäure

Reduktion von (-)-Jasmonsäure und (+)-Jasmonsäure zu Cucurbinsäure-Stereoisomeren (Dathe et al., 1993). Enantiomerenpaare: *7-iso*-Cucurbinsäure/*6-epi-3-iso*-Cucurbinsäure und *3-iso*-Cucurbinsäure/*6-epi-7-iso*-Cucurbinsäure.

Das Enzym StTRI reduzierte (-)-Jasmonsäure zu beiden Diastereomeren *6-epi-7-iso-CA* und *7-iso-CA* im Verhältnis 1:5. Für die Reduktion von ( $\pm$ )-Jasmonsäure, ( $\pm$ )-Methyljasmonat und ( $\pm$ )-Methyldihydrojasmonat bildete die StTRI jeweils zwei Diastereomere, wobei eine Trennung in die zwei jeweils dazugehörigen Enantiomere ohne Verwendung einer chiralen Säule nicht vorgenommen wurde (Dr. N. Reinhardt, unveröffentlichte Ergebnisse).

## A 1.4. Calystegine

### A 1.4.1 Struktur und Vorkommen

Calystegine sind polyhydroxylierte Nortropanalkaloide mit drei bis fünf Hydroxylgruppen an verschiedenen Positionen des Nortropan-Grundgerüsts. Sie werden nach der Zahl der Hydroxylgruppen und der Substituenten am Kohlenstoff oder Stickstoff in verschiedene Gruppen eingeteilt: trihydroxyliert (A-Calystegine), tetrahydroxyliert (B-Calystegine), pentahydroxyliert (C-Calystegine), Hydroxylgruppe an C1 durch Brückenkopf-Aminogruppe substituiert (N-Calystegine) und *N*-methyliert (*N*-Methylcalystegine). Die Hydroxylgruppe an Position C3 liegt meist in äquatorialer Stellung vor (Abb. A- 1). Ein typisches Merkmal der Calystegine ist die Brückenkopf-Hydroxylgruppe an Position C1, wodurch ein zyklisches Aminoketal gebildet wird (Dräger, 2004). Aufgrund der vielen Hydroxylgruppen als Substituenten sind Calystegine sehr hydrophile Moleküle. Sie liegen ungebunden, aber auch in glycosylierter Form, wie das 3- $\beta$ -Glucosid von Calystegin B<sub>1</sub> (Griffiths et al., 1996) und das 4- $\alpha$ -Galactosid von Calystegin B<sub>2</sub>, in *S. tuberosum* Knollen und in *Morus alba* vor (Asano et al., 2001a; Watson et al., 1999).

Calystegine wurden erstmals in Wurzelkulturen der Zaunwinde (*C. sepium*) und kurz danach in *Convolvulus arvensis* und *A. belladonna* entdeckt (Jung and Tepfer, 1987; Tepfer et al., 1988). Auch in Motten des Totenkopfschwärmers (*Acheronit atropos*) und in dem Schmetterling *Mechantia polymnia*, die sich von *Solanum*-Arten ernähren, wurden Calystegine gefunden. Für die Kartoffelpflanze wurden die Calystegine B<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> erstmals in Blättern und Knollen detektiert (Nash et al., 1993). Heute ist das Vorkommen der Calystegine für viele Gattungen der Solanaceae und Convolvulaceae nachgewiesen. Eine detaillierte Zusammenstellung des Vorkommens wird in Dräger (2004) und in Schimming et al. (2005) gegeben. Auch einige Gattungen der Brassicaceae enthalten Calystegine (Brock et al., 2006). Bei den Moraceae wurden Calystegine in der Gattung *Morus* (Asano et al., 2001a), bei

den Erythroxyloaceae in der Gattung *Erythroxyllum* identifiziert (Brock et al., 2005). Kürzlich wurde das Vorkommen von Calysteginen für einige Ericaceae nachgewiesen (Asano et al., 2014)

Calystegine akkumulieren in unterschiedlichen Pflanzenorganen als Stoffgemische verschiedener Zusammensetzung. Die am häufigsten in Pflanzen vorkommenden Calystegine sind Calystgin B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>1</sub> (Dräger, 2004). In *S. tuberosum* akkumulieren die Calystegine B<sub>2</sub> > A<sub>3</sub> > B<sub>4</sub> in der angegebenen Reihenfolge, dabei ist der Gehalt immer sortenabhängig (Friedman et al., 2003; Keiner, 2001). Für die Sorte Liu erreichen die Calystegine B<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> in den auskeimenden Augen der Knolle und in 3 mm kurzen Keimen einen Gesamtgehalt von 2.000-4.000 µg/g Frischmasse (FM). In der 3 mm Spitze eines 20 mm Keimes herrscht ein höherer Gesamtcalystegin-Gehalt von 1.200 µg/g FM im Vergleich zu den Knollen-nahen Abschnitten des Keimes. In den Blättern, Blüten und Wurzeln akkumulieren weniger Calystegine bis maximal 150 µg/g FM. Nach fünf Monaten Lagerungsdauer der Knollen verdreifachte sich der Calystegin-Gehalt in der Knollenschale ausgehend von 500 µg/g FM direkt nach der Ernte (Keiner and Dräger, 2000). Calystegine kommen häufig zusammen mit anderen Alkaloiden vor. In *S. tuberosum* akkumulieren Calystegine gemeinsam mit den Glycoalkaloiden α-Solanin und α-Chaconin (Friedman, 2004; Friedman et al., 2003). In *Erythroxyllum*-Arten kommen Calystegine zusammen mit dem Tropanalkaloid Cocain vor (Brock et al., 2005). Auch die Tropanalkaloide Hyoscyamin und Scopolamin akkumulieren gemeinsam mit Calysteginen in *Atropa*, *Datura* und *Hyoscyamus* (Dräger, 2004; Dräger et al., 1995). In einigen *Ipomoea*-Arten (Convolvulaceae) kommen Calystegine mit Indolizidinalkaloiden (Swainsonin), Pyrrolizidinalkaloiden oder Ergolinalkaloiden vor (Haraguchi et al., 2003; Jenett-Siems et al., 1998; Meira et al., 2012).

### A 1.4.2 Eigenschaften und mögliche natürliche Funktion

Calystegine sind aufgrund ihrer polyhydroxylierten Struktur Glycosidase-Inhibitoren. Glycosidasen (EC 3.2.1.) kommen ubiquitär vor und spalten reversibel glycosidische Bindungen. Sie katalysieren lebensnotwendige Prozesse, wie die Spaltung von Kohlenhydraten im menschlichen Darm oder den lysosomalen Abbau von Glycolipiden (Ballabio and Gieselmann, 2009; Watson et al., 2001). Diese Eigenschaften machen sie für den Einsatz als Antidiabetikum und zur Behandlung von lysosomalen Speicherkrankheiten interessant.



Calystegine hemmen Glycosidasen aus verschiedenen tierischen (Rind, Schwein, Ratte) und menschlichen Geweben wie Leber und Niere. Sie zeigen auch eine Hemmwirkung auf Glycosidasen aus Bakterien (*Caldocellum saccharolyticum*), Pilzen (*Aspergillus niger*) und Früchten (Mandel, Kaffeebohne). Eine kompetitive Hemmung der Calystegine wurde für Glucosidasen, Galactosidasen, Mannosidasen, Xylosidasen und Trehalasen gezeigt (Asano et al., 1997; Asano et al., 1995; Asano et al., 1996; Asano et al., 1994; Goldmann et al., 1996; Ikeda et al., 2003; Kato et al., 1997; Kato et al., 2011; Molyneux et al., 1993). Das in *S. tuberosum* am stärksten akkumulierte Calystegin B<sub>2</sub> ist ein potenter Inhibitor der pflanzlichen  $\beta$ -Glucosidase aus der Mandel (K<sub>i</sub> 1,2  $\mu$ M) und  $\alpha$ -Galactosidase aus der Kaffeebohne (K<sub>i</sub> 0,86  $\mu$ M), jedoch ein schwächerer Inhibitor der  $\beta$ -Galactosidase (K<sub>i</sub> 185  $\mu$ M) und  $\beta$ -Xylosidase (K<sub>i</sub> 60  $\mu$ M) der menschlichen Leber (Asano et al., 1995, Asano et al., 1997).

Der Transport der Calystegine durch *in vitro* Zellsysteme (Caco-2-Zellen) konnte nicht bestätigt werden, so wird auf eine geringe systemische Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation beim Menschen geschlossen. Die Calystegine B<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> als Inhibitoren von Maltase und Saccharase im menschlichen Dünndarm waren dem für Diabetes mellitus Typ 2 zugelassenen Arzneistoff Acarbose unterlegen. Calystegin B<sub>2</sub> (476  $\mu$ M) zeigte die beste Hemmwirkung auf Saccharase mit einem K<sub>i</sub> von 55  $\mu$ M gegenüber Acarbose (5  $\mu$ M) mit einem K<sub>i</sub> von 7,8  $\mu$ M (Jockovic et al., 2013). Neue synthetische Calystegin-Derivate, bezeichnet als Labystegine, hemmten die Maltase, Isomaltase und Saccharase stärker als das Antidiabetikum Miglitol und führten zu einer besseren Senkung des postprandialen Blutglucose-Levels bei Ratten (Kato et al., 2015). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Calystegine auch die menschliche  $\beta$ -Glucocerebrosidase der Lysosomen *in vitro* reversibel hemmen und gleichzeitig stabilisieren können (Chaperon-Effekt). Die Calystegine A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> erhöhten die intrazelluläre  $\beta$ -Glucocerebrosidase-Aktivität von Fibroblastenzellen, deren Aktivität durch eine Mutation stark gemindert war, auf das 1,5- und 1,7-fache. So wird ihr möglicher Einsatz in der Therapie der lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Gaucher diskutiert (Kato et al., 2014).

Calystegine könnten eine wichtige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle für Bodenbakterien in der Rhizosphäre sein. Von 42 getesteten Bodenbakterien war allerdings nur das Bakterium *Rhizobium meliloti* 41 in der Lage, Calystegine zu katabolisieren. Es werden bestimmte Calysteginkatabolismus-Gene (*cac*) dafür verantwortlich gemacht (Tepfer et al., 1988). Daraufhin wurde die Rhizosphäre von

Calystegin-bildenden Pflanzen (*C. sepium* und *C. arvensis*) und Pflanzen, die keine Calystegine bilden, auf das Vorhandensein von Bakterien mit *cac*-Genen untersucht. Nur in Rhizosphären-Isolaten der Calystegin-bildenden Pflanzen wurden *cac*-positive Bakterien wie z.B. *Pseudomonas fluorescens* identifiziert. Calystegin B<sub>2</sub> stimulierte das Wachstum von *R. meliloti*, hemmte aber nicht das Wachstum anderer *cac*-negativer *Rhizobium*- und *Agrobacterium*-Stämme. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Calystegin B<sub>2</sub> die Samenkeimung und das Streckungswachstum der Wurzel von Luzerne (*Medicago sativa*) hemmt (Goldmann et al., 1996). Auch das *cac*-positive Bakterium *Sinorhizobium meliloti* wuchs besonders gut in der Rhizosphäre von Calystegin-produzierenden Pflanzen (Guntli et al., 1999).

Ob Calystegine Abwehrsubstanzen gegen pflanzenpathogene Mikroorganismen sind, wurde bei *C. sepium* gegen den Pilz *Stagonospora convolvuli* untersucht. Calystegine hemmten nicht das Pilzwachstum und wurden nach Infektion der Pflanze auch nicht vermehrt gebildet. Die saure Invertase des Pilzes wurde nicht durch 10 mM Calystegin B<sub>2</sub> gehemmt, für die Invertase von *C. sepium* hingegen wurde ein Rückgang der Aktivität um mehr als die Hälfte gemessen (Höke and Dräger, 2004).

### **A 1.5. Ziele der Arbeit**

Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Funktionen der Tropinonreduktasen aus *S. tuberosum*, StTRI und StTRII, *in vivo* durch Generation und Untersuchungen an transgenen RNAi- und Überexpressionspflanzen zu bestätigen.

Die kinetischen Parameter und die Substratazeptanz der StTRI und StTRII wurden *in vitro* bereits charakterisiert und sind mit denen der TRI und TRII anderer Solanaceae vergleichbar. So ist die StTRI in der Lage, Tropinon zu Tropin zu reduzieren, die StTRII reduziert Tropinon zu Pseudotropin (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002). Es ist wahrscheinlich, dass diese *in vitro* gemessene Substratazeptanz auch der in der Pflanze entspricht. Belegt sind die Funktionen beider Enzyme jedoch erst dann, wenn nach Herabsetzen der Expression, z.B. durch RNAi, kein oder weniger Produkt oder nach Überexpression eines Biosynthesegens mehr Produkt *in vivo* messbar ist.

Die Kartoffelpflanze gehört nicht zu den Tropanalkaloid-bildenden Solanaceae, zeigt jedoch *TRI*-Transkript in Stolonen, Knollen, Blüten, Wurzeln und Keimen (Keiner, 2001). Auch TRI-Protein wird in Stolonen, Knollen und Keimen gebildet (Kaiser et al., 2006), endogen akkumulieren aber weder Tropin noch dessen Ester. Bisher ist nicht bewiesen, ob die StTRI ihre Fähigkeit zur Tropinbildung aus Tropinon auch *in vivo*

aufweist. TRI- und TRII-Enzyme reduzieren *in vitro* nicht nur die Carbonylgruppe des Tropinons, sondern setzen auch verschiedene andere Substrate mit Carbonylgruppen zu den entsprechenden Alkoholen um (Dräger, 2006). Deshalb ist anzunehmen, dass die StTRI auch eine andere Funktion als die Tropinonreduktion in der Pflanze übernimmt. In dieser Arbeit sollen durch Untersuchungen zur Tropinbildung an *StTRI* RNAi- und *StTRI* Überexpressionspflanzen Aussagen zu einer möglichen Funktion der StTRI *in vivo* getroffen werden. Weiterhin soll auf Unterschiede im Gehalt verschiedener Jasmonate geprüft werden.

Aufgrund der Fähigkeit des Enzyms StTRII, *in vitro* Pseudotropin durch Reduktion von Tropinon zu bilden, wird diese Reaktion auch in der Pflanze vermutet. Um diese Funktion *in vivo* zu bestätigen, sollen *StTRII* RNAi Pflanzen generiert werden. Ziel der Untersuchungen ist, ob durch Knockdown der *StTRII* die Pseudotropinbildung unterbrochen und eine verminderte Calysteginakkumulation in den Keimen von *S. tuberosum* erzeugt werden kann. Da bisher die Funktion der Calystegine in Pflanzen noch unbekannt ist, könnten Kartoffelpflanzen mit vermindertem Calystegin-Gehalt erstmals Hinweise dazu liefern. Ob Calystegine Hemmstoffe der Sporenkeimung des Kartoffelpathogens *P. infestans* sind, soll mittels der *StTRII* RNAi Pflanzen untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Generation von *S. tuberosum* mit erhöhter Calysteginakkumulation, um einen Vergleich des Phänotyps zwischen Pflanzen mit wenig, natürlichem und hohem Calystegin-Gehalt aufzustellen und damit weitere Hinweise auf die natürliche Funktion der Calystegine zu gewinnen. Zur Generation von *S. tuberosum* mit erhöhtem Calystegin-Gehalt wird die *D. stramonium* PMT (*DsPMT*) in der Kartoffelpflanze exprimiert. Die Expression von PMT als Eingangsenzym in den Sekundärstoffwechsel soll den Metabolitenfluss zu Tropinon verstärken. Gleichzeitig sollen die Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin quantifiziert werden um mögliche limitierende Schritte und Enzyme der Calysteginbiosynthese aufzuklären. Das Enzym StTRII wird nicht limitierend für die Calysteginbiosynthese angesehen (Richter et al., 2007) und deshalb nicht zur Überexpression gewählt (Richter et al., 2007).

Für diese Fragen werden mit verschiedenen Genkonstrukten stabil transformierte Kartoffelpflanzen (*StTRI* RNAi, *StTRI* Überexpression, *StTRII* RNAi, *DsPMT* Expression) umfassend untersucht auf:

1. Transkriptmengen der beteiligten Gene (*PMT*, *TRI*, *TRII*)
2. Akkumulation von Metaboliten des Primärstoffwechsels (Putrescin, Spermidin, Spermin) und des Sekundärstoffwechsels (*N*-Methylputrescin, Tropinon, Tropin, Pseudotropin, Calystegine und Jasmonate)
3. Phänotypische Veränderungen
4. Biomasse und Sporenkeimung von *P. infestans*

Das Genom der Kartoffelpflanze ist seit 2011 über die Datenbank des Potato Genome Sequencing Consortiums (PGSC, 2011; Sharma et al., 2013) zugänglich. Erstmals werden in dieser Arbeit Aussagen über das Vorkommen, die Häufigkeit und die genomische Struktur der Tropinonreduktasen, der Putrescin-*N*-methyltransferasen und der Spermidinsynthasen getroffen.

## B 2 Material und Methoden

### B 2.1 Material

#### B 2.1.1 *Solanum tuberosum* L.

Für alle Experimente mit Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) wurde als Wildtyp die Sorte Désirée (*S. tuberosum* L. cv. Désirée) genutzt. Als Vektorkontrolle (leerer Vektor, ohne Insert) diente die Linie pGPTV B2. Hierzu wurden Wildtyp Désirée Kartoffelpflanzen von A. Weinel (IPB, Halle) mit leerem Vektor pGPTV (Becker et al., 1992) transformiert. In dieser Arbeit wurden transgene Pflanzen aus Wildtyp Désirée Kartoffelpflanzen generiert, die mit den RNAi-Konstrukten für *StTRI* und *StTRII* (Vektor pHELLSGATE8: Helliwell et al., 2002; Wesley et al., 2001) sowie (Über)expressions-Konstrukten für *StTRI* und *DsPMT* (Vektor pGWB14: Nakagawa et al., 2007) transformiert wurden (B 2.2.3).

#### B 2.1.2 *Phytophthora infestans*

Für Hemmexperimente der Sporenkeimung und Infektionsexperimente wurde *P. infestans* Isolat 208m2, das mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) transformiert war, verwendet (Si-Ammour et al., 2003). *P. infestans* wurde von Prof. Dr. F. Mauch (Universität de Fribourg, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht erfolgte auf Hafer-Bohne-Medium (Tab. B- 2) im Dunkeln bei 18 °C für 11 bis 14 Tage (B 2.2.1).

#### B 2.1.3 *Escherichia coli*

Für Klonierungen wurden chemisch kompetente *E. coli* Bakterien (DH5 $\alpha$ , Grant et al., 1990) verwendet (B 2.2.4). Genotyp: F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>. Die Anzucht erfolgte auf LB-Platten oder in LB-Flüssigmedium bei 37 °C über Nacht unter Zusatz eines für die Selektion geeigneten Antibiotikums.

#### B 2.1.4 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von Kartoffelpflanzen (B 2.2.3) wurde der Bakterienstamm *A. tumefaciens* AGL-0 verwendet (Lazo et al., 1991). Genotyp: EHA101 pTiBo542 $\Delta$ T-region Mop<sup>+</sup>. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C auf LB-Platten oder in

LB-Flüssigmedium für zwei Tage unter Zusatz eines für die Selektion geeigneten Antibiotikums.

#### B 2.1.5 Chemikalien, Oligonukleotide, Enzyme und Kits

Verwendete Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth, Merck, Sigma-Aldrich, Fluka oder Appli-Chem in Analysenqualität bezogen. Lieferant für Castanospermin war die Firma Tocris Bioscience (United Kingdom).  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP wurde von der Firma Hartmann Analytik, Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert. Kits zur Extraktion von DNA/RNA und für Klonierungsarbeiten wurden von Fermentas/Thermo Scientific, Invitrogen, Sigma-Aldrich und Qiagen bezogen. Enzyme lieferten Fermentas, Invitrogen, New England Biolabs und Roche. Sonden für qRT-PCR wurden von Roche synthetisiert. Tab. B- 1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten, durch Synthese oder Extraktion gewonnenen Analysechemikalien:

Tab. B- 1: Chemikalien, durch Synthese oder Extraktion gewonnen

Chemikalie	Referenz	Gewinnung
(-)-Jasmonsäure	Prof. Dr. B. Hause (IPB, Halle), Kramell et al., 1996	Synthese
Cucurbinsäure	diese Arbeit (B 2.6.12)	Synthese
<sup>2</sup> D <sub>6</sub> -Jasmonsäure	Dr. G. Balcke (IPB, Halle), Miersch, 1991	Synthese
<sup>2</sup> D <sub>2</sub> -Jasmonsäure-Isoleucin	Dr. G. Balcke (IPB, Halle), Kramell et al., 1999	Synthese
<sup>2</sup> D <sub>5</sub> -OPDA	Dr. G. Balcke (IPB, Halle), Zimmerman and Feng, 1978	Synthese
Calystegine A <sub>3</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>4</sub>	Prof. Dr. N. Asano (Kanazawa University, Japan)	Extraktion
Calystegin B <sub>2</sub> (50 mM)	Dr. M. Mielke (MLU Halle-Wittenberg)	Extraktion
N-Methylputrescin	Prof. Dr. T. Hashimoto (Nara Institute of Science and Technology, Japan)	Synthese
Pseudotropin	Prof. Dr. B. Dräger (MLU Halle-Wittenberg), Nickon and Fieser, 1952	Synthese

#### B 2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

Als Lösungsmittel diente, soweit nicht anders angegeben, deionisiertes Wasser, das durch eine Milli-Q Anlage (Millipore) oder durch eine TKA-GenPure Anlage (TKA GmbH) gewonnen wurde. Hitzestabile Medien, Puffer und Lösungen wurden bei 121 °C und 2 bar Druck für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Flüssigkeiten wurden durch eine Membran der Porengröße 0,22 µm steril filtriert. Antibiotika und Inhaltsstoffe der Medien wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Biozym, Difco, Duchefa Biochemie, Sigma-Aldrich oder Serva bezogen.

Tab. B- 2: Zusammensetzung Medien und Lösungen zur Pflanzenkultur

<p><b>2(3) MS-Medium</b> Murashige und Skoog, 1962 0,441 % (m/V) MS-Salze (Duchefa Haarlem) 0,05 % (m/V) MES 0,6 % (m/V) Plant Agar 2(3) % (m/V) Saccharose pH 5,8 (Kaliumhydroxid)</p>	<p><b>Kokos-Nährlösung</b> (Atami Grow Products) 3,4 % (V/V) Stammlösung A (5,6 % (m/V) N; 4,69 % (m/V) K; 0,17 % (m/V) Na; 3,11 % (m/V) Ca; 0,91 % (m/V) Mg; 0,233 % (m/V) Fe; 0,001 % (m/V) Mn; 0,001 % (m/V) B) 1,4 % (V/V) Stammlösung B (0,74 % (m/V) N; 2,01 % (m/V) P; 5,38 % (m/V) K; 0,49 % (m/V) Mg; 1,07 % (m/V) S; 0,001 % (m/V) Fe; 0,032 % (m/V) Mn; 0,041 % (m/V) Zn; 0,011 % (m/V) B; 0,001 % (m/V) Cu; 0,002 % (m/V) Mo) 0,7 % (V/V) Salpetersäure konz. pH 5,8 (Kaliumhydroxid)</p>
<p><b>2CK-Medium</b> 0,1 % (V/V) Vitamin-Lösung 50 µg/ml Kanamycin 250 µg/ml Cefotaxim in 2MS-Medium</p>	<p><b>LB-Medium</b> 1 % (m/V) Bacto-Trypton 0,5 % (m/V) Hefe-Extrakt 0,5 % (m/V) Natriumchlorid (1,5 % (m/V) Agar)</p>
<p><b>2C-Medium</b> 0,1 % (V/V) Vitamin-Lösung 250 µg/ml Cefotaxim in 2 MS-Medium</p>	<p><b>SOB/SOC-Medium</b> Hanahan et al., 1983 2 % (m/V) Trypton 0,5 % (m/V) Hefeextrakt 10 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat <b>SOC:</b> + 20 mM Glucose pH 6,8-7,0</p>
<p><b>75K-Medium</b> 0,1 % (V/V) Vitamin-Lösung 250 µg/ml Cefotaxim 50 µg/ml Kanamycin 2 µg/ml Zeatinribosid 0,02 µg/ml 1-Naphthylelessigsäure 0,02 µg/ml Gibberellinsäure in GMS-Medium</p>	<p><b>Vitamin-Lösung</b> 0,5 mg/ml Nikotinsäure 0,5 mg/ml Pyridoxin-HCl 0,1 mg/ml Thiamin-HCl 2 mg/ml Glycin</p>
<p><b>76K-Medium</b> 0,1 % (V/V) Vitamin-Lösung 250 µg/ml Cefotaxim 50 µg/ml Kanamycin 5 µg/ml 1-Naphthylelessigsäure 0,1 µg/ml Benzylaminopurin in GMS-Medium</p>	<p><b>YEB-Medium</b> 0,5 % (m/V) Fleisch-Extrakt 0,1 % (m/V) Hefe-Extrakt 0,5 % (m/V) Pepton 0,5 % (m/V) Saccharose 2 mM Magnesiumsulfat (1,5 % (m/V) Agar)</p>
<p><b>GMS-Medium</b> 0,441 % (m/V) MS-Salze (Duchefa Haarlem) 0,05 % (m/V) MES 0,6 % (m/V) Plant Agar 1,6 % (m/V) Glucose pH 5,8 (Kaliumhydroxid)</p>	
<p><b>Hafer-Bohne-Medium</b> 3,4 % (m/v) Bohnenmehl 1,7 % (m/V) Hafermehl 8,5 % (m/V) Saccharose 1,5 % (m/V) Agarose</p>	

Tab. B- 3: Zusammensetzung Puffer und Lösungen

<p><b>1x MEN-Puffer</b>                      20 mM MOPS                      5 mM Natriumacetat                      1 mM EDTA                      pH 7,0 (Natriumhydroxid)</p>	<p><b>Lysispuffer Plasmidpräparation</b>                      15 % (m/V) Saccharose                      50 mM Tris-HCl                      50 mM EDTA</p>
<p><b>20x SSC-Lösung</b>                      3 M Natriumchlorid                      0,3 M Natriumtricitrat-Dihydrat</p>	<p><b>Neutralisierungslösung</b>                      1,5 M Natriumchlorid                      0,5 M Tris-HCl                      pH 7,0</p>
<p><b>Alkalische SDS-Lösung</b>                      0,2 M Natriumhydroxid                      1 % (m/V) SDS</p>	<p><b>PCI-Lösung</b>                      50 % (V/V) Phenol                      48 % (V/V) Chloroform                      2 % (V/V) Isoamylalkohol</p>
<p><b>Denaturierungslösung</b>                      1,5 M Natriumchlorid                      0,5 M Natriumhydroxid</p>	<p><b>Pflanzen-DNA Extraktionspuffer</b>                      100 mM Tris-HCl pH 8,0                      50 mM EDTA pH 8,0                      500 mM Natriumchlorid                      1,5 % SDS</p>
<p><b>DNA-Probenpuffer</b>                      10 mM EDTA pH 8,0                      30 % (V/V) Glycerol                      0,1 % (m/V) Bromphenolblau</p>	<p><b>RNA-Probenpuffer</b>                      52,8 % (V/V) Formamid                      10,6 % (V/V) 10x MOPS                      17 % (V/V) Formaldehyd                      12 % (V/V) ml Wasser                      7 % (V/V) Glycerol                      0,6 % (V/V) Bromphenolblau</p>
<p><b>High-Salt-Lösung</b>                      1,2 M Natriumchlorid                      0,8 M Natriumtricitrat</p>	<p><b>TE-Puffer</b>                      20 mM Tris-HCl                      1 mM EDTA                      pH 8,0</p>
<p><b>Hybridisierungspuffer</b>                      0,2 % PVP 40                      0,2 % Ficoll 400                      0,2 % BSA                      48 % (V/V) Lösung N                      48 % (V/V) Formamid                      120 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA</p>	<p><b>Trizol-Lösung</b>                      0,8 M Guanidiniumthiocyanat                      0,4 M Ammoniumthiocyanat                      100 mM Natriumacetat pH 5,0                      5 % (V/V) Glycerol                      45 % (V/V) Wasser                      50 % (V/V) Phenol</p>
<p><b>Lösung N</b>                      1,8 M Natriumchlorid                      100 mM Natriumdihydrogenphosphat                      10 mM EDTA                      0,2 % SDS                      pH 7,0</p>	<p><b>Transformationspuffer II</b>                      10 mM MOPS                      75 mM Calciumchlorid                      10 mM Rubidiumchlorid                      15 % (V/V) Glycerol                      pH 7,0</p>
<p><b>Transformationspuffer I</b>                      35 mM Kaliumacetat                      45 mM Manganchlorid                      100 mM Rubidiumchlorid                      10 mM Calciumchlorid                      15 % (V/V) Glycerol</p>	



### B 2.1.7 Datenbanken und Internetprogramme

Tab. B- 4: Datenbanken und Internetprogramme

Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (Rote Liste, 2015)	<a href="http://www.rote-liste.de">http://www.rote-liste.de</a>
Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen	<a href="http://www.fao.org">http://www.fao.org</a>
International Potato Center, Peru	<a href="http://cipotato.org">http://cipotato.org</a>
Genomdatenbank <i>S. tuberosum</i> (PGSC, 2011; Sharma et al., 2013)	<a href="http://solgenomics.net/">http://solgenomics.net/</a> <a href="http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml">http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml</a>
Massenspektren	<a href="http://webbook.nist.gov/chemistry">http://webbook.nist.gov/chemistry</a>
Sequenzvergleiche	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
Statistik, t-Test	<a href="http://vassarstats.net/">http://vassarstats.net/</a>

## B 2.2 Kultivierung, Transformation und Selektion der Organismen

### B 2.2.1 Kultivierung von *P. infestans*

*P. infestans* Dauerkulturen wurden freundlicherweise von M. Häußler (IPB, Halle) angelegt und bei -80 °C gelagert. Frisches Mycel wurde durch Ausstreichen der Dauerkultur oder durch Überimpfen von Mycel auf Hafer-Bohne-Kulturmedium (Tab. B- 2) gewonnen. Die Anzucht von *P. infestans* erfolgte durch Übertragen von Mycel auf Kulturmedium in Erlenmeyerkolben und Inkubation bei 18 °C im Dunkeln für 11 bis 14 Tage. Die Zoosporen wurden durch Überschichten der Sporangien mit 5 ml sterilem Wasser, kurzem Schwenken, Inkubation für 3-4 h bei 4 °C und Filtration der Suspension durch Gaze (Polyester, 20 µm Porengröße, Durocas) gewonnen.

### B 2.2.2 Kultivierung von *S. tuberosum*

Spross-Stecklinge von *S. tuberosum* wurden steril unter Langtagbedingungen (16 h Licht: 160 µE, 22 °C) in einer Phytokammer angezogen und nach Wurzelbildung in ein Gemisch aus gedämpfter Erde:Sand (1:1) umgetopft (Töpfe 11x11 cm). Die Kultivierung erfolgte in einer Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 200 µE, 20 °C, 8 h Dunkelheit, 18 °C, Luftfeuchte 70 %). Experimente mit Blättern wurden nach drei bis vier Wochen Pflanzenwachstum in der Phytokammer durchgeführt. Um saubere Wurzeln anzuziehen, wurden bewurzelte Spross-Stecklinge in Quarzsand umgetopft (Topfdurchmesser 8 cm) und drei bis vier Wochen in flüssiger Kokos-Nährlösung (Tab. B- 2) in der Phytokammer kultiviert. Zur Knollenbildung wurden drei bis vier Wochen alte Pflanzen in eine

Gewächshauskammer überführt (16 h Licht, 20 °C, 8 h Dunkelheit, 15 °C, Luftfeuchte 55-75 %) und bis zum Abreifen drei bis vier Monate kultiviert. Die Knollen wurden fünf bis sieben Monate bei 7 °C dunkel gelagert und bei Keimstart auf Raumtemperatur (Dunkellagerung) überführt. Um die Zeit bis zur Keimung zu beschleunigen, wurden Knollen für vier Wochen bei 7 °C dunkel gelagert und danach auf Raumtemperatur überführt bis die Keimung nach weiteren zwei Monaten startete. Zur Keimernte wurden die Knollen in dunklen Schubladen ausgelegt. Die Ernte der Keime (0,5-1 cm Länge) erfolgte ein- bis zweimal pro Woche über einen Zeitraum von vier bis fünf Monaten kumulativ bis keine Keime mehr nachwachsen.

### B 2.2.3 *A. tumefaciens*-vermittelte, stabile Transformation von *S. tuberosum*

Zur stabilen Transformation von *S. tuberosum* wurden Wildtyp-Pflanzen des Kultivars Désirée auf 2 MS-Medium (Tab. B- 2) steril angezogen. *A. tumefaciens* wurden in 20 ml YEB-Medium (Tab. B- 2) mit geeigneten Antibiotika (50 µg/ml Spectinomycin für pHELLSGATE8-Konstrukte (F 6.3), 50 µg/ml Kanamycin für pGWB14-Konstrukte (F 6.4) bei 28 °C im Inkubatorschüttler (zwei Tage, 150 upm) kultiviert. Die Agrobakterien-Suspension wurde zentrifugiert (8.000 upm, 10 min, 4 °C), der Überstand dekantiert und verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml steril filtrierter 10 mM Magnesiumsulfat-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (8.000 upm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 10 ml sterilem 3 MS-Medium (Tab. B- 2) wurde das Bakterienpellet suspendiert und auf Eis gelagert.

Zur Vorbereitung der Blattscheibentransformation wurden sechs Petrischalen mit 10 ml sterilem 3 MS-Medium gefüllt. Blätter der Wildtyp-Kartoffelpflanzen wurden mit einem Skalpell abgeschnitten und auf der Blattunterseite fünf- bis sechsmal quer über die Mittelrippe angeritzt. In jede Petrischale wurden 12 bis 14 Blätter mit der Blattunterseite nach oben auf das 3 MS-Medium gelegt. 100 µl Agrobaktériensuspension wurden in das 3 MS-Medium zwischen die Blätter gegeben und durch Schwenken verteilt. Die Petrischalen wurden verschlossen, in Alufolie eingewickelt und zwei Tage bei 20 °C inkubiert. Danach wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf 76K-Medium (Tab. B- 2) überführt. Nach weiteren sieben Tagen erfolgte das Umsetzen der Blätter auf 75K-Medium (Tab. B- 2) zur Sprossinduktion. Die Blätter wurden nun alle ein bis zwei Wochen auf 75K-Medium umgesetzt bis Sprosse zu einer Länge von 1 cm heranwachsen. Diese wurden abgeschnitten und auf hormonfreiem 2CK-Medium (Tab. B- 2) zur Wurzelbildung angeregt. Kanamycin

im 2CK-Medium diente der Selektion von transformierten Spross-Stecklingen und Cefotaxim der Verhinderung der Kontamination mit *A. tumefaciens*. Positive Transformanden wurden durch Southern- und Northern-Blot Analyse identifiziert und auf 2C-Medium (Tab. B- 2) weitervermehrt. Die Transformation und die Kultivierung der Kartoffelpflanzen erfolgte steril unter Langtagbedingungen in einer Phytokammer (16 h Licht, 200  $\mu$ E, 20 °C, 8 h Dunkelheit, 18 °C).

#### B 2.2.4 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

250 ml SOB-Flüssigmedium (Tab. B- 2) wurden mit einer über Nacht bei 37 °C angezogenen Vorkultur von *E. coli*-Zellen (DH5 $\alpha$ ) angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 150 upm bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,48-0,6 weiter angezogen. Die Kultur wurde in 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und zentrifugiert (3.000 upm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 15 ml auf Eis gekühltem Transformationspuffer I (Tab. B- 3) vorsichtig resuspendiert. Es schloss sich eine Inkubation für 1-2 h auf Eis, eine Zentrifugation (4.000 upm, 5 min, 4 °C) und das Resuspendieren der Pellets je in 4 ml Transformationspuffer II (Tab. B- 3) an. Die kompetenten Zellen wurden je zu 100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Herstellung wurde freundlicherweise durch U. Smolka (IPB, Halle) übernommen.

Zur Transformation wurden 4  $\mu$ l der TOPO-Cloning Reaktion (pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen) zu 200  $\mu$ l kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde leicht geschwenkt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C, danach wurden die Zellen 1 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l SOC-Medium (Tab. B- 2) folgte die Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C (150 upm) für 1-3 h. 50-200  $\mu$ l der Zellsuspension wurden auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### B 2.2.5 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen (AGL-0) erfolgte nach Höfgen und Willmitzer (1988) und wurde freundlicherweise durch U. Smolka (IPB, Halle) übernommen. Zur Transformation wurden 200  $\mu$ l chemisch kompetente Zellen für 30 min auf Eis aufgetaut. Danach wurden 2-4  $\mu$ g Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben, das Reaktionsgefäß wurde leicht geschwenkt und 5 min auf Eis gekühlt. Es

folgten die Inkubation in flüssigem Stickstoff für 5 min und ein Hitzeschock bei 37 °C für weitere 5 min. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium (Tab. B- 2) wurden die Zellen bei 28 °C im Schüttelinkubator (150 upm) für 1-3 h inkubiert. 50-200 µl der Zellsuspension wurden auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

### **B 2.3 Phänotypische Untersuchungen der transgenen Pflanzen**

#### B 2.3.1 Pflanzenwachstum

Die transgenen Pflanzen der verschiedenen Transformationen wurden während ihres drei- bis vierwöchigen Wachstums in der Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 20 °C, 8 h Dunkelheit, 18 °C, Luftfeuchte: 70 %) und während der drei- bis viermonatigen Reifezeit der Knollen in einer Gewächshauskammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 20 °C, 8 h Dunkelheit, 15 °C, Luftfeuchte: 55-75 %) mit Kontrollpflanzen (Wildtyp und Leervektor) phänotypisch verglichen. Vergleichsparameter zur Beurteilung möglicher oberirdisch sichtbarer Unterschiede des Habitus und Wachstums der Pflanzen waren:

- Wachstum: Gleichmäßigkeit, Wachstumsverzögerungen
- Blätter: Färbung, Form und Größe
- Blüten: Bildung, Färbung, Form und Größe der Blütenbestandteile
- Reife und Seneszenz: Veränderung des Habitus, zeitliche Verzögerungen

#### B 2.3.2 Kartoffelknollen

Die Knollenbildung der Kartoffelpflanzen erfolgte in Erde:Sand 1:1 (Töpfe 11x11 cm) in einer Gewächshauskammer unter Langtagbedingungen über einen Zeitraum von drei bis vier Monaten. Nach dem vollständigen Abwelken der Pflanzen wurden die Knollen geerntet und verschiedenen Tests unterzogen:

- Bestimmung des Gesamtknollengewichts aller Knollen einer Pflanze
- Bestimmung der Anzahl der gebildeten Knollen einer Pflanze
- Analyse und fotografische Dokumentation des Knollenaussehens (Form, Farbe und Größe) aller gebildeter Knollen einer Pflanze

#### B 2.3.3 Kartoffelkeime

Kartoffelknollen wurden nach der Ernte in einer Kältekammer bei 7 °C dunkel gelagert. Nach einer Dormanz von fünf bis sieben Monaten startete die Keimung. Die keimenden Knollen wurden auf Raumtemperatur überführt und die gesamte Zeit der

Keimung weiterhin dunkel gelagert. Um die Dormanz zu beschleunigen wurden Knollen für je zwei Experimente mit *StTRII* RNAi Linien und *DsPMT* Überexpressionslinien nach verkürzter vierwöchiger Kaltlagerung bei 7 °C zur Keimung auf Raumtemperatur überführt. Der Startzeitpunkt der Keimung wurde für jedes Experiment durch Vergleich der transgenen Linien mit den dazugehörigen Kontrollen ermittelt. Keime der Knollen einer Pflanze (Länge: 0,5-1 cm) wurden kumulativ über einen Zeitraum von ca. vier bis fünf Monaten geerntet, zu einer Probe gepoolt und bei -80 °C gelagert. Das Aussehen der Keime wurde vor der Keimernte hinsichtlich möglicher unterschiedlicher Formen, Farben und Längen der Keime beurteilt und pro Experiment einmal fotografisch dokumentiert. Nach dem Ende der Keimungszeit wurden die Gewichte der aus den Knollen einer Pflanze produzierten Keime ermittelt. Das Keimmaterial wurde danach für die Gehaltsbestimmung von Calysteginen (B 2.6.7, B 2.6.8, B 2.6.9) eingesetzt.

## **B 2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **B 2.4.1 RNA-Isolation (Trizol-Methode)**

200 mg gefrorenes, gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml Trizol-Lösung (Tab. B- 3) versetzt und 1 min kräftig geschüttelt (2.500 upm). Anschließend wurde für 5 min bei RT inkubiert und nochmals für 1 min kräftig geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und erneutes Schütteln für 20 s. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde zentrifugiert (13.000 upm, 15 min, 4 °C). 500 µl wässriger, klarer Überstand wurde zur RNA-Fällung mit 250 µl Isopropanol und 250 µl High-Salt-Lösung (Tab. B- 3) versetzt. Nach Inkubation für 10 min bei RT wurde die RNA durch Zentrifugation (13.000 upm, 10 min, 4 °C,) pelletiert und mit 500 µl kaltem 70 % (V/V) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 15 min bei RT getrocknet, in 30 µl sterilem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

### **B 2.4.2 DNase Verdau**

Nach Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe (B 2.4.1) wurde die enthaltene DNA durch DNase verdaut (RNase-Free DNase Set, Qiagen). Dazu wurden 2 µg Gesamt-RNA in 4 µl Wasser aliquotiert und mit 1 µl 10 x RDD-Puffer, 1 µl DNase I (1 U) und 4 µl RNase freiem Wasser versetzt. Es folgte die Inkubation für 30 min bei 37 °C, Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA-Lösung, Inkubation für 10 min bei 65 °C und Kühlung auf 4 °C.

### B 2.4.3 cDNA Synthese

Nach dem DNase-Verdau (B 2.4.2) erfolgte die First Strand cDNA-Synthese mittels des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas) nach Angaben des Herstellers. Pro Ansatz kamen 2 µg Gesamt-RNA, Oligo(dt)<sub>18</sub> Primer, Ribolock RNase Inhibitor (20 U), dNTP-Mix und RevertAid H<sup>-</sup>Reverse Transkriptase (200 U) zum Einsatz. Die cDNA-Synthese erfolgte durch Inkubation bei 37 °C für 5 min, 42 °C für 60 min und 70 °C für 10 min. Anschließend wurde die cDNA 1:10 mit Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### B 2.4.4 DNA-Isolation (für Southern-Blot)

200 mg gefrorenes, gemörseretes Blattmaterial wurde mit 1 ml Pflanzen-DNA Extraktionspuffer (Tab. B- 3) gemischt und 10 min im Wasserbad bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 5 M Kaliumacetat wurde 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (13.000 upm, 10 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde mit 800 µl PCI-Lösung (Tab. B- 3) versetzt und 60 min durch leichtes Schwenken gemischt. Nach Zentrifugation (13.000 upm, 5 min, 4 °C) wurde die obere, wässrige Phase mit 800 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die genomische DNA wurde durch Zentrifugation (13.000 upm, 10 min, 4 °C) pelletiert und mit 1 ml 70 % (V/V) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei 40 °C getrocknet und in 15 µl sterilem Wasser gelöst.

### B 2.4.5 Plasmidpräparation aus *E. coli* Bakterien

Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte in 2 ml, 5 ml oder 50 ml LB-Flüssigmedium bei 37 °C im Schüttelinkubator (150 upm) über Nacht unter Zusatz eines zur Selektion geeigneten Antibiotikums.

Aus LB-Flüssigkulturen (2 ml, 50 ml) wurde Plasmid-DNA mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) für die 2 ml Kultur oder mithilfe des QIAfilter Midi Kits (Qiagen) für die 50 ml Kultur nach Angaben des Herstellers präpariert. Zuvor wurde aus der 50 ml Kultur eine Glycerolkultur aus 750 µl Bakteriensuspension und 750 µl sterilem 50 %-igen (V/V) Glycerol angelegt. Diese wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und dauerhaft bei -80 °C gelagert.

Neben der Kit-Aufreinigung wurde die Plasmid-DNA aus der 5 ml LB-Flüssigkultur alternativ isoliert: Die Flüssigkultur wurde zentrifugiert (13.000 upm, 5 min, 4 °C) und das Bakterienpellet in Lysispuffer (Tab. B- 3) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 M Natriumhydroxid, 1 % (m/V) SDS) und 5 min

Inkubation auf Eis (Bakterienlyse) wurden zur Neutralisation 150 µl 3 M Kaliumacetat-Lösung zugegeben. Es folgte eine erneute Inkubation auf Eis (5 min) und Zentrifugation (13.000 upm, 10 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde mit 270 µl Isopropanol versetzt und die DNA 10 min bei RT gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (13.000 upm, 10 min, 4 °C) pelletiert und mit 100 µl 70 % (V/V) Ethanol gewaschen. Nach Trocknung für 5 min bei 37 °C wurde das Pellet in 20 µl sterilem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### B 2.4.6 Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens* Bakterien

Die Bakterien wurden in 50 ml LB-Flüssigmedium für zwei Tage mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion bei 28 °C im Schüttelinkubator (150 upm) angezogen. Die DNA-Isolation erfolgte mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) mit folgenden Abwandlungen zu dem Herstellerprotokoll: Zur alkalischen Lyse mit Puffer P2 wurden die Bakterien 5 min bei RT inkubiert. Um Bakterienzelltrümmer vom Lysat abzutrennen erfolgte nach Zugabe von Puffer N3 eine auf 20 min verlängerte Zentrifugation bei 13.000 upm. Die Plasmid-DNA wurde mit 20 µl Puffer EB (70 °C) eluiert.

#### B 2.4.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen für Klonierungsschritte (B 2.4.8) und zur Herstellung von Sonden für Southern- oder Northern-Blot Analysen (B 2.4.15, B 2.4.16) zu gewinnen, wurden diese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

#### B 2.4.8 Klonierungen

PCR-Produkte für Klonierungsschritte wurden mit *Pfu* DNA-Polymerase (Fermentas) unter Verwendung von CACC-erweiterten Primern amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tab. F- 2 zusammengefasst. Die PCR-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (B 2.4.10), durch Gelextraktion gereinigt (B 2.4.7) und in die Vektoren pENTR oder pCR8 mithilfe des pENTR™/D-TOPO® Cloning Kits oder pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben kloniert. Es schloss sich die Transformation von kompetenten DH5α-Zellen an (B 2.2.4). Subklonierungen in die binären Vektoren pHELLSGATE8 (F 6.2.3) und pGWB14 (F 6.2.4) erfolgten durch LR-Clonase-Reaktion mithilfe des Gateway® LR Clonase® II

Enzym-Mixes (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem binären Vektor transformiert (B 2.2.4). Nach Plasmidextraktion (B 2.4.5) und Verdau des Vektors mit mindestens drei verschiedenen Restriktionsenzymen (B 2.4.9) erfolgte die Transformation von *A. tumefaciens* mit dem binären Vektor (B 2.2.5).

### B 2.4.9 Restriktionsverdau von Vektoren

Zur Kontrolle der Klonierung von Fragmenten in die Vektoren pENTR und pCR8 sowie zur Kontrolle der LR-Clonase-Reaktion für die Vektoren pHELLSGATE8 und pGWB14 wurde die Plasmid-DNA (B 2.4.5) mit mindestens drei verschiedenen Restriktionsenzymen (Fermentas, Invitrogen, New England Biolabs) für 1-3 h bei 37 °C entsprechend den Angaben des Herstellers verdaut.

### B 2.4.10 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Elektrophorese

Durch Restriktionsverdau von Vektoren (B 2.4.9), von genomischer DNA für Southern-Blot Analysen (B 2.4.15) und durch PCR-Reaktionen (B 2.4.11) wurden DNA-Fragmente verschiedener Größen erzeugt. Die DNA-Proben wurden zu einem Anteil von 10 % mit DNA-Probenpuffer (Tab. B- 3) versetzt und auf einem 1-2 %-igen Agarosegel bei einer Spannung von 80 mV aufgetrennt. Als DNA-Größenmarker wurde  $\lambda$ -*Pst*I-Marker verwendet, als Gel- und Elektrophoresepuffer diente TE-Puffer (Tab. B- 3). Zur Färbung der DNA wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromid-Lösung (1,6 mg/l) inkubiert und anschließend im UV-Licht ausgewertet.

### B 2.4.11 PCR mit Plasmid-DNA, cDNA

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA und cDNA erfolgte mit 1-100 ng DNA, 0,2 mM dNTP-Mix, je 100 pmol genspezifischen Primern, 5  $\mu$ l 10x *Pfu*-Puffer mit Magnesiumsulfat (Fermentas) und 1,25 U *Pfu* DNA-Polymerase (Fermentas) in einem Volumen zu 50  $\mu$ l Wasser. PCR-Programm: 2 min initiale Denaturierung bei 94 °C, 40 Zyklen bestehend aus 10-30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Primeranlagerung bei 45-55 °C, 2 min/kb Elongation und abschließende Elongation für 7 min bei 72 °C.

### B 2.4.12 Kolonie-PCR für *E. coli*

Eine Kolonie-PCR erfolgte nach Aufschluss der Bakterienzellen. Dazu wurden Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und zuerst auf eine LB-



Agarplatte mit geeignetem Selektionsantibiotikum, danach in ein PCR-Gefäß mit 20 µl Wasser überführt. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch die Inkubation für 10 min bei 95 °C, einen Kälteschock für 10 min bei -80 °C und erneutes Erhitzen für 5 min bei 95 °C. Es wurden 3 µl 10x DreamTaq Puffer (Fermentas), 0,2 mM dNTP-Mix, je 50 pmol genspezifische Primer und 2,5 U DreamTaq<sup>TM</sup> DNA-Polymerase (Fermentas) zu 50 µl Wasser ergänzt. PCR-Programm: 2 min initiale Denaturierung bei 94 °C, 40 Zyklen bestehend aus 20 s Denaturierung für 94 °C, 30 s Primeranlagerung bei 45-55 °C, 1 min/kb Elongation bei 72 °C und abschließende Elongation für 5 min bei 72 °C.

#### B 2.4.13 Kolonie-PCR für *A. tumefaciens*

Nach basischem Zellaufschluss erfolgte die Kolonie-PCR. Dafür wurden Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und zuerst auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Selektions-Antibiotikum, danach in ein PCR-Gefäß mit 10 µl 20 mM Natriumhydroxid überführt. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch die Inkubation für 8 min bei 37 °C. Pro Ansatz wurden 2 µl Lysat in ein neues PCR-Gefäß überführt und 2 µl 10x DreamTaq Puffer (Fermentas), 0,2 mM dNTP-Mix, je 40 pmol genspezifische Primer und 1 U DreamTaq<sup>TM</sup> DNA-Polymerase (Fermentas) zu einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit Wasser ergänzt. PCR-Programm analog B 2.4.12.

#### B 2.4.14 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) zur Transkriptmengenquantifizierung

Die Bestimmung der Transkriptabundanz erfolgte mittels quantitativer PCR in Triplikaten. Die PCR-Reaktionen erfolgten in 96-Well-Platten mit dem Maxima<sup>TM</sup> Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific), je 900 nM genspezifischen Primern, der genspezifischen Taqman-Sonde (Roche) und 10 ng cDNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl Wasser. Der Referenzfarbstoff ROX (5-Carboxyrhodamin-X) war im Master Mix enthalten. Verwendete Primer und Sonden sind in Tab. F- 3 aufgelistet. Für die PCR und die Bestimmung der Transkriptmengenakkumulation wurde ein Mx3005P qPCR System (Agilent) und die Herstellersoftware (MxPro) verwendet. Die relative Expression der Zielgene wurde auf den Expressionslevel des Haushaltsgens *StEF1α* (AB061263) normalisiert (Nicot et al., 2005) und mit der  $\Delta C_t$ -Methode ( $2^{-\Delta C_t}$ ) berechnet (Schmittgen and Livak, 2008).

### B 2.4.15 Southern-Blot

Isolierte genomische Pflanzen-DNA (B 2.4.4) wurde mit einem oder zwei Restriktionsenzymen (je 10 U) nach Herstellerangaben unter Zugabe von 10 µg RNase A (Fermentas) über Nacht bei 37 °C gespalten. Die Fragmente wurden auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt (B 2.4.10). Das Gel wurde 45 min in 200 ml Denaturierungslösung (Tab. B- 3) inkubiert, anschließend zweimal mit Wasser gewaschen und 45 min in Neutralisierungslösung (Tab. B- 3) inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit Wasser, danach wurde das Gel über Nacht durch Kapillarkraft auf eine positiv geladene Nylonmembran (Nylon Membranes, positively charged, Roche) geblotet. Hierzu wurden ein Stapel Papierhandtücher, gefolgt von zwei Schichten in 20x SSC-Puffer (Tab. B- 3) getränktem Blotting-Papier (Blotting Pad, 11x14 cm, Almohadillas para) und die in 20x SSC-Puffer getränkte positiv geladene Nylonmembran übereinander gelegt. Das DNA-Gel wurde anschließend auf die Membran geschichtet und mit einer Lage von in 20x SSC-Puffer getränktem Blotting-Papier bedeckt. Ein langer, ebenfalls mit 20x SSC-Puffer befeuchteter Filterpapierstreifen wurde über das letzte Blotting-Papier gelegt, die Enden tauchten jeweils in 20x SSC-Puffer. Um die Verdunstung des SSC-Puffers zu verhindern wurde der Blot über Nacht mit einer Folie abgedeckt. Nach dem Blotten wurde die Nylonmembran 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde durch Crosslinken mittels UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker, Stratagene), wobei die obere Membranseite 2 min und die untere Membranseite 1 min mit UV-Licht bestrahlt wurden. Danach wurde die Membran mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (B 2.4.17).

### B 2.4.16 Northern-Blot

Mithilfe der Trizol-Methode (B 2.4.1) isolierte Pflanzen-RNA wurde zu 10-20 µg RNA in 20 µl Wasser aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Nach langsamen Auftauen der RNA-Proben auf Eis wurde die RNA-Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt. Es folgte eine Aliquotierung auf 20 µg Gesamt-RNA in 20 µl Wasser. Die Proben wurden mit 5 µl RNA-Probenpuffer (Tab. B- 3) und 0,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (100 µg/ml) versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Danach wurden sie bis zum Auftrag auf das RNA-Gel auf Eis gekühlt. Das aufgetragene Probevolumen betrug 25 µl. Die Elektrophorese fand unter denaturierenden Bedingungen mit Gelen bestehend aus 1 % (m/V) Agarose und

5 % (V/V) Formaldehyd statt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1x MEN-Puffer (Tab. B- 3). Die RNA wurde bei einer Spannung von 80 mV aufgetrennt und die Banden unter UV-Licht ausgewertet. Anschließend wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet und durch UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden (B 2.4.15). Es schloss sich die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde an (B 2.4.17).

#### B 2.4.17 Southern- und Northern-Hybridisierungen

Zur Herstellung der Sonden für Southern-Hybridisierungen wurden DNA-Fragmente bestehend aus einem Teil des jeweiligen Inserts (RNAi-Fragment oder Ganzlängen-Sequenz) und einem Teil der angrenzenden Vektorsequenz von pHELLSGATE8 (F 6.2.3) bzw. pGWB14 (F 6.2.4) verwendet (siehe Anhang, F 6.5). Die Fragmente wurden durch Restriktionsspaltung des Vektors (B 2.4.9), Gelelektrophorese (B 2.4.10) und anschließender Gelextraktion (B 2.4.7) gewonnen. Für Northern-Hybridisierungen wurden vollständige offene Leserahmen der *StTRI* und *DsPMT* durch PCR (B 2.4.11) aus den Vektoren pENTR (F 6.2.1) oder pCR8 (F 6.2.2) gewonnen. Die Fragmente wurden ebenfalls durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Gelextraktion isoliert.

Die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden erfolgte mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP unter Verwendung des Amersham Megaprime DNA Labeling Kits (GE Healthcare). Dazu wurden 5  $\mu$ l DNA und 5  $\mu$ l Primer 5 min bei 95 °C denaturiert. Je 4  $\mu$ l dTTP, dCTP, dGTP, 5  $\mu$ l Reaktionspuffer und 16  $\mu$ l Wasser wurden zugegeben. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP und 2  $\mu$ l Klenow-Fragment (1 U/ $\mu$ l) wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der Sonde erfolgte über eine Sephadex-Säule (ProbeQuant™ G-50 Micro Columns, GE Healthcare) durch Zentrifugation (3.000 upm, 3 min). Der Reaktionsansatz wurde anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert und zu 20 ml Hybridisierungspuffer (Tab. B- 3), in dem die Membran bereits 1 h bei 42 °C vorhybridisiert wurde, gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über 24 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen. Anschließend wurde die Membran dreimal 20 min bei 65 °C mit 50 ml 3x SSC-Puffer + 0,5 % (V/V) SDS gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Einwickeln in Kunststoffolie wurde die Membran auf einen Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics) gelegt und in einer Metallkassette verschossen. Nach einem bis sieben Tagen erfolgte die Detektion der Signale mit einem Phosphor-Imager (Typhoon 9410, Amersham Biosciences).

## **B 2.5 Bioassays**

### **B 2.5.1 Infektion von Kartoffelblättern mit *P. infestans* und Biomassebestimmung durch q-PCR**

*P. infestans* Sporensuspension (B 2.2.1) wurde auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Sporen/ml eingestellt (Luna™ Automated Cell Counter, Logos) und danach auf Eis gekühlt. Blätter von drei bis vier Wochen alten Kartoffelpflanzen wurden an der Unterseite mit je sechs Tropfen á  $10 \mu\text{l}$  Sporensuspension inokuliert und mit einem Kordelzugbeutel (160x240 mm, LDPE,  $50 \mu\text{m}$ , Roth) umhüllt. Während der Inokulation wurde die Suspension häufig geschwenkt um eine gleichmäßige Verteilung der Sporen zu gewährleisten. Nach drei Tagen wurden die infizierten Blattscheiben mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 6 mm) ausgestochen. Die Biomasse von *P. infestans* wurde durch q-PCR bestimmt (Eschen-Lippold et al., 2007).

### **B 2.5.2 Sporenkeimungsassay mit *P. infestans* und Calysteginen sowie Keimextrakten von *StTRII* RNAi Pflanzen**

*P. infestans* Sporensuspension (B 2.2.1) wurde auf eine Konzentration von  $2 \cdot 5 \cdot 10^5$  Sporen/ml eingestellt. Calystegin B<sub>2</sub>-Lösung (Reinheit: 80 %), wurde freundlicherweise von Dr. M. Mielke (MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Pro Assay wurden jeweils  $98 \mu\text{l}$  *P. infestans* Sporensuspension ( $2 \cdot 10^5$  Sporen/ml) und  $2 \mu\text{l}$  Calystegin B<sub>2</sub>-Lösung gemischt, so dass eine Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$  Calystegin B<sub>2</sub> erhalten wurde. Weiterhin wurden Keim-Extrakte von Désirée Wildtyp Kartoffelpflanzen, Leervektor und der *StTRII* RNAi Linien A und O aus  $1,0 \text{ g}$  Frischmasse durch zweimalige methanolisch-wässrige Extraktion mit je  $10 \text{ ml}$  Methanol:Wasser (1:1) gewonnen und auf ein Volumen von  $0,5 \text{ ml}$  eingeeengt. Eine Lösungsmittel-Kontrolle wurde mitgeführt. Um einen zu den Keimen physiologischen Calystegin-Gehalt im Assay zu erreichen wurde der auf  $0,5 \text{ ml}$  eingeeengte Keimextrakt im Assay wieder 1:1 verdünnt. In den Sporenkeimungsassays wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  *P. infestans* Sporensuspension ( $5 \cdot 10^5$  Sporen/ml) mit  $50 \mu\text{l}$  Keimextrakt oder  $50 \mu\text{l}$   $30 \text{ mM}$  Calystegin B<sub>2</sub> oder Wasser gemischt. Alle Sporenkeimungsassays wurden bei  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 Stunden im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die gekeimten und nicht gekeimten Sporen auf Fotos unter Nutzung des Fotomikroskops Nikon AZ100 (Vergrößerung 16-fach, Fläche pro Foto  $0,6 \text{ mm}^2$ ) ausgezählt. Pro Foto wurden zwischen 20 und 50 Sporen registriert. Jeder Assay wurde dreifach angesetzt und durch 15 Fotos ausgewertet.

## B 2.6 Isolation und Analytik pflanzlicher Sekundärstoffe

### B 2.6.1 Fütterungsversuche mit Tropinon

*S. tuberosum* Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 20 °C, 8 h Dunkelheit, 20 °C, Luftfeuchte: 70 %) für vier Wochen in einer Phytokammer angezogen. Für den Fütterungsversuch wurden zwei bis drei Blätter einer Pflanze in ein Gefäß mit 20 ml 5 mM Tropinon-Lösung pH 7,0 oder Wasser zur Kontrolle gestellt. Die Tropinon-Lösung und das Wasser wurden alle zwei bis drei Tage wieder zu 20 ml ergänzt. Nach acht Tagen wurden die Blätter aus der Lösung entnommen und die Blattstengel abgeschnitten, um das meiste des darin aufgenommenen, unmetabolisierten Tropinons von der Analyse auszuschließen. Die Blattansätze wurden zum Entfernen anhaftender Tropinon-Lösung mit Wasser abgespült. Danach wurden die Blätter einer Pflanze gepoolt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

### B 2.6.2 Extraktion von Tropinon, Tropin und Pseudotropin

Tropinon, Tropin und Pseudotropin wurden aus *S. tuberosum* Blättern wässrig extrahiert. Dazu wurden 1,8 g gemörserte Frischmasse mit 6 ml Wasser versetzt, 1 min bei 2.500 upm geschüttelt und 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach Zentrifugation (5.000 upm, 10 min, 4 °C) wurde der Extraktionsvorgang wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden unter vermindertem Druck bei 50 °C bis auf 1 ml eingengt. Zur Abtrennung von hydrophilen Begleitstoffen wurde jede Probe mit 100 µl Ammoniak konz. alkalisiert und auf eine 1 g Extrelut<sup>®</sup> NT-Säule (Merck) aufgegeben. Nach 20 min Einwirkzeit erfolgte die Elution zweimal mit 3 ml Chloroform und einmal mit 3 ml eines Gemisches aus Chloroform:Methanol (8:2). Die vereinigten Eluate wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, unter vermindertem Druck bei 30 °C zur Trockne eingengt und in 500 µl Ethylacetat gelöst.

### B 2.6.3 GC-MS Analyse von Tropinon, Tropin, Pseudotropin

Tropinon, Tropin und Pseudotropin wurden durch Gaschromatografie gekoppelt mit massenspektrometrischer Analyse (GC-MS: GCMS 2010, Shimadzu) quantifiziert. Die Gehaltsbestimmung erfolgte anhand von Kalibrierkurven für Tropinon, Tropin und Pseudotropin. Jeder Probe wurden 0,1 mg/ml Azobenzol als interner Gerätestandard zugesetzt. Die Bestimmungsgrenze als kleinste Konzentration der Kalibriergeraden

betrug für Tropinon 1 ng/µl, für Tropin und Pseudotropin jeweils 5 ng/µl. Quantifizierbar ist ein Gehalt an Tropinon ab 200 ng/g Frischmasse, an Tropin ab 270 ng/g Frischmasse und an Pseudotropin ab 215 ng/g Frischmasse. Die GC-MS Geräteparameter zur Tropinon-Analytik sind in Tab. B- 5 zusammengefasst.

Tab. B- 5: GC-MS Geräteparameter GCMS 2010

Injektion	1 µl, splitless
Säule	FS-Supreme-5ms, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,1 µm (Chromatographie Service)
Mobile Phase	Helium
Flussrate	1 ml/min
Temperaturgradient	60 °C → 10 °C/min bis 180 °C (1min) → 15 °C/min bis 300 °C (2 min)
Temperatur Interface	250 °C
Temperatur Ionenquelle	200 °C
Ionisationsspannung	70 eV
Ionisation	EI
Detektorspannung	1,2 kV
MS-Analyse	5,5-15 min, Totalionenstrom (TIC), 50-350 m/z

#### B 2.6.4 Extraktion von Polyaminen

Die Polyamine Putrescin, *N*-Methylputrescin, Spermidin und Spermin in freier und konjugierter Form wurden aus Blättern von *S. tuberosum* sauer extrahiert. Konjugierte Polyamine liegen gebunden an Proteine, Nukleinsäuren oder die Zellwand im Extrakt (Überstand) und Pellet vor (Bouchereau et al., 1999). Um auch diese konjugierten Polyamine quantifizieren zu können, wurden sie durch saure Hydrolyse in die freie Form überführt.

Zur Extraktion wurden 50-100 mg getrocknetes Blattgewebe mit 1,5 ml 5 % (V/V) Perchlorsäure homogenisiert und 2 h bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 upm, 20 min, RT) wurde der Überstand (Ü1) erhalten, in dem freie und konjugierte Polyamine vorliegen. Das Pellet wurde in 1 ml 1 N Natriumhydroxid-Lösung resuspendiert. Zur Hydrolyse der konjugierten Polyamine im Pellet wurden 250 µl Pelletsuspension mit 250 µl Salzsäure konz. in einer braunen Glasampulle verschlossen und 18 h bei 110 °C hydrolysiert (P). Die konjugierten Polyamine in 250 µl Ü1 wurden ebenfalls einer Hydrolyse durch 250 µl Salzsäure konz. unterzogen (Ü2). Die beiden Hydrolysate von P und Ü2 wurden zentrifugiert (13.000 upm, 1 min, RT). Jeweils 100 µl des klaren Überstandes von Ü1, Ü2 und P wurden bei 50 °C zur Trockne eingengt, in 100 µl 5 % (V/V) Perchlorsäure

resuspendiert und dansyliert (B 2.6.5). Die drei erhaltenen Fraktionen einer Probe lassen sich wie folgt hinsichtlich ihrer Polyamin-Zusammensetzung charakterisieren:

**Ü1:** Überstand 1, darin befinden sich freie und konjugierte Polyamine

**Ü2:** Überstand 2, darin befinden sich nach Hydrolyse nur noch freie Polyamine

**P:** Pellet, darin befinden sich nach Hydrolyse nur noch freie Polyamine

#### B 2.6.5 Dansylierung von Polyaminen

Durch Reaktion mit Dansylchlorid, das ein Chromophor besitzt, können die daran gebundenen Polyamine durch UV- und Fluoreszenzdetektion quantifiziert werden. Die Dansylierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Flores und Galston (1982). Dazu wurden 100 µl saure Polyamin-Lösung (B 2.6.4) mit 100 µl gesättigter Natriumcarbonat-Lösung alkalisiert und mit 400 µl Dansylchlorid-Lösung (7,5 mg/ml Aceton) versetzt. Nach Inkubation für 60 min unter Lichtausschluss und Schütteln (1.000 upm) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Prolin-Lösung (100 mg/ml) gestoppt. Nach weiteren 30 min Inkubation unter Lichtausschluss wurden die dansylierten Polyamine dreimal mit je 500 µl Toluol ausgeschüttelt. Die vereinigten Toluolphasen wurden unter vermindertem Druck bei 60 °C zur Trockne eingeeengt und bis zur HPLC-Messung bei -20 °C gelagert.

#### B 2.6.6 HPLC-Analyse von Polyaminen

Die dansylierten und getrockneten Polyamin-Proben wurden in 800 µl Acetonitril durch Inkubation für 10 min im Ultraschallbad rückgelöst. Die Polyamine wurden auf einem HPLC-System La Chrom (Merck Hitachi) und einer RP-18 Säule (RP 18 LiChrocart, Merck, Tab. B- 6) getrennt. Aus dansylierten Standards für Putrescin, *N*-Methylputrescin, Spermidin und Spermin wurden Kalibrierkurven erstellt, anhand der die Polyamine quantifiziert wurden. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit erfolgte die Quantifizierung der Polyamine mit einem Fluoreszenz-Detektor (Merck Hitachi, L-7485), Absorption bei 365 nm, Emission bei 510 nm. Die Bestimmungsgrenze als kleinste Konzentration der Kalibriergeraden betrug für die vier Polyamine 0,25 ng/40 µl Injektionsvolumen. Quantifizierbar ist ein Gehalt von Putrescin ab 215 ng/g Frischmasse, *N*-Methylputrescin ab 130 ng/g Frischmasse, Spermidin ab 90 ng/g Frischmasse und Spermin ab 75 ng/g Frischmasse. Der Dioden-Array-Detektor (Merck Hitachi, L-7455) diente zur Kontrolle des Spektrums der für dansylierte Polyamine typischen Absorptionsmaxima bei 215 nm und 250 nm. Externe dansylierte Standards für Putrescin, *N*-Methylputrescin, Spermidin und

Spermin wurden bei jeder Analyse mitgeführt. In jeder Probe wurden die Polyamine in ihrer freien und konjugierten Form bestimmt (B 2.6.4). Die verwendeten HPLC-Geräteparameter sind aus Tab. B- 6 ersichtlich.

Tab. B- 6: HPLC-Geräteparameter zur Polyaminquantifizierung

Säule	RP 18 LiChrocart, 250 mm x 4 mm, 5 µm Partikelgröße (Merck)
Fluss	1 ml/min
Gradient	Laufmittel A: Acetonitril:Wasser (10:90) Laufmittel B: Acetonitril:Wasser (90:10) 0 min- 5 min: steigend von 70 % auf 82 % Acetonitril 5 min-12 min: steigend auf 90 % Acetonitril 12 min-22 min: isokratisch bei 90 % Acetonitril 22 min-24 min: fallend auf 70 % Acetonitril 24 min-35 min: isokratisch bei 70 % Acetonitril
Temperatur Säulenofen	40 °C
Probenvolumen	800 µl
Injektionsvolumen	40 µl
Dioden-Array-Detektor	Absorption bei 220 nm
Fluoreszenz-Detektor	Absorption bei 365 nm, Emission bei 510 nm

#### B 2.6.7 Extraktion von Calysteginen

Calystegine wurden aus 0,5-1 cm langen Kartoffelkeimen (B 2.3.3) wässrig-methanolisch extrahiert. Dazu wurden 250 mg gemörserte Frischmasse mit 6 ml eines Methanol:Wasser-Gemisches (1:1) versetzt, 1 min bei 2.500 upm geschüttelt und 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach Zentrifugation (5.000 upm, 10 min, 4 °C) wurde der Extraktionsvorgang wiederholt. Zur Abtrennung von sauren und neutralen Begleitstoffen und zur Aufkonzentrierung der Calystegine wurde der vereinigte Extrakt über eine stark saure Kationentauscher-Säule (Chromabond SA<sup>®</sup>, 1.000 mg, Macherey-Nagel) gereinigt. Um den Durchfluss von 1 ml/min des jeweiligen Lösungsmittels durch die Säule zu ermöglichen, wurde mittels Vakuum-Apparatur bei einem Unterdruck von 800 mbar gearbeitet. Nach Konditionierung der Säule mit 5 ml Methanol:Wasser (1:1) erfolgte die Aufgabe des Extraktes und das Waschen der Säule mit 10 ml Wasser. Die Calystegine wurden zweimal mit 2 ml 2 N Ammoniak eluiert und die Säule wurde mit 1 ml Wasser nachgewaschen. 1-2 ml der vereinigten Eluate wurden gefriergetrocknet und durch Silylierung derivatisiert (B 2.6.8).



### B 2.6.8 Silylierung von Calysteginen

Um die nicht flüchtigen Calystegine durch GC-MS Analyse zu quantifizieren, wurden sie durch Silylierung mit Hexamethyldisiloxan (HMDS) und Trimethylchlorsilan (TMCS) in Trimethylsilyl-Derivate (TMS-Derivate) überführt. Dazu wurde das Lyophilisat mit 30 µl wasserfreiem Pyridin, 40 µl HMDS und 10 µl TMCS versetzt und 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Azobenzol (1 mg/ml) als interner Gerätestandard und 145 µl n-Hexan erfolgte die Analyse durch GC-MS (B 2.6.9).

### B 2.6.9 GC-MS Analyse von Calysteginen

Die Calystegine A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> wurden nach Silylierung als TMS-Derivate durch Gaschromatografie gekoppelt mit massenspektrometrischer Analyse (GC-MS: GCMS 2010, Shimadzu) quantifiziert. Die Zuordnung der in den Proben enthaltenen Calystegine erfolgte durch Calystegin-Standardsubstanzen für die Calystegine A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> anhand von Retentionszeiten und MS-Fragmentierungsmustern (F 6.7.2). Aus Pflanzenmaterial gereinigte Calystegin-Standardsubstanzen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. N. Asano (Kanazawa University, Japan) zur Verfügung gestellt. Der Gehalt der Calystegine A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub> wurde anhand einer Kalibriergeraden mit Castanospermin (Tocris Biosciences, United Kingdom) als Referenz-Standard berechnet. Castanospermin (Octahydroindolizin-1,6,7,8-tetrol) ist den Calysteginen durch den stickstoffhaltigen Indolizin-Bizyklus mit vier Hydroxylgruppen strukturell sehr ähnlich. Die Bestimmungsgrenze als kleinste Konzentration der Kalibriergeraden für Castanospermin betrug 10 ng/µl. Quantifizierbar ist ein Calystegin-Gehalt ab 12 µg/g Frischmasse (berechnet als Castanospermin). Die zur Tropinon-Analytik (Tab. B- 5) variierenden GC-MS Geräteparameter für die Calystegin-Analytik sind aus Tab. B- 7 ersichtlich.

Tab. B- 7: GC-MS Geräteparameter zur Calystegin-Analytik

GC-MS Parameter	
Temperaturgradient	50 °C (2,5 min) → 20 °C/min bis 160 °C (1 min), 5 °C/min bis 240 °C (2 min) → 10 °C/min bis 330 °C (2 min)
MS-Analyse	6,5-25 min, Totalionenstrom (TIC), 50-550 m/z

### B 2.6.10 Extraktion von Jasmonaten

Jasmonsäure (JA), Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile), 12-Hydroxyjasmonat (12-OH-JA), Oxophytodiensäure (OPDA) und Cucurbinsäure (CA) wurden aus Kartoffelblättern methanolisch extrahiert. Dazu wurden ca. 50 mg in flüssigem Stickstoff gemörserte Blatt-Frischmasse mit 500 µl Methanol und je 50 ng deuterierten internen Standards ( $^2\text{D}_6$ -JA,  $^2\text{D}_2$ -JA-Ile,  $^2\text{D}_5$ -OPDA) versetzt und zweimal 30 s in einer Kugelmühle (30 Hz) extrahiert. Nach Zentrifugation (12.000 upm, 10 min, RT) wurden 450 µl Überstand 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Reinigung des Extrakts erfolgte mittels Festphasenextraktion (SPE) über einen sauren Kationenaustauscher (Chromabond<sup>®</sup> HR-XC, Macherey-Nagel) in 96-Well-Säulen (50 mg SPE-Material pro Säule). Die Säulen wurden zuvor mit 500 µl Methanol und 500 µl Wasser konditioniert. Anschließend wurde der Extrakt in fünf 1 ml Schritten aufgegeben, die Elution der Jasmonate erfolgte in 900 µl Acetonitril. Der einheitliche Lösungsmitteldurchlauf durch die Säulen wurde durch Zentrifugation (300 upm, 2 min, RT) ermöglicht. Die in Acetonitril gelösten Jasmonate wurden bis zur UPLC-MS/MS Analyse (B 2.6.11) bei -80 °C gelagert.

### B 2.6.11 UPLC-MS/MS Analyse von Jasmonaten

Die Quantifizierung von JA, 12-OH-JA, JA-Ile, OPDA und CA in Kartoffelblättern erfolgte, wenn nicht gesondert gekennzeichnet, nach der Methode Balcke et al. (2012).

Für das Experiment C 3.2.8 wurde eine optimierte Methode zur Bestimmung von Jasmonaten angewendet (Dr. G. Balcke, IPB Halle, unveröffentlicht): Die Aufreinigung und Trennung der Phytohormone erfolgte auf einem Symbiosis<sup>™</sup> Pico-UPLC-System mit on-line SPE-Kombination (Spark Holland, Niederlande). 200 µl Extrakt (60:40 Acetonitril:1 % Essigsäure in Wasser, pH 3,0) wurden auf einer hydrophoben SPE-Säule (HySphere<sup>™</sup> Resin GP: Partikelgröße 10-12 µm, Länge 10 mm, Innendurchmesser 2 mm, Spark Holland, Niederlande) injiziert, die zuvor mit 1.000 µl Acetonitril und 2.000 µl 1 % Essigsäure in Wasser vorkonditioniert wurde. Zur Desorption der Hormone von der SPE-Kartusche auf die analytischen Trennsäule wurde ein Fluss von 50 µl/min (80:20 Acetonitril/1 % Essigsäure in Wasser) über die Gradientenpumpe (1240 Spark) eingestellt. Eine Refokussierung der Hormonpeaks erfolgte durch HPD-Verdünnung (high pressure dispenser) mit 300 µl/min 1 % Essigsäure in Wasser, wobei 8 min ein Volumen von 2.000 µl

zudosiert wurde. Die Phytohormone wurden auf einer C18-Säule Nucleoshell RP18 (Porenweite 90 Å; Partikelgröße 2,7 µm, Länge 10 cm, Innendurchmesser 2 mm, Macherey-Nagel) bei 40 °C und einer Flussrate von 400 µl/min durch Gradientenelution (Laufmittel A: 0,3 mM Ameisensäure in Wasser, Laufmittel B: Acetonitril) aufgetrennt.

Programm:

0 min- 6 min: isokratisch bei 80 % Acetonitril, Flussrate: 50 µl/min

6 min- 8 min: fallend auf 5 % Acetonitril, Flussrate: 50 µl/min

8 min- 19 min: steigend auf 95 % Acetonitril, Flussrate: 400 µl/min

19 min- 24 min: isokratisch bei 95 % Acetonitril, Flussrate: 400 µl/min

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte on-line durch (-)-ESI-MS/MS mit einem TripleTOF 5600+ SWATH™ System (Sciex Instruments, Toronto, Kanada) unter Verwendung einer Turbo-Duo-Source. Prozessparameter: MS1 - Massenbereich 65-1250 Da (50 ms), Kollisionsenergie = -10 V; MS2: Massenbereich 65-1250 in 59 SWATH-Taschen á 20 Da (je 20 ms) Q1 Fenster, dynamische Kollisionsenergie mit einer Kollisionsenergie-Differenz von ±35 V, Quellgas: Curtain-Gas 35, GS1 60, GS2 70 in willkürlichen Einheiten, Spannung Ionenquelle: -4500 V, Temperatur Ionenquelle: 600 °C, Gerätesoftware: Symbiosis Pico-1 (Spark Holland, Niederlande). Zur Datenauswertung wurde die Software PeakView™ (AB Sciex Instruments, Toronto, Kanada) genutzt.

#### B 2.6.12 Herstellung des Cucurbinsäure-Standards

Der CA-Standard als Gemisch aus 6-epi-7-iso-Cucurbinsäure und 7-iso-Cucurbinsäure wurde durch Reduktion von (-)-Jasmonsäure (JA) mit Natriumborhydrid (NaBH<sub>4</sub>) gewonnen. Dazu wurde methanolische JA mit NaBH<sub>4</sub> bei 4 °C versetzt. Nach 60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser gestoppt. Die CA wurde durch Ansäuern mit 1 M Salzsäure bis pH 3 protoniert und in Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Trocknung des Lösungsmittels bei 40 °C wurde der Rückstand in Wasser (pH 7,4) aufgenommen. Danach wurde die CA über eine 150 mg SPE-Säule (Oasis Max Cartridge 6cc, Waters) gereinigt. Dazu wurde die Säule mit 6 ml Acetonitril und 6 ml Wasser konditioniert und die wässrige CA-Lösung aufgegeben. Nach Waschen mit 6 ml wässriger Essigsäure-Lösung (pH 2) wurde die protonierte CA mit 12 ml Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde bei 45 °C getrocknet und in Acetonitril:Wasser (1:1) gelöst.

## C 3 Ergebnisse

### C 3.1 Expression der *DsPMT* in *S. tuberosum*

#### C 3.1.1 Insertionsereignisse und Transkriptabundanz in *DsPMT* exprimierenden Linien

Die Expression der *DsPMT* in der Kartoffelpflanze verfolgt das Ziel, die PMT-Enzymaktivität zu verstärken. Dadurch können limitierende Schritte der Calysteginbiosynthese aufgeklärt oder zusätzlich eine verstärkte Calysteginbildung erreicht werden. Die kodierende Sequenz der *DsPMT* (Abb. F- 11) wurde mittels Gateway-Technik aus dem Vektor pENTR™/D-Topo (Abb. F- 1) hinter den 35S-Promoter in den Vektor pGWB14 (Nakagawa et al., 2007) kloniert. *S. tuberosum* Désirée-Pflanzen wurden stabil mit dem Expressionskonstrukt transformiert. Die Integration des Konstrukts in das Genom der regenerierten Pflanzen wurde durch Southern-Blot Analyse festgestellt. Abb. C- 1 zeigt einen Southern-Blot mit verschiedenen Linien als Beispiel. Insgesamt wurden 21 positive Transformanden erhalten (siehe Anhang, Abb. F- 14), die in Sterilkultur weitervermehrt wurden.

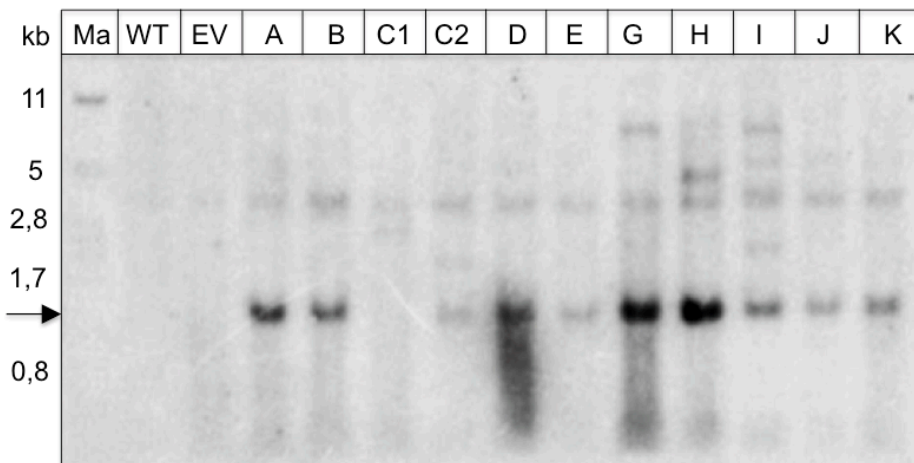


Abb. C- 1: Nachweis der Integration des *DsPMT*-Expressionskonstrukts in das Genom von *S. tuberosum*

Genomische DNA wurde aus Blättern isoliert, mit *Xba*I und *Sac*I verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP-markierten Sonde, hergestellt durch *Xba*I- und *Sac*I-Verdau des Vektors pGWB14, der das *DsPMT*-Expressionskonstrukt trägt. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind in der Vektorkarte von pGWB14 markiert (Abb. F- 5). Der Pfeil markiert die erwartete Bande bei 1273 bp, die in den Linien A, B, C2, D, E, G, H, I, J, K erkennbar ist. Ma- $\lambda$ -*Pst*I-Marker, WT-Wildtyp, EV-Leervektor.

Die Expression der *DsPMT* wurde durch Northern-Blot Analyse von 16 Linien überprüft (Abb. C- 2). Da das endogene *PMT*-Transkript in Kartoffel-Wildtyp Blättern sehr schwach akkumuliert (Stenzel et al., 2006), eignete sich Blattmaterial zur Untersuchung der erhöhten Transkriptmengen in den transgenen Linien. Die *StPMT* und die *DsPMT* besitzen eine Homologie von 91 % auf Nukleotidebene, sodass die verwendete full-length *DsPMT*-Sonde vermutlich auch an *StPMT* RNA hybridisiert. Durch Northern-Blot Analyse (B 2.4.16) konnte die *DsPMT*-Transkriptabundanz in den transgenen Linien B, D, E, J und K festgestellt werden. In Kontrollpflanzen (WT, EV) wurden keine, in anderen transformierten Linien schwache Signale detektiert. Für weitere Experimente wurden stets die fünf Linien mit der stärksten *DsPMT*-Transkriptabundanz (B, D, E, J, K) genutzt.

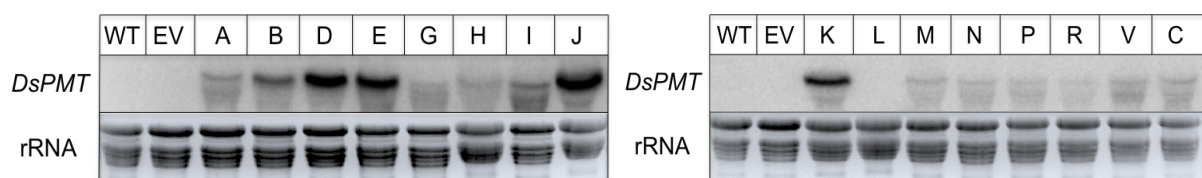


Abb. C- 2: *DsPMT*-Transkriptabundanz in verschiedenen Linien

Northern-Blot Analyse von 16 unabhängigen *DsPMT*-Kandidatenlinien und Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor). RNA wurde aus Blättern von *S. tuberosum* isoliert. 20 µg RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung erfolgte mit einem  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP-markierten full-length cDNA-Fragment von *DsPMT* (1135 bp). Als Ladekontrollen dienten die mit Ethidiumbromid gefärbten rRNA-Gele.

### C 3.1.2 Polyamin-Gehalt der *DsPMT* exprimierenden Linien

Transkriptmengenerhöhungen der *PMT* durch genetische Manipulation führten häufig zu einer Änderung des Polyamin-Gehalts in Pflanzen und Wurzelkulturen der Solanaceae, besonders zu einer Erhöhung von *N*-Methylputrescin (NMP). Der Putrescin-Gehalt änderte sich dabei nicht (Moyano et al., 2002; Moyano, 2004; Rothe et al., 2003). Durch die *PMT*-Expression erniedrigte sich der Gehalt der Polyamine Spermidin und Spermin leicht (Sato et al., 2001; Zhang et al., 2007). Für Kartoffelblätter beschreibt die Literatur einen geringen endogenen Putrescin-Gehalt von ca. 5 µmol/g Trockenmasse. NMP wurde in Blättern noch nicht nachgewiesen, sondern kommt nur in Kartoffelkeimen und in den Augen der Kartoffelknolle vor (Stenzel et al., 2006).

Um Polyaminveränderungen in den *DsPMT* exprimierenden Kartoffelpflanzen zu analysieren, wurden die Polyamine Putrescin, NMP, Spermidin und Spermin in Blättern durch HPLC-Analyse anhand ihrer Standards identifiziert und quantifiziert

(B 2.6.6). Der Polyamin-Gehalt der Blätter drei bis vier Wochen alter Kartoffelpflanzen von Kontrollen und *DsPMT* exprimierenden Linien ist in Abb. C- 3 dargestellt. Jede Probe wurde während der Aufarbeitung in drei Fraktionen geteilt. Dabei wurde jedes Polyamin aus der freien, löslichen Fraktion (Überstand Ü1), der löslichen, konjugierten Fraktion (Überstand Ü2) und der unlöslichen, konjugierten Fraktion (Pellet P) bestimmt (B 2.6.4). Im ersten Experiment (Abb. C- 3) zeigten alle fünf *DsPMT* exprimierenden Linien eine signifikante Erhöhung des NMP-Gehalts bis auf 10-18 µg/g Frischmasse (FM) im Vergleich zu Kontrollpflanzen mit 2 µg/g FM. Dabei lagen in Blättern von *DsPMT* exprimierenden Linien mehr als zwei Drittel des NMPs als freies, lösliches Polyamin (Ü1) vor, jeweils ca. 10 % als lösliches, konjugiertes Polyamin (Ü2) und ca. 10 % als unlösliches, konjugiertes Polyamin (P). Für Putrescin, Spermidin und Spermin veränderten sich der Gesamtpolyamin-Gehalt und die Verhältnisse der drei Polyaminfraktionen zwischen Kontrollen und *DsPMT* exprimierenden Linien nicht. Putrescin und Spermin akkumulierten bis zu einem Gehalt von ca. 15 µg/g FM. Die Putrescin-Fraktionen setzten sich mit 70 % Ü1, 15 % Ü2 und 15 % P zusammen. Für Spermin lag der Anteil der löslichen, konjugierten Fraktion (Ü2) mit 50 % höher als bei den anderen Polyaminen. In allen untersuchten Pflanzen war Spermidin das Polyamin mit dem höchsten Gesamtgehalt von 35-50 µg/g FM. Dabei betrug der Anteil des löslichen, konjugierten Spermidins (Ü2) ca. 30 % des Gesamtspermidins.

In einem zweiten Experiment wurden nur die freien, löslichen Polyamine (Ü1) in Blättern von *DsPMT* exprimierenden Linien und Kontrollpflanzen bestimmt (Abb. C -4) und ein vergleichbares Ergebnis erzielt. NMP war in den Blättern der *DsPMT* exprimierenden Linien signifikant gegenüber den Kontrollpflanzen erhöht, in denen kein NMP quantifizierbar war (Bestimmungsgrenze NMP: 130 ng/g FM, B 2.2.6). Der Putrescin-, Spermidin- und Spermin-Gehalt in den *DsPMT* exprimierenden Linien unterschied sich nicht von dem der Kontrollpflanzen. Da in zwei Experimenten erhöhte NMP-Mengen festgestellt werden konnten, ist die *DsPMT* offenbar als Protein *in vivo* aktiv. Der Polyamin-Gehalt von Putrescin, Spermidin und Spermin wird aber in einem engen Intervall konstant gehalten.

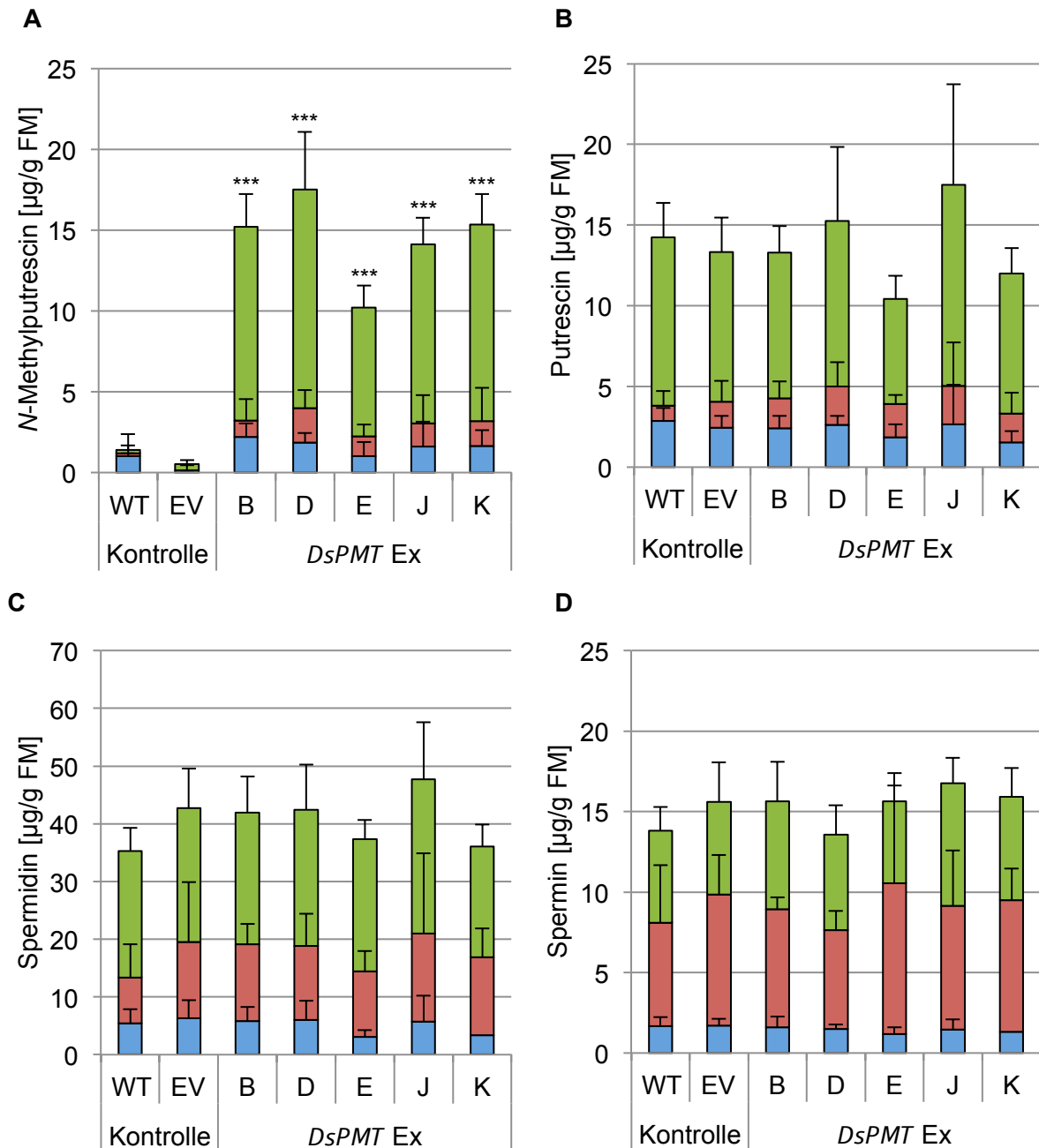


Abb. C- 3: Polyamine in *DsPMT* exprimierenden Linien (1. Exp.)

*N*-Methylputrescine (A), Putrescine (B), Spermidin (C) und Spermin (D) wurden in Blättern von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *DsPMT* exprimierenden Pflanzen (*DsPMT* Ex: Linien B, D, E, J, K) quantifiziert. Nach saurer Extraktion wurden die konjugierten Polyamine im Überstand und Pellet mit HCl in die freie Form überführt. Die Polyamine wurden dansyliert und durch HPLC-Fluoreszenzdetektion erfasst. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Polyaminfraktionen: grün: freies, lösliches Polyamin (Überstand Ü1), rot: lösliches, konjugiertes Polyamin (Überstand Ü2), blau: unlösliches, konjugiertes Polyamin (Pellet P). Erstes Experiment, Kontrollen: n=12, *DsPMT* Ex: n=4. Beim Students t-Test wurde jeweils die transgene Linie verglichen mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV: \*\*\* p<0,001.

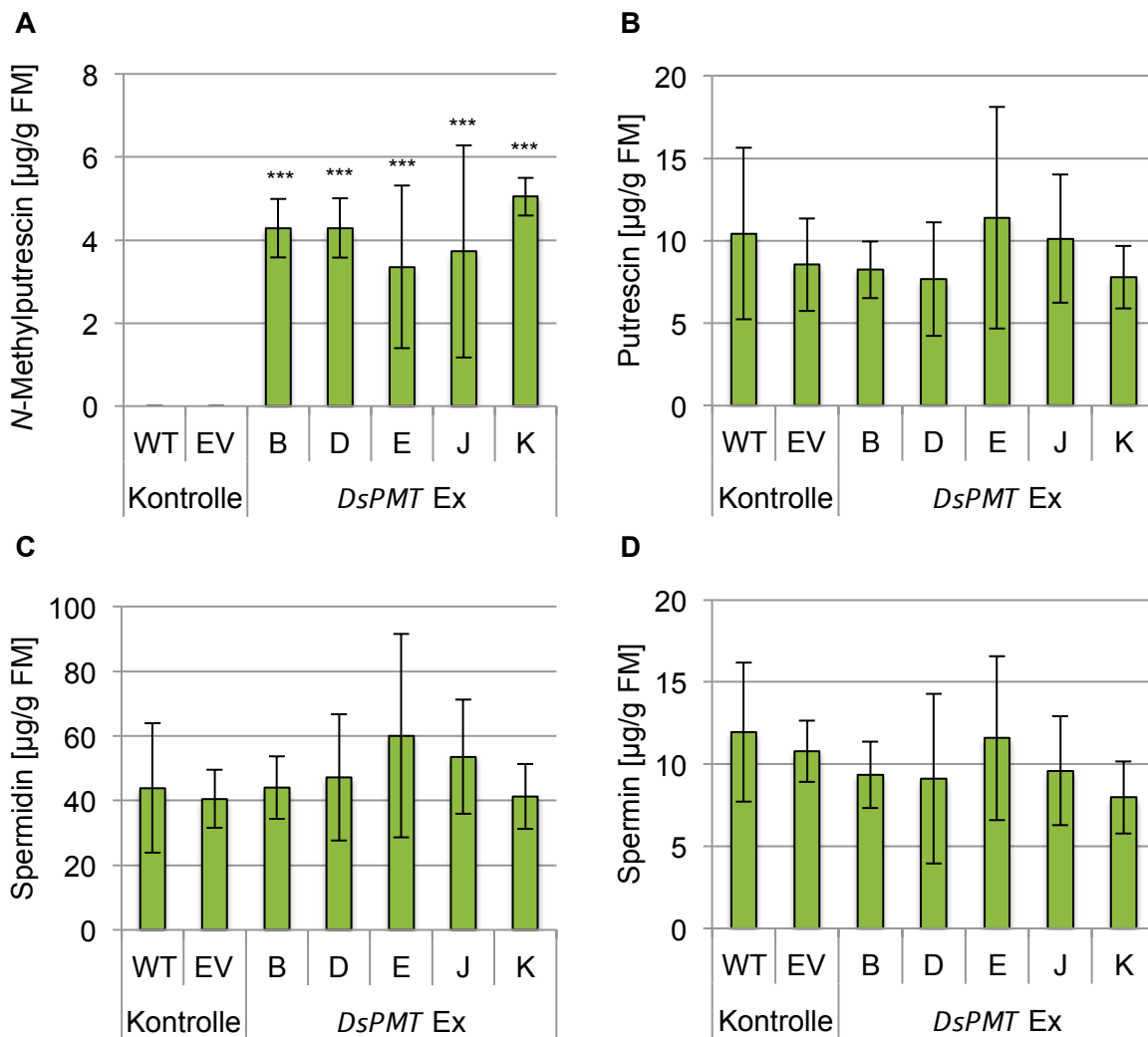


Abb. C- 4: Polyamine in *DsPMT* exprimierenden Linien (2. Exp.)

*N*-Methylputrescine (A), Putrescine (B), Spermidin (C) und Spermin (D) wurden in Blättern von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *DsPMT* exprimierenden Pflanzen (*DsPMT Ex*: Linien B, D, E, J, K) quantifiziert. Nach saurer Extraktion wurden die freien, löslichen Polyamine im Überstand Ü1 dansyliert und durch HPLC-Fluoreszenzdetektion erfasst. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Polyamine im Überstand Ü1. Zweites Experiment, Kontrollen: n=16, *DsPMT Ex*: n=6. Beim Students t-Test wurde jeweils die transgene Linie verglichen mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV: \*\*\* p<0,001.

### C 3.1.3 Intermediate der Calysteginbiosynthese und Calystegine

Tropinon, Tropin und Pseudotropin als Intermediate zwischen NMP und den Calysteginen wurden in den Blättern drei bis vier Wochen alter Kartoffelpflanzen quantifiziert. Dadurch kann der mögliche erhöhte Einbau des NMPs der *DsPMT* exprimierenden Linien in die Intermediate der nachfolgenden Biosyntheseschritte untersucht werden. Endogen akkumulieren Tropinon und Pseudotropin in Kartoffelblättern kaum, Tropin wurde bisher nicht detektiert (Richter, 2006).



In dieser Arbeit konnten die Intermediate nur im ersten von zwei Experimenten mittels GC-MS quantifiziert werden. Bei der Wiederholung des Experiments wurden weder Tropinon, Tropin noch Pseudotropin detektiert. Quantifizierbar sind Tropinon, Tropin und Pseudotropin mit der verwendeten GC-MS-Methode ab einem Gehalt von 200 ng/g FM, 270 ng/g FM und 215 ng/g FM (B 2.6.3). Im ersten Experiment zeigten die Kontrollpflanzen und die *DsPMT* exprimierenden Linien einen niedrigen Gesamtgehalt an Intermediaten bis 10 µg/g FM (Abb. C- 5). Die Gehaltsverteilung nahm mit Ausnahme der Linie D in der Reihenfolge Pseudotropin > Tropinon > Tropin ab. Individuelle Schwankungen der Intermediate zwischen den *DsPMT* exprimierenden Linien, z.B. Linien B und K, erlauben nicht die Schlussfolgerung einer generellen Erhöhung oder Erniedrigung der Metaboliten im Vergleich zu den Kontrollen. Zwar war in Linie K weder Tropinon noch Pseudotropin quantifizierbar, aber Linie B bildete Pseudotropin bis 6 µg/g FM, Kontrollen nur maximal 3 µg/g FM. Die Linien E, J und K akkumulierten weniger als 0,5 µg/g FM Tropinon im Vergleich zu Kontrollpflanzen mit 1-2 µg/g FM.

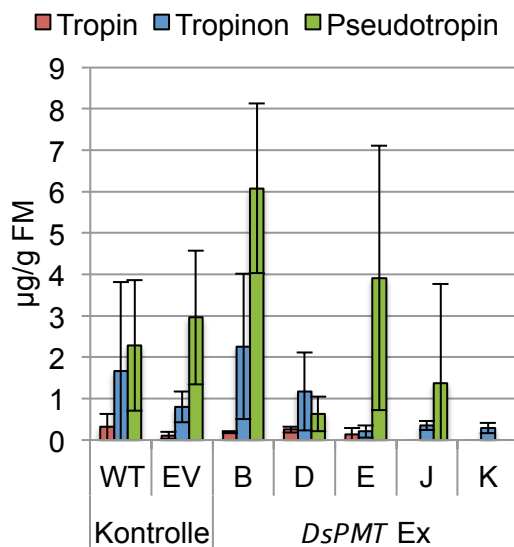


Abb. C- 5: Gehalt von Tropin, Tropinon, Pseudotropin der *DsPMT* exprimierenden Linien

Tropinon, Tropin und Pseudotropin wurden aus Blättern von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *DsPMT* exprimierenden Linien (*DsPMT* Ex: B, D, E, J, K) wässrig extrahiert und durch GC-MS Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines Experiments, Kontrollen: n=16, *DsPMT* Ex: n=4.

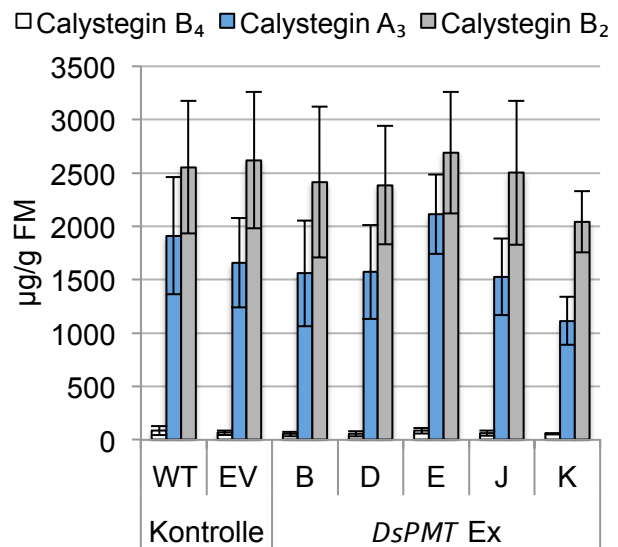


Abb. C- 6: Calystegin-Gehalt der *DsPMT* exprimierenden Linien

Calystegine B<sub>4</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> wurden aus Keimen von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *DsPMT* exprimierenden Linien (B, D, E, J, K) wässrig-methanolisch extrahiert und nach Silylierung durch GC-MS Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Experimenten, Kontrollen: n=24, *DsPMT* Ex: n=6.

Kurze Keime der Kartoffelknolle sind das Gewebe mit dem höchsten Gehalt an Calysteginen (Keiner and Dräger, 2000). Die Calystegine B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> akkumulierten sowohl in 0,5-1 cm kurzen Keimen von Kontrollpflanzen als auch von *DsPMT* exprimierenden Linien insgesamt bis auf 4.000-5.000 µg/g FM (Abb. C- 6). Das am stärksten in Kartoffelkeimen vorkommende Calystegin B<sub>2</sub> erreichte einen Gehalt von ca. 2.500 µg/g FM, gefolgt von Calystegin A<sub>3</sub> mit 1.000-2.000 µg/g FM und Calystegin B<sub>4</sub> mit 50-90 µg/g FM. Es lässt sich feststellen, dass die Erhöhung der *DsPMT*-Transkriptmengen und des NMPs in den *DsPMT* exprimierenden Linien keine vermehrte Calysteginbildung in den Keimen erzeugt.

### C 3.1.4 Wachstum von *P. infestans* auf den *DsPMT* exprimierenden Linien

Synthetische Polyamin-Analoga besitzen durch die Hemmung des Polyamin-Biosyntheseenzym Ornithindecaboxylase (ODC) antifungale und fungizide Eigenschaften gegen verschiedene pathogene Pilze (Walters and Mackintosh, 1997). Auf Kartoffelblättern kann das Wachstum von *P. infestans* durch synthetische Putrescin-Analoga wie Keto-Putrescin und Diaminobut-2-en-Derivate (Foster and Walters, 1993; Havis et al., 1994a; Havis et al., 1994b) und durch Spermin (Haggag and Abd El-Khair, 2007) gehemmt werden. Bisher ist nicht bekannt, ob auch NMP ein Hemmstoff der ODC von *P. infestans* sein kann und dessen Wachstum beeinflusst.

In den *DsPMT* exprimierenden Linien ist der Gehalt an NMP bis auf 18 µg/g FM im Vergleich zu Kontrollpflanzen mit 2 µg/g FM signifikant erhöht (Abb. C- 3). Um zu überprüfen, ob diese NMP-Erhöhung in den Blättern der *DsPMT* exprimierenden Linien einen Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans* hat, wurde die relative Biomasse nach Infektion der Blätter bestimmt. Die relative Biomasse von *P. infestans* unterschied sich drei Tage nach Inokulation der Blätter mit  $1 \cdot 10^5$  Sporen/ml nicht signifikant zwischen Kontrollpflanzen und *DsPMT* exprimierenden Linien (Abb. C- 7, t-Test:  $p > 0,05$ ). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Erhöhung von NMP bis auf 18 µg/g FM in den Blättern der *DsPMT* exprimierenden Linien das Wachstum von *P. infestans* nicht beeinflusst.

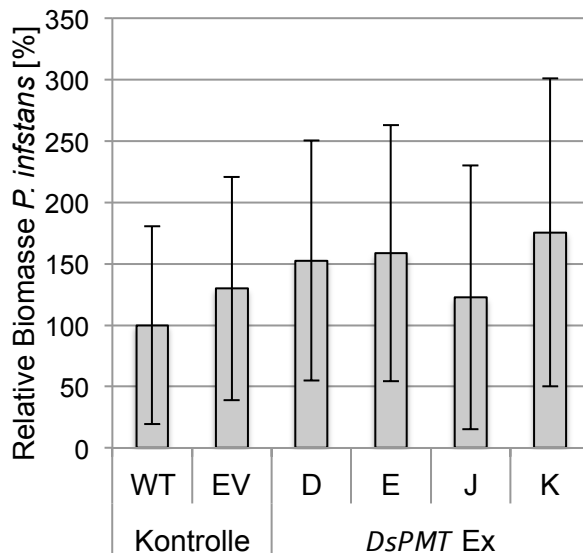


Abb. C- 7: *P. infestans* Biomasse in *DsPMT* exprimierenden Linien

Drei Tage nach Inokulation von je zwei Blättern pro Pflanze (WT-Wildtyp, EV-Leervektor, *DsPMT* Ex-*DsPMT* exprimierenden Linien D, E, J, K) mit  $6 \times 10^5$   $\mu\text{l}$  *P. infestans* Sporensuspension ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml) wurden die Infektionsstellen mit einem Korkbohrer ausgestanzt und die Biomasse mittels q-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen für zwei Experimente. Die Biomasse des WT wurde auf 100 % festgesetzt. Kontrollen: n=28, *DsPMT* Ex: n=16.

### C 3.2 Modulierung der *StTRI*-Expression in *S. tuberosum*

#### C 3.2.1 Herstellung und Charakterisierung der *StTRI* RNAi Linien und *StTRI* Überexpressionslinien

Bisher sind nur Daten zum Substratumsatz der *StTRI* durch *in vitro* Enzymaktivitätsmessungen des rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteins verfügbar. Die *StTRI* reduziert Tropinon zu Tropin, aber auch andere zyklische, nicht in der Kartoffelpflanze vorkommende Ketone wie Chinuclidinon und *N*-Methylpiperdin-4-on zu den entsprechenden Alkoholen (Kaiser et al., 2006). Die endogene Funktion der *StTRI* in *S. tuberosum* ist noch nicht bekannt.

Zur Erhöhung der *StTRI*-Expression in der Kartoffelpflanze wurde die kodierende Sequenz der *StTRI* (Abb. F- 12) mittels Gateway-Technik aus dem Vektor pCR<sup>®</sup>8/GW/Topo<sup>®</sup> (Abb. F- 2) hinter den 35S-Promoter in den Vektor pGWB14 (Nakagawa et al., 2007) kloniert. Um die Expression der *StTRI* zu unterdrücken, erfolgte die Klonierung des *StTRI* RNAi Fragments (F 6.3.2) mittels Gateway-Technik aus dem Vektor pENTR<sup>™</sup>/D-Topo (Abb. F- 1) hinter den 35S-Promoter in den Vektor pHELLSGATE8 (Helliwell et al., 2002; Wesley et al., 2001). *S. tuberosum* Désirée-Pflanzen wurden stabil mit den Expressionskonstrukten transformiert. Die Integration der Konstrukte in das Genom der regenerierten Pflanzen wurde durch Southern-Blot Analyse ermittelt. Für *StTRI* Überexpressionspflanzen (*StTRI* ÜE) wurden 17 Linien, für *StTRI* RNAi Pflanzen (*StTRI* RNAi) 19 Linien erhalten, die in Sterilkultur weitervermehrt wurden (siehe Anhang, Abb. F- 15, Abb. F- 16).

Die erhöhte Expression der *StTRI* wurde auf Transkriptebene durch Northern-Blot Analyse nachgewiesen. Dabei zeigten acht Linien (B, G, K, R, J, L, Q, S) verstärkte *StTRI*-Transkriptmengen in den Blättern. Das endogene *StTRI*-Transkript war im Northern-Blot Abb. C- 8 kaum sichtbar und ist damit in Kartoffelblättern sehr schwach exprimiert. Um die reduzierte Expression für *StTRI* nachzuweisen eignen sich Gewebe wie Blätter oder Wurzeln mit endogener Expression der *StTRI*. Obwohl in Wurzeln bereits *StTRI*-Transkript durch Northern-Blot Untersuchungen nachgewiesen wurde (Keiner et al., 2002), konnten in den für diese Arbeit durchgeführten Northern-Blots keine Signale in Wurzeln detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für Kartoffel-Wildtyp Blätter wurden kaum sichtbare (Abb. C- 8) und schwache Signale (Abb. C- 9A) für *StTRI* mittels Northern-Blot erhalten. Der Effekt einer reduzierten *StTRI*-Expression wurde daher in Blattmaterial durch Northern-Blot und zusätzlich durch qRT-PCR nachgewiesen. Schwache *StTRI* Signale in Wildtyp- und Leervektor-Blättern sind im Northern-Blot Abb. C- 9A sichtbar, für die *StTRI* RNAi Linien A, C, F, H, L, M, N wurden keine Signale detektiert. Reduzierte *StTRI*-Transkriptmengen dieser sieben Linien wurden zusätzlich durch qRT-PCR bestätigt (Abb. C- 9B).

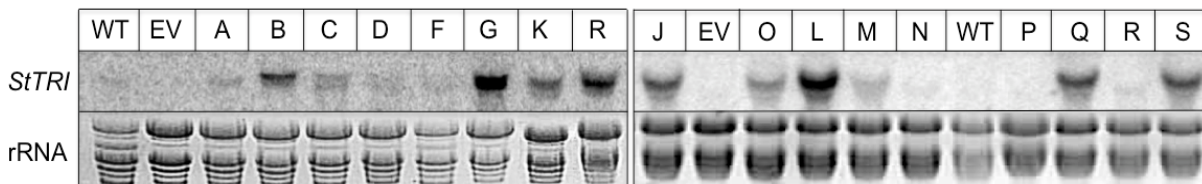


Abb. C- 8: *StTRI*-Transkriptabundanz in verschiedenen Linien

Northern-Blot Analyse von 17 unabhängigen *StTRI* Überexpressions-Kandidatenlinien und Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor). RNA wurde aus Blättern isoliert. 20 µg RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung erfolgte mit einem  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP-markierten full-length cDNA-Fragment von *StTRI* (795 bp). Als Ladekontrollen dienten die mit Ethidiumbromid gefärbten rRNA-Gele.

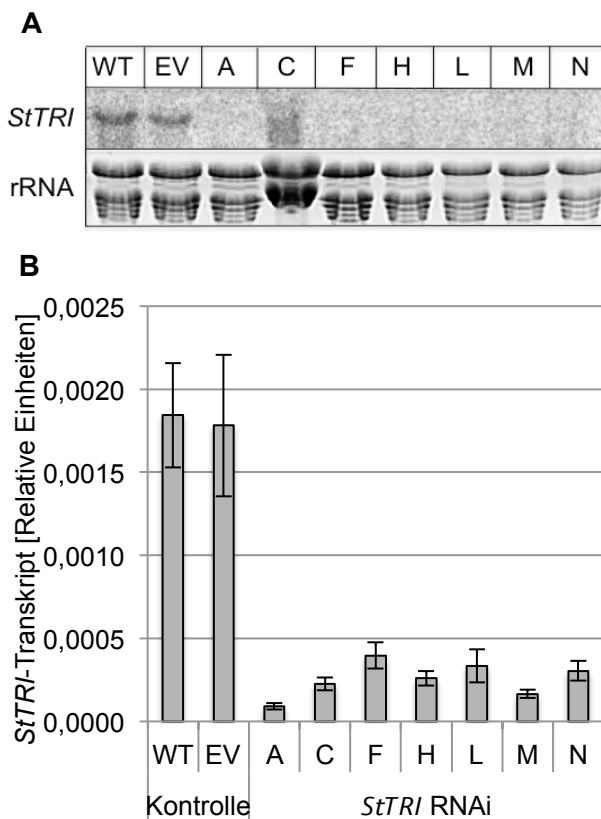


Abb. C- 9: *StTRI*-Transkriptabundanz in *StTRI* RNAi Linien

A: Northern-Blot Analyse von sieben unabhängigen *StTRI* RNAi Linien (A, C, F, H, L, M, N) und Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor). RNA wurde aus Blättern isoliert. 20 µg RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einem  $\alpha$ - $^{32}$ P-dATP-markierten full-length cDNA-Fragment von *StTRI* (795 bp). Als Ladekontrolle diente das mit Ethidiumbromid gefärbte rRNA-Gel.

B: qRT-PCR Analyse der *StTRI*-Transkriptmengen in Blättern von sieben *StTRI* RNAi Linien (A, C, F, H, L, M, N). Als Referenzgen diente *StEF1 $\alpha$* . Gezeigt ist der  $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Wert aus zwei Experimenten als Mittelwert aus je 24 Proben (WT, EV) und je 12 Proben pro *StTRI* RNAi Linie sowie deren Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean).

### C 3.2.2 Tropinon-Fütterung an *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien

Um die mögliche *in vivo* Funktion der *StTRI* als Tropin-bildende Tropinonreduktase zu analysieren, wurden Blätter der *StTRI* RNAi Linien und *StTRI* ÜE Linien mit Tropinon-Lösung gefüttert. Ungefütterte Kartoffelblätter haben einen sehr geringen endogenen Gehalt an Tropin von <1 µg/g FM (Abb. C- 5). Nach Fütterung von 5 mM Tropinon an Blätter von Kontrollpflanzen (WT, EV) wurde sowohl vermehrt gebildetes Tropin (15-30 µg/g FM) als auch Pseudotropin (200 µg/g FM) nachgewiesen. Das Verhältnis Tropin:Pseudotropin lag bei 1:7 bis 1:13 (Abb. C- 10). Durch die Eigenschaft der endogenen Tropinbildung nach Tropinon-Fütterung sind Blätter ein geeignetes Gewebe um eine verminderte bzw. vermehrte Bildung von Tropin in den transgenen Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen anzuzeigen. Auf diese Weise kann die Fähigkeit der *StTRI*, Tropinon als Substrat *in vivo* zu reduzieren, nachgewiesen werden.

Blätter drei bis vier Wochen alter Kartoffelpflanzen von WT/EV, *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien wurden am Stengelende mit einem Skalpell schräg abgeschnitten und für acht Tage in Gläser mit 20 ml 5 mM Tropinon-Lösung gestellt. Verbrauchte Tropinon-Lösung wurde alle zwei bis drei Tage erneut aufgefüllt. Zur Analyse wurden nur die Blätter ohne Stengel verwendet, da sich vermutlich im Xylem der Stengel

nach der Fütterung sehr viel Tropinon befand. Dieses störte die GC-Analytik, da es in Vorexperimenten den Tropinpeak überlagerte (Abb. F- 18, Rt Tropinon = 6,09 min, Rt Tropin = 6,25 min). Als Kontrollen dienten Blätter, die über den Fütterungszeitraum in Wasser gestellt wurden. In diesen Proben waren Tropinon, Tropin und Pseudotropin nicht bzw. in wenigen Proben nur in sehr geringen Mengen bis 5 µg/g FM nachweisbar. Auch in den mit Wasser gefütterten Blättern der *StTRI* ÜE Linien akkumulierte Tropin nicht (Daten nicht gezeigt). Während der Inkubation in Tropinon-Lösung zeigten alle Blätter keine sichtbaren Hinweise auf Stress oder Toxizität wie Färbung, Welken oder schnellere Alterung im Vergleich zu Kontrollblättern in Wasser.

Abb. C- 10 stellt den Gehalt an Tropinon, Tropin und Pseudotropin nach Tropinon-Fütterung in den *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien dar. Die Tropinon-Aufnahme unterschied sich in beiden Experimenten sehr stark. Dabei akkumulierte Tropinon im ersten Experiment in den Kontrollpflanzen, den *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien um 500 µg/g FM, im zweiten Experiment um 1.500 µg/g FM. Bei allen *StTRI* RNAi Linien und *StTRI* ÜE Linien wurden in beiden Experimenten signifikante Unterschiede im Tropin-Gehalt verglichen mit den Kontrollpflanzen erzielt. Bei den Tropinon-gefütterten Blättern zeigte sich eine 15-30-fach verminderte Tropinbildung in den *StTRI* RNAi Linien (1-2 µg/g FM) und eine 2-5-fach erhöhte Tropinbildung in den *StTRI* ÜE Linien (50-100 µg/g FM) im Vergleich zu Kontrollblättern (15-30 µg/g FM). Die GC-Chromatogramme sind im Anhang durch Abb. F- 24, Abb. F- 25 und Abb. F- 26 dargestellt. Diese reduzierte und erhöhte Tropinbildung der in der *StTRI*-Expression modifizierten Linien zeigt, dass das Enzym *StTRI* *in vivo* zur Tropinonreduktion in der Lage ist.

Die Bildung von Acetyltropin aus den nach Tropinon-Fütterung im Blatt erhöht vorliegenden Tropinmengen ist als weiterer Metabolismus wahrscheinlich. Der verwendete Acetyltropin-Standard zeigte die typischen Molekülmassen bei der GC-MS Analyse (Witte et al., 1987, siehe Anhang Abb. F- 23). Acetyltropin wurde aber ohne und auch nach Tropinon-Fütterung der Blätter weder in den Kontrollpflanzen, noch in den *StTRI* ÜE Linien nachgewiesen. Pseudotropin wurde nach Tropinon-Fütterung in Kontrollblättern, *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien nicht immer in gleichem Ausmaß gebildet. Die *StTRI* RNAi Linie H akkumulierte <100 µg/g FM und die *StTRI* ÜE Linie G >400 µg/g FM Pseudotropin im Vergleich zu Kontrollpflanzen mit 200 µg/g FM. Die zwei *StTRI* RNAi Linien H und N waren gekennzeichnet durch

einen erniedrigten Pseudotropin-Gehalt, obwohl durch die Bestimmung der relativen Expression der *StTRII* dieser *StTRI* RNAi Linien (Abb. C- 12) keine veränderten *StTRII*-Transkriptmengen nachgewiesen wurden. Auch der Calystegin-Gehalt in den Keimen der *StTRI* RNAi Linie H war nicht erniedrigt und für die Linie N sogar erhöht (Abb. C- 13). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein verringertes Vermögen zur Pseudotropinbildung der *StTRI* RNAi Linien nach Tropinon-Fütterung in Blättern die endogene Calysteginbildung der Keime nicht erniedrigt.

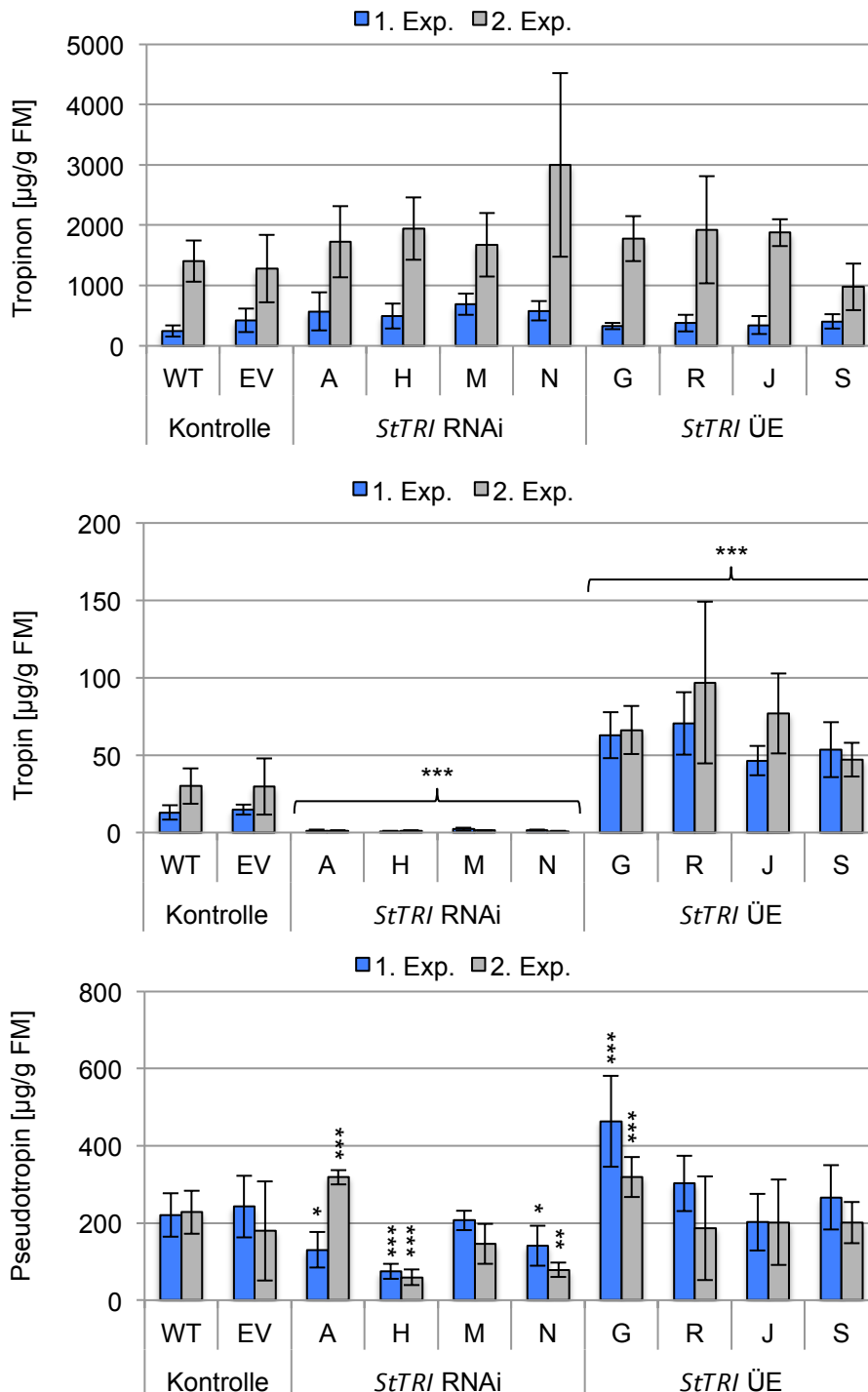


Abb. C- 10: Gehalt von Tropinon, Tropin, Pseudotropin in *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien nach Tropinon-Fütterung

Blätter von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor), *StTRI* RNAi Linien (A, H, M, N) und *StTRI* ÜE Linien (G, R, J, S) wurden acht Tage mit 5 mM Tropinon gefüttert. Tropinon (A), Tropin (B) und Pseudotropin (C) wurden wässrig extrahiert und durch GC-MS Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Experimenten, Kontrollen: n≥8 Kontrollen, *StTRI* RNAi Linien: n≥4, *StTRI* ÜE Linien: n≥4. Beim Students t-Test wurde jeweils der Gesamtgehalt der transgenen Linie mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV eines Experiments verglichen: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

### C 3.2.3 Calystegin-Gehalt der *StTRI* ÜE Linien

Die erhöhte Expression der *StTRI* könnte durch einen verstärkten Umsatz von Tropinon und einer vermehrten Tropinbildung Einfluss auf den metabolischen Fluss zu den Calysteginen nehmen. So könnte weniger Tropinon zur Pseudotropinbildung und für die Biosynthese der Calystegine zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden die Calystegine B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> in 0,5-1 cm langen Kartoffelkeimen der *StTRI* ÜE Linien quantifiziert. Fünf von sieben *StTRI* ÜE Linien zeigten keine Unterschiede im Gehalt der Calystegine verglichen mit den Kontrollpflanzen. Die Linien B und K akkumulierten signifikant erniedrigte Calysteginmengen von 1160 und 1460 µg/g FM verglichen mit dem Gehalt der Kontrollpflanzen von 2070 µg/g FM (Abb. C- 11). Da aber ein reduzierter Calystegin-Gehalt nicht für alle *StTRI* ÜE Linien gleichermaßen zutrifft, kann nicht auf eine generelle Beeinflussung der Calysteginbildung geschlossen werden.

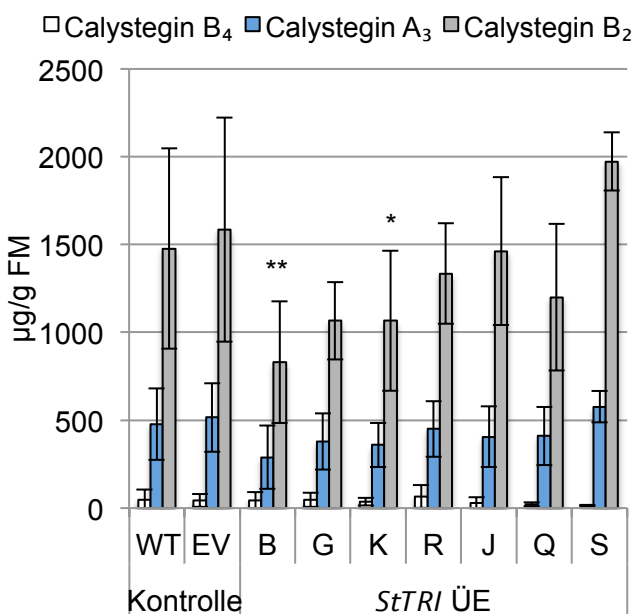


Abb. C- 11: Calystegin-Gehalt der *StTRI* ÜE Linien

Calystegine B<sub>4</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> wurden aus Kartoffelkeimen von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRI* ÜE Linien (B, G, K, R, J, Q, S) wässrig-methanolisch extrahiert und nach Silylierung durch GC-MS Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten, Kontrollen: n≥20, *StTRI* ÜE Linien: n≥8. Beim Students t-Test wurde jeweils der Gesamtcalystegin-Gehalt der transgenen Linie verglichen mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV: \* p<0,05, \*\* p<0,01.



### C 3.2.4 *StTRII*-Transkriptabundanz der *StTRI* RNAi Linien

*StTRI* und *StTRII* sind zu 73 % auf Nukleotidebene identisch. Die Nukleotid-Übereinstimmung im Bereich des *StTRI* RNAi Fragments zur *StTRII* beträgt 68 % (Abb. F- 10). Das gewählte *StTRI* RNAi Fragment (Nukleotid 367-702, F 6.3.2) befindet sich an der den C-Terminus codierenden Nukleotidsequenz und liegt außerhalb der im N-terminalen Bereich lokalisierten NADPH-Bindestelle (Abb. C- 27). Das *StTRI* RNAi Fragment wurde nach dem Kriterium ausgewählt, dass es nicht 21-24 hintereinander stehende, zu *StTRII* identische Nukleotide besitzt. Dadurch soll verhindert werden, dass sich in der *StTRI* RNAi Pflanze siRNA-Stücke des *StTRI* RNAi Fragments an *StTRII*-mRNA anlagern und diese spalten. In diesem unerwünschten Fall könnten simultan die *StTRII*-Transkriptmengen in den *StTRI* RNAi Linien erniedrigt sein.

Mittels qRT-PCR wurden unveränderte *StTRII*-Transkriptmengen in den *StTRI* RNAi Linien verglichen mit den Kontrollpflanzen ermittelt (Abb. C- 12). Untersucht wurden 0,5-1 cm lange Kartoffelkeime und die Wurzeln drei Wochen alter Kartoffelpflanzen. Das sind Organe, in denen bereits ein Vorkommen von *StTRII*-Transkripten nachgewiesen wurde (Keiner, 2001). Höhere relative Transkriptmengen in Wurzeln (B) als in Keimen (A) lassen erkennen, dass die *StTRII* stärker in den Wurzeln als in den Keimen exprimiert ist.

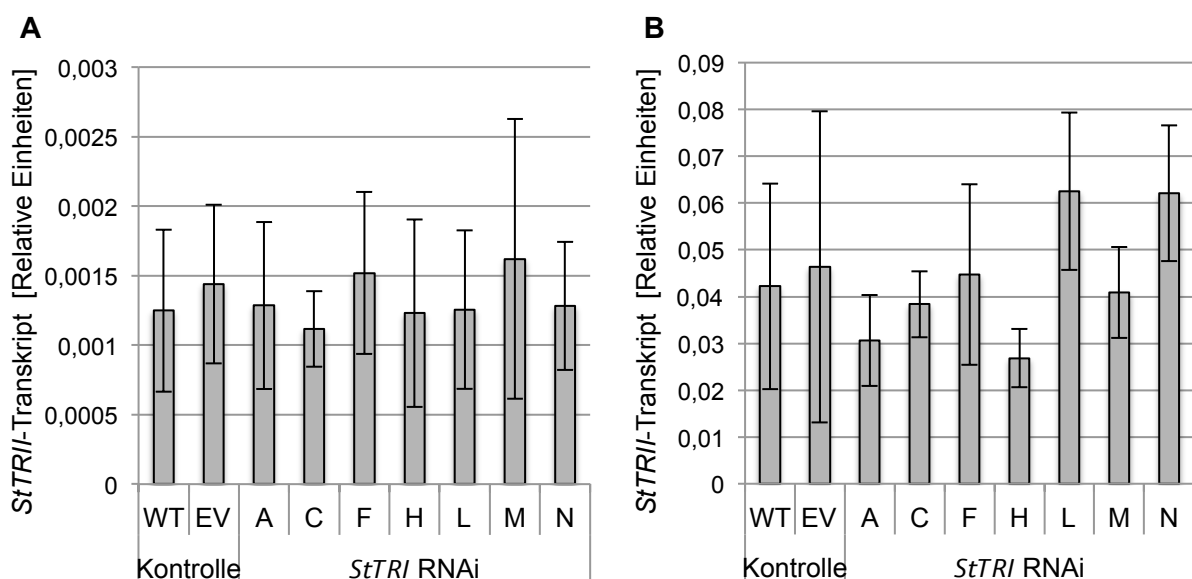


Abb. C- 12: *StTRII*-Transkriptabundanz in Keimen und Wurzeln von *StTRI* RNAi Linien

qRT-PCR Analyse der *StTRII*-Transkriptmengen in Keimen (A) und Wurzeln (B) von Kontrollen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRI* RNAi Linien. Als Referenzgen diente *StEF1α*. Gezeigt ist der  $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Wert aus zwei Experimenten als Mittelwert aus je 21 Proben (WT, EV) und je sechs Proben pro *StTRI* RNAi Linie sowie deren Standardabweichung.

C 3.2.5 Calystegin-Gehalt der *StTRI* RNAi Linien

Die Calystegine B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> akkumulierten in 0,5-1 cm langen Kartoffelkeimen von Kontrollpflanzen und *StTRI* RNAi Linien bis zu einem Gesamtgehalt von 1.500-3.600 µg/g FM (Abb. C- 13). Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und *StTRI* RNAi Linien zeigten sich nicht generell. Bei den untersuchten Linien waren Schwankungen ober- und unterhalb des Calystegin-Gehalts der Kontrollen feststellbar. Die *StTRI* RNAi Linie C zeigte einen signifikant erhöhten Gesamtcalystegin-Gehalt von 3.660 µg/g FM verglichen mit dem Gehalt der Kontrollpflanzen von 2.080 µg/g FM. Auch bei *StTRI* RNAi Linie N war der Gehalt an Gesamtcalysteginen mit 3.110 µg/g FM erhöht. Die *StTRII*-Transkriptmengen in den Keimen der betroffenen Linien C und N unterschieden sich aber nicht von denen der Kontrollpflanzen (Abb. C- 12A), so dass keine Korrelation zwischen den *StTRII*-Transkriptmengen und dem Calystegin-Gehalt vorliegt.

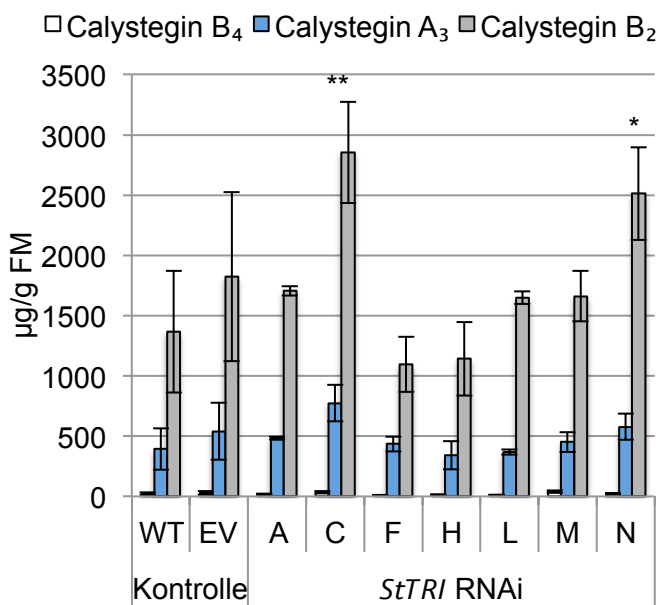


Abb. C- 13: Calystegin-Gehalt der *StTRI* RNAi Linien

Calystegine B<sub>4</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> wurden aus Kartoffelkeimen von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRI* RNAi Linien (A, C, F, H, L, M, N) wässrig-methanolisch extrahiert und nach Silylierung durch GC-MS Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Experimenten, Kontrollen: n≥14 *StTRI* RNAi Linien: n≥4. Beim Students t-Test wurde jeweils der Gesamtcalystegin-Gehalt der transgenen Linie verglichen mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV: \* p<0,05, \*\* p<0,01.

C 3.2.6 *StPin2*-Transkriptabundanz in *StTRI* RNAi Linien nach Verwundung

*In vitro* Untersuchungen zum Substratumsatz der *StTRI* mit Jasmonaten lieferten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Enzyms in der Reduktion von Jasmonaten in *S. tuberosum* (Dr. N. Reinhardt, unveröffentlichte Ergebnisse, siehe Kapitel A 1.3). Deshalb wurden die *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien für Untersuchungen zur Expression Jasmonat-abhängiger Gene und den möglichen veränderten Abbau verschiedener Jasmonate nach Verwundung genutzt.

Unterschiede in der Expression von Verwundungs- und Jasmonat-induzierbaren Genen in den transgenen Linien können Hinweise auf Veränderungen der Regulation des Jasmonatabbaus geben. In *S. tuberosum* sind die Proteinase-Inhibitor Gene, z.B. *StPin2*, durch Verwundung und Jasmonsäure induzierbar (Farmer et al., 1992; Ishikawa et al., 1994; Peña-Cortés et al., 1995). Ein verlangsamtes Abklingen von *StPin2*-Signalen in den *StTRI* RNAi Linien wäre ein Hinweis auf eine verlängerte Verweildauer von Jasmonsäure im Gewebe. Diese könnte durch einen verlangsamten Abbau von Jasmonsäure verursacht werden, da in den *StTRI* RNAi Linien durch fehlendes *StTRI* Protein der Jasmonatabbau verzögert sein könnte. Blätter von Kontrollpflanzen und *StTRI* RNAi Linien wurden nach Verwundung mittels Northern-Blot Analyse auf veränderte *StPin2*-Transkriptmengen untersucht. Unverwundete Blätter von Kontrollpflanzen und *StTRI* RNAi Linien zeigten sehr schwache *StPin2*-Signale. 24 Stunden nach Verwundung war eine Steigerung der *StPin2*-Transkriptakkumulation sowohl in den Kontrollen als auch in den *StTRI* RNAi Linien detektierbar. Drei und sechs Tage nach Verwundung zeigte sich ein unterschiedlicher Rückgang der *StPin2*-Expression in den Kontrollpflanzen und *StTRI* RNAi Linien. Diese Unregelmäßigkeit der Signalabnahme sowohl für die transgenen Linien als auch für die Kontrollen lässt keine Rückschlüsse auf Veränderungen des Jasmonatabbaus in den *StTRI* RNAi Linien zu (Abb. C- 14). In einem zweiten Experiment wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

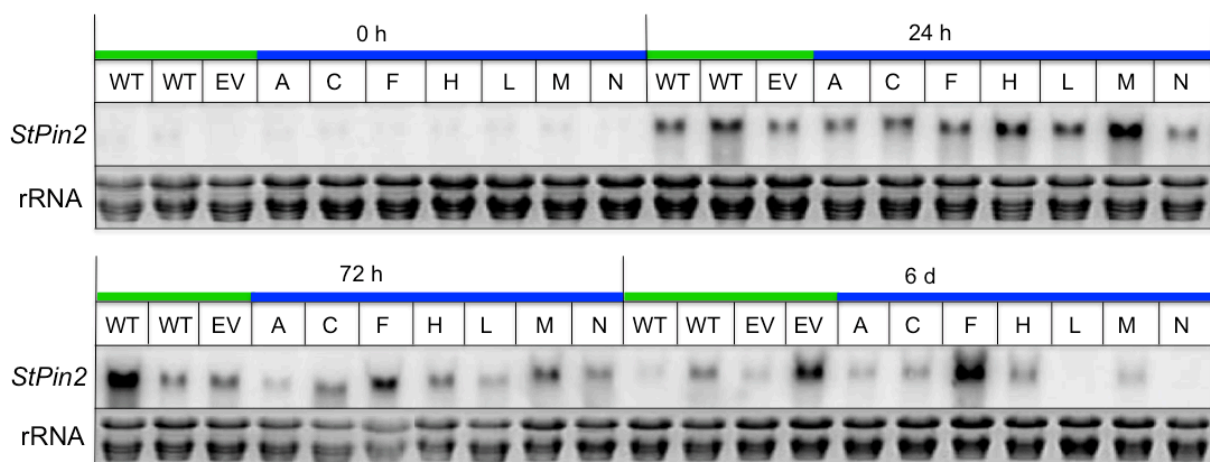


Abb. C- 14: *StPin2*-Transkriptabundanz in *StTRI* RNAi Linien

Northern-Blot Analyse von sieben unabhängigen *StTRI* RNAi Linien (blau: A, C, F, H, L, M, N) und Kontrollpflanzen (grün: WT-Wildtyp, EV-Leervektor). RNA wurde aus unverwundeten Kartoffelblättern (0 h) und Blättern zu verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 72 h und 6 d) nach Verwundung isoliert. 20 µg RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran geblotet. Die Hybridisierung erfolgte mit einem  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP-markierten full-length cDNA-Fragment von *StPin2* (666 bp). Gezeigt ist eines von zwei Experimenten. Als Ladekontrollen dienen die mit Ethidiumbromid gefärbten rRNA-Gele.

### C 3.2.7 Quantifizierung von Jasmonaten in *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien

Die Analyse von Jasmonaten in unverwundeten und verwundeten Blättern von *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Pflanzen kann mögliche Veränderungen in dem Gehalt von Jasmonsäure (JA), Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile), 12-Hydroxyjasmonat (Tuberonsäure, 12-OH-JA), 12-Oxophytodiensäure (OPDA) und Cucurbinsäure (CA) aufklären. Wenn das Enzym StTRI einen Beitrag zum Abbau von Jasmonaten nach Verwundung leistet, könnten Gehaltsunterschiede der Jasmonate durch eine verringerte (in *StTRI* RNAi) oder gesteigerte (in *StTRI* ÜE) StTRI-Enzymaktivität verursacht sein.

CA ist nicht kommerziell verfügbar. Aus diesem Grund wurde aus (-)-Jasmonsäure, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Hause, IPB Halle, ein CA-Standard durch Reduktion mit Natriumborhydrid hergestellt (B 2.6.12) und durch MS/MS Analyse identifiziert (Abb. F- 37, Abb. F- 38). Eine Enantiomertrennung in die beiden CA-Stereoisomere (Abb. A- 3) wurde nicht vorgenommen. Die Quantifizierung der Jasmonate JA, JA-Ile, 12-OH-JA, OPDA und CA erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. G. Balcke, IPB Halle.

Vor der Aufarbeitung wurden den Blattproben je 50 ng deuterierte Standards von  $^2\text{H}_6$ -JA,  $^2\text{H}_2$ -JA-Ile und  $^2\text{H}_5$ -OPDA zugegeben. Die Probenaufarbeitung und Quantifizierung der Jasmonate per UPLC-ESI-MS/MS erfolgte nach der Methode aus Balcke et al. (2012). Der Gehalt an JA und JA-Ile stieg in Blättern von Kontrollpflanzen und transgenen Linien 30 min nach Verwundung auf einen höchsten Wert von 1  $\mu\text{g/g}$  FM an. Acht Stunden nach Verwundung war der Gehalt an JA-Ile bei 0,2  $\mu\text{g/g}$  FM für die *StTRI* RNAi Linien noch leicht, aber nicht signifikant erhöht (Students t-Test:  $p > 0,05$ ) verglichen mit den Kontrollpflanzen und *StTRI* ÜE Linien. CA wurde in Kartoffelblättern erstmals identifiziert und quantifiziert. Der CA-Gehalt ist in allen Proben und zu allen untersuchten Zeitpunkten mit 0,02-0,08  $\mu\text{g/g}$  FM sehr gering (Abb. C- 15). Der Gehalt an OPDA zeichnete sich in allen Proben durch starke individuelle Schwankungen bis 3  $\mu\text{g/g}$  FM aus. Bei Vergleich der unterschiedlichen Linien und Zeitpunkte war aber keine Regelmäßigkeit erkennbar (Daten nicht gezeigt).

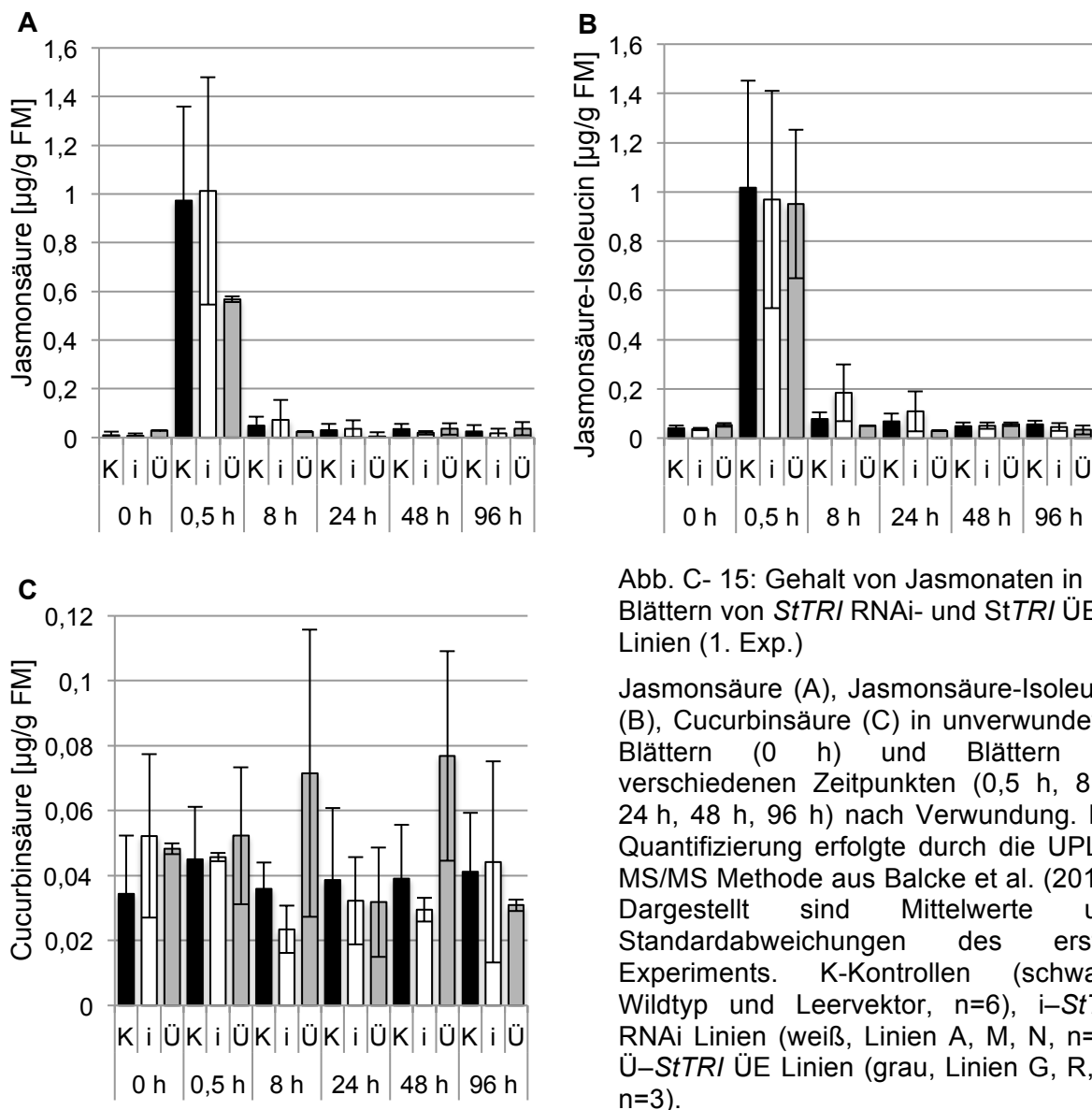


Abb. C- 15: Gehalt von Jasmonaten in Blättern von *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien (1. Exp.)

Jasmonsäure (A), Jasmonsäure-Isoleucin (B), Cucurbinsäure (C) in unverwundeten Blättern (0 h) und Blättern zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 8 h, 24 h, 48 h, 96 h) nach Verwundung. Die Quantifizierung erfolgte durch die UPLC-MS/MS Methode aus Balcke et al. (2012). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des ersten Experiments. K-Kontrollen (schwarz, Wildtyp und Leervektor, n=6), i-*StTRI* RNAi Linien (weiß, Linien A, M, N, n=3); Ü-*StTRI* ÜE Linien (grau, Linien G, R, S, n=3).

Um mögliche Unterschiede im Abbau der Jasmonate nach dem Zeitpunkt 30 min nach Verwundung in *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien zu erkennen, wurden die Zeitabstände für die Gehaltsbestimmungen zwischen 30 min und 24 h engmaschiger analysiert. In dem Gehalt von JA, JA-Ile, OPDA und 12-OH-JA zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen, *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien. Die schrittweise Erniedrigung des Gehalts von JA und JA-Ile von ca. 1 µg/g FM 2 h nach Verwundung korrelierte mit einem Anstieg von 12-OH-JA bis auf 1 µg/g FM 4 h nach Verwundung (Abb. C- 16). Der OPDA-Gehalt war über den betrachteten Zeitraum konstant in fast allen Proben bei ca. 0,5 µg/g FM. Daten zum CA-Gehalt in den Blättern konnten für dieses Experiment nicht erhoben werden, da der Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode aus Balcke et al. (2012) lag:  $^2\text{H}_6\text{-JA}$  Bestimmungsgrenze = 12,93 nmol/l, dies entspricht 2-3 ng/g FM Blatt. Der

unveränderte Gehalt der verschiedenen Jasmonate in den *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien im Vergleich zu Kontrollpflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung ließ keine Hinweise auf die Beteiligung der *StTRI* an der Reduktion von Jasmonaten zu. Da CA aber nur in einem von zwei Experimenten quantifiziert werden konnte, wurde in einem nächsten Experiment (Kapitel C 3.2.8) die mögliche Beteiligung der *StTRI* an der CA-Bildung erneut geprüft.

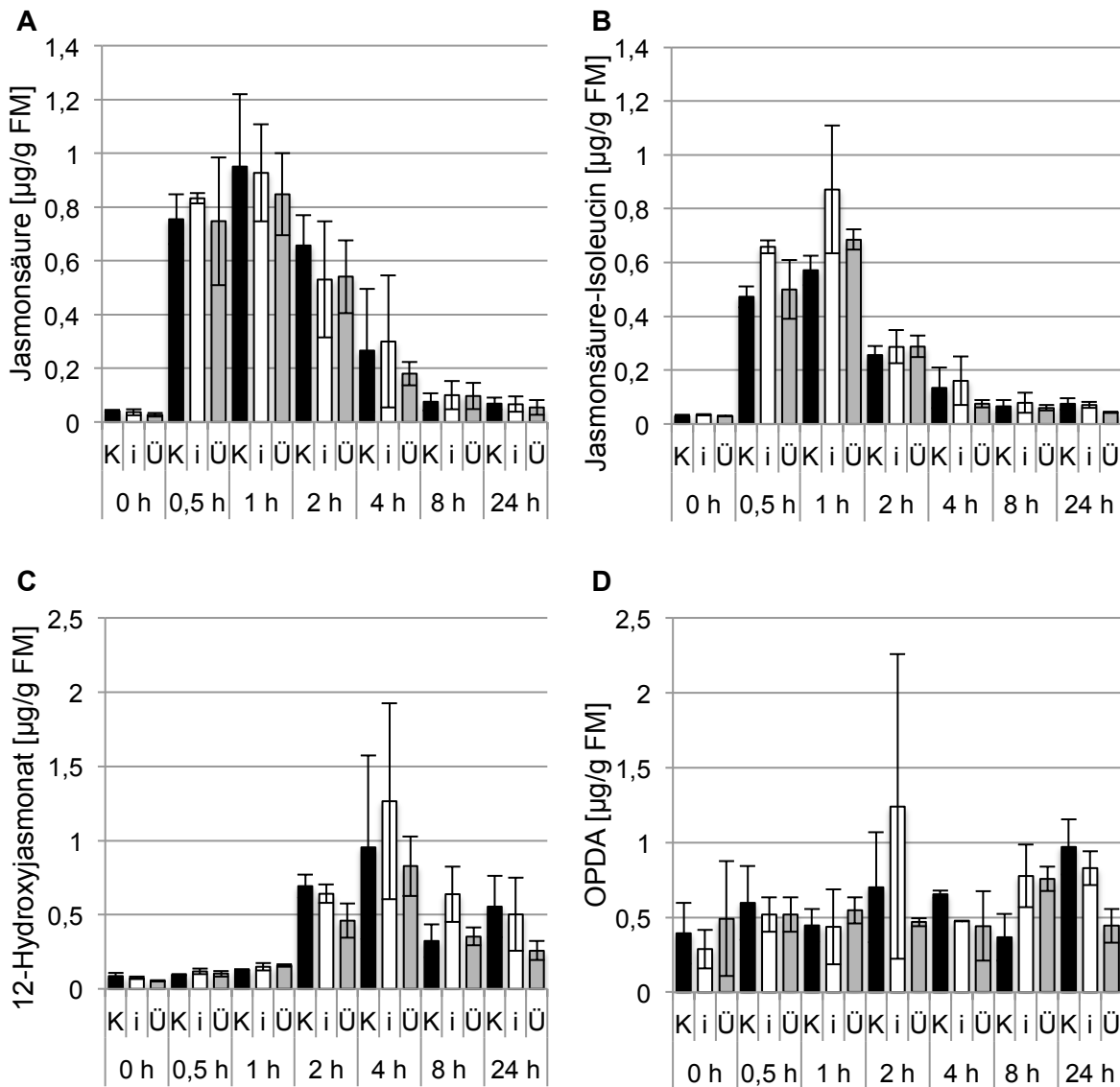


Abb. C- 16: Gehalt von Jasmonaten in Blättern von *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien (2. Exp.)

Jasmonsäure (A), Jasmonsäure-Isoleucin (B), 12-Hydroxyjasmonat (C) und OPDA (D) in unverwundeten Blättern (0 h) und Blättern zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h) nach Verwundung. Die Quantifizierung erfolgte durch die UPLC-MS/MS Methode aus Balcke et al. (2012). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen des zweiten Experiments. K-Kontrollen (schwarz, Wildtyp und Leervektor, n=6), i-*StTRI* RNAi Linien (weiß, Linien A, M, N, n=3); Ü-*StTRI* ÜE Linien (grau, Linien G, R, S, n=3).

C 3.2.8 Methyljasmonat-Fütterung an *StTRI* ÜE Linien

Flüchtige, organische Verbindungen, zu denen auch der Methylester der Jasmonsäure (Methyljasmonat, MeJA) gehört, werden über Spaltöffnungen und durch Diffusion in Blätter aufgenommen (Baldwin et al., 2006). In der Pflanze wird MeJA durch Esterasen zu JA abgebaut und mit Isoleucin konjugiert (Stuhlfelder et al., 2002; Tamogami et al., 2008). Wenn die *StTRI* ÜE Linien zu einem verstärkten Abbau von JA in der Lage sind, kann nach MeJA-Aufnahme und Metabolismus zu JA eine reduzierte Verweildauer von JA im Blattgewebe und ein Anstieg von CA erwartet werden. Durch die Inkubation von Kartoffelblättern der Kontrollpflanzen und *StTRI* ÜE Linien auf 50  $\mu\text{M}$  MeJA-Lösung in geschlossenen Petrischalen sollte eine Aufnahme von MeJA über die Luft ermöglicht werden.

Der Gehalt an JA und CA wurde nach verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 6 h, 24 h) mit einer optimierten Methode zur Jasmonat-Quantifizierung (B 2.6.11, Dr. G. Balcke, IPB Halle, unveröffentlicht) gemessen. Eine Stunde nach Inkubationsbeginn erhöhte sich der Gehalt an JA bis auf 0,7  $\mu\text{g/g}$  FM in Kontrollpflanzen und *StTRI* ÜE Linien. Im weiteren Verlauf der Behandlung gab es keine statistisch signifikanten Veränderungen (Students t-Test:  $p > 0,05$ ) des JA-Gehalts zwischen Kontrollpflanzen und transgenen Linien. Ohne und auch nach Inkubation auf MeJA-Lösung lag der CA-Gehalt im Blatt zwischen 0,04-0,06  $\mu\text{g/g}$  FM (Abb. C- 17). Da keine Erhöhung des CA-Gehalts in den *StTRI* ÜE Linien detektiert werden konnte, kann eine Beteiligung der *StTRI* an der CA-Bildung *in vivo* nicht belegt werden.

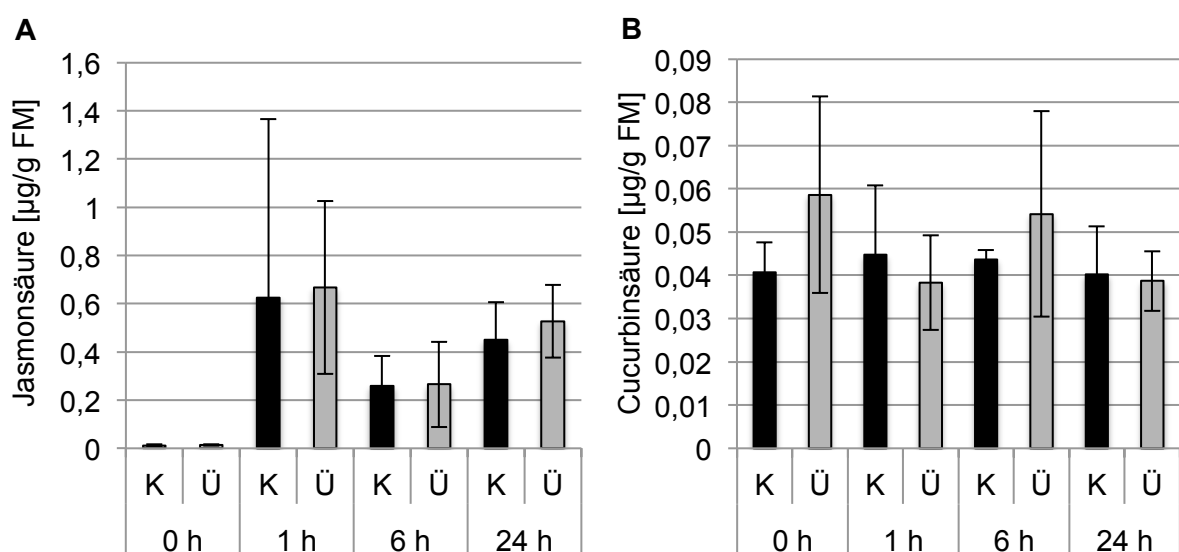


Abb. C- 17: Gehalt von Jasmonsäure und Cucurbinsäure in *StTRI* ÜE Linien

Jasmonsäure (A) und Cucurbinsäure (B) in Kartoffelblättern von Kontrollen (K, schwarz, Wildtyp und Leervektor) und *StTRI* ÜE Linien (Ü, grau: Linien R, B, S) zu verschiedenen

Zeitpunkten (0 h, 1 h, 6 h, 24 h) nach Inkubation auf 50  $\mu$ M MeJA-Lösung. Die Quantifizierung erfolgte durch die UPLC-Methode mit on-line SPE-Kombination und ESI-MS/MS (B 2.6.11, Dr. G. Balcke, IPB Halle, unveröffentlicht). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten, Kontrollen: n=12, Ü: n=6.

### **C 3.3 Reduktion der *StTRII*-Expression in *S. tuberosum***

#### C 3.3.1 Herstellung und Charakterisierung der *StTRII* RNAi Linien

Für das Enzym *StTRII* ist bisher die postulierte Funktion der Reduktion von Tropinon zu Pseudotropin *in vivo* und damit die Beteiligung an der Calysteginbiosynthese in *S. tuberosum* nicht bestätigt. Für den *in vivo* Beweis der Pseudotropinbildung wurde die *StTRII*-Expression in der Kartoffelpflanze durch RNAi unterdrückt. Dazu erfolgte die Klonierung des *StTRII* RNAi Fragments (F 6.3.3) mittels Gateway-Technik aus dem Vektor pENTR™/D-Topo (Abb. F- 2) hinter den 35S-Promoter in den Vektor pHELLSGATE8 (Helliwell et al., 2002; Wesley et al., 2001). *S. tuberosum* Désirée-Pflanzen wurden stabil mit dem Expressionskonstrukt transformiert. Die Integration des Konstrukts in das Genom der regenerierten Pflanzen wurde durch Southern-Blot Analyse festgestellt. Insgesamt wurden 18 positive Transformanden erhalten, die in Sterilkultur weitervermehrt wurden (siehe Anhang, Abb. F- 17).

Eine reduzierte *StTRII*-Expression wurde durch qRT-PCR in Wurzeln und Keimen nachgewiesen (Abb. C- 18). In diesen Organen wurden zuvor bereits endogene *StTRII*-Transkripte mittels Northern-Blot Analyse detektiert (Keiner et al., 2002). Der Effekt einer reduzierten *StTRII*-Expression war in fünf *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y) in der Wurzel und in den Keimen signifikant. Für die Linien T und Y zeigte sich dabei eine etwas schwächere, aber dennoch signifikante Herabsetzung der *StTRII*-Expression. Die relativen *StTRII*-Transkriptmengen lagen in Wurzeln und Keimen sowohl für die Kontrollpflanzen, als auch für die *StTRII* RNAi Linien in gleicher Größenordnung (Abb. C- 18).



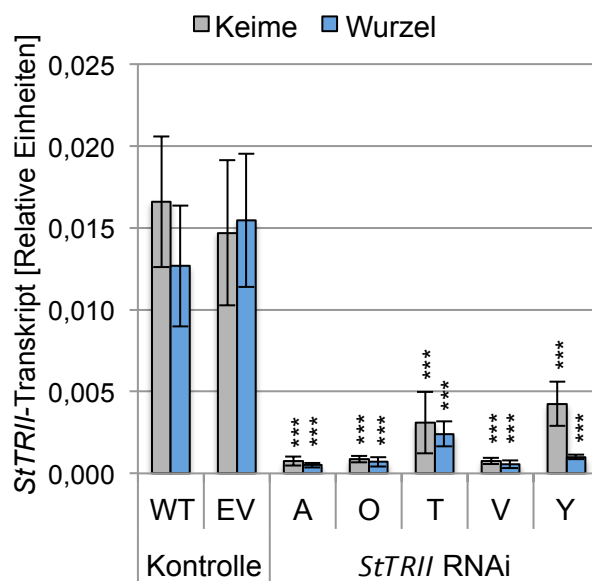


Abb. C- 18: *StTRII*-Transkriptabundanz in Keimen und Wurzeln von *StTRII* RNAi Linien

qRT-PCR Analyse der *StTRII*-Transkriptmengen in Keimen und Wurzeln von Kontrollen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y). Als Referenzgen diente *StEF1α*. Die Daten sind zusammengefasst aus je zwei Experimenten für Keime und Wurzeln. Gezeigt ist der  $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Wert als Mittelwert aus je 20 Proben (WT, EV) und  $\geq 6$  Proben pro *StTRII* RNAi Linie sowie deren Standardabweichung. Beim Students t-Test wurde jeweils die transgene Linie verglichen mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV: \*\*\*  $p < 0,001$ .

### C 3.3.2 *StTRI*-Transkriptabundanz der *StTRII* RNAi Linien

Als *StTRII* RNAi Fragment wurde der gleiche Sequenzbereich (Nukleotid 367-702, F 6.3.3) am Ende der *StTRII*-Sequenz wie zuvor für das *StTRI* RNAi Fragment gewählt. In diesem Bereich stimmen *StTRI* und *StTRII* zu 68 % auf Nukleotidebene überein. Ob in den *StTRII* RNAi Pflanzen die *StTRI*-Transkriptmengen durch einen unerwünschten RNAi-Effekt für *StTRI* herabgesetzt sind, wurde durch qRT-PCR ermittelt. Hierzu wurde die relative Expression der *StTRI* in Blättern nach Fütterung mit Tropinon für acht Tage und in Wurzeln drei Wochen alter Pflanzen bestimmt (Abb. C- 19).

Die *StTRI*-Transkriptmengen der fünf *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y) waren im Vergleich zu den Kontrollpflanzen in mit Tropinon gefütterten Blättern und in Wurzeln nicht erniedrigt (Students t-Test:  $p > 0,05$ ). Damit lag keine unerwünschte Herabsetzung der *StTRI*-Expression in den *StTRII* RNAi Linien vor. Eine große Variabilität war für Linie V in beiden Organen zu erkennen. In den Wurzeln waren generell stark variierende Transkriptmengen der *StTRI* messbar. Darüber hinaus zeigten die Wurzeln nur sehr niedrige *StTRI*-Transkriptmengen im Vergleich zu den mit Tropinon gefütterten Blättern (Abb. C- 19). Dem entgegen wurden in vorangegangenen Studien durch Northern-Blot Analyse höhere *StTRI*-Transkriptmengen in Wurzeln als in Kartoffelblättern nachgewiesen (Keiner, 2001).

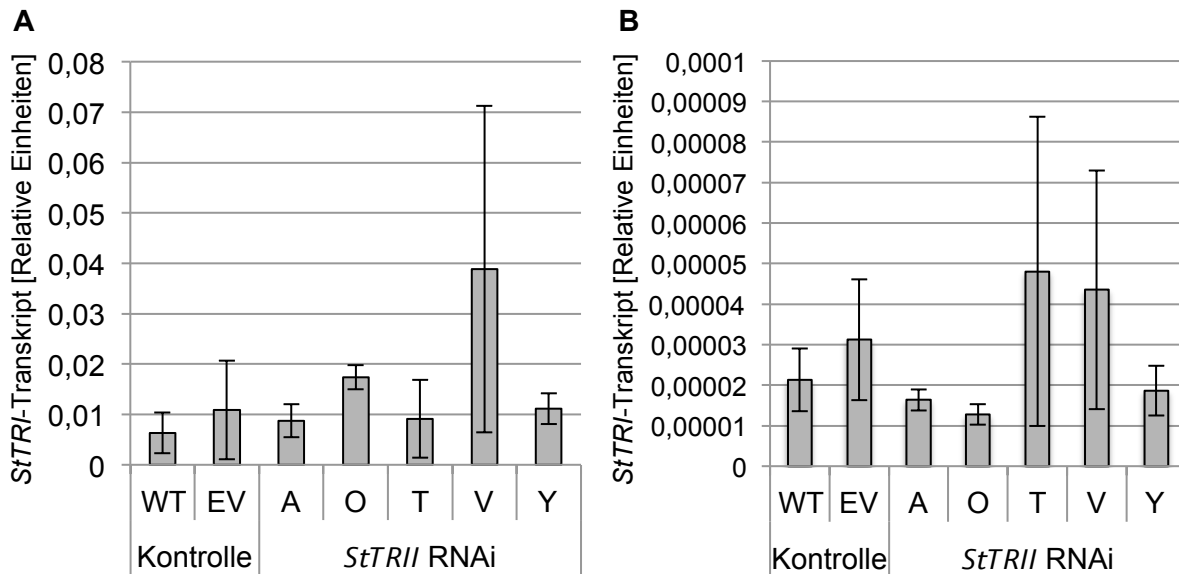


Abb. C- 19: *StTRI*-Transkriptabundanz in Blättern und Wurzeln von *StTRII* RNAi Linien

qRT-PCR Analyse der *StTRI*-Transkriptmengen in acht Tage lang mit Tropinon gefütterten Blättern (A) und in Wurzeln (B) von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y). Als Referenzgen diente *StEF1α*. Gezeigt ist der  $2^{-\Delta\text{ct}}$ -Wert aus zwei Experimenten als Mittelwert aus je 20 Proben (WT, EV) und je 8 Proben pro *StTRII* RNAi Linie sowie deren Standardabweichung.

### C 3.3.3 Tropinon-Fütterung an *StTRII* RNAi Linien

Durch Fütterung von Tropinon an Blätter von *StTRII* RNAi Linien und Kontrollpflanzen können Unterschiede in der Bildung von Pseudotropin nachvollzogen werden. Ungefütterte Blätter eignen sich nicht, da sie nur einen sehr geringen endogenen Gehalt an Pseudotropin von max. 6  $\mu\text{g/g}$  FM aufweisen (Abb. C- 5). Die Durchführung der Fütterungsexperimente gestaltete sich analog der Tropinon-Fütterung an *StTRI* RNAi- und *StTRI* ÜE Linien (B 2.6.1, C 3.2.2). Die Blätter wurden acht Tage in 5 mM Tropinon-Lösung gestellt. Ist die *StTRII* in der Kartoffelpflanze an der Pseudotropinbildung beteiligt, so wird eine verringert gebildete Pseudotropinmenge in den *StTRII* RNAi Linien erwartet.

In den Kontrollpflanzen wurde Pseudotropin nach Tropinon-Fütterung bis auf  $577 \pm 303 \mu\text{g/g}$  FM (WT) und  $622 \pm 214 \mu\text{g/g}$  FM (EV) gebildet. Alle fünf *StTRII* RNAi Linien wiesen einen bis unter 10  $\mu\text{g/g}$  FM signifikant erniedrigten Gehalt an Pseudotropin auf. Das entspricht einer Reduktion der Pseudotropinbildung um mehr als 98 %. Daraus kann abgeleitet werden, dass das Enzym *StTRII* einen wesentlichen Beitrag zur Pseudotropinbildung *in vivo* leisten kann. Dabei blieb Tropin unverändert in Kontrollpflanzen und *StTRII* RNAi Linien mit einem Gehalt von

20-25  $\mu\text{g/g}$  FM (Abb. C- 20). Dieser konstante Tropin-Gehalt korreliert mit der unveränderten *StTRI*-Expression in den *StTRII* RNAi Linien (Abb. C- 19).

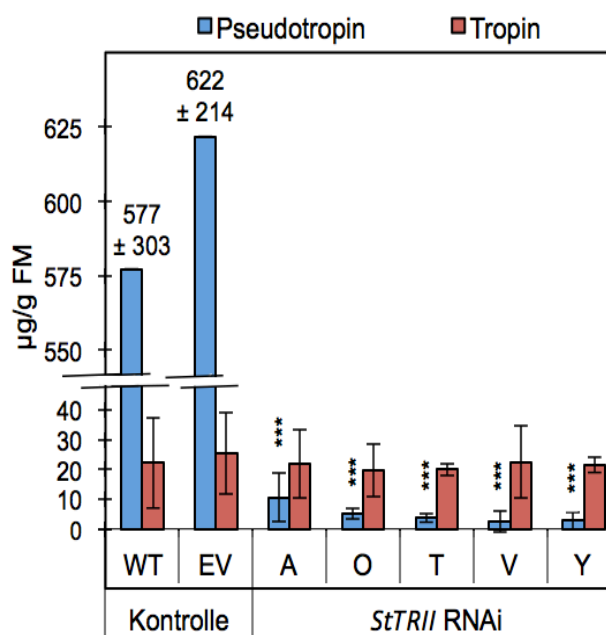


Abb. C- 20: Gehalt von Tropin und Pseudotropin in *StTRII* RNAi Linien nach Tropinon-Fütterung

Blätter von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y) wurden acht Tage mit 5 mM Tropinon gefüttert. Tropin und Pseudotropin wurden wässrig extrahiert und durch GC-MS Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Experimenten, Kontrollen:  $n \geq 10$ , *StTRII* RNAi Linien:  $n \geq 5$ . Pseudotropin-Gehalt WT: 577  $\pm$  303  $\mu\text{g/g}$  FM, EV: 622  $\pm$  214  $\mu\text{g/g}$  FM. Beim Students t-Test wurde jeweils der Gesamtgehalt der transgenen Linie mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV verglichen: \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### C 3.3.4 Calystegin-Gehalt der *StTRII* RNAi Linien

Der Gehalt der Calystegine B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> wurde in 0,5-1 cm langen Keimen von *StTRII* RNAi Linien im Vergleich zu Kontrollpflanzen untersucht. In vorangegangenen Calystegin-Gehaltsbestimmungen dieser Arbeit (Abb. C- 6, Abb. C- 11, Abb. C- 13) wurde bereits gezeigt, dass Kartoffelkeime bis zu 5.000  $\mu\text{g/g}$  FM Gesamtcalystegine enthalten und damit geeignet sind, um eine Reduktion der gebildeten Calysteginmenge anzuzeigen. Blätter sind eher ungeeignet für derartige Untersuchungen, da die Calystegine B<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> in den Blättern von 30-40 cm hohen Pflanzen gemeinsam nur einen geringen Gehalt von weniger als 50  $\mu\text{g/g}$  FM aufweisen (Keiner and Dräger, 2000). Mit der in dieser Arbeit verwendeten Extraktions- und Quantifizierungsmethode für Calystegine (B 2.6.7, B 2.6.8, B 2.6.9) wurden in unbehandelten, mittleren Blättern drei bis vier Wochen alter Kartoffelpflanzen keine Signale für Calystegine detektiert. Quantifizierbar ist ein Calystegin-Gehalt ab 12  $\mu\text{g/g}$  FM.

Abb. C- 21 zeigt, dass Keime von Kontrollpflanzen 4.000-6.000  $\mu\text{g/g}$  FM Gesamtcalystegine in der typischen Reihenfolge Calystegin B<sub>2</sub> > Calystegin A<sub>3</sub> > Calystegin B<sub>4</sub> akkumulieren. Die *StTRII* RNAi Linien unterschieden sich stark in ihrem Calystegin-Gehalt. In Linie T wurden die drei Calystegine zu einem Gehalt von

4.000 µg/g FM ohne Unterschied zu den Kontrollpflanzen gebildet. Linie Y zeigte eine signifikante Reduktion des Gesamtcalystegin-Gehalts um mehr als die Hälfte verglichen mit den Kontrollen. In den Linien A, O und V war die Calysteginbildung nahezu vollständig unterdrückt. Dabei enthielten *StTRII* RNAi Linie A nur noch 16 µg/g FM, Linie O 14 µg/g FM und Linie V 125 µg/g FM Gesamtcalystegine. Calystegin B<sub>4</sub> war in diesen Linien nicht mehr nachweisbar. Die typische Reihenfolge der Calysteginakkumulation: Calystegin B<sub>2</sub> > Calystegin A<sub>3</sub> > Calystegin B<sub>4</sub> änderte sich für die *StTRII* RNAi Linien nicht.

Die insgesamt starken Unterschiede in der Calysteginbildung der *StTRII* RNAi Linien korrelieren mit den *StTRII*-Transkriptmengen in den Keimen (Abb. C- 18). Die *StTRII*-Transkriptmengen waren am stärksten erniedrigt in Keimen der Linien A, O und V, deren Calystegin-Gehalt auch am niedrigsten war. Die Linien T und Y zeigten erhöhte *StTRII*-Transkriptmengen und akkumulierten auch erhöhte Calysteginmengen im Vergleich zu den anderen drei *StTRII* RNAi Linien (A, O, V), Linie T sogar bis auf das Niveau der Kontrollen (Abb. C- 21). Aus diesen Korrelationen kann abgeleitet werden, dass die *StTRII* für die Calysteginbiosynthese in den Keimen notwendig ist.

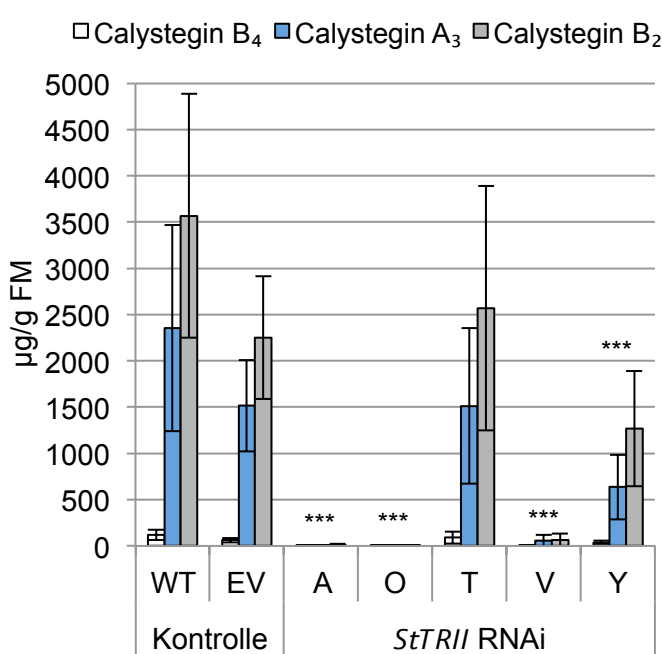


Abb. C- 21: Calystegin-Gehalt der *StTRII* RNAi Linien

Calystegine B<sub>4</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> wurden aus Kartoffelkeimen von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y) wässrig-methanolisch extrahiert und nach Silylierung durch GC-MS Analyse quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standard-abweichungen von drei Experimenten, Kontrollen: n≥16, *StTRII* RNAi Linien n≥10, Bestimmungsgrenze der Calystegine 12 µg/g FM. Beim Students t-Test wurde jeweils der Gesamtcalystegin-Gehalt der transgenen Linie verglichen mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV: \*\*\* p<0,001.

### C 3.4 Sporenkeimungsassays mit *P. infestans* und Calystegin B<sub>2</sub> sowie Extrakten aus *StTRII* RNAi Linien

Um Hinweise auf eine mögliche Funktion der Calystegine als Abwehrmetaboliten in *S. tuberosum* zu erhalten, wurde der Einfluss von Calystegin B<sub>2</sub> auf die Auskeimung der Sporen von *P. infestans* in Sporenkeimungsassays untersucht. Calystegin B<sub>2</sub> ist das am stärksten vorkommende Calystegin in den Keimen der Kartoffelpflanze und wurde aus diesem Grund für die Untersuchungen ausgewählt. Weiterhin wurden Keimextrakte der *StTRII* RNAi Linien A und O verwendet, deren Calystegin-Gehalt am stärksten reduziert ist (Abb. C- 21). Es wurde die Keimungsrate der *P. infestans* Sporen in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Calystegin B<sub>2</sub> (10 µM, 100 µM, 500 µM und 15 mM) und Wasser verglichen. Zusätzlich wurde die Sporenkeimungsrate nach Zugabe von Keimextrakten mit physiologischem Calystegin-Gehalt (WT, EV) und stark reduziertem Calystegin-Gehalt (*StTRII* RNAi Linien A und O) analysiert (Abb. C- 22). Jeder Sporenkeimungsassay einer Behandlung wurde dreifach angesetzt, dabei wurden pro Ansatz 15 Fotos auf gekeimte und nicht gekeimte Sporen ausgezählt. Die Sporenanzahl pro Foto variierte je nach Experiment zwischen 20 und 60.

Die Experimente (Abb. C- 22) zeigen, dass Calystegin B<sub>2</sub> im Assay keinen Einfluss auf die Sporenkeimung von *P. infestans* hat. In Gegenwart von bis zu 15 mM Calystegin B<sub>2</sub> Endkonzentration im Assay wurden Sporenkeimungsraten von 75-86 % erreicht. Im Gegensatz dazu hemmten alle Extrakte aus Kartoffelkeimen die Sporenkeimung sehr stark, so dass nur geringe Keimungsraten von 0,2-0,4 % erzielt wurden. Dabei unterschieden sich Extrakte aus Kartoffelkeimen mit physiologischem Calystegin-Gehalt (WT, EV) und stark reduziertem Calystegin-Gehalt (*StTRII* RNAi Linien A und O) nicht. Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Hemmung der *P. infestans* Sporenkeimung durch die Extrakte nicht auf die darin enthaltenen Calystegine zurückzuführen ist. Zusätzlich ist auch kein auf die Sporenkeimung hemmender Effekt mit der Reinsubstanz Calystegin B<sub>2</sub> aufgetreten. Es kann vermutet werden, dass andere Sekundärmetaboliten, wie die in Kartoffelkeimen vorkommenden Steroidalkaloide α-Solanin und α-Chaconin (Barceloux, 2009), an der Hemmung der *P. infestans* Sporenkeimung beteiligt sein könnten. Um den Einfluss des bei der Extrakterstellung verwendeten Lösungsmittels auf die Sporenkeimung auszuschließen, wurde gezeigt, dass in

Sporenkeimungsassays mit eingegengtem Lösungsmittel (LM) keine geringere Sporenkeimungsrate im Vergleich zu Wasser und 15 mM Calystegin B<sub>2</sub> auftrat.

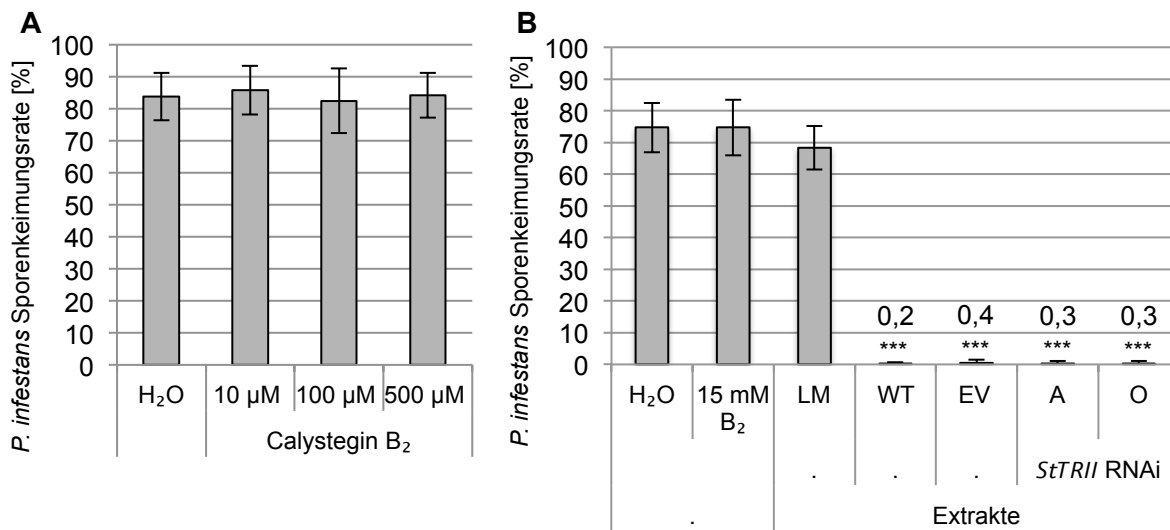


Abb. C- 22: *P. infestans* Sporenkeimung nach verschiedenen Behandlungen

*P. infestans* Sporenkeimungsassays, Experiment A mit Wasser (H<sub>2</sub>O) als Negativkontrolle, Calystegin B<sub>2</sub> (Endkonzentrationen im Assay: 10 µM, 100 µM, 500 µM), Experiment B mit 15 mM Calystegin B<sub>2</sub>, Extrakten aus Kartoffelkeimen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor, *StTRII* RNAi Linien A, O) sowie Wasser (H<sub>2</sub>O) und eingegengtem Lösungsmittel (LM) als Negativkontrollen. Das LM (Methanol:Wasser, 1:1) wurde von 20 ml auf 500 µl eingegengt. Die Keimextrakte wurden aus 1,0 g FM mit zweimal 10 ml Methanol:Wasser (1:1) hergestellt und auf 500 µl eingegengt. Im Assay wurden *P. infestans* Sporensuspensionen (2-5\*10<sup>5</sup> Sporen/ml) mit Calystegin B<sub>2</sub>-Lösungen oder Keimextrakten gemischt und 20 h bei 15 °C inkubiert. Jede Behandlung wurde dreifach angesetzt und die Sporen auf je 15 Fotos ausgezählt. Beim Students t-Test wurde die Sporenkeimungsrate des jeweiligen Extrakts mit der des eingegengten LMs verglichen: \*\*\* p<0,001.

### C 3.5 Untersuchungen zum Phänotyp der transgenen Pflanzen

Alle für die Experimente genutzten Linien der verschiedenen Konstrukte (*StTRI* RNAi, *StTRII* RNAi, *StTRI* ÜE, *DsPMT* Ex) wurden phänotypisch nach den in Kapitel B 2.3 beschriebenen Merkmalen charakterisiert. Untersucht wurden Pflanzenwachstum sowie Knollen- und Keimbildung. Für die Linien der Konstrukte *StTRI* RNAi, *StTRI* ÜE und *DsPMT* Ex konnten keine phänotypisch sichtbaren Unterschiede zu Kontrollpflanzen (WT, EV) festgestellt werden. Repräsentativ für die zur Beurteilung erfassten Parameter zur phänotypischen Charakterisierung wird in den folgenden Kapiteln die phänotypische Untersuchung der *StTRII* RNAi Linien detailliert vorgestellt.

### C 3.5.1 Pflanzenwachstum

Die Kartoffelpflanzen der Kontrollen (WT, EV) und transgenen Linien aller Konstrukte (*StTRI* RNAi, *StTRII* RNAi, *StTRI* ÜE, *DsPMT* Ex) wurden nach Einsetzen in Erde:Sand (1:1) während des Wachstums in der Phytokammer (drei bis vier Wochen) und danach im Gewächshaus bis zum Abreifen (drei bis vier Monate) auf phänotypische Unterschiede untersucht. Die Gleichmäßigkeit des Wachstums, die erreichte Wuchshöhe der Pflanzen, die Färbung, Form und Größe der Blätter der transgenen Linien zeigten keine Unterschiede zu den Kontrollpflanzen. Alle Pflanzen begannen nach ca. zwei Wochen Wachstum in der Phytokammer Stolone zu bilden. Im Gewächshaus blühten sowohl die Linien der transgenen Pflanzen als auch die Kontrollpflanzen zur gleichen Zeit. Die Blüten zeigten keine morphologischen Unterschiede hinsichtlich Farbe, Form oder Größe der Blütenbestandteile. Der Habitus von Kontrollpflanzen und transgenen Linien unterschied sich nicht während des Abreifens im Gewächshaus.

Gebildete Knollen der *StTRII* RNAi Linien A, O, V und der Kontrollpflanzen wurden nach der Ernte erneut in Erde ausgebracht und die Pflanzen der nächsten Generation wiederum bis zur Erntereife der Knollen hinsichtlich phänotypischer Merkmale (Wachstum, Blätter- und Blütenbildung) analysiert. Auch in dieser zweiten Generation wurden keine morphologischen Unterschiede zu Kontrollpflanzen festgestellt. Der Habitus ca. sechs Wochen alter Pflanzen der zweiten Generation von *StTRII* RNAi Linien und Kontrollen (WT, EV) ist in Abb. C- 23 dokumentiert.



Abb. C- 23: Habitus der *StTRII* RNAi Pflanzen

Sechs Wochen alte Kartoffelpflanzen der zweiten Generation von Kontrollen (WT-Wildtyp: 1-2, EV-Leervektor: 1-2) und *StTRII* RNAi Linien (A1-2, O1-2, V1-2), Anzucht unter Langtagbedingungen im Gewächshaus, 15-20 °C, in Erde:Sand (1:1).

### C 3.5.2 Kartoffelknollen

Die pro Pflanze gebildeten Knollen wurden nach vollständigem Abreifen jeder Pflanze geerntet und phänotypisch bewertet. Zu den dazu erfassten Parametern gehörten die Bestimmung des Gesamtknollengewichts der von jeder Pflanze gebildeten Knollen, die Bestimmung der Anzahl der Knollen jeder Pflanze und die Bewertung der Morphologie der Knollen hinsichtlich Farbe, Form und Größe. Repräsentativ wird hier die Bewertung für die Linien von *StTRII* RNAi vorgestellt. Alle weiteren untersuchten Linien der anderen Konstrukte (*StTRI* RNAi, *StTRI* ÜE, *DsPMT* Ex) zeigten analog zu *StTRII* RNAi keinen veränderten Knollenphänotyp. Die Pflanzen der Kontrollen, aber auch der *StTRII* RNAi Linien bildeten zwei bis sieben Knollen unterschiedlicher Form von länglicher bis ovaler Gestalt mit meist



leichter Krümmung aus. Die Knollenlänge variierte von 2-8 cm, die Färbung der Knollen kann als rot-bräunlich bis gräulich beschrieben werden (Abb. C- 26). Die Gewichte der gebildeten Knollen pro Pflanze der *StTRII* RNAi Linien unterschieden sich nicht signifikant (t-Test:  $p>0,05$ ) von denen der Kontrollpflanzen (Abb. C- 24).

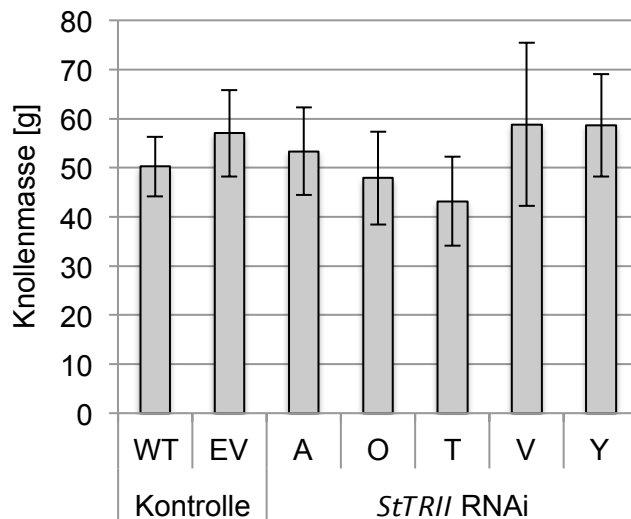


Abb. C- 24: Knollenmasse der *StTRII* RNAi Linien

Die Kartoffelpflanzen wurden drei bis vier Wochen in einer Phytokammer, danach weiter im Gewächshaus unter Langtagbedingungen für drei bis vier Monate bis zum Abreifen kultiviert. Nach der Knollenernte wurde jeweils die Masse aller gebildeter Knollen einer Pflanze bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten, Kontrollen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor)  $n=21$ , *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y)  $n=9$ .

### C 3.5.3 Kartoffelkeime

Die Keimung der Knollen wurde für Linien aller vier Konstrukte *StTRI* RNAi, *StTRII* RNAi, *StTRI* ÜE und *DsPMT* Ex und Kontrollpflanzen (WT, EV) untersucht. Nach der Ernte der Knollen folgte eine Kalt- und Dunkellagerung bei 7 °C bis nach fünf bis sieben Monaten Dormanz die Keimung startete. Die Knollen wurden ab diesem Zeitpunkt dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Der Startzeitpunkt der Keimung differierte zwischen verschiedenen Experimenten um bis zu zwei Monate, jedoch begannen alle transgenen Linien immer zeitgleich mit ihren Kontrollen zu keimen. Um die Ruhephase bis zur Keimung zu verkürzen, wurde für zwei Experimente von *StTRII* RNAi und *DsPMT* Ex die Kalt- und Dunkellagerung bei 7 °C auf vier Wochen verkürzt. Danach wurden die Knollen auf Raumtemperatur überführt und weiterhin dunkel gelagert. Die Keimung der Kontrollpflanzen und transgenen Linien startete frühzeitig nach weiteren sechs Wochen. Diese veränderten Bedingungen hatten weder Einfluss auf die Keimbereitschaft und die Ausbeute der Keime noch auf den Gehalt an Calysteginen (Daten nicht gezeigt).

Während eines Zeitraums von vier bis fünf Monaten wurden von den bei Raumtemperatur dunkel gelagerten Knollen kumulativ alle ein bis zwei Wochen Keime für die Bestimmung der Keimmasse und die Gehaltsbestimmung von Calysteginen geerntet. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den Keimen der

Kontrollen und der transgenen Linien der Konstrukte *StTRI* RNAi, *StTRI* ÜE und *DsPMT* Ex hinsichtlich Form, Farbe oder Wachstumsverhalten registriert. Exemplarisch sind für die *StTRII* RNAi Linien die Gewichte der aus den Knollen gebildeten Keime in Abb. C- 25 dargestellt. Für *StTRII* RNAi Linie O wurde ein verlangsamtes und schwächeres Keimwachstum festgestellt, das sich in einer erniedrigten Gesamtkeimmasse ausdrückt.

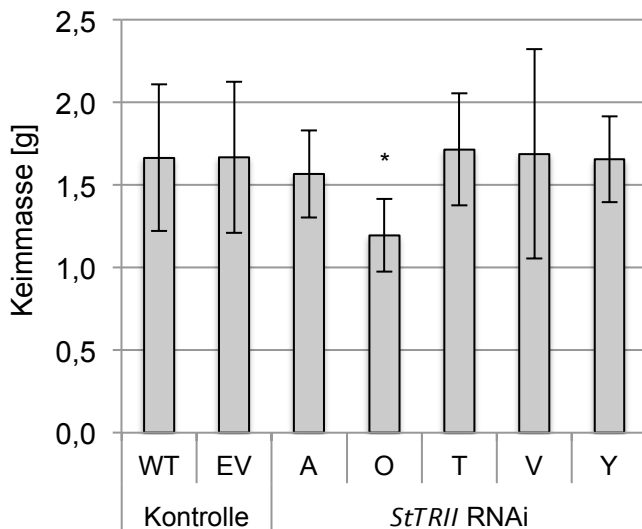


Abb. C- 25: Keimmasse der *StTRII* RNAi Linien

Kartoffelkeime wurden kumulativ über vier bis fünf Monate geerntet. Dabei wurden die Knollen dunkel und bei Raumtemperatur gelagert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten, Kontrollen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor):  $n \geq 18$ , *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y):  $n=7$ . Beim Students t-Test wurde jeweils die transgene Linie verglichen mit den Werten der zusammengefassten Kontrollen WT und EV: \*  $p < 0,05$ .

Das Aussehen der keimenden Knollen wurde fotografisch dokumentiert. Abb. C- 26 zeigt exemplarisch die Keimung für die *StTRII* RNAi Linien verglichen mit Kontrollpflanzen ca. vier Wochen nach Keimstart. Diese zwei Wochen nach der ersten Keimernte nachgebildeten Keime waren wiederum zwei Wochen alt und 0,5-1 cm lang. Sowohl die Keime der Kontrollpflanzen als auch der *StTRII* RNAi Linien zeigten am Ansatz zur Knolle eine rötliche Färbung, die sich zur Keimspitze hin zu einer weißen, leicht gelblichen Farbe veränderte. Der deutlich verringerte Calystegin-Gehalt in den Keimen der Linien A, O und V (Abb. C- 21) hatte keinen Einfluss auf die Keimbereitschaft und verursachte keinen veränderten Phänotyp der Keime oder Knollen.



Abb. C- 26: Keimung von Kartoffelknollen der *StTRII* RNAi Linien

Keimung von Kontrollpflanzen (WT-Wildtyp, EV-Leervektor) und *StTRII* RNAi Linien (A, O, T, V, Y) zwei Wochen nach der ersten Keimernte und vier Wochen nach Keimstart. Während der Keimung wurden die Knollen dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Dargestellt sind Knollen von sechs Pflanzen WT/EV 1-6 und je drei Pflanzen pro *StTRII* RNAi Linie 1-3. Keimlänge: 0,5-1 cm.

### C 3.6 Genomische Organisation der *StTRI*, *StTRII*, *StPMT* und *StSPDS*

Die genomische Organisation aus Exon- und Intronbereichen sowie die Häufigkeit und Lage der Gene Tropinonreduktase I und II (*StTRI* und *StTRII*), Putrescin-N-methyltransferase (*StPMT*) und Spermidinsynthase (*StSPDS*) im Genom von *S. tuberosum* wurden mit Hilfe der 2011 durch das Potato Genome Sequencing Consortium veröffentlichten Datenbank auf <http://solgenomics.net/> und [http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc\\_download.shtml](http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml) (PGSC, 2011) analysiert. Der Datenbank zugrunde gelegt ist das sequenzierte Genom der homozygoten (doppelt monoploiden) Kartoffelsorte *Solanum tuberosum* Gruppe Phureja.

#### C 3.6.1 Genvarianten und Häufigkeiten

Vor der Veröffentlichung des *S. tuberosum* Genoms wurde die Häufigkeit des Auftretens der Gene *StPMT*, *StSPDS*, *StTRI* und *StTRII* durch genomische Southern-Blot Analysen näherungsweise bestimmt. Für *StPMT* und *StSPDS* wurden jeweils zwei Gene (Stenzel et al., 2006), für *StTRI* ein bis zwei Gene (single-copy) und für *StTRII* mehr als drei Gene (multi-copy) ermittelt (Keiner, 2001, Keiner et al., 2002).

Die Datenbank des PGSC liefert Sequenzeinträge für annotierte Tropinonreduktasen, Putrescin-N-Methyltransferasen und Spermidinsynthasen. Deren Lokalisation, Exonanzahl und Nukleotidübereinstimmung mit den bereits bekannten *StTR*-, *StPMT*- und *StSPDS*-Sequenzen aus *S. tuberosum* sind in Tab. C- 1 zusammengestellt. Die als *Tropinone reductase I* annotierte Sequenz auf Chromosom 10 zeigt eine sehr hohe Nukleotidübereinstimmung von >98 % mit der bekannten *StTRI* (AJ307584) und *StTR-homologen* (AJ400815) Sequenz aus Keiner (2001). Das Protein StTR-homolog reduziert *in vitro* im Gegensatz zu StTRI kein Tropinon, die Proteinsequenz der StTR-homolog unterscheidet sich aber nur in sieben Aminosäuren von der StTRI-Sequenz (Keiner, 2001). Annotiert als *Tropinone reductase II* ist eine Sequenz mit ebenso >98 %-iger Übereinstimmung zu der bekannten *StTRII* (Keiner et al., 2002). Übrige als *Tropinone reductase* bezeichnete Sequenzen weisen eine dazu geringere Übereinstimmung von 66-70 % zu *StTRI*, *StTR-homolog* und *StTRII* auf. Die *Tropinone reductase 1*-Sequenz liegt kurz hintereinander auf Chromosom 9 dupliziert vor. Weitere drei Sequenzen mit einer Nukleotidübereinstimmung von 58-70 % zu den bekannten *StTRs*, annotiert als

„short chain alcohol dehydrogenases“, sind im Genom der Kartoffelpflanze zu finden, werden aber in die hier aufgeführten Betrachtungen nicht mit einbezogen.

Von den beiden annotierten *PMTs* unterscheidet sich eine *PMT*-Sequenz (*PMT2*) mit 93 % Nukleotidübereinstimmung nur wenig von der bekannten *StPMT*-Sequenz aus Stenzel et al. (2006), die andere *PMT*-Sequenz (*PMT1*) mit 80 % stärker. Eine detaillierte Übersicht der Nukleotidübereinstimmungen der für *TRs*, *PMTs* und *SPDSs* annotierten Sequenzen aus der *S. tuberosum* Datenbank untereinander und im Vergleich zu den bekannten *StTR*-, *StPMT*- und *StSPDS*-Sequenzen befindet sich im Anhang (Tab. F- 4).

Tab. C- 1: *TR*-, *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen des *S. tuberosum* Genoms

Die Übereinstimmung der annotierten *TR*-, *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen (PGSC, 2011) auf Nukleotidebene wurde verglichen mit den *StTRI*-, *StTR-homolog*-, *StTRII*-Sequenzen (Keiner, 2001) und den *StPMT*- und *StSPDS*-Sequenzen (Stenzel et al., 2006).

Annotiertes Gen (PGSC), Abkürzung Genlocus der genomischen Sequenz	An- zahl	Chromo- som	Exons	Höchste Nukleotid- Übereinstimmung mit ... (%)
<i>Tropinone reductase I, TRI</i> PGSC0003DMG400028221	1	10	5	<i>StTRI</i> : 98,5 <i>StTR-homolog</i> : 98,8
<i>Tropinone reductase 1, TR1</i> PGSC0003DMG402008895	2	9	5	<i>StTRII</i> : 72,0
<i>Tropinone reductase, TR</i> PGSC0003DMG400019196	1	10	5	<i>StTR-homolog</i> : 67,8
<i>Tropinone reductase homolog, TRh</i> PGSC0003DMG400020618	1	4	5	<i>StTRII</i> : 70,5
<i>Tropinone reductase II, TRII</i> PGSC0003DMG400005974	1	4	5	<i>StTRII</i> : 98,4
<i>Putrescine N-methyltransferase, PMT1</i> PGSC0003DMG400037026	1	6	8	<i>StPMT</i> : 79,6
<i>Putrescine N-methyltransferase, PMT2</i> PGSC0003DMG400036131	1	8	8	<i>StPMT</i> : 93,3
<i>Spermidine synthase 1, SPDS1</i> PGSC0003DMG400004111	1	4	9	<i>StSPDS</i> : 87,3
<i>Spermidine synthase, SPDS2</i> PGSC0003DMG400024232	1	5	9	<i>StSPDS</i> : 99,2

### C 3.6.2 Genomische Strukturen

Die Exon-Intron Längen der verschiedenen *TR*-, *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen (PGSC, 2011) wurden anhand ihrer genomischen Sequenzen ermittelt (Tab. C- 2). Alle als *Tropinone reductase (TR)* annotierten Sequenzen weisen im Vergleich zueinander eine sehr einheitliche Länge aller fünf Exons auf. Auch *PMT1* und *PMT2* zeigen Übereinstimmungen in der Exonlänge. So besitzen drei aufeinanderfolgende

Exons in *PMT1* und *PMT2* mit 105, 73 und 72 Basenpaaren die gleiche Länge, die anderen Exons variieren in ihrer Länge. Die zwei annotierten *SPDS*-Sequenzen *SPDS1* und *SPDS2* zeigen eine fast vollständige Übereinstimmung in den Längen von Exon zwei bis neun. Die Exons zwei bis sieben der *SPDS1*, *SPDS2* und *PMT2* sind ebenfalls durch einheitliche Längen charakterisiert, so dass ein evolutionärer Zusammenhang der Entstehung von *PMT* und *SPDS* vermutet werden kann. Aus den Längen der Introns für die *TRs*, *PMTs* und *SPDSs* untereinander lassen sich keine Regelmäßigkeiten ableiten.

Tab. C- 2: Exon-Intron Längen der *TRs*, *PMTs* und *SPDSs* des *S. tuberosum* Genoms

Exon-Intron Längen der *TRs*, *PMTs* und *SPDSs*, ermittelt anhand der veröffentlichten *S. tuberosum* Genomsequenz des Potato Genome Sequencing Consortiums (PGSC, 2011). *TR1-1* – *Tropinone reductase 1* auf Chromosom 9 (1. Sequenz), *TR1-2* – *Tropinone reductase 1* auf Chromosom 9 (2. Sequenz).

Sequenz	Exon-Intron Längen [bp]
<i>TRI</i>	76- 671-208- 107-217-1360-114-1018-180
<i>TR1-1</i>	96- 243-207- 738-219- 474-109- 150-182
<i>TR1-2</i>	96- 286-207-1016-219-1075-105- 737-182
<i>TR</i>	102- 137-209-1574-220- 94-106- 85-194
<i>TRh</i>	79- 89-210- 84-214-2109-113- 168-177
<i>TRII</i>	70- 348-208- 913-215- 107-113- 300-180
<i>PMT1</i>	196-1301-185- 102-105- 120- 73- 95- 72-798-196-604-121-105- 57
<i>PMT2</i>	187- 582- 77- 62-123- 77 -105- 110- 73-755- 72-281-187-685-184
<i>SPDS1</i>	88- 902- 77- 93-123- 568- 106- 288- 72-107- 72-73- 196-155-130-103- 66
<i>SPDS2</i>	205- 536- 77- 109-123- 405- 105- 269 - 73-108- 72-83- 196-439-127- 97- 66

### C 3.6.3 Proteinvergleiche

In den Proteinsequenzen von Tropinonreduktasen sind typische Motive und Aminosäuren, z.B. für die katalytische Tetrade, die NADPH-Bindestelle und Substratbindestelle, charakteristisch (Filling et al., 2002; Nakajima et al., 1998; Oppermann et al., 2003). Auch Putrescin-*N*-methyltransferasen unterscheiden sich durch spezifische Aminosäuren von den Spermidinsynthasen (Stenzel et al., 2006). Es wird postuliert, dass die Evolution der *PMT* aus der *SPDS* durch Spezialisierung und Funktionsänderung durch nur wenige ausgetauschte Aminosäuren stattgefunden haben kann (Junker et al., 2013). Um zu überprüfen, ob die *TR*-, *PMT*- und *SPDS*-Proteine der *S. tuberosum* Datenbank (PGSC, 2011) Sequenzeigenschaften der jeweiligen Enzymfamilien aufweisen, wurden deren Proteinsequenzen auf typischen Motive und Aminosäuren untersucht (Abb. C- 27 und Abb. C- 29).

### C 3.6.3.1 Tropinonreduktasen

Alle Tropinonreduktase-Proteinsequenzen der *S. tuberosum* Datenbank (PGSC, 2011) sind charakterisiert durch die für kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs) typische katalytische Tetrade, bestehend aus den Aminosäuren Asparagin, Serin, Tyrosin und Lysin (N-S-Y-K) (Abb. C- 27). Zusätzlich sind Motive, die das zentrale  $\beta$ -Faltblatt stabilisieren und so die Bindung des Co-Substrats NADPH ermöglichen (Oppermann et al., 2003), wie das glycinreiche TGxxxGxG-Motiv, in allen annotierten TR-Sequenzen und das NNAG-Motiv in drei von fünf TR-Sequenzen vollständig vorhanden. Einige Aminosäuren der Tropinon-Bindestelle und auch der NADPH-Bindestelle (Nakajima et al., 1998) unterscheiden sich zwischen den annotierten TR-Sequenzen (gelb markiert). Doch auch zwischen StTRI und StTRII (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002) gibt es Aminosäure-Variationen an der Bindestelle für Tropinon und NADPH (rot markiert), die sich wiederum im Vergleich zur *D. stramonium* TRI und TRII unterscheiden (Nakajima et al., 1998). Einige nur in TRI und TRII aus *S. tuberosum* konservierte Aminosäuren (Kaiser et al., 2006) sind auch an der jeweiligen Position in den annotierten TR-Sequenzen konserviert, z.B. K62 in allen fünf annotierten TR-Sequenzen und E77 in vier annotierten TR-Sequenzen. Diese Eigenschaft und das meist vollständige Vorhandensein der anderen typischen Sequenzmotive bekannter Tropinonreduktasen sind Hinweise auf eine korrekte Zuordnung der annotierten TRs in die Gruppe der Tropinonreduktasen aus *S. tuberosum*.

## Ergebnisse

StTRI	---MAELRE-----KWSLKGTTALVTGGSKGIGYAIVEELANFGARVYTCSRNE	48
TRI_PGSC	---MAELRE-----KWSLKGTTALVTGGSKGIGYAIVEELANFGARVYTCSRNE	48
TRI_PGSC	---MAEKNESNSED--GRWTLQGTALVTGGTKGIGHAIVEELAGFGAIVYTCCRNQEQ	55
TRh_PGSC	---MAQIGD-----GRWSLHGMTALVTGGTRGIGYAIVEELASFGASIYTCSRNKD	49
TR_PGSC	MATMATGEEQSSSSNRVQKWSLHGKTALVTGGTRGIGSAIVEELAGFGASVHTCSRNKKE	60
TRII_PGSC	---MAAG-----RWNLEGCTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCSRNOKE	46
StTRII	---MAAG-----RWNLEGCTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCSRNOKE	46
	**                                  :*.*. * *****:*** .*****:*** :*:*.***::	
StTRI	LQECLDIWRKKGLKVEGSVCDLLSRTEREKLMKTVEDVDFGKLNILVNNAGVAIHKEAKD	108
TRI_PGSC	LQECLDIWRKKGLKVEGSVCDLLSRTEREKLMKTIEDVDFGKLNILVNNAGVAIHKEAKD	108
TRI_PGSC	LDQCLERWRGKGYKVEGCVCDLTLRQPQEMLMKVINFFQGLNINILINNAGILIVKAATE	115
TRh_PGSC	LDECLEKWQTKGYKVNSTCDFLELDQRIELIDKATQHFNGKLDILVNNAAICVPKETAQ	109
TR_PGSC	LDEKIQEWEAKGFKVTGSVCDLFSKEQREELIHTVSSVFEGKLNILVNNAAISMIRKTDAD	120
TRII_PGSC	LNECLTQWRKGFKVEASVCDLSSRSEREEFIKTVANHFDFGKLNILVNNAGIVIIYKEAKD	106
StTRII	LNECLTQWRKGFKVEASVCDLSSRSEREEFIKTVANHFDFGKLNILVNNAGIVIIYKEAKD	106
	*:: : * . ** ** ...** . : * :... . *::*:***:***: : * : :	
StTRI	FTKEDYNIIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQN-GNVIFVSSIAGFSALPSLSLYSASKG	167
TRI_PGSC	FTKQDYNIIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQN-GNVIFVSSIAGFSALPSLSLYSASKG	167
TRI_PGSC	FTEDDYSLIMKTNFEASHHISQIAHPILKASEN-GNIVFISSVAGLVALPISIIYAATKG	174
TRh_PGSC	ITSADCSLMMGTNFEASYNLCQLAYPYLKSGK-ASIVFISSISGIMAIPIFVSLYAATKG	168
TR_PGSC	ISVEDYSKIMGTNVEPFHITQIAYPLLKACGNTASIVFISSLAGSLALPALSVYGASKG	180
TRII_PGSC	YTMEDYSLIMSINFEAAYHLSVLAHPLKASQR-GNVVFISISIGASALPYEAVYGATKG	165
StTRII	YTMEDYSLIMSINFEAAYHLSVLAHPLKASQR GNVVFISISIGASALPYEAVYGATKG	165
	: * . : * *.**::: :*: * **.. . .::*:***:***: * * :*:*.***	
StTRI	AINQMTKNLACEWAKDNIRVNSVAPAVILTPLVETAIKKNPQOKEEIDSFVVKTPLGRAG	227
TRI_PGSC	AINQMTKNLACEWAKDNIRVNSVAPAVILTPQIETAIKENPQOKEEIDSFVVKTPLGRAG	227
TRI_PGSC	AMNQLTRNLAYEWAKDNIRVNAVAPWIINTPLIEAAK-NPLTKERMEKISRTPICRAG	233
TRh_PGSC	AINQLTKNLACEWGDNIRVNAVAPWIIDTALDTVAE--DFESSDVEKLIKRTPISRMG	226
TR_PGSC	AINQLTKFLACEWASDGIRVNTVSPFAVKTNILKAEDI-DPSLLGNYSELMCRTPPKPIA	239
TRII_PGSC	AMDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVAPGVIASMVEMTIQ-DPEQKENLDKLDRCALHRMG	224
StTRII	AMDQLTRCLAFEWAKDNIRVNGVAPGVIASMVEMTIQ-DPEQKENLDKLDRCALHRMG	224
	*::*:***: * * **..*.*** *:* : : . . . : : : .	
StTRI	KPEEASAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF---	264
TRI_PGSC	KPEEVSAVIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF---	264
TRI_PGSC	EPKEVSAMVAFLCFPAASYITGQVICVDGGLTINGSF---	270
TRh_PGSC	KPNEVSSLVAYLCFPAAYITGQIICVDGGKTVSG-FP--	263
TR_PGSC	EPDEISPLVAFLCFPAASHITGQIILVDGGFSAGSFKFQS	279
TRII_PGSC	EPKELAAVAFLCFPAASYVTGQIIYVDGGFMANGGF---	261
StTRII	EPKELAAVAFLCFPAASYVTGQIIYVDGGFMANGGF---	261
	:*. * :.:*:***:***:***:***: * .*** ..	

Abb. C- 27: Sequenzvergleich der TR-Proteinsequenzen (PGSC, 2011) mit StTRI und StTRII (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002)

**A** - Aminosäuren/Motive zur Strukturbildung der NADPH-Bindungsstelle (Oppermann et al., 2003, Nakajima et al., 1998)

**A** - Aminosäuren der Tropinon-Bindestelle (Nakajima et al., 1998)

**A** - Aminosäure-Variationen an den Tropinon- und NADPH-Bindestellen im Vergleich zur *D. stramonium* TRI und TRII (Nakajima et al., 1998)

**A** - Aminosäuren der katalytische Tetrade: N-S-Y-K (Filling et al., 2002)

**A** - Konservierte Motive innerhalb der SDR-Proteinfamilie (Oppermann et al., 2003)

**A** - Aminosäure-Unterschiede in den TRI/TRII-typischen Aminosäuren/Sequenzmotiven

**A** - Aminosäuren, identisch in StTRI und StTRII, aber nicht in anderen TRs (Kaiser et al., 2006)

\* - identische Aminosäuren

: - stark konservierte Aminosäuren

. - schwach konservierte Aminosäuren



Mit den annotierten TR-Sequenzen der *S. tuberosum* Datenbank (PGSC, 2011, blau markiert) wurde ein phylogenetischer Baum zusammen mit anderen TRI- und TRII-Sequenzen aus Solanaceae und Tropinonreduktase-ähnlichen Sequenzen (tropinone reductase-like, TRLs) aus *A. thaliana* konstruiert (Abb. C- 28). Die TRI und TRII (PGSC) bilden jeweils eine Gruppe mit StTRI und StTRII. Die anderen drei TR-Sequenzen TR1, TR, TRh (PGSC) gruppieren sich weder gemeinsam zu den TRI-Sequenzen, noch zu den TRII-Sequenzen oder TRLs aus *A. thaliana*.

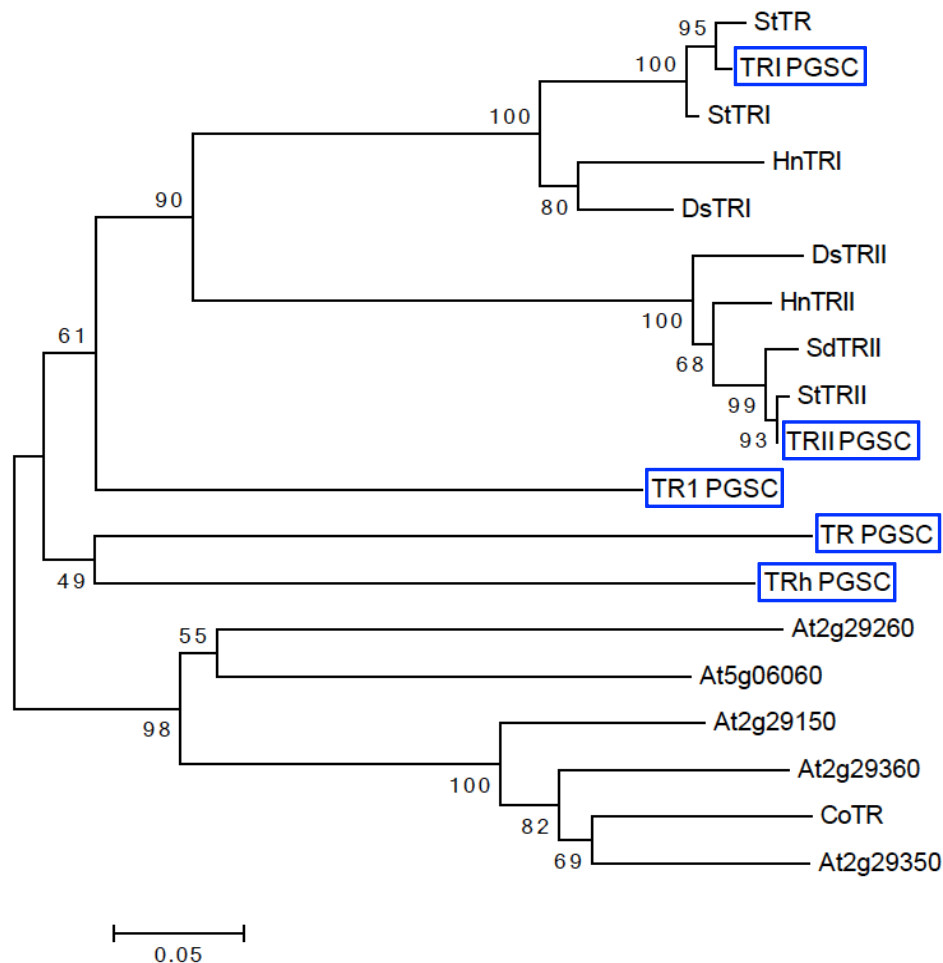


Abb. C- 28: Phylogenetischer Baum der TRs aus Solanaceae und TRLs aus *A. thaliana*

Erstellt mit MEGA6.06 (Tamura et al., 2013) aus Proteinsequenzen der annotierten TRs (blau markiert, PGSC, 2011, Tab. C- 1) und TRI- und TRII-Sequenzen aus Solanaceae, TRL-Sequenzen aus *A. thaliana* und einer TR-Sequenz aus *C. officinalis*. Die Accession-Nummern aus UniProtKB zeigt Tab. F- 5 im Anhang. St – *Solanum tuberosum*, Hn – *Hyoscyamus niger*, Ds – *Datura stramonium*, Sd – *Solanum dulcamara*, Co – *Cochlearia officinalis*, At – *Arabidopsis thaliana*. Die Proteinsequenzen wurden mittels Clustal W2 aligniert, Positionen mit Lücken wurden eliminiert. Zur Baumkonstruktion wurde die Neighbor-Joining-Methode (Saitou and Nei, 1987) verwendet. Der Bootstrap-Konsensus Baum (Felsenstein, 1985) wurde mit 1.000 Wiederholungen berechnet.

### C 3.6.3.2 Putrescin-*N*-methyltransferasen und Spermidinsynthasen

Den PMT- und SPDS-Proteinsequenzen der *S. tuberosum* Datenbank (PGSC, 2011) sind typische Aminosäuren und Motive gemeinsam, die sie entweder zur Gruppe der PMTs oder zur Gruppe der SPDSs zuordnen (Abb. C- 29). Die glycinreiche Bindestelle GGGxG der Co-Substrate SAM/dcSAM (Pósfai et al., 1989; Schluckebier et al., 1995) ist in fast allen Sequenzen vollständig vorhanden. Eine Ausnahme bildet die PMT1, bei der an Position 190 ein Glycin durch ein Valin ersetzt ist. Die Aminosäuren der Bindestelle des gemeinsamen Substrats Putrescin sind in allen vier Sequenzen enthalten, inklusive des für die Katalyse notwendigen Aspartats (Korolev et al., 2002; Malone et al., 1995; Schluckebier et al., 1995). Darüber hinaus besitzen alle betrachteten Sequenzen die PMT- und SPDS typischen Sequenzmotive 1 bis 4 (Hashimoto et al., 1998a). Der Vergleich von weiteren StPMT- und StSPDS-spezifischen Aminosäuren (Stenzel et al., 2006; Suzuki et al., 1999a) zeigt, dass auch diese mit wenigen Ausnahmen in den PMT- und SPDS-Proteinsequenzen existent sind. Die vollständige Aminosäure-Übereinstimmung in der Putrescin-Bindestelle und die wenigen Aminosäure-Unterschiede in den Sequenzbereichen der Co-Substratbindestelle sowie in den für PMT- oder SPDS typischen Aminosäuren lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Zugehörigkeit der beiden PMT-Sequenzen zur Gruppe der PMTs und der beiden SPDS-Sequenzen zur Gruppe der SPDSs korrekt ist.

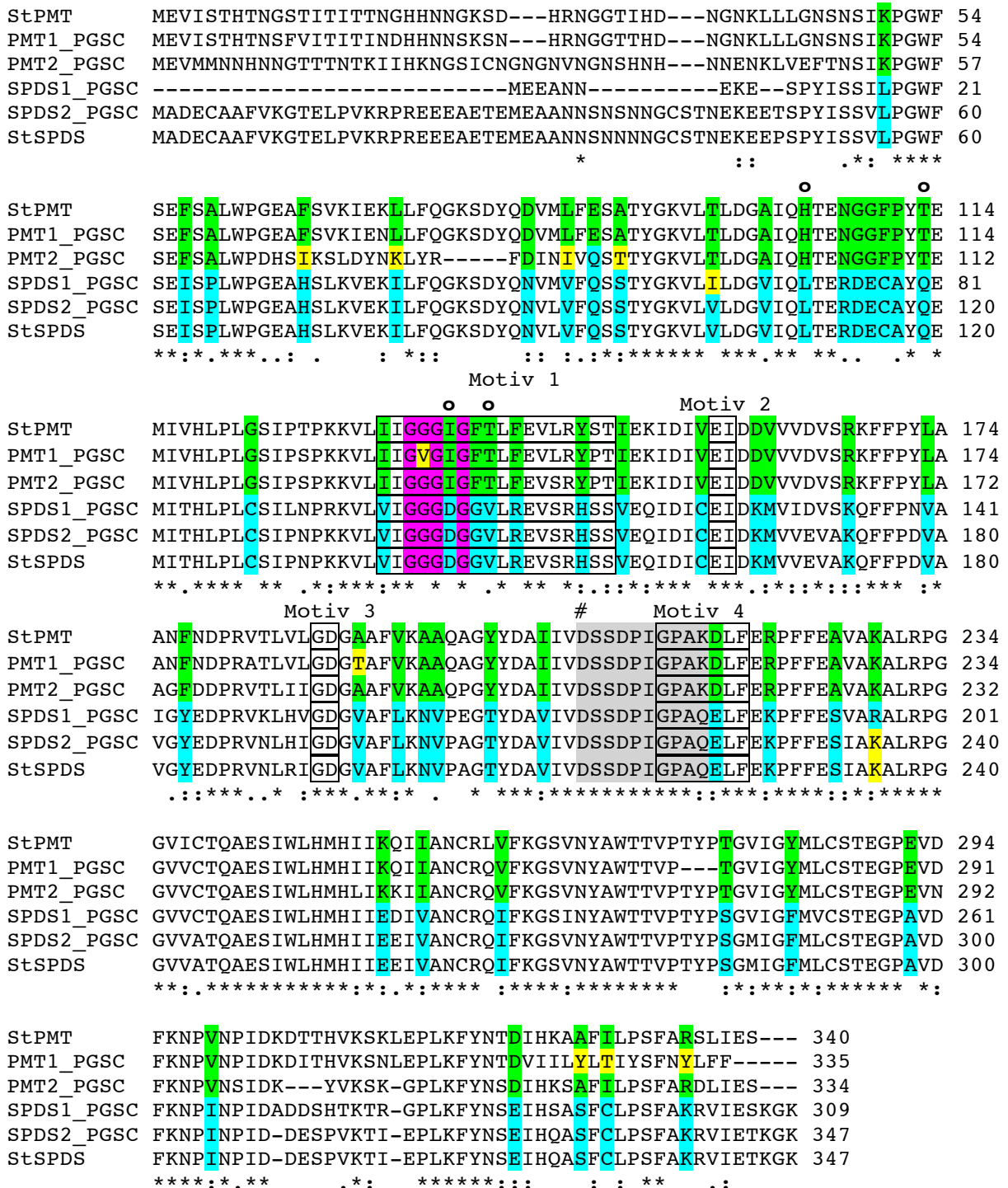


Abb. C- 29: Sequenzvergleich der PMT- und SPDS-Proteinsequenzen (PGSC, 2011) mit StPMT und StSPDS (Stenzel et al., 2006)

- A - typische Sequenzmotive in PMT und SPDS (Hashimoto et al., 1998a)
- A - G-Loop: SAM/dcSAM Bindestelle (Pósfai et al., 1989; Schluckebier et al., 1995)
- A - P-Loop: Putrescin-Bindestelle (Schluckebier et al., 1995, Malone et al., 1995, Korolev et al., 2002)
- A/A - Aminosäuren, die PMT und SPDS unterscheiden (Suzuki et al., 1999a)
- A - Aminosäure-Unterschiede zwischen PMT1/PMT2, SPDS1/SPDS2 (PGSC, 2011) im Vergleich zur StPMT und StSPDS (Stenzel et al., 2006)
- O - Aminosäuren, verantwortlich für PMT- oder SPDS-Aktivität (Junker et al., 2013)
- # - Aspartat, involviert in die Katalyse bei PMT und SPDS (Korolev et al., 2002)

Die phylogenetische Analyse der PMT- und SPDS-Sequenzen der *S. tuberosum* Datenbank (PGSC, 2011, blau markiert), bereits bekannten PMT- und SPDS-Sequenzen aus Solanaceae sowie SPDS-Sequenzen aus *C. officinalis*, *A. thaliana* und *H. sapiens* verdeutlichen, dass die annotierten PMT-Sequenzen innerhalb der PMTs und die annotierten SPDS-Sequenzen innerhalb der pflanzlichen SPDSs clustern (Abb. C- 30). SPDS2 (PGSC) gruppiert sich gemeinsam zu der StSPDS und SPDS1 (PGSC) gemeinsam zu der DsSPDS1. PMT2 (PGSC) zeigt die höchste Verwandtschaft zur StPMT und PMT1 (PGSC) hatte einen gemeinsamen Vorfahren mit der AbPMT1 und der HnPMT.

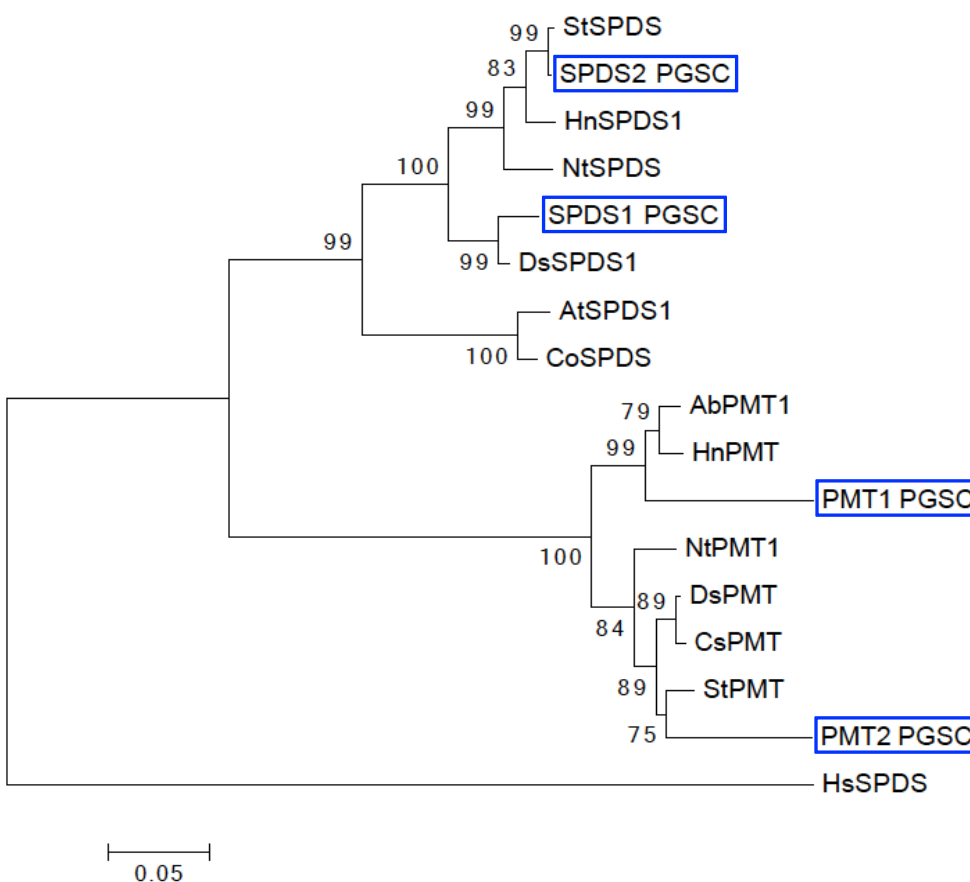


Abb. C- 30: Phylogenetischer Baum der SPDSs und PMTs

Erstellt mit MEGA6.06 (Tamura et al., 2013) aus Proteinsequenzen der annotierten SPDSs und PMTs (PGSC, 2011, Tab. C- 1) und SPDS- und PMT-Sequenzen aus Solanaceae, Convolvulaceae, *A. thaliana* und *H. sapiens*. Die Accession-Nummern aus UniProtKB zeigt Tab. F- 5 im Anhang. Ab – *Atropa belladonna*, At – *Arabidopsis thaliana*, Cs – *Calystegia sepium*, Co – *Cochlearia officinalis*, Ds – *Datura stramonium*, Hs – *Homo sapiens*, Nt – *Nicotiana tabacum*, St – *Solanum tuberosum*. Die Proteinsequenzen wurden mittels Clustal W2 aligniert, Positionen mit Lücken wurden eliminiert. Zur Baumkonstruktion wurde die Neighbor-Joining-Methode (Saitou and Nei, 1987) verwendet. Der Bootstrap-Konsensus Baum (Felsenstein, 1985) wurde mit 1.000 Wiederholungen berechnet.

## D 4 Diskussion

### D 4.1 *DsPMT* exprimierende Pflanzen

Die *D. stramonium PMT (DsPMT)* wurde in *S. tuberosum* exprimiert um Veränderungen der nachgeordneten Metaboliten Tropinon, Tropin und Pseudotropin bis zu den Calysteginen zu erzielen. Durch Erhöhung oder Gleichbleiben von Intermediaten ist es zudem möglich, limitierende Metaboliten und limitierende Schritte der Calysteginbiosynthese zu erkennen.

#### D 4.1.1 Polyamine, Intermediate und Calystegine

Die PMT war bislang eines der Schlüsselenzyme, um die Biosynthese von Tropanalkaloiden in Solanaceae zu steigern. Durch *PMT*-Expression gelang dies aber nicht bei allen untersuchten Arten, so dass in einigen Arbeiten nur der Gehalt an *N*-Methylputrescin (NMP), nicht aber der Gehalt der gewünschten Tropanalkaloide als Endprodukte der Biosynthese gesteigert werden konnte. Dies legte eine artspezifische Limitierung der Biosynthese durch die dem NMP nachgeschalteten Biosyntheseschritte nahe. So konnte auch in dieser Arbeit durch die Expression der *DsPMT* in *S. tuberosum* eine signifikante Erhöhung des NMPs in den Blättern nachgewiesen werden bei gleichzeitig konstantem Gehalt anderer Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin (Abb. C- 3, Abb. C- 4). Diese Steigerung des NMP-Gehalts setzte sich nicht in den weiteren Biosyntheseweg zu den Calysteginen fort, da keine Erhöhung der Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin festgestellt wurde (Abb. C- 5). Auch die Calystegine als Endprodukte der Biosynthese blieben in ihrem Gehalt unverändert (Abb. C- 6).

Analog zu dieser Arbeit wurden in Wurzelkulturen von *Duboisia*-Hybriden, *A. belladonna* und *H. niger* nach Expression der *N. tabacum PMT* erhöhte NMP-Mengen festgestellt ohne Steigerung der Tropanalkaloide als Endprodukte der Biosynthese (Häkkinen et al., 2005; Moyano et al., 2002; Moyano, 2004; Rothe et al., 2003; Zhang et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde ein gesteigerter NMP- und Nikotin-Gehalt in *NtPMT* exprimierenden *N. sylvestris* Pflanzen detektiert (Sato et al., 2001). Auch die durch *NtPMT*-Expression gesteigerte Tropanalkaloidbiosynthese in Wurzelkulturen von *D. metel*, *H. muticus* und *S. parviflora* (Moyano et al., 2003; Moyano, 2004; Lee et al., 2005) stützt die These einer Spezies-abhängigen, dem NMP nachgeschalteten Regulation. Folglich könnten nachgeschaltete

Biosyntheseenzyme unterschiedlich aktiv sein. Tab. A- 1 zeigt katalytische Parameter von Tropinonreduktasen aus Solanaceae, die sich in Affinität und Umsatzgeschwindigkeit deutlich voneinander unterscheiden. Darüber hinaus könnten in Arten der gleichen Pflanzenfamilie die Lokalisation der PMT-nachgeschalteten Proteine und der Transport der Intermediate im Gewebe unterschiedlich sein. Bei Lokalisationsexperimenten für das Enzym TRII wurde festgestellt, dass es in Wurzeln von *H. niger* in der Rinde, im Perizykel und in der Endodermis lokalisiert ist, in Wurzeln von *S. tuberosum* hingegen nur in der Rinde, nicht aber im Perizykel oder in der Endodermis (Kaiser et al., 2006; Nakajima and Hashimoto, 1999). In zwei Pyrrolizidinalkaloid-produzierenden Arten der Boraginaceae wurde das Sekundärstoffwechsellenzym Homospermidinsynthase ebenfalls in unterschiedlichen Geweben der Wurzel lokalisiert (Niemüller et al., 2012).

In den *DsPMT* exprimierenden *S. tuberosum* Pflanzen blieb der Putrescin-Gehalt trotz signifikanter NMP-Erhöhung unverändert (Abb. C- 3, Abb. C- 4). Dies lässt auf eine zeitgleiche Nachbildung des zur NMP-Synthese verbrauchten Putrescins schließen. So könnten Transkriptmengenerhöhungen oder eine Steigerung der Enzymaktivität der PMT-vorgeschalteten Biosyntheseenzyme Ornithindecaboxylase (ODC) und Arginindecaboxylase (ADC) erwartet werden, was experimentell noch geprüft werden sollte. Der konstante Gehalt der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin bei vermehrter NMP-Bildung durch *NtPMT*-Expression wurde ebenfalls für *Duboisia*-Hybriden und *A. belladonna* Wurzelkulturen beschrieben (Moyano et al., 2002; Rothe et al., 2003). Diese Regulation weist auf die Wichtigkeit einer konstanten Polyamin-Homöostase in Pflanzen hin. Polyamine sind an zahlreichen Prozessen der Entwicklung und Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt und fungieren als Modulatoren von Genen, Transkripten und Proteinen (Tiburcio et al., 2014). Eine Reduktion des Putrescin- und Spermidin-Gehalts durch Knockout der Biosyntheseenzyme ADC oder Spermidinsynthase (SPDS) verlief häufig letal (Imai et al., 2004; Kusano et al., 2008).

Die Expression der *DsPMT* verursachte keine Veränderungen in der Zusammensetzung der verschiedenen Polyaminfraktionen für Putrescin, Spermin und Spermidin in den Blättern drei bis vier Wochen alter Kartoffelpflanzen (Abb. C- 3). Der Anteil von freien Polyaminen war am größten, es folgten die lösliche, gebundene Fraktion und die unlösliche, gebundene Fraktion. Eine andere Arbeit dagegen beschreibt bei zwei Monate alten *S. tuberosum* Pflanzen des Kultivars

Désirée, dass der lösliche, gebundene Anteil über die freien Polyamine überwiegt (Stenzel et al., 2006). Diese verschiedenen Ergebnisse könnten durch eine zunehmende Konjugation der freien Polyamine bei Alterung der Pflanzen erklärt werden. In weiteren Arbeiten wurde eine Veränderung der Anteile der Polyaminfraktionen während des Pflanzenwachstums und nach abiotischem Stress registriert. So verringerte sich bei Salatpflanzen (*Lactuca sativa*) die freie Polyaminfraktion von Putrescin, Spermidin und Spermin während des Wachstums bei gleichzeitiger Zunahme der konjugierten Polyaminfraktion (Pinto and Ferreira, 2015). Auch bei der Mungbohne (*Vigna radiata*) wurden in jungen Zellen viele freie Polyamine, in älteren Zellen verstärkt Zellwand-gebundene Polyamine gemessen (Goldberg and Perdrizet, 1984). Umgekehrt führte Herbizid-Applikation bei der Gartenerbse (*Pisum sativum*) zur Mobilisierung der freien Polyamine aus der gebundenen Fraktion (Moskova et al., 2014). Auch Wassermangel verursachte einen Anstieg von freien Polyaminen in Weizen (*Triticum aestivum*) (Liu et al., 2004).

Da in den *DsPMT* exprimierenden Linien keine Erhöhung der Intermediate Tropinon, Tropin und Pseudotropin messbar war (Abb. C- 5), könnte von keiner weiteren Metabolisierung des zusätzlichen NMPs ausgegangen werden. Ein niedriger endogener Gehalt an Tropinon wurde bereits durch eine andere Studie in Blättern, Blüten, Wurzeln und Stolonen von *S. tuberosum* festgestellt. Geringe Mengen endogen gebildetes Pseudotropin wurden nur in Wurzeln nachgewiesen, endogenes Tropin in keinem Pflanzenorgan (Richter, 2006). So könnten Biosyntheseschritte zwischen NMP und Tropinon limitierend für die Biosynthese sein, z.B. durch das Enzym Methylputrescinoxidase (MPO). In Tabak-Wurzelkulturen wurde durch MPO-Überexpression eine Steigerung und durch Herabsetzen der Expression eine Verringerung des Gehalts an Nikotin erreicht (Hashimoto and Kato, 2007). Darüber hinaus könnten die nachfolgenden Biosyntheseschritte ausgehend von 4-Methylaminobutanal, an das Acetoacetat addiert wird und nach Zyklisierung und Decarboxylierung Tropinon bildet, für eine Limitierung ursächlich sein (Abb. A- 1). Die katalysierenden Enzyme für diese Reaktionen sind bisher noch unbekannt. Rothe und Mitarbeiter (2003) erhielten vergleichbare Ergebnisse bei der Expression der *NtPMT* in *A. belladonna* Wurzelkulturen. Trotz erhöhtem NMP-Gehalt akkumulierten Tropinon, Tropin und Pseudotropin nicht, so dass ein oder mehrere limitierende Biosyntheseschritte zwischen NMP und Tropinon vermutet wurden.

Eine nicht messbare Akkumulation von Intermediaten kann auch ein Hinweis auf eine schnelle enzymatische Umsetzung zu anderen Metaboliten oder den Endprodukten des Biosynthesewegs sein. So kann die geringe Akkumulation von Tropinon in *S. tuberosum* auf die direkte Reduktion zu Pseudotropin zurückgeführt werden. Die StTRII ist in den meisten Organen von *S. tuberosum* das aktivere Enzym im Vergleich zur StTRI. Nach Fütterung von 2 mM Tropinon wurde dies in Wurzeln, Blättern, Keimen und Stolonen durch StTRII zu Pseudotropin umgesetzt, dabei wurde in diesen Pflanzenorganen kein Tropin nachgewiesen. Nur in den Knollen wurde nach Tropinon-Fütterung Tropin, aber kein Pseudotropin gebildet (Richter et al., 2007). Auch kinetische Untersuchungen *in vitro* bestätigten eine fünf- bis sechsfach höhere Affinität von Tropinon zur StTRII ( $K_m$  33  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zur StTRI ( $K_m$  188  $\mu\text{M}$ ) sowie eine mehr als 500-fach höhere Wechselzahl der StTRII ( $k_{cat}$  9,4  $\text{s}^{-1}$ ) im Vergleich zur StTRI ( $k_{cat}$  0,015  $\text{s}^{-1}$ ) (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002). Auch Richter und Mitarbeiter (2007) stellten die Hypothese auf, dass Tropinon nicht in *S. tuberosum* akkumuliert, da es durch die starke Enzymaktivität der StTRII rasch zu Pseudotropin umgesetzt werden und in die Calysteginbiosynthese fließen könnte. Folglich wurde der Biosyntheseschritt der Pseudotropinbildung durch die StTRII als nicht limitierend für die Calysteginbildung diskutiert (Richter et al., 2007). Calystegine als Endprodukte der Biosynthese akkumulierten nicht verstärkt in den Keimen der *DsPMT* exprimierenden Pflanzen trotz des signifikanten NMP-Anstiegs in den Blättern. So kann die These aufgestellt werden, dass NMP kein limitierender Metabolit für die Biosynthese von Calysteginen ist. Auch in den Keimen der *DsPMT* exprimierenden Linien kann eine Erhöhung des Gehalts an NMP vermutet werden. Da in Wildtyp *S. tuberosum* Keimen eine gute Putrescin-Verfügbarkeit besteht (10-12  $\mu\text{mol/g}$  TM), aber trotz PMT-Enzymaktivität nur wenig NMP vorkommt (<1  $\mu\text{mol/g}$  TM) (Stenzel et al., 2006), ist ein erhöhter Umsatz zu NMP in den Keimen der *DsPMT* exprimierenden Linien wahrscheinlich und zukünftig experimentell zu prüfen. Bisher wurde aufgrund der sehr geringen NMP-Menge, die ausschließlich in den keimenden Augen der Knolle und in kleinen Keimen gefunden wurde, angenommen, dass NMP ein limitierender Metabolit der Calysteginbiosynthese sein kann (Keiner and Dräger, 2000; Stenzel et al., 2006).

Die für die Calysteginbiosynthese limitierenden Biosyntheseschritte könnten auch zwischen Pseudotropin und den Calysteginen liegen. Hierzu bedarf es der Bestimmung der intermediären Metaboliten, wobei für die Biosyntheseschritte nach



Pseudotropin in *S. tuberosum* bisher weder Enzyme identifiziert noch intermediäre Metaboliten bestätigt wurden. Norpseudotropin als ein möglicher erster Metabolit nach einer Desaminierung von Pseudotropin wurde nur in *C. sepium* (Scholl, 2003) und *Morus alba* (Kusano et al., 2002) identifiziert. Andere pflanzliche *N*-Demethylasen sind bereits aus *N. tabacum*, *Oryza sativa* und *A. thaliana* bekannt. In Tabak katalysiert die Nikotin-*N*-Demethylase die Bildung von Nornikotin (Luo et al., 2014, Siminszky et al., 2005). Für Reis und *A. thaliana* sind verschiedene Histon-Lysin-Demethylasen identifiziert, welche die Expression von Genen, z.B. für den Zeitpunkt der Blütenbildung, regulieren (Luo et al., 2014; Siminszky et al., 2005; Xu et al., 2007).

#### D 4.1.2 *P. infestans* und *N*-Methylputrescin

Pflanzenpathogene Pilze bilden endogene Polyamine über die Enzyme ODC, einige Arten auch über die ADC (Khan and Minocha, 1989). Das Wachstum von *P. infestans* kann durch ODC-Inhibitoren wie Mono- und Difluormethylornithin, Methylacetylenputrescin und durch den ADC-Inhibitor Monofluormethyldehydroarginin gehemmt werden (Barker et al., 1993). Auf *S. tuberosum* Blättern wurde eine Wachstumshemmung von *P. infestans* nach Applikation von den Putrescin-Analoga Ketoputrescin, Diaminobut-2-en-Derivaten und Spermin erzielt (Foster and Walters, 1993; Haggag and Abd El-Khair, 2007; Havis et al., 1994a; Havis et al., 1994b).

Da Putrescin-Analoga gute Kandidaten für eine Hemmung von *P. infestans* sind, wurde untersucht, ob die bis auf 18 µg/g FM signifikante Erhöhung des NMP-Gehalts in den Kartoffelblättern der *DsPMT* exprimierenden Linien (Abb. C- 3) das Wachstum von *P. infestans* beeinflusst (Abb. C- 7). Bisher gab es noch keine Untersuchungen dazu, ob NMP ein Hemmstoff der Polyaminbiosyntheseenzyme pflanzenpathogener Pilze sein kann. In dem wässrigen Anteil der *S. tuberosum* Blätter betrug die NMP-Konzentration zwischen 0,1 mM und 0,2 mM. Als Berechnungsgrundlage diente die Trockenmasse von Kartoffelblättern mit 10 %. In bereits beschriebenen Wachstumshemm-Untersuchungen mit *P. infestans* wurden Polyamin-Analoga meist in einer Konzentration vergleichbarer Größenordnung von 0,1 mM bis 1 mM auf die Kartoffelblätter aufgebracht (Barker et al., 1993; Foster and Walters, 1993; Haggag and Abd El-Khair, 2007). Die relative *P. infestans* Biomasse unterschied sich nach Inokulation der Blätter von *DsPMT* exprimierenden Linien mit  $1 \cdot 10^5$  Sporen/ml nach drei Tagen nicht signifikant von den Kontrollblättern (Abb. C- 7). Dies zeigt, dass ein

Anstieg der NMP-Konzentration bis auf 0,2 mM in den Blättern keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans* ausübt. Darüber hinaus ist aber auch noch nicht bekannt, ob *P. infestans* NMP über einen Transporter aufnimmt. Für *Phytophthora sojae* Zoosporen wurde die Existenz von Polyamin-Transportern für Putrescin und Spermidin bereits gezeigt (Chibucos and Morris, 2006). Um einen generellen Effekt von NMP auf das Wachstum von *P. infestans* ausschließen zu können, müsste mit höheren Konzentration der Reinsubstanz NMP von >1 mM in Hemmexperimenten geprüft werden, ob eine Reduktion des Wachstums erreicht werden kann. Hemmexperimente zur *P. infestans* Sporenkeimung könnten analog den in Kapitel B 2.5.2 beschriebenen Methoden mit NMP durchgeführt werden. Zusätzlich könnte mit Hilfe der *DsPMT* exprimierenden Linien mit erhöhtem NMP-Gehalt der Blätter oder auch mit der Reinsubstanz NMP untersucht werden, ob NMP eine hemmende Wirkung auf das Wachstum anderer kartoffelpathogener Pilze, wie *Rhizoctonia solani*, der bevorzugt die keimenden Knollen befällt (Chamoun et al., 2014) oder *Alternaria solani*, zeigt.

### **D 4.2 StTRI- und StTRII-Modifikationen**

#### D 4.2.1 Einfluss der *StTRI*-Aktivität auf den Calystegin-Biosyntheseweg

Die stereospezifische Reduktion von Tropinon stellt den zentralen Verzweigungspunkt im Sekundärstoffwechsel zu den Tropanalkaloiden und Calysteginen in Solanaceae dar (Dräger, 2006). Durch die unterschiedliche Aktivität von Tropinonreduktase-Enzymen, z.B. bei der kompetitiven Hemmung der TRI durch das Schwefel-Analogon des Tropinons TBON, wurde durch Zunahme des Tropinon-Metabolismus über die TRII eine Erhöhung der Calysteginmenge in Wurzelkulturen von *D. stramonium* und *A. belladonna* erreicht (Dräger et al., 1992; Dräger et al., 1994). In *A. belladonna* Wurzelkulturen führte die Expression der *DsTRI* zu einer Erhöhung des Gehalts an Tropin und der Tropanalkaloide mit einem verringerten Gehalt an Pseudotropin und der Calystegine (Richter et al., 2006). Auch die in dieser Arbeit generierten *TRI*-Modifikationen in *S. tuberosum* könnten durch Verringerung oder Erhöhung der *StTRI*-Enzymmengen Veränderungen der Tropinonverfügbarkeit für die *StTRII* am Verzweigungspunkt zu den Calysteginen verursachen. Bei erhöhter *StTRI*-Expression mit verstärktem Tropinon-Umsatz zu Tropin könnte ein verminderter Tropinon-Metabolismus durch die *StTRII* erwartet

werden. Im Gegensatz dazu ist bei verminderter *StTRI*-Expression mit erniedrigtem Tropinon-Umsatz zu Tropin ein erhöhter Tropinonfluss zu den Calysteginen möglich. Um den Einfluss von *StTRI*-Aktivität auf die Calysteginbildung zu prüfen, wurden Calystegine in den Keimen von *StTRI* RNAi- und *StTRI* Überexpressionslinien quantifiziert. Bei beiden genetischen Manipulationen der *StTRI* wurden jeweils bei zwei von sieben untersuchten Linien signifikante Unterschiede im Calystegin-Gehalt festgestellt (Abb. C- 11, Abb. C- 13). Die *StTRI* RNAi Linien C und N produzierten mehr Calystegine und die *StTRI* Überexpressionslinien B und K weniger Calystegine als die Kontrollpflanzen. Nur für diese Linien könnte die Theorie der Abnahme des Tropinonflusses zu Pseudotropin bei *StTRI* Überexpression und der Zunahme des Flusses zu Pseudotropin bei *StTRI* RNAi postuliert werden. Die jeweils anderen fünf *StTRI* RNAi- und *StTRI* Überexpressionslinien mit unverändertem Calystegin-Gehalt stützen diese Theorie nicht. Darüber hinaus wurde in den *StTRI* RNAi Linien keine gleichzeitige Herabsetzung der *StTRII*-Expression mit möglichem Einfluss auf den Calysteginbiosyntheseweg bestätigt (Abb. C- 12). Es kann aufgrund der niedrigen endogen gebildeten Mengen an Tropin in Kartoffelblättern (Abb. C- 5) und bisher keiner Bestätigung von Tropin-abgeleiteten Produkten in *S. tuberosum* angenommen werden, dass die *StTRI* *in vivo* nur einen sehr schwachen Tropinon-Umsatz zu Tropin leistet. Dadurch könnte sich dieser durch *StTRI* RNAi weiter herabgesetzte oder durch *StTRI* Überexpression verstärkte Tropinon-Umsatz wenig bis nicht auf die Pseudotropinbildung und den Calystegin-Gehalt auswirken. In anderen Organen der Kartoffelpflanze wie in Keimen, Blüten, Wurzeln, Stolonen und Knollen wurde bisher noch kein endogenes Tropin detektiert (Richter, 2006). Ein sehr geringes Vorkommen an *StTRI*-Protein wurde für Knollen, Keime und Stolone durch Immunolokalisation und Western-Blot nachgewiesen (Kaiser et al., 2006).

Die Überexpression der *StTRI* diene der verstärkten Proteinbildung in allen Organen der Kartoffelpflanze. Aber die endogene Verfügbarkeit von Tropinon als Substrat für die *StTRI* in den verschiedenen Geweben ist unbekannt. So muss die verstärkte *StTRI*-Expression nicht zwingend einen Einfluss auf die Calysteginbildung haben, wenn das Substrat Tropinon nicht in ausreichender Menge zugänglich ist. In *S. tuberosum* Wildtyp-Pflanzen kommen *StTRI* und *StTRII* nur partiell in den gleichen Organen und Geweben vor, so dass eine Konkurrenz um Tropinon nicht immer gegeben sein muss. Andere Studien zeigten durch Western-Blot und Immunolokalisation den Nachweis von *StTRI*-Protein in der Knollenschale, im Mark

und den Augen der Knolle sowie in einigen Rindenzellen der Stolone und in den Keimen. Für StTRII wurden starke Signale durch Immunolokalisation im Phloemparenchym der Keime, Stolone und Wurzeln sowie in der Rinde von Stolonen und Wurzeln detektiert. Das Phloem wurde als Transportgewebe für die Intermediate der Biosynthese und Calystegine diskutiert (Kaiser et al., 2006). Es wird angenommen, dass Calystegine in der Wurzel von *S. tuberosum* gebildet und zu den Keimen transportiert werden, wo sie auch zusätzlich neu gebildet werden (Richter et al., 2007). Auch für *A. belladonna* ist die Expression von *AbTRI* und *AbTRII* in verschiedenen Organen der Pflanze beschrieben. Die Transkripte beider Tropinonreduktasen kommen im Unterschied zu *S. tuberosum* in den Organen Blatt, Sprossachse, Blüte und Wurzel gleichzeitig vor. Die *AbTRII* ist dabei immer stärker als die *AbTRI* exprimiert, nur in der reifen Frucht und in den Samen wurde fast ausschließlich *AbTRI*-Transkript gemessen. Die hohen Transkriptmengen der Biosyntheseenzyme ODC, PMT, MPO, TRI, TRII, Littorinmutase und H6H in der Wurzel weisen auf die Tropanalkaloidbiosynthese in der Wurzel hin (Bedewitz et al., 2014). Eine organspezifische Biosynthese und die Kompartimentierung sind auch für andere Alkaloide, wie Monoterpenindolalkaloide aus *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), untersucht. In den Blättern übernehmen die Zellen des Phloemparenchyms und der Epidermis die Biosynthese der Vorstufe Secologanin. Aus dem Intermediat Strictosidin wird dann weiter in der Epidermis, im Mesophyll und in den Idioblasten das Alkaloid Vinblastin synthetisiert (Salim and De Luca, 2013).

### D 4.2.2 Tropinon-Umsatz der StTRI und StTRII *in vivo*

*S. tuberosum* gehört nicht zu den Tropanalkaloid-produzierenden Solanaceae, aber ein Vorkommen sowohl von *StTRI*-Transkript als auch von StTRI-Protein wurde in Stolonen, Knollen und Keimen bereits belegt (Kaiser et al., 2006; Keiner, 2001). Durch *in vitro* Aktivitätsmessungen mit StTRI-Protein wurde die Fähigkeit der Tropinonreduktion zu Tropin festgestellt (Kaiser et al., 2006). Bisher war aber noch nicht bewiesen, ob die StTRI auch *in vivo* zur Tropinbildung in der Lage ist. Der *in vivo* Aktivitätsbeweis erfolgte erstmalig in dieser Arbeit durch Fütterungsexperimente mit Tropinon an *StTRI* RNAi- und *StTRI* Überexpressionslinien. Auch für StTRII wurde nach Herabsetzen der *StTRII*-Expression erstmalig *in vivo* nachgewiesen, dass das Enzym Pseudotropin als Vorstufe der Calystegine bildet.

Der erniedrigte Tropinon-Umsatz in den Blättern der *StTRI* RNAi Linien und der erhöhte Umsatz in den *StTRI* Überexpressionslinien im Vergleich zu Kontrollpflanzen bestätigten die Funktion der StTRI als Tropin-bildende Tropinonreduktase *in vivo* (Abb. C- 10). Diese Funktion ist für die Bedingung erfüllt, dass Tropinon in einer Konzentration von 5 mM über einen Zeitraum von acht Tagen Fütterung von den Blättern aufgenommen wurde. In den *StTRII* RNAi Linien mit signifikant erniedrigter *StTRII*-Transkriptabundanz (Abb. C- 18) wurde nach acht Tagen Tropinon-Fütterung der Blätter eine Erniedrigung des Pseudotropin-Gehalts um 98 % im Vergleich zu Kontrollblättern gemessen (Abb. C- 20). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die StTRII *in vivo* für die Bildung von Pseudotropin notwendig ist. Ohne eine Tropinon-Aufnahme durch Fütterung ist der Gehalt von endogenem Tropinon in *S. tuberosum* Blättern zu gering für Umsatzmessungen zu Tropin und Pseudotropin (Abb. C- 5). In welchem Ausmaß die StTRI im Sekundärstoffwechsel der Kartoffelpflanze einen Beitrag zur Tropinbildung leistet, bleibt nicht abschließend beantwortet. Ohne externe Tropinon-Zufuhr durch Fütterung findet keine Tropin-Akkumulation in verschiedenen Organen der Kartoffelpflanze statt (Richter, 2006). Dies könnte durch das stärkere StTRII-Vorkommen und die höhere StTRII-Aktivität bedingt sein, die eine Tropinon-Verfügbarkeit für StTRI vermindern (Kaiser et al., 2006, Richter et al., 2007).

In anderen Arbeiten wurde die Fütterung von Tropinon an verschiedenen Organen von *S. tuberosum* angewendet, um den Umsatz zu Tropin und Pseudotropin zu verfolgen. Die Bildung von Tropin und Pseudotropin verlief organspezifisch. In Keimen und Blättern, die 24 h in 5 mM Tropinon-Lösung inkubiert waren, wurde Pseudotropin, aber kein Tropin nachgewiesen. In Sprossachsen wurde nach 18 h Tropinon-Fütterung ebenfalls nur Pseudotropin detektiert (Keiner and Dräger, 2000). Erst nach 48 h Tropinon-Fütterung von Keimen (Keiner, 2001) und Knollen (Richter et al., 2007) wurde Tropin nachgewiesen. Das Fehlen von Tropin nach 24 h Tropinon-Fütterung lässt ebenso vermuten, dass Tropin während der Fütterung erst sehr langsam gebildet werden könnte. Die Tropinbildung wurde auch bei *TRI* exprimierenden *N. tabacum* Pflanzen und *A. belladonna* Wurzelkulturen untersucht. Bei Tropinon-Fütterungsexperimenten mit *HnTRI* exprimierenden Tabakblättern wurde nach einem Zeitraum von fünf Tagen ein unregelmäßig erhöhter Tropin-Gehalt in den verschiedenen *HnTRI* exprimierenden Linien im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (Rocha et al., 2002). Richter und Mitarbeiter (2005) erzielten in *DsTRI* exprimierenden *A. belladonna* Wurzelkulturen eine bis vierfach erhöhte

Tropinbildung, die zur Verdreifachung der Tropanalkaloide Scopolamin und Hyoscyamin führte. Eine Applikation von Tropinon an die Wurzelkulturen war nicht erforderlich, was auf eine gute Verfügbarkeit von Tropinon im Wurzelgewebe hinwies.

Ein bis 15-fach geringerer Tropin-Gehalt im Vergleich zum Pseudotropin-Gehalt wurde in dieser Arbeit bei den mit Tropinon-gefütterten Wildtyp-Blättern festgestellt (Abb. C- 10). Es kann ein schnellerer und effektiverer Substratumsatz durch StTRII postuliert werden. Die tatsächlich im Blatt gebildeten Proteinmengen für StTRI und StTRII sind jedoch nicht bekannt. In Enzymassays mit rekombinanter StTRI und StTRII und Tropinon als Substrat wurden eine stärkere Affinität, eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit und eine höhere Wechselzahl von StTRII im Vergleich zur StTRI festgestellt (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002). Auch eine unterschiedliche Lokalisation der StTRI und StTRII im Blattgewebe ist möglich, die mit einer unterschiedlichen Tropinon-Verfügbarkeit nach Tropinon-Fütterung verbunden sein könnte. Aber nach acht Tagen Fütterung von 5 mM Tropinon sollte allen Blattbereichen genügend Substrat zur Verfügung stehen. Zukünftig könnte die Lokalisation beider Tropinonreduktasen im Blattgewebe aufgeklärt werden, die bisher nur für die Organe Wurzeln, Stolone und Keime durch Immunolokalisation untersucht ist (Kaiser et al., 2006).

Als weiterer Metabolismus für das vermehrt gebildete Tropin nach Tropinon-Fütterung von Blättern des Wildtyps und der *StTRI* Überexpressionslinien ist eine Veresterung mit Acetat zu Acetyltropin möglich. In *HnTRI* exprimierenden Tabakblättern wurde ein Anstieg von Tropin und Acetyltropin nach Fütterung von Tropinon nachgewiesen (Rocha et al., 2002). Die Acetylierung von Tropin und auch Pseudotropin wird durch Acyl-CoA-abhängige Transferasen katalysiert (Boswell et al., 1999; Rabot et al., 1995; Robins et al., 1994a). Kürzlich wurde eine Acyltransferase für den letzten Schritt der Cocain-Synthese, die Veresterung von Methylecgonin und Benzoyl-CoA, identifiziert (Schmidt et al., 2015). Tropin-Ester wie Acetyltropin, Diacetyltropin und Tigloyltropin wurden in den Gattungen *Datura* und *Hyoscyamus* bereits nachgewiesen. (Dräger et al., 1992; Parr et al., 1990; Robins et al., 1990; Robins et al., 1991). Bislang blieben Untersuchungen zum Vorkommen von Tropinestern in mit Tropinon-gefütterten Kartoffelorganen erfolglos (Keiner, 2001). Es wurde auch keine Acyltransferase-Aktivität zur Bildung von Acetyltropin und Acetylpsudotropin in *S. tuberosum* Wurzelkulturen festgestellt (Robins et al.,

1994a). Mit der in dieser Arbeit verwendeten neutralen Extraktionsmethode für Tropinon und Intermediate (B 2.6.2) konnte ebenfalls die Bildung von Acetyltropin ohne und auch nach Tropinon-Fütterung in Kartoffelblättern durch GC-MS nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich ist in der Literatur zur Extraktion der Tropinester eine saure, statt der hier verwendeten neutralen Extraktionsmethode (B 2.6.2) beschrieben, deren Anwendbarkeit zukünftig geprüft werden könnte (Doerk-Schmitz et al., 1994).

Eine Induktion der Tropinonreduktase-Transkripte für *StTRI* und *StTRII* wurde nach acht Tagen Tropinon-Fütterung für *S. tuberosum* Wildtyp-Pflanzen untersucht. Die Ergebnisse bei den Wiederholungen der Experimente waren nicht reproduzierbar und wurden deshalb nicht in das Ergebniskapitel integriert. Eine Induktion der *StTRI*-Transkriptmengen wurde in zwei Experimenten nach Wasser- und auch nach Tropinon-Fütterung im Vergleich zu unbehandelten Blättern festgestellt. Aber nur in einem der beiden Experimente wurde eine Induktion von *StTRII*-Transkript durch Tropinon- und Wasser-Behandlung gemessen. Ob auch ein Unterschied der jeweiligen Transkriptmengen für *StTRI* und *StTRII* zwischen in den in Wasser und den in Tropinon-Lösung stehenden Blättern auftrat, konnte in drei Experimenten nicht reproduzierbar ermittelt werden. Eine Induktion von Tropinonreduktase-Transkripten wurde bereits in verschiedenen anderen Arbeiten, z.B. nach Zugabe von Pflanzenhormonen oder nach Verwundung, gezeigt. In *Anisodus acutangulus* (Solanaceae) induzierte Methyljasmonat *AaTRII*-Transkripte in der Wurzel, der Sprossachse und im Blatt nach 12 h und 24 h. Für die *AaTRI* fand in diesen Organen nur eine sehr schwache Induktion statt. Zum Vergleich nahm in *A. acutangulus* Wurzelkulturen die Expression der *AaTRI* und *AaTRII* nach Methyljasmonat-Applikation ab, sodass eine gewebespezifische Regulation der beiden Tropinonreduktasen postuliert wurde (Kai et al., 2009a). Die Expression einer *TRI* in Blättern von *Withania somnifera* (Solanaceae) konnte nach Applikation von Methyljasmonat, Salicylsäure und durch Verwundung gesteigert werden (Kushwaha et al., 2013b). Transkriptmengen einer zu den *TRI* gruppierten Tropinonreduktasen aus *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) waren 24 h nach Methyljasmonat-Applikation ebenfalls erhöht (Chen et al., 2013). Ob Methyljasmonat auch die Transkriptmengen der *StTRI* und *StTRII* beeinflusst, könnte in weiteren Analysen überprüft werden.

### D 4.2.3 Umsatz von Jasmonsäure

Tropinonreduktasen gehören zu der Gruppe der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs), einer Enzymfamilie, die durch katalytische Vielseitigkeit in der Lage ist, verschiedenste Substrate mit Carbonylfunktionen zu den entsprechenden Alkoholen zu reduzieren (Oppermann et al., 2003; Tonfack et al., 2011). So ist für die rekombinant in *E. coli* hergestellte StTRI durch *in vitro* Enzymassays die Fähigkeit zur Reduktion von Jasmonaten, wie (-)-Jasmonsäure, (±)-Jasmonsäure, (±)-Methyljasmonat und (±)-Methyldihydrojasmonat, gezeigt worden (Dr. N. Reinhardt, MLU Halle-Wittenberg, unveröffentlichte Ergebnisse). Reaktionsprodukte sind Cucurbinsäure-Derivate (Abb. A- 3). Das Vorkommen von Cucurbinsäure und ihrer Derivate ist für einige Pflanzen, wie *Cucurbita pepo* (Fukui et al., 1977), *Vicia faba* (Miersch et al., 1989), *Phaseolus vulgaris* (Clarke et al., 2000), *Asparagus officinalis* (Gapper et al., 2002), *Hordeum vulgare* (Meyer et al., 1991), *Solanum lycopersicum* (Van Meulebroek et al., 2012) und einige Pilze, wie *Pisolithus tinctorius* (Miersch et al., 1999), *Botryodiplodia theobromae* (Miersch et al., 1987) und *Collybia dryophila* (Miersch et al., 1993), beschrieben. Auch in *S. tuberosum* cv. Katahdin wurde bisher eine Cucurbinsäure-Verbindung (7-iso-Methylcucurbit) identifiziert und ein Anstieg in unterirdischen Geweben unter Kurztagbedingungen gemessen (Malkawi et al., 2007). Ob es in Pflanzen Enzyme zur Inaktivierung von Jasmonsäure zu Cucurbinsäure gibt, ist ebenfalls unbekannt. Der Abbau der bioaktiven Form Jasmonsäure-Isoleucin erfolgt einerseits durch Oxidation zur 12-Hydroxy-Jasmonsäure-Isoleucin und 12-Carboxy-Jasmonsäure-Isoleucin, katalysiert durch die Cytochrom-P-450 Enzyme CYP94B3 und CYP94C1 in *A. thaliana* (Heitz et al., 2012; Kitaoka et al., 2011; Koo et al., 2011). Andererseits wird der Abbau durch Hydrolyse zu Jasmonsäure und Isoleucin durch Jasmonsäure-Isoleucin-Hydrolase 1 in *Nicotiana attenuata* beschrieben (Woldemariam et al., 2012).

In den *StTRI* RNAi Linien sollten mögliche Veränderungen in dem Jasmonatabbau nach Verwundung nachvollzogen werden. Wenn die *StTRI* Jasmonsäure zu Cucurbinsäure reduziert, wäre in den *StTRI* RNAi Linien ein verlangsamter Jasmonatabbau zu erwarten. Dieser könnte sich in einem verlangsamten Rückgang der Expression von Jasmonat-responsiven Genen, z.B. Proteinase-Inhibitoren, äußern. Nach Anstieg des Gehalts von Jasmonaten, z.B. durch Verwundung, erhöht sich auch die Expression von Proteinase-Inhibitor 1 und 2 (*Pin1*, *Pin2*) in Pflanzen



(Farmer et al., 1992; Graham et al., 1986; Green and Ryan, 1972). Für *S. tuberosum* Blätter wurde nach Applikation von Jasmonsäure und Methyljasmonat ein starker Anstieg von *StPin2*-Transkripten nach 24 h beschrieben (Ishikawa et al., 1994). Auch Royo und Mitarbeiter (1996) stellten eine starke Expression von *StPin2* in Kartoffelblättern 24 h bis 72 h nach Verwundung fest. Andere Literatur beschreibt für *S. tuberosum* einen zeitigen Anstieg der *StPin2*-Expression bereits 2 h nach Verwundung der Blätter (Peña-Cortes et al., 1988) und 8 h nach Verwundung der Wurzel (Dammann et al., 1997). Zur Untersuchung der *StPin2*-Transkriptmengen in Blättern der *StTRI* RNAi Linien wurden späte Zeitpunkte (24 h, 72 h und 6 Tage) nach Verwundung ausgewählt, um einen möglichen verzögerten Rückgang der *StPin2*-Expression im Vergleich zu Kontrollblättern zu verfolgen. Nach 72 h und auch 6 Tagen war die *StPin2*-Expression in Kontrollpflanzen und *StTRI* RNAi Linien rückläufig, ohne dass ein Unterschied festgestellt werden konnte (Abb. C- 14). Danach wurden in verwundeten Blättern der *StTRI* RNAi- und *StTRI* Überexpressionslinien die endogen gebildeten Jasmonat-Verbindungen Jasmonsäure, Jasmonsäure-Isoleucin, 12-Hydroxyjasmonat, OPDA und Cucurbinsäure quantifiziert (Abb. C- 15). Cucurbinsäure wurde durch diese Arbeit erstmalig in *S. tuberosum* detektiert und quantifiziert. Jasmonsäure und Jasmonsäure-Isoleucin erreichten bereits 30 min nach Verwundung ihren höchsten Gehalt bei 1 mg/g FM und gingen nach 8 h wieder auf den Level eines unverwundeten Blattes zurück. 4 h nach Verwundung erreichte auch 12-Hydroxyjasmonat seinen Scheitelpunkt bei 1 mg/g FM, was auf einen Abbau durch Hydroxylierung von Jasmonsäure deuten kann. Ein Abbau von Jasmonsäure zu 12-Hydroxyjasmonat nach Verwundung wurde bereits für Tomatenblätter gezeigt (Miersch et al., 2008). 12-Hydroxyjasmonat induziert die Knollenbildung der Kartoffelpflanze, wird aber nicht den biologisch aktiven Jasmonaten zugeordnet (Helder et al., 1993; Miersch et al., 2008; Yoshihara et al., 1996). Der unveränderte Cucurbinsäure-Gehalt in den *StTRI* RNAi Linien, *StTRI* Überexpressionslinien und Kontrollpflanzen weist nicht auf eine Reduktion von Jasmonsäure zu Cucurbinsäure durch *StTRI in vivo* hin.

Aber das Vorkommen von geringen Mengen Cucurbinsäure in den Blättern von *S. tuberosum* lässt annehmen, dass es ein anderes Enzym in der Pflanze gibt, das die Reduktion von Jasmonsäure zu Cucurbinsäure katalysiert. Dies könnte eine SDR sein, die diese Reaktion unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder

möglicherweise auch nur als unbedeutende Nebenaktivität übernimmt. Die Datenbank des *S. tuberosum* Genoms liefert zahlreiche Einträge für Sequenzen, die den SDRs zugeordnet werden können (PGSC, 2011). Für mehrere SDR-Enzyme aus *A. thaliana* wurde *in vitro* die Fähigkeit zur Reduktion von Jasmonaten festgestellt (Reinhardt, 2014). Die direkte Bildung von Cucurbinsäure-Derivaten aus Jasmonsäure *in vivo* wurde bisher noch nicht für Pflanzen beschrieben. Der mykorrhizierende Pilz *Pisolithus tinctorius* hingegen bildete nach Applikation von Jasmonsäure drei Cucurbinsäure-Derivate (Miersch et al., 1999).

Die Möglichkeit eines Umsatzes von erhöhter Jasmonsäure zu Cucurbinsäure nach Methyljasmonat-Fütterung an Blätter von *StTRI* überexprimierenden Linien wurde in einem nächsten Experiment überprüft. Aufgenommenes Methyljasmonat wird in Pflanzen durch Esterasen zu Jasmonsäure gespalten (Stuhlfelder et al., 2002; Wu et al., 2008). Nach einem Anstieg der Jasmonsäure bis auf 0,6 µg/g FM nach einer Stunde folgte ein Rückgang auf 0,3 µg/g FM in Kontrollblättern und auch in Blättern von *StTRI* Überexpressionslinien. Der konstante Cucurbinsäure-Gehalt in den *StTRI* Überexpressionslinien deutet auch hier nicht auf einen verstärkten Abbau von Jasmonsäure zu Cucurbinsäure. Somit fungiert die *StTRI* *in vivo* nicht als Jasmonsäure-abbauendes Enzym. Ob Cucurbinsäure *in vivo* das Reduktionsprodukt von Jasmonsäure ist, kann nicht sicher gesagt, aber wegen Strukturähnlichkeit angenommen werden. Dies könnte durch Analyse des Cucurbinsäure-Gehalts in Jasmonat-defizienten Pflanzen ermittelt werden, z.B. den *jai-*, *spr2-* oder *def1-* Mutanten von Tomate (Howe et al., 1996; Li et al., 2003; Li et al., 2004). Tomate eignet für derartige Versuche, da in den Blättern und in der Frucht ein Vorkommen von Cucurbinsäure bestätigt ist (Van Meulebroek et al., 2012). Ein Fehlen von Cucurbinsäure in den Jasmonat-defizienten Mutanten könnte einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Jasmonatabbau und Cucurbinsäurebildung liefern. Die Fütterung von Jasmonat-defizienten Pflanzen mit Jasmonsäure und ein Wiederauftreten von Cucurbinsäure könnte die direkte Bildung aus Jasmonsäure beweisen. Darüber hinaus wären ein Fütterungsversuch mit markierter Jasmonsäure und die Messung des Umsatzes zu markierter Cucurbinsäure aussagekräftig.

Die Funktion von Cucurbinsäure in Pflanzen ist noch unvollständig untersucht. Die Verbindung wurde zuerst in Kürbissamen identifiziert, wachstumshemmende Eigenschaften wurden festgestellt (Fukui et al., 1977; Koshimizu et al., 1974). In Untersuchungen zur Knollenbildung bei *S. tuberosum* zeigte Cucurbinsäure einen

Knollen-induzierenden Effekt, der aber im Vergleich zu Jasmonsäure und Methyljasmonat schwächer ausgeprägt war (Koda et al., 1991). Die Induktion von *StPin2*-Transkripten wurde in Kartoffelblättern am stärksten durch Jasmonsäure und Methyljasmonat ausgelöst, aber in geringerem Maße auch vom Methylester der Cucurbinsäure (Methylcucurbitat) und Cucurbinsäure selbst (Ishikawa et al., 1994).

#### D 4.2.4 Pflanzen mit reduziertem Calystegin-Gehalt

Das Herabsetzen der *StTRII*-Expression durch genetische Manipulation mit der Folge einer reduzierten Calysteginbildung wurde durch diese Arbeit erstmalig vorgenommen. Zum Nachweis des RNAi-Effekts für *StTRII* wurde in Wurzeln und in Keimen der Kartoffelpflanze die Expression der *StTRII* untersucht. Beide Organe waren gekennzeichnet durch unterschiedlich stark herabgesetzte *StTRII*-Transkriptmengen (Abb. C- 18). In den Keimen der *StTRII* RNAi Linien konnte erstmalig eine Korrelation zwischen der gebildeten Calysteginmenge und der *StTRII*-Transkriptabundanz festgestellt werden. Eine starke Herabsetzung der *StTRII*-Transkripte in den Linien A, O und V geht mit dem fast vollständigen Fehlen der Calystegine B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> in diesen Linien einher (Abb. C- 21). Für die Linien T und Y ist die schwächere Unterdrückung des *StTRII*-Transkripts nicht ausreichend um die Calysteginbildung auf das minimale Niveau der Linien A, O und V herabzusetzen. Daraus kann abgeleitet werden, dass ab einer bestimmten Grenze der Herabsetzung der *StTRII*-Transkriptmengen nicht mehr genug Pseudotropin gebildet wird, um den endogenen Calystegin-Gehalt zu erreichen. Andere Literatur beschreibt die Expression der *DsTRII* in *A. belladonna* Wurzelkulturen. Dabei wurden mehrere Linien mit erhöhten *DsTRII*-Transkriptmengen erzeugt, aber nur bei einer Linie ein erhöhter Calystegin-Gehalt detektiert. In dieser Linie korrelierte die vermehrt gebildete Pseudotropinmenge mit einem gesteigerten Calystegin-Gehalt (Richter et al., 2005).

Die Kartoffelpflanzen mit geringem Calystegin-Gehalt können zukünftig dazu beitragen, Informationen über die Funktion von Calysteginen zu erhalten, z.B. durch die Messung der Ausbildung eines metabolischen Phänotyps in den Keimen oder der ganzen Pflanze. Beim Auskeimen der Knollen wird Stärke zu Saccharose umgebaut. Die Zellwandsynthese wird gesteigert und die Bildung von Keimen beginnt (Farre et al., 2001; Hajirezaei et al., 2003). Bei der Keimbildung wurde ein verstärkter Transport von Saccharose über das Phloem zu dem meristematischen Keimgewebe nachgewiesen (Hartmann et al., 2011; Viola et al., 2007). Diese Prozesse könnten,

falls Calystegine aufgrund ihrer zuckerähnlichen Struktur als Enzyminhibitoren in den Kohlenhydratabbau eingreifen, in den *StTRII* RNAi Linien ein verändertes Keimungsverhalten zur Folge haben. Calystegine besitzen die Eigenschaft, pflanzliche Glycosidasen (Kapitel A 1.4.2) und die *C. sepium* Invertase zu hemmen (Höke and Dräger, 2004). Da aber während der Kultivierung der *StTRII* RNAi Linien mit Ausnahme der Linie O keine phänotypischen Auffälligkeiten auftraten, ist davon auszugehen, dass der verminderte Calystegin-Gehalt keinen Einfluss auf das Pflanzenwachstum, die Keimzeit und Keimungsintensität der Knolle hat. Die Linie O produzierte eine geringere Masse an Keimen als die anderen im Calystegin-Gehalt reduzierten Linien (Abb. C- 25), zeigte aber keinen weiteren Phänotyp. In anderen Studien gelang für *A. belladonna* auch eine Veränderung des Calystegin-Gehalts, ohne dass sich der Phänotyp änderte. In Wurzelkulturen wurde durch Zugabe von 5 % Saccharose zum Kulturmedium eine Erhöhung des Calystegin-Gehalts festgestellt, das synthetische Auxin Indolbuttersäure hingegen verringerte den Calystegin-Gehalt (Rothe et al., 2003). Nach Expression der *DsTRI* in *A. belladonna* Wurzelkulturen wurde der Calystegin-Gehalt um 30-90 % reduziert, gleichzeitig erhöhten sich die Tropanalkaloide um das drei- bis fünffache (Richter et al., 2005).

In folgenden Experimenten müsste untersucht werden, ob es in den *StTRII* RNAi Linien Metabolitenveränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels der Keime und Knolle gibt. Dazu könnte der Gehalt an Stärke, Saccharose, Glucose und Fructose bestimmt werden. Doch die komplexen metabolischen und regulatorischen Prozesse bei der Keimung von Kartoffelknollen (Fernie and Willmitzer, 2001; Sonnewald and Sonnewald, 2014) lassen die Schlussfolgerung zu, dass Calystegine möglicherweise nur einen Teilbaustein in der Regulation dieser Prozesse bei der Keimung einnehmen könnten. Die Entstehung eines Keimes wird durch viele Faktoren wie durch Umweltverhältnisse, Veränderungen des Primärstoffwechsels und von Transkripten, strukturellen Gewebeveränderungen und Pflanzenhormonen beeinflusst (Sonnewald and Sonnewald, 2014).

Richter und Mitarbeiter (2007) untersuchten bei Kartoffelpflanzen mit supprimierter Saccharose-Synthase und exprimierter cytosolischer und apoplastischer Invertase aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) die Auswirkungen auf den Gehalt an Calysteginen. Invertase katalysiert den Saccharose-Abbau zu Glucose und Fructose, die Saccharose-Synthase den reversiblen Abbau von Saccharose zu UDP-Glucose und Fructose (Salerno and Curatti, 2003). Dabei wurde festgestellt, dass durch

Suppression der Saccharose-Synthase der Calystegin-Gehalt einiger Linien in den Keimen, der Schale und den Augen der Knolle anstieg. Auch einige apoplastische Invertase-exprimierende Linien zeigten einen erhöhten Calystegin-Gehalt in der Wurzel. Die Expression der cytosolischen Invertase führte dagegen zu einem stärkeren Rückgang von Calysteginen in der Knollenschale bei Lagerung (Richter et al., 2007). In einer anderen Studie zur Expression von Invertase aus *S. cerevisiae* in *S. tuberosum* wurde eine verzögerte Keimung festgestellt, die mit einem verringerten Saccharose-Transport zu den Keimen in Verbindung gebracht wurde (Hajirezaei et al., 2003). Da sowohl die Expression von Invertase als auch die Suppression der Saccharose-Synthase zu erhöhten Vorkommen von Glucose und zum Teil auch Fructose in Kartoffelknollen führen (Sonnewald et al., 1997; Zrenner et al., 1995) und Calystegine Hemmstoffe der pflanzlichen Invertase aus *C. sepium* sind (Höke and Dräger, 2004), könnte folgender Zusammenhang spekuliert werden: Ein endogen hohes Vorkommen von Calysteginen könnte zur Inhibition der Invertase beitragen um die Glucose- und Fructose-Freisetzung aus Saccharose zu regulieren, ein erniedrigtes Vorkommen hätte einen vermehrten Abbau von Saccharose zur Folge. Um die Theorie der Beteiligung von Calysteginen an einer Invertasehemmung *in vivo* zu prüfen, könnte der Gehalt an Saccharose und reduzierenden Zuckern in den Knollen und Keimen der *StTRII* RNAi Linien bestimmt werden. Als *in vitro* Vortest könnte eine Hemmwirkung der Calystegine auf die *S. tuberosum* Invertasen geprüft werden.

#### D 4.2.5 Calystegine bei der Pathogenabwehr

In *S. tuberosum* kommen Calystegine besonders in den unterirdischen Pflanzenorganen und in jungen Geweben vor (Keiner and Dräger, 2000), die besonderen Schutz gegenüber Fraßfeinden und Pathogenen benötigen. In den 1990er Jahren wurden Untersuchungen zur Aufklärung der Funktion von Calysteginen als Abwehrsubstanzen gegen Insekten und deren Larven vorgenommen (Dr. B. Dräger, persönliche Kommunikation, unveröffentlicht): In Wahlfraßversuchen mit Kartoffelblättern, auf denen eine Calystegin-Lösung oder Wasser zur Kontrolle aufgebracht war, wurde das Verhalten folgender Schädlinge getestet: Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*), Wanderheuschrecken der Gattung *Schistocerca*, Raupen des Eulenfalters der Gattung *Spodoptera* und Raupen des Tabakswärmers (*Manduca sexta*). Eine Präferenz bzw. Abneigung für oder gegen die mit Calysteginlösung befeuchteten Blätter konnte bei keinem Insekt

festgestellt werden. Wenn nur Calystegin-angereichertes Futter angeboten wurde, zeigten die Larven keinerlei Fraßhemmung oder sichtbare Vergiftungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Oomycet *P. infestans* als Modellorganismus zur Testung einer möglichen Abwehrfunktion von Calysteginen gewählt. *P. infestans* als Erreger der Kraut- und Knollenfäule von *S. tuberosum* befällt sowohl unterirdische als auch oberirdische Organe der Pflanze (Andrivon, 1995) und schien deshalb zur Testung von Keimextrakten geeignet. Mit Extrakten von Keimen der stark im Calystegin-Gehalt reduzierten *StTRII* RNAi Linien und Kontrollpflanzen sowie Calystegin B<sub>2</sub>-Lösungen wurde in Sporenkeimungsassays untersucht, ob die Auskeimung von *P. infestans* Sporen inhibiert werden kann. Alle Keimextrakte der *StTRII* RNAi Linien und Kontrollpflanzen hemmten die Auskeimung der Sporen sehr stark, wohingegen Calystegin B<sub>2</sub> sogar in unphysiologisch hoher Konzentration von 15 mM keinen Effekt auf die Sporenkeimung zeigte (Abb. C- 22). Diese gleichmäßig starke Hemmung der Sporenkeimung aller Extrakte lässt vermuten, dass nicht die Calystegine, sondern andere in den Keimen befindliche Substanzen dafür verantwortlich sein müssen. Die in *S. tuberosum* vorkommenden Steroidalkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin sind in der Lage, die Sporenkeimung und das Wachstum von pathogenen Pilzen, wie *Alternaria brassicicola* oder *Rhizoctonia solani*, zu hemmen. Dabei wurde ein synergistischer Effekt gezeigt (Fewell and Roddick, 1993). Da der höchste Steroidalkaloid-Gehalt in Geweben der Kartoffelpflanze mit hoher metabolischer Aktivität, z.B. den Keimen, vorkommt (Barceloux, 2009), ist es wahrscheinlich, dass auch die *P. infestans*-Sporenkeimung in den Kartoffelkeimen durch die Steroidalkaloide beeinflusst worden sein kann. Überprüft werden könnte diese These durch *P. infestans* Sporenkeimungsassays mit den Reinsubstanzen  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin. Aliferis und Mitarbeiter (2012) untersuchten gezielt den Metabolitenstoffwechsel von *S. tuberosum* Keimen nach Infektion mit *R. solani*. Ein vermindertes Vorkommen der Steroidalkaloide  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin und ein gleichzeitig gehäuftes Vorkommen der weniger toxischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Formen der Alkaloide ließen den Schluss zu, dass der Pilz die Zuckerkette der  $\alpha$ -Formen hydrolysiert. Der progressive Verlauf der Infektion stützte die These, dass *R. solani*  $\beta$ - und  $\gamma$ -Solanin/Chaconin toleriert. Bei der Bestimmung von Calystegin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> in den infizierten Keimen wurde kein Anstieg der Calystegine nachgewiesen, sodass die Beteiligung der Calystegine an Abwehr der Infektion als gering eingeschätzt wurde.

Ein Ansatz zur Aufklärung der biologischen Funktion von Calysteginen kann auch die Beteiligung der Calystegine an einer für die Pflanze förderlichen Rhizosphäre sein. Hier könnten schädliche Mikroorganismen durch Calystegin-verstoffwechselnde, für die Pflanze nützliche Organismen verdrängt werden. Besonders die jungen Keime sind im Boden einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt und müssen geschützt werden. Das starke Vorkommen der Calystegine besonders in jungen, kurzen Keimen unterstützt diese Vermutung (Abb. C- 6, Abb. C- 11, Keiner and Dräger, 2000). Im Boden befällt der Pilz *R. solani* die Keime, Wurzeln und Stolone der Kartoffelpflanze, indem er durch Hydrolyse von Pektinen und Cellulose Poren in der Zellwand bildet (Chamoun et al., 2014; Lahlali and Hijri, 2010). Andere Mikroorganismen der pflanzlichen Rhizosphäre können das Vorkommen von *R. solani* beeinflussen, wie das Bakterium *Bacillus subtilis*, welches das Wachstum von *R. solani* inhibiert und das Pflanzenwachstum bei *R. solani*-Infektion fördert. Diese biologische Kontrolle und die Suche nach weiteren förderlichen Organismen für das Wachstum von *S. tuberosum* ist ein neuer Ansatz zur Bekämpfung von *R. solani*-Infektionen (Ghyselinc et al., 2013, Lahlali and Hijri, 2010).

Rhizobien als für die Kartoffelpflanze förderliche Mikroorganismen sind in der Lage, durch ihre Zellwand-Lipopolysaccharide Resistenz zu induzieren und damit Nematodeninfektionen der Wurzel zu reduzieren (Reitz et al., 2000). Viele Rhizobien-Spezies treten gehäuft bei Makronährstoffmangel von Stickstoff, Kalium und Phosphor in der Rhizosphäre der Wurzel auf. Ursächlich kann dieses gehäufte Vorkommen der Spezies durch eine Veränderung der aus der Wurzel abgegebenen Metaboliten hervorgerufen sein (Unno et al., 2015). *Rhizobium meliloti* ist in der Lage, Calystegin B<sub>2</sub> zu verstoffwechseln und kommt häufig in der Rhizosphäre von Pflanzen vor, die Calystegine bilden (Goldmann et al., 1996, Tepfer et al., 1988, Guntli et al., 1999). So kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Calystegin-produzierende Pflanzen ihre Rhizosphäre mit Mikroorganismen als Symbiosepartner bereichern, die einerseits Calystegine als Nährstoffquelle nutzen und andererseits pathogene Mikroorganismen verdrängen. Dass Calystegine an die Umgebung abgegeben werden, ist durch das Vorhandensein von Calysteginen in Wurzel-Exsudaten von *C. sepium* wahrscheinlich (Tepfer et al., 1988). Ein Calystegin-Transporter ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht identifiziert.

### **D 4.3 Genomische Organisation der Gene für Tropinonreduktasen, Putrescin-*N*-methyltransferasen und Spermidinsynthasen**

Mithilfe der *S. tuberosum* Genomdatenbank (PGSC, 2011) wurden Untersuchungen zur Häufigkeit, zur genomischen Struktur und zur Einordnung der annotierten Tropinonreduktase (TR)-, Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT)- und Spermidinsynthase (SPDS)-Sequenzen anhand typischer Aminosäure-Sequenzmotive in die entsprechenden Gruppen der TRs, PMTs und SPDSs getroffen.

Es existieren verschiedene Theorien für die Evolution von neuen, spezialisierten Funktionen von Enzymen. Die Neo- und Nonfunktionalisierung beschreibt die Genduplikation, bei der die ursprüngliche Kopie des Gens seine Funktion beibehält und die zweite Kopie durch Mutation eine neue Funktion hinzugewinnt oder die ursprüngliche Funktion gänzlich verliert (Ohno, 1970). Die Subfunktionalisierung postuliert die Evolution vom Enzym mit vielen unspezialisierten Funktionen (Generalist) zu einem Enzym mit einer spezialisierten Funktion (Spezialist). Die Genduplikation tritt entweder vor der Spezialisierung durch Mutation auf (Hughes, 1994) oder nach der Spezialisierung (Aharoni et al., 2005; Khersonsky et al., 2006).

Im Genom von *S. tuberosum* kommen fünf Tropinonreduktase-Sequenzen vor (PGSC, 2011, Tab. C- 1), dabei eine *TRI*-Sequenz (98 % Nukleotidübereinstimmung mit *StTRI*), eine *TRII*-Sequenz (98 % Nukleotidübereinstimmung mit *StTRII*) und drei weitere *TR*-Sequenzen mit unbekannter Funktion (*TR1*, *TR*, *TRh*: 66-72 % Nukleotidübereinstimmung mit *StTRI* oder *StTRII*). *TRI* und *TRII* können sich durch Genduplikation und Funktionswechsel entwickelt haben. Diese Annahme wird gestützt durch die in allen fünf Sequenzen nahezu fast exakten Exon-Längen, die übereinstimmenden vier Aminosäuren der katalytischen Tetrade (Filling et al., 2002) und die NADPH-Binderegion (Oppermann et al., 2003, Nakajima et al., 1998). Sechs und mehr Aminosäure-Unterschiede in der Tropinon-Binderegion (Abb. C- 27, Nakajima et al., 1998) lassen vermuten, dass die drei Proteine *TR1*, *TR* und *TRh* nicht zwingend in der Lage sein müssen, Tropinon zu binden und umzusetzen. Für die Substrat-Bindung in *TRI* und *TRII* ist eine umgekehrte Orientierung des Tropinons entscheidend (Nakajima et al., 1998). In *TRII* ist eine konservierte Glutaminsäure (E156 in *StTRII*) für die Interaktion mit dem positiv geladenen Stickstoff des Tropinons durch Säure-Base-Interaktion essentiell. In *TRI* wird die gedrehte Orientierung des Tropinons durch Abstoßung des Stickstoffs mit einem



positiv geladenen Histidin (H102 in StTRI) gewährleistet (Nakajima et al., 1998). Da bei den Proteinsequenzen für TR1, TR und TRh weder die Glutaminsäure, noch das Histidin an den für die Fixierung von Tropinon wichtigen Positionen auftritt, ist die Wahrscheinlichkeit zur korrekten Bindung von Tropinon zum Erhalt von TRI- oder TRII-Aktivität gering. Auch ein als StTR-homolog benanntes Protein aus *S. tuberosum* (AJ400815), das nur in zwei relevanten Aminosäuren (Position 199: Glutamin in StTR-homolog/Leucin in StTRI; Position 217: Isoleucin in StTR-homolog/Phenylalanin in StTRI) der Tropinon-Binderegion zu StTRI verschieden ist, katalysiert *in vitro* die Reduktion von Tropinon nicht (Keiner, 2001).

Bei der phylogenetischen Analyse gruppieren sich die drei Proteinsequenzen von TR1, TR und TRh mit der Variation an der Tropinon-Binderegion evolutionär vor den bekannten TRI- und TRII-Sequenzen aus Solanaceae, so dass ein gemeinsames Vorläuferprotein mit TRI und TRII postuliert werden kann (Abb. C- 28). Da zwei Sequenzen der *TR1* auf Chromosom 9 kurz hintereinander vorkommen, ist von einer Duplikation des betroffenen Sequenzabschnitts im Genom auszugehen. Auch Tropinonreduktase-ähnliche Proteine (TRLs) aus *A. thaliana* wurden hinsichtlich möglicher Abstammung und Funktionalitäten bereits untersucht (Reinhardt, 2014). Von insgesamt 16 *TRL*-Sequenzen sind 12 auf Chromosom 2 kurz nacheinander in Tandem angeordnet. Eine *TRL* auf Chromosom 5 (*At5g06060*) wird als Vorläufergen angesehen, aus denen eine weitere *TRL* auf Chromosom 2 (*At2g29260*) durch Duplikation entstanden ist und danach sich die anderen *TRLs* auf Chromosom 2 durch weitere Duplikationen entwickelt haben (Navarro-Quezada, 2007). Die *TRLs* aus *A. thaliana* reduzieren *in vitro* kein Tropinon oder Stickstoff-enhaltende Tropinon-Analoga, haben aber ein großes Substratspektrum, denn sie setzen kleine lipophile Carbonylverbindungen, Terpene, Flavonoide und Steroide zu den entsprechenden Alkoholen um (Reinhardt, 2014; Reinhardt et al., 2014). Die Funktion dieser Enzyme für die Pflanze wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Eine Beteiligung an der Biosynthese von Tropanalkaloiden oder Calysteginen ist auszuschließen, da diese in *A. thaliana* nicht vorkommen (Brock et al., 2006). Ob die Proteine TR1, TR und TRh aus *S. tuberosum* in der Lage sind, Tropinon oder andere Substrate mit Carbonylfunktion zu reduzieren, müsste nach Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine in Enzymassays untersucht werden.

In der *S. tuberosum* Genomdatenbank (PGSC, 2011) wurden jeweils zwei Sequenzen für *PMTs* und *SPDSs* ermittelt. Eine *PMT*-Nukleotidsequenz (*PMT1*) ist

zu 93 % mit der *StPMT* identisch, die andere *PMT*-Sequenz (*PMT2*) zu 80 %. Die Identität auf Nukleotidebene der *SPDS*-Sequenzen zur *StSPDS* beträgt 99 % für *SPDS1* und 87 % für *SPDS2* (Tab. C- 1). Das Proteinalignment zeigt, dass alle vier Sequenzen die Co-Substrat-Bindestellen (Pósfai et al., 1989; Schluckebier et al., 1995), die Putrescin-Bindestelle (Malone et al., 1995; Pósfai et al., 1989; Schluckebier et al., 1995; Korolev et al., 2002) und auch die vier für *PMT* und *SPDS* typischen Sequenzmotive (Hashimoto et al., 1998b) gemeinsam haben. Die Aminosäuren, die spezifisch den *PMTs* oder *SPDSs* zugeordnet werden, sind jeweils in den beiden untersuchten *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen mit nur wenigen Unterschieden vorhanden (Suzuki et al., 1999a, Abb. C- 29). Bei der phylogenetischen Analyse werden beide *PMTs* eindeutig in das Cluster der *PMTs* anderer Solanaceae eingruppiert und die beiden *SPDSs* in das Cluster anderer *SPDS* (Abb. C- 30). Die Überprüfung der Aktivität der rekombinanten Enzyme könnte zukünftig durch *in vitro* Enzymassays mit Putrescin als Substrat bestätigt werden.

Für die Differenzierung zwischen *PMT*- und *SPDS*-Aktivität sind nur wenige Aminosäuren verantwortlich. Die *A. thaliana* *SPDS1* (*AtSPDS1*) ließ sich *in vitro* durch ein bis drei ausgetauschte Aminosäuren der *dcSAM*-Bindestelle in ein bifunktionelles Enzym mit *PMT*- und *SPDS*-Doppelaktivität umwandeln. Vier ausgetauschte Aminosäuren führten ausschließlich zu *PMT*-Aktivität ohne *SPDS*-Aktivität (Junker et al., 2013). Diese vier relevanten Aminosäuren, bezogen auf *StSPDS* sind folgende: D143, Q118, V146 und L109. In den beiden untersuchten *SPDS*-Sequenzen sind die vier *SPDS*-spezifischen und in den beiden *PMT*-Sequenzen die vier *PMT*-spezifischen Aminosäuren vorhanden (Abb. C- 29). Deshalb kann postuliert werden, dass die *SPDS1* und *SPDS2* folglich *SPDS*-Aktivität besitzen müssten, die *PMT1* und *PMT2* demnach *PMT*-Aktivität. Die Anzahl der *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen in der Kartoffelpflanze wurde bereits von Stenzel und Mitarbeitern (2006) durch genomische Southern-Blot Analyse untersucht. Sie ergab auch jeweils zwei *PMT*- und zwei *SPDS*-Sequenzen, wobei eine *SPDS* und beide *PMT*-Sequenzen kloniert wurden, eine *PMT* aber nach der heterologen Proteinexpression unlöslich vorlag. Auch für andere Tropanalkaloid- und Calysteginproduzierende Solanaceae ist das Vorhandensein von mindestens einer *PMT*- und *SPDS*-Sequenz und die Aktivität der rekombinanten Proteine durch *in vitro* Enzymassays belegt (Teuber et al., 2007). Für *N. tabacum* wurden sogar drei *PMT*-Sequenzen identifiziert (Hashimoto et al., 1998a).

Durch die Kenntnis der Position der untersuchten Sequenzen im *S. tuberosum* Genom können sich zukünftig weitere Studien zur Regulation der Gene anschließen. Regulationsmechanismen für *StPMT*, *StTRI* und *StTRII* auf Promoter-Ebene sind bisher noch unbekannt und können durch Promoter-Bindungsstudien untersucht werden. Falls *in vitro* PMT-Aktivität für beide PMTs nachgewiesen werden kann, können gezielt beide Gene einzeln ausgeschaltet werden. Ob die Calystegine als Endprodukte der Biosynthese auch dann noch akkumulieren durch die Aufrechterhaltung der NMP-Bildung durch die jeweils andere PMT, wäre zu prüfen und ein wichtiger Hinweis auf funktionelle Redundanz von Sekundärstoffwechselgenen.

## E 5 Zusammenfassung

In *S. tuberosum* ist die Funktion einiger an der Calysteginbiosynthese beteiligter Enzyme *in vivo* noch nicht bestätigt worden. Für mehrere Biosyntheseschritte sind die Enzyme auch noch völlig unbekannt, ebenso deren Regulation. Für die Tropinonreduktasen StTRI und StTRII wurde der Substratumsatz von Tropinon mit den rekombinanten Proteinen *in vitro* nachgewiesen (Kaiser et al., 2006; Keiner et al., 2002), so dass die Tropinonreduktion zu Tropin durch StTRI und zu Pseudotropin durch StTRII auch als *in vivo* Funktion vermutet werden kann. Doch in der Kartoffelpflanze kommen weder Tropanalkaloide noch Tropin-abgeleitete Produkte wie Tropinester vor. Auch die Funktion der besonders in den Keimen akkumulierten Calystegine ist derzeit noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Tropinonreduktasen *StTRI* und *StTRII* modifiziert und die nachgeschalteten Metaboliten quantifiziert, um die Funktion der Enzyme *in vivo* festzustellen. Das Herabsetzen der *StTRII*-Expression sollte Pflanzen mit einem reduzierten Calystegin-Gehalt liefern, um die Funktion der Calystegine für die Pflanze untersuchen zu können. Die Expression des Eingangsenzyms Putrescin-*N*-methyltransferase (PMT) in den Sekundärstoffwechsel und die Bestimmung der nachfolgenden Metaboliten sollte dazu beitragen, limitierende Schritte der Calysteginbiosynthese aufzuklären.

Die Expression der *DsPMT* in der Kartoffelpflanze ist gelungen. Erhöhte *PMT*-Transkriptmengen und eine gesteigerte Bildung von *N*-Methylputrescin (NMP) wurden detektiert. Der Gehalt anderer Polyamine, wie Putrescin, Spermidin und Spermin, veränderte sich nicht. Durch die NMP-Bildung verbrauchtes Putrescin wurde zeitgleich neu nachgebildet. Die NMP-Erhöhung setzte sich nicht in den weiteren Biosyntheseweg zu den Calysteginen fort. Obwohl Polyamin-Analoga gute Kandidatensubstanzen für eine Hemmung von pflanzenpathogenen Pilzen sind, beeinflusste der erhöhte NMP-Gehalt in den Blättern von *DsPMT* exprimierenden Linien das Wachstum des Kartoffelpathogens *P. infestans* nicht.

Durch die Fütterung von Blättern der *StTRI* RNAi- und *StTRI* Überexpressionspflanzen mit Tropinon wurde die Funktion der StTRI als Tropin-bildende Tropinonreduktase *in vivo* gezeigt. Blätter von *StTRI* RNAi Linien bildeten verminderte, von *StTRI* Überexpressionslinien vermehrte Tropin-Mengen.

Acetyltropin als möglicher Folgemetabolit nach Tropin wurde dabei nicht nachgewiesen.

Cucurbinsäure wurde erstmals in *S. tuberosum* identifiziert und in den Blättern quantifiziert. Obwohl die StTRI verschiedene Jasmonate bei *in vitro* Enzymassays zu Cucurbinsäure-Derivaten reduziert (Dr. N. Reinhardt, MLU Halle-Wittenberg, unveröffentlicht), konnte die Beteiligung der StTRI an der Reduktion von Jasmonsäure zu Cucurbinsäure *in vivo* nicht bestätigt werden. Das Vorhandensein von geringen Mengen an Cucurbinsäure in Kartoffelblättern lässt aber spekulieren, dass es eine andere Reduktase gibt, die möglicherweise auch nur als Nebenaktivität die Bildung von Cucurbinsäure aus Jasmonsäure katalysiert.

Durch Tropinon-Fütterungsexperimente mit Blättern von *StTRII* RNAi Linien und durch Nachweis eines reduzierten Pseudotropin-Gehalts wurde gezeigt, dass die *StTRII* für die Pseudotropinbildung *in vivo* notwendig ist. Keime der *StTRII* RNAi Linien waren gekennzeichnet durch einen stark reduzierten Calystegin-Gehalt. Die Pflanzen zeigten phänotypisch keine Veränderungen mit Ausnahme einer Linie. Weil Calystegine als Glycosidase-Inhibitoren in den Kohlenhydratstoffwechsel eingreifen könnten, ist zukünftig die Prüfung eines metabolischen Phänotyps in den Keimen und der Knolle der *StTRII* RNAi Linien sinnvoll. Die im Calystegin-Gehalt reduzierten *StTRII* RNAi Linien sind das Werkzeug für die zukünftige Untersuchung der Calysteginfunktion.

Um Hinweise auf die Funktion der Calystegine in *S. tuberosum* zu erhalten, wurde der Einfluss von Calystegin B<sub>2</sub> und Keimextrakten von *StTRII* RNAi Pflanzen mit stark reduziertem Calystegin-Gehalt auf die Sporenkeimung von *P. infestans* untersucht. Calystegin B<sub>2</sub> beeinflusste die Auskeimung der Sporen nicht. Eine Hemmung der Sporenkeimung wurde für Keimextrakte vom Kartoffel-Wildtyp und auch der *StTRII* RNAi Linien festgestellt. Andere Substanzen in den Keimen, z.B.  $\alpha$ -Solanin und  $\alpha$ -Chaconin, sind gute Kandidaten, um deren Einfluss auf die *P. infestans* Sporenkeimung zukünftig zu überprüfen.

Sequenzen für Tropinonreduktasen, Putrescin-*N*-methyltransferasen und Spermidinsynthesen aus der *S. tuberosum* Genomdatenbank (PGSC, 2011) wurden hinsichtlich Exon-Struktur, Abstammung und typischer Sequenzmotive für die jeweiligen Enzymgruppen untersucht. Die nahezu gleichen Exon-Längen der fünf TR-Sequenzen weisen auf eine Evolution durch Duplikation und Funktionswechsel hin. Alle TR-Proteine zeigten übereinstimmenden Sequenzmotive, aber teils

Variationen an der Tropinon-Bindestelle. Phylogenetisch gruppierten sich zwei der fünf Sequenzen in die Gruppe von TRI und TRII. Den PMTs und SPDSs sind für die jeweilige Enzymgruppe typische Aminosäure-Motive gemeinsam, sie clustern auch phylogenetisch in die jeweiligen Gruppen. Die Aktivität der rekombinanten TR-, PMT- und SPDS-Proteine könnte zukünftig mittels Enzymassays untersucht werden. Mit Hilfe von Promoter-Studien könnten Erkenntnisse zur Regulation der Sekundärstoffwechselgene gewonnen werden.

## F 6 Anhang

### F 6.1 Konstrukte, Primer und Sonden

#### F 6.1.1 Konstrukte und transgene Linien

Tab. F- 1: Konstrukte und transgene Linien

Konstrukt	Linie
<i>StTRI</i> RNAi	A, C, F, H, L, M, N
<i>StTRII</i> RNAi	A, O, T, V, Y
<i>StTRI</i> ÜE	G, R, J, S
<i>DsPMT</i> Ex	B, D, E, J, K

#### F 6.1.2 Primer für Konstrukte

Tab. F- 2: Primer für Konstrukte

Gen GenBank-Nr.	Konstrukt, Funktion	Primer	Primersequenz (5' → 3')	Größe [bp]
<i>StTRI</i> AJ307584	RNAi	StTRI-RNAi-5	GCTTATCATTATCTCAAATTGC	343
		StTRI-RNAi-3	caccAGCTATTACTGCTGAAGCTTC TTC	
	Über- expression	StTRI-OE-5	caccATGGCAGAATTGAGAGAAAA TGG	799
		StTRI-OE-3	TTAAAACCCACCATTTCGCTGTAAA TCC	
<i>StTRII</i> AJ292343	Ganzlängen gen zur Klonierung von <i>StTRII</i> RNAi	StTRII-5	ATGGCAGCAGGAAGATGG	786
		StTRII-3	TTAAAAGCCACCATTAGCC	
	RNAi	StTRII-RNAi-5	GCTTACCACTTATCTGTACTTGC	343
		StTRII-RNAi-3	caccTGCAACAACCTGCTGCAAGTTC	
<i>DsPMT</i> AJ583514	Expression	DsPMT-OE-5	caccATGGAAGTCTTGTCATC	1039
		DsPMT-OE-3	CTAAGACTCTATCATACTTC	

## F 6.1.3 Primer und Sonden für qRT-PCR

Tab. F- 3: Primer und Sonden für qRT-PCR

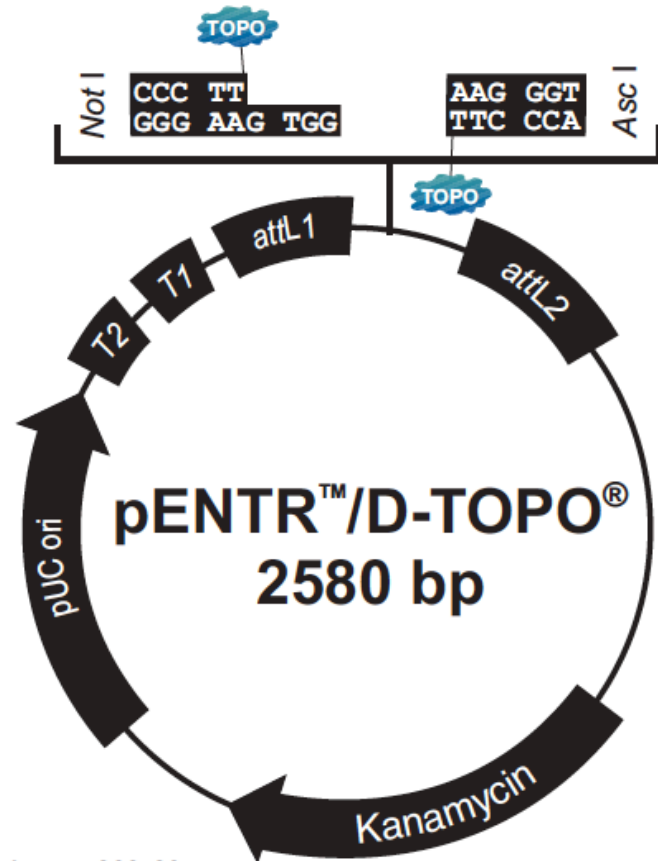
Primer: MWG Eurofins Operon, Sonden: Universal Probe Library von ROCHE,  
<https://lifescience.roche.com>

Gen	GenBank-Nr.	Primer Sonden-Nr.	Primersequenz (5'→3')	Amplicon [bp]
			Sondensequenz (5'→3')	
<i>StTRI</i>	AJ307584	TRL-RT-5 TRL-RT-3 #33	CTGAAGAAGTTTCAGCAGTAA	76
			GCCCATATAATTTGGCCTGTAA	
			TCCCAGCT	
<i>StTRII</i>	AJ292343	StTRII-Taq-F StTRII-Taq-R #45	CAAAGGGGCAATGTTGTCTT	81
			TTTGGTTGCTCCATAAACAGC	
			CTGGGGCT	
<i>StEF1α</i>	AB061263	StEF1α-F StEF1α-R #162	CACTGCCCAGGTCATCATC	67
			GTCAAGCACTGGAGCATATC	
			TCCTGGCC	
<i>Phytophthora infestans</i> spezifische DNA-Sequenz (Eschen-Lippold et al., 2007; Judelson and Tooley, 2000)		PiO8-3-3-F PiO8-3-3-R #4	CGTACGGGCAATGTAGTTCC	
			TTTGCACAGTATCACGCAAGT	
			GGTGTCCA	
<i>StNOX</i>	AB050661	StNOX-F StNOX-R #73	TCAATGCATAGGTATGAAGGAATC	70
			TCTCTTCTAGCTAGAGCATCAAA	
			T GCTGAGGA	



## F 6.2 Vektorkarten

### F 6.2.1 pENTR™/D-Topo®



#### Comments for pENTR™/D-TOPO® 2580 nucleotides

*rrnB* T2 transcription termination sequence: bases 268-295

*rrnB* T1 transcription termination sequence: bases 427-470

M13 forward (-20) priming site: bases 537-552

*attL1*: bases 569-668 (c)

TOPO® recognition site 1: bases 680-684

Overhang: bases 685-688

TOPO® recognition site 2: bases 689-693

*attL2*: bases 705-804

T7 Promoter/priming site: bases 821-840 (c)

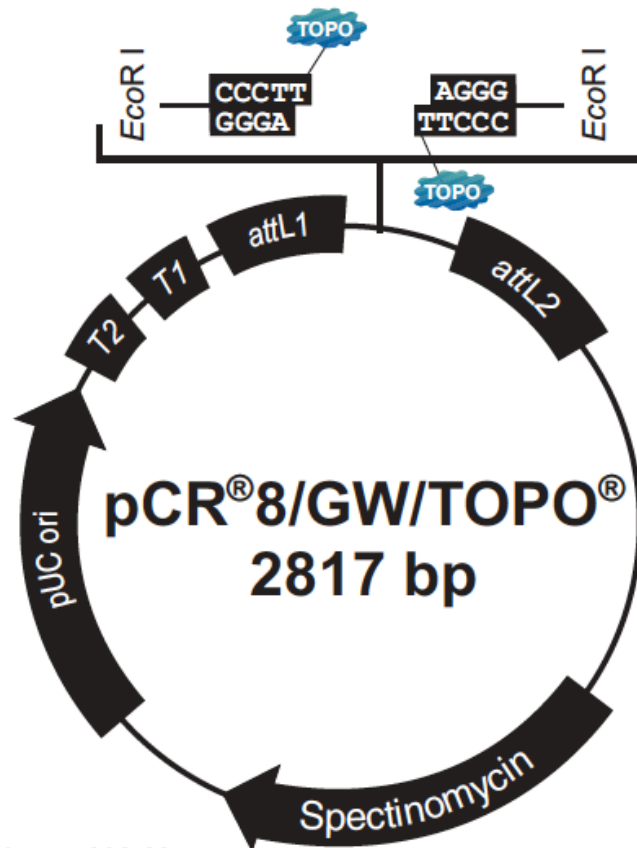
M13 reverse priming site: bases 845-861

Kanamycin resistance gene: bases 974-1783

pUC origin: bases 1904-2577

Abb. F- 1: Vektorkarte pENTR™/D-Topo® (Invitrogen)

F 6.2.2 pCR<sup>®</sup>8/GW/Topo<sup>®</sup>



**Comments for pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>**  
**2817 nucleotides**

- rrnB* T2 transcription termination sequence: bases 268-295
- rrnB* T1 transcription termination sequence: bases 427-470
- M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
- attL1*: bases 569-668
- GW1 priming site: bases 607-631
- TOPO<sup>®</sup> recognition site 1: bases 678-682
- TOPO<sup>®</sup> recognition site 2: bases 683-687
- attL2*: bases 696-795
- GW2 priming site: bases 733-757
- T7 Promoter/priming site: 812-831 (c)
- M13 reverse priming site: bases 836-852
- Spectinomycin promoter: bases 930-1063
- Spectinomycin resistance gene (*Spn<sup>R</sup>*): 1064-2074
- pUC origin: bases 2141-2814

Abb. F- 2: Vektorkarte pCR<sup>®</sup>8/GW/Topo<sup>®</sup> (Invitrogen)

## F 6.2.3 pHELLSGATE8

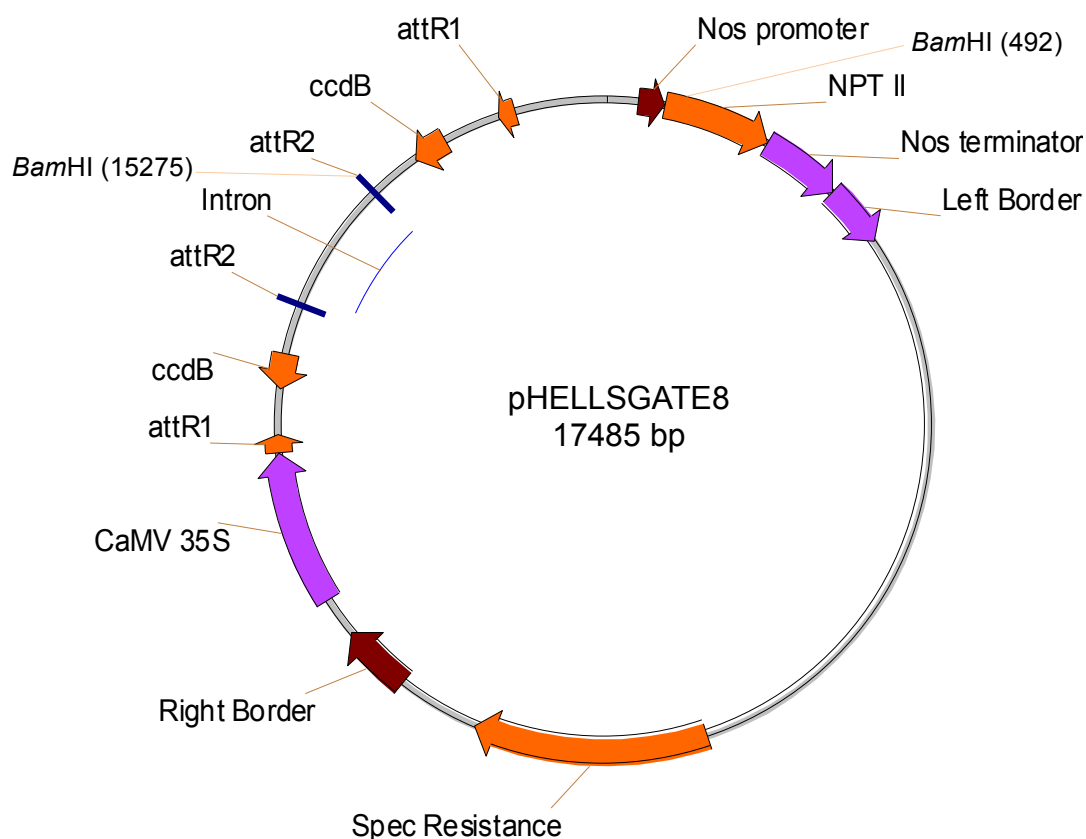


Abb. F- 3: Vektorkarte pHELLSGATE8

Zur Herstellung der Fragmente für Southern-Blot Analysen wurde der Vektor jeweils mit *Bam*HI geschnitten.

Fragmente: *StTRI* RNAi: 1701 bp  
*StTRII* RNAi: 1701 bp

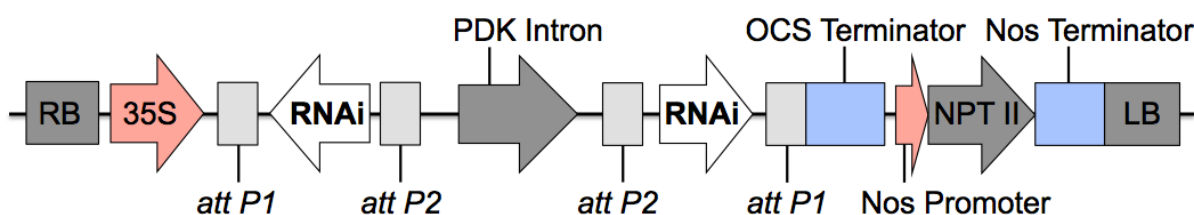


Abb. F- 4: Rekombinationskassette pHELLSGATE8

Schema nach Wesley et al., 2001; Helliwell et al., 2002: RB – right border, 35S – *Cauliflower Mosaic Virus* (Blumenkohlmosaikvirus) 35S-Promoter, *att P1/att P2* – attachment sites (Gateway®-Rekombinationsstellen), RNAi – RNAi-Konstrukte in sense und antisense Orientierung, PDK Intron – Pyruvat Dehydrogenase Kinase (Funktion: Intron), OCS Terminator – Octopin Synthase Terminator, Nos-Promoter – Nopalin Synthase Promoter, NPTII – Neomycin Phosphotransferase II (Kanamycin-Resistenzgen), Nos Terminator – Nopalin Synthase Terminator, LB – left border.

F 6.2.4 pGWB14

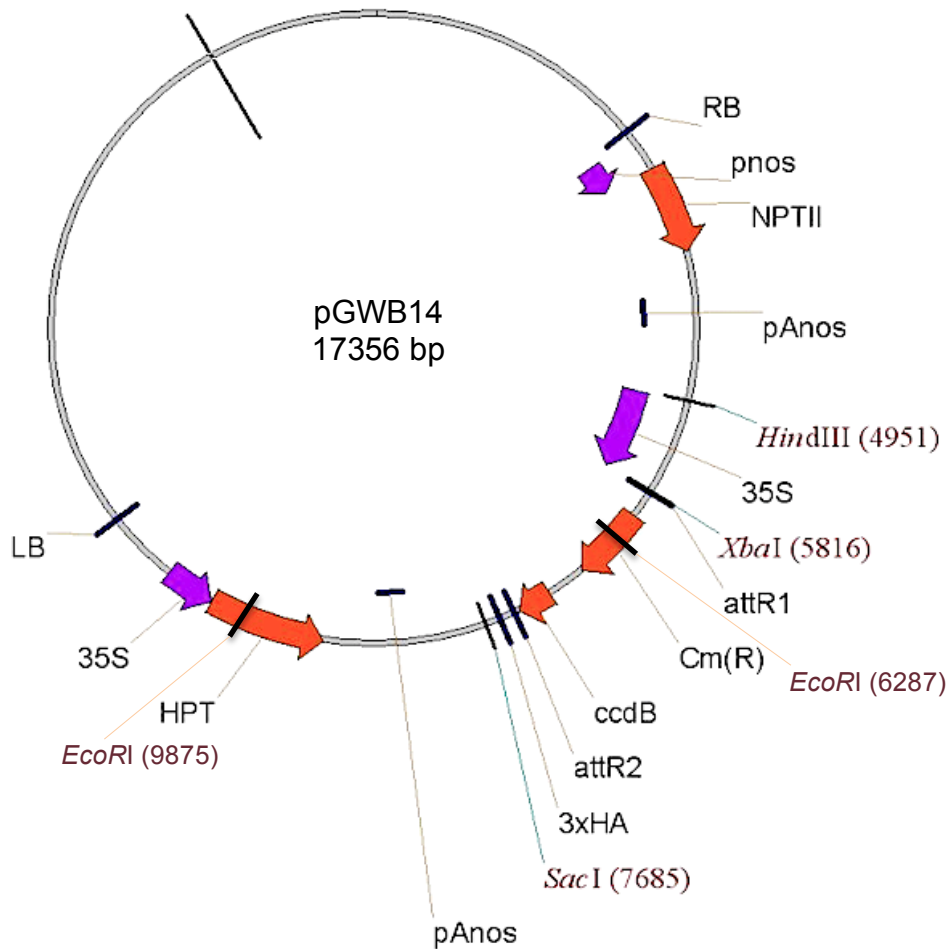


Abb. F- 5: Vektorkarte pGWB14

Zur Herstellung der Fragmente für Southern-Blot Analysen wurde der Vektor mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten.

Fragmente: *StTR1* Überexpression (*EcoRI*): 2361 bp  
*DsPMT* Expression (*SacI*, *XbaI*): 1273 bp

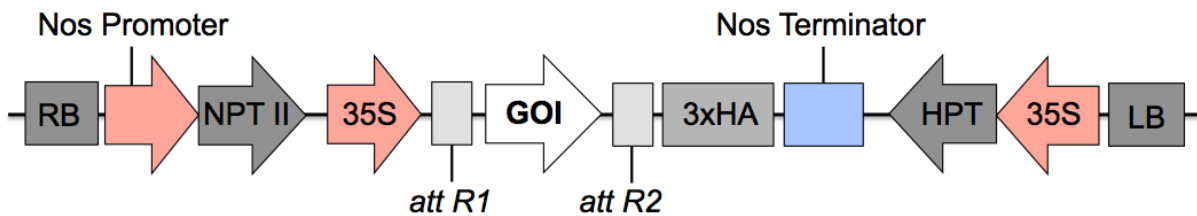


Abb. F- 6: Rekombinationskassette pGWB14

Schema nach Nakagawa et al., 2007; RB – right border, Nos Promoter – Nopalin Synthase Promoter, NPTII - Neomycin Phosphotransferase II (Kanamycin-Resistenzgen), 35S – *Cauliflower Mosaic Virus* (Blumenkohlmosaikvirus) 35S-Promoter, att R1/attR2 – attachment sites (Gateway®-Rekombinationsstellen), GOI – Gene of interest, 3xHA – Hämagglutinin-Tag, Nos-Terminator – Nopalin Synthase Terminator, HPT – Hygromycin-Phosphotransferase (Hygromycin-Resistenzgen), LB – left border.

## F 6.3 Sequenzen für RNAi-Konstrukte in pHELLSGATE8

### F 6.3.1 *StTRI*

ATGGCAGAATTGAGAGAAAAATGGAGTCTTAAAGGCACCACTGCACTTGTTACTGGTGGCTC  
 CAAAGGCATAGGGTACGCTATAGTGGAAGAATTGGCAAATTTTGGAGCAAGAGTATATACAT  
 GTTCACGTAATGAAAATGAACTTCAAGAATGCCTTGATATTTGGAGAAAAAGGGACTTAAA  
 GTCGAAGGTTCTGTTTGTGACTTATTATCTCGTACTGAACGTGAAAACTTATGAAGACTGT  
 TGAAGATGTATTTGATGGAAAGCTTAATATTCTGGTGAATAATGCAGGAGTGGCAATACATA  
 AGGAAGCTAAAGATTTACAAAAGAAGATTACAATATAATTATGGGAACTAATTTTGAAGCT  
**GCTTATCATTTATCTCAAATTGC**TTATCCTTTATTGAAGGCTTCTCAAAATGGAAATGTTAT  
 TTTTGTTCCTTCTATTGCTGGATTTTCAGCATTGCCCTCTCTTTCTCTTTACTCTGCTTCCA  
 AAGGTGCAATAAATCAAATGACAAAGAAGCTTGGCATGTGAATGGGCCAAGGACAATATTCGG  
 GTCAATTCTGTTGCTCCAGCAGTCATTTTAACCCACATCGTTGAAACTGCAATTAAGAAAA  
 TCCTCAACAAAAAGAAGAAATGATAGTTTGTGTTGAAGACTCCTTTGGGCCGGGCCGGAA  
 AGCC**GAAGAAGCTTCAGCAGTAATAGCT**TTTCTTTGCTTCCCAGCTGCTTCTTATATTACG  
 GGCCAAATTATATGGGCCGATGGTGGATTTACAGCTAATGGTGGGTTTTAA

Abb. F- 7: *StTRI*-Nukleotidsequenz (AJ307584, 795 bp, Kaiser et al., 2006)

Primer zur Amplifikation des *StTRI* RNAi Fragments (343 bp) wurden ausgehend von der *StTRI*-Nukleotidsequenz designt und sind unterstrichen. Sequenzunterschiede zur *StTR-homologen* Sequenz (AJ400815, Abb. F- 8) sind grau markiert.

Primer: *StTRI*-RNAi-5: GCTTATCATTTATCTCAAATTGC  
*StTRI*-RNAi-3: caccAGCTATTACTGCTGAAGCTTCTTC

### F 6.3.2 *StTR-homolog*

Da die *StTRI*-Sequenz (AJ307584) zur Klonierung nicht verfügbar war, wurde ein Fragment aus *StTR-homolog* (AJ400815) mit den anhand der *StTRI*-Sequenz designten Primern (Abb. F- 7) amplifiziert. Dieses wird als *StTRI* RNAi Fragment bezeichnet und ist grau markiert.

ATGGCAGAATTGAGAGAAAAATGGTGTCTTAAAGGCACCACTGCACTTGTTACTGGTGGCTC  
 CAAAGGCATAGGGTACGCTATAGTGGAAGAATTGGCAAATTTTGGAGCAAGAGTATATACAT  
 GTTCACGTAATGAAAATGAACTTCAAGAATGCCTTGATATTTGGAGAAAAAGGGACTTAAA  
 GTCGAAGGTTCTGTTTGTGACTTATTATCTCGTACTGAACGTGAAAACTTATGAAGACTAT  
 TGAAGATGTATTTGATGGAAAGCTTAATATTCTGGTGAATAATGCAGGAGTGGCAATACATA  
 AGGAAGCTAAAGATTTACAAAAGAAGATTACAATATAATTATGGGAACTAATTTTGAAGCT  
**GCTTATCATTTATCTCAAATTGC**TTATCCTTTATTGAAGGCTTCTCAAAATGGAAATGTTAT  
 TTTTGTTCCTTCTATTGCTGGATTTTCAGCATTGCCCTCTCTTTCTCTTTACTCTGCTTCCA  
 AAGGTGCAATAAATCAAATGACAAAGAAGCTTGGCATGTGAATGGGCCAAGGACAATATTCGG  
 GTCAATTCTGTTGCTCCAGCAGTCATTTTAACCCACAAAATTGAAACTGCAATTAAGAAAA  
 TCCTCAACAAAAAGAAGAAATGATAGTAATTGTTGTTAAGACTCCTTTGGGCCGGGCCGGAA  
 AGCC**GAAGAGGTTTCAGCAGTAATAGCT**TTTCTTTGCTTCCCAGCTGCTTCTTATATTACG  
 GGCCAAATCATATGGGCCGATGGTGGATTTACAGCTAATGGTGGGTTTTAA

Abb. F- 8: *StTR-homologe* Nukleotidsequenz (AJ400815, 795 bp, Keiner, 2001)

Das mit den anhand der *StTRI*-Sequenz (Abb. F- 7) designten Primern amplifizierte Fragment ist grau markiert. Sequenzunterschiede zur *StTRI*-Sequenz sind blau markiert.

F 6.3.3 *StTRII*

ATGGCAGCAGGAAGATGGAATCTTGAAGGCTGCACTGCCCTTGTTACCGGTGGTTCTAGAGG  
 CATAGGGTATGGGATAGTAGAGGAAGTAGCAAGTCTTGGTGCATCAGTTTATACATGTTTAC  
 GTAATCAAAAGGAGCTTAATGAGTGTTTAACTCAATGGAGAAGTAAAGTTTTAAAGTTGAA  
 GCTTCTGTTTGTGATTTATCATCAAGATCTGAAAGAGAGGAGTTTATCAAGAATGTTGCTAA  
 TCATTTTGATGGAAAACCAATATTTTGGTTAATAATGCTGGAATTGTCATATACAAAGAAG  
 CTAAAGATTACACTATGGAAGATTACTCTCTAATTATGAGTATCAACTTTGAGGCT**GCTTAC**  
**CACTTATCTGTACTTGC**ACACCCCTTATTGAAAGCATCACAAAGGGGCAATGTTGTCTTTAT  
 TTCTTCTATTTCTGGGGCTTCAGCATTACCATATGAAGCTGTTTATGGAGCAACCAAAGGAG  
 CAATGGATCAACTCACAAAGATGCTTAGCGTTTGAATGGGCAAAGGACAATATTCGTGTCAAT  
 GGTGTTGCACCGGGGTTATTGCATCTTCTATGGTCGAAATGACTATTCAGATCCAGAACA  
 AAAAGAAAATTTGGACAAGTTGATTGATAGATGTGCTTTACATAGAATGGGTGAGCCTAAAG  
**AACTTGCAGCAGTTGTTGCA**TTTCTCTGTTTTCTGCTGCTTCATATGTCCTGGCCAAATT  
 ATATATGTTGATGGTGGATTTATGGCTAATGGTGGCTTTTAA

Abb. F- 9: *StTRII*-Nukleotidsequenz (AJ292343, 786 bp, Keiner et al., 2002)

Primer zur Amplifikation des *StTRII* RNAi Fragments sind unterstrichen, das *StTRII* RNAi Fragment (343 bp) ist grau markiert.

Primer StTRII-RNAi-5: GCTTACCACTTATCTGTACTTGC  
StTRII-RNAi-3: caccTGCAACAACCTGCTGCAAGTTC

F 6.3.4 Nukleotid-Alignment der *StTRI* RNAi- und *StTRII* RNAi Fragmente

*StTRI*-RNAi GCTTATCATTTATCTCAAATTGCTTATCCTTTATTGAAGGCTTCTCAAATGGAAATGTT60  
*StTRII* RNAi GCTTACCACTTATCTGTACTTGCACACCCCTTATTGAAAGCATCACAAAGGGGCAATGTT60  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* :\*.\*\*\*\*\*: \* \*\* \*\*\*\*\*.\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*. \*\*.\*\*\*\*\*

*StTRI*-RNAi ATTTTGTTCCTTCTATTTGCTGGATTTTCAGCATTGCCCTCTCTTTCTCTTTACTCTGCT120  
*StTRII* RNAi GTCTTTATTTCTTCTATTTCTGGGGCTTCAGCATTACCATATGAAGCTGTTTATGGAGCA120  
 .\* \*\*.\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*. \*\*\*\*\*.\*\*\*.\*.\* : : \*\* \*\*\*\*\* :\*\*:

*StTRI*-RNAi TCCAAAGGTGCAATAAATCAAATGACAAAGAAGCTTGGCATGTGAATGGGCAAGGACAAT180  
*StTRII* RNAi ACCAAAGGAGCAATGGATCAACTCACAAAGATGCTTAGCGTTTGAATGGGCAAAGGACAAT180  
 :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\* \*\*\*\*\*.:\*\*\*.\*\*\*.\* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

*StTRI*-RNAi ATTCGGTCAATTCGTGTTGCTCCAGCAGTCATTTAACCCACAAATTGAACTGCAATT240  
*StTRII* RNAi ATTCGTGTCAATGGTGTGTCACCGGGGTTATTGCATCTTCTATGGTCGAAATGACTATT240  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*. \* .\*\* \*\* \* : \* \* : : . . \* \*\*\*\*\* .\*:\*\*\*

*StTRI*-RNAi AAGAAAAATCCTCAACAAAAGAAGAAATTGATAGTATTGTTGTTAAGACTCCTTTGGGC300  
*StTRII* RNAi CA---AGATCCAGAACAAAAGAATAATTGGACAAGTTGATTGATAGATGTGCTTTACAT297  
 .\* \*.\*.\*\*\*\*\*: \*\*\*\*\*.\*\*\*: \* \*\* \* . : \* .\*\*\*:\*\*\*. : \* \*\*\*\*\*. .

*StTRI*-RNAi CGGGCCGAAAGCCCGAAGAGGTTTCAGCAGTAATAGCT339  
*StTRII* RNAi AGAATGGGTGAGCCTAAAGAAGTTGCAGCAGTTGTTGCA336  
 .\*.. \*\*:.\*.\*\*\*.\*\*\*. \*\* \*\*\*\*\*:.\*:\*\*\*:

Abb. F- 10: Nukleotid-Alignment der *StTRI* RNAi- und *StTRII* RNAi Fragmente

68 % Sequenz-Übereinstimmung. 14 identische, hintereinander stehende Nukleotide sind rot markiert.

- \* - identische Nukleotide
- : - stark konservierte Nukleotide
- . - schwach konservierte Nukleotide

## F 6.4 Sequenzen für (Über)expressions-Konstrukte in pGWB14

### F 6.4.1 *DsPMT*

Zur Expression der *PMT* in *S. tuberosum* wurde die Sequenz der *Datura stramonium PMT* (AJ583514) verwendet. *DsPMT* und *StPMT* (AJ605553) zeigen eine Übereinstimmung von 91 % auf Nukleotidebene.

**ATGGAAGTCTTGTCATC**TACCCACACAAATGGCTCTTCCCTCCTTAAAAATGGTGTTCATCAC  
 CATGAACGGCCACCACAAATGGCAATTCGGATCACCGGAACGGCGGCACCACTGTTTCATGAAA  
 ATGGCAGAAAGTTATTGGGGAACCTCAACTCTATTAAGCCTGGTTGGTTTTTCAGAGTTTAGC  
 GCCTTATGGCCAGGTGAAGCATTCTCACTGAAAATTGAGAAGTTGCTATTTTCAGGGAAAGTC  
 TGATTACCAAGATGTCATGCTCTTTGAGTCAGCAACTTATGGAAAGGTTCTGACATTGGATG  
 GAGCAATTC AACACACAGAGAATGGTGGATTTCCATATACTGAAATGATTGTTTCATCTCCCA  
 CTTGGTTCCATCCCTAATCCAAAAAAGGTTTTGATAATTGGTGGAGGAATTGGTTTTACATT  
 ATTCGAAGTGCTTCGTTATCCTACCGTTGAGAAAATAGACATAGTTGAGATTGATGACGTGG  
 TGGTTGATGTATCAAGAAAATTTTTCCCCTACCTTGCGGCTAACTTTAATGATCCTCGTGTA  
 ACTTTGGTTCTCGGTGATGGAGCTGCATTTGTAAAGGCTGCACAAGCAGGGTATTATGACGC  
 TATTATAGTGGACTCTTCTGATCCTATTGGTCCAGCAAAAGATTTGTTTGAGAGGCCATTTT  
 TTGAGGCAGTAGCCAAAGCACTTAGACCAGGAGGCGTTGTGTGCACACAGGCTGAAAGCATT  
 TGGCTTCATATGCATATTATCAAACAAATTATTGCCAATTGTCGTCAAGTCTTTAAGGGTTC  
 TGTCAACTATGCTTGGACTACTGTTCCCTACTTATCCAACCTGGTGTAAATTGGTTACATGCTGT  
 GCTCTACTGAGGGACCAGAAGTTGACTTCAAGAATCCAGTGAATCCAATTGACAAAGATGAA  
 ACTCATGCCAACTCCAAATTAGGACCTTTGAAGTTCTACAACACCGATATTCACAAAGCAGC  
 TTTCATTTTGCCATCTTTTGCCA**GAAGTATGATAGAGTCTTAG**

Abb. F- 11: *DsPMT*-Nukleotidsequenz (AJ583514, 1035 bp, Teuber et al., 2007)

Primer zur Amplifikation der full-length *DsPMT*-Sequenz sind unterstrichen.

Primer DsPMT-OE-5: caccATGGAAGTCTTGTCATC  
DsPMT-OE-3: CTAAGACTCTATCATACTTC

### F 6.4.2 *StTRI*, amplifiziert aus Knollen-cDNA

Zur Überexpression der *StTRI* in *S. tuberosum* wurde folgende *TRI*-Sequenz verwendet, die aus Knollen-cDNA von *S. tuberosum* var. Désirée amplifiziert wurde. Sie unterscheidet sich in zwei Nukleotiden und einer Aminosäure (Position 232: hier Valin anstelle von Alanin) von der *StTRI*-Sequenz (Abb. F- 7, Keiner, 2001) und wird im Folgenden als *StTRI* bezeichnet. Sequenzunterschiede sind rot markiert. Das *StTRI*-Protein mit der Aminosäure Valin 232 ist *in vitro* in der Lage, Tropinon zu Tropin zu reduzieren (Dr. N. Reinhardt, MLU Halle-Wittenberg, unveröffentlichte Ergebnisse).

**ATGGCAGAATTGAGAGAAAATGG**AGTCTTAAAGGCACCACTGCACTTGTTACTGGTGGCTC  
 CAAAGGCATAGGGTACGCTATAGTGGAAGAATTGGCAAATTTTGGAGCAAGAGTATATACAT  
 GTTCACGTAATGAAAATGAACTTCAAGAATGCCTTGATATTTGGAGAAAAAAGGGACTTAAA  
 GTCGAAGGTTCTGTTTGTGACTTATTATCTCGTACTGAACGTGAAAACTTATGAAGACTGT  
 TGAAGATGTATTTGATGGAAAGCTTAATATTCTGGTGAATAATGCAGGAGTGGCAATACATA  
 AGGAAGCTAAAGATTTACAAAAGAAGATTACAATATAATTATGGGAACTAATTTTGAAGCT  
 GCTTATCATTTATCTCAAATTGCTTATCCTTTATTGAAGGCTTCTCAAATGGAAATGTTAT





und *Xba*I. Der Pfeil markiert die erwartete Bande bei 1273 bp, erkennbar in den Linien: L, M, N, P, R, V, Z, CC, GG, KK, OO. Ma- $\lambda$ -*Pst*I-Marker, WT-Wildtyp, EV-Leervektor.

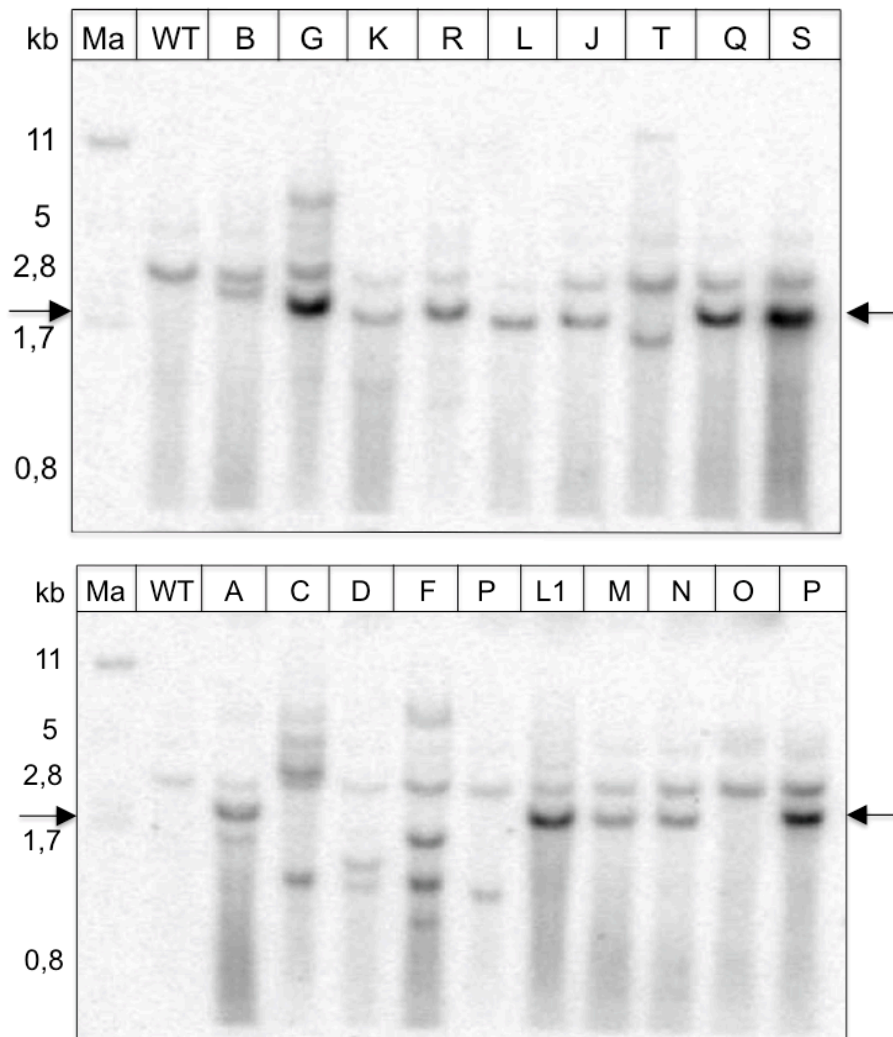


Abb. F- 15: Southern-Blots *StTR1* ÜE

Verwendetes Restriktionsenzym zum Verdau der genomischen DNA aus Blättern und zum Verdau des Vektors pGWB14 für die Herstellung der  $\alpha$ - $^{32}$ P-dATP-markierten Sonde: *Eco*RI. Der Pfeil markiert die erwartete Bande bei 2361 bp, erkennbar in den Linien: G, K, R, L, J, Q, S, A, L1, M, N, O, P. Ma- $\lambda$ -*Pst*I-Marker, WT-Wildtyp, EV-Leervektor.

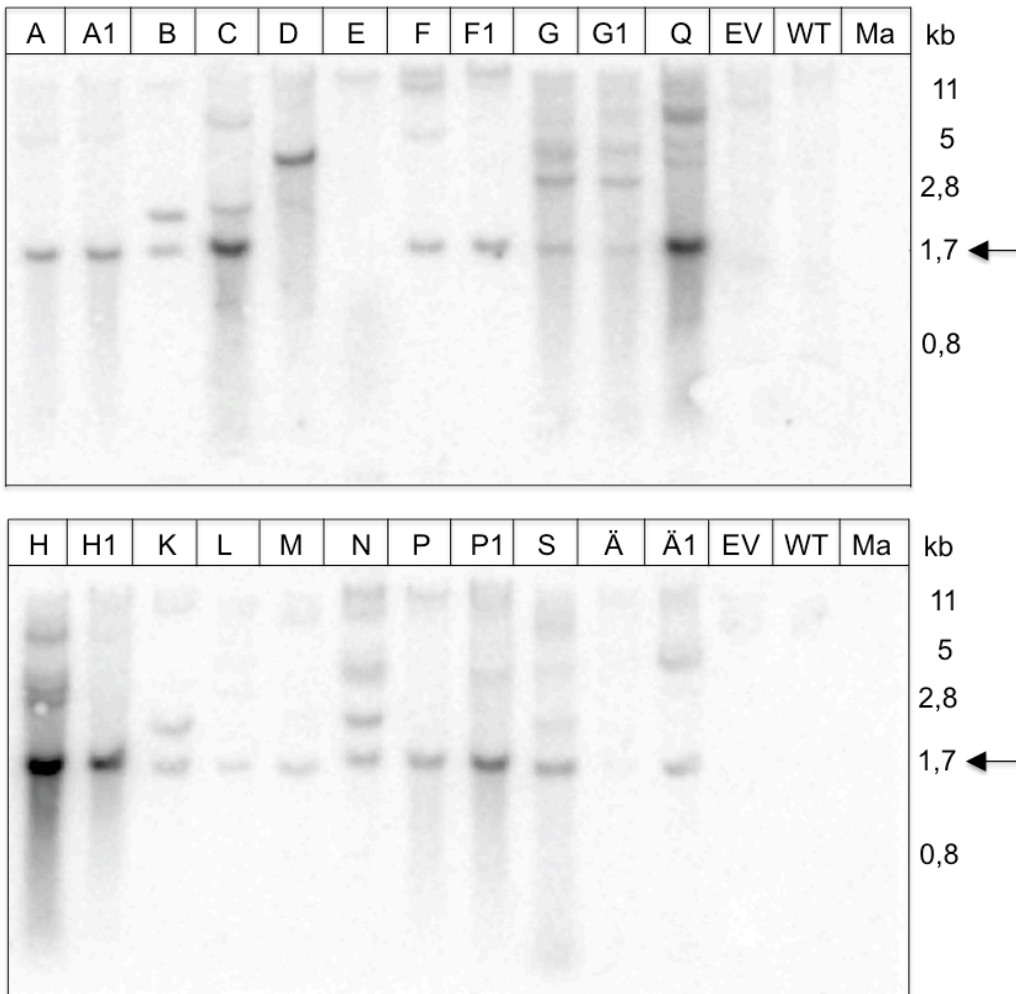
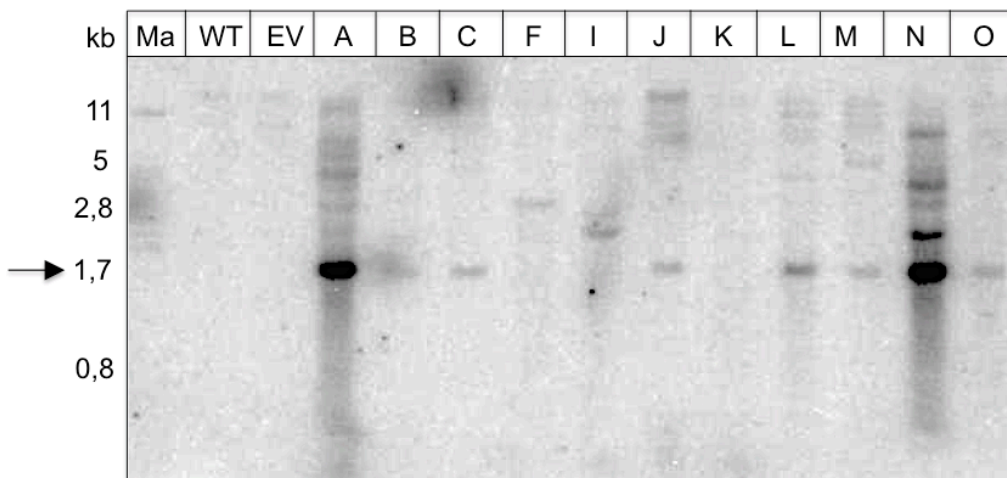
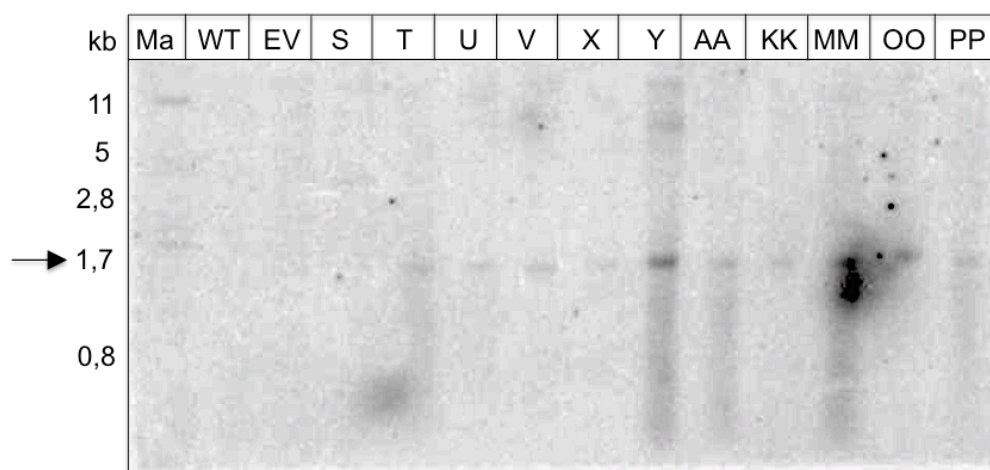


Abb. F- 16: Southern-Blots *StTR1* RNAi

Verwendetes Restriktionsenzym zum Verdau der genomischen DNA aus Blättern und zum Verdau des Vektors pHELLSGATE8 für die Herstellung der  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP-markierten Sonde: *Bam*HI. Der Pfeil markiert die erwartete Bande bei 1701 bp, erkennbar in den Linien: A, A1, B, C, F, F1, G, G1, Q, H, H1, K, L, M, N, P, P1, S, Ä1. Ma- $\lambda$ -*Pst*I-Marker, WT-Wildtyp, EV-Leervektor.



Abb. F- 17: Southern-Blots *StTRII* RNAi

Verwendetes Restriktionsenzym zum Verdau der genomischen DNA aus Blättern und zum Verdau des Vektors pHELLSGATE8 für die Herstellung der  $\alpha$ - $^{32}$ P-dATP-markierten Sonde: *Bam*HI. Der Pfeil markiert die erwartete Bande bei 1701 bp, erkennbar in den Linien: A, B, C, J, L, M, N, O, T, U, V, X, Y, AA, KK, MM, OO, PP. Ma- $\lambda$ -*Pst*I-Marker, WT-Wildtyp, EV-Leervektor.

## F 6.6 Sequenzvergleiche und Phylogenetische Analysen

### F 6.6.1 Nukleotidvergleich von *TR*-, *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen

Tab. F- 4: Nukleotidvergleich *TR*s, *PMT*s, *SPDS*s aus *S. tuberosum*

Nukleotidvergleich der *TR*-, *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen aus der Datenbank des Potato Genome Sequencing Consortiums (PGSC, 2011, *TR1* - PGSC0003DMG400028221, *TR1* - PGSC0003DMG402008895, *TR* - PGSC0003DMG400019196, *TRh* - PGSC0003DMG400020618, *TRII* - PGSC0003DMG400005974, *PMT1* - PGSC0003DMG400037026, *PMT2* - PGSC0003DMG400036131, *SPDS1* - PGSC0003DMG400004111, *SPDS2* - PGSC0003DMG400024232) mit den *TR*-, *PMT*- und *SPDS*-Sequenzen: (**A**: Keiner, 2001, *TR1* - AJ307584, *TRh* - AJ400815, *TRII* - AJ292343) und **B**: Stenzel et al., 2006, *PMT* - AJ605553, *SPDS* - AJ345003). Nukleotid-Übereinstimmungen >90 % sind rot markiert.

A		PGSC, 2011					Keiner, 2001		
		<i>TR1</i>	<i>TR1</i>	<i>TR</i>	<i>TRh</i>	<i>TRII</i>	<i>TR1</i>	<i>TRh</i>	<i>TRII</i>
Keiner, 2001	<i>TR1</i>	69,8	98,5	66,2	66,2	74,3	/	/	/
	<i>TRh</i>	70,8	98,8	67,8	66,0	73,3	98,6	/	/
	<i>TRII</i>	72,0	73,5	67,4	70,5	98,4	74,2	71,8	/
PGSC, 2011	<i>TR1</i>	/	/	/	/	/			
	<i>TR1</i>	68,0	/	/	/	/			
	<i>TR</i>	63,0	61,6	/	/	/			
	<i>TRh</i>	68,3	63,1	62,1	/	/			
	<i>TRII</i>	70,2	72,1	61,3	65,8	/			

B		PGSC, 2011				Stenzel et al., 2006	
		PMT1	PMT2	SPDS1	SPDS2	PMT	SPDS
Stenzel et al., 2006	PMT	79,6	93,3	71,1	69,2	/	/
	SPDS	69,6	69,0	87,3	99,2	69,1	/
PGSC, 2011	PMT1	/	/	/	/		
	PMT2	76,1	/	/	/		
	SPDS1	70,8	69,5	/	/		
	SPDS2	69,4	68,4	87,3	/		

### F 6.6.2 Proteinsequenzen zur Erstellung phylogenetischer Bäume

Tab. F- 5: Accession-Nummern (UniProtKB) der Proteinsequenzen zur Erstellung phylogenetischer Bäume mit MEGA6.06 (Tamura et al., 2013)

Bezeichnung	Organismus	Accession-Nummer (UniProtKB)
At2g20150	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ZW03
At2g29260		Q9ZW12
At2g29350		Q9ZW18
At2g29360		Q9ZW19
At5g06060		Q9LHT0
AtSPDS1		Q9ZUB3.1
CoTR		<i>Cochlearia officinalis</i>
CoSPDS	CAO02391	
DsTRI	<i>Datura stramonium</i>	P50162
DsTRII		P50163
DsSPDS1		Q96556.1
HnTRI	<i>Hyoscyamus niger</i>	Q96457
HnTRII		P50164
HnSPDS1		O48658.1
HsSPDS	<i>Homo sapiens</i>	P19623.1
SdTRII	<i>Solanum dulcamara</i>	B1VK30
NtPMT1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q42963.1
StTRI	<i>Solanum tuberosum</i>	Q9AR59
StTRII		Q6KF77
StTR (homolog)		Q9M3N1

## F 6.7 Chromatogramme und Massenspektren

### F 6.7.1 GC-MS Chromatogramme und Massenspektren Tropinon und Derivate

Die Massenspektren für Tropinon, Tropin, Pseudotropin und Acetyltropin entsprechen denen der Literaturangaben (Ott et al., 2007; Zayed and Wink, 2004, <http://webbook.nist.gov/chemistry>). Azobenzol diente als interner Gerätestandard.

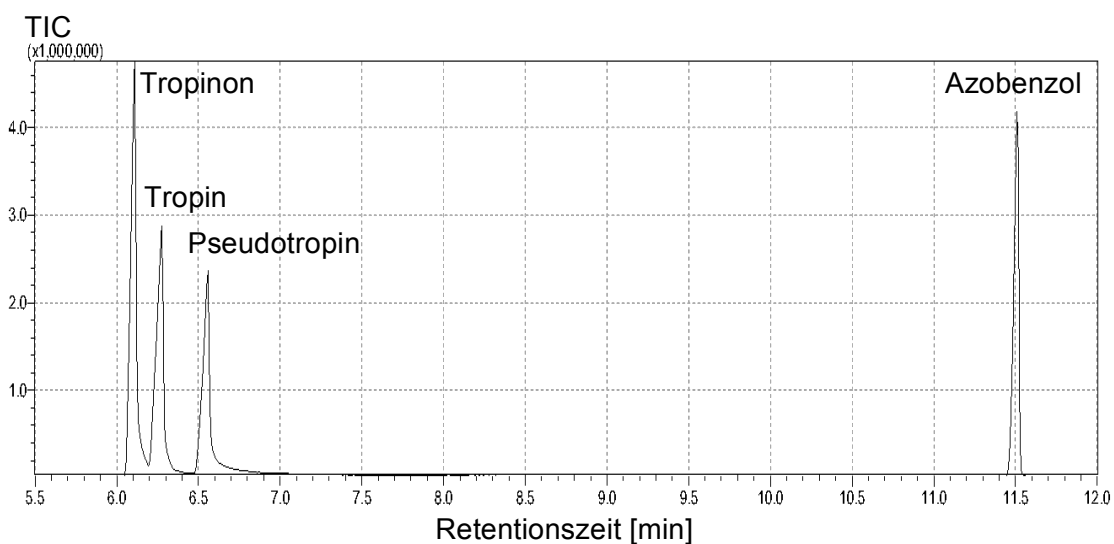


Abb. F- 18: GC-MS Chromatogramm Tropinon-, Tropin- und Pseudotropin-Standard

Retentionszeiten: Tropinon = 6,09 min, Tropin = 6,25 min, Pseudotropin = 6,57 min, Azobenzol = 11,50 min.

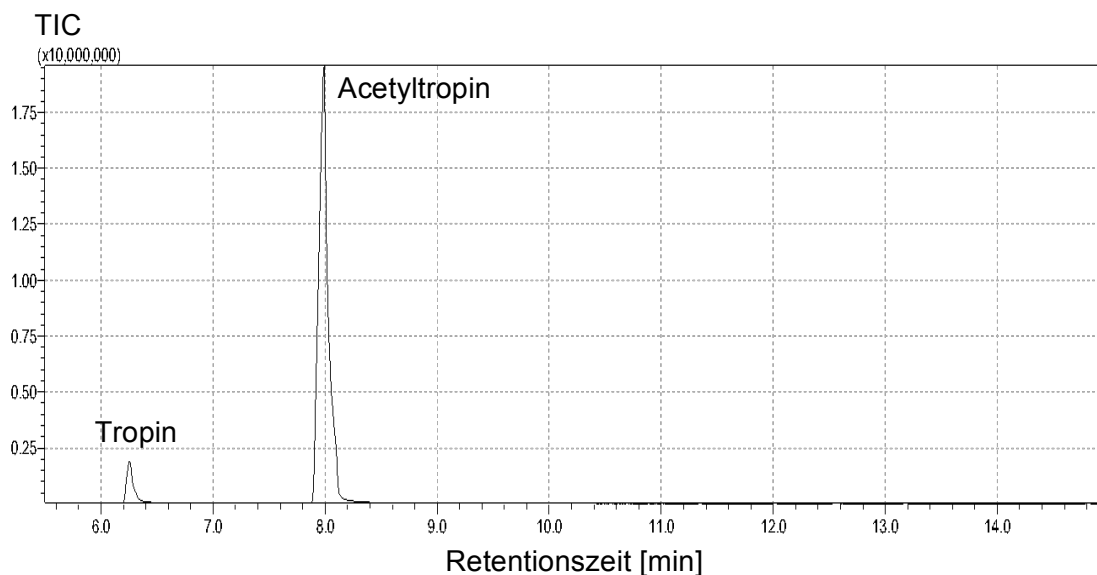


Abb. F- 19: GC-MS Chromatogramm Acetyltropin-Standard

Retentionzeit: Acetyltropin = 8,00 min.

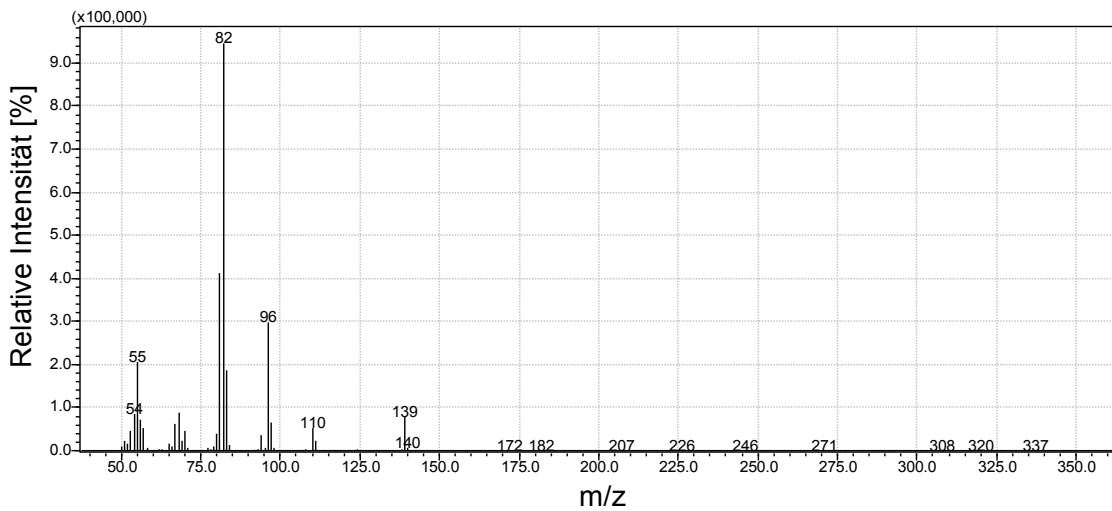


Abb. F- 20: Massenspektrum Tropinon

Charakteristische Massenfragmente: 82, 96, 55, 139, 110.

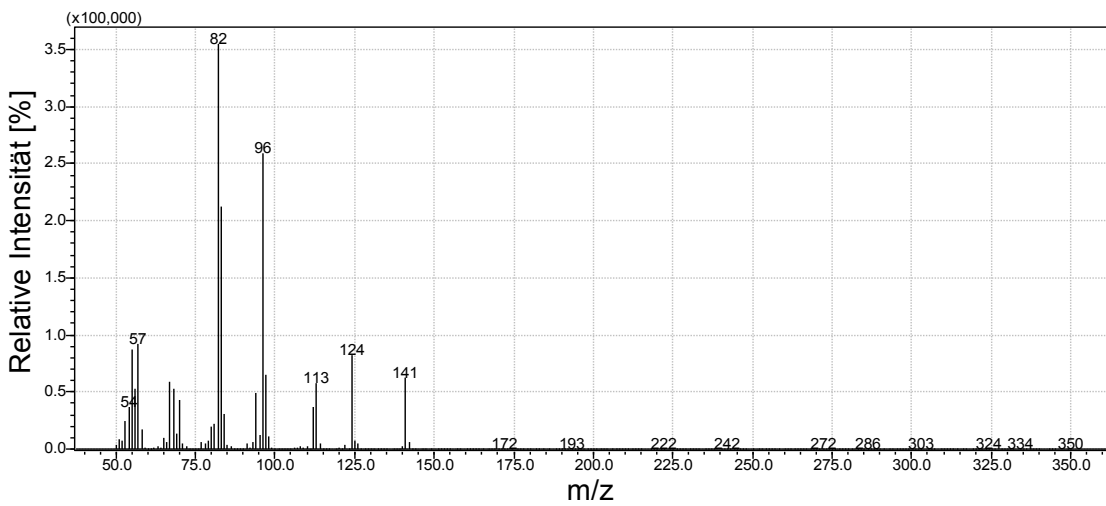


Abb. F- 21: Massenspektrum Tropin

Charakteristische Massenfragmente: 82, 96, 57, 124, 141, 113.

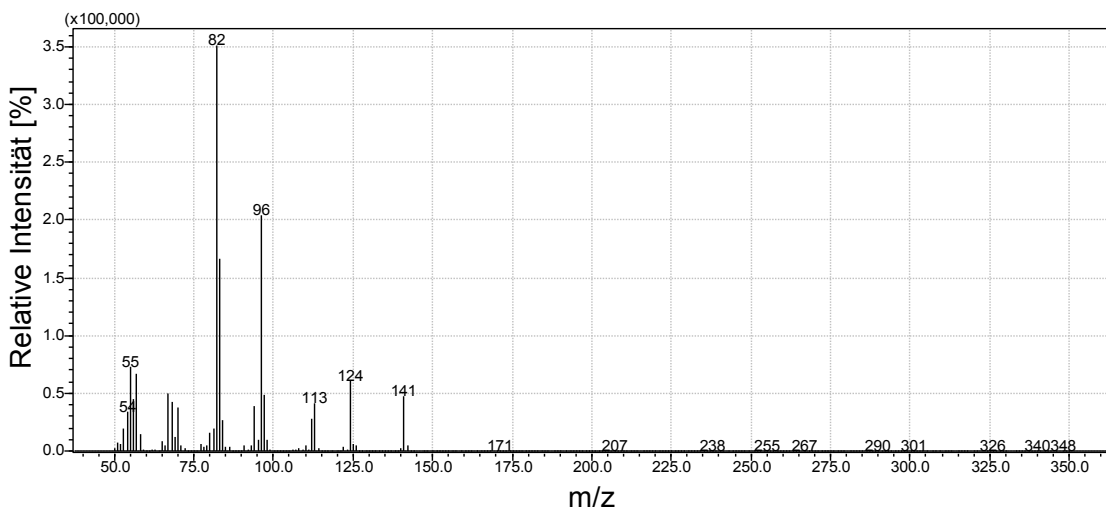


Abb. F- 22: Massenspektrum Pseudotropin

Charakteristische Massenfragmente: 82, 96, 57, 124, 141, 113.

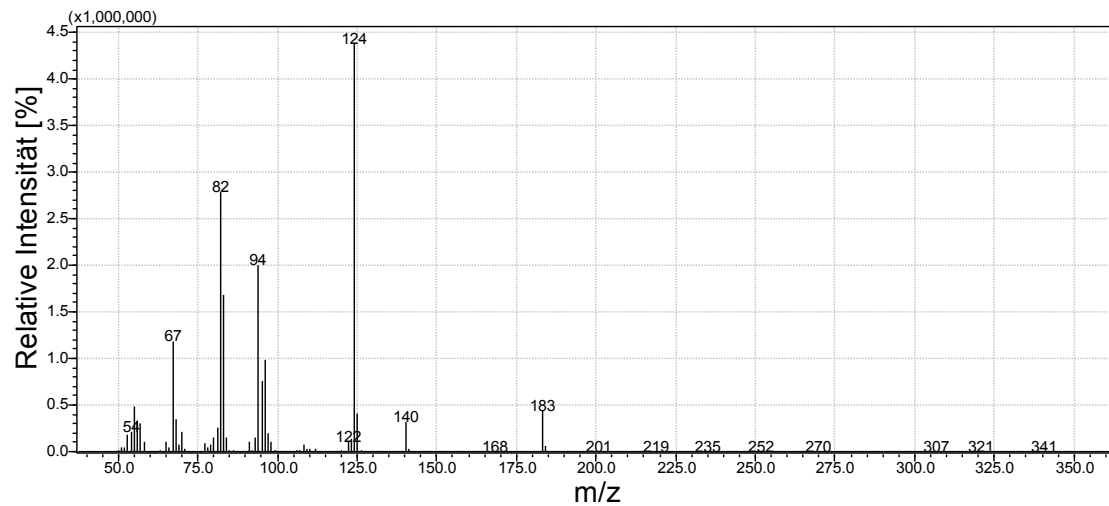
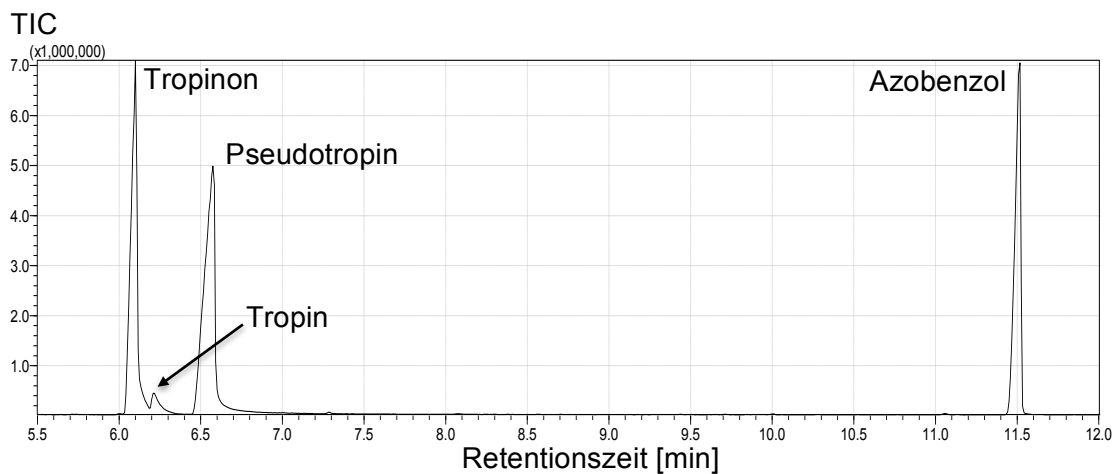
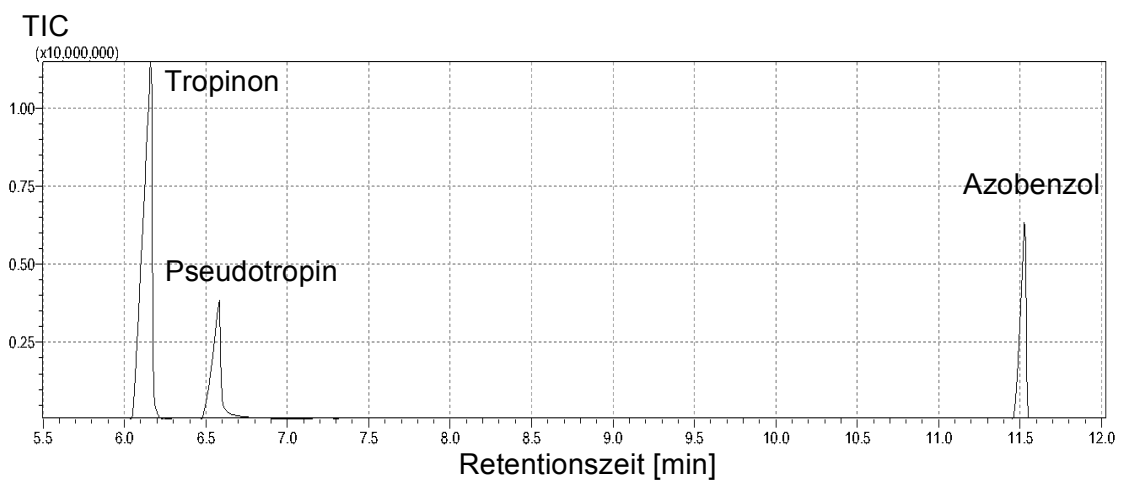


Abb. F- 23: Massenspektrum Acetyltropin

Charakteristische Massenfragmente: 124, 82, 94, 67, 183, 140.

Abb. F- 24: GC-MS Chromatogramm Blätter *S. tuberosum* Wildtyp

Tropinon-Fütterung für acht Tage.

Abb. F- 25: GC-MS Chromatogramm Blätter *StTRI* RNAi Linie M

Tropinon-Fütterung für acht Tage.

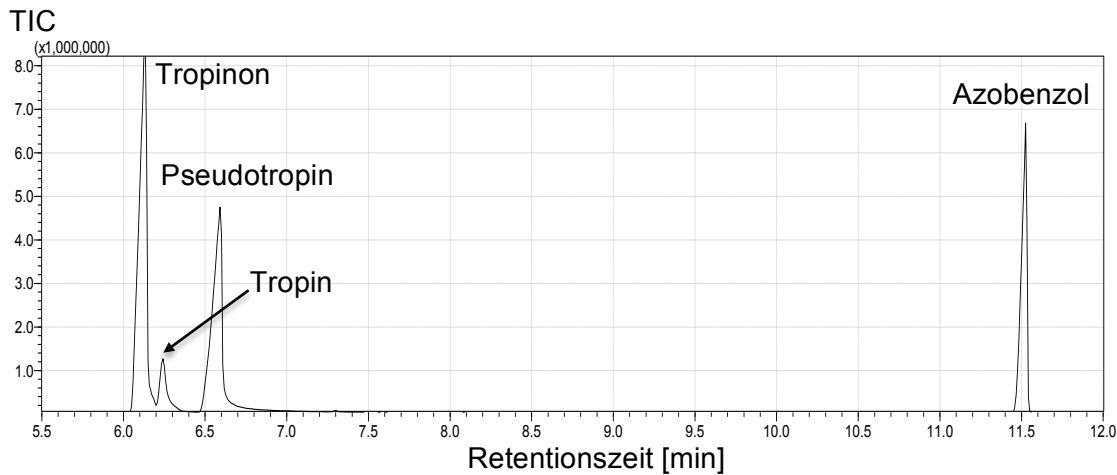


Abb. F- 26: GC-MS Chromatogramm Blätter *StTRI* Überexpressionslinie R  
Tropinon-Fütterung für acht Tage.

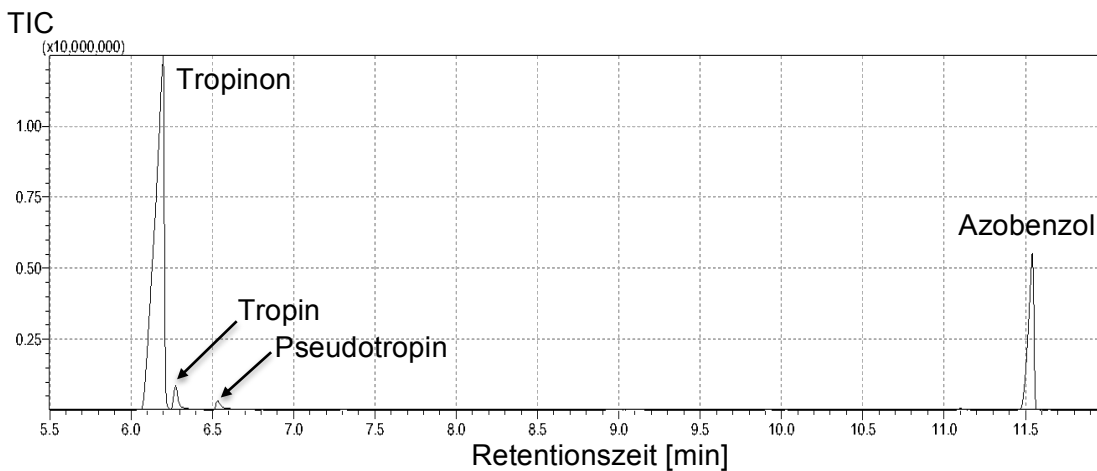


Abb. F- 27: GC-MS Chromatogramm Blätter *StTRII* RNAi Linie O  
Tropinon-Fütterung für acht Tage.

### F 6.7.2 GC-MS Chromatogramme und Massenspektren TMS-Calystegine

Anhand der Massenspektren silylierter Calystegin-Standardsubstanzen für Calystegin B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> und B<sub>4</sub> (TMS-Derivate) wurden die Calystegine in den Keimen von *S. tuberosum* identifiziert und zugeordnet. Die Massenspektren der TMS-Calystegine entsprechen den Literaturangaben (Dräger, 1995; Griffiths et al., 2008; Schimming et al., 1998; Scholl et al., 2001). Azobenzol diente als interner Gerätestandard. Die Calysteginkonzentration der Proben wurde anhand von Kalibriergeraden mit der Standardsubstanz Castanospermin (silyliert, TMS-Derivat) berechnet.



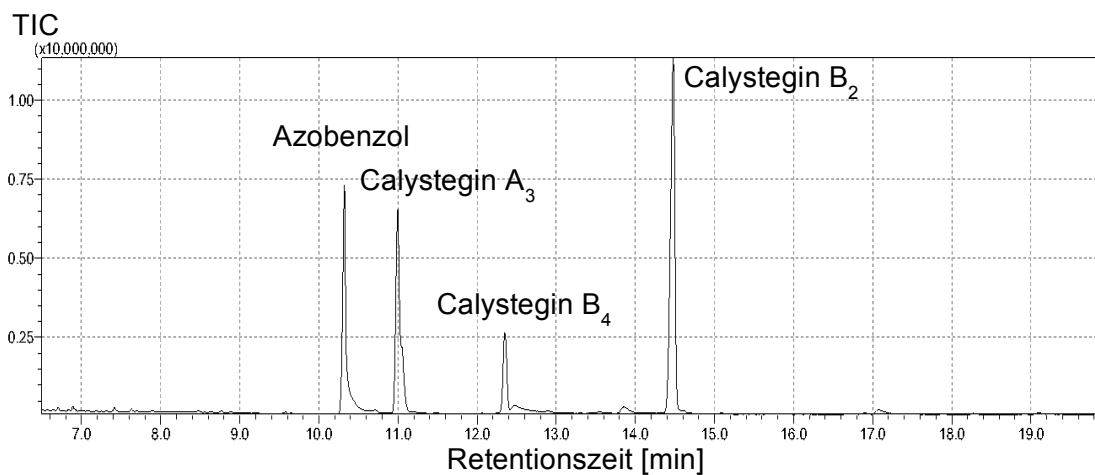


Abb. F- 28: GC-MS Chromatogramm für TMS-Calystegine A<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> und B<sub>2</sub>

Retentionszeiten: Azobenzol = 10,35 min, Calystegin A<sub>3</sub> = 11,05 min, Calystegin B<sub>4</sub> = 12,35 min, Calystegin B<sub>2</sub> = 14,48 min.

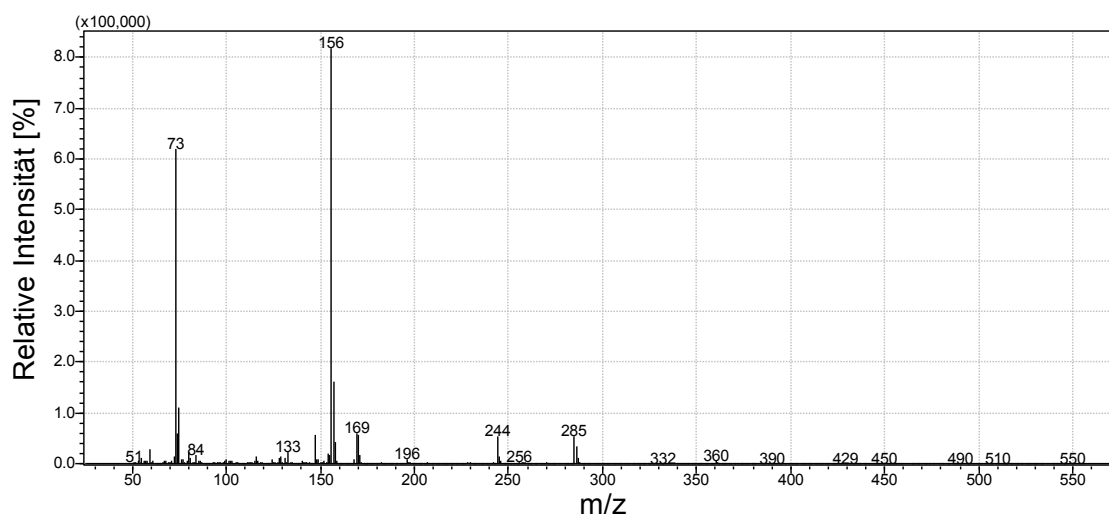


Abb. F- 29: Massenspektrum TMS-Calystegin A<sub>3</sub>

Charakteristische Massenfragmente: 156, 73, 244, 285.

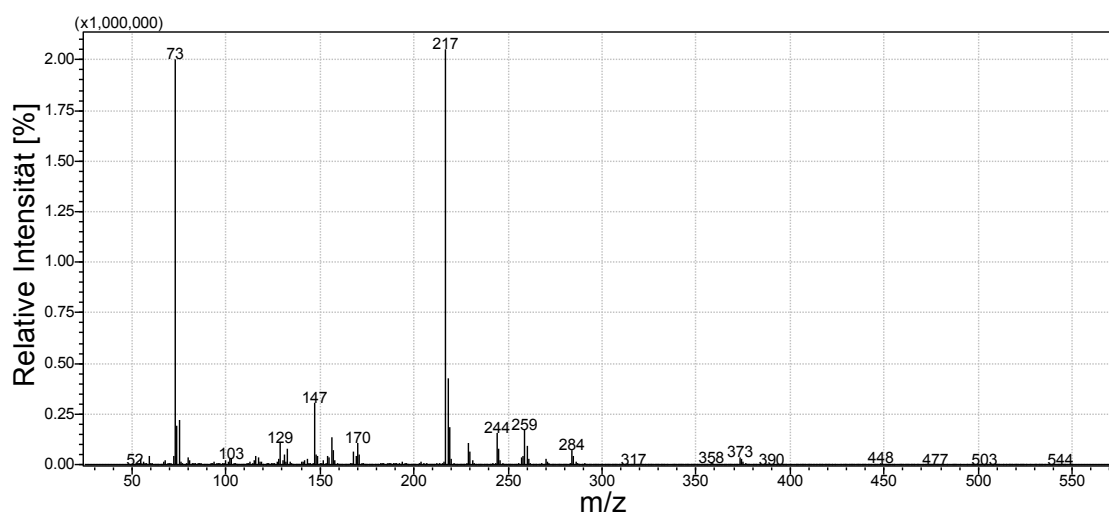


Abb. F- 30: Massenspektrum TMS-Calystegin B<sub>4</sub>

Charakteristische Massenfragmente: 217, 73, 147, 244.

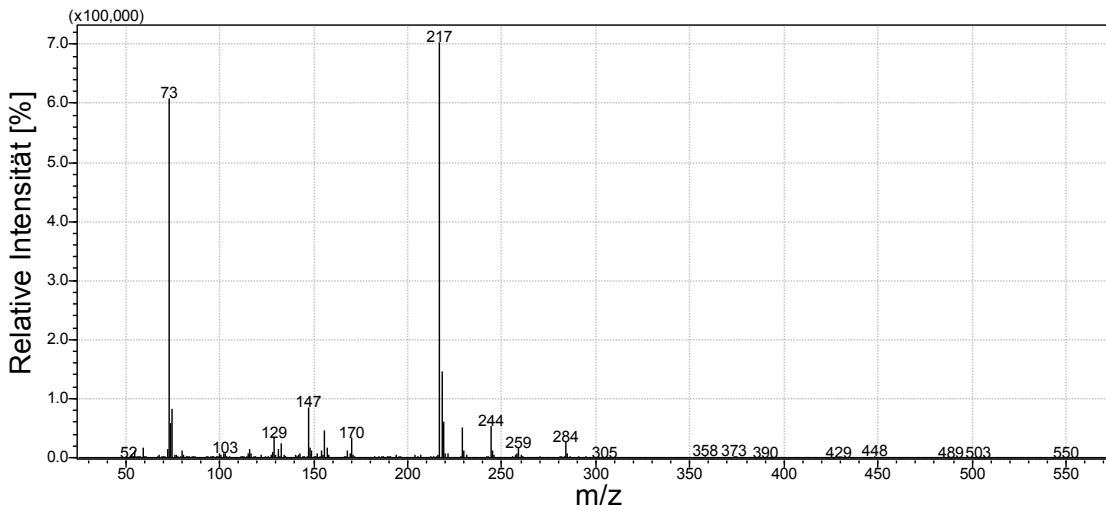


Abb. F- 31: Massenspektrum TMS-Calystegin B<sub>2</sub>  
 Charakteristische Massenfragmente: 217, 73, 147, 244.

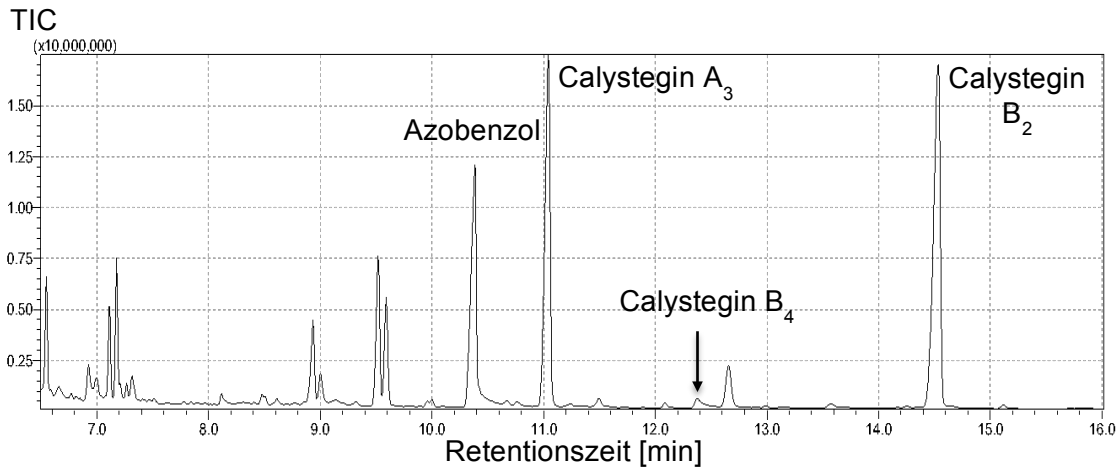


Abb. F- 32: GC-MS Chromatogramm TMS-Calystegine *S. tuberosum* Wildtyp

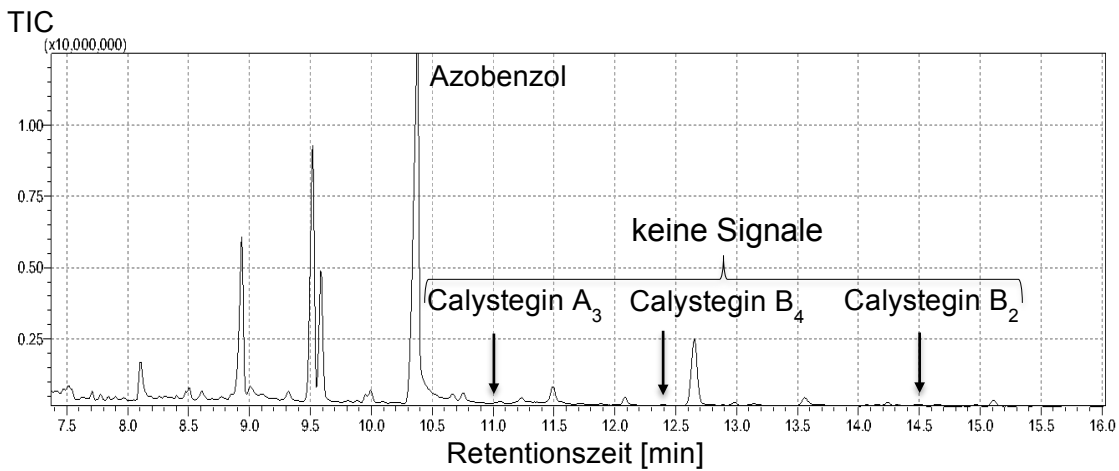


Abb. F- 33: GC-MS Chromatogramm TMS-Calystegine *StTRII* RNAi Linie O

## F 6.7.3 HPLC Chromatogramme Polyamine

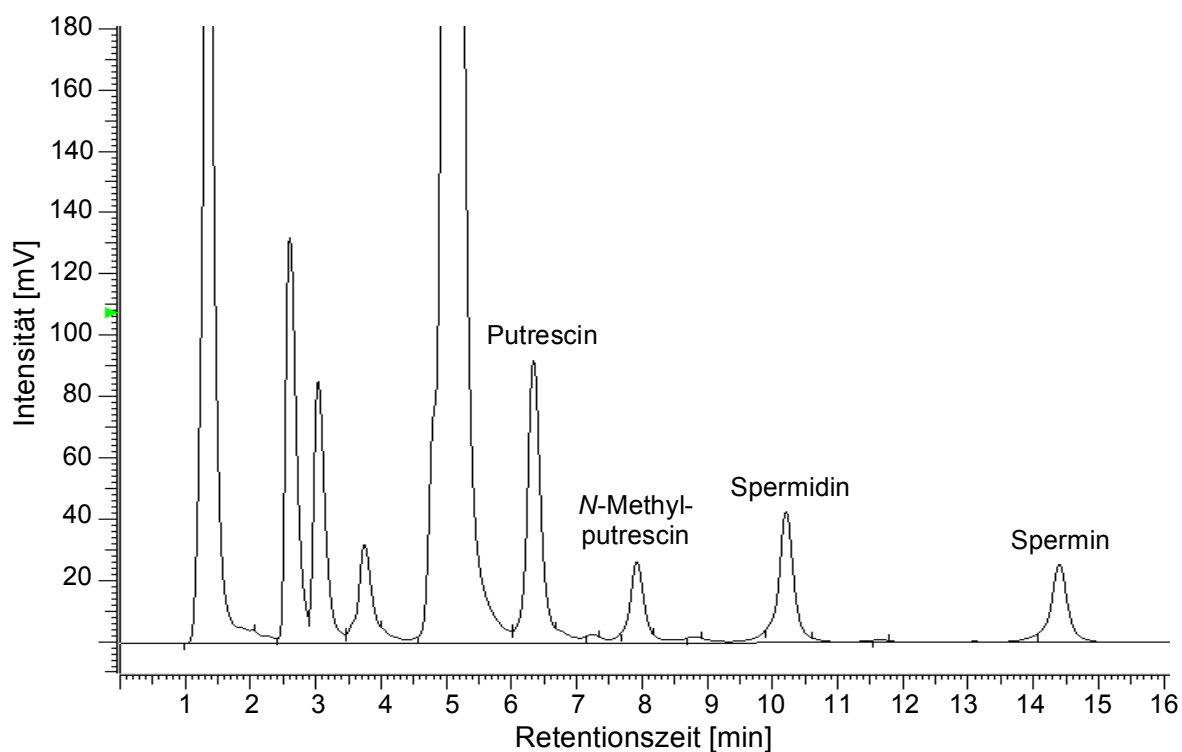
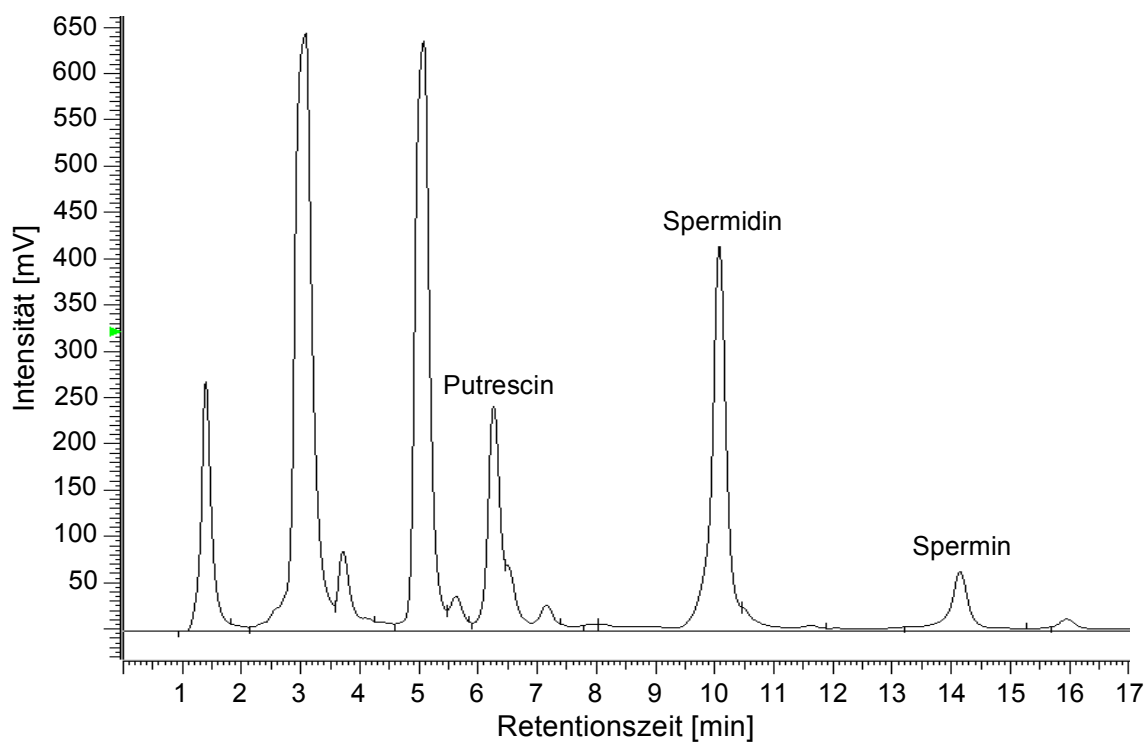


Abb. F- 34: HPLC Chromatogramm dansylierte Polyamin-Standards

Retentionszeiten: Putrescin = 6,35 min, N-Methylputrescin = 7,93 min, Spermidin = 10,21 min, Spermin = 14,40 min.

Abb. F- 35: HPLC Chromatogramm Blätter *S. tuberosum* Wildtyp

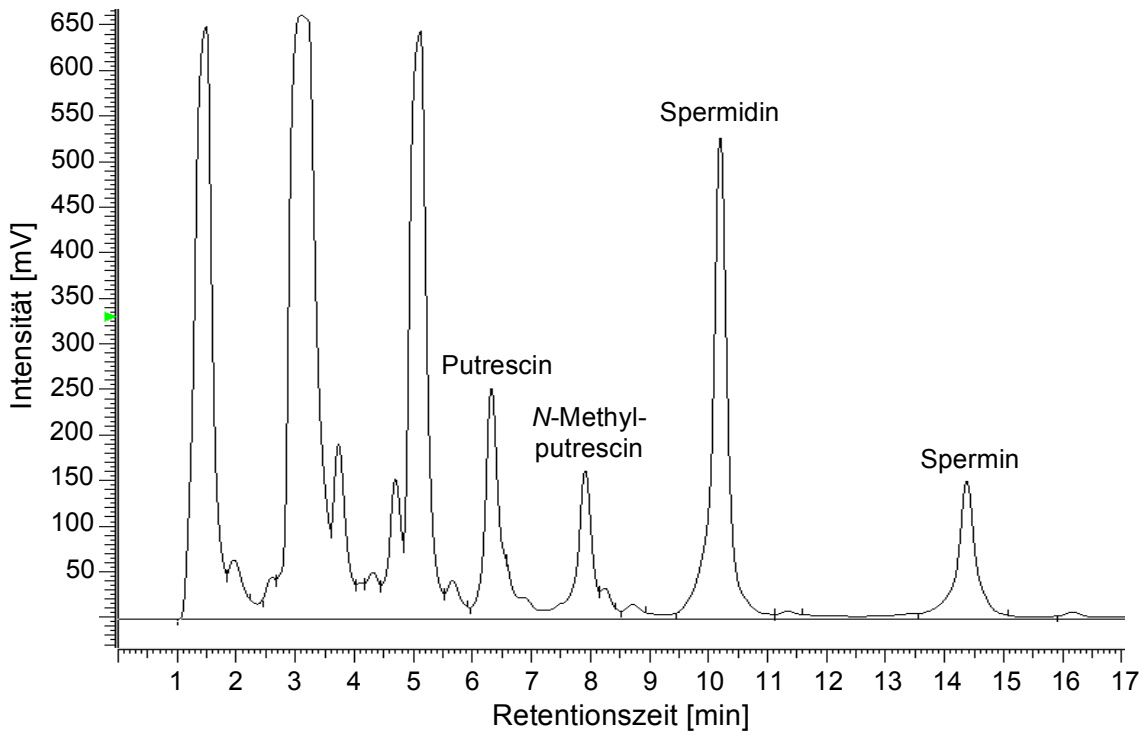


Abb. F- 36: HPLC-Chromatogramm Blätter *DsPMT* exprimierende Linie K

F 6.7.4 UPLC-MS/MS Chromatogramme Cucurbinsäure

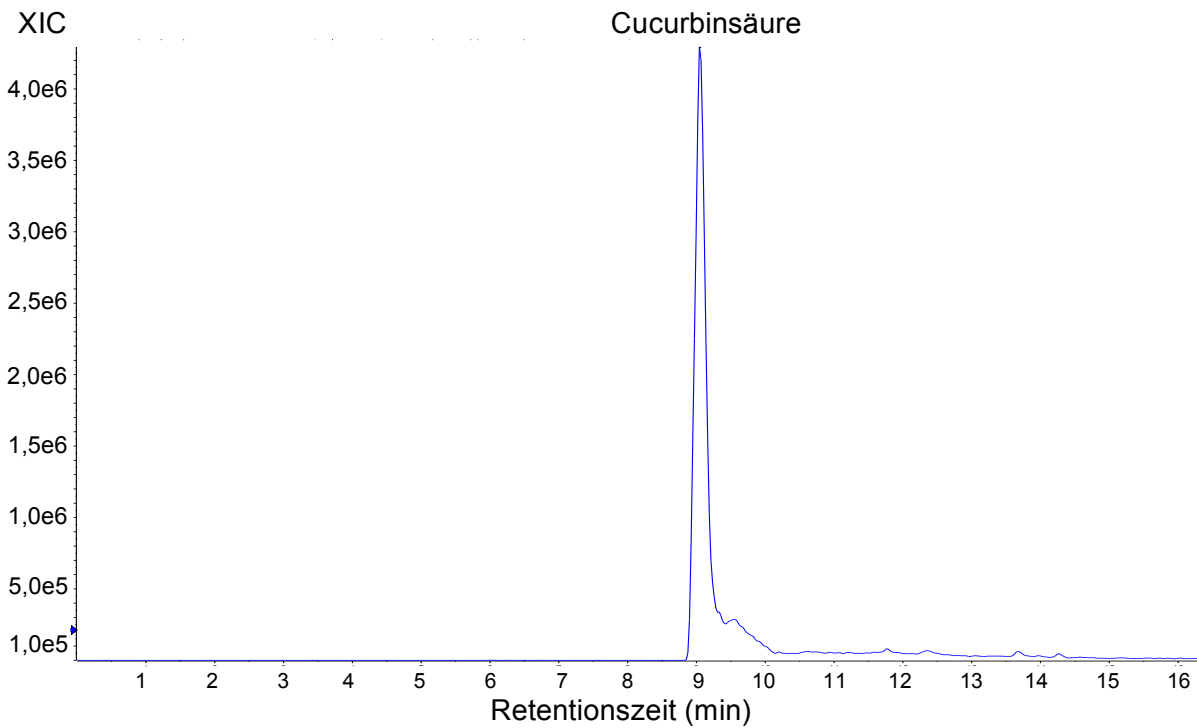


Abb. F- 37: UPLC-MS Chromatogramm Cucurbinsäure-Standard

Retentionszeit Cucurbinsäure = 9,05 min.

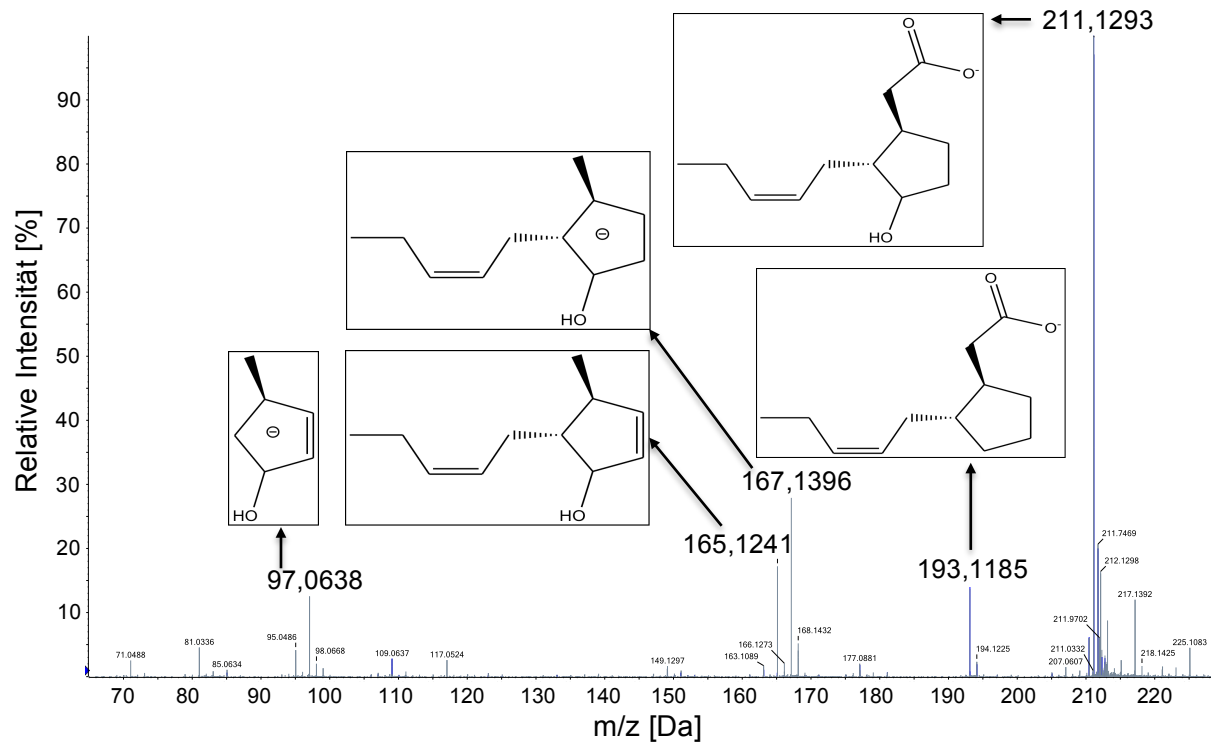


Abb. F- 38: MS/MS Spektrum Cucurbinsäure-Standard

M (Cucurbinsäure) = 211,13 Da.

## Literaturverzeichnis

- Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Gould, S. M., Roodveldt, C., Tawfik, D. S. (2005). The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nat Genet*, 37(1), 73-76.
- Aliferis, K. A., Jabaji, S. (2012). FT-ICR/MS and GC-EI/MS Metabolomics Networking Unravels Global Potato Sprout's Responses to *Rhizoctonia solani* Infection. *Plos One*, 7(8).
- Andrивon, D. (1995). Biology, Ecology, and Epidemiology of the Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora-Infestans* in Soil. *Phytopathology*, 85(10), 1053-1056.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Hackett, L., Topping, J., Winchester, B. (1997). The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology*, 7(8), 1085-1088.
- Asano, N., Kato, A., Oseki, K., Kizu, H., Matsui, K. (1995). Calystegins of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae). Structure determination and their glycosidase inhibitory activities. *Eur J Biochem*, 229(2), 369-376.
- Asano, N., Kato, A., Yokoyama, Y., Miyauchi, M., Yamamoto, M., Kizu, H., Matsui, K. (1996). Calystegin N-1, a novel nortropane alkaloid with a bridgehead amino group from *Hyoscyamus niger*: Structure determination and glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res*, 284(2), 169-178.
- Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H., Matsui, K. (1994). N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res*, 259(2), 243-255.
- Asano, N., Strusovskaya, O. G., Kosyakov, D. S., Pokryshkin, S. A., Gavrilin, M. V., Mudretsova, J. V. (2014). Identification of calystegines in plants of family Ericaceae by gas chromatography - mass spectrometry method. *Khim. Rastit. Syr'ya*(2), 207-212.
- Asano, N., Yamashita, T., Yasuda, K., Ikeda, K., Kizu, H., Kameda, Y., Kato, A., Nash, R. J., Lee, H. S., Ryu, K. S. (2001a). Polyhydroxylated Alkaloids Isolated from Mulberry Trees (*Morus alba* L.) and Silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem*, 49(9), 4208-4213.
- Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoke, D., Drager, B., Watson, A. A., Nash, R. J. (2001b). Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry*, 57(5), 721-726.
- Bagni, N., Ruiz-Carrasco, K., Franceschetti, M., Fornalè, S., Fornasiero, R. B., Tassoni, A. (2006). Polyamine metabolism and biosynthetic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11-12), 776-786.
- Bakker, E., Borm, T., Prins, P., van der Vossen, E., Uenk, G., Arens, M., de Boer, J., van Eck, H., Muskens, M., Vossen, J., van der Linden, G., van Ham, R., Klein-Lankhorst, R., Visser, R., Smant, G., Bakker, J., Goverse, A. (2011). A genome-wide genetic map of NB-LRR disease resistance loci in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(3), 493-508.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C. C., Preston, C. A. (2006). Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: "Talking Trees" in the Genomics Era. *Science*, 311(5762), 812-815.
- Ballabio, A., Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(4), 684-696.

- Barceloux, D. G. (2009). Potatoes, tomatoes, and solanine toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). *Dis Mon*, 55(6), 391-402.
- Barker, J. H. A., Smith, T. A., John Owen, W. (1993). Inhibition of polyamine metabolism in *Phytophthora* species. *Mycological Research*, 97(11), 1358-1362.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol*, 20(6), 1195-1197.
- Bedewitz, M. A., Gongora-Castillo, E., Uebler, J. B., Gonzales-Vigil, E., Wiegert-Rininger, K. E., Childs, K. L., Hamilton, J. P., Vaillancourt, B., Yeo, Y. S., Chappell, J., DellaPenna, D., Jones, A. D., Buell, C. R., Barry, C. S. (2014). A Root-Expressed L-Phenylalanine:4-Hydroxyphenylpyruvate Aminotransferase Is Required for Tropane Alkaloid Biosynthesis in *Atropa belladonna*. *Plant Cell*.
- Bell, E., Malmberg, R. (1990). Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Molecular and General Genetics MGG*, 224(3), 431-436.
- Biastoff, S., Brandt, W., Dräger, B. (2009). Putrescine N-methyltransferase – The start for alkaloids. *Phytochemistry*, 70(15–16), 1708-1718.
- Boswell, H. D., Dräger, B., McLauchlan, W. R., Portsteffen, A., Robins, D. J., Robins, R. J., Walton, N. J. (1999). Specificities of the enzymes of N-alkyltropane biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*. *Phytochemistry*, 52(5), 871-878.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140(2), 103-125.
- Brock, A., Bieri, S., Christen, P., Dräger, B. (2005). Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, 66(11), 1231-1240.
- Brock, A., Herzfeld, T., Paschke, R., Koch, M., Dräger, B. (2006). Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry*, 67(18), 2050-2057.
- Burlingame, B., Mouillé, B., Charrondière, R. (2009). Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 494-502.
- Chamoun, R., Samsatly, J., Pakala, S. B., Cubeta, M. A., Jabaji, S. (2014). Suppression subtractive hybridization and comparative expression of a pore-forming toxin and glycosyl hydrolase genes in *Rhizoctonia solani* during potato sprout infection. *Mol Genet Genomics*.
- Chaudhuri, K., Das, S., Bandyopadhyay, M., Zalar, A., Kollmann, A., Jha, S., Tepfer, D. (2009). Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation. *Transgenic Res*, 18(1), 121-134.
- Chen, W., Cheng, X. F., Zhou, Z. H., Liu, J. J., Wang, H. Z. (2013). Molecular cloning and characterization of a tropinone reductase from *Dendrobium nobile* Lindl. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 1145-1154.
- Chibucos, M. C., Morris, P. F. (2006). Levels of Polyamines and Kinetic Characterization of Their Uptake in the Soybean Pathogen *Phytophthora sojae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3350-3356.

- Clarke, S. F., Guy, P. L., Jameson, P. E., Schmierer, D., Burritt, D. J. (2000). Influence of white clover mosaic potyvirus infection on the endogenous levels of jasmonic acid and related compounds in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *J. Plant Physiol.*, 156(4), 433-437.
- Cohen, E., Heimer, Y. M., Mizrahi, Y. (1982). Ornithine Decarboxylase and Arginine Decarboxylase Activities in Meristematic Tissues of Tomato and Potato Plants. *Plant Physiol*, 70(2), 544-546.
- Couladis, M. M., Friesen, J. B., Landgrebe, M. E., Leete, E. (1991). Enzymes catalysing the reduction of tropinone to tropine and  $\psi$ -tropine isolated from the roots of *Datura innoxia*. *Phytochemistry*, 30(3), 801-805.
- Dammann, C., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J. J. (1997). Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *Plant J.*, 11(4), 773-782.
- Dathe, W., Kramell, H.-M., Daeter, W., Kramell, R., Slovik, S., Hartung, W. (1993). Uptake of jasmonic acid and related compounds by mesophyll protoplasts of the barley leaf. *Journal of Plant Growth Regulation*, 12(3), 133-140.
- Davis, J., Radcliffe, E., Thill, C., Ragsdale, D. (2012). Resistance to Aphids, Late Blight and Viruses in Somatic Fusions and Crosses of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum bulbocastanum* Dun. *American Journal of Potato Research*, 89(6), 489-500.
- De Luca, V., St Pierre, B. (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci*, 5(4), 168-173.
- De Sutter, V., Vanderhaeghen, R., Tilleman, S., Lammertyn, F., Vanhoutte, I., Karimi, M., Inzé, D., Goossens, A., Hilson, P. (2005). Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells. *The Plant Journal*, 44(6), 1065-1076.
- Deng, F. (2005). Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1), 16-26.
- Dewey, R. E., Xie, J. (2013). Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 94(0), 10-27.
- Docimo, T., Reichelt, M., Schneider, B., Kai, M., Kunert, G., Gershenzon, J., D'Auria, J. C. (2012). The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant Mol Biol*, 78(6), 599-615.
- Doerk-Schmitz, K., Witte, L., Alfermann, A. W. (1994). Tropane Alkaloid Patterns in Plants and Hairy Roots of *Hyoscyamus-Albus*. *Phytochemistry*, 35(1), 107-110.
- Dräger, B. (1995). Identification and quantification of calystegines, polyhydroxyl nortropane alkaloids. *Phytochemical Analysis*, 6(1), 31-37.
- Dräger, B. (2004). Chemistry and biology of calystegines. *Nat Prod Rep*, 21(2), 211-223.
- Dräger, B. (2006). Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, 67(4), 327-337.
- Dräger, B., Funck, C., Höhler, A., Mrachatz, G., Nahrstedt, A., Portsteffen, A., Schaal, A., Schmidt, R. (1994). Calystegines as a new group of tropane alkaloids in Solanaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(2-3), 235-240.



- Dräger, B., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1988). Purification and Characterization of Pseudotropine Forming Tropinone Reductase from *Hyoscyamus niger* Root Cultures. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(10), 2663-2667.
- Dräger, B., Portsteffen, A., Schaal, A., McCabe, P., Peerless, A. J., Robins, R. (1992). Levels of tropinone-reductase activities influence the spectrum of tropane esters found in transformed root cultures of *Datura stramonium* L. *Planta*, 188(4), 581-586.
- Dräger, B., Schaal, A. (1994). Tropinone reduction in *Atropa belladonna* root cultures. *Phytochemistry*, 35(6), 1441-1447.
- Dräger, B., van Almsick, A., Mrachatz, G. (1995). Distribution of calystegines in several solanaceae. *Planta Med*, 61(6), 577-579.
- Eschen-Lippold, L., Rothe, G., Stumpe, M., Göbel, C., Feussner, I., Rosahl, S. (2007). Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. *Phytochemistry*, 68(6), 797-801.
- Facchini, P. J., St-Pierre, B. (2005). Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(6), 657-666.
- Farmer, E. E., Johnson, R. R., Ryan, C. A. (1992). Regulation of Expression of Proteinase Inhibitor Genes by Methyl Jasmonate and Jasmonic Acid. *Plant Physiol*, 98(3), 995-1002.
- Farre, E. M., Bachmann, A., Willmitzer, L., Trethewey, R. N. (2001). Acceleration of potato tuber sprouting by the expression of a bacterial pyrophosphatase. *Nature Biotechnology*, 19(3), 268-272.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fernie, A. R., Willmitzer, L. (2001). Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol*, 127(4), 1459-1465.
- Fewell, A. M., Roddick, J. G. (1993). Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine. *Phytochemistry*, 33(2), 323-328.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. (2002). Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25677-25684.
- Fonzi, W. A., Sypherd, P. S. (1987). The gene and the primary structure of ornithine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 262(21), 10127-10133.
- Foster, S. A., Walters, D. R. (1993). Fungicidal activity of the polyamine analogue, keto-putrescine. *Pesticide Science*, 37(3), 267-272.
- Friedman, M. (2004). Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 143-155.
- Friedman, M. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J Agric Food Chem*, 54(23), 8655-8681.
- Friedman, M., Roitman, J. N., Kozukue, N. (2003). Glycoalkaloid and Calystegine Contents of Eight Potato Cultivars. *J Agric Food Chem*, 51(10), 2964-2973.

- Fuell, C., Elliott, K. A., Hanfrey, C. C., Franceschetti, M., Michael, A. J. (2010). Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 513-520.
- Fukui, H., Koshimizu, K., Yamazaki, Y., Usuda, S. (1977). Structures of Plant Growth Inhibitors in Seeds of *Cucurbita pepo* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(1), 189-194.
- Gapper, N. E., Norris, G. E., Clarke, S. F., Lill, R. E., Jameson, P. E. (2002). Novel jasmonate amino acid conjugates in *Asparagus officinalis* during harvest-induced and natural foliar senescence. *Physiol. Plant.*, 114(1), 116-124.
- Ghyselinck, J., Velivelli, S. L., Heylen, K., O'Herlihy, E., Franco, J., Rojas, M., De Vos, P., Prestwich, B. D. (2013). Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. *Syst Appl Microbiol*, 36(2), 116-127.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling Behav.*, 5(1), 26-33.
- Goldberg, R., Perdrizet, E. (1984). Ratio of free to bound polyamines during maturation in mung-bean hypocotyl cells. *Planta*, 161(6), 531-535.
- Goldmann, A., Message, B., Tepfer, D., Molyneux, R. J., Duclos, O., Boyer, F.-D., Pan, Y. T., Elbein, A. D. (1996). Biological Activities of the Nortropine Alkaloid, Calystegine B2, and Analogs: Structure-Function Relationships. *Journal of Natural Products*, 59(12), 1137-1142.
- Goldmann, A., Milat, M.-L., Ducrot, P.-H., Lallemand, J.-Y., Maille, M., Lepingle, A., Charpin, I., Tepfer, D. (1990). Tropane derivatives from *Calystegia sepium*. *Phytochemistry*, 29(7), 2125-2127.
- Graham, J. S., Hall, G., Pearce, G., Ryan, C. A. (1986). Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. *Planta*, 169(3), 399-405.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12), 4645-4649.
- Green, T. R., Ryan, C. A. (1972). Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. *Science*, 175(4023), 776-777.
- Griffiths, D. W., Bain, H., Deighton, N., Robertson, G. W., Dale, M. F. B. (2000). Photo-induced synthesis of tomatidenol-based glycoalkaloids in *Solanum phureja* tubers. *Phytochemistry*, 53(7), 739-745.
- Griffiths, D. W., Shepherd, T., Stewart, D. (2008). Comparison of the Calystegine Composition and Content of Potato Sprouts and Tubers from *Solanum tuberosum* Group Phureja and *Solanum tuberosum* Group Tuberosum. *J Agric Food Chem*, 56(13), 5197-5204.
- Griffiths, R. C., Watson, A. A., Kizu, H., Asano, N., Sharp, H. J., Jones, M. G., Wormald, M. R., Fleet, G. W. J., 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 B1). *Tetrahedron Letters*, 37(18), 3207-3208.

- Guntli, D., Heeb, M., Moenne-Loccoz, Y., Defago, G. (1999). Contribution of calyestegine catabolic plasmid to competitive colonization of the rhizosphere of calyestegine-producing plants by *Sinorhizobium meliloti* Rm41. *Molecular Ecology*, 8(5), 855-863.
- Haggag, W. M., Abd El-Khair, H. (2007). Application of some natural compounds for management of potato late and early blights. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 5(2), 157-163.
- Hajirezaei, M. R., Bornke, F., Peisker, M., Takahata, Y., Lerchl, J., Kirakosyan, A., Sonnewald, U. (2003). Decreased sucrose content triggers starch breakdown and respiration in stored potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 477-488.
- Häkkinen, S. T., Moyano, E., Cusidó, R. M., Palazón, J., Piñol, M. T., Oksman-Caldentey, K.-M. (2005). Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2611-2618.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D., Michael, A. J. (2001). Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J*, 27(6), 551-560.
- Haraguchi, M., Gorniak, S. L., Ikeda, K., Minami, Y., Kato, A., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J., Asano, N. (2003). Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *J Agric Food Chem*, 51(17), 4995-5000.
- Hartmann, A., Senning, M., Hedden, P., Sonnewald, U., Sonnewald, S. (2011). Reactivation of Meristem Activity and Sprout Growth in Potato Tubers Require Both Cytokinin and Gibberellin. *Plant Physiol*, 155(2), 776-796.
- Hashimoto, T., Kato, A. (2007). Regulating alkaloids in a plant by increasing or decreasing N-methylputrescine oxidase (MPO) genes, MPO1 and MPO2, cloned from tobacco plant). USA Patent No.
- Hashimoto, T., Matsuda, J., Yamada, Y. (1993). Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 beta-hydroxylase. *FEBS Lett*, 329(1-2), 35-39.
- Hashimoto, T., Nakajima, K., Ongena, G., Yamada, Y. (1992). Two Tropinone Reductases with Distinct Stereospecificities from Cultured Roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol*, 100(2), 836-845.
- Hashimoto, T., Shoji, T., Mihara, T., Oguri, H., Tamaki, K., Suzuki, K., Yamada, Y. (1998a). Intraspecific variability of the tandem repeats in *Nicotiana putrescine* N-methyltransferases. *Plant Mol Biol*, 37(1), 25-37.
- Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K.-i., Yamada, Y. (1998b). Molecular Cloning of Plant Spermidine Synthases. *Plant and Cell Physiology*, 39(1), 73-79.
- Hashimoto, T., Yamada, Y. (1994). ALKALOID BIOGENESIS - MOLECULAR ASPECTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 257-285.
- Haslam, S. C., Young, T. W. (1992). Purification of N-methylputrescine oxidase from *Nicotiana rustica*. *Phytochemistry*, 31(12), 4075-4079.
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F., van der Vossen, E. A. G. (2008). Societal Costs of Late Blight in Potato

- and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research*, 51(1), 47-57.
- Havis, N. D., Walters, D. R., Foster, S. A., Martin, W. P., Cook, F. M., Robins, D. J. (1994a). Fungicidal activity of the synthetic putrescine analogue, (E)-1,4-diaminobut-2-ene, and derivatives. *Pesticide Science*, 41(1), 61-69.
- Havis, N. D., Walters, D. R., Martin, W. P., Cook, F. M., Robins, D. J. (1994b). Fungicidal activity of three putrescine analogues. *Pesticide Science*, 41(1), 71-76.
- Heim, W. G., Sykes, K. A., Hildreth, S. B., Sun, J., Lu, R. H., Jelesko, J. G. (2007). Cloning and characterization of a *Nicotiana tabacum* methylputrescine oxidase transcript. *Phytochemistry*, 68(4), 454-463.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., Werck-Reichhart, D., Pinot, F. (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 Catalyze Two Successive Oxidation Steps of Plant Hormone Jasmonoyl-isoleucine for Catabolic Turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6296-6306.
- Helder, H., Miersch, O., Vreugdenhil, D., Semadeni, G. (1993). Occurrence of hydroxylated jasmonic acids in leaflets of *Solanum demissum* plants grown under long- and short-day conditions. *Physiol Plant*, 88(4), 647-653.
- Helliwell, C. A., Wesley, S. V., Wielopolska, A. J., Waterhouse, P. M. (2002). High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology*, 29(10), 1217-1225.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1994). Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell*, 6(5), 723-735.
- Hijmans, R. (2001). Global distribution of the potato crop. *American Journal of Potato Research*, 78(6), 403-412.
- Hirsch, C. D., Hamilton, J. P., Childs, K. L., Cepela, J., Crisovan, E., Vaillancourt, B., Hirsch, C. N., Habermann, M., Neal, B., Buell, C. R. (2014). Spud DB: A Resource for Mining Sequences, Genotypes, and Phenotypes to Accelerate Potato Breeding. *Plant Gen.*, 7(1), 1-12.
- Höke, D., Dräger, B. (2004). Calystegines in *Calystegia sepium* do not inhibit fungal growth and invertase activity but interact with plant invertase. *Plant Biol (Stuttg)*, 6(2), 206-213.
- Hosaka, K., Hanneman, R. E., Jr. (1988). The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 76(2), 172-176.
- Howe, G. A., Lightner, J., Browse, J., Ryan, C. A. (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell*, 8(11), 2067-2077.
- Hughes, A. L. (1994). *The Evolution of Functionally Novel Proteins after Gene Duplication* (Vol. 256).
- Ikeda, K., Kato, A., Adachi, I., Haraguchi, M., Asano, N. (2003). Alkaloids from the Poisonous Plant *Ipomoea carnea*: Effects on Intracellular Lysosomal Glycosidase Activities in Human Lymphoblast Cultures. *J Agric Food Chem*, 51(26), 7642-7646.

- Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y., Takahashi, T. (2004). Spermidine Synthase Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 135(3), 1565-1573.
- Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y., 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 Mol Biol*, 38(6), 1101-1111.
- Ishikawa, A., Yoshihara, T., Nakamura, K. (1994). Structure–Activity Relationships of Jasmonates in the Induction of Expression of Proteinase Inhibitor Genes of Potato. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(3), 544-547.
- Jaber-Vazdekis, N., González, C., Ravelo, Á. G., Zárate, R. (2009). Cloning, characterization and analysis of expression profiles of a cDNA encoding a hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase (H6H) from *Atropa baetica* Willk. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 20-25.
- Jäger, E. J., Ebel, F., Hanelt, P., Müller, G. K. (2008). *Rothmaler, Exkursionsflora von Deutschland, Krautige Zier- und Nutzpflanzen* (Vol. 5): Spektrum Akademischer Verlag.
- Janowitz, T., Kneifel, H., Piotrowski, M. (2003). Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Lett*, 544(1–3), 258-261.
- Jaremicz, Z., Luczkiewicz, M., Kokotkiewicz, A., Krolicka, A., Sowinski, P. (2014). Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. *Biotechnol Lett*, 36(4), 843-853.
- Jenett-Siems, K., Schimming, T., Kaloga, M., Eich, E., Siems, K., Gupta, M. P., Witte, L., Hartmann, T. (1998). Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. *Phytochemistry*, 47(8), 1551-1560.
- Jockovic, N., Fischer, W., Brandsch, M., Brandt, W., Drager, B. (2013). Inhibition of human intestinal alpha-glucosidases by calystegines. *J Agric Food Chem*, 61(23), 5550-5557.
- Jörnvall, H., Höög, J.-O., Persson, B. (1999). SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett*, 445(2–3), 261-264.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34(18), 6003-6013.
- Judelson, H. S., Tooley, P. W. (2000). Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. *Phytopathology*, 90(10), 1112-1119.
- Jung, G., Tepfer, D. (1987). Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown in vitro. *Plant Science*, 50(2), 145-151.
- Junker, A., Fischer, J., Sichhart, Y., Brandt, W., Drager, B. (2013). Evolution of the key alkaloid enzyme putrescine N-methyltransferase from spermidine synthase. *Front Plant Sci*, 4, 260.
- Jupe, F., Witek, K., Verweij, W., Sliwka, J., Pritchard, L., Etherington, G. J., Maclean, D., Cock, P. J., Leggett, R. M., Bryan, G. J., Cardle, L., Hein, I., Jones, J. D. (2013).

- Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations. *Plant J*, 76(3), 530-544.
- Kai, G., Li, L., Jiang, Y., Yan, X., Zhang, Y., Lu, X., Liao, P., Chen, J. (2009a). Molecular cloning and characterization of two tropinone reductases in *Anisodus acutangulus* and enhancement of tropane alkaloid production in AaTRI-transformed hairy roots. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 54(3), 177-186.
- Kai, G., Liu, Y., Wang, X., Yang, S., Fu, X., Luo, X., Liao, P. (2011). Functional identification of hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase from *Anisodus acutangulus* and overproduction of scopolamine in genetically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 33(7), 1361-1365.
- Kai, G., Zhang, A., Guo, Y., Li, L., Cui, L., Luo, X., Liu, C., Xiao, J. (2012). Enhancing the production of tropane alkaloids in transgenic *Anisodus acutangulus* hairy root cultures by over-expressing tropinone reductase I and hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase. *Molecular BioSystems*, 8(11), 2883-2890.
- Kai, G., Zhang, Y., Chen, J., Li, L., Yan, X., Zhang, R., Liao, P., Lu, X., Wang, W., Zhou, G. (2009b). Molecular characterization and expression analysis of two distinct putrescine N-methyltransferases from roots of *Anisodus acutangulus*. *Physiol Plant*, 135(2), 121-129.
- Kaiser, H., Richter, U., Keiner, R., Brabant, A., Hause, B., Dräger, B. (2006). Immunolocalisation of two tropinone reductases in potato (*Solanum tuberosum* L.) root, stolon, and tuber sprouts. *Planta*, 225(1), 127-137.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European Journal of Biochemistry*, 269(18), 4409-4417.
- Kashiwagi, K., Suzuki, T., Suzuki, F., Furuchi, T., Kobayashi, H., Igarashi, K. (1991). Coexistence of the Genes for Putrescine Transport Protein and Ornithine Decarboxylase at 16-Min on *Escherichia-Coli* Chromosome. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20922-20927.
- Kato, A., Asano, N., Kizu, H., Matsui, K., Suzuki, S., Arisawa, M. (1997). Calystegine alkaloids from *Duboisia leichhardtii*. *Phytochemistry*, 45(2), 425-429.
- Kato, A., Nakagome, I., Nakagawa, S., Koike, Y., Nash, R. J., Adachi, I., Hirono, S. (2014). Docking and SAR studies of calystegines: binding orientation and influence on pharmacological chaperone effects for Gaucher's disease. *Bioorg Med Chem*, 22(8), 2435-2441.
- Kato, A., Wang, L., Ishii, K., Seino, J., Asano, N., Suzuki, T. (2011). Calystegine B3 as a specific inhibitor for cytoplasmic  $\alpha$ -mannosidase, Man2C1. *Journal of Biochemistry*, 149(4), 415-422.
- Kato, A., Zhang, Z.-L., Wang, H.-Y., Jia, Y.-M., Yu, C.-Y., Kinami, K., Hirokami, Y., Tsuji, Y., Adachi, I., Nash, R. J., Fleet, G. W. J., Koseki, J., Nakagome, I., Hirono, S. (2015). Design and Synthesis of Labystegines, Hybrid Iminosugars from LAB and Calystegine, as Inhibitors of Intestinal  $\alpha$ -Glucosidases: Binding Conformation and Interaction for ntSI. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(9), 4501-4515.
- Katoh, A., Shoji, T., Hashimoto, T. (2007). Molecular cloning of N-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant Cell Physiol*, 48(3), 550-554.

- Kaur-Sawhney, R., Shih, L.-M., Galston, A. W. (1982). Relation of Polyamine Biosynthesis to the Initiation of Sprouting in Potato Tubers. *Plant Physiol*, 69(2), 411-415.
- Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(24), 3895-3906.
- Kawai, Y., Ono, E., Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, 78(2), 328-343.
- 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., Dräger, B. (2000). Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science*, 150(2), 171-179.
- Keiner, R., Kaiser, H., Nakajima, K., Hashimoto, T., Dräger, B. (2002). Molecular cloning, expression and characterization of tropinone reductase II, an enzyme of the SDR family in *Solanum tuberosum* (L.). *Plant Mol Biol*, 48(3), 299-308.
- Khan, A. J., Minocha, S. C. (1989). Polyamine Biosynthetic Enzymes and the Effect of their Inhibition on the Growth of Some Phytopathogenic Fungi. *Plant and Cell Physiology*, 30(5), 655-663.
- Khanam, N., Khoo, C., Close, R., Khan, A. G. (2000). Organogenesis, Differentiation and Histolocalization of Alkaloids in Cultured Tissues and Organs of *Duboisia myoporoides* R. Br. *Annals of Botany*, 86(4), 745-752.
- Khersonsky, O., Roodveldt, C., Tawfik, D. S. (2006). Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(5), 498-508.
- Kitaoka, N., Matsubara, T., Sato, M., Takahashi, K., Wakuta, S., Kawaide, H., Matsui, H., Nabeta, K., Matsuura, H. (2011). Arabidopsis CYP94B3 Encodes Jasmonyl-I-Isoleucine 12-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Jasmonate. *Plant and Cell Physiology*, 52(10), 1757-1765.
- Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S., Yoshihara, T. (1991). Potato Tuber-Inducing Activities of Jasmonic Acid and Related-Compounds. *Phytochemistry*, 30(5), 1435-1438.
- Koelen, K. J., Gross, G. G. (1982). Partial Purification and Properties of Tropine Dehydrogenase from Root Cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med*, 44(04), 227-230.
- Koo, A. J. K., Cooke, T. F., Howe, G. A. (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9298-9303.
- Korolev, S., Ikeguchi, Y., Skarina, T., Beasley, S., Arrowsmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A., Pegg, A. E., Savchenko, A. (2002). The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nat Struct Mol Biol*, 9(1), 27-31.
- Koshimizu, K., Fukui, H., Usuda, S., Mitsui, T. (1974). *Plant growth inhibitors in seeds of pumpkins*.

- Kramell, R., Porzel, A., Miersch, O., Schneider, G. (1999). Analysis of synthetic isoleucine conjugates of cucurbitic acid isomers by liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 10(2), 82-87.
- Kramell, R., Schneider, G., Miersch, O. (1996). Resolution of Racemic Jasmonic Acid and Abscisic Acid by Chiral High Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 7(4), 209-212.
- Kusano, G., Orihara, S., Tsukamoto, D., Shibano, M., Coskun, M., Guvenc, A., 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(2), 185-192.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.
- Kushwaha, A. K., Sangwan, N. S., Tripathi, S., Sangwan, R. S. (2013a). Molecular cloning and catalytic characterization of a recombinant tropine biosynthetic tropinone reductase from *Withania coagulans* leaf. *Gene*, 516(2), 238-247.
- Kushwaha, A. K., Sangwan, N. S., Trivedi, P. K., Negi, A. S., Misra, L., Sangwan, R. S. (2013b). Tropine Forming Tropinone Reductase Gene from *Withania somnifera* (Ashwagandha): Biochemical Characteristics of the Recombinant Enzyme and Novel Physiological Overtones of Tissue-Wide Gene Expression Patterns. *Plos One*, 8(9), e74777.
- Lahlali, R., Hijri, M. (2010). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *Fems Microbiology Letters*, 311(2), 152-159.
- Lazo, G. R., Stein, P. A., Ludwig, R. A. (1991). A DNA Transformation-Competent Arabidopsis Genomic Library in Agrobacterium. *Nat Biotech*, 9(10), 963-967.
- Lee, O. S., Kang, Y. M., Jung, H. Y., Min, J. Y., Kang, S. M., Karigar, C. S., Prasad, D. T., Bahk, J. D., Choi, M. S. (2005). Enhanced production of tropane alkaloids in *Scopolia parviflora* by introducing the PMT (putrescine N-methyltransferase) gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(2), 167-172.
- Leete, E. (1967). Biosynthesis of the Nicotiana alkaloids. XI. Investigation of tautomerism in N-methyl-delta-pyrrolinium chloride and its incorporation into nicotine. *J Am Chem Soc*, 89(26), 7081-7084.
- Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G. I., Bauer, P., Ling, H.-Q., Ganai, M. W., Howe, G. A. (2003). The Tomato Suppressor of prosystemin-mediated responses2 Gene Encodes a Fatty Acid Desaturase Required for the Biosynthesis of Jasmonic Acid and the Production of a Systemic Wound Signal for Defense Gene Expression. *Plant Cell*, 15(7), 1646-1661.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., Pichersky, E., Howe, G. A. (2004). The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *Plant Cell*, 16(1), 126-143.
- Li, R., Reed, D. W., Liu, E., Nowak, J., Pelcher, L. E., Page, J. E., Covello, P. S. (2006). Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement. *Chem Biol*, 13(5), 513-520.



- Liu, C.-J., Huhman, D., Sumner, L. W., Dixon, R. A. (2003). Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome P450 81E enzymes from *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 36(4), 471-484.
- Liu, H. P., Dong, B. H., Zhang, Y. Y., Liu, Z. P., Liu, Y. L. (2004). Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. *Plant Science*, 166(5), 1261-1267.
- Liu, T., Zhu, P., Cheng, K. D., Meng, C., He, H. X. (2005a). Molecular cloning, expression and characterization of hyoscyamine 6beta-hydroxylase from hairy roots of *Anisodus tanguticus*. *Planta Med*, 71(3), 249-253.
- Liu, T., Zhu, P., Cheng, K. D., Meng, C., Zhu, H. X. (2005b). Molecular cloning and expression of putrescine N-methyltransferase from the hairy roots of *Anisodus tanguticus*. *Planta Med*, 71(10), 987-989.
- Liu, X. Q., Yang, C. X., Chen, M., Li, M. Y., Liao, Z. H., Tang, K. X. (2010). Promoting scopolamine accumulation in transgenic plants of *Atropa belladonna* generated from hairy roots with over expression of pmt and h6h gene. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17), 1708-1713.
- Long, S. P., Lu, Y., Wang, Y. X., Yang, C. X., Lan, X. Z., Liao, Z. H. (2013). Enhancement of tropane alkaloids production in transgenic hair roots of *Atropa belladonna* by overexpressing endogenous genes AbPMT and AbH6H. *Yao Xue Xue Bao*, 48(2), 243-249.
- Luo, M., Hung, F.-Y., Yang, S., Liu, X., Wu, K. (2014). Histone Lysine Demethylases and Their Functions in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(2), 558-565.
- Luo, X., Weng, S., Ni, X., Wang, X., Fu, X., Xiao, J., Kai, G. (2012). The effects of elicitation on the expression of key enzyme genes and on production of tropane alkaloids in *Anisodus acutangulus* plant. *Biologia*, 67(2), 352-359.
- Malkawi, A., Jensen, B. L., Langille, A. R. (2007). Plant Hormones Isolated from "Katahdin" Potato Plant Tissues and the Influence of Photoperiod and Temperature on Their Levels in Relation to Tuber Induction. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(4), 308-317.
- Malone, T., Blumenthal, R. M., Cheng, X. (1995). Structure-guided Analysis Reveals Nine Sequence Motifs Conserved among DNA Amino-methyl-transferases, and Suggests a Catalytic Mechanism for these Enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 253(4), 618-632.
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1991). Molecular cloning of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J Biol Chem*, 266(15), 9460-9464.
- Meira, M., da Silva, E. P., David, J. M., David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(3), 682-713.
- Meyer, A., Gross, D., Schmidt, J., Jensen, E., Vorkefeld, S., Sembdner, G. (1991). Cucurbitic acid related metabolites of the plant growth regulator dihydrojasmonic acid in barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 187(6), 401-408.
- Michael, A. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J., Burtin, D. (1996). Molecular cloning and functional identification of a plant ornithine decarboxylase cDNA. *Biochem J*, 314 ( Pt 1), 241-248.

- Miersch, O. (1991). Synthesis of (+/-)-(10-H-2,11-(H-2)2,12-(H-2)(3)Jasmonic Acid. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences*, 46(12), 1727-1729.
- Miersch, O., Günther, T., Fritsche, W., Sembdner, G. (1993). Jasmonates from Different Fungal Species. *Natural Product Letters*, 2(4), 293-299.
- Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I., Wasternack, C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist*, 177(1), 114-127.
- Miersch, O., Preiss, A., Sembdner, G., Schreiber, K. (1987). (+)-7-Isojasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, 26(4), 1037-1039.
- Miersch, O., Regvar, M., Wasternack, C. (1999). Metabolism of jasmonic acid in *Pisolithus tinctorius* cultures. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 39(3), 243-247.
- Miersch, O., Sembdner, G., Schreiber, K. (1989). Occurrence of Jasmonic Acid Analogs in *Vicia-Faba*. *Phytochemistry*, 28(2), 339-340.
- Minguet, E. G., Vera-Sirera, F., Marina, A., Carbonell, J., Blázquez, M. A. (2008). Evolutionary Diversification in Polyamine Biosynthesis. *Molecular Biology and Evolution*, 25(10), 2119-2128.
- Minocha, R., Majumdar, R., Minocha, S. C. (2014). Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Front Plant Sci*, 5, 175.
- Mizusaki, S., Tanabe, Y., Noguchi, M., Tamaki, E. (1972). N-methylputrescine oxidase from tobacco roots. *Phytochemistry*, 11(9), 2757-2762.
- Molyneux, R. J., Pan, Y. T., Goldmann, A., Tepfer, D. A., Elbein, A. D. (1993). Calystegins, a Novel Class of Alkaloid Glycosidase Inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304(1), 81-88.
- Moshier, J. A., Gilbert, J. D., Skunca, M., Dosescu, J., Almodovar, K. M., Luk, G. D. (1990). Isolation and expression of a human ornithine decarboxylase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 4884-4892.
- Moskova, I., Todorova, D., Alexieva, V., Segiev, I. (2014). Protective effect of hydrogen peroxide against paraquat toxicity in young pea plants: possible role of endogenous polyamines. *Am. J. Plant Sci.*, 5(22), 3408-3416, 3410 pp.
- Moummou, H., Kallberg, Y., Tonfack, L. B., Persson, B., van der Rest, B. (2012). The Plant Short-Chain Dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC Plant Biol*, 12.
- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R. M., Bagni, N., Pinol, M. T. (2002). Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the pmt gene. *Phytochemistry*, 59(7), 697-702.
- Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazon, J., Cusido, R. M., Pinol, M. T., Teeri, T. H., 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(381), 203-211.

- Moyano, E. B., M.; Cusido, J.; Palazon, J.; Pinol, M. T. . (2004). Application of metabolic engineering to increase tropane alkaloid production. *Recent Research Developments in Biochemistry*, 5, 317-327.
- Nakada, Y., Itoh, Y. (2003). Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology*, 149(3), 707-714.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 34-41.
- Nakajima, K., Hashimoto, T. (1999). Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant Cell Physiol*, 40(11), 1099-1107.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1993). Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9591-9595.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1994). Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 11695-11698.
- Nakajima, K., Kato, H., Oda, J. i., Yamada, Y., 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(23), 16563-16568.
- Nakajima, K., Oshita, Y., Kaya, M., Yamada, Y., Hashimoto, T. (1999b). Structures and Expression Patterns of Two Tropinone Reductase Genes from *Hyoscyamus niger*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(10), 1756-1764.
- Nakajima, K., Oshita, Y., Yamada, Y., Hashimoto, T. (1999c). Insight into the Molecular Evolution of Two Tropinone Reductases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(10), 1819-1822.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., Yamada, Y. (1998). Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 4876-4881.
- Nash, R. J., Rothschild, M., Porter, E. A., Watson, A. A., Waigh, R. D., Waterman, P. G. (1993). Calystegines in *Solanum* and *Datura* Species and the Deaths-Head Hawk-Moth (*Acherontia-Atropus*). *Phytochemistry*, 34(5), 1281-1283.
- Nasomjai, P., Reed, D. W., Tozer, D. J., Peach, M. J., Slawin, A. M., Covello, P. S., O'Hagan, D. (2009). Mechanistic insights into the cytochrome P450-mediated oxidation and rearrangement of littorine in tropane alkaloid biosynthesis. *ChemBiochem*, 10(14), 2382-2393.
- Navarro-Quezada, A. R. (2007). *Molecular evolution of tropinone-reductase-like and tau GST genes duplicated in tandem in Brassicaceae*. (Dissertation), Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Nickon, A., Fieser, L. F. (1952). Configuration of Tropine and Pseudotropine. *J Am Chem Soc*, 74(22), 5566-5570.
- Nicot, N., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2907-2914.
- Niemüller, D., Reimann, A., Ober, D. (2012). Distinct Cell-Specific Expression of Homospermidine Synthase Involved in Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis in Three Species of the Boraginales. *Plant Physiol*, 159(3), 920-929.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*. London, New York: Allen & Unwin, Springer-Verlag.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T., Nambara, E. (2006). CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8' - Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 141(1), 97-107.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, 143–144(0), 247-253.
- Ott, S. C., Tofern-Reblin, B., Jenett-Siems, K., Siems, K., Mueller, F., Hilker, M., Onegi, B., Witte, L., Eich, E. (2007). Unusual tropane alkaloid pattern in two African convolvulaceous species. Phytochemistry and chemotaxonomy of the convolvulaceae, part 20. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences*, 62(2), 285-288.
- Oufir, M., Legay, S., Nicot, N., Van Moer, K., Hoffmann, L., Renaut, J., Hausman, J.-F., Evers, D. (2008). Gene expression in potato during cold exposure: Changes in carbohydrate and polyamine metabolisms. *Plant Science*, 175(6), 839-852.
- Palazon, J., Navarro-Ocana, A., Hernandez-Vazquez, L., Mirjalili, M. H. (2008). Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. *Molecules*, 13(8), 1722-1742.
- Parr, A. J., Payne, J., Eagles, J., Chapman, B. T., Robins, R. J., Rhodes, M. J. C. (1990). Variation in tropane alkaloid accumulation within the solanaceae and strategies for its exploitation. *Phytochemistry*, 29(8), 2545-2550.
- Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005). Sites and Regulation of Polyamine Catabolism in the Tobacco Plant. Correlations with Cell Division/Expansion, Cell Cycle Progression, and Vascular Development. *Plant Physiol*, 138(4), 2174-2184.
- Peña-Cortés, H., Fisahn, J., 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*, 92(10), 4106-4113.
- Peña-Cortés, H., Sanchez-Serrano, J., Rocha-Sosa, M., Willmitzer, L. (1988). Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. *Planta*, 174(1), 84-89.
- Perlak, F., Stone, T., Muskopf, Y., Petersen, L., Parker, G., McPherson, S., Wyman, J., Love, S., Reed, G., Biever, D., Fischhoff, D. (1993). Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol Biol*, 22(2), 313-321.
- Petersson, E. V., Arif, U., Schulzova, V., Krtkova, V., Hajslova, J., Meijer, J., Andersson, H. C., Jonsson, L., Sitbon, F. (2013). Glycoalkaloid and calystegine levels in table potato

- cultivars subjected to wounding, light, and heat treatments. *J Agric Food Chem*, 61(24), 5893-5902.
- PGSC. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), 189-195.
- Pinto, E., Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2015). Changes in the Content of Free and Conjugated Polyamines during Lettuce (*Lactuca sativa*) Growth. *J Agric Food Chem*, 63(2), 440-446.
- Piotrowski, M., Janowitz, T., Kneifel, H. (2003). Plant C-N Hydrolases and the Identification of a Plant N-Carbamoylputrescine Amidohydrolase Involved in Polyamine Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1708-1712.
- Portsteffen, A., Dräger, B., Nahrstedt, A. (1994). The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. *Phytochemistry*, 37(2), 391-400.
- Pósfai, J., Bhagwat, A. S., Pósfai, G., Roberts, R. J. (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 17(7), 2421-2435.
- Pramod, K. K., Singh, S., Jayabaskaran, C. (2010). Biochemical and structural characterization of recombinant hyoscyamine 6beta-hydroxylase from *Datura metel* L. *Plant Physiol Biochem*, 48(12), 966-970.
- Rabot, S., Peerless, A. C. J., Robins, R. J. (1995). Tigloyl-CoA:pseudotropine acyl transferase—An enzyme of tropane alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 39(2), 315-322.
- Reinhardt, N. (2014). *Katalytische Vielseitigkeit kurzkettiger Reduktasen aus Brassicaceen*. (Dissertation), Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Reinhardt, N., Fischer, J., Coppi, R., Blum, E., Brandt, W., Dräger, B. (2014). Substrate flexibility and reaction specificity of tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases. *Bioorganic Chemistry*, 53, 37-49.
- Reitz, M., Rudolph, K., Schroder, I., Hoffmann-Hergarten, S., Hallmann, J., Sikora, R. A. (2000). Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3515-3518.
- Richter, U. (2006). *Calystegine in Solanum tuberosum L. – Biosynthese und physiologische Bedeutung im Kohlenhydratstoffwechsel*. (Dissertation), Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Richter, U., Rothe, G., Fabian, A. K., Rahfeld, B., Dräger, B. (2005). Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), 645-652.
- Richter, U., Sonnewald, U., Dräger, B. (2007). Calystegines in potatoes with genetically engineered carbohydrate metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1603-1615.
- Robins, R., Bachmann, P., Peerless, A., Rabot, S. (1994a). Esterification reactions in the biosynthesis of tropane alkaloids in transformed root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(2-3), 241-247.
- Robins, R., Parr, A., Payne, J., Walton, N., Rhodes, M. C. (1990). Factors regulating tropane-alkaloid production in a transformed root culture of a *Datura candida* × *D. aurea* hybrid. *Planta*, 181(3), 414-422.

- Robins, R., Woolley, J., Ansarin, M., Eagles, J., Goodfellow, B. (1994b). Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures. *Planta*, 194(1), 86-94.
- Robins, R. J., Abraham, T. W., Parr, A. J., Eagles, J., Walton, N. J. (1997). The Biosynthesis of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium*: The Identity of the Intermediates between N-Methylpyrrolinium Salt and Tropinone. *J Am Chem Soc*, 119(45), 10929-10934.
- Robins, R. J., Bachmann, P., Woolley, J. G. (1994c). Biosynthesis of hyoscyamine involves an intramolecular rearrangement of littorine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(6), 615-619.
- Robins, R. J., Bent, E. G., Rhodes, M. J. (1991). Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by *Datura stramonium* L. transformed root cultures : 3. The relationship between morphological integrity and alkaloid biosynthesis. *Planta*, 185(3), 385-390.
- Rocha, P., Stenzel, O., Parr, A., Walton, N., Christou, P., Dräger, B., Leech, M. J. (2002). Functional expression of tropinone reductase I (trl) and hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase (h6h) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. *Plant Science*, 162(6), 905-913.
- Rom, E., Kahana, C. (1993). Isolation and characterization of the *Drosophila* ornithine decarboxylase locus: Evidence for the presence of two transcribed ODC genes in the *Drosophila* genome. *DNA Cell Biol.*, 12(6), 499-508.
- Rothe, G., Dräger, B. (2002). Tropane alkaloids - metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Science*, 163(5), 979-985.
- Rothe, G., Garske, U., Dräger, B. (2001). Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation. *Plant Sci*, 160(5), 1043-1053.
- Rothe, G., Hachiya, A., Yamada, Y., Hashimoto, T., Dräger, B. (2003). Alkaloids in plants and root cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine N-methyltransferase. *Journal of Experimental Botany*, 54(390), 2065-2070.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A. G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S., Sánchez-Serrano, J. J. (1996). Characterization of Three Potato Lipoxygenases with Distinct Enzymatic Activities and Different Organ-specific and Wound-regulated Expression Patterns. *Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 21012-21019.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Salerno, G. L., Curatti, L. (2003). Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? *Trends Plant Sci*, 8(2), 63-69.
- Salim, V., De Luca, V. (2013). Chapter One - Towards Complete Elucidation of Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis Pathway: *Catharanthus roseus* as a Pioneer System. In G.-G. h. Nathalie (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. Volume 68, pp. 1-37): Academic Press.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K.-i., Choi, K.-B., Morishige, T., Fujimoto, H., Yamada, Y. (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 367-372.
- Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richter, A., Jenett-Siems, K., Dräger, B., Asano, N., Gupta, M. P., Correa, M. D., Eich, E. (1998). Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, 49(7), 1989-1995.

- Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W., Cheng, X. (1995). Universal Catalytic Domain Structure of AdoMet-dependent Methyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 247(1), 16-20.
- Schmidt, G. W., Jirschitzka, J., Porta, T., Reichelt, M., Luck, K., Torre, J. C. P., Dolke, F., Varesio, E., Hopfgartner, G., Gershenzon, J., D'Auria, J. C. (2015). The last step in cocaine biosynthesis is catalyzed by a BAHD acyltransferase. *Plant Physiol.*, 167(1), 89-101.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Scholl, Y. (2003). *Gene, Enzyme und Produkte der Calysteginbildung in Calystegia sepium (L.) R. Br.* (Dissertation), Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Scholl, Y., Höke, D., Dräger, B. (2001). Calystegines in Calystegia sepium derive from the tropane alkaloid pathway. *Phytochemistry*, 58(6), 883-889.
- Scholl, Y., Schneider, B., Dräger, B. (2003). Biosynthesis of calystegines: <sup>15</sup>N NMR and kinetics of formation in root cultures of Calystegia sepium. *Phytochemistry*, 62(3), 325-332.
- Sharma, S. K., Bolser, D., de Boer, J., Sønderkær, M., Amoros, W., Carboni, M. F., D'Ambrosio, J. M., de la Cruz, G., Di Genova, A., Douches, D. S., Eguluz, M., Guo, X., Guzman, F., Hackett, C. A., Hamilton, J. P., Li, G., Li, Y., Lozano, R., Maass, A., Marshall, D., Martinez, D., McLean, K., Mejía, N., Milne, L., Munive, S., Nagy, I., Ponce, O., Ramirez, M., Simon, R., Thomson, S. J., Torres, Y., Waugh, R., Zhang, Z., Huang, S., Visser, R. G. F., Bachem, C. W. B., Sagredo, B., Feingold, S. E., Orjeda, G., Veilleux, R. E., Bonierbale, M., Jacobs, J. M. E., Milbourne, D., Martin, D. M. A., Bryan, G. J. (2013). Construction of Reference Chromosome-Scale Pseudomolecules for Potato: Integrating the Potato Genome with Genetic and Physical Maps. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 3(11), 2031-2047.
- Shoji, T., Yamada, Y., Hashimoto, T. (2000). Jasmonate Induction of Putrescine N-Methyltransferase Genes in the Root of Nicotiana sylvestris. *Plant and Cell Physiology*, 41(7), 831-839.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Mauch, F. (2003). Quantification of induced resistance against Phytophthora species expressing GFP as a vital marker:  $\beta$ -aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 237-248.
- Siminszky, B., Gavilano, L., Bowen, S. W., Dewey, R. E. (2005). Conversion of nicotine to nornicotine in Nicotiana tabacum is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(41), 14919-14924.
- Slater, A., Cogan, N. I., Hayes, B., Schultz, L., Dale, M. F., Bryan, G., Forster, J. (2014). Improving breeding efficiency in potato using molecular and quantitative genetics. *Theoretical and Applied Genetics*, 1-14.
- Sonnenwald, S., Sonnewald, U. (2014). Regulation of potato tuber sprouting. *Planta*, 239(1), 27-38.
- Sonnenwald, U., Hajirezaei, M. R., Kossmann, J., Heyer, A., Trethewey, R. N., Willmitzer, L. (1997). Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnology*, 15(8), 794-797.

- Stenzel, O., Teuber, M., Drager, B. (2006). Putrescine N-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta*, 223(2), 200-212.
- Stuhlfelder, C., Lottspeich, F., Mueller, M. J. (2002). Purification and partial amino acid sequences of an esterase from tomato. *Phytochemistry*, 60(3), 233-240.
- Sung, P.-H., Huang, F.-C., Do, Y.-Y., Huang, P.-L. (2011). Functional Expression of Geraniol 10-Hydroxylase Reveals Its Dual Function in the Biosynthesis of Terpenoid and Phenylpropanoid. *J Agric Food Chem*, 59(9), 4637-4643.
- Suzuki, K., Yamada, Y., Hashimoto, T. (1999a). Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol*, 40(3), 289-297.
- Suzuki, K.-i., Yun, D.-J., Chen, X.-Y., Yamada, Y., Hashimoto, T. (1999b). An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Mol Biol*, 40(1), 141-152.
- Tamogami, S., Rakwal, R., Agrawal, G. K. (2008). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(4), 723-727.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., Denarie, J., Rosenberg, C. (1988). A Plasmid of *Rhizobium-Meliloti*-41 Encodes Catabolism of 2 Compounds from Root Exudate of *Calystegium-Sepium*. *Journal of Bacteriology*, 170(3), 1153-1161.
- Teuber, M., Azemi, M. E., Namjoyan, F., Meier, A. C., Wodak, A., Brandt, W., Drager, B. (2007). Putrescine N-methyltransferases--a structure-function analysis. *Plant Mol Biol*, 63(6), 787-801.
- Tiburcio, A., Altabella, T., Bitrián, M., Alcázar, R. (2014). The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta*, 240(1), 1-18.
- Todd, A. T., Liu, E., Polvi, S. L., Pammett, R. T., Page, J. E. (2010). A functional genomics screen identifies diverse transcription factors that regulate alkaloid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 62(4), 589-600.
- Tonfack, L. B., Moummou, H., Latche, A., Youmbi, E., Benichou, M., Pech, J.-C., van der Rest, B. (2011). The plant SDR superfamily: involvement in primary and secondary metabolism. *Curr. Top. Plant Biol.*, 12, 41-53.
- Unno, Y., Shinano, T., Minamisawa, K., Ikeda, S. (2015). Bacterial community shifts associated with high abundance of *Rhizobium* spp. in potato roots under macronutrient-deficient conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 80, 232-236.
- Van Meulebroek, L., Vanden Bussche, J., Steppe, K., Vanhaecke, L. (2012). Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant. *J. Chromatogr. A*, 1260, 67-80.



- Viola, R., Pelloux, J., Van Der Ploeg, A., Gillespie, T., Marquis, N., Roberts, A. G., Hancock, R. D. (2007). Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant, Cell & Environment*, 30(8), 973-983.
- Walters, D. R., Mackintosh, C. A. (1997). Control of plant disease by perturbation of fungal polyamine metabolism. *Physiol Plant*, 100(3), 689-695.
- Wang, X., Chen, M., Yang, C., Liu, X., Zhang, L., Lan, X., Tang, K., Liao, Z. (2011). Enhancing the scopolamine production in transgenic plants of *Atropa belladonna* by overexpressing pmt and h6h genes. *Physiol Plant*, 143(4), 309-315.
- Watson, A. A., Davies, D. R., Asano, N., Winchester, B., Kato, A., Molyneux, R. J., Stegelmeier, B. L., Nash, R. J. (1999). Calystegine Alkaloids in the Potato and Other Food Plants *Natural and Selected Synthetic Toxins* (Vol. 745, pp. 129-139): American Chemical Society.
- Watson, A. A., Fleet, G. W. J., Asano, N., Molyneux, R. J., Nash, R. J. (2001). Polyhydroxylated alkaloids — natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry*, 56(3), 265-295.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G., Waterhouse, P. M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27(6), 581-590.
- Wink, M., Roberts, M. (1998). Compartmentation of Alkaloid Synthesis, Transport, and Storage. In M. Roberts & M. Wink (Eds.), *Alkaloids* (pp. 239-262): Springer US.
- Witte, L., Müller, K., Arfmann, H. A. (1987). Investigation of the Alkaloid Pattern of *Datura innoxia* Plants by Capillary Gas-Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry. *Planta Med*, 53(02), 192-197.
- Woldemariam, M. G., Onkokesung, N., Baldwin, I. T., Galis, I. (2012). Jasmonoyl-l-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-l-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant Journal*, 72(5), 758-767.
- Wu, J., Wang, L., Baldwin, I. (2008). Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? *Planta*, 227(5), 1161-1168.
- Xu, D., Shen, Y., Chappell, J., Cui, M., Nielsen, M. (2007). Biochemical and molecular characterizations of nicotine demethylase in tobacco. *Physiol Plant*, 129(2), 307-319.
- Yamashita, A., Kato, H., Wakatsuki, S., Tomizaki, T., Nakatsu, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., Oda, J. (1999). Structure of tropinone reductase-II complexed with NADP<sup>+</sup> and pseudotropine at 1.9 Å resolution: implication for stereospecific substrate binding and catalysis. *Biochemistry*, 38(24), 7630-7637.
- Yang, C. C., Min, Zeng, L. Z., Lei, Liu, X. L., Xiaozhong, Tang, K. L., Zhihua. (2011). Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing pmt and h6h genes. *Plant Omics Journal*, 4(1), 29-33.
- Yoshihara, T., Amanuma, M., Tsutsumi, T., Okumura, Y., Matsuura, H., Ichihara, A. (1996). Metabolism and Transport of [2-<sup>14</sup>C](±) Jasmonic Acid in the Potato Plant. *Plant and Cell Physiology*, 37(5), 586-590.
- Zabetakis, I., Edwards, R., O'Hagan, D. (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50(1), 53-56.

- Zayed, R., Wink, M. (2004). Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 59(11-12), 863-867.
- Zhang, L., Ding, R. X., Chai, Y. R., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K. M., Xu, T. F., Pi, Y., Wang, Z. N., Zhang, H. M., Kai, G. Y., Liao, Z. H., Sun, X. F., Tang, K. X. (2004). Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6786-6791.
- Zhang, L., Yang, B., Lu, B., Kai, G., Wang, Z., Xia, Y., Ding, R., Zhang, H., Sun, X., Chen, W., Tang, K. (2007). Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing Putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta*, 225(4), 887-896.
- Zhou, Z., Pang, J., Guo, W., Zhong, N., Tian, Y., Xia, G., Wu, J. (2012). Evaluation of the resistance of transgenic potato plants expressing various levels of Cry3A against the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in the laboratory and field. *Pest Manag Sci*, 68(12), 1595-1604.
- Zimmerman, D. C., Feng, P. (1978). Characterization of a prostaglandin-like metabolite of linolenic acid produced by a flaxseed extract. *Lipids*, 13(5), 313-316.
- Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L., Sonnewald, U. (1995). Evidence of the Crucial Role of Sucrose Synthase for Sink Strength Using Transgenic Potato Plants (*Solanum-Tuberosum* L). *Plant Journal*, 7(1), 97-107.

## Wissenschaftliche Beiträge

### Publikationen

Küster, N., Rosahl, S., Dräger, B. Potato plants with genetically engineered tropane alkaloid precursors.

Publikation in Vorbereitung für das Journal *Planta*.

### Vorträge

Küster, N., (2012). Characterization of tropinone reductase I (TRI) in *Solanum tuberosum* and tropinone reductase-like enzymes (TRLs) in *Arabidopsis thaliana*. Tagung der Sektion "Pflanzliche Naturstoffe", Hildesheim.

Küster, N., Rosahl, S., Dräger, B., (2014). Enzymes of nortropane alkaloid biosynthesis in *Solanum tuberosum*. 3<sup>rd</sup> Banff Conference on Plant Metabolism, Banff, Kanada.

### Poster

Küster, N., Blum, E., Rosahl, S., Dräger, B., (2013). *In vivo* significance of tropinone reductases I and II in *Solanum tuberosum*. 61<sup>st</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Münster.

## **Danksagung**

Die hier vorliegende Dissertation wurde im Institutsbereich Pharmazeutische Biologie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg und am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle angefertigt. Besonders danke ich Frau Prof. Birgit Dräger für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die fachliche Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dierk Scheel und Frau Prof. Sabine Rosahl danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, in der Gruppe „Induzierte Pathogenabwehr“ des IPBs zu arbeiten. Für das stetige Interesse an meiner Arbeit, die fachliche Betreuung und konstruktiven Gespräche sowie für die persönliche Unterstützung bedanke ich mich besonders bei Frau Prof. Sabine Rosahl.

Bei Dr. Elke Blum und Dr. Yvonne Sichhart möchte ich mich für die fachlichen Diskussionen in der Startphase meiner Experimente bedanken. Herzlicher Dank gilt Frau Dr. Juliane Mittasch für die fachlichen Gespräche und das kritische Korrekturlesen in der Endphase meiner Promotionszeit. Den Doktoranden der Arbeitsgruppe „Biogene Arzneistoffe“, bestehend aus Dr. Nicole Reinhardt, Dr. Nebojša Jocković, Anne Junker, Sebastian Pietack, Ralph Coppi, Mathias Reisberg, Sabrina Schläger sowie auch Dr. Bettina Rahfeld und Dr. Carsten Milkowski danke ich für die schöne Zeit, die persönlichen und fachlichen Gespräche zwischen dem alltäglichen Laborgeschehen. Für die Unterstützung im technischen Bereich bedanke ich mich bei Anja Wodak.

Großer Dank gilt Dr. Gerd Balcke für die zahlreichen Messungen der Pflanzenhormone. Herzlich möchte ich mich bei Ulrike Smolka für die technische Unterstützung bei den Laborarbeiten bedanken. Den Doktoranden Melanie Dobritzsch, Andreas Matern und Juliane Rausche danke ich für die nette und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor und für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Zuletzt gilt ein herzlicher Dank an meine Familie, die mich auf meinem Weg bis hierhin und in all meinen Vorhaben immer unterstützte.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die hier vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Hilfsmittel und Quellen sowie wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen anderer Arbeiten sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule eingereicht.

Halle (Saale), Juli 2016

---

Nadine Küster

## Lebenslauf

Name: Nadine Küster  
Geburtsdatum: 19.10.1985  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Schwemsaler Str. 30  
06774 Muldestausee, OT Krina

1996-2005 Besuch des Europagymnasiums Walther-Rathenau  
Bitterfeld

2005 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

2005-2009 Pharmaziestudium an der Martin-Luther Universität Halle-  
Wittenberg

11/2009-04/2010 Diplomarbeit am Institut für Pharmazie der Martin-Luther  
Universität Halle-Wittenberg in der AG Biogene  
Arzneistoffe unter Leitung von Frau Prof. Dr. Birgit Dräger

05/2010-10/2010 Pharmaziepraktikum in der Stephanus-Apotheke, Halle

10/2010 Diplom-Pharmazeutin, „Klonierung und Charakterisierung  
von Spermidinsynthesemutanten aus *D. stramonium* und  
*A. thaliana*“

11/2010 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin

01/2011-04/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie  
der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg in der AG  
Biogene Arzneistoffe unter Leitung von Frau Prof. Dr.  
Birgit Dräger

01/2011-07/2015 Gastwissenschaftlerin am Leibniz-Institut für  
Pflanzenbiochemie in Halle, Abteilung Stress- und  
Entwicklungsbiologie, AG Induzierte Pathogenabwehr  
unter Betreuung von Prof. Dr. Sabine Rosahl

seit 09/2015 Elternzeit