

Karlsruher Beiträge zur Pflanzenphysiologie

Karlsruhe Contributions to Plant Physiology

Christian Müller

Untersuchungen über zwei Enzyme der plastidären Isoprenoidbiosynthese: DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase

**Investigations on two enzymes of the plastidic isoprenoid
biosynthesis: DOXP- synthase and DOXP- reductoisomerase**

Karls. Beitr. Pflanzenphysiol. 39, 1-129 (2003)
ISSN 0173 - 3133

Herausgegeben von: Hartmut K. Lichtenthaler
Botanisches Institut (Pflanzenphysiologie
und Pflanzenbiochemie)
Universität Karlsruhe (TH)
Kaiserstr. 12
D-76128 Karlsruhe

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER ZWEI ENZYME DER PLASTIDÄREN
ISOPRENOIDBIOSYNTHESE: DOXP-SYNTHASE UND DOXP-
REDUKTOISOMERASE**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von
Diplom-Biologe
Christian Müller
aus
Pforzheim
2003

Dekan: Prof. Dr. M. Metzler

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hartmut K. Lichtenthaler
2. Gutachter: Prof. Dr. János Rétey

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2003

Dank

Meinem akademischen Lehrer Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hartmut K. Lichtenthaler möchte ich sehr herzlich danken für seine Förderung und für die Möglichkeit, auf dem hochinteressanten Forschungsgebiet der plastidären Isoprenoidbiosynthese in Pflanzen forschen zu können. Im besonderen förderte er mich stets durch grundlegende Anregungen, durch die Möglichkeit auf nationalen und internationalen Tagungen meine Ergebnisse präsentieren und in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlichen zu können.

Herrn Prof. Dr. János Rétey, Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe, danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern danke ich herzlichst für die Unterstützung und für die anregenden Diskussionen. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Zeidler, Herrn Dr. Schwender und Herrn Dr. Focke.

Frau Sabine Zeiler und Frau Melanie Siehler (stud. Hilfskraft) danke ich für die Unterstützung bei einigen Experimenten.

Herrn Prof. Dr. Thomas J. Bach danke ich für die Untersuchung der Wirkung von Clomazone und 5-Ketoclomazone auf die IPP-Isomerase von Tabak.

Dank gilt auch folgenden Personen und Firmen für die großzügige Bereitstellung von Chemikalien, Hemmstoffen, Herbiziden, von Bakterienstämmen und Algen:

Prof. Dr. S. Beale, Brown University, Providence

Prof. Dr. Albert Boronat, Universitat de Barcelona,

Prof. Dr. Rodney Croteau, Washington State University,

Dr. Carl Fedtke, Bayer AG, Wuppertal,

Dr. Hassan Jomaa, Jomaa Pharmaka GmbH, Giessen

Dr. H. Ulrich May und Prof. Dr. Dr. h.c. Frieder W. Lichtenthaler, TU Darmstadt

Dr. Ulf Mißlitz, BASF AG, Ludwigshafen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel (Forschungshilfe Li 119/19-1 an Prof. Dr. H. K. Lichtenthaler).

	Abkürzungsverzeichnis	7
	English Summary	9
1	Einführung.....	13
1.1	Einteilung und Funktion der Isoprenoide	13
1.2	Biosynthese der Isoprenoide.....	15
1.2.1	Der klassische Acetat/MVA-Weg der IPP-Biosynthese	15
1.2.2	Diskrepanzen zur Biosynthese plastidärer Isoprenoide nach dem Acetat/MVA-Weg	16
1.2.3	Der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat / 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Weg (DOXP/MEP-Weg) der Isoprenoidbiosynthese	17
1.2.4	Die Synthese von Isoprenoiden aus IPP und DMAPP.....	19
1.3	Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese.....	20
1.4	Problemstellung	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Chemikalien und Geräte	25
2.2	Allgemeine Verfahren.....	26
2.2.1	Pflanzenanzucht	26
2.2.2	Isolierung von Etiochloroplasten	26
2.2.3	Proteinbestimmung	26
2.2.4	Antikörperaufreinigung.....	27
2.2.5	Immunpräzipitation	27
2.2.6	SDS-PAGE.....	27
2.2.7	Coomassie Färbung von Proteingelen.....	28
2.2.8	Western-Blot	28
2.3	Enzyme des DOXP/MEP-Weges.....	29
2.3.1	Enzympräparationen	29
2.3.2	Aufreinigung der rekombinanten DXS und DXR.....	30
2.3.3	Enzymtests	30
2.3.4	Produktnachweis der Enzymreaktionen mit GC/MS	33
2.3.5	Experimente mit der DOXP-Reduktoisomerase aus Gerste	33
2.3.6	Experimente mit der rekombinanten DOXP-Reduktoisomerase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.3.7	Hydratation von IPP und DMAPP	36
2.3.8	Experimente zur Änderung der DXS- und DXR-Aktivität aus Gerstenetiochloroplasten bei der Ergrünung.....	37
2.3.9	Hemmexperimente mit der DXS und DXR	38
2.4	Experimente mit Algen.....	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Nachweis und Eigenschaften von Enzymen des DOXP/MEP-Weges	41
3.1.1	Nachweis der DOXP-Synthase Aktivität	41
3.1.2	Nachweis der DOXP-Synthase mit Antikörpern	44
3.1.3	Nachweis und Eigenschaften der DOXP-Reduktoisomerase.....	46
3.1.4	Weitere Enzyme und Zwischenprodukte des DOXP/MEP-Weges.....	53
3.2	Regulation der DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase bei der Ergrünung von etiolierter Gerste.....	53
3.2.1	Abhängigkeit der DOXP-Synthase-Aktivität von der Belichtungsdauer....	54
3.2.2	Abhängigkeit der DOXP-Reduktoisomerase-Aktivität von der Belichtungsdauer	59

3.2.3	Einfluss von Hellrot und Dauerdunkelrot auf die DXS- und DXR-Aktivität	60
3.3	Inhibitoren des DOXP/MEP-Weg	62
3.3.1	Potentielle Inhibitoren des DOXP/MEP-Weg.....	62
3.3.2	Algentestsystem zur Identifizierung von Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges.....	67
4	Diskussion	71
4.1	Enzyme des DOXP/MEP-Weges.....	71
4.1.1	Die DOXP-Synthase (DXS).....	71
4.1.2	Die DOXP-Reduktoisomerase (DXR)	71
4.1.3	Suche nach weiteren Zwischenprodukten	74
4.2	Regulation des DOXP/MEP-Weges	75
4.2.1	Änderung der DXS- und DXR-Aktivität bei der Ergrünung von Gerste	76
4.2.2	Regulation des DOXP/MEP-Weges.....	77
4.3	Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges	79
4.3.1	Fosmidomycin	79
4.3.2	Clomazone und Derivate	83
4.3.3	Testsysteme zur Identifizierung von Hemmstoffen des DOXP/MEP-Weges	87
4.4	Neuere Erkenntnisse zur IPP-Biosynthese über den DOXP/MEP-Weg.....	89
4.4.1	Weitere Schritte des DOXP/MEP-Weges	89
4.4.2	Verbreitung und Evolution des DOXP/MEP-Weges und des Acetat/MVA-Weges	95
4.5	Ausblick	99
5	Zusammenfassung	101
6	Literatur	105
	Aus dieser Arbeit entstandene Publikationen.....	127

ABA	Abscisinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPI	Acetylmethylphosphinat
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Becquerel
CDP-ME	4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol
CDP-ME2P	4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMAEPP	Dimethylaminoethylpyrophosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DOCHP	2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[(2-chlorbenzyl)-hydroxy-amino]-propansäure
DOX(P)	1-Deoxy-D-xylulose(-5-phosphat)
DTT	Dithiothreitol
DXR	DOXP-Reduktoisomerase
DXS	DOXP-Synthase
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FG	Frischgewicht
FMN	Flavin-mononucleotid
FPP	Farnesylpyrophosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat, sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektroskopie
GDPH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HMBPP	4-Hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyldiphosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HMGR	HMG-CoA Reduktase
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration, die zu einer 50%-igen Hemmung führt
IP	Isopentenylphosphat
iPMP	Isopentenyladenosin-5'-monophosphat
IpOHA	N-Isopropyl-Oxalyhydroxamat
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
LSC	Liquid Scintillation Counter
MEcPP	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat
ME(P)	2-C-Methyl-D-erythritol(-4-phosphat)
MVA	Mevalonsäure
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(phosphat), reduzierte Form
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Pyrophosphat
TBS(-T)	Tris-buffered saline (mit Tween 20)
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TPP	Thiaminpyrophosphat
WB	Westernblot
ZMP	Zeatinribosid 5'-phosphat

Christian Müller:
Investigations on two enzymes of the plastidic isoprenoid biosynthesis:
DOXP-synthase and DOXP-reductoisomerase

Introduction:

This Ph.D. thesis deals with the first two enzymes of the recently detected plastidic isoprenoid biosynthesis pathway, the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway (DOXP/MEP pathway) in plants. Examined were several aspects of the identification, characterization, regulation and inhibition of the first two enzymes of this pathway, the DOXP synthase (DXS) and DOXP reductoisomerase (DXR). The DOXP/MEP pathway in plants is responsible for the biosynthesis of important plant isoprenoids such as carotenoids, the phytyl side chains of chlorophylls, α -tocopherol and phylloquinone K₁ and the nonaprenyl side chain of plastoquinone-9 (Lichtenthaler *et al.*, 1997). With the discovery of this mevalonate-independent pathway of isoprenoid biosynthesis in bacteria (Rohmer *et al.*, 1993) and plants (Lichtenthaler *et al.*, 1995 and 1997) former controversial results in labelling of plastidic isoprenoids can now be explained. In fact, there exists a compartmentation of isoprenoid biosynthesis in plants: cytosolic isoprenoids (e.g. sterols) are synthesized via the classical acetate/mevalonate pathway, whereas plastidic isoprenoids are made via the DOXP/MEP pathway (see review Lichtenthaler, 1999). Because the DOXP/MEP pathway does not occur in animals, it is an ideal target for the development of new herbicides and antibiotics.

Objective:

The aim of this investigation, originally started after the detection of the DOXP/MEP pathway, was to verify the enzymes DXS and DXR in plants with biochemical methods, to develop test-systems for these enzymes, to analyze the effect of potential inhibitors, to find new inhibitors of the DOXP/MEP pathway and to get first insights into the regulation of the DOXP/MEP pathway.

Results:

- 1) Enzyme assays to detect and characterize the DOXP synthase (DXS) and DOXP reductoisomerase (DXR) were developed and their products were identified by GC/MS. The recombinant DXS from *Chlamydomonas reinhardtii* and *E. coli*, as well as DXR enzyme preparations from barley and the recombinant DXR of *Arabidopsis thaliana* were used in this investigation.
- 2) Attempts were taken to identify the last step of the DOXP/MEP pathway leading to IPP or DMAPP in crude protein extracts of barley. One tested possibility was that the last step may be a reversible dehydration of the last intermediate yielding IPP or DMAPP. A hydration of IPP or DMAPP could, however, not be observed. In the meantime it is known from other authors, that in the last enzymic step both a dehydration and reduction step occur yielding IPP and DMAPP.
- 3) Activity of the enzymes DXS and DXR was detected in plants and both enzymes were localized in the plastids. This is in agreement with the biosynthesis of plastidic isoprenoids via the DOXP/MEP pathway. DXS was detected in barley (crude protein extracts and plastids) and in chloroplasts of spinach and pea. DXR activity was verified in crude protein extracts and plastids of barley.

- 4) The DOXP/MEP pathway requires ATP and NADPH and is responsible for the biosynthesis of photosynthetic pigments. Therefore, one can assume that enzymes of the DOXP/MEP pathway may be light regulated via photosynthesis. During the light-driven photosynthetic performance the concentration of Mg^{2+} and the pH value of the plastid stroma change and regulate many plastidic enzymes. It was shown in this investigation that the DXR of barley is regulated by the pH value. This enzyme has a pH optimum value of 8.1, which is typical of a light activated plastid stroma enzyme. However, increasing the Mg^{2+} concentration in the physiological range (2-4 mM) has little effect on the DXR activity. Obviously, the DXR activity depends on photosynthesis indirectly via the increase of the pH value in the stroma.
- 5) The K_m values of DOXP and NADPH were determined with the recombinant DXR of *Arabidopsis thaliana*. The K_{mDOXP} was $108 \pm 11 \mu M$ and the K_{mNADPH} $7,2 \pm 1,5 \mu M$. Similar results were reported in an independent work for the *E. coli* enzyme (Koppisch *et al.*, 2002). The low K_{mNADPH} indicates that *in vivo* NADPH is not limiting for the enzyme reaction.
- 6) Also investigated was if the light-induced pigment accumulation during greening of etiolated barley seedlings correlates with changes in DXS and/or DXR activity. The time course of DXS and DXR activity in (etio-)chloroplasts was measured after illumination of 6 d old etiolated barley seedlings. Only small changes in DXS activity per fresh weight were observed after 24 h greening. With the decline in the pigment accumulation rate after 24 h the DXS activity decreased. Obviously, there is enough DXS enzyme in etiolated barley shoots and this enzyme seems to be not limiting for isoprenoid biosynthesis during greening. In contrast, the DXR activity did not change within the first 4 h of illumination but was several times higher after 24 hours. Therefore, the DXR which is stimulated by light appears to be an important regulatory enzyme of the DOXP/MEP pathway.
- 7) In the search for inhibitors of the DOXP/MEP pathway the possible mode of action of the herbicide clomazone was examined. Clomazone and several derivatives were tested. DXR was not inhibited by clomazone or any of its derivatives. In contrast, the DXS is inhibited by the clomazone metabolite 5-ketoclomazone with an IC_{50} value of $50 \mu M$ but not by clomazone and the other derivatives. Together with recently reported results that application of DOXP can annihilate the inhibition of chlorophyll and carotenoid accumulation in clomazone-sensitive barley seedlings (Zeidler, 2001), the herbicidal effect of clomazone can be explained by its degradation to 5-ketoclomazone and the inhibition of DXS by 5-ketoclomazone. The involvement of other than the tested metabolites or possibly other enzyme targets in the DOXP/MEP pathway can presently not be excluded.

The inhibitory effect of 5-ketoclomazone on the enzymes of *Chlamydomonas reinhardtii* and *E. coli* (both are clomazone-insensitive organisms) as well as barley (a clomazone-sensitive plant) was in a similar concentration range. Thus, the selectivity of clomazone can not be explained by a different sensitivity of the target enzyme. It seems more likely that a different way or rate of metabolism in sensitive and insensitive plants is responsible for the selectivity of clomazone in intact plants as earlier reported (Normann *et al.*, 1990).

- 8) The effect of the herbicide fosmidomycin, its derivative FR 900098 and several other related phosphonates on the DXS and DXR was investigated. Only DXR was inhibited by fosmidomycin and FR 900098, while the other compounds had no effect. This was the first report on the inhibition of the DXR of plants by fosmidomycin (Schwender *et*

al., 1999). The IC₅₀ value was 0,7 µM (barley, 0.5 mM DOXP, 1 mM NADPH) and 0,28 µM (*Arabidopsis thaliana*, 0.25 mM DOXP, 1 mM NADPH).

- 9) The effect of several inhibitors of isoprenoid biosynthesis on growth and pigment accumulation of the algae *Euglena gracilis* (Euglenophyta), *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) and *Ochromonas danica* (Heterokontophyta) was examined with the aim to establish a test-system for inhibitors of IPP biosynthesis.

Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase in the acetate/mevalonate pathway blocked the growth of *Cyanidium caldarium* and *Ochromonas danica* who possess both isoprenoid pathways. The growth of *Cyanidium* was blocked by fosmidomycin which also inhibited pigment accumulation of *Ochromonas danica* which was grown under photoheterotrophic conditions. Also, clomazone and 5-ketoclomazone inhibited pigment accumulation in *Ochromonas*. The stronger inhibition by 5-ketoclomazone in comparison to clomazone is in agreement with a bioactivation of clomazone. Obviously, the inhibition of one isoprenoid pathway can not be compensated for by products of the other pathway, so that both pathways seems to be essential for normal growth. External supply of potential intermediates (methylerythritol, isopentenol and dimethylallyl alcohol) could not annihilate the inhibition of the DOXP/MEP pathway in *Ochromonas danica*, possibly due to the lack of kinases who could phosphorylate these intermediates.

From labelling experiments it was concluded that *Euglena gracilis* uses only the acetate/mevalonate pathway. The effect of fosmidomycin on its growth was investigated to test if the DOXP/MEP pathway were present in this alga. However, growth was not inhibited neither by fosmidomycin nor by cerivastatin or the combination of these inhibitors. Possibly, the DOXP/MEP pathway does, indeed, not occur in *Euglena* and cerivastatin does not reach the compartment of isoprenoid biosynthesis in this alga.

- 10) In the discussion part (in German) the results described in this investigation are contrasted and compared with our present knowledge of the research on the DOXP/MEP pathway and in view of the evolution of the acetate/mevalonate and the DOXP/MEP pathway of isoprenoid biosynthesis.

1 Einführung

Isoprenoide bilden die vielfältigste Stoffgruppe in der Natur. Mehrere zehntausend unterschiedliche Isoprenoide sind heute bekannt (Davis und Croteau, 2000). Der Grundbaustein aller Isoprenoide ist das Isopren (2-Methyl-1,3-butadien). Die Verkettung mehrerer Isopreneinheiten führt zu den unterschiedlichsten Isoprenoiden (Isoprenregel, Wallach, 1885; Ruzicka *et al.*, 1953), den „reinen“ Prenyllipiden (Carotinoide, Sterole) und den „gemischten“ Prenyllipiden (Chlorophylle, Prenylchinone), die auch eine nicht von Isopren abgeleitete Komponente besitzen (Goodwin, 1977; Lichtenthaler, 1977). Das „aktive“ zelluläre Isopren, die Vorstufe aller Isoprenoide, wurde Ende der 1950er Jahre entdeckt (Lynen *et al.*, 1958; Bloch *et al.*, 1959) und als Isopentenylpyrophosphat identifiziert. Die meisten der in der Natur vorkommenden Isoprenoide werden von Pflanzen synthetisiert. Ein kleiner Teil übernimmt wichtige Funktionen im pflanzlichen Primärstoffwechsel. Ein Großteil der pflanzlichen Isoprenoide gehört jedoch zu den Sekundärmetaboliten.

Die Isoprenoide haben seit jeher für den Menschen eine große Bedeutung (z.B. Vitamine E, A, K) und sind von wesentlicher kommerzieller Bedeutung als Duftstoffe, Pigmente, Medikamente (Taxol, Herzglykoside) und Werkstoff (Naturkautschuk). Mit der Entdeckung des Mevalonat-unabhängigen Isoprenoid-Biosyntheseweges in Bakterien (Rohmer *et al.*, 1993) und Pflanzen (Lichtenthaler *et al.*, 1995 und 1997) ergeben sich neue Angriffspunkte zur Entwicklung wirksamer Herbizide und Antibiotika, da dieser Biosyntheseweg nicht in Tieren vorkommt (Lichtenthaler *et al.*, 2000).

1.1 Einteilung und Funktion der Isoprenoide

„Reine“ Prenyllipide

Isoprenoide lassen sich einteilen in Hemi-, Mono-, Sesqui-, Di-, Tri- und Polyterpene, abhängig von der Anzahl der C₅-Grundbausteine. Hemiterpene sind die einfachsten Isoprenoide und bestehen aus nur einer Isopreneinheit. Das bedeutendste Hemiterpen ist das Isopren, welches bei höheren Temperaturen und Starklicht in großer Menge von vielen Pflanzen emittiert wird (ca. 250-460 Millionen Tonnen pro Jahr). Seine Emission übersteigt weit diejenige der anderen leichtflüchtigen Terpene. Seine Funktion in der Pflanze ist noch nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird ein antioxidativer Schutz oder ein Schutz der photosynthetischen Membranen vor hohen Temperaturen (eine Diskussion findet sich in Zeidler, 2001). Neuere Studien mit Fosmidomycin, einem Inhibitor der MVA-unabhängigen IPP-Biosynthese (Abschnitt 4.4.2), der die Isoprenemission unterdrückt ohne die Photosynthese zu hemmen, belegten beide Theorien. Eine verminderte Isoprenemission führte zur erhöhten Schädigung der Photosynthese durch Ozon (Loreto und Velikova, 2001) und zu einer verringerten Thermotoleranz der Pflanzen (Sharkey *et al.*, 2001). Neben Isopren vermitteln noch weitere Alkene, jedoch nicht Ethylen, eine Thermotoleranz, während Alkane den gegenteiligen Effekt aufweisen.

Viele ätherische Öle enthalten als Hauptbestandteil Mono-, Sesqui- und Diterpene aus 2, 3 oder 4 Isopreneinheiten, sowohl offenkettige als auch zyklische, und haben unterschiedlichste Funktionen z.B. als Fraßschutz, Anlockung von Insekten oder Pathogenabwehr. Das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) gehört zwar zu den Sesquiterpenen, wird jedoch durch den Abbau von Carotinoiden (Tetraterpene) gebildet (Milborrow und Lee, 1998; Liotenberg *et al.*, 1999).

Die wichtigsten Diterpene sind die Gibberelline (Pflanzenhormone) und das Phytol. Letzteres ist die Seitenkette der Chlorophylle, des α -Tocopherols (Vitamin E) und des Phyllochinons K₁.

In Archaeobakterien sind die Zellmembranen nicht aus *n*-Acyllipiden aufgebaut, sondern bestehen hauptsächlich aus Diphytanylglycerin Phospholipiden (C₂₀) oder Dibisphytanyl-ether (C₄₀). Phytanol ist ein gesättigtes Tetraterpen. Da die Kondensation mehrerer Isopreneinheiten zu Polyprenolen als ein einfacheres Biosyntheschema als das der Fettsäurebiosynthese anzusehen ist, wurde vermutet, dass die ersten Biomembranen in der Evolution aus Polyprenolen aufgebaut waren (Ourisson und Nakatani, 1994).

Von den Triterpenen abgeleitet sind die Sterole, deren wichtigste Funktion in der Stabilisierung von Biomembranen liegt und deren Eigenschaften maßgeblich mitbestimmt. In den Zellmembranen der tierischen Zellen übernimmt diese Funktion Cholesterin, das darüber hinaus Ausgangssubstanz für die Biosynthese weiterer Sterole und Steroide ist (z.B. Sexualhormone und Gallensäuren). Bei Pilzen übernimmt Ergosterin die Funktion des Cholesterins in Membranen. In Pflanzen sind Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol oder z.B. bei Spinat Spinasterol die häufigsten Sterole. Ihr Anteil macht 60-80% der Gesamtsterole aus. Von Campesterol leiten sich die Brassinosteroide ab, die ähnlich wie die Pflanzenhormone Indoleessigsäure, Gibberelline und Cytokinine das Wachstum und die Zellteilung in Pflanzen fördern (Schopfer und Brennicke, 1999). Neben den tetrazyklischen Sterolen bilden Pflanzen eine Vielzahl pentazyklischer Triterpene, meist konjugiert mit Kohlenhydraten, Alkaloiden oder anderen Verbindungen. Im Unterschied zu den Sterolen sind diese Triterpene nicht essentiell und werden auch nicht von allen Pflanzen synthetisiert. Zu diesen Triterpenen gehören pharmakologisch interessante Verbindungen wie z.B. die zu den Saponinen gehörenden Avicine, die das Wachstum von Tumorzellen hemmen. Eine Übersicht über Funktion und Vielfalt von Triterpenen findet sich bei Chappell (2002).

Die Funktion der Sterole zur Stabilisierung von Membranen übernehmen in Eubakterien häufig 3-Deoxyhopanoide, pentazyklische Triterpene. Sie leiten sich in Bakterien direkt von Squalen ab, und ihnen fehlt die Sauerstoffgruppe am C-3. Die meisten weisen außerdem eine mehrfach hydroxylierte C₅-Seitenkette auf, abgeleitet von einer Pentose. Zusätzliche Modifikationen beinhalten u.a. Glykosylierungen dieser Seitenkette.

Als wichtigste Vertreter der Tetraterpene sind die Carotinoide zu nennen, welche sich in den Lichtsammelkomplexen der Photosynthese finden, um dort die Lichtenergie auf die Reaktionszentren weiter zu leiten. Der lichtabhängige Xanthophyllzyklus steht im Dienste der nicht-photochemischen Energiedissipation. In den Reaktionszentren beider photosynthetischen Photosysteme ist β -Carotin als Lipidantioxidans bzw. als Schutz für das jeweilige Chlorophyll a-Dimer, P680 und P700, vorhanden.

Zu den höherkettigen pflanzlichen Isoprenoiden gehören Kautschuk mit 400-100000 Isopreneinheiten, Guttachpera, Polyprenole und Dolichole, welche an der Glykosylierung von Proteinen beteiligt sind.

Gemischte Prenyllipide

Zu den gemischten Prenyllipiden gehört das Ubichinon, welches in der Atmungskette vorkommt und in allen Eukaryonten und vielen Prokaryonten zu finden ist. Die Prenylseitenkette besteht in Pflanzen entweder aus 9 oder 10 Isopreneinheiten. In einigen Bakterien findet sich Menachinon (Vitamin K₂) in den Elektronentransportketten.

Gemischte, von Pflanzen synthetisierte Prenyllipide sind das α -Tocopherol (Vitamin E), welches als Oxidationsschutz große kommerzielle Bedeutung besitzt, insbesondere bei Kosmetika. Vitamin K₁ mit einer Diterpen-Seitenkette (Phytylrest) und Plastochinon-9 mit einer Nonaprenyl-Seitenkette sind wichtige Bestandteile der photosynthetischen Biomembranen. Prenylseitenketten finden sich auch bei tRNA und Cytokininen. Besondere Bedeutung haben prenylierte Proteine, die eine regulatorische Funktion aufweisen oder deren Prenylrest der Verankerung des Proteins in Biomembranen dient.

1.2 Biosynthese der Isoprenoide

1.2.1 Der klassische Acetat/MVA-Weg der IPP-Biosynthese

Der klassische Acetat/Mevalonat Weg der IPP-Biosynthese (siehe Abbildung 1-1) wurde Ende der 1950er Jahre an Tieren und Hefe aufgeklärt (Lynen und Henning, 1960; Bloch, 1965). Das Biosyntheseschema wurde auf Pflanzen übertragen (Goodwin, 1977), und versucht, mittels Markierungsstudien mit radioaktiven Substraten dies zu bestätigen. Zumindest für die Biosynthese von Sterolen konnte der Acetat/MVA-Weg bei Pflanzen erfolgreich nachgewiesen werden (siehe auch 1.2.2).

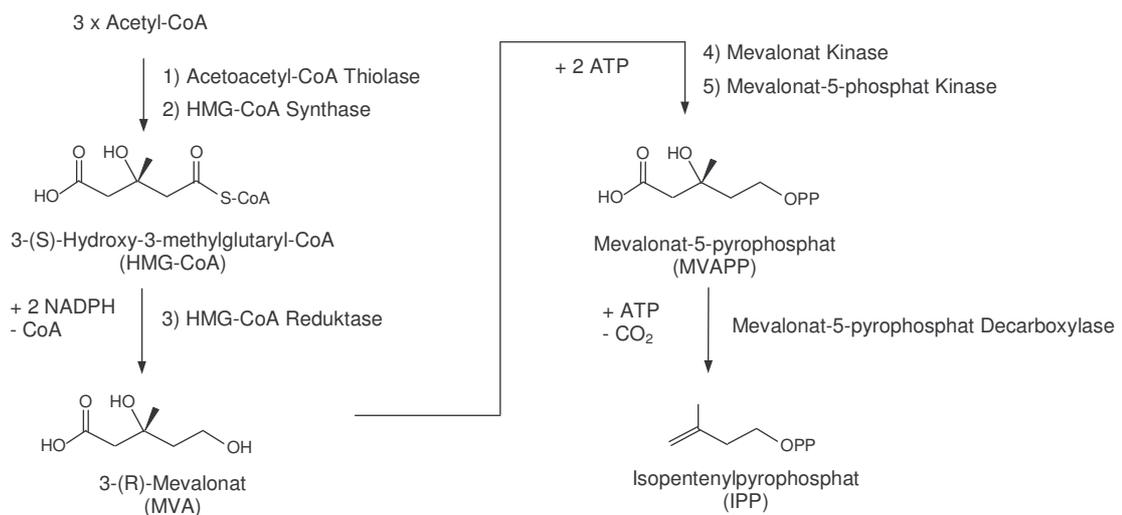


Abbildung 1-1: Die IPP-Biosynthese nach dem klassischen Acetat/Mevalonat-Weg.

Im ersten Schritt katalysiert die Acetoacetyl-CoA Thiolase die Claisen-Esterkondensation zweier Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Anschließend erfolgt eine Aldolkondensation mit Acetyl-CoA zu HMG-CoA durch die HMG-CoA-Synthase. Der nächste Schritt wird als der regulatorische angesehen, bei dem HMG-CoA zur Mevalonsäure (MVA) durch die HMG-CoA-Reduktase (HMGR) reduziert wird. MVA-Kinase und MVAP-Kinase katalysieren die Phosphorylierung unter ATP-Verbrauch zu Diphospho-MVA. Anschließend erfolgt die Decarboxylierung unter ATP-Verbrauch zu Isopentenyl-diphosphat durch die Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase.

Alle Enzyme des Acetat/MVA-Weges konnten aus Pflanzen kloniert werden, z.B. die Acetoacetyl-CoA-Thiolase aus *Raphanus sativus* (Vollack und Bach, 1996), HMG-CoA-Synthase (Montamat *et al.*, 1996), Mevalonat-Kinase (Lluch *et al.*, 2000) und Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase (Cordier *et al.*, 1999) aus *Arabidopsis thaliana* und Phosphomevalonat-Kinase aus *Catharantus roseus* (Schulte *et al.*, 1999).

HMGR ist das am besten untersuchte Enzym des Acetat/MVA-Weges, dem eine Schlüsselrolle in der Regulation zugeordnet wird, wie in Tieren zunächst gezeigt worden war. Die Regulation umfasst Transkription, Translation, Degradation und Phosphorylierung des Enzyms (Goldstein und Brown, 1990). In den bisher untersuchten Pflanzen finden sich mehrere Gene der HMGR (Chappell, 1995), während Tiere nur ein Gen besitzen. *Arabidopsis thaliana* enthält zwei Gene (Enjuto *et al.*, 1994), die mindestens 3 unterschiedliche Isoformen kodieren, und die Kartoffel enthält mindestens sieben. Die un-

terschiedlichen Gene sind zum einen wahrscheinlich zur Kanalisierung des Stoffwechselflusses in Richtung verschiedener Endprodukte z.B. Sterole zuständig (Chappell, 1995), zum anderen Gewebe- und Entwicklungsstadium-spezifisch, wie im Falle der HMGR2 aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden konnte (Bach *et al.*, 1999). Ebenfalls wurde bei Verwundung in der Kartoffel eine erhöhte Expression von HMGR1 und eine damit verbundene erhöhte Sterolakkumulation beobachtet, während Pilzelicitoren zu einer erhöhten Expression von HMGR2 und HMGR3 führten (Choi *et al.*, 1992). Neben der Regulation der Transkription wurde auch über eine (post)translationelle Feedback-Regulation in Tabak berichtet (Wentzinger *et al.*, 2002). Eine Hemmung der Squalensynthese führte sowohl zu erhöhten Expression als auch zu einer erhöhten Enzymaktivität, während bei Hemmung der Squalenepoxidase nur eine erhöhte Enzymaktivität gemessen wurde. Das Enzym kann auch durch reversible Phosphorylierung inaktiviert werden (Stermer *et al.*, 1994).

Die pflanzliche HMGR enthält zwei hydrophobe Bereiche, die das Enzym im ER verankern. Da diese Bereiche hoch konserviert sind, ist wahrscheinlich dieses Enzym nur am ER lokalisiert, so dass die MVA Biosynthese auf das Cytoplasma beschränkt ist (Bach *et al.*, 1999). Weiterhin fehlt eine Transitpeptidsequenz, die für den Transport in die Chloroplasten nötig wäre (Bach, 1995).

1.2.2 Diskrepanzen zur Biosynthese plastidärer Isoprenoide nach dem Acetat/MVA-Weg

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass sich in Pflanzen alle Isoprenoide von dem klassischen Acetat/MVA Weg ableiten lassen. Aufgrund eines zwar schwachen Einbaus von ^{14}C -Mevalonsäure und ^{14}C -Acetat in plastidäre Isoprenoide bestand zunächst noch kein Zweifel an diesem vermeintlichen „Dogma“.

Immer wieder wurde von einem guten Einbau von ^{14}C -MVA oder ^{14}C -Acetat in Sterole berichtet, während plastidäre Isoprenoide kaum markiert wurden. $^{14}\text{CO}_2$ wird dagegen bevorzugt in plastidäre Isoprenoide eingebaut (Goodwin, 1958; Treharne *et al.*, 1964, 1966; Lichtenthaler *et al.*, 1982; Gray, 1987; Lichtenthaler *et al.*, 1997). Die Markierungsexperimente wurden dahingehend interpretiert, dass eine strikte Kanalisierung und Regulation des Stoffwechselflusses sowohl in die Fettsäurebiosynthese als auch in die Isoprenoidbiosynthese existiert, so dass externes Acetat nur für die plastidäre Fettsäurebiosynthese verwendet werden sollte (Kleinig, 1989). Der geringe Einbau von angebotenem MVA in plastidäre Isoprenoide wurde mit einer Behinderung des MVA-Transports durch die Chloroplasten-Hüllmembran versucht zu erklären.

Kontroversen gab es jedoch hinsichtlich der Frage, ob Chloroplasten eine autonome IPP Biosynthese besitzen oder auf den Import von IPP angewiesen sind (Gray, 1987). Für die letztere These sprach, dass, wenn überhaupt, nur geringe Aktivitäten der Enzyme des klassischen Acetat/MVA-Weges in isolierten Chloroplasten gemessen werden konnten, wohingegen die entsprechenden Aktivitäten im Cytosol nachgewiesen werden konnten. Zudem wurde von isolierten Chloroplasten zwar $[1-^{14}\text{C}]\text{IPP}$ in Prenylipide eingebaut, aber keine Zwischenprodukte des Acetat/MVA-Weges (Kreuz und Kleinig, 1981, 1984; Lütcke-Brinkhaus und Kleinig 1987). Für eine autonome IPP-Biosynthese in Chloroplasten sprachen dann besonders Experimente mit Mevinolin, einem spezifischen Inhibitor der HMG-CoA Reduktase, der die Sterolbiosynthese im Cytoplasma hemmte, aber keinen Einfluss auf die plastidäre Isoprenoidbiosynthese hatte (Bach und Lichtenthaler, 1983).

Untersuchungen zur Regulation der Isoprenoidbiosynthese in Pflanzen ergaben ebenfalls Widersprüche. Eine Überexpression der HMGR in Tabak führte zu einer erhöhten Akkumulation von Cycloartenol, jedoch nicht von Carotinoiden und Phytol (Chappell, 1995). Ebenfalls konnte auch kein Zusammenhang zwischen Carotinoidbiosynthese wäh-

rend der Reifung von Tomaten und HMGR Aktivität festgestellt werden (Narita und Gruissem, 1989).

Erst die Entdeckung einer Mevalonat-unabhängigen plastideneigenen IPP-Biosynthese in photosynthetischen Organismen (Lichtenthaler *et al.*, 1995 und 1997; Schwender *et al.*, 1995 und 1996) ermöglichte eine plausible Erklärung der widersprüchlichen Ergebnisse.

1.2.3 Der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat / 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Weg (DOXP/MEP-Weg) der Isoprenoidbiosynthese

Ein alternativer Weg der IPP-Biosynthese¹ wurde zunächst bei der Untersuchung der Biosynthese von Hopanoiden in verschiedenen Bakterien von Rohmer 1993 entdeckt (Rohmer *et al.*, 1993, zur Entdeckung siehe auch Rohmer, 1999). Zur Untersuchung wurden Bakterien mit unterschiedlich ¹³C-markierter Glucose, Erythrose, Acetat und Pyruvat angezogen. Die Markierung, ermittelt mit ¹³C-NMR, in den untersuchten Isoprenoiden entsprach nicht dem klassischen Acetat/MVA-Weg. Mevalonat konnte als Vorstufe ausgeschlossen werden, und es wurde postuliert, dass eine C2-Einheit, gebildet durch Decarboxylierung von Pyruvat, auf eine C3-Einheit – möglicherweise Dihydroxyaceton - übertragen werden würde. Notwendig in diesem Schema war außerdem eine Umlagerung bei der Biosynthese von IPP. Die Identifizierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat als Ausgangssubstanzen dieses MVA unabhängigen Biosyntheseweges gelang mit der Untersuchung verschiedener *E. coli* Mutanten, die Defekte im Glucosemetabolismus aufwiesen (Rohmer *et al.*, 1996).

In einer Kooperation (seit Januar 1993) zwischen den Arbeitsgruppen Lichtenthaler, Karlsruhe, und Rohmer, Straßburg, konnte zunächst an der Grünalge *Scenedesmus obliquus* eindeutig die Biosynthese von Isoprenoiden über diesen Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweg belegt werden (Schwender, 1995; Schwender *et al.*, 1995, Lichtenthaler *et al.*, 1995; Schwender *et al.*, 1996). Es folgte der Nachweis in höheren Pflanzen und in mehreren weiteren Algen (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Schwender *et al.*, 1997; Disch *et al.*, 1998b; Schwender, 1999). Die Biosynthese nach dem DOXP/MEP-Weg konnte für die Phytolseitenkette von Chlorophyllen, für Carotinoide, die Nonaprenyl-Seitenkette des Plastochinon-9, für Isopren und Sterole in Grünalgen gezeigt werden. Es fand sich hierbei eine Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese, bei der plastidäre Isoprenoide über den DOXP/MEP-Weg und cytosolische über den Acetat/MVA-Weg synthetisiert werden. Ausnahmen hiervon waren *Euglena gracilis*, bei der dieser neue Biosyntheseweg nicht nachgewiesen werden konnte (Müller, 1997; Disch *et al.*, 1998b), und die eigentlichen Grünalgen (Chlorophyta), die ausschließlich den DOXP/MEP-Weg besitzen (Schwender *et al.*, 2001).

Unabhängig von den Arbeiten der Karlsruher Gruppe konnte in der Arbeitsgruppe Arigoni in Zürich die Biosynthese der Diterpene Ginkgolid A und Bilobalid in *Ginkgo biloba* über einen Mevalonat-unabhängigen Weg nachweisen. Die Ergebnisse waren zunächst nur in Form einer Doktorarbeit zugänglich (Schwarz, 1994), und wurden erst später in einem Buchbeitrag veröffentlicht (Schwarz und Arigoni, 1999). Die universelle Bedeutung des DOXP/MEP-Weges für Pflanzen und ganz allgemein für photosynthetische Organismen ergab sich erst durch den Nachweis, dass alle Isoprenoide in Chloroplasten ausschließlich über diesen Biosyntheseweg gebildet werden (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1999; Rohmer 1999).

¹ Andere Namen in der Literatur für diesen Biosyntheseweg sind Mevalonat-unabhängiger-, Triosephosphat/Pyruvat-, Rohmer- und MEP-Weg bzw. Kombinationen hiervon.

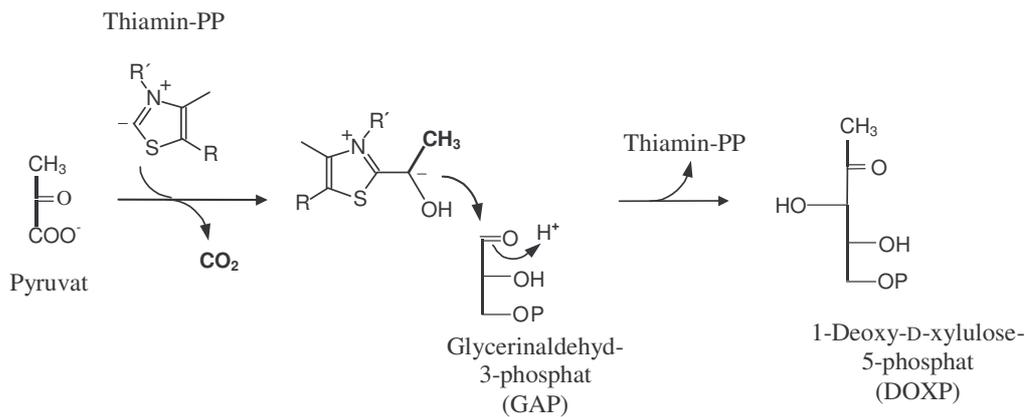


Abbildung 1-2: Reaktionsmechanismus der DOXP-Synthese, dem ersten Enzym des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese. Die Reaktion ähnelt der einer Transketolase. Zunächst bindet Pyruvat an Thiamin und wird decarboxyliert. Die C₂-Einheit wird anschließend auf Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen.

Als erstes Zwischenprodukt dieses IPP-Biosyntheseweges konnte 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) identifiziert werden, indem der Einbau von markierter DOX in Isoprenoide von Pflanzen und Algen (Schwender *et al.*, 1997; Zeidler *et al.*, 1997; Arigoni *et al.*, 1997) und in die Prenylseitenkette des Ubichinon von *E. coli* (Rosa Putra *et al.*, 1998) nachgewiesen werden konnte. In einer Doktorarbeit von der Arbeitsgruppe Arigoni in Zürich (Broers, 1994) war zwar schon 1994 von dem Einbau von markierter DOX in Ubichinon von *E. coli* berichtet worden, was - da nicht veröffentlicht - erst später bekannt wurde. DOXP ist gleichzeitig Vorstufe für die Biosynthese von Thiaminpyrophosphat (Vitamin B₁; Estramareix und David, 1996) und Pyridoxalphosphat (Vitamin B₆), dessen Biosynthese in Pflanzen aus DOXP jedoch fraglich ist (Mittenhuber, 2001). Das Gen der DOXP-Synthase wurde erstmals aus *E. coli* kloniert (Sprenger *et al.*, 1997, Lois *et al.*, 1998) und bald darauf aus der Pfefferminze (Lange *et al.*, 1998). DXS wurde auch von der Karlsruher Arbeitsgruppe aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* kloniert (Lichtenthaler, 1999; Schwender *et al.*, 1999). Das pflanzliche Gen aus *Arabidopsis thaliana* war zwar schon seit 1996 bekannt, jedoch wurde es zunächst als Gen beschrieben, welches essentiell für die Chloroplastenentwicklung ist (Mandel *et al.*, 1996). Nachdem die Sequenz der DXS bekannt war, war aufgrund der hohen Sequenzhomologie die Funktion als DXS naheliegend (Sprenger *et al.*, 1997, Lois *et al.*, 1998, Lange *et al.*, 1998), und später wurde auch die Identität mit der DXS festgestellt (Araki *et al.*, 2000; Estéves *et al.*, 2000). Die DOXP-Synthase weist Sequenzhomologien zu Transketolasen und zur E1-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes auf. Der Reaktionsmechanismus ähnelt dem der E1-Untereinheit und dem von Transketolasen. Thiaminpyrophosphat (TPP) decarboxyliert Pyruvat unter Bildung des resonanzstabilisierten Ylids Hydroxyethyl-TPP. Anschließend wird die C₂-Einheit auf D-Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen (Abbildung 1-2).

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war darüber hinaus nur bekannt, dass 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) das mögliche nächste Zwischenprodukt ist, was durch den Einbau von Deuterium-markiertem Methylerythritol in Ubichinon und Menachinon in *E. coli* untermauert wurde (Duvold *et al.*, 1997a). ME und ME-Derivate finden sich in einigen höheren Pflanzen (Methylerythritol: Dittrich und Angyal, 1988; Methylerythronolaktone: Schramm *et al.*, 1979; Kringstad *et al.*, 1980; Ford, 1981) und in *Corynebacterium* (Methylerythritol-2,4-cyclodiphosphat, MEcPP), für letzteres konnte durch Einbau von ¹³C-markierter Glukose nachgewiesen werden, dass es über den DOXP/MEP-Weg gebildet wird (Duvold *et al.*, 1997b). Auch für Methylerythritol und Methylerythronolaktone in

Pflanzen konnte die Biosynthese über Deoxyxylulose gezeigt werden (Fellermeier *et al.*, 1998; Sagner *et al.*, 1998). MEcPP wird von einigen Bakterien unter oxidativem Stress akkumuliert (Ostrovsky *et al.*, 1998). Es wurde jedoch nur als Nebenprodukt angesehen. Erst später wurde festgestellt, dass es sich um ein Zwischenprodukt des DOXP/MEP-Weges handelt. Zum Wissensstand zum DOXP/MEP-Weg zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit siehe auch die Übersicht (Lichtenthaler, 1998).

Das zweite Enzym, die DOXP-Reduktoisomerase, die in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht wurde, wurde zunächst aus *E. coli* (Takahashi *et al.*, 1998) und später aus Pflanzen kloniert (Schwender *et al.*, 1999; Lange und Croteau, 1999a).

Nach heutigem Erkenntnisstand ist der DOXP/MEP-Weg weit verbreitet in Eubakterien, in photosynthetischen Algen und höheren Pflanzen, während er in Archaeobakterien, Tieren und Pilzen nicht zu finden ist (Disch und Rohmer, 1998; Lichtenthaler, 1998; Lichtenthaler, 1999; Zeidler *et al.*, 2000).

1.2.4 Die Synthese von Isoprenoiden aus IPP und DMAPP

Ausgangssubstanzen für die unterschiedlichen Isoprenoide sind Isopentenylpyrophosphat (IPP), Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), Geranylpyrophosphat (GPP, 2 Isopreneinheiten), Farnesylpyrophosphat (FPP, 3 Isopreneinheiten) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, 4 Isopreneinheiten). Das Endprodukt des klassischen Acetat/MVA-Weges, IPP, wird zunächst durch die IPP-Isomerase (IPI) in DMAPP umgewandelt, Ausgangssubstanz für die Kettenverlängerung und verschiedene Hemiterpene, während nach dem DOXP/MEP-Weg sowohl IPP als auch DMAPP als Endprodukte in Frage kommen (siehe 4.4.1). Die Isoprensynthese, die die Synthese von Isopren aus DMAPP katalysiert, wurde aus der Pappel kloniert, ähnelt einer Limonen-Synthase und bildet auch aus GPP Limonen, jedoch mit einer 200-fach geringeren spezifischen Aktivität (Miller *et al.*, 2001). Ausgehend von DMAPP werden sukzessive IPP Einheiten in einer Kopf-Schwanz Addition angehängt. Sowohl FPP-Synthase als auch GGPP-Synthase verwenden als Substrate IPP und DMAPP, ohne dass ein Zwischenprodukt (GPP bzw. FPP) freigesetzt wird (Gershenzon und Croteau, 1993). Andere Prenyltransferasen verwenden als Substrate GPP, FPP und GGPP und zur Kettenverlängerung ebenfalls IPP (Ogura und Koyama, 1998). Insbesondere sind dies Prenyltransferasen zur Biosynthese längerer Ketten Isoprenoide. Neben den Prenyltransferasen, die zu *trans* Doppelbindungen im Produkt führen, bilden andere *cis* Doppelbindungen in den Isoprenoidketten, wie z.B. eine *cis*-Prenyltransferase bei der Biosynthese von Kautschuk oder die Dehydrodolichyldiphosphat-Synthase bei der Biosynthese von Dolichol (Gershenzon und Croteau, 1993; Ogura und Koyama, 1998). Weitere Prenyltransferasen übertragen einen Prenylrest auf nicht-isoprenoide Akzeptoren. Hierzu gehören Proteinprenyltransferasen, die einen Farnesyl oder Geranylgeranyl Rest auf Proteine übertragen. Diese Proteinprenylierung findet sich in allen Kompartimenten von Pflanzen (Parmryd und Dallner, 1996). Die Prenylkette ist hierbei über eine Thioetherbrücke an das Protein gekoppelt. Bei plastidär kodierten Proteinen findet sich stattdessen ein Phytylrest, der nicht über eine Thioetherbindung an das Protein gekoppelt ist. Dieser Phytylrest leitet sich möglicherweise von einem aus dem Cytoplasma importierten Farnesylrest ab (Parmryd *et al.*, 1999). Interessant in diesem Zusammenhang wäre auch, ob diese Prenylreste über den DOXP/MEP-Weg gebildet werden können, da bei den Untersuchungen nur ¹⁴C markiertes Farnesol, Geranylgeraniol und MVA verwendet wurden.

Neben dieser Kopf-Schwanz-Addition erfolgt bei der Biosynthese von Triterpenen und Tetraterpenen eine Kopf-Kopf bzw. Schwanz-Schwanz Addition. Aus zwei Molekülen FPP wird Squalen gebildet, der Vorläufer der Triterpene und Sterole, und aus zwei GGPP Phytoen, der Vorläufer der Carotinoide.

Gemeinsam ist vielen Enzymen der Isoprenoidbiosynthese, insbesondere der Prenyltransferasen und Zyklasen, der Reaktionsmechanismus (Chappel, 1995). Zunächst erfolgt eine Abspaltung des Pyrophosphates von einem allylischen Prenyl-PP unter Bildung eines Carbokations, gefolgt von einem elektrophilen Angriff an eine Doppelbindung unter Ausbildung einer C-C Bindung. Durch Addition eines Nukleophils oder durch Deprotonierung unter Ausbildung einer Doppelbindung entsteht das Produkt, im Falle der Prenyltransferasen ein allylisches Prenyl-PP. Dieses dient als Ausgangssubstanz weiterer Prenyltransferasen. Zyklasen, welche die Biosynthese der unterschiedlichen zyklischen Mono-, Di- und Sesquiterpene aus den entsprechenden Prenyl-PP einleiten, katalysieren eine intramolekulare Knüpfung einer C-C-Bindung, wobei das C-Gerüst weiteren Modifikation (z.B. Umlagerungen) unterliegen kann. Einige Zyklasen katalysieren dabei die Bildung mehrerer Produkte.

1.3 Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese

Schon lange existierte die Vorstellung von einer Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese, nach der Mono-, Di- und Tetraterpene im Plastiden synthetisiert werden sollten, während Sesqui- und Triterpene im Cytosol gebildet werden sollten (Kleinig, 1989). Dies ergab sich schon aus dem Vorkommen der einzelnen Isoprenoide in den Kompartimenten: Sterole in cytoplasmatischen Membranen (Eichenberger, 1977) und Carotinoide, Chlorophylle, Plastochinon-9, α -Tocopherol und Phyllochinon K₁ in Chloroplasten (Lichtenthaler und Park, 1963; Lichtenthaler und Calvin, 1964). Im Einklang hiermit stand auch der damalige Nachweis von Enzymaktivitäten der jeweiligen Prenyltransferasen in den einzelnen Kompartimenten, GPP-Synthase und GGPP-Synthase im Chloroplasten und FPP-Synthase im Cytosol. Jedoch wurde inzwischen auch von einer cytosolischen GGPP-Synthase berichtet (Okada *et al.*, 2000), die auch zweifelsohne für eine Geranylgeranylierung von Proteinen im Cytosol benötigt wird, einer cytosolischen GPP-Synthase in *Lithospermum erythrorhizon* (Sommer *et al.*, 1995) und von einer FPP-Synthase im Chloroplasten (Sanmiya *et al.*, 1999). Diese Kompartimentierung konnte nach Entdeckung des DOXP/MEP-Weges durch vielfache Markierungsstudien belegt werden, nach denen Hemi-, Mono-, Di- und Tetraterpene über den DOXP/MEP-Weg gebildet werden, während Triterpene über den Acetat/MVA-Weg synthetisiert werden (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1999).

Neben der Biosynthese von Sesquiterpenen nach dem Acetat/MVA-Weg (z.B. Adam *et al.*, 1998) wurde bei einigen flüchtigen Sesquiterpenen aus verschiedenen Pflanzen neben dem Einbau von deuterierter MVA auch ein beträchtlicher Einbau von deuterierter DOX festgestellt (Piel *et al.*, 1998). Dies wurde durch einen Export von Prenyl-PP aus dem Chloroplasten in das Cytosol gedeutet. Bei der Untersuchung der Biosynthese von Sesquiterpenen aus Kamille mit [1-¹³C]DOX und [1-¹³C]Glukose und Untersuchung mittels ¹³C-NMR wurde eine Mischmarkierung der Isoprenoide gefunden (Adam und Zapp, 1998; Adam *et al.*, 1999). Während die ersten beiden Isopreneinheiten nach dem DOXP/MEP-Weg markiert waren, war die endständige teilweise nach dem Acetat/MVA-Weg markiert. Als Modell wurde ein Export von GPP und IPP in das Cytosol vorgeschlagen, wobei die cytosolische FPP-Synthase zur Synthese von FPP statt DMAPP bevorzugt GPP und IPP, abgeleitet von DOXP und cytosolischer MVA, verwerten sollte. Ebenso denkbar wäre jedoch auch ein Import von IPP in den Chloroplasten mit einer plastidären FPP-Synthase. Im allgemeinen wird zwar davon ausgegangen, dass FPP-Synthasen im Cytosol lokalisiert sind, jedoch gibt es auch einen Hinweis auf ein plastidäres Enzym (Sanmiya *et al.*, 1999). Auch bei der Biosynthese von Sterolen konnte eine Beteiligung des DOXP/MEP-Weges in *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare*, *Daucus carota* (Schwender, 1999) und in der Rotalge *Cyanidium caldarium* (Müller, 1997) nachgewiesen werden. Einigen Markierungsexperi-

menten zufolge ist ein Import von Prenyl-PP oder Prenolen in den Chloroplasten möglich. Für den Farnesylanteil von Diterpenen, Phytol und β -Carotin war eine Beteiligung des Acetat/MVA-Weges gefunden worden in einem Lebermoos, Hornmoos und bei *Ginkgo biloba* (Nabeta *et al.*, 1995, 1997; Schwarz und Arigoni, 1999; Daisuke *et al.*, 2000). Demzufolge könnte FPP bei diesen Organismen aus dem Cytosol im Chloroplasten um eine Einheit verlängert werden, um GGPP zu bilden. Der Einbau über den Umweg eines Abbaues wurde in den Experimenten ausgeschlossen, da ansonsten entweder eine Mischmarkierung der unterschiedlichen Positionen mittels NMR erkennbar gewesen wäre, oder eine Markierung von nicht isoprenoiden Verbindungen (z.B. Fettsäuren) beobachtet worden wäre. Da Mischmarkierungen nicht bei allen Markierungsstudien in unterschiedlichen Pflanzen zu beobachten waren, hängt offensichtlich die potentielle Fähigkeit, Intermediate zwischen den Kompartimenten auszutauschen, auch von der untersuchten Pflanze bzw. deren Entwicklungszustand ab. Kritisch zu sehen ist jedoch, dass bei den Studien mit ^{13}C oder ^2H markierten Intermediaten immer wesentlich größere Mengen an Intermediaten den Pflanzen angeboten wurden als die natürliche endogene Konzentration, die im allgemeinen sehr gering ist. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass hierdurch der entsprechende Biosyntheseweg durch Intermediate „übersättigt“ war, und erst in Folge dessen überschüssiges Prenyl-PP bzw. Prenol in das andere Kompartiment exportiert wurde, während unter physiologischen Bedingungen dieser Austausch vermutlich keine Rolle spielen dürfte. Unter physiologischen Bedingungen soll ein Austausch von Intermediaten weniger als 1% ausmachen (Eisenreich *et al.*, 2001). Die Hemmstudien, die mit Inhibitoren der Isoprenoidbiosynthese gemacht worden sind, sprechen auch gegen die Relevanz des beobachteten Austausch unter physiologischen Bedingungen. Weder kann die Hemmung des Acetat/MVA-Weges durch Mevinolin noch die Hemmung des DOXP/MEP-Weges durch Fosmidomycin durch den jeweiligen anderen zellulären IPP-Biosyntheseweg kompensiert werden (siehe auch Abschnitt 4.3.3).

Demgegenüber sind Mitochondrien auf den Import von IPP angewiesen (Disch *et al.*, 1998a). Mit unterschiedlich ^{13}C markierter Glucose und Pyruvat konnte eine Markierung von Ubichinon-10 nach dem Acetat/MVA-Weg in Tabak BY-2 Zellkulturen nachgewiesen werden. Der Vergleich der Markierung zwischen Sterolen, Fettsäuren und Ubichinon-10 legte eine Biosynthese aus einem Acetyl-CoA Pool nahe. Dies ist in Einklang mit früheren Experimenten, bei denen in isolierte Mitochondrien von mehreren Pflanzen IPP aber nicht MVAP in Ubichinon eingebaut wurde (Lütke-Brinkhaus *et al.*, 1984). Außerdem ergab sich bei Untersuchungen zu dem Effekt von Mevinolin auf die Akkumulation unterschiedlicher Prenyllipide, dass nur der Gehalt an Sterolen und Ubichinon im Gegensatz zu plastidären Isoprenoiden reduziert war (Schindler *et al.*, 1985) und dann auch kürzer-kettige Ubichinone (Q-7 und Q-8) auftraten, während Pflanzen unter Normalbedingungen nur Q-9 und/oder Q-10 enthalten. Zur Biosynthese von Ubichinon aus IPP wird unter anderem eine mitochondrielle FPP-Synthase, die in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden konnte (Cunillera *et al.*, 1997), und eine mitochondrielle IPP-Isomerase benötigt, deren Nachweis im Gegensatz zur cytosolischen und plastidären jedoch noch fehlt. Vermutet wurde, dass durch unterschiedlichen Translationsstart die IPP-Isomerasen mit entsprechender Transitpeptidsequenz für die jeweiligen Kompartimente gebildet werden (Cunningham und Gantt, 2000), was aus dem Vorhandensein mehrerer Startcodons auf der mRNA geschlossen wurde. Über eine Prenyltransferase zur Biosynthese der Ubichinonseitenkette aus FPP wurde ebenfalls noch nicht berichtet.

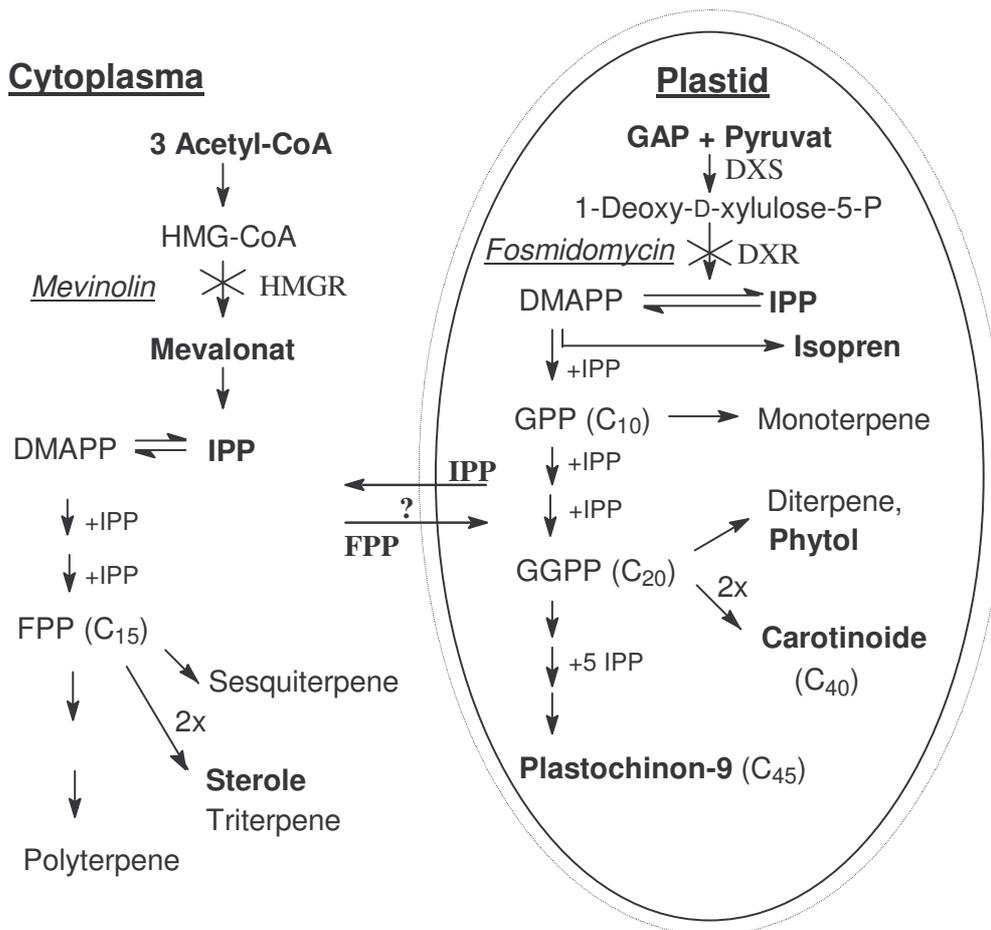


Abbildung 1-3: Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese in Pflanzen (nach Lichtenthaler *et al.*, 1997). Plastidäre Isoprenoide (Mono-, Di- und Tetraterpene werden über den DOXP/MEP-Weg gebildet, während cytosolische über den klassischen Acetat/MVA-synthetisiert werden. Obwohl es Hinweise auf einen Austausch von Prenyl-PP gibt, ist noch kein Organismus bekannt, bei dem ein Biosyntheseweg den anderen ersetzen kann. Mevinolin und andere Statine (z.B. Cerivastatin) hemmen die HMG-CoA-Reduktase (HMGR), das Schlüsselenzym des Acetat/Mevalonat-Weges. Fosmidomycin ist hingegen ein Inhibitor der DOXP-Reduktoisomerase (DXR), dem zweiten Enzym des DOXP/MEP-Weges.

1.4 Problemstellung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nur der erste Schritt des DOXP/MEP-Weges – die Bildung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat, katalysiert durch die DOXP-Synthase – bekannt. Als nächsten Schritt war die Bildung vom 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat postuliert worden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten Methoden entwickelt werden, um Enzyme des DOXP/MEP-Weges in Pflanzen nachzuweisen, insbesondere die beiden ersten Enzyme, die DOXP-Synthase (DXS) und die DOXP-Reduktoisomerase (DXR).

Es sollten Faktoren untersucht werden, die die Aktivität von DXS und DXR steuern. Hierzu sollte die Regulation in Abhängigkeit der Photosyntheseaktivität anhand der Mg^{2+} -Konzentrationsabhängigkeit und der pH-Abhängigkeit an der pflanzlichen DXR beispielhaft untersucht werden. Es sollten die K_m -Werte der pflanzlichen DXR bestimmt werden,

um mögliche Unterschiede zum Enzym anderer Organismen zu ermitteln bzw. ob das Enzym auch über die NADPH-Konzentration reguliert wird.

Weiterhin sollte der Langzeiteinfluss von Licht auf die Enzym-Aktivität der DXS und DXR ermittelt werden. Als Modell sollte die Ergrünung der Primärblätter von etiolierter Gerste dienen, bei denen im Zuge der starken Chlorophyll-, Carotinoid- und Prenylchinonakkumulation eine erhöhte Isoprenoidbiosynthese abläuft.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war noch kein Inhibitor des DOXP/MEP-Weges bekannt. Mit Hilfe der zu entwickelnden Enzymtests sollten potentielle Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges getestet werden, um Aufschluss über deren mögliche Wirkungsweise zu gewinnen. Ein Beispiel eines Herbizids, das die plastidäre Isoprenoidbiosynthese hemmt, und dessen Wirkungsmechanismus bis dahin unbekannt war, ist Clomazone, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einigen Derivaten und einigen seiner *in vivo*-Abbauprodukte untersucht wurde.

Zusätzlich zu den Enzymtests sollte ein Algentestsystem entwickelt werden, um Inhibitoren der Isoprenoidbiosynthese an ganzen Organismen identifizieren zu können. In den meisten Algen finden sich beide IPP-Biosynthesewege. Dadurch wäre es denkbar, dass ein Biosyntheseweg den anderen ersetzen kann, falls einer blockiert sein sollte. Aufgrund von Hemmmustern mit Hemmstoffen des Acetat/MVA-Weges und des DOXP/MEP-Weges sollte es evt. möglich sein, Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges zu identifizieren. Ein weitere Möglichkeit ist die Aufhebung der Hemmung eines Biosyntheseweges durch externes Angebot an fehlenden Intermediaten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel60-Platten der Firma Merck, Darmstadt, und Celluloseplatten (POYGRAM[®] CEL 300) von Machery und Nagel eingesetzt.

Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Dimethylisoxazolidinone wurde von Herrn Zeidler im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert und Methylerythritol aus Blättern des Tulpenbaums (*Liriodendron tulipifera* L.) isoliert (Zeidler, 2001).

Fosmidomycin wurde zunächst in nicht reiner Form von der BASF AG, Ludwigshafen, erhalten. Danach wurde Fosmidomycin und FR-900098 im Rahmen der Kooperation von Herrn Dr. Hassan Jomaa, Universität Giessen, zur Verfügung gestellt. Später wurde Fosmidomycin von der Firma Molecular Probes erworben.

Clomazone wurde von der Bayer AG, Wuppertal, Dr. Fedtke, und später zusammen mit seinen Derivaten von der BASF AG, Ludwigshafen, Dr. Ulf Mißlitz zur Verfügung gestellt. 5-Ketoclomazone wurde zunächst von der Firma TeLA Technische Lebensmittel- und Umweltanalytik GmbH Berlin für den Arbeitskreis Lichtenthaler synthetisiert. Clomazone wurde auch von Riedel-de Haën erhalten.

Dimethylaminoethylpyrophosphat (DMAEPP) wurden von Herrn Prof. R. Croteau, Washington State University, Pullman, Washington bezogen.

Synthetische 1-Deoxy-D-xylulose und sein Deuterium-markiertes Methylglykosid, Methyl-[1-²H₁]1-Deoxy-D-xylulofuranosid, wurden von Herrn H. U. May am Institut für Organische Chemie, Technische Universität Darmstadt, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. h.c. F. W. Lichtenthaler, synthetisiert.

NADPH wurde von der Firma Gerbu (Gaiberg) bezogen mit einem angegebenen Reinheitsgrad von 82%. Dies wurde über die Extinktion bei 340 nm überprüft und bestätigt.

Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Bäckerhefe wurde von Fluka (Sigma-Aldrich Gruppe) bezogen (354 U/mg Protein, 0,8 mg Protein/ml, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat) und vor Gebrauch dialysiert gegen 0,1 M Tricin, pH 8. 1 U oxidiert 1 µmol Glukose-6-phosphat pro Minute bei 25 °C, pH 7,6.

Triosephosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel wurde von Sigma erhalten (5000 U/mg, 3,3 mg Protein/ml, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat) und vor der Verwendung abzentrifugiert. 1 U setzt 1 µmol D-Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Dihydroxyacetophosphat pro Minute bei 25 °C, pH 7,5 um.

Alle weiteren Materialien wurden gekauft bei Unternehmen der Sigma-Aldrich Gruppe und bei den Firmen Gerbu (Gaiberg), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe).

GC/MS Analysen wurden an einem Hewlett Packard 5890 II Gaschromatographen mit einer „crosslinked methylsilicone“-Säule von Hewlett Packard (20 m x 0,32 mm), an dem ein Hewlett Packard 5971A-Massendetektor angeschlossen war, durchgeführt. Der Säulenvordruck betrug 11 psi Helium.

Die FPLC-Anlage zur Aufreinigung der rekombinanten Enzyme war von der Firma Pharmacia (Controller 2252, Pumpe 2248, Photometer 2141, Integrator 2221).

Zur Detektion von radioaktiven Spots auf DC-Platten kam ein Instant Imager von der Firma Canberra Packard zum Einsatz (InstantImager). Von der selben Firma wurde der Liquid Scintillation Analyzer 2000CA verwendet.

Der Microplattenreader (SpectraMax) war von der Firma Molecular Devices (Isma-ning).

Für die Gelelektrophorese der isolierten Proteine wurden Apparaturen von Hoefer und Biorad eingesetzt.

2.2 Allgemeine Verfahren

2.2.1 Pflanzenanzucht

Gerstensamen (*Hordeum vulgare* L. var. Alexis) wurden 2h in Wasser vorgequollen, auf mineralstoffhaltigem Torfkultursubstrat (TKS II) ausgesät und im Dunkeln bei 25 °C angezogen. Die etiolierten Keimlinge wurden nach 6 Tagen unter ein Leuchtstoffröhrenfeld (Osram L40, 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mit einer Lichtperiode von 16 h und 8 h Dunkelheit weiter kultiviert.

Kichererbsen (*Cicer arietinum* L.) und Erbsen (*Pisum sativum* L.) wurden analog angezogen, jedoch nicht etioliert sondern im Licht/Dunkel-Wechsel (16 h / 8 h). Vor der Aussaat wurde die Samenschale entfernt.

Spinat (*Spinacia oleracea* L.) wurde jeweils von einem lokalen Markt bezogen. Lebermoos wurde vom Botanischen Garten, Universität Karlsruhe, angezogen. Blätter der Pappel (*Populus nigra* L.) wurden von Bäumen des Universitätsgeländes unter Wasser abgeschnitten und weiter verwendet.

2.2.2 Isolierung von Etiochloroplasten

Es wurde ein modifiziertes Verfahren nach Roughan (1987) verwendet:

Alle Schritte der Isolierung wurden auf Eis durchgeführt und eine Kühlzentrifuge verwendet. Das Pflanzenmaterial (Gerste, Erbse oder Spinat) wurde mit Hilfe eines Mixers durch kurze Impulse in isotonischem, halb-gefrorenen Isolationspuffer (2 mM HEPES/KOH pH 7,8, 6,4% Sorbit, 0,4 mM KCl, 0,04 mM EDTA) zerkleinert. Anschließend wurde das zerkleinerte Material durch eine Mullbinde hindurch gepresst und mit einem 40%-igen Percollkissen in Waschpuffer (Isolationspuffer mit 6% Sorbit statt 6,4%) unterschichtet. Zur Isolierung von Chloroplasten wurde bei 2500 x g 2 min zentrifugiert, im Falle von Etiochloroplasten wurde 4 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, zertrümmerte Chloroplasten vorsichtig weggewischt, und die Chloroplasten wurden nochmals in Waschpuffer aufgenommen und zentrifugiert. Die isolierten Chloroplasten wurden entweder in einem hypotonischen Puffer (20 mM Tricin, pH 8) aufgenommen, um sie zum Platzen zu bringen, oder in isotonischem Waschpuffer aufgenommen. Der Chlorophyll und Carotinoidgehalt wurde nach Lichtenthaler (1987) in 80% Aceton bestimmt, nachdem eine Probe der Etiochloroplastensuspension mit 4-fachen Volumen Aceton versetzt und zentrifugiert wurde.

Etiochloroplasten wurden aus Gerste isoliert, Chloroplasten aus Gerste, Erbse und Spinat.

2.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach einem modifizierten Verfahren nach Lowry durchgeführt (Bach *et al.*, 1986):

Proteinproben wurden auf 1 ml mit H₂O verdünnt und mit 50 µl 2% Natriumdesoxycholat versetzt. Nach 15 min wurde mit 200 µl 30% Trichloressigsäure das Protein gefällt, abzentrifugiert und in 2 ml Lowry-Reaktionsgemisch (je 4 ml 2% CuSO₄ und Kaliumnatriumtartrat in 100 ml 0,1 N NaOH, 2% Na₂CO₃) aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl 5% SDS und 200 µl Folin-Reagenz (1:2 verdünnt) wurde nach 60 min im Dunkeln die Extinktion bei 650 nm gemessen und aus einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin (20 µg bis 180 µg) die Proteinmenge bestimmt.

2.2.4 Antikörperaufreinigung

Zur Aufreinigung wurde eine 1 ml NHS-aktivierte HiTrap Säule (Amersham Biosciences) verwendet, an die die rekombinante DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii* gekoppelt wurde. Die Kopplung erfolgte nach der Herstellerempfehlung. 1,2 mg rekombinante DXS in 1 ml Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) wurde auf die Säule aufgetragen. Nach 30 min wurde mit Kopplungspuffer gewaschen. Zur Deaktivierung von noch vorhandenen aktiven Gruppen wurde 0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3 verwendet und die Säule mit 0,1 M Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4 gewaschen. Die Säule wurde aufbewahrt in Äquilibrierungspuffer (0,01 M Na₂HPO₄, 0,14 M NaCl, pH 7,4).

Das Antiserum wurde mit einer PD10-Säule (Gelfiltrationssäule, bei der Moleküle größer 10 kDa ungehindert die Säule passieren) in Äquilibrierungspuffer überführt und 7 ml auf die HiTrap Säule mit gekoppelter DXS aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Proteine waren im Durchbruch nicht mehr detektierbar (Messen der Extinktion bei 280 nm). Die gebundenen Antikörper wurden mit 0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 3 eluiert. 2 ml Fraktionen wurden gesammelt und durch 135 µl 1 M NaHCO₃ neutralisiert. Anschließend wurde der aufgereinigte Antikörper mit einer PD10-Säule in TBS-T (Tris-buffered saline mit Tween 20: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8,0) überführt.

2.2.5 Immunpräzipitation

Mit dem aufgereinigten Antikörper wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, um nachzuweisen, dass dieser an die DXS aus Gerstenetiochloroplasten bindet.

Etioplasten wurden in 20 mM Tricin, pH 8 aufgenommen und die Membranfraktion (Thylakoide) abzentrifugiert. Der Überstand (Stromaproteine) wurde 1:2 mit aufgereinigtem Antikörper bzw. TBS-T-Puffer (Kontrolle) verdünnt. Parallel wurden Ansätze mit rekombinanter DXS und einer Mischung aus rekombinanter DXS mit Stromafraktion der Etioplasten durchgeführt mit gleicher Antikörper-Konzentration bzw. TBS-T. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Ansätze mit 1:2 Protein A-Sepharose versetzt zur Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach einer weiteren Stunde wurde abzentrifugiert und mit den Überständen DXS-Enzymtests durchgeführt.

2.2.6 SDS-PAGE

Zur Überprüfung der Reinheit der Enzympräparation sowie dem Nachweis von der DOXP-Synthase in Etioplasten wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Verwendet wurde ein 8%-iges Trenngel und ein 5%-iges Sammelgel. Je nach Erfordernis wurden entweder Minigele verwendet (Biorad, Nachweis der rekombinanten Enzyme) oder größere Gele für eine bessere Auftrennung der Proteine, wobei bei diesen auch eine größere Menge an Protein aufgetragen werden konnte.

Als Elektrophorese-Puffer wurde 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3 verwendet. Das Trenngel wurde mit 0,375 mM Tris, 0,1% SDS, 8% Acrylamid/Bisacrylamid

(37,5:1), pH 8,8 angesetzt. Das Sammelgel enthielt 0,13 M Tris, 0,1% SDS, 5% Acrylamid/Bisacrylamid, pH 6,8. Die Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 0,1% Ammoniumpersulfat und 0,04% (Trenngel) bzw. 0,1% (Sammelgel) TEMED. Proteinproben wurden in Ladepuffer (Endkonzentration: 50 mM Tris, 100 mM Dithiothreitol (DTT), 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerin, pH 6,8) aufgenommen, 3 min auf 100 °C erhitzt und aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 8 V/cm angelegt. Nach dem Eindringen der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 15 V/cm erhöht.

2.2.7 Coomassie Färbung von Proteingelen

Proteine wurden auf den SDS-PAGE Gelen durch eine herkömmliche (Sambrook *et al.*, 1989) oder durch eine kolloidale Coomassie Färbung (Neuhoff *et al.*, 1990) nachgewiesen.

Die herkömmliche Färbung wurde zur Überprüfung der Aufreinigung der rekombinanten DXS und DXR über Zn²⁺-Affinitätschromatographie verwendet (siehe 2.3.2). Die SDS-Gele wurden für mehrere Stunden in Essigsäure/Methanol/Wasser (10:45:45) mit 0,25 g /100 ml Coomassie Brilliant Blue 4 h fixiert und gefärbt. Anschließend wurde mit Essigsäure/Methanol/Wasser (10:45:45) mehrmals entfärbt bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren.

Die empfindlichere kolloidale Coomassie Färbung wurde für die Untersuchungen der Expression der DXS in Etiochloroplasten eingesetzt (siehe 2.3.8). Die Färbelösung wurde angesetzt aus 98% Lösung A (2% 85%-ige ortho-Phosphorsäure, 10% Ammoniumsulfat) und 2% Lösung B (5% Coomassie Blue G250) und vor Verwendung über Nacht geschüttelt. Die Gele wurden zunächst eine Stunde fixiert (40% Methanol, 2% Essigsäure) und anschließend 3 h mit der Färbelösung inkubiert. Entfärbt wurde durch mehrmaliges Waschen mit Wasser, bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren.

2.2.8 Western-Blot

Zum Nachweis der DOXP-Synthase in Pflanzen wurden Antikörper gegen die rekombinante DOXP-Synthase von *Chlamydomonas reinhardtii* aus zwei Kaninchen von der Firma Biotrend, Köln, bezogen. Die Tiere wurden mit rekombinanter DOXP-Synthase immunisiert. Dazu wurde DXS aufgereinigt über Zn²⁺-Affinitätschromatographie, überführt in 0,1 M Tricin pH 8 (Abschnitt 2.3.2) und anschließend gefriergetrocknet.

Proteinbanden von SDS-Gele wurden mittels einer Semi-dry Bloteinrichtung auf Nitrocellulose-Membranen übertragen (Kyhse-Andersen, 1984; vgl. Abbildung 2-1). Der Blot dauerte 1,5 h. Die Stromstärke betrug in mA das 0,8-fache der Membranfläche. Mit 5% Magermilchpulver in TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8,0) wurden die Membranen für eine Stunde inkubiert, um nicht-besetzte Proteinbindestellen auf der Membran abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran in Antiserum- bzw. Präimmunserumlösung (unterschiedliche Verdünnungen von 1:500 bis 1:10000 in TBS-T, der aufgereinigte Antikörper 1:10000) überführt. Nach 3 Stunden wurde die Antiserumlösung ausgetauscht gegen TBS-T und die Antiserumlösung für eine nochmalige Verwendung aufgehoben. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper, welcher gegen Antikörper von Kaninchen gerichtet ist und mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Zum Nachweis der Antikörper wurde die Membran anschließend nochmals 3 mal gewaschen mit TBS-T und in 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9,5 überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 66 µl Nitro-Blue-Tetrazolium (0,5 g pro 10 ml 70% Dimethylformamid) und 33 µl pro 10 ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (0,5 g/10 ml Dimethylformamid), ein künstliches Substrat der Phosphatase. Die Reaktion wurde nach Sichtbarwerden der Banden (violett Färbung) durch Austausch mit Wasser gestoppt.

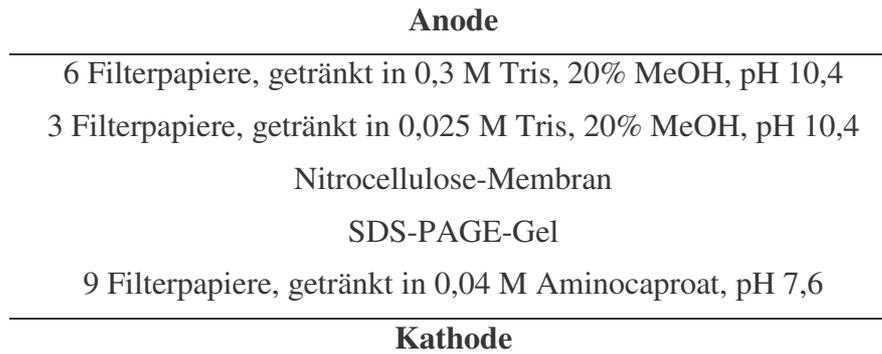


Abbildung 2-1: Schema des Semi-dry-Western-Blots.

2.3 Enzyme des DOXP/MEP-Weges

Zum Nachweis von Enzymen und Zwischenprodukten des DOXP/MEP-Weges wurden zunächst Tests mit radioaktiven Substraten entwickelt. Zur Auftrennung von Edukten und Produkten der jeweiligen Enzymreaktion wurden dünnenschichtchromatographisches Trennverfahren verwendet. Zunächst wurde mittels radioaktiven und nicht radioaktiven Referenzsubstanzen ein geeignetes System gewählt. Zur Sichtbarmachung nicht radioaktiver Substanzen wurde entweder Jod verwendet, welches zur Braunfärbung von organischen Substanzen führt, oder mit einem Gemisch von 0,5 ml Anisaldehyd, 2 ml konz. Schwefelsäure und 100 ml Essigsäure besprüht mit anschließender Erhitzung auf 110 °C bis zum Sichtbarwerden.

2.3.1 Enzympräparationen

Zur Entwicklung eines Enzymtest für die DOXP-Synthase (DXS) wurde zunächst rekombinante DXS von *E. coli* in *E. coli* überexprimiert. Der Stamm wurde mir von Prof. Boronat, Barcelona, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid mit rekombinanter DXS enthielt ein durch IPTG (Isopropylthiogalaktosid) induzierbares *lac*-Operon und eine Ampicillin-Resistenz-Kassette. Die DXS wurde später von Herrn Schwender bei uns am Institut im Rahmen seiner Doktorarbeit aus *Chlamydomonas reinhardtii* kloniert (Schwender, 1999). Das klonierte Enzym verfügte über ein His₆-Tag, der Expressionsvektor verfügte über ein *lac*-Operon und eine Kanamycinresistenz.

Der Nachweis der DOXP-Reduktoisomerase erfolgte zunächst in Proteinrohextrakten von 6 Tage alten etiolierten Primärblättern von Gerste, die oberhalb der Koleoptile abgeschnitten wurden. Diese wurden in 0,1 M BisTris pH 8, 2 mM DTT; 0,1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Serinproteaseinhibitor), 0,1% PVP (lösliches oder unlösliches Polyvinylpyrrolidon), 5 mM MgCl₂, 5 mM NaF zermörsert, mit einem Mulltuch filtriert und die Zelltrümmer bei 10000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mittels einer PD10 Gelfiltrationssäule in den gleichen Puffer ohne Zusatz von PVP und PMSF überführt zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen. Das Protein wurde partiell aufgereinigt mit einer fraktionierten Polyethylenglycol-Fällung. Das Protein wurde zwischen 10% und 30 % gefällt. Nach einer Ammoniumsulfat-Fällung konnte dagegen keine Aktivität mehr detektiert werden.

Das Enzym war nicht lagerfähig. Zusatz von Glycerin, Sorbitol, NaCl, Albumin, unterschiedliche Proteaseinhibitoren (Pefabloc, EDTA) brachten keine Verbesserung. Auch andere Puffer (Tris-, Phosphatpuffer) erhöhten die Stabilität nicht.

Proteinrohextrakte von etiolierten Primärblättern von Gerste wurden auch für Tests zur Hydratase-Reaktion von IPP oder DMAPP verwendet.

Von Blättern der Kichererbse und Pappel wurden zum DXR-Nachweis ebenfalls in gleicher Weise Proteinrohextrakte gewonnen. Jedoch wurde keine Aktivität gefunden, und auf weitere Experimente wurde verzichtet. Ebenfalls erfolglos blieb der DXS-Nachweis in Proteinrohextrakten von Lebermoos.

Experimente wurden auch mit der rekombinanten DXR aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt, welche von Herrn Dr. Schwender kloniert worden ist (Schwender *et al.*, 1999). Das Enzym wurde im selben Expressionsvektor kloniert wie die DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Anzucht der transformierten *E. coli* und Isolierung der DXR erfolgten in gleicher Weise.

2.3.2 Aufreinigung der rekombinanten DXS und DXR

E. coli, transformiert mit der *dxs* aus *Chlamydomonas reinhardtii* bzw. *dxr* aus *Arabidopsis thaliana*, wurde in LB-Medium bei 37 °C angezogen mit 10 µg/ml Kanamycin. Bei einer Zelldichte von $OD_{560nm}=1$ der Bakterienkultur erfolgte die Induktion mit IPTG. Die Bakterien wurden dann über Nacht bei 24 °C weiter kultiviert. Nach dem Abzentrifugieren (5000 x g) der Zellen, Waschen mit 0,85 % NaCl und nochmaligen Abzentrifugieren wurden diese mittels einer French-Press (552 bar) in Isolationspuffer (0,05 M K-Phosphat; 0,5 M NaCl; pH 7,8; 2 mM DTT; 0,1 mM PMSF) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 10000 x g 30 min abzentrifugiert, und der Überstand umgepuffert in Isolationspuffer mittels einer PD10 Gelfiltrationssäule.

Die Anzucht und Isolierung der rekombinanten DXS aus *E. coli* erfolgte in gleicher Weise, jedoch wurde statt Kanamycin 10 µg/ml Ampicillin verwendet und die Induktion mit IPTG erfolgte 4h vor der Ernte. Als Isolationspuffer diente 0,1 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM DTT und 0,1 mM PMSF. Das Enzym wurde nicht weiter aufgereinigt und bei -20 °C gelagert.

Die Aufreinigung der rekombinanten DXS von *Chlamydomonas reinhardtii* und der DXR von *Arabidopsis thaliana* erfolgte über eine FPLC. Eine HiTrap Säule (Amersham Biosciences) mit Iminodiessigsäure Gruppen zum Komplexieren zwei-wertiger Kationen wurde mit Zn^{2+} beladen und das Rohhomogenat aufgetragen. Beide Enzyme verfügten über ein (His)₆-Tag, welches Zn^{2+} komplexieren kann und zunächst an die Säule binden. Anschließend wurde mit einem Imidazolgradienten das Enzym von der Säule eluiert, indem Imidazol um die Bindestelle mit dem Enzym konkurriert (0-0,5 M Imidazol in Isolationspuffer innerhalb 20 min). Die Elution der Proteine wurde über die Extinktion bei 280 nm verfolgt. Die Proteinfraktionen wurden gesammelt und auf Enzymaktivität überprüft. Es erwies sich als vorteilhaft DXS nach der Aufreinigung zunächst mit 50% PEG zu fällen, bei -20 °C aufzubewahren, und vor Enzymtests in Reaktionspuffer aufzunehmen. DXR wurde über eine PD 10 Säule in Reaktionspuffer überführt.

2.3.3 Enzymtests

DOXP-Synthase (DXS)

Die DOXP-Synthase katalysiert die Umsetzung von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) unter Abspaltung von CO₂. Die Reaktion benötigt Thiaminpyrophosphat (TPP) und Mg^{2+} . Verwendet wurde zunächst ein Gemisch von D/L-GAP und [2-¹⁴C]Pyruvat. Die Auftrennung von [2-¹⁴C]Pyruvat und [2-¹⁴C]DOXP erfolgte über eine Dünnschichtchromatographie mit Cellulose als stationärer Phase und Propanol/Essigsäure/Wasser (6:2:2) als mobiler Phase. Neben Pyruvat war noch

eine Bande mit geringerem R_f -Wert zu erkennen, der mit der Lagerdauer von Pyruvat zunahm. Der R_f -Wert von Pyruvat betrug 0,62, von dem Abbauprodukt 0,48 und von DOXP 0,38. Möglicherweise handelte es sich hierbei um Polymerisationsprodukte, die bei der Lagerung von Pyruvat auch bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ entstehen (Von Korff, 1969). Die Detektion erfolgte mit einem Instant Imager, und anschließend wurden DOXP und Pyruvat ausgekratzt und die Radioaktivität mit einem LSC (Liquid Scintillation Counter) bestimmt. Neben dem Enzymtest mit D/L-GAP wurde in Anlehnung an Hahn *et al.* (2001) Dihydroxyacetophosphat (DHAP) und Triosephosphat-Isomerase (TIM) eingesetzt (Abbildung 2-2), die DHAP zu D-GAP umsetzt mit einer Gleichgewichtskonstante von 0,047 (GAP/DHAP). DHAP hemmt hierbei nicht die DOXP-Synthase (Hahn *et al.*, 2001).

Standardtests enthielten 5 mM Mg^{2+} , 0,5 mM Pyruvat, 50 Bq $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Pyruvat/ μl Assay, 2 mM TPP, 2 mM D/L-GAP oder 10 mM DHAP und 0,825 Units TIM/ μl Assay in 0,1 M Tricin Puffer pH 8. Mit einer Zeitreihe wurde zunächst der lineare Bereich ermittelt, in dem sich die Geschwindigkeit nicht änderte, um die Anfangsgeschwindigkeit bestimmen zu können. Die Tests wurden bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, 5 μl entnommen und durch Zugabe von 5 μl Aceton die Reaktion abgestoppt und komplett auf die Cellulose Platten aufgetragen.

Analog zu den Standardtests erfolgte die Synthese von DOXP bzw. $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ DOXP als Substrat des nächsten Enzyms, wobei mittels DC die vollständige Umsetzung kontrolliert wurde. Nach dem Denaturieren der DXS durch Erhitzen im siedenden Wasserbad für eine Minute und Abzentrifugieren wurde der Überstand direkt für den DXR-Test verwendet.

DOXP-Reduktoisomerase (DXR)

Die DOXP-Reduktoisomerase katalysiert die Umlagerung und Reduktion von DOXP zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP). Als Reduktionsmittel dient NADPH, und die Reaktion benötigt zweiwertige Kationen. Bei Proteinrohextrakten aus Gerste war eine unspezifische Oxidation von NADPH, gemessen über die Extinktionsabnahme bei 340 nm, zu beobachten, welche die eigentliche Enzymreaktion überdeckte. So konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen Kontrolle ohne DOXP und Reaktionsansatz mit DOXP detektiert werden. Daher wurde statt eines optischen Tests ein radioaktiver Enzymassay verwendet mit einem NADPH regenerierendem System (Abbildung 2-2). Enzymatisch synthetisiertes $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ DOXP wurde mit NADPH umgesetzt und entstehendes NADP^+ wurde mit Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (GPDH) von Bäckerhefe (Abschnitt 2.1) wieder zu NADPH reduziert. Eine Oxidation von NADPH war photometrisch nicht mehr zu beobachten bei Standardtests. Weder Glucose-6-phosphat noch 6-Phosphogluconat, das Produkt der GPDH Reaktion, hemmten die DXR, wie für die rekombinante DXR aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden konnte. Standardtests wurden in 0,1 M BisTris oder Tricin, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 1 mM NADPH, 0,5 mM DOXP und $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ DOXP (100 Bq/ μl), 0,05 U/ μl GPDH, 10 mM Glucose-6-phosphat und bei Tests mit Proteinrohextrakten aus Gerste 5 mM NaF zur Hemmung von Phosphatasen. Die Reaktion wurde nach Entnahme von 5 μl durch Erhitzen im siedendem Wasserbad gestoppt, Fluorid durch Zugabe von CaCl_2 (Endkonzentration 0,1 M) als CaF_2 gefällt und anschließend mit 1 U alkalischer Phosphatase für eine Stunde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ die Phosphatgruppe entfernt. Methylerythritol (ME) und Deoxyxylulose (DOX) wurde dünnschichtchromatographisch über Kieselgel 60 aufgetrennt. Als Laufmittel wurde Aceton/Ethylacetat/ H_2O (50/50/2) verwendet. Der R_f -Wert für DOX betrug 0,4, für ME 0,2 und für Pyruvat bzw. Abbauprodukte hiervon 0,0. Die radioaktiven Spots wurden ausgekratzt und im LSC gezählt. Um die Anfangsgeschwindigkeit bestimmen zu können, wurde mit einer Zeitreihe zunächst der lineare Bereich ermittelt, in dem sich die Geschwindigkeit nicht änderte,.

Mit dem aufgereinigten rekombinanten Enzym aus *Arabidopsis thaliana* wurde zusätzlich ein optischer Test verwendet, der in 96 Well Microplatten durchgeführt wurde. Gemessen wurde die Oxidation von NADPH bei 340 nm. Standardtests wurden mit 0,82 mM NADPH, unterschiedlichen DOXP-Konzentrationen, 5 mM Mg^{2+} in 0,1 M Tricin pH 8 bei 30 °C durchgeführt. Die DOXP-Konzentration wurde über die Menge an oxidiertem NADPH bestimmt. Hierbei wurden diejenigen Enzymtests herangezogen, bei denen keine Oxidation von NADPH mehr zu beobachten war. Dies war gegeben für Konzentrationen kleiner als 0,3 mM. Unter diesen Bedingungen konnte keine Reversibilität gefunden werden. Wie bei Hoeffler *et al.* (2002) und Koppisch *et al.* (2002) beschrieben katalysiert die DXR eine reversible Reaktion, deren Gleichgewicht auf der Seite des Produktes liegt. Bei einer Gleichgewichtskonstante von $4,6 \pm 0,5 \times 10^{-10}$ M ($([H^+][DOXP][NADPH])/([NADP^+][MEP])$; Hoeffler *et al.*, 2002) werden bei 0,3 mM DOXP und 0,82 mM NADPH bei pH 8 97,5% von DOXP in MEP umgewandelt. Bei geringeren Konzentrationen von DOXP ergibt sich ein noch geringerer Fehler, so dass dieser vernachlässigt werden kann.

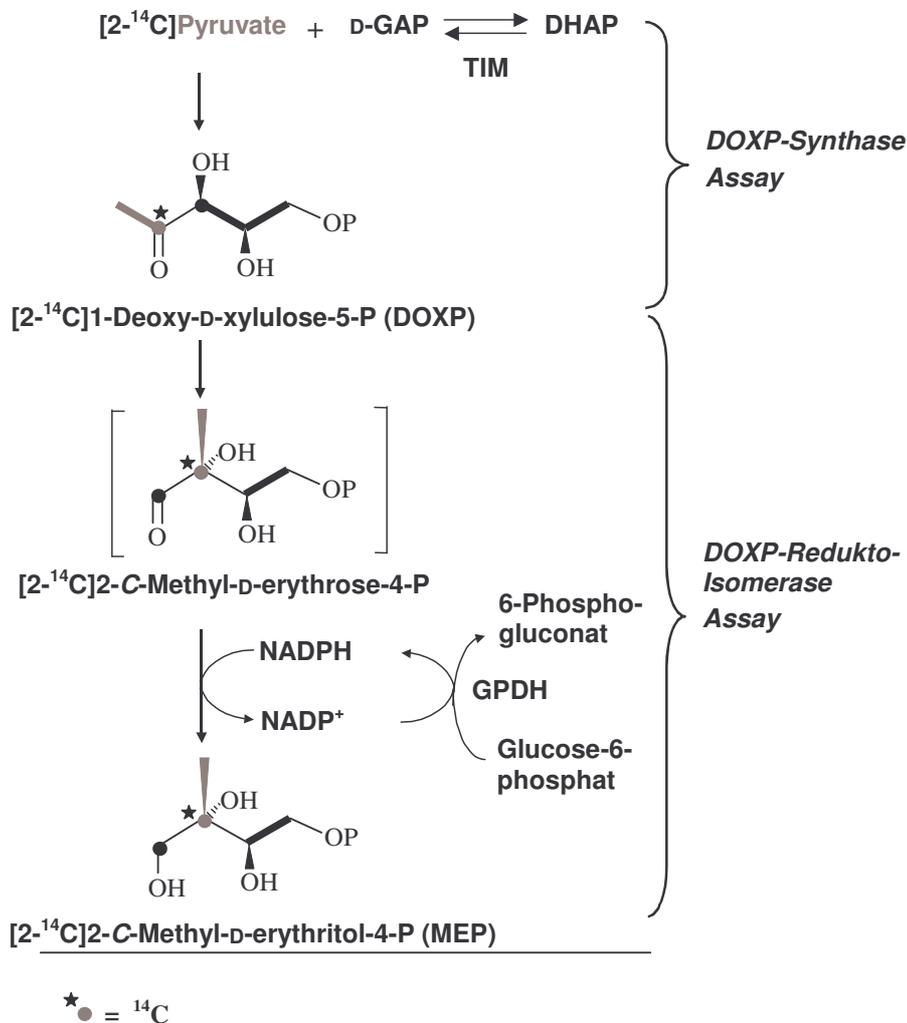


Abbildung 2-2: Radioaktive Enzymtests zum Nachweis der Aktivitäten der DOXP-Synthase (DXS) und DOXP-Reduktoisomerase (DXR). Für die rekombinante DXR aus *Arabidopsis thaliana* wurde auch ein optischer Test verwendet. TIM: Triosephosphat-Isomerase, GPDH: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat.

2.3.4 Produktnachweis der Enzymreaktionen mit GC/MS

Der Produktnachweis der Enzymreaktionen erfolgte sowohl für die DXS als auch DXR in analoger Weise. Im Falle des DXR-Nachweises in Proteinrohextrakten von Gerste wurde zusätzlich 5 mM NaF zur Hemmung von Phosphatasen hinzugegeben. Es wurde ein nicht radioaktiver Enzymtest unter Standardbedingungen durchgeführt und parallel dazu ein radioaktiver Test, um den Umsatz zu kontrollieren. Die Reaktion wurde im siedenden Wasserbad gestoppt. Das denaturierte Protein wurde abzentrifugiert, und der Überstand mit alkalischer Phosphatase (0,1 U/ μ l) und, wenn der Enzymansatz NaF enthielt, zusätzlich mit CaCl_2 zur Fällung von F^- als CaF_2 versetzt. Nach 1 h bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz mit der gleichen Menge Aceton versetzt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand im Rotavapor eingengt. DOX und ME wurden dünnschichtchromatographisch (Ethylacetat/Aceton/ H_2O 50:50:2, siehe oben) aufgetrennt, ausgekratzt, eluiert mit MeOH und eingengt. Anschließend erfolgte die Acetylierung über Nacht mit Toluol/Essigsäureanhydrid/Pyridin 2:1:1. Nach Einengung und Aufnahme in Methanol wurden Proben in das GC/MS gespritzt. Als Programm wurde eine Anfangstemperatur von 80 °C (5 min) gewählt mit anschließender Erhöhung der Temperatur um 20 °C/min auf 280 °C. Es wurde eine „crosslinked methylsilicone“-Säule verwendet. Die Retentionszeit für DOX-triacetat betrug 8,8 min und für ME-1,3,4-triacetat 23,6 min.

2.3.5 Experimente mit der DOXP-Reduktoisomerase aus Gerste

Zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit der DOXP-Reduktoisomerase wurde zunächst mit einem Gerstenrohextrakt eine fraktionierte PEG Fällung (10% und 30%) durchgeführt und das Pellet der 30% Fällung in 20 mM KCl aufgenommen. Proben hiervon wurden mit 2x Puffer (0,2 M Bis/Tris, unterschiedliche pH Werte) versetzt und Enzymtests durchgeführt.

Ebenfalls wurde die Mg^{2+} -Konzentrationsabhängigkeit der Enzymaktivität bestimmt. Es wurde ein Bereich von 0,5 mM bis 10,5 mM ausgewählt, was den Bereich der im Stroma der Chloroplasten auftretenden Mg^{2+} -Konzentration abdeckt. Im Dunkeln liegt die Konzentration bei 2 mM, im Licht bei 4 mM (Marschner, 1986).

2.3.6 Experimente mit der rekombinanten DOXP-Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana*

Bestimmung der Kenngrößen der DXR

Die Bestimmung des $K_{m\text{DOXP}}$ -Wertes erfolgte mit einem optischen Test. Der Test wurde durchgeführt mit zwei NADPH Konzentrationen (0,41 mM und 0,82 mM) und acht DOXP Konzentrationen. Es wurde festgestellt, dass V_{max} bei 0,41 mM NADPH 89% des V_{max} bei 0,82 mM NADPH betrug. Daraus folgte, dass der $K_{m\text{NADPH}}$ im Bereich von 80 μ M liegen sollte. Die Empfindlichkeit des Microplattenreader genügte nicht, um diese geringen NADPH-Konzentrationen zu messen. Zur Ermittlung wurde ein radioaktiver Test verwendet mit einem NADPH regenerierenden System (siehe Abbildung 2-2). Die [^{14}C]DOXP-Konzentration betrug 1,1 mM, was dem 10-fachen des $K_{m\text{DOXP}}$ -Wertes entsprach (siehe 3.1.3), die NADPH Konzentrationen betragen 0,82 μ M, 4,1 μ M, 8,2 μ M, 41 μ M und 82 μ M. Das NADPH regenerierende System bewirkte, dass über einen längeren Zeitraum die NADPH-Konzentration sich nicht änderte, und die Reaktion nahezu linear war:

[NADPH]	4,1 μ M	41 μ M
% Umsatz (min)	11 (20 min)	27 (20 min)
	30 (60 min)	49 (40 min)

Bei 0,5 mM DOXP und 0,82 mM NADPH wurde überprüft, ob Glucose-6-phosphat oder das Produkt der GPDH-Reaktion Phosphogluconat die DXR hemmt. Dies war jedoch nicht der Fall. Die GPDH wird durch NADPH gehemmt. Jedoch selbst bei 1mM NADPH konnte im optischen Test keine Abnahme der Extinktion bei 340 nm festgestellt werden.

Bei Verwendung dieses NADPH regenerierenden Systems sinkt zunächst die NADPH Konzentration und die NADP^+ Konzentration steigt bis die Geschwindigkeit der Oxidation von Glucose-6-phosphat derjenigen der Reduktion von DOXP entspricht. Die Frage ist demnach, wie sich die NADPH Konzentration ändert, und die Geschwindigkeit der Reduktion von DOXP beeinflusst. Die eingesetzte Menge an GPDH (0,05 U/ μl) vermag 50 nmol Glucose-6-phosphat bei 26 °C, pH 7,6 pro Minute und pro μl zu oxidieren. Der K_m -Wert von NADP^+ für das Hefeenzym beträgt 50 μM (Bergmeyer, 1970). Die eingesetzte DXR-Menge führte zu 0,022 nmol DOXP $\text{min}^{-1} \mu\text{l}^{-1}$ bei 1,1 mM DOXP und 82 μM NADPH (Anfangskonzentration), d.h. berechnet mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung wird die Geschwindigkeit von 0,022 nmol Glucose-6-phosphat/min bei 0,022 μM NADP^+ von der GPDH erreicht. Selbst bei einer NADPH-Anfangskonzentration von 0,82 μM ergibt sich eine Konzentration von mindestens 0,8 μM NADPH, so dass keine Änderung der Anfangsgeschwindigkeit zu erwarten war.

Berechnung der K_m -Werte und des V_{\max} -Wertes

Die Berechnung der K_m -Werte erfolgte nach einem Verfahren, das in „Fundamentals of Enzyme Kinetics“, von Cornish-Bowden (1995) beschrieben ist.

Der K_m -Werte eines Substrates bei Bisubstratreaktionen entspricht dem einer Einsubstratreaktion, wenn die Konzentration des anderen Substrates sättigend ist, d.h. wenn eine Erhöhung der Konzentration dieses Substrates zu keiner messbaren Geschwindigkeitssteigerung führt. Eine Möglichkeit, den K_m -Wert eines Substrates zu bestimmen, ist demnach das andere Substrat in hoher Konzentration einzusetzen, wodurch sich die Geschwindigkeitsgleichung zu einer Michaelis-Menten Einsubstratgleichung vereinfacht. Die Messfehler werden im allgemeinen als normalverteilt angenommen, wobei zwei unterschiedliche Arten von Fehlern in Betracht kommen. Eine Art von Fehler ist ein multiplikativer Fehler, bei dem die prozentuale Abweichung der gemessenen Geschwindigkeit immer gleich ist, und die andere ein additiver Fehler, bei dem die absolute Abweichung unverändert ist.

$$v_i = \frac{V_{\max} * S_i * (1 - e_i)}{K_m + S_i} \text{ multiplikativer Fehler; } v_i = \frac{V_{\max} * S_i}{K_m + S_i} + e_i \text{ additiver Fehler}$$

e_i ist hierbei ein normalverteilter Fehler um den Wert 0.

Um die Kenngrößen zu bestimmen, wird versucht den Fehler e_i zu minimieren, indem die Summe der Fehlerquadrate minimiert wird. Dies führt auf folgendes Verfahren, das auch als gewichtete Regression bezeichnet wird.

$$\hat{K}_m = \frac{\sum w_i \sum \frac{w_i}{S_i v_i} - \sum \frac{w_i}{S_i} \sum \frac{w_i}{v_i}}{\sum \frac{w_i}{S_i^2} \sum \frac{w_i}{v_i} - \sum \frac{w_i}{S_i} \sum \frac{w_i}{S_i v_i}} \quad \hat{V}_{\max} = \frac{\sum \frac{w_i}{S_i^2} \sum w_i - \left(\sum \frac{w_i}{S_i} \right)^2}{\sum \frac{w_i}{S_i^2} \sum \frac{w_i}{v_i} - \sum \frac{w_i}{S_i} \sum \frac{w_i}{S_i v_i}}$$

S_i und v_i sind die Substratkonzentration und die gemessene Geschwindigkeit bei Experiment i , w_i ist die zugehörige Gewichtung. Die Wahl von w_i hängt vom Fehler ab, bei einem multiplikativen ist $w_i = v_i^2$ und bei einem additiven $w_i = \hat{v}_i^3 v_i$, wobei \hat{v}_i die berechnete Geschwindigkeit bei Experiment i ist. Zunächst wird $\hat{v}_i = v_i$ gesetzt. Anschließend wird \hat{K}_m und \hat{V}_m mit $w_i = \hat{v}_i^3 v_i$ ermittelt. Aus \hat{K}_m und \hat{V}_m wird dann im nächsten Schritt \hat{v}_i bei

der Substratkonzentration S_i berechnet. Das Verfahren wird mehrmals wiederholt, bis sich keine Änderungen mehr ergeben.

Die Standardabweichung von K_m und V_{max} berechnet sich wie folgt:

$$\sigma_{\text{exp}}^2 = \frac{1}{n-2} \sum w_i \left(\frac{1}{v_i} - \frac{1}{\hat{v}_i} \right)^2$$

$$\sigma^2(\hat{V}_{\text{max}}) = \frac{\hat{V}_{\text{max}}^4 \sigma_{\text{exp}}^2 \sum \frac{w_i}{S_i^2}}{\sum \frac{w_i}{S_i^2} \sum w_i - \left(\sum \frac{w_i}{S_i} \right)^2}$$

$$\sigma^2(\hat{K}_m) = \frac{\hat{V}_{\text{max}}^2 \sigma_{\text{exp}}^2 \left(\sum w_i + 2\hat{K}_m \sum \frac{w_i}{S_i} + \hat{K}_m^2 \sum \frac{w_i}{S_i^2} \right)}{\sum \frac{w_i}{S_i^2} \sum w_i - \left(\sum \frac{w_i}{S_i} \right)^2}$$

Wahl des Verfahrens, additiver oder multiplikativer Fehler

K_m und V_{max} -Werte wurden zunächst unter der Annahme eines multiplikativen Fehlers berechnet. Anschließend wurde überprüft, ob diese Annahme richtig war oder nicht, und gegebenenfalls das Verfahren für einen additiven Fehler verwendet.

In Abbildung 2-3 und Abbildung 2-4 sind die Ergebnisse für die rekombinante DOXP-Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt. In den Abbildungen wurde als Bezeichnung für \hat{v}_i v_i kalk. gewählt. Demnach ergab sich als Tendenz ein multiplikativer Fehler bei Bestimmung des K_{mNADPH} und ein additiver bei K_{mDOXP} .

Hierzu wurde die Differenz $v_i - \hat{v}_i$ und $v_i / \hat{v}_i - 1$ gegen \hat{v}_i graphisch aufgetragen. Bei einem multiplikativen Fehler erhöht sich der absolute Fehler (Abbildung 2-3 A) bei Erhöhung der Geschwindigkeit, während der relative Fehler sich nicht verändert (Abbildung 2-3 B). Bei einem additiven Fehler verhält es sich umgekehrt. Bei Erhöhung der Geschwindigkeit ändert sich der absolute Fehler nicht (Abbildung 2-4 A), während der relative Fehler abnimmt (Abbildung 2-4 B).

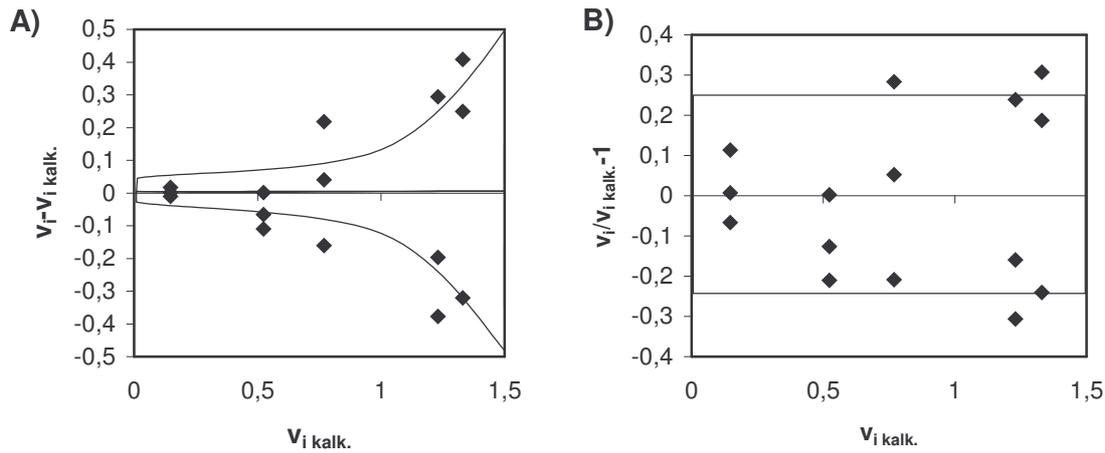


Abbildung 2-3: Fehleranalyse nach Bestimmung des K_{mNADPH} -Wertes der DOXP-Reduktoisomerase. Mit Zunahme der Geschwindigkeit nahm auch der Messfehler zu (A). Der relative Messfehler blieb jedoch konstant (B). Insgesamt ergab sich daraus ein multiplikativer Messfehler. Die Einheit von v_i und $v_i \text{ kalk.}$ ist $\mu\text{mol (mg Protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die Linien dienen nur der Veranschaulichung des Trends. Die DOXP-Konzentration betrug 1,1 mM.

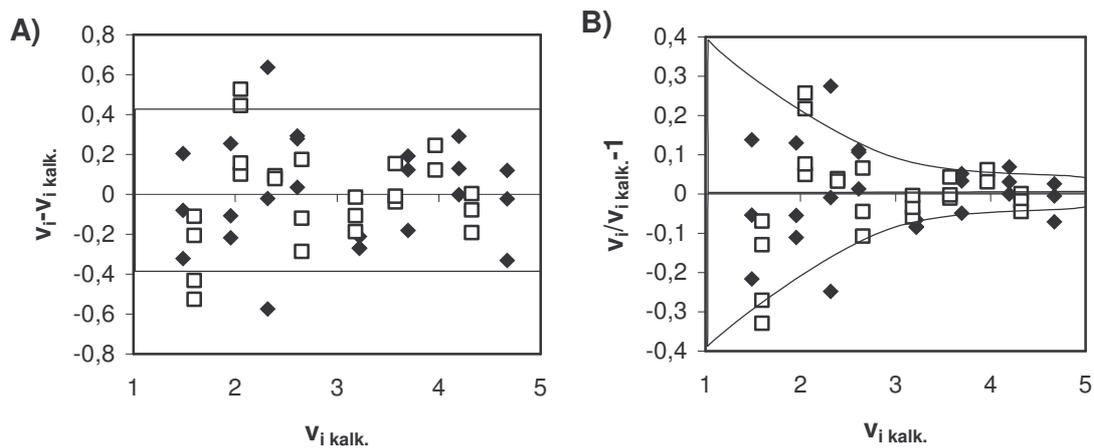


Abbildung 2-4: Fehleranalyse nach der Bestimmung des K_{mDOXP} -Wertes der Reduktoisomerase (\square 0,41 mM NADPH, \blacklozenge 0,82 mM NADPH). Mit Zunahme der Geschwindigkeit blieb der Messfehler nahezu konstant (A), während der relative Messfehler abnahm (B). Daraus ließ sich auf einen additiven Messfehler schließen. Die Einheit von v_i und $v_i \text{ kalk.}$ ist $\mu\text{mol (mg Protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die Linien dienen nur der Veranschaulichung des Trends.

2.3.7 Hydratation von IPP und DMAPP

Experimente zur Hydratation wurden mit Proteinrohextrakten (siehe 2.3.1) aus etiolierten Primärblättern 6 Tage alter Gerste durchgeführt. Als Puffer wurde neben 0,1 M BisTris mit 5 mM NaF auch 0,1 M Kalium-Phosphat Puffer pH 8 unter sonst gleichen Bedingungen verwendet. Die Tests wurden unter Stickstoff oder Argon durchgeführt mit 0,5 mM DMAPP oder 0,1 mM IPP. Als Kontrolle wurde sowohl denaturierter Proteinextrakt verwendet als auch Experimente ohne Stickstoff, um Oxidationsprodukte von Hydratationsprodukten eventuell unterscheiden zu können. Um eine Isomerisierung von IPP und DMAPP zu verhindern, wurde 0,1 mM DMAEPP, ein Inhibitor der IPP-Isomerase, zugesetzt. In analoger Weise wurde 1 mM NADP^+ zugesetzt, um eine mögliche Reversibilität

des letzten Schrittes des DOXP/MEP-Weges, die Reduktion von 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyl-diphosphat zu IPP und DMAPP, zu überprüfen.

Nach 1 bis 2 Stunden wurde alkalische Phosphatase und CaCl_2 (Endkonzentration 0,1 M) zur Fällung von F^- hinzugegeben und mit Diethylether dreimal extrahiert. Nach Einengen durch einen Stickstoffstrom erfolgte eine Auftrennung über eine Kieselgel-DC mit Ethylacetat/Aceton/ H_2O (50/50/2) als Laufmittel und der Nachweis mit 0,5 ml Anisaldehyd, 2 ml konz. Schwefelsäure und 100 ml Essigsäure mit anschließender Erhitzung auf 110°C bis zum Sichtbarwerden. Zusätzlich wurden Methylbutandiol ($R_f = 0,8$) und 2-C-Methylbutan-1,2,4-triol ($R_f = 0,4$) auf die DC als Referenzpunkte aufgetragen.

2.3.8 Experimente zur Änderung der DXS- und DXR-Aktivität aus Gerstenetiochloroplasten bei der Ergrünung

Die Ergrünung von etiolierter Gerste wurde als Modellsystem zur Untersuchung der Regulation von DXS und DXR durch Licht verwendet. Da das Optimum der DXS-Aktivität in Etioplasten nach 6 Tagen erreicht war, wurde für weitere Experimente 6 Tage alte etiolierte Gerste verwendet. Diese wurden unter ein Lichtfeld mit einer 16 h Lichtperiode gestellt (siehe 2.2.1) und zu verschiedenen Zeitpunkten Etiochloroplasten isoliert (siehe 2.2.2). DXS-Aktivitäten wurden mit radioaktiven Standardtests mit 10 mM DHAP, 0,825 Units TIM pro μl Assay und mit Pyruvat-Konzentrationen von 0,1 und 0,55 mM bestimmt. Zur Bestimmung der DXR-Aktivität wurden radioaktive Standardtests mit GPDH, Glukose-6-phosphat, 0,82 mM NADPH und 0,05 mM DOXP verwendet. Als Bezugsgröße der Enzymaktivität diente der Carotinoidgehalt und nicht die Proteinmenge, da eine Aktivitätsabnahme bezüglich der Proteinmenge auch bei einer positiven Regulation denkbar ist (siehe Diskussion 4.2). Die Abnahme der DXS-Aktivität in Bezug auf den Proteingehalt innerhalb von 24 h wurde bestimmt.

Für die DXS ergab sich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit sich innerhalb der ersten 15 min nicht änderte, für die DXR innerhalb von 10 min (DXR). Zur Aktivitätsbestimmung wurde daher der Umsatz nach 7,5 min (DXS) bzw. 5 min (DXR) durch Entnahme einer Probe und Stoppen mit Aceton bestimmt (siehe 2.3.3).

Zum Nachweis der DOXP-Bildung mittels GC/MS wurde 10 mM Pyruvat eingesetzt und ein Kontrollansatz ohne DHAP. Die Aufbearbeitung erfolgte wie in 2.3.4 beschrieben.

Parallel zu den Aktivitätsmessungen sollte mit Antikörpern gegen die DXS die Menge an DXS in Etiochloroplasten aus etiolierten Primärblättern von Gerste in Abhängigkeit der Belichtungsdauer untersucht werden. Hierzu wurden Etiochloroplasten isoliert, und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Diese Gele wurden für einen Westernblot verwendet. Parallel dazu wurden in Gelen mit einer kolloidalen Coomassie Färbung die Proteinbanden sichtbar gemacht. Es stellte sich jedoch dabei heraus, dass die verwendeten Antikörper ungeeignet für den spezifischen Nachweis der DXS waren. Weiterhin hatte sich gezeigt, dass die Antikörper nur schwach an das rekombinante Enzym aus *Chlamydomonas reinhardtii* binden, da der Antikörpernachweis in etwa genauso empfindlich wie eine parallel durchgeführte kolloidale Coomassie Färbung war.

Es wurde die Carotinoid- und Chlorophyllakkumulation in etiolierter Gerste nach Belichtung unter den Versuchsbedingungen über mehrere Tage ermittelt. Hierzu wurden Acetonextrakte von Primärblättern angefertigt und der Chlorophyll- und Carotinoidgehalt nach Lichtenthaler (1987) bestimmt. Das Trockengewicht veränderte sich nicht im Beobachtungszeitraum. Der Wassergehalt betrug 91,5%.

2.3.9 Hemmexperimente mit der DXS und DXR

Es wurden mehrere Substanzen hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die DXS und DXR untersucht. Die verwendeten Chemikalien (Herbizide, potentielle Hemmstoffe) sind im Ergebnisteil (3.3.1) näher erläutert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Hemmtests mit den zuvor beschriebenen Standardzytmtests durchgeführt. Getestet wurde die partiell aufgereinigte DXR aus Proteinrohextrakten von Primärblättern aus etiolierter Gerste und die rekombinante DXR aus *Arabidopsis thaliana*. Als DXS wurde das rekombinante Enzym aus *Chlamydomonas reinhardtii* und aus *E. coli*, sowie die aus Gerstenetioplasten isolierte Enzymfraktion verwendet.

Bei der DXR aus Gerste und *Arabidopsis thaliana* wurde der IC_{50} -Wert von Fosmidomycin, der derjenigen Inhibitor-Konzentration entspricht, bei der eine 50%-ige Hemmung des Umsatzes auftritt, bestimmt. Zur Ermittlung wurde bei Gerste ein radioaktiver Standardtest mit 0,5 mM DOXP und bei *Arabidopsis thaliana* ein optischer Standardtest mit 0,25 mM DOXP verwendet. Es wurde $\ln(P/(1-P))$ mit $P = v_{\text{gehemmt}}/v_{\text{nicht gehemmt}}$ gegen $\log([Fosmidomycin])$ aufgetragen (sogenannte logit-Transformation). Der Schnittpunkt mit der x-Achse ergibt den Logarithmus des IC_{50} -Wertes.

2.4 Experimente mit Algen

Es wurden verschiedene Hemmexperimente mit *Cyanidium caldarium* CDP (Rhodophyta), eine Mutante, die heterotroph im Dunkeln photosynthetische Pigmente bildet und von Herrn Prof. Dr. S. Beale (Brown University, Providence, RI, USA) stammte, *Euglena gracilis* (Euglenophyta, Algensammlung Göttingen) und *Ochromonas danica* (Heterokontophyta, Algensammlung Göttingen) durchgeführt. Die Anzucht der Stammkulturen erfolgte in Erlenmeyerkolben, die Hemmexperimente in Reagenzgläsern unter einem Lichtfeld (Osram L40, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$) mit einer Lichtperiode von 16 h bei 25 °C.

In allen Medien waren folgende Mikroelemente pro Liter vorhanden: $\text{FeSO}_4/\text{Titriplex III}$ (7 mg und 9,3 mg), H_3BO_3 (0,5 mg), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mg), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 mg). Außerdem wurde 10 mg Vitamin B_1 , 5 μg Vitamin B_{12} und 0,1 mg Biotin pro Liter hinzugefügt. Stammlösungen der Mikroelemente und Vitamine wurden zuvor steril filtriert und dem autoklavierten (20 min 120 °C) Restmedium zugesetzt.

Cyanidium caldarium: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,982 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,625 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (14,7 mg/l), KH_2PO_4 (0,68 g/l), pH 4,5.

Euglena gracilis und *Ochromonas danica*: NH_4Cl (0,5 g/l), KH_2PO_4 (0,3 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4 g/l), CaCO_3 (60 mg), $\text{NaCitrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,8 g/l), pH 6. Diesem Basismedium mit Vitaminzusatz wurde entweder 0,1% Bactopecton und 0,05% Hefeextrakt in Anlehnung an das von der Göttinger Algensammlung empfohlene Medium für *Ochromonas danica* oder 0,1% Glucose zugesetzt.

Das Wachstum der Algen wurde durch Messen der Extinktion bei 560 nm verfolgt.

Die Algenstammkulturen wurden auf Pilzwachstum und Bakterienwachstum überprüft durch Ausplattieren einer Probe auf LB-Medium-, Malzextrakt- (3% Malzextrakt, 0,5% Pepton, pH 5) und Hefemedium- (2% Bactopecton, 1% Hefeextrakt, 2% Glukose, pH 6,5) Platten.

Cyanidium caldarium

Es wurde die Wirkung von Cerivastatin, einem Hemmstoff der HMG-CoA-Reduktase, und Fosmidomycin, einem Hemmstoff der DOXP-Reduktoisomerase, auf das Wachstum unter photoautotrophen Bedingungen getestet. Weiterhin wurde untersucht, ob Methylene-

rythritol (ME) und Isopentenol die gefundene Hemmwirkung aufheben konnte. Pro Experiment wurden jeweils 3 Algenkulturen verwendet.

Weiterhin wurde überprüft, welchen Einfluss Fosmidomycin auf den Einbau von 0,01% [2-¹³C]MVA und 0,01% Me-[1-²H₁]DOX im Medium in Phytol (Seitenkette der Chlorophylle) hat, um einen möglichen Import von Intermediaten der cytosolischen Isoprenoidbiosynthese in den Plastiden zu überprüfen. Zur Bestimmung des Markierungsgrads wurde das Verfahren, beschrieben in Müller (1997) und Schwender (1999), verwendet.

Euglena gracilis und Ochromonas danica

Es wurden bei *Euglena gracilis* Fosmidomycin und Cerivastatin getestet. Da beide keine Hemmwirkung zeigten, wurde auf weitere Versuche verzichtet. Dass Fosmidomycin keine Wirkung besitzt, war zu erwarten, da der DOXP/MEP-Weg bei *Euglena* nicht vorkommt. Die Nicht-Wirkung von Cerivastatin mag durch Aufnahmeschwierigkeiten dieses Hemmstoffs in *Euglena* zusammenhängen. Bei *Ochromonas danica* wurde zusätzlich die Wirkung von Clomazone und 5-Ketoclomazone untersucht. Es wurde überprüft, ob Methylerythritol oder ein Gemisch aus Isopentenol und Dimethylallylalkohol die Hemmwirkung von Fosmidomycin aufheben könnte. Neben der Wachstumshemmung wurde auch die Hemmung der Pigmentakkumulation protokolliert. Die Algen wurden am Ende des Experiments abzentrifugiert bei 2500 x g, in Aceton aufgenommen und der Pigmentgehalt nach Lichtenthaler (1987) bestimmt. Der Pigmentgehalt wurde auf die Zelldichte bezogen durch Division mit dem Extinktionswert der Algenkultur bei 560 nm und hieraus die Hemmung berechnet. Es wurden die Anfangswerte der Pigmentgehalte zu Beginn des Experiments abgezogen, sofern diese mehr als 10% des Endwertes betragen.

Pro Experiment wurden jeweils 3 Algenkulturen verwendet.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit war nur das erste Enzym des DOXP/MEP-Weges, die DOXP-Synthase, aus *E. coli* kloniert worden. Als nachfolgender Schritt war die Bildung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat postuliert worden, während darüber hinaus keine weiteren Intermediate dieses plastidären Biosyntheseweges bekannt waren. Mit diesen Voraussetzungen wurden Enzymtests entwickelt und Enzyme des DOXP/MEP-Weges in Pflanzen nachgewiesen. Ein weiterer bisher nicht untersuchter Aspekt war die Regulation des DOXP/MEP-Weges, insbesondere die Änderung von Enzymaktivitäten in der Pflanze auf äußere und innere Faktoren. Untersucht wurden K_m -Werte, pH-Abhängigkeit und die Mg^{2+} -Konzentrationsabhängigkeit der DOXP-Reduktoisomerase. Speziell der pH-Wert und die Mg^{2+} -Konzentration, die sich in Abhängigkeit der Photosyntheseaktivität ändern, regulieren die Aktivität vieler plastidärer Enzyme. Um Einblick in die Langzeit- bzw. Lichtregulation zu erhalten, wurde die Änderung der Aktivität der DOXP-Synthase und der DOXP-Reduktoisomerase während der durch Belichtung ausgelösten Ergrünung von etiolierter Gerste untersucht.

Da der DOXP/MEP-Weg der plastidären Isoprenoidbiosynthese ein neues, ideales Ziel zur Entwicklung von Herbiziden ist, wurden Herbizide mit bis dahin unbekanntem Wirkungsmechanismus wie Clomazone und einige seiner Derivate sowie Fosmidomycin näher untersucht. Weitere potentielle Inhibitoren, die getestet wurden, waren Phosphonate mit ähnlichen Strukturmerkmalen wie Fosmidomycin, AMPI, ein Hemmstoff der Pyruvat-Dehydrogenase, und zwei effektive Inhibitoren, L-Cycloserin und Aminoxyacetat, der pflanzlichen Isoprenemission. Untersuchungen wurden mit Algen als Testsysteme sowie den ersten beiden Enzymen des DOXP/MEP-Weges, der DOXP-Synthase und der DOXP-Reduktoisomerase, durchgeführt.

3.1 Nachweis und Eigenschaften von Enzymen des DOXP/MEP-Weges

3.1.1 Nachweis der DOXP-Synthase Aktivität

Die DOXP-Synthase (DXS) katalysiert den ersten Schritt im DOXP/MEP-Weg der plastidären IPP-Biosynthese. Zunächst wurde ein geeigneter radioaktiver Enzymassay entwickelt, der zur Synthese von DOXP als Substrat der DOXP-Reduktoisomerase verwendet wurde (Abschnitt 3.1.3), sowie zum Nachweis des Enzyms in Pflanzen (siehe unten) und für Untersuchungen zur Lichtregulation der DXS in Gerste (Abschnitt 3.2.1) und bei Hemmstoffstudien einsetzbar war (Abschnitt 3.3).

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die rekombinante DXS von *E. coli* verwendet, die mir von Prof. Albert Boronat, Barcelona, zur Verfügung gestellt wurde. Das Enzym aus *E. coli* wurde nicht weiter aufgereinigt, sondern Proteinrohextrakte eingesetzt. Später wurde zusätzlich die rekombinante DXS von *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht, welche von Herrn Dr. Schwender am Lehrstuhl Botanik II, Karlsruhe, kloniert worden war (Schwender *et al.*, 1999). Das rekombinante Enzym verfügt über ein His₆-Tag, das die effektive Aufreinigung über eine Zn^{2+} -Affinitätssäule ermöglichte. Nach der Aufreinigung war eine einzelne Hauptbande bei 66 kDa zu erkennen (Abbildung 3-1).

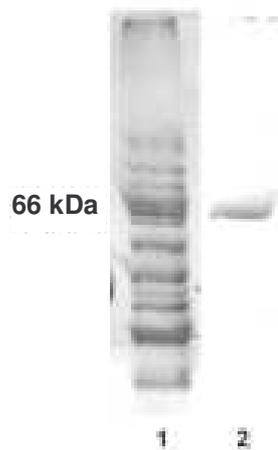


Abbildung 3-1: SDS-PAGE mit Proteinrohextrakt aus *E. coli* mit überexprimierter rekombinanter DOXP-Synthase, aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Spur 1), nach deren Aufreinigung über eine Zn^{2+} Affinitätssäule (Spur 2). Als Referenz wurde BSA (66 kDa) aufgetragen, welches auf gleicher Höhe zu sehen war. Nur beim Auftrag von größeren Mengen waren neben dem rekombinanten Protein Banden mit einem kleineren Molekulargewicht zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um proteolytische Fragmente handelte. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Mittels GC/MS konnte die Umsetzung von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) durch die DXS erfolgreich gezeigt werden (siehe Abbildung 3-2). Zum Nachweis wurde ein Enzymansatz mit alkalischer Phosphatase versetzt, die so erhaltene 1-Deoxy-D-xylulose (DOX) über DC aufgetrennt, acetyliert und mittels GC/MS als DOX-3,4,5-triacetat nachgewiesen. Die Acetylierung führt zu einer geringeren Polarität und besserem Trennverhalten bei der GC. Als Referenz diente acetylierte, synthetische 1-Deoxy-D-xylulose, die von Herrn H. U. May aus der Arbeitsgruppe von Prof. F. W. Lichtenthaler, Universität Darmstadt, synthetisiert wurde.

Das natürliche Substrat ist D-GAP, da dieses aber nicht käuflich zu erwerben ist, wurde einerseits ein Racemat von D/L-GAP verwendet und andererseits im Enzymassay Dihydroxy-acetonphosphat (DHAP) und Triosephosphat-Isomerase (TIM) eingesetzt nach Hahn *et al.* (2001). Bei letzterem wird ausschließlich D-GAP aus DHAP gebildet, wobei jedoch das Gleichgewicht auf Seiten von DHAP liegt ($[GAP]/[DHAP] = 4,73 \cdot 10^{-2}$, Voet und Voet, 1994). Standardassays enthielten 20 mM DHAP und 0,5 mM Pyruvat inklusive $[2-^{14}C]$ Pyruvat. Die Auftrennung von Pyruvat und DOXP erfolgte über eine DC (Propanol/Essigsäure/ H_2O 6:2:2, R_f -Werte: DOXP 0,38, Pyruvat 0,62). Neben Pyruvat und DOXP war noch ein weiterer Fleck mit einem R_f -Wert von 0,48, bei dem es sich um ein Abbauprodukt von Pyruvat handelte, das schon im eingesetzten Pyruvat vorhanden war. Die spezifische Aktivität bei Standardassays betrug für das aufgereinigte rekombinante Enzym aus *Chlamydomonas reinhardtii* durchschnittlich $1,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Da hier die DHAP-Konzentration um ein Vielfaches höher lag als die Pyruvat-Konzentration, war die D-GAP-Konzentration nahezu konstant über den gesamten Reaktionsverlauf.

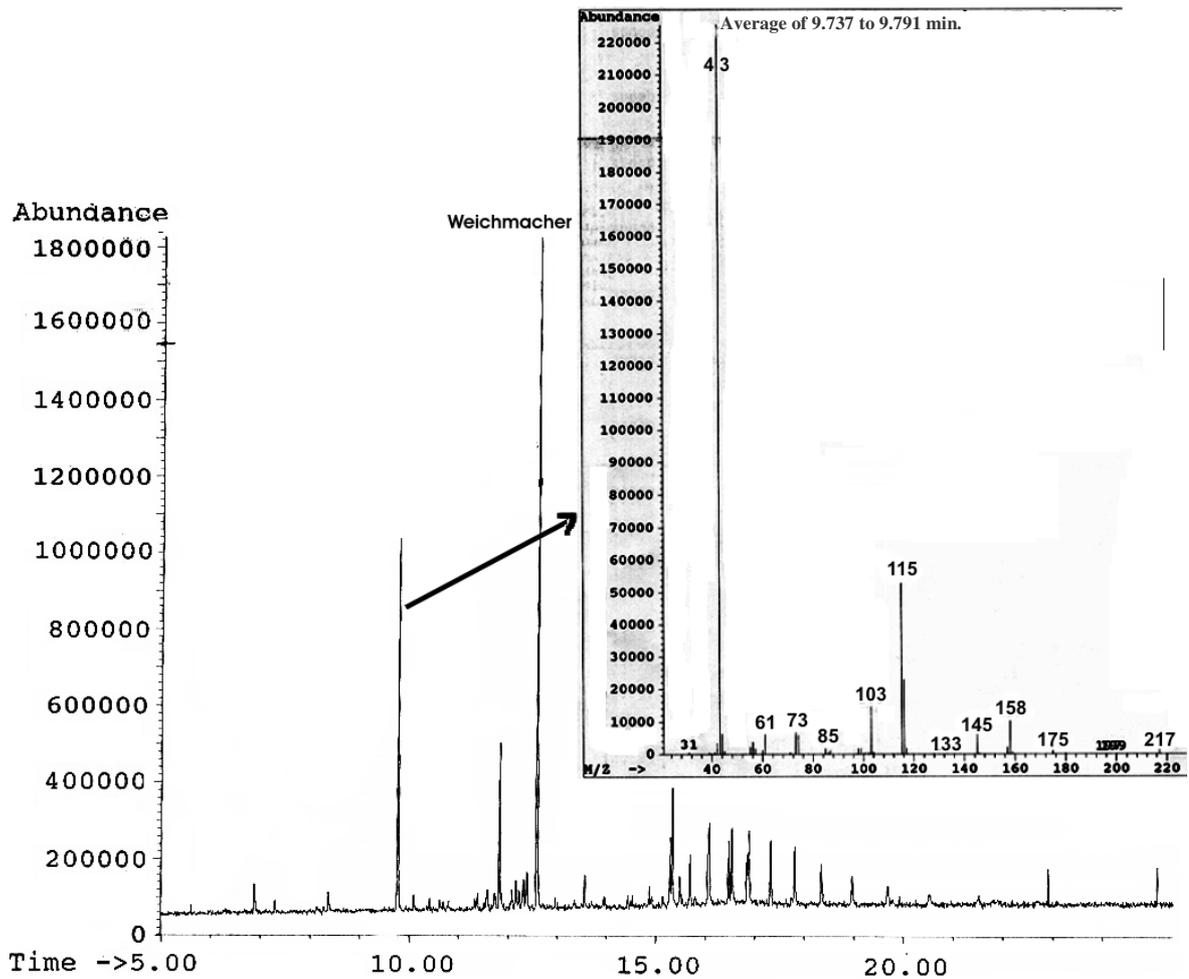


Abbildung 3-2: Nachweis des Produktes der DOXP-Synthase als 1-Deoxy-D-xylulose-2,3,4-triacetat mittels GC/MS. Aus einem Enzymansatz mit DXS wurde DOXP zu DOX dephosphoryliert mit alk. Phosphatase, über Dünnschichtchromatographie aufgereinigt und acetyliert. Als Referenz diente acetylierte, authentische DOX, synthetisiert von Herrn H. U. May, Universität Darmstadt.

DOXP-Synthase-Aktivität konnte auch in mehreren Pflanzen nachgewiesen werden. So fand sich Aktivität in Chloroplasten von Spinat, Erbse und Gerste und in Etiochloroplasten von Gerste. Der Nachweis von DOXP erfolgte zunächst mittels DC. Wurden Etiochloroplasten von Gerste mit $[2-^{14}\text{C}]$ Pyruvat und D/L-GAP bzw. DHAP und Triosephosphat-Isomerase inkubiert, und der Ansatz mit alkalischer Phosphatase verdaut, so verschwand der DOXP-Fleck komplett bei der anschließenden DC. Das entstandene DOX ließ sich mit einem anderen Trennsystem nachweisen, wobei die Menge derjenigen von DOXP aus dem ersten Trennsystem entsprach, d.h., bei dem DOXP-Fleck handelte es sich um eine phosphorylierte Verbindung, die durch Dephosphorylierung komplett in eine dem Laufverhalten von DOX entsprechende Verbindung umgewandelt wurde. In den nicht dephosphorylierten Ansätzen war auf Höhe von DOX bei dem DOX-Trennsystem kein Fleck zu erkennen.

Die Pyruvat-Dehydrogenase katalysiert die Bildung von DOX aus Pyruvat und Glycerinaldehyd (Yokota und Sasajima, 1986), wahrscheinlich aber nicht die Bildung von DOXP aus GAP und Pyruvat (Yokota und Sasajima, 1984; Diskussion 4.2). Jedoch konnte

mittels DC unter den Versuchsbedingungen Pyruvatdehydrogenase-Aktivität nach Zugabe von CoA und NAD⁺ nicht detektiert werden. Acetyl-CoA hat einen R_f-Wert von 0,26 bei der Cellulose-DC (Propanol/Essigsäure/Wasser 60/20/20).

Mittels GC/MS, analog zum DXS-Nachweis (siehe oben) konnte die DOXP-Bildung aus Pyruvat und GAP in Etioplasten nachgewiesen werden, wobei in einer Kontrolle ohne Pyruvat und GAP kein DOXP gefunden wurde. Die Bildung von DOXP durch ein anderes Enzym wurde ausgeschlossen, da dies unwahrscheinlich ist und 5-Ketoclofazone, ein Inhibitor der DXS (3.3.1), die DOXP-Bildung in Etioplasten hemmte. Eine nähere Erläuterung ist in der Diskussion (4.2) gegeben.

3.1.2 Nachweis der DOXP-Synthase mit Antikörpern

Neben dem enzymatischen Nachweis der DOXP-Synthase in Etiochloroplasten wurde versucht das Enzym mit Antikörpern nachzuweisen, um damit den Einfluss exogener Faktoren auf die Expression untersuchen zu können (siehe Abschnitt 3.2, S. 53). Hierzu wurden Antiseren gegen das rekombinante Enzym von *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet, welches 72% identische Aminosäuren zu der DXS aus Reis (*Oryza sativa*) aufweist (Schwender, 1999). Zwei Kaninchen wurden mit durch Zn²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigtem Enzym von der Firma Biotrend, Köln, immunisiert.

Während mit den Präimmunseren nur sehr schwache Banden im Western-Blot des aufgereinigten Enzyms zu sehen waren, waren mit den Antiseren neben der eigentlichen DXS Bande weitere kleinere, schwächere Proteinbanden zu erkennen (Abbildung 3-3, Exp. 1 und 2). Hierbei handelte es sich vermutlich um proteolytische Fragmente der rekombinanten DXS. Um zu überprüfen, ob der Antikörper evt. hauptsächlich das His₆-Tag des rekombinanten Enzyms erkennt, wurde dieses mit Thrombin entfernt. Da keine signifikanten Unterschiede in der Detektion zu erkennen waren, wurde daraufhin auf eine Entfernung des His₆-Tag mit Thrombin verzichtet. Der Vergleich zwischen Nachweis des Enzyms mit einer kolloidalen Coomassie Färbung bei der SDS-PAGE und mit einem Western-Blot mit Antiserum ergab, dass der Antikörpernachweis in etwa genauso empfindlich war. Im allgemeinen sollte jedoch ein Nachweis mit Antikörpern wesentlich empfindlicher sein. Offenbar war im vorliegenden Fall die Bindung zwischen Antikörper und Antigen ungewöhnlich schwach und könnte die Schwierigkeiten beim Nachweis der DXS in Etiochloroplasten erklären.

Bei Etiochloroplasten aus Gerste und bei Chloroplasten aus Spinat ergaben sich im Westernblot ein starker Hintergrund und mehrere Proteinbanden sowohl mit Präimmunserum als auch mit Antiserum (Abbildung 3-3, Exp. 2 und 3). Auf Höhe der DXS waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Prä- und Antiserum sichtbar. Durch mehrmalige Verwendung der Seren konnte zwar der Hintergrund stark reduziert werden, jedoch ohne dass eine Proteinbande im Bereich der DXS eindeutig zu detektieren gewesen wäre. Auch eine Differenzierung zwischen Stromaproteinen und Thylakoidproteinen brachte nichts. Eine Proteinbande, die nur beim Antiserum auftrat, wurde als mögliche DXS ausgeschlossen a) wegen des zu hohen Molekulargewichtes von 90 kDa, während alle bisher bekannten DOXP-Synthasen aus Bakterien und Pflanzen ein Molekulargewicht um die 70 kDa (ohne Transitpeptid bei Pflanzen) haben, und b) da sie mit dem aufgereinigten Antikörper nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-3, Exp. 4).

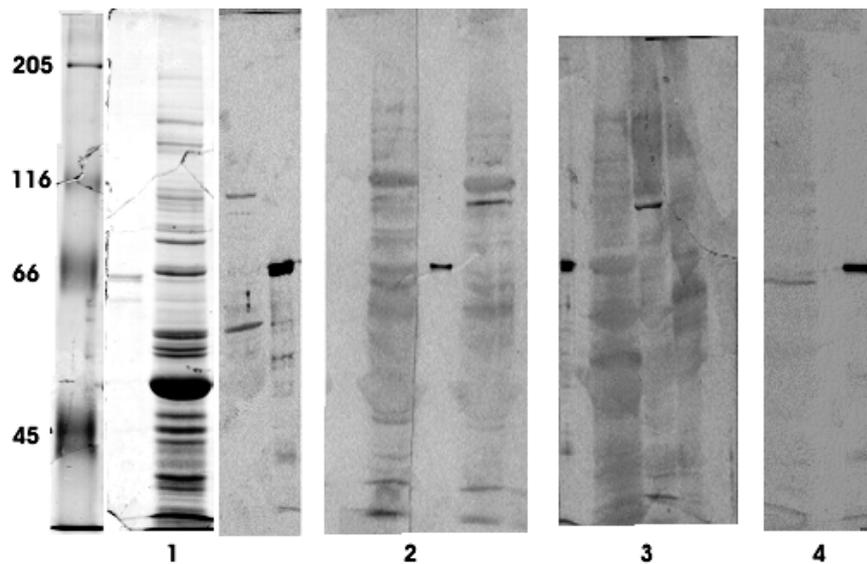


Abbildung 3-3: SDS-PAGE und Western-Blot von Etioplasten aus Gerste. 1 SDS-Page mit zugehörigem Western-Blot (WB). Von links nach rechts: Markerproteine, DXS, Etioplasten (SDS, WB), DXS (WB); 2 Vergleich zwischen Präimmunsereum (links DXS und Etioplasten) und Antiserum (rechts DXS und Etioplasten); 3 WB mit Antiserum: DXS, Spinatchloroplasten, Stroma- und Membranproteine; 4 aufgereinigter Antikörper Etioplasten und DXS. Die Gele wurden mit Coomassie (kolloidal) gefärbt.

Sowohl das Antiserum als auch Präimmunsereum reagierte mit Proteinen, so dass die DXS nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Eine Proteinbande bei 90 kDa war nur bei dem Antiserum zu erkennen. Diese verschwand jedoch nach Aufreinigung des Antikörpers, stattdessen trat eine Proteinbande bei 60 kDa auf. Das Molekulargewicht aller bekannten DXS liegt im Bereich von 70 kDa. Es konnte jedoch keine Bande bei 70 kDa detektiert werden.

Nach der Aufreinigung des Antikörpers mittels einer Säule, an die das rekombinante Enzym gekoppelt worden war, ergab sich eine einzelne Proteinbande von 60 kDa. Ein proteolytischer Abbau des DXS-Proteins wurde ausgeschlossen. Weder konnte ein proteolytischer Abbau von rekombinanter DXS durch Inkubation mit Etioplasten nachgewiesen werden, noch zeigten sich Unterschiede wenn die Etioplastenproteine sofort nach der Isolation denaturiert wurden. Die 60 kDa-Bande war auch als einzige Bande in Proteinrohextrakten von *Chlamydomonas reinhardtii* zu erkennen. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um die DOXP-Synthase handelte, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Durch Inkubation von Etioplasten bzw. von rekombinantem Enzym mit Antikörper sollte der Antigen-Antikörperkomplex mit Protein A-Sepharose präzipitiert werden, so dass im anschließenden Enzymassay die Enzymaktivität deutlich verringert sein sollte. Im Falle des rekombinanten Enzyms betrug die Aktivität nach der Präzipitation nur noch ein Viertel, während die DXS-Aktivität in der Stromafraktion von Etioplasten unvermindert war (3% Umsatz in 30 min, Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Immunpräzipitation der DOXP-Synthase aus Gerste. Mittels einer Immunpräzipitation sollte untersucht werden, ob die verwendeten Antikörper das Enzym aus Gerste detektieren. Während durch Bindung des Antikörper-DXS_{rek.}-Komplexes an Protein A die Umsatzrate im Überstand drastisch verringert wurde, war dem bei der Stromafraktion nicht so. Die Pyruvatkonzentration betrug 100 μ M.

	Antikörper	Protein A Sepharose	%Umsatz (min)
rekombinantes Enzym	-	+	23,6 (5) 59,6 (15)
rekombinantes Enzym	+	+	5,6 (5) 8,1 (15)
Stromafraktion und rekombinantes Enzym	-	+	24,3 (5) 52,5 (15)
Stromafraktion und rekombinantes Enzym	+	+	7,4 (5) 18,9 (15)
Stromafraktion	-	+	3 (30)
Stromafraktion	+	+	3 (30)

Der geringe Umsatz erklärt sich dadurch, dass durch den zusätzlichen Schritt des Abzentrifugierens der Membranen DXS verloren ging. Frisch isolierte Etioplasten des gleichen Experiments führten zu 15% Umsatz in 15 min. Die Kombination von rekombinantem Enzym mit Stromaproteinen ergab eine etwas kleinere Verringerung der Aktivität. Möglicherweise bindet ein Teil der Antikörper auch an andere Proteine, so dass weniger rekombinantes Enzym komplexiert wird.

Die Ergebnisse bei Gerste deuten daraufhin, dass der Antikörper, wenn überhaupt, nur sehr schwach an die DOXP-Synthase aus Gerste bindet. Daher ist es zweifelhaft, ob es sich bei der detektierten 60 kDa Bande tatsächlich um die DOXP-Synthase handelt, obwohl das Auftreten der 60 kDa Bande im Westernblot von *Chlamydomonas* dafür spricht. Wie schon erwähnt, bindet der Antikörper nur schwach an die rekombinante DXS, so dass nicht auszuschließen ist, dass die DXS nur in geringer Konzentration in *Chlamydomonas* vorhanden ist, und deshalb kein Signal im Western-Blot zu erkennen war.

Die verwendeten Antiseren haben sich als ungeeignet erwiesen, um die Expression der DXS in Pflanzen und deren Regulation zu untersuchen. Es konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Antiseren die DXS detektieren. Vielmehr war auch die Bindung an das aufgereinigte, rekombinante Enzym von *Chlamydomonas reinhardtii* schwach, und die Empfindlichkeit des Nachweis lag nur im Bereich einer kolloidalen Coomassie-Färbung.

3.1.3 Nachweis und Eigenschaften der DOXP-Reduktoisomerase

Zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit war nur der erste Schritt des DOXP/MEP-Weges bekannt, und es sollte zunächst in Pflanzenproteinextrakten die Umlagerung und NADPH-abhängige Reduktion von DOXP zu MEP durch die DOXP-Reduktoisomerase (DXR) nachgewiesen werden. Getestet wurden Proteinrohextrakte von etiolierten Primärblättern von Gerste, da diese zwar im Dunkeln schon einige Carotinoide bilden, bei der Ergrünung jedoch eine hohe lichtinduzierte Pigmentbiosynthese (Chlorophylle, Carotinoide) aufweisen und mit einer hohen Aktivität von Enzymen des DOXP/MEP-Weges zu rechnen war. Auch Rohextrakte von Blättern von Kichererbse wurden getestet, da in diesen

Methylerythronolakton nachgewiesen worden war (Ford, 1981). In Kichererbse wurde jedoch keine DXR-Aktivität gefunden.

Mit Proteinrohextrakten aus Gerstenkeimlingen wurden die pH-Abhängigkeit und Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration der DXR untersucht, um Hinweise auf die Abhängigkeit der DXR-Aktivität von der Photosyntheseaktivität zu erhalten.

Im Verlaufe der vorliegenden Doktorarbeit wurde von Herrn Dr. Jörg Schwender an Lehrstuhl Botanik II, Karlsruhe, die DXR aus *Arabidopsis thaliana* kloniert (Schwender *et al.*, 1999). Mit dieser DXR wurden die K_m -Werte für NADPH und DOXP bestimmt.

Untersuchungen mit Proteinrohextrakten von Gerste

Mittels GC/MS und Vergleich mit natürlichem Methylerythritol, isoliert aus Blättern von einem Tulpenbaum (Zeidler, 2001), konnte die Umsetzung von DOXP in MEP unter Beteiligung von NADPH in Proteinrohextrakten aus etiolierten Primärblättern von Gerste nachgewiesen werden (Abbildung 3-4). Typische Enzymaktivitäten lagen im Bereich von 0.5 nmol/mg Protein/min bei einer DOXP-Konzentration von 0,5 mM und 1 mM NADPH. Die fraktionierte Fällung mit PEG erhöhte die spezifische Aktivität um das 10-fache. Da die Rohextrakte nur eine geringe Aktivität aufwiesen und eine unspezifische NADPH Oxidation zu beobachten war, wurde kein optischer Test verwendet, sondern ein radioaktiver Test mit enzymatisch synthetisiertem $[2-^{14}C]DOXP$, NADPH und mit Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) als NADPH regenerierendes System. In einem optischen Test konnte gezeigt werden, dass die NADPH Konzentration konstant blieb bei 0,5 mM DOXP und 0,82 mM NADPH. Mit Hilfe des rekombinanten Enzyms ergab sich weiterhin, dass weder Glucose-6-P noch das Produkt Phosphogluconat der GPDH die DXR hemmen. Die Enzymaktivität war mit und ohne NADPH regenerierendem System gleich.

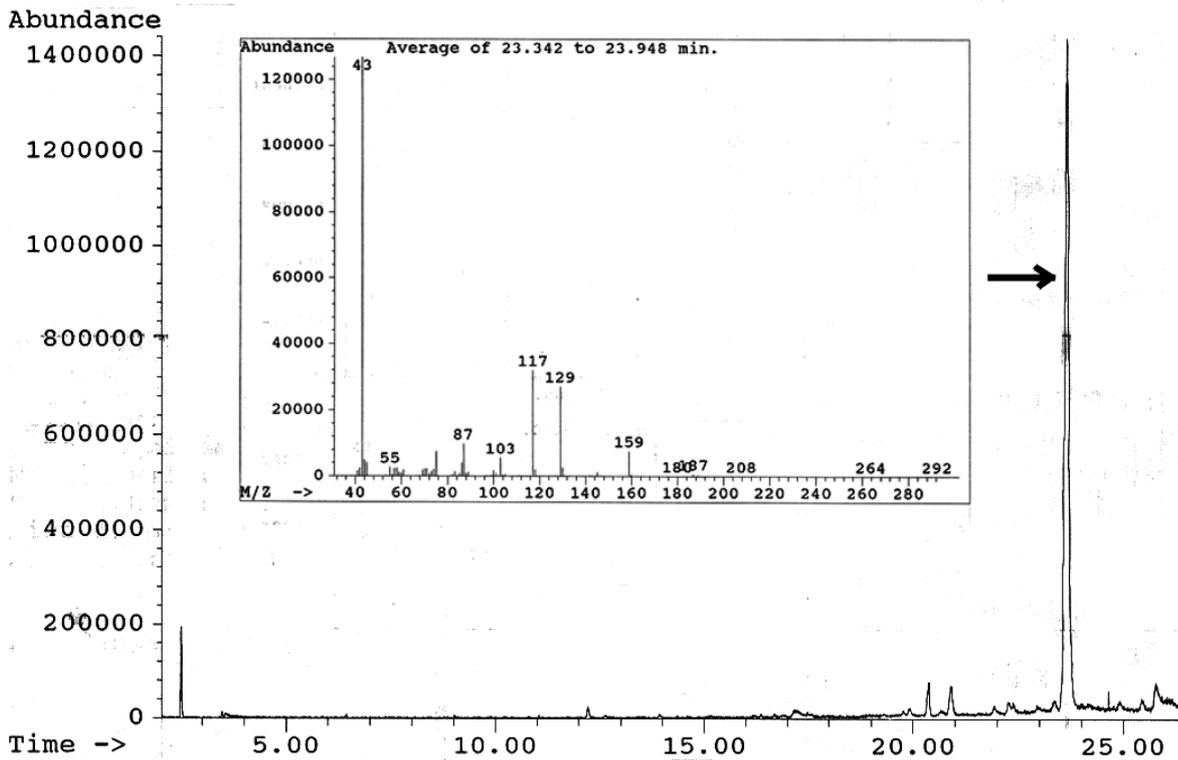


Abbildung 3-4: Nachweis des Produktes der DOXP-Reduktoisomerase aus Gerste als 1,3,4-Methylerythritoltriacetat mittels GC/MS. Mit einem Proteinrohextrakt von Gerste wurde DOXP und NADPH zu MEP umgesetzt, Produkt und Substrat dephosphoryliert und über DC aufgetrennt. Das erhaltene Produkt ME wurde anschließend ausgekratzt und acetyliert. Als Referenzsubstanz für den GC/MS-Nachweis diente Methylerythritol, isoliert aus Blättern eines Tulpenbaumes.

Es wurden zunächst unterschiedliche Puffer mit Protein stabilisierenden Zusätzen (Glycerin, Sorbitol, Albumin, Proteaseinhibitoren z.B. EDTA, PMSF oder Pefabloc) ausprobiert, jedoch war die DOXP-Reduktoisomerase nicht lagerfähig. Daher wurden für jeden Versuch frische Enzympräparationen aus Primärblättern von Gerste angefertigt.

Mg²⁺-Abhängigkeit der DXR

Je nach Photosyntheseaktivität ändert sich in Pflanzen der Mg²⁺ Gehalt im Stroma der Chloroplasten, wobei bei aktiver Photosynthese die Mg²⁺-Konzentration im Stroma ansteigt, da Mg²⁺ gegenläufig zur Protonenakkumulation im Thylakoidinneren vom Thylakoidlumen in das Stroma transportiert wird. Es ist bekannt, dass viele Stromaproteine durch die Mg²⁺-Konzentration reguliert werden (Richter, 1988). Die Mg²⁺-Konzentration beträgt im Dunkeln im Stroma 2 mM und steigt im Licht auf 4 mM an (Marschner, 1986). Insgesamt ergab sich ein leichter Anstieg der DXR-Aktivität (Abbildung 3-5), ohne dass ein Optimum zu erkennen war, und im physiologisch interessanten Bereich stieg die Aktivität um 14,6% bei Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration von 1,5 mM auf 5,5 mM.

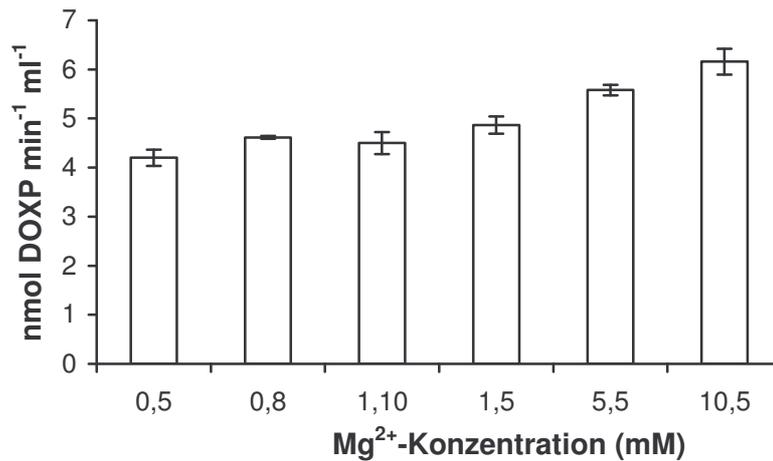


Abbildung 3-5: Abhängigkeit der DOXP-Reduktoisomerase aus Gerste von der Mg²⁺-Konzentration. Während im Dunkeln die Mg²⁺ Konzentration im Stroma der Chloroplasten bei 2 mM liegt, steigt sie im Licht auf 4 mM an (Marschner, 1986). Die Aktivität der DXR stieg um 14,5% bei Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration von 1,5 mM auf 5,5 mM. Die Mg²⁺-Konzentration hat damit nur einen geringen Einfluss auf die Enzymaktivität.

pH-Abhängigkeit der DXR

Weiterhin wurde die pH-Abhängigkeit der DXR untersucht. Das pH Optimum (Abbildung 3-6) der DOXP-Reduktoisomerase liegt bei 8,1, was einem typischen Stromaprotein der Chloroplasten entspricht. Aktivität war in einem Bereich von pH 6,7 bis 9,2 zu detektieren. Die Erhöhung der Aktivität um das 2,6-fache bei pH 8-8,1 im Vergleich zu pH 7 spricht für eine Regulation der DXR über den pH, und damit über die Photosyntheseaktivität und den bei Belichtung in Chloroplasten auftretenden pH-Gradienten zwischen Thylakoidinnern (5,8) und Stroma (8,2).

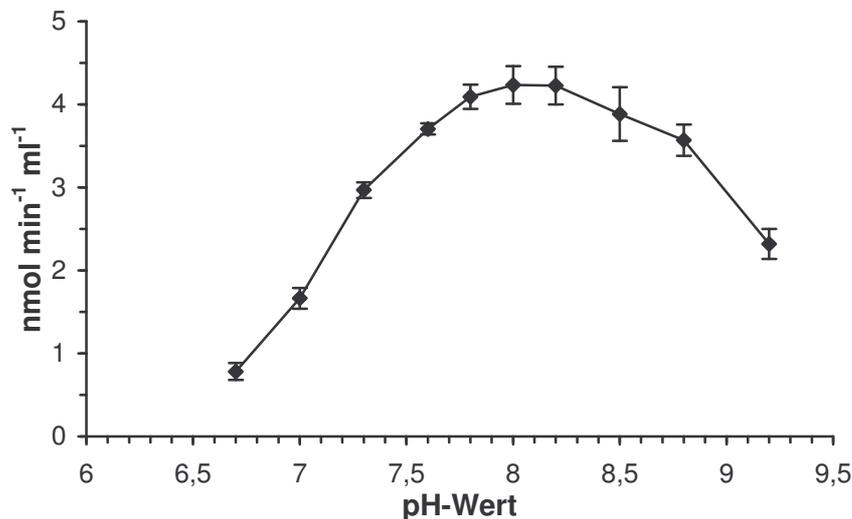


Abbildung 3-6: Abhängigkeit der DOXP-Reduktoisomerase-Aktivität aus Gerstenkeimlingen vom pH-Wert. Das pH-Optimum liegt bei 8,1 und ist typisch für Stromaproteine der Chloroplasten.

Weitere Untersuchungen wurden mit der rekombinanten DOXP-Reduktoisomerase, die von Herrn Schwender an unserem Institut aus *Arabidopsis thaliana* in einen Expressionsvektor kloniert worden war (Schwender *et al.*, 1999), durchgeführt.

Untersuchungen mit der rekombinanten DOXP-Reduktoisomerase von *Arabidopsis thaliana*

Das rekombinante Enzym besitzt ein His₆-Tag und ließ sich über eine Hitrap-Säule aufreinigen, an der Zn²⁺ gebunden war. Während zelluläre Proteine nicht an die Säule binden, komplexiert das His₆-Tag das Zn²⁺ der Affinitätssäule und kann von der Säule mit Imidazol eluiert werden. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurde die Aufreinigung der DXR überprüft (Abbildung 3-7).

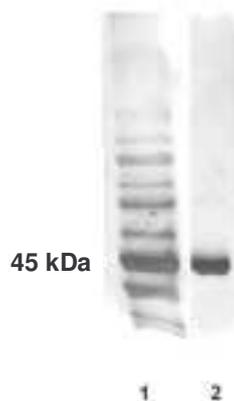


Abbildung 3-7: SDS-PAGE mit Proteinrohextrakt aus *E. coli* mit überexprimierter rekombinanter DOXP-Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana* (Spur 1), nach der Aufreinigung über eine Zn²⁺ Affinitätssäule (Spur 2). Die rekombinante DXR hat ein Molekulargewicht von 45 kDa (Schwender *et al.*, 1999) Nur beim Auftrag einer größeren Menge waren neben dem rekombinanten Protein Banden mit einem kleineren Molekulargewicht zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um proteolytische Fragmente handelte.

Neben dem radioaktiven DXR-Test wurde mit dem aufgereinigten rekombinanten Enzym ein optischer Test entwickelt. Es wurde die Oxidation von NADPH in Gegenwart von DOXP durch die Abnahme der Extinktion bei 340 nm gemessen. Standardenzymtests wurden mit 0,82 mM NADPH in einem Microplattenreader durchgeführt. Mit diesem Test konnte jedoch nicht der K_m-Wert für NADPH ermittelt werden, da die Empfindlichkeit des Gerätes nicht ausreichte um NADPH-Konzentrationen im Bereich des K_m-Wertes zu messen (Abbildung 3-8 B). Stattdessen wurde dieser mit einem radioaktiven Test abgeschätzt.

Wie im Falle der DXR von Gerste waren Enzympräparationen der *Arabidopsis*-DXR nicht lagerfähig. Bei der Ermittlung der Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der eingesetzten Enzymmenge ergab sich kein linearer Zusammenhang bei geringen Enzymkonzentrationen. Erst bei höheren Enzymkonzentrationen zeigte sich ein linearer Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Enzymkonzentration. Zusatz von Albumin (1 mg/ml Endkonzentration) führte nicht zu einer Verbesserung. Es ergab sich eher eine etwas geringere Aktivität. Messungen wurden im linearen Bereich durchgeführt.

Die DXR katalysiert eine Bisubstrat-Reaktion, wobei NADPH zunächst an das Enzym bindet und anschließend DOXP (Koppisch *et al.*, 2002). Beim K_m-Wert eines Substrates (DOXP oder NADPH) wird die halbe Maximalgeschwindigkeit der Reaktion erreicht, sofern das andere Substrat in sättigender Konzentration vorliegt. Zur Bestimmung der K_m-Werte wurde daher eine möglichst hohe Konzentration des einen Substrates gewählt, und die Konzentration des anderen variiert, von dem der K_m-Wert bestimmt wurde.

Aus den Anfangsgeschwindigkeiten und den zugehörigen Substratkonzentrationen wurden die K_m-Werte mittels einer gewichteten Regression bestimmt. Anschließend wurde

eine Fehleranalyse durchgeführt und gegebenenfalls das Verfahren korrigiert (vgl. Material und Methoden 2.3.6). Zwei Arten von Fehlern sind zu beachten. Zum einen ist es möglich, dass bei der Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit ein konstanter additiver Fehler ($v \pm e$) auftritt, zum anderen ist auch ein multiplikativer Fehler ($v \cdot e$) zu beachten. Ein multiplikativer Fehler kann z.B. auftreten, wenn die Enzymkonzentration schwankt und sich wegen der linearen Abhängigkeit der Geschwindigkeit bei höheren Geschwindigkeiten ein größerer Fehler ergibt. Ein additiver Fehler kann z.B. durch ein abzuziehendes Hintergrundsignal hervorgerufen werden. Je nach beobachtetem Fehler ist ein unterschiedliches Verfahren vorzuziehen. Die Fehleranalyse des optischen Enzymassays ergab einen additiven Fehler, während der radioaktive Enzymtest einen multiplikativen Fehler aufwies (siehe auch Abbildung 2-4, S. 32). Mit einem optischen Test wurde der K_m -Wert von DOXP und V_{max} der Hinreaktion bestimmt (Abbildung 3-8 A), wobei die NADPH-Konzentration ca. dem 100-fachen des K_{mNADPH} entsprach. Die Empfindlichkeit des Testes genügte nicht, den K_m -Wert für NADPH zu bestimmen. Dieser wurde mit einem radioaktiven Test abgeschätzt (Abbildung 3-8 B) bei 1,1 mM DOXP, dem 10-fachen des K_{mDOXP} . Der K_{mDOXP} betrug $108 \pm 11 \mu\text{M}$, K_{mNADPH} $7,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$ und V_{max} $5,26 \pm 0,19 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ bzw. $1,45 \pm 0,19 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die unterschiedlichen V_{max} -Werte lassen sich dadurch erklären, dass das Enzym nicht stabil war, und sich so bei unterschiedlichen Experimenten unterschiedliche spezifische Aktivitäten ergaben. Abweichungen von einer Michaelis-Menten Kinetik wurden nicht beobachtet.

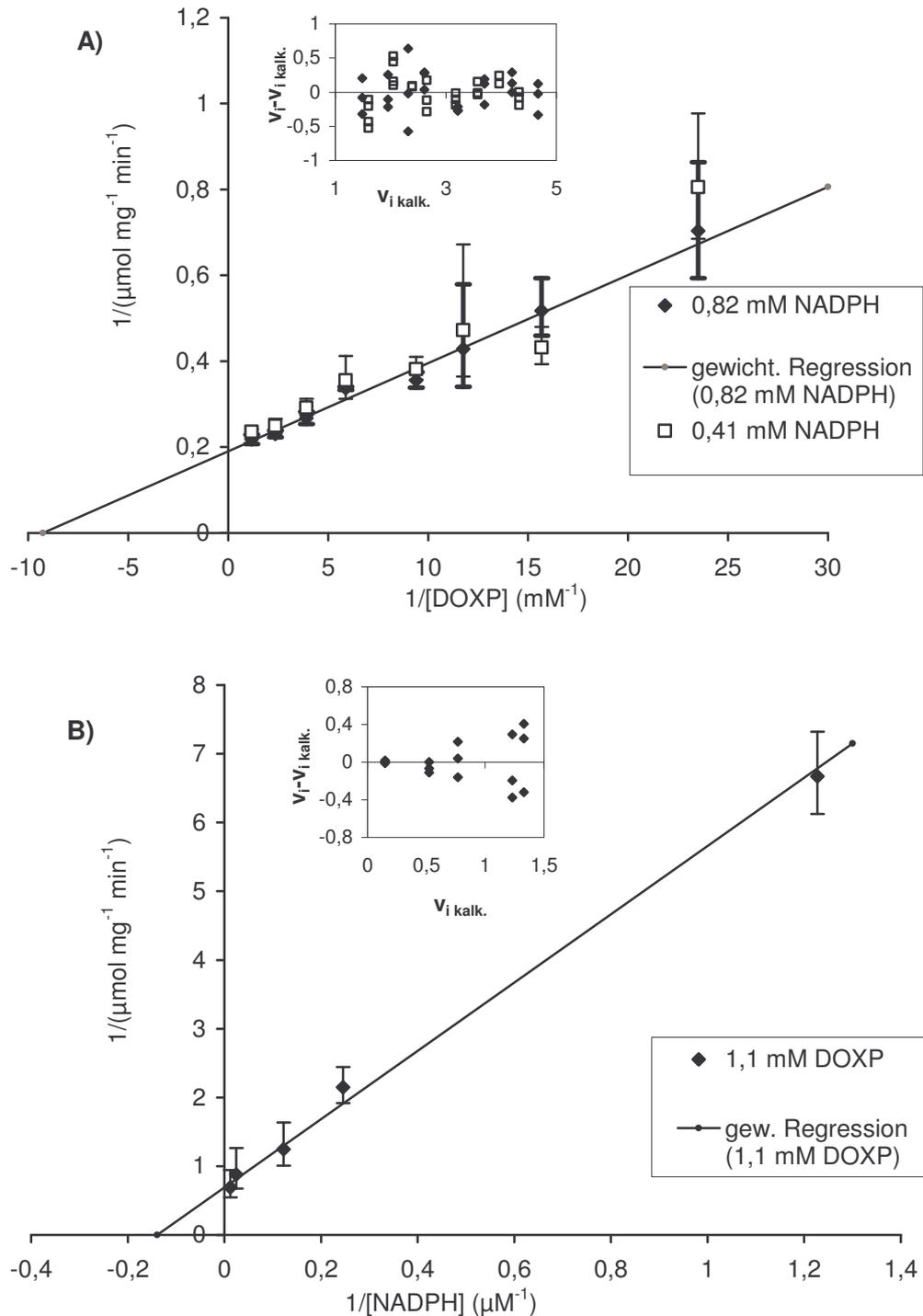


Abbildung 3-8: Lineweaver-Burk Plot eines Enzymtests mit der rekombinanten DOXP-Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana*. Pro Substratkonzentration wurden 3 Messungen durchgeführt.

A) Die gewichtete Regression lieferte einen $K_{m\text{DOXP}}$ -Wert von $108 \pm 11 \mu\text{M}$ und einen V_{max} -Wert von $5,26 \pm 0,19 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ bei einer NADPH Konzentration von 0,81 mM. Ermittelt wurden die Werte mit einem optischen Test. Bei der halben NADPH Menge ergaben sich nur geringe Unterschiede in der Enzymaktivität.

B) Mit einem radioaktiven Test wurde der K_m -Wert für NADPH bestimmt. Die gewichtete Regression lieferte einen $K_{m\text{NADPH}}$ -Wert von $7,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$ und einen V_{max} -Wert von $1,45 \pm 0,19 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ bei einer DOXP-Konzentration von 1,1 mM.

Die ermittelten K_m -Werte der DXR aus *Arabidopsis thaliana* entsprechen denen, die von anderen Autoren für das *E. coli* Enzym ermittelt wurden (siehe Diskussion 4.1.2). Die Enzyme der beiden unterschiedlichen Organismen weisen zumindest bei den K_m -Werten in ihren katalytischen Eigenschaften keine Unterschiede auf. Der geringe K_{mNADPH} -Wert von 7,2 μM deutet darauf hin, dass die NADPH-Konzentration im Stroma nicht limitierend für die Umsetzung von DOXP zu MEP ist, was jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden kann (siehe Diskussion 4.1.2).

3.1.4 Weitere Enzyme und Zwischenprodukte des DOXP/MEP-Weges

Hydratation von IPP bzw. DMAPP

Als letzter Schritt des plastidären DOXP/MEP-Weges war eine H_2O -Abspaltung unter Bildung einer Doppelbindung denkbar gewesen. Weiterhin war nicht klar, ob IPP oder DMAPP das Endprodukt dieses Biosyntheseweges ist. Es wurde somit versucht eine Hydratation entweder von IPP oder von DMAPP nachzuweisen, unter der Annahme, dass diese Reaktion reversibel ist. Als Untersuchungsobjekt wurde, wie bei den DOXP-Reduktoisomerase-Versuchen, Proteinrohextrakt aus etiolierten Gerstenkeimlingen eingesetzt. DMAPP und IPP können in Pflanzenrohextrakten zu höherkettigen Prenylphosphaten umgesetzt werden oder in geringerem Umfang durch Sauerstoff oxidiert werden. Als Oxidationsprodukte von IPP in *Tanacetum vulgare* treten hauptsächlich 3-Methyl-3,4-oxidobutan-1-ol und 3-Methylbutan-1,3,4,-triol und in geringerem Umfang auch 3-Methyl-1,3-butandiol (Banthorpe *et al.*, 1977).

Unter Stickstoff wurden keines dieser Produkte gefunden. Um Oxidationsprodukte von Hydratationsprodukten zu unterscheiden, wurden parallel Ansätze mit und ohne Stickstoff bzw. Argon gemacht. Um die Kondensation von IPP und DMAPP bzw. die Isomerisierung zu verhindern, wurde jeweils nur IPP oder DMAPP mit Zusatz von DMAEPP, einem Inhibitor der IPP-Isomerase, eingesetzt. Nach 2h bei 30 $^{\circ}\text{C}$ wurden die Ansätze mit alkalischer Phosphatase verdaut und mit Diethylether extrahiert. Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung diente Methylbutandiol und 2-C-Methylbutan-1,2,4-triol als Referenz. Die Alkohol-Analoga von IPP und DMAPP Isopentenol (3-Methyl-3-buten-1-ol) und Dimethylallylalkohol (3-Methyl-2-buten-1-ol) waren wegen ihrer Flüchtigkeit nicht mehr durch die verwendete Dünnschichtchromatographie nachweisbar.

Bei einem dieser Versuche war auf Höhe von Methylbutandiol ein Fleck zu erkennen, der in der denaturierten Kontrolle nicht zu sehen war. Das Ergebnis konnte jedoch nicht reproduziert werden. Häufig waren Flecken oberhalb von Methylbutandiol bzw. auf Höhe von 2-C-Methylbutan-1,2,4-triol zu erkennen, was jedoch nicht weiterverfolgt wurde, da diese nicht als letztes Produkt des DOXP/MEP-Weg in Frage kamen. Nachdem später bekannt war, dass LytB den letzten Schritt des DOXP/MEP-Weges katalysiert – eine Wasserabspaltung und Reduktion – wurde versucht, eine Oxidation von IPP bzw. DMAPP mittels NADP^+ durch einen optischen Test nachzuweisen. Nach Gao *et al.* (2002) wird das Substrat von LytB, Hydroxymethylbutenylpyrophosphat, bei Anwesenheit von NADPH, NADP^+ und ATP in Phytoen von Chromoplasten eingebaut. Daher wurde davon ausgegangen, dass NADH bei Pflanzen nicht das Cosubstrat, wie dies für das *E. coli* Enzym beschrieben wurde, ist. Jedoch konnte keine Reduktion von NADP^+ festgestellt werden.

3.2 Regulation der DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase bei der Ergrünung von etiolierter Gerste

Die Biosynthese der Pigmente der Photosynthese erfolgt über den DOXP/MEP-Weg. Von daher ist eine Regulation des DOXP/MEP-Weges durch Licht naheliegend, zumal

Licht die Bildung der photosynthetischen Pigmente und der photochemisch aktiven Thylakoide und Chloroplasten stimuliert. Ein geeignetes System zur Untersuchung der Licht-abhängigen Regulation sind etiolierte Pflanzen, bei denen nach Belichtung die Pigmentbiosyntheserate stark ansteigt. Ausgewählt wurde etiolierte Gerste und die Änderung der Aktivität der DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase im Zuge der Belichtung untersucht.

In Etiochloroplasten von Gerstenkeimlingen konnte sowohl DXS als auch DXR-Aktivität nachgewiesen werden. Für die DXS erfolgte der Nachweis mittels Dünnschicht-Chromatographie, GC/MS und die Hemmung durch 5-Ketoclofazone, während die DXR-Aktivität durch Nachweis des Produktes nach Dephosphorylierung als ME mittels Dünnschicht-Chromatographie und Hemmung der DXR-Aktivität durch Fosmidomycin nachgewiesen werden konnte. DXS-Aktivität fand sich in der Stromafraktion nach Aufschluss der Etioplasten in hypotonischem Puffer und Abzentrifugieren der Membranfraktion (Thylakoide).

3.2.1 Abhängigkeit der DOXP-Synthase-Aktivität von der Belichtungsdauer

Es wurde festgestellt, dass die Aktivität der DXS aus Gerste bei Bezug auf den Proteingehalt mit der Belichtungsdauer der Pflanzen sinkt von $4,1 \text{ nmol DOXP min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ auf $2,4 \text{ nmol DOXP min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ nach 24 h. Da aber während der Ergrünung eine Vielzahl von Proteinen neu gebildet werden, kann man daraus nicht schließen, dass die DXS durch Licht negativ reguliert wird. Eine Abnahme ergäbe sich auch, wenn die DXS nur in geringerem Maße als andere Proteine durch Licht induziert werden würde. Daher wurde ein anderes Bezugssystem gewählt. In etiolierten Gerstenkeimlingen sind schon Carotinoide enthalten, aber keine Chlorophylle. Nach Belichtung wird die Akkumulation der photosynthetischen Pigmente (Chlorophylle und Carotinoide) induziert, und der Gehalt an Carotinoiden erhöht sich. Bei Enzymen, die nicht durch Licht reguliert werden, sollte deren Aktivität bezüglich des Carotinoidgehaltes im selben Maße reduziert werden wie die Carotinoidmenge ansteigt (z.B. Verdopplung des Carotinoidgehaltes entspräche einer Halbierung der Enzymaktivität). Daher wurde als Bezugsgröße der Aktivität der beiden Enzyme DXS und DXR der Carotinoidgehalt verwendet. Als Vergleichsgröße wurde die Zunahme des Carotinoidgehaltes in der Gesamtpflanze herangezogen.

Bei 6 Tage alten Primärblättern von etiolierten Gerstenkeimlingen steigt der Carotinoidgehalt pro Frischgewicht innerhalb von 24 h nach Belichtung auf das 2 bis 2,4-fache (Abbildung 3-9), um danach schwächer anzusteigen. Der Wassergehalt (91,5%) änderte sich im Versuchszeitraum nicht, so dass dies auch den Anstieg des Carotinoidgehalt pro Trockengewicht wiedergibt.

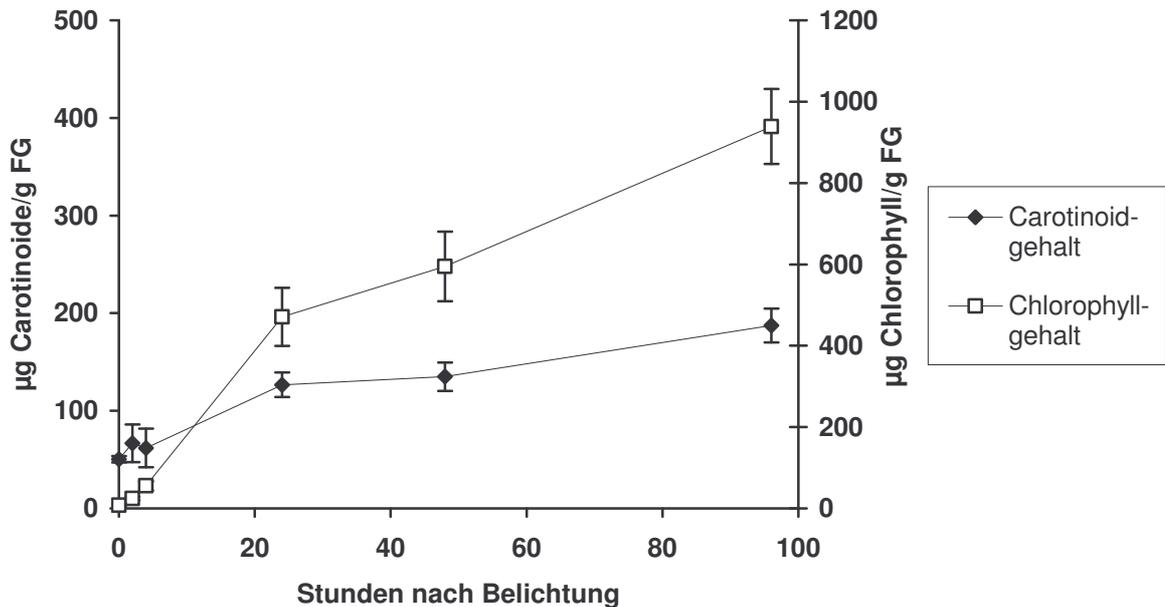


Abbildung 3-9: Verlauf der Pigmentakkumulation in Primärblättern etiolierter Gerste während der Ergrünung. Der Wassergehalt lag bei 91,5% und änderte sich nicht im Versuchszeitraum.

Aus dem Anstieg des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes lässt sich die benötigte Flussrate durch den DOXP/MEP-Weg abschätzen, wobei die in den Etioplasten schon vorhandenen Vorstufen der Pigmentbildung unberücksichtigt bleiben. Der Chlorophyllgehalt erhöhte sich von 8 auf 470 µg Chlorophyll/g Frischgewicht und der Carotinoidgehalt von 50 auf 126 µg Carotinoide pro g Frischgewicht (FG). Aus dem Molekulargewicht von β -Carotin und Chlorophyll *a* ergibt sich für die Carotinoide ein Fluss von 1,13 µmol IPP pro 24 h und pro g Frischgewicht ($0,79 \text{ nmol (g FG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und für die Chlorophyll 2,1 µmol IPP pro 24 h und pro g Frischgewicht ($1,4 \text{ nmol (g FG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Weiterhin muss noch der Anstieg des Gehalts an Plastochinon-9 und α -Tocopherol berücksichtigt werden (Lichtenthaler, 1969). In etwa ergibt sich dabei 0,5 µmol IPP pro 24 h ($0,35 \text{ nmol (g FG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$).²

Legt man die Daten nach Lichtenthaler (1969) zugrunde, nach denen die Carotinoide Plastochinon- und α -Tocopherolakkumulation in etiolierter Gerste erst nach 6 h Belichtung beginnt, ergibt sich bei den Carotinoiden ein Fluss von 1,05 und bei den Chinonen 0,46 nmol IPP (g Frischgewicht)⁻¹ min⁻¹. Nach 4 h war bei den Versuchsbedingungen eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Carotinoideakkumulation ($\alpha=10\%$) festgestellt worden. Zusammengenommen betrug die Flussrate maximal $2,9 \text{ nmol IPP (g FG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

² Da das Molekulargewicht von Chlorophyll *b* nur geringfügig höher ist und zu einer etwas geringeren Flussrate führen würde, wurde zur Berechnung nur das Molekulargewicht von Chlorophyll *a* verwendet. Ebenfalls wurde zur Vereinfachung bei den Carotinoiden nur das Molekulargewicht von β -Carotin herangezogen. Der Anstieg des Gehalts an Plastochinon-9 und α -Tocopherol wurde von Lichtenthaler (1969) bei der Ergrünung von Gerste untersucht: In Etioplasten betrug das Verhältnis Carotinoide zu α -Tocopherol ca. 3,0 und das Verhältnis Carotinoide zu Plastochinon ca. 1,9. Der Gehalt an Phyllochinon K₁ ist im Vergleich zu den anderen Chinonen gering und wurde nicht berücksichtigt. Übertragen auf die hier erhaltenen Ergebnisse ergab sich ca. 0,5 µmol IPP pro 24 h.

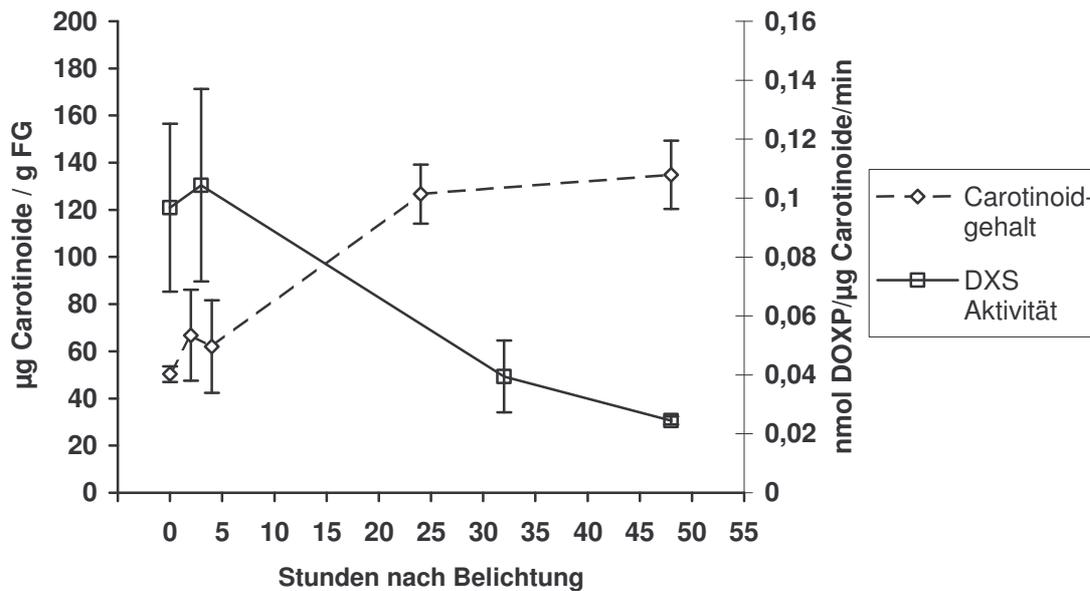


Abbildung 3-10: Zunahme des Carotinoidgehaltes in 6 Tage alten etiolierten Gerstenkeimlingen nach Belichtung und Abnahme der DOXP-Synthase Aktivität. Nach 24 h erhöhte sich der Carotinoidgehalt auf das 2,4-fache, während im gleichen Ansatz die DXS-Aktivität nach 32 h nur noch 40,8% betrug (0,1 mM Pyruvat, jeweils 3 Aktivitätsbestimmungen).

Zunächst wurde die DXS-Aktivität bei 0,1 mM Pyruvat bestimmt. Bei einem dieser Experimente waren nach 15 min nur noch 30% Pyruvat im Assay vorhanden. In diesem Falle war keine Aktivitätsbestimmung möglich, da die Pyruvat-Konzentration sich im Versuchszeitraum stark veränderte und damit auch die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion gemäß Michaelis-Menten. Daraufhin wurde 0,55 mM Pyruvat eingesetzt, wodurch in einem breiteren Konzentrationsbereich DXS-Aktivitäten bestimmt werden konnten.

Die Aktivität der DOXP-Synthase erreichte nach 6 Tagen im Dunkeln ihr Maximum ($0,35 \text{ nmol DOXP } (\mu\text{g Carotinoide})^{-1} \text{ min}^{-1}$ nach 6 Tagen, $0,22 \text{ nmol DOXP } (\mu\text{g Carotinoide})^{-1} \text{ min}^{-1}$ nach 5 Tagen; 0,55 mM Pyruvat). Nach sieben Tagen im Dunkeln betrug die DXS-Aktivität nur noch 60% ($0,21 \text{ nmol DOXP } (\mu\text{g Carotinoide})^{-1} \text{ min}^{-1}$) des 6 Tage Wertes. Für die weiteren Experimente wurden daher 6 Tage alte etiolierte Gerstenkeimlinge verwendet, die anschließend einem Tag/Nacht Wechsel unterzogen wurden. Die durchschnittliche DXS-Aktivität in unbelichteten Etioplasten lag bei $0,375 \text{ nmol DOXP } (\mu\text{g Carotinoide})^{-1} \text{ min}^{-1} \pm 9,1\%$ (0,55 mM Pyruvat; 4 Anzuchten mit je 3 Aktivitätsbestimmungen) bzw. $0,078 \pm 18\%$ (0,1 mM Pyruvat; 4 Anzuchten mit je 3 Aktivitätsbestimmungen). Bezogen auf das Frischgewicht ($50 \mu\text{g Carotinoide/g Frischgewicht}$) ergibt sich $18,8$ (0,55 mM Pyruvat) bzw. $3,9 \text{ nmol DOXP } (\text{g FG})^{-1} \text{ min}^{-1}$ (0,1 mM Pyruvat). Die gemessenen Enzymaktivitäten reichen somit theoretisch aus, um die ermittelte maximale Flussrate (siehe oben) von $2,9 \text{ nmol IPP } (\text{g FG})^{-1} \text{ min}^{-1}$ zu ermöglichen, sofern die Pyruvat und GAP-Konzentration *in vivo* nicht zu einem wesentlich geringeren Fluss durch die DXS führen.

In den unterschiedlichen Versuchsreihen lag die Carotinoidekonzentration zwischen 4 und $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ im Enzymtest, woraus zu schließen ist, dass die Enzymaktivität unabhängig von der Pigment- bzw. Proteinkonzentration war. Innerhalb der ersten 4 h ergab sich keine Änderung der Aktivität (Abbildung 3-11). Nach 24 h nahm die DXS-Aktivität in Bezug auf den Carotinoidgehalt sowohl bei 0,1 mM Pyruvat als auch bei 0,55 mM Pyruvat ab. Je nach Experiment betrug die Aktivität nach 24 h 40% bis 64% des Ausgangswertes bei 0 h

und fiel mit zunehmender Belichtungsdauer auf einen konstanten Wert von ca. 14% (Abbildung 3-10; Abbildung 3-11). Im Vergleich mit der Zunahme des Carotinoidgehaltes auf das ca. 2 bis 2,4-fache nach 24 h ergab sich je nach Experiment entweder überhaupt keine positive Regulation durch Licht oder eine nur schwache Aktivitätserhöhung (Abbildung 3-11 C). Nach 24 h verringerte sich die Pigmentakkumulation, und der Carotinoidgehalt stieg um 6,6% innerhalb von weiteren 24 h. Im gleichen Zeitraum viel die DXS-Aktivität um 26%. Nach weiteren 24 h sank die Aktivität nochmals um 49%. Zu diesem Zeitpunkt (72 h) waren die Primärblätter voll ergrünt. Die DXS-Aktivität nahm demnach nach 24 h ab (Abbildung 3-11 C), was mit der verringerten Pigmentakkumulation in den Primärblättern korreliert.

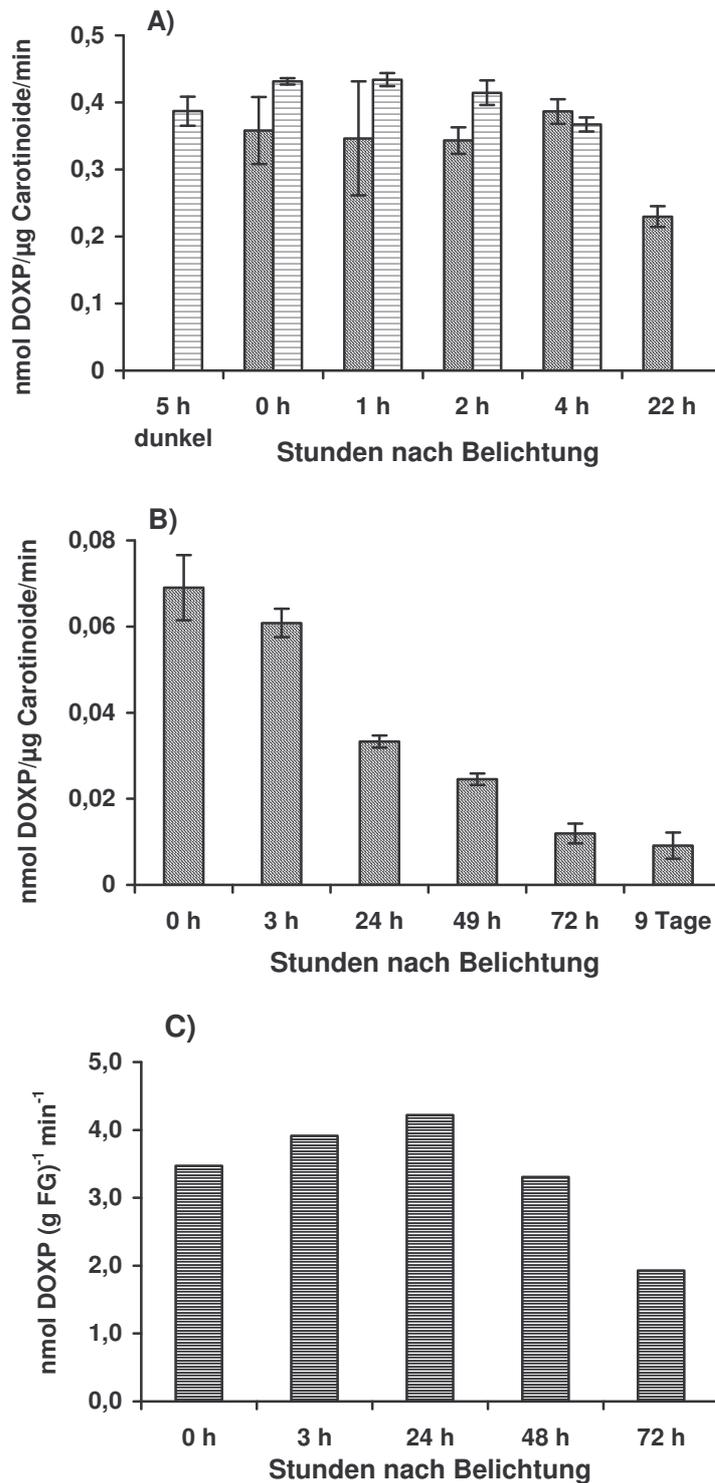


Abbildung 3-11: Änderung der DOXP-Synthese-Aktivität in Etiochloroplasten nach Belichtung. **A)** Die Pyruvat-Konzentration betrug 0,55 mM und die Ergebnisse zweier unterschiedlicher Pflanzenanzuchten dargestellt **B)** 0,1 mM Pyruvat. **C)** Änderung der DXS-Aktivität in Bezug auf das Frischgewicht, berechnet aus B) und Abb. 3-9. Eine leichte Erhöhung der DXS-Aktivität ergab sich innerhalb von 24 h und einem anschließenden Abfall. Hier erhöhte sich der Carotinoidgehalt um das 2,4-fache nach 24 h. Bei einer Erhöhung des Carotinoidgehaltes um nur das Doppelte innerhalb von 24 h ergibt sich jedoch keine Änderung der DXS-Aktivität in den ersten 24 h.

Bei der DOXP-Synthase ergab sich insgesamt keine oder nur schwache Erhöhung der Aktivität durch Licht innerhalb von 24 h. Die DXS-Aktivität in Bezug auf den Carotinoidgehalt verringerte sich wie die Carotinoidakkumulation stieg. Nach 24 h war eine Aktivitätsabnahme zu beobachten, nachdem sich auch die Pigmentbiosynthese verlangsamt hatte.

3.2.2 Abhängigkeit der DOXP-Reduktoisomerase-Aktivität von der Belichtungsdauer

Nachdem offensichtlich Licht bei der Ergrünung der Primärblätter der Gerste nur einen geringen Einfluss auf die DOXP-Synthase-Aktivität hatte, wurde die Änderung der Aktivität der DOXP-Reduktoisomerase bei der Ergrünung untersucht. Die DXR-Aktivität in Bezug auf den Carotinoidgehalt blieb in den ersten 4 h konstant, jedoch erhöhte sich die DXR-Aktivität leicht innerhalb von 24 h (Abbildung 3-12 A) im Gegensatz zur DXS, bei der im Durchschnitt eine Halbierung auftrat. Die Aktivierung der DXR bei der Ergrünung innerhalb von 24 h wird besonders deutlich beim Bezug der Aktivität auf das Frischgewicht (Abbildung 3-12 B). Nach 24 h betrug die DXR-Aktivität das 4,5-fache (3,8-fache) des Ausgangswertes bei einer gleichzeitigen Erhöhung des Carotinoidgehaltes auf das 2,4-fache (2-fache).

Der 0 h-Wert betrug $0,08 \pm 31\%$ nmol MEP ($\mu\text{g Carotinoide}$)⁻¹ min⁻¹ (3 Anzuchten, insgesamt 6 DXR-Aktivitätsbestimmungen; 0,05 mM DOXP). Aus dem 0 h Wert von 0,08 nmol MEP ($\mu\text{g Carotinoide}$)⁻¹ min⁻¹ ergibt sich bezogen auf das Frischgewicht ($50 \mu\text{g Carotinoide (g FG)}$)⁻¹ zum Zeitpunkt 0) $4 \text{ nmol IPP (g FG)}$ ⁻¹ min⁻¹ und genügt wie im Falle der DXS für eine ausreichende Biosynthese von IPP, sofern die *in vivo* Konzentrationen von Substraten oder auch Produkten die Enzymaktivität nicht limitieren.

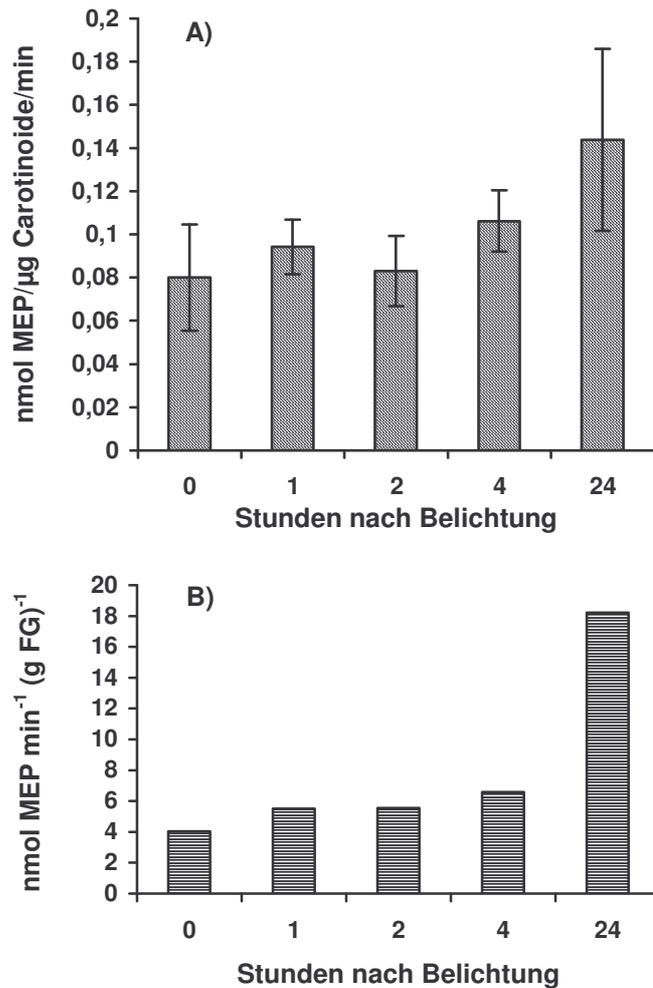


Abbildung 3-12: Änderung der DXR-Aktivität während der Ergrünung von belichteten Primärblättern 6 d etiolierter Gerste. Es wurden die Mittelwerte von 3 Experimenten mit je 2 bis 3 Aktivitätsbestimmungen bestimmt. **A)** Änderung der DXR-Aktivität in Bezug auf den Carotinoidgehalt **B)** Änderung der DXR-Aktivität in Bezug auf das Frischgewicht, berechnet aus den Daten von Abb. 3-9 und A. Innerhalb der ersten 4 h ergab sich ein schwacher Anstieg. Nach 24 Stunden erhöhte sich die Aktivität auf das 4,5-fache.

Daraus ergab sich, dass in Etioplasten DXR vorhanden ist, und bei Belichtung zusätzlich die DXR-Aktivität induziert wird. Die DXR erwies sich als ein wichtiger regulatorischer Punkt im DOXP/MEP-Weg. Die Erhöhung der Carotinoidbiosynthese und die lichtinduzierte Bildung der Chlorophylle ist mit der Aktivitätssteigerung der DXR gekoppelt.

3.2.3 Einfluss von Hellrot und Dauerdunkelrot auf die DXS- und DXR-Aktivität

Viele durch Licht induzierte Vorgänge in Pflanzen beruhen auf der Wirkung von Phytochrom (vgl. Schopfer und Brennicke, 1999). Phytochromreaktionen beruhen auf der reversiblen Umwandlung von physiologisch inaktivem P_r zu aktivem Phytochrom (P_{fr}) durch Hellrot. P_{fr} kann durch Dunkelrot wieder in P_r übergehen. Da auch bei Dunkelrot eine geringe Menge an P_{fr} vorhanden ist, kann Dauerdunkelrot zu Phytochromeffekten führen (sogenannte HIR Reaktion). Dies findet sich besonders in etiolierten Pflanzen, die wesent-

lich mehr Gesamtphytochrom besitzen als grüne Pflanzen³. Die durch Dauerdunkelrot in etiolierten Pflanzen gebildete P_{fr} -Menge reicht aus, um P_{fr} -Reaktionen auszulösen. Im Dunkeln ist dagegen nur P_r vorhanden.

Schon länger war bekannt, dass die Akkumulation von photosynthetischen Pigmenten in *Raphanus* (Lichtenthaler und Becker, 1972; Lichtenthaler und Becker, 1975) und Gerste (Kleudgen und Lichtenthaler, 1974) durch aktives Phytochrom induziert wird. Der durch Hellrot ausgelöste Effekt lässt sich durch Dunkelrot revertieren. Dauerdunkelrot allein führt ebenfalls zu einer erhöhten Pigmentakkumulation. Es wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Induktion der Pigmentakkumulation durch Hellrot oder Dunkelrot mit einer frühen Änderung der DXS- oder DXR-Aktivität im Zuge der Belichtung gekoppelt ist.

Tabelle 3-2: Einfluss von Phytochrom auf die DXS-Aktivität. Weder Hellrotblitze, gefolgt von einer Dunkelphase noch Dauerdunkelrot führten zu einer signifikanten Änderung in der DXS-Aktivität. Bei 6 h Weißlicht ergab sich eine Erhöhung der Aktivität in Bezug auf den Carotinoidgehalt. Diese Erhöhung war jedoch nicht signifikant ($\alpha=10\%$), unter der Annahme, dass der Carotinoidgehalt sich erst nach 6 h erhöht (Lichtenthaler, 1969). Demgegenüber ergab sich keine Änderung bei 6 h HR.

	DXS (% Aktivität)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
DD 0 h ¹	100,0 ±25	100 ±10	100 ±18
10' HR + 3 h DD	93,3 ±2,1	-	-
3 h DR	99,1 ±1	108,7 ±18	-
6 h DR	-	113,0 ±11	83,7 ±18
4 h DD	-	107 ±11	-
6 h HR	-	-	95,4 ±14
6 h WL	-	-	115,2 ±20
5' HR + 3 h DD + 5' HR + 3 h DD	-	-	110 ±29

¹ Exp. 1: 0,55 mM Pyruvat, ansonsten 0,1 mM. 100% entsprachen bei Exp. 1 0,29, bei Exp. 2 0,051 und bei Exp. 3 0,08 nmol DOXP ($\mu\text{g Carotinoide}$)⁻¹ min⁻¹

DD: Dauerdunkel, HR: Hellrot, DR: Dunkelrot, WL: Weißlicht. Pro Experiment wurden 3 Aktivitätsbestimmungen bzw. 6 Bestimmungen bei 2 x HR + 2 x DD durchgeführt.

DXS: (Tabelle 3-2) Hellrotbestrahlung (10' bzw. 2 x 5') gefolgt von einer Dunkelperiode führte zu keiner Änderung der DXS-Aktivität. Auch bei Dauerdunkelrot war keine Änderung der Aktivität innerhalb von 6 h zu beobachten. Dauerhellrot entspricht in seiner Wirkung in vielen Fällen der Wirkung von Weißlicht (Schopfer und Brennicke, 1999). Bei Dauerhellrot konnte kein Effekt nachgewiesen werden. Im Vergleich war bei Weißlicht eine Erhöhung der DXS-Aktivität zu erkennen, die jedoch nicht signifikant war, sofern man die verzögerte Carotinoidakkumulation, die erst nach ca. 6 h eintritt, berücksichtigt

³ Die Wirkungsweise der Phytochrome A und B ist am besten untersucht (vgl. Schopfer und Brennicke, 1999): PhyA ist das dominierende Phytochrom im Keimling und verantwortlich für Hochintensitätsreaktionen (HIR) und Niedrigintensitätsreaktionen (VLFR). PhyB findet sich in allen Entwicklungsstadien der Pflanze und ist verantwortlich für Niederintensitätsreaktionen (LFR).

(Lichtenthaler, 1969). Insgesamt konnte keine Wirkung von Phytochrom auf die DXS-Aktivität nachgewiesen werden.

DXR: Zunächst war eine Abnahme der DXR-Aktivität bei Hellrot und Dauerdunkelrot zu erkennen (Experiment 1, Tabelle 3-3). Dies konnte jedoch in einem weiteren Experiment nicht bestätigt werden (Experiment 2, Tabelle 3-3), so dass sich kein Einfluss von Phytochrom auf die DXR-Aktivität im Versuchszeitraum ergibt.

Tabelle 3-3: Wirkung von Hellrot und Dauerdunkelrot auf die DXR-Aktivität. Durch Vergleich beider Experimente ergab sich insgesamt keine Änderung in der DXR-Aktivität.

	DXR (% Aktivität)	
	Exp. 1	Exp. 2
DD 0 h ¹	100 ±22	100 ±45
10' (5') ² HR + 3 h DD	78 ±16	103 ±5
3 h DR	69 ±7	91 ±8

¹ 100% DXR-Aktivität entsprachen bei Exp. 1 0,11 und bei Exp. 2 0,076 nmol MEP ($\mu\text{g Carotinoide}^{-1} \text{min}^{-1}$).

² Bei Experiment 1 wurde mit 5' HR belichtet

DD: Dauerdunkel, HR: Hellrot, DR: Dunkelrot. Pro Exp. wurden 3 Aktivitätsbestimmungen durchgeführt.

3.3 Inhibitoren des DOXP/MEP-Weg

Verschiedene potentielle Hemmstoffe wurden an der DOXP-Synthase und der DOXP-Reduktoisomerase getestet. Hierfür verwendet wurde die DOXP-Synthase von *E. coli*, von *Chlamydomonas reinhardtii* und von Gerste (Etiochloroplasten). Der Einfluss auf die DOXP-Reduktoisomerase-Aktivität wurde am Enzym aus Gerste und dem rekombinanten Enzym von *Arabidopsis thaliana* bestimmt. Weiterhin wurde versucht ein Algentestsystem zu entwickeln, um die Einwirkung der Herbizide/Hemmstoffe auf die ganze Zelle zu untersuchen.

3.3.1 Potentielle Inhibitoren des DOXP/MEP-Weg

Fosmidomycin und weitere Phosphonate

Fosmidomycin und FR-900098 sind seit längerem bekannte, aus *Streptomyces*-Stämmen isolierte Antibiotika, die die Isoprenoidbiosynthese in einigen Bakterien hemmen. Verschiedene Überlegungen (siehe Diskussion 4.3.1) legten nahe, dass Fosmidomycin den DOXP/MEP-Weg auf Höhe der DXR hemmt.

Fosmidomycin und FR-900098 erwiesen sich als effektive Inhibitoren der DOXP-Reduktoisomerase, während die DOXP-Synthase durch diese beiden Hemmstoffe nicht gehemmt wird (Tabelle 3-4). Darüber hinaus wurde noch die Wirkung weiterer Phosphonate untersucht mit teilweise ähnlicher Struktur (Abbildung 3-13). Keines dieser zusätzlichen Phosphonate führte jedoch zu einer Hemmung der DXS oder DXR.

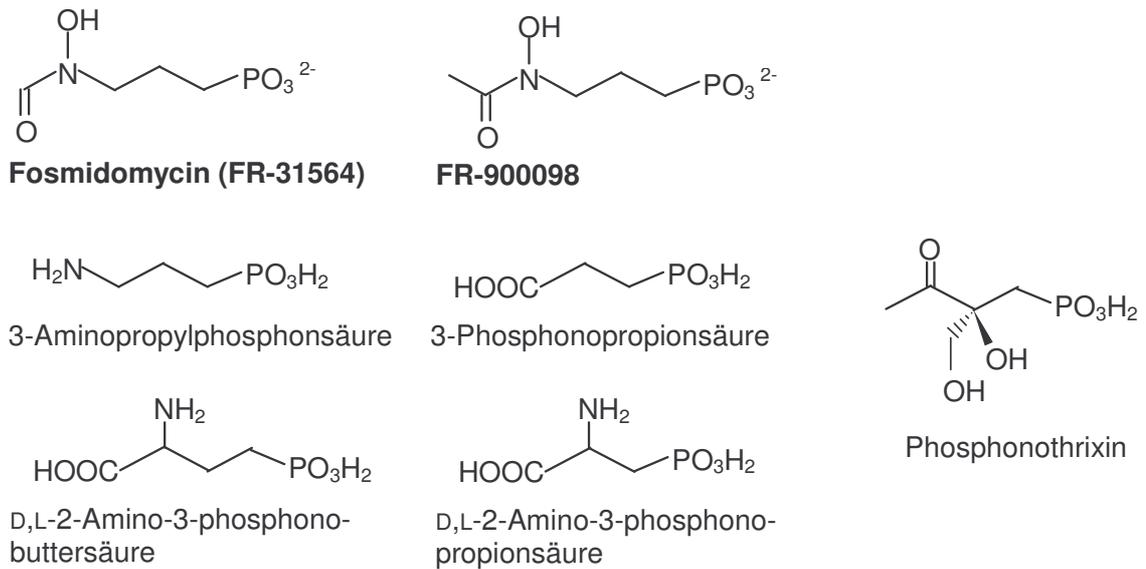


Abbildung 3-13: Fosmidomycin und weitere Phosphonate, deren mögliche Hemmwirkung auf die DOXP-Reduktoisomerase und DOXP-Synthase untersucht wurde. Es erwiesen sich ausschließlich Fosmidomycin und FR900098 als Inhibitoren der DXR. Die DXS wurde durch keine der Substanzen gehemmt.

Tabelle 3-4: Wirkung einiger Phosphonate auf die Enzymaktivität von DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii* und DXR aus *Arabidopsis thaliana*. Außer Fosmidomycin und FR-900098 führte keines der Phosphonate zu einer signifikanten Änderung der DOXP-Reduktoisomerase-Aktivität (n=3). Die DOXP-Synthase wird durch keine der getesteten Substanzen gehemmt (n=3).

Substanz	% Hemmung DXS ([Substanz])	% Hemmung DXR ([Substanz])
Fosmidomycin	0% (1 mM)	100% (46 µM)
FR-900098	0% (1 mM)	100% (20 µM)
3-Phosphonopropionsäure	0% (3,2 mM)	0% (100 µM)
D,L-2-Amino-3-phosphonopropionsäure	0% (3 mM)	0% (100 µM)
3-Aminopropylphosphonsäure	0% (3,7 mM)	0% (100 µM)
D,L-2-Amino-4-phosphonobuttersäure	0% (2,7 mM)	0% (100 µM)
Phosphonothrixin	-4,4% (0,5 mM) ²	0% (100 µM)

²rekombinantes Enzym aus *E. coli*

Für Fosmidomycin wurde der IC₅₀-Wert, welcher die Hemmstoffkonzentration angibt, bei der das Enzym zu 50% gehemmt ist, von dem Enzym aus *Arabidopsis thaliana* und Gerste bestimmt (Abbildung 3-14). Bei Gerste ergab sich ein IC₅₀-Wert von 0,7 µM bei 0,5 mM DOXP und 1 mM NADPH und bei *Arabidopsis thaliana* ein IC₅₀-Wert von 0,28 µM bei 0,25 mM DOXP und 1 mM NADPH. Der höhere IC₅₀-Wert bei Gerste ergibt sich durch die höhere DOXP-Konzentration, da Fosmidomycin unter den Reaktionsbedingungen ein kompetitiver Inhibitor der DXR bezüglich DOXP ist (Koppisch *et al.*, 2002; siehe Diskussion 4.3.1).

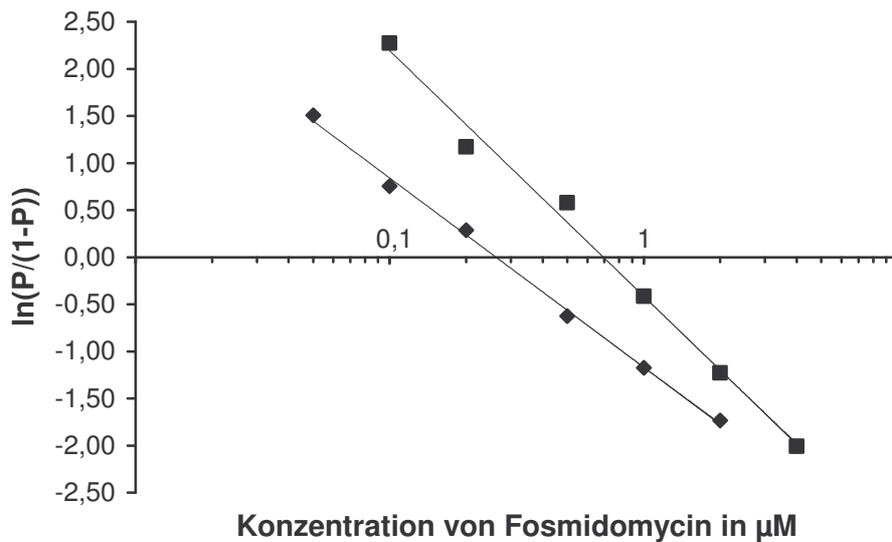
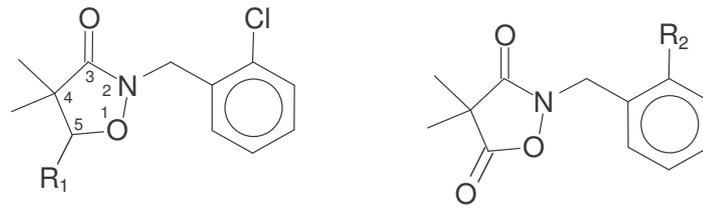


Abbildung 3-14: Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase aus Gerste (■) und *Arabidopsis thaliana* (◆). Der IC_{50} -Wert liegt bei $0,7 \mu\text{M}$ bei Gerste und bei $0,28 \mu\text{M}$ bei *Arabidopsis thaliana*. Bei Gerste wurde $0,5 \text{ mM}$ DOXP verwendet und bei *Arabidopsis thaliana* $0,25 \text{ mM}$ DOXP. P bedeutet hier $v_{\text{gehemmt}}/v_{\text{nicht gehemmt}}$. Es wurden 3 Aktivitätsbestimmungen pro Fosmidomycinkonzentration durchgeführt.

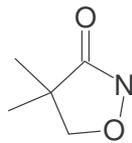
Fosmidomycin konnte als effektiver Inhibitor der pflanzlichen DXR nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde die DXR durch die anderen Phosphonate mit ähnlicher Struktur nicht gehemmt.

Clomazone und Derivate

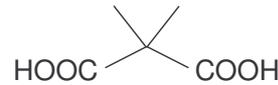
Clomazone ist ein selektives Herbizid, eingesetzt z.B. beim Anbau von Soja gegen Gräser und Unkräuter, welches die plastidäre Isoprenoidakkumulation in Pflanzen hemmt. Das Wirkungsprinzip war bisher unbekannt (siehe Diskussion 4.3.2). Neben Clomazone sind auch mehrere seiner Derivate als Herbizide wirksam, darunter auch einige nachgewiesene Abbauprodukte. Es sollte untersucht werden, ob eines der ersten beiden Enzyme des DOXP/MEP Weges durch Clomazone und/oder eines seiner Derivate bzw. Abbauprodukte (siehe Abbildung 3-15) gehemmt wird, um Aufschluss über seine Wirkungsweise zu gewinnen.



Clomazone und Derivate



Dimethylisoxazolidinon



Dimethylmalonsäure

Abbildung 3-15: Im Enzymtest auf Hemmung getestete Derivate von Clomazone. Dimethylmalonsäure könnte beim Abbau von Clomazone in Pflanzen auftreten.

R₁: H (Clomazone), 5-Acetoxy-, 5-Hydroxy-, 5-Benzoyloxy- und 5-Chlorclomazone

R₂: Methyl (2-(2-Methylphenyl)-Methyl-4,4-Dimethyl-3,5-Isoxazolidindion) oder Chlor (5-Ketoclomazone)

Keines der untersuchten Derivate hemmte die DOXP-Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana*. Jedoch erwies sich als einziges Derivat 5-Ketoclomazone als Inhibitor der DOXP-Synthase, während die anderen Derivate nur eine geringe Wirkung aufwiesen. Der IC₅₀-Wert von 5-Ketoclomazone betrug 50 µM für das rekombinante Enzym von *Chlamydomonas reinhardtii* (Abbildung 3-16). Sowohl die DXS aus *E. coli* als auch das Enzym aus Gerste wurde ähnlich gut gehemmt (Tabelle 3-5). Es erwies sich als vorteilhaft, das Enzym zuvor mit Inhibitor 30 min bis 2 h bei 30 °C zu inkubieren. Innerhalb dieses Zeitraumes erhöhte sich die Hemmwirkung je nach Experiment, was auf einen langsam bindenden Inhibitor hindeutete. Jedoch konnte auch eine Inkubationszeit von 24 h (18 h davon bei 4 °C) die Hemmwirkung nicht verbessern. Auch nach diesem Zeitraum betrug die Hemmung 50% bei 50 µM 5-Ketoclomazone.

5-Ketoclomazone wird in der Sojabohne über 5-Hydroxycyclomazone gebildet und vermutlich weiter zu 2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[(2-chlorbenzyl)-hydroxyamino]-propansäure abgebaut (ElNaggar *et al.*, 1992). 5-Hydroxycyclomazone hemmte jedoch nicht die DOXP-Synthase, während für die andere Substanz beschrieben wurde, dass diese die DOXP-Reduktoisomerase von *E. coli* hemmt (Jomaa, 2000). Die DOXP-Synthase wurde hierbei nicht untersucht.

Tabelle 3-5: Wirkung verschiedener Derivate von Clomazone auf die DOXP-Synthese aus *E. coli*, *Chlamydomonas reinhardtii* und aus Etiochloroplasten von Gerste. Eine Hemmung der DXR war bei keinem der Derivate zu erkennen. Die Vorinkubation mit Hemmstoff betrug 2h, bei Gerste 30 min. Bei 5-Benzoyloxyclozomazone, 5-Hydroxyclozomazone, Dimethylmalonat und Dimethylisoxazolidinon waren die Aktivitätsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant ($\alpha=5\%$). Im Vergleich zu 5-Ketoclozomazone ist die Hemmung/Förderung der anderen Substanzen jedoch nur minimal.

Substanz	% Hemmung <i>E.coli</i> DXS (Konzentration)	% Hemmung <i>Chlamydomonas</i> DXS (Konzentration)	% Hemmung Gerste DXS (Konzentration)
Clomazone	0 % (50 μ M)	-7,5 % (100 μ M)	0 %
5-Ketoclozomazone	63 % (50 μM)	62,7 % (100μM)	77 % (50 μM)
5-Chlorclozomazone	-	-6,7 % (100 μ M)	-
5-Hydroxyclozomazone	-	-4,7 % (100 μ M)	-
5-Acetylclozomazone	-	7,8 % (100 μ M)	-
5-Benzoyloxyclozomazone	-	-5,7 % (100 μ M)	-
2-(2-Methylphenyl)-Methyl-4,4-Dimethyl-3,5-Isloxazolidindion	-	10,1 % (100 μ M)	-
Dimethylisoxazolidinon		-3,1 % (100 μ M)	
Dimethylmalonat		-10,4 % (100 μ M)	

Negative Werte bedeuten eine Steigerung in der Aktivität. Die Standardabweichung betrug im Durchschnitt 4% (n=3).

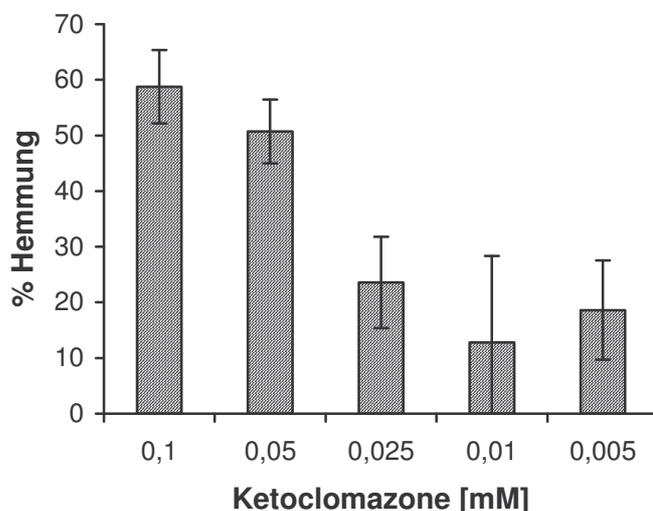


Abbildung 3-16: Hemmung der DOXP-Synthese von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit der 5-Ketoclozomazone Konzentration (n=3). Die Vorinkubation betrug 30 min. Eine 50%-ige Hemmung ergab sich bei ca. 50 μ M 5-Ketoclozomazone.

Weitere getestete Substanzen

Vitamin B₆-Antagonisten erwiesen sich als effektive Inhibitoren der Isoprenemission (Zeidler, 2001). Obwohl nicht zu erwarten war, dass Vitamin B₆-Antagonisten eines der ersten beiden Enzyme hemmen, wurde sichergestellt, dass die Hemmung der Isoprenemission nicht in Zusammenhang mit den beiden ersten Enzymen des DOXP/MEP-Weges steht. Ausgewählt wurden L-Cycloserin und Aminooxyacetat (Abbildung 3-17), welche

die Isoprenemission nahezu komplett unterbinden (Zeidler, 2001). Im Enzymtest zeigten jedoch beide Substanzen keinen Effekt auf die Enzymaktivität der DXS und DXR.

AMPI (Acetylmethylphosphinat, Abbildung 3-17) ist ein Hemmstoff der mitochondrialen und plastidären Pyruvat-Dehydrogenase, deren Reaktionsmechanismus dem der DOXP-Synthase ähnelt. Es ergab sich eine Hemmung der DOXP-Synthase von 56% bei einer Konzentration von 100 μM AMPI.

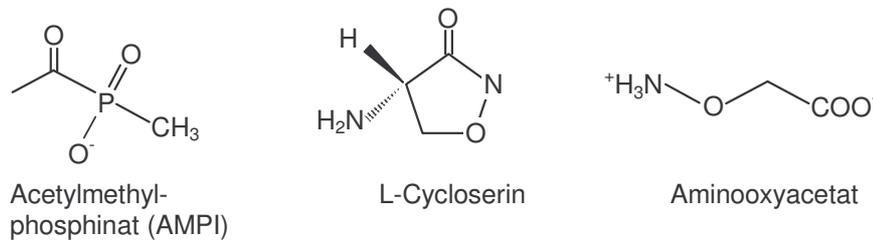


Abbildung 3-17: Weitere Substanzen, deren Wirkung auf die Aktivität von DXS und DXR überprüft wurde. Aminooxyacetat und L-Cycloserin sind effektive Inhibitoren der Isoprenemission. AMPI ist ein Inhibitor der plastidären und mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase. Als wirksam gegenüber der DOXP-Synthase erwies sich AMPI.

Tabelle 3-6: Weitere Substanzen, deren Wirkung auf die DXS und DXR getestet wurden. Als einziger Hemmstoff erwies sich AMPI, welches die DXS hemmt. Die Vorinkubation mit den Substanzen betrug 30 min (n=3).

Substanz	% Hemmung DXS	% Hemmung DXR
AMPI	58,6 % (100 μM)	0 % (100 μM)
L-Cycloserin	0 % (100 μM)	-9,1 % (1 mM) ¹
Aminooxyacetat	0 % (100 μM)	6,7 % (1 mM)

¹ negative Werte bedeuten eine Steigerung der Aktivität.

3.3.2 Algentestsystem zur Identifizierung von Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges

An den Algen *Euglena gracilis* (Euglenophyta), *Ochromonas danica* (Heterokontophyta) und *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) wurde die Wirkung verschiedener Hemmstoffe der Isoprenoidbiosynthese auf die Bildung photosynthetischer Pigmente (Chlorophylle und Carotinoide) und/oder Wachstum der Algen untersucht. Getestet wurde ein Hemmstoff der HMG-CoA-Reduktase, Cerivastatin, sowie Fosmidomycin, ein Hemmstoff der DXR. Bei *Ochromonas danica* wurde auch die Wirkung von Clomazone und 5-Ketoclomazone untersucht. Insbesondere sollte ein Testsystem entwickelt werden, mithilfe dessen eindeutig ein Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges identifiziert werden könnte.

Die Algen wurden überprüft auf Kontaminationen durch Pilze und Bakterien durch Ausplattieren einer Probe aus den verwendeten Stammkulturen auf entsprechende Agarplatten. Bei den beschriebenen Experimenten waren keine Kontamination zu entdecken.

Euglena gracilis (Euglenophyta)

Euglena gracilis bildet sowohl plastidäre als auch cytosolische Isoprenoide nach dem Acetat/MVA-Weg. Ob jedoch diese Alge den DOXP/MEP-Weg komplett verloren hat, oder ob dieser unter bestimmten physiologischen Bedingungen aktiv ist bzw. essentiell ist, ist unbekannt. Eine essentielle Funktion könnte jedoch durch Inhibitoren getestet werden.

Fosmidomycin zeigte allerdings keinerlei Wirkung auf das Wachstum und die Pigmentbildung, was zu erwarten war. Überraschenderweise hemmte auch Cerivastatin und die Kombination beider Hemmstoffe nicht. Eine mögliche Erklärung ist, dass Cerivastatin bei *Euglena* schlecht bzw. nicht aufgenommen wird und nicht zu dem Kompartiment der Isoprenoidbiosynthese gelangt.

Cyanidium caldarium (Rhodophyta)

Aufgrund von Markierungsstudien (Müller, 1997) war bei dieser Alge damit zu rechnen, dass eine Hemmung eines Isoprenoidbiosyntheseweges durch den anderen kompensiert werden könnte, da beide IPP-Biosynthesewege vorhanden sind. Außerdem wurde untersucht, ob nicht phosphorylierte Intermediate (Methylerythritol und Isopentenol) die hemmende Wirkung von Fosmidomycin aufheben können. Die Experimente wurden unter photo-autotrophen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3-7: Hemmung des Wachstums von *Cyanidium caldarium* durch Hemmstoffe der Isoprenoidbiosynthese. Das Wachstum der Algenkulturen unter photoautotrophen Bedingungen wurde 4 bis 6 Tage beobachtet (n=3). Sowohl Cerivastatin als auch Fosmidomycin führten zum Absterben der Algenkulturen. Die Hemmung durch Fosmidomycin ließ sich nicht durch Methylerythritol (ME) oder Isopentenol aufheben.

	Cerivastatin (10 nM)	Fosmidomycin (0,93 mM)	Fosmidomycin (0,93 mM) Isopentenol 0,01 %	Fosmidomycin (0,93 mM) Methylerythri- tol 0,01 %	Fosmidomycin 5 µM
Effekt	Absterben	Absterben	Wachstums- stillstand	Absterben	34 % Wachs- tumshemmung

Sowohl Cerivastatin (10 nM) als auch Fosmidomycin (0,93 mM) allein genommen führten zum Absterben der Algen (Tabelle 3-7). Die Hemmung des DOXP/MEP-Weges durch Fosmidomycin ließ sich nicht durch Methylerythritol aufheben. Isopentenol führte zu einem Wachstumsstillstand und konnte die Hemmung durch Fosmidomycin nicht kompensieren. Das Verhindern des Absterbens durch Isopentenol könnte entweder dadurch erklärt werden, dass ein geringer Anteil von Isopentenol zur Biosynthese plastidärer Isoprenoide verwendet wurde, oder dass Isopentenol als Kohlenstoffquelle verwertet wurde, da Fosmidomycin zu einer Hemmung der plastidären Isoprenoidbiosynthese führt, und damit wegen Mangel an Pigmenten und Prenylchinon kein photosynthetischer Elektronentransport und keine Photosynthese möglich ist. Wegen des sehr schwachen Effekts von Isopentenol wurde auf weitere Experimente verzichtet. Ohne Inhibitor war das Wachstum unbeeinflusst von der Zugabe von Isopentenol oder Methylerythritol.

Unter der Einwirkung von 5 µM Fosmidomycin wurde untersucht, ob bei Hemmung des DOXP/MEP-Weges verstärkt [2-¹³C]MVA und im geringeren Maße Me-[1-²H₁]DOX (Methylglykosid von DOX) in Phytol eingebaut wird. Im Falle von Me-[1-²H₁]DOX ergab sich in der Kontrolle eine Markierung von 86% der Isopreneinheiten von Phytol, während mit Fosmidomycin nur 64% der Isopreneinheiten markiert waren. Im Gegensatz zu früheren Versuchen mit einem allerdings sehr geringen MVA-Einbau von 7% (Müller, 1997) konnte jedoch kein Einbau von [2-¹³C]MVA in Phytol festgestellt werden.

***Ochromonas danica* (Heterokontophyta)**

Da *Ochromonas danica* unter photoautotrophen Bedingungen zunächst nicht wuchs, wurde in Anlehnung an das von der Göttinger Algensammlung empfohlene Medium ein Medium mit Hefeextrakt, Bactopepton und Vitaminzusatz (B₁, B₆ und B₁₂) verwendet und somit photoheterotroph angezogen. Später wurde Hefeextrakt und Bactopepton durch 0,1% Glucose ersetzt. Das Wachstum der Kulturen war bei beiden Ansätzen gleich gut.

An *Ochromonas danica* wurde die Wirkung von Cervistatin, Fosmidomycin, Clomazone und 5-Ketoclomazone untersucht. Ebenso wie bei *Cyanidium caldarium* wirkt Cerivastatin lethal bei *Ochromonas*. Eine Konzentration von 100 µM Cerivastatin führte zum Absterben der Kultur. Bei 100 µM Fosmidomycin wurde die Pigmentbildung unter heterotrophen Bedingungen komplett unterbunden, während das Wachstum um 39% vermindert war. Die Carotinoidakkumulation wurde stärker gehemmt als die Akkumulation von Chlorophyll *a* (Tabelle 3-8; Heterokontophyta besitzen kein Chlorophyll *b*). Bei 50 µM Fosmidomycin lag die Hemmung der Carotinoidakkumulation zwischen 88% und 100% und die der Chlorophyllakkumulation zwischen 80% und 100% und die Wachstumshemmung bei 38%. Weder mit Methylerythritol (0,2 mg/ml) noch mit einem Gemisch aus Isopentenol (3-Methyl-3-buten-1-ol) und Dimethylallylalkohol (3-Methyl-2-buten-1-ol; je 0,01%) konnte die Hemmung aufgehoben werden. Während Methylerythritol keinen Einfluss auf das Wachstum hatte, hemmten die freien Alkohole von IPP und DMAPP das Wachstum und Konzentrationen von 0,2% führten zum Absterben.

Tabelle 3-8: % Hemmung der Akkumulation der photosynthetischen Pigmente Chlorophyll *a* und Carotinoide in *Ochromonas danica* durch Fosmidomycin. Verglichen wurde der Pigmentgehalt in Bezug auf die Zelldichte. Als Maß hierfür wurde die Extinktion bei 560 nm einer 2,7 ml Reagenzglaskultur verwendet. Das Wachstum der Alge wurde bei 100 µM bzw. 56 µM Fosmidomycin zu 39% bzw. 38% gehemmt. Das Wachstum wurde 3 Tage beobachtet und anschließend der Chlorophyll- und Carotinoidgehalt bestimmt. Es wurden jeweils 3 parallele Ansätze durchgeführt.

Konzentration von Fosmidomycin	Chl <i>a</i>	Carotinoide	+ je 0,01% Isopentenol, Dimethylallylalkohol		+ 0,2 mg/ml Methylerythritol		
			Chl <i>a</i>	Carotinoide	Chl <i>a</i>	Carotinoide	
% Hemmung							
100 und 56 µM ¹	100	100					
50 µM	80	88			84	89	
10 µM	62	72	57 ²	67 ²			

¹ Basismedium mit 0,1% Bactopepton und 0,05% Hefeextrakt. Bei den anderen Experimenten wurde dem Basismedium 0,1% Glucose zugesetzt. Das Wachstum erfolgte bei allen Experimenten photoheterotroph.

² Das Gemisch der Alkohole hemmte das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle zu 16%, hatte aber keinen Einfluss auf die Pigmentakkumulation.

Sowohl Clomazone als auch 5-Ketoclomazone hemmten die Pigmentakkumulation (Tabelle 3-9). Auch hier war die Carotinoidbiosynthese stärker betroffen als die Chlorophyll *a* Bildung. 5-Ketoclomazone war um den Faktor 2,6 wirksamer als Clomazone. Die Hemmung der Carotinoidakkumulation bei 200 µM 5-Keto-clomazone bzw. Clomazone betrug 82% bzw. 31%, die des Chlorophylls 73% bzw. 28%. Bei 600 µM 5-Keto-

clomazone ergab sich eine Hemmung von 70% bzw. 57% mit einer deutlichen Wachstumshemmung von 38%. Die im Vergleich zu Fosmidomycin wesentlich stärkere Wachstumshemmung ließe sich gegebenenfalls durch Hemmung der Thiamin (Vitamin B₁) oder Pyridoxal (Vitamin B₆) Biosynthese erklären. Jedoch ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Wachstumshemmung mit und ohne Vitaminzusatz von B₁ und B₆.

Tabelle 3-9: % Hemmung der Pigmentakkumulation in *Ochromonas danica* durch Clomazone und 5-Ketoclomazone. Verglichen wurde der Pigmentgehalt in Bezug auf die Zelldichte. Als Maß für die Zelldichte wurde die Extinktion bei 560 nm einer 2,7 ml Reagenzglaskultur verwendet. Es wurden jeweils 3 parallele Ansätze durchgeführt.

	Chl a	Carotinoide	Wachstumshemmung
% Hemmung			
200 µM Clomazone ¹	28	31	11
200 µM 5-Ketoclomazone ¹	73	82	13
200 µM 5-Ketoclomazone ²	54	67	11
600 µM 5-Ketoclomazone ²	57	70	38
600 µM 5-Ketoclomazone ³	60	75	46

¹ Basismedium mit 0,1% Bactopepton und 0,05% Hefeextrakt. ²Basismedium mit 0,1% Glucose ohne Vitaminzusatz. ³Basismedium mit 0,1% Glucose und Vitaminzusatz (B₁, B₆ und B₁₂). Durch den Vitaminzusatz steigerte sich die Wachstumsrate um das 1,7-fache.

4 Diskussion

4.1 Enzyme des DOXP/MEP-Weges

4.1.1 Die DOXP-Synthase (DXS)

Die DOXP-Synthase wurde im Rahmen dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Ergrünung etiolierter Gerste untersucht und die Änderung ihrer Aktivität bei Belichtung ermittelt (siehe Abschnitt 4.2.1). Darüber hinaus konnte auch in Chloroplasten von Spinat und Erbse DXS-Aktivität detektiert werden. Für Hemmstofftests wurde auch die rekombinante DOXP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii*, welche von Herrn Dr. Schwender an unserem Institut kloniert worden ist (Schwender *et al.*, 1999), und auch jene aus *E. coli* eingesetzt, die mir von Herrn Prof. Boronat, Barcelona, zur Verfügung gestellt wurde. Die Entdeckung der DOXP-Synthase wurde schon in der Einleitung besprochen. Inzwischen kann die DOXP-Synthase in zwei Typen DXS1 und DXS2, die jeweils über eine Chloroplasten-Transitpeptidsequenz verfügen, eingeteilt werden (Walter *et al.*, 2002). Während in *Arabidopsis thaliana* wahrscheinlich nur eine Kopie der DXS vorhanden ist, wurden zunächst in *Medicago truncatula* zwei unterschiedliche DXS-Sequenzen gefunden, eine die eine hohe Homologie zur DXS aus *Arabidopsis thaliana* aufweist (DXS1), eine andere mit hoher Homologie zur DXS aus *Mentha piperita* (Walter *et al.*, 2002). Bei der Suche in Datenbanken wurden in weiteren Pflanzen, jedoch nicht in *Arabidopsis thaliana*, ebenfalls diese zwei unterschiedlichen Typen gefunden (Walter *et al.*, 2002), welches die Unterteilung in zwei Typen ermöglichte. Die Funktion zweier weiterer DXS-ähnlicher Sequenzen in *Arabidopsis thaliana* ist noch unbekannt (Araki *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción und Boronat, 2002). Die zwei DXS Sequenzen (*dxsA* und *dxsB*), die schon in *Rhodobacter capsulatus* (Hahn *et al.*, 2001) beschrieben wurden, sind nur entfernt mit denen aus Pflanzen verwandt.

4.1.2 Die DOXP-Reduktoisomerase (DXR)

Das zweite Enzym der plastidären Isoprenoidbiosynthese bzw. das erste DOXP/MEP-Weg spezifische Enzym, die DOXP-Reduktoisomerase, katalysiert die intramolekulare Umlagerung von DOXP und seine Reduktion mit NADPH zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP). Als ein mögliches Zwischenprodukt tritt dabei Methylerythrose-4-phosphat auf (Abbildung 4-1). Als Reaktionsmechanismus kommt entweder eine Ketolumlagerung in Betracht oder möglicherweise eine Retroaldolkondensation, bei der zunächst eine Spaltung in Glykolaldehyd-phosphat und Hydroxyaceton erfolgt, gefolgt von einer Aldolkondensation (Hoeffler *et al.*, 2002a).

Die Reaktion ähnelt derjenigen der Ketolsäurereduktoisomerase (KARI) im Biosyntheseweg der verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin, die DXR weist aber keine Sequenzhomologie mit der KARI auf (Takahashi *et al.*, 1998). Die Ähnlichkeit in der katalysierten Reaktion zwischen DXR und KARI war auch die Basis für die Entdeckung, dass Fosmidomycin die DXR blockiert, da es ein Strukturanalogon des Zwischenprodukts der DXR-Reaktion ist, ähnlich wie IpOHA ein Strukturanalogon vom Zwischenprodukt der KARI-Reaktion ist (Zeidler *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Kenngrößen des pflanzlichen Enzyms aus *Arabidopsis thaliana* und Gerste bestimmt. Zunächst konnte DXR-Aktivität in Proteinrohextrakten von etiolierter Gerste nachgewiesen werden, und später konnte die DXR-Aktivität in Etiochloroplasten von Gerste lokalisiert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der Lokalisierung des DOXP/MEP-Weges in Plastiden. Für die weitere Charakterisierung der DXR wurde mit dem rekombinanten Enzym aus *Arabidopsis thaliana* (Schwender *et al.*, 1999) gearbeitet.

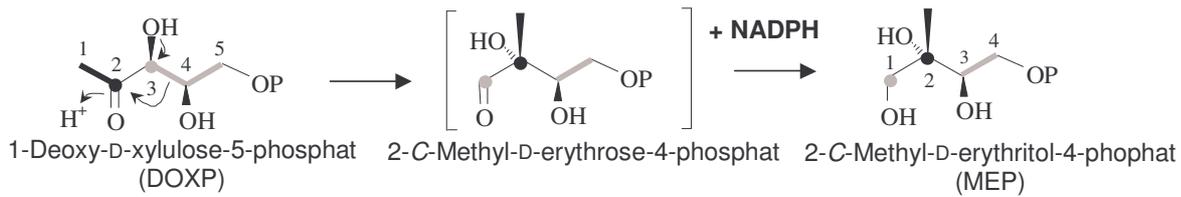


Abbildung 4-1: Intramolekulare Umlagerung und Reduktion von DOXP zu MEP, katalysiert von der DOXP-Reduktoisomerase. Zunächst erfolgt eine Umlagerung zu 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat, gefolgt von einer NADPH abhängigen Reduktion. Die Bindung der Substrate erfolgt sequentiell: Zunächst NADPH und anschließend DOXP (Koppisch *et al.*, 2002).

Die ersten Untersuchungen zur DXR aus *E. coli* (Takahashi *et al.*, 1998) zeigten, dass zu Katalyse 2-wertige Kationen benötigt werden, wobei Mn^{2+} zur höchsten Aktivität führte. In einer neueren Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe wurde dann jedoch Co^{2+} als das physiologisch relevante Kation beschrieben (Kuzuyama *et al.*, 2000a). Koppisch *et al.* (2002) vermutete, dass nicht Mn^{2+} das physiologisch relevante Kation in *E. coli* ist, da sie keine Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Kationen (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+}) fanden, und die intrazelluläre Konzentration an Mg^{2+} wesentlich höher ist als die Mn^{2+} - oder Co^{2+} -Konzentration. Da bei Pflanzen gerade die Mg^{2+} -Konzentration im Stroma eine wichtige Rolle bei der Regulation von Stromaproteinen spielt (Richter, 1988), wurde in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit der DOXP-Reduktoisomerase-Aktivität von der Mg^{2+} -Konzentration untersucht. Während die Mg^{2+} -Konzentration im Dunkeln im Stroma bei 2 mM liegt, erhöht sie sich auf 4 mM bei Belichtung (Marschner, 1986). Die Aktivität der DXR aus Gerste erhöhte sich bei 5,5 mM Mg^{2+} um 14,6% im Vergleich zu 1,5 mM, so dass sich nur eine geringe Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration ergab. Dagegen erhöhte sich die Aktivität der Gerste-DXR um das 2,6-fache bei Erhöhung des pH-Wertes von 7 auf 8, der gleichzeitig das Optimum markiert, was typisch für Stromaproteine ist. Im Vergleich hierzu besitzt die *E. coli*-DXR ein breites pH Optimum. Zwischen pH 7 und pH 8,5 beträgt die Aktivität mindestens 75% der Maximalgeschwindigkeit (Kuzuyama *et al.*, 2000a). Insgesamt ergibt sich eine Regulation der pflanzlichen DXR über den pH-Wert und weniger über die Mg^{2+} -Konzentration. Die Aktivität der DXR ist somit an die Photosynthese in Chloroplasten gekoppelt, wobei sich der pH-Wert im Stroma in Abhängigkeit von der Photosyntheseleistung erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die K_m -Werte für NADPH und DOXP der rekombinanten DXR aus *Arabidopsis thaliana* bestimmt. Der $K_{m\text{DOXP}}$ betrug 108 μM und der $K_{m\text{NADPH}}$ 7,2 μM und entspricht somit den bei der DXR aus *E. coli* gefundenen Werten. Für das Enzym aus *E. coli* wurden als $K_{m\text{DOXP}}$ bzw. $K_{m\text{NADPH}}$ 99 μM bzw. 18 μM (Kuzuyama *et al.*, 2000a), 115 μM bzw. 0,5 μM (Koppisch *et al.*, 2002) und 97 μM für DOXP (Hoeffler *et al.*, 2002a) in Anwesenheit von Mg^{2+} ermittelt. Die DXR wurde darüber hinaus auch bei *Streptomyces coelicolor* (Cane *et al.*, 2001) und *Zymomonas mobilis* (Grolle *et al.*, 2000) untersucht. Der K_m -Wert für DOXP lag bei 190 μM (*S. coelicolor*) und bei 300 μM (*Z. mobilis*), für NADPH wurden K_m -Werte von 190 μM (*S. coelicolor*) und 5 μM (*Z. mobilis*) ermittelt. Während sich die $K_{m\text{DOXP}}$ -Werte wenig unterscheiden, ergaben sich große Unterschiede in den K_m -Werten für NADPH. Letztere betragen bis auf *S. coelicolor* nur einen Bruchteil des $K_{m\text{DOXP}}$. Während die endogene DOXP-Konzentration im Chloroplasten nicht bekannt ist, wurde in Chloroplasten von Spinat der NADP(H) Gehalt bestimmt (Heineke *et al.*, 1991). Er betrug im Licht 0,9 mM und im Dunkeln 0,6 mM. Als Verhältnis NADPH/NADP ergab sich im Licht 0,5 und im Dunkeln 0,23, so dass selbst im Dunkeln die NADPH Konzentration den $K_{m\text{NADPH}}$ -Wert der DXR bei weitem übersteigt.

Wenn jedoch die DOXP-Konzentration im Chloroplasten nicht sättigend ist, muss der apparente K_{mNADPH} betrachtet werden, der von der DOXP-Konzentration und von K_{iNADPH} (Dissoziationskonstante des Enzym-NADPH Komplexes) abhängt, so dass der apparente Wert höher liegen kann. Dieser berechnet sich über

$$K_{mNADPH}^{app} = \frac{K_{iNADPH} K_{mDOXP} + K_{mNADPH} [DOXP]}{K_{mDOXP} + [DOXP]} \quad (\text{Cornish-Bowden, 1995}).$$

Ist kein DOXP vorhanden, ist der K_{mNADPH}^{app} identisch mit dem K_{iNADPH} . Bei Erhöhung der DOXP-Konzentration nähert sich der K_{mNADPH}^{app} dem tatsächlichen K_{mNADPH} , d.h. wenn der K_{iNADPH} größer als der K_{mDOXP} ist, sinkt der apparente K_m -Wert und umgekehrt steigt er.

Bisher ist der K_{iNADPH} Wert noch nicht bestimmt worden. Neben der Abhängigkeit von der NADPH Konzentration kann auch eine Produkthemmung durch NADP eine Rolle spielen, die sich schon durch die Reversibilität der Reaktion ergibt, so dass eine Regulation möglicherweise über das Verhältnis NADPH/NADP⁺ erfolgt. Bei der Ketolsäurereduktisomerase (KARI) aus Spinat, die eine ähnliche Reaktion wie die DXR katalysiert und im Plastiden lokalisiert ist, wurde ebenfalls ein niedriger K_m -Wert für NADPH von 5,7 μ M gefunden, und das Enzym wurde durch NADP⁺ gehemmt (Dumas *et al.*, 1989). Aus der Hemmung durch NADP⁺ wurde gefolgert, dass KARI durch das Verhältnis NADPH/NADP⁺ reguliert wird, das wie auch die Mg²⁺-Konzentration die Photosyntheseaktivität der Chloroplasten widerspiegelt.

Ein weiterer Faktor, der die Aktivität der DXR in Abhängigkeit der Photosynthesaktivität reguliert, ist Thioredoxin, welchem eine entscheidende Rolle bei der Lichtaktivierung einiger Chloroplastenenzyme zukommt (Richter, 1988). Zur Identifizierung Thioredoxin-abhängiger Enzyme wurde ein Affinitätschromatographie mit an einer Säule gekoppeltem Thioredoxin durchgeführt (Balmer *et al.*, 2003). Als Thioredoxin-abhängige Enzyme des DOXP/MEP-Weges konnten hierbei die DXR und HMBPP-Synthase (*gcpE*) identifiziert werden.

Kloniert wurde das Enzym DXR erstmals aus *E. coli* (Takahashi *et al.*, 1998). Bekannt war bis dahin, dass im Schritt nach der DOXP-Synthese Methylerythritol gebildet wird (Duvold, *et al.*, 1997a, Duvold, *et al.*, 1997b), welches von *E. coli* in Isoprenoide eingebaut werden kann. Dies wurde zur Identifikation der entsprechenden Reduktisomerase genutzt, indem nach Mutanten gesucht wurde, die Methylerythritol für das Wachstum benötigten, und dadurch das entsprechende Gen kloniert. In der Folge wurde die DXR bei uns am Institut von Herrn J. Schwender aus *Arabidopsis thaliana* kloniert (Schwender *et al.*, 1999), aus Pfefferminze (Lange und Croteau, 1999a), *Plasmodium falciparum* (Jomaa *et al.*, 1999a) und verschiedenen Bakterien u.a. *Pseudomonas aeruginosa* (Altincicek *et al.*, 2000), *Zymomonas mobilis* (Grolle *et al.*, 2000), *Synechococcus leopoliensis* (Miller *et al.*, 2000) und *Streptomyces coelicolor* (Cane *et al.*, 2001). Das Reduktionsmittel ist hauptsächlich NADPH, während NADH nicht als Cofaktor dient (Takahashi *et al.*, 1998).

Die Bindung der Substrate erfolgt sequentiell an die DXR, zunächst wird NADPH gebunden und anschließend DOXP (Koppisch *et al.*, 2002). Dies wurde ermittelt mit Hilfe von Fosmidomycin, das ein Struktur analogon zu Methylerythrosephosphat ist (s.u), und Dihydro-NADPH (NADPH₃), ein nicht reaktives Analogon zu NADPH. Fosmidomycin hemmt die DXR kompetitiv bezüglich DOXP bzw. unkompetitiv bezüglich NADPH. NADPH₃ ist ein kompetitiver Inhibitor bezüglich NADPH, und ein nicht-kompetitiver Inhibitor bez. DOXP. Dieses Hemmmuster entspricht einem sequentiellen Modell. Bei der Reduktion von DOXP wird das proS Hydrid-Ion von NADPH auf die Re-Seite des Aldehyds von dem möglichen Zwischenprodukt Methylerythrose-4-phosphat übertragen. Die

DXR ist somit eine Klasse B-Dehydrogenase (Radykewicz *et al.*, 2000). Dies wurde auch bei der DXR von *Synechocystis* sp. PCC6803 (Proteau *et al.*, 1999) und *Liriodendron tulipifera* (Arigoni *et al.*, 1999b) gefunden.

Die Umsetzung von DOXP nach MEP ist reversibel, wobei das Gleichgewicht jedoch auf der Produktseite liegt. Die Gleichgewichtskonstante $K_{eq} = \frac{[NADP^+][MEP]}{[NADPH][DOXP]}$ liegt bei 45 ± 6 bei einem pH von 7,6 und 37°C . Unter Berücksichtigung des pH-Wertes ergibt sich $4,6 \pm 0,5 \times 10^{-10} \text{ M}$ ($[H^+]/K_{eq}$ Hoeffler *et al.*, 2002a) und daraus berechnet bei einem pH von 7,6 eine Gleichgewichtskonstante von 55, welche etwas höher liegt als die bei Koppisch *et al.* (2002) angegebene. Die K_m -Werte betragen für MEP $330 \mu\text{M}$ und für $NADP^+$ $25 \mu\text{M}$ (Koppisch *et al.*, 2002). Das mögliche Intermediat der Reaktion, Methylerythrosephosphat lässt sich nicht nachweisen, jedoch wird es vom Enzym mit NADPH zu MEP umgesetzt ($K_m=158 \mu\text{M}$), so dass dieses als Zwischenprodukt höchst wahrscheinlich ist. An sich sollte die Umlagerung von DOXP unabhängig vom Cosubstrat NADPH sein. Bei Zugabe von NADPH-Analoga, die die Reduktion unterbinden, sollte sich demnach Methylerythrosephosphat nachweisen lassen, was jedoch nicht gelang (Hoeffler *et al.*, 2002a).

Die DOXP-Reduktoisomerase ist inzwischen kristallisiert worden (Reuter *et al.*, 2002; Yajima *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme, das Enzym läge als Homotetramer vor (Takahashi *et al.*, 1998), ergab sich als Quartärstruktur ein Homodimer. Die Bindung der Substrate führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung, eine flexible Schleife verschließt das Reaktionszentrum, so dass das Reaktionszentrum vom umgebenden Wasser abgeschirmt ist.

4.1.3 Suche nach weiteren Zwischenprodukten

Als mögliches Reaktionsschema zur Umwandlung von MEP in IPP oder DMAPP wurden von mir abwechselnde Dehydratationen und Reduktionen der Doppelbindung wie bei Teilschritten der Fettsäurebiosynthese bzw. Reduktionen von OH Gruppen angenommen, wobei sowohl IPP als auch DMAPP als Endprodukte in Betracht kamen. Unter der Annahme eines reversiblen letzten Schrittes schien nach diesem Schema eine Wasserabspaltung unter Ausbildung einer Doppelbindung eine erfolgsversprechende Möglichkeit zu sein, ein weiteres Zwischenprodukt zu entdecken, wobei mit IPP als auch DMAPP als möglichem Endprodukt gerechnet wurde. So ist von anderen Hydratationsreaktionen bekannt, dass sie reversibel sind, z.B. katalysiert die Fumarase die reversible Hydratation von Fumarat zu Malat, wobei das Gleichgewicht auf der Seite von Malat liegt (Karlson, 1988). Trotz intensiver Suche konnten keine Hydratationsprodukte weder von DMAPP noch von IPP unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen nachgewiesen werden. Nachdem während meiner Untersuchungen als letzter Schritt des DOXP/MEP-Weges die Reduktion von 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyl-diphosphat (HMBPP) zu IPP und DMAPP durch *lytB* bekannt wurde (vgl. 4.4.1), wurde versucht, eine Oxidation von IPP oder DMAPP durch $NADP^+$ nachzuweisen, was jedoch nicht gelang. Der Grund könnte entweder an einer zu geringen Aktivität liegen, oder daran dass die Reaktion nicht reversibel ist. Für letzteres spricht folgende Beobachtung: In MVA-verwertenden *E. coli* Stämmen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass *idi* die einzige IPP-Isomerase in *E. coli* ist (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000). Wenn jedoch die letzte Reaktion des DOXP/MEP-Weges reversibel ist, sollte aus IPP über HMBPP DMAPP entstehen können, d.h. *lytB* sollte in gewissem Umfang als Ersatz einer IPP-Isomerase fungieren können, was jedoch nicht festgestellt worden ist. Die Abwesenheit einer IPP-Isomerase Aktivität wurde auch *in vitro* in Zellextrakten von *Synechocystis* mit und ohne Zusatz von FAD/FMN und NADPH nach-

gewiesen (Ershov *et al.*, 2000; Ershov *et al.*, 2002⁴). Leider wurde hier nicht NADP⁺, das Substrat der möglichen Rückreaktion von LytB, getestet.

Während für LytB aus *E. coli* NADH als besseres Substrat als NADPH beschrieben wurde (Adam *et al.*, 2002), wurden beim Einbau von HMBPP in Phytoen von Chromoplasten ATP, NADPH und NADP⁺ als Cofaktoren (Gao *et al.*, 2002) verwendet. Deswegen wurde bei den Untersuchungen NADP⁺ und nicht NAD⁺ gewählt.

4.2 Regulation des DOXP/MEP-Weges

Wegen der Bedeutung des DOXP/MEP-Weges für die Biosynthese von wesentlichen Komponenten der Photosynthese (Chlorophylle, Carotinoide, Plastochinon-9) war eine Regulation dieses Biosyntheseweges durch Licht bei der Ergrünung etiolierter Pflanzen zu erwarten. Untersucht wurde die Aktivitätsänderung der ersten beiden Enzyme, DXS und DXR, während der Ergrünung der Blätter von im Dunkeln angezogenen Pflanzen. Die regulatorische Funktion von DXS und DXR im DOXP/MEP-Weg ist inzwischen durch eine Vielzahl von Untersuchungen sowohl an Bakterien als auch Pflanzen belegt (siehe unten).

Mittels radioaktiver Tests konnte DXS- und DXR-Aktivität in Etiochloroplasten aus Gerste nachgewiesen werden. Beide Reaktionen ließen sich durch Inhibitoren dieser Enzyme hemmen, die DXS durch 5-Ketoclofazone, und die DXR durch Fosmidomycin. Bei der DXS wurde zusätzlich das Produkt DOXP nach Dephosphorylierung und Acetylierung für den GC/MS-Nachweis als DOX-3,4,5-triacetat mittels GC/MS identifiziert durch Vergleich mit authentischem DOX-3,4,5-triacetat. Eine Bildung von DOXP als Nebenprodukt eines anderen Enzyms wäre denkbar gewesen, wurde aber aus folgenden Gründen ausgeschlossen. Thiamin-abhängige Enzyme unterscheiden sich sehr in ihrer Substratspezifität und werden zur Synthese von Kohlenhydraten und Derivaten eingesetzt (Schörken und Sprenger, 1998). So konnte eine Thiamin-abhängige DOX-Bildung aus Glycerinaldehyd und Pyruvat in Proteinrohextrakten vieler Bakterien, Actinomyceten, Hefen und Schimmelpilze nachgewiesen werden (Yokota und Sasajima, 1984). Ein Enzym, welches diese DOX-Bildung katalysiert, ist die Pyruvat-Dehydrogenase (Yokota und Sasajima, 1986). Eine Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität konnte jedoch in meinen Experimenten unter den Versuchsbedingungen nicht detektiert werden. In den Experimenten von Yokota und Sasajima (1984) konnte die Bildung von DOXP aus GAP und Pyruvat nur in *E. coli*-Rohextrakten nachgewiesen werden, jedoch mit einer sehr geringen Umsatzrate. In Proteinextrakten anderer Mikroorganismen war keine DOXP-Bildung nachweisbar. Die Bildung von DOXP aus GAP und Pyruvat wird offenbar nur durch die DXS katalysiert. Außerdem hemmte 5-Ketoclofazone die DOXP-Bildung in Etiochloroplasten. 5-Ketoclofazone erwies sich als ein Inhibitor der rekombinanten DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii* (vgl. 4.3.2).

Zunächst stellte sich die Frage nach einem geeigneten Bezugssystem für die Messung der Aktivität der DXS und DXR. Die Aktivitätsänderung bezüglich des Proteingehaltes während der Ergrünung zu messen, eignet sich nicht zur Ermittlung der Lichtregulation beider Enzyme, da eine Vielzahl von Chloroplasten-Proteinen durch Licht induziert werden wie z.B. die Rubisco, das bei weitem häufigste Enzym in Chloroplasten. Schon allein deswegen wäre eine Abnahme der DXS- und DXR-Enzym-Aktivitäten bezüglich des Proteingehaltes zu erwarten, unabhängig davon, ob DXR oder DXS induziert werden würde oder nicht. Als eine andere relative Bezugsgröße bietet sich der Carotinoidgehalt in den

⁴ In dieser Arbeit wurde u.a. untersucht, ob *Synechocystis* eine Klasse 2 IPP-Isomerase, die NADPH und FMN/FAD als Cofaktoren benötigt, besitzt, wie aufgrund von Sequenzhomologien vermutet wurde (Kaneda *et al.*, 2001). Aktivität wurde nicht gefunden.

verwendeten Etioplasten an. In den Primärbättern der etiolierten Gerstenkeimlinge sind schon Carotinoide enthalten, und der Gehalt an Carotinoiden pro Frisch- und Trockengewicht erhöhte sich um das 2 bis 2,4-fache innerhalb von 24 h nach Belichtung. Wenn die DXS und DXR durch Licht nicht stimuliert werden sollten, sollte sich eine Verringerung der Aktivität um den Faktor 2 bis 2,4 ergeben. Bei einer stärkeren Abnahme ergäbe sich eine negative Regulation, bei einer geringeren eine positive.

4.2.1 Änderung der DXS- und DXR-Aktivität bei der Ergrünung von Gerste

Die DOXP-Synthase-Aktivität bei Bezug auf den Carotinoidgehalt halbierte sich im Mittel innerhalb von 24 h Belichtung, während der Carotinoidgehalt sich in etwa verdoppelte. Somit ergab sich insgesamt, wenn überhaupt, nur eine schwache Zunahme der DXS-Aktivität in den Primärblättern der Gerste. Nach 48 h Ergrünung begann sich die DXS-Aktivität zu verringern und auch die Pigmentakkumulation nahm stark ab. Auch innerhalb der ersten 4 Stunden der Belichtung konnte keine Änderung der DXS-Aktivität festgestellt werden.

Auch bei der DXR war innerhalb der ersten 4 h nach Belichtung keine Änderung in der Aktivität der DXR zu erkennen. Jedoch war nach 24 h eine leichte Erhöhung der DXR-Aktivität in Bezug auf den Carotinoidgehalt nachzuweisen. Demnach wird die DXR, im Gegensatz zur DXS, bei der Ergrünung der Primärblätter von etiolierter Gerste durch Licht stimuliert.

Diese verzögerte Erhöhung der DXR-Aktivität spiegelt sich wieder in einer verzögerten Induktion der Carotinoidakkumulation bei Gerste. Während der ersten 6 h der Ergrünung ändert sich der Carotinoidgehalt, Plastochinon-9 und α -Tocopherol in Gerste kaum, um nach 6 h anzusteigen (Lichtenthaler, 1969). In Übereinstimmung wurde in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Erhöhung des Carotinoidgehalts nach 4 h festgestellt. Dies bedeutet eine starke Erhöhung der Isoprenoidbiosynthese nach 6 h, wie sich aus der Abschätzung des Fluss durch den DOXP/MEP-Weg unter den Versuchsbedingungen folgern lässt. Es ergab sich einer Erhöhung des Flusses im DOXP/MEP-Weg von $1,4 \text{ nmol IPP min}^{-1} (\text{g FG})^{-1}$ um ca. $1,5 \text{ nmol IPP min}^{-1} (\text{g FG})^{-1}$, was ungefähr einer Verdopplung entspricht. Die Induktion der DXR ist offenbar mit dieser Erhöhung verknüpft, und spricht für eine wichtige regulatorische Funktion der DXR bei der Ergrünung von Gerste.

Bei der Regulation des DOXP/MEP-Weges durch Licht in Gerste ist in den Blättern etiolierter Pflanzen zunächst sowohl DXS als auch DXR vorhanden. Mit der Belichtung erhöht sich parallel zur lichtinduzierten Chlorophyll-, Carotinoid-, Plastochinon-9- und Phyllochinon K_1 -Synthese (Lichtenthaler, 1969) die DXR-Aktivität innerhalb von 24 h, während die DXS-Aktivität im gleichen Zeitraum zunächst gleich bleibt.

Im Einklang mit dieser Interpretation stehen Untersuchungen zur Expression der DXR und DXS in *Arabidopsis thaliana* (Carretero-Paulet *et al.*, 2002). DXS lässt sich in allen Geweben und auch Etioplasten nachweisen. Bei der Blütenbildung wird jedoch die DXR erst später induziert, das von den Autoren mit einer regulatorischen Funktion der DXR erklärt wird.

Ein Einfluss von Phytochrom sowohl auf DXS und DXR konnte nicht festgestellt werden. Dies stimmt überein mit der unveränderten DXS-Aktivität bei Belichtung mit Weißlicht in den 24-48 h der Ergrünung. Ebenfalls konnte kein kurzzeitiger Phytochromeffekt auf die DXR-Aktivität innerhalb 3 h festgestellt werden in Übereinstimmung mit unveränderter Aktivität während der ersten 4 h. Zur weiteren Untersuchung der Phytochromeffekte bei der Ergrünung von Gerste sind längere Untersuchungszeiträume notwendig. Dass die

lichtinduzierte Aktivitätserhöhung der DXR durch aktives Phytochrom ausgelöst werden könnte ist denkbar, da für die lichtinduzierte Carotinoidakkumulation ein klarer Phytochromeffekt nachgewiesen wurde.

4.2.2 Regulation des DOXP/MEP-Weges

Die DOXP-Synthase:

Die Bedeutung der DOXP-Synthase für die Entwicklung von Pflanzen ergab sich durch Identifikation von Mutanten dieses Enzyms. Es wurde ein Gen, *cla1*, mit zunächst unbekannter Funktion, welches für die Chloroplastenentwicklung essentiell ist, in *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Mandel *et al.*, 1996). Später konnte seine Identität mit der DOXP-Synthase nachgewiesen werden (Araki *et al.*, 2000; Estéves *et al.*, 2000). Ein Ausschalten der DXS führte zu einem Albinotyp (ohne Chlorophylle und Carotinoide), bei dem die Plastidenentwicklung in einem frühen Stadium arretiert ist, die Plastiden den Proplastiden ähneln und keine Pigmente akkumulieren. Der Phänotyp war nicht auf eine Hemmung der Vitaminbiosynthese zurückzuführen, da diese dem Medium zugesetzt waren (Estéves *et al.*, 2000). Ein Basenaustausch in *CLA1* führte bei niederen Temperaturen zu Chlorosen hauptsächlich in jungem, sich entwickelndem Gewebe (Araki *et al.*, 2000). DXS-Expression konnte in allen Geweben nachgewiesen werden, insbesondere in jungem Gewebe. Im Gegensatz hierzu ergaben sich Unterschiede bei der Analyse der Proteinmenge. In Wurzeln konnte kaum DXS nachgewiesen werden. Mit der Reifung der Organe erhöhte sich auch die Menge an DXS bis zu einem Maximum, danach fiel die Menge ab (Estéves *et al.*, 2000). Untersuchungen mit transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen ergaben bei einer Überexpression bzw. verringerten Expression einen erhöhten bzw. geringeren Gehalt an plastidären Isoprenoiden (Chlorophylle, Carotinoide, α -Tocopherol und ABA; Estéves *et al.*, 2001). Dies steht in Einklang mit der DXS als einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im DOXP/MEP-Weg. Es wurde jedoch vermutet, dass noch andere Schritte an der Regulation der Isoprenoidbiosynthese beteiligt sind. DXS wurde positiv reguliert in dunkeladaptierten Keimlingen (8 Tage Licht/Dunkelwechsel, 3 Tage dunkel, Mandel *et al.*; 1996). In Tomate ließ sich DXS-Transcript in allen Geweben nachweisen, jedoch kaum in der Wurzel (Lois *et al.*, 2000). Während der Sekundärcarotinoidakkumulation bei der Reifung der Tomaten steigt die DXS-Expression sehr stark an ähnlich wie jene der Phytoensynthese, um im späten Stadium wieder abzufallen. Im Unterschied zur DXS erhöht sich der Gehalt an mRNA der Phytoensynthese jedoch schon früher im noch grünen Zustand der Früchte. Demnach hat die DXS eine entscheidende Rolle beim Beginn der Reifung von Tomaten, indem erst die Erhöhung der DXS-Menge die Bereitstellung einer ausreichenden Menge von GGPP für die Phytoensynthese ermöglicht (Lois *et al.*, 2000). Auch beim Übergang von Chloroplasten zu Chromoplasten in Paprikafrüchten war eine erhöhte Expression der DXS festgestellt worden (Bouvier *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel ist die Induktion der DXS-Transkription während der Besiedlung von Wurzeln einiger Gräser durch Mycorrhiza-Pilze (Walter *et al.*, 2000).

Die DOXP-Reduktoisomerase:

Zur Regulation der DXR gibt es unterschiedliche Erkenntnisse. Während der Reifung von Tomaten fand sich keine Erhöhung weder der mRNA noch des Proteins, was gegen eine regulatorische Funktion der DXR spricht (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001). In Pfefferminze (*Mentha piperita*) führte jedoch eine Überexpression der DXR zu einer Erhöhung des Monoterpengehaltes in Blättern, während eine Unterdrückung zu einer Verringerung führte (Mahmoud und Croteau, 2001). Auch bei der Ausbildung der Mycorrhiza bei Gräsern konnte neben der Induktion der DXS auch eine Induktion der DXR beobachtet werden (Walter *et al.*, 2000). Das Expressionsmuster der DXR in *Arabidopsis thaliana*

entspricht dem der DXS. Beide werden besonders in jungem, sich entwickelndem Gewebe (Carretero-Paulet *et al.*, 2002) exprimiert. Ähnlich wie im Falle der DXS ergab sich eine positive Regulation der DXR Expression durch Licht in etiolierten Keimlingen. Im Gegensatz zur DXS schien jedoch die Expression in einigen Entwicklungsstadien wesentlich geringer zu sein z.B. im Spross ausgewachsener Pflanzen.

Die restriktivere Expression der DXR in *Arabidopsis thaliana* ließe sich erklären durch die Doppelfunktion der DXS, die auch möglicherweise verantwortlich für die Biosynthese von Thiamin und Pyridoxal ist, so dass der DXR eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation des DOXP/MEP-Weges zukommt. Auch die erhöhte Expression der DXR und die unveränderte der DXS unter der Einwirkung von Fosmidomycin, einem spezifischen Hemmstoff der DXR (siehe Abschnitt 4.3.1), spricht hierfür (Carretero-Paulet *et al.*, 2002).

Die Reversibilität der DXR Reaktion (Koppisch *et al.*, 2002), bzw. die Beobachtung dass in transgenen *E. coli*-Stämmen eine Überexpression der DXR nicht zu einer erhöhten Carotinoidakkumulation führt (Miller *et al.*, 2000), wurde als Indiz angesehen, dass nicht die DXR sondern die DXS der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Jedoch liegt das Reaktionsgleichgewicht der DXR auf der Seite der Produkte. Im allgemeinen unterliegen diejenigen Reaktionen eines Stoffwechselweges einer Regulation, die weit von ihrem Gleichgewicht *in vivo* entfernt sind (Voet und Voet, 1994), d.h. zur Beurteilung dieser Frage muss die *in vivo* Freie Reaktionsenthalpie ΔG der Reaktion in der Zelle bekannt sein, die im Falle der DXR u.a. abhängig von der Konzentration an DOXP und MEP ist. ΔG kann sich von der Freien Standardreaktionsenthalpie ΔG^0 durchaus unterscheiden (Voet und Voet, 1994).

Bis auf die Ergebnisse bei Tomate und *E. coli* spricht insoweit alles dafür, dass sowohl DXS als auch DXR an der Regulation des DOXP/MEP-Weges beteiligt sind. Offenbar gibt es jedoch Unterschiede zwischen den Organismen, ob eher die DXS einen limitierenden Schritt des DOXP/MEP-Weges darstellt (z.B. Reifung der Tomate, s.o.) oder eher die DXR (Blütenbildung in *Arabidopsis thaliana*, s.o.). Bei der Ergrünung von etiolierter Gerste übernimmt die DXR eine wichtige regulatorische Funktion, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Die DXR-Aktivität erhöht sich innerhalb der ersten 24 h, während die DXS-Aktivität sich nicht oder nur wenig erhöht.

Regulation weiterer Enzyme des DOXP/MEP-Weges

Eine Unterdrückung der Expression CDP-ME-Synthase (siehe Abbildung 4-5) führte in *Arabidopsis thaliana* zu einer Verringerung der Pigment- und *ent*-Kaurenakkumulation, der Vorstufe der Gibberelline (Okada *et al.*, 2002). Bei der Induktion der Biosynthese von Indolalkaloiden mit einem Monoterpenanteil in *Catharantus roseus* Zellkulturen wurde eine erhöhte Expression von DXS, DXR und MEcPP-Synthase (siehe Abbildung 4-5) festgestellt (Veau *et al.*, 2000).

Es wurde schon früher spekuliert, dass die IPP-Isomerase eine geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese plastidärer Isoprenoide darstellt (Albrecht und Sandmann, 1994). Im Einklang hiermit steht die Erhöhung der IPP-Isomerase-Aktivität bei Belichtung von Maisetioplasten (Albrecht und Sandmann, 1994), und die erhöhte Expression einer der zwei gefundenen IPP-Isomerasen in der Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Sun *et al.*, 1998) bei Erhöhung der Beleuchtungsstärke. Die mehrfach gefundene erhöhte Carotinoidakkumulation bei Überexpression der IPP-Isomerase in entsprechend genetisch veränderten *E. coli* Stämmen (Kajiwara *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 2000) lässt sich weniger durch eine regulatorische Funktion als durch ein schnelles Einstellen des IPP/DMAPP-Gleichgewichts erklären (siehe Abschnitt 4.4), da die IPP-Isomerase für das Wachstum in *E. coli* nicht notwendig ist (Hahn *et al.*, 1999), und die Enzymaktivität in

E. coli kaum nachweisbar ist (Hoeffler *et al.*, 2002b). Ähnlich verhält es sich bei dem Cyanobakterium *Synechocystis*, dem eine IPP-Isomerase fehlt (Ershov *et al.*, 2000; Ershov *et al.*, 2002).

4.3 Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Derivate von Clomazone, Fosmidomycin und weitere Phosphonate, Acetylmethylphosphinat (AMPI) und zwei effektive Hemmstoffe der Isoprenemission, Aminooxyacetat und L-Cycloserin, untersucht. Die letzteren beiden sind Hemmstoffe Vitamin B₆-abhängiger Enzymreaktionen, und wie zu erwarten war, ergab sich keine Hemmwirkung im DXS- und DXR-Enzymtest. Als einzige Hemmstoffe der DOXP-Reduktoisomerase konnten Fosmidomycin und FR900098 und als Hemmstoffe der DOXP-Synthase 5-Ketoclomazone, ein Abbauprodukt des Herbizids Clomazone, sowie AMPI identifiziert werden.

AMPI ist ein Hemmstoff der mitochondrialen (Baillie *et al.*, 1988) und plastidären Pyruvatdehydrogenase (Golz und Lichtenthaler, 1984) und ist herbizidal wirksam. Es bindet wahrscheinlich irreversibel an das Enzym, indem es statt Pyruvat an Thiamin bindet. AMPI erwies sich auch als Hemmstoff der DOXP-Synthase, die einen ähnlichen Reaktionsmechanismus aufweist. Jedoch betrug die Hemmung bei 100 µM nur 56%. Obwohl nach diesen Ergebnissen eine Hemmung des DOXP/MEP-Weges und damit der Isoprenemission durch AMPI zu erwarten ist, stimulierte AMPI allerdings die Isoprenemission (Zeidler, 2001). Jedoch führt AMPI andererseits zu einer Erhöhung der Pyruvatkonzentration bei Gerste (Baillie *et al.*, 1988), so dass die höhere Pyruvatkonzentration der Hemmung der DXS entgegenwirken könnte. Notwendig zur Klärung der Frage, warum AMPI trotz der Hemmung der DXS die Isoprenemission fördert, ist eine genaue Charakterisierung der Hemmung, z.B. ob eine irreversible Hemmung wie im Falle der Pyruvatdehydrogenase vorliegt. Eine erhöhte Pyruvatkonzentration könnte dagegen die Hemmung aufheben, sofern AMPI die DXS in Bezug auf Pyruvat kompetitiv hemmt.

4.3.1 Fosmidomycin

Fosmidomycin und weitere verwandte Phosphonate sind Antibiotika, die aus Streptomyces Stämmen von der Fujisawa Pharmaceutical Co. in den 80er Jahren isoliert worden sind (siehe Abbildung 4-2, Okuhara *et al.*, 1980). Neben der antibakteriellen Wirkung besitzt Fosmidomycin auch herbizide Wirkung, indem die Isoprenoidbiosynthese in Pflanzen gehemmt wird (Kamuro *et al.*, 1989).

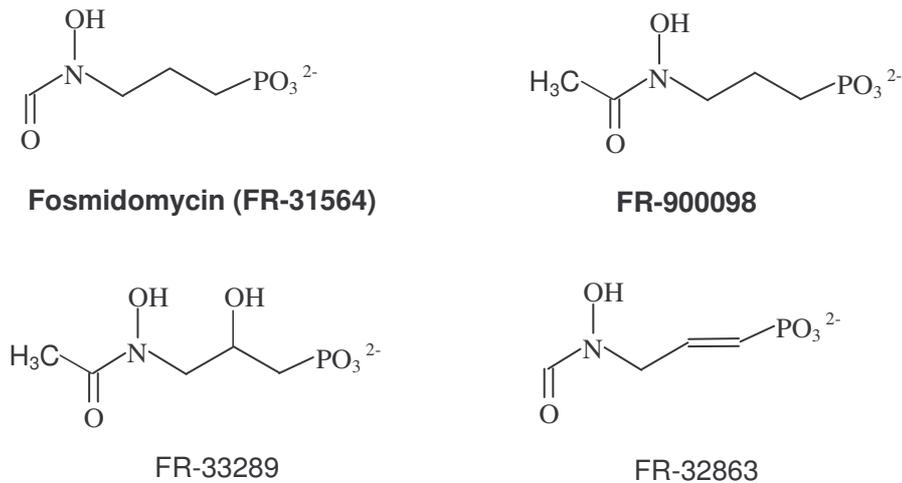


Abbildung 4-2: Chemische Struktur von Fosmidomycin und weiteren Phosphonaten, die aus *Streptomyces* Stämmen isoliert worden sind. Fosmidomycin ist die wirksamste Komponente und hemmt die Isoprenoidbiosynthese in Bakterien und Pflanzen durch Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase (Kuzuyama *et al.*, 1998; Zeidler *et al.*, 1998; Schwender *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2000). Die Hemmung der DXR konnte auch für FR-900098 gezeigt werden.

Bei *E. coli* führt Fosmidomycin zur Verringerung des Ubi- und Menachinongehaltes und zu einer Störung der Zellwandbiosynthese, indem die Synthese von Undecaprenyldiphosphat gehemmt wird, das zum Transport von Zuckern über die Membran benötigt wird. Dadurch kommt es zur Bildung von Sphäroplasten, kugelförmig angeschwollenen Zellen. Die Beobachtung, dass Fosmidomycin nur solche Bakterien hemmt, die Mevalonat kaum in Isoprenoide einbauen, wurde zunächst damit erklärt, dass nur für Fosmidomycin sensitive Bakterien eine eigene Isoprenoidbiosynthese essentiell ist. Es sollte ein früher Schritt der Isoprenoidbiosynthese gehemmt werden, möglicherweise die Bildung von Farnesylpyrophosphat (Shigi, 1989). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch nichts von einem Mevalonat-unabhängigen Isoprenoidbiosyntheseweg bekannt. Herr Zeidler am Institut Botanik II, Karlsruhe, zog den Schluss, dass Fosmidomycin ein Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges sei (Zeidler, 2001). Als Wirkungsort kam die DOXP-Reduktoisomerase in Betracht. Dies ergab sich auch durch Vergleich mit der Ketolsäurereduktoisomerase (KARI), die eine ähnliche Reaktion im Biosyntheseweg der verzweigten Aminosäuren katalysiert. Für die KARI existiert ein Analogon zum Übergangszustand N-Isopropyl-Oxalylhydroxamat (IpOHA), das dem möglichen Zwischenprodukt 3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoat ähnelt (Aulabaugh und Schloss, 1990). Übertragen auf die Reaktion der DXR und des möglichen Intermediats 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat, ließ sich folgern, dass Fosmidomycin ein potentieller Inhibitor der DXR ist (Abbildung 4-3; Zeidler, 2001).

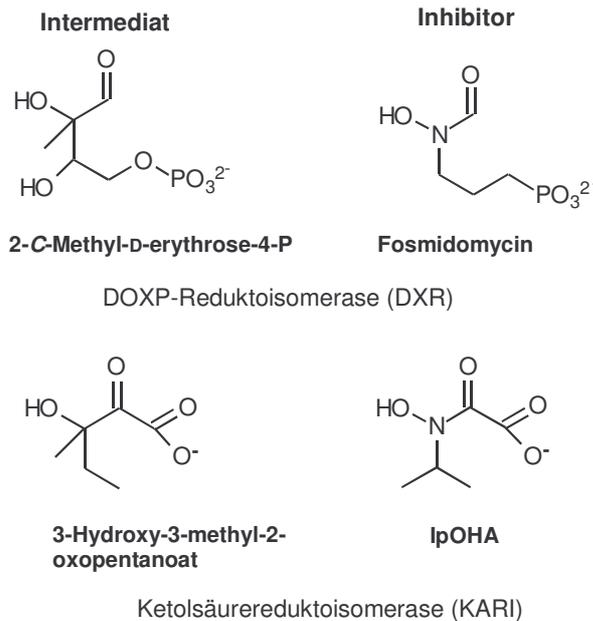


Abbildung 4-3: Vergleich der möglichen Zwischenprodukte mit Hemmstoffen der DXR und KARI (nach Zeidler, 2001). Fosmidomycin ist ein Strukturanalogon zu dem möglichen Zwischenprodukt 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat der DXR und IpOHA zu 3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoat der KARI.

Zunächst wurde Fosmidomycin von der BASF AG, Ludwigshafen, erhalten, welches jedoch nur in geringer Reinheit vorlag. Später wurde es im Rahmen einer Kooperation von Hassan Jomaa, Universität Giesen, zur Verfügung gestellt. Herr Hassan Jomaa war unabhängig auf Fosmidomycin als möglichen Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges gestoßen. Im Rahmen dieser Kooperation sollte zum einen zunächst der DOXP/MEP-Weg als Target evaluiert werden, und zum anderen die Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase nachgewiesen werden. Herr Zeidler konnte mit Hilfe des Isoprenestestsystemes den DOXP/MEP-Weg als wahrscheinliches Target ausmachen (Zeidler *et al.*, 1998; Zeidler, 2001). Im Gegensatz zu Mevalonsäure konnte DOX die Hemmwirkung auf die Isoprenemission aufheben. Weiterhin führte Fosmidomycin dazu, dass exogen angebotenes DOX durch Platanenblätter im Gegensatz zu Wasserkontrollen kaum verarbeitet wurde, was auf die DOXP-Reduktoisomerase als Target hinwies. Herr Schwender konnte darüber hinaus zeigen, dass auch die Pigmentakkumulation bei der Ergrünung von etiolierten Gerstenkeimlingen und die Biosynthese von Lycopin in reifenden Tomaten durch Fosmidomycin unterbunden wird (Zeidler *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse legten nahe, dass Fosmidomycin in der Tat ein Hemmstoff des DOX/MEP-Weges ist mit der DOXP-Reduktoisomerase als Target.

Nach dem Nachweis von DOXP-Reduktoisomerase-Aktivität in Proteinrohextrakten aus etiolierten Gerstenkeimlingen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Gerstenenzym durch Fosmidomycin spezifisch gehemmt wird. Der IC_{50} lag bei $0,7 \mu\text{M}$ ($0,5 \text{ mM DOXP}$, 1 mM NADPH). Bei dem rekombinanten Enzym von *Arabidopsis thaliana* betrug der IC_{50} -Wert $0,28 \mu\text{M}$, wobei DOXP in einer Konzentration von $0,25 \text{ mM}$ eingesetzt worden war (Müller *et al.*, 2000). FR900098 erwies sich ebenfalls als Inhibitor der DXR aus *Arabidopsis thaliana*. Zur gleichen Zeit konnte die japanische Arbeitsgruppe von Prof. Seto die Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase aus *E. coli* durch Fosmidomycin zeigen. Der IC_{50} -Wert betrug $8,2 \text{ nM}$ bei $0,3 \text{ mM DOXP}$. Die Autoren vermuteten eine nicht-kompetitive Hemmung bezüglich DOXP (Kuzuyama *et al.*, 1998). Im Falle des Enzymes von *Zymomonas mobilis* wurde jedoch eine kompetitive Hemmung festgestellt

(Grolle *et al.*, 2000). Der K_I -Wert ($0,6 \mu\text{M}$) lag hier wesentlich höher als bei *E. coli* ($0,036 \mu\text{M}$). Die IC_{50} -Werte unterscheiden sich teilweise erheblich bei der DOXP-Reduktoisomerase aus unterschiedlichen Organismen (siehe Tabelle 4-1). So fand sich bei *Pseudomonas aeruginosa* ein IC_{50} -Wert von $0,15 \mu\text{M}$ (1 mM DOXP , Altincicek *et al.*, 2000), bei *Plasmodium falciparum* $0,04 \mu\text{M}$ (Jomaa *et al.*, 1999a) und bei dem Cyanobakterium *Synechococcus leopoliensis* $7,5 \mu\text{M}$ (Miller *et al.*, 2000). Inzwischen wurde die Hemmung näher am Enzym von *E. coli* untersucht (Koppisch *et al.*, 2002), womit sich die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des Hemmtyps und die großen Unterschiede im ermittelten K_I -Wert zum Teil erklären lassen. Es ergab sich, dass Fosmidomycin ein langsam bindender Inhibitor ist. Zunächst bindet Fosmidomycin an den Enzym-NADPH-Komplex. Ohne Vorinkubation mit Fosmidomycin und NADPH ergibt sich daraus eine kompetitive Hemmung bezüglich DOXP mit einem K_I -Wert von $0,215 \mu\text{M}$. In einem langsamen Schritt wird der Enzym-Inhibitor-NADPH-Komplex in einen anderen inaktiven Zustand überführt mit einem K_I -Wert von $0,021 \mu\text{M}$, so dass sich insgesamt eine gemischte Hemmung ergibt. Da sowohl bei *Plasmodium falciparum* als auch *Pseudomonas aeruginosa* unbekannt ist, ob eine Vorinkubation des Enzyms mit Fosmidomycin und NADPH vorgenommen wurde, lassen sich die Werte mit denen der anderen Organismen nicht vergleichen. Zumindest wird die DXR von *Plasmodium falciparum* durch Fosmidomycin 4x stärker gehemmt als das von *Pseudomonas aeruginosa*. Interessanterweise wird ersteres durch FR900098 4x stärker gehemmt als durch Fosmidomycin, während bei letzterem keine Unterschiede zwischen den beiden Substanzen zu erkennen sind (Altincicek *et al.*, 2000). Die gefundenen Unterschiede (Tabelle 4-1) eröffnen die Möglichkeit, Derivate von Fosmidomycin als Herbizide, Antibiotika oder Antimalariamedikamente zu entwickeln, die selektiv wirksam sind.

Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* besitzt den DOXP/MEP-Weg, und Fosmidomycin erwies sich als wirksames Medikament gegen Malaria, wie zunächst an Mäusen gezeigt worden war (Jomaa *et al.*, 1999a). Inzwischen sind auch klinische Studien in Gambia und Thailand durchgeführt worden (Wiesner *et al.*, 2002). Fosmidomycin führte zunächst zu einer Heilung der Malariapatienten, aber nach kurzer Zeit kam es zum Wiederausbruch der Krankheit in 50 % der Fälle. Um diesem Problem zu begegnen, könnte sich eine Kombination unterschiedlicher Präparate als nützlich erweisen. Mehrere Wirkstoffe wurden in Kombination mit Fosmidomycin getestet und mit Clindamycin, ein Hemmstoff der prokaryontischen Translation, ergab sich eine synergistische Wirkung im Mausmodell (Wiesner *et al.*, 2002). Der Vorteil einer Kombination liegt auch darin, dass Resistenzbildungen erschwert werden, die bei den bisherigen Antimalariapräparaten ein großes Problem darstellen. Resistenzbildungen gegenüber Fosmidomycin sind in *E. coli* bekannt und untersucht worden. Einigen der Fosmidomycin-resistenten Stämmen fehlt das Aufnahmesystem für *sn*-Glycerin-3-phosphat, welches für den Transport von Fosmidomycin in die Zelle verantwortlich ist (Kojo *et al.*, 1980). Eine weitere Resistenz ergab sich aus der Amplifikation eines Gens, welches am Export von Fosmidomycin aus den Zellen beteiligt ist (Fujisaki *et al.*, 1996).

Tabelle 4-1: Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase durch Fosmidomycin bei verschiedenen Organismen. Die großen Unterschiede lassen sich teilweise dadurch erklären, daß Fosmidomycin ein langsam bindender Inhibitor ist, wodurch sich bei einer Vorinkubation mit NADPH ein wesentlich geringerer K_I -Wert ergibt. Bei dem zunächst bestimmten K_I -Wert bei *E.coli* (Kuzuyama *et al.*, 1998) handelt es sich somit eher um den K_I^* -Wert (Hemmkonstante mit Vorinkubation, Koppisch *et al.*, 2002). Die Werte von *P. aeruginosa* und *P. falciparum* sind jedoch direkt vergleichbar, da die verwendeten Assays identisch waren.

Organismus	IC ₅₀ -Wert	Substratkonzentration DOXP / NADPH	K _I -Wert	Autor
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>)	0,7 µM ¹	0,5 mM/1 mM		a
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,28 µM ¹	0,25 mM/1 mM		a
<i>E. coli</i>	0,0082 µM ²	0,3 mM	0,038 µM	b
<i>E. coli</i>	0,68 µM ³	0,25 mM/sättigend ³	0,215 µM	c
	1,15 µM ³	0,5 mM/sättigend ³	(K _I *=0,021 µM)	
<i>Zymomonas mobilis</i>	1,1 µM ^{2,3}	0,25 mM/sättigend ³	0,6 µM	d
	1,6 µM ^{2,3}	0,5 mM/sättigend ³		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,15 µM ²	1 mM/0,3 mM		e
<i>Plasmodium falciparum</i>	0,04 µM ²	1 mM/0,3 mM		f
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	7,5 µM ^{2,4}	(66 mM) ⁴ /0,125 mM		g

¹ keine Vorinkubation mit NADPH und Fosmidomycin

² Ob eine Vorinkubation mit NADPH und Fosmidomycin vorgenommen wurde, ist unbekannt.

³ Die IC₅₀-Werte wurden aus den K_I-Werten und den K_M-Werten berechnet unter der Annahme eines kompetitiven Hemmtyps von Fosmidomycin bezüglich DOXP (Koppisch *et al.*, 2002) bzw. keiner Vorinkubation von Fosmidomycin. Der K_{mDOXP}-Wert für *Z. mobilis* beträgt 0,3 mM, für *E. coli* 0,115 mM.

⁴ die DOXP Konzentration wurde nicht bestimmt, sondern ein DXS Assay Ansatz mit 66 mM Pyruvat wurde verwendet.

Autoren: a) vorliegende Doktorarbeit, Müller *et al.*, 2000; b) Kuzuyama *et al.*, 1998; c) Koppisch *et al.*, 2002; d) Grolle *et al.*, 2000; e) Altincicek *et al.*, 2000; f) Jomaa *et al.*, 1999a; g) Miller *et al.*, 2000.

Bei Fosmidomycin handelt es sich wahrscheinlich um ein Übergangszustandsanalogon (Abbildung 4-3; Zeidler, 2001), wie sich aus dem Vergleich mit der KARI ergab (siehe oben). Zum besseren Verständnis fehlt jedoch noch die bislang nicht gelungene Kristallisation der DXR mit Fosmidomycin (Yajima *et al.*, 2002).

4.3.2 Clomazone und Derivate

Clomazone⁵ (2-(2-Chlorophenyl)-methyl-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinon; siehe Abbildung 4-4) ist ein seit längerem bekanntes, selektives Herbizid, verwendet u.a. beim Anbau von Soja zur Bekämpfung von Ungräsern und Unkräutern. Neben Clomazone wirken viele Derivate hiervon herbizidal. Mit Ausnahme von 2-(2-Methylphenyl)-methyl-4,4-dimethyl-3,5-isoxazolidindion wirken die in dieser Doktorarbeit verwendeten Derivate herbizidal (Chang, 1983; Chang *et al.*, 1987). Am wirksamsten sind Derivate mit den

⁵ Weitere Bezeichnungen sind Dimethazone, Command und FMC 57020

Gruppen OCH₃, O, OH und Cl an C-5. Weitere Veränderungen sowohl am aromatischen als auch am heterozyklischen Ring führen zu einer verringerten bzw. zum kompletten Verlust der Wirkung (Chang *et al.*, 1987). In etiolierten Keimlingen verhindert Clomazone bei Belichtung zunächst die Entwicklung von Etiochloroplasten zu Chloroplasten, ohne jedoch die Pigmentbiosynthese komplett zu unterbinden. Längere Belichtung führt schließlich zur Zerstörung der Thylakoide (Duke und Paul, 1986). Gehemmt wird die Phytol-, Carotinoid-, Gibberelinsäure- und α -Tocopherolbiosynthese, woraus auf eine mögliche Hemmung eines frühen Schrittes der Isoprenoidbiosynthese geschlossen wurde (Sandmann und Böger, 1986): So hemmte Clomazone den Einbau von Mevalonsäure in GGPP, FPPP und GPP in abnehmender Stärke in Spinatblattextrakten, während die IPP-Biosynthese nicht gehemmt wurde. Dies deutete auf die IPP-Isomerase und/oder Prenyltransferasen als Target hin (Sandmann und Böger, 1987). Die cytosolische Squalenbiosynthese wurde weniger stark gehemmt. Diesem Befund standen allerdings gegenteilige Ergebnisse gegenüber, nach denen weder die IPP-Isomerase noch Prenyltransferasen durch Clomazone gehemmt werden (Lützow *et al.*, 1990; Weimer *et al.*, 1992a; Croteau, 1992; Scott *et al.*, 1994).

Der Grund für die Selektivität von Clomazone bei Pflanzen ist ebenfalls unbekannt. In mehreren Untersuchungen konnte nur ein geringer Unterschied in der Aufnahme- und in der Translokationsrate als auch in der Translokation von Clomazone festgestellt werden. Die gefundenen Unterschiede konnten die großen Differenzen in der Empfindlichkeit verschiedener Pflanzen nicht erklären (Weston und Barrett, 1989; Norman *et al.*, 1990; Liebl und Norman, 1991; Weimer *et al.*, 1991; Scott und Weston, 1992; Weimer *et al.*, 1992b). Clomazone wurde sogar schneller abgebaut in der sensitiven Saampappel (*Abutilon theophrasti*) als in der nicht-sensitiven Sojabohne (Weimer *et al.*, 1991; Weimer *et al.*, 1992b). In beiden Pflanzenarten fanden sich identische Metabolite mit gleicher prozentualer Verteilung. Da nur die HPLC-Profile verglichen worden sind, und damit die Metabolite nicht eindeutig identifiziert wurden, konnte eine Bioaktivierung nicht ausgeschlossen werden. Für eine Bioaktivierung bzw. unterschiedliche Metabolisierung sprachen Experimente mit sensibler Baumwolle und toleranter Sojabohne. Die gesammelten Metabolite aus Baumwolle führten zu einer Hemmung der Chlorophyllbiosynthese der Saampappel, jedoch nicht der Sojabohne, diejenigen aus der Sojabohne hatten keinen Effekt (Normann *et al.*, 1990). Auch eine unterschiedliche Empfindlichkeit des Targets wurde nicht ausgeschlossen. Beim Abbau von Clomazone durch Sojabohne (Abbildung 4-4; ElNaggar *et al.*, 1992) und Mikroorganismen (Liu *et al.*, 1996) erfolgen Hydroxylierungen an C-5, C-6, C-7(8) des Clomazone, am aromatischen Ring und weitere Dehydrogenierungen. Der Abbau führt u.a. zu einem Teil zu einer Abspaltung des Benzylrestes vom Isoxazolidinonring, oder auch zu den herbizidal wirksamen Abbauprodukten 5-Hydroxyclo-mazone, 5-Ketoclo-mazone bzw. dem zwischen C-5 und O des Heterozyklus geöffneten Abbauprodukt DOCHP, 2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[(2-chlorbenzyl)-hydroxy-amino]-propansäure. Demgegenüber zeigen die Benzyl-derivate keine herbizidale Wirkung (Scott *et al.*, 1994).

Aufgrund der zuvor genannten Ergebnisse wurde am Lehrstuhl Botanik II, Karlsruhe, die Wirkungsweise von Clomazone und einiger Derivate näher untersucht. Da bisher kein Zielenzym identifiziert worden war, jedoch wahrscheinlich war, dass offenbar ein früherer Schritt der Isoprenoid-Biosynthese gehemmt werden könnte, wurde als Mechanismus die Hemmung des DOXP/MEP-Weges durch Clomazone oder eines seiner Abbauprodukte postuliert (siehe auch Zeidler, 2001). In Paralleluntersuchungen konnte von Herrn Dr. Zeidler gezeigt werden, dass die Isoprenemission bei mehreren Pflanzen in allen Fällen durch 5-Ketoclo-mazone, jedoch durch Clomazone nur in einigen Pflanzen gehemmt wird. Für eine Bioaktivierung von Clomazone zu 5-Ketoclo-mazone oder zu einem weiteren Abbauprodukt sprach auch die Aufhebung der Clomazonehemmung der Ergrünung von Gerste durch den P450-Hemmstoff Aminobenzotriazol (ABT), da die Hydroxylierung von

Clomazone bei seinem Abbau zu 5-Ketoclomazone vermutlich mittels eines P450-Enzyms katalysiert wird.

Bei den eigenen Untersuchungen an den ersten beiden Enzymen des DOXP/MEP-Weges ergab sich eine Hemmung der DOXP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii* durch 5-Ketoclomazone, während alle weiteren untersuchten Clomazone-Derivate (vgl. Abbildung 4-4) keine Hemmwirkung auf die DXS zeigten. Auch die DXS aus *E. coli* und Gerste wurde durch 5-Ketoclomazone gehemmt, aber nicht durch Clomazone. Ebenfalls wurde von keinem der untersuchten Substanzen die DOXP-Reduktoisomerase gehemmt. Im Einklang mit der DOXP-Synthase als Target von Clomazone steht die Beobachtung, dass die Hemmwirkung von Clomazone bzw. 5-Ketoclomazone auf die Pigmentakkumulation während der Ergrünung von Gerste bzw. die Wachstumshemmung von *Scenedesmus obliquus* durch 5-Ketoclomazone durch Zugabe von exogenem DOXP aufgehoben bzw. verringert wurde (Zeidler, 2001). Ebenso wie Clomazone zu einer Arretierung der Plastidenentwicklung in Etioplasten (Duke und Paul, 1986) führt, bewirkt eine defekte DXS bei der *Arabidopsis thaliana* CLA1 Mutante eine Hemmung der Plastidenentwicklung und einen damit verbundenen Albinotyp (Mandel *et al.*, 1996).

Obwohl keine Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase durch die untersuchten Abbauprodukte von Clomazone beobachtet wurde, kann diese als zusätzliches Target nicht ausgeschlossen werden. So wurde ein weiteres Abbauprodukt von Clomazone, DOCHP, als Hemmstoff der DXR beschrieben mit einem im Vergleich zur Hemmung der DXS durch 5-Ketoclomazone ebenfalls hohen IC₅₀-Wert von 20 µM (Jomaa, 2000). Es wurde jedoch nicht eine mögliche Hemmung der DXS durch DOCHP untersucht. Es ist also durchaus denkbar, dass sich die herbizidale Wirkung von Clomazone auf mehrere Angriffspunkte beim DOXP/MEP-Weg zurückzuführen ist. Da für die Hemmwirkung einerseits der aromatische Ring wichtig ist (Chang *et al.*, 1987), aber andererseits die Benzyl-Abbauprodukte keine Wirkung zeigen, kommen als wirksame Agenzien nur Abbauprodukte in Betracht, bei denen keine Abspaltung des Heterozyklus vom aromatischen Ring erfolgt. Anhand der Struktur/Wirkungsuntersuchungen sind 5-Hydroxyclozomazone, 5-Ketoclozomazone und DOCHP die wahrscheinlichsten Kandidaten, die für die Wirkung von Clomazone verantwortlich sind. Aufgrund der nachgewiesenen Hemmung der DOXP-Synthase durch 5-Ketoclozomazone und der DOXP-Reduktoisomerase durch DOCHP lässt sich der Wirkungsmechanismus eingrenzen auf die Bioaktivierung von Clomazone und die Hemmung der DOXP-Synthase und/oder der DOXP-Reduktoisomerase. Die stärkere Hemmwirkung von 5-Ketoclozomazone auf die Pigmentakkumulation in *Ochromonas danica* im Vergleich zu Clomazone ist ein weiteres Indiz für diese Annahme.

Die Derivate von Clomazone, die mir von der BASF AG, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt worden sind, sind bis auf 2-(2-Methylphenyl)-methyl-4,4-dimethyl-3,5-isoxazolidindion, das sich von 5-Ketoclozomazone durch eine Methylgruppe statt eines Chloratoms am aromatischen Ring unterscheidet, als Herbizide wirksam (Chang, 1983; Chang *et al.*, 1987). Der Abbau der Derivate zu 5-Ketoclozomazone erfolgt möglicherweise über 5-Hydroxyclozomazone, indem bei 5-Acetoxylozomazone und bei 5-Benzoyloxylozomazone die Esterbindung gespalten wird. Bei 5-Chlorlozomazone ist ein Hydroxyl-Austausch zur Entfernung des Chloratoms möglich, wobei ebenfalls 5-Hydroxyclozomazone entsteht.

Wegen der früheren Ergebnissen von Sandmann und Böger (1986), nach denen die IPP-Isomerase oder eine Prenyltransferase durch Clomazone gehemmt wird, wurde die Wirkung von Clomazone und erstmals auch von 5-Ketoclozomazone auf die IPP-Isomerase von Tabak freundlicherweise im Labor von Herrn Prof. Bach (Straßburg) untersucht, wobei aber keine Hemmung zu beobachten war.

Für die Selektivität von Clomazone scheint nicht eine unterschiedliche Sensitivität des Zielenzyms DXS verantwortlich zu sein. Während die Pigmentakkumulation von Gerste durch Clomazone und 5-Ketoclomazone gehemmt wird, und weder *E. coli* noch *Chlamydomonas* sensitiv sind (Zeidler, 2001), ergaben sich keine großen Unterschiede bei der Hemmung der DXS der unterschiedlichen Organismen durch 5-Ketoclomazone. Eine Selektivität ließe sich auch erklären, wenn nicht-sensitive Pflanzen im Gegensatz zu sensitiven über einen Import von cytosolischem IPP in die Chloroplasten plastidäre Isoprenoide bilden könnten (siehe auch Einführung, 1.3). Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges sollten dann alle eine ähnliche Selektivität aufweisen, was jedoch nicht der Fall ist, wie das folgende Beispiel zeigt.

Die herbizidale Wirkung von Fosmidomycin ist im Vergleich zu Clomazone nur für wenige Pflanzen bekannt. Jedoch wurde sowohl die Hühnerhirse (*Echinochloa crusgalli*) als auch Sojabohne (Kamuro *et al.*, 1989) durch Fosmidomycin gehemmt, während die Hühnerhirse sensitiv im Gegensatz zur Sojabohne bezüglich Clomazone ist (Chang, 1983). Die Selektivität von Clomazone lässt sich daher nicht dadurch erklären, dass die Hemmung des DOXP/MEP-Weges durch den Acetat/MVA-Weg kompensiert wird.

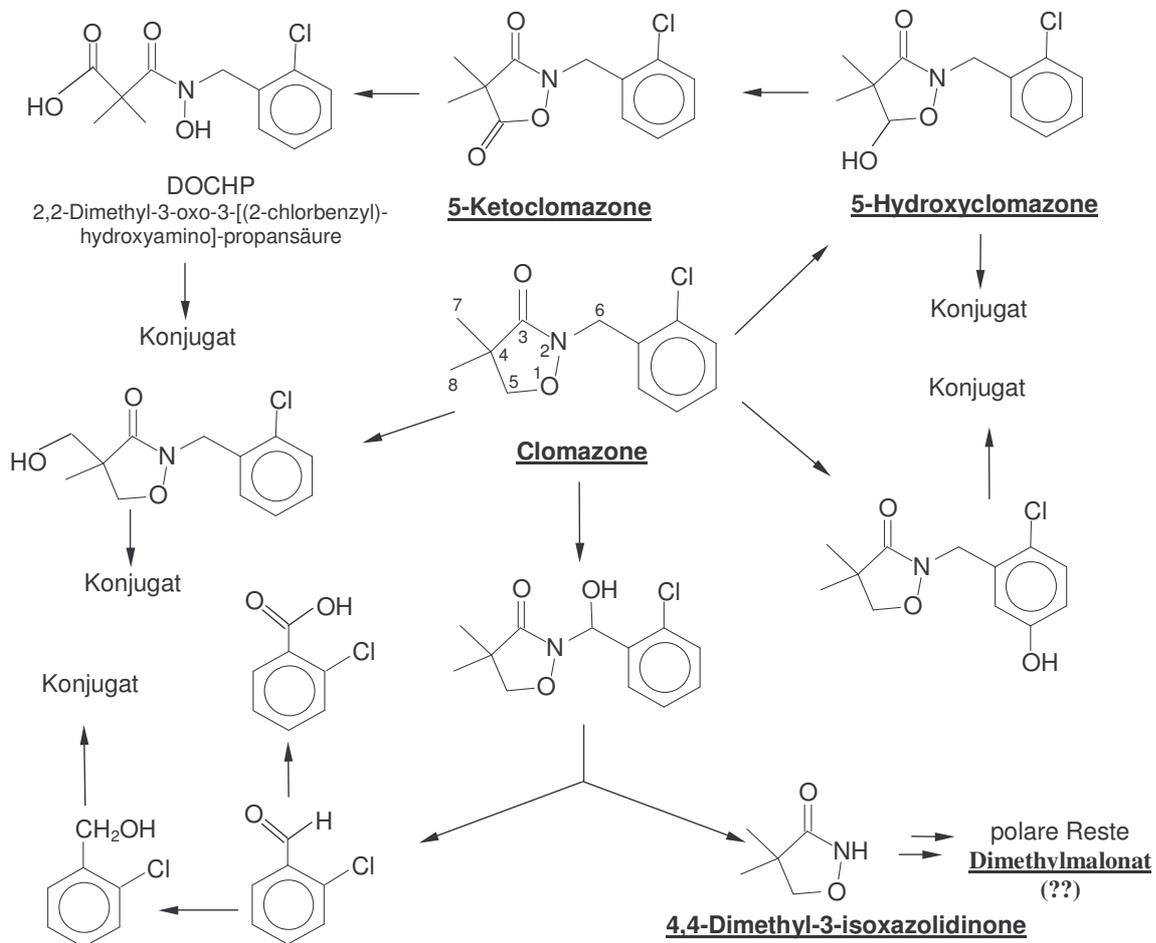


Abbildung 4-4: Mögliche Abbauwege von Clomazone. Mehrere Derivate konnten in der Sojabohne nachgewiesen werden, aufgrund derer die obigen Abbauwege vorgeschlagen worden sind (El-Naggar *et al.*, 1992). Die Wirkung der unterstrichenen Derivate auf die DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase wurde untersucht. Die DOXP-Synthase wurde durch 5-Ketoclozomazone gehemmt, während die anderen Derivate keine Wirkung zeigten. Die DOXP-Reduktoisomerase wurde durch keines der untersuchten Derivate gehemmt.

4.3.3 Testsysteme zur Identifizierung von Hemmstoffen des DOXP/MEP-Weges

Neben dem erfolgreichen Isopren-Testsystem und dem Pigmentbiosynthese-Testsystem von Gerste (Zeidler *et al.*, 2000), wurde versucht, weitere Testsysteme zu etablieren, u.a. ein Algentestsystem; sowie Enzymassays, um an diesen direkt potentielle Inhibitoren zu testen.

Da Algen leicht zu kultivieren sind, sollten sie sich hervorragend zur Entwicklung von Testsystemen eignen. Bis auf die Grünalgen, welche Isoprenoide ausschließlich über den DOXP/MEP-Weg synthetisieren (Schwender *et al.*, 2001), liegt bei den bisher untersuchten anderen Algengruppen, z.B. den Rhodophyta und Heterokontophyta, eine Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese vor. Plastidäre Isoprenoide werden über den DOXP/MEP-Weg gebildet und cytosolische Isoprenoide über den klassischen Acetat/MVA-Weg. Bei *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) wurden Sterole bei Einbauexperimenten mit markierter DOX und MVA nicht nur über den klassischen Acetat/MVA Weg gebildet, sondern auch in einem hohen Maße durch DOX markiert. Umgekehrt wurde auch in Phytol ein allerdings geringerer Anteil des angebotenen MVA eingebaut (Müller, 1997). Auch bei *Ochromonas danica* wurde eine leichte Markierung von Phytol durch MVA festgestellt (Müller, 1997). Dies legte nahe, dass Intermediate der Isoprenoidbiosynthese auch zwischen den Kompartimenten ausgetauscht werden können. Bei einer Hemmung des einen Biosyntheseweges könnte dann theoretisch dieser durch den im anderen Kompartiment vorhandenen kompensiert werden. Nur wenn beide Biosynthesewege gehemmt würden, sollte eine Wachstumshemmung erkennbar sein. Cerivastatin, ein spezifischer Hemmstoff der HMG-CoA-Reduktase, führt bereits bei einer niedrigen Konzentration von 10 nM zum Absterben der *Cyanidium caldarium*-Kultur. Bei *Ochromonas danica* führte Cerivastatin in einer Konzentration von 100 µM zum Absterben der Algenkultur. Offensichtlich ist der Acetat/MVA-Weg essentiell für das Wachstum dieser beiden Algen und kann nicht durch die plastidäre IPP und Isoprenoidbiosynthese kompensiert werden. In Tabak-Zellkulturen konnte noch eine weitere Funktion des Acetat/MVA-Weges oder dessen Produkte neben der Biosynthese cytosolischer Isoprenoide nachgewiesen werden. Mit Mevinolin, ebenfalls ein Statin, wird der Übergang von der G1 zur S-Phase beim Zellzyklus verhindert. Daneben existiert noch ein weiterer MVA-abhängiger Kontrollpunkt in der G2-Phase. Bei der Kontrolle des Zellzyklus spielen offensichtlich cytosolische Isoprenoide oder deren Derivate eine wichtige regulative Rolle (Hemmerlin und Bach, 1998). Diese Isoprenoide sind vermutlich beteiligt an der Induktion der DNA-Replikation (Hemmerlin *et al.*, 1999). Zur Eingrenzung der verantwortlichen Isoprenoide wurde die Wirkung von Inhibitoren der Squalensynthese, von Proteinprenyltransferasen und der DolichylPP-Oligosaccharid-Protein-Glykotransferase, was einer Hemmung der Dolichol Biosynthese gleichkommt, untersucht (Hemmerlin *et al.*, 2000). Hierbei zeigte sich, dass die Hemmung der Sterolbiosynthese und der Farnesylierung von Proteinen durch Mevinolin die Störung des Zellzyklus erklären kann.

Fosmidomycin, ein Hemmstoff der DOXP-Reduktoisomerase, reduziert die Wachstumsrate sowohl von *Cyanidium caldarium* als auch von *Ochromonas danica*. Bei ersterem wurde die Wirkung unter photoautotrophen Bedingungen untersucht, so dass die Wachstumshemmung sich automatisch aus einer Hemmung der Pigmentbildung, der Bildung des Photosyntheseapparates und einer stark verringerten Photosynthese ergibt. Daher wurde nur die Hemmung des Wachstums protokolliert. Wegen des besseren Wachstums wurde *Ochromonas danica* unter photoheterotrophen Bedingungen kultiviert. Auch bei vollständiger Hemmung der Pigmentbiosynthese durch Fosmidomycin war unter diesen Bedin-

gungen bei *Ochromonas danica* noch ein Wachstum zu beobachten. Eine ähnliche Wirkung wies 5-Ketoclofazone auf, jedoch war die Wachstumshemmung ausgeprägter. Da die Hemmung der DOXP-Synthase möglicherweise auch die Biosynthese von Thiamin und Pyridoxal beeinträchtigen könnte, wurde untersucht, ob die Wachstumshemmung durch Zugabe von Thiamin und Pyridoxal aufgehoben werden könnte. Dies war jedoch nicht der Fall. Eine Hemmung des Wachstums unter photoheterotrophen Bedingungen bei einer Blockierung des DOXP/MEP-Weges ergibt sich damit eher durch die nicht vorhandene Photosynthese, wodurch eine Energie- und Kohlenstoffquelle entfällt, was offenbar nicht durch den Metabolismus von Glukose vollständig kompensiert werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den untersuchten Algen weder der DOXP/MEP-Weg noch der Acetat/MVA-Weg den jeweils anderen kompensieren kann, obwohl dies aufgrund der Markierungsstudien zu erwarten gewesen wäre. Es muss hier berücksichtigt werden, dass die Zugabe von Intermediaten bei den Markierungsexperimenten zu einem Überschuss an Folgeprodukten führen könnte, die über das andere Kompartiment abgeführt werden. Möglicherweise sind die Transportsysteme nicht so geartet, um unter physiologischen Bedingungen eine ausreichende Versorgung mit Intermediaten aus dem einen bei Hemmung des anderen Biosyntheseweges im anderen Kompartiment zu gewährleisten. Der Austausch von isoprenoïden Metaboliten zwischen den Kompartimenten scheint somit eher von untergeordneter Bedeutung unter physiologischen Bedingungen zu sein (siehe auch 1.3).

Durch den Einsatz von Intermediaten eines Stoffwechselweges kann der Wirkungsort eines Hemmstoffes eingegrenzt werden oder auch Gene eines Stoffwechselweges identifiziert werden. Aus Markierungsstudien war bekannt, dass *E. coli* Methylerythritol in Isoprenoïde einbaut (Duvold *et al.* 1997). Durch Mutagenese wurden *E. coli* Stämme erzeugt, die Methylerythritol für das Wachstum benötigten. Dadurch konnte das zweite Enzym des DOXP/MEP-Weges kloniert und identifiziert werden (Kuzuyama *et al.*, 1998, Takahashi *et al.*, 1998). Die Hemmwirkung von Fosmidomycin auf *E. coli* konnte ebenfalls durch ME aufgehoben werden (Kuzuyama *et al.*, 1998). Bei *Cyanidium caldarium* und *Ochromonas danica* konnte die Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase allerdings nicht durch Methylerythritol aufgehoben werden. Wahrscheinlich kann der freie Alkohol nicht zum eigentlichen Intermediat MEP phosphoryliert werden oder ME wird nicht durch die Alge aufgenommen. Ebenfalls war gezeigt worden, dass deuteriertes ME nicht in Isoprenoïde von Pappel (Zeidler, 2001) und in die Isoprenoïde von Grünalgen (Schwender, 1999) eingebaut wird. Auch Isopentenol konnte nicht die Wachstumshemmung von *Cyanidium caldarium* und *Ochromonas danica* durch Fosmidomycin aufheben. Zwar erfolgte durch die Zugabe von Isopentenol kein Absterben der Kulturen mehr, aber dies lässt sich eher dadurch erklären, dass die Alge den Alkohol als Kohlenstoffquelle verwendet hat im Gegensatz zu dem rein photoautotrophen Wachstum der anderen Versuche. Für *Synechocystis* ist beschrieben worden, dass es die freien Alkohole von IPP und DMAPP, Isopentenol und Dimethylallylalkohol, verwerten kann (Cunningham *et al.*, 2000). *Synechocystis* fehlt eine IPP-Isomerase (Ershov *et al.*, 2000; Ershov *et al.*, 2002). In der Aufnahme und Verwertung von Intermediaten des DOXP/MEP-Weges scheinen die Organismen sehr unterschiedlich zu sein.

4.4 Neuere Erkenntnisse zur IPP-Biosynthese über den DOXP/MEP-Weg

4.4.1 Weitere Schritte des DOXP/MEP-Weges

Die Verzweigung des DOXP/MEP-Weges

Im Gegensatz zum klassischen Acetat/MVA-Weg, der nur IPP liefert, sind sowohl IPP als auch DMAPP Endprodukte des DOXP/MEP-Weges. Erste Hinweise darauf ergaben sich aus Markierungsstudien mit deuteriertem Methylerythritol und DOX. Deuterium am C-4 von DOX, welches sich am C-3 von MEP und am C-2 von IPP wiederfindet (vgl. Abbildung 4-5), fand sich in *E. coli* in den von DMAPP abgeleiteten, während es in den von IPP abgeleiteten Isopreneinheiten fehlte (Giner *et al.*, 1998). Im Vergleich hierzu wurde bei *Catharanthus roseus* (Arigoni *et al.*, 1999a) und auch bei *Zymomonas mobilis* (Charon *et al.*, 1999) ein kompletter Verlust dieses Deuteriums beobachtet. Weitere Markierungsstudien mit $[3,5,5,5-^2\text{H}_4]\text{ME}$ bestätigten nochmals die Ergebnisse bei *E. coli* (Charon *et al.*, 2000). Alle bisher bekannten IPP-Isomerasen und Prenyltransferasen eliminieren das proR-H am C-2 von IPP (Leyes *et al.*, 1999a; Leyes *et al.*, 1999b und Zitate). Sollte sich das Deuterium an C-4 von DOXP in der proR Position am C-2 wiederfinden, würde dies einen Verlust in allen Isopreneinheiten bedeuten entsprechend der Situation bei *Catharanthus*. In der proS Position hingegen bliebe es in allen Isopreneinheiten erhalten. Die Markierungsstudien von *E. coli* lassen sich nur erklären, wenn sich die Stereoselektivität der IPP-Isomerase oder Prenyltransferasen unterscheidet, oder wenn eine Verzweigung vorliegt. Jedoch wurden keine Unterschiede zwischen der IPP-Isomerase bzw. Prenyltransferasen von *E. coli* und anderen Organismen festgestellt (Leyes *et al.*, 1999a; Leyes *et al.*, 1999b). Da die IPP-Isomerase darüber hinaus nicht essentiell in *E. coli* ist (Hahn *et al.*, 1999), wurde eine Verzweigung vorgeschlagen. Dem Cyanobacterium *Synechocystis* fehlt sogar eine IPP-Isomerase (Ershov *et al.*, 2000; Ershov *et al.*, 2002). Mit einem genetisch konstruierten *E. coli* Stamm, der DXR defizient ist und in dem die Enzyme von MVA zu IPP aus dem klassischen Acetat/MVA-Weg exprimiert wurden, konnte die Verzweigung nachgewiesen werden. Dieser *E. coli* Stamm benötigt entweder Methylerythritol (ME) oder MVA für das Wachstum. Das Ausschalten von *idi* (IPP-Isomerase) führte dazu, dass der *E. coli* Stamm zwar mit ME wuchs aber nicht mehr mit MVA (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000). Da der Stamm mit ME wuchs, muss der DOXP/MEP-Weg sowohl IPP als DMAPP bilden, das heißt es muss eine Verzweigung des Biosyntheseweges existieren. Außerdem war dies ein weiterer Nachweis, dass in *E. coli* die IPP-Isomerase nicht essentiell ist, und dass auch keine weitere, unbekannte IPP-Isomerase existiert, die keinerlei Ähnlichkeit mit bisher bekannten IPP-Isomerasen hat. Eine IPP-Isomerase, die keine Sequenzhomologie zu bisher bekannten aufweist, wurde allerdings aus *Streptomyces* CL190 und *Staphylococcus aureus* kloniert. Dieses Enzym benötigt FMN und NAD(P)H und findet sich in einigen Archaeobakterien und grampositiven Bakterien (Kaneda *et al.*, 2001) und wird als Klasse 2 IPP-Isomerase benannt.

In Pflanzen war zunächst davon ausgegangen worden, dass IPP das Endprodukt des DOXP/MEP-Weges sei. Dies wurde aus den schon oben erwähnten Markierungsstudien von Arigoni *et al.* (1999a) gefolgert. Der Verlust des H an C-4 von DOXP erklärt sich entweder über die IPP-Isomerase und Prenyltransferasen, was gleichbedeutend mit IPP als Endprodukt ist, oder über einen unbekanntem Schritt im DOXP/MEP-Weg. Der Befund, dass bei einer Hemmung der IPP-Isomerase in isolierten Drüsenzellen aus Pfefferminze ausschließlich IPP gebildet wird (McCaskill und Croteau, 1999), wurde inzwischen revidiert (Lange *et al.*, 2001). Bei *Catharanthus* scheint aufgrund der Markierungsmuster IPP das Endprodukt zu sein. In *Eucalyptus globulus* wurde hingegen wie bei *E. coli* das H an

C-4 von DOXP in die von DMAPP aber nicht in die von IPP abgeleiteten Einheiten von Cineol eingebaut (Rieder *et al.*, 2000), so dass hier eine Verzweigung vorhanden ist. In Tabak BY-2-Zellkulturen wurde dieses H sowohl in der DMAPP als auch in den IPP abgeleiteten Isopreneinheiten wiedergefunden (Hoeffler *et al.*, 2002b). Dies spricht für DMAPP als Endprodukt, da durch die IPP-Isomerase und Prenyltransferasen dieses Proton nicht entfernt wird. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der IPP-Zweig aktiv ist. Offensichtlich ist je nach untersuchter Pflanze entweder DMAPP oder IPP oder beides wie in *E. coli* das Endprodukt des DOXP/MEP-Weges. Die Untersuchungen mit *Z. mobilis* legen nahe, dass es auch bei Bakterien Unterschiede bezüglich des Endproduktes des DOXP/MEP-Weges gibt.

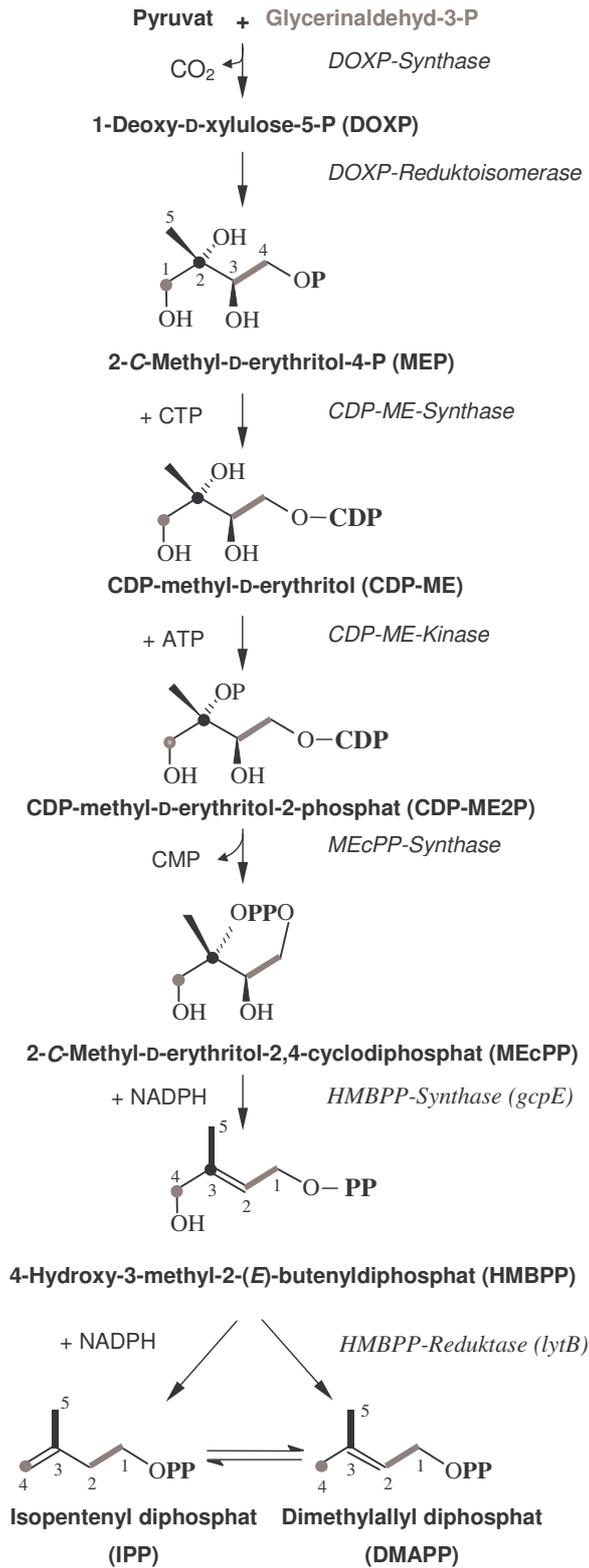


Abbildung 4-5: Der DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese bei photosynthetischen Organismen und teilweise pathogenen Eubakterien mit seinen 7 Enzymreaktionen.

CDP-ME-Synthase, CDP-ME-Kinase und MEcPP-Synthase

Zunächst konnte in *E. coli* Proteinrohextrakten eine Umsetzung von MEP mit ATP gezeigt werden. Es stellte sich aber heraus, dass CTP wesentlich effizienter ist (Rohdich *et al.*, 1999). Das Produkt wurde als 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) identifiziert, und mit einer Datenbanksuche nach CDP verwertenden Enzymen wurde das Gen (*ygbP*) identifiziert und kloniert. Wegen der Korrelation des Vorhandenseins des Gens in mehreren Organismen mit der Verbreitung des DOXP/MEP-Weges und wegen des Einbaus von [2-¹⁴C]CDP-ME in Isoprenoide von Chromoplasten aus *Capsicum annum* wurde geschlossen, dass dies das dritte Enzym des DOXP/MEP-Weges sei. Zu dem damaligen Zeitpunkt wäre es auch denkbar gewesen, dass es sich um eine Nebenweg handelt und Chromoplasten aus CDP-ME wieder MEP bilden könnten. Erst ein anderer Ansatz brachte den Nachweis, dass es sich tatsächlich um ein Zwischenprodukt des DOXP/MEP-Weges handelt (Kuzuyama *et al.*, 2000b). Neben der Arbeitsgruppe von Prof. Boronat, Barcelona (siehe oben; Campos *et al.*, 2001a), konstruierte die japanische Arbeitsgruppe von Prof. Seto einen *E. coli* Stamm mit den letzten 3 Enzymen des Acetat/MVA-Weges, so dass dieser Stamm Isoprenoide über MVA bilden kann. Mutanten in *ygbP* konnten nur bei Zusatz von MVA im Medium wachsen, womit die Bedeutung von *ygbP* für die Isoprenoidbiosynthese nachgewiesen war. Die CDP-ME-Synthase ist aus *E. coli* kristallisiert worden (Richard *et al.*, 2001). Das Enzym formt ein Homodimer, und bei der Reaktion handelt es sich vermutlich um einen S_N2-Mechanismus. Das Enzym aus *Arabidopsis thaliana* wurde von Rohdich *et al.* (2000a) kloniert.

Im nächsten Schritt wird CDP-ME an der OH-Gruppe des C-2 zu CDP-ME2P (4-CDP-Methyl-D-erythritol-2-phosphat) unter ATP Verbrauch phosphoryliert. Die CDP-ME-Kinase wurde aus *E. coli* (Kuzuyama *et al.*, 2000c; Lüttgen *et al.*, 2000) und Tomate (Rohdich *et al.*, 2000b) kloniert. Der Nachweis erfolgte wiederum über den Einbau des Produktes in Carotinoide von Chromoplasten (Lüttgen *et al.*, 2000) bzw. über einen MVA verwertenden *E. coli* Stamm (Kuzuyama *et al.*, 2000c).

2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MEcPP) ist das nächste Zwischenprodukt des DOXP/MEP-Weges, welches unter oxidativem Stress von einigen Bakterien akkumuliert wird (Ostrovsky *et al.*, 1998) und zunächst als Nebenprodukt angesehen worden war. Es wird aus CDP-ME durch Abspaltung von CMP gebildet. Das Enzym wurde aus *E. coli* kloniert (Herz *et al.*, 2000; Takagi *et al.*, 2000a), und MEcPP wurde ebenfalls in Carotinoide von Chromoplasten aus *Capsicum annum* eingebaut. Wird den Chromoplasten neben [2-¹⁴C]MEcPP auch noch nicht radioaktives MEP angeboten, so hatte dies keinen Einfluss auf den Einbau von MEcPP in Carotinoide, das heißt MEcPP ist ein Zwischenprodukt und nicht nur ein Nebenprodukt des DOXP/MEP-Weges (Herz *et al.*, 2000). Kinetische Einbaustudien in die Lipidfraktion von Chromoplasten mit Kombinationen von [1-³H]MEP und [2-¹⁴C]MEcPP bestätigten die Reaktionsfolge von MEP über MEcPP zu den Prenyllipiden (Fellermeier *et al.*, 2001). Das Enzym wurde kristallisiert aus *E. coli* (Kemp *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2002). Das Enzym bildet ein Homotrimer, benötigt Zn²⁺ und ein weiteres 2-wertiges Kation (Kemp *et al.*, 2002; Steinbacher *et al.*, 2002).

4-Hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyldiphosphat-Synthase (gcpE)

Die bis dahin identifizierten Gene zeigten ein Verbreitungsmuster, das die Verbreitung des DOXP/MEP-Weges widerspiegelte. Auch zwei weitere Gene, *gcpE* und *lytB*, folgen dieser Verteilung. Mit Hilfe des MVA-verwertenden *E. coli* Stammes konnte gezeigt werden, dass *gcpE* für die Biosynthese von Isoprenoiden nach dem DOXP/MEP-Weg essentiell ist (Campos *et al.*, 2001b; Altincicek *et al.*, 2001a). Hinweise über seine enzymatische Funktion ergaben sich durch ein Ausknocken von *gcpE* in *E. coli*, was zu einer Akkumula-

tion von MEcPP (Seemann *et al.*, 2002a) führte. Eine andere Strategie war, alle Enzyme von DXS bis GcpE und zusätzlich eine D-Xylulose-Kinase (*xylB*) in *E. coli* zu exprimieren. Durch Zugabe von ¹³C-markierter DOX, welche durch die D-Xylulose-Kinase in den Zellen phosphoryliert wurde, in das Anzuchtmedium konnte 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyldiphosphat (HMBPP) nachgewiesen werden (Hecht *et al.*, 2001). Dass es sich bei HMBPP um ein Zwischenprodukt in der Reaktionsfolge von MEcPP zu IPP/DMAPP handelt, konnte auch durch Ausschalten von *lytB* (s.u.) gezeigt werden (Hintz *et al.*, 2001). *GcpE* katalysiert in einem Schritt die Bildung von HMBPP aus MEcPP, welche eine Reduktion und eine Wasserabspaltung (vgl. Abbildung 4-5) beinhaltet. Die Umwandlung von MEcPP zu HMBPP war zunächst in zellfreien Proteinextrakten aus *E. coli*, die *gcpE* überexprimieren, nachgewiesen worden (Seemann *et al.*, 2002b; Wolff *et al.*, 2002), jedoch nur mit einer geringen Umsatzrate und unbekanntem Cofaktorbedarf. Das aufgereinigte Enzym katalysiert die Umsetzung vom MEcPP zu HMBPP in Gegenwart des künstlichen Elektronendonators Dithionit (Kollas *et al.*, 2002) oder bei Zugabe von Flavodoxinreduktase, Flavodoxin und NADPH (Seemann *et al.*, 2002c). Ob letzteres System auch *in vivo* an der Katalyse beteiligt ist, ist jedoch noch offen. Das Enzym besitzt ein [4Fe-4S]-Cluster (Seemann *et al.*, 2002c) und ist Sauerstoff-empfindlich (Wolff *et al.*, 2002), was die Akkumulation von MEcPP in einigen Bakterien (Ostrovsky *et al.*, 1998) unter oxidativem Stress erklären könnte.

Die Umsetzung erfolgt wahrscheinlich über einen radikalischen Reaktionsmechanismus mit zwei Ein-Elektronen Übertragungen. Der Mechanismus der Ringöffnung und der Wasserabspaltung sind jedoch noch unbekannt (Seemann *et al.*, 2002b).

Ein Funktionsnachweis konnte auch für *gcpE* aus *Arabidopsis thaliana* erbracht werden. *GcpE* defiziente *E. coli* Stämme lassen sich mit dem *Arabidopsis* Gen komplementieren (Querol *et al.*, 2002). Es besitzt im Vergleich zu dem Protein aus *E. coli* zusätzlich noch eine Transitpeptidsequenz und eine weitere Sequenz von 268 Aminosäuren, deren Funktion jedoch unbekannt ist. Im Gegensatz hierzu besitzen die anderen Enzyme im Vergleich zu den *E. coli* Enzymen abgesehen von einer Transitpeptid-Sequenz keine zusätzlichen Domänen. Durch Einbau von Tritium-markiertem HMBPP in Phytoen von Chromoplasten konnte auch für Pflanzen dieses als Zwischenprodukt nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2002).

Das Produkt von *gcpE* – HMBPP – gilt als das aktivierende Agens von $\gamma\delta$ T-Zellen (Hintz *et al.*, 2001). Diese Immunzellen sind eine Untergruppe von T-Zellen, welche durch niedermolekulare phosphorylierte Verbindungen stimuliert werden können. Die erste dieser Substanzen, die entdeckt wurde, war IPP. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die eigentliche phosphorylierte Verbindung im Zusammenhang mit dem DOXP/MEP-Weg steht (Jomaa *et al.*, 1999b). Die Beobachtung, dass Extrakte von *gcpE* defizienten *E. coli* Stämmen in geringerem Umfang $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren können als Wildstämme, führte zu der Vermutung, dass *gcpE* (Alincicek *et al.*, 2001b) eine wichtige Rolle bei der Biosynthese des verantwortlichen Agens spielt. Ein Ausschalten von *lytB* (s.u.) führte hingegen zu einer 150-fachen stärkeren Stimulation (Eberl *et al.*, 2002). Als Substanz konnte dann HMBPP identifiziert werden, welche ca. 12.500 bis 21.500 mal wirksamer ist als IPP (Hintz *et al.*, 2001). Die Charakterisierung einer weiteren aktivierenden, phosphorylierten Verbindung – 3-Formyl-1-butylpyrophosphat –, die als Zwischenprodukt in Betracht gezogen worden war (Belmant *et al.*, 1999), wurde wieder in Zweifel gezogen, da die Identifizierung nicht eindeutig war (Hintz *et al.*, 2001).

HMBPP könnte auch in Pflanzen eine Rolle bei der Biosynthese von Cytokinin spielen. Als erster Schritt galt die Bildung von Isopentenyladenosin-5'-monophosphat (iPMP) aus DMAPP und AMP, wovon sich die anderen Cytokinine ableiten sollten. Inzwischen

wurde noch eine von diesem Schema unabhängige Biosynthese postuliert, die zu Zeatinribosid 5'-phosphat (ZMP) führen soll (Åstot *et al.*, 2000). In *Agrobacterium tumefaciens* wurde ein Gen (*tzs*) identifiziert, welches ZMP aus HMBPP und AMP bildet. Das Enzym akzeptiert ebenfalls DMAPP, woraus dann iPMP gebildet wird (Krall *et al.*, 2002). In *Arabidopsis thaliana* wurden acht Isopentenyltransferasen kloniert. Sieben von diesen sind an der Cytokinin Biosynthese beteiligt, wie entweder direkt durch den enzymatischen Nachweis der Bildung von iPMP aus DMAPP und AMP, oder durch Überexpression in *E. coli*, wobei Isopentenyladenin und *trans*-Zeatin im Medium detektiert wurde, gezeigt werden konnte. (Takei *et al.*, 2001). Der Nachweis von Zeatin im Medium könnte nicht nur durch Bildung aus iPMP nach dem „klassischen“ Schema der Zeatinbiosynthese erklärt werden, sondern auch durch einen iPMP unabhängigen Weg. Da einige der Isopentenyltransferasen von *Arabidopsis thaliana* im Cytosol lokalisiert sind und andere im Chloroplasten, wurde eine Kompartimentierung vorgeschlagen, bei der Cytokinine sich entweder von DMAPP über den Acetat/MVA-Weg im Cytosol oder von HMBPP über den DOXP/MEP-Weg im Chloroplasten ableiten lassen (Krall *et al.*, 2002).

HMBPP-Reduktase (*lytB*)

Als letzter Schritt des DOXP/MEP-Weges wurde zunächst eine Isopentenylphosphat-Kinase beschrieben (Lange und Croteau, 1999b). Die spezifische Aktivität war jedoch sehr gering, und es stellte sich später heraus, dass es sich hierbei um die CDP-ME-Kinase gehandelt hatte (Rohdich *et al.*, 2000b; Kuzuyama *et al.*, 2000c). IP-Kinase-Aktivität konnte in diesen Arbeiten nicht nachgewiesen werden. Der letzte Schritt des DOXP/MEP-Weges wird durch *lytB*⁶ katalysiert. Den ersten Hinweis zur Bedeutung von *lytB* im DOXP/MEP-Weg lieferten Untersuchungen an dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 (Cunningham *et al.*, 2000): Eine Mutante in der Promoterregion von *lytB* wies ein schwach grünlich-gelbliches Aussehen auf. Wachstum mit den freien Alkoholen von IPP und DMAPP führte zu einem normalen Wachstum. Darüber hinaus war ein Ausknocken von *lytB* lethal. *LytB* wurde in *E. coli*, in das die Gene der Lycopinbiosynthese kloniert worden waren, überexprimiert, was zu einer höheren Lycopin Produktion führte. Der gleiche Effekt wurde bei der Überexpression von *idi* (IPP-Isomerase) und *dxs* beobachtet. Eine Kombination von *idi* und *lytB* erbrachte keine erhöhte Lycopin-Akkumulation im Vergleich zur Überexpression von *idi* allein, während ein multiplikativer Effekt bei der Kombination von *dxs* mit *lytB* oder *idi* auftrat. Daraus wurde gefolgert, dass *lytB* ein essentielles Gen des DOXP/MEP-Weges ist, und das Verhältnis von IPP zu DMAPP beeinflusst. Altincicek *et al.* (2001c) konnte ebenfalls zeigen, dass *lytB* essentiell für die Isoprenoidbiosynthese von *E. coli* ist, und entweder vor oder an der Verzweigung im DOXP/MEP-Weg involviert ist.

Ein Ausschalten von *lytB* führt zur Akkumulation von HMBPP (Hintz *et al.*, 2001) in MVA-verwertenden *E. coli* Stämmen, was HMBPP als mögliches Substrat von *LytB* nahe legte. In *E. coli* Stämmen, die *xylB* und die Gene des DOXP/MEP-Weges von *dxs* bis *lytB* überexprimieren (s.o), konnte eine Akkumulation von IPP und DMAPP im Verhältnis 5:1 neben einer Akkumulation von MEcPP und HMBPP nachgewiesen werden (Rohdich *et al.*, 2002). *LytB* sollte somit für den letzten Schritt des DOXP/MEP-Weges und die Verzweigung verantwortlich sein (vgl. Abbildung 4-5). Zellfreie *E. coli* Extrakte katalysieren in Gegenwart von rekombinantem *LytB*, FAD, NADH und 2-wertigen Kationen die Umsetzung von HMBPP zu IPP und DMAPP im Verhältnis 5:1 (Adam *et al.*, 2002) analog zum *in vivo* Experiment. NADPH führte zu einer geringeren Umsatzrate. Da das aufgereinigte, rekombinante Enzym keinerlei Aktivität aufweist, sondern nur mit Proteinrohextrak-

⁶ Ein namensgleiches Gen, eine Mureinhydrolase aus *Streptococcus pneumoniae* (Garcia *et al.*, 1999), hat nichts gemeinsam mit *lytB* des DOXP/MEP-Weges.

ten aus *E. coli* oder Chromoplasten von *Capsicum annuum*, wird wahrscheinlich ein weiteres Protein für den Elektronentransfer benötigt. Jedoch konnte inzwischen eine Umsetzung von HMBPP zu IPP und DMAPP im Verhältnis 5:1 in Gegenwart des aufgereinigten Enzyms und reduziertem Methylviologen (Semichinon) als künstlichen Elektronendonator gezeigt werden (Altincicek *et al.*, 2002).

Eine Erklärung der erhöhten Lycopinakkumulation bei Überexpression der IPP-Isomerase in *E. coli* (s.o.), ergibt sich durch das Verhältnis von IPP zu DMAPP von 3:1 bei Carotinoiden im Vergleich zu 5:1 bei *lytB*. Dies führt dazu, dass zu wenig DMAPP und ein Überschuss an IPP vorhanden ist. Die interne Menge an IPP-Isomerase scheint in diesen Stämmen nicht auszureichen, das Gleichgewicht für eine effektive Isoprenoidbiosynthese schnell genug einzustellen. Hierfür spricht auch, dass IPP-Isomerase-Aktivität in Proteinextrakten von *E. coli* kaum zu detektieren ist (Hoeffler *et al.*, 2002b), und das Gleichgewicht der IPP-Isomerase auf Seiten von DMAPP liegt, während in *lytB* überexprimierenden *E. coli*-Stämmen das Verhältnis *in vivo* 5:1 (IPP:DMAPP) ist. Im Falle von *lytB* wurde eine geringe spezifische Aktivität festgestellt, so dass *lytB* möglicherweise ein Flaschenhals der Isoprenoidbiosynthese ist (Adam *et al.*, 2002). Eine Überexpression würde dann zu der beobachteten erhöhten Lycopinakkumulation führen.

4.4.2 Verbreitung und Evolution des DOXP/MEP-Weges und des Acetat/MVA-Weges

Wie bereits in der Einleitung erläutert, besitzen höhere Pflanzen eine Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese. Cytosolische Isoprenoide werden über den klassischen Acetat/MVA-Weg gebildet, während sich plastidäre vom DOXP/MEP-Weg ableiten. Drüsenzellen von Pfefferminze sind eine Ausnahme dieses Schemas, da hier der klassische Acetat/MVA-Weg im Cytosol auf Höhe von HMG-CoA blockiert ist (McCaskill und Croteau, 1995). Die Lokalisierung des DOXP/MEP-Weges im Chloroplasten ist vielfach belegt worden, z.B. durch den Nachweis der ersten beiden Enzyme in Chloroplasten in dieser Arbeit, der Einbau von Intermediaten in Chromoplasten (siehe Arbeiten der Arbeitsgruppe Eisenreich und Bacher). Bei allen pflanzlichen Genen der Enzyme findet sich im Gegensatz zu den bakteriellen eine zusätzliche Transitpeptidsequenz der im Kern kodierten DOXP/MEP-Weg-Enzyme, die für den Transport in die Chloroplasten verantwortlich ist (siehe zitierte Arbeiten in Abschnitt 4.1).

Auch bei den meisten Algen findet sich eine Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese. Untersucht wurden Vertreter der Diatomeen, Heterokontophyta, Rhodophyta und Streptophyta, zu denen auch die Landpflanzen gehören, und in allen wurde eine Kompartimentierung gefunden (Müller, 1997; Schwender *et al.*, 1997; Disch *et al.*, 1998b, Cvejić und Rohmer, 2000; Schwender *et al.*, 2001). Der Prasinophyt *Mesostigma viride*, dessen Vorläufer in der Evolution auch Vorläufer der Chlorophyta und Streptophyta war, besitzt ebenfalls beide Biosynthesewege (Schwender *et al.*, 2001). Dagegen werden Isoprenoide in allen bisher untersuchten Vertretern der Chlorophyta ausschließlich über den DOXP/MEP-Weg gebildet (Schwender *et al.*, 2001), d.h. Chlorophyta verloren schon sehr früh in der Evolution nach der Abtrennung von den Streptophyta den klassischen Acetat/MVA-Weg. Eine Analogie hierzu findet sich beim Zuckerphosphatstoffwechsel in Grünalgen. Auch hier fehlen einige cytosolische Enzyme (Schnarrenberger *et al.*, 1990). Für die Abwesenheit des Acetat/MVA-Weges spricht auch, dass Cerivastatin keine hemmende Wirkung auf das Wachstum aufweist, kein HMG-CoA Gen gefunden wurde (Schwender *et al.*, 2001), und auch in der pigmentlosen Grünalge *Prototheca wickerhamii* Ergosterol über den DOXP/MEP-Weg gebildet wird (Zhou und Nes, 2000). In *Euglena gracilis* werden auch plastidäre Isoprenoide über den klassischen Acetat/MVA-Weg synthetisiert (Müller, 1997, Disch *et al.*, 1998b). Hier ging bei der sekundären Endosymbiose

bei der Inkorporation einer Grünalge der DOXP/MEP-Weg verloren. Als wichtiges Pathogen nutzt der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* den DOXP/MEP-Weg (Jomaa *et al.*, 1999a). *P. falciparum* gehört zu den Apicomplexa, die ein zusätzliches Organell, den Apicoplasten, neben den Mitochondrien besitzen. Von welcher Vorläuferalge sich der Apicoplast ableitet ist immer noch strittig. Einigen Untersuchungen zufolge leitet sich dieser von einer Rotalge (sekundäre Endosymbiose) ab, und möglicherweise haben Apicomplexa, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta und Dinoflagellaten einen gemeinsamen Ursprung (Wilson, 2002). Eine tertiäre Endosymbiose wurde auch nicht ausgeschlossen. Anderen Untersuchungen zufolge leitet sich der Apicoplast von einer Grünalge ab (Funes *et al.*, 2002).

In den Cyanobakterien ist der DOXP/MEP-Weg vielfach belegt, und steht in Einklang mit der Endosymbiontentheorie, nach der Chloroplasten von einem ursprünglichen Cyanobakterium abstammen (vgl. Lichtenthaler, 1998; Lichtenthaler, 1999). Im Gegensatz hierzu haben Mitochondrien als ehemalige selbständige Organismen die Fähigkeit zur eigenständigen Isoprenoidbiosynthese verloren (Lütke-Brinkhaus *et al.*, 1984; Disch *et al.*, 1998a). In anderen photosynthetischen phototrophen Bakterien (z.B. *Rhodobacter capsulatus*, Hahn *et al.*, 2001) ist ebenfalls der DOXP/MEP-Weg vorhanden. Eine bisher bekannte Ausnahme bei den phototrophen Bakterien ist das grüne Nichtschwefelbakterium *Chloroflexus aurantiacus*, bei dem die Biosynthese des Diterpens Verrucosan-2 β -ol über den Acetat/MVA-Weg erfolgt (Rieder *et al.*, 1998).

Die meisten Eubakterien nutzen ausschließlich den DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese, einige den Acetat/MVA-Weg und einige beide Biosynthesewege. *Rickettsia prowazekii* und *Mycoplasma genitalium* besitzen keinen IPP-Biosyntheseweg und sind auf den Import von Isoprenoiden angewiesen (Lange *et al.*, 2000). Zu den Eubakterien, die Isoprenoide nach dem klassischen Acetat/MVA-Weg synthetisieren, gehören *Borrelia burgdorferi*, *Myxococcus fulvus* (Boucher und Doolittle, 2000), *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (ehemals *Flavobacterium*, Eisenreich *et al.*, 2002), einige Gram-positive Bakterien mit geringem G+C-Gehalt (Staphylococcen, Enterococcen und Streptococcen, Wilding *et al.*, 2000, *Lactobacillus plantarum*, Boucher und Doolittle, 2000). Bei *Paracoccus zeaxanthinifaciens* finden sich alle Gene des MVA-Weges von der Acetyl-CoA-Acetyltransferase bis zur IPP-Isomerase auf einem Operon (Hümbelin *et al.*, 2002). Bei *Borrelia burgdorferi* befinden sich die Gene von der HMG-CoA-Synthase bis Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase auf einem Operon, während bei Staphylococcen, Enterococcen und Streptococcen die Gene auf zwei Cluster verteilt sind (Wilding *et al.*, 2000). Der Acetat/MVA-Weg ist essentiell für das Wachstum von *Streptococcus pneumoniae*, wie durch Ausschalten der HMG-CoA-Synthase und HMGR gezeigt werden konnte (Wildung *et al.*, 2000). Einige der zu den Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C Gehalt gehörenden Streptomyces Stämme haben beide IPP-Biosynthesewege. Bei *Streptomyces ariovifer* werden primäre Isoprenoide wie die Seitenkette von Menachinon während der exponentiellen Wachstumsphase über den DOXP/MEP-Weg gebildet, während das Antibiotikum Naphpertin in der stationären Phase über den Acetat/MVA-Weg synthetisiert wird (Seto *et al.*, 1996). Die Synthese von letzterem konnte hierbei durch den HMG-CoA-Reduktase (HMGR) Hemmstoff Pravastatin gehemmt werden, ohne einen Einfluss auf das Wachstum zu haben. Diese Aufteilung, nach der primäre Isoprenoide nach dem DOXP/MEP-Weg und sekundäre Isoprenoide nach dem Acetat/MVA-Weg gebildet werden, fand sich auch bei dem Actinomycet *Actinoplanes* sp. (Seto *et al.*, 1998). Gene des Acetat/MVA-Weges (HMG-CoA-Synthase bis Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase) wurden bei *Streptomyces* sp. identifiziert und liegen auf einem Operon (Takagi *et al.*, 2000b).

Interessanterweise findet sich in einigen Bakterien, die ausschließlich den DOXP/MEP-Weg verwenden, auch die HMGR, ein Leitenzym des Acetat/MVA-Weges. Möglicherweise dient sie dem Abbau von Mevalonat unter Beteiligung der HMG-CoA-Lyase (Boucher und Doolittle, 2000). Insgesamt betrachtet weisen die wenigen Eubakterien mit dem Acetat/MVA-Weg einen geringen Verwandtschaftsgrad untereinander auf.

In Archaeobakterien werden Isoprenoide über den Acetat/MVA-Weg gebildet. In allen Archaea finden sich die Gene für HMG-CoA-Synthase, HMGR und Mevalonat-Kinase, während die weiteren Gene zur Synthese von IPP fehlen (Boucher und Doolittle, 2000; Lange *et al.*, 2000). Offensichtlich besitzen die weiteren Enzyme zur Umwandlung von MVAP zu IPP keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Enzymen. Ähnlich verhält es sich mit der IPP-Isomerase, die nicht im Genom von Archaeobakterien zu detektieren war. Stattdessen wurden Sequenzen gefunden, die der in *Streptomyces* sp. gefundenen Klasse 2 IPP-Isomerase entsprechen (siehe 4.4; Kaneda *et al.*, 2001). Gene des DOXP/MEP-Weges finden sich nicht in Archaea mit einer Ausnahme, die Sequenz der CDP-ME-Synthase wurde als einzige in *Pyrococcus horikoshii* gefunden und wurde vermutlich über lateralen Gentransfer erworben (Rohdich *et al.*, 1999; Boucher und Doolittle, 2000).

Bei beiden Biosynthesewegen trat offenbar ein lateraler Gentransfer im Laufe der Evolution auf. Das Schlüsselenzym des Acetat/MVA-Weges, die HMGR, lässt sich in zwei Klassen unterteilen. Klasse 1 umfasst die HMGR aus Eukaryonten und Archaea, Klasse 2 die bakteriellen HMGRs. Ausnahmen hiervon, die für einen lateralen Gentransfer sprechen, sind das Archaeobakterium *Archaeoglobus fulgidus* mit einer bakteriellen HMGR, eine „Archae-HMGR“ in Streptomyces Stämmen und im Eukaryont *Giardia lamblia* eine bakterielle HMGR (Boucher und Doolittle, 2000). Im DOXP/MEP-Weg spricht für ein lateralen Gentransfer das Vorhandensein der CDP-ME-Synthase im Archaeobakterium *Pyrococcus horikoshii* und in einigen Gram-positiven Bakterien mit geringem G+C Gehalt, die den Acetat/MVA-Weg besitzen (Boucher und Doolittle, 2000).

Nach der Endosymbiontentheorie leiten sich Plastiden von einem Vorläufer der Cyanobakterien ab. Interessanterweise zeigte der Vergleich der Gene der ersten 5 Enzyme des DOXP/MEP-Weges, dass die Sequenzen der pflanzlichen Gene sich stärker unterscheiden von denen der Cyanobakterien als von denen anderer Eubakterien (Lange *et al.*, 2000). Einzige Ausnahme hiervon war die Gensequenz der DXR. Dies wurde ebenfalls mit einem lateralen Gentransfer erklärt.

Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich beim DOXP/MEP-Weg um einen sehr früh entstandenen Biosyntheseweg in Eubakterien. Der Ursprung des Acetat/MVA-Weges in einigen Eubakterien ist unbekannt. Möglicherweise könnte er über lateralen Gentransfer aus Eukaryonten oder Archaeobakterien sekundär erworben worden sein (Boucher und Doolittle, 2000; Wilding *et al.*, 2000).

Energiebilanz

Es stellt sich die Frage, ob einer der beiden Isoprenoidbiosynthesewege einen Vorteil unter bestimmten Umweltbedingungen darstellen könnte. Ein Kriterium ist der Energiebedarf zur Synthese von IPP, zunächst betrachtet mit GAP als Ausgangssubstrat.

Zur Synthese einer IPP-Einheit nach dem klassischen Acetat/MVA-Weg werden 3 GAP benötigt, die in Acetyl-CoA überführt werden. Dabei entstehen 6 ATP und 6 NADH. Zur Umsetzung von Acetyl-CoA zu IPP werden 3 ATP und 2 NADPH benötigt. Als Bilanz ergibt sich ein Verlust von 4 CO₂, Verbrauch von 2 NADPH und ein Gewinn von 3 ATP und 6 NADH.

Beim DOXP/MEP-Weg werden nur 2 GAP benötigt, und allein daraus resultiert ein Vorteil von 1 GAP im Vergleich zum Acetat/MVA-Weg. Aus einem GAP wird Pyruvat

gebildet mit einem Gewinn von 2 ATP und 2 NADH. Im DOXP/MEP-Weg wird aus CTP CMP und PP, was 2 ATP entsprechen. Zusätzlich erfolgt noch eine Phosphorylierung unter ATP Verbrauch. Als Bilanz ergibt sich ein Gewinn von 2 NADH und GAP, ein Verlust von einem ATP, 3 NADPH und 1 CO₂.

Bei autotrophen Organismen wiegt der Verlust von 3 CO₂ schwerer, da dieses CO₂ wieder fixiert werden muss. Unter autotrophen Bedingungen ergibt sich somit ein Vorteil des DOXP/MEP-Weges im Vergleich zum Acetat/MVA-Weg, sofern die CO₂-Fixierung über den Calvin-Zyklus erfolgt. Bei *Chloroflexus*, welcher den Acetat/MVA-Weg besitzt (Rieder *et al.*, 1998), erfolgt die CO₂-Fixierung über den Hydroxypropionat-Weg. Bei der Fixierung entstehen Dicarbonsäuren, aus denen Acetyl-CoA und Glyoxylat gebildet werden können. Da hier ein Verlust an CO₂ vermieden wird, kann die Biosynthese über den Acetat/MVA-Weg von Vorteil sein. Unter heterotrophen Bedingungen spielt der CO₂ Verlust keine Rolle.

Aus 6 NADH ergeben sich 18 ATP bei der Atmungskettenphosphorylierung, insgesamt also 21 ATP beim Acetat/MVA-Weg. Bei der Veratmung von GAP entstehen 3 ATP, 15 ATP (5 NADH) und 2 ATP (1 FADH₂), insgesamt ergeben sich mit den zwei weiteren NADH 25 ATP beim DOXP/MEP-Weg. Das zusätzliche NADPH beim DOXP/MEP-Weg entspricht ungefähr einem Verlust von 3 ATP, wenn NADPH über den oxidativen Pentosephosphat Zyklus gebildet wird ($6 \text{ Glucose-P} + 12 \text{ NADP} \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ NADPH} + 6 \text{ Ribose-P}$, d. h. Verlust 1 Glucose/12 NADPH).

Energetisch gesehen ist die Bilanz zwischen beiden Biosynthesewegen bis auf ein ATP ausgeglichen, so dass sich auf den ersten Blick keine Vorteile für den ein oder anderen Weg ergeben. Bei anderen Elektronenakzeptoren als Sauerstoff ist der Unterschied noch geringer, da dann pro NADH weniger als 3 ATP gebildet werden. Ebenfalls spielt das Substrat eine Rolle, das für den Organismus hauptsächlich zur Energiegewinnung zur Verfügung steht und der spezielle Abbauweg. Wenn beim Abbau von Substraten z.B. Acetyl-CoA entsteht, so ergibt sich ein energetischer Vorteil des klassischen Acetat/MVA-Weges. In vielen Pseudomonaden, die den DOXP/MEP-Weg besitzen, wird Glucose über den Entner-Doudoroff Weg abgebaut. Aus Glucose-6-Phosphat entsteht 1 NADPH, GAP und Pyruvat. Aus 2 Glucose entstehen beim DOXP/MEP-Weg 1 IPP, 2 Pyruvat und ein NADH unter Verbrauch von 1 ATP und 1 NADPH. Beim Acetat/MVA-Weg wird 1 IPP, ein Pyruvat, 2 NADH und ein ATP gebildet. Wegen des zusätzlichen Pyruvat ist bei Pseudomonaden – diese zeichnen sich u.a. durch Abwesenheit von Gärungen aus – der DOXP/MEP-Weg energetisch günstiger. Bei Gärungen sollte derjenige Biosyntheseweg vorteilhafter sein, bei dem die meisten Reduktionsäquivalente verbraucht bzw. die wenigsten gebildet werden, da als Elektronenakzeptoren von NADH Substrate dienen, die damit nicht mehr zur Energiegewinnung zur Verfügung stehen. Bei der Vergärung von GAP zu Pyruvat, welches je nach Gärungstyp unterschiedlich weiter verwertet wird, entstehen noch 2 NADH, so dass insgesamt 4 (6) NADH gebildet und 3 (2) NADPH beim DOXP/MEP-Weg (Acetat/MVA-Weg) verbraucht werden, und Pyruvat als Elektronenakzeptor bzw. zum weiteren Energiegewinn beim DOXP/MEP-Weg zur Verfügung steht. Bei Gärungen scheint also der DOXP/MEP-Weg für die Organismen energetisch günstiger sein.

4.5 Ausblick

Eine immer wieder gestellte Frage bei der Grundlagenforschung ist, worin der Nutzen dieser liegt. Schon die weite Verbreitung und der Nachweis der Biosynthese zahlreicher Isoprenoide nach dem DOXP/MEP-Weg zeigt die elementare Bedeutung dieses IPP-Biosyntheseweges. Zahlreiche für den Menschen interessante Verbindungen werden über den DOXP/MEP-Weg gebildet, wie z.B. Vitamine (α -Tocopherol, β -Carotin, Phyllochinon K_1) und pharmakologisch wirksame Terpenoide. Erst durch die Entdeckung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme und die Aufklärung der regulatorischen Schritte wird es möglich, die Isoprenoidakkumulation in Pflanzen gezielt zu steuern. Als Möglichkeiten sind hier z.B. mit Carotinoiden angereicherte Lebensmittel und die erhöhte Akkumulation pharmakologisch relevanter Isoprenoide in Pflanzen zu nennen.

In diesem Zusammenhang steht auch die Frage, wie der DOXP/MEP-Weg reguliert wird. Bisher ist für die ersten beiden Enzyme eine regulatorische Funktion nachgewiesen. Wie werden die 5 anderen Enzyme des DOXP/MEP-Weges reguliert? Ist das letzte Enzym, die HMBPP-Reduktase ein wichtiger regulatorischer Schritt, wie dies vermutet wird? Welche Rolle spielt ein teilweiser Austausch von Intermediaten zwischen Cytosol und Plastiden, und wie erfolgt der Transport? Tritt ein Austausch nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen auf? Welche Unterschiede bezüglich des Austausches von Intermediaten finden sich in unterschiedlichen Pflanzen? Gibt es Organismen, bei denen der DOXP/MEP-Weg ersetzbar durch den cytosolischen Acetat/MVA-Weg ist, oder umgekehrt?

Neben der Frage der regulatorischen Funktion steht eine komplette Charakterisierung der letzten beiden Enzyme (HMBPP-Synthase und HMBPP-Reduktase) des DOXP/MEP-Weges noch aus. Was sind die Cofaktoren? Um was für einen Reaktionsmechanismus handelt es sich? Welches weitere Protein ist Cofaktor der HMBPP-Reduktase? Welche Unterschiede zwischen einzelnen Organismen gibt es bei diesem Enzym? In welchem Verhältnis bildet die HMBPP-Reduktase IPP und DMAPP bei unterschiedlichen Organismen?

Mit der Entdeckung des DOXP/MEP-Weges in Pflanzen, pathogenen Bakterien und in dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, ergeben sich ganz neue Angriffspunkte zur Entwicklung neuer Herbizide, Antibiotika und Antimalariamittel (Lichtenthaler *et al.*, 2000), was schon zu mehreren Patenten geführt hat. Der Vorteil liegt insbesondere darin, dass der DOXP/MEP-Weg nicht beim Menschen vorkommt, und dadurch mit geringen Nebenwirkungen von Hemmstoffen zu rechnen ist. Bisher sind jedoch erst zwei Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges bekannt: Fosmidomycin und 5-Ketoclofazone. Bezüglich der Wirkungsweise von Clomazone bzw. 5-Ketoclofazone sind noch viele Fragen offen: Wie lässt sich die Selektivität erklären? Wie hemmt 5-Ketoclofazone die DXS? Spielen noch andere Abbauprodukte bei der Wirkung von Clomazone eine Rolle? Kommt es zu einer Anreicherung eines Abbauproduktes womöglich von 5-Ketoclofazone im Plastiden, so dass sich trotz hohem IC_{50} -Wert eine Hemmung der plastidären Isoprenoidbiosynthese ergibt?

Gerade unter dem Aspekt, dass immer mehr Resistenzen gegen herkömmliche Antibiotika und Antimalaria-Medikamente auftreten, ist dieser DOXP/MEP-Biosyntheseweg als Ansatzpunkt neuer Wirkstoffe von besonderer Bedeutung. Eine Kombination von Präparaten mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus verspricht eine Verringerung der Resistenzbildungen. Je mehr unterschiedliche Angriffspunkte bekannt sind, desto mehr Ausweichmöglichkeiten sind bei Resistenzbildungen gegeben. Daher ist der DOXP/MEP-Weg ein vielversprechender, neuer Angriffspunkt zur Entwicklung neuartiger Hemmstoffe.

5 Zusammenfassung

Einführung

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Aspekte zur Identifizierung, Charakterisierung, Regulation und Hemmung der plastidären IPP-Biosynthese nach dem DOXP/MEP-Weg in Pflanzen bearbeitet. Der DOXP/MEP-Weg hat eine universelle Bedeutung in Pflanzen zur Biosynthese von Primärmetaboliten u.a. der Phytolseitenkette von Chlorophyllen, α -Tocopherol und Phyllochinon K₁, sowie der Carotinoide, der Nonaprenylseitenkette von Plastochinon-9 und der Sekundärmetabolite Hemiterpene (Isopren), Mono- und Diterpene (siehe Übersicht: Lichtenthaler, 1998). Mit der Entdeckung dieses Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosyntheseweges in Bakterien (Rohmer *et al.*, 1993) und Pflanzen (Lichtenthaler *et al.*, 1995 und 1997) können jetzt frühere, widersprüchliche Beobachtungen zur plastidären IPP-Biosynthese erklärt werden. In höheren Pflanzen existiert eine Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese, nach der plastidäre Isoprenoide über den DOXP/MEP-Weg synthetisiert werden und cytosolische Isoprenoide über den klassischen Acetat/MVA-Weg (siehe auch Lichtenthaler, 1999). Da Tiere Isoprenoide ausschließlich über den Acetat/MVA-Weg bilden, ist der DOXP/MEP-Weg ein ideales Ziel zur Entwicklung neuartiger Herbizide und Antibiotika.

Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit biochemischen Methoden versucht, in Pflanzen die beiden ersten Enzyme des DOXP/MEP-Weges nachzuweisen, Testsysteme für die Enzyme zu entwickeln, die Wirkung von Hemmstoffen zu analysieren, evt. neue Hemmstoffe aufzufinden und erste Informationen zur Regulation dieser Enzyme zu erhalten.

Ergebnisse

- 1) Enzymtests für die DOXP-Synthase (DXS) und die DOXP-Reduktoisomerase (DXR) wurden entwickelt und die Produkte mittels GC/MS identifiziert. Verwendet wurden zu diesem Zwecke die rekombinante DXS aus *E. coli* und aus *Chlamydomonas reinhardtii*, sowie für die DXR Proteinrohextrakte aus Gerste und die rekombinante DXR aus *Arabidopsis thaliana*.
- 2) Proteinrohextrakte von Gerste wurden auch verwendet, um den letzten Schritt des DOXP/MEP-Weges zu identifizieren. Eine getestete Möglichkeit wäre eine reversible Wasserabspaltung im letzten Schritt gewesen mit IPP oder DMAPP als Endprodukt. Jedoch konnte keine Hydratation von IPP oder DMAPP festgestellt werden.
- 3) DXS und DXR-Aktivität wurde erstmals in Pflanzen gemessen und die Enzymaktivitäten in Plastiden (Etiochloroplasten) lokalisiert. Dies steht in Einklang mit der Biosynthese plastidärer Isoprenoide über den DOXP/MEP-Weg. DXS-Aktivität wurde in Gerste (Rohextrakt und Etiochloroplasten), Spinatchloroplasten und Erbsenchloroplasten nachgewiesen. DXR-Aktivität wurde in isolierten Rohextrakten und in Etiochloroplasten von Gerste nachgewiesen.
- 4) Der DOXP/MEP-Weg benötigt ATP und NADPH und ist verantwortlich für die Biosynthese der photosynthetischen Pigmente. Daher war eine Regulation durch die Photosynthese denkbar. In Abhängigkeit der Photosyntheseaktivität erhöht sich sowohl die Mg²⁺-Konzentration als auch der pH-Wert im Stroma und reguliert viele plastidäre Stromaenzyme. Es wurde eine pH-Abhängigkeit der DXR nachgewiesen mit einem Optimum bei pH 8,1, typisch für ein Licht-aktiviertes Stromaenzym. Demgegenüber fand sich nur eine geringe DXR-Aktivitätssteigerung bei Erhöhung der Mg²⁺-

Konzentration. Die DXR kann damit durch die lichtinduzierten Änderungen des pH-Wertes im Stroma reguliert werden. Die DXR-Aktivität ist demnach gekoppelt an die Photosyntheseaktivität über die Änderung des pH-Wertes im Stroma.

- 5) Es wurden die K_m -Werte für DOXP und NADPH bei der rekombinanten DXR aus *Arabidopsis thaliana* bestimmt. Für DOXP ergab sich ein K_m -Wert von $108 \pm 11 \mu\text{M}$ und für NADPH ein K_m -Wert von $7,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$. Vergleichbare Werte wurden in einer unabhängigen Arbeit für das Enzym aus *E. coli* beschrieben (Koppisch *et al.*, 2002). Der niedrige K_m -Wert von NADPH spricht dafür, dass NADPH *in vivo* für die Katalyse wahrscheinlich nicht limitierend ist.

Untersucht wurde ebenfalls, ob die Licht-induzierte Pigmentakkumulation während der Ergrünung von etiolierter Gerste mit einer Änderung der DXS- und DXR-Aktivität korreliert. Der zeitliche Verlauf der DXS- und DXR-Aktivität in (Etio-) Chloroplasten nach Belichtung von 6 Tage alten etiolierten Gerstenkeimlingen wurde untersucht. Nur geringe Änderungen der DXS-Aktivität (Bezugnahme auf Frischgewicht) wurden nach 24 h Ergrünung beobachtet. Mit der Abnahme der Pigmentakkumulationsrate nach 24 h sank die DXS-Aktivität. Offenbar genügt die bereits vorhandene DXS-Aktivität während der Ergrünung für die Isoprenoidbiosynthese und ist nicht limitierend. Im Gegensatz hierzu änderte sich die DXR-Aktivität innerhalb von 4h zunächst nicht, aber war nach 24 h wesentlich höher. Die DXR ist demnach ein wichtiges regulatorisches Enzym des DOXP/MEP-Weges und wird durch Licht stimuliert.

- 6) Bei der Suche nach Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges wurde die mögliche Wirkungsweise des Herbizides Clomazone untersucht. Überprüft wurde, ob DXS oder DXR durch Clomazone oder Derivate gehemmt werden. Clomazone und Derivate hatten keinen Hemmeffekt auf die DXR. Im Gegensatz hierzu wurde die DXS durch das Clomazone-Abbauprodukt 5-Ketoclomazone mit einem IC_{50} -Wert von $50 \mu\text{M}$ gehemmt, während Clomazone und die anderen Derivate keine Wirkung aufwiesen. Zusammen mit der kürzlich beschriebenen Aufhebung der Hemmung der Pigmentakkumulation in Gerste durch DOXP (Zeidler, 2001) ergibt sich für ganze Pflanzen als Wirkungsprinzip eine Bioaktivierung von Clomazone zu 5-Ketoclomazone mit der DXS als Target. Eine mögliche Beteiligung weiterer Abbauprodukte und der Hemmung eines weiteren Schrittes des DOXP/MEP-Weges kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Hemmwirkung von 5-Ketoclomazone auf die DXS von *E. coli* und *Chlamydomonas reinhardtii*, die beide Clomazone-tolerante Organismen sind, sowie von Gerste, eine Clomazone-sensitive Pflanze, lag in einem ähnlichen Konzentrationsbereich. Demnach lässt sich die Selektivität der Wirksubstanz gegenüber Pflanzen nicht über eine unterschiedliche Sensitivität der DXS erklären. Möglicherweise ist die Selektivität im unterschiedlichen Metabolismus von Clomazone in intakten Pflanzen begründet, wie schon in früheren Untersuchungen vermutet worden war (Normann *et al.*, 1990).

- 7) Die Wirkung von Fosmidomycin, FR 900098 und mehrerer weiterer Phosphonate mit ähnlicher Struktur auf Aktivität von DXS und DXR wurde überprüft. Während die DXS durch keine der Substanzen gehemmt wurde, erwiesen sich Fosmidomycin und FR900098 als effektive Inhibitoren der DXR. Dies wurde in dieser Doktorarbeit erstmals für das pflanzliche Enzym gezeigt (Schwender *et al.*, 1999). Demgegenüber zeigten die anderen getesteten Phosphonate keinerlei Wirkung. Der IC_{50} -Wert von Fosmidomycin der DXR aus Gerste betrug $0,7 \mu\text{M}$ ($0,5 \text{ mM DOXP}$, 1 mM NADPH), und derjenige des rekombinanten Enzyms aus *Arabidopsis thaliana* betrug $0,28 \mu\text{M}$ ($0,25 \text{ mM DOXP}$, 1 mM NADPH).
- 8) Es wurde die Wirkung verschiedener Hemmstoffe der Isoprenoidbiosynthese auf das Wachstum und die Pigmentakkumulation der Algen *Cyanidium caldarium* (Rhodophy-

ta), *Ochromonas danica* (Heterokontophyta) und *Euglena gracilis* (Euglenophyta) untersucht.

Cerivastatin, ein Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, führte bei *Ochromonas* und *Cyanidium*, die beide Biosynthesewege besitzen, zum Absterben der Kulturen. Fosmidomycin führte bei *Cyanidium caldarium* unter autotrophen Bedingungen zu einer Wachstumshemmung, und bei *Ochromonas danica*, angezogen unter photoheterotrophen Bedingungen, zu einer Hemmung der Pigmentakkumulation. Auch Clomazone und 5-Ketoclomazone hemmte die Pigmentakkumulation von *Ochromonas*. Die stärkere Hemmwirkung von 5-Ketoclomazone im Vergleich zu Clomazone ist in Einklang mit der Bioaktivierung von Clomazone. Eine Hemmung eines Isoprenoidbiosyntheseweges kann demnach nicht durch den anderen aufgehoben werden. Beide Isoprenoidbiosynthesewege sind offenbar essentiell für ein normales Wachstum. Das externe Angebot von Intermediaten des DOXP/MEP-Weges (Methylerythritol und Isopentenol und Dimethylallylalkohol), konnte ebenfalls die Hemmung von Wachstum und Pigmentbildung nicht aufheben. Wahrscheinlich fehlen die zur Phosphorylierung dieser Intermediate nötigen Kinasen.

Markierungsexperimente legten nahe, dass *Euglena* nur den Acetat/MVA-Weg besitzt. Die Wirkung von Fosmidomycin auf das Wachstum wurde untersucht, um zu überprüfen, ob der DOXP/MEP-Weg in dieser Alge vorhanden ist. Jedoch weder Fosmidomycin noch Cerivastatin und auch eine Kombination beider Hemmstoffe hemmten *Euglena*. Offenbar ist der DOXP/MEP-Weg in der Tat in *Euglena gracilis* nicht vorhanden, und Cerivastatin gelangt nicht zu dem Kompartiment der Isoprenoidbiosynthese.

- 9) Im Diskussionsteil wurden die eigenen Ergebnisse in Zusammenhang mit dem aktuellen Stand der Forschung des DOXP/MEP-Weges diskutiert, und die Evolution des Acetat/MVA-Weges und des DOXP/MEP-Weges erörtert. Außerdem wurde ein Ausblick auf die weitere Forschung gegeben.

6 Literatur

- Adam, K.-P. und Zapp, J.: Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. - *Phytochem.* **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* and *Conocephalum conicum*. - *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 181-187 (1998).
- Adam, K.-P., Thiel, R. und Zapp, J.: Incorporation of 1-[1-¹³C]deoxy-D-xylulose in chamomile sesquiterpenes. - *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 127-132 (1999).
- Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Gräwert, T., Arigoni, D., Bacher, A. und Rohdich, F.: Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12108-12113 (2002).
- 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).
- Altincicek, B., Hintz, M., Sanderbrand, S., Wiesner, J., Beck, E. und Jomaa, H.: Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes of the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. - *FEMS Microbiol. Lett.* **190**, 329-333 (2000).
- Altincicek, B., Kollas, A.-K., Sanderbrand, S., Wiesner, J., Hintz, M., Beck, E. und Jomaa, H.: GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. - *J. Bacteriol.* **183**, 2411-2416 (2001a).
- Altincicek, B., Moll, J., Campos, N., Foerster, G., Beck, E., Hoeffler, J.-F., Grosdemange-Billiard, C., Rodríguez-Concepción, M., Rohmer, M., Boronat, A., Eberl, M. und Jomaa, H.: Cutting edge: human $\gamma\delta$ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *J. Immunol.* **166**, 3655-3658 (2001b).
- Altincicek, B., Kollas, A.-K., Eberl, M., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Hintz, M., Beck, E. und Jomaa, H.: *LytB*, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. - *FEBS Lett.* **499**, 37-40 (2001c).
- Altincicek, B., Duin, E. C., Reichenberg, A., Hedderich, R., Kollas, A.-K., Hintz, M., Wagner, S., Wiesner, J., Beck, E. und Jomaa, H.: *LytB* protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *FEBS Lett.* **532**, 437-440 (2002).
- Araki, N., Kusumi, K., Masamoto, K., Niwa, Y. und Iba, K.: Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate of isoprenoid biosynthesis. - *Physiol. Plant.* **108**, 19-24 (2000).

- 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. 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 (1999a).
- Arigoni, D., Giner, J. L., Sagner, S., Wungsintaweekul, J., Zenk, M. H., Kis, K., Bacher, A. und Eisenreich, W.: Stereochemical course of the reduction step in the formation of 2-C-methylerythritol from the terpene precursor 1-deoxyxylulose in higher plants. - *Chem. Commun.*, 1127-1128 (1999b).
- Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.-H. und Sandberg, G.: An alternative cytokinin biosynthesis pathway. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14778-14783 (2000).
- Aulabaugh, A. und Schloss, J. V.: Oxalyl hydroxamates as reaction intermediate analogues for ketol-acid reductoisomerase. - *Biochemistry* **29**, 2824-2830 (1990).
- Bach, T. J.: Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants - a review. - *Lipids* **30**, 191-202 (1995).
- Bach, T. J. und Lichtenthaler, H. K.: Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. - *Physiol. Plant.* **59**, 50-60 (1983).
- Bach, T. J., Rogers, D. H. und Rudney, H.: Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. *Eur. J. Biochem.* **154**, 103-111 (1986).
- Bach, T. J., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A. und Vollack, K. U.: Mevalonate biosynthesis in plants. - *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **34**, 107-122 (1999).
- Baillie, A. C., Wright, K., Wright, B. J. und Earnshaw, C. G.: Inhibitors of pyruvate dehydrogenase as herbicides. - *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**, 103-112 (1988).
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. und Buchanan, B. B.: Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 370-375 (2003).
- Banthorpe, D. V., Bucknall, G. A., Gutowski, J. A. und Rowan, M. G.: Epoxidation and hydration of prenyl pyrophosphates by plant extracts. - *Phytochem.* **16**, 355-358 (1977).
- Belmant, C., Espinosa, E., Poupot, R., Peyrat, M.-A., Guiraud, M., Poquet, Y., Bonneville, M. und Fournié, J.-J.: 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate a novel mycobacterial metabolite-activating human $\gamma\delta$ T cells. - *J. Biol. Chem.* **274**, 32079-32084 (1999).
- Bergmeyer, H.: Methoden der enzymatischen Analyse. *Verlag Chemie, Weinheim* (1970).
- Bloch, K.: The Biological Synthesis of Cholesterol. - *Science* **150**, 19-28 (1965).

- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A. H. und de Waard, A.: Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. - *J. Biol. Chem.* **234**, 2595-2604 (1959).
- Boucher, Y. und Doolittle, W. F.: The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. - *Mol. Microbiol.* **37**, 703-716 (2000).
- 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).
- Broers, S. T. J.: Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. - *Dissertation, Eidgenössische Hochschule Zürich* (1994).
- Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Sauret-Güeto, S., Galego, F., Lois, L.-M. M. und Boronat, A.: *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate : a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. - *Biochem. J.* **353**, 59-67 (2001a).
- Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Seemann, M., Rohmer, M. und Boronat, A.: Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. - *FEBS Lett.* **488**, 170-173 (2001b).
- Cane, D. E., Chow, C., Lillo, A. und Kang, I.: Molecular cloning, expression and characterization of the first three genes in the mevalonate-independent isoprenoid pathway in *Streptomyces coelicolor*. - *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 1467-1477 (2001).
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodríguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A. und Campos, N.: Expression and molecular analysis of the Arabidopsis *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate Pathway. - *Plant Physiol.* **129**, 1581-1591 (2002).
- Chang, J. H.: Herbicidal 3-isoxazolidinones and hydroxamic acids United States Patent 4,405,357 (1983).
- Chang, J. H., Konz, M., Aly, E. A., Sticker, R. E., Wilson, K. R., Krog, N. E. und Dickinson, P. R.: 3-Isoxazolidinones and related compounds. A new class of herbicides. - In: Baker, D. R. (Hrsg.): *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*, ACS Symposium series 355. American Chemical Society, Washington DC, S. 10-23 (1987).
- Chappell, J.: Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 521-547 (1995).
- Chappell, J.: The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. - *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 151-157 (2002).

- Charon, L., Pale-Grosdemange, C. und Rohmer, M.: On the reduction steps in the mevalonate independent 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in the bacterium *Zymomonas mobilis*. - *Tetrahedron Lett.* **40**, 7231-7234 (1999).
- Charon, L., Hoeffler, J.-F., Pale-Grosdemange, C., Lois, L.M., Campos, N., Boronat, A. und Rohmer, M.: Deuterium-labeled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. - *Biochem. J.* **346**, 737-742 (2000).
- Choi, D., Ward, B. L. und Bostock, R. M.: Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. - *Plant Cell* **4**, 1333-1344 (1992).
- Cordier, H., Karst, F. und Bergès, T.: Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase. - *Plant Mol. Biol.* **39**, 953-968 (1999).
- Cornish-Bowden, A.: Fundamentals of enzyme kinetics. *Portland Press, London* (1995).
- Croteau, R. B.: Clomazone does not inhibit the conversion of isopentenyl pyrophosphate to geranyl, farnesyl, or geranylgeranyl pyrophosphate *in vitro*. - *Plant Physiol.* **98**, 1515-1517 (1992).
- 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).
- Cunningham, F. X. J. und Gantt, E.: Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. - *Plant Cell Physiol.* **41**, 119-123 (2000).
- Cunningham, F. X. J., Lafond, T. P. und Gantt, E.: Evidence of a role for *lytB* in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *J. Bacteriol.* **182**, 5841-5848 (2000).
- Cvejić, J. H. und Rohmer, M.: CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornerutum* and *Nitzschia ovalis*. - *Phytochem.* **53**, 21-28 (2000).
- Daisuke, I., Renuka Praxide, K., Takashi, F., Kenji, K. und Nabeta, K.: Nonequivalent labeling of the phytyl side chain of chlorophyll a in callus of the hornwort *Anthoceros punctatus*. - *J. Nat. Prod.* **63**, 1090-1093 (2000).
- Davis, E. D. und Croteau, R.: Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. - *Top. Curr. Chem.* **209**, 53-95 (2000).
- Disch, A. und Rohmer, M.: On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. - *FEMS Microbiol. Lett.* **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* PCC 6714. - *Biochem. J.* **333**, 381-388 (1998b).
- Dittrich, P. und Angyal, S. J.: 2-C-Methyl-D-erythritol in leaves of *Liriodendron tulipifera*. - *Phytochem.* **27**, 935 (1988).
- Duke, S. O. und Paul, R. N.: Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development. I. Ultrastructural effects in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) primary leaves. - *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**, 1-10 (1986).
- Dumas, R., Joyard, J. und Douce, R.: Purification and characterization of acetoxyacid reductoisomerase from spinach chloroplasts. - *Biochem. J.* **262**, 971-976 (1989).
- Duvold, T., Cali, P., Rohmer, M. und Bravo, J.-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 (1997a).
- Duvold, T., Pale-Grosdemange, 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 (1997b).
- Eberl, M., Altincicek, B., Kollas, A.-K., Sanderbrand, S., Bahr, U., Reichenberg, A., Beck, E., Foster, D., Wiesner, J., Hintz, M. und Jomaa, H.: Accumulation of a potent $\gamma\delta$ T cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*. - *Immunology* **106**, 200 (2002).
- 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).
- Eisenreich, W., Rohdich, F. und Bacher, A.: Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. - *Trends Plant Sci.* **6**, 78-84 (2001).
- Eisenreich, W., Bacher, A., Berry, A., Bretzel, W., Hümbelin, M., Lopez-Ulibarri, R., Mayer, A. F. und Yeliseev, A.: Biosynthesis of zeaxanthin via mevalonate in *Paracoccus* species Strain PTA-3335. A product-based retrobiosynthetic study. - *J. Org. Chem.* **67**, 871-875 (2002).
- ElNaggar, S. F., Creekmore, R. W., Schocken, M., Rosen, R. T. und Robinson, R. A.: Metabolism of clomazone herbicide in soybean. - *J. Agric. Food Chem.* **40**, 880-883 (1992).

- 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).
- Ershov, Y. V., Gantt, R. R., Cunningham, F. X. J. und Gantt, E.: Isopentenyl diphosphate isomerase deficiency in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. - *FEBS Lett.* **473**, 337-340 (2000).
- Ershov, Y. V., Gantt, R. R., Cunningham, F. X. J. und Gantt, E.: Isoprenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. - *J. Bacteriol.* **184**, 5045-5051 (2002).
- Estéves, J. M., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jimenéz, L. F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y. und León, P.: Analysis of the expression of *CLAI*, a gene that encodes the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. - *Plant Physiol.* **124**, 95-103 (2000).
- Estéves, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S. und León, P.: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. - *J. Biol. Chem.* **276**, 22901-22909 (2001).
- Estramareix, B. und David, S.: Biosynthesis of thiamine. - *New J. Chem.* **20**, 607-629 (1996).
- Fellermeier, M. A., Maier, U. H., Sagner, S., Bacher, A. und Zenk, M.: (-)-2C-Methyl-D-erythro-1,4-lactone is formed after application of the terpenoid precursor 1-deoxy-D-xylulose. - *FEBS Lett.* **437**, 278-280 (1998).
- Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Kis, K., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. und Zenk, M. H.: Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis: The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants. - *Eur. J. Biochem.* **268**, 6302-6310 (2001).
- Ford, C. W.: A new lactone from water-stressed chickpea. - *Phytochem.* **20**, 2019-2020 (1981).
- Fujisaki, S., Ohnuma, S.-i., Horiuchi, T., Takahashi, I., Tsukui, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Kitabatake, M. und Inokuchi, H.: Cloning of a gene from *Escherichia coli* that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. - *Gene* **175**, 83-87 (1996).
- Funes, S., Davidson, E., Reyes-Prieto, A., Magallon, S., Herion, P., King, M. P. und Gonzalez-Halphen, D.: A green algal apicoplast ancestor. - *Science* **298**, 2155 (2002).
- Gao, W., Loeser, R., Raschke, M., Dessoy, M. A., Fulhorst, M., Alpermann, H., Wessjohann, L. A. und Zenk, M. H.: (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: an intermediate in the formation of terpenoids in plant chromoplasts. - *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 2604-2607 (2002).

- Garcia, P., Gonzalez, P., Garcia, E., Lopez, R. und Garcia, J. L.: LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. - *Mol. Microbiol.* **31**, 1275-1277 (1999).
- Gershenzon, J. und Croteau, R. B.: Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. - In: Moore, T. S. (Hrsg.): *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, Boca Raton, S. 339-388 (1993).
- Giner, J. L., Jaun, B. und Arigoni, D.: Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: The fate of the 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. - *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1857-1858 (1998).
- Goldstein, J. L. und Brown, M.: Regulation of the mevalonate pathway. - *Nature* **343**, 425-430 (1990).
- Golz, A. und Lichtenthaler, H. K.: Inhibition of the plastidic pyruvate dehydrogenase complex in isolated plastids of oat. - *Z. Naturforsch.* **49c**, 421-426 (1984).
- Goodwin, T. W.: Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$, $[2-^{14}\text{C}]$ -acetate and $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonic acid into β -carotene in etiolated maize seedlings. - *Biochem. J.* **68**, 26-27 (1958).
- Goodwin, T. W.: The prenyl lipids of the membranes of higher plants. - In: Tevini, M., Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): *Lipid and Lipid Polymers of Higher Plants*. Springer Verlag, Berlin, S. 29-47 (1977).
- Gray, J. C.: Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. - *Adv. Bot. Res.* **14**, 25-91 (1987).
- Grolle, S., Bringer-Meyer, S. und Sahn, H.: Isolation of the *dxr* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. - *FEMS Microbiol. Lett.* **191**, 131-137 (2000).
- Hahn, F. M., Hurlburt, A. P. und Poulter, C. D.: *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. - *J. Bacteriol.* **181**, 4499-4504 (1999).
- Hahn, F. M., Eubanks, L. M., Testa, C. A., Blagg, B. S. J., Baker, J. A. und Poulter, C. D.: 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. - *J. Bacteriol.* **183**, 1-11 (2001).
- Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D. und Rohdich, F.: Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14837-14842 (2001).
- Heineke, D., Riens, B., Grosse, H., Hoferichter, P., Peter, U., Flügge, U.-I. und Heldt, H. W.: Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. - *Plant Physiol.* **95**, 1131-1137 (1991).
- Hemmerlin, A. und Bach, T. J.: Effects of mevinolin on cell cycle progression and viability of tobacco BY-2 cells. - *Plant J.* **14**, 65-74 (1998).

- Hemmerlin, A., Brown, S. C. und Bach, T. J.: Function of mevalonate in tobacco cell proliferation. - *Acta Bot. Gallica* **146**, 85-100 (1999).
- Hemmerlin, A., Fischt, I. und Bach, T. J.: Differential interaction of branch-specific inhibitors of isoprenoid biosynthesis with cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. - *Physiol. Plant.* **110**, 342-349 (2000).
- Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M. A., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. und Rohdich, F.: Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2486-2490 (2000).
- Hintz, M., Reichenberg, A., Altincicek, B., Bahr, U., Gschwind, R. M., Kollas, A.-K., Beck, E., Wiesner, J., Eberl, M. und Jomaa, H.: Identification of (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in *Escherichia coli*. - *FEBS Lett.* **509**, 317-322 (2001).
- Hoeffler, J.-F., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C. und Rohmer, M.: Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. Mechanistic investigations of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. - *Eur. J. Biochem.* **269**, 4446-4457 (2002a).
- Hoeffler, J.-F., Hemmerlin, A., Grosdemange-Billiard, C., Bach, T. J. und Rohmer, M.: Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: On the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. - *Biochem. J.* **366**, 573-583 (2002b).
- Hümbelin, M., Thomas, A., Lin, J., Li, J., Jore, J. und Berry, A.: Genetics of isoprenoid biosynthesis in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. - *Gene* **297**, 129-139 (2002).
- Jomaa, H.: Use of 3-isoxazolidinones and hydroxylamine acids for the treatment of infections. - *Internationales Patent*, WO 00/41473 (2000).
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D. und Beck, E.: Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. - *Science* **285**, 1573-1575 (1999a).
- Jomaa, H., Feurle, J., Lühs, K., Kunzmann, V., Tony, H.-P., Herderich, M. und Wilhelm, M.: $V\gamma 9/V\delta 2$ T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **25**, 371-378 (1999b).
- Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K. und Misawa, N.: Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. - *Biochem. J.* **324**, 421-426 (1997).
- Kamuro, Y., Kawai, T. und Kakiuchi, T.: - *US Patent* 4,846,872 (1989).

- Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y. und Seto, H.: An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 932-937 (2001).
- Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* (1988).
- Kemp, L. E., Bond, C. S. und Hunter, W. N.: Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: An essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6591-6596 (2002).
- Kleinig, H.: The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 39-59 (1989).
- Kleudgen, H. K. und Lichtenthaler, H. K.: Induction and reversion of prenyl-lipid synthesis in etiolated barley seedlings by red and far-red light. In: Avron, M. (Hrsg.): Proceedings of the 3rd International Congress on Photosynthesis, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, Vol. III. *Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam*, S. 2021-2028 (1974).
- Kojo, H., Shigi, Y. und Nishida, M.: FR-31564. a new phosphonic acid antibiotic: bacterial resistance and membrane permeability. - *J. Antibiot.* **33**, 44-48 (1980).
- Kollas, A.-K., Duin, E. C., Eberl, M., Altincicek, B., Hintz, M., Reichenberg, A., Henschker, D., Henne, A., Steinbrecher, I., Ostrovsky, D. N., Hedderich, R., Beck, E., Jomaa, H. und Wiesner, J.: Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *FEBS Lett.* **532**, 432-436 (2002).
- Koppisch, A. T., Fox, D. T., Blagg, B. S. J. und Poulter, C. D.: *E. coli* MEP synthase: Steady-state kinetic analysis and substrate binding. - *Biochemistry* **41**, 236-243 (2002).
- Krall, L., Raschke, M., Zenk, M. H. und Baron, C.: The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyl diphosphate and AMP. - *FEBS Lett.* **527**, 315-318 (2002).
- Kreuz, K. und Kleinig, H.: On the compartmentation of isopentenyl diphosphate synthesis and utilization in plant cells. - *Planta* **153**, 153-587 (1981).
- Kreuz, K. und Kleinig, H.: Synthesis of prenyl lipids in cells of spinach leaf. Compartmentation of enzymes for formation of isopentenyl diphosphate. - *Eur. J. Biochem.* **141**, 531-535 (1984).
- Kringstad, R., Singaas, A. O., Rusten, G., Baekkemoen, G., Paulsen, B. S. und Nordal, A.: 2-C-Methylaldotetronic acid, a new lactone-forming acid present in plants. - *Phytochem.* **19**, 543-545 (1980).
- Kuzuyama, T., Shimizu, T. 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 (1998).

- Kuzuyama, T., Takahashi, S., Takagi, M. und Seto, H.: Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. - *J. Biol. Chem.* **275**, 19928-19932 (2000a).
- Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Dairi, T. und Seto, H.: Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. - *Tetrahedron Lett.* **41**, 703-706 (2000b).
- Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T. und Seto, H.: Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol to its 2-phospho derivative by 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase. - *Tetrahedron Lett.* **41**, 2925-2928 (2000c).
- Kyhse-Andersen, J.: Electrophoretic transfer of multiple gels: simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. - *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209 (1984).
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. - *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 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.* **1**, 170-174 (1999a).
- Lange, B. M. und Croteau, R. B.: Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13714-13719 (1999b).
- 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., Rujan, T., Martin, W. und Croteau, R. B.: Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13172-13177 (2000).
- Lange, B. M., Ketchum, R. E. B. und Croteau, R. B.: Isoprenoid biosynthesis. Metabolic profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis. - *Plant Physiol.* **127**, 305-314 (2001).
- Leyes, A. E., Baker, J. A., Hahn, F. M. und Poulter, C. D.: Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: Stereochemistry of the reaction catalyzed by isopentenyl diphosphate : dimethylallyl diphosphate isomerase. - *Chem. Comm.*, 717-718 (1999a).
- Leyes, A. E., Baker, J. A. und Poulter, C. D.: Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: stereochemistry of the reaction catalyzed by farnesyl diphosphate synthase. - *Org. Lett.* **1**, 1071-1073 (1999b).

- Lichtenthaler, H. K.: Light-stimulated synthesis of plastid quinones and pigments in etiolated barley seedlings. - *Biochim. Biophys. Acta* **184**, 164-172 (1969).
- Lichtenthaler, H. K.: Regulation of prenylquinone synthesis in higher plant leaves. - In: Tevini, M. Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. Springer Verlag, Berlin, S. 231-244 (1977).
- Lichtenthaler, H. K.: Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. - *Methods Enzymol.*, **148**, 350-382 (1987).
- Lichtenthaler, H. K.: The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. - *Fett/Lipid* **100**, 128-138 (1998).
- Lichtenthaler, H. K.: The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47-65 (1999).
- Lichtenthaler, H. K. und Park, R. B.: Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. - *Nature* **198**, 1970-1972 (1963).
- Lichtenthaler, H. K. und Calvin, M.: Chinone and pigment composition of chloroplast lamellae from spinach. - *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 30-40 (1964).
- Lichtenthaler, H. K. und Becker, K.: Changes of the plastidquinone and carotenoid metabolism associated with the formation of functioning chloroplast in continuous far-red and white light. In: Junk, W. (Hrsg.): *Proceedings of the 2nd International Congress on Photosynthesis Research, Vol. 3*. N. V. Publishers, The Hague, S. 2451-2459 (1972).
- Lichtenthaler, H. K. und Becker, K.: Formation of individual carotenoid components in *Raphanus* etioplasts in continuous far-red and white light. - *Z. Pflanzenphys.* **75**, 303-306 (1975).
- 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: Wintermans, J. F. G. M., Kniper, P. J. C. (Hrsg.): *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, S. 489-500 (1982).
- Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Seemann, M. und Rohmer, M.: Carotenoid biosynthesis in green alga proceeds via a novel biosynthetic pathway. - In: Mathis, P. (Hrsg.): *Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. IV*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, S. 115-118 (1995).
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. und Schwender, J.: Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis in higher plants. - *Physiol. Plant.* **101**, 643-652 (1997).
- Lichtenthaler, H. K., Zeidler, J., Schwender, J. und Müller, C.: The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test-system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. - *Z. Naturforsch.* **55c**, 305-313 (2000).

- Liebl, R. A. und Norman, M. A.: Mechanism of clomazone selectivity in corn (*Zea mays*), soy bean (*Glycine max*), smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*), and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). - *Weed Science* **39**, 329-332 (1991).
- Liottenberg, S., North, H. und Mario-Poll, A.: Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. - *Plant Phys. Biochem.* **37**, 341-350 (1999).
- Liu, S. Y., Shocken, M. und Rosazza, J. P. N.: Microbial transformations of clomazone. - *J. Agric. Food Chem.* **44**, 313-39 (1996).
- Lluch, M. A., Masferrer, A., Arró, M., Boronat, A. und Ferrer, A.: Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from *Arabidopsis thaliana*. - *Plant Mol. Biol.* **42**, 365-376 (2000).
- Lois, L.-M. M., Campos, N., Rosa Putra, S., Danielsen, K., Rohmer, M. und Boronat, A.: Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-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).
- Lois, L.-M. M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N. und Boronat, A.: Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. - *Plant J.* **22**, 503-513 (2000).
- Loreto, F. und Velikova, V.: Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. - *Plant Physiol.* **127**, 1781-1787 (2001).
- Lütke-Brinkhaus, F. und Kleinig, H.: Formation of isopentenyl diphosphate via mevalonate does not occur within etioplasts and etiochloroplasts of mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. - *Planta* **171**, 401-406 (1987).
- Lütke-Brinkhaus, F., Liedvogel, B. und Kleinig, H.: On the biosynthesis of ubiquinones in plant mitochondria. - *Eur. J. Biochem.* **141**, 537-541 (1984).
- Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A. und Eisenreich, W.: Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1062-1067 (2000).
- Lützow, M., Beyer, P. und Kleinig, H.: The herbicide *Command* does not inhibit the prenyl diphosphate-forming enzymes in plastids. - *Z. Naturforsch.* **45c**, 856-858 (1990).
- Lynen, F. und Henning, U.: Über den biologischen Weg zum Naturkautschuk. - *Angew. Chemie* **72**, 820-829 (1960).
- Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. und Kessel, I.: Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. - *Angew. Chemie* **70**, 738-742 (1958).

- Mahmoud, S. S. und Croteau, R. B.: Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8915-8920 (2001).
- Mandel, M. A., Feldmann, K. K., Herrera-Estrella, L. L., Rocha-Sosa, M. M. und León, P.: *CLAI*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. - *Plant J.* **9**, 649-658 (1996).
- Marschner, H.: Mineral nutrition in higher plants. *Academic Press Inc., London* (1986).
- McCaskill, D. und Croteau, R.: Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. - *Planta* **197**, 49-56 (1995).
- McCaskill, D. und Croteau, R.: Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the 1-deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. - *Tetrahedron Lett.* **40**, 653-656 (1999).
- Milborrow, B. V. und Lee, H. S.: Endogenous biosynthetic precursors of (+) abscisic acid. VI carotenoids and ABA are formed by the "non-mevalonate" triose-pyruvate pathways in chloroplasts. - *Aust. J. Plant Physiol.* **25**, 507-512 (1998).
- Miller, B., Heuser, T. und Zimmer, W.: Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. - *FEBS Lett.* **481**, 221-226 (2000).
- Miller, B., Oschinski, C. und Zimmer, W.: First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli*. - *Planta* **213**, 483-487 (2001).
- Mittenhuber, G.: Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B₆ (Pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. - *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 1-20 (2001).
- Montamat, F., Guilloton, M., Karst, F. und Delrot, S. .: Isolation and characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. - *Gene* **167**, 197-202 (1996).
- Müller, C.: Untersuchungen zur IPP-Biosynthese bei Algen aus unterschiedlichen Abteilungen. - *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe* (1997).
- Müller, C., Schwender, J., Zeidler, J. und Lichtenthaler, H. K.: Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 794-795 (2000).
- 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 ^{13}C -labelled mevalonates and ^{13}C -labelled glycine in cultured cells of liverworts, *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. - *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 261-267 (1997).
- Narita, J. O. und Gruissem, W.: Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. - *Plant Cell* **1**, 181-190 (1989).
- Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Erhardt, W. und Taube, D.: Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with Coomassie Brilliant Blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. - *Electrophoresis* **11**, 101-117 (1990).
- Norman, M. A., Liebl, R. A. und Widholm, J. M.: Uptake and metabolism of clomazone in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. - *Plant Physiol.* **92**, 777-784 (1990).
- Ogura, K. und Koyama, T.: Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. - *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276 (1998).
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M. und Kamiya, Y.: Five geranyl geranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localised into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. - *Plant Physiol.* **122**, 1045-1056 (2000).
- Okada, K., Kawaide, H., Kuzuyama, T., Seto, H., Curtis, I. S. und Kamiya, Y.: Antisense and chemical suppression of the nonmevalonate pathway affects *ent*-kaurene biosynthesis in *Arabidopsis*. - *Planta* **215**, 339-344 (2002).
- Okuhara, M., Kuroda, Y., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, M. und Imanaka, H.: Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32853 and FR-33289. - *J. Antibiot.* **33**, 24-28 (1980).
- Ostrovsky, D., Diomina, G., Lysak, E., Matveeva, E., Ogrel, O. und Trutko, S.: Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains. - *Arch. Microbiol.* **171**, 69-72 (1998).
- Ourisson, G. und Nakatani, Y.: The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. - *Chem. Biol.* **1**, 11-23 (1994).
- Parmryd, I. und Dallner, G.: Function and Pharmacology of Protein Prenylation; Organization of isoprenoid biosynthesis. - *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 677-682 (1996).
- Parmryd, I., Andersson, B. und Dallner, G.: Protein prenylation in spinach chloroplasts. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10074-10079 (1999).
- Piel, J., Donath, J., Bandemer, K. und Boland, W.: Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: induced and constitutive emission of volatiles. - *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 2478-2481 (1998).

- Proteau, P. J., Woo, Y. H., Williamson, R. T. und Phaosiri, C.: Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate isomeroeductase. - *Org. Lett.* **1**, 921-923 (1999).
- Querol, J., Campos, N., Imperial, S., Boronat, A. und Rodríguez-Concepción, M.: Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. - *FEBS Lett.* **514**, 343-346 (2002).
- Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. und Arigoni, D.: Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. - *FEBS Lett.* **465**, 157-160 (2000).
- Reuter, K., Sanderbrand, S., Jomaa, H., Wiesner, J., Steinbrecher, I., Beck, E., Hintz, M., Klebe, G. und Stubbs, M. T.: Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *J. Biol. Chem.* **277**, 5378-5384 (2002).
- Richard, S. B., Bowman, M. E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A. M., Cane, D. E. und Noel, J. P.: Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthetase involved in mevalonate-independent isoprenoid biosynthesis. - *Nat. Struct. Biol.* **8**, 641-648 (2001).
- Richard, S. B., Ferrer, J.-L., Bowman, M. E., Lillo, A. M., Tetzlaff, C. N., Cane, D. E. und Noel, J. P.: Structure and mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase. - *J. Biol. Chem.* **277**, 8667-8672 (2002).
- Richter, G.: Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* (1988).
- Rieder, C., Strauß, G., Fuchs, G., Arigoni, D., Bacher, A. und Eisenreich, W.: Biosynthesis of the diterpene verrucosan-2 β -ol in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. - *J. Biol. Chem.* **273**, 18099-18108 (1998).
- Rieder, C., Jaun, B. und Arigoni, D.: On the early steps of cineol biosynthesis in *Eucalyptus globulus*. - *Helv. Chim. Acta* **83**, 2504-2513 (2000).
- Rodríguez-Concepción, M. und Boronat, A.: Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. - *Plant Physiol.* **130**, 1079-1089 (2002).
- Rodríguez-Concepción, M., Campos, N., Lois, L.-M., Maldonado, C., Hoeffler, J.-F., Grosdemange-Billiard, C. und Rohmer, M.: Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. - *FEBS Lett.* **473**, 328-332 (2000).
- Rodríguez-Concepción, M., Ahumada, I., Diez-Juez, E., Sauret-Güeto, S., Lois, L.-M., Gallego, F., Carretero-Paulet, L., Campos, N. und Boronat, A.: 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. - *Plant J.* **27**, 213-222 (2001).

- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A. und Zenk, M. H.: Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11758-11763 (1999).
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk, M. H. und Bacher, A.: Biosynthesis of terpenoids: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6451-6456 (2000a).
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Lüttgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Schramek, N., Zenk, M. H. und Bacher, A.: Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8251-8256 (2000b).
- Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A. und Eisenreich, W.: Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1158-1163 (2002).
- Rohmer, M.: A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. - In: Barton, F., 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. 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).
- Roughan, P. G.: Long-chain fatty acid synthesis and utilization by isolated chloroplasts. *Methods Enzymol.* **148**, 327-337 (1987).
- 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., Fellermeier, 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. F. und Maniatis, T.: Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York* (1989)
- Sandmann, G. und Böger, P.: Interference of dimethazone with formation of terpenoid compounds. - *Z. Naturforsch.* **41c**, 729-732 (1986).
- Sandmann, G. und Böger, P.: Interconversion of prenyl pyrophosphates and subsequent reactions in the presence of FMC 57020. - *Z. Naturforsch.* **42c**, 803-807 (1987).
- Sanmiya, K., Ueno, O., Matsuoka, M. und Yamamoto, N.: Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. - *Plant Cell Physiol.* **40**, 348-354 (1999).
- 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).
- 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).
- Schopfer, P. und Brennicke, A.: Pflanzenphysiologie. *Springer-Verlag, Berlin* (1999).
- Schörken, U. und Sprenger, G. A.: Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. - *Biochim. Biophys. Acta* **1385**, 229-243 (1998).
- Schramm, R. W., Tomaszewska, B. und Petersson, G.: Sugar-related hydroxy acids from *Phaseolus* and *Trifolium* species. - *Phytochem.* **18**, 1393-1394 (1979).
- Schulte, A. E., van der Heijden, R. und Verpoorte, R.: Purification and characterization of phosphomevalonate kinase from *Catharantus roseus*. - *Phytochem.* **52**, 975-984 (1999).
- Schwarz, M. K.: Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. - *Dissertation, Eidgenössische Hochschule Zürich* (1994).
- Schwarz, M. und Arigoni, D.: Ginkgolide biosynthesis. - In: Barton, F., Nakanishi, K. (Hrsg.): *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 2: Isoprenoids including Carotenoids and Steroids* (D. E. Cane Hrsg.). *Elsevier Science, Oxford*, S. 367-400 (1999).
- Schwender, J.: Untersuchungen zur Biosynthese der Isoprenoide bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* mittels ¹³C-Isotopenmarkierung (Diplomarbeit, Universität Karlsruhe). - *Karls. Beitr. Pflanzenphysiol.* **36**, 1-168 (1995).
- Schwender, J.: Die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese und deren Verbreitung in Pflanzen (Dissertation, Universität Karlsruhe). - *Karls. Beitr. Pflanzenphysiol.* **36**, 1-168 (1999).
- 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).
- Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J. 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).
- Schwender, J., Gemünden, C. und Lichtenthaler, H. K.: Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. - *Planta* **212**, 416-423 (2001).
- Scott, J. E. und Weston, L. A.: Cole crop (*Brassica oleracea*) tolerance to clomazone. - *Weed Science* **40**, 7-11 (1992).
- Scott, J. E., Weston, L. A., Chappell, J. und Hanley, K.: Effects of clomazone on IPP isomerase and prenyl transferase activities in cell suspension cultures and cotyledons of solanaceous species. - *Weed Science* **42**, 509-516 (1994).
- Seemann, M., Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Hoeffler, J.-F., Grosdemange-Billiard, C., Boronat, A. und Rohmer, M.: Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: accumulation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in a *gcpE* deficient mutant of *Escherichia coli*. - *Tetrahedron Lett.* **43**, 775-778 (2002a).
- Seemann, M., Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Ibañez, E., Duvold, T., Tritsch, D., Boronat, A. und Rohmer, M.: Isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli* via the methylerythritol phosphate pathway: enzymatic conversion of methylerythritol cyclodiphosphate into a phosphorylated derivative of (*E*)-2-methylbut-2-ene-1,4-diol. - *Tetrahedron Lett.* **43**, 1413-1415 (2002b).
- Seemann, M., Tse Sum Bui, B., Wolff, M., Tritsch, D., Campos, N., Boronat, A., Marquet, A. und Rohmer, M.: Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: the (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] protein. - *Angew. Chemie Int. Ed.* **41**, 4337-4339 (2002c).
- Seto, H., Watanabe, H. und Furihata, K.: Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioovifer*. - *Tetrahedron Lett.* **37**, 7979-7982 (1996).
- Seto, H., Orihara, N. und Furihata, K.: Studies on the biosynthesis of terpenoids produced by Actinomycetes. Part 4. Formation of BE-40644 by the mevalonate and nonmevalonate pathways. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 9497-9500 (1998).
- Sharkey, T. D., Chen, X. und Yeh, S.: Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. - *Plant Physiol.* **125**, 2001-2006 (2001).

- Shigi, Y.: Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. - *J. Antimicrobial Chemotherapy* **24**, 131-145 (1989).
- Sommer, S., Severin, K., Camara, B. und Heide, L.: Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. - *Phytochem.* **38**, 623-627 (1995).
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S. und Sahm, H.: Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12857-12862 (1997).
- Steinbacher, S., Kaiser, J., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Eisenreich, W., Gerhardt, S., Bacher, A. und Rohdich, F.: Structure of 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids. - *J. Mol. Biol.* **316**, 79-88 (2002).
- Stermer, B. A., Bianchini, G. M. und Korth, K. L.: Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. - *J. Lipid Res.* **35**, 1133-1140 (1994).
- Sun, Z., Cunningham, F. X. J. und Gantt, E.: Differential expression of two isopentenylpyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11482-11488 (1998).
- Takagi, M., Kuzuyama, T., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T. und Seto, H.: Studies on the nonmevalonate pathway: formation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol. - *Tetrahedron Lett.* **41**, 3395-3398 (2000a).
- Takagi, M., Kuzuyama, T., Takahashi, S. und Seto, H.: A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. strain CL190. - *J. Bacteriol.* **182**, 4153-4157 (2000b).
- 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).
- Takei, K., Sakakibara, H. und Sugiyama, T.: Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. - *J. Biol. Chem.*, **276**, 26405-26410 (2001).
- Treharne, K. J., Mercer, E. I. und Goodwin, T. W.: Incorporation of [2-¹⁴C]mevalonic acid into sterol, β -carotene or phytol in developing leaves of monocotyledonous and dicotyledonous plants. - *Biochem. J.* **90**, 39-40 (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 chloroplasts development. - *Biochem. J.* **99**, 239-245 (1966).

- Veau, B., Courtois, M., Oudin, A., Chénieux, J.-C., Rideau, M. und Clastre, M.: Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. - *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 159-163 (2000).
- Voet, D. und Voet, J. G.: Biochemie. *John Wiley & Sons, Inc., New York* (1994).
- Vollack, K. U. und Bach, T. J.: Cloning of a cDNA encoding cytosolic acetoacetyl-coenzyme A thiolase from radish by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. - *Plant Physiol.* **111**, 1097-1108 (1996).
- Von Korff, R. W.: Purity and stability of pyruvate and α -ketoglutarate. *Methods Enzymol.* **13**, 519-523 (1969).
- Wallach, O.: Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischen Öle. - *Justus Liebigs Ann. Chem.* **227**, 277-302 (1885).
- Walter, M. H., Fester, T. und Strack, D.: Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. - *Plant J.* **21**, 571-578 (2000).
- Walter, M. H., Hans, J. und Strack, D.: Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. - *Plant J.* **31**, 243-254 (2002).
- Weimer, M. R., Buhler, D. D. und Balke, N. E.: Clomazone selectivity: absence of differential uptake, translocation, or detoxification. - *Weed Science* **39**, 529-534 (1991).
- Weimer, M. R., Balke, N. E. und Buhler, D. D.: Herbicide clomazone does not inhibit *in vitro* geranylgeranyl synthesis from mevalonate. - *Plant Physiol.* **98**, 427-432 (1992a).
- Weimer, M. R., Balke, N. E. und Buhler, D. D.: Absorption and metabolism of clomazone by suspension-cultured cells of soybean and velvetleaf. - *Pestic. Biochem. Physiol.* **42**, 43-53 (1992b).
- Wentzinger, L. F., Bach, T. J. und Hartmann, M.-A.: Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. - *Plant Physiol.* **130**, 334-346 (2002).
- Weston, L. A. und Barrett, M.: Tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and bell pepper (*Capsicum annum*) to clomazone. - *Weed Science* **37**, 285-289 (1989).
- Wiesner, J., Henschker, D., Hutchinson, D. B., Beck, E. und Jomaa, H.: In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. - *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2889-2894 (2002).
- Wilding, E. I., Brown, J. R., Bryant, A. P., Chalker, A. F., Holmes, D. J., Ingraham, K. A., Iordanescu, S., So, C. Y., Rosenberg, M. und Gwynn, M. N.: Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate in gram-positive cocci. - *J. Bacteriol.* **182**, 4319-4327 (2000).

- Wilson, R. J. M.: Progress with parasite plastids. - *J. Mol. Biol.* **319**, 257-274 (2002).
- Wolff, M., Seemann, M., Grosdemange-Billiard, C., Tritsch, D., Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A. und Rohmer, M.: Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*. - *Tetrahedron Lett.* **43**, 2555-2559 (2002).
- Yajima, S., Nonaka, T., Kuzuyama, T., Seto, H. und Ohsawa, K.: Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors: Implications of a flexible loop movement upon substrate binding. - *J. Biochem.* **131**, 313-317 (2002).
- Yokota, A. und Sasajima, K.-I.: Formation of 1-deoxy-D-threo-pentulose and 1-deoxy-L-threo-pentulose by cell-free extracts of microorganisms. - *Agric. Biol. Chem.* **48**, 149-158 (1984).
- Yokota, A. und Sasajima, K.-I.: Formation of 1-deoxyketoses by pyruvate dehydrogenase and acetoin dehydrogenase. - *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2517-2524 (1986).
- Zeidler, J.: Vorstufen und Hemmstoffe der Isoprenbiosynthese in Pflanzen (Dissertation, Universität Karlsruhe). - *Karls. Beitr. Pflanzenphysiol.* **38**, 1-157 (2001).
- Zeidler, J. G., Lichtenthaler, F. W., Lichtenthaler, H. K. und May, H. U.: Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway?. - *Z. Naturforsch.* **52c**, 15-23 (1997).
- Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C., Wiesner, J., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H. und Lichtenthaler, H. K.: Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. - *Z. Naturforsch.* **53c**, 980-986 (1998).
- Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C. und Lichtenthaler, H. K.: The isoprenoid biosynthesis of plants as a test-system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. - *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 798-800 (2000).
- Zhou, W. X. und Nes, W. D.: Stereochemistry of hydrogen introduction at C-25 in ergosterol synthesized by the mevalonate-independent pathway. - *Tetrahedron Lett.* **41**, 2791-2795 (2000).

- Lichtenthaler, H. K., Zeidler, J., Schwender, J. und Müller, C.: The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test-system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. - *Z. Naturforsch.* **55c**, 305-313 (2000).
- Müller, C., Schwender, J., Zeidler, J. und Lichtenthaler, H. K.: Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 794-795 (2000).
- Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J. 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., Schwender, J., Müller, C., Wiesner, J., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H. und Lichtenthaler, H. K.: Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. - *Z. Naturforsch.* **53c**, 980-986 (1998).
- Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C. und Lichtenthaler, H. K.: The isoprenoid biosynthesis of plants as a test-system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. - *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 798-800 (2000).

Lebenslauf von Christian Müller

06.05.1968	Geboren in Pforzheim
1974-1978	Grundschule in Huchenfeld (Pforzheim) und Baden-Baden
1978-1988	Gymnasium in Baden-Baden
1988-1990	Zivildienst in Emmendingen und Karlsruhe
1990-1997	Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH) Abschluss Diplom 1997
Seit Oktober 1997	Beginn der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Botanik II, Universität Karlsruhe (TH), bei Prof. H. K. Lichtenthaler