

Die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese und deren Verbreitung in Pflanzen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der

Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Jörg Schwender

aus Saarbrücken

1999

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November 1999
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. K. Lichtenthaler
Korreferent: Prof. Dr. T. J. Bach

DANK

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung und Förderung während meines Studiums und meiner Promotion. Auch möchte ich meiner Frau Gabriela danken für ihr Verständnis, welches sie dem mit meiner Tätigkeit verbundenen Zeitaufwand entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. K. Lichtenthaler möchte herzlich ich danken für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation am Lehrstuhl Botanik II anzufertigen, für seine ständige großzügige Förderung und für wesentliche wissenschaftliche Anregungen und eingehende Diskussionen. Auch für das Ermöglichen der Teilnahme an vielen wissenschaftlichen Tagungen im In- und Ausland möchte ich ihm vielmals danken.

Herrn Prof. Dr. M. Rohmer, Université Louis Pasteur, Strasbourg, danke ich für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. F. W. Lichtenthaler, Universität Darmstadt, danke ich für die Synthese Deuterium-markierter 1-Desoxy-Xylulose und Diskussionen über NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. T. J. Bach, Strasbourg, danke ich für die Übernahme des Korreferates und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Danken möchte ich Frau Andrea Disch, Arbeitsgruppe M. Rohmer, Strasbourg, die einen wesentlichen Teil der NMR-Messungen und Auswertungen durchgeführt hat, für gute Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Dr. H. Röttele, Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe, welcher einen anderen Teil der NMR-Messungen durchgeführt hat.

Frau S. Zeiler, Botanik II Karlsruhe, danke ich sehr für die von ihr übernommenen Arbeiten, insbesondere den Southern- und western-Blots.

Frau S. Hübner, Botanik II Karlsruhe, danke ich für ihre Mithilfe u. a. bei der Präparation von über 500 Gersten-Embryonen.

Herrn Dr. R. Wejnar, Universität Jena, danke ich für die von ihm erhaltenen aseptischen Kulturen von *Lemna gibba*.

Herrn Dr. M. Goldschmidt-Clermont, Universität Genf, danke ich für die Bereitstellung einer *Chlamydomonas* cDNA-Bibliothek und des Bakterienstammes *E. coli* BHB2600.

Bei den Mitarbeitern von Botanik II, besonders bei meinen Mitdoktoranden Johannes Zeidler und Christian Müller sowie bei Herrn Dr. M. Focke bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Diese Arbeit wurde durch eine DFG-Forschungsbeihilfe an Prof. Dr. H. K. Lichtenthaler (Li 119/19-1) gefördert.

Abkürzungsverzeichnis	V
English Summary	VII
1 Einführung	1
1.1 Die „Biogenetische Isoprenregel“ und Vielfalt der Isoprenoide	1
1.2 Addition der Isopreneinheiten zu Prenylketten	3
1.3 Subzelluläre Biosynthesekompartimente Pflanzlicher Isoprenoide	3
1.4 Bildung von IPP nach dem Acetat/Mevalonat-Weg	4
1.5 Alternativer IPP-Biosyntheseweg	6
1.6 Problemstellung	9
2 Methoden	11
2.1 Einbauexperimente	11
2.1.1 Für Markierungsexperimente verwendete Grünalgen.....	11
2.1.2 ¹³ C- und ² H- markierte Substrate	11
2.1.3 Markierung von Grünalgen mit [1- ¹³ C]-Glucose und [3- ¹³ C]-Pyruvat.....	12
2.1.4 Einbau ¹³ C-markierter Glucose in Isoprenoide höherer Pflanzen.....	12
2.1.5 Einbau von [1- ² H ₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2- ¹³ C]Mevalonsäurelacton in Isoprenoide von Algen und höheren Pflanzen	16
2.2 Gewinnung verschiedener Prenyllipide und der Fettsäuren aus Pflanzen- geweben für die NMR-Analytik und für GC-MS	17
2.2.1 Extraktion der Lipide aus Pflanzengeweiben für die NMR-Analytik.....	17
2.2.2 Lipid-Fractionen für die GC-MS-Analyse	17
2.2.3 Gewinnung von Phytol, Sterolen, β-Carotin und Lutein.....	18
2.2.4 Gewinnung von Fettsäuren.....	18
2.2.5 Extraktion und Aufreinigung der Lipide aus den Grünalgen <i>Scenedesmus</i> , <i>Chlamydomonas</i> und <i>Chlorella</i>	18
2.2.6 Extraktion und Reinigung der Lipide aus <i>Lemna gibba</i>	19
2.2.7 Extraktion und Reinigung der Lipide aus <i>Hordeum vulgare</i>	19
2.2.8 Extraktion und Reinigung der Lipide aus <i>Daucus carota</i>	20
2.2.9 Extraktion und Reinigung des Lycopins aus Tomatenfrüchten	20
2.3 Identifizierung und Analyse der Isotopenmarkierung der Isoprenoide, Fettsäuren und langkettigen Alkohole	21
2.4 Molekulargenetische Methoden	26
2.4.1 Anzucht von Algen und Pflanzen	26
2.4.2 Zur Klonierung verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	26
2.4.3 Medien für Bakterien.....	26
2.4.4 Vermehrung von λ-Phagen.....	27
2.4.5 Isolierung von DNA.....	28
2.4.6 Isolierung von RNA	29
2.4.7 cDNA aus <i>Arabidopsis</i> -RNA.....	29
2.4.8 Fällung von Nucleinsäuren	29

2.4.9	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.4.10	Quantifizierung von Nukleinsäuren	30
2.4.11	Markierung von DNA mit Digoxigenin (DIG-11-UTP)	31
2.4.12	Southern-Blot Analyse	31
2.4.13	Plauehybridisierung	34
2.4.14	Restriktionsverdau	35
2.4.15	Dephosphorylierung von DNA	35
2.4.16	Klonierungsmethoden	35
2.4.17	Ligation	35
2.4.18	Genetische Transformation durch Elektroporation	36
2.4.19	Sequenzierung von DNA	36
2.4.20	Sequenzanalysen	36
2.4.21	Standard-PCR	36
2.4.22	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Markierungsexperimente mit einzelligen Grünalgen	39
3.1.1	Einbau von [3- ¹³ C]-Pyruvat in Phytol von <i>Scenedesmus obliquus</i>	39
3.1.2	Einbau von [1- ¹³ C]-Glucose in <i>Chlorella fusca</i> und <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	40
3.1.3	Einbau von [1- ² H ₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2- ¹³ C]-Mevalonsäurelacton in Grünalgen	41
3.1.4	Zusammenfassung: Markierungsexperimente mit Grünalgen	43
3.2	Markierungsexperimente mit höheren Pflanzen	44
3.2.1	Einbau von [1- ¹³ C]-Glucose in Isoprenoide grüner Pflanzengewebe	44
3.2.2	Einbau von [1- ¹³ C]-Glucose und [U- ¹³ C ₆]-Glucose in Lycopin reifender To... ..	45
3.2.3	Einbau von [1- ² H ₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2- ¹³ C]-Mevalonsäurelacton in <i>Lemna gibba</i>	47
3.2.4	Einbau von [1- ² H ₁]-1-Desoxy-D-Xylulose in ergrünende Gerstenkeimlinge	48
3.2.5	Zusammenfassung: Einbauversuche mit höheren Pflanzen	48
3.3	Klonierung der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	49
3.3.1	DXS-spezifische Oligonukleotide und Digoxigenin-markierte Sonde	49
3.3.2	Durchsuchen der <i>Chlamydomonas</i> -cDNA-Bibliothek	49
3.3.3	Sequenzierung des Klones 6/1	50
3.3.4	Heterologe Expression des Klones 6/1 in <i>E. coli</i>	54
3.4	Klonierung der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
3.4.1	Klonierung der DXR aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
3.4.2	Heterologe Expression der DXR aus <i>A. thaliana</i> in <i>E. coli</i>	62
4	Diskussion	65
4.1	Isoprenoidbiosynthese in Grünalgen	68
4.1.1	IPP-Biosynthese in <i>Scenedesmus</i>	68
4.1.2	Einbau von [1- ¹³ C]-Glucose in Isoprenoide von <i>Chlorella fusca</i> und <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	72

4.1.3	Vorkommen der IPP-Biosynthesen über 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat und Mevalonsäure in Grünalgen	72
4.2	Isoprenoidbiosynthese in höheren Pflanzen	75
4.2.1	Isoprenoidbiosynthese in grünen Geweben.....	75
4.2.2	Lycopinbiosynthese in reifenden Tomatenfrüchten.....	77
4.3	Klonierung und heterologe Expression der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-synthase (DXS) aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.....	80
4.4	Klonierung und heterologe Expression der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) aus <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	84
4.5	Zusammenfassung: Bisher bekannte Schritte der IPP-Biosynthese über DOXP	86
4.6	Diskussion weiterer Literatur über die alternative IPP-Biosynthese	87
4.6.1	Vergleich der neuen Erkenntnisse über die plastidäre IPP-Biosynthese in Pflanzen mit älterer Literatur	87
4.6.2	Neuere Ergebnisse über die alternative IPP-Biosynthese in höheren Pflanzen....	90
4.6.3	Bildung der isoprenoiden Ubichinon-Seitenkette in höheren Pflanzen	94
4.6.4	DOXP-Weg in Bakterien, Cyanobakterien und eukaryotischen Algen	95
4.6.5	Acetat/Mevalonat-Weg in Pilzen und Mammalia.....	97
4.6.6	1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat als IPP-Vorstufe	97
4.6.7	2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat als weitere IPP-Vorstufe	99
4.6.8	Weitere Intermediate des DOXP-Weges	100
4.7	Ausblick:	101
5	Zusammenfassung.....	103
Literatur		109
Anhang A NMR-Tabellen		123
Anhang B GC/MS-Daten		157
Anhang C Publikationen unter Mitwirkung des Autors		167

Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	copyDNA
CoA	Coenzym A
CDP	disodium 4-chloro-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'- (5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan]-4-yl) phenyl phosphate
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DIG	Digoxygenin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DOX	1-Desoxy-D-Xylulose
DOXP	1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	(Ethyldinitrilo)tetraessigsäure
FPP	Farnesylpyrophosphat
g	Erdbeschleunigung g
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektroskopie
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IPP	Isopentenylidiphosphat
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektroskopie
MVA	Mevalonsäure
MVL	Mevalonsäurelacton
NMR	Magnetische Kernresonanz
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
P	Phosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction
pfu	Plaque-bildende Einheit (Plaque-forming unit)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	Bromochloroindolylgalaktosid

English Summary

Introductory Remarks

Isopentenyl diphosphate (IPP) is the common C₅ building block of isoprenoids. Since 1958, the only known pathway for the formation of IPP was the **acetate/mevalonate pathway**. It was generally accepted, that all organisms use this pathway for the formation of IPP and isoprenoids. Between 1993 and 1995, however, an alternative IPP pathway was detected first in several eubacteria by M. Rohmer (biosynthesis of ubiquinone and hopanoids), in the green alga *Scenedesmus obliquus* (in a joint investigation of J. Schwender, H. K. Lichtenthaler and M. Rohmer) and in *Ginkgo biloba* (biosynthesis of the diterpene ginkgolide A, by M. K. Schwarz and D. Arigoni).

In his experimental diploma thesis of 1995, J. Schwender at Botany II Karlsruhe performed ¹³C-labeling experiments which exhibited the following main characteristics of the IPP-formation in the green alga *Scenedesmus obliquus*: A C₂-unit (obviously derived from pyruvate by decarboxylation) is added to triosephosphate (possibly glyceraldehyde-3-phosphate). The resulting product with 5 carbon atoms undergoes a C-C rearrangement to form the branched carbon skeleton of IPP.

Objective

It was the aim of this Ph. D. thesis of J. Schwender, to describe the occurrence of the new and alternative pathway for IPP and isoprenoid biosynthesis in plants as well as to elucidate the biosynthetic steps of this pathway in plants in more detail. By using different stable isotope labeling techniques, the biosynthesis of plastidic isoprenoids such as phytol (side-chain of chlorophylls), carotenoids, plastoquinone-9 and of the cytoplasmic sterols was investigated in green algae and several higher plants. In addition to the labeling experiments, it was attempted to clone possible genes of this alternative IPP pathway of plants.

Applied Methods

A) Stable Isotope Labeling Techniques:

1. Green algae and higher plants were grown heterotrophically under aseptic conditions on [1-¹³C]-glucose (10 % ¹³C-enrichment at C-1). Phytol (side-chain of chlorophylls), β-carotene, lutein, plastoquinone-9 and the major sterol components were isolated (chapter 2.1.3, 2.1.4, 2.2). The ¹³C-enrichment of all carbon positions of each isoprenoid was analysed using ¹³C-NMR spectroscopy. This allowed to identify the incorporation of [1-¹³C]-glucose into the particular isoprenic units of various isoprenoids. According to the acetate/mevalonate pathway, the isoprenic units (IPP) should have been labelled at the C-atoms C-2, C-4 and C-5, whereas a labeling via the alternative IPP-pathway should mark at C-1 and C-5 of IPP.

2. Green algae and higher plants were grown autotrophically. [2-¹³C]-Mevalonate or the possible IPP-precursor 1-deoxy-D-xylulose (deuterium-labelled at C-1) were applied to the growing cultures. After growth for several days, phytol and sterols were isolated by TLC and analysed using GC/MS (Chapter 2.1.5, 2.2). The incorporation rate of the labelled precursors into phytol and the different sterols was determined from the respective mass spectra.

B) Cloning Techniques (Chapter 2.4)

Cloning of the two first genes of the alternative IPP-pathway was possible by using the corresponding gene sequences from *E. coli*. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) was isolated from a *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA library. A partial cDNA for 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) was cloned from *Arabidopsis thaliana* by a PCR based method.

Results

1) Isoprenoid Biosynthesis in Green Algae (Chapters 3.1 and 4.1)

The green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella fusca* were grown heterotrophically on [1-¹³C]-glucose. For plastidic isoprenoids (phytol, β-carotene, lutein) as well as for the cytoplasmic sterols, only one common labeling pattern of isoprenic C₅-units was found which indicated that IPP had been formed according to the alternative non-mevalonate IPP pathway.

In precedent studies, ¹³C-labeling experiments with the green alga *Scenedesmus obliquus* had shown, that different plastidic isoprenoids and cytoplasmic sterols are formed via the alternative IPP pathway. The incorporation of glucose, ¹³C-labelled at different positions, lead to the following mechanism: the first precursor of IPP is formed by the addition of a C₂-unit (most possibly derived from pyruvate by decarboxylation) to triosephosphate (possibly glyceraldehyde-3-phosphate). The resulting C₅-product would possibly be the pentulose 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. This proposed mechanism was then confirmed by the incorporation of ¹³C-labelled pyruvate and of ²H-labelled 1-deoxy-D-xylulose into isoprenoids of *Scenedesmus obliquus*: After [3-¹³C]-pyruvate was added to the culture medium, all isoprenic units of phytol were labelled at C-5, which is in agreement with the assumption, that C-3 and C-5 of the isoprenic units stem from pyruvate. In addition, [1-²H₁]-1-deoxy-D-xylulose was incorporated at good rates into phytol and sterols of *Scenedesmus obliquus* and the mass spectra of phytol unequivocally indicated that the deuterium-label occurred at four positions of this diterpenic isoprenoid. The first step of IPP biosynthesis was also confirmed by the isolation of a cDNA from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, which codes for the first enzyme of this pathway, the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS).

The occurrence of the non-mevalonate IPP pathway was further investigated for representatives of different green algal classes. These were grown in the presence of [1-²H₁]-1-deoxy-D-xylulose or [2-¹³C]-mevalolactone. The labelled phytol and sterols were analyzed by GC/MS. For the Chlorophyceae (*Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*) and the Ulvophyceae (*Gloeotilopsis planctonica*), incorporation of [1-²H₁]-1-deoxy-D-xylulose was observed into phytol and into sterols with equal rates, whereas [2-¹³C]-mevalolactone was not incorporated. Obviously plastidic isoprenoids as well as cytosolic sterols are formed in these organisms via the alternative IPP pathway. In contrast, in two representatives of the Charophyceae (*Klebsormidium flaccidum*, *Spirogyra* sp.) mevalonic acid was incorporated into the sterols, whereas [1-²H₁]-1-deoxy-D-xylulose was incorporated mainly into phytol. This indicated that Charophytes form the plastidic isoprenoids via DOXP, whereas the cytosolic sterols are formed via the classical acetate/mevalonate pathway. This strongly suggests that the DOXP pathway is located in the plastidic compartment, whereas in the cytoplasm IPP biosynthesis is formed via mevalonate. This compartmentalization with two parallel and separate IPP synthesis pathways was also found in higher plants (see below). From the incorporation studies with members of different classes of green algae it can be concluded, that the progenitors of the land plants and of the green alga used the DOXP

pathway for IPP biosynthesis in plastids and the acetate/mevalonate pathway in the cytoplasm. This compartmentalization was maintained in the Charophyte/Embryophyta-lineage, whereas the cytoplasmic acetate/mevalonate pathway was lost in the Chlorophyceae/Ulvophyceae-lineage.

2) Isoprenoid Biosynthesis in Higher Plants (Chapters 3.2 and 4.2)

Three higher plants were investigated by incorporation of [1-¹³C]-glucose into isoprenoids and subsequent analysis of the labeled isoprenoids with ¹³C-NMR spectroscopy. For heterotrophic growth on glucose, duckweed cultures (*Lemna gibba* L.), green callus cultures of *Daucus carota* (L.) and barley embryo cultures were used. The plants/tissues were grown under low-light conditions on media containing glucose as a carbon source. This allowed greening of the plants, but did not allow a substantial contribution of photosynthesis to plant growth and biomass formation. After isolation of isoprenoids from the labelled plant material, the isoprenoids phytol, β-carotene, lutein, plastoquinone-9 and the main sterol components of *Lemna gibba* as well as phytol and sterols from *Daucus carota* and *Hordeum vulgare* were analyzed by ¹³C-NMR spectroscopy. In all three plants, the plastidic isoprenoids were labelled according to the DOXP pathway, whereas the sterols were labelled via the acetate/mevalonate pathway. In addition, *Lemna gibba* incorporated [1-²H₁]-1-deoxy-D-xylulose mainly into phytol, whereas [2-¹³C]-mevalolactone was mainly incorporated into the sterols. The incorporation studies indicated, that in Higher Plants IPP, which is formed via the plastidic DOXP pathway, contributes to about 20 to 30 % to the cytoplasmic isoprenoid formation. Taken together, all three higher plants form plastidic isoprenoids via the DOXP pathway, whereas cytoplasmic sterols are formed predominantly via the acetate/mevalonate pathway.

In addition to green plant tissues, the biosynthesis of a secondary carotenoid (lycopene) which is formed in chromoplasts of tomatoes was investigated. Aqueous solutions of [1-¹³C]-glucose and [U-¹³C₆]-glucose were injected into small fully developed tomato fruits being at the starting point of lycopene biosynthesis (at the beginning of the colour change from green to red). Lycopene was isolated by TLC from the ripe, red fruits and was analyzed by ¹³C-NMR spectroscopy. From the resulting ¹³C-labeling pattern it was unequivocally deduced, that lycopene is formed via the DOXP pathway of IPP formation.

As a result of all the different incorporation experiments described here, it has been shown that plastids of higher plants form IPP independently from the cytoplasm via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, i. e. via the non-mevalonate DOXP-pathway for IPP formation. The existence of the DOXP-pathway in plastids explains, why so far in literature a clear proof for the existence of the acetate/mevalonate pathway in plastids was missing and why many older labeling results of plant isoprenoids were in contradiction to the use of the acetate/mevalonate pathway for the biosynthesis of plastidic isoprenoids.

3) Cloning and Heterologous Expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chapters 3.3 and 4.3)

As mentioned above, *Chlamydomonas reinhardtii* forms plastidic and cytoplasmic isoprenoids via the alternative DOXP pathway of IPP formation. In addition to the experiments which showed, that pyruvate and 1-deoxy-D-xylulose are precursors of IPP in green algae, an enzyme which forms 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate from pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate was cloned from *Chlamydomonas reinhardtii*. A 3.2 Kbp cDNA clone was isolated from a *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA library. The cDNA encodes a protein, which has homology to the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) of *E. coli* and to homologous open reading frames of other organisms. The polypeptide has a length of 735 amino acids, including a N-terminal putative presequence for plastid targeting. By

expression of the cDNA in *E. coli* it was shown, that the encoded protein is capable to form 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate from pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate. Southern-blot analysis revealed that the DXS of *Chlamydomonas reinhardtii* obviously is a single copy gene.

4) Cloning and Heterologous Expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana* (Chapters 3.4 and 4.4)

The second enzyme of the alternative IPP-biosynthesis is the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR). By database search, a genomic sequence of *Arabidopsis thaliana* was found, which has sequence homology to the *E. coli* DXR. By using a PCR-based cloning strategy, a corresponding cDNA fragment (1.3 Kbp) was obtained. The fragment encodes a polypeptide with 405 amino acids. After expression in *E. coli*, it was shown that the recombinant protein catalyzes the transformation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate. The reaction is NADPH-dependent and can be fully inhibited by micromolar concentrations of fosmidomycin, an inhibitor of the biosynthesis of plastidic isoprenoids.

5) The New Results in the Light of Older Literature (Chapter 4.6)

The existence of the mevalonate-independent DOXP-pathway of IPP formation in plastids, as demonstrated here, is supported by many findings in the older literature between 1960 and 1990. Thus, incorporation studies in different higher plants showed, that isotope labelled mevalonic acid is incorporated into sterols at good rates, whereas plastidic isoprenoids (β -carotene, chlorophyll, plastoquinone-9) were not or only poorly labelled. Many authors tried to measure activities of the enzymes of the acetate/mevalonate pathway in isolated plastids, but the existence of this pathway in plastids could never be shown with clear certainty.

As discussed in chapter 4.6.2, the alternative DOXP pathway of IPP formation is also used for the biosynthesis of many plant monoterpenes and diterpenes, as documented in the meantime by other research groups. Many sesquiterpenes have been investigated and were found to be formed via the acetate/mevalonate pathway. The major part of these results are in agreement with the model which is proposed in this thesis: In higher plants, the isoprenoid biosynthesis in the plastid compartment is fed from the plastidic DOXP pathway for IPP-biosynthesis and the cytosolic isoprenoid biosynthesis (sterols) from the acetate/mevalonate pathway.

Outlook

The two enzymes of the DOXP pathway (DXS and DXR), which have been described in this thesis, need further biochemical and genetic characterization. The regulation of these enzyme activities may be dependent on the development state of plants and may also be tissue-specific.

Several intermediates of the non-mevalonate DOXP pathway as well as the corresponding genes and enzymes are not yet identified. Each enzyme of this DOXP pathway of IPP formation can be a novel target for herbicides. In addition, overexpression of enzymes of this pathway in crop plants may result in an enhancement of the content e. g. of α -tocopherol or vitamin K₁ or β -carotene (provitamin A).

In the frame of the general regulation of isoprenoid biosynthesis in plants, further studies on the cross-talk between the plastidic and the cytosolic IPP-biosynthesis may yield interesting information on the regulation of the cellular metabolite flow.

1 Einführung

Aus dem Einbau von [1-¹⁴C]-, und [2-¹⁴C]-Acetat in das Lycopin reifender Tomaten zog Irving Zabin im Jahr 1957 in Bezug auf die Bildung der Isopreneinheiten des Lycopin folgende Bilanz: „It may be that the mechanism of formation of lycopene in tomatoes and in other plants has no relation to the formation of isoprenoid compounds in animal tissues.“ (ZABIN, 1957). Erst etwa 40 Jahre später zeigte sich, daß Zabin mit seiner Vermutung recht hatte. Wie in der vorliegenden Arbeit unter anderem auch für die Lycopin-Biosynthese in reifenden Tomaten gezeigt, werden die Isopreneinheiten vieler pflanzlicher Isoprenoide nicht wie bei Tieren und Pilzen aus Acetyl-CoA über Mevalonsäure gebildet, sondern über einen völlig anderen alternativen Biosyntheseweg. Das von Zabin 1957 beobachtete Verhältnis des Einbaues von [2-¹⁴C]-, und [1-¹⁴C]-Acetat in Lycopin von 5,5:1 deutete darauf hin, daß Acetat nicht direkte Vorstufe der Isopreneinheiten ist¹, da das über Mevalonsäure gebildete Lycopin im Verhältnis 3:2 aus C-2 bzw. C-1 des Acetat bestehen würde. Wie in dieser Arbeit beschrieben, wird Lycopin in reifenden Tomaten tatsächlich nach einem Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg für Isopentenyl Pyrophosphat gebildet.

1.1 Die „Biogenetische Isoprenregel“ und Vielfalt der Isoprenoide

In der chemischen Struktur vieler Naturstoffe kann man Isopren (2-Methyl-1,3-butadien, C₅H₈) als Grundeinheit erkennen. Terpene oder Isoprenoide sind solche Substanzen, die aus Isopren-Einheiten aufgebaut sind (WALLACH, 1885). Mit der „Biogenetischen Isoprenregel“ formulierte man die Annahme, daß in der Biosynthese der Isoprenoide biologische Isopreneinheiten miteinander verknüpft werden (RUZICKA *et al.*, 1953). Wenig später wurde Isopentenylpyrophosphat² (IPP, Abbildung 1-1) als biologische Isopreneinheit identifiziert (LYNEN *et al.*, 1958a; LYNEN, 1959; BLOCH *et al.*, 1959).

Daß die Isoprenoidbiosynthese universell von Isopentenylpyrophosphat (IPP) ausgeht, d. h. daß IPP auch in Pflanzen die Vorstufe aller Isoprenoide ist, scheint sicher. Wenn es auch wenige Nachweise über den *in-vitro* Einbau von markiertem IPP in pflanzliche Isoprenoide gibt, so ist der Weg der pflanzlichen Isoprenoidbiosynthese von der IPP-Isomerase über die Prenyltransferasen und beispielsweise die Phytoensynthase und weitere Enzyme der Carotinoidbiosynthese sehr gut dokumentiert (siehe z. B. BRITTON *et al.*, 1998).

Die biologischen Isopren-Einheiten können in unterschiedlicher Anzahl linear verknüpft und die isoprenoide Grundstruktur anschließend modifiziert werden (z. B. Zyklisierung, Oxydation). Dies ist Grundlage für das Vorkommen einer kaum überschaubaren Anzahl und Vielfalt an isoprenoiden Naturstoffen. Man unterscheidet Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Tri- (C₃₀), Tetra- (C₄₀) und Polyterpene (>C₄₀).

Von den zahlreichen pflanzlichen Isoprenoiden seien nur einige Beispiele genannt. Isopren selbst wird von vielen Pflanzen gebildet und in für die Umwelt bedeutsamen Mengen freigesetzt (EVANS *et al.*, 1982). Von den Mono-, Sesqui- und Diterpenen sind viele Bestandteile ätherischer Öle, welche in Blättern in epidermalen Öldrüsen oder Ölbehältern akkumuliert werden (CANE, 1981; CROTEAU, 1981). Viele Phytoalexine (Substanzen der pflanzlichen Pathogenabwehr) haben Sesqui- oder Diterpen-Struktur (WEST, 1981). Zu den Triterpenen zählen die Sterole, Triterpensaponine (pentacyclische glycosidierte Triterpene)

¹ Eine genauere Erläuterung hierzu findet sich im Diskussionsteil auf S. 89

² Nach neuerer Nomenklatur auch Isopentenylidiphosphat, IDP.

oder Herzglycoside (tetracyclische glycosidierte Triterpene) (HESS, 1991). Carotinoide sind Tetraterpene, welche viele Früchte und Blüten färben. Chlorophylle (Phytol-Seitenkette), Phyllochinon-K₁ (Naphthochinon-Ring mit Phytol-Seitenkette), Carotinoide und Plastochinon-9 (Benzochinon-Ring mit Nonaprenyl-Seitenkette) sind essentielle Bestandteile der photosynthetisch aktiven Membranen der Chloroplasten (LICHTENTHALER und PARK, 1963, LICHTENTHALER und CALVIN, 1964). Unter dem Begriff Prenyllipide werden unter anderen die Sterole und Carotinoide (reine Prenyllipide) sowie die Chlorophylle, das Plastochinon-9, Ubichinon und α -Tocopherol (gemischte Prenyllipide) zusammengefasst (LICHTENTHALER, 1977; GOODWIN, 1977).

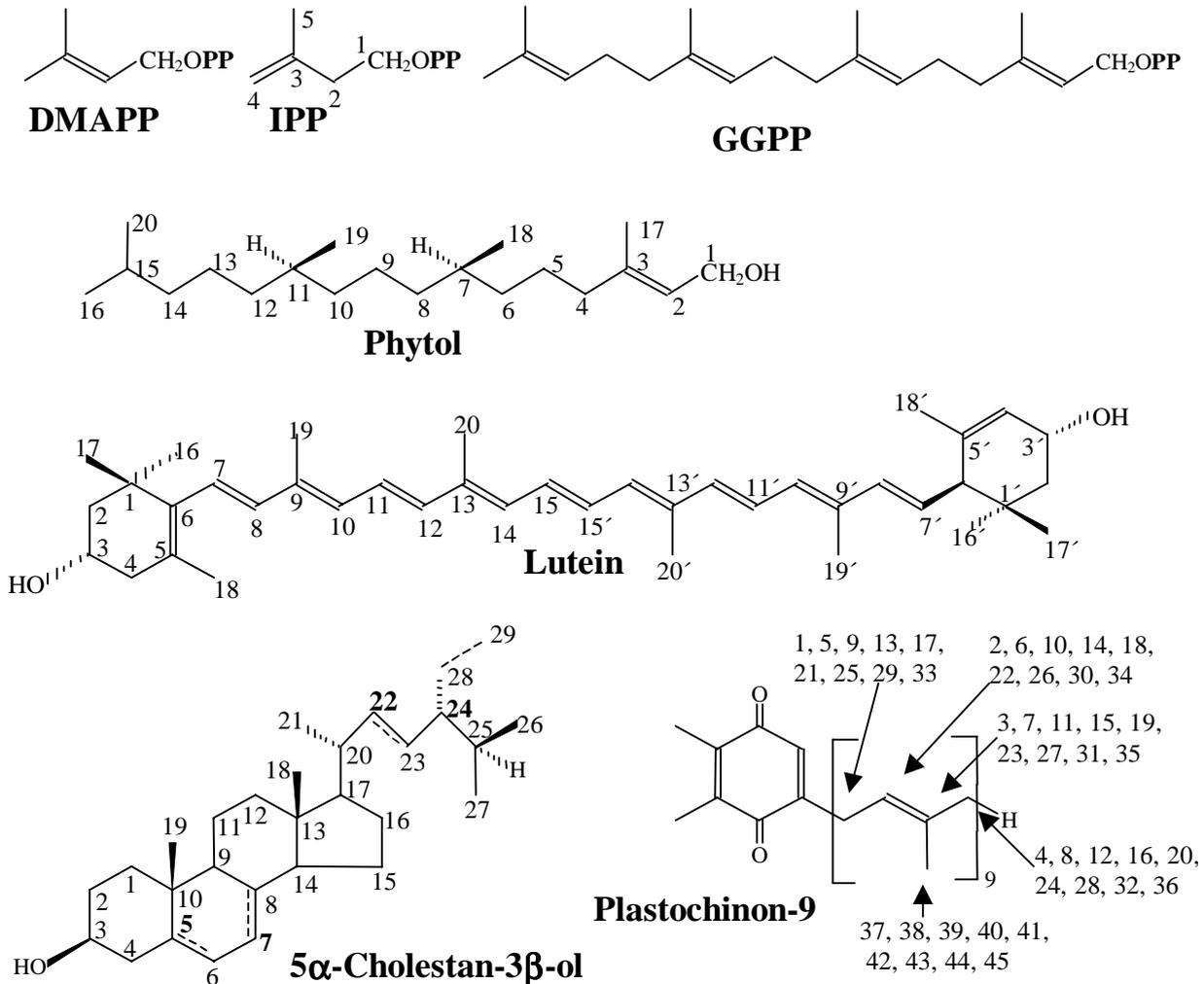


Abbildung 1-1 Einige pflanzliche Isoprenoide mit der in dieser Arbeit verwendeten Nummerierung der C-Atome. Isopentenyl diphosphat (IPP), Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) und Geranylgeranyl diphosphat (GGPP) als Isoprenoid-Vorstufen sind dargestellt. Für die Sterole ist die Grundstruktur 5 α -Cholestan-3 β -ol gezeigt mit den bei verschiedenen Sterolen möglichen Doppelbindungen (Δ^5 , Δ^7 , Δ^{22}) und der möglichen Methyl- oder Ethyl-Gruppe an C-24.

In den Mitochondrien findet sich Ubichinon als Bestandteil der Atmungskette, dessen isoprenoide Seitenkette in Pflanzen meist aus 9 oder 10 Isopreneinheiten besteht (Ubichinon Q-9, Q-10) (LICHTENTHALER, 1980; SCHINDLER und LICHTENTHALER, 1982).

Zu den Polyterpenen gehören die Polyprenole und Dolichole, beides ungesättigte Prenole welche in zahlreichen höheren Pflanzen vorkommen und aus bis zu 50 Isopreneinheiten bestehen (JANKOWSKI *et al.*, 1994). Wirtschaftlich bedeutsam sind die aus bis zu mehreren

tausend Isopreneinheiten bestehenden Polymere Kautschuk (Poly-cis) und Guttapercha (Poly-trans) (BENEDICT, 1983).

Die Prenylierung von Proteinen mit Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Resten spielt sowohl in tierischen wie auch in pflanzlichen Zellen eine wichtige regulatorische Rolle z. B. im Zellzyklus (GLOMSET *et al.*, 1990; CRICK *et al.*, 1997).

Zahlreiche von Pflanzen erzeugte Isoprenoide sind von wirtschaftlicher und pharmakologischer Bedeutung.

1.2 Addition der Isopreneinheiten zu Prenylketten

Aus Isopentenylpyrophosphat (IPP) entsteht über IPP-Isomerase das allylische Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, Abbildung 1-1). Dieses ist das Startermolekül für die Bildung von Prenylketten. Hierbei wird zunächst die Diphosphatgruppe des DMAPP abgespalten. Das entstehende allylische Kation addiert an die Doppelbindung eines IPP und nach Eliminierung eines Protons entsteht Geranylpyrophosphat (C_{10} , GPP). In analoger Weise kann das allylische GPP mit IPP zu Farnesylpyrophosphat (C_{15} , FPP) und dieses weiter zu Geranylgeranylpyrophosphat (C_{20} , GGPP, Abbildung 1-1) verlängert werden. FPP oder GGPP können weiter verlängert werden bis zu den aus hunderten von C-Atomen bestehenden Polyprenylketten von Kautschuk oder Guttapercha. Für die Biosynthesen der jeweiligen Prenyl-Pyrophosphate bestehen im allgemeinen spezifische Enzyme wie z. B. GPP-Synthase, FPP-Synthase und GGPP-Synthase (siehe z. B. GRAY, 1987; GERSHENZON und CROTEAU, 1993; OGURA und KOYAMA, 1998)

Neben dieser „Kopf-Schwanz-Addition“ (1'-4'-Addition) von IPP an allylische Prenylpyrophosphate können FPP und GGPP dimerisiert werden („Schwanz-Schwanz-Addition“). So entsteht aus zwei Molekülen FPP das Squalen ($2 \times C_{15} = C_{30}$) als Vorstufe der Sterole und cyclischer Triterpene sowie aus zwei Molekülen GGPP das 15-cis-Phytoen ($2 \times C_{20} = C_{40}$) als Vorstufe der Carotinoide. Allylische Prenylpyrophosphate können auch an nicht-isoprenoide Moleküle addiert werden und es entstehen prenylierte Substanzen wie z. B. Chlorophylle *a* und *b* (Phytol-Seitenkette) und Plastochinon-9 (Nonaprenyl-Seitenkette).

1.3 Subzelluläre Biosynthesekompartimente Pflanzlicher Isoprenoide

- *Sesquiterpene und Sterole*

Als der Syntheseort der Sesqui- und Triterpene wird allgemein das cytosolische Kompartiment angesehen (GRAY, 1987). FPP-Synthase, welche für die Sesqui- und Triterpenbiosynthese benötigt wird, wurde in mehreren Pflanzen als cytosolisches Enzym charakterisiert (GRAY, 1987). In *Arabidopsis thaliana* werden drei FPP-Synthase-Isoformen exprimiert, von welchen offensichtlich zwei im Cytosol lokalisiert sind und eine in den Mitochondrien (CUNILLERA *et al.*, 1996; 1997). Sesquiterpen-Synthasen gelten ebenfalls als cytosolische Enzyme (BOHLMANN *et al.*, 1998). In den cytosolischen Phospholipid-Membransystemen eukaryontischer Zellen (Plasmalemma, Tonoplast, Endoplasmatisches Retikulum) finden sich die Sterole (Triterpenderivate) als essentielle membranstabilisierende Bestandteile (OURISSON, 1994), welche jedoch nicht in den Plastiden vorkommen (MERCER und TREHARNE, 1966; EICHENBERGER und MENKE, 1966; EICHENBERGER, 1977). Das Fehlen von Sterolen in den Plastiden spricht gegen deren Biosynthese in diesem Kompartiment. Aufgrund der genannten Argumente kann die Biosynthese der Sesqui- und Triterpene in

höheren Pflanzen allgemein dem cytosolischen Kompartiment höherer Pflanzen zugeschrieben werden.

Untersuchungen über die Lipidzusammensetzung von Plasmamembranfraktionen aus *Dunaliella salina* sprechen dafür, daß auch in einzelligen Grünalgen die Sterole nur in cytosolischen Membranen vorkommen (SHEFFER *et al.*, 1986, PEELER *et al.*, 1989).

- **Mono-, Di- und Tetraterpene**

In den Thylakoidmembranen der Chloroplasten sind isoprenoide Substanzen enthalten, welche essentiell für die Photosynthese sind. Dies sind die Chlorophylle (diterpene Phytol-Seitenkette), Carotinoide (Tetraterpene), Plastochinon-9 (nonaterpene Seitenkette), α -Tocopherol (diterpene Seitenkette) und Phyllochinon K₁ (diterpene Seitenkette) (LICHTENTHALER und PARK, 1963). Diese Prenyllipide werden im Plastiden gebildet (LICHTENTHALER, 1993).

Für die Monoterpen- und für die Diterpen-Biosynthese werden die Enzyme GPP-Synthase bzw. GGPP-Synthase benötigt. Für deren Lokalisation im Plastiden gibt es Belege (SOLER *et al.*, 1992; DOGBO *et al.*, 1987; KUNTZ *et al.*, 1992). Auch ist z. B. in *Mentha x piperita* die Limonen-Synthase in den Leukoplasten der sekretorischen Drüsenzellen lokalisiert, was mittels spezifischer Antikörper gegen Limonen-Synthase (Immunogold-Markierung) und Protein-Import-Experimente an Chloroplasten belegt wurde (TURNER *et al.*, 1999). Die an verschiedenen Diterpenbiosynthesen beteiligte *ent*-Kauren-Synthase ist in verschiedenen Pflanzen im Plastiden lokalisiert (AACH *et al.*, 1995). Insgesamt ist für verschiedene Enzyme der Monoterpen-, Diterpen-, der Chlorophyll- und der Carotinoid-Biosynthese die Lokalisation im Plastiden gut belegt (Übersicht in GRAY, 1987; LICHTENTHALER, 1993; BOHLMANN *et al.*, 1998; WISE und CROTEAU, 1999). Man kann zusammenfassend sagen, daß die genannten Prenyllipide gänzlich im Plastiden gebildet werden und daß für andere Mono- und Diterpene zumindest die Vorstufen GPP bzw. GGPP im Plastiden gebildet werden.

1.4 Bildung von IPP nach dem Acetat/Mevalonat-Weg

Isopentenylpyrophosphat (IPP) sowie die dazu isomere Verbindung 3,3-Dimethylallyl diphosphat (DMAPP) sind die C₅-Grundbausteine der Isoprenoide in allen Organismengruppen. Die aus dem Tierreich und von Hefen bekannte IPP-Biosynthese über den Acetat-Mevalonat-Weg wurde im wesentlichen auch in Pflanzen gefunden (Siehe z. B. GOODWIN, 1977; BACH und LICHTENTHALER, 1983a und 1983b; BACH und LICHTENTHALER, 1987; GERSHENZON und CROTEAU, 1993), jedoch blieb die Existenz eines weiteren, des Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosyntheseweges, der in Grünalgen und Pflanzen u. a. im Rahmen der vorliegenden Dissertation z. T. in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen aufgeklärt wurde, bis 1995/1996 verborgen. Über einen alternativen IPP-Biosyntheseweg soll in diesem Kapitel noch nicht die Rede sein, da er in den Ergebnissen beschrieben ist.

Bei dem Acetat/Mevalonat-Weg wird IPP aus drei Molekülen Acetyl-CoA die Mevalonsäure synthetisiert. Diese wird zweifach phosphoryliert und unter Abspaltung von CO₂ und Wasser entsteht IPP (Abbildung 1-2).

- **Bildung von HMG-CoA aus Acetyl-CoA**

Acetoacetyl-CoA Thiolase (AACT, EC 2.3.1.9) bildet aus zwei Molekülen Acetyl-CoA über eine Claisen-Kondensation Acetoacetyl-CoA (AcAc-CoA). Durch Aldol-Addition einer weiteren Einheit Acetyl-CoA katalysiert die HMG-CoA Synthase (HMGS, EC 4.1.3.5) die Bildung des 3-(S)-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA). Während die AACT-

Reaktion endergonisch ist, bringt erst das zweite Enzym (durch Hydrolyse einer Thioester-Bindung) das Gleichgewicht der Gesamtreaktion auf Seiten des HMG-CoA (LYNEN *et al.*, 1958b).

Für AACT und HMGS gibt es im Tier jeweils cytosolische und mitochondriale Isoformen. Während die cytosolischen Enzyme der Sterol-Biosynthese dienen, werden die mitochondrialen Enzyme der sog. Ketogenese zugeschrieben, der Überführung von Acetyl-CoA in Acetoacetat (MCGARRY und FOSTER, 1980).

Für Pflanzen wurden cDNA-Klone für AACT aus *Raphanus sativus* (VOLLACK, 1994) und HMGS aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und funktionell untersucht (BACH und BENVENISTE, 1997).

Die IPP-Vorstufe HMG-CoA kann außer über die Enzyme AACT und HMGS auch beim Leucin-Abbau entstehen. Durch Zugabe von Leucin in das Kulturmedium von *Phycomyces blakesleeana* konnte die Carotinoid-Bildung des Pilzes erheblich gesteigert werden (GOODWIN und LIINSKY, 1952).

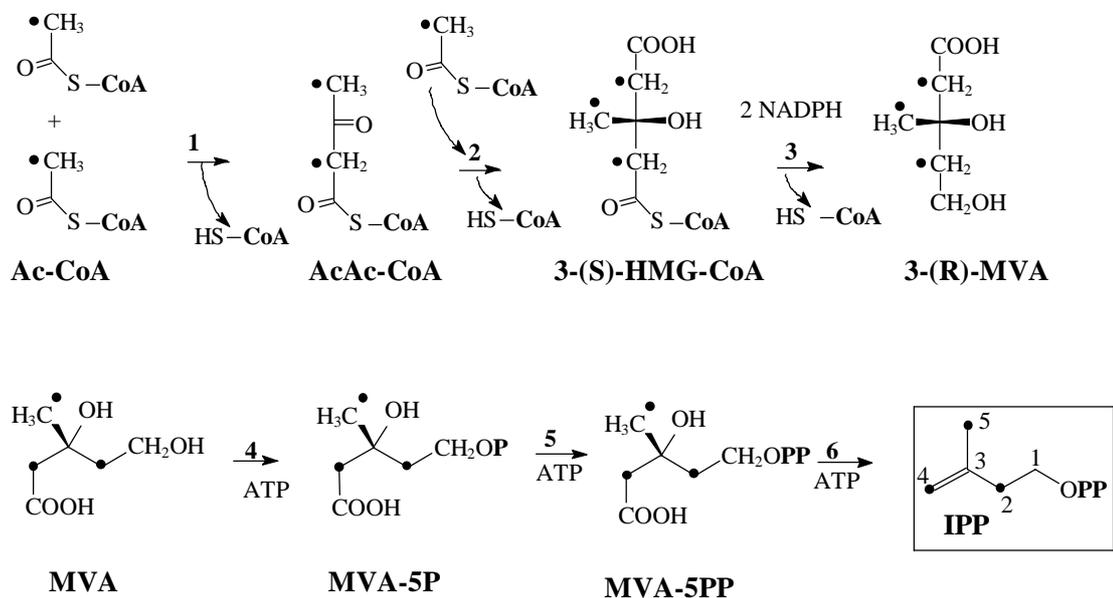


Abbildung 1-2 Bildung von Isopentenylpyrophosphat (IPP) nach dem Acetat/Mevalonat-Weg. Ac-CoA Acetyl-Coenzym A; AcAc-CoA, Acetoacetyl-CoA; HMG-CoA, β -Hydroxymethylglutaryl-CoA; MVA, Mevalonsäure; MVA-5PP, 5-Pyrophosphomevalonat. 1 Acetoacetyl-CoA Thiolase, 2 HMG-CoA Synthase, 3 HMG-CoA Reduktase, 4 Mevalonat Kinase, 5 5-Phosphomevalonat Kinase, 6 Mevalonatpyrophosphat Decarboxylase. Schwarze Punkte markieren C-Atome, welche aus C-1 oder C-6 der Glucose stammen, wenn Glucose über Glycolyse und Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA abgebaut wird.

• Bildung von Mevalonsäure

Die HMG-CoA Reduktase (HMGR, EC 1.1.1.34) bildet aus HMG-CoA unter Verbrauch von zwei Reduktionsäquivalenten (NADPH_2) die 3R-Mevalonsäure, die erste eindeutige Isoprenoid-Vorstufe. Die Reaktion ist irreversibel und HMG-CoA Reduktase wird in Tieren und Pflanzen allgemein als ein wesentlicher Regulationspunkt der IPP-Biosynthese angesehen (BROWN und GOLDSTEIN, 1980; GOLDSTEIN und BROWN, 1990; BACH *et al.*, 1990; BACH *et al.*, 1997 und 1999). Während bei den Säugetieren nur ein HMGR-Gen zu finden ist, wurden in höheren Pflanzen mehrere HMGR-Isoformen beschrieben, was auf eine komplexe

Regulation der pflanzlichen Isoprenoidbiosynthese auf der Ebene der HMG-Reduktase-Aktivität hindeutet (BACH *et al.*, 1997).

HMG-CoA Reduktase wird in Tier, Pflanze und Pilzen durch einen spezifischen Hemmstoff, Mevinolin, gehemmt (BACH und LICHTENTHALER, 1982a; 1982b; 1983a; 1987). Während bei höheren Pflanzen die zu erwartende Hemmwirkung von Mevinolin auf die Sterolbiosynthese nachgewiesen werden konnte, wurde kein Einfluß auf die Biosynthese der plastidären Prenylipide (β -Carotin, Plastochinon-9, Chlorophylle) gefunden (BACH und LICHTENTHALER, 1983b; SCHINDLER *et al.*, 1985).

- **Bildung von IPP aus Mevalonsäure**

Mevalonsäure wird mit ATP durch zwei Enzyme zum Mevalonat-5-diphosphat phosphoryliert (Mevalonat-Kinase, EC 2.7.1.36; Phosphomevalonat-Kinase, EC 2.7.4.2). Unter Verbrauch eines weiteren ATP werden schließlich die 3-OH-Gruppe und die Carboxylgruppe eliminiert und es entsteht IPP (Mevalonat-pyrophosphat Decarboxylase, EC 4.1.1.33).

- **IPP-Isomerase**

Die IPP-Isomerase (EC 5.3.3.2) katalysiert die Isomerisierung von IPP zu DMAPP. Die Reaktion ist reversibel. Das Enzym wurde in mehreren höheren Pflanzen charakterisiert (RAMOS-VALDIVIA *et al.*, 1997; KLEINIG, 1989).

- **Regulation der IPP-Biosynthese in Pflanzen**

Die Bildung von IPP und DMAPP muß dem Bedarf verschiedener Gewebe angepaßt werden können. Von den Enzymen der IPP-Biosynthese wird bisher der HMG-CoA Reduktase die wesentliche regulatorische Funktion zugeschrieben (BACH *et al.*, 1997). Höhere Pflanzen besitzen mehrere Isoformen des Enzymes, deren Expression und Aktivität in Abhängigkeit von Licht, Verwundung oder Pathogenangriff reguliert werden (BACH *et al.*, 1991). Auch der IPP-Isomerase wird regulatorische Bedeutung bei der Carotinoid-Biosynthese zugeschrieben (ALBRECHT und SANDMANN, 1994).

1.5 Alternativer IPP-Biosyntheseweg

- **Entdeckung einer Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosynthese ausgehend von Triosephosphat und Pyruvat in Bakterien**

Die Arbeitsgruppe Rohmer (Strasbourg) konnte bei verschiedenen Bakterienspezies mittels Einbau ^{13}C -markierter Substrate und ^{13}C -NMR-Analyse der markierten Isoprenoide zeigen, daß diese eine zum Acetat/Mevalonat-Weg völlig unterschiedene IPP-Biosynthese besitzen: Verschiedene ^{13}C -markierte Glucosen ([1- ^{13}C]-, [2- ^{13}C]-, [3- ^{13}C]-, [5- ^{13}C]-, [6- ^{13}C]-, [4,5- $^{13}\text{C}_2$]-Glucose) sowie [1- ^{13}C]-Acetat, [2- ^{13}C]-Acetat, [3- ^{13}C]-Pyruvat und [2- ^{13}C]-Erythrose wurden verschiedenen Eubakterien verfüttert (*Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*). Die extrahierten Hopanoide (prokaryotische triterpene Sterol-Analoga) sowie Ubichinon (Prenylseitenkette) von *Escherichia coli* wurden mit ^{13}C -NMR untersucht und die Markierungsmuster der Isopreneinheiten der Isoprenoide ließen auf ein Mevalonat-unabhängiges Biosyntheschema für IPP schließen (ROHMER *et al.*, 1993):

(1) Eine aus Pyruvat stammende C_2 -Einheit wird an ein Triosephosphat addiert (Abbildung 1-3). Dies ist denkbar durch Thiamin-katalysierte Decarboxylierung von Pyruvat und

anschließende Addition des entstandenen Hydroxyethyl-Thiamin an die Carbonylfunktion des Triosephosphat (die Aldo-Funktion des Glycerinaldehyd-3-phosphat, GAP, oder die Keto-Funktion des Dihydroxyacetonphosphat, DHAP). Daß Triosephosphat und Pyruvat beteiligt sind, ergab sich u. a. aus der Tatsache, daß die Isopreneinheiten jeweils aus C-1 und C-6 bzw. C-2 und C-5 der Glucose identisch markiert wurden. Die nach glycolytische Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat entstandenen Triosephosphate sind durch Triosephosphat-Isomerase ineinander überführbar und werden aus C-1 und C-6 bzw. aus C-2 und C-5 der Glucose in gleicher Weise markiert (Abbildung 1-3a).

- (2) Der aus Pyruvat und Triosephosphat entstandene C₅-Körper wird so umgelagert, daß die aus Pyruvat stammende C₂-Einheit zwischen C-1 und C-2 des ursprünglichen Triosephosphat wandert (Abbildung 1-3B und C) (ROHMER *et al.*, 1993). Diese Umlagerung konnte nachgewiesen werden u. a. durch ¹³C/¹³C-Kopplungen, welche in den ¹³C-NMR Spektren von mit [4,5-¹³C₂]-Glucose markierten Isoprenoiden auftraten. Mit dieser Umlagerung entsteht das verzweigte C-Gerüst des IPP. Die erwähnten Markierungsversuche lassen nicht eindeutig zwischen den in Abbildung 1-3 B und C dargestellten alternativen Biosynthesemechanismen unterscheiden.

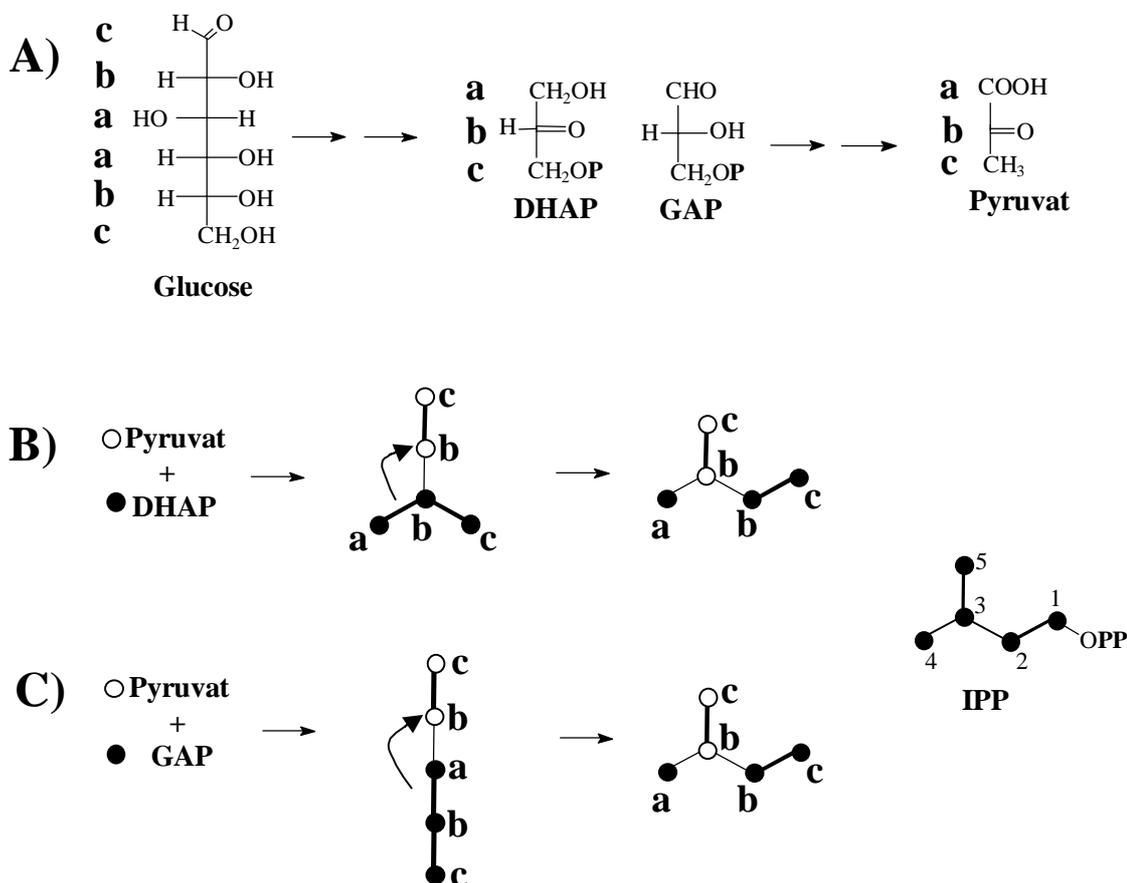


Abbildung 1-3 Pyruvat/Triosephosphat-Mechanismus der IPP-Biosynthese, wie er in Bakterien aus der Analyse ¹³C-punktmarkierter Isoprenoide nach Einbau verschieden ¹³C-markierter Glucosen und Acetat hergeleitet wurde (ROHMER *et al.*, 1993). (A) Herkunft der einzelnen C-Atome des Triosephosphat und des Pyruvat aus der Glucose (von den C-Atomen a, b, c) bei glycolytischem Abbau. (B) Addition der aus Pyruvat abgeleiteten C₂-Einheit an Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und anschließende Umlagerung zum C-Gerüst des IPP. (C) Addition der aus Pyruvat abgeleiteten C₂-Einheit an Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und anschließende Umlagerung zum C-Gerüst des IPP. In B) und C) werden die Isopreneinheiten identisch markiert.

Eine diesen beiden Reaktionsschritten entsprechende Analogie findet sich in der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin) wieder. Hierbei wird Pyruvat an Thiamin gebunden, decarboxyliert und das entstehende Hydroxyethyl-Thiamin an Pyruvat oder α -Ketobutyrat addiert (Acetolactat-Synthase, EC 4.1.3.18). Das entstandene Acetolactat (oder α -Aceto- α -Hydroxybutyrat) wird anschließend umgelagert (Ketosäure-Reduktoisomerase, EC 1.1.1.86).

- *Ginkgo biloba*-Diterpene

Mit Hilfe von ^{13}C -Markierungsversuchen wurde die in Bakterien gefundene „Pyruvat/Triosephosphat“-Biosynthese für IPP auch für das Diterpen Ginkgolid A sowie für das Bilobalid (ein pentanor-Diterpen) aus *Ginkgo biloba* nachgewiesen (SCHWARZ, Dissertation, Zürich 1994). Die Ginkgolide und das Bilobalid werden in den Wurzeln von *Ginkgo biloba* gebildet und von dort in die Blätter transportiert (CARTAYRADE *et al.*, 1997). Embryonen von *Ginkgo biloba* wurden auf Medien mit Zusatz von verschiedenen ^{13}C -markierten Glucosen oder auf ^{13}C -markierter Mevalonsäure kultiviert. Die Analyse des gebildeten Ginkgolid A und des Bilobalid mittels ^{13}C -NMR zeigte, daß beide Diterpene aus Glucose nach dem „Pyruvat/Triosephosphat“-Schema markiert werden, während Mevalonsäure nur in drei von vier Isopreneinheiten des C_{20} -Vorläufers eingebaut wird. Leider ist diese Doktorarbeit nicht in Fachzeitschriften publiziert worden und wurde erst später bekannt. Diese Untersuchungen zeigten, daß die in Bakterien gefundene Mevalonsäure-unabhängige IPP-Biosynthese auch im Pflanzenreich zumindest bei *Ginkgo* für die Synthese von isoprenoiden sekundären Pflanzenstoffen vorhanden ist. Die ersten Publikationen in Fachzeitschriften über die Existenz des alternativen IPP-Weges in Grünalgen und in höheren Pflanzen kamen von der Karlsruher Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit M. Rohmer. (SCHWENDER *et al.*, 1996; LICHTENTHALER *et al.*, 1997)

- *IPP-Biosynthese aus Pyruvat und Triosephosphat in einer Grünalge*

Um zu untersuchen, ob der zum Acetat/Mevalonat-Weg alternative IPP-Biosynthesemechanismus auch für die allgemein in Pflanzen zu findenden Prenyllipide wie Chlorophylle, Carotinoide und Prenylchinone zutrifft, wurden in der Diplomarbeit des Autors ^{13}C -Markierungsversuche mit der Grünalge *Scenedesmus obliquus* durchgeführt (SCHWENDER, 1995; SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996). Bei heterotrophem Wachstum auf Glucose wurde $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose eingebaut und mehrere isoprenoide Substanzen mittels ^{13}C -NMR untersucht. Die Phytol-Seitenkette der Chlorophylle, die Prenyl-Seitenkette des Plastochinon-9 sowie die Carotinoide β -Carotin und Lutein wurden untersucht und waren nicht markiert, wie es nach dem Acetat/Mevalonat-Weg zu erwarten gewesen wäre. Der Einbau von $[6-^{13}\text{C}]$ -Glucose, $[4, 5-^{13}\text{C}_2]$ -Glucose, $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose und $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat in Phytol und Chondrillasterol zeigte, daß der Pyruvat/Triosephosphat-Biosynthesemechanismus, welcher in Bakterien und für Ginkgolid A gefunden worden war, auch in *Scenedesmus obliquus* für alle untersuchten Isoprenoide gelten muß. Selbst die Sterole, welche in *Ginkgo* nach dem Acetat/Mevalonat-Weg markiert worden waren, wurden in *Scenedesmus* nach dem alternativen IPP-Weg markiert. Es wurde mit *Scenedesmus obliquus* ein eukaryontischer Organismus gefunden, welcher offensichtlich nur den alternativen Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosynthesemechanismus nutzt. Grünalgen stehen in der Evolution an der Basis der Höheren Pflanzen. Deshalb waren die Ergebnisse mit *Scenedesmus obliquus* ein Hinweis auf die offenbar vorhandene Verbreitung des Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweges in höheren Pflanzen.

- *1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) als erstes Intermediat der alternativen IPP-Biosynthese*

Die Addition des aus Pyruvat gebildeten Hydroxyethyl-Thiamin an GAP oder DHAP in der alternativen IPP-Biosynthese läßt zwei mögliche Produkte mit 5 C-Atomen zu, deren Umlagerung zum IPP-Gerüst führen könnte³ (Abbildung 1-3B, C)). 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat ist ein mögliches Produkt aus Pyruvat und GAP (Abbildung 1-4) und ist in *E. coli* als Vorstufe der Vitamine B₁ und B₆ bekannt (DAVID *et al.*, 1981; HILL *et al.*, 1989; 1996; HIMMELDIRK *et al.*, 1996).

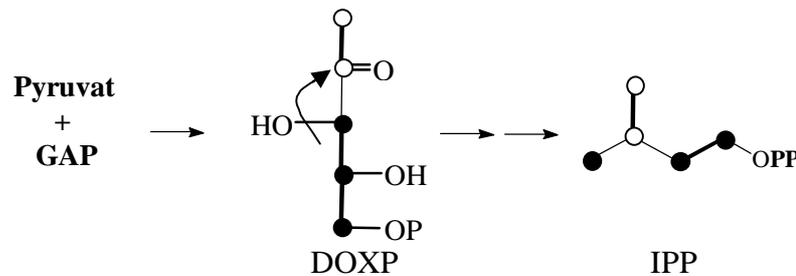


Abbildung 1-4 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) als mögliches Intermediat der alternativen IPP-Biosynthese. Die zur Bildung des verzweigten C₅-Gerüsts des IPP notwendige C-Skelett-Umlagerung ist dargestellt.

Es konnte zuerst von BROERS (Dissertation, Zürich, 1994) gezeigt werden, daß 1-Desoxy-D-Xylulose in *E. coli* in die Prenyl-Seitenkette von Ubichinon eingebaut wird. Leider wurde auch diese Dissertation nicht publiziert und war zunächst nicht ohne weiteres zugänglich. Der Einbau von markierter 1-Desoxy-D-Xylulose in pflanzliche Isoprenoide des Photosyntheseapparates wurde erstmals von der Karlsruher Arbeitsgruppe in einer Fachzeitschrift publiziert (ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997).

1.6 Problemstellung

Nachdem für die Grünalge *Scenedesmus* mit Markierungsexperimenten in meiner Diplomarbeit schon gezeigt werden konnte, daß sämtliche Isoprenoide nicht nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden, sondern über den aus Bakterien und dann auch aus *Ginkgo*-Diterpenen bekannten Triosephosphat/Pyruvat-Weg der IPP-Biosynthese entstehen, sollte dieser Mevalonat-unabhängige Biosyntheseweg und dessen Verbreitung in anderen Algen und in Höheren Pflanzen weiter untersucht werden. Eine wesentliche Motivation zu diesen Arbeiten waren zahlreiche ältere Befunde aus der Literatur, u. a. aus der Arbeitsgruppe Goodwin (z. B. GRIFFITH *et al.*, 1964), welche nicht vereinbar sind mit der Bildung von plastidären Prenyllipiden (Chlorophylle, Carotinoide, Plastochinon-9) über den Acetat/Mevalonat-Weg.

- *Untersuchungen über die Isoprenoidbiosynthese in weiteren Grünalgen*

Es sollte mittels Einbau von [1-¹³C]-Glucose überprüft werden, ob neben *Scenedesmus obliquus* andere einzellige Grünalgen den GAP/Pyruvat-Weg besitzen und ob in diesen ebenfalls sowohl plastidäre Isoprenoide, als auch cytosolische Sterole nach diesem IPP-Biosyntheseweg gebildet werden. Die Untersuchungen sollten auch auf mehrzellige

³ Berücksichtigt man, daß durch die Addition ein neues chirales Zentrum entsteht, gibt es vier mögliche Produkte.

Grünalgen sowie auf die den höheren Pflanzen besonders nahestehenden Charophyceen ausgedehnt werden.

- *Untersuchungen über die Isoprenoidbiosynthese in höheren Pflanzen*

Es sollte auch für höhere Pflanzen mittels Einbau von [1-¹³C]-Glucose untersucht werden, nach welchem IPP-Biosyntheseweg die in den Chloroplasten enthaltenen Prenylipide (Phytyl-Seitenketten der Chlorophylle, Carotinoide, Plastochinon-9) sowie die cytosolischen Sterole gebildet werden. Grüne Pflanzen oder Pflanzlichen Gewebe-Kulturen sollten durch heterotrophes Wachstum so weit vermehrt werden, daß am Ende das gesamte isolierte Material aus der markierten Glucose gebildet wurde. Die Wachstumsbedingungen (Licht) sollten so gewählt werden, daß die lichtabhängige Bildung grüner Chloroplasten möglich ist, die photosynthetische CO₂-Fixierung jedoch nur geringfügig zur Bildung der Biomasse beiträgt.

Neben den genannten Prenylipiden der Chloroplasten sollten Sekundärcarotinoide untersucht werden, welche in den Chromoplasten von Früchten und Blüten gebildet und akkumuliert werden.

Zur Untersuchung der ¹³C-Markierungsmuster der verschiedenen Isoprenoide mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie mußten einige jeweils mg der markierten Substanz in hoher Reinheit erhalten werden.

- *Einbau möglicher IPP-Vorstufen*

Einbauversuche mit isopenmarkierten möglichen Vorstufen (z. B. Deuterium-markierte 1-Desoxy-D-Xylulose) oder Intermediaten des Mevalonat-unabhängigen IPP-Weges sollten bei Algen und höheren Pflanzen durchgeführt werden. Für die Untersuchung markierter Lipide (Phytol, Sterole) stand im Institut ein Gaschromatograph/Massenspektrometer zur Verfügung. Die Berechnung der Isotopenanreicherung in markierten Lipiden erfolgte aus deren Massenspektren.

- *Klonierung von Genen des alternativen IPP-Weges aus Pflanzen*

Ferner sollte versucht werden, die zu Beginn dieser Dissertation noch unbekanntene Gene des alternativen IPP-Weges aus Pflanzen zu klonieren und zu untersuchen.

2 Methoden

2.1 Einbauexperimente

2.1.1 Für Markierungsexperimente verwendete Grünalgen

Folgende Grünalgen wurden als Reinkulturen von der Sammlung für Algenkulturen Göttingen (SAG) bezogen. Bei autotropher Anzucht (Beleuchtung $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Osram L 40 Leuchtstoffröhren) wurden die Algen in 250 ml Erlenmeyer-Kolben (Verschluß mit Wattestopfen) in 50 ml eines autoklavierten Flüssignährmediums in einem Schüttelinkubator bei 22°C autotroph angezogen. *Spirogyra sp.* wurde ohne Schütteln bei sonst gleichen Bedingungen angezogen.

	Nährmedium
<i>Scenedesmus obliquus</i> Kützing (Stamm 276-3c)	B
<i>Chlorella fusca</i> Shihira et Kraus (Stamm 211-8b)	B
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard (Stamm 11.31)	A
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Stamm 83.81)	A
<i>Gloettilopsis planctonica</i> Lyengar et Philipose (Stamm 29.93)	B
<i>Klebsormidium flaccidum</i> Kützing (Stamm 335-2a)	B
<i>Spirogyra sp.</i> Link (Stamm B169.80)	C

Nährmedium A (SURZYCKI, 1971)		Nährmedium B (verändert nach BISHOP und SENGER, 1971)		Nährmedium C (Medium 1 nach SCHLÖSSER, 1994)	
TRIS/HCl	20 mM, pH 7,0				
NH ₄ Cl	8 mM	KNO ₃	8 mM	KNO ₃	0,1 mM
K ₂ HPO ₄	0,54 mM	Na ₂ HPO ₄	1 mM	K ₂ HPO ₄	0,2 mM
KH ₂ PO ₄	0,46 mM	NaH ₂ PO ₄	3 mM		pH 6,8
MgSO ₄	1,5 mM	MgSO ₄	1 mM	MgSO ₄	0,1 mM
CaCl ₂	0,4 mM	CaCl ₂	0,1 mM	Erdextrakt	30 ml/l
Mikroelemente	*	Mikroelemente	*	Mikroelemente	*

*Mikroelemente: FeSO₄ /Titriplex III (36 μM), H₃BO₃ (8 μM), MnCl₂ (2,5 μM), ZnSO₄ (0,7 μM), CuSO₄ (0,4 μM), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (16 nM).

2.1.2 ¹³C- und ²H- markierte Substrate

[1-¹³C]-Glucose, [U-¹³C₆]-Glucose sowie [3-¹³C]-Pyruvat wurde bezogen von Omicron Biochemical Inc., IN, USA.

[1-²H₁]-1-Desoxy-2, 3-o-isopropyliden- β -D-Xylulose wurden synthetisiert von Herrn H. U. May am Institut für Organische Chemie, Universität Darmstadt (Prof. Dr. F. W. Lichtenthaler). Von [1-²H₁]-1-Desoxy-2, 3-o-isopropyliden- β -D-Xylulose wurde mittels saurer Hydrolyse (40 mM HCl, 3h bei 50 °C) die Isopropyliden-Schutzgruppe entfernt werden und man erhielt [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose.

DL-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton wurde bezogen von IC Chemikalien, D-85737 Ismaning.

2.1.3 Markierung von Grünalgen mit [1-¹³C]-Glucose und [3-¹³C]-Pyruvat.

Für die Markierung mit [1-¹³C]-Glucose und [3-¹³C]-Pyruvat wurden die Grünalgen *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Scenedesmus obliquus* auf folgendem anorganischem Flüssignährmedium angezogen:

NH₄Cl (6 mM), K₂HPO₄ (4 mM), Na H₂PO₄ (4 mM), MgSO₄ (1 mM), CaCl₂ (0,1 mM), pH 7,0. Mikroelemente: FeSO₄ /Titriplex III (36 µM), H₃BO₃ (8 µM), MnCl₂ (2,5 µM), ZnSO₄ (0,7 µM), CuSO₄ (0,4 µM), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (16 nM).

Für die Markierung mit [1-¹³C]-Glucose oder [3-¹³C]-Pyruvat wurden die Algen in 2 bis 5 l sterilem Medium mit Zusatz von 0,1 % Glucose angezogen. Die Glucose, die Phosphate, Makro-Nährsalze sowie die Mikroelemente wurden getrennt voneinander autoklaviert und nach dem Autoklavieren vereinigt. Na [3-¹³C]-Pyruvat wurde in wässriger Lösung sterilfiltriert (Membranfilter, 0,45 µm).

Die Kultur wurde in Anzuchtgefäßen (6l-Rundkolben, Rührfisch, Gummistopfen mit durchgehenden Glasröhren zur Belüftung und Probenentnahme) mit steriler Luft durchperlt (20 l/h) und mit einem Rührfisch durchmischt. Zu Beginn wurde dem Nährmedium etwa 50 ml einer dichtgewachsenen Vorkultur zugegeben. Während des Wachstums wurden täglich kleine Proben der Kultur entnommen und die optische Dichte bei 680 nm als Maß für die Zelldichte gemessen. Bei einer OD₆₈₀ von 1,5 bis 2.0 (meist nach 4-5 d) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Zur Analyse mittels ¹³C-NMR mußten die zu untersuchenden Substanzen in Mengen von einigen mg erhalten werden.

- *Einbau von [3-¹³C]-Pyruvat in Isoprenoide von Scenedesmus obliquus*

Scenedesmus obliquus wurde während 4 d mit 0,1 % Glucose und 0,05 % Na [3-¹³C]-Pyruvat angezogen. Es wurde belichtet mit einer geringen wachstums-stimulierende Belichtung von etwa 5 µmol m⁻² s⁻¹ (Osram L 40 Leuchtstoffröhren).

- *Markierung der Prenylipide von Chlorella fusca mit [1-¹³C]-Glucose*

Chlorella fusca wurde in 10 l Nährlösung während 4 d angezogen. Die Glucose war zu 10 % mit [1-¹³C]-Glucose angereichert. Beleuchtung wie bei *Scenedesmus obliquus* (s.o.).

- *Markierung der Prenylipide von Chlamydomonas reinhardtii mit [1-¹³C]-Glucose*

Chlamydomonas reinhardtii wurde in 5 l Flüssigkultur während 5 d angezogen. Es wurde zusätzlich zu dem oben beschriebenen Nährmedium 0,025 % Hefe-Extrakt zugegeben. Damit konnte die Kultur dann bei völliger Dunkelheit wachsen. Die Glucose war zu 10 % mit [1-¹³C]-Glucose angereichert.

2.1.4 Einbau ¹³C-markierter Glucose in Isoprenoide höherer Pflanzen

Nachdem mittels heterotropher Anzucht auf ¹³C-markierter Glucose für einige Grünalgen nachgewiesen worden war, daß diese ihre Prenylipide nach dem alternativen IPP-Biosyntheseweg bilden, sollte versucht werden, ähnliche ¹³C-Markierungstechniken auch auf höhere Pflanzen anzuwenden. Mittels Verfütterung von [1-¹³C] Glucose sollte die

Biosynthese der plastidären Isoprenoide wie Phytol, β -Carotin, Plastochinon-9 und der Sterole untersucht werden.

- *Einbau von [1-¹³C]-Glucose in Isoprenoide von Lemna gibba L.*

Wasserlinsen (Lemnaceae, Gattung *Lemna*) sind monokotyle, frei schwimmende Pflanzen, welche sich durch Sprossung vermehren und ruhige Wasseroberflächen (Teiche) rasch mit einem grünen Teppich überziehen können. Axenische Kulturen der Wasserlinse (*Lemna gibba*, L.; bezogen von Dr. R. Wejnar, Universität Jena) wurden in 250ml-Erlenmeyer-Kolben angezogen, welche mit Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen waren. Die Pflanzen vermehrten sich unter einem Lichtfeld ($150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) auf einem flüssigen mineralischen Medium (verändert nach JUNGnickel, 1986):

Makroelemente:		Mikroelemente:	
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	FeSO ₄ /Titriplex III	36 μM
KNO ₃	8 mM	H ₃ BO ₃	8 μM
Ca(NO ₃) ₂	1 mM	MnCl ₂	2,5 μM
MgSO ₄	1 mM	ZnSO ₄	0,7 μM
		CuSO ₄	0,4 μM
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	16 nM

Lemna benötigt, wie andere höhere Pflanzen und im Gegensatz zu den Grünalgen zur Ergrünung Licht. Auch findet im Dunkeln auf Glucose kein Wachstum statt. Die Pflanzen sollten heterotroph auf Glucose angezogen werden, weil a) die gesamte Biomasse aus dem markierten Zucker als C-Quelle gebildet werden sollte und b) die photosynthetische Refixierung von aus [1-¹³C]-Glucose freigesetztem ¹³CO₂ keine spezifische ¹³C-Markierung ergibt. In schwachem Licht ($40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$), welches nur ein sehr langsames autotrophes Wachstum zuließ, wuchsen Kulturen mit Zusatz von Glucose (0,3 %) um ein Vielfaches schneller als ohne Glucose. Man kann dieses Wachstum somit annähernd als heterotroph bezeichnen, d. h. der überwiegende Teil der Biomasseproduktion erfolgte durch Verbrauch von Glucose als Kohlenstoff- und Energielieferant und nicht durch photosynthetische CO₂-Fixierung.

Zur Markierung mit [1-¹³C]-Glucose wurde *Lemna* auf 0,3 % Glucose im Medium (angereichert mit 10 % [1-¹³C]-Glucose) heterotroph angezogen. Es wurden 120 Erlenmeyer-Kolben mit je 30 ml sterilem Medium beschickt und mit je etwa 10 Pflanzen beimpft. Die Pflanzen wuchsen bei 25°C und einer Beleuchtung von $40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Osram L Leuchtstoffröhren). Nach 12 Tagen wurden die Pflanzen mit einem Frischgewicht von 150g geerntet.

- *Einbau von [1-¹³C]-Glucose in Isoprenoide von Gerstenembryonen*

20g Gerstenkaryopsen (*Hordeum vulgare* L.) wurden 1,5 h in 50 % H₂SO₄ behandelt, mit sterilem Wasser bis etwa pH 5 gewaschen und dann Dunkeln auf feuchter, steriler Watte angekeimt. Nach 5 d wurden die etiolierten Sprosse vom Endosperm getrennt und in eine mineralische Nährlösung (s. o. JUNGnickel, 1986) mit 1% Glucose gestellt (50 % Anreicherung [1-¹³C]Glucose). Über 48h wurde alle 2h für 2 min belichtet ($50 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Osram L). Nach 48 h waren die Primärblätter im Mittel von 7,4 cm auf 11,6 cm angewachsen und leicht grün. 250 Pflanzen enthielten nur 1,2 mg Chlorophyll. Es wurde das Phytol isoliert, acetyliert und mit ¹³C-NMR untersucht. Es konnte eine signifikante

^{13}C -Anreicherung in den C-Positionen C-1 und C-5 der Isopreneinheiten gemessen werden (1,3 – 1,7% gegenüber 1,1 % an den anderen Positionen). Gegenüber der eingesetzten Anreicherung von 50 % [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-Glucose ist die Anreicherung im gebildeten Phytol aber vergleichsweise gering. Dieser Einbauversuch ergab nicht die gewünschte Einbaurate. Möglicherweise besitzt der etiolierte Gerstenkeimling im 5d alten Stadium so viel Speicherstärke in den Geweben, so daß die aufgenommene ^{13}C -markierte Glucose bei der Ergrünung durch Kohlenhydrate, welche aus der Speicherstärke entsteht, stark verdünnt wird.

Schließlich wurden mit dem Beginn der Keimung Gersten-Embryonen isoliert und auf einem Vollmedium mehrere Tage angezogen, um sicherzustellen, daß die [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-Glucose wirklich effizient in die Isoprenoide eingebaut wird.

Trockene Gerstenkaryopsen wurden wie folgt vorbehandelt:

- 35 min Quellung in H_2O .
- 20 min Behandlung mit $\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (10:10 v/v)
- 45 min Behandlung mit 50% iger H_2SO_4

Danach wurde die Schwefelsäure abgenommen und die Karyopsen solange mit sterilem Wasser gewaschen, bis sich ein pH von 5-7 einstellte. Nun wurden die Karyopsen auf steriler, feuchter Watte für 24 h angekeimt. Nach dieser Zeit war bei den meisten Embryonen ein Wachstum der Keimwurzel um etwa 1 mm erkennbar. Solche Embryonen wurden unter sterilen Bedingungen aus der Karyopse herauspräpariert.

Aus 110 g behandelten Gerstenkaryopsen wurden insgesamt 700 Embryonen präpariert. Je etwa 10 Embryonen wurden in kleine Petrischalen (5 cm Durchmesser) gesetzt, welche sterile Watte und 10 ml Voll-Nährmedium (verändert nach REINERT und YEOMAN, 1982) enthielten:

Makroelemente:		Mikroelemente:			
KH_2PO_4	18 mM	FeSO_4 /Titriplex III	36 μM	Nicotinsäure	4 mg/l
CaCl_2	0,4 mM	H_3BO_3	8 μM	Pyridoxin	0,2 mg/l
CaSO_4	0,15 mM	MnCl_2	2,5 μM	Thiamin-HCl	0,2 mg/l
KCl	0,4 mM	ZnSO_4	0,7 μM	Casein Hydrolysat	0,5 %
MgSO_4	2 mM	CuSO_4	0,4 μM	Glucose *	1%
		KI	1 μM		
		$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	16 nM		

* 15 % Anreicherung mit [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-Glucose).

Die Embryonen wuchsen bei 25°C unter einem schwachen Rotlicht-Feld (λ_{max} 660 nm, $5 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Nach 5 Tagen konnten etwa 400 schwach grüne Sprosse geerntet werden (17g FG). Die Sprosse enthielten 4,2 mg Chlorophyll. Phytol und Sitosterol sowie Stigmasterol wurden aus den Sprossen isoliert und mittels ^{13}C -NMR untersucht.

• Einbau von [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-Glucose in Isoprenoide von Karotten-Kalluskulturen

Zum Einbau markierter Glucosen eignen sich prinzipiell pflanzliche Kallus- oder Zellsuspensionskulturen, da diese heterotroph oder mixotroph mit einem Zucker (Saccharose) als Kohlenstoffquelle wachsen, man also leicht ^{13}C -markierten Zucker einbauen kann. Es wurden Kalluskulturen aus Blattgewebe von Tabak, Bohne und Fichte erzeugt, welche über mehrere Passagen unter einem Licht von $150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gehalten wurden. Meist bildeten die Zellkulturen nach einigen Passagen kaum noch Chlorophylle und Carotinoide, auch wenn man sie im Licht hielt. Am besten geeignet erschien aber eine Kalluskultur aus *Daucus carota* L., welche schon seit einigen Jahren im Institut Botanik II gehalten wurde und konstant einen relativ hohen Chlorophyllgehalt aufwies (50 μg Chlorophyll a+b/g FG).

Die grünen Kalluskulturen von *Daucus carota* wurden in Petrischalen auf Fest-Medium (1,5 % Agar) angezogen. Die Petrischalen waren mit Parafilm abgedichtet. Das Anzuchtsmedium enthielt an Wuchsstoffen 2 ppm Indolessigsäure, 1 ppm Kinetin und 1 ppm 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure. An Zuckern enthielt das Medium 3% Saccharose und 0,35 % [1-¹³C]-Glucose (w/w), was einer ¹³C-Anreicherung von 10 % in C-1 der freien Hexose entspricht. Nach 24 d Wachstum bei 25°C und 150 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ Belichtung wurden von 14 Petrischalen 150 g Kallusgewebe geerntet. Es wurden Phytol, Sitosterol und Stigmasterol isoliert und mittels ¹³C-NMR untersucht. β-Carotin und Lutein waren für die NMR-Analysen in nicht ausreichenden Mengen enthalten.

Anzuchtsmedium für Kalluskulturen nach MURASHIGE und SKOOG (1962):

KNO ₃	1,9 g/l	MnSO ₄ x H ₂ O	17 mg/l	Nicotinsäure	0,5 mg/l
NH ₄ NO ₃	1,65 g/l	H ₃ BO ₃	6,2 mg/l	Pyridoxin	0,5 mg/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,37 g/l	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6 mg/l	Thiamin	0,1 mg/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,44 g/l	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25 mg/l	Agar	1 %
KH ₂ PO ₄	0,17 g/l	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025 mg/l	Saccharose	30 g/l
		CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025 mg/l	Glycin	2 mg/l
		KI	0,83 mg/l	myo-Inosit	0,1 g/l
		Fe-EDTA	46,3 mg/l		

- **Einbau verschiedener markierter Substrate in Lycopin reifender Tomatenfrüchte**

Lycopin wird in den Früchten der Tomate (*Lycopersicon esculentum*, *Solanum Lycopersicon* L.) während der Reifung in der Fruchthaut sowie im Fruchtfleisch akkumuliert. Die rotfrüchtigen Sorten enthalten im Reifezustand an Carotinoiden neben Phytoen, Phytofluen, Lutein und β-Carotin hauptsächlich Lycopin. Während der Reifung werden die Chlorophylle fast völlig abgebaut. β-Carotin und Lycopin werden gänzlich neu gebildet. Somit bietet es sich an, in Tomatenfrüchte kurz vor der Reifung markierte Substrate zu injizieren und danach das gebildete Lycopin zu untersuchen.

Tomatenpflanzen der kleinfrüchtigen Sorte Sweet 100 (F₁-Hybride) wurden im Botanischen Garten der Universität im Gewächshaus kultiviert. Früchte wurden mit dem Ende des Größenwachstums und mit der ersten sichtbaren Rötung geerntet. Die markierten Substrate wurden in wässriger, sterilfiltrierter Lösung in die Fruchtkammern der Früchte injiziert (etwa 10 µl pro Frucht, Tabelle 2-1). Zum Reifen wurden die Früchte dann während 8-10 Tagen im Dunkeln bei 25°C gelagert.

Tabelle 2-1 In Tomatenfrüchte injizierte markierte Substrate. Pro Frucht (2-4 g) wurden etwa 10 µl Substratlösung injiziert.

Substrat	Konzentration der injizierten Lösung
[1- ² H ₁]-1-Desoxy-D-Xylulose	10 µg/µl
DL-[2- ¹³ C] Mevalonsäurelacton	10 µg/µl
[1- ¹³ C] Glucose	333 µg/µl
[U- ¹³ C ₆] Glucose	500 µg/µl

2.1.5 Einbau von [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2-¹³C]Mevalonsäurelacton in Isoprenoide von Algen und höheren Pflanzen

- *Einbau von [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton in Isoprenoide von Grünalgen*

Kulturen von *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* (Stamm 83.81), *Gloeotilopsis planctonica* und *Klebsormidium flaccidum* wurden in 50 ml Medium (siehe 2.1.1, S. 11) in Erlenmeyerkolben bei einer Belichtung von 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einem Schüttelinkubator bei 22°C autotroph angezogen. Zu Beginn des Wachstums wurden 0,05 % [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose oder DL-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton zugesetzt. Nach etwa 10 Tagen, nachdem sich die Zellen vervielfacht hatten, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und die Lipide extrahiert und analysiert wie unter 2.2.2 (S. 17) beschrieben.

- *Einbau von [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2-¹³C]Mevalonsäurelacton in Isoprenoide von Lemna gibba*

Lemna gibba wurde in 50 ml Flüssigmedium (siehe 2.1.4, S. 12) in Erlenmeyerkolben bei einer Belichtung von 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 22°C autotroph angezogen. Zu Beginn des Wachstums wurden [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose oder DL-[2-¹³C]Mevalonsäurelacton zugesetzt. Nach etwa 10 Tagen wurden die Pflanzen geerntet, die Lipide extrahiert und analysiert wie unter 2.2.2 (S. 17) beschrieben.

- *Einbau von [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose in Isoprenoide von ergrünenden Gerstenkeimlingen*

Gerstenkaryopsen wurden im Dunkeln auf TKS-2 Torf über 5 Tage angekeimt. Die 5 bis 7 cm langen etiolierten Sprosse wurden abgeschnitten und mit den abgeschnittenen Enden in eine wässrige Lösung mit 0,05 % [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose gestellt. Zur Aufnahme des markierten Zuckers über die Transpiration wurden die in der Lösung stehenden Sprosse über 5 h im Dunkeln in einen Luftstrom gestellt (Ventilator). Danach wurde 12 h lang belichtet. Aus den ergrüneten Sprossen wurden dann die Lipide extrahiert und analysiert wie unter 2.2.2 (S. 17) beschrieben.

2.2 Gewinnung verschiedener Prenyllipide und der Fettsäuren aus Pflanzengewebe für die NMR-Analytik und für GC-MS

Folgende Arbeiten wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Rohmer von Frau Andrea Disch, Universität Strasbourg, durchgeführt: Chromatographische Aufreinigung einzelner Bestandteile der Phytolacetat-, Sterolacetat- und der Fettsäurefraktionen sowie die Auswertung der NMR-Spektren von Phytolacetat, β -Carotin, Lutein, verschiedenen Sterolen, von Fettsäuren und langkettigen aliphatischen Alkoholen. Die NMR-Spektren wurden von Herrn J.-D. Sauer, Universität Strasbourg, aufgenommen.

Die NMR-Spektren von isolierten Lycopin-Proben wurde von Herrn Dr. H. Röttele, Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe, aufgenommen. Die Auswertung dieser Spektren wurde von mir vorgenommen.

2.2.1 Extraktion der Lipide aus Pflanzengewebe für die NMR-Analytik

Für die Extraktion der Lipide aus Grünalgen, aus den Blättern von *Lemna gibba* und *Hordeum vulgare*, aus Kallusgewebe von *Daucus carota* sowie aus Tomatenfrüchten wurde zum Schutz der Pigmente bei Raumtemperatur und bei gedämpftem Licht gearbeitet sowie auf möglichst schnelles Zerkleinern und Extrahieren des Gewebes geachtet. Es wurden zur Extraktion je nach Pflanzengewebe verschiedene Lösungsmittel verwendet (Aceton, Methanol, Methylenchlorid, Chloroform/Methanol (2:1), siehe 2.2.5-2.2.9). Es wurde etwas NaHCO_3 zugegeben, um mögliche Ansäuerung des Extraktes durch das Pflanzengewebe zu neutralisieren.

Der frische Extrakt wurde mit n-Hexan ausgeschüttelt (meist unter Zugabe von Wasser oder halbgesättigter NaCl -Lösung) und so die Lipide in Hexan überführt. Der Hexan-Extrakt wurde mit Wasser gegenextrahiert und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Hexan wurde dann am Rotationsverdampfer bei 40°C bei wenig Licht abgezogen. Die Lipide wurden in Methanol bei Raumtemperatur unter N_2 -Atmosphäre verseift (3 % KOH). Nach Verseifung der Lipide wurde etwa 1 Volumen Wasser zugegeben und die nicht-verseifbaren Lipide mehrfach mit Hexan oder Hexan/Diethylether (1:1) extrahiert. Nach Ansäuern der wässrigen Phase (H_2SO_4) wurden schließlich die Fettsäuren mit Hexan extrahiert.

2.2.2 Lipid-Fractionen für die GC-MS-Analyse

Zur Untersuchung von Phytol und Sterolen wurden Pflanzengewebe oder Algenzellen mit Methanol extrahiert und der Extrakt durch Zugabe von KOH (auf 3%) bei Raumtemperatur verseift (12 h). Nach Zugabe von 1 Vol. H_2O wurde mit Hexan extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt bis zur Trockene. Der Extrakt wurde danach auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit CH_2Cl_2 aufgetrennt (2 x entwickelt). Die Phytol-Bande (R_f 0,3) und eine Sterol-Bande (R_f 0,1) mit CHCl_3 eluiert und vereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer wurde acetyliert (Essigsäure-Anhydrid/Pyridin/Toluol 1:1:2, 12 h). Nach dem Acetylieren wurden die Lösungsmittel im Rotavapor entfernt.

Die Phytol/Sterol-Fraktion wurde mit einem Gaschromatographen mit Massendetektor analysiert (GC-MS: Hewlett Packard 5890 II, crosslinked Methylsilicone 20m X 0,32 mm, Hewlett Packard 5971A Massendetektor). Temperaturprogramm 80°C (3 min), Erhitzen auf 280°C ($20^\circ\text{C}/\text{min}$), 20 min 280°C . Unter diesen Bedingungen erschien das Phytolacetat bei 12,1 min und die Sterole zwischen 17 und 22 min im Detektor (siehe 2.3, S. 21).

2.2.3 Gewinnung von Phytol, Sterolen, β -Carotin und Lutein

Die nicht-verseifbare Lipidfraktion wurde per Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Merck 5721) mit Methylenchlorid als Laufmittel aufgetrennt (2x entwickelt). Die Xanthophyll- (Rf 0) und die β -Carotin-Bande (Rf 0,9) wurden ausgekratzt. Dann wurde die Platte mit Berberylchlorid (0,1 % in Ethanol) besprüht, die Sterole-Bande (Rf 0,12) und die Phytol-Bande (Rf 0,27) im UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und ausgekratzt.

Aus der Xanthophyll-Fraktion wurde über eine weitere Dünnschicht-Trennung (Kieselgel, peroxidfreier Diethylether) das Lutein (Rf 0,36) erhalten. β -Carotin wurde über Kieselgel-Platten mit Hexan/Exther (40:1) als Laufmittel gereinigt (Rf 0,9). Die Sterol- sowie Phytol-Fraktionen wurden acetyliert (Essigsäure-Anhydrid/Pyridin/Toluol 1:1:2, 12 h). Die acetylierten Fraktionen wurden dann von Frau Andrea Disch (Strasbourg) mittels Dünnschichtchromatographie auf AgNO_3 - imprägnierten Kieselgelplatten weiter aufgetrennt. Dabei wurde die Phytylacetat-Fraktion in Phytylacetat und Acetate langkettiger aliphatischer Alkohole (hauptsächlich C_{22}) zerlegt, welche teilweise auch mit NMR-Spektroskopie untersucht wurden. Zur Auftrennung der Sterylacetate kam Reverse-Phase-HPLC zum Einsatz.

Die Sterolfractionen aus Grünalgen (*Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*) enthielten als Hauptkomponenten Chondrillasterol, 22,23-dihydro-Chondrillasterol und Ergost-7-enol. Aus den Sterolfractionen der höheren Pflanzen (*Lemna gibba*, *Hordeum vulgare*, *Daucus carota*) wurden Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol als Hauptkomponenten isoliert (vgl. 2.3, S. 21).

2.2.4 Gewinnung von Fettsäuren

Die Fettsäurefraktionen wurden von Frau Andrea Disch (Universität Straßburg) mit Diazomethan methyliert, mittels AgNO_3 -imprägnierter Kieselgelschichten dünnschichtchromatographisch weiter getrennt und schließlich mittels NMR-Methoden analysiert.

2.2.5 Extraktion und Aufreinigung der Lipide aus den Grünalgen *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* und *Chlorella*

Die Zellen wurden mit Glaskugeln (1 mm) und Methanol unter Eiskühlung geschüttelt (Vibrogen Zelmühle, Edmund Bühler GmbH, Tübingen). Dann wurde über eine Glasfritte (G3) abfiltriert. Die Zellen wurden darauf mehrfach mit Methanol: CHCl_3 (1:2 v/v) kalt extrahiert und der Gesamtextrakt bis zur Trockene eingengt.

- *Verseifung und Extraktion der nicht-verseifbaren Lipide sowie der Fettsäurefraktion:*

Die durch Methanol/Chloroform erhaltenen Fraktionen wurden in Methanol (3 % KOH) über Nacht bei Raumtemperatur und unter Stickstoffatmosphäre verseift. Nach Zugabe von Wasser wurde drei mal mit n-Hexan/Diethylether (1:1, v/v) extrahiert. Der gesamte Hexan/Ether Extrakt wurde zweimal mit Wasser gegenextrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und schließlich bis zur Trockene eingengt. Nach der Extraktion mit Hexan/Ether wurde die Methanolische, alkalische Phase mit H_2SO_4 angesäuert und wiederum mit n-Hexan dreifach extrahiert. Nach Gegenextraktion (Wasser), Trocknung über Na_2SO_4 und Einengen wurde eine fettsäurehaltige Fraktion erhalten.

β -Carotin, Lutein, Phytol und Sterole wurden gereinigt (siehe 2.2.3, S. 18) und, wenn in genügender vorhanden, mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

2.2.6 Extraktion und Reinigung der Lipide aus *Lemna gibba*

Die Pflanzen wurden mit Methanol zermörsert und in einem Büchnertrichter abgenutscht. Der Rückstand wurde mehrmals mit Methanol und schließlich mit Methanol/Chloroform (1:2) extrahiert. Die Methanol/Chloroform-Fraktion wurde eingengt und mit dem Methanol-Extrakt vereinigt. Halbgesättigte NaCl-Lösung wurde zugegeben und die Lipide mit n-Hexan/Diethylether (1:1) extrahiert. Der Lipid-Extrakt wurde dann mit Wasser gegenextrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingengt bis auf ein geringes Volumen von etwa 10 ml.

- *Vorfraktionierung der Lipide*

Die durch Extraktion erhaltene Lipidfraktion (Hexan-gelöst) wurde auf einer Kieselgel-Säule (20 ml) aufgetragen. Nach und nach wurden mit Lösungsmittelgemischen steigender Polarität verschiedene Lipidfraktionen eluiert.

Lösungsmittel		Eluierte Substanzen
Hexan/Diethylether 40:1	80 ml	β-Carotin, Plastochinon-9
Hexan/Diethylether 10:1	50 ml	α-Tocopherol, Plastohydrochinon-9
Methanol	100 ml	Chlorophylle, Xanthophylle, Sterole, Glycerolipide

- *Trennung der Lipidfraktionen*

Die β-Carotin/Plastochinon-Fraktion wurde per Dünnschichtchromatographie (Kieselgel) mit Hexan/Diethylether 40:1 (v/v) aufgetrennt. β-Carotin (Rf 0,5) und Plastochinon (Rf 0,1) wurden erhalten. Plastochinon wurde mit Hexan/Diethylether 5:1 (v/v) nochmals gereinigt (Rf 0,5).

Die Chlorophyll/Xanthophyll/Sterol-Fraktion wurde 12 h bei RT verseift (Methanol, 3 % KOH). Danach wurde mit Hexan und Diethylether extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gegenextrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingengt.

Die nicht-verseifbare Lipidfraktion wurde per Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt wie unter 2.2.3 (S. 18) beschrieben. Phytol, β-Carotin, Lutein, Plastochinon-9, Sito- und Stigmasterol wurden mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Auch Palmitinsäuremethylester wurde untersucht.

2.2.7 Extraktion und Reinigung der Lipide aus *Hordeum vulgare*

Die aus dem Wachstum der Gerstenembryonen erhaltenen Sprosse wurden mit Aceton in einem Mixer zerkleinert. Danach wurde über einen Büchner-Trichter filtriert und der Rückstand mehrmals mit Aceton nachgewaschen. Der Aceton-Extrakt wurde dann mit Hexan extrahiert, eingengt und verseift wie unter 2.2.1 (S. 17) beschrieben.

Phytol, Sitosterol und Stigmasterol wurden wie unter 2.2.3 (S. 18) beschrieben isoliert und mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Auch Palmitinsäuremethylester wurde untersucht.

2.2.8 Extraktion und Reinigung der Lipide aus *Daucus carota*

Das Kallusgewebe von *Daucus carota* wurde mit Methanol zerkleinert. Danach wurde über einen Büchner-Trichter (Filterpapier, Schleicher & Schuell) filtriert. Der Rückstand wurde nochmals mit Methanol, dann mehrmals mit Chloroform/Methanol (2:1) bis zur Entfärbung gewaschen. Der Chloroform/Methanol-Extrakt wurde bis zur Trockene eingeeengt und mit dem Methanol-Extrakt aufgenommen. Dann wurden die Lipide in Hexan überführt und verseift wie unter 2.2.1 (S. 11) beschrieben. Phytol, Sitosterol und Stigmasterol wurden wie unter 2.2.3 (S. 18) beschrieben isoliert und mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

2.2.9 Extraktion und Reinigung des Lycopins aus Tomatenfrüchten

Die roten Tomatenfrüchte wurden mit Methanol zerkleinert. Danach wurde über einen Büchner-Trichter filtriert. Der Tomatenrückstand wurde nochmals mit Methanol, dann mehrmals mit Methylenchlorid bis zur Entfärbung extrahiert. Die Methanolextrakte ihrerseits wurden mit Methylenchlorid in einem Schütteltrichter extrahiert. Die vereinigten Methylenchlorid-Extrakte wurden eingeeengt bis zur Trockene.

- *Reinigung des Lycopins*

Die Lipide wurden in Methanol verseift (3 % KOH, über Nacht, RT, N₂-Atmosphäre). Mengenmäßig war für die NMR-Spektroskopie nur Lycopin als überwiegender Hauptbestandteil der Carotinoide interessant.

Nach der Verseifung wurde mit Hexan drei mal extrahiert, wobei nur die völlig unpolaren Carotine (β -Carotin, Lycopin) vollständig in die Hexan-Phase übergangen während z. B. die polarereren Xanthophylle (u. a. Lutein) nur teilweise in die Epiphase übergangen. Die somit angereicherte Lycopinfraktion wurde nur noch einer Dünnschicht-chromatographischen Reinigung unterzogen, in der das Lycopin für die NMR-spektroskopische Untersuchung rein erhalten wurde. Die Lycopinfraktion wurde auf Kieselgel mit Hexan/Methylenchlorid (80+20) getrennt. Neben dem Lycopin (Rf 0,5) wurden folgende Bestandteile spektralphotometrisch untersucht (BRITTON, 1995): Xanthophylle (Rf 0), ein unbekanntes Carotin (Rf 0,6), sowie β -Carotin, Phytoen und Phytofluen (alle Rf 0,71).

Lycopin wurde dann NMR-spektroskopisch untersucht.

Analytische Daten des isolierten Lycopin:

UV/VIS-Spektrum in Hexan: λ_{\max} 443.5, 470.0, 502.0 (vergleiche BRITTON, 1995).

NMR-Spektroskopie (vergleiche ENGLERT, 1995; CLOUGH und PATTENDON, 1983):

¹H-NMR δ (500 MHz, CDCl₃): 1,61 (3H, s, 17-CH₃), 1,69 (3H, s, 16-CH₃), 1,82 (3H, s, 18-CH₃), 1,97 (6H, s, 19, 20-CH₃), 2,11 (4H, m, 3, 4-CH₂), 5,11 (1H, m, 2-H), 5,95 (1H, d, 6-H), 6,18 (1H, d, 10-H), 6,25 (2H, d, 8-H, 14-H), 6,35 (1H, d, 12-H), 6,49 (1H, dd, 7-H), 6,60-6,66 (2H, m, 11-H, 15-H).

Nummerierung der C-Atome siehe Abbildung 1-1. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. 1H = Intensität eines Protons. s = Singlet, d = doublett, dd = doublett von doubletts; m = multiplett.

¹³C-NMR: siehe Tabelle 1 im Anhang A.

2.3 Identifizierung und Analyse der Isotopenmarkierung der Isoprenoide, Fettsäuren und langkettigen Alkohole

- *Auswertung von ^{13}C -NMR Spektren*

Phytol, β -Carotin und Lutein wurden als Referenzsubstanzen aus grünen Gerstenblättern oder Spinat isoliert.

Die Identifizierung von Phytol, β -Carotin, Lutein, den Algen-Sterolen, den Sterolen der höheren Pflanzen sowie der Fettsäuren und langkettigen Alkohole wurde von Frau Andrea Disch am Institut Le Bel, Universität Strasbourg, durchgeführt (DISCH, 1998). Für alle diese Substanzen lagen aus der Literatur Daten über NMR-Spektren (^{13}C - und ^1H -NMR) sowie über Massenspektroskopie vor. Die Messung der ^{13}C -NMR Spektren erfolgte an der Universität Strasbourg (Dr. J.-D. Sauer). Die Berechnung der im Anhang A aufgeführten ^{13}C -Isotopenanreicherungen in den Substanzen (ausgenommen Lycopin) wurde von Frau Andrea Disch durchgeführt.

Die Identifizierung von Lycopin (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, UV-VIS Spektroskopie) wurde von mir durchgeführt (Siehe 2.2.9, S. 20). Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des Lycopin wurden am Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe, von Herrn Dr. H. Röttele aufgenommen. Die Auswertung der ^{13}C -NMR Spektren wurde von mir vorgenommen.

Zur Bestimmung der ^{13}C -Anreicherung in einer markierten Substanz wurde ein ^1H -Breitband-entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum der markierten Substanz und eines einer unmarkierten Referenz-Substanz unter identischen Bedingungen aufgenommen. Dies ist notwendig, da in ^{13}C -NMR-Spektren die Intensität der einzelnen Signale von der Relaxationszeit der einzelnen C-Kerne und von Kopplungseffekten mit benachbarten Protonen abhängt (HESSE *et al.*, 1994, S.184). Bezieht man die Signalintensität eines C-Kerns der markierten Substanz auf die desselben Kerns in der unmarkierten Referenzsubstanz, kann man die ^{13}C -Anreicherung berechnen:

$$\% \text{ } ^{13}\text{C} = \frac{1,1 \times C_x \times B}{C_{xr} \times B_r}$$

C_x = Intensität des NMR-Signales eines C-Atomes der markierten Substanz.

B = Intensität des NMR-Signales eines Bezugs-Atomes in der markierten Substanz (z. B. Methylgruppe des acetylierten Phytol).

C_{xr} = Intensität C-Atom x in natürlich markierter Referenzsubstanz.

B_r = Intensität des Bezugsatoms in in natürlich markierter Referenzsubstanz.

- *Analyse vom Massenspektren*

Die Analyse von Deuterium- und ^{13}C -markierten Isoprenoiden mittels GC-MS wurde von mir durchgeführt. Die Identifizierung (s. Tabelle 2-2) erfolgte durch Auswertung der Massenspektren und Vergleich mit Literaturdaten über die Fragmentierung von Sterolen im Massenspektrum (GOAD, 1991). Die GC/MS-Analysen wurden mit einem Hewlett Packard 5890II-Gaschromatographen, gekoppelt mit einem Hewlett Packard 5971A Massenspektrometer, durchgeführt. Die Trennungen des Phytolacetat und der Sterole wurden mit einer Crosslinked Methylsilicone- Säule (20m x 0,32 mm) durchgeführt. Das Temperaturprogramm war: 80 °C 3 min, Heizen auf 280 °C (20°C/min), 20 min 280 °C.

Tabelle 2-2 Identifizierung von Sterolen (in acetylierter Form) aus verschiedenen Algen und höheren Pflanzen mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS). Die Struktur ist beschrieben bezogen auf Cholestanol (s. Abbildung 1-1). Retentionszeiten im GC sowie die Massen der Fragmente der Molekülonen ($M = \text{Sterolacetat}$) sind angegeben. Es sind jeweils Namen für die 24- α - und die 24- β -Konfiguration angegeben (GOAD, 1991), welche mittels GC/MS nicht unterschieden werden können. Für die Identifizierung der Sterole standen Daten über die massenspektroskopische Fragmentierung von Sterolen aus GOAD (1991) zur Verfügung. Cholesteryl- und Sitosteryl-Acetat standen Vergleichs-Substanzen zur Verfügung. Ebenso waren die Sterolgemische aus *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota* bekannt (Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol wurden von Frau A. Disch, Strasbourg, mittels GC/MS und NMR identifiziert).

Struktur bezogen auf Cholestanol	Name (für 24- α -, 24- β -Konfiguration)	Retentionszeit (min)	$[\text{M-AcOH}]^+$	$[\text{M}]^+$
Δ^5	Cholesterol	18,3	368	-
$\Delta^{5,22}$ 24-Methyl	Diatomsterol Brassicasterol	18,6	380	-
$\Delta^{5,24(28)}$ -24-Methylen	24-Methylen-Cholesterol	18,9	380	-
$\Delta^{5,7,22}$ 24-Methyl	24-Epi-Ergosterol Ergosterol	19,1	378	-
Δ^5 24-Methyl	Campesterol 22, Dihydrobrassicasterol	19,4	382	-
$\Delta^{5,22}$ 24-Ethyl	Stigmasterol Poriferasterol	20,0	394	-
Δ^7 24-Methyl	Ergost-7-enol	20,0	-	442
$\Delta^{5,24(28)}$ -24-Ethyliden	Fucosterol Isofucosterol	20,4	394	
$\Delta^{7,22}$ 24-Ethyl	Spinasterol Chondrillasterol	20,6	-	454
$\Delta^{5,7,22}$ 24-Ethyl	7-Dehydrostigmasterol 7-Dehydroporiferasterol	20,7	392	
Δ^5 24-Ethyl	Sitosterol Clionasterol	20,9	396	
Δ^7 24-Ethyl	22,23-Dihydrospinasterol 22,23-Dihydrochondrillasterol	21,5	-	456

- *Massenspektroskopische Analysen von ^{13}C - und ^2H -markierten Substanzen*

In den Massenspektren organischer Verbindung findet man neben dem Peak der Molekülmasse M sogenannte „Isotopen-Satelliten“ oder „Isotopen-Peaks“ der Massen $M+1$, $M+2$, $M+3$, usw. Solche Neben-Peaks kommen durch den Gehalt an schweren Isotopen zustande und lassen die Bestimmung der natürlichen oder künstlichen Anreicherung an ^{13}C oder ^2H zu (RAUSCHENBACH *et al.*, 1974, MILLARD, 1978). Da 1,08 % des natürlichen Kohlenstoffs aus dem schweren Isotop ^{13}C besteht, besitzen bei einer Substanz mit 20 C-Atomen etwa 18 % der Moleküle einen ^{13}C -Kern ($^{12}\text{C}_{19} \text{ } ^{13}\text{C}_1$) und sind somit um eine Masseneinheit schwerer. Seltener sind die Isotopomeren $^{12}\text{C}_{18} \text{ } ^{13}\text{C}_2$, $^{12}\text{C}_{17} \text{ } ^{13}\text{C}_3$ usw. Für ein Molekül C_{20} teilt sich die Intensität des Molekülonen wie folgt auf: M (80,1 %), $M+1$

(17,8 %), M+2 (1,9 %), M+3 (0,13 %) (siehe Gleichung 5). Durch Einbau von schweren Isotopen wie ^{13}C oder ^2H erhöhen sich die Intensitäten der Isotopen-Peaks.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen spielen für die Intensität der Isotopen-Peaks neben dem natürlich vorkommenden Isotop ^{13}C andere schwere Kerne wie ^2H oder ^{18}O und ^{17}O keine Rolle, da ^2H ein sehr geringes natürliches Vorkommen hat (0,0145 %) und in den untersuchten Sterolen und dem Phytol jeweils nur 1 O-Atom vorkommt. Bei allen Berechnungen wurde deshalb nur der natürliche Gehalt an ^{13}C berücksichtigt. Für die Ermittlung der Isotopenanreicherung aus Isotopenpeaks muß sichergestellt sein, daß das untersuchte Fragment (oder Molekülion) nicht von anderen Fragmenten (z. B. $[\text{M-H}]^+$) überlagert wird (RAUSCHENBACH *et al.*, 1974, MILLARD, 1978). Solche Überlagerungen konnten für die Molekülionen von natürlich ^{13}C -angereichertem Phytol und den in dieser Arbeit untersuchten Sterolen nicht gefunden werden.

Eine Substanz mit n C-Atomen sei an q Positionen mit einem schweren Isotop (^{13}C oder ^2H) markiert. Die Häufigkeit des natürlich vorkommendem ^{13}C (n Positionen) und des eingebauten schweren Isotopes (q Positionen) wird durch zwei Binominalverteilungen beschrieben (RAUSCHENBACH *et al.*, 1974). Das Verhältnis der Intensitäten der Isotopenpeaks I_M und I_{M+1} berechnet sich damit zu:

(1)

$$\frac{I_{M+1}}{I_M} = \frac{n \times 0,0108}{1 - 0,0108} + \frac{q \times a}{1 - a}$$

a = Anreicherung des schweren Isotopes an q Positionen ist.

n = Zahl der C-Atome des Moleküls.

0,0108 = Natürliche Häufigkeit des Isotopes ^{13}C .

Das Verhältnis I_{M+1}/I_M kann aus einem Massenspektrum entnommen werden. Somit kann a durch Umstellen obiger Gleichung berechnet werden.

Eine weitere Möglichkeit der Analyse des Isotopengehaltes in einer Substanz ist die rechnerische Korrektur der natürlichen Isotopenhäufigkeit (RAUSCHENBACH *et al.*, 1974). Hierbei werden die Intensitäten der Peaks M, M+1, M+2 usw. durch ein Subtraktionsverfahren so korrigiert, daß der natürlichen ^{13}C -Gehaltes im Spektrum nicht mehr enthalten ist. Die aus dem Spektrum entnommenen Intensitäten $I_M, I_{M+1} \dots$ werden nach folgendem Modus in korrigierte Werte umgerechnet:

(2)

$$I_{M+1}^{korr} = I_{M+1} - I_M \times P_1 / P_0$$

(3)

$$I_{M+2}^{korr} = I_{M+2} - I_{M+1}^{korr} \times P_2 / P_0 - I_M \times P_1 / P_0$$

(4), für $k > 2$:

$$I_{M+k}^{korr} = I_{M+k} - I_{M+k-1}^{korr} \times P_2 / P_0 - I_{M+k-2}^{korr} \times P_1 / P_0$$

Wobei P_0 , P_1 und P_2 die relativen Intensitäten der Peaks M, M+1 und M+2 sind bei natürlicher Isotopenhäufigkeit von ^{13}C . P_k wird berechnet über eine Binominalverteilung:

(5)

$$P_k = \frac{n! \times p^k \times (1-p)^{n-k}}{k! \times (n-k)!}$$

(n = Zahl der C-Atome im Molekül, p = 0,0108 natürlicher ^{13}C -Gehalt; k = 1, 2, 3 ...)

Rechenbeispiel

Anhand eines Rechenbeispielles sollen beide Berechnungsverfahren demonstriert werden:

Die Grünalge *Klebsormidium flaccidum* wurde auf [2- ^{13}C]-MVA angezogen. Das Massenspektrum von $\Delta^{5,22}$, 24-Ethyl-Cholesterol (M = [Sterylacetat-AcOH] = 394 (m/e), n = 29 C-Atome) wurde untersucht. Es gibt nach Einbau von [2- ^{13}C]-MVA (über [4- ^{13}C]-IPP) im triterpenen Cholesterol-Gerüst 5 markierbare Positionen⁴ (q = 5).

Meßdaten aus dem Massenspektrum:

$I_{394} = 1311$, $I_{395} = 2297$, $I_{396} = 1913$, $I_{397} = 820$, $I_{398} = 132$

Aus dem Verhältnis $I_{M+1} / I_M = 1,752$ berechnet sich nach Gleichung (1), daß 22,31 % der Isopreneinheiten markiert sind.

Durch Anwendung des Subtraktionsverfahrens (Gleichungen (2) – (4)) auf die Meßdaten ergeben sich folgende relative Intensitäten der Isotopenpeaks:

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5
Meßdaten (rel. Einheiten)	1311	2297	1913	820	132	0
Meßdaten (Mol %)	20,25	35,49	29,55	12,67	2,04	0
Natürl. ^{13}C -Anreicherung (Mol %) für C_{29} (Gleichung (5))	72,56	23,40	3,64	0,36	0,03	0
Anwendung des Subtraktions- verfahrens auf die Meßdaten (Gl. (2) – (4))	27,80	39,74	26,35	6,89	-0,75	-0,11
Sterolmoleküle:	$^{12}\text{C}_{29}$	$^{12}\text{C}_{28}^{13}\text{C}_1$	$^{12}\text{C}_{27}^{13}\text{C}_2$	$^{12}\text{C}_{26}^{13}\text{C}_3$	$^{12}\text{C}_{25}^{13}\text{C}_4$	$^{12}\text{C}_{24}^{13}\text{C}_5$

Nach rechnerischer Eliminierung der natürlichen ^{13}C -Anreicherung entsprechen nun die relativen Intensitäten für M+1, M+2 usw. dem Anteil an Molekülen, die einfach, zweifach usw. ^{13}C -markiert sind (obige Tabelle):

M+1: 39,47 % $^{12}\text{C}_{28}^{13}\text{C}_1$
M+2: 26,35 % $^{12}\text{C}_{27}^{13}\text{C}_2$
M+3: 6,89 % $^{12}\text{C}_{26}^{13}\text{C}_3$
.... usw ...

⁴ Bei der Sterolbiosynthese über Cycloartenol (6 Isopreneinheiten) werden drei Methylgruppen entfernt, wobei eine aus C-4 des IPP stammt und somit eine markierbare Position entfällt (siehe 4.0.1, S. 65).

Damit berechnet sich folgende Einbaurrate, bezogen auf 5 markierbare Isopreneinheiten:

$$\frac{39,74 + 2 \times 26,35 + 3 \times 6,89 + 4 \times (-0,75) + 5 \times (-0,11)}{5 \text{ markierbare Isopreneinheiten}} = 21,91\%$$

Wenn man aus dem berechneten Einbau von 21,91 % wiederum eine Binominalverteilung berechnet (Gleichung 5, $n = 5$, $p = 0,22$) findet man die Verteilung der Intensitäten Isotopenpeaks wieder, wie sie aus den Meßdaten nach Anwendung des Subtraktionsverfahrens berechnet wurden.

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5
Binominalverteilung für $n=5$, $p=0,22$ (Gleichung 5)	28,87	40,71	22,97	6,48	0,91	0

Überprüfung der GC/MS-Messmethode mit einem deuterierten Standard

Die Rotalge *Cyanidium caldarium* wurde auf Deuterium-markierter 1-Desoxy-D-Xylulose angezogen (SCHWENDER *et al.*, 1997; MÜLLER, 1997). Der Einbau in Phytol wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^2\text{H-NMR}$ -Spektren des acetylierten Phytol bestimmt. Aus den NMR-spektroskopischen Daten ergab sich, daß das Phytol an vier Methylgruppen zu 80 % monodeuteriert ist (SCHWENDER *et al.*, 1997; MÜLLER, 1997). Die Analyse der Probe mittels GC/MS erbrachte für das Fragment $\text{M} = [\text{Phytolacetat-AcOH}]^+ = 278$ folgende Intensitäten: M (1811), M+1 (2291), M+2 (8592), M+3 (24309), M+4 (36317), M+5 (7494), M+6 (894). Aus diesen Werten berechnet sich nach obiger Methode der Subtraktion der natürlichen ^{13}C -Anreicherung (4 markierbare Positionen) ein Einbau von 80,46 %, was in guter Übereinstimmung mit dem aus den NMR-Spektren gewonnenen Wert von 80 % ist. Die GC/MS-Messung lies sich mehrfach reproduzieren.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Anzucht von Algen und Pflanzen

Chlamydomonas reinhardtii (Stamm 83.81, Algensammlung Göttingen) wurde auf einem Festmedium angezogen:

1 % Agar, 0,5 % Hefeextrakt, TRIS/Essigsäure (20 mM, pH 7,0).

Folgende anorganischen Bestandteile waren enthalten: NH_4Cl (8 mM), K_2HPO_4 (0,54 mM), KH_2PO_4 (0,46 mM), MgSO_4 (1,5 mM), CaCl_2 (0,4 mM). Mikroelemente: FeSO_4 /Titriplex III (36 μM), H_3BO_3 (8 μM), MnCl_2 (2,5 μM), ZnSO_4 (0,7 μM), CuSO_4 (0,4 μM), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (16 nM).

Arabidopsis thaliana L. var. Columbia wurde auf TKS-2 Torf ausgesät. Die Anzucht erfolgte bei 22°C unter einem Lichtfeld. Nach etwa 14 Tagen konnten die Pflanzen geerntet werden.

2.4.2 Zur Klonierung verwendete *E. coli*-Stämme

XL1 Blue MRF' wurde bezogen von der Firma Stratagene (Amsterdam). Genotyp: $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, endA1 , supE44 , thi-1 , recA1 , gyrA96 , relA1 , lac , [$\text{F}'\text{proAB}$, $\text{lacI}^q\Delta\text{M15}$, $\text{Tn10}(\text{tet}^r)$, Amy , can^r]

JM109(DE3) wurde bezogen von der Firma Promega (Mannheim) und für die Expression von rekombinanten Proteinen mit dem Expressionsvektor pET5b verwendet. Der Stamm enthält den ins Genom integrierten Bacteriophagen λDE3 (lysogener Phage), welcher für eine durch den Induktor IPTG induzierbare T7-RNA-Polymerase codiert. Zusammen mit dem Expressionsvektor pET5, welcher einen T7-Promotor enthält, ist die Expression eines in pET5 klonierten Genes möglich. Genotyp von JM109(DE3): endA1 , recA1 , gyrA96 , thi , hsdR17 (r_k^- , m_k^+), relA1 , supE44 , $\Delta(\text{lac-proAB})$, [F' , traD36 , proAB , $\text{lacI}^q\Delta\text{M15}$], $\lambda(\text{DE3})$

BHB2600 wurde bezogen von Herrn Dr. M. Goldschmidt-Clermont, Universität Genf. Dieser Stamm diente der Vermehrung von λ -Phagen der *Chlamydomonas* cDNA-Bibliothek (λ -NM1149). Genotyp von BHB 2600: F^- , SupE , SupF , met^- , λCH616

2.4.3 Medien für Bakterien

Alle Medien wurden 20 min bei 120 °C autoklaviert. Bei Festmedien wurde den Flüssigmedien Agar zu einer Endkonzentration von 1,5% zugegeben.

LB-Medium (Luria-Bertani): Standardmedium zur Anzucht von *E. coli*.

1%	Bacto-Pepton
0,5%	Hefeextrakt
1%	NaCl

Vor dem Autoklavieren wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

LB-amp-Medium: Dem LB-Medium wurde nach dem Autoklavieren Ampicillin zugesetzt (Endkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$).

2x YT-Medium wurde für die Expression von Proteinen mit *E. coli* JM109(DE3) verwendet.

16 %	Bacto-Trypton
10 %	Hefe-Extrakt
5 %	NaCl

Vor dem Autoklavieren wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

SOC-Medium: Medium zum Anwachsen elektroporierter Zellen.

2,0 %	Trypton	
0,5 %	Hefeextrakt	
0,05 %	NaCl	
2,5 mM	KCl	
20 mM	MgCl ₂	
20 mM	Glucose	pH 7,0

MgCl₂ und Glucose werden einzeln als Stammlösung autoklaviert und kurz vor Gebrauch zugeben.

NZY-Medium: Medium zur Anzucht von BHB 2600

1,0 %	Bacto-Pepton	
0,5 %	Hefe-Extrakt	
0,5 %	NaCl	
0,2 %	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	pH 7,5

TOP-Agarose wurde noch flüssig mit *E. coli* BHB 2600 und λ-Phagen gemischt und dann auf eine NZY-Agar-Platte gegossen.

0,5 %	NaCl	
0,2 %	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	
0,5 %	Hefeextrakt	
1,0 %	Casein-Hydrolysat	
0,7 %	Agarose	pH 7,5

2.4.4 Vermehrung von λ-Phagen

E. coli BHB 2600 wurde über Nacht in flüssigem LB-Medium (ergänzt mit 2 % Maltose und 10 mM MgSO₄) unter Schütteln bei 30 °C angezogen. 100 µl dieser Bakterienkultur wurde mit Phagenlösung (bis zu 10⁵ pfu) gemischt. 2,5 ml verflüssigtes TOP-Agarose Medium (45 °C) wurde hinzugegeben und nach kurzem Mischen sofort auf eine vorgewärmte NZY-Platte (10 cm Durchmesser) gegossen. Nach Erhärten der Agarose wurden die TOP-Agar Platten etwa 6 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde im TOP-Agar eine Bakterentrübung mit hellen Phagenplaques sichtbar. Nun konnten einzelne Phagenplaques isoliert werden (Ausstechen mit einer Pasteur-Pipette) und in 500 µl SM-Puffer überführt werden. Ganze Plattenlysate wurden hergestellt, indem die angewachsene TOP-Agar Platte mit 4 ml SM-Puffer überschichtet wurde. Nach 1 h bei RT wurde der Überstand abgenommen. Durch Zugabe von Chloroform wurden Plaque-Lysate und Plattenlysate konserviert und konnten längere Zeit bei 4°C aufbewahrt werden.

SM-Puffer:

0,01 %	Gelatine
50 mM	Tris/HCl pH 7,5
100 mM	NaCl
8 mM	MgSO ₄

2.4.5 Isolierung von DNA

- *Isolierung von genomischer DNA aus Chlamydomonas*

Die DNA-Isolierung nach NEWMANN *et al.* (1990) wurde leicht modifiziert. Die Fällung der DNA geschieht in Anwesenheit von CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) und bei hoher Konzentration von NaCl, wodurch die Fällung von Kohlenhydraten mit der DNA verhindert wird.

50 ml dicht gewachsene Algenkultur wurde 5 min bei 5000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 150 µl H₂O resuspendiert und mit 300µl Lysis-Puffer (SDS-EB-Puffer, s. u.) versetzt. Nun wurde abzentrifugiert (10000 upm, 10 min) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 300 µl Pheno/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) zugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 15 min) wurde die Oberphase wieder in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1/7 Volumen 5M NaCl sowie 0,1 Volumen 10 % CTAB versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde mit 300µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und zentrifugiert (13000 Upm, 15 min). Die Oberphase wurde abgenommen und die DNA mit dem 2-fachen Volumen an Ethanol gefällt (0°C, 30 min). Nach Abzentrifugieren der gefällten Nukleinsäuren (13000 Upm, 10 min) wurde das Pellet zweimal mit 200µl 80% igem Ethanol gewaschen, getrocknet und zuletzt in 40µl TE aufgenommen.

SDS-EB-Puffer:

2 %	SDS
400 mM	EDTA
100 mM	Tris/HCl pH 8,0

- *Isolierung von genomischer DNA aus Arabidopsis thaliana*

100 – 500 mg Pflanzenmaterial wurden zu Beginn der Lichtperiode geerntet. Die Pflanzen (ohne Wurzel) wurden in einem vorgekühlten Mörser bei –70°C eingefroren und anschließend zermörsert. Die DNA wurde nun in der Weise wie für *Chlamydomonas* beschrieben isoliert.

- *Plasmid-Isolierung aus Bakterien*

Plasmide wurden mit Isolationskits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerprotokollen durchgeführt. Die Bakterien-Zellen wurden durch alkalische Lyse aufgebrochen. Im Gegensatz zur Plasmid-DNA kann die genomische DNA der Bakterien bei der anschließenden Neutralisierung nicht mehr renaturieren und wird mit den denaturierten Proteinen und unlöslichen Zelltrümmern abzentrifugiert. Die Reinigung der im Überstand befindlichen Plasmid-DNA beruht auf der Bindung von DNA an ein Silica-Gel Säulenmaterial unter Hochsalz-Bedingungen. Nach Entfernung von Kontaminationen durch einen Waschpuffer wird die DNA mit einem leicht alkalischen Puffer mit geringer Ionenstärke (z. B. TE-Puffer) eluiert. Die so gewonnene Plasmid-DNA besitzt den für Restriktionsverdau oder Sequenzierung notwendigen Reinheitsgrad.

- *Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen und aus Agarose-Gelen*

Hierzu wurde ein System der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Aufreinigung von DNA basiert wie bei den Plasmid-Isolationskits auf der Bindung von DNA an Silica-Gel

unter Hochsalzbedingungen und Elution mit leicht alkalischen Puffern geringer Ionenstärke. PCR-Reaktions-Ansätzen wurde ein Hochsalzpuffer zugegeben und die DNA wurde dann an eine Säule gebunden, mit Waschpuffer behandelt und die gereinigte DNA schließlich eluiert. Ausgeschnittene Agarose-Gel-Stücke wurden vor der Säulenreinigung mit einem Hochsalzpuffer bei 50 °C gelöst.

- **Reinigung von Lambda-Phagen-DNA**

Um größerer Mengen DNA eines Phagen-Klones zu gewinnen wurde *E. coli* BHB 2600 in 500 ml LB-Medium angezogen und bei einer O.D. (560 nm) von 0,4 wurden 2 ml einer Phagenlösung (etwa 10^{10} pfu) zugegeben. Nach 5h waren die Zellen lysiert (nur noch leichte Trübung der Kulturlösung) und es wurde abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde mit dem λ -Maxiprep-Kit der Fa. Qiagen (Hilden) die Phagen-DNA isoliert. Hierbei wurde zunächst die von den lysierten Bakterien stammende DNA mit einer DNase bei 37°C verdaut. Dann wurden die Phagenpartikel unter Zusatz von Polyethylenglykol gefällt und abzentrifugiert. Nach Resuspendierung der Phagen und kurzem Erhitzen (70°C, Zerstörung der DNasen), wurden die Proteinhüllen der Phagen mit einem Detergens denaturiert und abzentrifugiert. Es folgte eine DNA-Aufreinigung aus dem Überstand über eine Silica-Gel Säule.

2.4.6 Isolierung von RNA

Zur Isolation von RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* und aus *Arabidopsis thaliana* wurde das Qiagen Plant RNeasy Kit verwendet. Die RNA-Reinigung mit diesem Kit geht schnell und man bekommt die meisten RNase freien Lösungen und Geräte vom Hersteller geliefert, was ein die Gewinnung von RNA mit guter Qualität vereinfacht.

Pflanzengewebe wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver verrieben. Das Zellpulver oder absedimentierte *Chlamydomonas*-Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert. Die Zell-Lyse wurde durch einen „Qia-Shredder“ weiter vervollständigt. Dann wurde Ethanol zugegeben und die RNA an eine Anionentauscher-Säule gebunden. Nach zwei Wasch-Schritten mit verschiedenen Waschpuffern wurde die RNA mit RNase-freiem H₂O eluiert.

2.4.7 cDNA aus *Arabidopsis*-RNA

cDNA wurde aus *Arabidopsis* gesamt-RNA mit oligo-dT Primern und Superscript II Reverser Transkriptase von GIBCO (Eggenstein) hergestellt. Die (dT)₁₆-Primer binden an die Poly-A-Sequenz der 3'-Enden der mRNA. Die Reverse Transkriptase kann an am gebundenen (dT)₁₆-Primer starten und den cDNA-Strang synthetisieren.

Die RNA wurde zunächst mit dT₁₆ 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt (25 µg RNA mit 500 pmol (dT)₁₆ in 45 µl H₂O). Dann wurden 20 µl 5-fach-Puffer für die Erststrangsynthese, 10 µl 0,1 M DTT und 20 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 2,5 mM) zugegeben und 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Superscript II Reverse Transkriptase wurde für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Nach der Erststrangsynthese wurde 5 min auf 95 °C erhitzt. Die so erhaltene cDNA wurde für PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.4.8 Fällung von Nucleinsäuren

Zur Fällung wurden der DNA- bzw. RNA-Lösung 1/10 Volumen einer 3M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 0,7 Volumenteile Isopropanol zugegeben. Nach etwa 30 min auf Eis oder auch bei 4 °C über Nacht wurde die Nucleinsäure durch 20 minütiges Zentrifugieren

sedimentiert (5000*g, RT). Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 80%igem Ethanol gewaschen. Nach 3 min Zentrifugation wurde das Ethanol abgenommen und das Präzipitat 10 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Nucleinsäuren in TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
1 mM	EDTA

2.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach dem Größenbereich der zu trennenden Fragmente kamen 0,5 % -1,5 %ige Agarose-Gele zum Einsatz. Die Horizontalelektrophorese wurde bei einer Spannung von 4V/cm Trennstrecke durchgeführt. Es wurde ein TAE-Puffersystem verwendet (SAMBROOK *et al.*,1989):

TAE-Puffer

40 mM	Tris/Essigsäure, pH 7,2
1 mM	EDTA

5 X Ladepuffer:

1 X	TAE-Puffer
50 %	Glycerin
0,1 %	Bromphenolblau

Zur Probenvorbereitung wurde 0,2 Vol. an Ladepuffer zugegeben und 2 min bei 68 °C inkubiert. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 10 min mit Ethidiumbromid angefärbt (5 µg/ml in TAE-Puffer). Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator gelegt und die DNA-Banden bei 312 nm sichtbar gemacht.

Sollten nach der Gelelektrophorese bestimmte Banden wiedergewonnen werden, wurden diese mit Kristallviolett angefärbt. Das Kristallviolett befand sich im Gel und im Laufpuffer mit einer Konzentration von 5 µg /ml.

2.4.10 Quantifizierung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder RNA kann photometrisch bestimmt werden. Eine ungefähre Abschätzung der Konzentration bringt der visuelle Vergleich der Bandenstärke im Ethidium-Bromid gefärbten Agarose-Gelen.

Durch Messung im Spektralphotometer wurde die DNA-Konzentration wie folgt bestimmt:

$$\text{(Doppelsträngige DNA) in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = 0.05\mu\text{g}/\mu\text{l} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{OD}_{260 \text{ nm}}$$

Das Verhältnis $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$ sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Andernfalls liegt eine Verunreinigung der DNA-Lösung z. B. mit Proteinen vor.

- *Konzentrationsabschätzung in einem Agarosegel*

Die zu messenden DNA-Probe wurde mit DNA-Proben bekannter Konzentration (z. B. ein DNA-Größenmarker) in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid

kann durch Vergleichen der Fluoreszenzintensität der DNA-Banden der DNA-Gehalt abgeschätzt werden.

2.4.11 Markierung von DNA mit Digoxigenin (DIG-11-UTP)

Digoxigenin-markierte DNA-Sonden wurden mittels PCR-Reaktionen hergestellt. Den Desoxynukleotid-Bausteinen war DIG-11-dUTP (Fa. Boehringer, Mannheim) zugemischt.

(50 µl-Ansatz):

5 µl	MgCl ₂	25 mM
5 µl	PCR-Puffer	10-fach
1 µl	dATP	10 mM
1 µl	dCTP	10 mM
1 µl	dGTP	10 mM
0,75 µl	dTTP	10 mM
0,25 µl	DIG-11-dUTP	10 mM
32,5 µl	H ₂ O (steril)	
1 µl	DNA	
1 µl	Primer 1 (50 pmol/µl)	
1 µl	Primer 2 (50 pmol/µl)	
0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)	

Nach der PCR-Reaktion (Abschnitt 2.4.21, S. 36) wurde das Produkt durch Agarose-Gelelektrophorese geprüft und die DNA-Konzentration abgeschätzt. Als Sonde wurde aus der PCR-Reaktion soviel zur Vorhybridisierungslösung zugegeben, daß sich eine Konzentration der Sonden-DNA von 2 – 10 ng/ml ergab. Die Sonde kann mehrfach zur Hybridisierung verwendet werden.

2.4.12 Southern-Blot Analyse

Genomische DNA wurde mit einem Restriktionsenzym geschnitten (siehe 2.4.14, S. 35). 20 bis 60 µg verdaut DNA wurde mit Agarose-Gelelektrophorese (0,7 % Agarose) aufgetrennt. Das Gel wurde darauf für 1 h in Denaturierungs-Lösung gelegt. Dann wurde die DNA durch einen Abwärtstransfer in alkalischem Transferpuffer auf eine Nylon-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran für 10 min neutralisiert und dann 30 min bei 80°C gebacken.

Denaturierungslösung:

3 M	NaCl
0,4 M	NaOH

Alkalischer Transferpuffer:

3 M	NaCl
8 mM	NaOH
2 mM	Sarkosyl

Neutralisierungslösung:0,2 M Na₂HPO₄ pH 6,8

- *Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden und Chemolumineszenz-Detektion*

Es wurden Nylon-Membranen mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Hierbei kamen zwei verschiedene Protokolle zum Einsatz. Für Hybridisierung mit GC-reichen Sequenzen, wie sie bei *Chlamydomonas* anzutreffen sind, wird vielfach die Verwendung Formamid-haltiger Hybridisierungslösungen empfohlen (SAMBROOK *et al.*, 1989). Daneben wurde auch ein Hybridisierungsprotokoll ohne Formamid verwendet.

Nach Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte die Detektion der Markierung über einen Digoxigenin-spezifischen Antikörper (Anti-DIG), welcher mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt ist (Anti-DIG/AP-Konjugat, Fa. Boehringer, Mannheim). Die alkalische Phosphatase spaltet das Substrat CDP, wobei Chemolumineszenz entsteht, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wird.

- *Hybridisierung und Stringenzwaschungen: Hybridisierung mit 50 % Formamid*

Die Hybridisierung und Stringenzwaschung mit formamid-haltiger Hybridisierungslösung wurde durchgeführt nach dem „DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ der Firma Boehringer (Mannheim). Vorhybridisiert wurde die Nylonmembran für 2 h bei 42 °C. Die formamidhaltige Hybridisierungslösung wurde bei 68°C denaturiert und dann auf 42 °C temperiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C als Standardtemperatur oder davon abweichend bei einer höheren Temperatur. Nach dem Hybridisieren wurde die Membran 2x 5 min mit Waschpuffer A bei RT gewaschen. Die Stringenzwaschungen erfolgten 2 x für 15 min mit Waschpuffer B bei 68 °C.

Prähybridisierungslösung:

50%	Formamid (deionisiert)
	5x SSC
0,1%	N-Laurylsarcosin
0,02%	SDS
2%	Boehringer Blockierungsreagenz

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung + Digoxigenin-markierte DNA-Sonde (2-10 ng/ml)

Waschpuffer A

0,3 M	NaCl
30 mM	Na-Citrat pH 7,2
0,1 %	SDS

Waschpuffer B

75 mM	NaCl
7,5 mM	Na-Citrat pH 7,2
0,1 %	SDS

- *Hybridisierung und Stringenzwaschungen: Protokoll nach ENGLER-BLUM et al., 1993.*

Vorhybridisiert wurde die Nylonmembran für 2 h bei 68 °C. Die Hybridisierungslösung wurde bei 100°C denaturiert, dann auf 68 °C temperiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C als Standardtemperatur oder davon abweichend bei einer höheren Temperatur. Nach dem Hybridisieren wurde die Membran 3 x 20 min mit dem auf 68 °C vorgewärmtem Waschpuffer gewaschen.

Prähybridisierungslösung

0,25 M	Na ₂ HPO ₄	pH 7,2
1 mM	EDTA	
20 %	SDS	
0,5 %	Boehringer Blockierungsreagenz	

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung + Digoxigenin-markierte DNA-Sonde (2-10 ng/ml)

Waschpuffer

20 mM	Na ₂ HPO ₄	pH 7,2
1 mM	EDTA	
1 %	SDS	

- *Detektion*

Zur Detektion wurde zunächst mit Wasch-Puffer I gewaschen. Dann wurde mit Block-Puffer inkubiert. Dann wurde mit Puffer III das Antikörper/Alkalische Phosphatase-Konjugat gebunden. Überschüssiger Antikörper wurde mit Puffer I entfernt. Schließlich wurde im Substrat-Puffer (IV) gewaschen und mit Substrat-Lösung (V) das Chemolumineszenz-Substrat (CDP-Star) zugegeben. Die Membran wurde in Polypropylenfolie eingeschweißt und für 15 min bis mehrere Stunden ein Röntgenfilm aufgelegt.

Nach Engler-Blum	50 % Formamid
Wasch-Puffer I (5 min)	Wasch-Puffer I (1 min)
0,1M Maleinsäure	0,1M Maleinsäure
3 M NaCl	0,15 M NaCl,
0,3% Tween 20	0,3% Tween 20
pH 8,0	pH 7,5
Block-Puffer II (60 min)	Block-Puffer II (2x30 min)
Puffer I + 0,5 % Boehringer	0,1M Maleinsäure
Blockierungsreagenz	0,15 M NaCl, pH 7,5
	1 % Boehringer Blockierungsreagenz

--- Fortsetzung Tabelle vorige Seite ---

Anti-DIG-Puffer III (30 min)

Puffer II
+ anti-DIG-AP-Konjugat (1:20000)

Anti-DIG-Puffer III (30 min)

Puffer II
+ anti-DIG-AP-Konjugat (1:20000)

Wasch-Puffer I (2x20 min)

0,1 M Maleinsäure
3 M NaCl
0,3% Tween 20 pH 8,0

Wasch-Puffer I (2x30 min)

0,1M Maleinsäure
0,15 M NaCl,
0,3% Tween 20 pH 7,5

Substrat-Puffer IV (1 min)

100 mM Tris-HCl pH 9,5
100 mM NaCl
20 mM MgCl₂

Substrat-Puffer IV (1 min)

100 mM Tris-HCl
100 mM NaCl, pH 9,5

Substrat-Lösung V (5 min)

Puffer IV
+ CDP-Star 240 µM

Substrat-Lösung V (5 min)

Puffer IV
+ CDP-Star 240 µM

2.4.13 Plaquehybridisierung

Zum Durchsuchen der *Chlamydomonas* cDNA-Phagen-Bibliothek (λ NM1149) wurden die auf Top-Agar gewachsenen Phagenplaques (siehe 2.4.4, S. 27) auf Nylonmembranen (Fa. Qiagen, Hilden) übertragen. Dazu wurden die Nylon-Membranen für 1 min auf die Agar-Oberfläche aufgelegt. Dann wurden die Membranen mit der Rückseite (Abdruck nach oben) nacheinander auf drei Filterpapiere gelegt, welche mit folgenden Lösungen getränkt waren: Denaturierungslösung (5 min auflegen), Neutralisierungslösung (auflegen 15 min), 2xSSC (auflegen 20 min). Schließlich wurden die Membranen 30 min bei 80°C gebacken, um die DNA zu fixieren.

Die Hybridisierung der Membranen mit einer Digoxigenin-markierten Sonde wurde mit der Hybridisierungsmethode nach Boehringer durchgeführt (Hybridisierungslösung mit 50% Formamid, siehe 2.4.12, S. 31).

Denaturierungs-Lsg:

0,5 N NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungs-Lsg.:

1 M Tris/HCl pH 7,5
1,5 M NaCl

2X SSC

0,3 M NaCl
30 mM Na-Citrat pH 7,2
0,1 % SDS

2.4.14 Restriktionsverdau

Beim Verdau mit Restriktionsendonucleasen (Typ II) werden DNA-Stränge vom Enzym an bestimmten Erkennungssequenzen gespalten. Der Verdau erfolgt im allgemeinen mit einem für die jeweilige Restriktionsendonuklease vom Hersteller mitgelieferten Puffer bei 37 °C für 2 h unter folgenden Bedingungen:

Reaktionsansatz:

X µg DNA
1/10 Gesamtvolumen Restriktionpuffer (10-fach)
3 x X Units Restriktionsenzym
Y µl H₂O

Das Gesamtvolumen sollte mindestens das 10-fache des Volumens betragen, welches an Restriktionsenzym zugegeben wird.

2.4.15 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Präparation von Vektor-DNA für die Klonierung wurden nach dem Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen die 5'-Phosphatreste der geschnittenen DNA enzymatisch abzuspalten. Durch diese Dephosphorylierung wird deren Wiederverknüpfung in einer Ligationsreaktion verhindert. So kann die linearisierte Vektor-DNA in der Ligationsreaktion nicht mit sich selbst ligiert werden, was die Ausbeute an rekombinanten Ligationsprodukten erhöht.

Zur Dephosphorylierung wurde die Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) zum Restriktionsverdau dazugegeben (4U/pmol 5'-Enden). Das Enzym wurde nach dem Verdau durch Erhitzen auf 65°C (10 min) inaktiviert.

2.4.16 Klonierungsmethoden

Es wurde das Plasmid pBluescript SK II(+) (Fa. Stratagene, Amsterdam) verwendet. Dies ist ein Plasmid mit hoher Kopienzahl, welches eine Ampicillin-Resistenz trägt. Somit können auf Ampicillin-Medien nur transgene *E. coli*-Zellen wachsen. pBluescript besitzt außerdem einen funktionsfähigen N-terminalen Teil des β-Galaktosidase-Genes (LacZ') in welchem die Klonierungsstellen des Vektors liegen (multiple cloning site). Wurde ein Stück Fremd-DNA in das LacZ'-Gen eingefügt, kann die β-Galaktosidase nicht mehr funktionsfähig exprimiert werden. Rekombinante Klone ergeben auf mit IPTG/X-Gal (siehe 2.4.18, S. 36) behandelten LB_{amp}-Platten farblose Kolonien, wogegen *E. coli*-Transformanten mit nicht-rekombinanten Plasmiden zu blauen Kolonien anwachsen (Blau-Weiss-Selektion).

2.4.17 Ligation

Vektor-DNA und DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach, Taunus) ligiert. Ein Ligationsansatz (10 µl Volumen) enthielt 100 ng geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA und dazu soviel Insert-DNA, daß Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:1 vorlagen. Es wurde der Ligationspuffer (Fa. NEB, enthält ATP) sowie 2 Weiss Units T4-DNA-Ligase zugegeben und für 12 h bei 16 °C inkubiert.

2.4.18 Genetische Transformation durch Elektroporation

Zur Elektroporation stand ein „Genepulser II“ der Fa. BioRad (München) zur Verfügung. Elektrokompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue MRF⁺) wurden von der Firma Stratagene (Amsterdam) bezogen und bei -70 °C gelagert. Die Zellen wurden kurz vor der Elektroporation auf Eis aufgetaut. Zu 40 µl Zellen wurden 2 µl eines Ligationsansatzes (10 – 100 ng DNA) gemischt. Nach 40 s auf Eis wurden die Zellen in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette eingefüllt. Nach der Elektroporation (0,1 cm Küvette; 1500 V; 50 µF; 150 Ω) wurden die Zellen sofort in 500 µl SOC-Medium aufgenommen und für 50 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden verschiedene Mengen (2 bis 200 µl) der transformierten Zellen auf LB_{amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen. Zur Blau-Weiss-Selektion waren zuvor LB_{amp}-Platten mit Lösungen folgender Substanzen oberflächlich imprägniert worden: der Induktor IPTG (Isopropylthiogalaktosid, 800 µg pro Platte) und das Chromogen Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid, 800 µg pro Platte) in Lösung auf die Oberfläche der LB_{amp}-Platten aufgebracht worden.

2.4.19 Sequenzierung von DNA

Alle DNA-Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Mit der jeweils neu gewonnenen Sequenzinformation konnten neue Sequenzierprimer synthetisiert werden und so auch große DNA-Klone sequenziert werden. Im allgemeinen wurden die DNA-Klone in beiden Richtungen sequenziert.

2.4.20 Sequenzanalysen

Die Elektropherogramme der Sequenzierungen konnten mit einem von der Firma SeqLab zu Verfügung gestellten Programm betrachtet, die Qualität der Daten begutachtet und Lesefehler gegebenenfalls korrigiert werden.

Durch Kooperation mit dem Biochemischen Institut der Universität Karlsruhe (Prof. Dr. J. Retey) war es möglich, über eine online-Verbindung das Programmpaket HUSAR (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg) zu benutzen. Dieses Programmpaket ermöglicht verschiedene Analysen von DNA-Sequenzen (Translation, Suchen von Restriktionsschnittstellen) und ermöglicht Homologie-Recherchen in verschiedenen Gendatenbanken.

2.4.21 Standard-PCR

Für eine Standard-PCR-Reaktionen wurde folgendes Pipettierschema durchgeführt:

(50 µl-Ansatz):

32,5 µl	H ₂ O (steril)	
5 µl	MgCl ₂	25 mM
5 µl	PCR-Puffer	10-fach
4 µl	dNTP	2,5 mM
1 µl	DNA	
1 µl	Primer 1 (50 pmol/µl)	
1 µl	Primer 2 (50 pmol/µl)	
0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)	

Die eisgekühlte Mischung wurde bei 95 °C in den Thermocycler gestellt. Dann wurde ein von den Primern abhängiges Temperaturprogramm mit 25-35 Zyklen durchgeführt: Denaturierung (95 °C, 30 sec.), Hybridisierung der Primer (50-60 °C, 30 sec.), Komplementärstrang-Synthese (72 °C, 30 – 60 sec.).

2.4.22 Heterologe Expression in *E. coli*

Zur Expression der klonierten DOXP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* und der DOXP-Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana* wurden die Plasmide pET5bDXS (siehe 3.3.4, S. 54) bzw. pET5bDXR (siehe 3.4.2, S. 62) in *E. coli* JM109(DE3) in *E. coli* transformiert. *E. coli* JM109(DE3) ist geeignet für die Expression von T7-Expressionsplasmiden wie pET (vgl. 2.4.2, S. 26).

- *Induktion transgener E. coli und Zellaufschluß*

E. coli JM109(DE3)/pET5bDXS und *E. coli* JM109(DE3)/ pET5bDXR wurden in 2xYT-Medium (s. 2.4.3) bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von $OD_{560\text{ nm}} = 0,6$ in einem Schüttelinkubator angezogen. Dann wurde IPTG zugegeben (1mM) und 4h bei 22 °C weiter geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5000g), mit 1%iger wässriger NaCl-Lösung gewaschen und schließlich in mindestens 4 Zellvolumen Extraktionspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden dann mit einer French Press bei 4 °C aufgeschlossen. Dann wurde das Zell-Lysat 30 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit Glycerin versetzt (auf 20 % v/v) und bis zur Verwendung in Enzymtests bei -20°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt nach LOWRY (1951).

Extraktionspuffer I (DOXP-Reduktoisomerase):

Tris/HCl	pH 7,5	100 mM
MgCl ₂		2 mM
DTT		2 mM
PMSF		100 µM

Extraktionspuffer II (DOXP-Synthase):

= Extraktionspuffer I +

NaF		5 mM
TPP		50 µM
Na-EDTA		500 µM

Die folgenden Enzymtests für DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase wurden am Institut Botanik II von Herrn Dipl. Biol. Christian Müller im Rahmen seiner Dissertation entwickelt.

- *Enzymtest DOXP-Synthase (20 µl Gesamtvolumen):*

Proteinextrakt +

Tris/HCl	pH 7,5	100 mM
DTT		2 mM
MgCl ₂		2 mM
Na-EDTA		500 µM
PMSF		100 µM
NaF		5 mM
TPP		1 mM
Na-Pyruvat		1 mM
Na-[2- ¹⁴ C] Pyruvat		4,6 KBq
DL-Glycerinaldehyd-3-P		3,75 mM

Es wurde bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Erhitzen für 30 s im kochenden Wasserbad. Dann wurde CaCl₂ auf 100 mM Endkonzentration zugegeben, um das Fluorid auszufällen. Es wurde alkalische Phosphatase zugegeben (2 U) und 2 h bei 30°C inkubiert.

- *Enzymtest DOXP-Reduktoisomerase (20 µl Gesamtvolumen):*

Proteinextrakt

Tris/HCl	pH 7,5	100 mM
DTT		2 mM
MgCl ₂		2 mM
PMSF		100 µM
NaF		5 mM
¹⁴ C-DOXP 3 KBq		0,25 mM
NADPH ₂		5 mM

Es wurde inkubiert bei 30°C. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Erhitzen im kochenden Wasserbad für 30 s. Dann wurde CaCl₂ auf 100 mM zugegeben, um das Fluorid auszufällen. Es wurde alkalische Phosphatase zugegeben (2 U) und 2 h bei 30°C inkubiert.

- *Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte*

Von den radioaktiven dephosphorylierten Reaktionsansätzen der DOXP-Synthase oder der DOXP Reduktoisomerase wurden 2 bis 5 µl auf Kieselgel 60 (Merck) Dünnschichtplatten aufgetragen und mit Aceton/Ethylacetat/Wasser (50+50+2) entwickelt. Ein Autoradiogramm der Dünnschichtplatte wurde anschließend in einem Instant Imager (InstantImager, Fa. Packard) erhalten. DOX (Rf 0,4), Methylerythritol (Rf 0,2) und Pyruvat (Rf 0) wurden durch chromatographische Standards identifiziert. Nicht-radioaktive Produkte wurden durch Besprühen der Dünnschichtplatten mit Methanol/Schwefelsäure/p-Anisaldehyd (85:10:5:0,5 v/v/v/v) und anschließendes Erhitzen auf 110 °C sichtbar gemacht.

3 Ergebnisse

3.1 Markierungsexperimente mit einzelligen Grünalgen

3.1.1 Einbau von [3-¹³C]-Pyruvat in Phytol von *Scenedesmus obliquus*.

Scenedesmus obliquus war heterotroph auf Glucose unter Zusatz von Na-[3-¹³C]-Pyruvat angezogen worden. Die Analyse des markierten Phytols mittels ¹³C-NMR ergab in den C-5 der Isopreneinheiten eine ¹³C-Anreicherung von etwa 5 % gegenüber dem natürlichen Gehalt von 1,1 % in allen anderen Positionen (Tabelle 3-1). Zusätzlich zum Phytol wurde noch eine Fettsäure untersucht. Fettsäuren werden aus Acetyl-CoA gebildet, welches aus Pyruvat über Pyruvat-Dehydrogenase gebildet werden kann. In der Fettsäure Palmitinsäure-Methylester waren alle geradzahligen C-Atome (C-2, C-4, ... C-16) zu 5-6 % mit ¹³C angereichert (Tabelle A-18), was zeigt, daß [2-¹³C]-Acetyl-CoA in die Fettsäurebiosynthese einging. Bei der Biosynthese der Isopreneinheiten aus [2-¹³C]-Acetyl-CoA über den Acetat/Mevalonat-Weg wäre eine Markierung der C-Atome C-2, C-4 und C-5 der Isopreneinheiten zu erwarten gewesen. Dagegen wurde nur C-5 markiert.

Tabelle 3-1 ¹³C-Gehalte in den fünf C-Atomen der Isopreneinheiten verschiedener Prenyllipide aus *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca*. Die Gehalte sind Mittelwerte, welche aus den Daten im Anhang A berechnet wurden (Tabellen A-17, A-19 bis A-23, A-26 bis A-30). Nummerierung der C-Atome der Isopreneinheiten siehe Abbildung 1-1.

Organismus Markierte Vorstufe (Isotopen-Anreicherung)	Analysierte Isoprenoide	Isotopengehalt in den Isopreneinheiten (%)				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
<i>Scenedesmus obliquus</i> [3- ¹³ C]-Pyruvat (99 %)	Phytol	1,2	1,1	1,1	1,0	4,7
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> [1- ¹³ C]-Glucose (10%)	Phytol, Lutein, 22,23-Dihydro- chondrillasterol, Ergost-7-enol, Chondrillasterol	3,3 3,3 4,2 2,8 2,5	1,1 1,1 1,6 0,9 1,0	1,1 1,2 1,6 1,0 1,1	1,4 1,6 1,8 1,4 1,3
<i>Chlorella fusca</i> [1- ¹³ C]-Glucose (10%)	Phytol, β-Carotin, 22,23-Dihydro- chondrillasterol, Ergost-7-enol, Chondrillasterol	3,5 2,9 3,5 3,9 4,0	1,0 0,9 1,2 1,1 1,1	1,0 0,9 1,2 1,1 1,1	1,3 1,2 1,4 1,2 1,4	3,4 3,1 3,5 3,3 4,2

3.1.2 Einbau von [1-¹³C]-Glucose in *Chlorella fusca* und *Chlamydomonas reinhardtii*

Nach heterotropher Anzucht von *Chlorella fusca* und *Chlamydomonas reinhardtii* auf [1-¹³C]-Glucose waren in Phytol, β -Carotin, Lutein, 22,23-Dihydro-Chondrillasterol, Ergost-7-enol und Chondrillasterol alle Isopren-Einheiten nach dem gleichen Muster markiert: die C-Atome C-1 und C-5 der Isopreneinheiten waren zu 3 bis 5 % mit ¹³C angereichert gegenüber 1,1 bis 1,8 % ¹³C-Gehalt an den übrigen Positionen (Tabelle 3-1, Abbildung 3-1). In der Palmitinsäure aus beiden Algen (Anhang A, Tabellen A-24, A-31), sowie in dem aus Docosensäure (C₂₂) abgeleiteten Docosanol (Anhang A, Tabellen A-25, A-32) waren die geradzahligten C-Atome zu 3,0 bis 3,6 % mit ¹³C angereichert, während für die anderen C-Atome ein ¹³C-Gehalt von 1,0 bis 1,4 % gemessen wurde. Dies läßt auf [2-¹³C]-Acetyl-CoA als biosynthetische Vorstufe der Fettsäuren und als mögliche Vorstufe für IPP schließen. Bei einer IPP-Biosynthese über den Acetat/Mevalonat-Weg hätten die Isopreneinheiten aus [2-¹³C]-Acetyl-CoA an C-2, C-4 und C-5 markiert werden müssen.

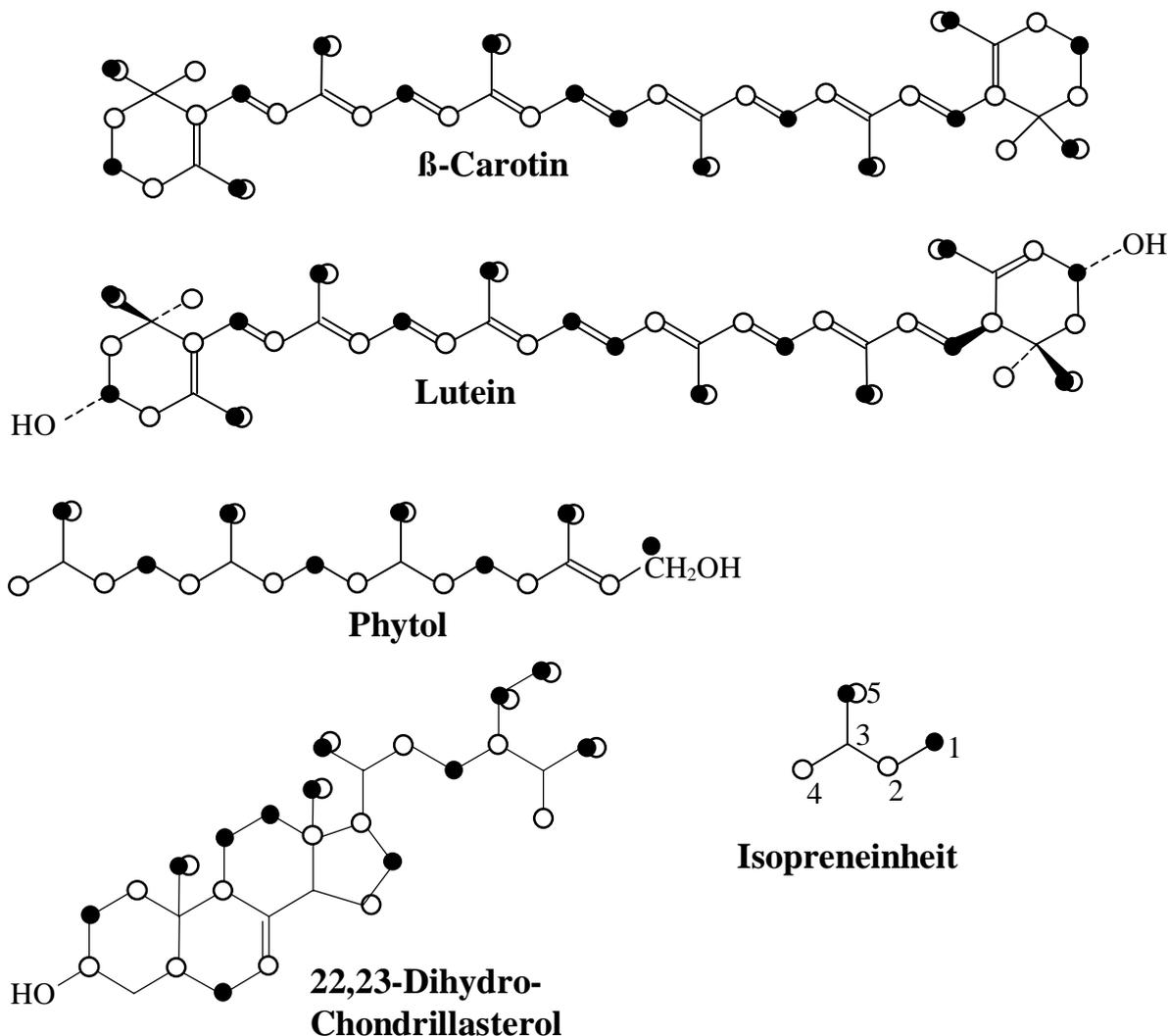


Abbildung 3-1 Einbau von [1-¹³C]-Glucose in Isoprenoide der Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca*. Die schwarzen Punkte (●) zeigen die Positionen der gefundenen Markierungen. Die offenen Kreise (○) zeigen die nach dem klassischen Acetat/Mevalonat-Weg erwarteten Markierungen an. Die Markierung der einzelnen Isopreneinheiten in C-1 und C-5 ist in allen Isoprenoiden identisch.

3.1.3 Einbau von [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton in Grünalgen

[1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton (Abbildung 3-2) wurden autotroph wachsenden Kulturen der Grünalgen *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Gloeotilopsis planctonica*, *Klebsormidium flaccidum* und *Spirogyra* sp. zugegeben. Der Einbau in Phytol sowie in die Haupt-Sterolkomponenten (% der mit ²H oder ¹³C markierten Isopreneinheiten) wurde jeweils mittels GC/MS bestimmt (Tabelle 3-2).

Für *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Gloeotilopsis planctonica* konnte jeweils ein etwa gleich großer Einbau von 1-Desoxy-D-Xylulose sowohl in das Phytol, als auch in die Sterole gemessen werden (Tabelle 3-2). Der Einbau in Phytol und in die Sterole betrug zwischen 10 % bei *Chlamydomonas* und 74 % bei *Gloeotilopsis*. Nach Verabreichung von DL-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton an Kulturen von *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Gloeotilopsis planctonica* zeigten die Massenspektren des Phytol und der Sterole keinerlei Einbau an.

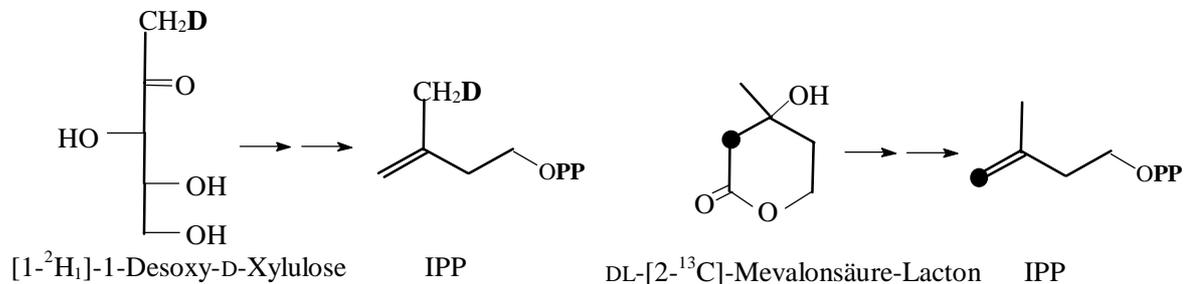


Abbildung 3-2 Markierte (potentielle) Vorstufen für Isoprenopide. Die Markierung des aus den Vorstufen gebildeten IPP ist angezeigt. (●) = ¹³C-markierung.

Die Grünalgen *Klebsormidium flaccidum* und *Spirogyra* sp. verhielten sich im Vergleich zu den anderen untersuchten Grünalgen grundsätzlich anders. [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose wurde von *Klebsormidium* mit geringer, aber signifikanter Anreicherung in Phytol wie auch in die Sterole eingebaut. DL-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton wurde dagegen in *Klebsormidium* in vielfach höherer Anreicherung in die Sterole eingebaut, als in das Phytol (Tabelle 3-2). In *Spirogyra* wird Mevalonsäure vorwiegend in die Sterole, [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose dagegen etwa 2fach höher in das Phytol als in die Sterole eingebaut (Tabelle 3-2).

- **Spezifischer Einbau der [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol und Sterole**

Im Massenspektrum des Phytol, welches in *Gloeotilopsis* aus [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose markierten worden war, hatte im Bereich des Moleküls der M+4 Peak die höchste Intensität (Abbildung 3-3). Nach rechnerischer Subtraktion der natürlichen ¹³C-Anreicherung (siehe 2.1.5, S. 16) ergibt sich, daß 48 % der Phytol-Moleküle vierfach, 22 % dreifach, 8 % zweifach und 3 % einfach deuteriert sind. Das in Abbildung 3-3 sichtbare Fragment der Masse M+5 ist durch den natürlichen ¹³C-Gehalt der vierfach Deuteriummarkierten Phytolmoleküle erklärbar und geht deshalb nicht auf fünffache Deuterierung zurück (M+5/M+4 = 0,23). Dem Massenspektrum gemäß gibt es also 1-, 2-, 3- und 4-fach deuterierte Phytol-Moleküle. Ähnlich kann auch für das Massenspektrum des aus [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose zu 58 % markierten Phytol aus *Spirogyra* festgestellt werden, daß auch hier höchstens vierfach deuterierte Moleküle auftreten (siehe Tabellen im Anhang B). Offensichtlich geht im Phytol jede der vier Isopreneinheiten aus 1-Desoxy-D-Xylulose hervor.

Das Massenspektrum des aus $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose markierten Δ^5 -24-Ethylsterol aus *Gloeotilopsis* zeigt in gleicher Weise die Markierung an vier Positionen an (siehe Tabellen im Anhang B), wobei bedacht werden muß, daß von den sechs markierbaren Methylgruppen im Cycloartenol im endgültigen Sterolemolekül zwei verloren gehen (siehe Abbildung 4-1, S.65: C-30, C-31 und C-32 gehen verloren).

Tabelle 3-2 Einbau von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose und DL-[2- ^{13}C]-Mevalonsäurelacton in Phytol und Sterole verschiedener Grünalgen. Die Einbauraten wurden aus den MS-Daten (Anhang B) mittels der Methode der Korrektur der natürlichen ^{13}C -Anreicherung berechnet (siehe 2.3, S. 21). Die Zahlenwerte sind in dieser Tabelle gerundet.

Analysierte Substanz	Prozent Einbau aus:			
	$[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose		DL-[2- ^{13}C]-MVL	
<i>Scenedesmus obliquus</i>				
	0,05 %		0,05 %	
Phytol	37 %		0 %	
Chondrillasterol	39 %		0 %	
Ergost-7-enol	43 %		0 %	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Stamm 83.81)				
	0,05 %		0,05 %	
Phytol	11 %		0 %	
$\Delta^{5,7,22}$ 24-Ethyl-Sterol	10 %		0 %	
$\Delta^{5,7,22}$ 24-Methyl-Sterol	8 %		- %	
<i>Gloeotilopsis planctonica</i>				
	0,05 %		0,05 %	
Phytol	74 %		0 %	
Δ^5 24-Ethyl-Sterol	73 %		0 %	
<i>Klebsormidium flaccidum</i>				
	0,02 %		0,05 %	
	0,02 %		0,05 %	
Phytol	2 %	4 %	0 %	0 %
Δ^5 24-Methyl-Sterol	2 %	4 %	9 %	26 %
$\Delta^{5,22}$ 24-Ethyl-Sterol	2 %	4 %	7 %	22 %
<i>Spirogyra sp.</i>				
	0,05 %		0,05 %	
Phytol	58 %		2 %	
$\Delta^{5,24(28)}$ -24-Ethyliden-Sterol	27 %		18 %	
$\Delta^{5,24(28)}$ -24-Methylen-Sterol	26 %		31 %	

Auch die Massenspektren von markiertem Phytol aus *Scenedesmus obliquus*, *Lemna gibba* (siehe 3.2.3, S. 47) und *Hordeum vulgare* (siehe 3.2.4, S. 48) lassen das Vorkommen von vier deuterierbaren Positionen im Molekül erkennen. Wurden in den GC/MS-Chromatogrammen statt der Mittelung aller MS-Spektren des Phytol-Signals nur die MS-Spektren aus der linken Hälfte des Signals gemittelt (der geringsten Retentionszeit), fand sich eine vergleichsweise höhere Deuterium-Anreicherung. Der M+4-Peak hatte wie beim Phytol aus *Gloeotilopsis* und *Spirogyra* die höchste Intensität und die Moleküle sind an vier Positionen deuteriert. Die Anreicherung von hoch-markierten Phytol-Molekülen im linken Teil des GC-Signales deutet auf ein leicht verändertes chromatographisches Laufverhalten Deuterium-markierter Phytol-Moleküle hin.

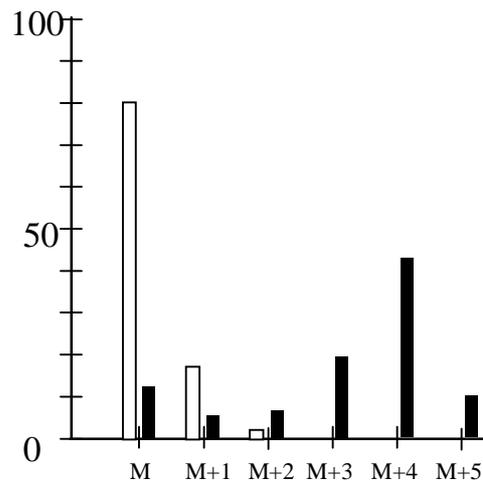


Abbildung 3-3 Massenspektrum von Phytolacetat aus dem Bereich des Fragmentes M = 278 [Phytylacetat-AcOH]⁺. Weiße Balken: Natürliche Isotopenanreicherung. Schwarze Balken: Aus [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose markiertes Phytol aus *Gloeotilopsis*. Detaillierte Informationen siehe Anhang B.

3.1.4 Zusammenfassung: Markierungsexperimente mit Grünalgen

In *Scenedesmus obliquus* wurden aus [3-¹³C]-Pyruvat alle C-Atome des Phytol markiert, welche dem C-5 der Isopreneinheiten entsprechen. Es konnte kein Hinweis auf eine Markierung nach dem Acetat-Mevalonat-Weg gefunden werden. Nach heterotrophem Wachstum von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca* auf [1-¹³C]-Glucose wurden Phytol, Carotinoide, sowie die Sterole nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Biosyntheschema markiert, wie dies schon für *Scenedesmus obliquus* bekannt war. Ein Einbau von [2-¹³C]-Mevalonsäurelacton in Isoprenoide der Grünalgen *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Gloeotilopsis planctonica* konnte nicht nachgewiesen werden, wogegen diese Grünalgen die alternative IPP-Vorstufe [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose gleichermaßen in das plastidäre Phytol wie auch in die cytosolischen Sterole einbauten. Die Charophyceen *Klebsormidium flaccidum* und *Spirogyra sp.* bauten [2-¹³C]-Mevalonsäurelacton in die Sterole, dagegen aber kaum in das Phytol ein. [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose wurde von *Spirogyra* deutlich besser in das Phytol als in die Sterole, von *Klebsormidium* mit gleicher Rate in Phytol und die Sterole eingebaut.

3.2 Markierungsexperimente mit höheren Pflanzen

3.2.1 Einbau von [1-¹³C]-Glucose in Isoprenoide grüner Pflanzengewebe

Lemna gibba war mixotroph auf [1-¹³C]-Glucose angezogen worden. Embryonen aus steril-behandelten Gersten-Karyopsen (*Hordeum vulgare*) waren auf einer Nährlösung mit [1-¹³C]-Glucose im Schwachlicht angezogen worden. Eine grüne Kallus-Gewebekultur aus *Daucus carota* war auf einem Festmedium mit Zusatz von [1-¹³C]-Glucose vermehrt worden. Aus den markierten Geweben wurden verschiedene Prenyllipide und Fettsäuren gereinigt sowie die ¹³C-Anreicherung in allen C-Positionen mittels ¹³C-NMR untersucht.

Die in *Hordeum vulgare* und *Lemna gibba* untersuchte Palmitinsäure war in beiden Pflanzen in gleicher Weise markiert. Die geradzahigen C-Positionen waren zu etwa 4,5 % (*Hordeum vulgare*) bzw. 2,5 % (*Lemna gibba*) mit ¹³C angereichert, was nach dem bekannten Biosyntheschema der Fettsäuren aus Acetyl-CoA auf einen Einbau von [2-¹³C]-Acetyl-CoA in die Fettsäuren hinweist (Tabellen A-9, A-16).

In allen drei Versuchsansätzen (*Lemna*, *Hordeum*, *Daucus*) waren in den analysierten Haupt-Sterolen (Sitosterol, Stigmasterol) die Isopreneinheiten in einheitlicher Weise markiert (Tabelle 3-3, Abbildung 3-4). Die C-Atome C-2, C-4 und C-5 der Isopreneinheiten wiesen eine deutliche ¹³C-Anreicherung gegenüber C-1 und C-3 auf (Tabelle 3-3). Dies weist auf eine Bildung von IPP aus [2-¹³C]-Acetyl-CoA über den Acetat/Mevalonat-Weg hin. Jedoch kann man für alle Sterole jeweils auch erkennen, daß C-1 der Isopreneinheiten eine etwas höhere ¹³C-Anreicherung aufweist als C-3 (Tabelle 3-3). Dies weist auf einen geringen Anteil von Isopreneinheiten hin, welche wie die Isoprenoide der Grünalgen an C-1 und C-5 markiert wurden.

Tabelle 3-3 ¹³C-Gehalte in den fünf C-Atomen der Isopreneinheiten verschiedener Prenyllipide aus *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota*. Die Gehalte sind Mittelwerte, welche aus den Daten im Anhang A berechnet wurden (Tabellen A-3 bis A-8, A-10 bis A-15). Nummerierung der C-Atome der Isopreneinheiten siehe Abbildung 1-1.

Organismus Markierte Vorstufe (Anreicherung)	Analysierte Isoprenoide	Isotopengehalt in den Isopreneinheiten (%)				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
<i>Lemna gibba</i> [1- ¹³ C]-Glucose (10%)	Sitosterol,	2,0	2,5	1,5	2,7	3,0
	Stigmasterol,	2,0	2,7	1,4	2,8	2,8
	Phytol,	3,1	1,4	1,5	1,6	3,1
	β-Carotin,	1,9	1,0	0,9	1,2	1,9
	Lutein,	2,6	1,4	1,3	1,4	2,8
	Plastochinon-9	1,9	1,1	1,1	1,1	2,0
<i>Hordeum vulgare</i> [1- ¹³ C]-Glucose (15%)	Sitosterol,	1,7	3,8	1,3	3,9	4,2
	Stigmasterol,	1,4	3,3	1,3	3,2	3,1
	Phytol	4,7	1,0	1,1	1,4	4,5
<i>Daucus carota</i> Saccharose + [1- ¹³ C]-Glucose (molares Verhältnis 5:1)	Sitosterol,	2,5	5,1	1,7	4,9	5,5
	Stigmasterol,	1,7	3,8	1,1	4,2	4,0
	Phytol	3,2	1,3	1,4	1,7	3,2

Die Isopreneinheiten des Phytol (*Lemna*, *Hordeum*, *Daucus*) sowie des β -Carotin, des Lutein und des Plastochinon-9 (*Lemna*) wurden aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose in anderer Weise als die der Sterole markiert. Die für den Acetat/Mevalonat-Weg erwartete Markierung an C-2, C-4 und C-5 der Isopreneinheiten wurde nicht gefunden. Stattdessen waren alle Isopreneinheiten an C-1 und C-5 markiert (Tabelle 3-3, Abbildung 3-4). Dies ist das schon in *Scenedesmus obliquus* gefundene isoprenoide Markierungsmuster (SCHWENDER *et al.*, 1995; 1996).

3.2.2 Einbau von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose und $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose in Lycopin reifender Tomaten

Tomatenfrüchte waren zu Beginn der Reifung (Lycopinakkumulation) geerntet worden. Eine wässrige Lösung mit $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose, $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose, $[2-^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton oder $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose wurde in die Fruchtkammern injiziert. Nach 10 Tagen der Lycopinbildung wurde das Lycopin extrahiert, dünnschichtchromatographisch gereinigt und mittels ^{13}C -NMR untersucht.

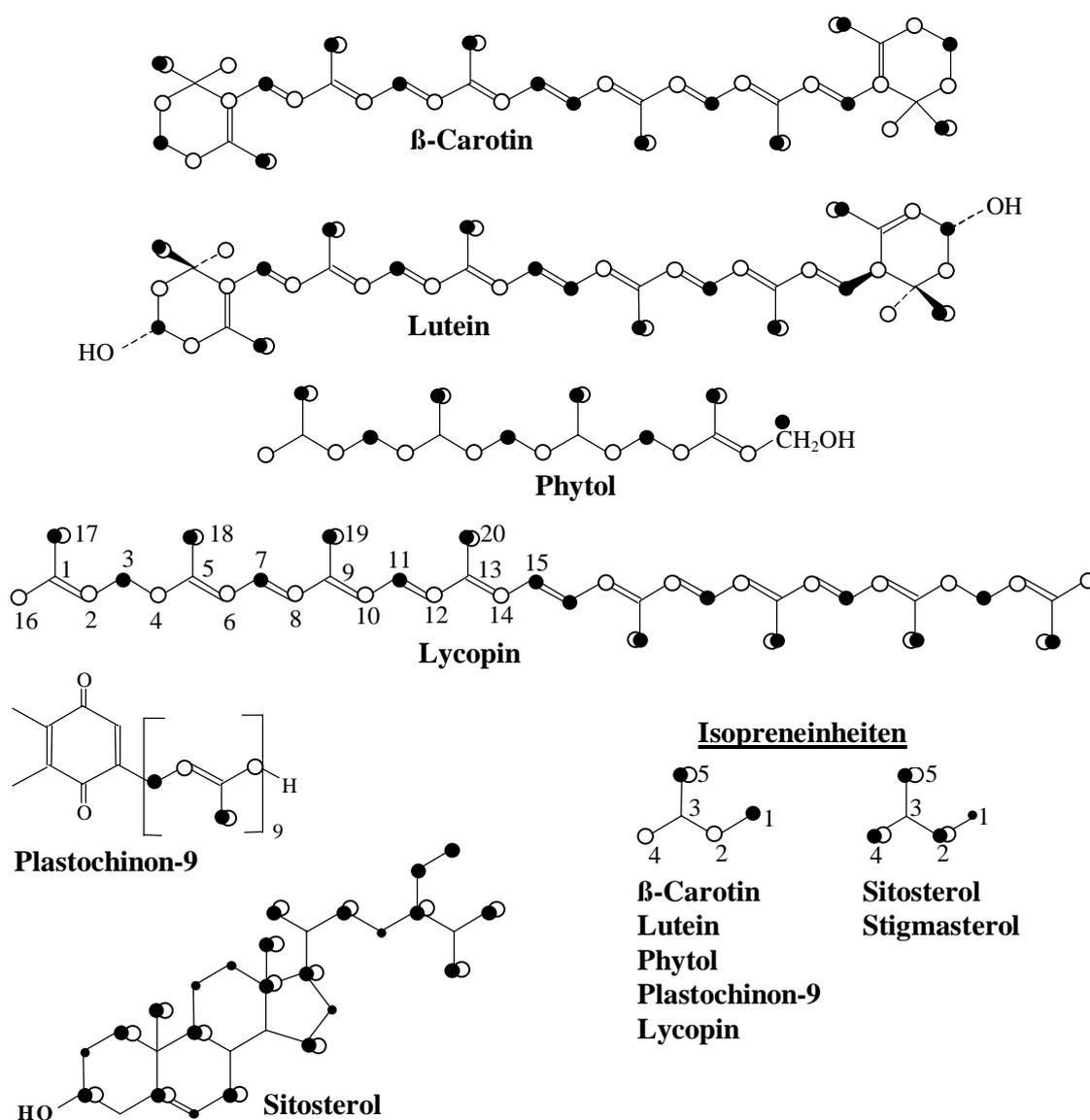


Abbildung 3-4 Einbau von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose in Isoprenoide der Wasserlinse (*Lemna gibba*), Gerste (*Hordeum vulgare*), Karotte (*Daucus carota*) und Tomate (*Lycopersicum esculentum*). Die schwarzen Punkte (●) zeigen die Positionen der gefundenen Markierungen. Die offenen Kreise (○) zeigen die nach dem klassischen Acetat/Mevalonat-Weg erwarteten Markierungen an.

Aus [1-¹³C]-Glucose ergab sich ein Markierungsmuster der Isopreneinheiten des Lycopin, wie es zuvor schon für verschiedene Grünalgen und für plastidäre Isoprenoide aus *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota* gefunden worden war (siehe 3.2.1, S. 44). In C-1 und C-5 der Isopreneinheiten fand sich eine relative Anreicherung von 2 % ¹³C gegenüber 1,1 bis 1,3 % in den Positionen C-2, C-3 und C-4 (Tabelle 3-4, Abbildung 3-4). Dies weist wiederum auf die aus *Scenedesmus obliquus* bekannte IPP-Biosynthese aus Pyruvat und Triosephosphat hin (SCHWENDER *et al.*, 1995; 1996). Aus [2-¹³C]-Mevalonsäurelacton fand sich nur eine schwache Markierung in C-4 der Isopreneinheiten (Tabelle 3-4). Aus [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose konnte mittels ¹H-NMR kein Einbau in das Lycopin nachgewiesen werden.

Tabelle 3-4 ¹³C-Gehalt in den fünf C-Atomen der Isopreneinheiten des Lycopin aus Tomatenfrüchten (*Lycopersicon esculentum*). Der ¹³C-Gehalt kann relativ angegeben werden, indem im markierten Lycopin C-5 mit 1,1% festgelegt wurde (vgl. Abbildung 3-4). Die Gehalte sind Mittelwerte, welche aus den Werten im Anhang A berechnet wurden (Tabellen A-1, A-2). Nummerierung der C-Atome der Isopreneinheiten siehe Abbildung 3-4.

		Analysiertes Isoprenoid	Isotopengehalt in den Isopreneinheiten (%)				
			C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
<i>Lycopersicon esculentum</i>							
[1- ¹³ C]-Glucose	Lycopin		2,1	1,1	1,1	1,3	2,0
[2- ¹³ C]-Mevalonsäurelacton	Lycopin		1,1	1,1	1,1	1,3	1,0

• ¹³C/¹³C-Kopplungen in Lycopin nach Einbau von [U-¹³C₆]-Glucose.

Nach Injektion von [U-¹³C₆]-Glucose in reife Tomaten konnten im ¹³C-NMR-Spektrum des markierten Lycopin verschiedene ¹³C/¹³C-Kopplungen beobachtet werden (Abbildung 3-5), welche auf das häufige und damit meßbare Vorkommen der in Abbildung 3-5 dargestellten Isotopomeren hindeutet.

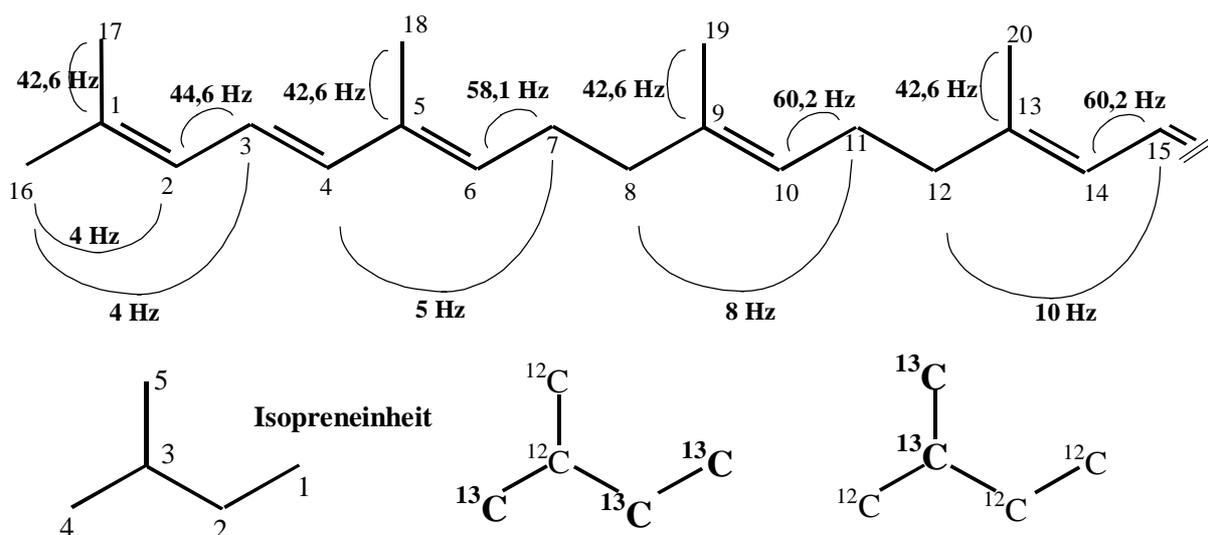


Abbildung 3-5 Interpretation der gemessenen ¹³C/¹³C-Kopplungen, welche im ¹³C-NMR-Spektrum von Lycopin aus Tomatenfrüchten nach Einbau von [U-¹³C₆]-Glucose auftraten. Die Kopplungskonstanten in Hz sind angegeben. Die Isopren-Isotopomeren, welche die beobachteten Kopplungen verursachen, sind angezeigt. Bei einer Bildung der Isopreneinheiten aus Acetyl-CoA über Mevalonsäure wäre das gezeigte Isotopomer ¹²C₂¹³C₃ nicht zu erwarten gewesen.

Die Aufspaltungen der NMR-Signale mit Abstand zwischen 40 und 60 Hz sprechen für die Kopplung benachbarter ^{13}C -Kerne (HESSE *et al.*, 1997). Solche Kopplungen zeigen an, daß Bindungen zwischen zwei ^{13}C -Atomen aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glucose-Molekülen bis in das Lycopin erhalten blieben. Kopplungskonstanten < 10 Hz weisen auf die Kopplung zweier ^{13}C -Kerne hin, welche über zwei oder drei C-C-Bindungen reichen (HESSE *et al.*, 1997), d. h. daß ursprünglich in einem $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glucose-Molekül benachbarte C-Atome z. B. durch eine intramolekulare Umlagerung während der Lycopin-Biosynthese voneinander entfernt wurden.

Für alle C-Atome des Lycopin, welche C-3 und C-5 der Isopreneinheiten entsprechen, konnte eine Aufspaltung der NMR-Signale in Dubletts mit Kopplungskonstanten von etwa 42 Hz beobachtet werden (Abbildung 3-5). C-3 und C-5 der Isopreneinheit sind also eine biosynthetische C_2 -Einheit. Für die C-Atome C-3, C-7, C-11 und C-15 des Lycopin, welche alle dem C-1 des IPP entsprechen, war eine doppelte Aufspaltung der NMR-Signale in Dubletts von Dubletts zu sehen. Dies zeigte, daß eine Kopplung zwischen C-1 und C-2 der Isopreneinheiten (44 - 60 Hz) sowie zusätzlich zwischen C-1 und C-4 der Isopreneinheiten (4-10 Hz) bestand (siehe Abbildung 3-5). Die Signale C-4, C-8, C-12 und C-16, welche C-4 der Isopreneinheiten entsprechen, zeigten $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Kopplungen (< 10 Hz) mit dem C-1 der jeweiligen Isopreneinheit (siehe Abbildung 3-5). Die Doppelaufspaltungen am C-1 der Isopreneinheiten sowie die Aufspaltungen < 10 Hz am C-4 beweisen den gemeinsamen Einbau von drei ^{13}C -Kernen in die Positionen C-1, C-2 und C-4 des IPP, d. h. die C-Atome in diesen Positionen stammen aus einem Glucosemolekül. Die für den Einbau der C_3 -Einheit ebenfalls zu erwartende Doppelaufspaltung der Signale für C-2 der Isopreneinheiten war nur für C-2 des Lycopin deutlich zu sehen (etwa 4 Hz, Abbildung 3-5).

Zusammenfassend kann für den Einbau von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glucose in Lycopin festgestellt werden, daß jede Isopreneinheit des Lycopin biosynthetisch aus einer C_2 -Einheit und einer C_3 -Einheit hervorgegangen ist: C-3 mit C-5 stammen aus einer C_2 -Einheit, C-1, C-2 und C-4 stammen aus einer C_3 -Einheiten. Dies ist ein Markierungsmuster, welches mit der Biosynthese des IPP aus Acetat-Einheiten nicht vereinbar ist und auch schon in *Scenedesmus obliquus* beim Einbau von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glucose beobachtet worden war (SCHWENDER *et al.*, 1996).

3.2.3 Einbau von $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose und DL- $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton in *Lemna gibba*

Wasserlinsen (*Lemna gibba*) wurden photoautotroph auf einem Flüssigmedium unter Zugabe von $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton (MVL) oder der mutmaßlichen alternativen IPP-Vorstufe $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose (Abbildung 3-2) angezogen. Der Einbau in Phytol sowie in die Hauptsterolkomponente Sitosterol wurden mittels GC/MS bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose besser in Phytol als in Sitosterol eingebaut wurde (zwischen 2 bis 3-fache Einbaurate). Bei Verabreichung von DL- $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -MVL ergab sich das umgekehrte Bild: MVL wurde deutlich besser in Sitosterol als in das Phytol eingebaut (zwischen 6 bis 12-fache Einbaurate). Ähnlich wie unter 3.1.3 (S. 41) für Grünalgen beschrieben, zeigte das Massenspektrum des aus $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose markierten Phytol vier markierbare Positionen an, gemäß der Vorstufenfunktion der 1-Desoxy-D-Xylulose für die vier Isopreneinheiten des Phytol (vgl. Tabellen im Anhang B).

Tabelle 3-5 Einbau von $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose und DL- $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton in Isoprenoide von *Lemna gibba*.

Analysierte Substanz	Prozent Einbau aus:				
	$[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose			DL- $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -MVL	
Angebotene Konzentration →	0,02 %	0,05 %	0,07 %	0,01 %	0,02 %
Phytol	20 %	46 %	53 %	1 %	1 %
Sitosterol	6 %	18 %	25 %	6 %	12 %

3.2.4 Einbau von $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose in ergrünende Gerstenkeimlinge

5 Tage alte etiolierte Gerstenkeimlinge wurden abgeschnitten und in eine Lösung mit $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose gestellt. Nach Aufnahme der Substanz im Dunkeln und nachfolgender Ergrünung im Licht wurden die Lipide extrahiert und Phytol sowie Sitosterol mittels GC/MS analysiert. Phytol wurde zu etwa 40 % aus $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose markiert, während Sitosterol zu etwa 2 % markiert war. Ähnlich wie unter 3.1.3 (S. 41) für Grünalgen beschrieben, zeigt das Massenspektrum des markierten Phytol eine Deuterierung an vier Positionen an (vgl. Tabellen im Anhang B).

3.2.5 Zusammenfassung: Einbauversuche mit höheren Pflanzen

Aus $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -Glucose zeigten die plastidären Prenyllipide aus *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* (Phytol, β -Carotin, Lutein, Plastochinon-9) sowie das Lycopin aus reifen Tomatenfrüchten einheitlich eine Markierung der Isopreneinheiten an C-1 und C-5. Dieses Markierungsmuster ist nicht mit der IPP-Biosynthese nach dem Acetat/Mevalonat-Weg vereinbar, wurde schon für Isoprenoide der Grünalgen *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca* gefunden und weist auf die Mevalonat-unabhängige IPP-Biosynthese aus Pyruvat und Triosephosphat hin (SCHWENDER *et al.*, 1996). Dagegen wurden in *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* die Isopreneinheiten der Sterole nach dem Acetat/Mevalonat-Weg markiert: Nach Abbau von $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -Glucose zu $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -Acetyl-CoA wird über $[2, 4, 6\text{-}^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäure die Isopreneinheit an den Positionen C-2, C-4 und C-5 markiert. Eine geringfügig erhöhte ^{13}C -Anreicherung in C-1 der Isopreneinheiten der Sterole deutet zusätzlich auf einen geringen Anteil an Isopreneinheiten hin, welche wie die plastidären Isoprenoide an C-1 und C-5 markiert sind. Im Einklang mit der unterschiedlichen Bildung von IPP für plastidäre Isoprenoide und für die cytosolischen Sterole wurde von *Lemna gibba* ^{13}C -markierte Mevalonsäure in die Sterole, kaum aber in das plastidäre Phytol eingebaut. Die alternative IPP-Vorstufe 1-Desoxy-D-Xylulose wurde (in deuterierter Form) dagegen hauptsächlich in das Phytol und deutlich geringer in die Sterole eingebaut.

Nach Injektion von $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -Glucose in reife Tomatenfrüchte, konnte im Lycopin der reifen Früchte die Markierung der Isopreneinheiten an den C-Atomen C-1 und C-5 gefunden werden. Die Bildung von Isopreneinheiten nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Mechanismus konnte durch den Einbau von $[U\text{-}^{13}\text{C}_6]$ -Glucose in Lycopin reifer Tomaten weiter bestätigt werden. Anders als bei der Bildung von IPP aus Acetat-Einheiten über den Acetat/Mevalonat-Weg, werden C-1, C-2 und C-4 der Isopreneinheiten aus einer C_3 -Einheit gebildet. Dies bestätigt einen IPP-Biosynthesemechanismus, wie er schon für die Grünalge *Scenedesmus obliquus* gefunden wurde (SCHWENDER *et al.*, 1996).

3.3 Klonierung der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Für die Klonierung der DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii* stand eine *Chlamydomonas*-cDNA-Bibliothek (λ -Insertionsvektor, λ -NM1149) zur Verfügung, welche uns freundlicherweise von Herrn M. Goldschmidt-Clermont, Universität Genf, zur Verfügung gestellt wurde. Die cDNA-Inserts waren mit zwei *NotI*-Schnittstellen in den Phagen ligiert. Mit den Oligonukleotiden **λ -left** (5' TGAGCAAGTTCAGCCTGGTTAAGTC 3') und **λ -right** (5' GCTTATGAGTATTTCTTCCAGGGTA 3') konnte das Phageninsert direkt aus einem Phagenlysate mittels PCR amplifiziert werden, wodurch die Insertgröße bestimmt werden konnte, ohne Phagen-DNA zu isolieren. Die Phagen wurden mit *E. coli* BHB 2600 vermehrt.

Um das Gen der DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii* zu isolieren, wurde davon ausgegangen, daß es Ähnlichkeit zu einer Familie Transketolase-homologer bakterieller Gensequenzen besitzt (siehe 4.3, S. 80). Aus Bereichen hoher Homologien wurden sequenzdegenerierte Oligonucleotid-Primer abgeleitet. Mit diesen Primern konnte aus *Chlamydomonas*-cDNA ein 250 bp großes Fragment amplifiziert und kloniert werden, welches Sequenzhomologie zu den bakteriellen Transketolase-homologen Genen aufweist (**pChlamy5**). Diese Arbeiten wurden in einer im Rahmen dieser Dissertation betreuten Diplomarbeit von Frau M. Borinin durchgeführt (BORININ, 1998). Mit dem Fragment **pChlamy5** als Gensonde war die Identifizierung eines Gesamtklones aus der cDNA-Bibliothek möglich.

3.3.1 DXS-spezifische Oligonukleotide und Digoxigenin-markierte Sonde

Zum Durchsuchen der *Chlamydomonas* cDNA-Bibliothek nach einem Klon für die DXS wurden aus der Sequenz **pChlamy5** folgende Oligonukleotide abgeleitet:

5v1 (5' TGCCCACGCAGTACAACAACA 3')

5r3 (5' CGTCAAGCTTAGCAGTTGCCTTCT 3')

Mittels dieser PCR-Primer wurde aus **pChlamy5** eine Digoxigenin-markierte Sonde (Sonde Chlamy5) hergestellt (siehe 2.4.11, S. 31).

3.3.2 Durchsuchen der *Chlamydomonas*-cDNA-Bibliothek

Um den Aufwand des Durchsuchens der cDNA-Bibliothek mittels Plaquehybridisierung zu verringern, wurde die Gesamt-cDNA-Bibliothek zunächst in kleinere Unterpopulationen zerlegt (Komplexität der cDNA-Bibliothek nach Angaben des Herstellers: 250.000 verschiedene Klone). Dazu wurden 25 Top-Agar-Platten mit je 10.000 pfu (plaque forming units) beimpft und angezogen. Die hieraus erhaltenen 25 Plattenlysate wurden mittels PCR mit den Primern **5V1** und **5R3** (siehe 3.3.1, S. 49) untersucht. Bei vier von fünf Plattenlysaten konnte hierdurch ein Fragment der richtigen Größe (200 bp) amplifiziert werden, d. h. der gesuchte Klon war in vier der fünf Unterpopulationen der Bibliothek vertreten.

Vier Unterpopulation der Komplexität 10.000, welche nach Prüfung mit PCR die gesuchte cDNA enthielt, wurden nun mittels Plaquehybridisierung mit einer DXS-Sonde durchmustert, um einzelne DXS-Klone zu isolieren (siehe 2.4.13, S. 34). Es wurden Top-Agar-Platten mit je 1000 pfu beimpft, die Phagenplaques auf Nylonmembranen übertragen und mit der Sonde **Chlamy5** (siehe 3.3.1, S. 49) hybridisiert (siehe 2.4.13, S. 34). Mehrere positive Phagenplaques wurden isoliert und je über drei Aufreinigungs-Schritte (Isolierung eines einzelnen positiven Plaques) wurden schließlich vier cDNA-Klone erhalten.

Nach Amplifikation der cDNA-Inserts der vier selektierten λ -Klone mittels PCR (Primer **λ -left**, **λ -right**) konnte die Größe der cDNA-Klone mittels Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt werden. Klon 2/1 hat eine Größe von etwa 2,5 Kbp während die Klone 3/1, 4/1 und 6/1 in ihrer Größe nicht unterscheidbar waren und deren Größe auf 3,2 Kbp bestimmt wurde.

3.3.3 Sequenzierung des Klones 6/1

Klon 6/1 wurde schließlich in Großkultur vermehrt und etwa 100 μ g Phagen-DNA isoliert (siehe 2.4.5, S. 28). Phagen-DNA wurde mit *NotI* geschnitten und nach Gelelektrophoretischer Auftrennung das Phagen-Insert mittels Gelelektion gewonnen. Nach Ligation in pBluescript SKII (mit *NotI* geschnitten) wurde in *E. coli* XL1 Blue kloniert und der Klon **pBlueDXS** erhalten (siehe 2.4.17, S. 35; 2.4.18, S. 36).

Durch mehrere Einzelsequenzierungen (Fa. SeqLab, Göttingen) wurde die gesamte Nukleotidsequenz von **pBlueDXS** bestimmt (Abbildung 3-6). Dabei wurde aus jeweils neu dazugewonnener Sequenzinformation ein neuer Sequenzierprimer entwickelt, um ein weiteres Stück des Genes zu sequenzieren. Die Gesamtsequenz umfasst 3232 bp (Abbildung 3-6). An Position 135 befindet sich das erste Methionin-Codon der Sequenz. Für die meisten Eukaryonten-Gene trifft zu, daß die Translation mit dem ersten Methionin-Codon der cDNA-Sequenz beginnt. Die Nukleotidsequenz, welche das ATG-Codon umgibt, hat Ähnlichkeit zu einer Konsensus-Sequenz für Start-Codons in Pflanzen (vgl. CACAATGC mit Konsensus AACAAATGGC aus LUTCKE *et al.*, 1987; vgl. Abbildung 3-6). Dies stützt die Annahme, daß die Proteintranslation mit dem Methionin-Codon an Position 135 beginnt. Übersetzt man von dieser Position ab die Nukleotidsequenz, befindet sich in Position 2340 das Stop-Codon (TAA). Das so übersetzte Protein umfasst 735 Aminosäuren. Das entspricht einer Größe von etwa 80,8 kDa des Proteines. Die Proteinsequenz weist hohe Homologie zu der des Genes 'CLA1' auf (SwissProt: Q38854, 66 % identische Aminosäuren), dem mutmaßlichen DXS-Gen aus *Arabidopsis thaliana* (siehe 4.3, S. 80).

Ein Vergleich mit mehreren bakteriellen mutmaßlichen DXS-Sequenzen zeigt, daß das *Chlamydomonas*-Protein am N-Terminus etwa 80 Aminosäuren länger ist, als die bakteriellen Sequenzen (vgl. Abbildung 3-8). Dieser verlängerte N-Terminus könnte ein Transit-Peptid für den Transport des Proteines z. B. in Plastiden sein. Ein Vergleich der Aminosäuren-Zusammensetzung der ersten 79 Aminosäuren der *Chlamydomonas* DXS mit den restlichen 656 Aminosäuren zeigte, daß Alanin (A), Arginin (R) und Leucin (L) im mutmaßlichen Transitpeptid relativ häufig vorkommen (A im Transitpeptid zu 20 % gegenüber 10 % im übrigen Protein; R 13 % gegenüber 5 %; L 9 % gegenüber 2,5 %).

Auf die Protein-codierende Sequenz folgt ein etwa 800 bp langer nicht-translatierter Bereich. An Position 3149 findet sich eine als Polyadenylierungs-Signal bekannte Sequenz (AATAAA, vgl. Abbildung 3-6).

Die gefundene DNA-Sequenz umfasst auch exakt die Sequenz Chlamy5 (bp 890 – 1110), welche als Genfragment für die Isolierung des gesamten cDNA-Klones der DXS verwendet wurde.

1	GATTGATTGGCACGCACATAAGTGCACCCTCTGAACCTTTAGATCTTGTGCATTTAGGTC	60
61	TAGTGCAAGTGTTTCGACATCACGCCAGCGTTGTGTAGGCCAGGGCACTGATCTTCTCTCGC	120
121	ATAATCTGCC CACAATG CTGCGTGGTGCTGTTTTCTCACGGCCCTGCGGTGCGCCGACCGGG	180
1	M L R G A V S H G P A V A D R A	16
181	CTGCCGCTGGCCCCGCCGCTGCGCTGCTCCCCTGCGCCGTGGTGTGCGCAGCGCAGCGC	240
17	A A G P A R C A A P V A R G V R S A A P	36
241	CCACGCGTCAGCGTCGCGCGGAGGCTTCGGTCAATGCCCGCGGGCGGGCCCGCCGGTA	300
37	T R Q R R A E A S V N A P R A G P A G S	56
301	GCTACTCGGGCGAGTGGGATAAGCTTTCAGTGGAGGAGATTGATGAGTGGCGCGATGTGG	360
57	Y S G E W D K L S V E E I D E W R D V G	76
361	GCCCGAAGACGCCCTGCTGGACTGTCAATTACCCGGTGCACCTGAAGAACTTCAACA	420
77	P K T P L L D T V N Y P V H L K N F N N	96
421	ATGAGCAGCTGAAGCAGCTCTGCAAGGAGCTGCGCAGTGACATCGTGCACACCGTCTCTC	480
97	E Q L K Q L C K E L R S D I V H T V S R	116
481	GCACCGGTGGACACCTTAGCAGCAGCCTGGGCGTGGTGGAGCTGACGGTGGCTATGCACT	540
117	T G G H L S S S L G V V E L T V A M H Y	136
541	ATGTATTCAACACCCCGGAGGACAAGATTATTTGGGACGTGGGCCACCAGGCGTATGGCC	600
137	V F N T P E D K I I W D V G H Q A Y G H	156
601	ACAAGATCCTGACTGGCCGTCGCAAGGGTATGGCCACGATTGCGCCAGACCAACGGCCTTT	660
157	K I L T G R R K G M A T I R Q T N G L S	176
661	CGGGCTTCACGAAGCGGACGAGAGCGAGTACGACCCTTTCGGCGCTGGCCACAGCTCCA	720
177	G F T K R D E S E Y D P F G A G H S S T	196
721	CCTCGATTTTCGGCGCTCTGGGTATGGCGTGGGCCGCGACGTTAAGGGCAAGAAGAACA	780
197	S I S A A L G M A V G R D V K G K K N S	216
781	GTGTGATCGCTGTCATCGGCGACGGCGCCATCACCGGGGTATGGCCTATGAGGCCATGA	840
217	V I A V I G D G A I T G G M A Y E A M N	236
841	ACCATGCGGGCTTCTTGACAAGAACATGATTGTGATTCTGAACGACAACCAGCAGGTGT	900
237	H A G F L D K N M I V I L N D N Q Q V S	256
901	CGTGCCACGCGAGTACAACAACAAGAACCAGGACCCCGTGGGCGCCCTGTCCAGCGCCC	960
257	L P T Q Y N N K N Q D P V G A L S S A L	276
961	TGGCGCGCTGCAGGCCAACCGGCCCTGCGCGAGCTGCGCGAGATTGCCAAGGGCGTGA	1020
277	A R L Q A N R P L R E L R E I A K G V T	296
1021	CCAAGCAGCTGCCTGACGTTGTCCAGAAGGCAACTGCTAAGATTGACGAGTATGCTCGCG	1080
297	K Q L P D V V Q K A T A K I D E Y A R G	316
1081	GCATGATCAGCGCACTGGCTCCACGCTGTTTGAGGAGCTGGGCCTGTACTACATCGGCC	1140
317	M I S G T G S T L F E E L G L Y Y I G P	336
1141	CTGTGGACGGCCACAACCTGGACGACCTCATCGCCGTGCTCAGCGAGGTGCGCAGCGCCG	1200
337	V D G H N L D D L I A V L S E V R S A E	356
1201	AGACCGTGGGCCCGTGTGGTGCACGTGGTAACGGAGAAGGGCCGCGGCTACCTGCCCG	1260
357	T V G P V L V H V V T E K G R G Y L P A	376

1261	CCGAGACGGCGCAGGACAAGATGCACGGTGTGGTCAAGTTCGACCCCCGCACCGGCAAGC	1320
377	E T A Q D K M H G V V K F D P R T G K Q	396
1321	AGGTGCAGGCCAAGACGAAGGCCATGTCTACACGAACTACTTCGCGGACGCGCTGACGG	1380
397	V Q A K T K A M S Y T N Y F A D A L T A	416
1381	CGGAGGCGGAGCGCGACAGCCGCATCGTGGCGGTGCACGCGGCCATGGCGGGCGGCACCG	1440
417	E A E R D S R I V A V H A A M A G G T G	436
1441	GCCTGTACCGGTTTCGAGAAGAAGTTCGCCGACCGCACCTTTGACGTGGGCATTGCGGAGC	1500
437	L Y R F E K K F P D R T F D V G I A E Q	456
1501	AGCACGCCGTGACCTTTGCTGCCGGCCTGGCGTGCAGGGCCTGGTGCCTTCTGCACCA	1560
457	H A V T F A A G L A C E G L V P F C T I	476
1561	TCTACAGTACCTTCATGCAGCGCGGTTACGACCAGATCGTGCACGACGTGTCCCTGCAGA	1620
477	Y S T F M Q R G Y D Q I V H D V S L Q K	496
1621	AGCTGCCTGTGCGCTTCGCTATGGACCGCGCTGGCCTGGTGGGCGCTGACGGCTCCACGC	1680
497	L P V R F A M D R A G L V G A D G S T H	516
1681	ACTGCGGCGCCTTCGACGTGACGTTTCATGGCGTCGCTGCCGCACATGATCACCATGGCTC	1740
517	C G A F D V T F M A S L P H M I T M A P	536
1741	CCTCGAACGAGGCGGAGCTCATCAACATGGTGGCCACCTGCGCCGCCATCGACGACGCGC	1800
537	S N E A E L I N M V A T C A A I D D A P	556
1801	CCTCGTGCTTCCGCTTCCCCCGCGGCAACGGCCTGGGCTGGACCTGGCCGCTACGGCA	1860
557	S C F R F P R G N G L G L D L A A Y G I	576
1861	TCAGCAAGGACCTGAAGGGTGTGCCCTCGAGGTGGGCAAGGGTGTGTCCGCCGCGCAGG	1920
577	S K D L K G V P L E V G K G V V R R Q G	596
1921	GCAAGGACGTGTGCCTGGTGGCGTACGGCAGCAGTGTGAACGAGGCGCTGGCCGCGGCGG	1980
597	K D V C L V A Y G S S V N E A L A A A D	616
1981	ACATGCTGGAGCGCGATGGCGTGTCCACCACCGTCATTGACGCGCGCTTCTGCAAGCCTC	2040
617	M L E R D G V S T T V I D A R F C K P L	636
2041	TGGACACCAAGCTGATCCGCTCGGCTGCCAAGGAGCACCCCTGTCATGATCACCATCGAGG	2100
637	D T K L I R S A A K E H P V M I T I E E	656
2101	AGGGCTCCGTGGGTGGCTTCGCTGCGCACGTGATGCAGTTCCTCGCACTGGAGGGCCTGC	2160
657	G S V G G F A A H V M Q F L A L E G L L	676
2161	TGGACGGCGGGCTCAAGTTCGGGCCATGACGCTGCCGACCGCTACATCGACCACGGCG	2220
677	D G G L K F R P M T L P D R Y I D H G D	696
2221	ACTACCGCGACCAGCTGGCCATGGCCGGCCTCACCAGCCAGCACATCGCCTCCACCGCGC	2280
697	Y R D Q L A M A G L T S Q H I A S T A L	716
2281	TCACCACCTGGGGCGCGCCAAGGACGCCGCAAGTTCCTCACTGTGACGCGCTGCAAGCGT	2340
717	T T L G R A K D A A K F S L S A L Q A *	735
2341	AA AGCACCCAATCAGCCTGGGGCCTCAATAGGACGACGGCAATCACATATACAGCTTGAG	2400
2401	CTTGGTGCATACGGAGGAGGCGGTTCGGATGGCTGCAAAGGCAGCCTAGCAACGGAGCGGA	2460
2461	TTACGGCAGGTTGTTGACAAGAGTGGCAGACAGGGAAGGCAGGCATCGACATGTAAGGGC	2520
2521	ATGGCCGTGGGAGGCTGATGCAGCCCTTGGCTTGGTGAACACAGCGGCGCCGAGCTTGTA	2580
2581	GGTTAGGTTTTCAGTGTGAGGCGTTTGATACTCGACTTGATGGCTGCGGGGTTGTCGGA	2640
2641	AGCAGGACGATGCCCGTGTGGTTGGAACGGCGTCTAGTTGGTTCTGGCAACGGGCATCGA	2700
2701	GCTGGGGAAGCGTTGGGGCATGCACCTGCTCAGCGGGGACCGTGAGCTTTCGGCGAGTTT	2760
2761	TGGCGGGTTCGTAGGACGATGAGTGGTGTGACACACGCATAGTCCCACCACACGCTTCG	2820

```

2821 TACACGACGTTGGTCATTTTGTGCGCCCCGATGCAAAGGGGCAGGAGACCAGGCAGCAAAG 2880
2881 CGGCTCGACGCCCTTGCGCCTTACTGTATTTTGACCCTTAAGATTGATGCGTGTGTGTC 2940
2941 TGTGTGCGTGTGGTTCACAGTTATTTGTGTTGCCGAGTGGTATGTTACTGCGTGTGGGC 3000
3001 TGACAAGGACTGCGATGACGGATGGCGTGCAGGAAGCTGTGGCACGTGCGGATGTAGATG 3060
3061 AGGATCTAGGTGCTTGCGGGCACACTGACAGTCAAATAGGCCATGCCATGCAAGCCGCAC 3120
3121 GCCGTAACAGACTTCAGTGACCTCGTTGAATAAACCCGCACACGCACCCGTGACCCATGAA 3180
3181 ATGGGTTTGCTGCGAATGACAGCGCACTCCACGATGTAAATGTGAATCATAT 3232

```

Abbildung 3-6 Darstellung der Nucleinsäuresequenz des cDNA-Klones der *Chlamydomonas reinhardtii* DOXP-Synthase (GenBank nr. aj007559), welcher aus einer *Chlamydomonas reinhardtii* λ -cDNA Bibliothek isoliert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt. Das Stop-Codon ist mit einem Stern gekennzeichnet. Mit Fettschrift hervorgehoben sind die Region des wahrscheinlichen Translationsstartes und ein mögliches Polyadenylierungssignal (AATAAA).

- **Southern-Blot Analyse**

Um zu überprüfen, ob es in *Chlamydomonas reinhardtii* zu dem von der cDNA 6/1 codierten Gen Isoformen gibt, wurde mittels PCR aus der Sequenz 6/1 eine Digoxigeninmarkierte Sonde hergestellt (Primer λ -left, λ -right; siehe 2.4.11, S. 31). DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, gelelektrophoretisch auf Agarose aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen (Southern-Transfer). Nach Hybridisieren mit der Sonde 6/1 (Methode nach ENGLER-BLUHM *et al.*, 1993; siehe 2.4.12, S. 31) wurden für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III jeweils nur eine Bande gefunden (Abbildung 3-7), was gegen das Vorkommen einer Isoform spricht. Für *Xho*I wurden dagegen zwei Banden gefunden (Abbildung 3-7). Eine einzige *Xho*I-Schnittstelle befindet sich in der Sequenz 6/1 in der Mitte an Position 1887 (CTCGAG, Abbildung 3-6) und teilt damit die 3,2 Kbp große cDNA-Sequenz in zwei Abschnitte > 1Kbp, womit das Vorkommen zweier detektierbarer *Xho*I-Fragmente im DXS-Gen wahrscheinlich ist. Bei Hybridisierung mit 57 °C konnten gegenüber stringenten Bedingungen bei 65°C (ENGLER-BLUHM *et al.*, 1993) keine zusätzlichen Banden gefunden werden (Abbildung 3-7). Demnach existieren wahrscheinlich keine Isoformen des Genes.

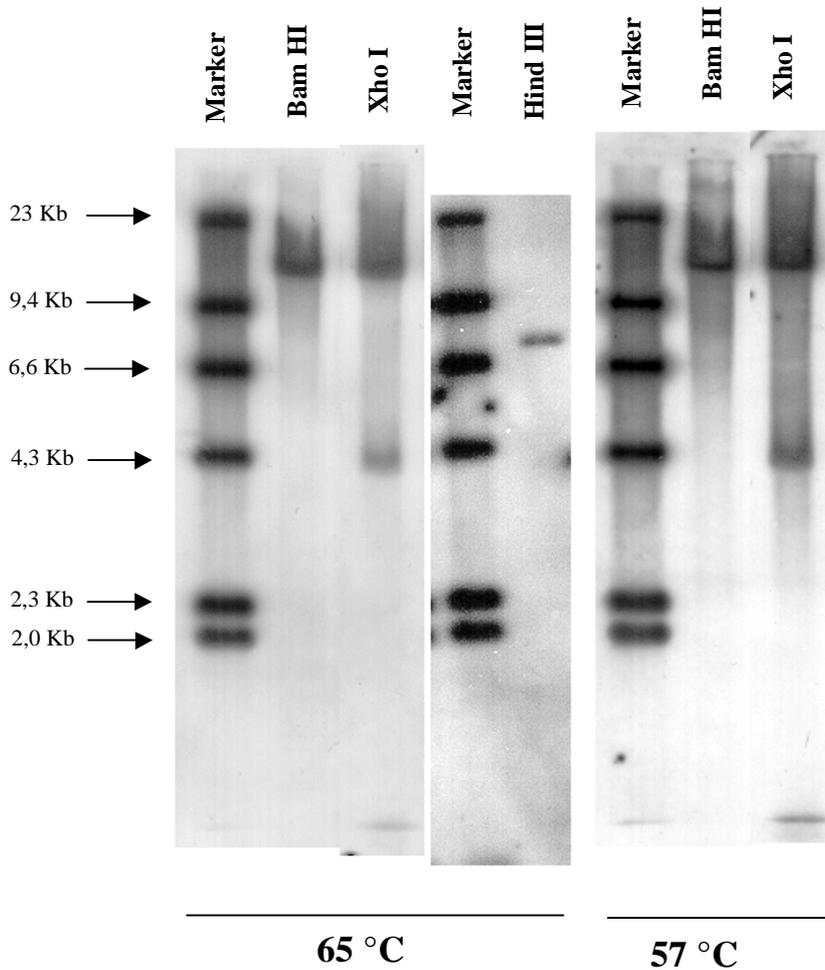


Abbildung 3-7 Southern-Blot-Analyse genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Je 50 µg DNA wurden mit *Bam HI*, *Xho I* oder *Hind III* verdaut. Danach wurde die DNA auf einem Agarose-Gel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Southern-Transfer auf eine Nylonmembran wurde hybridisiert mit einer Digoxigenin-markierten Sonde, abgeleitet aus dem Klon 6/1 (DXS). Bei 57°C Hybridisierungstemperatur sind gegenüber stringenteren Bedingungen (65 °C Hybridisierungstemperatur) keine zusätzlichen Banden zu sehen. Als Marker wurde λ-DNA, geschnitten mit *Hind III* (Digoxigenin-markiert) aufgetragen (Boehringer, Mannheim).

3.3.4 Heterologe Expression des Klones 6/1 in *E. coli*

Zum Nachweis der Enzymaktivität des durch den Klon 6/1 codierten Genes wurde ein Teil des Genes in den Expressionsvektor *pET5b* (Fa. Promega, Mannheim) umklontiert. *pET5b* besitzt den Promotor und den Bereich des Translationsstartes des Genes „T7-Gen 10“. Ab der 10ten Aminosäure nach dem Startcodon kann eine Nucleotidsequenz einkloniert werden (mehrere Restriktions-Schnittstellen sind vorhanden). Durch eine im Wirtstamm induzierte Bildung von T7-Polymerase kann das Fusionsprotein exprimiert werden. Dieses besteht dann aus einem 10-15 Aminosäuren langen N-Terminus (sog. T7-tag) gefolgt von der Proteinsequenz des einklonierten Genes.



Abbildung 3-8 (A) Homologievergleich der Proteinsequenzen der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase aus *E. coli* mit dazu homologen Sequenzen (ORF) aus anderen Bakterien sowie aus *Arabidopsis thaliana* und der in der vorliegenden Arbeit klonierten DXS-Sequenz aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Nur der N-Terminus der Proteine ist gezeigt. Schwarz unterlegte Aminosäuren sind in mindestens vier der neun Sequenzen identisch. Der Übergangsbereich zwischen dem mutmaßlichen Plastiden-Transitpeptid der pflanzlichen Sequenzen und dem funktionellen Protein wird dort vermutet, wo die homologen bakteriellen Sequenzen beginnen. *Mycobacterium leprae* (M. leprae, SwissProt: Q50000), *Bacillus subtilis* (SwissProt: P54523), *Haemophilus influenzae* (SwissProt: P45205), *E. coli* (SwissProt: P77488), *Rhodobacter capsulatus* (R. caps., SwissProt: P26242), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Synecho, SwissProt: P73067), *Arabidopsis thaliana* (A. thal., SwissProt: Q38854), *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlamy, GenBank: AJ007559). (B) Die aus der *Chlamydomonas*-DXS-Sequenz (Abbildung 3-6) abgeleiteten Primer mit angehängten Restriktionsschnittstellen sind dargestellt. (C) Der N-Terminus des Fusionsproteinens ist dargestellt, welches nach Ligation des PCR-Fragmentes DXSev1/DXSer in pET5b entsteht. Der von pET5b codierte Teil ist unterstrichen. Die Masse des 683 Aminosäuren langen Fusionsproteinens berechnet sich zu 73645 Da.

Um die Sequenz 6/1 in *E. coli* zu exprimieren, sollte das in den Vektor zu klonierende Fragment beim Übergang zwischen dem mutmaßlichen N-terminalen Transitpeptid und der eigentlichen DXS-codierenden Proteinsequenz beginnen. Durch Vergleich der Proteinsequenz von Klon 6/1 mit mehreren bakteriellen DXS-Sequenzen wurde dieser Übergangsbereich abgegrenzt (Abbildung 3-8) und drei verschiedene Oligonukleotidprimer entwickelt welche am 5'-Ende durch eine *BamHI*-Schnittstelle ergänzt wurden (DXSev, DXSev1, DXSev2; Abbildung 3-8). Aus der Sequenz jenseits des Stop-Codons (bp 2373) wurde der Primer DXSer abgeleitet (Abbildung 3-6), welcher eine *EcoRI*-Schnittstelle enthält. Ein mit PCR mit den Primerpaaren DXSev/DXSer, DXSev1/DXSer oder DXSev2/DXSer gewonnenes DNA-Fragment kann nach Restriktionsverdau mit *BamHI* und *EcoRI* in der beabsichtigten Orientierung im Leserahmen des Vektor-codierten Fusionspeptides in das Plasmid pET5b einligiert werden. Ebenso ist mit diesen Primern die Ligation zur Expression in pET28b (Fa. Novagen, Expression mit N-terminalem Histidin-Tag) und in pBluescript SK II (+) möglich.

Mittels PCR mit den angegebenen Primern wurden die Fragmente DXSev/er (2055 bp, codierend für 665 Aminosäuren), DXSev1/er (2067 bp, 669 Aminosäuren) und DXSev2/er (2022 bp, 654 Aminosäuren) erhalten, über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe 2.4.9, S. 30), mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und in *pET5b* (geschnitten mit *Bam*HI/*Eco*RI) ligiert. Nach Transformation in *E. coli* XL1Blue wurden die Klone *pDXSev*, *pDXSev1* und *pDXSev2* erhalten.

Die Plasmide *pDXSev*, *pDXSev1* und *pDXSev2* wurden in *E. coli* JM109(DE3) transformiert. Dieser Stamm enthält ein IPTG-induzierbares Gen für eine T7-RNA-Polymerase, welche dann die Transkription des in *pET5b* klonierten Genes durchführt. Proteinextrakte aus mit IPTG induzierten Zellen wurde mit ¹⁴C-Pyruvat und DL-GAP inkubiert (siehe 2.4.22, S. 37). Die Reaktion wurde abgestoppt (30s bei 95°C) und mittels alkalischer Phosphatase die Phosphatgruppen der Produkte abgespalten (siehe 2.4.22, S. 37). Mittels Dünnschichtchromatographie wurde das radioaktive Produkt 1-Desoxy-D-Xylulose vom radioaktiven Pyruvat getrennt, welches am Start verblieb (Abbildung 3-9). Wie aus dem Autoradiogramm in Abbildung 3-9 ersichtlich, führten die Plasmide *pDXSev* und *pDXSev1* nach Expression zum radioaktiven Produkt, während die Plasmide *pDXSev2* sowie der Expressionsvektor ohne Insert (*pET5b*) zu keinem Produkt führten. Man kann daraus ersehen, daß die Klone *pDXSev* und *pDXSev1* zu funktionsfähigen Proteinen führten, während *pDXSev2* nicht funktionsfähig war. Das radioaktive Produkt lief gleich weit mit synthetischer 1-Desoxy-D-Xylulose (siehe 2.4.22, S. 37).

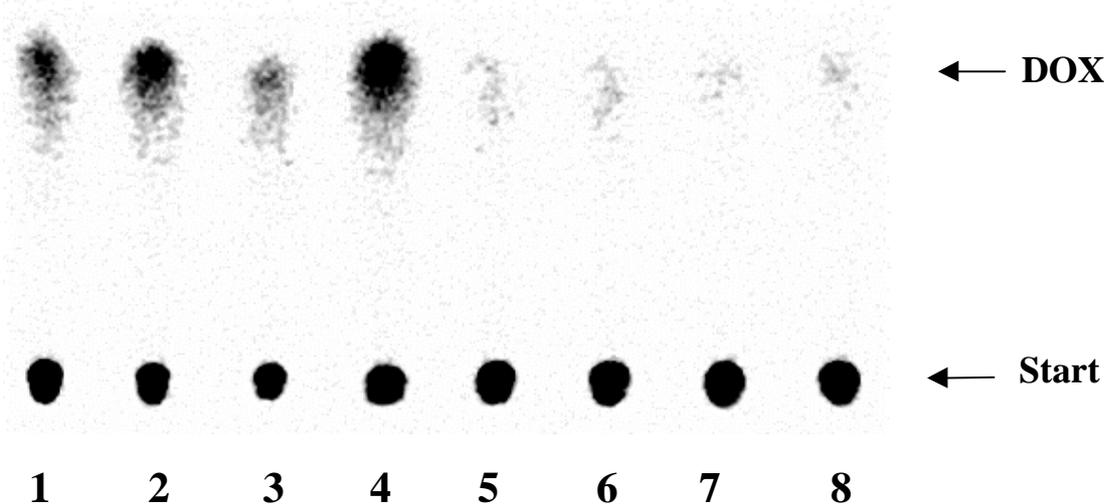


Abbildung 3-9: Enzymtest der rekombinanten DXS von *Chlamydomonas reinhardtii*. Enzymextrakte der induzierten *E. coli*-Zellen wurden mit DL-GAP (3,5 mM) und ¹⁴C-Pyruvat (1 mM) inkubiert (siehe 2.4.22, S. 37). Nach Abstoppen der Reaktion (30s 95°C) wurden die Phosphate mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das Reaktionsprodukt auf Kieselgel 60 aufgetrennt (Ethylacetat/Aceton/H₂O 50:50:2). (1), (2): Plasmid *pDXSev*, 10 min (1) und 30 min Inkubationszeit (2). (3), (4): Plasmid *pDXSev1* mit 10 min (3) und 30 min Inkubationszeit (4). (5), (6): Plasmid *pDXSev2* mit 10 min (5) min und 30 min Inkubationszeit (6) (7), (8): Kontrolle (Plasmid *pET5b* ohne Insert), 10 und 30 min Inkubationszeit. Als Referenzsubstanz diente synthetische 1-Desoxy-D-Xylulose (siehe 2.1.2, S. 11).

Abbildung 3-10 zeigt das Autoradiogramm einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Reaktionsansatzes mit Plasmid *pDXSev1* mit und ohne Phosphatase-Verdau. Es wurde im Vergleich mit der in Abbildung 3-9 gezeigten Trennung ein polareres Lösungsmittelgemisch verwendet, welches Pyruvat und Phosphate vom Start weg bewegt (Abbildung 3-10). Ohne Dephosphorylierung zeigt das Laufverhalten des radioaktiven Produktes eine höhere Polarität an als nach Phosphataseverdau. Dies zeigt, daß das

radioaktive Produkt der Enzymreaktion eine Phosphatgruppe trägt. Wird GAP dem Reaktionsansatz nicht zugegeben, wird kein Produkt gebildet (Tabelle 3-6).

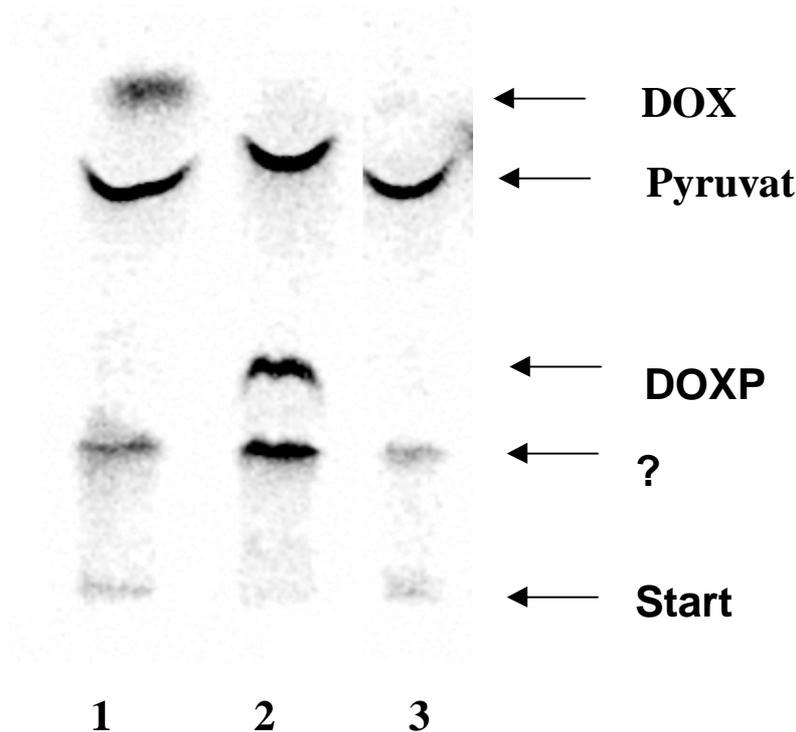


Abbildung 3-10: Reaktionsprodukte der rekombinanten DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii*, aufgetrennt auf Kieselgel mit 1-Propanol/Ethylacetat/H₂O 60:10:30. (1): Plasmid pDXSev1, Verdau mit alkalischer Phosphatase. (2): wie (1), jedoch ohne Verdau mit alkalischer Phosphatase. (3): Kontrolle (Plasmid pET5b ohne Insert). Als Referenzsubstanz diente synthetische 1-Desoxy-D-Xylulose (siehe 2.1.2, S. 11).

Die Produktidentifikation des Produktes der DXS als 1-Desoxy-D-Xylulose-Triacetat mittels GC/MS ist unter 3.4.2 (S. 62) beschrieben.

	pDXSev1	pDXSev1 (ohne DL-GAP)	pDXR	Kein Protein
Protein [µg/µl]	0,5	0,5	1,5	0
Pyruvat (%)	81	98	98	98
DOXP (%)	19	2	2	2

Tabelle 3-6 Enzymtest der rekombinanten DXS von *Chlamydomonas reinhardtii*. Enzymextrakte der induzierten *E. coli*-Zellen wurden mit DL-GAP (3,5 mM) und ¹⁴C-Pyruvat (1 mM) inkubiert (siehe 2.4.22, S. 37). Es wurde aufgetrennt auf Kieselgel mit 1-Propanol/Ethylacetat/H₂O 60:10:30 und nach Exposition im Instant Imager die Radioaktivität der Banden für Pyruvat und DOXP quantifiziert (Angegeben sind % Radioaktivität der Summe für Pyruvat und DOXP). Bei einer Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl werden etwa 20 % des Pyruvat umgesetzt. Es findet kein Umsatz statt, wenn DL-GAP weggelassen wird, die Proteinexpression mit einem anderen Plasmid stattfindet (pDXR, siehe 3.4.2, S. 62) oder wenn kein Protein zugegeben wird. Eine Kontrolle, bei der das Plasmid pET5b ohne Insert eingesetzt wurde, ist in Abbildung 3-9 dargestellt.

3.4 Klonierung der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) aus *Arabidopsis thaliana*

Von der Arbeitsgruppe Seto (Tokyo, Japan) wurde die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) aus *E. coli* kloniert (KUZUYAMA *et al.*, 1998a; TAKAHASHI *et al.*, 1998). Das Enzym (398 AS, 43 kDa) katalysiert die Umlagerung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat, wobei unter Reduktion 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat entsteht, welches als Intermediat der IPP-Biosynthese in *E. coli* beschrieben wurde (DUVOLD *et al.*, 1997a; 1997b).

Eine Datenbanksuche mit der Nukleotidsequenz der DXR aus *E. coli* (GenBank Nr. AB013300) lieferte 8 homologe Sequenzen aus anderen Bakteriengenomen, welche alle für Proteine der Größe 380–400 Aminosäuren codieren. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen untereinander lieferte mehrere Bereiche konservierter Aminosäuren. Alle diese konservierten Aminosäure-Sequenzen werden in einer bisher nicht näher charakterisierten genomischen Nukleotidsequenz aus *Arabidopsis thaliana* codiert (GenBank Nr. AB009053). Dies ließ vermuten, daß in dieser genomischen Sequenz aus *Arabidopsis*-Genom das zur *E. coli* DXR homologe Gen codiert wird. Der mögliche Anfang des funktionellen *Arabidopsis*-Proteins war durch das konservierte Sequenzmotiv „(V/L)GSTGSIG“ vorgegeben (Basen 31454 – 31477 der Sequenz AB009053, invers komplementär), da dieses bei allen bakteriellen Proteinen sehr nahe am N-Terminus liegt (Abbildung 3-11). Der C-Terminus (Stop-Codon) des Proteinens konnte eindeutig identifiziert werden durch eine zu dem genomischen DNA-Abschnitt homologe cDNA-Sequenz aus *A. thaliana* (GenBank Nr. AA586087) welche offensichtlich das 3'-Ende des Genes umfasst.

<i>E. coli</i>	DRI	MKQLTIL	LGSTGSIG	KNA...
<i>B. subt.</i>	ORF	MKNICLL	LGATGSIGE	QOT...
<i>Synecho.</i>	ORF	MVKRISIL	LGSTGSIG	TQT...
<i>Aquifex</i>	ORF	MKLGVL	LGSTGSV	GSQT...
<i>Chlamydia</i>	ORF	MKHLAL	IGSTGSIG	RQV...
<i>Haemoph.</i>	ORF	MQKQNVIL	LGSTGSIG	KST...
<i>Helicob.</i>	ORF	MVV	LGSTGSIG	KNA...
<i>A. thaliana</i>		...AWPGRAVPEAPRO	QSWDGPKPISIV	LGSTGSIG TQT... ..
		DXRV2->	DXRV3->	<-DXRR1

Abbildung 3-11 Vergleich der Proteinsequenzen (Bereich des N-Terminus) der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) aus *E. coli* mit dazu homologen bakteriellen Aminosäuresequenzen und einer mutmaßlichen DXR-Aminosäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* (abgeleitet aus AB009053). Schwarz unterlegt ist das konservierte Sequenzmotiv „LGSTGSIG“. Der Primer DXRV3 kennzeichnet den Beginn des Genabschnittes der *A. thaliana* DXR, welcher aus cDNA isoliert und in einen Expressionsvektor ligiert wurde. *E. coli* (SwissProt: P45568), *Bacillus subtilis* (*B. subt.*, Pir: B69881), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synecho*, SwissProt: Q55663), *Aquifex aeolicus* (*Aquifex*, SwissProt: O66722), *Chlamydia trachomatis* (*Chlamydia*, SPTREMBL: O84074), *Haemophilus influenzae* (*Haemoph.*, SwissProt: P44055), *Helicobacter pylori* (*Helicob.*, SwissProt: P56139), *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, GenBank: AB009053, genomische DNA-Sequenz).

Anhand der zur Verfügung stehenden Sequenzdaten wurden folgende Oligonukleotid-Sequenzen entwickelt, um das Gen direkt aus *A. thaliana*-cDNA zu amplifizieren und nach Ligation in den T7-Expressionsvektor *pET5b* (Fa. Promega, Mannheim) eine Expression des Proteinens zu ermöglichen: Die Primer **DXRV3** (5'-TCAGGATCC GGCGCCTCGTCAATCT-3', Basen 31505 – 31520 der Sequenz AB009053, invers komplementär) und **DXRV2** (5' GCATGGCCTGGGAGAGCTGT-3', Basen 31527 – 31546,

invers komplementär) beginnen kurz vor der Codierung für das konservierte Sequenzmotiv „(V/L)GSTGSIG“ (Abbildung 3-11). Der in gegensätzlicher Richtung orientierte Primer **DXRR1** (5'-GACGAATTCTTCTTCCAACAACCAATTCT-3', Basen 28974 - 28993) beginnt kurz hinter dem Stop-Codon. Die PCR-Primer enthalten am 5'-Ende die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI (**DXRv3**) und *Eco*RI (**DXRR1**), um das amplifizierte Genfragment in der gewünschten Orientierung in den Expressionsvektor einzuligieren.

3.4.1 Klonierung der DXR aus *Arabidopsis thaliana*

Aus 3 Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (var. *Columbia*, ganze Pflanzen, ohne Wurzel) wurde RNA isoliert (Siehe 2.4.6, S. 29). Mit 25 µg RNA wurde mittels Reverser Transkriptase und dem Oligonukleotid dT₁₆ eine Erststrangsynthese durchgeführt (Siehe 2.4.7, S. 29). 5 µl dieser Reaktion (entsprechend 1,25 µg der eingesetzten RNA) dienten als Templat in einer Standard-PCR (Siehe 2.4.21, S. 36). Die Amplifikation mittels PCR wurde zweistufig durchgeführt, um die Selektivität der Amplifikation zu verbessern. Zunächst wurde mit den Primern DXRv2/DXRr1 amplifiziert und das PCR-Produkt mit den Primern DXRV3/DXRR1 reamplifiziert. Als PCR-Produkt wurde nach Agarose-Gelelektrophorese ein Fragment der Größe 1200-1400 bp gefunden. Nach Auftrennung in einem Kristallviolett gefärbten Agarose-Gel wurde die Produktbande eluiert (siehe 2.4.9, S. 30) und die gewonnene DNA mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Das Fragment wurde in den Expressionsvektor *pET5b* (geschnitten mit *Bam*HI und *Eco*RI) ligiert.

Nach der Ligation wurde in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Drei Klone wurden vermehrt, Plasmid-DNA gewonnen und diese ansequenziert. Ein Klon wurde komplett sequenziert (*pET5bDXR*, Abbildung 3-12). Die aus *Arabidopsis thaliana* klonierte cDNA codiert für 405 Aminosäuren (etwa 44,5 KDa). Dies entspricht der Länge der *E. coli* DXR (398 Aminosäuren). Es besteht eine Sequenzhomologie von 44 % (identische Aminosäuren) zur *E. coli* DXR und von 66 % zur DXR-homologen Aminosäuresequenz von *Synechocystis* (SwissProt: Q55663). Diese Sequenzähnlichkeiten zeigen, daß offensichtlich das zu *E. coli* DXR homologe Gen kloniert wurde.

		pET5b .->		
1	ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGGATCCGGCGCCTCG		50	
1	<u>M A S M T G G Q Q M G R D P A P R</u>		17	
51	TCAATCTTGGGATGGACCAAACCCATCTCTATCGTTGGATCTACTGGTT		100	
18	Q S W D G P K P I S I V G S T G S		34	
	□			I1
101	CTATTGGCACTCAGACATTGGATATTGTGGCTGAGAATCCTGACAAATTC		150	
35	I G T Q T L D I V A E N P D K F		50	
151	AGAGTTGTGGCTCTAGCTGCTGGTTCGAATGTTACTCTACTTGCTGATCA		200	
51	R V V A L A A G S N V T L L A D Q		67	
	□			I2
201	GGTAAGGAGATTTAAGCCTGCATTGGTTGCTGTTAGAAACGAGTCACTGA		250	
68	V R R F K P A L V A V R N E S L I		84	
251	TTAATGAGCTTAAAGAGGCTTTAGCTGATTTGGACTATAAACTCGAGATT		300	
85	N E L K E A L A D L D Y K L E I		100	
	□			I3
301	ATTCCAGGAGAGCAAGGAGTGATTGAGGTTGCCCGACATCCCGAAGCTGT		350	
101	I P G E Q G V I E V A R H P E A V		117	
	□			I4
351	AACCGTTGTTACCGGAATAGTAGGTTGTGCGGGACTAAAGCCTACGGTTG		400	
118	T V V T G I V G C A G L K P T V A		134	
401	CTGCAATTGAAGCAGGAAAGGACATTGCTCTTGCAAACAAAGAGACATTA		450	
135	A I E A G K D I A L A N K E T L		150	
451	ATCGCAGGTGGTCCTTTCGTGCTTCCGCTTGCCAACAAACATAATGTAAA		500	
151	I A G G P F V L P L A N K H N V K		167	
	□			I5
501	GATTCTTCCGGCAGATTTCAGAACATTCTGCCATATTTTCAGTGTATTCAAG		550	
168	I L P A D S E H S A I F Q C I Q G		184	
551	GTTTGCCTGAAGGCGCTCTGCGCAAGATAATCTTGACTGCATCTGGTGGA		600	
185	L P E G A L R K I I L T A S G G		200	
	□			I6
601	GCTTTTAGGGATTGGCCTGTGCGAAAAGCTAAAGGAAGTTAAAGTAGCGGA		650	
201	A F R D W P V E K L K E V K V A D		217	
651	TGCGTTGAAGCATCCAAACTGGAACATGGGAAAGAAAATCACTGTGGACT		700	
218	A L K H P N W N M G K K I T V D S		234	
	□			I7
701	CTGCTACGCTTTTCAACAAGGGTCTTGAGGTCATTGAAGCGCATTATTTG		750	
235	A T L F N K G L E V I E A H Y L		250	
751	TTTGGAGCTGAGTATGACGATATAGAGATTGTCATTCATCCGCAAAGTAT		800	
251	F G A E Y D D I E I V I H P Q S I		267	
	□			I8
801	CATACATTCCATGATTGAAACACAGGATTCATCTGTGCTTGCTCAATTGG		850	
268	I H S M I E T Q D S S V L A Q L G		284	
851	GTTGGCCTGATATGCGTTTACCGATTCTCTACACCATGTCATGGCCCGAT		900	
285	W P D M R L P I L Y T M S W P D		300	
	□			I9
901	AGAGTTCCTTGTCTGAAGTAACTTGGCCAAGACTTGACCTTTGCAAAC		950	
301	R V P C S E V T W P R L D L C K L		317	
951	CGGTTTCATTGACTTTCAAGAAACCAGACAATGTGAAATACCCATCCATGG		1000	
318	G S L T F K K P D N V K Y P S M D		334	

1001	ATCTTGCTTATGCTGCTGGACGAGCTGGAGGCACAATGACTGGAGTTCTC	1050
335	L A Y A A G R A G G T M T G V L	350
	□	I10
1051	AGCGCCGCCAATGAGAAAGCTGTTGAAATGTTTCATTGATGAAAAGATAAG	1100
351	S A A N E K A V E M F I D E K I S	367
1101	CTATTTGGATATCTTCAAGGTTGTGGAATTAACATGCGATAAACATCGAA	1150
368	Y L D I F K V V E L T C D K H R N	384
1151	ACGAGTTGGTAACATCACCGTCTCTTGAAGAGATTGTTCACTATGACTTG	1200
385	E L V T S P S L E E I V H Y D L	400
1201	TGGGCACGTGAATATGCCGCGAATGTGCAGCTTTCTTCTGGTGCTAGGCC	1250
401	W A R E Y A A N V Q L S S G A R P	417
1251	AGTTCATGCATGAAGAATTGGTTGTTGGAAGAAGAATTC	1289
418	V H A *	420

Abbildung 3-12 Nucleinsäure-Sequenz und daraus abgeleitete Peptid-Sequenz des mit pET5bDXR exprimierten und in der vorliegenden Arbeit klonierten Fragmentes der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana* (Genbank Nr. AJ242588). Das vom Expressionsvektor codierte T7-Fusionspeptid ist unterstrichen, die zur Einklonierung in den Expressionsvektor verwendete Restriktionsschnittstelle *BamHI* ist in fetten Buchstaben und unterstrichen. Mit (□) sind Nucleotide markiert, nach denen in der genomischen Sequenz AB009053 ein Intron inseriert ist. Für das 420 Aminosäuren lange exprimierte Fusionspeptid berechnet sich eine Masse von 45661 Da.

- **Southern-Blot-Analyse**

Um zu überprüfen, ob es in *Arabidopsis thaliana* zu der klonierten cDNA *pET5bDXR* Isoformen gibt, wurde mit PCR aus *pET5bDXR* eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt (Primer DXRV3, DXRR1; 2.4.11, S. 31). DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, elektrophoretisch in Agarose aufgetrennt und mittels Southern-Transfer auf eine Nylonmembran übertragen (siehe 2.4.12, S. 31). Nach Hybridisierung mit der DXR-spezifischen Sonde (Methode nach ENGLER-BLUHM *et al.*, 1993; siehe 2.4.12, S. 31) wurden alle Fragmentgrößen detektiert, welche sich aus der Lage der Restriktionsschnittstellen für *BamHI*, *XhoI* und *EcoRV* in der genomischen Sequenz AB009053 vorhersagen lassen (Abbildung 3-13). Eine Ausnahme hiervon macht eine etwa 10 Kbp große Bande, welche vermutlich durch nicht vollständigen Verdau der DNA mit *XhoI* entsteht (Abbildung 3-13, Symbol „□“). Bei einer Hybridisierungstemperatur von 57 °C konnten gegenüber stringenten Bedingungen bei 65°C (ENGLER-BLUHM *et al.*, 1993) keine zusätzlichen Banden gefunden werden (Abbildung 3-13). Demnach konnten mittels Southern-Hybridisierung keine Isoformen des Genes nachgewiesen werden.

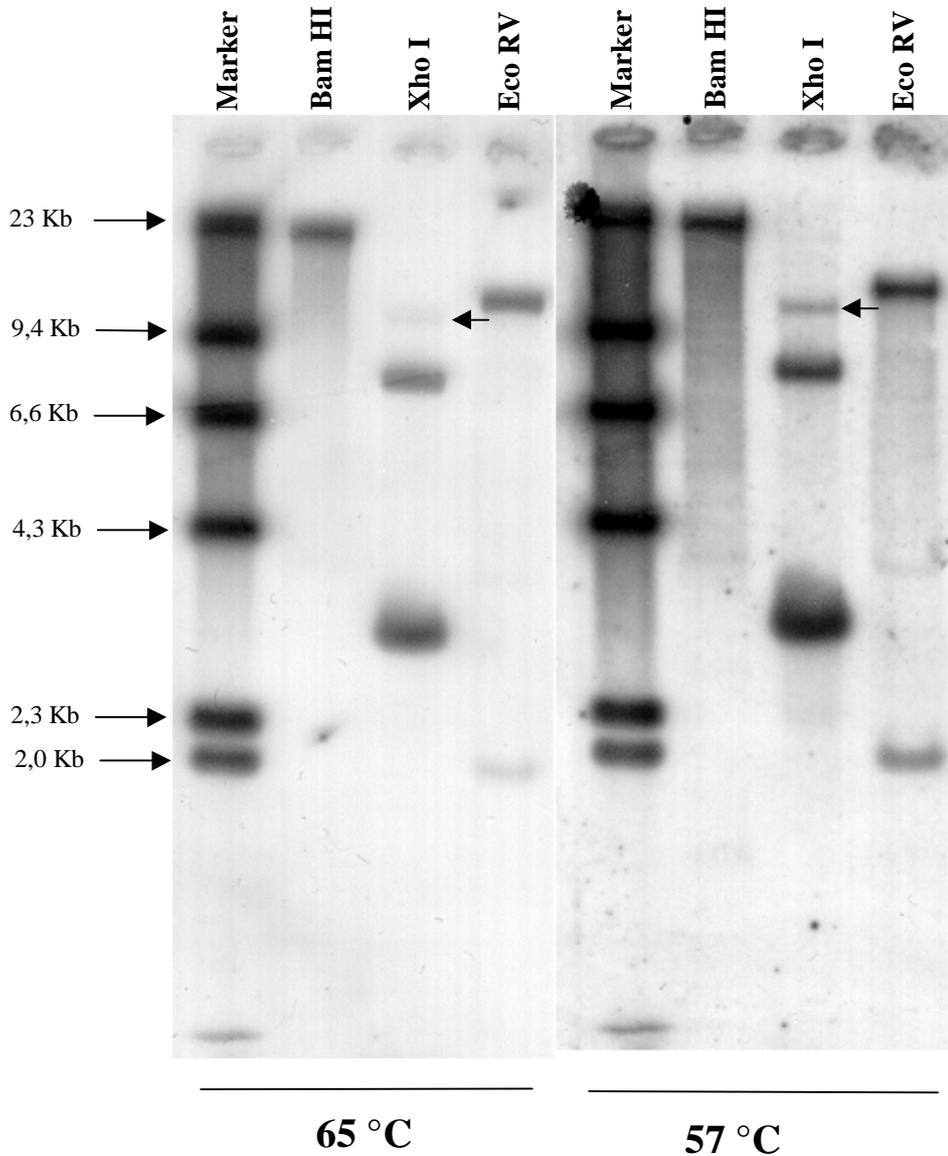


Abbildung 3-13 Southern-Blot-Analyse genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*, verdaut mit *Bam HI*, *Xho I* und *Eco RV*. Es wurde hybridisiert mit einer Digoxigenin-markierten Sonde, abgeleitet aus dem Klon PET5bDXR. Bei 57°C Hybridisierungstemperatur sind gegenüber stringenten Bedingungen (65 °C Hybridisierungstemperatur) keine zusätzlichen Banden zu sehen. Als Marker wurde λ -DNA, geschnitten mit Hind III (Digoxigenin-markiert) aufgetragen (Boehringer, Mannheim).

3.4.2 Heterologe Expression der DXR aus *A. thaliana* in *E. coli*

Das Plasmid pET5bDXR wurde zur Expression in *E. coli* JM109(DE3) transformiert. Dieser Stamm enthält ein IPTG-induzierbares Gen für die T7-Polymerase, welche für die Expression mit pET5b erforderlich ist. Transformierte Zellen wurden vermehrt, die Expression mit IPTG induziert und ein Proteinextrakt der Zellen gewonnen (siehe 2.4.22, S. 37). Der Proteinextrakt wurde mit enzymatisch erzeugtem 1-Desoxy-D-xylulose-5-

phosphat (0,25 mM) und NADPH (0,5 mM) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion (30s bei 95°C) wurde alkalische Phosphatase zugegeben. Die dephosphorylierten Substanzen wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Abbildung 3-14).

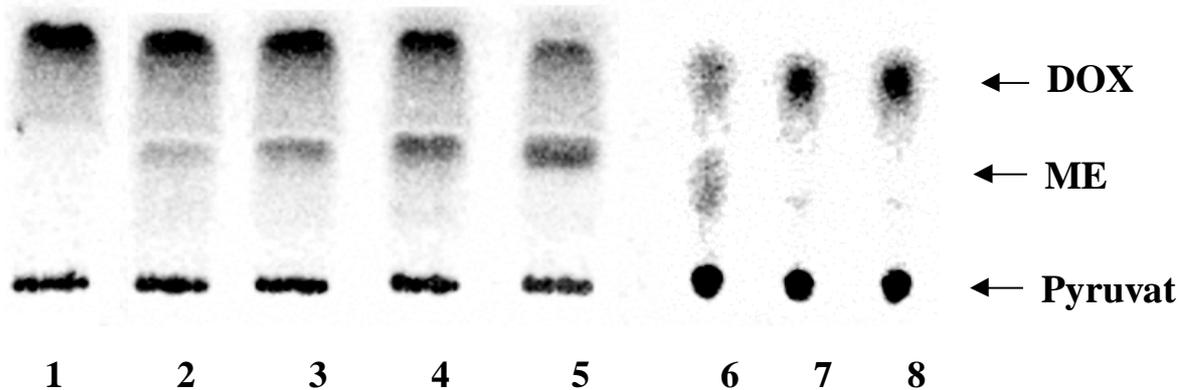


Abbildung 3-14 Enzymtests der rekombinanten DXR aus *Arabidopsis thaliana*. Proteinextrakte aus mit IPTG induzierten *E. coli* Zellen (JM109(DE3)/pET5bDXR) wurden mit enzymatisch erzeugtem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat und NADPH inkubiert (siehe 2.4.22, S. 37). Nach Abstoppen der Reaktion (30s bei 95°C) wurden die Phosphate mit alkalische Phosphatase dephosphoryliert und das Reaktionsprodukt auf Kieselgel aufgetrennt (Ethylacetat/Aceton/H₂O 50:50:2). (1): Kontrolle (*E. coli* JM109(DE3)/pET5b, ohne Insert), 1,5 µg/µl Protein. (2) – (5) *E. coli* JM109(DE3)/pET5bDXR: (2) 0,25 µg/µl, (3) 0,5 µg/µl, (4) 1 µg/µl, (5) 2,5 µg/µl Protein. (6)-(8): (6) *E. coli* JM109(DE3)/pET5bDXR, (7) Zusatz von 5 µM Fosmidomycin, (8) Reaktionsansatz ohne NADPH. DOX = 1-Desoxy-D-Xylulose, ME = 2-C-Methylerythritol.

Wie Abbildung 3-14 und Tabelle 3-7 zeigen, wird aus 1-Desoxy-D-Xylulose in Anwesenheit von NADPH ein radioaktives Produkt gebildet. Wird das im Reaktionsansatz befindliche Mangan-II-Salz weggelassen, ist der enzymatische Umsatz verringert. Dies ist ein Hinweis auf eine Mn-Abhängigkeit, wie sie auch bei der *E. coli*-DXR besteht (KUZUYAMA *et al.*, 1998a; TAKAHASHI *et al.*, 1998). Mit Fosmidomycin, einem spezifischen Hemmstoff pflanzlicher Isoprenoidbiosynthese und der *E. coli* DXR (KUZUYAMA *et al.*, 1998b), konnte die Produktbildung verhindert werden (Abbildung 3-14(7); Tabelle 3-7). Das radioaktive dephosphorylierte Produkt der Enzymreaktion lief in der Dünnschichtchromatographie gleichweit mit Methylerythritol, welches von Herrn J. Zeidler am Institut aus *Liriodendron tulipifera* isoliert und identifiziert wurde (DITTRICH und ANGYAL, 1988). Offensichtlich wurde also eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und funktionell in *E. coli* exprimiert.

	PET5bDXR	PET5bDXR (Kein NADPH)	PET5bDXR (Kein Mn ²⁺)	PET5bDXR (1 µM Fosmidomycin)
DOX	34 %	92 %	58 %	90 %
ME	66 %	8 %	42 %	10 %

Tabelle 3-7 Enzymtests der rekombinanten DXR aus *Arabidopsis thaliana*. *E. coli* JM109(DE3)/pET5bDXR wurde mit IPTG induziert (siehe 2.4.22, S. 37). Zellfreie Extrakte wurden mit enzymatisch erzeugtem ¹⁴C-markiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat und NADPH inkubiert (siehe 2.4.22, S. 37). Die Proteinkonzentration im Reaktionsansatz betrug 1 µg/µl. Nach Abstoppen der Reaktion (30s bei 95°C) wurden die Phosphate mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das Reaktionsprodukt auf Kieselgel aufgetrennt (Ethylacetat/Aceton/H₂O 50:50:2). Nach Exposition im Instant Imager konnte die Radioaktivität der Banden für 1-Desoxyxylulose (DOX, R_f 0,4) und 2-C-Methylerythritol (ME, R_f 0,2) quantifiziert werden. Dargestellt sind die Werte in % der Summe der Aktivität von DOX und ME.

- *Identifizierung von 1-Desoxyxylulose und 2-C-Methylerythritol*

Zusätzlich zum radioaktiven DXR-Assay wurde ein nicht-radioaktiver Assay durchgeführt, um das Produkt der *Chlamydomonas* DXS (1-Desoxyxylulose-5-Phosphat, DOXP) sowie der DXR aus *Arabidopsis thaliana* (2-C-Methylerythritol-4-Phosphat, MEP) mittels GC/MS zu identifizieren. Nach Umsatz von Pyruvat und DL-GAP mit rekombinanter DXS aus *Chlamydomonas* (siehe 2.4.22, S.37; 100 µl Volumen) wurde das Produkt mittels zellfreiem Enzymextrakt aus *E. coli* JM109(DE3)/pET5bDXR und NADPH weiter umgesetzt (siehe 2.4.22, 1 ml Reaktionsvolumen). Nach einer Stunde Inkubation bei 30 °C wurde ein mehrfaches Volumen an Methanol zugegeben, die Proteine durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand am Rotationsverdampfer eingengt. Das Reaktionsprodukt wurde über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit n-Propanol/Ethylacetat/H₂O 6:1:3 (v/v/v) aufgetrennt, wobei DOXP und MEP nicht voneinander getrennt werden. Eine Bande bei $R_f = 0.36$ wurde identifiziert (Sprühreagenz siehe 2.4.22) und eluiert, mit alkalischer Phosphatase behandelt und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur acetyliert (Pyridin/Essigsäure-Anhydrid 1:1 v/v). Außerdem wurden Standards acetyliert (synthetisches DOX, ME aus *Liriodendron Tulipifera*). Die acetylierten Fraktionen wurden mittels GC/MS analysiert (Hewlett Packard 5890 Series II, crosslinked methylsilicone 20 m x 0.32 mm, Hewlett Packard 5971A Mass Selective Detector, Temperaturprogramm: 80°C (3 min), erhitzen auf 280 °C (20°C/min)). DOX-Triacetat wie auch ME-Triacetat aus dem Reaktionsansatz konnten durch Vergleich mit authentischen Standards identifiziert werden:

DOX Triacetat (7.86 min.), GC/MS: $m/z = 217$ (2 %), 158 (23 %), 145 (11 %), 115 (100 %), 103 (27 %), 74 (9 %), 73 (12 %), 61 (11 %).

Methylerythritol Triacetat (8.17 min.), GC/MS: $m/z = 187$ (2 %), 159 (31 %), 145 (5 %), 140 (10 %), 129 (94 %), 117 (100 %), 103 (18 %), 87 (26 %), 86 (13 %), 75 (20 %).

Die MS-Daten für ME-Triacetat wurde ebenfalls durch die Daten aus ANTHONSON *et al.* (1976) bestätigt.

4 Diskussion

4.0.1 Isopreneinheiten der Carotinoide und Sterole

Zur Interpretation von ^{13}C -Markierungsmustern in Carotinoiden und Sterolen muß die Lage der einzelnen Isopreneinheiten in den Molekülen bekannt sein. Aus der Anwendung der Isoprenregel kann man die einzelnen linear verknüpften Isopreneinheiten des Phytol und des Plastochinon-9, sowie von 4 der 8 Isopreneinheiten des β -Carotin und des Lutein leicht erkennen (vgl. Abbildung 1-1). Abgeleitet von linearer Verknüpfung sind die cyclischen Enden Carotinoid-Moleküle (Abbildung 4-1). Schwieriger ist die Anwendung der Isoprenregel auf die Sterole. Nach der Bildung von Cycloartenol aus Epoxysqualen ist die Lage einzelner Isopreneinheiten nur noch schwer zu erkennen. Das für Pflanzen bekannte Schema der Cyclisierung/Umlagerung des Epoxysqualen zum Cycloartenol (Abbildung 4-1) ist für höhere Pflanzen durch Einbauexperimente mit ^{13}C - oder ^2H - markiertem Acetat und Mevalonsäure belegt (SEO *et al.*, 1988; NES *et al.*, 1992). Aus den Arbeiten von SEO *et al.* (1988) kann eindeutig abgeleitet werden, welche Positionen im Cycloartenol aus C-2 des Acetyl-CoA stammen (Abbildung 4-1). Dieselben Positionen sollten auch aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose markiert werden, wenn dieses zu $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetyl-CoA abgebaut wird (s. 4.0.2).

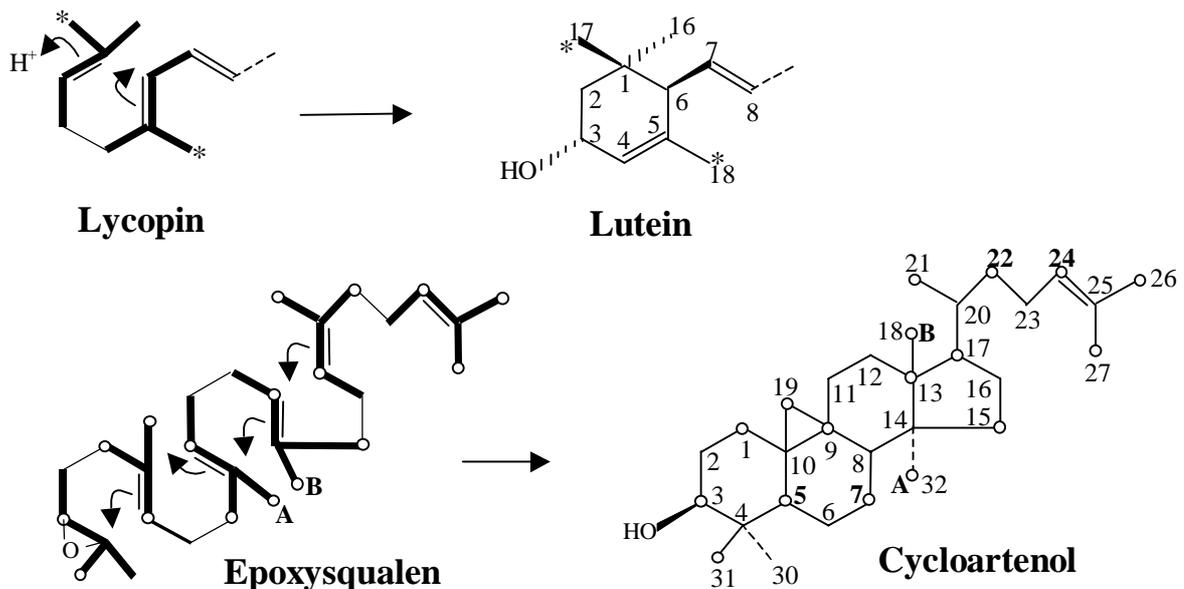


Abbildung 4-1 Cyclisierungsreaktionen von Lycopin und Epoxysqualen im Rahmen der Carotinoid- und der Sterol-Biosynthese. Bei der Cyclisierung von Lycopin zum ϵ -Ionon-Ring des Lutein kennzeichnet '*' die Methylgruppe der Isopreneinheit. Die Herkunft des C-17 des Lutein aus der Methylgruppe des IPP wird belegt durch Markierungsexperimente aus der vorliegenden Arbeit (Siehe Anhang A, Tabellen A-14, A-23). Bei der Bildung von Cycloartenol findet eine Cyclisierung des Epoxysqualens und anschließend eine Verschiebung der mit A und B bezeichneten Methylgruppen statt. Bei der weiteren Umsetzung von Cycloartenol zu den Phytosterolen werden die Methylgruppen an C-4 und C-14 entfernt. Die Markierung des Epoxysqualen und des Cycloartenol aus C-2 des Acetat ist gezeigt (o). Fett gezeichnete Bindungen beschreiben die Isopreneinheiten.

4.0.2 Die Interpretation von Einbaumustern aus [1-¹³C]-Glucose in Isoprenoiden von Algen und höheren Pflanzen

¹³C-Anreicherung an markierten Positionen

Eine Messung der absoluten Anreicherung des Isotopes ¹³C mittels ¹³C-NMR Spektroskopie war möglich im Falle der Messung des acetylierten Phytols und der acetylierten Sterole. Der Acetylrest diente hierbei als natürlich angereicherte Referenz. Wenn der zu markierende Organismus die angebotene Glucose als einzige C-Quelle nutzt, ist zu erwarten, daß eine Anreicherung von 10 % ¹³C in C-1 der Glucose sich in den Isoprenoiden an den markierten Positionen halbiert (5 %) wiederfindet. Der Grund hierfür ist, daß die glycolytische Spaltung von [1-¹³C]-Glucose (über Fructose-1,6-bisphosphat) zu je einem markierten Molekül Dihydroxyaceton-Phosphat und einem unmarkierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat führt, welche über Triosephosphat-Isomerase ineinander überführbar sind. Nach Verfütterung von 10%ig angereicherter [1-¹³C]-Glucose an Grünalgen und höhere Pflanzen waren die Isopreneinheiten der Isoprenoide sowie die Fettsäuren aber nur zu 3 bis 4 % markiert (bei Verfütterung von 15% [1-¹³C]-Glucose etwa zu 5 %). Der im Vergleich zum rechnerisch erwarteten leicht niedrigere gemessene Markierungsgrad kann durch einen teilweisen Abbau der Glucose über den oxidativen Pentosephosphatzyklus erklärt werden: Glucose-6-Phosphat wird zum 6-Phospho-Gluconat oxidiert und das C-1 unter Abspaltung als CO₂ freigesetzt. Ribulose-5-Phosphat entsteht, aus welchem nur unmarkiertes Triosephosphat regeneriert werden kann (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996).

Im Falle der Markierung des Lycopin in reifenden Tomatenfrüchten mit ¹³C-markierten Glucosen wurde die [1-¹³C]-Glucose bzw. die [U-¹³C₆]-Glucose ohne Isotopenverdünnung in die Früchte injiziert. In der Tomatenfrucht muß man einen unmarkierten pool von Zuckern vermuten, da die Frucht nach der Trennung von der Mutterpflanze selbstständig zur Bildung des Lycopin fähig ist. Die ¹³C-Anreicherung von 99 % in der injizierten [1-¹³C]-Glucose fand sich tatsächlich im Lycopin stark verdünnt wieder⁵. Es wurden bei diesen Markierungsversuchen wahrscheinlich kaum neue Sterole gebildet. In den Sterolen konnte mittels GC/MS kein Einbau aus [1-¹³C]-Glucose nachgewiesen werden. Man konnte bei diesen Experimenten also nicht wie bei *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota* auf die Kompartimentierung der IPP-Biosynthese schließen.

Kompartimentierung der IPP-Biosynthesen

In höheren Pflanzen und Grünalgen werden Phytol (Seitenkette der Chlorophylle), β-Carotin, Lutein und Plastochinon-9 im Chloroplasten gebildet (siehe 1.3, S. 3), während die Sterole im Cytosol gebildet werden (siehe 1.3, S. 3). Damit soll im Folgenden von der Markierung der plastidären Isoprenoide auf die IPP-Biosynthese im Plastiden und der Markierung der Sterole auf die cytosolische IPP-Biosynthese geschlossen werden.

Ableitung der Isopreneinheiten aus Glucose

Grünalgen und höhere Pflanzen wurden auf Glucose als Kohlenstoff-Quelle angezogen. Der Glucose wurden 10 oder 15 % [1-¹³C]-Glucose beigemischt. Während des Wachstums auf der markierten Glucose fand eine solche Vervielfachung der Biomasse statt, daß alle untersuchbaren Substanzen neu gebildet wurden. So konnten alle Isoprenoide wie auch alle Fettsäuren analysiert werden, sofern man sie in genügender Menge isolieren konnte. Die Mindestmenge für ¹³C-NMR Spektroskopie von Phytol, Carotinoiden und Sterolen liegt bei etwa 2 mg, wobei mit solchen Mengen sehr lange Meßzeiten benötigt werden.

Über die Markierungsmuster der Isoprenoide aus dem Einbau von [1-¹³C]-Glucose sollte „retrobiosynthetisch“ zwischen verschiedenen IPP-Biosynthesen unterschieden werden

⁵ Die ¹³C-Anreicherung im Lycopin konnte nur relativ (bezogen auf C-5 des Lycopin) bestimmt werden. Bei sehr hoher ¹³C-Anreicherung wären jedoch komplizierte ¹³C/¹³C-Kopplungen meßbar gewesen.

können. Voraussetzung für solche Experimente ist, daß man den Abbauweg der aufgenommenen Glucose und damit die Markierung der Intermediate kennt, aus denen IPP gebildet wird. Der Abbauweg der aufgenommenen Glucose konnte unabhängig von den Markierungsmustern der Isoprenoide aus der Markierung der Fettsäuren abgeleitet werden. In den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca* sowie in *Lemna gibba* und *Hordeum vulgare* war nach Wachstum auf [1-¹³C]-Glucose Palmitinsäure untersucht worden und in der Weise markiert, daß [2-¹³C]-Acetyl-CoA in die Fettsäurebiosynthese einging (vgl. Abschnitte 3.1, S. 39 und 3.2, S. 44). Also wurde in allen untersuchten Pflanzen die angebotene [1-¹³C]-Glucose glycolytisch über [3-¹³C]-Triosephosphat zum [3-¹³C]-Pyruvat und dies zu [2-¹³C]-Acetyl-CoA umgesetzt (Abbildung 4-2A). Aus [2-¹³C]-Acetyl-CoA über Mevalonat gebildete Isopreneinheiten werden an den Positionen C-2, C-4 und C-5 markiert (Abbildung 4-2B). Dieses Markierungsmuster wurde für die Sterole der untersuchten höheren Pflanzen gefunden, nicht jedoch bei den plastidären Isoprenoiden der höheren Pflanzen sowie den Sterolen der Grünalgen (vgl. 3.2, S. 44).

In den plastidären Isoprenoiden von *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* wurden die Isopreneinheiten aus [1-¹³C]-Glucose an den Positionen C-1 und C-5 markiert. Dies deutet darauf hin, daß sich die einzelnen C-Atome der Isopreneinheiten wie in Abbildung 4-2 C gezeigt aus den C-Atomen der Glucose (bzw. Triosephosphat) herleiten. Dieses in Abbildung 4-2 C gezeigte Einbauschema wurde für einige Eubakterien (z. B. *E. coli*) und für die Grünalge *Scenedesmus obliquus* mittels mehrerer ¹³C-Markierungsexperimente nachgewiesen (ROHMER *et al.*, 1993; SCHWENDER *et al.*, 1996).

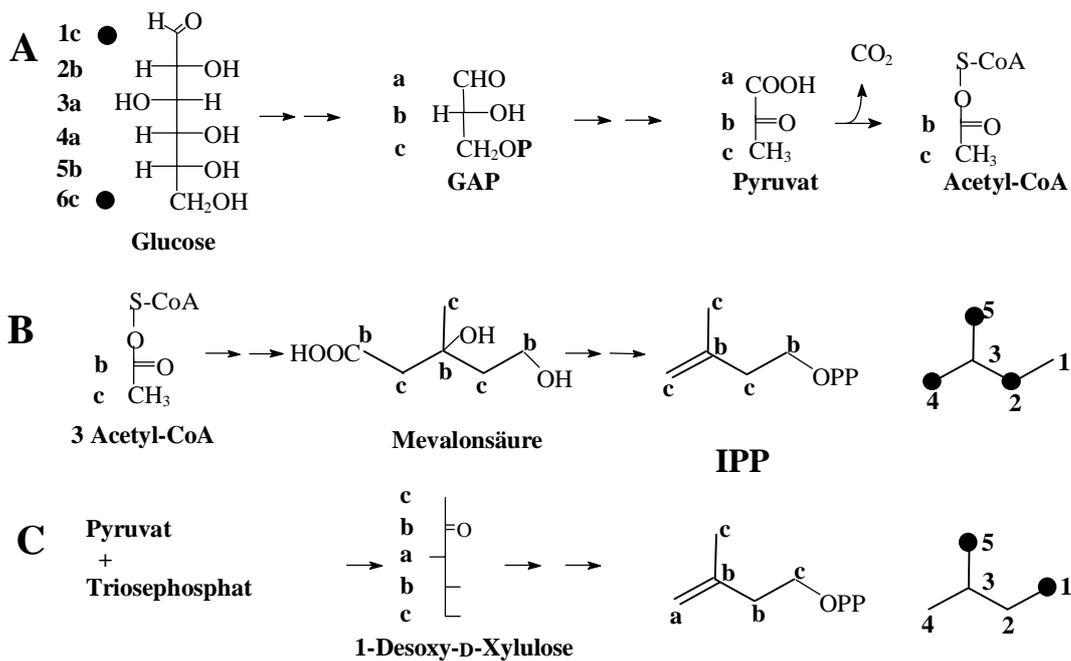


Abbildung 4-2 Herkunft der C-Atome von Isopreneinheiten aus Glucose. (A) Aus Glucose wird glycolytisch GAP (Glycerinaldehyd-3-Phosphat), Pyruvat sowie über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex Acetyl-CoA gebildet. (B) Herkunft der C-Atome des IPP, wenn dieses aus Acetyl-CoA über Mevalonsäure gebildet wird (vgl. Abbildung 1-2). (C) Herkunft der C-Atome des IPP, wenn dieses aus Pyruvat und GAP gebildet wird (vgl. 1.5, S. 6). (●) Jeweils Gefundene Markierung aus [1-¹³C]-Glucose.

In den Fällen, in denen Isopreneinheiten an den Positionen C-1 und C-5 markiert wurden, war zusätzlich an der Position C-4 eine leicht erhöhte ^{13}C -Anreicherung zu beobachten (Tabelle 3-1, S. 39; Tabelle 3-3, S. 44; Tabelle 3-4, S.46). Dies kann auf eine nicht perfekte Stereokontrolle der IPP-Isomerase hindeuten. C-4 und C-5 des IPP können hierbei vertauscht werden.

C-24-Alkylierung der Sterole

Ergost-7-enol besitzt eine C-24-Methylgruppe (C-28, vgl. Abbildung 1-1, S. 2), welche nicht zur isoprenoiden Grundstruktur gehört. Entsprechend besitzen die untersuchten Sterole Sitosterol, Stigmasterol, Chondrillasterol und Dehydrochondrillasterol eine nicht-Isoprenoide C-24-Ethyl-Gruppe (C-28, C-29). Die C-24-Methyl/Ethyl-Gruppen werden sowohl in Grünalgen, als auch wahrscheinlich in höheren Pflanzen durch Methylierung aus S-Adenosylmethionin an Cycloartenol angefügt (GOODWIN, 1981). In den aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose markierten Sterolen der Grünalgen und der höheren Pflanzen sind die Positionen C-28 und C-29 deutlich ^{13}C -angereichert (siehe Tabellen im Anhang A). Sie stammen also aus C-1 der Glucose. Dies ist über den C_1 -Stoffwechsel erklärbar: Aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose entsteht aus dem glycolytischen Intermediat $[3-^{13}\text{C}]$ -3-Phosphoglycerat $[3-^{13}\text{C}]$ -Serin. C-3 des Serin wird über Serin-Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1) in den C-1-Stoffwechsel überführt. Über S-Adenosylmethionin wird das Sterolgerüst am C-24 methyliert.

4.1 Isoprenoidbiosynthese in Grünalgen

4.1.1 IPP-Biosynthese in *Scenedesmus*

Mit der Grünalge *Scenedesmus obliquus*, an der die Mevalonat-unabhängige IPP-Biosynthese bereits studiert worden war (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996), wurden weitere Isotopen-Markierungsversuche durchgeführt.

- *Einbau von $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat*

Scenedesmus wurde auf Glucose unter Zusatz von $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat angezogen. Die aus diesem Experiment gewonnenen Erkenntnisse über die IPP-Biosynthese ergänzen die aus früheren Einbauversuchen, bei denen *Scenedesmus* auf $[1-^{13}\text{C}]$ -, $[6-^{13}\text{C}]$ -, $[4, 5-^{13}\text{C}_2]$ -, und $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose sowie auf $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat heterotroph angezogen worden war (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996; Abbildung 4-3 A).

Nach Einbau von $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat waren im Phytol die Isopreneinheiten an der Position C-5 markiert (Abbildung 4-3 B). C-5 der Isopreneinheit stammt also aus C-3 des Pyruvat. Die Position C-5 wird ebenfalls aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose und aus $[6-^{13}\text{C}]$ -Glucose markiert (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996; Abbildung 4-3 A). Dies wird dadurch erklärbar, daß C-3 des Pyruvat auf dem Wege der Glycolyse aus C-1 und C-6 der Glucose hervorgeht (Abbildung 4-2 A). Es entsteht aus $[1-^{13}\text{C}]$ - oder $[6-^{13}\text{C}]$ -Glucose also endogen $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat. Ebenso muß aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose endogen uniform ^{13}C -markiertes Pyruvat entstehen. Nach Einbau von $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose zeigten die NMR-Spektren von Phytol und Chondrillasterol $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Kopplungen zwischen C-3 und C-5 der Isopreneinheiten (Abbildung 4-3 A; SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996). Demnach stammen also C-3 und C-5 als biosynthetische C_2 -Einheit der Isopreneinheit aus C-2 und C-3 des Pyruvat (C-1 des Pyruvat geht vermutlich durch Decarboxylierung verloren).

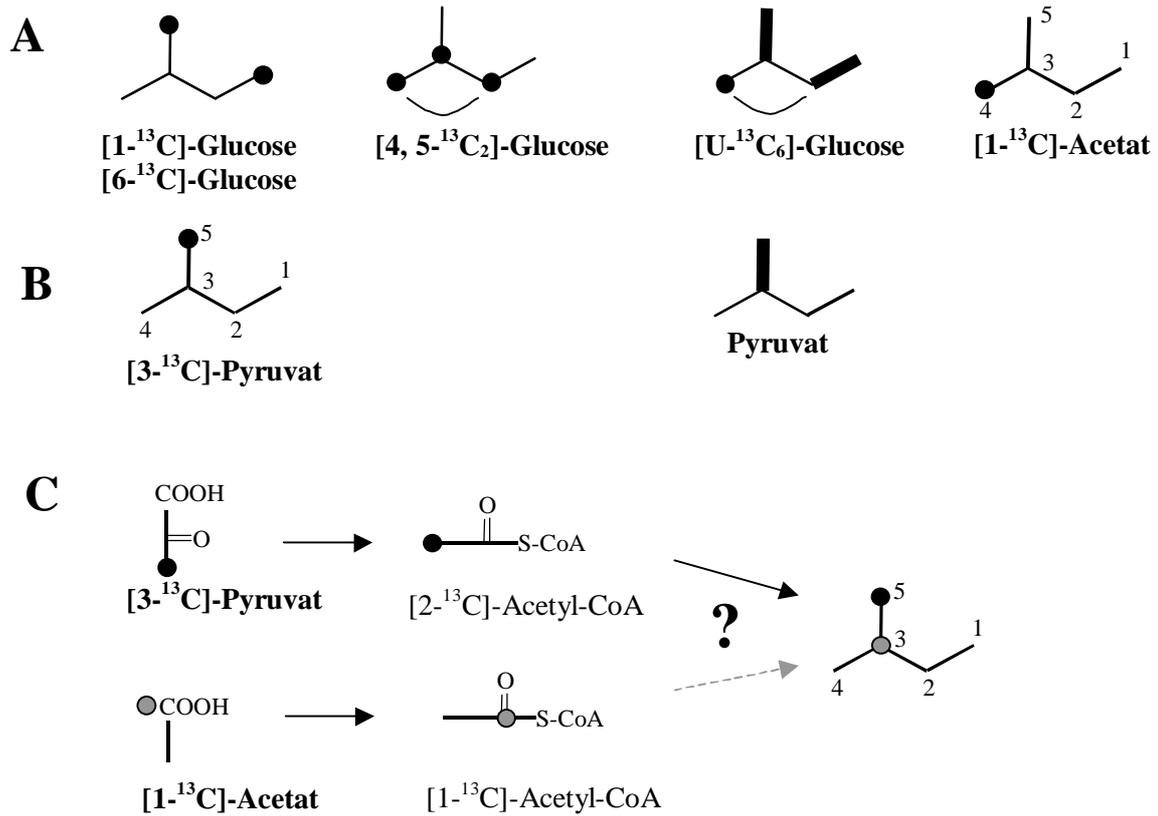


Abbildung 4-3 Markierungsmuster der Isopreneinheiten in Phytol und Chondrillasterol aus *Scenedesmus obliquus* (A) nach Verabreichung verschieden markierter Glucosen sowie von [1-¹³C]-Acetat (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996). C-C-Bindungen der [U-¹³C₆]-Glucose, welche in den Isopreneinheiten erhalten bleiben, sind durch schwarze Balken symbolisiert. Die C-C-Bindungen der Glucose, welche durch die intermolekulare Umlagerung in der IPP-Biosynthese gebrochen werden, sind durch einen Bogen gekennzeichnet. (B) Der in dieser Arbeit zusätzliche durchgeführte Einbau von [3-¹³C]-Pyruvat zeigt, daß C-3 und C-5 der Isopreneinheiten aus Pyruvat stammen. (C) Wenn [3-¹³C]-Pyruvat über [2-¹³C]-Acetyl-CoA in die Isopreneinheiten eingebaut würde, müßte der Einbau von [1-¹³C]-Acetat die Position C-3 der Isopreneinheiten markieren.

Mit dem Einbau von [3-¹³C]-Pyruvat in Phytol von *Scenedesmus* wird damit die biogenetische Herkunft von C-3 und C-5 der Isopreneinheit aus C-2 und C-3 des Pyruvat belegt. Die Möglichkeit, daß nicht Pyruvat selbst, sondern aus Pyruvat abgeleitetes Acetyl-CoA Vorstufe für C-3 und C-5 der Isopreneinheit ist, kann im Folgenden ausgeschlossen werden:

- *Acetyl-CoA kann als IPP-Vorstufe in Scenedesmus ausgeschlossen werden*

Pyruvat ist also in *Scenedesmus* eine Vorstufe für Isoprenoide. Pyruvat, so wurde für verschiedene Pflanzen mit *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten gezeigt, wird im Gegensatz zu Acetat effizient in plastidäre Isoprenoide eingebaut (SHAH und ROGERS, 1969; COOPER und BENEDICT, 1967; HEINTZE *et al.*, 1990; BÄUERLE *et al.*, 1990). Es wurde für Pflanzen vermutet, daß Pyruvat über den plastidären Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex in Acetyl-CoA umgesetzt wird und dieses (über Mevalonsäure) in Isoprenoide eingebaut wird (HOPPE *et al.*, 1993). Eine Beteiligung des aus [3-¹³C]-Pyruvat gebildeten Acetyl-CoA an der IPP-Biosynthese kann aber für *Scenedesmus* ausgeschlossen werden. Dafür muß man die Einbaumuster aus [1-¹³C]-Acetat und [3-¹³C]-Pyruvat miteinander vergleichen (Abbildung 4-3 A, B). Durch die Markierungsmuster der in *S. obliquus* gebildeten Fettsäuren wird belegt, daß

[1-¹³C]-Acetat zu [1-¹³C]-Acetyl-CoA wie auch [3-¹³C]-Pyruvat zu [2-¹³C]-Acetyl-CoA umgesetzt wird (SCHWENDER *et al.*, 1996, Abschn. 3.1.1, S. 39). Da [3-¹³C]-Pyruvat die Position 5 der Isopreneinheiten markiert (vgl. Abbildung 4-3 C), müßte [1-¹³C]-Acetat die Position C-3 der Isopreneinheiten markieren, wenn C-3 und C-5 des IPP biogenetisch aus Acetyl-CoA (Acetat-Einheit) abgeleitet wären (vgl. Abbildung 4-3 C). [1-¹³C]-Acetat markiert dagegen C-4 der Isopreneinheiten (Abbildung 4-3 A), was durch eine gluconeogenetische Umwandlung von [1-¹³C]-Acetat in [1-¹³C]-Triosephosphat erklärbar ist (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996). Somit kann ausgeschlossen werden, daß Acetyl-CoA in *Scenedesmus* an der IPP-Biosynthese beteiligt ist. Vielmehr trifft offensichtlich das schon aus Bakterien bekannte Biosyntheschema zu, nachdem Pyruvat decarboxyliert und mit Triosephosphat zu einer C₅-Einheit verknüpft wird. Dieser C₅-Vorläufer des IPP wird dann durch eine Umlagerung in das verzweigte Isopren-Gerüst umgebaut (vgl. 1.5, S. 6; Abbildung 4-4).

- *Triosephosphat als IPP-Vorstufe wird indirekt belegt*

Es wurde gezeigt, daß C-3 und C-5 der Isopreneinheiten in *Scenedesmus obliquus* aus Pyruvat stammen. Da die C-Atome C-1, C-2 und C-4 der Isopreneinheiten nicht aus Pyruvat markiert werden, kann dieser Teil weder aus Pyruvat, noch aus daraus abgeleiteten Intermediaten (z. B. aus Acetyl-CoA) stammen. Die Einbauversuche mit [1-¹³C]-, [6-¹³C]-, [4, 5-¹³C₂]- und [U-¹³C₆]- Glucose hatten erkennen lassen, daß C-1, C-2 und C-4 der Isopreneinheit eine biosynthetische C₃-Einheit darstellen, welche wie Triosephosphat zu gleichen Teilen aus der oberen Hälfte (C-1, C-2, C-3) und der unteren Hälfte (C-4, C-5, C-6) der Glucose hergeleitet ist (vgl. Abbildung 4-2 A; Abbildung 4-3 A; SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996). Alle Einbauversuche aus Glucose und Pyruvat zusammengenommen muß die biosynthetische C₃-Einheit also aus einem Glycolyse-Intermediat abgeleitet sein, welches zwischen Fructose-1,6-bis-Phosphat und Pyruvat liegt. In Anbetracht der im Folgenden besprochenen Rolle von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat als weiteres Intermediat der IPP-Biosynthese und der Klonierung einer 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* bleibt kaum ein Zweifel, daß Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) die biosynthetische C₃-Einheit der Isopreneinheiten bildet.

- *1-Desoxy-D-Xylulose ist IPP-Vorstufe in S. obliquus*

Um nun zu zeigen, daß das aus Pyruvat und Triosephosphat gebildete C₅-Intermediat der IPP-Biosynthese die aus *E. coli* bekannte Pentulose 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat ist (vgl. 1.5, S. 6), wurde *Scenedesmus* mit Deuterium-markierter [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose angezogen (siehe 3.1.3, S. 41). Den Massenspektren des markierten Phytol konnte entnommen werden, daß - gemäß der Herkunft jeder der vier Isopreneinheiten aus je einem Molekül 1-Desoxy-D-Xylulose - vier Positionen im Molekül mit Deuterium markiert werden (siehe 3.1.3, S. 41). Auch für die triterpenen Sterole kann die Markierung an vier Positionen festgestellt werden⁶. Etwa 40 % der Isopreneinheiten in Phytol und in den Sterolen wurde markiert, d. h. aus dem im Medium befindlichen Zucker gebildet. 1-Desoxy-D-Xylulose findet also offensichtlich als Vorstufe für IPP Verwendung (Abbildung 4-4). Ein Enzym, welches die Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat aus Pyruvat und GAP katalysiert, wurde aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* kloniert (siehe 4.3, S. 80). In dieser Grünalge wurden mit Einbau von [1-¹³C]-Glucose und [1-²H₁]-DOX wie in *Scenedesmus obliquus* der DOXP-Weg nachgewiesen (siehe 4.1.2, S. 72; 4.1.3, S.72).

⁶ bei der Biosynthese der Sterole aus Cycloartenol gehen zwei der sechs potentiell markierten Methylgruppen verloren (s. Abbildung 4-1)

Mit dem Einbau von verschiedenen ^{13}C -markierten Glucosen und Acetat (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996) und den in dieser Arbeit vorgestellten ergänzenden Markierungsversuchen mit $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat und $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose konnten für *Scenedesmus obliquus* folgende Biosyntheseschritte der IPP-Bildung bestätigt und weiter belegt werden (vgl. Abbildung 4-4):

1. Die Addition einer aus Pyruvat abgeleiteten C_2 -Einheit an das glycolytische Intermediat Glycerinaldehyd-3-Phosphat unter Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase).
2. Die Umlagerung des C-Gerüsts der 1-Desoxy-D-Xylulose zur verzweigten Struktur des IPP.

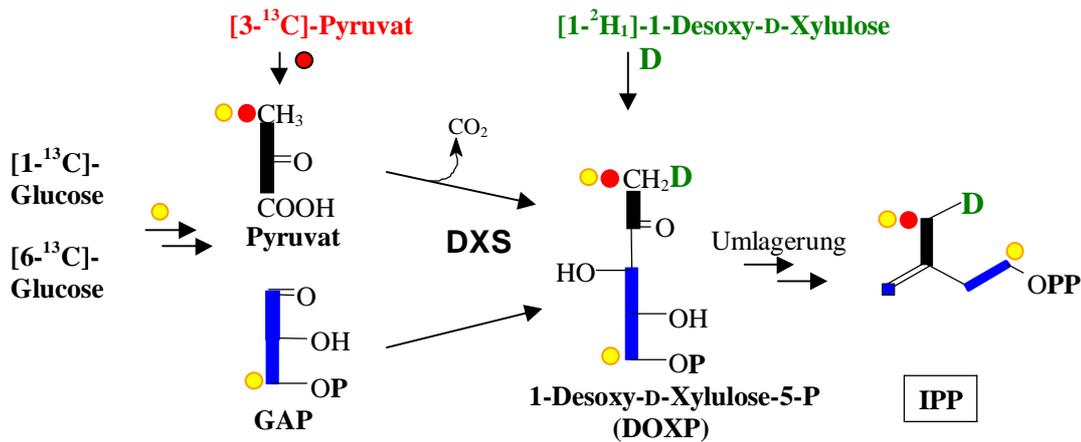


Abbildung 4-4 Bildung von Isopentenylpyrophosphat (IPP) in *Scenedesmus obliquus*. Die Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat (DOXP) aus Pyruvat und GAP ist aus den verschiedenen Markierungsversuchen mit *Scenedesmus obliquus* ableitbar. Eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat Synthase (DXS) wurde in der vorliegenden Arbeit aus *Chlamydomonas reinhardtii* kloniert.

- *Weitere Intermediate der IPP-Biosynthese in S. obliquus*

Als weitere Schritte zur Bildung von IPP aus 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat sind eine C-C-Umlagerung sowie die Entfernung von drei in der 1-Desoxy-D-Xylulose befindlichen Sauerstoff-Atomen zu benennen. Die Umlagerung zum verzweigten C-Gerüst des IPP findet wahrscheinlich auf der Stufe des 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat statt, wie in Abschnitt 4.6.7 (S. 99) diskutiert. Eine 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) wurde in der vorliegenden Arbeit aus *Arabidopsis thaliana* kloniert (siehe 3.4, S. 58). 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat wird umgelagert und unter Reduktion entsteht 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat. Die Bildung von 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat aus 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat konnte für *Scenedesmus obliquus* nicht belegt werden. Deuterium- markiertes 2-C-Methylerythritol (freundlicherweise von Herrn Prof. M. Rohmer, Strasbourg, zur Verfügung gestellt) wurde von der Grünalge nicht in Isoprenoide eingebaut. Möglicherweise findet keine Aufnahme oder keine Umsetzung zum phosphorylierten Intermediat statt. 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat als Intermediat der IPP-Biosynthese wurde für andere Organismen belegt (siehe 4.6.7, S. 99).

4.1.2 Einbau von [1-¹³C]-Glucose in Isoprenoide von *Chlorella fusca* und *Chlamydomonas reinhardtii*

Nach Einbau von [1-¹³C]-Glucose in die Isoprenoide von *Chlorella fusca* und *Chlamydomonas reinhardtii* waren die Markierungsmuster der Isopreneinheiten dieselben, wie sie zuvor schon für *Scenedesmus obliquus* gefunden wurden (SCHWENDER *et al.*, 1996). In allen drei Grünalgenarten wurden die plastidäre Phytol-Seitenkette der Chlorophylle, die Carotinoide, wie auch die cytosolischen Sterole nach dem für das Pyruvat/Triosephosphat-Biosyntheseschema typischen Muster markiert (Markierung an Positionen C-1 und C-5 der Isopreneinheiten vgl. 4.0.2). Offensichtlich trifft neben *Scenedesmus obliquus* auch für die Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca* zu, daß die Biosynthese sowohl von plastidären als auch von cytosolischen Isoprenoiden über den DOXP-Weg stattfindet.

4.1.3 Vorkommen der IPP-Biosynthesen über 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat und Mevalonsäure in Grünalgen

Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesen wurde nun unter Einbeziehung weiterer Vertreter verschiedener Grünalgen-Klassen mittels Verfütterung von Deuterium-markierter 1-Desoxy-D-Xylulose und von ¹³C-markierter Mevalonsäure untersucht. Nachdem mittels Einbau von [1-¹³C]-Glucose nur einzellige Grünalgen untersucht worden waren (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella fusca*), wurden nun auch trichal organisierte Grünalgen mit einbezogen. Für die Auswahl weiterer Arten wurde die Systematik der Grünalgen nach FRIEDL (1997) zugrundegelegt (vgl. Tabelle 4-1). Zu den schon untersuchten drei kokkalen Chlorophyceae (*Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca*) wurden *Gloeotilopsis planctonica* (Ulvophyceae, bildet kurze unverzweigte Zellfäden) sowie *Klebsormidium flaccidum* und *Spirogyra* sp. (Charophyceae, beide fädig, unverzweigt) ausgewählt.

Chlorella fusca wurde im folgenden nicht weiter untersucht. Nach FRIEDL (1997) sowie nach KESSLER (1992) ist die Gattung *Chlorella* phylogenetisch heterogen und der hier verwendete Stamm *Chlorella fusca* (SAG 211-8b) steht biochemisch der Gattung *Scenedesmus* nahe.

- *Chlorophyceae* und *Ulvophyceae*

Der Einbau von [1-¹³C]-Glucose in *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca* hatte gezeigt, daß alle untersuchten Isoprenoide (Phytol, β -Carotin, Lutein, Plastochinon-9, Sterole) über den Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosynthesemechanismus gebildet werden (siehe 4.1.2, S. oben). Ebenfalls wird in *Scenedesmus obliquus* die Prenylseitenkette des in den Mitochondrien gebildeten Ubichinon aus [1-¹³C]-Glucose nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Weg markiert (MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998). In Übereinstimmung mit dem Fehlen der IPP-Biosynthese über Mevalonsäure wurde ¹³C-Mevalonsäure weder in Phytol noch in die Sterole von *S. obliquus* und *C. reinhardtii* eingebaut. Dagegen wurde 1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol sowie in die Sterole beider Arten eingebaut. Es wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Frau M. Borinin versucht, Genfragmente der HMG-CoA Reduktase, dem Schlüsselenzym des Acetat/Mevalonat-Weges, aus *S. obliquus*, *C. reinhardtii* oder *C. fusca* zu klonieren. Dies gelang in keinem Falle (BORININ, 1997).

Die Ulvophycee *Gloeotilopsis planctonica* verhält sich in gleicher Weise wie die genannten Vertreter der Chlorophyceae. Aus 1-Desoxy-D-Xylulose wurden etwa 70 % der Isopreneinheiten des Phytol und der Sterole markiert, während Mevalonsäure offensichtlich keine Vorstufe ist. Ebenso wurde ein anderer trichaler Vertreter der Ulvophyceae, *Ulothrix fimbriata*, in der Karlsruher Arbeitsgruppe untersucht (MÜLLER, 1997). Auch diese Alge

zeigte aus 1-Desoxy-D-Xylulose einen Einbau von etwa 20 % in Phytol und in die Sterole, keinen aber aus Mevalonsäure. Die untersuchten Chlorophyceen sowie die Ulvophyceen *Gloeotilopsis planctonica* und *Ulothrix fimbriata* besitzen offensichtlich nur die IPP-Biosynthese über 1-Desoxy-D-Xylulose.

Insgesamt ist also die Präsenz des Acetat/Mevalonat-Weges für Chlorophyceae und Ulvophyceae in Frage gestellt. Die untersuchten Chlorophyceae und die Ulvophyceae gehören zusammen in die Gruppe der Chlorophyta, welchen noch die meist kokkalen Trebouxiophyceae (z. B. *Trebouxia*, *Chlorella*), aber auch die trichal organisierten Chaetophorales und Oedogoniales zugerechnet werden (Tabelle 4-1; FRIEDL, 1997). Die Chlorophyta sind gemäß ultrastruktureller Merkmale (Geißelbasalkörper, Mitose, Cytokinese) sowie nach DNA-Sequenzvergleichen (18S-rDNA) eine monophyletische Gruppe innerhalb der Grünalgen, wobei die Charophyceae zusammen mit den Landpflanzen eine weitere hiervon getrennte monophyletische Linie bilden (Tabelle 4-1; FRIEDL, 1997).

• *Charophyceae*

Im Gegensatz zu den untersuchten Chlorophyceae und den Ulvophyceae waren bei den untersuchten Charophyceen *Klebsormidium flaccidum* und *Spirogyra* sp. beide IPP-Biosynthesen nachweisbar. Mevalonsäure wird in beiden Algen vorwiegend in die Sterole eingebaut, während das plastidäre Phytol in *Spirogyra* vorwiegend aus 1-Desoxy-D-Xylulose markiert wurde. Somit müssen im Cytosol die Enzyme des Acetat/Mevalonat-Weges und im Plastiden die des DOXP-Weges aktiv sein. Ein gewisser Austausch von Isoprenoidevorstufen (z. B. IPP) zwischen Cytosol und Plastid könnte dafür verantwortlich sein, daß die Vorstufen DOX und MVA jeweils nicht ausschließlich nur in Phytol bzw. in die Sterole eingebaut wurden, wohl aber jeweils mit eindeutiger Präferenz. In *Klebsormidium* konnte sogar ein gleich großer Einbau von DOX in das Phytol und die Sterole festgestellt werden, jedoch läßt der geringe Einbau von MVA in das Phytol - im Vergleich zu dem in die Sterole - auf einen im Cytosol lokalisierten MVA-Weg schließen.

Tabelle 4-1 Systematik der Grünalgen und höheren Pflanzen nach FRIEDL (1997) und Vorkommen der beiden alternative IPP-Biosynthesen. Aufgrund ultrastruktureller Merkmale des Cytoskeletts (Mitose, Geißelbasalkörper) und aufgrund von Sequenzvergleichen der 18S-rDNA wurde die hier aufgeführte Systematik entwickelt. Morphologisch begründete Klassen wie die Chlorococcales und Volvocales wurden aufgelöst. Typisch kokkale Grünalgen werden nun in verschiedene Klassen gestellt. Hinter den Gattungsnamen einzelner Vertreter ist die in dieser Arbeit gefundene Verteilung der beiden IPP-Biosynthesewege über DOX oder MVA (Plastid/Cytosol) angegeben. * Aus MÜLLER (1997).

Stamm	Klasse	Ordnung	Gattung (Plastid/Cytosol)
Chlorophyta	Chlorophyceae		<i>Scenedesmus</i> (DOX/DOX)
			<i>Chlamydomonas</i> (DOX/DOX)
			<i>Chlorella fusca</i> (DOX/DOX)
			<i>Volvox</i>
	Ulvophyceae		<i>Ulva</i> ,
			<i>Gloeotilopsis</i> (DOX/DOX)
			<i>Ulothrix</i> (DOX/DOX)*
Streptophyta	Charophyceae	Zygnematales	<i>Mougeotia</i> , <i>Spirogyra</i> (DOX/MVA)
		Coleochaetales	<i>Coleochaete</i>
		Klebsormidiales	<i>Klebsormidium</i> (DOX/MVA)
		Charales	<i>Chara</i> , <i>Nitella</i>
		„Embryophyten“	<i>Lemna</i> , <i>Hordeum</i> , (DOX/MVA)
			<i>Daucus</i> (DOX/MVA)
			(siehe 4.2, S. 75)

- *IPP-Biosynthese und Phylogenie der Grünalgen und höheren Pflanzen*

Vertreter der Chlorophyceae und der Ulvophyceae, beides Untergruppen der Chlorophyta, bilden offenbar alle Isoprenoide über den DOXP-Weg (Tabelle 4-1). Die Charophyceae bilden mit den Landpflanzen eine monophyletische Gruppe, die deutlich von den Chlorophyta getrennt ist („Streptophyta“, siehe Tabelle 4-1, FRIEDL, 1997) und Vertreter der Charophyceae wie der Landpflanzen besitzen beide IPP-Biosynthesewege in einer kompartmentäre Trennung (Tabelle 4-1): Plastidäre Isoprenoide werden nach dem DOXP-Weg gebildet, während cytosolische Isoprenoide nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden. Die Bildung von IPP über MVA kann als ursprüngliches Merkmal der Grünalgen und der Eukaryonten generell angesehen werden, da nach bisheriger Kenntnis alle plastidenlosen Eukaryonten diese IPP-Biosynthese besitzen (siehe 4.6.5, S. 97) und der DOXP-Weg vermutlich von den prokaryotischen endosymbiotischen Plastidenvorläufern in die Vorläufer der Grünalgen und höheren Pflanzen mitgebracht wurde (siehe 4.6.4, S. 95). Man kann also annehmen, daß die gemeinsamen Grünalgen-ähnlichen Vorfahren aller Grünalgen und höheren Pflanzen eine plastidäre IPP-Biosynthese nach dem DOXP-Weg und eine cytosolische über Acetyl-CoA und Mevalonsäure besaßen. Diese ursprüngliche kompartmentäre Verteilung wurde bis in die Charophyceae und in die Embryophyten beibehalten. In der hiervon deutlich getrennten Linie der Chlorophyta (Chlorophyceae, Ulvophyceae, Trebouxiophyceae, Chaetophorales, Oedogoniales) ging dagegen vermutlich der cytosolische Acetat/Mevalonat-weg verloren oder die Enzyme dieses Weges sind kaum metabolisch aktiv.

Das Fehlen cytosolischer Enzymaktivitäten in den Chlorophyceen und Ulvophyceen gegenüber den Charophyceen und höheren Pflanzen wird auch berichtet für verschiedene Enzyme des Zucker-Phosphat Metabolismus (SCHNARRENBERGER *et al.*, 1990). Für Aldolase und Glucose-6-Phosphat Isomerase wurden in verschiedenen höheren Pflanzen und Charophyceen (*Chara foetida*, *Klebsormidium flaccidum*) zwei Isoformen gefunden – je eine plastidäre und eine cytosolische. Für *Chlamydomonas reinhardtii* und *Dunaliella bioculata* (Chlorophyceae) sowie für *Acetabularia mediterranea* (Ulvophyceae) wurde dagegen jeweils nur eine plastidäre Isoform gefunden (SCHNARRENBERGER *et al.*, 1990). Im Zuge einer allgemeinen Reduktion solcher cytosolischen Stoffwechselaktivitäten, welche doppelt (sowohl im Plastiden, als auch im Cytosol) vorkommen, könnte auch die Reduktion der cytosolischen IPP-Biosynthese (über Mevalonat) in einigen Grünalgen verstanden werden.

Es wäre allerdings auch denkbar, daß in Chlorophyceen wie *Scenedesmus obliquus* oder *Chlamydomonas reinhardtii* die cytosolische IPP-Biosynthese über Mevalonsäure reduziert wurde und später (nach Genduplikation) die Enzyme des DOXP-Weges sowohl im Plastiden, als auch im Cytosol lokalisiert sind. Jedoch konnte im Falle der aus *Chlamydomonas* klonierten 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) kein Hinweis auf Isoenzyme gefunden werden (siehe 3.3.3, S. 50).

- *Zusammenfassung: IPP-Biosynthese in Grünalgen*

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Pyruvat und der 1-Desoxy-D-Xylulose als Vorstufen der Isoprenoide in *Scenedesmus obliquus* belegt werden konnte. Das Enzym, welches aus Pyruvat und GAP 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat bildet, wurde aus *Chlamydomonas reinhardtii* kloniert und die Enzymaktivität durch heterologe Expression gezeigt. Neben *Scenedesmus obliquus* wurden auch unter weiteren Vertretern der Grünalgen nur solche gefunden, welche einen plastidären, Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosyntheseweges über 1-Desoxy-D-Xylulose besitzen. Darüber hinaus bilden die untersuchten Vertreter der Chlorophyta (Chlorophyceae, Ulvophyceae)

offensichtlich sowohl die plastidären, als auch die cytosolischen Isoprenoide über den DOXP-Weg. Vertreter der Charophyceae bilden Phytol über den DOXP-Weg, während die Sterole über den MVA-Weg gebildet werden. Die gemeinsamen Vorfahren der Grünalgen und Landpflanzen besaßen vermutlich sowohl den DOXP-Weg (plastidär) als auch den Acetat/Mevalonat-Weg der IPP-Biosynthese (cytosolisch). Die hieraus hervorgegangene Linie der Chlorophyta (oder zumindest viele Vertreter dieser) hat gegenüber den Streptophyta (Charophyceae und Landpflanzen), möglicherweise im Zuge der allgemeinen Reduktion verschiedener cytosolischer Stoffwechselaktivitäten, den Acetat/Mevalonat-Weg verloren.

Um die hier gefundene Verteilung der IPP-Biosynthesewege unter verschiedenen Klassen der Grünalgen weiter zu untermauern, müssten noch weiterer Vertreter einzelner Grünalgen-Klassen überprüft werden.

4.2 Isoprenoidbiosynthese in höheren Pflanzen

4.2.1 Isoprenoidbiosynthese in grünen Geweben

Mittels Einbau von [1-¹³C]-Glucose in Isoprenoide sollte untersucht werden, ob in höheren Pflanzen die Biosynthese der plastidären Isoprenoide nach dem Acetat/Mevalonat-Weg abläuft, oder ob wie bei den Grünalgen *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca* das Markierungsmuster des alternativen Pyruvat/Triosephosphat Biosyntheseweges nachweisbar ist.

Im Unterschied zu den Grünalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlamydomonas reinhardtii* ist es für Markierungsversuche mit [1-¹³C]-Glucose bei höheren Pflanzen ein prinzipielles Problem, daß diese zur Ergrünung Licht benötigen, also nicht im Dunkeln auf Glucose angezogen werden können. Je mehr Licht man beim Wachstum auf der markierten Glucose gibt, desto mehr tritt die Photosynthese gegenüber dem heterotrophen Wachstum in den Vordergrund. Bei dem zu markierenden Organismus sollte die Synthese der Biomasse im wesentlichen aus einem markierten Substrat und möglichst nicht aus der photosynthetischen CO₂-Fixierung erfolgen. Wenn eine Pflanze mixotroph auf [1-¹³C]-Glucose wächst, könnte über den oxidativen Pentosephosphatzyklus ¹³CO₂ freigesetzt werden. Wenn dieses durch Photosynthese wieder in Triosephosphat überführt wird, kann das spezifische Markierungsmuster aus der [1-¹³C]-Glucose überdeckt werden. Dieser Effekt konnte bei den in dieser Arbeit beschriebenen Markierungsexperimenten mit höheren Pflanzen weitgehend vermieden werden. In den markierten Isoprenoiden waren unmarkierte Positionen zu 1,1 bis 1,7 % mit ¹³C angereichert.

Drei höhere Pflanzen waren auf [1-¹³C]-Glucose photomixotroph angezogen worden: Wasserlinsen (*Lemna gibba*) waren in einem anorganischen Flüssignährmedium unter Zusatz von [1-¹³C]-Glucose (¹³C-Anreicherung 10 %) im Schwachlicht angezogen worden. Aus Gersten-Karyopsen (*Hordeum vulgare*) präparierte sterilbehandelte Embryonen waren auf einem komplexen Nährmedium mit [1-¹³C]-Glucose (15 % Anreicherung) im Schwachlicht angezogen worden. Als weitere höhere Pflanze war eine grüne Kalluskultur aus *Daucus carota* auf einem Festmedium mit [1-¹³C]-Glucose vermehrt worden. Unter den gegebenen Bedingungen wurden von allen drei Pflanzen grüne Gewebe (Blätter, Kallus) entwickelt. Die erwartete endogene Bildung von [3-¹³C]-Triosephosphat und [3-¹³C]-Pyruvat aus [1-¹³C]-Glucose wurde durch die Markierung von Fettsäuren bestätigt.

- *Biosynthese von Isoprenoiden in Chloroplasten*

Für die plastidären Isoprenoide aus *Lemna gibba* (Phytol, β -Carotin, Lutein, Plastochinon-9) sowie für das in *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* untersuchte Phytol wurde aus [$1-^{13}\text{C}$]-Glucose ein einheitliches Markierungsmuster der Isopreneinheiten beobachtet. C-1 und C-5 der Isopreneinheiten wurden markiert, was auf die Biosynthese aus Pyruvat und Triosephosphat hinweist (vgl. 4.0.2, S. 66), wie dies schon für Isoprenoide verschiedener Grünalgen gefunden wurde. Der hohe und spezifischen Einbau von [$1-^2\text{H}_1$]-1-Desoxy-D-Xylulose in das Phytol von *Lemna gibba* (siehe 3.2.3, S. 47) sowie in das Phytol ergründer Gerstenkeimlinge (siehe 3.2.4, S. 48) bestätigt, daß 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) eine IPP-Vorstufe der plastidären Isoprenoid-Biosynthese ist.

- *Biosynthese der cytosolischen Sterole*

Im Gegensatz zu den plastidären Isoprenoiden wurden die Isopreneinheiten der Sterole aller drei Pflanzen aus [$1-^{13}\text{C}$]-Glucose an den Positionen C-2, C-4 und C-5 markiert, was auf die Acetat/Mevalonat-Biosynthese des IPP hinweist (vgl. 4.0.2, S. 66). Der Einbau von DL-[$2-^{13}\text{C}$]-Mevalonsäurelacton in die Sterole von *Lemna gibba* gegenüber einem sehr geringen Einbau in das Phytol (siehe 3.2.3, S. 47) bestätigt, daß die Sterole über den Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden. Jedoch deutet sich auch eine Beteiligung des DOXP-Weges an der Sterol-Biosynthese an. Zur Markierung an den Positionen C-2, C-4 und C-5 der Isopreneinheiten kann zusätzlich eine leicht erhöhte ^{13}C -Anreicherung in der Position C-1 (s. Tabelle 3-3; Sterole von *Lemna gibba*, *Daucus carota*, *Hordeum vulgare*) festgestellt werden. Auch ist die ^{13}C -Anreicherung an C-5 etwas höher als die an C-4 und C-2. Dies kann so interpretiert werden, daß das überwiegende Einbaumuster des Acetat/Mevalonat-Weges (C-2/C-4/C-5) durch ein Markierungsmuster des Pyruvat/Triosephosphat-Weges (C-1/C-5) überlagert wird. Eine ungefähre Abschätzung des Anteils beider Biosynthesewege an der Sterolbiosynthese kann berechnet werden über den Vergleich der ^{13}C -Anreicherung in solchen C-Positionen, welche nur über MVA und solchen, die nur über DOXP markiert werden: Die Differenz der ^{13}C -Anreicherung zwischen C-1 und C-3 der Isopreneinheiten entspricht dem Anteil an IPP, welches aus dem DOXP-Weg kommt. Die Differenz der ^{13}C -Anreicherung zwischen C-2 und C-3 (oder C-4 und C-3) der Isopren-Einheiten entspricht dem Anteil an IPP aus dem Acetat/Mevalonat-Weg. Wendet man dieses Berechnungs-Schema auf die Sterole von *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* an, so ergibt sich, daß in *Lemna gibba* etwa 30 %, in *Daucus carota* etwa 20 % und in *Hordeum vulgare* etwa 15 % der Isopren-Einheiten aus dem DOXP-Weg gebildet wurden, während 70, 80 bzw. 85 % aus dem Acetat/Mevalonat-Weg stammen (Tabelle 4-2). Eine solche Mischmarkierung deutet sich auch aus dem Einbau von [$1-^2\text{H}_1$]-1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol und die Sterole von *Lemna gibba* an. Der Einbau in die Sterole betrug, je nach Konzentration der Vorstufe im Medium, zwischen 30 und 50 % des Einbaues in Phytol (siehe 3.2.3, S. 47).

Eine weitere mögliche Interpretation der erhöhten ^{13}C -Anreicherung in C-1 der Isopreneinheiten wäre eine Metabolisierung von [2, 4, 5- ^{13}C]-DMAPP über den sogenannten „Mevalonate shunt“, dessen Existenz in höheren Pflanzen gezeigt wurde (NES und BACH, 1985): [2, 4, 5- ^{13}C]-DMAPP würde dephosphoryliert und zum Methylcrotonyl-CoA überführt. Dieses geht in den Leucin-Katabolismus ein, wobei unter Einbau von CO_2 HMG-CoA entsteht (NES und BACH, 1985). Durch HMG-CoA-Lyase entsteht Acetoacetat, aus welchem über Acetoacetyl-CoA und HMG-CoA IPP entsteht (NES und BACH, 1985). C-1 des IPP leitet sich nun aus dem im Leucin-Katabolismus eingebauten CO_2 her. Ist das eingebaute CO_2 also mit ^{13}C angereichert (durch Abbau von [$1-^{13}\text{C}$]-Glucose im oxidativen Pentosephosphat-Zyklus), trägt IPP in C-1 eine ^{13}C -Anreicherung. Jedoch ist mit diesem Modell die erhöhte Anreicherung von C-5 (IPP) gegenüber C-2 und C-4 (IPP) nicht erklärbar.

Tabelle 4-2 Anteil des DOXP-Weges und des Acetat-Mevalonat-Weges an der Bildung von Sterolen in *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare*. Die zugrundeliegenden ^{13}C -Anreicherungen sind aus Tabelle 3-3 und den Tabellen im Anhang A entnommen. Nach Verfütterung von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose wird C-3 der Isopreneinheiten aus keiner der beiden IPP-Biosynthesen markiert. C-1 wird nur aus dem DOXP-Weg, C-2 und C-4 werden nur aus dem Acetat/Mevalonat-Weg markiert (über MVA), während C-5 aus beiden IPP-Biosynthesen markiert wird.

<i>Lemna gibba</i> (Sitosterol, Stigmasterol)					
C-Atom der Isopreneinheit: markiert aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose über:	C-3 -	C-1 DOXP	C-2 MVA	C-4 MVA	C-5 DOXP/ MVA
Mittlere ^{13}C -Anreicherung (%) (kleinster/größter Wert)	1,45 (1,3/1,7)	2,0 (1,8/2,3)	2,6 (2,3/2,7)	2,75 (2,5/2,9)	2,9 (2,6/3,2)
Differenz zu C-3	0	$\Delta = 0,55$	$\Delta = 1,15$	$\Delta = 1,3$	$\Delta = 1,45$
% von $\Delta\text{C-1} + \Delta\text{C-2}$	-	32 %	68 %	76 %	85 %
<i>Daucus carota</i> (Sitosterol)					
Mittlere ^{13}C -Anreicherung (%) (kleinster/größter Wert)	1,7 (1,5/2,2)	2,5 (2,1/2,9)	5,1 (4,1/6,2)	4,9 (4,7/5,2)	5,5 (4,6/6,4)
Differenz zu C-3	0	$\Delta = 0,8$	$\Delta = 3,3$	$\Delta = 3,2$	$\Delta = 3,8$
% von $\Delta\text{C-1} + \Delta\text{C-2}$	-	19 %	81 %	78 %	93 %
<i>Hordeum vulgare</i> (Sitosterol)					
Mittlere ^{13}C -Anreicherung (%) (kleinster/größter Wert)	1,3 (1,2/1,5)	1,7 (1,4/1,9)	3,8 (3,4/5,1)	3,9 (3,8/4,2)	4,2 (3,7/4,5)
Differenz zu C-3	0	$\Delta = 0,4$	$\Delta = 2,5$	$\Delta = 2,6$	$\Delta = 2,9$
% von $\Delta\text{C-1} + \Delta\text{C-2}$	-	14 %	86 %	90 %	100 %

Daß der Einbau aus $[1-^2\text{H}_1]$ -DOX in *Lemna* in die Sterole bis zu 50 % des Einbaues in das Phytol ausmachte, spricht auch für die Interpretation der ^{13}C -Markierungsmuster der Sterole als Mischmarkierung von Isopreneinheiten aus beiden IPP-Biosynthesewegen. In den Markierungsexperimenten mit $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose dürfte die gegebene Glucose kaum das Verhältnis des Anteiles des DOXP-Weges und des Acetat/Mevalonat-Weges an der Sterol-Bildung beeinflussen, wie vielleicht zu erwarten bei der Gabe markierter Vorstufen wie DOX oder MVA. Man kann also festhalten, daß die Sterole von *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* überwiegend aus dem Acetat-Mevalonat-Weg, wahrscheinlich aber bis zu etwa 30 % auch aus dem DOXP-Weg gebildet werden. Man kann hier einen Export von IPP aus dem Plastiden in das Cytosol vermuten.

Umgekehrt zur Beteiligung des DOXP-Weges an der Sterol-Biosynthese kann aus den Daten des Einbaues von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose in *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* eine Beteiligung des Acetat/Mevalonat-Weges an der Biosynthese der plastidären Isoprenoide nicht hergeleitet werden. Aus dem Rechenschema in Tabelle 4-2 kann man abschätzen, daß eine Beteiligung des Acetat/Mevalonat-Weges an der plastidären IPP-Biosynthese größer 10 % in den Markierungsmustern signifikant sichtbar sein müßte. Ein solcher möglicher Anteil war in den in Tabelle 3-3 gezeigten Meßwerten nicht sichtbar.

4.2.2 Lycopinbiosynthese in reifenden Tomatenfrüchten

Tomatenfrüchte waren nach dem Ende des Größenwachstums und zu Beginn der Lycopinbildung geerntet worden und es war $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose in die Fruchtkammern injiziert worden. Bei der Lycopin-Bildung und -Akkumulation wird das Chlorophyll der

Chloroplasten abgebaut. Es werden in den Plastiden große Mengen von Carotinoiden (hauptsächlich Lycopin) akkumuliert, was die Umwandlung in Chromoplasten kennzeichnet (BEN-SHAUL und NAFTALI, 1969; LAVAL-MARTIN, 1975; BATHGATE *et al.*, 1985).

Das nach Injektion von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose in reife Tomatenfrüchte neu gebildete Lycopin zeigte dasselbe Markierungsmuster der Isopreneinheiten, wie es vorher schon für Carotinoide, Phytol-Seitenketten der Chlorophylle und für die Prenylseitenkette des Plastochinon-9 in *Lemna gibba* und für *Hordeum vulgare* und *Daucus carota* sowie in verschiedenen Grünalgen gefunden worden war. In den plastidären Isoprenoiden wie auch im Lycopin der Tomate waren aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose die Positionen C-1 und C-5 der Isopreneinheiten markiert worden, was darauf hinweist, daß das Lycopin in reifenden Tomatenfrüchten nach dem Pyruvat/Triosephosphat Biosyntheschema gebildet wird (siehe 4.0.2, S. 66). Der Einbau von $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose in Lycopin zeigte zusätzlich, daß C-1, C-2 und C-4 der Isopreneinheiten biosynthetisch aus einer C_3 -Einheit hervorgehen, wie es nach dem Pyruvat/GAP-Biosyntheschema - der Addition von Pyruvat an GAP mit anschließender Umlagerung des C-Gerüsts - gefordert wird (siehe 1.5, S. 6, 4.1.1, S. 68).

Nachdem die mutmaßliche IPP-Vorstufe DOX von allen untersuchten Grünalgen und von höheren Pflanzen in Isoprenoide eingebaut wird (siehe 4.1.3, S. 72, 4.2.1, S. 75), wäre ein Einbau von 1-Desoxy-D-Xylulose in Lycopin reifender Tomaten zu erwarten gewesen. In einem solchen Experiment mit $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose war aber keine Markierung im Lycopin meßbar. Möglicherweise kann im Tomatengewebe 1-Desoxy-D-Xylulose nicht in das Phosphat überführt werden. Angesichts des Nachweises des „C-2 + C-3“-Biosynthesemechanismus mittels Einbau von $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose bestehen jedoch kaum Zweifel, daß der Biosynthesemechanismus des IPP in reifenden Chromoplasten identisch ist mit dem anderer höherer Pflanzen, d. h. daß Lycopin über 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat gebildet wird. Dafür spricht auch, daß Fosmidomycin, ein Inhibitor der Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosynthese (siehe 4.4, S. 84), die Lycopinbildung in reifenden Tomaten stark hemmt (ZEIDLER *et al.*, 1998).

In Ergänzung zu den Untersuchungen über die Isoprenoidbiosynthese in Chloroplasten konnte hier gezeigt werden, daß auch bei der Bildung eines Sekundäracarotinoids, bzw. bei der Umwandlung vom Chloroplasten zum Chromoplasten in einer höheren Pflanze der DOXP-Weg aktiv ist.

- *Kompartimentierung der IPP-Biosynthese in höheren Pflanzen*

Mit *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* (monokotyle Pflanzen) und mit *Daucus carota* (dikotyle Pflanze) wurden drei nicht eng verwandte Vertreter der höheren Pflanzen untersucht und jeweils dieselbe kompartimentäre Verteilung zweier verschiedener IPP-Biosynthesen gefunden (Abbildung 4-5): Im Plastiden gebildete Isoprenoide (Phytol-Seitenkette der Chlorophylle, Plastochinon-9, β -Carotin, Lutein, sowie das Sekundäracarotinoid Lycopin) werden über den DOXP-Weg gebildet, während im Cytosol gebildete Sterole überwiegend über den Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden. Sogar die den höheren Pflanzen nahestehenden Charophyceae besitzen offenbar beide IPP-Biosynthesen in der beschriebenen Kompartimentierung (siehe 4.1.3, S. 72). Inzwischen ist in einer Reihe weiterer höherer Pflanzen für Isoprenoide, deren Bildungsort der Plastid ist (verschiedene Monoterpene, Diterpene, Carotinoide), die Biosynthese nach dem alternativen DOXP-Weg belegt, während Sesquiterpene und Sterole nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden (siehe 4.6.2, S. 90). Auch lassen sich viele Befunde aus der älteren Literatur über die Biosynthese plastidärer Isoprenoide mit einer plastidären, Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosynthese am besten erklären. So hat z. B. Mevinolin, ein Hemmstoff der HMG-CoA Reduktase, nur Einfluß auf die Biosynthese der Sterole, kaum aber auf die von β -Carotin oder der

Chlorophylle (siehe 4.6.1, S. 87). Dagegen hemmt Fosmidomycin, ein Hemmstoff der DOXP Reduktoisomerase in *E. coli* (KUZUYAMA *et al.*, 1998b) und in *A. thaliana* (siehe 4.4, S. 84), die Biosynthese plastidärer Isoprenoide wie Isopren, Chlorophylle und Carotinoide (ZEIDLER *et al.*, 1998; vgl. Abbildung 4-5). Man kann aufgrund der vielen hier dargelegten Belege verallgemeinern, daß im Plastiden-Kompartiment der höheren Pflanze die Vielfalt der Monoterpene, der Diterpene, die tetraterpenen Carotinoide, sowie die Seitenkette des Plastochinon-9 nach dem DOXP-Weg über 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat gebildet werden (Abbildung 4-5). Somit müssen auch die Enzyme des DOXP-Weges im Plastiden lokalisiert sein.

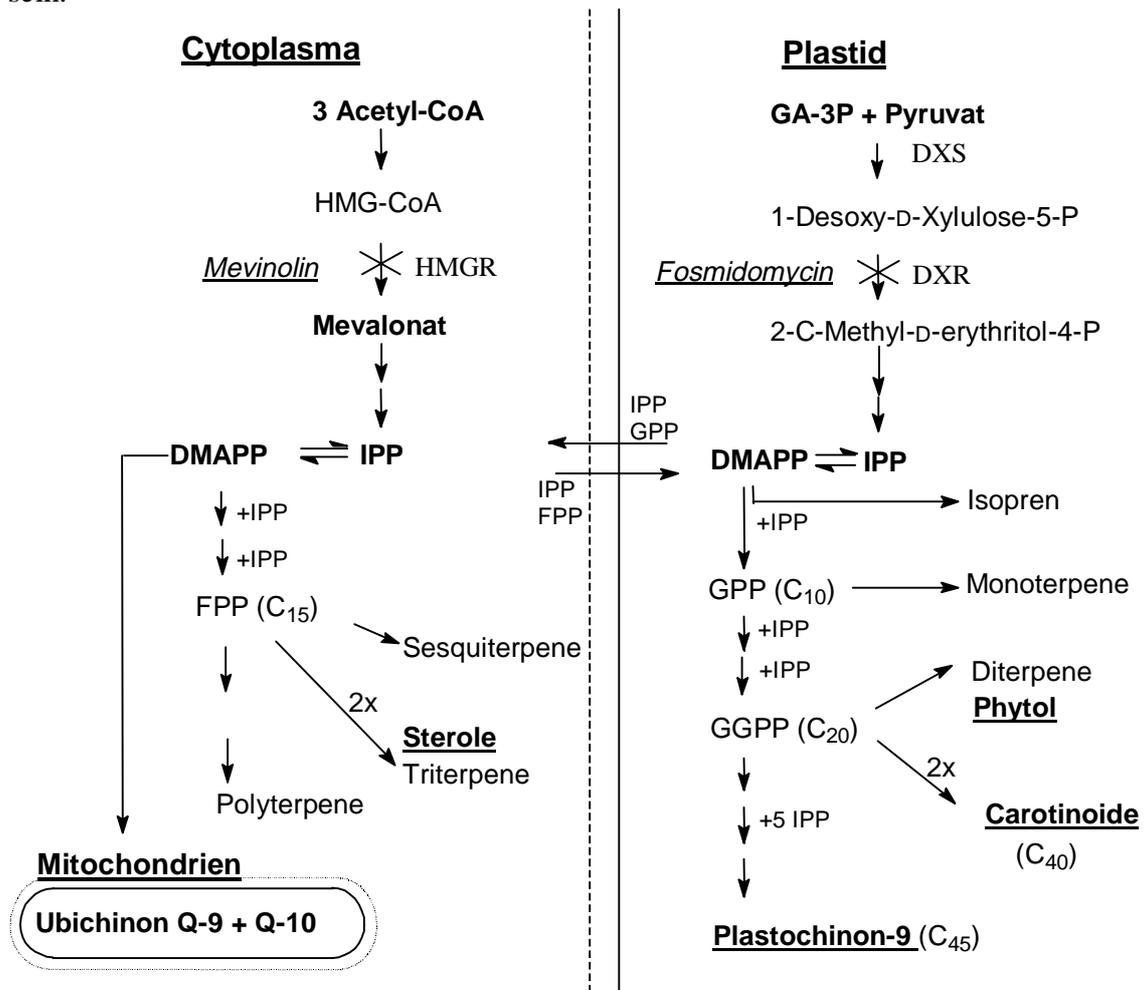


Abbildung 4-5 Kompartimentierung der IPP-Biosynthese höherer Pflanzen, wie sie aus den Markierungsversuchen mit *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota* hergeleitet werden kann. Die plastidären Isoprenoide Phytol (Seitenkette der Chlorophylle), β -Carotin, Lutein und die Seitenkette des Plastochinon-9 werden nach dem Pyruvat/GAP-Biosyntheschema über 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat gebildet. Dieser DOXP-Biosyntheseweg ist offensichtlich im Plastiden lokalisiert. Die im cytosolischen Kompartiment gebildeten Sterole werden aus Acetyl-CoA über Mevalonsäure gebildet. Ein geringer Austausch von Prenyl-Pyrophosphaten (oder Derivate derselben) zwischen Plastid und Cytosol ist angedeutet (siehe 4.6.2, S. 90). Im mitochondrialen Kompartiment ist die Isoprenoid-Biosynthese von der cytosolischen IPP-Biosynthese abhängig (siehe 4.6.3, S. 94). HMGR = HMG-CoA Reduktase, DXS = 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase, DXR = 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase. HMGR ist durch Mevinolin hemmbar, DXR ist durch Fosmidomycin hemmbar.

Als Beweis für die Lokalisation der IPP-Biosynthese über DOXP im Plastiden kann gewertet werden, daß für Chromoplastenpräparationen aus der Paprika-Frucht und Narzissen-Blüten der Einbau von ^{14}C -markiertem DOXP und 2-C-Methyl-d-erythritol-4-Phosphat in β -Carotin gezeigt wurde (FELLMEIER *et al.*, 1999). Außerdem wurde für die DOXP-Synthase (DXS) aus *Arabidopsis thaliana* (MANDEL *et al.*, 1996), aus *Mentha x piperita* (LANGE *et al.*, 1998) und aus *Capsicum annuum* (BOUVIER *et al.*, 1998) jeweils in der Proteinsequenz eine N-terminale Region gefunden, welche wahrscheinlich ein Plastiden-Transitpeptid darstellt. Entsprechend wurde mittels Immunoblot-Analysen in *Capsicum annuum* die DXS in Chloroplasten und Chromoplasten lokalisiert (BOUVIER *et al.*, 1998). Man kann also annehmen, daß die DXS, das Eingangsenzym des DOXP-Weges, in höheren Pflanzen allgemein im Plastiden lokalisiert ist. Für das zweite Enzym der alternativen IPP-Biosynthese, die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (DXR), welche DOXP zu 2-C-Methyl-d-Erythritol-4-Phosphat umsetzt, ist ebenfalls die Lokalisation im Plastiden zu vermuten. Die DXR aus *Mentha x piperita* besitzt ebenfalls eine N-terminale Region mit Charakteristika für ein Plastidentransitpeptid (LANGE und CROTEAU, 1999) und ist offenbar ebenfalls im Plastiden lokalisiert. Die in der vorliegenden Arbeit klonierte cDNA aus *A. thaliana*, welche für DXR codiert, ist am 5'-Ende nicht vollständig. Deshalb kann hier noch keine Aussage über ein N-terminales Transitpeptid getroffen werden.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß in Charophyceen, Moosen und höheren Pflanzen die IPP-Biosynthese im Plastiden-Kompartiment über DOXP und im Cytosol über MVA verläuft. Dies ist sicherlich eine Verallgemeinerung und die strenge kompartmentäre Trennung beider IPP-Biosynthesen trifft vielleicht nicht immer zu. Zu dem diskutierten einfachen Kompartimentierungsschema wäre auch eine Subkompartimentierung der zwei verschiedenen IPP-Biosynthesen im Rahmen von Multienzymkomplexen denkbar. So könnte der DOXP-Weg auch im Cytosol vorkommen und dort (über Substratkanalisierung) für die Biosynthese ganz bestimmter (weniger) Isoprenoide zuständig sein, nicht aber etwa für die Sterolbiosynthese. Das doppelte Vorkommen eines IPP-Biosyntheseweges im Plastiden und im cytosolischen Kompartiment kann allerdings für *Arabidopsis thaliana* ausgeschlossen werden. Da für die Gene der DXS und der DXR in *A. thaliana* jeweils nur ein Genlokus gefunden wurde (MANDEL *et al.*, 1996; Abschnitt 4.4, S. 84), gibt es wahrscheinlich keine cytosolischen Isoformen dieser Enzyme. Andererseits sind alle drei HMGR-Isoformen in *A. thaliana* cytosolische Isoformen (ENJUTO *et al.*, 1994; LUMBRERAS *et al.*, 1995) und es wird berichtet, daß es für Mevalonat-Kinase in *A. thaliana* nur ein Gen gibt (siehe BACH und BENVENISTE, 1997). Dies spricht gegen das Vorkommen des Mevalonat-Weges im Plastiden.

4.3 Klonierung und heterologe Expression der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-synthase (DXS) aus *Chlamydomonas reinhardtii*

- *Eine Transketolase als Eingangsenzym des Triosephosphat/Pyruvat-Weges*

Der vorgeschlagene Mechanismus für die Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat aus Pyruvat und GAP (siehe 4.1.1, S. 68) wurde in Anlehnung an den von Transketolasen katalysierten C_2 -Transfer von Ketosen (Xylulose-5-P, Fructose-6-P, Sedoheptulose-7-P) auf Aldosen (GAP, Erythrose-4-P, Ribose-5-P) entwickelt. Im ersten Schritt wird das Donor-Substrat (Ketose) gespalten und es entsteht Dihydroxyethyl-Thiamin-Pyrophosphat sowie eine Aldose, welche freigesetzt wird. Bei Transketolasen aus *E. coli* und aus Hefe kann nachweislich auch Hydroxypyruvat als Donor-Substrat Verwendung finden (HUMPHREY *et al.*, 1995; HEINRICH *et al.*, 1971). Im zweiten Schritt wird die Thiamin-gebundene C_2 -Einheit an das Akzeptor-Substrat (Aldose) addiert und es wird eine Ketose frei. Ein Transketolase-

ähnliches Enzym, welches – in Analogie zum Hydroxypyruvat als Substrat - Pyruvat Thiamin-katalysiert decarboxyliert und an GAP addiert, würde die Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat katalysieren (Abbildung 4-8). Ein solches Enzym kommt also als Eingangsenzym des alternativen IPP-Weges in Betracht.

In der Arbeitsgruppe Boronat (Universität Barcelona) wurde aus *E. coli* ein Gen kloniert, welches mit dem Gen der FPP-Synthase, einem Enzym der Isoprenoid-Biosynthese, in einem Operon vereint ist, und dessen Peptidsequenz eine hohe Homologie zu Transketolasen aufweist (Persönliche Mitteilung A. Boronat, 1996). Zu diesem Gen anfangs unbekannter Funktion aus *E. coli* (SwissProt: P77488) gibt es eine Reihe homologer Proteinsequenzen in verschiedenen Bakterien. Vertreter aus dieser Familie Transketolase-ähnlicher Sequenzen finden sich unter anderem in den Genomen von *Bacillus subtilis* (SwissProt: P54523), *Rhodobacter capsulatus* (SwissProt: P26242) und *Synechocystis sp.* (SwissProt: P73067). Alle diese Proteinsequenzen sind etwa 650 Aminosäuren lang. Bereiche hoher Homologie zueinander finden sich über die gesamte Länge der Proteine verteilt, wie etwa ein für Thiamin-bindende Proteine charakteristisches Sequenzmotiv (HAWKINS *et al.*, 1989). Ein pflanzliches Gen, welches seiner Proteinsequenz nach dieser Familie zuzurechnen ist (CLA1, span. „cloroplastos alterados“, „veränderte Chloroplasten“) wurde von einer mexikanischen Arbeitsgruppe aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und zunächst als Transketolase erkannt (MANDEL *et al.*, 1996). CLA1-defiziente Mutanten zeigen einen albino-Phänotyp. Heterozygote Mutanten sind stark reduziert im Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt der Blätter. Bei homozygoten Mutanten sinkt der Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt fast auf null. Die Plastiden sind hier in einem frühen Entwicklungsstadium arretiert (MANDEL *et al.*, 1996). Beide mutante Phänotypen könnten mit einer Funktion des CLA1-Genes in der Chlorophyll- und Carotinoidbiosynthese zusammenhängen. Das kerncodierte Gen CLA1 wird lichtabhängig exprimiert und das Protein wird wahrscheinlich in die Plastiden importiert (N-terminale Transitsequenz) (MANDEL *et al.*, 1996). Alle diese Eigenschaften sprechen für die Funktion des Genes CLA1 als plastidäre 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS), welche dort für die Biosynthese der plastidären Isoprenoide verantwortlich ist. Aus den genannten Eigenschaften von Transketolase-ähnlichen Enzymen aus *E. coli* und aus *Arabidopsis thaliana* erschien es interessant, nach einer zu CLA1 homologen Sequenz in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zu suchen.

- 1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Aus Aminosäuren, welche in den Transketolase-homologen Sequenzen aus Bakterien und in CLA1 hoch konserviert sind, wurden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet. Mit diesen Oligonukleotiden wurden aus DNA und cDNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* Fragmente amplifiziert und kloniert, welche Homologie zu den Ausgangssequenzen aufwiesen (BORININ, 1997; vom Autor betreute Diplomarbeit). Mittels dieser Sequenzinformation konnte ein kompletter, 3,2 Kbp langer cDNA-Klon aus einer *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA-Bibliothek isoliert werden (siehe 3.3, S. 49). Durch heterologe Expression eines Teiles der Protein-codierenden Sequenz in *E. coli* konnte gezeigt werden, daß die klonierte cDNA für ein Protein codiert, welches Pyruvat und DL-GAP in 1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat umsetzt. Der Expressionsklon pDXSev1 codiert für ein etwa 74 KDa großes Protein. Das dephosphorylierte Produkt der Enzymreaktion wurde mittels GC/MS identifiziert (siehe 3.4.2, S. 62). Es handelt sich bei dem Enzym also offensichtlich um 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS), das Eingangsenzym der IPP-Biosynthese in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die *Chlamydomonas reinhardtii* DXS hat 51 % identische Aminosäuren mit der DXS aus *E. coli* (SwissProt: P77488; LOIS *et al.*, 1998). Es besteht außerdem eine hohe Homologie zu pflanzlichen DXS-Proteinsequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (SwissProt: Q38854; 71 % identische Aminosäuren) *Mentha x piperita* (SPTREMBL O64904; 65%

identische Aminosäuren), *Capsicum annuum* (SPTREMBL: O78327; 72 % identische Aminosäuren), *Oryza sativa* (SwissProt: O22567; 72 % identische Aminosäuren) und *Lycopersicon esculentum* (EMBLNEW: af143812; 73 % identische Aminosäuren). Für die DXS-Gensequenzen aus *Mentha x piperita* und *Capsicum annuum* wurde die Funktionalität durch heterologe Expression bewiesen (LANGE *et al.*, 1998; BOUVIER *et al.*, 1998).

In allen DXS-Sequenzen und anderen Thiamin bindenden Enzymen findet sich ein konserviertes Sequenzmotiv einer Bindestelle für Thiamin-Pyrophosphat (GDG(X)₇₋₈E(X)₃₋₄A(X)₁₁₋₁₃NN; HAWKINS *et al.*, 1989), welches in der *Chlamydomonas* DXS von den Aminosäuren 222-252 codiert wird (Abbildung 4-6). Ein Vergleich der DXS-Enzyme mit verschiedenen Transketolasen aus Spinat, Kartoffel, Hefe und *E. coli* liefert verschiedene gemeinsame invariante Aminosäurereste (Abbildung 4-6, schwarz hinterlegt). Die Transketolase aus Hefe wurde mit Röntgenstrukturanalyse untersucht (NIKKOLA *et al.*, 1994; NILSSON *et al.*, 1997) und es gibt mehrere Aminosäure-Reste, welche auch in der DXS erhalten sind und für welche genaue Funktionen beschrieben wurden (Abbildung 4-6, Kennzeichnung '*'). So sind in der Hefe-Transketolase die Reste D157 (D223 in DXS *Chlamydomonas*) und N187 (N252 in DXS *Chlamydomonas*) an der Bindung des Thiamin beteiligt (NIKKOLA *et al.*, 1994). H 30 (H120), D477 (D512) und R528 (R563) sind an der Bindung des Substrates beteiligt (NILSSON *et al.*, 1997). Die Aminosäure E418 der Hefe-Transketolase ist ebenfalls in der DXS aus *Chlamydomonas* konserviert (E455), bewirkt die Deprotonierung an C-2 des Thiazolium-Ringes des Thiamin-Pyrophosphat, und ist essentiell für dessen katalytische Aktivität (NILSSON *et al.*, 1997). Ein gezielter Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin in der DXS aus *Capsicum annuum* bewirkt ebenso wie in den Transketolasen einen vollständigen Verlust der Enzymaktivität (BOUVIER *et al.*, 1998).

- *N-terminales Transitpeptid*

Das *Chlamydomonas reinhardtii* DXS-Gen enthält vermutlich ein N-terminales Transitpeptid, da eine Homologie mit bakteriellen und pflanzlichen DXS-Homologen erst etwa ab Aminosäure 80 beginnt (siehe Abbildung 4-6 und 3.3.3, S. 50). Vorstellbar wäre, daß das Protein in den Plastiden transportiert wird. Für pflanzliche Transitpeptide, welche den Import von Proteinen in das plastidäre oder das mitochondrielle Kompartiment steuern, kann man keine hoch konservierten Sequenzmotive definieren (VON HEIJNE *et al.*, 1989). Es gibt jedoch für verschiedene Transitpeptide (Chloroplast, Mitochondrium) jeweils ein gehäuftes Vorkommen bestimmter Aminosäuren (VON HEIJNE *et al.*, 1989). Für Chloroplasten-Transitpeptide aus *Chlamydomonas reinhardtii* kommen folgende Aminosäuren am häufigsten vor (Mittelwerte aus 12 Transitsequenzen): Alanin (29 %), Arginin (14 %), Valin (12 %), Serin (10 %) (FRANZEN *et al.*, 1990). Saure Aminosäure-Reste kommen sehr selten vor (FRANZEN *et al.*, 1990). Das mutmaßliche Transitpeptid der *Chlamydomonas*-DXS ist ähnlich zusammengesetzt: Am häufigsten sind Alanin (20 %), Arginin (13 %), Valin (12 %) und Serin (8 %) (Mittel der Aminosäuren 1-79; vgl. Abbildung 4-6). Diese Werte weichen deutlich ab vom Gehalt des Gesamtproteines der genannten Aminosäuren. Somit ist es wahrscheinlich, daß das DXS-Enzym in *Chlamydomonas reinhardtii* in den Plastiden importiert wird.

Da in *Chlamydomonas reinhardtii* sowohl die plastidären Isoprenoide, als auch die cytosolischen Sterole nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Weg gebildet werden, war zu vermuten, daß im cytosolischen Kompartiment ein evolutiv „verloren“ gegangener Acetat/MVA-Weg durch Enzyme des Pyruvat/Triosephosphat-Weges ersetzt wurde. Es sollte also eine cytosolische Isoform der plastidären *Chlamydomonas*-DXS existieren.

```

1  MLRGAVSHGPAVADRAAAGPARCAAPVARGVRSAAPTRQRRAEASVNAPR
51  AGPAGSYSGEWDKLSVEEIDWRDVGPKTPLLDTVNYPVHLKKNFNNEQLK
101  QLCKELRSDIVHTVSRITGCHLSSSLGVVELTVAMHYVFNTPEDKIILWDVGR
      ** * *
151  HQAYGHKILITGRRKGMATIRQTNGLSGFTKRDESEYDFPGAGHSSTSISA
      * * *
201  ALGMAVGRDVKGKKNSVIAVIGDGAITGCMAYEAMNHAGFLDKNMIVILN
      * *
251  DNQQVSLPTQYNNKNQDPVGLSSALARLQANRPLRELREIAKGVTKQLP
      *
301  DVVQKATAKIDEYARGMISGTGSTLFEELGLYYIGPVDGHNLDDLIAVLS
351  EVRSAETVGPVLVHVVTEKRGYLP AETAQDKMHGVVKFDPRTGKQVQAK
401  TKAMSYTNYFADALTAEAERDSRIVAVHAAMAGGTGLYRFEKKFPDRITFD
451  VGIAEQHAVTFAAGLACEGLVPFCTIYSTFMQRGYDQIVHDVSLQKLPVR
      * *
501  FAMDRAGLVGADGSTHCGAFDVTFMASLPHMITMAPSNEAELINMVATCA
      * ** *
551  AIDDAPS CFRFP RGNGLGLDLAAYGISKDLKGVPLEVVGKGVVRRQKGDVC
      *
601  LVAYGSSVNEALAAADMLERDGVSTTVIDARFCKPLDTKLIIRSAAKEHPV
651  MITIEEGSVGFAAHVMQFLALEGLLDGGLKFRPMTLPDRYIDHGDYRDQ
701  LAMAGLTSQHIASTALTTLGRAKDAAKFSLSALQA*

```

Abbildung 4-6 Aminosäuresequenz der in der vorliegenden Arbeit klonierten cDNA, codierend für DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii*. **Unterstrichen:** Vermutliche Transitpeptid-Sequenz. **Grau/Schwarz hinterlegt:** Aminosäure-Reste welche identisch sind in folgenden pflanzlichen DXS-Sequenzen: *Arabidopsis thaliana* (SwissProt: Q38854), *Catharanthus roseus* (SPTREMBL: Q82676), *Mentha x piperita* (SPTREMBL: O64904), *Oryza sativa* (SwissProt: O22567) und *Capsicum annum* (SPTREMBL: O78327). **Schwarz hinterlegt:** Aminosäure-Reste, welche ebenfalls in den folgenden Transketolasen konserviert sind: *Spinacea oleracea* (SPTREMBL: O20250), *Solanum tuberosum* (SwissProt: q43848), *Saccharomyces cerevisiae* (SwissProt: p33315), *E. coli* (SwissProt: p27302). ***:** An der Bindung von Thiamin oder Substraten oder an der Katalyse beteiligte Aminosäurereste in der Transketolase aus Hefe (NIKKOLA *et al.*, 1994; NILSSON *et al.*, 1997). Die dieser Abbildung zugrundeliegenden Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm MALIGN durchgeführt (Programmpaket HUSAR, Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg).

Den Southern-Blot-Analysen nach zu urteilen existiert eine solche Isoform allerdings nicht (siehe 3.3.3, S. 50). Möglicherweise gibt es also nur eine plastidäre IPP-Biosynthese, welche andere Kompartimente mit versorgt. Das in Kapitel 4.1.3 (S. 72) diskutierte (im Vergleich zu höheren Pflanzen) fehlende Vorkommen von cytosolischen Isoenzymen des Zuckerphosphat-Stoffwechsels in *Chlamydomonas reinhardtii* kann auch als Hinweis dafür gewertet werden, daß es nur zu einer Eliminierung der cytosolischen IPP-Biosynthese über MVA kam, nicht aber zu einer Ersetzung durch den DOXP-Weg.

4.4 Klonierung und heterologe Expression der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) aus *Arabidopsis thaliana*

2-C-Methylerythritol-4-Phosphat wurde als das zweite Intermediat in der IPP-Biosynthese in *E. coli* beschrieben (DUVOLD *et al.*, 1997b, siehe Abbildung 4-8). Man kann davon ausgehen, daß auch in Pflanzen dieses Intermediat gebildet wird: An Chromoplastenpräparationen aus Paprika und Narzissenblüten konnte der Einbau von ^{14}C -markiertem 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat in β -Carotin gezeigt werden (FELLMEIER *et al.*, 1999).

Von der Arbeitsgruppe Seto (Tokyo, Japan) wurde die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) aus *E. coli* kloniert (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Das Enzym katalysiert die Umlagerung und Reduktion von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat (Abbildung 4-8). Das Enzym benötigt NADPH und Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Cofaktoren (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Es wird gehemmt durch Fosmidomycin (KUZUYAMA *et al.*, 1998b). Die Publikation der DXR aus *E. coli* (TAKAHASHI *et al.*, 1998) war Anlass, nach einem hierzu homologen Gen in einer Pflanze zu suchen.

Eine Datenbanksuche mit der Nukleotidsequenz der DXR aus *E. coli* (GenBank Nr. AB013300) lieferte 8 homologe Sequenzen aus anderen Bakteriengenomen, welche alle für Proteine der Größe 380–400 Aminosäuren codieren. Zu dieser Familie DXR-homologer Sequenzen konnte in einem bisher nicht näher charakterisierten genomischen DNA-Abschnitt aus *Arabidopsis thaliana* eine passende Nukleotidsequenz gefunden werden (GenBank Nr. AB009053), was vermuten ließ, daß an dieser Stelle im *Arabidopsis*-Genom das zur *E. coli* DXR homologe Gen codiert wird. Das 3'-Ende des Transkriptes dieses Genes konnte in einer cDNA-Sequenz aus *A. thaliana* gefunden werden (GenBank Nr. AA586087). Die gegebenen Sequenzinformationen führten zur Klonierung eines Teils des Transkriptes (cDNA). Nach heterologer Expression dieser Protein-codierenden Sequenz in *E. coli* konnte gezeigt werden, daß das etwa 44,5 KDa große Protein in Abhängigkeit von NADPH 1-Desoxyxylulose-5-Phosphat zu 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat umsetzt (siehe 3.4.2, S. 62). Das rekombinante Enzym ist wie die DXR aus *E. coli* durch Fosmidomycin in mikromolarer Konzentration stark hemmbar (siehe 3.4.2, S. 62; KUZUYAMA *et al.*, 1998b). Fosmidomycin hemmt auch die Biosynthese plastidärer Isoprenoide in höheren Pflanzen (ZEIDLER *et al.*, 1998), was ein deutlicher Hinweis darauf ist, daß die hier aus *A. thaliana* klonierte DXR an der Biosynthese plastidärer Isoprenoide beteiligt ist.

Die DXR katalysiert, ähnlich wie die Ketosäure-Reduktoisomerase (EC 1.1.1.86), eine C-C-Umlagerung des Substrates mit anschließender Reduktion. Ein Vergleich von Proteinsequenzen der DXR mit verschiedenen Sequenzen der Ketosäure-Reduktoisomerase erbrachte allerdings kaum Homologien. Nur das N-terminale konservierte Sequenzmotiv „(V/L)GSTGSIG“ der DXR (Abbildung 4-7) ähnelt einer in zahlreichen Enzymen zu findenden Konsensus-Sequenz für Dinucleotid-Bindestellen (GxGxxG/A; WIERENGA *et al.*, 1985), welche auch in verschiedenen Sequenzen der Ketosäure-Reduktoisomerase enthalten

ist (NADP-Bindestelle; RANE und CALVO, 1997). Da die DXR als Coenzym NADPH benötigt, könnte das Sequenzmotiv „(V/L)GSTGSIG“ also ein Hinweis auf eine NADPH-Bindestelle sein. Größere Übereinstimmung besteht aber mit dem Konsensus „(V/L)GATGXVG“⁷, welcher sich in 10 verschiedenen Proteinsequenzen für die Aspartat-Semialdehyd Dehydrogenase findet (ASA-DH, EC 1.2.1.11). Tatsächlich wurde für die ASA-DH aus *E. coli* mittels Mutagenese einiger Aminosäuren aus diesem Konsensus-Bereich gezeigt, daß dieser eine NADPH-Bindestelle kennzeichnet (OUYANG und VIOLA, 1995). Für DXR und ASA-DH kann man nun das gemeinsame Sequenzmotiv „(VL)G(A/S)TGXVG“ als vermutlichen Konsensus für NADP-Bindestellen formulieren, welcher von dem weitverbreiteten Konsensus „GxGxxG“ abweicht. Sequenzvergleiche zwischen ASA-DH und DXR-Proteinsequenzen zeigten sogar eine weitergehende Homologie zwischen beiden Enzymen an. Worauf diese Homologie begründet ist, ist nicht bekannt.

Durch Southern-Blot Analysen (siehe 3.4.1, S. 59) konnten im *Arabidopsis*-Genom keine DXR-Homologen Sequenzen nachgewiesen werden. Somit muß man davon ausgehen, daß es in *A. thaliana* für die DXR keine Isoformen gibt, wie dies auch schon für die DXS dieser Pflanze gefunden wurde (MANDEL *et al.*, 1996).

```

1  APRQSWDGPKPISIVGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLL
      *****
51  ADQVRRFKPALVAVRNESLINELKEALADLDYKLEIIPGEQGVIEVARHP
101  EAVTVVTGIVGCAGLKPTVAATEAGKDIALANKETLIAGGPFVLPLANKH
151  NVKILPADSEHS AIFQCIQGLPEGALRKIILTASGGAFRDWPVEKLKEVK
201  VADALKHPNWMGKKITVDSATLENKGLEVTEAHYLFGA EYDDIEIVIHP
251  QSIHSMIETQDSVLAQLGW PDMRLPILYTMSWPD RVPCSEVTWPRILD
301  CKLGS LTFKKPDNVKYPSMDL AYAAGRAGTMTGVLSAANEKAVEMFIDE
351  KISYLDIFKVVVELTCDKHRNELV TSPSLEEIVHYDLW AREYAANVQLSSG
401  ARPVHA
    
```

Abbildung 4-7 Proteinsequenz der in der vorliegenden Arbeit klonierten *Arabidopsis thaliana* 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reductoisomerase (DXR). Im Vergleich mit *E. coli* DXR (SwissProt Nr.: P45568) und homologen Sequenzen aus *Synechocystis* PCC6803 (SwissProt: Q55663), *Haemophilus influenzae* (SwissProt: P44055) und *Helicobacter pylori* (SwissProt: P56139) sind hochkonservierte Aminosäurereste schwarz unterlegt. '*' kennzeichnet eine mutmaßliche Konsensussequenz für die NADPH-Bindestelle. Der dieser Abbildung zugrundeliegende Sequenzvergleich wurde mit dem Programm MALIGN durchgeführt (Programmpaket HUSAR, Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg).

⁷ V/L GSTGSIG (Konsensus DXR)
V/L GATGXVG (Konsensus ASA-DH)

Inzwischen wurde auch ein DXR-Homolog aus *Mentha x piperita* kloniert (LANGE und CROTEAU, 1999). Die cDNA codiert für ein Protein, welches mit der *Arabidopsis*-DXR Proteinsequenz 84 % identische Aminosäuren gemeinsam hat. Zusätzlich codiert der cDNA-Klon aus *Mentha* für einen etwa 80 Aminosäuren langen N-terminalen Teil, welcher vermutlich für ein Plastiden-Transitpeptid darstellt (LANGE und CROTEAU, 1999). Somit ist das Enzym vermutlich im Plastiden lokalisiert, dem Kompartiment der Isoprenoid-Biosynthese über den DOXP-Weg.

4.5 Zusammenfassung: Bisher bekannte Schritte der IPP-Biosynthese über DOXP

In Grünalgen und höheren Pflanzen dient 1-Desoxy-D-Xylulose als IPP-Vorstufe (siehe 4.1, S. 68ff. und 4.2, S. 75ff.). Die beiden ersten Enzyme der Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosynthese wurden in dieser vorliegenden Arbeit untersucht. Die Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat aus Pyruvat und GAP ist der erste Schritt der IPP-Biosynthese. Das Enzym 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) wurde in der vorliegenden Arbeit aus *Chlamydomonas reinhardtii* (siehe 4.3, S. 80) und von anderen Arbeitsgruppen aus verschiedenen höheren Pflanzen kloniert (LANGE *et al.*, 1998; BOUVIER *et al.*, 1998). Das Enzym besitzt Sequenzhomologien zu Transketolasen.

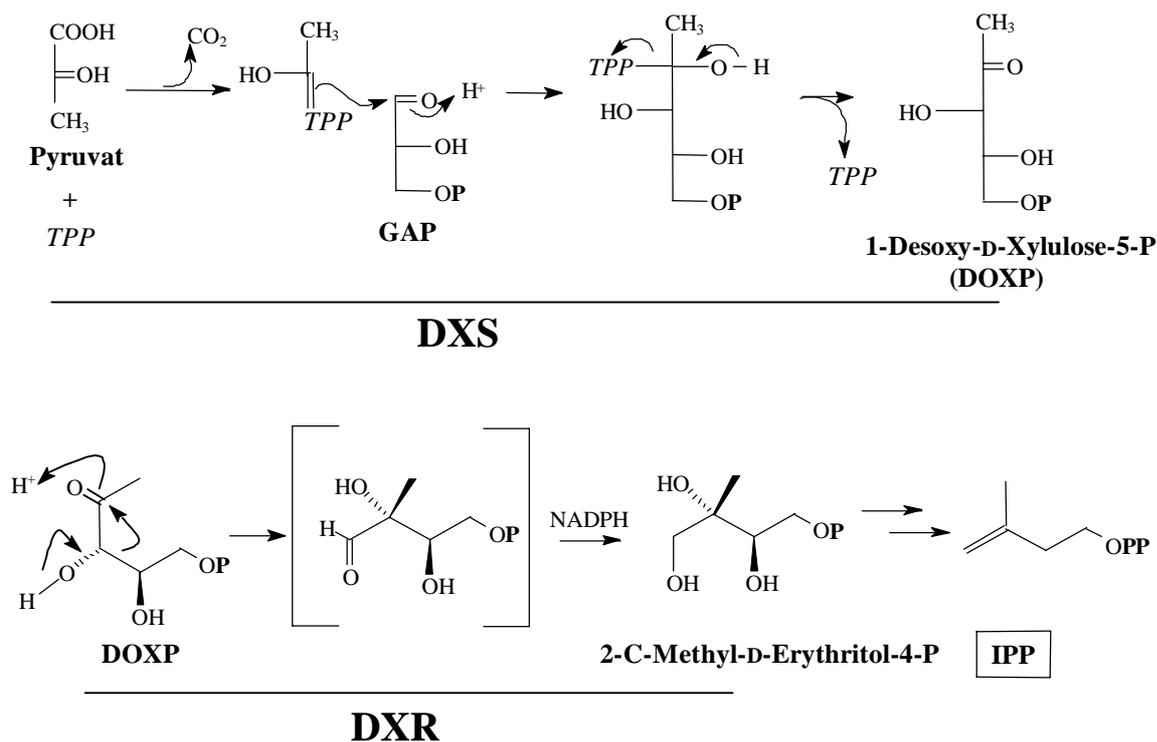


Abbildung 4-8 Bisher bekannte Schritte der IPP-Biosynthese nach dem Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg und vorgeschlagene Mechanismen. Das erste Enzym ist die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) Das Enzym bildet Thiamin-abhängig aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP). Das zweite bekannte Enzym ist die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR). Es bildet aus DOXP über eine Umlagerung und anschließende Reduktion mit NADPH das 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat.

Offensichtlich wird Pyruvat mittels Thiamin-Pyrophosphat decarboxyliert und das entstandene Hydroxyethyl-Thiamin an die Carbonyl-Funktion von GAP addiert (Abbildung

4-8). 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat wird freigesetzt und ist in Pflanzen nicht nur Vorstufe für IPP, sondern auch für Thiamin und Pyridoxalphosphat (JULLIARD und DOUCE, 1991).

Als zweites Enzym setzt die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase DOXP mittels einer C-C-Umlagerung und anschließender Reduktion zum 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP) um (Abbildung 4-8). Eine cDNA, welche für das Enzym codiert wurde in der vorliegenden Arbeit aus *Arabidopsis thaliana* kloniert (siehe 4.4, S. 84). Fosmidomycin inhibiert das rekombinant exprimierte Enzym in mikromolarer Konzentration und ist zugleich ein Inhibitor der Biosynthese plastidärer Isoprenoide in verschiedenen Pflanzen. Mit MEP ist das verzweigte C-Gerüst des IPP gegeben. Die weiteren Schritte, in denen drei OH-Gruppen aus MEP entfernt werden und durch Phosphorylierung die Diphosphat-Gruppe gebildet wird, sind bisher unbekannt (siehe 4.6.8, S. 100).

4.6 Diskussion weiterer Literatur über die alternative IPP-Biosynthese

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse sollen nun noch weiter mit älterer Literatur sowie mit der inzwischen reichlich erschienenen neueren Literatur über die alternative IPP-Biosynthese verglichen werden.

4.6.1 Vergleich der neuen Erkenntnisse über die plastidäre IPP-Biosynthese in Pflanzen mit älterer Literatur

Viele experimentelle Befunde über die Biosynthese plastidärer Isoprenoide, welche man in älterer Literatur findet, waren eigentlich im Widerspruch zu dem Dogma eines plastidären Acetat/Mevalonat-Weges und werden erst durch die Existenz des alternativen IPP-Weges erklärbar:

Es wird mehrfach berichtet, daß ^{14}C -markierte Mevalonsäure von grünen pflanzlichen Geweben in die cytosolischen Sterole eingebaut wird, nicht aber in verschiedene plastidäre Isoprenoide wie β -Carotin, Phytol und Plastochinon-9 (MERCER und GOODWIN, 1962; GRIFFITH *et al.*, 1964; TREHARNE *et al.*, 1964; TREHARNE *et al.*, 1966; WIECKOWSKI und GOODWIN, 1967; SHAH und ROGERS, 1969; THRELFALL und WHISTANCE, 1971; LICHTENTHALER *et al.*, 1982; SCHULZE-SIEBERT *et al.*, 1987). Der nicht stattfindende Einbau von Mevalonsäure in plastidäre Isoprenoide wurde von einigen der Autoren mit einer Undurchlässigkeit des Plastiden-Envelopes für Mevalonsäure erklärt.

Einbauexperimente der Arbeitsgruppe Kleinig mit Plastidenpräparationen aus Spinat und Narzissen-Blüten stehen im Widerspruch dazu, daß MVA und deren Phosphate im Plastiden IPP-Vorstufen sind: Während ^{14}C -markiertes IPP in GGPP und in β -Carotin eingebaut wurde, fand sich kein Einbau aus den ^{14}C -markierten direkten IPP-Vorläufern MVA, MVA-P und MVA-PP (KREUZ und KLEINIG, 1981). Ähnliche Ergebnisse lieferten Einbauversuche mit Chloroplasten der Grünalge *Acetabularia* (BÄUERLE *et al.*, 1990). Folglich sind die Enzymaktivitäten, welche MVA in IPP überführen, nicht im Plastiden vorhanden. Im Lichte der plastidären IPP-Biosynthese über den DOXP-Weg in höheren Pflanzen sind diese Ergebnisse nun erklärbar.

Die Arbeitsgruppe Schultz führte eine Serie von Experimenten über die Biosynthese von plastidären Isoprenoiden durch. Man untersuchte verschiedene Stadien der Plastidenentwicklung in Gersten-Blättern. Hiernach ist der unreife Plastid der Blattbasis autonom in der IPP-Biosynthese, während der „reife“ Chloroplast der oberen Blatt-Teile die endogene IPP-Biosynthese einstellt und das IPP aus dem Cytosol importiert (HEINTZE *et al.*,

1990; HOPPE *et al.*, 1993). Für die IPP-Biosynthese der unreifen Chloroplasten soll ein plastidärer Acetat/Mevalonat-Weg zuständig sein. Der Einbau markierter Mevalonsäure in plastidäre Isoprenoide konnte allerdings nicht gezeigt werden. Auch Acetat ließ sich nicht effizient in die plastidären Isoprenoide einbauen. Es wurde eine Substratkanalisierung vorgeschlagen, welche die plastidären Intermediatepools zwischen Acetyl-CoA und IPP für Markierungsexperimente unzugänglich macht. Nach jetzigen Erkenntnissen trifft sicher eher die Erklärung zu, daß Acetat oder MVA nicht in die plastidären Isoprenoide eingebaut werden, da sie keine Vorstufen in der plastidären IPP-Biosynthese sind.

Neben den Markierungsstudien erbrachte auch der Einsatz eines Hemmstoffes der IPP-Biosynthese in Bezug auf die Biosynthese plastidärer Isoprenoidebiosynthese nicht die zu erwartenden Effekte. Bei höheren Pflanzen wurde durch einen spezifischen Hemmstoff der HMG-CoA Reduktase (siehe 1.4, S. 4), Mevinolin, die Sterolbiosynthese stark gehemmt (BACH und LICHTENTHALER, 1982a, 1983b; DÖLL *et al.*, 1984). Jedoch hatte Mevinolin keinen Einfluß auf die Biosynthese der plastidären Prenyllipide wie β -Carotin, Plastochinon-9 und die Chlorophylle (BACH und LICHTENTHALER, 1982a, 1983b; DÖLL *et al.*, 1984). Man konnte hier vermuten, daß Mevinolin nicht in die Plastiden eindringen kann und somit eine plastidäre HMG-CoA-Reduktase nicht hemmen kann. Eine aus Sicht der jetzigen Ergebnisse angebrachte Begründung ist allerdings, daß die plastidäre IPP-Biosynthese aus Pyruvat und GAP nicht durch Mevinolin hemmbar ist.

- *HMG-CoA Reduktase*

Für die HMG-CoA-Reduktase (HMGR), ein wesentliches Enzym für die Regulation des Acetat/Mevalonat-Weges (siehe Abschnitt 1.4, S. 4), wurden in verschiedenen Pflanzen jeweils mehrere Isoformen gefunden. So wurden in *Arabidopsis thaliana* drei verschiedene Isoformen beschrieben (zwei Gene, drei verschiedene Transkripte). Alle drei Isoformen sind im ER lokalisiert (ENJUTO *et al.*, 1994; LUMBRERAS *et al.*, 1995). Jedoch wurde bisher noch von keiner HMGR-Isoform berichtet, welche in den Plastiden importiert würde (N-terminale Plastidentransitsequenz fehlt). Wenn schon für das cytosolische Kompartiment unterschiedlich regulierte Isoformen der HMGR vorhanden sind, wären bei der Vielfalt an Diterpenen und an Tetraterpenen des Primär- und Sekundärstoffwechsels, welche im Plastiden synthetisiert werden, mehrere HMGR-Isoformen für das Plastiden-Kompartiment zu erwarten.

Es gibt einige Berichte über die biochemische Charakterisierung plastidärer Isoformen der HMG-CoA Reduktase (BROOKER und RUSSEL, 1975; WONG *et al.*, 1982; AREBALO und MITCHEL, 1984; RAMACHANDRA REDDY und DAS, 1986; WILSON und RUSSEL, 1992; KIM *et al.*, 1996). In diesen Arbeiten wurde für isolierte Plastiden HMGR-Aktivität nachgewiesen. Hierbei muß jedoch bedacht werden, daß die cytosolischen Formen der HMGR an ER-Membranen gebunden sind. Plastidenpräparationen müssen also frei von ER-Membranen sein, um tatsächlich eine postulierte plastidäre HMGR messen zu können. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß die HMGR im Envelope der Plastiden vorkommt (WILSON und RUSSEL, 1992) und somit mit den Plastidenpräparationen mit isoliert wird. Ob eine solche im Envelope lokalisierte HMGR an der plastidären IPP-Biosynthese mitwirkt ist jedoch nicht sicher.

Die Beobachtung, daß Lycopin in reifenden Tomatenfrüchten nach dem DOXP-Weg gebildet wird (siehe 3.2.2, S. 45), erklärt den Befund von NARITA und GRUISSEM (1989), nachdem HMGR-Expression und -Enzymaktivität zwar während des Größenwachstums der Früchte, nicht aber während der Lycopin-Bildung gemessen werden konnte (NARITA und GRUISSEM, 1989). Auch konnten dieselben Autoren mit Mevinolin, einem spezifischen Inhibitor der HMGR, nur eine Hemmung des Größenwachstums der Früchte herbeiführen, nicht aber die Lycopin-Bildung und -Akkumulation unterdrücken (NARITA und GRUISSEM,

1989). Spätere Untersuchungen der Arbeitsgruppe Gruissem zeigten, daß durch Arachidonsäure in Tomatenfrüchten die Lycopin-Bildung stimuliert werden kann, wobei zu Beginn (während 48 h) eine erhöhte Transkription einer HMGR-Isoform (HMGR2) gefunden wurde (RODRIGUEZ-CONCEPCION und GRUISSEM, 1999). Jedoch kann auch unter diesen Umständen die Lycopin-Bildung nicht durch Mevinolin gehemmt werden und die HMGR-Expression nach Applikation der Arachidonsäure wird von den Autoren der Arachidonsäure-induzierten Pathogen-Abwehr zugeschrieben (RODRIGUEZ-CONCEPCION und GRUISSEM, 1999). In Ergänzung zur fehlenden Hemmbarkeit der Lycopin-Biosynthese durch Mevinolin konnte die Karlsruher Arbeitsgruppe zeigen, daß die Lycopin-Bildung in Tomatenfrüchten mit Fosmidomycin, einem Inhibitor des DOXP-Weges, hemmbar ist (ZEIDLER *et al.*, 1998).

- *Frühe Arbeiten zur Carotinoid-Biosynthese in Tomatenfrüchten*

Es gibt verschiedene frühe Arbeiten zur Biosynthese von Carotinoiden in reifenden Tomatenfrüchten (ZABIN, 1957; BRAITHWAITE und GOODWIN, 1960a; WILLIAMS *et al.*, 1967a, b). Die Einbaustudien mit radioaktiven Vorstufen wurden meist im Sinne des Acetat/Mevalonat-Weges gedeutet. Es gibt jedoch einen frühen Hinweis darauf, daß Lycopin über eine vom Acetat/Mevalonat-Weg völlig verschiedene IPP-Biosynthese entsteht: ZABIN (1957) fand, daß [2-¹⁴C]-Acetat und [1-¹⁴C]-Acetat im Verhältnis 5,5:1 in Lycopin eingebaut werden, wobei aber die Fettsäuren aus beiden markierten Vorstufen gleich stark markiert wurden. Das Einbauverhältnis in das Lycopin steht im Widerspruch dazu, die Isopreneinheiten direkt aus Acetat gebildet wurden, d. h. daß Acetyl-CoA über Acetoacetat, HMG-CoA und MVA in IPP überführt wird (siehe 1.4, S. 4): Es stammen 3 C-Atome des IPP aus C-2 des Acetat sowie 2 C-Atome aus C-1 des Acetat. Das erwartete Verhältnis ist somit 1,5:1 und das gefundene viel höher. Wenn jedoch die IPP-Biosynthese über den DOXP-Weg stattfindet, geht die Biosynthese von GAP aus. In der Grünalge *Scenedesmus obliquus* und in dem Lebermoos *Heteroscyphus planus* fand sich im Phytol nach Verabreichung von [1-¹³C]-Acetat eine deutliche Markierung in C-4 der Isopreneinheiten (SCHWENDER *et al.*, 1996; NABETA *et al.*, 1998b). Wenn C-4 der Isopreneinheit aus der Carboxyl-Gruppe und die übrigen C-Atome aus der Methylgruppe des Acetat gebildet werden, ergibt sich ein Verhältnis von 4:1. Die Markierung der Isopreneinheit an C-4 aus [1-¹³C]-Acetat ist zurückführbar auf die Bildung von Triosephosphat aus Acetat über die Reaktionen des Glyoxylatzyklus und des Citratzyklus. In der Bilanz des Glyoxylatzyklus entsteht aus 2 Molekülen Acetyl-CoA ein Succinat-Molekül, welches in Oxalacetat überführt wird. Von hier aus wird Phosphoenolpyruvat, daraus 3-Phosphoglycerat und schließlich GAP gebildet. Geht man von [2-¹⁴C]-Acetat aus, so entsteht auf diesem Wege [2,3-¹⁴C]-GAP – und über den DOXP-Weg wird IPP an den Positionen C-1, C-2, C-3 und C-5 markiert (vgl. Abbildung 4-2). Aus [1-¹⁴C]-Acetat wird [1-¹⁴C]-GAP gebildet und IPP nur an C-4 markiert. Dies ergibt ein theoretisches Einbauverhältnis des [2-¹⁴C]-Acetat zu [1-¹⁴C]-Acetat von 4:1. Die Reaktionen des Citratcyclus überlagern allerdings die Reaktionssequenz des Glyoxylatzyklus in der Weise, daß C-1 des GAP zum Teil aus C-2 des Acetat gebildet wird⁸. [2-¹⁴C]-Acetat markiert IPP dann in den Positionen C-1, C-2, C-3 und C-5 sowie in geringerem Maße in C-4, was das Einbauverhältnis [2-¹⁴C]-Acetat zu [1-¹⁴C]-Acetat noch zugunsten des [2-¹⁴C]-Acetat verschiebt. Insgesamt kommt man mit diesen Überlegungen dem von Zabin beobachteten Einbauverhältnis von 5,5:1 viel näher als dem nach dem Acetat/Mevalonat-Weg erwartete Verhältnis von 1,5:1.

Mit weiteren Einbauversuchen konnten Goodwin und Mitarbeiter im Gewebe reifender Tomatenfrüchte den Einbau von Mevalonsäure mit ¹⁴C/³H-Doppelmarkierung in Lycopin und andere Carotinoide nachweisen, wobei das Verhältnis des eingebauten ³H zum ¹⁴C den

⁸ Hierfür verantwortlich ist die Reaktionssequenz 2-Oxoglutarat → Succinyl-CoA → Succinat.

spezifischen Einbau der Vorstufe deutlich machte (WILLIAMS *et al.*, 1967a, b). Auch konnte nach Einbau von [1-¹⁴C]- und [2-¹⁴C]-Acetat in Lycopin und chemischem Abbau teilweise das ¹⁴C-Markierungsmuster der Isopreneinheiten bestimmt werden (BRAITHWAITE und GOODWIN, 1960a). Die Ergebnisse dieser Einbauexperimente wurden als Beleg für die Biosynthese des Lycopins über Mevalonsäure gewertet.

In dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Einbau von [2-¹³C]-MVA in Tomatenfrüchte (siehe 4.2.2, S. 77) war allenfalls eine sehr schwache Markierung des Lycopins beobachtet worden. Die ¹³C-Anreicherung in den einzelnen Atomen des aus [1-¹³C]-Glucose markierten Lycopin ließ dagegen nur den DOXP-Weg erkennen. Eine größere Beteiligung des Acetat/Mevalonat-Weges an der Lycopin-Biosynthese hätte zu einer erhöhten Anreicherung in den Positionen C-2 und C-4 der Isopreneinheiten führen müssen. Die Vorstufe [1-¹³C]-Glucose stellt keine spezifische Vorstufe für einen der beiden IPP-Biosynthesewege dar und es wurde doch nur das Markierungsmuster des DOXP-Weges gefunden. Somit kann vermutet werden, daß in den genannten „klassischen“ Arbeiten der Goodwin-Arbeitsgruppe zur Lycopin-Biosynthese in Tomaten ein minimaler Beitrag des Acetat/Mevalonat-Weges zur Lycopin-Biosynthese detektiert wurde.

- **Folgerungen**

Es wurden aus der älteren Literatur Einbauversuche mit ¹⁴C-MVA an ganzen Pflanzen, Markierungsversuche an isolierten Plastiden, Hemmversuche mit Mevinolin, sowie Ergebnisse über die molekulare Genetik der pflanzlichen HMG-CoA-Reduktase diskutiert. Insgesamt ergeben die meisten der genannten Ergebnisse eine Bestätigung für die Biosynthese *plastidärer* Isoprenoide nach dem DOXP-Weg und damit eine Bestätigung des Kompartimentierungsmodells beider IPP-Biosynthesen, welches in Abschnitt 4.2 (S. 78) vorgeschlagen wurde.

4.6.2 Neuere Ergebnisse über die alternative IPP-Biosynthese in höheren Pflanzen

Es konnte in dieser Arbeit für drei höhere Pflanzen und zwei Grünalgen gezeigt werden, daß plastidäre Isoprenoide nach dem DOXP-Weg der IPP-Biosynthese gebildet werden, während die im Cytosol gebildeten Sterole hauptsächlich über den Acetat/Mevalonat-Weg entstehen (Abbildung 4-5). Für die Vielzahl an pflanzlichen Mono- und Diterpenen gilt, daß zumindest deren isoprenoide Grundstruktur (GPP, GGPP) im Plastiden gebildet wird (siehe 1.3, S. 3). Anders als beim Chlorophyll oder bei den Carotinoiden muß jedoch der Ort späterer Biosyntheseschritte sowie der Akkumulation des Isoprenoides nicht unbedingt der Plastid sein. Eine Reihe von Publikationen anderer Arbeitsgruppen zeigt inzwischen bei vielen höheren Pflanzen, daß Mono- und Diterpene nach dem DOXP-Weg gebildet werden, während Sesquiterpene und Sterole nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden. Damit ist die gefundene Lokalisation des DOXP-Weges im Plastiden vielfach belegt:

- **Isopren, Mono- und Diterpene sowie plastidäre Prenyllipide werden über DOXP gebildet**

In Zellkulturen von *Catharanthus roseus* wurden die plastidären Isoprenoide β -Carotin, Phytol und Lutein aus [1-¹³C]-1-Desoxy-D-xylulose zu etwa 15 % markiert, während im Sitosterol nur etwa 1 % der Isopreneinheiten aus 1-Desoxy-D-xylulose markiert wurden (ARIGONI *et al.*, 1997). Im Lebermoos *Conocephalum conicum* wurden nach Verabreichung von [1-¹³C]-Glucose das monoterpene Borneol und die diterpene Phytol-Seitenkette der Chlorophylle nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Biosyntheschema markiert, während das

sesquiterpene Cubebanol sowie das Stigmasterol nach dem Acetat/Mevalonat-Weg markiert wurden (ADAM *et al.*, 1998).

In dem Lebermoos *Heteroscyphus planus* werden die diterpene Phytol-Seitenkette des Chlorophyll, ein Diterpen (Heteroscyphinsäure A) wie auch das β -Carotin nach dem DOXP-Weg gebildet. Die Sesquiterpene β -Barbatanol und 7-Methoxy-1,2-dihydrocadalene werden dagegen aus dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet. Dies läßt sich aus einer Reihe von Markierungsexperimenten der Arbeitsgruppe Nabeta ableiten, wenn auch die Schlussfolgerungen der Autoren etwas anders zu sein scheinen (NABETA *et al.*, 1995; 1997; 1998a; 1998b). Obwohl ein Einbau aus [2-¹³C]-Mevalonsäure in Phytol und β -Carotin von *Heteroscyphus planus* berichtet wird (NABETA *et al.*, 1997), wurde [6, 6 -²H₂]-Glucose in Phytol und β -Carotin aus *Heteroscyphus planus* gemäß dem DOXP-Weg eingebaut: Die Isopreneinheiten wurden an C-1 und C-5 zweifach deuteriert (NABETA *et al.*, 1998b). Aus anderen Einbauversuchen kann abgeleitet werden, daß der überwiegende Anteil der Isopreneinheiten der Diterpene (Phytol) und des β -Carotin über den DOXP-Weg gebildet wird (NABETA *et al.*, 1998b):

1. Bei Verabreichung von [2-¹³C]-Mevalonsäure wurde der Einbau in ein Diterpen (Heteroscyphinsäure A) und in ein Sesquiterpen (1-Methoxy-1,2-dehydroxydalene) aus *Heteroscyphus planus* verglichen. Die Markierung im Sesquiterpen (etwa 10 % Anreicherung) war um das 10fache höher als im Diterpen (NABETA *et al.*, 1995). Hieraus kann man ableiten, daß im Diterpen höchstens 10 % der Isopreneinheiten aus dem Acetat/Mevalonat-Weg stammen.
2. [2-¹³C]-Glycerin, aus welchem endogen vermutlich [2-¹³C]-GAP und [2-¹³C]-Pyruvat entstehen, markiert gemäß dem DOXP-Weg eindeutig C-2 und C-3 der Isopreneinheiten des Phytol und des β -Carotin (NABETA *et al.*, 1998b). Ein hoher Anteil an Isopreneinheiten, welche über Mevalonsäure gebildet werden, hätte zu einer meßbaren Anreicherung in C-1 der Isopreneinheiten führen müssen. Beim sesquiterpenen β -Barbatanol wurden aus [2-¹³C]-Glycerin an C-1 und C-3 markiert (NABETA *et al.*, 1998a), was deren Bildung über den Acetat/Mevalonat-Weg anzeigt ([2-¹³C]-Glycerin \square [2-¹³C]-GAP \square [2-¹³C]-Pyruvat \square [1-¹³C]-Acetyl-CoA \square \square [1, 3-¹³C]-IPP).
3. Aus Deuterium-markiertem Acetat fand sich mittels NMR-Spektroskopie kein meßbarer Einbau in Phytol, was nach dem Acetat/Mevalonat-Weg zu erwarten gewesen wäre (NABETA *et al.*, 1998b). Wenn nur wenige Prozent der Isopreneinheiten über Mevalonsäure gebildet würden, hätte man eine meßbare Deuterierung finden müssen.

Die Biosynthesestudien der Gruppe Nabeta an *Heteroscyphus planus* lassen also erkennen, daß Sesquiterpene über den Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden, während Diterpene (Heteroscyphinsäure A) und Carotinoide – bis auf eine geringe Beteiligung des Acetat/Mevalonat-Weges von wenigen Prozent – über DOXP gebildet werden.

Für eine heterotroph wachsende Zellkultur aus *Nicotiana tabacum* zeigte sich ebenfalls das Vorkommen des DOXP-Weges im Plastiden. Die Zellen wurden mit verschiedenen ¹³C-markierten Glucosen angezogen. Das plastidäre Plastochinon-9 wurde nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Biosyntheschema markiert, die Sterole und Ubichinon-10 nach dem Acetat/Mevalonat-Weg (DISCH *et al.*, 1998a). Auch hier zeigt sich die Kompartimentierung in einen plastidären DOXP-Weg (Plastochinon-9) und den cytosolischen Acetat/Mevalonat-Weg (Sterole). Zusätzlich zeigt diese Arbeit, daß auch das in den Mitochondrien gebildete Ubichinon nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet wird.

Isopren, welches von vielen Pflanzen unter Hitze-Streß im Starklicht gebildet wird, wurde aus [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose hochgradig in der Methylgruppe markiert (ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997). Daß Isopren über den DOXP-Weg gebildet wird, läßt

vermuten, daß die Isoprenbiosynthese im Plastiden stattfindet. Damit im Einklang steht die Identifizierung einer plastidären Isopren-Synthase, welche aus DMAPP Isopren bildet (WILDERMUTH und FALL, 1996).

Für verschiedene Monoterpene aus höheren Pflanzen wurde die Biosynthese über den DOXP-Weg nachgewiesen. Menthon und Pulegon aus *Mentha x piperita* werden nach dem DOXP-Weg gebildet (EISENREICH *et al.*, 1997), wobei der Bildungsort die Leukoplasten der sekretorischen Drüsenzellen ist (TURNER *et al.*, 1999). Ebenso wurde die Bildung nach dem DOXP-Weg für Linalyl-Acetat aus *Mentha citrata* (FOWLER *et al.*, 1999), für Geraniol aus *Pelargonium graveolens*, Thymol aus *Thymus vulgaris* (EISENREICH *et al.*, 1997), Bornylacetat aus dem Lebermoos *Conocephalum conicum* (THIEL *et al.*, 1997), sowie für mehrere flüchtige Monoterpene nachgewiesen (PIEL *et al.*, 1998). Für mehrere Diterpene wird ebenfalls die Biosynthese nach dem DOXP-Weg berichtet: Ginkgolid A aus *Ginkgo biloba* (SCHWARZ, 1994), Taxol aus *Taxus chinensis* (EISENREICH *et al.*, 1996), sowie Marrubiin aus *Marrubium vulgare* (KNÖß *et al.*, 1997).

- **Mischmarkierungen**

In einigen Fällen wurde eine eindeutige Beteiligung beider IPP-Biosynthesen an der Bildung eines Isoprenoides gefunden. Wie in der vorliegenden Arbeit berichtet, wurden bei *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota* nach heterotropher Anzucht auf [1-¹³C]-Glucose die Isopreneinheiten der Sterole im wesentlichen über Mevalonsäure, jedoch bis zu einem Anteil von 30 % der über den DOXP-Weg gebildet (siehe 4.2.1, S. 75). Man kann daraus auf einen bedeutenden Export von IPP oder GPP aus dem Plastiden in das Cytosol schließen.

Ähnliche Resultate lieferten auch Markierungsstudien an Sesquiterpenen der Kamille. Die Sesquiterpene Bisabololoxid A und Chamazulen aus den Blüten der Kamille (*Matricaria recutita*) wurde nach Markierung mit [1-¹³C]-Glucose mittels ¹³C-NMR analysiert (ADAM und ZAPP, 1998). Die Isopreneinheiten 1 und 2 des Sesquiterpen-Vorläufers FPP wurden nach dem DOXP-Weg gebildet, während sich für die zuletzt angefügte dritte Isopreneinheit eine Mischmarkierung aus DOXP-Weg und Acetat/Mevalonat-Weg (etwa 40 % Anteil an DOXP) ergab. Es ist somit denkbar, daß in größerem Umfang über DOXP gebildetes GPP aus dem Plastiden exportiert und im Cytosol mit aus Mevalonsäure gebildetem IPP zur Sesquiterpenvorstufe FPP verlängert wird. Die Arbeiten von ADAM und ZAPP (1998) sprechen also für einen Export von GPP und IPP aus dem Plastiden.

Für die Biosynthese des diterpenen Ginkgolid A aus *Ginkgo biloba* zeigte der Einbau von ¹³C-markierter Mevalonsäure, daß offenbar cytosolisch gebildetes FPP in die Biosynthese des Diterpen-Vorläufers GGPP einging (SCHWARZ, 1994). Die vierte Isopreneinheit, mit der FPP zum GGPP verlängert wurde (katalysiert von GGPP synthase, vgl. GRAY, 1987), war aus Mevalonsäure noch schwächer markiert worden als der FPP-Anteil. Wenn auch insgesamt der Einbau an ¹³C-Mevalonsäure in das Ginkgolid A gering war (etwa 1 % der Isopreneinheiten aus MVA), war den NMR-spektroskopischen Daten dennoch der Einbau weniger, aus ¹³C-markierter Mevalonsäure hoch-markierter FPP-Moleküle zu entnehmen. Es gibt also einen geringen Beitrag von im Cytosol aus MVA gebildetem FPP zur Ginkgolid-Biosynthese.

Ein weiterer Hinweis auf einen Import von cytosolisch gebildetem FPP in den Plastiden ergibt sich aus Biosynthesestudien einer japanischen Arbeitsgruppe mit einem Lebermoos. ²H- und ¹³C-markierte Mevalonsäure wurden Kulturen von dem Lebermoos *Heteroscyphus planus* zugesetzt. Ein Diterpen (Heteroscyphinsäure A ; NABETA *et al.*, 1995), sowie Phytol und β-Carotin (NABETA *et al.*, 1997) wurden isoliert und mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Die Autoren fanden einen Einbau von Mevalonsäure vor allem in die Isopreneinheiten, welche den ersten drei Isopreneinheiten des Geranylgeranyl-Pyrophosphat

(GGPP) entsprechen (NABETA *et al.*, 1997). Wie beim Ginkgolid A war die vierte, bei der Biosynthese des GGPP zuletzt angehängte Isopreneinheit aus Mevalonsäure viel schwächer markiert worden (NABETA *et al.*, 1997). Hieraus kann man wie beim Ginkgolid A auf einen Import von FPP aus dem Cytosol in den Plastiden schließen. Solche über Mevalonsäure gebildeten FPP-Moleküle wurden dann mit IPP verlängert, welches im Plastiden über DOXP gebildet wurde. Wie in diesem Abschnitt schon diskutiert, ist jedoch der Beitrag von aus MVA gebildeten Isopreneinheiten insgesamt an der Biosynthese der Diterpene und des β -Carotins in *Heteroscyphus planus* gering.

Bei Pflanzen der Lima-Bohne (*Phaseolus lunatus*) wird nach Aufnahme von Jasmonsäure die Emission verschiedener flüchtiger Monoterpene (Ocimen, Linalool), eines Sesquiterpenes (DMNT, 4,8-Dimethyl-Nona-1,3,7-Trien) und eines Diterpenes (TMTT, 4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Trien) stark erhöht (PIEL *et al.*, 1998). Bei Markierungsexperimenten nach Jasmonsäure-Induktion war das emittierte DMNT aus [5-²H₂]-DOX zu etwa 40 % und aus [4-²H₂,6-²H₃]-MVA zu etwa 90 % markiert. In dieses Sesquiterpen werden also sowohl MVA als auch DOX effizient eingebaut während die Monoterpene doch mit viel eindeutiger Präferenz aus DOX markiert wurden (PIEL *et al.*, 1998).

Bei den hier diskutierten Mischmarkierungen wurde mehrfach ein bedeutender Anteil der Isopreneinheiten von Sterolen (*Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota*) und Sesquiterpenen (Kamille) über DOXP gebildet. Dagegen wurde bei den Ginkgo-Diterpenen und den Diterpenen aus *Heteroscyphus planus* nur wenige Prozent der Isopreneinheiten aus MVA gebildet, was auf einen geringen Import von FPP aus dem Cytosol hinweist. Bei den berichteten Experimenten muß auch bedacht werden, daß die Zugabe von Isotopen-markierter Mevalonsäure oder 1-Deoxyxylulose im Markierungsexperiment möglicherweise eine Überflutung der internen Intermediate-Pools bedingt. Der Anteil der über Mevalonsäure gebildeten Isopreneinheiten an der Isoprenoid-Biosynthese im Plastiden ist damit vielleicht artifiziell überhöht. Es wäre also interessant, solche Einbauexperimente mit radioaktiv markierten Vorstufen durchzuführen. Man könnte die radioaktive Vorstufe in viel geringerer Konzentration einsetzen, so daß die genannte Intermediateüberflutung nicht eintritt.

- *Ausnahmen: Monoterpene, welche nach dem Acetat/Mevalonat-Weg, Sesquiterpene, welche nach dem DOXP-Weg gebildet werden*

Neben den vielen genannten Beispielen dafür, daß in höheren Pflanzen Mono-, Di- und Tetraterpene (Carotinoide) über dem DOXP-Weg gebildet werden, während Sesqui- und Triterpene aus dem Acetat/Mevalonat-Weg entstehen, sind bisher allerdings auch wenige Ausnahmen bekannt:

Shikonin, ein rotes Pigment von *Lithospermum erythrorhizon*, besitzt einen hemiterpenen Anteil, welcher von Geranyl-Diphosphat abgeleitet ist (LI *et al.*, 1998). Das monoterpene Geranyl-Diphosphat wird jedoch nicht über DOXP, sondern nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet (LI *et al.*, 1998).

Viele Gramineen akkumulieren in ihren Wurzeln sesquiterpenoide Cyclohexanon-Derivative. Es konnte mit Gerstenpflanzen durch Einbau verschieden ¹³C-markierter Glucosen nachgewiesen werden, daß Blumenol C (6-(3-hydroxybutyl)-1,1,5-trimethyl-4-cyclohexan-3-on) nach dem DOXP-Weg gebildet wird (MAIER *et al.*, 1998). Hier handelt es sich also um ein Sesquiterpen, welches nach dem DOXP-Weg gebildet wird.

- *Folgerungen*

Nachdem nun viele Beispiele aufgeführt wurden für die Biosynthese von Mono- und Diterpenen nach dem DOXP-Weg sowie von Sesquiterpenen und Sterolen nach dem Acetat/Mevalonat-Weg, behält das Kompartimentierungsmodell der beiden IPP-Biosynthesen in höheren Pflanzen (siehe S. 78; Abbildung 4-5, S. 79) grundsätzlich seine Berechtigung. Auch die genannten Mischmarkierungen von Isoprenoiden aus beiden IPP-Biosynthesen sprechen nicht gegen das Modell, sondern für das häufige Vorkommen eines Exportes von IPP und GPP aus dem Plastiden. Über die genannten Ausnahmefälle, in denen ein Monoterpen nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet wird sowie ein Sesquiterpen nach dem DOXP-Weg, kann bisher nur spekuliert werden. Wichtig wäre z. B. im Falle der Biosynthese eines Monoterpenes (GPP) über MVA auch die Biosynthese weiterer Isoprenoide in derselben Pflanze zu untersuchen. Denkbar wäre, daß zu der Lokalisation des DOXP-Weges im Plastiden und des Acetat/MVA-Weges im Cytosol auch eine weitere Subkompartimentierung im Zusammenhang mit Multienzymkomplexen und einer Substratkanalisierung vorkommt. Es wäre z. B. auch denkbar, daß, obwohl die meisten Sesquiterpene im Cytosol über MVA gebildet werden, einige Sesquiterpene auch im Plastiden gebildet werden. Dies läßt der Bericht der Lokalisation von FPP-Synthase in Chloroplasten von Reis, Gerste und Tabak vermuten (SANMIYA *et al.*, 1999).

4.6.3 Bildung der isoprenoiden Ubichinon-Seitenkette in höheren Pflanzen

Neben dem Plastiden als Kompartiment der Isoprenoid-Biosynthese gilt auch das pflanzliche Mitochondrium als Biosynthesekompartiment von Isoprenoiden, d. h. von Ubichinon (SCHINDLER und LICHTENTHALER, 1982). Es gibt Gründe anzunehmen, daß in höheren Pflanzen das mitochondriale Ubichinon nach dem klassischen Acetat/Mevalonat-Weg gebildet wird. Einbauexperimente mit Mais, Bohne (*Phaseolus vulgaris*) und Tabak zeigten, daß ¹⁴C-Mevalonsäure in die Sterole wie auch in das Ubichinon eingebaut wird (THRELFALL und WHISTANCE, 1971). Durch Mevinolin, einen spezifischen Hemmstoff der HMG-CoA-Reduktase, kann die Akkumulation von Sterolen sowie von Ubichinon in *Raphanus sativus*-Keimlingen gehemmt werden, wobei relativ zum UQ-10 mehr UQ-9 akkumuliert wird (SCHINDLER *et al.*, 1985). Zugleich wird die Bildung der plastidären Isoprenoide kaum beeinflusst (SCHINDLER *et al.*, 1985). Diese Ergebnisse sprechen für eine Biosynthese der Ubichinon-Seitenkette nach dem Acetat/Mevalonat-Weg und unabhängig von der plastidären Isoprenoid-Biosynthese. In isolierten Mitochondrien aus Kartoffelknollen, Spinatblättern und Narzissen-Blütenblättern wird ¹⁴C-markiertes IPP in die Seitenkette des Ubichinon eingebaut, während Mevalonsäure-5-Phosphat nicht eingebaut wird (LÜTCKE-BRINKHAUS *et al.*, 1984). Dies spricht für eine Abhängigkeit der mitochondrialen Ubichinon-Biosynthese von cytosolisch erzeugtem IPP.

Von den Arbeitsgruppen Bach und Rohmer (Strasbourg) wurde eine Zellsuspensionskultur aus *Nicotiana tabacum* mit verschiedenen ¹³C-markierten Glucosen heterotroph angezogen und einige Isoprenoide mittels ¹³C-NMR untersucht. Plastochinon-9 wurde nach dem DOXP-Weg markiert, während die Sterole und das Ubichinon-10 nach dem Acetat/MVA-Weg markiert wurden (DISCH *et al.*, 1998a). Dieser Nachweis der Bildung des Ubichinon nach dem Acetat-Mevalonat-Weg kann auf dem Hintergrund der oben genannten Markierungsstudien mit radioaktiven Vorstufen und den Hemmexperimenten mit Mevinolin auf höhere Pflanzen verallgemeinert werden.

Wie schon bei der Biosynthese der Sterole, weicht die Grünalge *Scenedesmus obliquus* bei der Biosynthese des Ubichinon von der höheren Pflanze ab. Nach Anzucht von *Scenedesmus obliquus* auf [1-¹³C]-Glucose wurde das ¹³C-Markierungsmuster von Ubichinon-10 mittels ¹³C-NMR bestimmt. Die isoprenoide Seitenkette war, wie alle anderen bisher untersuchten

Isoprenoide dieser Grünalge, nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Schema markiert (MÜLLER, 1998).

4.6.4 DOXP-Weg in Bakterien, Cyanobakterien und eukaryotischen Algen

Neben den untersuchten Grünalgen und höheren Pflanzen ist auch die Biosynthese der Isoprenoide anderer Algen von Interesse. In der von mir betreuten Diplomarbeit von Herrn C. Müller bei Botanik II, Karlsruhe, und in Zusammenarbeit mit A. Disch (Arbeitsgruppe Prof. M. Rohmer, Universität Straßburg) wurde die Isoprenoide-Biosynthese einiger mixotroph kultivierbarer einzelliger Mikroalgen untersucht (MÜLLER, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997; DISCH *et al.*, 1998b).

- *DOXP-Weg in Cyanobakterien*

Da die endosymbiontischen Vorläufer der Plastiden von Grünalgen, höheren Pflanzen und Rotalgen wahrscheinlich Cyanobakterien waren (CAVALIER-SMITH, 1992), ist es interessant, das Vorkommen des DOXP-Weges in Cyanobakterien zu überprüfen. In dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6714 wurden Phytol (Seitenkette von Chlorophyll *a*) und β -Carotin aus [1-¹³C]-Glucose und [6-¹³C]-Glucose nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Biosyntheschema markiert (C-1 und C-5 der Isopreneinheiten markiert; MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998). Nach Einbau von [U-¹³C₆]-Glucose in *Synechocystis* konnte im Phytol nachgewiesen werden, daß C-1, C-2 und C-4 der Isopreneinheiten als C₃-Einheit eingebaut werden (PROTEAU, 1998), wie bei der Biosynthese über DOXP zu erwarten. Es konnte aber bei Experimenten der Karlsruher Arbeitsgruppe mit *Synechocystis* weder aus 1-Desoxy-D-Xylulose, noch aus Mevalonsäure ein Einbau in Phytol gefunden werden. Möglicherweise kann 1-Desoxy-D-Xylulose von diesem Cyanobakterium nicht phosphoryliert werden. Auch ist im inzwischen vollständig sequenzierten Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 eine zum Eingangsenzym 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase aus *E. coli* und Pflanzen hoch homologe Gensequenz bekannt (SwissProt P73067). Auch eine zur DOXP Reduktoisomerase homologe Gensequenz ist im Genom von *Synechocystis* vorhanden (SwissProt Q55663). Offensichtlich realisieren Cyanobakterien die IPP-Biosynthese über den DOXP-Weg.

- *DOXP-Weg in Heterokontophyta und Rhodophyta*

Für die Goldalge *Ochromonas danica*, sowie für die thermophile Rotalge *Cyanidium caldarium* (Synonym *Galdieria sulphuraria*) ergab sich ein Bild der Kompartimentierung der IPP-Biosynthesen wie bei den höheren Pflanzen (Vgl. 4.2, S. 75). Die cytosolischen Sterole wurden aus [1-¹³C]-Glucose jeweils nach dem Acetat/Mevalonat-Weg markiert, während das plastidäre Phytol sowie das β -Carotin (*Ochromonas*) nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Biosyntheschema markiert wurden (MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998b). 1-Desoxy-D-Xylulose wurde in *Ochromonas* weder in Phytol noch in die Sterole eingebaut, während Mevalonsäure in die Sterole zu etwa 85 % eingebaut wurde und in Phytol nur etwa zu 10 % (MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998b). In *Cyanidium* wurde 1-Desoxy-D-Xylulose sehr effizient in das Phytol eingebaut (etwa 80 %), während Mevalonsäure hauptsächlich in die Sterole eingebaut wurde (MÜLLER, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997). *Ochromonas* und *Cyanidium* besitzen offensichtlich einen plastidären DOXP-Weg und im cytosolischen Kompartiment den Acetat/Mevalonat-Weg. Die Rotalgen (Rhodophyta) besitzen nur Chlorophyll *a* sowie die den Cyanobakterien ähnlichen Phycobilisomen als Lichtsammelkomplexe. Die Plastiden der Rhodophyta leiten sich vermutlich von Cyanobakterien ab (CAVALIER-SMITH, 1992). *Ochromonas* ist ein Vertreter der großen Algengruppe der Heterokontophyta, welche durch heterokonte Begeißelung und durch

Ausstattung mit Chlorophyll *a* und *c* ausgezeichnet sind. Ihre mit vier Membranen umgebenen Plastiden leiten sich von Eukaryontischen Algen, möglicherweise von Vertretern der Glaucophyta ab (sekundäre Endosymbiose; CAVALIER-SMITH, 1992; VAN DEN HOEK *et al.*, 1995). In beiden großen Algengruppen somit der DOXP-Weg für plastidäre Isoprenoide nachgewiesen werden.

- *Euglenophyta*

Schon 1960 wurde die Biosynthese des β -Carotin in *Euglena gracilis* mittels Einbau von [2-¹⁴C] Mevalonsäure studiert (STEELE und GURIN, 1960). Der chemische Abbau des β -Carotins zeigte den Einbau der ¹⁴C-Markierung aus [2-¹⁴C] Mevalonsäure in C-4 der Isopreneinheiten an (STEELE und GURIN, 1960). Somit war der Acetat-Mevalonat-Weg bewiesen für die Biosynthese eines plastidären Isoprenoides einer grünen einzelligen Alge, welche man damals noch den Grünalgen zurechnete. Bei Untersuchungen der Karlsruher Arbeitsgruppe zusammen mit der Straßburger Arbeitsgruppe um Prof. Rohmer wurde *Euglena gracilis* heterotroph auf [1-¹³C]-Glucose angezogen. Das Phytol wie auch die Sterole wurden aus [1-¹³C]-Glucose nach dem Acetat/Mevalonat-Weg markiert (MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998). Wurde ¹³C-markierte Mevalonsäure autotroph wachsenden Kulturen zugegeben, wurden die Sterole stärker markiert als das Phytol (MÜLLER, 1997). Deuterium-markierte 1-Desoxy-D-Xylulose wurde nur schwach in das Phytol eingebaut (MÜLLER, 1997). Der Acetat/Mevalonat-Weg wird also für die Biosynthese der Sterole und auch plastidärer Isoprenoide benutzt. Der schwache Einbau von 1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol kommt möglicherweise durch einen geringen Beitrag des DOXP-Weges zur plastidären IPP-Biosynthese in *Euglena* hin. Dafür spricht auch der relativ geringe Einbau von MVA in Phytol im Vergleich zu dem in die Sterole.

- *Plasmodium*

Plasmodium falciparum ist der bisher einzige Eukaryontische Organismus, für welchen der DOXP-Weg nachgewiesen wurde, ohne daß er einen Chloroplasten enthält (H. Jomaa, Universität Giessen, persönliche Mitteilung). Jedoch scheint in *Plasmodium* und anderen Apikomplexa ein rudimentärer Plastid zu bestehen. Für *Plasmodium* und für mehrere andere Vertreter dieser zu den Apikomplexa zählenden Parasiten wurde ein etwa 35Kb großes, extranukleäres Genom nachgewiesen, welches von der Organisation und Art der enthaltenen Gene eindeutig als rudimentäres plastidäres Genom identifiziert wurde (MCFADDEN *et al.*, 1997). Das extranukleäre Genom ist in einem mit mehreren Membranen umgebenen Organell enthalten (MCFADDEN *et al.*, 1997). Somit waren die Vorfahren dieser parasitischen Apikomplexa vermutlich plastidenführende Algen.

- *Plastiden-Endosymbiose*

Da sowohl in einigen Grünalgen und höheren Pflanzen, als auch bei Vertretern der Rhodophyta und der Heterokontophyta die IPP-Biosynthese aus Pyruvat und GAP immer plastidäre Isoprenoide betrifft, während die cytosolischen Sterole über den Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden, liegt es nahe anzunehmen, daß der DOXP-Weg jeweils mit den endosymbiontischen Vorläufern der Plastiden in die heterotrophe Wirtszelle aufgenommen wurde. Die eukaryontische Wirtszelle (Eucyte) dagegen verfügt immer über den Acetat/Mevalonat-Weg und behält diesen für das cytosolische Kompartiment bei. Als endosymbiontische Vorläufer der Plastiden in Grünalgen und Rotalgen kommen die Vorfahren der heutigen Cyanobakterien in Frage (CAVALIER-SMITH, 1992; VAN DEN HOEK *et al.*, 1995). Diese haben vermutlich den DOXP-Weg in Grünalgen, Rotalgen und höhere Pflanzen mitgebracht.

- **DOXP-Weg und Acetat/MVA-Weg in Eubakterien und Archaeobakterien**

Eine Übersicht über das Vorkommen des DOXP-Weges in Bakterien findet sich bei ROHMER (1999). Die zum Acetat/Mevalonat-Weg alternative IPP-Biosynthese wurde nachgewiesen in photosynthetischen Bakterien wie *Synechocystis* sp. PCC6714 (Cyanobacteria) sowie *Rhodopseudomonas palustris* und *Rhodopseudomonas acidophila* (Purpurbakterien). Die IPP-Biosynthese über DOXP wurde in gram-negativen Eubakterien wie *Methylobacterium fujisawaense*, *Methylobacterium organophilum*, *Zymomonas mobilis*, in Pseudomonaden sowie in *Escherichia coli* und einer ganzen Reihe weiterer Enterobakterien nachgewiesen (ROHMER, 1999). Auch wurde der DOXP-Weg in Gram-positiven Bakterien wie *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Corynebacterium ammoniagenes* und zwei *Mycobacterium*-Species nachgewiesen (ROHMER, 1999). Interessanterweise wurde in einem Vertreter der Gattung *Streptomyces* in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen je einer der beiden IPP-Biosynthesewege nachgewiesen (SETO *et al.*, 1996).

Für einige weitere Eubakterien wie *Myxococcus fulvus*, *Lactobacillus plantarum* oder *Flavobacterium* bestehen experimentelle Beweise für die Biosynthese der Isoprenoide über den Acetat/Mevalonat-Weg (ROHMER, 1999). Unter den Archaeobakterien wurde ebenfalls der Acetat/Mevalonat-Weg nachgewiesen (z.B. in *Halobacterium cutirubrum*) und es ist noch kein Vertreter dieser Gruppe bekannt, welcher den DOXP-Biosyntheseweg verwendet (ROHMER, 1999).

4.6.5 Acetat/Mevalonat-Weg in Pilzen und Mammalia

Es gibt verschiedene Berichte über den Nachweis des Acetat/Mevalonat-Biosyntheseweges der IPP-Biosynthese in Pilzen (zusammengefaßt in DISCH und ROHMER, 1998). So wird z. B. β -Carotin in *Phycomyces blakesleanus* über Mevalonsäure gebildet (BRAITHWAITE und GOODWIN, 1960b). Auch für die β -Carotin-Biosynthese in der Hefe *Rhodotorula glutinis* konnte dieser klassische IPP-Biosyntheseweg nachgewiesen werden (DISCH und ROHMER, 1998). Alle bisher bekannten Literaturdaten sprechen für das Vorkommen des alternativen Pyruvat/GAP IPP-Weges nur unter den Eubakterien und in photosynthetischen Eukaryonten. Für plastidenfreie Eukaryonten konnte bisher die Existenz des alternativen IPP-Weges noch nicht belegt werden. Für verschiedene Mammalia wie Mensch, Hamster und Maus konnte bei den vom Autor durchgeführten Homologiesuchen in Gendatenbanken nie eine DXS- oder DXR-homologe Gensequenz gefunden werden, was als Hinweis auf das komplette Fehlen dieses Biosyntheseweges in diesen Organismen gewertet werden kann. Das komplette Fehlen des DOXP-Weges in den Mammalia macht die Enzyme dieses Biosyntheseweges zu einem idealen Angriffspunkt für Antibiotika.

4.6.6 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat als IPP-Vorstufe

- **1-Desoxy-D-Xylulose als IPP-Vorstufe in Pflanzen**

Die Massenspektren des mit $^2\text{H}_1$ -1-Desoxy-D-Xylulose markierten Phytol aus den Grünalgen *Gloeoilopsis* und *Scenedesmus* wie auch aus *Lemna gibba* und *Hordeum vulgare* zeigten deutlich, daß Phytol an vier Positionen mit Deuterium markiert wurde (siehe 3.1.3, S. 41). Dies ist zu erwarten, wenn jede der vier Isopreneinheiten aus einem Molekül 1-Desoxy-D-Xylulose entsteht. Eine Untersuchung der genauen Lokalisation der Deuterium-Markierung aus $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose im Phytol-Molekül konnte für die Rotalge *Cyanidium caldarium* durchgeführt werden, welche Phytol und β -Carotin nach dem DOXP-Weg bildet (MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998b). Das ^1H -NMR-Spektrum des zu 80 – 90 % aus $^2\text{H}_1$ -1-Desoxy-D-Xylulose markiertem Phytol zeigte, daß sich die Deuterium-Markierung in den Methylgruppen C-17, C-18, C-19 und C-20 befindet (vgl. Abbildung 1-1; MÜLLER, 1997;

SCHWENDER *et al.*, 1997). Dieser hochgradige und spezifische Einbau von 1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol impliziert, daß 1-Desoxy-D-Xylulose eine C₅-Vorstufe des IPP ist. Die Umlagerung des C-Gerüsts der 1-Desoxy-D-Xylulose zum verzweigten Gerüst des IPP (vgl. Abbildung 4-4) konnte von anderen Arbeitsgruppen durch Einbau ¹³C-doppelmarkierter 1-Desoxy-D-Xylulose für *E. coli* (Ubichinon-Seitenkette, ROSA PUTRA *et al.*, 1998) und später für *Catharanthus roseus* (Phytol, β-Carotin, ARIGONI *et al.*, 1997) nachgewiesen werden. Inzwischen wurde auch gezeigt, daß ¹⁴C-markiertes 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat von Chromoplastenpräparationen aus Paprika und Narzissen-Blüten in β-Carotin eingebaut wird (FELLMEIER *et al.*, 1999).

Für den ersten Schritt der IPP-Biosynthese nach dem Mevalonat-unabhängigen Weg muß es in Grünalgen und höheren Pflanzen ein Enzym geben, welches aus Pyruvat und GAP 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat bildet. Wie in Abschnitt 3.3 (S.49) ausgeführt konnte die cDNA einer 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) aus *Chlamydomonas reinhardtii* kloniert werden. Expression der cDNA in *E. coli* führte zu einer Enzymaktivität, welche aus Pyruvat und GAP 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat bildet. Das DXS-Gen wurde auch aus verschiedenen höheren Pflanzen kloniert (LANGE *et al.*, 1998 BOUVIER *et al.*, 1998 MANDEL *et al.*, 1996).

- **Einbauraten aus [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose in Isoprenoide**

Die von einem Organismus aus der Nährlösung aufgenommene Isotopen-markierte 1-Desoxy-D-Xylulose muß zum Intermediat 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat phosphoryliert werden, um in die IPP-Biosynthese einzugehen. Der Phosphorylierungsschritt kann eine Limitierung der Einbaurate bedeuten, oder es findet kein Einbau statt. Bei verschiedenen Grünalgen und höheren Pflanzen wurde 1-Desoxy-D-Xylulose in einer Konzentration von 0,05 % im Nährmedium angeboten. Die Einbauraten in die Isoprenoide lagen zwischen 10 und 40 %. Nur bei der Grünalge *Gloeotilopsis planctonica* wurden das Phytol und die Sterole zu über 70 % markiert (siehe 3.1.3, S. 41). Die Erforderlichkeit einer geeigneten Kinase wird durch das Beispiel der Rotalge *Cyanidium caldarium* verdeutlicht. Bei dieser Alge konnte ein über 80 %iger Einbau der Vorstufe 1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol erreicht werden (MÜLLER, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997). Diese Alge ist in der Lage, auf verschiedenen Pentosen als Kohlenstoff-Quelle zu wachsen. Dabei wird nachweislich eine Pentulose-Kinase induziert (GROSS *et al.*, 1997), welche vermutlich auch durch 1-Desoxy-D-Xylulose induziert wird und dieses phosphorylieren kann.

- **Die Rolle des DOXP als IPP-Vorstufe ist in *E. coli* am besten untersucht**

Die Untersuchungen über die IPP-Biosynthese in *E. coli* liefern die bisher detailliertesten Belege für den Biosynthesemechanismus aus Pyruvat und GAP über 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat. Bei Untersuchungen der Isoprenoidbiosynthese in *E. coli* konnte schon 1994 in der Arbeitsgruppe Arigoni (Zürich) gezeigt werden, daß Deuterium-markierte 1-Desoxy-D-Xylulose sehr effizient in die Ubichinon-Seitenkette eingebaut wird und daß der Ubichinon-Gehalt der Zellen ansteigt, wenn sich 1-Desoxy-D-Xylulose im Medium befindet (BROERS, 1994). Später konnte von den Arbeitsgruppen Rohmer (Strasbourg) und Sahm (Jülich) für *E. coli* gezeigt werden, daß Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat (nicht jedoch Dihydroxyacetonphosphat) direkte Vorläufer von IPP sind. Dies gelang mit Hilfe von 6 verschiedenen *E. coli*-Mutanten des Triosephosphat-Metabolismus. Mit dem Verfüttern von ¹³C-markiertem Pyruvat oder ¹³C-markiertem Glycerin an die verschiedenen *E. coli*-Mutanten und Analyse des gebildeten Ubichinon konnte Dihydroxyacetonphosphat gegenüber GAP als IPP-Vorstufe ausgeschlossen werden (ROHMER *et al.*, 1996). Somit erfolgt in *E. coli* die Addition einer von Pyruvat abgeleiteten C₂-Einheit (wahrscheinlich Hydroxyethyl-Thiamin) an Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und es entsteht 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat. Der

Einbau von [2-¹³C]-, [2, 3-¹³C₂]-, und [2, 4-¹³C₂]-1-Desoxy-D-Xylulose in Ubichinon von *E. coli* zeigte die eindeutige Zuordnung aller C-Atome aus 1-Desoxy-D-Xylulose zu denen des IPP (ROSA PUTRA *et al.*, 1998). Ein Enzym, welches die Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat aus Pyruvat und GAP mit Thiamin-Pyrophosphat als Cofaktor katalysiert, die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS), wurde aus *E. coli* kloniert. Es handelt sich um ein 65 kDa großes Protein, dessen Aminosäuresequenz Homologie zu Transketolasen aufweist (LOIS *et al.*, 1998).

Die Pentulose 1-Desoxy-D-Xylulose ist nicht nur biosynthetische Vorstufe von Isoprenoïden. Dieser Zucker ist schon länger in *E. coli* als Vorläufer des Thiaminpyrophosphat und des Pyridoxal-Phosphat bekannt (DAVID *et al.*, 1981; HILL *et al.*, 1989; 1996; HIMMELDIRK *et al.*, 1996). Ebenfalls in höheren Pflanzen wurde 1-Desoxy-D-Xylulose als Vorstufe von Thiaminpyrophosphat identifiziert (JULLIARD und DOUCE, 1991).

4.6.7 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat als weitere IPP-Vorstufe

Daß 2-C-Methyl-D-erythritol (vgl. Abbildung 4-9) eine Vorstufe für Isoprenoïde in *E. coli* ist, konnte durch den Einbau von Deuterium-markiertem 2-C-Methyl-D-Erythritol in die Prenyl-Seitenketten von Ubichinon und Menachinon in *E. coli* gezeigt werden (DUVOLD *et al.*, 1997b). Von *Corynebacterium ammoniagenes* wird unter oxydativem Streß 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclo-Diphosphat gebildet. Nach Verfütterung verschieden ¹³C-markierter Glucosen, wurde 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-Diphosphat in der Weise markiert, wie es dessen Ableitung aus 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat durch Umlagerung fordert (DUVOLD *et al.*, 1997a). Auch wurde inzwischen aus *E. coli* ein Enzym kloniert, welches 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat über eine C-C-Umlagerung und einen Reduktionsschritt in 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat umsetzt (vgl. Abbildung 4-8; KUZUYAMA *et al.*, 1998a; TAKAHASHI *et al.*, 1998). Die Verbindung der Umlagerung mit der anschließenden Reduktion findet sich ähnlich bei der von der Ketosäure-Reduktoisomerase katalysierten Reaktion wieder.

2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat ist offensichtlich auch in Pflanzen ein weiteres Intermediat der IPP-Biosynthese. Der unphosphorylierte Alkohol 2-C-Methyl-D-erythritol wurde in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen (ANTHONSEN *et al.*, 1976; DITTRICH und ANGYAL, 1988). 1-Desoxy-D-Xylulose ist eine Vorstufe für das in *Liriodendron tulipifera* gebildete und akkumulierte 2-C-Methyl-D-erythritol (SAGNER *et al.*, 1998). Ein zur *E. coli*-1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) homologes Gen wurde im Rahmen dieser Arbeit aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und das Enzym wurde funktionell exprimiert (siehe 3.4.2, S. 62). Inzwischen konnte auch an Chromoplastenpräparationen aus Paprika und Narzissenblüten der Einbau von ¹⁴C-markiertem 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat in β -Carotin gezeigt werden (FELLMEIER *et al.*, 1999). Der Einbau von 2-C-Methyl-D-erythritol in Isoprenoïde von Grünalgen gelang bisher nicht (Ergebnis der Karlsruher Arbeitsgruppe). Dies könnte jedoch daran liegen, daß die untersuchten Pflanzen den angebotenen Alkohol nicht zum phosphorylierten Intermediat umsetzen können. Jedenfalls gibt es noch keine Belege für den Einbau von 2-C-Methylerythritol in Isoprenoïde von Pflanzen.

Die aus *A. thaliana* klonierte DXR ist hemmbar durch Fosmidomycin, einen Hemmstoff der der *E. coli* DXR (KUZUYAMA *et al.*, 1998b). Auch die Isopren-Biosynthese bei verschiedenen Pflanzen, die Biosynthese von Carotinoiden und Chlorophyll bei der Ergrünung von Gerstenkeimlingen sowie die Bildung von Lycopin während der Reifung von Tomatenfrüchten wird durch Fosmidomycin gehemmt (ZEIDLER *et al.*, 1998). Die Hemmung der DXR einer Pflanze durch Fosmidomycin sowie die Hemmung der Biosynthese verschiedener Isoprenoïde in Pflanzen sprechen dafür, daß die DXR in Pflanzen an der

Isoprenoidbiosynthese beteiligt ist, d. h. die Umsetzung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat in 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat einen weiteren Schritt der pflanzlichen IPP-Biosynthese darstellt.

Zusammenfassend seien nochmals die Argumente benannt, welche für 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat als Vorstufe von IPP und Isoprenoiden sprechen: Das Vorkommen des unphosphorylierten Alkohols 2-C-Methyl-D-erythritol in verschiedenen Bakterien und Pflanzen, der Einbau von isotope-markiertem 2-C-Methyl-D-erythritol in Isoprenoide in *E. coli*, die Klonierung einer 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) in *E. coli* und *Arabidopsis thaliana* sowie ein Hemmstoff (Fosmidomycin) der sowohl das Enzym DXR als auch die Biosynthese plastidärer Isoprenoide in Pflanzen hemmt.

4.6.8 Weitere Intermediate des DOXP-Weges

Daß das Endprodukt der Isoprenoid-Biosynthese aus DOXP tatsächlich IPP und nicht etwa DMAPP ist, wurde mit verschiedenen experimentellen Ansätzen für *Cathanthus roseus* (ARIGONI *et al.*, 1999) und *Mentha x piperita* (MCCASKILL und CROTEAU, 1999) gezeigt. Für die weiteren Biosyntheseschritte zwischen 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat (MEP) und IPP kann man annehmen, daß die drei OH-Gruppen im MEP nach einem aus vielen Biosynthesen bekannten Schema entfernt werden: Die Eliminierung von H₂O und anschließende Reduktion der entstandenen Doppelbindung (R-CH₂-CHOH-R' \square R-CH=CH-R' + H₂O; R-CH=CH-R' + H₂ \square R-CH₂-CH₂-R'). Mittels Deuterium-Markierungen konnte inzwischen für *E. coli* der Verbleib aller Protonen aus 1-Desoxy-D-Xylulose im isoprenoiden Endprodukt Ubichinon-10 untersucht werden. In *E. coli* bleiben die Deuterium-Markierungen aus [1-²H₃]-DOX (GINER und JAUN, 1998), die aus [4-²H₁]-DOX (GINER *et al.*, 1998) und die aus [5-²H₂]-DOX (BROERS, 1994) im isoprenoiden Endprodukt erhalten. Alle Protonen an C-1, C-4 und C-5 des DOXP bleiben also bis zum IPP erhalten. Dies sind die Protonen an C-3, C-4 und C-5 des MEP (vgl. Abbildung 4-8, S. 86; Abbildung 4-9). Weil die Protonen an C-3 und C-4 des MEP erhalten bleiben, ist eine Eliminierung von H₂O zwischen C-3 und C-4 des MEP und weiteren Intermediaten ausgeschlossen. Da die Protonen an C-5 des MEP erhalten bleiben, ist eine Eliminierung von H₂O zwischen C-2 und C-5 des MEP auszuschließen.

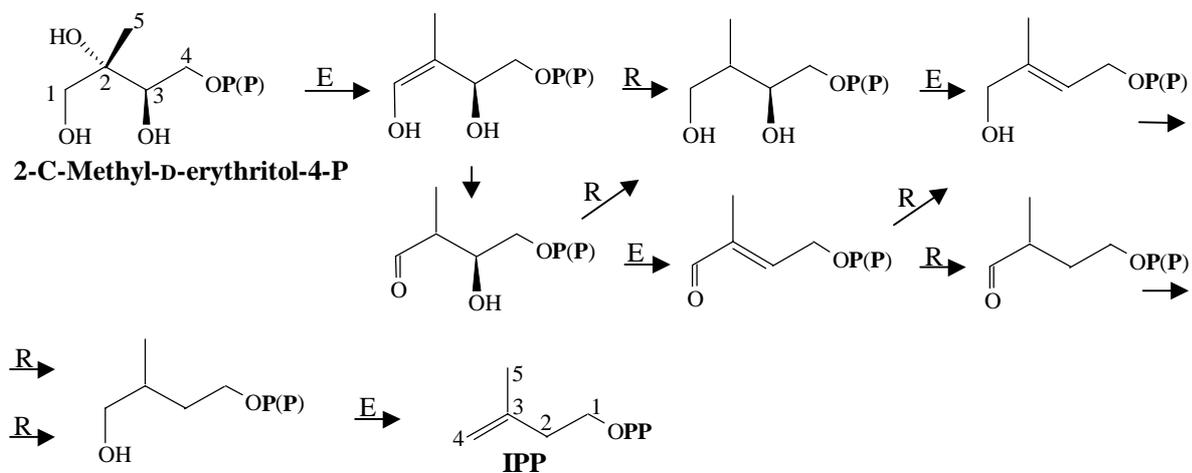


Abbildung 4-9 Möglich Intermediate zwischen 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat und IPP. Der Schritt der Phosphorylierung zum Diphosphat kann auf jeder Stufe erfolgen und ist deshalb nicht angezeigt. E = Eliminierung von H₂O, R = Reduktion.

Schließlich kann die Abspaltung von 2-OH (MEP) zusammen mit 3-H (MEP) ausgeschlossen werden, da dies den vollständigen Verlust einer Deuterium-Markierung an C-3 (MEP) bedeuten würde. Man kann viele der möglichen Wasserabspaltungen ausschließen und so genauer abgrenzen, welche Reaktionsschritte in welcher Reihenfolge zwischen 2-C-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat und IPP liegen. Das in Abbildung 4-9 gezeigte Schema beinhaltet alle noch möglichen Biosynthese-Sequenzen und geht davon aus, daß die letzte Eliminierung von H₂O zur Doppelbindung im Endprodukt IPP führt. Der Schritt der Phosphorylierung zum Diphosphat könnte auf jeder Stufe der gezeigten Reaktionssequenz stattfinden.

4.7 Ausblick:

Eine interessante Aufgabe bleibt die Suche nach weiteren Intermediaten und Enzymen des DOXP-Weges in Pflanzen. Hierzu wird in der Arbeitsgruppe Lichtenthaler derzeit die Isolierung solcher Intermediate wie auch die Identifizierung weiterer Gene/Enzyme verfolgt.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Enzyme des DOXP-Weges könnten noch weiter biochemisch charakterisiert werden.

Es wäre auch interessant, an einigen höheren Pflanzen das Vorkommen von DXS- und DXR-Sequenzen im Genom möglichst genau zu untersuchen und die Lokalisation der Enzyme im Plastiden zu belegen. Man könnte so das Modell der Kompartimentären Trennung des DOXP-Weges und des Acetat/MVA-Weges in Plastid und Cytosol weiter bestätigen.

Mittels der ¹⁴C-markierten IPP-Vorstufen MVA und DOX könnte bei verschiedenen Pflanzen der Austausch an Isoprenoid-Vorstufen zwischen Plastid und Cytosol genauer untersucht werden.

Die Messung der Expression und der Enzymaktivitäten der Enzyme des DOXP-Weges in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand bzw. vom Entwicklungszustand der Pflanzen kann Aufschluß über deren Regulation geben. Es wäre interessant zu wissen, welche Enzymaktivitäten des DOXP-Weges limitierend für die gesamte Isoprenoid-Biosynthese sind. Diese Enzyme sind speziell geeignet als Angriffspunkte für Herbizide wie auch für die gentechnologische Verbesserung der Ausbeute an Isoprenoiden aus Nutzpflanzen.

Es wurden in dieser Arbeit nur einige Gruppen der Grünalgen auf die IPP-Biosynthese untersucht. Weitere Untersuchungen über die Verbreitung des DOXP-Weges und des Acetat/MVA-Weges unter den Grünalgen könnte genauer klären, in welchen Gruppen der Acetat/Mevalonat-Weg verloren ging und ob dieser Verlust einmalig an der Basis einer Gruppe stattfand oder mehrfach unabhängig auftrat. Dies könnte näher an die Frage heranführen, welcher evolutionäre Druck die Eliminierung eines der alternativen Biosynthesewege bewirkt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde an mehreren Vertretern der Höheren Pflanzen und Grünalgen geprüft, auf welchem Wege der Grundbaustein der Isoprenoidbiosynthese, Isopentenylpyrophosphat (IPP), gebildet wird. Dafür wurde bei verschiedenen Grünalgen und höheren Pflanzen mittels Isotopenmarkierungen die Biosynthese von plastidären Prenyllipiden (Phytol, Carotinoide, Plastochinon-9) sowie der im cytosolischen Kompartiment gebildeten Sterole untersucht. Der schon seit etwa 1958 bekannte Acetat/Mevalonat-Weg war bisher der einzige in Pflanzen bekannte Biosyntheseweg für IPP. Das Vorkommen und die Bedeutung des in Eubakterien und in einer Grünalge zwischen 1993 und 1995 entdeckten alternativen IPP-Biosyntheseweges (Pyruvat/Triocephosphat- oder DOXP-Weg) in Grünalgen und höheren Pflanzen wurde durch Markierungsstudien und durch molekularbiologische Studien untersucht.

Zur Untersuchung der Biosynthese einzelner Isoprenoide wurden zwei Methoden angewandt:

1. Nach heterotrophem Wachstum von Grünalgen oder höheren Pflanzen auf Glucose, welche mit $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose angereichert war, wurden Phytol, β -Carotin und Plastochinon-9 sowie die Haupt-Sterolkomponenten isoliert und mittels ^{13}C -NMR jeweils die ^{13}C -Anreicherung an allen Positionen des Kohlenstoff-Gerüsts der Isoprenoide bestimmt. Die sich in Bezug auf die Isopreneinheit ergebenden Markierungsmuster wurden im Hinblick auf die Biosynthese des Isopentenyl-Diphosphat (IPP) interpretiert.
2. Die IPP-Vorstufen Mevalonsäure und 1-Desoxy-D-Xylulose wurden in Isotopenmarkierter Form (^2H , ^{13}C) verschiedenen Grünalgen und Pflanzen angeboten. Die Anreicherung der Vorstufen in Phytol und in den Sterolen konnte nach Analyse einer Lipidfraktion mittels GC/MS durch die Auswertung von MS-Spektren bestimmt werden.

Die Klonierung der ersten zwei Gene der alternativen IPP-Biosynthese aus Pflanzen gelang ausgehend von aus *E. coli* bereits bekannten Gensequenzen. Für die Klonierung der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase wurde eine *Chlamydomonas*-cDNA-Bibliothek durchsucht. Für die Klonierung der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana* wurde eine PCR-basierte Klonierungsmethode angewandt.

5.1 Isoprenoidbiosynthese in Grünalgen

Der Einbau von $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat und von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose in die Isoprenoide der Grünalge *Scenedesmus obliquus* ergänzt frühere Erkenntnisse über die Mevalonat-unabhängige IPP-Biosynthese dieser Grünalge. Aus dem Einbau von $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat und dem schon bekannten Markierungsmuster der Isoprenoide aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose wurde abgeleitet, daß in *Scenedesmus* die C-Atome C-3 und C-5 der Isopreneinheiten aus Pyruvat stammen. Der von manchen Autoren für Pflanzen vermutete Einbau von Pyruvat über Acetyl-CoA in Isoprenoide wurde durch einen Vergleich der Markierungsmuster von Isoprenoiden aus $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat und $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat ausgeschlossen.

Nach Verfütterung von Deuterium-markierter $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose an autotroph wachsende *Scenedesmus*-Kulturen wurde mittels massenspektroskopischen Analysen nachgewiesen, daß Phytol-Moleküle an vier Positionen mit Deuterium markiert waren, wie zu erwarten, wenn $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose eine Vorstufe für die vier Isopreneinheiten ist.

Für das Phytol wie für die Sterole wurde eine Einbaurate von 40 % festgestellt. Ein Enzym, welches die Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat katalysiert, wurde in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen (siehe 5.3, S. 105). Dieses ist sicherlich auch in *Scenedesmus* das Eingangsenzym der IPP-Biosynthese, da in *Chlamydomonas reinhardtii* der Einbau von [1-¹³C]-Glucose in verschiedene Isoprenoide sowie der Einbau von 1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol und in die Sterole auf die identische IPP-Biosynthese wie bei *Scenedesmus obliquus* hinwies. Somit wurde die zu Beginn der vorliegenden Arbeit aufgestellte Vermutung bestätigt, daß der erste Schritt der IPP-Biosynthese in der Grünalge *Scenedesmus* in der Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat besteht.

In Ergänzung zu den Markierungsversuchen mit *Scenedesmus obliquus* wurde durch Einbau von [1-¹³C]-Glucose in zwei weitere einzellige Grünalgen, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Chlorella fusca* gezeigt, daß sowohl plastidäre Isoprenoide (Phytol, β -Carotin, Lutein) als auch cytosolische Isoprenoide (Sterole) nicht nach dem Acetat/Mevalonat-Weg, sondern nach dem DOXP-Biosynthese gebildet werden.

Weiter wurde die Verbreitung der beiden alternativen IPP-Biosynthesen in Vertretern verschiedener Grünalgen-Klassen mittels Verfütterung der markierten IPP-Vorstufen [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und [2-¹³C]-Mevalonsäure untersucht. Vertreter der Chlorophyceae (*Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*) und der Ulvophyceae (*Gloeotilopsis planctonica*) zeigten Einbau von 1-Desoxy-D-Xylulose in Phytol und in die Sterole, während aus Mevalonsäure kein Einbau nachweisbar war. Die Biosynthese der plastidären wie auch der cytosolischen Isoprenoide verläuft also offensichtlich ausschließlich über den DOXP-Weg. Dagegen zeigten Vertreter der den Landpflanzen relativ nahestehenden Charophyceae (*Klebsormidium flaccidum*, *Spirogyra* sp.) eine cytosolische IPP-Bildung über Mevalonsäure an (Markierung der Sterole aus Mevalonsäure), während die plastidären Isoprenoide (Phytol) über den DOXP-Weg gebildet werden. Die bei den Charophyceae gefundene Biosynthese der Isoprenoide im Cytosol über Mevalonat und im Plastiden über DOXP wurde auch in höheren Pflanzen gefunden (siehe 5.2, S. 104). Es ist deshalb zu vermuten, daß die gemeinsamen stammesgeschichtlichen Vorläufer der Landpflanzen und der Grünalgen beide IPP-Biosynthesen in der genannten kompartimentären Trennung besaßen, während die Untergruppe der Chlorophyta (Chlorophyceae, Ulvophyceae) – oder einzelne Vertreter dieser – die cytosolische IPP-Biosynthese über Mevalonat gänzlich verloren oder möglicherweise soweit reduzierten, daß er nicht mehr nachweisbar ist.

5.2 Isoprenoidbiosynthese in höheren Pflanzen

Die Isoprenoidebiosynthese in grünen Geweben dreier höherer Pflanzen wurde mittels Einbau von [1-¹³C]-Glucose und anschließender Analyse isolierter Isoprenoide durch ¹³C-NMR untersucht. Die Wasserlinse (*Lemna gibba*), grüne Kallus-Gewebekulturen von *Daucus carota* und Kulturen isolierter Embryonen von *Hordeum vulgare* wurden unter Schwachlichtbedingungen auf [1-¹³C]-Glucose angezogen. Phytol, β -Carotin, Lutein und die isoprenoide Seitenkette des Plastochinon-9 aus *Lemna gibba* sowie Phytol und Lutein aus *Daucus carota* und Phytol aus *Hordeum vulgare* wurden untersucht. In allen untersuchten plastidären Isoprenoiden fand sich das aus Grünalgen bekannte Markierungsmuster der Isopreneinheiten wieder. Dies zeigt die IPP-Bildung nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Schema an. Dagegen wurden in allen drei Pflanzen die Sterole nach dem klassischen Acetat/Mevalonat-Weg markiert. Außerdem wurde gezeigt, daß ²H-markierte 1-Desoxy-D-Xylulose, die mutmaßliche erste C₅-Vorstufe des IPP, in *Lemna gibba* besser in das Phytol, als in die Sterole eingebaut wird. Umgekehrt wird ¹³C-markierte Mevalonsäure überwiegend in die Sterole eingebaut. Zusammengefasst haben die Einbauversuche mit [1-¹³C]-

Glucose, mit ^2H -markierter 1-Desoxy-D-Xylulose sowie mit ^{13}C -markierter Mevalonsäure gezeigt, daß im Plastiden der höheren Pflanze nicht der Acetat/Mevalonat-Weg, sondern ein dazu alternativer IPP-Biosyntheseweg über 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat vorliegt.

Die beiden IPP-Biosynthesen im Plastiden und im Cytosol sind offenbar nicht vollständig voneinander getrennt. Für alle drei untersuchten höheren Pflanzen konnte festgestellt werden, daß neben dem Acetat/Mevalonat-Weg auch der DOXP-Weg zu bis zu etwa 30% an der Sterol-Biosynthese beteiligt ist. Dies deutet darauf hin, daß Isoprenoid-Vorstufen (evtl. IPP) aus dem Plastiden in das cytosolische Kompartiment exportiert werden.

Neben der Isoprenoid-Biosynthese in grünen Geweben wurde auch die Biosynthese eines Sekundärcarotinoids, des in Tomatenfrüchten akkumulierten Lycopin, untersucht. Durch Injektion wässriger Lösungen von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose und $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose in Tomatenfrüchte zum Zeitpunkt der beginnenden Reife (i. e. der Lycopinbildung) konnte das in Chromoplasten gebildete und akkumulierte Lycopin markiert werden. Aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose wurde das Lycopin wie schon die Isoprenoide der Grünalgen und die plastidären Isoprenoide aus *Lemna*, *Daucus* und *Hordeum* nach dem Pyruvat/Triosephosphat-Schema markiert. Die Markierungsmuster des Lycopin aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose stehen im Einklang mit der Bildung einer C_5 -Vorstufe des IPP durch Addition einer von Pyruvat abgeleiteten C_2 -Einheit an eine C_3 -Einheit (Glycerinaldehyd-3-Phosphat). Der Nachweis des Einbaues von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Desoxy-D-Xylulose in Lycopin gelang allerdings nicht. Möglicherweise kann die 1-Desoxy-D-Xylulose in diesem Gewebe nicht in das eigentliche Intermediat, 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat umgesetzt werden.

Zusammenfassend konnte für höhere Pflanzen gezeigt werden, daß die plastidären Isoprenoide, entgegen allen bisherigen Annahmen, nicht über den lange bekannten Acetat/Mevalonat-Weg, sondern über den aus Bakterien und der Grünalge *Scenedesmus* bekannten DOXP-Weg gebildet werden. Viele bisher nicht erklärbare Markierungsbefunde über die Biosynthese von plastidären Prenyllipiden wie Phytol (Chlorophyll-Seitenkette), β -Carotin oder Plastochinon-9 aus der älteren Literatur können vor dem Hintergrund der Biosynthese von IPP über den DOXP/MEP-Weg besser gedeutet werden.

5.3 Klonierung und heterologe Expression der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* bildet wie *Scenedesmus obliquus* cytosolische und plastidäre Isoprenoide nach dem DOXP-Weg. Aus einer *Chlamydomonas* λ -cDNA-Bibliothek wurde ein wahrscheinlich kompletter, 3,2 Kbp langer cDNA-Klon isoliert und sequenziert. Dieser Klon codiert für ein Protein, welches Sequenzhomologie zur 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) aus *E. coli* und anderen Organismen aufweist. Die proteincodierende Sequenz (735 Aminosäuren) besitzt einen N-terminalen, etwa 80 Aminosäuren langen Abschnitt, welcher wahrscheinlich ein Transitpeptid für den Eintransport in den Plastiden darstellt. Die Expression der proteincodierenden Sequenz (ohne Transitpeptid) in *E. coli* ermöglichte den Nachweis der enzymatischen Aktivität als 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS). Southernblot-Analysen sprechen gegen das Vorkommen von Isoformen der DXS in *Chlamydomonas reinhardtii*.

5.4 Klonierung und heterologe Expression der 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) aus *Arabidopsis thaliana*

Als weiteres, an der Biosynthese der Isoprenoide über DOXP beteiligtes pflanzliches Enzym konnte ein cDNA-Fragment aus *Arabidopsis thaliana* kloniert werden, welches für 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) codiert. Ein solches Enzym war erst 1998 aus *E. coli* kloniert und beschrieben worden. Mit der Aminosäuren-Sequenz der *E. coli*-DXR konnte in einer Gen-Datenbank das vermutliche DXR-Gen aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Durch eine PCR-basierte Klonierungsstrategie konnte aus *Arabidopsis*-mRNA ein entsprechender 1,3 Kbp großer cDNA-Klon gewonnen werden, welcher für die DXR-homologe Proteinsequenz codiert. Nach Expression der cDNA in *E. coli* konnte die Enzymaktivität als DXR nachgewiesen werden. Das Enzym ist hemmbar durch Fosmidomycin, ein Hemmstoff der bei höheren Pflanzen die Biosynthese plastidärer Isoprenoide blockiert.

5.5 Diskussion weiterer Literatur

Aus vielen älteren Einbaustudien mit höheren Pflanzen geht hervor, daß markierte Mevalonsäure gut in die Sterole, aber kaum in plastidäre Isoprenoide (β -Carotin, Chlorophyll, Plastochinon-9) eingebaut wird. Auch wurde vielfach erfolglos versucht, in isolierten Plastiden die Existenz des Acetat/Mevalonat-Weges zweifelsfrei nachzuweisen. All dies spricht dafür, daß im Plastiden IPP nicht über MVA, sondern über den DOXP-Weg gebildet wird.

Die Biosynthese über den DOXP-Weg wurde inzwischen für eine ganze Reihe von pflanzlichen Monoterpenen und Diterpenen nachgewiesen, während Sesquiterpene und Sterolen über den Acetat/Mevalonat-Weg entstehen. In einigen Fällen werden Sterole oder Sesquiterpene offenbar auch zu großen Anteilen aus beiden IPP-Biosynthese gebildet. Grundsätzlich zeigt sich aber, daß die Mono- und Diterpene, für welche der Plastid der Bildungsort ist, über den DOXP-Weg gebildet werden, während die im Cytosol gebildeten Sesqui- und Triterpene über den Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden.

Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnissen über die Isoprenoidbiosynthese im Plastiden und im Cytosol wurde auch das Mitochondrium als Biosynthesekompartiment für Isoprenoide (Ubichinon) diskutiert. Die hierzu in der Literatur auffindbaren Daten sprechen dafür, daß die in Einzelfällen für höhere Pflanzen nachgewiesene Biosynthese der Prenyl-Seitenkette des Ubichinon über Mevalonat allgemein für höhere Pflanzen gilt.

Die phylogenetische Herkunft des DOXP-Weges aus prokaryotischen Vorläufern der Plastiden wurde diskutiert. Der DOXP-Weg der IPP-Biosynthese ist in höherer Pflanzen offensichtlich in den Plastiden lokalisiert. Wie neuere Publikationen zeigen, trifft dies auch für Vertreter der zweier großer Algengruppen, der Heterokontophyta und der Rhodophyta zu. Zudem wurde der DOXP-Weg in einem Cyanobakterium nachgewiesen. Es scheint also offensichtlich, daß der DOXP-Weg nur in Bakterien, Cyanobakterien und den Plastiden photosynthetischer Organismen vorkommt. Vermutlich haben also die endosymbiontischen prokaryotischen Vorläufer der Plastiden (vermutlich Cyanobakterien-ähnliche Organismen) diese IPP-Biosynthese in den Eukaryontischen Wirt mitgebracht.

Die bisher aus Bakterien und Pflanzen bekannten Fakten über einzelne Biosyntheseschritte des DOXP-Weges wie auch weitere mögliche Intermediate wurden diskutiert.

5.6 Ausblick

Am Ende der Diskussion wird ein Ausblick gegeben auf mögliche weiterführende Arbeiten zur Klärung der weiteren Schritte des DOXP-Weges der IPP-Bildung und zur weiteren Untersuchung dessen Verbreitung in photosynthetisch aktiven Pflanzen und Algen.

- AACH, H., BÖSE, G. und GRAEBE, J. E.: *ent*-Kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings and the localization of *ent*-kaurene synthase in plastids of three species. – *Planta* **197**, 333-342 (1995).
- ADAM, K.-P. und ZAPP, J.: Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. - *Phytochemistry* **48**, 953-959 (1998).
- ADAM, K.-P., THIEL, R., ZAPP, J. und BECKER, H.: Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde-pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpos natans*. - *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 181-187 (1998).
- ALBRECHT, M. und SANDMANN, G.: Light stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphat isomerase. - *Plant Physiol.* **105**, 529-534 (1994).
- ANTHONSEN, T. HAGEN, S., KAZI, M. A., SHAH, S. W. und TAGAR, S. A.: 2-C-Methylerythritol, a new branched alditol from *Convolvulus glomeratus*. - *Acta Chem. Scand. B* **30**, 91-93 (1976).
- AREBALO, R.E. und MITCHEL, E. D.: Cellular distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase and mevalonate kinase in leaves of *Nepeta cataria*. - *Phytochemistry* **23**, 13-18 (1984).
- ARIGONI, D., SAGNER, S., LATZEL, C., EISENREICH, W., BACHER, A. und ZENK, M. H.: Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10600-10605 (1997).
- ARIGONI, D., EISENREICH, W., LATZEL, C., SAGNER, S., RADYKEWICZ, T., ZENK, M. H. und BACHER, A.: Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1309-1314 (1999).
- BACH, T. J. und LICHTENTHALER, H. K.: Inhibition of mevalonate biosynthesis and of plant growth by the fungal metabolite mevinolin. – In: Wintermanns, J.F.G.M., Kuiper, P.J.C. (Hrsg.): *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. Elsevier, Amsterdam, S. 515-521 (1982a).
- BACH, T.J. und LICHTENTHALER, H. K.: Mevinolin - a highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase of radish plants. - *Z. Naturforsch.* **37c**, 46-50 (1982b).
- BACH, T.J. und LICHTENTHALER, H.K.: Mechanisms of inhibition by mevinolin (MK 803) of microsome-bound radish and of partially purified yeast HMG-CoA reductase (EC.1.1.1.34). - *Z. Naturforsch.* **38c**, 212-219 (1983a).
- BACH, T.J. und LICHTENTHALER, H.K.: Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. - *Physiol. Plant.* **59**, 50-60 (1983b).
- BACH, T. J. und LICHTENTHALER, H. K.: Plant growth regulation by mevinolin and other sterol biosynthesis inhibitors. – In: Fuller, G., Nes, W. D. (Hrsg.): *Ecology and Metabolism of Plant Lipids*. American Chemical Society, Washington DC, S. 109-139 (1987).
- BACH, T. J. und BENVENISTE, P.: Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eucaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization. - *Prog. Lipid Res.* **36**, 197-226 (1997).

- BACH, T.J., WEBER, T. und MOTEL, A.: Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in plants. - *In*: Towers, G. H. N., Stafford, H. A. (Hrsg.): Recent Advances in Phytochemistry, Vol 24. *Plenum Press, New York*, S. 1-82 (1990).
- BACH, T. J., BORONAT, A., CAELLES, C., FERRER, A., WEBER, T. und WETTSETEIN, A.: Aspects related to mevalonate biosynthesis in plants. - *Lipids* **26**, 637-648 (1991).
- BACH, T. J., BORONAT, A., CAMPOS, N., FERRER, A. und VOLLACK, K. U.: Mevalonate biosynthesis in plants. - *In*: Parish, J. E., Nes, W. D. (Hrsg.): Biochemistry and Function of Sterols. *CRC Press, Boca Raton*, S. 135-150 (1997).
- BACH, T. J., BORONAT, A., CAMPOS, N., FERRER, A. und VOLLACK, K. U.: Mevalonate biosynthesis in plants. - *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **34**, 107-122 (1999).
- BATHGATE, B., PURTON, M. E., GRIERSON, D. und GOODENOUGH, P. W.: Plastid changes during the conversion of chloroplasts to chromoplasts in ripening tomatoes. - *Planta* **165**, 197-204 (1985).
- BÄUERLE, R., LÜTKE-BRINKHAUS, F., ORTMANN, B., BERGER, S. und KLEINIG, H.: Prenyl lipid and fatty-acid synthesis in isolated *Acetabularia* chloroplasts. - *Planta* **181**, 229-233 (1990).
- BENEDICT, C. R.: Biosynthesis of rubber. - Benedict, C. R. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol II, *John Wiley and Sons, New York*, S. 355-370. (1983).
- BEN-SHAUL, Y. und NAFTALI, Y.: The development and ultrastructure of lycopene bodies in chromoplasts of *Lycopersicon esculentum*. - *Protoplasma* **67**, 333-344 (1969).
- BISHOP, N. I. und SENGER, H.: Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. - *Meth. Enzymol.* **23A**, 53-66 (1971).
- BLOCH, K., CHAYKIN, S., PHILLIPS, A. H. und DE WAARD, A.: mevalonic acid-pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. - *J. Biol. Chem.* **234**, 2595-2604 (1959).
- BOHLMANN, J., MEYER-GAUEN, G. und CROTEAU, R.: Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4126-4133 (1998).
- BORININ, M.: Molekularbiologische Untersuchungen zur 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat – Synthase (DXS) in Grünalgen. *Diplomarbeit, Botanisches Institut, Lehrstuhl II, Universität Karlsruhe* (1998).
- BOUVIER, F., d'HARLINGUE, A., SUIRE, C., BACKHAUS, R. A. und CAMARA, B.: Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. - *Plant Physiol.* **117**, 1423-1431 (1998).
- BRAITHWAITE, G. D. und GOODWIN, T. W.: Studies in carotenogenesis: the incorporation of [1-¹⁴C] acetate, [2-¹⁴C] acetate and ¹⁴CO₂ into lycopene by tomato slices. - *Biochem. J.* **76**, 1-5 (1960a).
- BRAITHWAITE, G. D. und GOODWIN, T. W.: Studies in carotenogenesis: The incorporation of [¹⁴C]-acetate, [¹⁴C]-mevalonate and ¹⁴CO₂ into β-carotene by the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. - *Biochem. J.* **76**, 5-10 (1960b).
- BRITTON, G.: UV/visible spectroscopy. - in: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Hrsg.): Carotenoids, Vol 1B: Spectroscopy. *Birkhäuser Verlag Basel*, S. 199-214 (1995).

- BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. und PFANDER, H. (Hrsg.): Carotenoids, Vol 3: Biosynthesis and Metabolism. *Birkhäuser Verlag Basel* (1998).
- BROERS, S., T., J.: Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *E. coli*. - *Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland* (1994).
- BROOKER, J. D. und RUSSEL, D.W.: Subcellular localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in *Pisum sativum* seedlings. - *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 730-737 (1975).
- BROWN, M. S. und GOLDSTEIN, J. L.: Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. - *J. Lipid Res.* **21**, 505-517 (1980).
- CANE, D. E.: Biosynthesis of sesquiterpenes. - In: Porter, J.W., Spurgeon, S.L. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Vol. 1, *John Wiley & Sons, New York, S.* 283-374 (1981).
- CARTAYRADE, A., NEAU, E., SOHIER, C., BALZ, J. P., CARDE, J. P. und WALTER, J.: Ginkgolide and bilobalide biosynthesis in *Ginkgo biloba*. I: Sites of synthesis, translocation and accumulation of ginkgolides and bilobalide. - *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 859-868 (1997).
- CAVALIER-SMITH, T.: The number of symbiotic origins of organelles. - *BioSystems* **28**, 91-106 (1992).
- CLOUGH, J. M. und PATTENDON, G.: Stereochemical assignment of polycopene and other poly-Z-isomeric carotenoids in fruits of the tangerine tomato *Lycopersicon esculentum* var. 'Tangella'. - *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 3011-3018 (1983).
- COOPER, C. Z., BENEDICT, C. R.: Compartmentalization of acetate pools in carotene synthesis. - *Plant Physiol.* **42**, 544-545 (1967).
- CRICK, D. C., ANDRES, D. A. und WAECHTER, C. J.: Novel salvage pathway utilizing farnesol and geranylgeraniol for protein isoprenylation. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 483-487 (1997).
- CROTEAU, R., Biosynthesis of monoterpenes. - In: Porter, J.W., Spurgeon, S.L. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 1, *John Wiley & Sons, New York, S.* 225-282 (1981).
- CUNILLERA, N., MONTSERRAT, A., DELOURME, D., KARST, F., BORONAT, A. und FERRER, A.: *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. - *J. Biol. Chem.* **271**, 7774-7780 (1996).
- CUNILLERA, N., BORONAT, A., und FERRER, A.: The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. - *J. Biol. Chem.* **272**, 15381-15388 (1997).
- DAVID, S., ESTRAMAREIX, B., FISCHER und J.-C., THÉRISOD: 1-Deoxy-D-threo-2-pentulose: the precursor of the five-carbon chain of the thiazole of thiamine. - *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 7341-7342 (1981).
- DISCH, A.: Biosynthèse des isoprénoides: distribution de la voie du mévalonate et de la voie du glyceraldéhyde phosphate/pyruvate. - *Dissertation, Universität Strasbourg* (1998)
- DISCH, A. und ROHMER, M.: On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. - *FEMS Microbiology Letters* **168**, 201-208 (1998).

- DISCH, A., HEMMERLIN, A., BACH, T. J. und ROHMER, M.: Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. - *Biochem. J.* **331**, 615-621 (1998a).
- DISCH, A., SCHWENDER, J., MÜLLER, C., LICHTENTHALER, H. K. und ROHMER, M.: Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714. - *Biochem. J.* **333**, 381-388 (1998b).
- DITTRICH, P. und ANGYAL, S. J.: 2-C-Methyl-D-erythritol in leaves of *Liriodendron tulipifera*. - *Phytochemistry* **27**, 935 (1988).
- DOGBO, O. und CAMARA, B.: Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. - *Biochem. Biophys. Acta* **920**, 140-148 (1987).
- DÖLL, M., SCHINDLER, S., LICHTENTHALER, H.K. und BACH, T.J.: Differential inhibition by mevinolin of prenyllipid accumulation in cell suspension cultures of *Sylibum marianum* L. - In: Siegenthaler, P. A., Eichenberger, W. (Hrsg.): Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, S. 277-278 (1984).
- DUVOLD, T., BRAVO, J.-M., PALE-GROSDÉMANGE, C. und ROHMER, M.: Biosynthesis of 2-C-Methyl-D-erythritol, a putative C₅ intermediate in the mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis. - *Tetrahedron Lett.* **38**, 4769-4772 (1997a).
- DUVOLD, T., CALI, P., BRAVO, J.-M. und ROHMER, M.: Incorporation of 2-C-Methyl-D-erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonate-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Escherichia coli*. - *Tetrahedron Lett.* **38**, 6181-6184 (1997b).
- EICHENBERGER, W., Steryl glycosides and acylated steryl glycosides. - In: Tevini, M., Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants. Springer-Verlag, Berlin, S. 169-179 (1977).
- EICHENBERGER, W. und MENKE, W.: Sterole in Blättern und Chloroplasten. - *Z. Naturforsch.* **21b**, 859-867 (1966).
- EISENREICH, W., MENHARD, B., HYLANDS, P. J., ZENK, M. H. und BACHER, A.: Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6431-6436 (1996).
- EISENREICH, W., SAGNER, S., ZENK, M. H. und BACHER, A.: Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. - *Tetrahedron Lett.* **38**, 3889-3892 (1997).
- ENGLER-BLUM, G., MEIER, M., FRANK, J. und MÜLLER, G. A.: Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. - *Anal. Biochem.* **210**, 235-244 (1993).
- ENGLERT, G.: NMR spectroscopy. - In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Hrsg.): Carotenoids, Vol. 1B. Birkhäuser, Basel, S. 147-260 (1995).
- ENJUTO, M., BALCELLS, L., CAMPOS, N., CAELLES, C., ARRO, M. und BORONAT, A.: *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 927-931 (1994).
- EVANS, R. C., TINGEY, D. T., GUMPERTZ, M. L. und BURNS, W. F.: Estimates of isoprene and monoterpene emission rates in plants. - *Bot. Gaz.* **143**, 304-310 (1982).

- FELLMEIER, M., KIS, K., SAGNER, S., MAIER, U., BACHER, A. und ZENK, M.: Cell-free conversion of 1-desoxy-D-xylulose 5-phosphate and 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate into β -carotene in higher plants and its inhibition by fosmidomycin. – *Tetrah. Lett.* **40**, 2743-2746 (1999).
- FOWLER, D. J., HAMILTON, J. T. G., HUMPHREY, A. J. und O'HAGAN, D.: Plant terpene biosynthesis. The biosynthesis of linalyl acetate in *Mentha citrata*. – *Tetrahedron Lett.* **40**, 3803-3806 (1999).
- FRANZEN, L., ROCHAIX, J. und VON HEIJNE, G.: Chloroplast transit peptides from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. – *FEBS Lett.* **260**, 165-168. (1990).
- FRIEDL, T.: The evolution of the green algae. – In: Bhattacharya, D. (Hrsg.): Origin of Algae and their Plastids. *Plant Systematics and Evolution [Suppl.]* **11**, 87-101 (1997).
- GERSHENZON, J. und CROTEAU, R. B.: Terpenoid biosynthesis: The basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. – In Gershenzon, J., Croteau, R. B., (Hrsg.): Lipid Metabolism in Plants. *CRC Press, Boca Raton*, S. 339-388 (1993).
- GINER, J.-L. und JAUN, B.: Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: retention of the methyl H-atoms of 1-deoxy-D-xylulose. – *Tetrahedron Lett.* **39**, 8021-8022 (1998).
- GINER, J.-L., JAUN, B., ARIGONI, D.: Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: The fate of the 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. – *Chem. Commun.*, 1857-1858 (1998).
- GLOMSET, J. A., GELB, M. H. und FARNSWORTH, C. C.: Prenylproteins in eucaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 139-142 (1990).
- GOAD, J.: Phytosterols. – In: Dey, P. M., Harborne, J. B. (Hrsg.): Methods in Plant Biochemistry. *Academic Press, London*, 369-434 (1991).
- GOLDSTEIN, J. L. und BROWN, M.: Regulation of the mevalonate pathway. – *Nature* **343**, 425-430 (1990).
- GOODWIN, T. W.: The prenyllipids of the membranes of higher plants. – In: Tevini, M., Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants. *Springer-Verlag, Berlin*, S. 29-47 (1977).
- GOODWIN, T. W.: Biosynthesis of plant sterols and other triterpenoids. – In: Porter, J.W., Spurgeon, S.L. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Vol. 1, *John Wiley & Sons, New York*, S. 443-480 (1981).
- GOODWIN, T. W. und LIINSKY, W.: Carotene production in *Phycomyces blakesleeanus*: the effect of different amino acids when used in media containing low concentrations of glucose. – *Biochem. J.* **50**, 268-272 (1952).
- GRAY, J.C.: Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. – *Adv. Bot. Res.* **14**, 25-91 (1987).
- GRIFFITH, W. T., THRELFALL, D. R. und GOODWIN, T. W.: Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ and [2- ^{14}C]mevalonic acid into plastoquinone in maize and barley seedlings. – *Biochem. J.* **90**, 40P-41P (1964).
- GROSS, W., SEIPOLD, P. und SCHNARRENBERGER, C.: Characterization and purification of an aldose reductase from the acidophilic and thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. – *Plant Physiol.* **114**, 231-236 (1997).

- HAWKINS, C. F., BORGES, A. und PERHAM, R. N.: A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. – *FEBS Lett.* **255**, 77-82 (1989).
- HEINRICH, C. P., NOACK, K. und WISS, O.: A circular dichroism study of transketolase from baker's yeast. – *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 275-279 (1971).
- HEINTZE, A., GÖRLACH, J., LEUSCHNER, C., HOPPE, P., HAGELSTEIN, P., SCHULZE-SIEBERT, D. und SCHULTZ, G.: Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. change from metabolic autonomy to division-of-labour stage. – *Plant Physiol.* **93**, 1121-1127 (1990).
- HEB, D.: Pflanzenphysiologie. *Ulmer, Stuttgart* (1991).
- HESSE, M., MEIER, H. und ZEEH, B.: Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. *G. Thieme, Stuttgart* (1997).
- HILL, R. E., SAYER, B. G. und SPENSER, I. D.: Biosynthesis of vitamin B6: incorporation of 1-desoxy-D-xylulose. – *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1916-1917 (1989).
- HILL, R. E., HIMMELDIRK, K., KENNEDY, I. A., PAULOSKI, R. M., SAYER, B. G., WOLF, E. und SPENSER, I. D.: The biogenetic anatomy of vitamin B6. – *J. Biol. Chem.* **271**, 30426-30435 (1996).
- HIMMELDIRK, K., KENNEDY, I. A., HILL, R. E., SAYER, B. G. und SPENSER, I. D.: Biosynthesis of vitamins B1 and B6 in *Escherichia coli*: concurrent incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into thiamin (B1) and pyridoxol (B6). – *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1187-1188 (1996).
- HOPPE, P., HEINTZE, A., RIEDEL, A., CREUZER, C. und SCHULTZ, G.: The plastidic 3-phosphoglycerate → acetyl-CoA pathway in barley leaves and its involvement in the synthesis of amino acids, plastidic isoprenoids and fatty acids during chloroplast development. – *Planta* **190**, 253-262 (1993).
- HUMPHREY, A. J., TURNER, N. J., MCCAGUE, R. und TAYLOR, S. J. C.: Synthesis of enantiomerically pure α -hydroxyaldehydes from corresponding α -hydroxycarboxylic acids: novel substrates for *Escherichia coli* transketolase. – *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2475-2476 (1995).
- JANKOWSKI, W. J., SWIEZEWSKA, E., SASAK, W. und CHOJNACKI, T.: Occurrence of polyprenols and dolichols in plants. – *J. Plant Physiol.* **143**, 448-452 (1989).
- JUILLARD, J. H. und DOUCE, R.: Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2041-2045 (1991).
- JUNGNICKEL, F.: Turion formation and behaviour in *Spirodela polyrhiza* at low levels of phosphate supply. – *Biologia Plant.* **28**, 168-173 (1986).
- KESSLER, E.: *Chlorella* – Biochemische Taxonomie einer für Forschung und Biotechnologie wichtigen Gattung einzelliger Grünalgen. *Naturwissenschaften* **79**, 260-265 (1992).
- KIM, K. K., YAMASHITA, H., SAWA, Y. und SHIBATA, H.: A high activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in chloroplasts of *Stevia rebaudiana* Bertoni. – *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 685-686 (1996).
- KLEINIG, H.: The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. – *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 39-59 (1989).
- KNÖSS, W., REUTER, B. und ZAPP, J.: Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. – *Biochem. J.* **326**, 449-454 (1997).

- KREUZ, K. und KLEINIG, H.: On the compartmentation of isopentenyl diphosphate synthesis and utilisation in plant cells. - *Planta* **153**, 153-587 (1981).
- KUNTZ, M., RÖMER, S., SUIRE, C., HUHENEY, P., WEIL, J. H., SCHANTZ, R. und CAMARA, B.: Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. - *Plant J.* **2**, 25-34 (1992).
- KUZUYAMA, T., TAKAHASHI, S., WATANABE, H. und SETO, H.: Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. - *Tetrahedron Letters* **39**, 4509-4512 (1998a).
- KUZUYAMA, T., SHIMIZU, T., TAKAHASHI, S. und SETO, H.: Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 7913-7916 (1998b).
- LANGE, B. M., WILDUNG, M. R., MCCASKILL, D. und CROTEAU, R.: A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2100-2104 (1998).
- LANGE, B. M. und CROTEAU, R.: Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. - *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 170-174 (1999).
- LAVAL-MARTIN, D.: Pigment evolution in *Lycopersicon esculentum* fruits during growth and ripening.- *Phytochemistry* **14**, 2357-2362 (1975).
- LI, S. M., HENNIG, S. und HEIDE, L.: Shikonin: A geranyl diphosphate-derived plant hemiterpenoid formed via the mevalonate pathway. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 2721-2724 (1998).
- LICHTENTHALER, H. K.: Regulation of prenylquinone synthesis in higher plants. - In: Tevini, M., Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. Springer-Verlag, Berlin, S. 231-256 (1977).
- LICHTENTHALER H. K.: Prenylquinones in plant leaves. - In: Mazliak, P., Benveniste, P., Costes, C., Douce, R. (Hrsg.): *Biochemistry and Function of Plant Lipids*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, S. 489-500 (1980).
- LICHTENTHALER, H. K.: The plant prenyllipids, including carotenoids, chlorophylls, and prenylquinones. - In: Moore, T. S. (Hrsg.): *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, Boca Raton, S. 427-470 (1993).
- LICHTENTHALER H. K. und PARK, R. B.: Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. - *Nature* **198**, 1070-1072 (1963).
- LICHTENTHALER H. K. und CALVIN, M.: Quinone and pigment composition of chloroplasts and quantasome aggregates from *Spinacea oleracea*. - *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 30-40 (1964).
- LICHTENTHALER H. K., BACH, T. J. und WELLBURN, A. R.: Cytoplasmatic and plastidic isoprenoid compounds of oat seedlings and their distinct labelling from ¹⁴C-mevalonate. - In: Wintermanns, J. F. G. M., Kuiper, P. J. C. (Hrsg.): *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, S. 489-500 (1982).

- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., DISCH, A. und ROHMER, M.: Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. - *FEBS Lett.* **400**, 271-274 (1997).
- LOIS, L.M., CAMPOS, N., ROSA-PUTRA, S., DANIELSEN, K., ROHMER, M. und BORONAT, A.: Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a franketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2105-2110 (1998).
- LOWRY, D. M., ROSEBROUGH, H. J., FARR, A. L. und RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. - *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- LUMBRERAS, V., CAMPOS, N. und BORONAT, A.: The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. - *Plant J.* **8**, 541-549 (1995).
- LUTCKE, H. A., CHOW, K. C., KERN, H. F., MICKE, F. S., MOSS, K. A. und SCHEELE, G. A.: Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. - *EMBO J.* **6**, 43-48 (1987).
- LÜTKE-BRINKHAUS, F., LIEDVOGEL, B. und KLEINIG, H.: On the biosynthesis of ubiquinones in plant mitochondria. - *Eur. J. Biochem.* **141**, 537-541 (1984).
- LYNEN, F.: New aspects of acetate incorporation into isoprenoid precursors. - *In:*, Wolstenholme, G. E. W., O'Conner, M. (Hrsg.): Biosynthesis of Terpenes and Sterols. *J. & A. Churchill, Ltd., London*, S. 95-116 (1959).
- LYNEN, F., EGGERER, H., HENNING, U. und KESSEL, I.: Farnesyl Pyrophosphat und 3-Methyl-delta3-butenyl-1-pyrophosphat, die biologische Vorstufe des Squalens. - *Angew. Chem.* **70**, 738 (1958a).
- LYNEN, F., HENNING, U., BUBLITZ, C., SÖRBO, B. und KRÖPLIN-RUEFF, L.: Der chemische Mechanismus der Acetessigsäurebildung in der Leber. - *Biochem. Z.* **330**, 269-296 (1958b).
- MAIER, W., SCHNEIDER, B. und STRACK, D.: Biosynthesis of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives in mycorrhizal barley roots proceeds via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. - *Tetrahedron Lett.*, **39**, 521-424 (1998).
- MANDEL, M. A., FELDMANN, K. A., HERRERA-ESTRELLA, L., ROCHA-SOSA, M. und LEON, P.: CLA1, a novel gene required for chloroplast development is highly conserved in evolution. - *Plant J.* **9**, 649-658 (1996).
- MCFADDEN, G. I., WALLER, R. F., REITH, M. E. und LANG-UNNASCH, N: Plastids in apicomplexan parasites. - *In:* Bhattacharya, D. (Hrsg.): Origin of Algae and their Plastids. *Plant Systematics and Evolution [Suppl.]* **11**, 261-288 (1997).
- MCGARRY, J.D. und FOSTER, D.W.: Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. - *Ann Rev. Biochem.* **49**, 395-420 (1980).
- MCCASKILL, D. und CROTEAU, R.: Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. - *Tetrah. Lett.* **40**, 653-656 (1999).
- MERCER, E. I. und GOODWIN, T. W.: The incorporation of [2-¹⁴C]mevalonic acid and ¹⁴CO₂ into the phytol side chain of chlorophyll in maize seedlings. - *Biochem. J.* **85**, 13P (1962).

- MERCER, E. J. und TREHARNE, K. J.: Occurrence of sterols in chloroplasts. - In: Goodwin, T.W. (Hrsg.): Biochemistry of Chloroplasts, Vol. 1. *Academic Press, London*, S. 181-185 (1966).
- MEREDITH, F.I. und PURCEL, A.E.: Changes in the concentration of carotenes of ripening Homestead tomatoes. - *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **89**, 544-549 (1966).
- MILLARD, B. J.: Quantitative Mass Spectrometry. *Heyden & Son, London* (1978).
- MÜLLER, C. Untersuchungen zur IPP-Biosynthese bei Algen aus unterschiedlichen Abteilungen. *Diplomarbeit, Botanisches Institut, Lehrstuhl II, Universität Karlsruhe* (1997).
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.- *Physiol. Plant.* **15**, 473-497 (1962).
- NABETA, K., ISHIKAWA, T. und OKUYAMA, H.: Sesqui- and di-terpene biosynthesis from ¹³C labelled acetate and mevalonate in cultured cells of *Heteroscyphus planus*. - *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* , 3111-3115 (1995).
- NABETA, K., KAWAE, T., SAITOH, T. und KIKUCHI, T.: Synthesis of chlorophyll a and β-carotene from ²H- and ¹³C-labelled mevalonates and ¹³C-labelled glycine in cultured cells of liverworts, *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. - *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 261-267 (1997).
- NABETA, K., KOMURO, K., UTOH, T., TAZAKI, H. und KOSHINO, H.: Biosynthesis of (-)-β-barbatene from ¹³C- and ²H-labelled acetate, mevalonate and glycerol. - *Chem. Commun.*, 169-170 (1998a).
- NABETA, K., SAITOH, T., ADACHI, K. und KOMURO, K.: Biosynthesis of phytol side-chain of chlorophyll a: apparent reutilization of carbon dioxide evolved during acetate assimilation in biosynthesis of chloroplastidic isoprenoids. - *Chem. Commun.*, 671-672 (1998b).
- NARITA, J. O. und GRUISSEM, W.: Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. - *The Plant Cell* **1**: 181-190 (1989).
- NES, W. D. und BACH, T. J.: Evidence for a mevalonate shunt in a tracheophyte. - *Proc R. Soc. Lond. B* **255**, 425-444 (1985).
- NES, W. D., NORTON, R. A. und BENSON, M.: Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [¹³C]mevalonates. - *Phytochemistry* **31**, 805-811 (1992).
- NEWMANN, S. M., BOYNTON, J. E., GILLHAM, N. W., RANDOLOHANDERSON, B. L., JOHNSON, A. M. und HARRIS, E. H.: Transformation of chloroplast ribosomal-RNA genes in *Chlamydomonas*. Molecular and genetic characterization of integration events. - *Genetics* **126**, 875-888 (1990).
- NIKKOLA, M., LINDQVIST, Y., SCHNEIDER, G.: Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution. - *J. Mol. Biol.* **238**, 387-404 (1994).
- NILSSON, M., MESHALKINA, L., LINDQVIST, Y., SCHNEIDER, G.: Examination of substrate binding in thiamin diphosphate dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis. - *J. Biol. Chem.* **272**, 1864-1869 (1997).
- OGURA, K. und KOYAMA, T.: Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. - *Chemical Reviews* **98**, 1264-1276 (1998).

- OURISSON, G.: Peculiarities of sterol biosynthesis in plants. - *J. Plant Physiol.* **143**, 434-439 (1994).
- OUYANG, J. und VIOLA, R. E.: Use of structural comparisons to select mutagenic targets in aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase. - *Biochemistry* **34**, 6394-6399 (1995).
- PEELER, T. C., STEPHENSON, M. B., EINSPAHR, K. J. und THOMPSON, G. A.: Lipid characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity. - *Plant Physiol.* **89**, 970-976 (1989).
- PIEL, J., DONATH, J., BANDEMER, K. und BOLAND, W.: Induzierte und konstitutiv emittierte Pflanzendüfte: Mevalonat-unabhängige Biosynthese terpenoider Duftstoffe. - *Angew. Chem.* **110**, 2622-2625 (1998).
- PROTEAU, P. J.: Biosynthesis of phytol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470: Utilization of the non-mevalonate pathway. - *J. Natural Products* **61**, 841-843 (1998).
- RAMACHANDRA REDDY, A. und DAS, V. S. R.: Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from leaves of guayule (*Parthenium argentatum*). - *Phytochemistry* **25**, 2471-2477 (1986).
- RAMOS-VALDIVIA, A.C., VAN DER HEJDEN, R. und VERPOORTE, R.: Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function.. - *Natural Product Reports* **14**, 591-604 (1997).
- RANE, M. J. und CALVO, K. C.: Reversal of the nucleotide specificity of ketol acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis identifies the NADPH binding site. - *Arch. Biochem. Biophys.* **338**, 83-89 (1997).
- RAUSCHENBACH, P., SCHMIDT, H. L., SIMON, H., TYKVA, R. und WENZEL, M.: Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen. *Springer-Verlag, Berlin* (1974).
- REINERT, J. und YEOMAN, M. M.: Plant and Cell Tissue Culture. *Springer, Berlin*. S. 56-58 (1982).
- RODRIGUEZ-CONCEPTION, M. und GRUISSEM, W.: Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. - *Plant Physiol.* **119**, 41-48 (1999).
- ROHMER, M.: A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. In: Barton, D., Nakanishi, K. (Hrsg.): *Comprehensive Natural Products chemistry*, Vol. 2: Isoprenoids including Carotenoids and Steroids (D. E. Cane Hrsg.). *Elsevier Science, Oxford*, S. 45-67 (1999).
- ROHMER, M., KNANI, M., SIMONIN, P., SUTTER, B. und SAHM, H.: Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. - *Biochem. J.* **295**, 517-524 (1993).
- ROHMER, M., SEEMANN, M., HORBACH, S., BRINGER-MEYER, S. und SAHM, H.: Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. - *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2564-2566 (1996).
- ROSA PUTRA, S., LOIS, L. M., CAMPOS, N., BORONAT, A. und ROHMER, M.: Incorporation of [2,3-¹³C₂]- and [2,4-¹³C₂]-D-1-deoxyxylulose into ubiquinone of *Escherichia coli* via the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 23-26 (1998).

- RUZICKA, L., ESCHENMOSER, A. und HEUSSER, H.: The isoprene rule and the biogenesis of isoprenoid compounds. *Experientia* **9**, 357-396 (1953).
- SAGNER, S., EISENREICH, W., FELLMEIER, M. LATZEL, C., BACHER, A. und ZENK, M.: Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol in plants by rearrangement of the terpenoid precursor, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. – *Tetrahedron Lett.* **39**, 2091-2094 (1998).
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. und MANIATIS, T., Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York* (1989).
- SANMIYA, K., UENO, O., MATSUOKA, M. und YAMAMOTO, N.: Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. – *Plant Cell Physiol.* **40**, 348-354 (1999).
- SCHEFFER, M., FRIED, A., GOTTLIEB, H. E., TIETZ, A. und AVRON, M.: Lipid composition of the plasma-membrane of the halotolerant alga, *Dunaliella salina*. – *Biochimica et Biophysica Acta* **857**, 165-172 (1986).
- SCHINDLER, S. und LICHTENTHALER, H. K.: Distribution and levels of ubiquinone homologues in higher plants. – In: Wintermanns, J.F.G.M., Kuiper, P.J.C. (Hrsg.): Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids. *Elsevier, Amsterdam*, S. 273-276 (1982).
- SCHINDLER, S., BACH, T. J. und LICHTENTHALER, H. K.: Differential inhibition by mevinolin of prenyllipid accumulation in radish seedlings. – *Z. Naturforsch.* **40c**, 208-214 (1985).
- SCHLÖSSER, U. G.: SAG – Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains 1994. – *Bot. Acta* **107**, 113-186 (1994).
- SCHNARRENBERGER, C., JACOBSHAGEN, S., MÜLLER, B. und KRÜGER, I.: Evolution of isozymes of sugar phosphate metabolism in green algae. – In: Ogita, Z. I., Market, C. L. (Hrsg.): Isozymes. Structure, Function and Use in Biology and Medicine. *Wiley-Liss, New York*, S. 743-764 (1990).
- SCHULZE-SIEBERT, D., HEINTZE, A. und SCHULTZ, G.: Substrate flow from photosynthetic carbon metabolism to chloroplast isoprenoid synthesis in spinach. Evidence for a plastidic phosphoglycerate mutase. - *Z. Naturforsch.* **42c**, 570-580 (1987).
- SCHWARZ, M. K.: Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. - *Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland* (1994).
- SCHWENDER, J.: Untersuchungen zur Biosynthese der Isoprenoide bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* mittels ¹³C-Isotopenmarkierung. - *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe* (1995). *Erschienen in:* (Lichtenthaler, H. K., Hrsg.): *Karlsruher Beiträge zu Pflanzenphysiologie* 31, 1-85 (1995).
- SCHWENDER, J., LICHTENTHALER, H. K., SEEMANN, M. und ROHMER, M.: Biosynthesis of isoprenoid chains of chlorophylls and plastoquinone in *Scenedesmus* by a novel pathway. – In: Mathis, P. (Hrsg.): Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. III. *Kluwer Academic Publ., Dordrecht*, S.1001-1004 (1995).
- SCHWENDER, J., SEEMANN, M., LICHTENTHALER, H. K. und ROHMER, M.: Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. - *Biochem. J.* **316**, 73-80 (1996).

- SCHWENDER, J., ZEIDLER, J., GRÖNER, R., MÜLLER, C., FOCKE, M., BRAUN, S., LICHTENTHALER, F. W. und LICHTENTHALER, H. K.: Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. - *FEBS Lett.* **414**, 129-134 (1997).
- SEO, S., UOMORI, A., YOSHIMURA, Y., TAKEDA, K., SETO, H., EBIZUKA, Y., NOGUCHI, H. und SANKAWA, U.: Biosynthesis of sitosterol, cycloartenol, and 24-methylenecycloartenol in tissue cultures of higher plants and of ergosterol in yeast from [1,2-¹³C₂]- and [2-¹³C²H₃]-acetate and [5-¹³C²H₂]MVA. - *J. Chem. Perkin Trans. I*, 2407-2414 (1988).
- SETO, H., WATANABE, H. und FURIHATA, K.: Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aeriovivifer*. - *Tetrahedron Lett.* **37**, 7979-7982 (1996).
- SHAH, S. P. J. und ROGERS, L. J.: Compartmentation of terpenoid biosynthesis in green plants. - *Biochem. J.* **114**, 395-405 (1969).
- SOLER, E., FERON, G., CLASTRE, M., DARGENT, R., GLEIZES, M. und AMBID, C.: Evidence for a geranyl-diphosphate synthase located within the plastids of *Vitis vinifera* L. cultivated invitro. - *Planta* **187**, 171-175 (1992).
- STEELE, J. W. und GURIN, S.: Biosynthesis of β -carotene in *Euglena gracilis*. - *J. Biol. Chem.* **235**, 2778-2785 (1960).
- SURZYCKI, S.: Synchronously grown cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. - *Meth. Enzymol.* **23A**, 67-73 (1971).
- TAKAHASHI, S., KUZUYAMA, T., WATANABE, H. und SETO, H.: A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9879-9884 (1998).
- THIEL, R., ADAM, K. P., ZAPP, J. und BECKER, H.: Isopentenyl diphosphate biosynthesis in liverworts. - *Pharm. Pharmacol. Lett.* **7**, 103-105 (1997).
- THRELFALL, D. R. und WHISTANCE, G. R.: Biosynthesis of isoprenoid quinones and chromanols. - In: Goodwin, T. W. (Hrsg.): Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry, *Academic Press, London*, S. 357-404 (1971).
- TREHARNE, K. J., MERCER, E. I. und GOODWIN, T. W.: Incorporation of [2-¹⁴C]mevalonic acid lactone into sterol, β -carotene or phytol in developing leaves of monocotyledonous and dicotyledonous plants. - *Biochem. J.* **90**, 39P-40P (1964).
- TREHARNE, K. J., MERCER, E. I. und GOODWIN, T. W.: Incorporation of [¹⁴C] carbon dioxide and [2-¹⁴C]-mevalonic acid into terpenoids of higher plants during chloroplast development. - *Biochem. J.* **99**, 239-245 (1966).
- TURNER, G., GERSHENZON, J., NIELSON, E. E., FROELICH, J. E. und CROTEAU, R.: Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. - *Plant Physiol.* **120**, 879-886 (1999).
- VOLLACK, K. U.: Isolierung und Charakterisierung einer cDNA für die Acetoacetyl-CoA-Thiolase [EC 2.3.1.9] aus *Raphanus sativus* L. durch Komplementierung einer *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante. - *Dissertation, Universität Karlsruhe* (1994).
- VAN DEN HOEK, C., MANN, D. G. und JAHNS, H. M.: Algae, An Introduction to Phycology. *Cambridge University Press, Cambridge* (1995).

- VON HEIJNE, G., STEPPUHN, J. und HERRMANN, R. G.: Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. – *Eur. J. Biochem.* **180**, 535-545 (1989).
- WALLACH, O.: Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischen Oele. - *Liebigs Ann. der Chemie* **227**, 277-302 (1885).
- WEST, C. A.: Biosynthesis of diterpenes. - *In: Porter, J.W., Spurgeon, S.L. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Vol. 1, John Wiley & Sons, New York, S. 375-411 (1981).*
- WIECKOWSKI, S. und GOODWIN, T. W.: Incorporation of DL-[2-¹⁴C]mevalonic acid lactone into β -carotene and the phytol side chain of chlorophyll in cotyledons of four species of pine seedlings. - *Biochem. J.* **105**, 89-92 (1967).
- WIERENGA, R. K., DE MAEYER, M. C. H. und HOL, W. G. J.: Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. – *Biochemistry* **24**, 1346-1357 (1985).
- WILDERMUTH, M. C. und FALL, R.: Light-dependent isoprene emission. – *Plant Physiol.* **112**, 171-182 (1996).
- WILLIAMS, R. J. H., BRITTON, G., CHARLTON, J. M. und GOODWIN, T. W.: The stereospecific biosynthesis of phytoene and polyunsaturated carotenes. - *Biochem. J.* **104**, 767-777 (1967a).
- WILLIAMS, R. J. H., BRITTON, G. und GOODWIN, T. W.: The biosynthesis of acyclic carotenes. - *Biochem. J.* **105**, 99-105 (1967b).
- WILSON, T. M. und RUSSEL, D.W.: The localization, partial purification and regulation of pea plastid HMG-CoA reductase. - *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **184**, 530-537 (1992).
- WISE, M. L. und CROTEAU, R.: Monoterpene Biosynthesis. *In: Barton, D., Nakanishi, K. (Hrsg.): Comprehensive Natural Products chemistry, Vol. 2: Isoprenoids including Carotenoids and Steroids (D. E. Cane Hrsg.). Elsevier Science, Oxford, S. 97-153 (1999).*
- WONG, R. J., Mc CORMACK, D. K. und RUSSEL, D. W.: Plastid 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase has distinct kinetic and regulatory features: properties of the enzyme and positive phytochrome control of activity in pea seedlings. - *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 631-638 (1982).
- ZABIN, I.: The formation of radioactive lycopene in ripening tomatoes. – *J. Biol. Chem.* **226**, 851-859 (1957).
- ZEIDLER, J. G., LICHTENTHALER, H. K., MAY, H. U. und LICHTENTHALER, F. W.: Is Isoprene Emitted by Plants Synthesized via the Novel Isopentenyl Pyrophosphate Pathway ? - *Z. Naturf.* **52c**, 15-23 (1997).
- ZEIDLER, J. G., SCHWENDER, J., MÜLLER, C., WIESNER, J., WEIDEMEYER, C., BECK, E., JOMAA, H. und LICHTENTHALER, H. K.: Inhibition of the non-mevalonate 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. - *Z. Naturf.* **53c**, 980-986 (1998).

Anhang A

Alle in diesem Anhang aufgeführten ^{13}C -NMR-Spektren wurden in CDCl_3 aufgenommen (Spektren A-1, A-2: Bruker AM 400; Spektren A-2 bis A32: Bruker WP 400). Die in den Tabellen A-1 und A-2 aufgeführten NMR-Spektren wurden vom Autor ausgewertet. Die in den Tabellen A-3 bis A-32 aufgeführten Meßwerte wurden von Frau Andrea Disch, Universität Straßburg, erhalten (DISCH, 1998).

Zu den Tabellen im Anhang A: In NMR-Spektren verschiedener Sterylacetate sowie von β -Carotin und Lutein kommen Überlagerungen von Signalen zweier oder dreier C-Atome vor. Bei einer solchen Überlagerung summieren sich die Einzelintensitäten. Man kann die ^{13}C -Anreicherungen der einzelnen Positionen nicht sicher berechnen. Die Meßbare ^{13}C -Anreicherung ergibt aber Auskunft darüber, ob bei zwei sich überlagernden Signalen markierte C-Positionen dabei sind. Ist z. B. die meßbare ^{13}C -Anreicherung im Überlagerungssignal 2,5 % und sind die markierten Positionen des Moleküls im Mittel zu 3,5 % markiert und die unmarkierten Positionen zu 1,2 %, so kann im Überlagerungssignal keine markierte Position enthalten sein (3,5 % + 1,2 % = 4,7 %). Zudem ergibt sich aus der isoprenoiden Gesamtstruktur, welche der am Überlagerungssignal beteiligten C-Positionen markiert sein müssen. Somit konnte die Summe der ^{13}C -Anreicherungen im gemessenen Signal in zwei Werte zerlegt werden. Es wurde dabei theoretisch markierten C-Positionen die mittlere ^{13}C -Anreicherung der übrigen markierten Positionen im Molekül zugewiesen. In folgender Tabelle sind alle auftretenden Überlagerungen zusammengefasst. Für C-Positionen in Fett-Schrift wird aus dem gesamten Markierungsmuster des Isoprenoids eine Markierung erwartet:

Tabellen im Anhang A	Substanz	Im ^{13}C -NMR-Spektrum überlagernde C-Positionen (vgl. Abbildung 1-1)
A-4, A-7, A-11	Sitosterylacetat	C-7, C-8
A-5, A-8, A-12	Stigmasterylacetat	C-7, C-8, C-25
A-13, A-30	β -Carotin	C-16, C-17
A-14, A-23	Lutein	C-6, C-12, C-12' C-7, C-11' C-15, C-15' C-20, C-20'
A-21, A-28	Dihydrochondrillasterylacetat	C-11, Methyl (Acetylrest) C-21, C-26
A-22, A-29	Ergost-7-enylacetat	C-11, Methyl (Acetylrest)

Tabelle A-1 Einbau [$1-^{13}\text{C}$]-Glucose in Lycopin reifender Tomaten

C-Atom	δ (ppm)	relative ^{13}C -Anreicherung	C-Atom der Isopren- einheit
5	139,51	1,1 *	C-3
12	137,37	1,31	C-4
13	136,56	1,15	C-3
9	136,18	1,16	C-3
8	135,42	1,37	C-4
14	132,66	1,01	C-2
1	131,76	1,11	C-3
10	131,57	1,02	C-2
15	130,09	2,03	C-1
6	125,73	1,06	C-2
11	125,16	2,09	C-1
7	124,81	2,13	C-1
2	123,96	1,10	C-2
4	40,25	1,34	C-4
3	26,70	2,10	C-1
16	25,72	1,26	C-4
17	17,72	1,94	C-5
18	16,98	1,96	C-5
19	12,92	2,03	C-5
20	12,81	1,95	C-5

* = Referenz, wird als 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt gesetzt.

Tabelle A-2 Einbau [2-¹³C]-MVL in Lycopin reifender Tomaten

C-Atom	δ (ppm)	relative ¹³ C-Anreicherung	C-Atom der Isopren- einheit
5	139.51	1.1 *	3
12	137.37	1.27	4
13	136.56	1.11	3
9	136.18	1.17	3
8	135.42	1.31	4
14	132.66	1.02	2
1	131.76	0.99	3
10	131.57	1.07	2
15	130.09	1.03	1
6	125.73	1.05	2
11	125.16	1.15	1
7	124.81	1.13	1
2	123.96	1.11	2
4	40.25	1.30	4
3	26.70	1.03	1
16	25.72	1.17	4
17	17.72	0.98	5
18	16.98	1.01	5
19	12.92	1.12	5
20	12.81	1.04	5

* = Referenz, wird als 1.1% natürlicher ¹³C-Gehalt gesetzt.

Tabelle A-3: Phytolacetat aus *Daucus carota*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose 3,5 g/l mit 30 g/l Saccharose (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	61,46	3,4	C-1
C-2	118,01	1,2	C-2
C-3	142,81	1,5	C-3
C-4	39,89	1,7	C-4
C-5	25,06	3,3	C-1
C-6	36,66	1,3	C-2
C-7	32,70	1,4	C-3
C-8	37,38	1,7	C-4
C-9	24,49	3,3	C-1
C-10	37,45	1,3	C-2
C-11	32,82	1,4	C-3
C-12	37,32	1,7	C-4
C-13	24,82	3,0	C-1
C-14	39,40	1,4	C-2
C-15	28,00	1,4	C-3
C-16	22,65	1,6	C-4
C-17	16,39	3,5	C-5
C-18	19,73a	3,2	C-5
C-19	19,77a	3,2	C-5
C-20	22,74	3,1	C-5
Me *	21,08	1,1*	
C=O	171,15	1,0	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-4 : Sitosterylacetat aus *Daucus carota*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 3,5 g/l mit 30 g/l Saccharose (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	37,04	5,2	C-4
C-2	27,81	2,8	C-1
C-3	74,02	6,2	C-2
C-4	38,16	1,9	C-3
C-5	139,71	4,5	C-2
C-6	122,67	2,4	C-1
C-7	31,93a	5,2	C-4
C-8	31,93a	1,5	C-3
C-9	50,09	5,5	C-2
C-10	36,63	2,2	C-3
C-11	21,07	2,6	C-1
C-12	39,77	2,1	C-1
C-13	42,36	4,1	C-2
C-14	56,73	1,8	C-3
C-15	24,32	4,9	C-4
C-16	28,27	2,2	C-1
C-17	56,09	5,4	C-2
C-18	11,89	6,4	C-5
C-19	19,34	5,7	C-5
C-20	36,19	1,5	C-3
C-21	18,81	4,8	C-5
C-22	33,99	4,7	C-4
C-23	26,15	2,9	C-1
C-24	45,89	4,9	C-2
C-25	29,21	1,6	C-3
C-26	19,84	5,2	C-4
C-27	19,07	4,6	C-5
C-28	23,12	3,9	-
C-29	12,01	3,1	-
Me	21,45	1,1*	
C=O	170,55	1,3	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = ein Signal

Tabelle A-5 : Stigmasterylacetat aus *Daucus carota*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 3,5 g/l mit 30 g/l Saccharose (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	37,01	4,2	C-4
C-2	27,79	2,1	C-1
C-3	74,01	3,9	C-2
C-4	38,13	1,3	C-3
C-5	139,66	4,0	C-2
C-6	122,66	1,7	C-1
C-7	31,90a	4,2	C-4
C-8	31,90a	1,2	C-3
C-9	50,03	4,2	C-2
C-10	36,62	1,1	C-3
C-11	21,03	1,3	C-1
C-12	39,63	1,7	C-1
C-13	42,22	3,6	C-2
C-14	56,79	1,2	C-3
C-15	24,37	4,3	C-4
C-16	28,94	1,3	C-1
C-17	55,94	3,8	C-2
C-18	12,06	4,3	C-5
C-19	19,33	3,8	C-5
C-20	40,53	1,0	C-3
C-21	21,21	3,7	C-5
C-22	138,34	4,1	C-4
C-23	129,28	2,0	C-1
C-24	51,25	3,5	C-2
C-25	31,90a	1,2	C-3
C-26	21,24	4,0	C-4
C-27	19,00	4,3	C-5
C-28	25,43	2,6	-
C-29	12,28	2,9	-
Me	21,48	1,1*	
C=O	170,59	1,0	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = ein Signal

Tabelle A-6: Phytolacetat aus *Hordeum vulgare*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{-Glucose}$ 15 % (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	61,47	5,0	C-1
C-2	117,99	0,9	C-2
C-3	142,82	1,4	C-3
C-4	39,88	1,4	C-4
C-5	25,05	4,9	C-1
C-6	36,66	1,0	C-2
C-7	32,71	1,0	C-3
C-8	37,38	1,4	C-4
C-9	24,49	4,7	C-1
C-10	37,45	0,9	C-2
C-11	32,82	1,0	C-3
C-12	37,32	1,4	C-4
C-13	24,82	4,3	C-1
C-14	39,40	1,1	C-2
C-15	28,00	1,1	C-3
C-16	22,65	1,4	C-4
C-17	16,39	4,8	C-5
C-18	19,74a	4,4	C-5
C-19	19,77a	4,7	C-5
C-20	22,74	3,1	C-5
Me *	21,10	1,1*	
C=O	171,16	1,0	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-7 : Sitosterylacetat aus *Hordeum vulgare*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 15 % (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	37,02	4,2	C-4
C-2	27,80	1,8	C-1
C-3	74,02	4,4	C-2
C-4	38,15	1,2	C-3
C-5	139,70	4,0	C-2
C-6	122,68	1,7	C-1
C-7	31,92a	4,2	C-4
C-8	31,92a	1,4	C-3
C-9	50,09	3,9	C-2
C-10	36,62	1,4	C-3
C-11	21,05	1,5	C-1
C-12	39,75	1,9	C-1
C-13	42,34	3,4	C-2
C-14	56,71	1,5	C-3
C-15	24,31	3,8	C-4
C-16	28,26	1,4	C-1
C-17	56,07	5,4	C-2
C-18	11,87	4,3	C-5
C-19	19,33	4,5	C-5
C-20	36,18	1,1	C-3
C-21	18,80	4,2	C-5
C-22	33,97	3,6	C-4
C-23	26,14	1,9	C-1
C-24	45,88	3,5	C-2
C-25	29,20	1,4	C-3
C-26	19,84	4,0	C-4
C-27	19,05	3,7	C-5
C-28	23,10	3,7	-
C-29	12,00	3,7	-
Me	21,46	1,1*	
C=O	170,56	1,1	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = ein Signal

Tabelle A-8 : Stigmasterylacetat aus *Hordeum vulgare*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 15 % (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	37,02	3,3	C-4
C-2	27,80	1,4	C-1
C-3	74,02	3,3	C-2
C-4	38,15	1,4	C-3
C-5	139,68	3,5	C-2
C-6	122,66	1,8	C-1
C-7	31,91a	3,3	C-4
C-8	31,91a	1,3	C-3
C-9	50,02	3,5	C-2
C-10	36,63	1,2	C-3
C-11	21,01	1,4	C-1
C-12	39,65	1,3	C-1
C-13	42,24	3,8	C-2
C-14	56,81	1,5	C-3
C-15	24,38	2,4	C-4
C-16	28,93	1,2	C-1
C-17	55,96	2,7	C-2
C-18	12,07	3,5	C-5
C-19	19,34	2,8	C-5
C-20	40,52	1,0	C-3
C-21	21,11	3,0	C-5
C-22	138,33	3,2	C-4
C-23	129,31	1,4	C-1
C-24	51,26	3,3	C-2
C-25	31,91a	1,3	C-3
C-26	21,24	3,1	C-4
C-27	19,00	3,9	C-5
C-28	25,43	3,0	-
C-29	12,27	3,1	-
Me	21,47	1,1*	
C=O	170,58	1,0	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = ein Signal

Tabelle A-9 : Palmitylsäuremethylester aus *Hordeum vulgare*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ Glucose 15% (%)	C-Atom der Acetat-einheit
C-1	147,39	1,8	C-1
C-2	34,15	4,5	C-2
C-3	24,99	1,4	C-1
C-4	29,18	4,3	C-2
C-5	29,28	1,5	C-1
C-6	29,47	4,6	C-2
C-7	29,67a	-	C-1
C-8	29,67a	-	C-2
C-9	29,67a	-	C-1
C-10	29,67a	-	C-2
C-11	29,67a	-	C-1
C-12	29,67a	-	C-2
C-13	29,38	1,5	C-1
C-14	31,95	4,9	C-2
C-15	22,71	1,5	C-1
C-16	14,14	4,9	C-2
OMe	51,46	1,1 *	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.
a = Einzelsignale nicht getrennt

Tabelle A-10: Phytolacetat aus *Lemna gibba*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose 10% (%)	C-Atom der Isopren-einheit
C-1	61,47	3,2	C-1
C-2	117,97	1,4	C-2
C-3	142,82	1,6	C-3
C-4	39,88	1,6	C-4
C-5	25,04	3,0	C-1
C-6	36,64	1,6	C-2
C-7	32,70	1,5	C-3
C-8	37,37	1,4	C-4
C-9	24,48	3,1	C-1
C-10	37,44	1,4	C-2
C-11	32,81	1,5	C-3
C-12	37,30	1,6	C-4
C-13	24,82	2,8	C-1
C-14	39,38	1,5	C-2
C-15	28,00	1,4	C-3
C-16	22,65	1,6	C-4
C-17	16,39	3,4	C-5
C-18	19,74a	3,2	C-5
C-19	19,77a	3,0	C-5
C-20	22,74	2,8	C-5
Me *	21,11	1,1*	
C=O	171,18	1,0	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-11 : Sitosterylacetat aus *Lemna gibba*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 10 % (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	37,03	2,8	C-4
C-2	27,81	2,1	C-1
C-3	74,02	2,7	C-2
C-4	38,16	1,5	C-3
C-5	139,70	2,5	C-2
C-6	122,67	1,9	C-1
C-7	31,93a	2,7	C-4
C-8	31,93a	1,3	C-3
C-9	50,08	2,6	C-2
C-10	36,63	1,6	C-3
C-11	21,06	1,9	C-1
C-12	39,79	1,9	C-1
C-13	42,35	2,3	C-2
C-14	56,73	1,7	C-3
C-15	24,32	2,6	C-4
C-16	28,27	1,8	C-1
C-17	56,08	2,5	C-2
C-18	11,88	3,1	C-5
C-19	19,33	3,2	C-5
C-20	36,18	1,5	C-3
C-21	18,81	3,0	C-5
C-22	33,98	2,6	C-4
C-23	26,14	2,3	C-1
C-24	45,89	2,5	C-2
C-25	29,20	1,6	C-3
C-26	19,84	2,6	C-4
C-27	19,07	2,6	C-5
C-28	23,11	2,9	-
C-29	12,01	2,9	-
Me	21,45	1,1*	
C=O	170,56	1,1	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = ein Signal.

Tabelle A-12 : Stigmasterylacetat aus *Lemna gibba*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 10 % (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	37,00	2,9	C-4
C-2	27,78	2,2	C-1
C-3	74,00	2,6	C-2
C-4	38,16	1,5	C-3
C-5	139,68	2,6	C-2
C-6	122,66	2,4	C-1
C-7	31,90a	2,6	C-4
C-8	31,90a	1,3	C-3
C-9	50,03	2,9	C-2
C-10	36,62	1,5	C-3
C-11	21,03	1,8	C-1
C-12	39,66	1,7	C-1
C-13	42,22	2,9	C-2
C-14	56,80	1,5	C-3
C-15	24,36	2,8	C-4
C-16	28,94	1,8	C-1
C-17	55,96	2,6	C-2
C-18	12,05	3,1	C-5
C-19	19,33	3,0	C-5
C-20	40,53	1,6	C-3
C-21	21,12	2,6	C-5
C-22	138,35	2,5	C-4
C-23	129,26	2,0	C-1
C-24	51,26	2,5	C-2
C-25	31,90a	1,3	C-3
C-26	21,23	2,6	C-4
C-27	19,00	3,2	C-5
C-28	25,43	2,6	-
C-29	12,27	2,8	-
Me	21,48	1,1*	
C=O	170,58	1,2	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = ein Signal

Tabelle A-13: β -Carotin aus *Lemna gibba*

C-Atom	δ (ppm)	Relative ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose 10% (%)	C-Atom der Isopren-einheit
C-1	34,32	1,2	C-3
C-2	39,72	1,1 *	C-2
C-3	19,31	2,3	C-1
C-4	33,16	1,6	C-4
C-5	129,40	0,9	C-3
C-6	137,95	1,0	C-2
C-7	126,70	1,5	C-1
C-8	137,80	1,0	C-4
C-9	136,05	0,8	C-3
C-10	130,87	1,0	C-2
C-11	125,07	1,7	C-1
C-12	137,27	0,9	C-4
C-13	136,50	0,7	C-3
C-14	132,44	1,0	C-2
C-15	130,02	2,0	C-1
C-16	29,01a	1,2	C-4
C-17	29,01a	1,8	C-5
C-18	21,79	2,1	C-5
C-19	12,79	2,0	C-5
C-20	12,84	1,8	C-5

* = Referenz, wird als 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt gesetzt.

a = ein Signal.

Tabelle A-14: Lutein aus *Lemna gibba*

C-Atom	δ (ppm)	Relative ^{13}C -Anreicherung von $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{-Glucose}$ 10% (%)	C-Atom	δ (ppm)	Relative ^{13}C -Anreicherung	C-Atom der Isopren-einheit
C-1	37,15	1,0	C-1'	34,06	1,7	C-3
C-2	48,44	1,1 *	C-2'	44,67	1,7	C-2
C-3	65,12	2,6	C-3'	65,96	2,6	C-1
C-4	42,57	1,4	C-4'	124,49	1,5	C-4
C-5	126,19	1,3	C-5'	137,76	1,6	C-3
C-6	137,58a	1,5	C-6'	54,98	1,5	C-2
C-7	125,60b	2,6	C-7'	128,76	2,7	C-1
C-8	138,52	1,3	C-8'	138,03	1,2	C-4
C-9	135,72	1,1	C-9'	135,10	1,1	C-3
C-10	131,32	1,4	C-10'	130,82	1,3	C-2
C-11	124,95	2,6	C-11'	125,60b	2,6	C-1
C-12	137,58a	1,5	C-12'	137,58a	1,5	C-4
C-13	136,44	1,5	C-13'	136,52	1,1	C-3
C-14	132,60	1,4	C-14'	132,60	1,4	C-2
C-15	130,06c	2,5	C-15'	130,11c	2,5	C-1
C-16	28,75	1,4	C-16'	29,52	1,6	C-4
C-17	30,28	2,5	C-17'	24,28	2,4	C-5
C-18	21,66	2,7	C-18'	22,91	3,3	C-5
C-19	12,79	3,1	C-19'	13,14	2,8	C-5
C-20	12,84d	2,8	C-20'	12,84d	2,8	C-5

a, b, d = Identische chemische Verschiebung

c = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig

* = Referenz, wird als 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt gesetzt.

Tabelle A-15: Plastochinon-9 *Lemna gibba*

C-Atome	δ (ppm)	Relative ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ Glucose 10% (%)	C-Atom der Isopreneinheit
Me-2'	12,05a	1,7	
Me-3'	12,39a	1,8	
C-37, C-38, C-39, C-40, C-41, C-42, C-43, C-44	16,05 16,17	2,0 2,6	C-5
C-45	17,70	1,8	C-5
C-36	25,71	1,1	C-4
C-1, C-5, C-9, C-13, C-17, C-21, C-25, C-29, C-33	26,53 26,75 27,5	2,0 1,9 2,0	C-1
C-4, C-8, C-12, C-16, C-20, C-24, C-28, C-32	39,76	1,1*	C-4
C-2, C-6, C-10, C-14, C-18, C-22, C-26, C-34	118,17 123,84 124,30 124,45	1,1 1,3 1,1 1,0	C-2
C-6'	132,06	1,3	
C-3, C-7, C-11, C-15, C-19, C-23, C-27, C-35	134,96 135,45 139,72	1,1 1,1 1,0	C-3
C-3'	140,60b	1,1	
C-2'	140,99b	1,9	
C-5'	148,00	1,7	
C-1'	187,70c	1,0	
C-4'	187,84c	1,1	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.
 1', 2', ... 5': C-Atome am Chinonring.
 a, b, c = austauschbar

Tabelle A-16 : Palmitylsäuremethylester aus *Lemna gibba*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{Glucose}$ 10% (%)	C-Atom der Acetat-einheit
C-1	147,41	2,0	C-1
C-2	34,13	2,5	C-2
C-3	24,97	1,2	C-1
C-4	29,17	2,3	C-2
C-5	29,28	1,5	C-1
C-6	29,47	2,5	C-2
C-7	29,68a	-	C-1
C-8	29,68a	-	C-2
C-9	29,68a	-	C-1
C-10	29,68a	-	C-2
C-11	29,68a	-	C-1
C-12	29,68a	-	C-2
C-13	29,38	1,3	C-1
C-14	31,94	2,7	C-2
C-15	22,71	1,5	C-1
C-16	14,15	2,8	C-2
OMe	51,47	1,1 *	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.
a = Einzelsignale nicht getrennt

Tabelle A-17: Phytylacetat aus *Scenedesmus obliquus*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{Pyruvat}$ 0,05 g/l (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	61,46	1,3	C-1
C-2	118,02	1,0	C-2
C-3	142,81	1,1	C-3
C-4	39,88	1,1	C-4
C-5	25,05	1,3	C-1
C-6	36,66	1,1	C-2
C-7	32,69	1,1	C-3
C-8	37,38	1,1	C-4
C-9	24,49	1,2	C-1
C-10	37,45	1,1	C-2
C-11	32,81	1,1	C-3
C-12	37,32	1,0	C-4
C-13	24,82	1,1	C-1
C-14	39,39	1,0	C-2
C-15	28,00	1,0	C-3
C-16	22,65	1,0	C-4
C-17	16,39	4,9	C-5
C-18	19,74a	4,7	C-5
C-19	19,77a	4,9	C-5
C-20	22,74	4,3	C-5
Me *	21,09	1,1*	
C=O	171,17	0,9	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-18 : Palmitinsäuremethylester aus *Scenedesmus obliquus*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[\text{3-}^{13}\text{C}]\text{Pyruvat}$ 0,05 g/l (%)	C-Atom der Acetat-einheit
C-1	-	-	C-1
C-2	34,15	6,6	C-2
C-3	24,99	1,8	C-1
C-4	29,18	6,0	C-2
C-5	-	-	C-1
C-6	29,47	5,6	C-2
C-7	29,68a	-	C-1
C-8	29,68a	-	C-2
C-9	29,68a	-	C-1
C-10	29,68a	-	C-2
C-11	29,68a	-	C-1
C-12	29,68a	-	C-2
C-13	-	-	C-1
C-14	31,95	6,1	C-2
C-15	22,72	1,8	C-1
C-16	14,16	5,2	C-2
OMe	51,46	1,1 *	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.
a = Einzelsignale nicht getrennt.

Tabelle A-19: Phytylacetat aus *Chlamydomonas reinhardtii*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 10% (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	61,46	3,4	C-1
C-2	118,00	1,0	C-2
C-3	142,80	1,1	C-3
C-4	39,88	1,4	C-4
C-5	25,05	3,3	C-1
C-6	36,65	1,2	C-2
C-7	32,69	1,2	C-3
C-8	37,38	1,4	C-4
C-9	24,48	3,3	C-1
C-10	37,45	1,0	C-2
C-11	32,81	1,1	C-3
C-12	37,31	1,4	C-4
C-13	24,82	3,0	C-1
C-14	39,39	1,1	C-2
C-15	28,00	1,0	C-3
C-16	22,64	1,4	C-4
C-17	16,39	3,3	C-5
C-18	19,74a	3,2	C-5
C-19	19,77a	3,1	C-5
C-20	22,73	3,0	C-5
Me *	21,11	1,1*	
C=O	171,18	1,0	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-20 Chondrillasterylacetat aus *Chlamydomonas reinhardtii*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ¹³ C- Anreicherung von [1- ¹³ C]-Glucose 10% (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	36,88	1,3	C-4
C-2	27,53	2,4	C-1
C-3	73,51	1,0	C-2
C-4	33,85	1,1	C-3
C-5	40,11	1,0	C-2
C-6	29,56	2,4	C-1
C-7	117,34	1,2	C-4
C-8	139,54	1,1	C-3
C-9	49,31	0,9	C-2
C-10	34,26	1,1	C-3
C-11	21,51a	2,6	C-1
C-12	39,44	2,6	C-1
C-13	43,29	0,8	C-2
C-14	55,10	1,0	C-3
C-15	23,01	1,0	C-4
C-16	28,41	2,5	C-1
C-17	55,91	0,9	C-2
C-18	12,11	2,6	C-5
C-19	12,96	2,5	C-5
C-20	40,79	1,0	C-3
C-21	21,37	2,0	C-5
C-22	138,13	1,3	C-4
C-23	129,54	2,2	C-1
C-24	51,25	0,9	C-2
C-25	31,86	1,3	C-3
C-26	20,94	2,4	C-5
C-27	18,97	1,3	C-4
C-28	25,41	2,6	-
C-29	12,46	1,9	-
Me	21,48a	1,1	
C=O	170,58	1,1*	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ¹³C-Gehalt.

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-21: 22-Dihydrochondrillasteryl-Acetat aus *Chlamydomonas reinhardtii*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 10 % (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	36,88	1,8	C-4
C-2	27,53	4,1	C-1
C-3	73,52	1,4	C-2
C-4	33,85	2,1	C-3
C-5	40,10	1,2	C-2
C-6	29,57	3,8	C-1
C-7	117,30	1,6	C-4
C-8	139,59	1,7	C-3
C-9	49,31	2,0	C-2
C-10	34,24	1,2	C-3
C-11	21,52a	4,4	C-1
C-12	39,53	4,3	C-1
C-13	43,39	1,5	C-2
C-14	55,02	1,5	C-3
C-15	22,99	1,6	C-4
C-16	27,98	4,4	C-1
C-17	56,09	1,6	C-2
C-18	11,88	4,3	C-5
C-19	12,96	3,7	C-5
C-20	36,75	1,4	C-3
C-21	19,00b	4,3	C-5
C-22	33,89	1,8	C-4
C-23	26,55	4,1	C-1
C-24	46,10	1,7	C-2
C-25	29,00	1,6	C-3
C-26	19,00b	4,3	C-5
C-27	19,63	2,0	C-4
C-28	23,05	4,2	-
C-29	12,35	4,9	-
Me	21,52a	0,9	
C=O	170,70	1,1*	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a, b = identisch.

Tabelle A-22: Ergost-7-enyl-Acetat aus *Chlamydomonas reinhardtii*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 10 % (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	36,86	1,3	C-4
C-2	27,52	2,2	C-1
C-3	73,52	1,1	C-2
C-4	33,85	1,1	C-3
C-5	40,08	0,9	C-2
C-6	29,56	3,6	C-1
C-7	117,30	1,6	C-4
C-8	139,60	0,9	C-3
C-9	49,30	0,8	C-2
C-10	34,22	0,8	C-3
C-11	21,50a	2,5	C-1
C-12	39,52	3,1	C-1
C-13	43,39	0,8	C-2
C-14	55,00	1,0	C-3
C-15	22,97	1,5	C-4
C-16	27,93	2,5	C-1
C-17	56,03	1,1	C-2
C-18	11,87	2,9	C-5
C-19	12,95	3,0	C-5
C-20	36,66	1,1	C-3
C-21	19,04	2,7	C-5
C-22	33,69	1,3	C-4
C-23	30,73	2,6	C-1
C-24	39,10	0,8	C-2
C-25	31,49	1,0	C-3
C-26	17,61	2,8	C-5
C-27	20,54	1,5	C-4
C-28	15,46	2,5	-
Me	21,50a	0,7	
C=O *	170,72	1,1*	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = identisch

Tabelle A-23: Lutein aus *Chlamydomonas reinhardtii*

C-Atom	δ (ppm)	Relative ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose 10% (%)	C-Atom	δ (ppm)	Relative ^{13}C -Anreicherung	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	37,15	1,1	C-1'	34,06	1,6	C-3
C-2	48,47	1,1*	C-2'	44,67	1,3	C-2
C-3	65,12	4,3	C-3'	65,96	4,0	C-1
C-4	42,59	1,8	C-4'	124,51	1,7	C-4
C-5	126,19	1,4	C-5'	137,76	1,8	C-3
C-6	137,59a	1,3	C-6'	54,99	1,2	C-2
C-7	125,62b	3,1	C-7'	128,75	2,8	C-1
C-8	138,52	1,7	C-8'	138,03	1,3	C-4
C-9	135,71	0,9	C-9'	135,10	1,0	C-3
C-10	131,32	1,2	C-10'	130,83	1,1	C-2
C-11	124,96	3,2	C-11'	125,62b	3,1	C-1
C-12	137,59a	1,3	C-12'	137,59a	1,3	C-4
C-13	136,44	1,1	C-13'	136,52	0,9	C-3
C-14	132,60c	1,0	C-14'	132,60c	1,0	C-2
C-15	130,06	2,7	C-15'	130,11	3,3	C-1
C-16	28,76	1,9	C-16'	29,53	1,6	C-4
C-17	30,29	3,9	C-17'	24,30	3,6	C-5
C-18	21,64	4,1	C-18'	22,89	4,1	C-5
C-19	12,78	4,1	C-19'	13,13	3,2	C-5
C-20	12,84d	3,4	C-20'	12,84d	3,4	C-5

a, b, c, d = identische chemische Verschiebung;

* = Referenz, wird als 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt gesetzt.

Tabelle A-24 : Palmitinsäuremethylester aus *Chlamydomonas reinhardtii*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{Glucose}$ 10% (%)	C-Atom der Acetat-einheit
C-1	147,40	1,4	C-1
C-2	34,14	3,1	C-2
C-3	24,98	1,0	C-1
C-4	29,17	3,0	C-2
C-5	29,27	1,3	C-1
C-6	29,47	3,1	C-2
C-7	29,67a	-	C-1
C-8	29,67a	-	C-2
C-9	29,67a	-	C-1
C-10	29,67a	-	C-2
C-11	29,67a	-	C-1
C-12	29,67a	-	C-2
C-13	29,38	1,1	C-1
C-14	31,94	3,2	C-2
C-15	22,71	1,1	C-1
C-16	14,14	3,3	C-2
OMe	51,46	1,1*	

a = Einzelsignale nicht getrennt

*** = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.**

Tabelle A-25 : Docosanylacetat aus *Chlamydomonas reinhardtii*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ Glucose 10% (%)	C-Atom der Acetat-einheit
C-1	64,70	1,2	C-1
C-2	29,29	3,3	C-2
C-3	25,94	1,0	C-1
C-4	28,64	3,6	C-2
C-5	29,55	1,5	C-1
C-6	29,60	2,9	C-2
C-7 – C18	29,72a	-	
C-19	29,39	1,2	C-1
C-20	31,95	3,4	C-2
C-21	22,71	1,2	C-1
C-22	14,13	3,5	C-2
Me	21,04	1,1*	
C=O	171,27	1,1	

a = Einzelsignale nicht getrennt

*** = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.**

Tabelle A-26: Phytylacetat aus *Chlorella fusca*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{-Glucose}$ 10% (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	61,46	3,6	C-1
C-2	118,02	1,0	C-2
C-3	142,79	1,1	C-3
C-4	39,89	1,3	C-4
C-5	25,06	3,5	C-1
C-6	36,67	1,1	C-2
C-7	32,70	1,0	C-3
C-8	37,39	1,3	C-4
C-9	24,49	3,5	C-1
C-10	37,46	1,0	C-2
C-11	32,82	1,0	C-3
C-12	37,33	1,3	C-4
C-13	24,82	3,2	C-1
C-14	39,40	1,0	C-2
C-15	28,00	1,0	C-3
C-16	22,64	1,3	C-4
C-17	16,39	3,7	C-5
C-18	19,74a	3,3	C-5
C-19	19,77a	3,3	C-5
C-20	22,74	3,2	C-5
Me *	21,08	1,1*	
C=O	171,15	0,9	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-27: Chondrillasterylacetat aus *Chlorella fusca*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 10% (%)	C-Atom der Isopren- einheit
C-1	36,88	1,3	C-4
C-2	27,53	4,0	C-1
C-3	73,51	0,8	C-2
C-4	33,85	1,3	C-3
C-5	40,11	1,1	C-2
C-6	29,56	4,6	C-1
C-7	117,35	1,7	C-4
C-8	139,54	0,9	C-3
C-9	49,31	1,2	C-2
C-10	34,25	1,2	C-3
C-11	21,51a	3,2	C-1
C-12	39,44	4,2	C-1
C-13	43,29	1,1	C-2
C-14	55,10	1,2	C-3
C-15	23,02	1,1	C-4
C-16	28,40	4,0	C-1
C-17	55,90	1,2	C-2
C-18	12,10	4,1	C-5
C-19	12,95	4,9	C-5
C-20	40,78	1,3	C-3
C-21	21,37	3,6	C-5
C-22	138,13	1,4	C-4
C-23	129,54	4,0	C-1
C-24	51,25	0,9	C-2
C-25	31,85	1,0	C-3
C-26	20,94	4,1	C-5
C-27	18,96	1,5	C-4
C-28	25,41	3,9	-
C-29	12,45	4,5	-
Me	21,48a	1,1	
C=O	170,58	1,1 *	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = Austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-28: 22-Dihydrochondrillasteryl-Acetat aus *Chlorella fusca*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose 10 % (%)	C-Atom der Isopreneinheit
C-1	36,89	1,3	C-4
C-2	27,54	3,4	C-1
C-3	73,52	1,2	C-2
C-4	33,85	1,6	C-3
C-5	40,11	0,7	C-2
C-6	29,57	3,3	C-1
C-7	117,30	1,2	C-4
C-8	139,59	1,0	C-3
C-9	49,32	1,3	C-2
C-10	34,24	1,0	C-3
C-11	21,52a	3,9	C-1
C-12	39,55	3,7	C-1
C-13	43,39	1,0	C-2
C-14	55,03	1,0	C-3
C-15	22,99	1,1	C-4
C-16	27,98	3,8	C-1
C-17	56,10	1,6	C-2
C-18	11,88	3,7	C-5
C-19	12,96	3,2	C-5
C-20	36,76	1,0	C-3
C-21	19,00b	3,5	C-5
C-22	33,90	1,4	C-4
C-23	26,57	3,2	C-1
C-24	46,11	1,1	C-2
C-25	29,01	1,3	C-3
C-26	19,00b	3,5	C-5
C-27	19,63	1,5	C-4
C-28	23,06	3,6	-
C-29	12,35	4,4	-
Me	21,52a	1,1	
C=O	170,69	1,1*	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a, b = identisch.

Tabelle A-29: Ergost-7-enyl-Acetat aus *Chlorella fusca*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von [1- ^{13}C]-Glucose 10 % (%)	C-Atom der Isopren-einheit
C-1	36,88	1,0	C-4
C-2	27,54	3,5	C-1
C-3	73,52	1,1	C-2
C-4	33,85	1,0	C-3
C-5	40,10	1,1	C-2
C-6	29,57	4,5	C-1
C-7	117,30	1,4	C-4
C-8	139,60	1,3	C-3
C-9	49,32	1,1	C-2
C-10	34,24	0,9	C-3
C-11	21,52a	4,0	C-1
C-12	39,53	4,0	C-1
C-13	43,39	1,1	C-2
C-14	55,02	1,2	C-3
C-15	22,98	1,3	C-4
C-16	27,93	4,0	C-1
C-17	56,03	1,1	C-2
C-18	11,88	3,4	C-5
C-19	12,95	3,4	C-5
C-20	36,66	1,0	C-3
C-21	19,05	3,0	C-5
C-22	33,70	1,3	C-4
C-23	30,75	3,3	C-1
C-24	39,12	1,0	C-2
C-25	31,51	1,1	C-3
C-26	17,63	3,5	C-5
C-27	20,54	1,0	C-4
C-28	15,48	3,9	-
Me	21,50a	0,8	
C=O *	170,72	1,1*	

* = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.

a = Austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig.

Tabelle A-30: β -Carotin aus *Chlorella fusca*

C-Atom	δ (ppm)	Relative ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose 10% (%)	C-Atom der Isopren-einheit
C-1	34,32	0,9	C-3
C-2	39,71	1,1*	C-2
C-3	19,31	3,4	C-1
C-4	33,16	1,5	C-4
C-5	129,40	0,9	C-3
C-6	137,95	0,8	C-2
C-7	126,69	2,5	C-1
C-8	137,80	1,0	C-4
C-9	136,05	0,8	C-3
C-10	130,87	0,8	C-2
C-11	125,07	2,6	C-1
C-12	137,26	1,1	C-4
C-13	136,50	0,8	C-3
C-14	132,44	0,7	C-2
C-15	130,01	2,8	C-1
C-16	29,01a	1,2a	C-4
C-17	29,01a	3,1a	C-5
C-18	21,79	3,0	C-5
C-19	12,79	2,8	C-5
C-20	12,84	3,5	C-5

a = austauschbar, da Zuordnung nicht eindeutig;

* = Referenz, wird als 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt gesetzt.

Tabelle A-31 : Palmitinsäuremethylester aus *Chlorella fusca*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C -Anreicherung von $[1-^{13}\text{C}]$ Glucose 10% (%)	C-Atom der Acetat-einheit
C-1	147,40	1,4	C-1
C-2	34,14	3,4	C-2
C-3	24,98	1,0	C-1
C-4	29,17	3,2	C-2
C-5	29,27	1,2	C-1
C-6	29,47	3,4	C-2
C-7	29,67a	-	C-1
C-8	29,67a	-	C-2
C-9	29,67a	-	C-1
C-10	29,67a	-	C-2
C-11	29,67a	-	C-1
C-12	29,67a	-	C-2
C-13	29,38	1,1	C-1
C-14	31,94	3,5	C-2
C-15	22,71	1,1	C-1
C-16	14,14	3,6	C-2
OMe	51,46	1,1*	

a = Einzelsignale nicht getrennt

*** = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.**

Tabelle A-32 : Docosanylacetat aus *Chlorella fusca*

C-Atom	δ (ppm)	Absolute ^{13}C - Anreicherung von [1- ^{13}C]Glucose 10% (%)	C-Atom der Acetat- einheit
C-1	64,70	1,2	C-1
C-2	29,28	3,8	C-2
C-3	25,94	1,1	C-1
C-4	28,64	3,6	C-2
C-5	29,55	1,4	C-1
C-6	29,60	3,4	C-2
C-7 – C18	29,72a	-	
C-19	29,38	1,3	C-1
C-20	31,95	4,2	C-2
C-21	22,71	1,1	C-1
C-22	14,13	4,0	C-2
Me	21,04	1,1*	
C=O	171,27	1,0	

a = Einzelsignale nicht getrennt

*** = Referenz, 1.1% natürlicher ^{13}C -Gehalt.**

Einbauraten der markierten Vorstufen [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose und [2-¹³C]-Mevalonsäure in Isoprenoide

Die folgenden Tabellen enthalten die aus den Massenspektren ablesbaren Intensitäten der untersuchten Fragmente [Phytylacetat – AcOH]⁺, [Sterylacetat- AcOH]⁺ oder [Sterylacetat]⁺. Bei den Messungen wurden Hintergrundsignale (Basislinie des GC/MS-Chromatogramms) durch ein Subtraktionsverfahren entfernt.

Die Einbauraten der markierten Vorstufen in die Isoprenoide wurden mittels der Methode der Korrektur der natürlichen ¹³C-Anreicherung (siehe 2.3) aus den massenspektroskopischen Daten berechnet. Hierbei wird zugrundegelegt, daß ein Phytolmolekül (Diterpen, vier Isopreneinheiten) aus einer IPP-Vorstufe an maximal vier Positionen markiert werden kann. Ein Sterolmolekül (Triterpen, 6 Isopreneinheiten) kann aus [1-²H₁]-1-Desoxy-D-Xylulose an maximal vier Positionen, sowie aus [2-¹³C]-Mevalonsäure an fünf Positionen markiert werden. Der Grund dafür, daß im Sterolgerüst nicht alle 6 Isopreneinheiten markierbar sind, liegt darin, daß in der Sterolbiosynthese zwischen Cycloartenol und dem Sterol drei Methylgruppen entfernt werden (siehe 4.0).

Jede Tabelle enthält eine Angabe über die eingesetzte markierte Vorstufe (DOX, MVA) und deren Konzentration im Anzuchtmedium. Die gemessenen Intensitäten sind jeweils auch in % der Gesamtintensität des Molekülionenclusters angegeben. „□“ verweist auf die berechnete Einbaurate der Vorstufe.

Referenzsubstanzen mit natürlichem ¹³C-Gehalt

Phytol

$$M^+ = [\text{Phytylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 278,1$$

M	M+1	M+2	M+3	M+4
7288	1576	182	27	
80,33%	17,37%	2,01%	0,30%	

□ 0,16 %

Sitosterol (Δ^5 24-Ethyl-Sterol)

$$M^+ = [\text{Sterylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 396,4$$

M	M+1	M+2	M+3
4529	1401	219	22
73,39%	22,70%	3,55%	0,36%

□ 0,01 %

Scenedesmuus obliquus**Phytol**

$$M^+ = [\text{Phetylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 278,1$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5
MVA 0,05 %	46560	10527	1236	4	0	0
	79,83%	18,05%	2,12%	0,01%	0,00%	0,00%

□ 0,17 %

DOX 0,05 %	5055	4005	2449	1964	2667	560
	30 %	24 %	15 %	12 %	16 %	3 %

□ 36,79 %

Mittel einiger Spektren aus dem vorderen Teil des Peaks des GC-Chromatogramms.

DOX 0,05 %	-	348	499	456	1022
	-	15 %	21 %	20 %	44 %

□ 67,80 %

Ergost-7-enol (Δ^7 24-Methyl-Sterol)

$$M^+ = [\text{Steryacetat}]^+ = 442,3$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
MVA 0,05 %	9941	3238	508				
	72,63%	23,66%	3,71%				

□ 0,25 %

DOX 0,05 %	1987	1722	1181	996	1020	445	256
	26,12%	22,64%	15,53%	13,09%	13,41%	5,85%	3,37%

□ 42,69 %

Chondrillasterol ($\Delta^{7,22}$ 24-Ethyl-Sterol)

$$M^+ = [\text{Steryacetat}]^+ = 454,3$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
MVA 0,05 %	4752	1552	203				
	73,03%	23,85%	3,12%				

□ 0,06%

DOX 0,05 %	971	869	603	545	549	159	30
	26,06%	23,32%	16,18%	14,63%	14,73%	4,27%	0,81%

□ 38,82 %

Chlamydomonas reinhardtii**Phytol**

$$M^+ = [\text{Phytylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 278,1$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4
DOX 0,05 %	32261	16320	6192	2053	373
	56,40%	28,53%	10,83%	3,59%	0,65%
□ 10,94 %					
MVA 0,05 %	24642	5001	721		
	81,16%	16,47%	2,37%		
□ -0,10 %					

 $\Delta^{5,7,22}$ 24-Ethyl-Sterol

$$M^+ = [\text{Sterylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 392$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4
DOX 0,05 %	4827	2970	1313	349	53
	50,75%	31,22%	13,80%	3,67%	0,56%
□ 10,32 %					
MVA 0,05 %	8386	2777	166		
	74,02%	24,51%	1,47%		
□ -0,67 %					

 $\Delta^{5,7,22}$ 24-Methyl-Sterol

$$M^+ = [\text{Sterylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 378$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4
DOX 0,05 %	7414	4132	1480	271	24
	55,66%	31,02%	11,11%	2,03%	0,18%
□ 7,56 %					

Gloeotilopsis planctonica**Phytol**M⁺ = [Phytylacetat – AcOH]⁺ = 278,1

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
DOX 0,05 %	815	358	456	1264	2797	651	191
	12,48%	5,48%	6,98%	19,35%	42,82%	9,97%	2,92%
□ 74,06 %							
MVA 0,05 %	26451	6411	788	129	53	17	
	78,14%	18,94%	2,33%	0,38%	0,16%	0,05%	
□ 1,0 %							

 Δ^5 24-Ethyl-SterolM⁺ = [Sterylacetat- AcOH]⁺ = 396

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
DOX 0,05 %	352	160	203	676	1259	387	65
	11,35%	5,16%	6,54%	21,79%	40,59%	12,48%	2,10%
□ 72,6 %							
MVA 0,05 %	8276	2609	421	65	33	8	1
	72,51%	22,86%	3,69%	0,57%	0,29%	0,07%	0,01%
□ 0,54 %							

Klebsormidium flaccidum**Phytol**M⁺ = [Phytylacetat - AcOH]⁺ = 278,1

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5
MVA 0,05 %	15091	3277	392			
	80,44%	17,47%	2,09%			
□ 0,00 %						
MVA 0,02 %	8847	2123	304	31		
	78,26%	18,78%	2,69%	0,27%		
□ 0,84 %						
DOX 0,05 %	26501	9688	1927	353	82	16
	68,71%	25,12%	5,00%	0,92%	0,21%	0,04%
□ 4,32 %						
DOX 0,02 %	13020	3682	540	31	0	0
(4 Messungen)	14024	3697	554	100	19	6
	16846	4512	665	54	1	1
	16881	4590	655	26	0	0
	76,02%	20,64%	3,03%	0,27%	0,03%	0,01%
□ 1,51 %						

 Δ^5 24-Methyl-SterolM⁺ = [Sterylacetat - AcOH]⁺ = 382,3

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5
MVA 0,05 %	1398	2530	2293	1378	404	
	17,47%	31,61%	28,65%	17,22%	5,05%	
□ 26,03 %						
MVA 0,02 %	2592	1807	745	211		
	48,40%	33,74%	13,91%	3,94%		
□ 8,72 %						
DOX 0,02 %	5999	2255	456	65	0	0
(4 Messungen)	5456	2024	407	60	6	0
	7154	2682	532	79	10	1
	7852	2920	574	85	11	1
	68,50%	25,58%	5,10%	0,75%	0,07%	0,00%
□ 2,13 %						
DOX 0,05 %	26050	11456	2715	484	76	8
	63,87%	28,09%	6,66%	1,19%	0,19%	0,02%
□ 4,00 %						

$\Delta^{5,22}$ 24-Ethyl-Sterol

$$M^+ = [\text{Sterylnacetat} - \text{AcOH}]^+ = 394$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5
MVA 0,05 %	1311	2297	1913	820	132	
	20,25%	35,49%	29,55%	12,67%	2,04%	
□ 22,01 %						
MVA 0,02 %	2357	1420	537	147	32	
	52,46%	31,60%	11,95%	3,27%	0,71%	
□ 7,48 %						
DOX 0,02 %	5312	1964	378	49	0	0
(4 Messungen)	4997	1825	341	47	5	0
	7023	2566	486	63	9	1
	7140	2630	498	66	8	2
	69,11%	25,38%	4,81%	0,64%	0,06%	0,01%
□ 1,59 %						
DOX 0,05 %	27542	12507	2918	482	106	22
	63,20%	28,70%	6,70%	1,11%	0,24%	0,05%
□ 3,95 %						

Spirogyra sp.**Phytol**

$$M^+ = [\text{Phytylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 278,1$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
DOX 0,05 %	1866	626	937	2250	2572	526	73
	21,08%	7,07%	10,59%	25,42%	29,06%	5,94%	0,82%
□ 58,25 %							
MVA 0,02 %	7195	2014	380	54	5		
	74,58%	20,87%	3,94%	0,56%	0,05%		
□ 2,25 %							

 Δ^5 24-Ethyliden-Sterol

$$M^+ = [\text{Sterylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 394,3$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
DOX 0,05 %	538	448	320	186	114	29	5
	32,80%	27,32%	19,51%	11,34%	6,95%	1,77%	0,30%
□ 27,3 %							
MVA 0,02 %	1610	979	548	281	149	51	
	44,50%	27,06%	15,15%	7,77%	4,12%	1,41%	
□ 18,48 %							

 Δ^5 24-Methylen-Sterol

$$M^+ = [\text{Sterylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 380$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
DOX 0,05 %	2027	2993	1977	916	332	66	9
	24,36%	35,97%	23,76%	11,01%	3,99%	0,79%	0,11%
□ 26,48 %							
MVA 0,02 %	905	976	743	466	248	88	
	26,42%	28,49%	21,69%	13,60%	7,24%	2,57%	
□ 30,98 %							

Lemna gibba**Phytol**M⁺ = [Phytylacetat – AcOH]⁺ = 278,1

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	
DOX 0,02 %	7279	4949	2906	1452	512	
	42,57%	28,94%	17,00%	8,49%	2,99%	
□ 19,70 %						
DOX 0,05 %	4171	3750	4338	4332	3360	744
	20,15%	18,12%	20,96%	20,93%	16,24%	3,60%
□ 45,92 %						
DOX 0,07 %	993	676	688	1054	1441	130
	19,93%	13,57%	13,81%	21,16%	28,92%	2,61%
□ 52,9 %						
MVA 0,01 %	36530	8604	1309	372		
	78 %	18 %	3 %	1 %		
□ 1,18 %						
MVA 0,02 %	28626	7121	813			
	78 %	19 %	2 %			
□ 0,57%						

Sitosterol (Δ^5 24-Ethyl-Sterol)M⁺ = [Steryacetat- AcOH]⁺ = 396,4

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	
DOX 0,02 %	7471	3739	1237	251		
	58,84%	29,45%	9,74%	1,98%		
□ 6,01 %						
DOX 0,05 %	5256	3748	2175	1152	317	
	41,56%	29,63%	17,20%	9,11%	2,51%	
□ 17,75 %						
DOX 0,07 %	1305	814	535	480	287	
	38,15%	23,79%	15,64%	14,03%	8,39%	
□ 25,06 %						
MVA 0,002 %	23097	8734	2010	437	-	
	67 %	25 %	6 %	1 %		
□ 2,05 %						
MVA 0,01 %	10676	4744	1913	754	-	
	59 %	26 %	10 %	4 %		
□ 5,82 %						
MVA 0,02 %	9106	5450	2376	1276	643	
	48 %	29 %	13 %	7 %	3 %	
□ 11,84 %						

Hordeum vulgare**Phytol**

$$M^+ = [\text{Phtylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 278,1$$

	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6
DOX 0,05 %	356	154	85	47	178	26	1
	42,03%	18,18%	10,04%	5,55%	21,02%	3,07%	0,12%
□ 33,29 %							

Sitosterol (Δ^5 24-Ethyl-Sterol)

$$M^+ = [\text{Sterylacetat} - \text{AcOH}]^+ = 396,4$$

	M	M+1	M+2
DOX 0,05 %	3388	972	43
	76,95%	22,08%	0,98%
□ -1,69 %			

Bisher von der Arbeitsgruppe Lichtenthaler unter meiner Mitwirkung entstandene Publikationen.

- DISCH, A., SCHWENDER, J., MÜLLER, C., LICHTENTHALER, H. K. und ROHMER, M.: Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714. - *Biochem. J.* **333**, 381-388 (1998).
- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J.: The 1-deoxy-D-xylulose-5-Phosphate pathway for biosynthesis of carotenoids and plastidic isoprenoids. – In: Sanchez, J., Cerda-Olmedo, E., Martinez-Force, E. (Hrsg.): Advances in Lipid Research. *Universidad de Sevilla, Sevilla*, S. 419-424 (1998).
- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., SEEMANN, M. und ROHMER, M.: Carotenoid biosynthesis in green algae proceeds via a novel biosynthetic pathway. – In: Mathis, P. (Hrsg.): Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. III. *Kluwer Academic Publ., Dordrecht*, S. 1000-1003 (1995).
- LICHTENTHALER, H. K., ROHMER, M. und SCHWENDER, J.: Two Independent Biochemical Pathways for Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis in Higher Plants. - *Physiologia Plantarum* **101**, 643-652 (1997).
- LICHTENTHALER, H. K., ROHMER, M., SCHWENDER, J., DISCH und A. SEEMANN, M.: A novel mevalonate-independent pathway for the biosynthesis of carotenoids, phytol and prenyl chain of plastoquinone-9 in green algae and higher plants - In: Williams, J., Khan, M. U. (Hrsg.): Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London*, S. 177-179 (1997).
- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., DISCH, A. und ROHMER, M.: Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. - *FEBS Lett.* **400**, 271-274 (1997).
- MÜLLER, C., SCHWENDER, J., DISCH, A., ROHMER, M., LICHTENTHALER, F. W. und LICHTENTHALER, H. K.: Occurrence of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isopentenyl diphosphate biosynthesis in different algae groups. – In: Sanchez, J., Cerda-Olmedo, E., Martinez-Force, E. (Hrsg.): Advances in Lipid Research. *Universidad de Sevilla, Sevilla*, S. 425-428 (1998).
- SCHWENDER, J.: Untersuchungen zur Biosynthese der Isoprenoide bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* mittels ¹³C-Isotopenmarkierung. - *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe* (1995). Erschienen in: Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): *Karlsruher Beiträge zu Pflanzenphysiologie* **31**, 1-85 (1995).
- SCHWENDER, J. und LICHTENTHALER, H. K.: Mevalonat-unabhängige Biosynthese für Carotinoide und andere Isoprenoide in Grünalgen. - *Phytomedizin* **26**, 50-51 (1996).
- SCHWENDER, J., LICHTENTHALER, H. K.: Biosynthesis of lycopene in tomato fruits via the non-mevalonate isoprenoid pathway. – In: Sanchez, J., Cerda-Olmedo, E., Martinez-Force, E. (Hrsg.): Advances in Lipid Research. *Universidad de Sevilla, Sevilla*, S. 462-464 (1998).
- SCHWENDER, J., LICHTENTHALER, H. K., SEEMANN, M. und ROHMER, M.: Biosynthesis of isoprenoid chains of chlorophylls and plastoquinone in *Scenedesmus* by a novel pathway. – In: Mathis, P. (Hrsg.): Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. III. *Kluwer Academic Publ., Dordrecht*, S.1001-1004 (1995).

- SCHWENDER, J., LICHTENTHALER, H. K., SEEMANN und M. ROHMER, M.: Biosynthesis of Cytoplasmic Sterols and of the Isoprenoid Chain of Plastoquinone in *Scenedesmus* by a novel Pathway. - *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, S59 (1995).
- SCHWENDER, J., LICHTENTHALER, H. K., DISCH, A. und ROHMER, M.: Biosynthesis of carotenoids and phytol proceeds by a novel non-mevalonate pathway. - *Plant Physiol. Biochem. special issue*, S21-32 (1996).
- SCHWENDER, J., SEEMANN, M., LICHTENTHALER, H. K. und ROHMER, M.: Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. - *Biochem. J.* **316**, 73-80 (1996).
- SCHWENDER, J., LICHTENTHALER, H. K., DISCH, A. und ROHMER, M.: Biosynthesis of sterols in green algae (*Scenedesmus*, *Chlorella*) according to a novel, mevalonate-independent pathway - In: Williams, J., Khan, M. U. (Hrsg.): Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London*, S. 180-182 (1997).
- SCHWENDER, J., ZEIDLER, J., GRÖNER, R., MÜLLER, C., FOCKE, M., BRAUN, S., LICHTENTHALER, F. W. und LICHTENTHALER, H. K.: Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. - *FEBS Lett.* **414**, 129-134 (1997).
- SCHWENDER, J., MÜLLER, C., ZEIDLER, J. G. und LICHTENTHALER, H. K.: Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. - *FEBS Lett.* **455**, 140-144 (1999).
- ZEIDLER, J. G., SCHWENDER, J., MÜLLER, C., WIESNER, J., WEIDEMEYER, C., BECK, E., JOMAA, H. und LICHTENTHALER, H. K.: Inhibition of the non-mevalonate 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. - *Z. Naturf.* **53c**, 980-986 (1998).