

**Vorstufen und Hemmstoffe der Isoprenbiosynthese
in Pflanzen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der

Universität Karlsruhe

genehmigte

DISSERTATION

von

Johannes Zeidler

aus Oberhausen

2001

Tag der mündlichen Prüfung:
Referent:
Korreferent:

31.01.2001
Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hartmut K. Lichtenthaler
Prof. Dr. János Rétey

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hartmut K. Lichtenthaler dafür, dass er mir als zunächst fachfremdem Chemiker ermöglicht hat, an einem hochinteressanten Forschungsprojekt der Isoprenoidbiosynthese am Lehrstuhl Botanik II mitzuarbeiten. Ich danke ihm für seine Betreuung und Förderung, insbesondere für die Möglichkeit, meine Ergebnisse bei zahlreichen in- und ausländischen Tagungen vorzustellen und in wissenschaftlichen Zeitschriften zu publizieren. Für seine stete Offenheit und Diskussionsbereitschaft möchte ich herzlich danken und für grundlegende Anregungen nicht nur auf wissenschaftlichem Gebiet.

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

Bei Herrn Dr. Manfred Focke, Botanik II, Universität Karlsruhe, bedanke ich mich sehr herzlich für seine Anregung, die Metabolituntersuchungen zur alternativen Isoprenoidbiosynthese auf Isopren auszurichten sowie für seine kreative Betreuung und Hilfe.

Ich danke Herrn Dr. H. Ulrich May für deuterierte 1-Deoxy-D-xylulose, die er während seiner Doktorarbeit im Institut für Organische Chemie der Universität Darmstadt bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. F. W. Lichtenthaler synthetisiert hat.

Danken möchte ich Herrn Rainer Gröner, der im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit an der Entwicklung zweier Methoden zur Isoprenmessung beteiligt war, der UV-Methode und der Kältefalle zum Sammeln von Isopren für die NMR-Untersuchung.

Frau Claudia Gemünden danke ich für die Hilfe bei der Entwicklung der enzymatischen Synthese von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat während ihrer Staatsexamensarbeit.

Ich danke auch Frau Melanie Siehler für ihre Unterstützung als studentische Hilfskraft bei Ergrünungsexperimenten mit Clomazone, Isopren-Hemmtests und der DOXP-Synthese.

Den Gärtnern des Botanischen Gartens danke ich für die Bereitstellung und Anzucht Isopren-emittierender Pflanzen.

Herrn Dr. Hassan Jomaa, Giessen, möchte ich danken für wertvolle Diskussionen und dafür, dass er uns die Hemmstoffe Fosmidomycin und FR-900038 zur Verfügung gestellt hat.

Für die Bereitstellung von Pflanzen bzw. Chemikalien danke ich Herrn Prof. Dr. Rennenberg, Universität Freiburg, Herrn Dr. Fedtke, Bayer AG, Herrn Prof. Spencer, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, und Herrn Prof. Dr. Croteau, Washington State University.

Meinen Mitdoktoranden im Isoprenoid-Team, Christian Müller und Jörg Schwender, danke ich herzlich für die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit. Dafür danke ich auch Herrn Alexander Baumann, Herrn Oliver Wenzel, Herrn Dr. Stefan Lang, allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Institut und den Studierenden des pflanzenbiochemischen Praktikums.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei gedankt für die Unterstützung des Projekts „Isoprenoide“ (Forschungsbeihilfe Li 119/19-1 an Prof. Dr. H.K. Lichtenthaler).

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	9
	ENGLISH SUMMARY.....	11
1	EINFÜHRUNG.....	11
1.1	Vorkommen und Bedeutung der Isoprenoide.....	15
1.2	Biosynthese von Isoprenoiden aus Isopreneinheiten	17
1.3	Subzelluläre Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese in Pflanzen.	18
1.4	Biosynthese der Isopreneinheiten.....	19
1.4.1	Der Acetat-Mevalonat-Weg	19
1.4.2	Der alternative IPP-Biosyntheseweg	21
1.5	Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese.....	24
1.6	Isoprenemission bei Pflanzen und Tieren.....	25
1.7	Emission weiterer pflanzlicher Isoprenoide	30
1.8	Problemstellung	30
2	MATERIAL UND METHODEN.....	33
2.1	Pflanzenanzucht.....	33
2.2	Chemikalien und Synthesen	34
2.2.1	Eigene Synthesen von ¹³ C und ² H-markierten Substraten.....	34
2.2.2	Enzymatische Synthese von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat	36
2.3	Experimente zur Markierung von Isopren	38
2.3.1	GC/MS-Bestimmung von Isopren	38
2.3.2	Abschätzung des Markierungsgrades von Isopren aus dem Massenspektrum	39
2.4	Quantifizierung von Isopren mittels UV-Spektroskopie.....	42
2.5	Markierungs- und Hemmexperimente mit 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO)..	44
2.5.1	Markierung von MBO mit [1- ² H ₁]-1-Deoxy-D-xylulose und D,L-[2- ¹³ C]- Mevalonsäurelacton.....	44
2.5.2	Abschätzung des Markierungsgrades von MBO aus dem Massenspektrum	44
2.5.3	Hemmung der MBO-Emission mit Fosmidomycin.....	45
2.6	Experimente zur Markierung von Monoterpenen	46
2.6.1	Markierung des etherischen Öls aus Keimlingen von <i>Picea abies</i> L. mit [1- ² H ₁]- 1-Deoxy-D-xylulose.....	46
2.6.2	Markierung flüchtiger Monoterpene aus <i>Pistacia lentiscus</i> L. mit [1- ² H ₁]-1- Deoxy-D-xylulose	46
2.7	Weitere Hemmexperimente	47
2.7.1	Ergrünungsexperimente mit Gerste zum Wirkungsmechanismus von Clomazone	47
2.7.2	Hemmtests mit Algen und <i>E. coli</i>	47
2.7.3	Anstau von 1-Deoxy-D-xylulose in Platanenblättern durch Fosmidomycin.....	50
2.7.4	<i>Raphanus</i> -Wurzelttest mit Cerivastatin	51
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Entwicklung von Methoden zur Messung der Isoprenemission bei Pflanzen	53

3.1.1	GC/MS-Methoden zur Messung des Einbaus stabiler Isotope	53
3.1.2	UV-Methode zur Quantifizierung von Isopren.....	54
3.2	Experimente zur Markierung von Isopren	55
3.2.1	Markierung von Isopren mit [1- ² H ₁]-1-Deoxy-D-xylulose und D,L-[2- ¹³ C]- Mevalonsäurelacton.....	55
3.2.2	Markierungsexperimente mit anderen möglichen IPP-Vorläufern.....	58
3.3	Experimente zur Hemmung der Isoprenemission	59
3.3.1	Hemmung durch Fosmidomycin, FR-900098 und Statine	60
3.3.2	Hemmung durch Clomazone und Derivate	63
3.3.3	Hemmung durch Vitamin B ₆ -Antagonisten.....	64
3.3.4	Hemmung durch weitere Substanzen	65
3.4	Markierungs- und Hemmexperimente mit 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO)..	65
3.4.1	Markierung von MBO mit [1- ² H ₁]-1-Deoxy-D-xylulose und D,L-[2- ¹³ C]- Mevalonsäurelacton.....	66
3.4.2	Hemmung der MBO-Emission mit Fosmidomycin.....	68
3.5	Experimente zur Markierung von Monoterpenen	69
3.5.1	Markierung des etherischen Öls aus Keimlingen von <i>Picea abies</i> L. mit [1- ² H ₁]- 1-Deoxy-D-xylulose.....	69
3.5.2	Markierung flüchtiger Monoterpene aus <i>Pistacia lentiscus</i> L. mit [1- ² H ₁]-1- Deoxy-D-xylulose.....	70
3.6	Weitere Hemmexperimente.....	70
3.6.1	Ergrünungsexperimente mit Gerste zum Wirkungsmechanismus von Clomazone	70
3.6.2	Hemmtests mit Algen und <i>E. coli</i>	73
3.6.3	Anstau von 1-Deoxy-D-xylulose in Platanenblättern durch Fosmidomycin.....	77
3.6.4	Test von Cerivastatin an <i>Raphanus</i> -Wurzeln	78
4	DISKUSSION	79
4.1	Markierungsexperimente mit Isopren und anderen Isoprenoiden	80
4.1.1	Synthesen möglicher Intermediate	80
4.1.2	Experimente zur Markierung von Isopren.....	81
4.1.3	Experimente zur Markierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO)	84
4.1.4	Experimente zur Markierung von Monoterpenen.....	84
4.2	Hemmung der Biosynthese von Isopren und anderen Isoprenoiden	85
4.2.1	Statine als spezifische Hemmstoffe des Mevalonatwegs.....	86
4.2.2	Fosmidomycin als spezifischer Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges der IPP- Biosynthese	86
4.2.3	Das Herbizid Clomazone und Derivate	91
4.2.4	Vitamin B ₆ -Antagonisten	97
4.2.5	Weitere Hemmstoffe	101
4.3	Neuere Erkenntnisse über die IPP-Biosynthese.....	103
4.3.1	Der Acetat-Mevalonatweg.....	104
4.3.2	Der DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese.....	106
4.4	Ausblick.....	121
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	123

6	LITERATUR.....	127
	AUS DIESER ARBEIT ENTSTANDENE PUBLIKATIONEN.....	155

AAN	Aminoacetonitril
ABA	Abscisinsäure (<i>abscisic acid</i>)
ABT	Aminobenzotriazol
ACC	Aminocyclopropancarbonsäure
AMPI	Acetylmethylphosphinat
AOA	Aminoxyacetat (<i>aminoxyacetic acid</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AVG	Aminoethoxyvinylglycin
cDNA	copyDNA
CDP	Cytidindiphosphat
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	Dünnschichtchromatographie
DCMU	3-[3,4-Dichlorphenyl]-1,1-dimethylharnstoff (<i>dichlorophenyl dimethyl urea</i>)
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMAEPP	Dimethylaminoethylpyrophosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DOX	1-Deoxy-D-xylulose
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	DOXP-Reduktoisomerase
DXS	DOXP-Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FDX	1-Fluor-1-Deoxy-D-xylulose
FPP	Farnesylpyrophosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektroskopie
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
GS	Glutamin-Synthetase
GTP	Guanosintriphosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HMGR	HMG-CoA-Reduktase
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration, die die Reaktionsgeschwindigkeit halbiert
IpOHA	N-Isopropyl-Oxalyhydroxamat
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KARI	Ketolsäure-Reduktoisomerase (<i>ketol acid reductoisomerase</i>)
MBO	2-Methyl-3-buten-2-ol
ME	2-C-Methyl-D-erythritol
MECPP	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MVA	Mevalonsäure (<i>mevalonic acid</i>)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduzierte Form
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD ₅₆₀	Optische Dichte bei 560 nm
P	Phosphat
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
psi	<i>pounds per square inch</i>
Rubisco	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

SIM	<i>single ion monitoring</i>
SPME	Festphasen-Mikroextraktion (<i>solid phase micro extraction</i>)
TPP	Thiaminpyrophosphat
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat

Johannes Zeidler: Precursors and Inhibitors of Isoprene Biosynthesis in Plants

Introduction:

In this Ph.D. thesis the distribution, possible intermediates and inhibitors of the alternative pathway of plastidic isoprenoid biosynthesis (DOXP/MEP pathway) were examined in several higher plants. DOXP and MEP stands for the now known first two intermediates 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate and 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate. The DOXP/MEP-pathway is completely different from the acetate/mevalonate pathway, which until recently was the only known pathway for the biosynthesis of the isoprenoid C₅-building blocks isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). Before the beginning of this work in 1996, the ¹³C-labelling of isoprenoids via the now known DOXP/MEP-pathway of IPP formation had been described between 1993 and 1995 by the groups of M. Rohmer, H. K. Lichtenthaler and D. Arigoni for isoprenoid hopanoids in several eubacteria (ROHMER *et al.*, 1993), for carotenoids, plastoquinone-9 and the phytol side-chain of chlorophylls in a green alga (LICHTENTHALER *et al.*, 1995; SCHWENDER *et al.*, 1995 and 1996) and for a diterpenoid in a higher plant (SCHWARZ, 1994).

Since the detection of the acetate/mevalonate pathway in 1958 an increasing number of research results were in contradiction to the formation of plastidic isoprenoids via mevalonic acid. With the discovery of the DOXP/MEP-pathway for plastidic isoprenoids in 1995 it was assumed to operate in plastids. At the beginning of this Ph.D. work in 1996 the intermediates and the distribution of the DOXP/MEP pathway in higher plants was not yet known. For the further elucidation of this pathway an isoprenoid was sought, that is synthesised in plastids and whose formation from IPP requires as few enzymatic steps as possible. The emission of the C₅-compound isoprene from plant leaves was chosen as a model for plastidic isoprenoid biosynthesis. The hemiterpene isoprene is probably the most abundant isoprenoid in nature and has a significant impact on atmospheric chemistry. Since gaseous isoprene is emitted immediately after its formation from DMAPP by the plastidic isoprene synthase, its biosynthesis directly reflects the formation of IPP and DMAPP in plastids. While the biosynthesis of higher isoprenoids such as carotenoids from IPP requires many further enzymatic steps, only two enzymes are necessary for isoprene formation: IPP isomerase and isoprene synthase.

Objective:

Before studies on possible intermediates and inhibitors of the DOXP/MEP pathway could be performed the following question had to be clarified: Is isoprene synthesised via the acetate/mevalonate pathway or the DOXP/MEP pathway of IPP formation?

This question was to be addressed through incorporation experiments with potential specific precursors of the DOXP/MEP pathway and with mevalonate labelled either with the stable isotope ²H or with ¹³C followed by a GC/MS analysis of isoprene. Potential precursors of the DOXP/MEP pathway were to be chemically synthesised in order to obtain information about its unknown intermediates. Labelling studies of isoprene were to be conducted with several plants so as to test the distribution of the plastidic DOXP/MEP pathway among higher plants. Furthermore, a plant test-system based on isoprene emission by plant leaves was to be developed with the intention of finding new inhibitors of the DOXP/MEP pathway. The mode of action of potential inhibitors of isoprene formation was to be narrowed down as far as possible. Finally, other plastidic plant terpenoids were to be tested, whether being made via the DOXP/MEP pathway or the mevalonate pathway.

Results:

1) Two new methods for the measurement of isoprene emitted by leaves were developed: The first one allows the enrichment of isoprene from the headspace in a droplet of decane and a fast determination of the incorporation of ^2H - and ^{13}C -labelled precursors via GC/MS. The second method is suitable for a convenient quantification of isoprene emitted from leaves via UV-absorbance. It therefore allows a rapid test of potential inhibitors of the DOXP/MEP pathway.

Several putative isoprene precursors were synthesized (see below). Many potential inhibitors of the DOXP/MEP-pathway were examined for an inhibition of isoprene emission, growth inhibition of several algae and *E. coli* as well as the inhibition of carotenoid and chlorophyll formation in greening barley sprouts.

The biosynthesis of a further volatile hemiterpene, 2-methyl-3-buten-2-ol from *Pinus ponderosa*, was examined with similar labelling and inhibition experiments. Like isoprene by deciduous trees, 2-methyl-3-buten-2-ol is emitted by many North American pines in high amounts in a light and temperature dependent fashion.

2) The following potential IPP-precursors were chemically synthesised: $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-deoxy-D-xylulose, its methyl glycoside, $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-deoxy-D-xylitol, $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ -1-deoxy-D-lyxitol, (*R*)- $[1,1,4,4\text{-}^2\text{H}_4]$ -2-C-methylbutan-1,2,4-triol, $[1\text{-}^2\text{H}_2]$ -3-methyl-2-buten-1-ol and its diphosphate ester (deuterated DMAPP). Unlabelled 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate was synthesised enzymatically with recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) from *Chlamydomonas reinhardtii*.

$[1\text{-}^2\text{H}_2]$ -3-methyl-2-buten-1-ol and its diphosphate ester (deuterated DMAPP) were not incorporated into isoprene by leaves of *Chelidonium majus* L. Presumably 3-methyl-2-buten-1-ol could not be activated to DMAPP by kinases, whereas DMAPP itself could probably not be taken up by cells or plastids because of its polarity. 1-deoxy-D-xylitol, 1-deoxy-D-lyxitol and (*R*)-2-C-methylbutan-1,2,4-triol were also not incorporated into isoprene by *Chelidonium majus* L. They are probably no precursors of the DOXP/MEP-pathway, as no evident biochemical links can be found between them and the intermediates of the DOXP/MEP-pathway, that are known today. $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]$ -2-C-methyl-D,L-erythritol (d-ME) was not incorporated into isoprene from *Populus nigra* L., although its phosphate ester MEP is known as an intermediate of the DOXP/MEP pathway today. d-ME can probably not be taken up because of its polarity or it is not phosphorylated by kinases to MEP.

3) Deuterium labelled 1-deoxy-D-xylulose (d-DOX) was incorporated into isoprene from all plants used in this work (*Populus nigra*, *Salix viminalis*, *Chelidonium majus*, *Platanus x acerifolia*, *Quercus robur*, *Robinia pseudoacacia* and *Eucalyptus globulus*). Thus, DOX was confirmed as an intermediate of the DOXP/MEP-pathway. ^{13}C -labelled mevalonic acid (^{13}C -MVA) was only poorly incorporated into isoprene. These experiments unequivocally showed that isoprene is formed via the DOXP/MEP-pathway and not via the acetate/mevalonate pathway. They also corroborated the presumed ubiquitous distribution of the DOXP/MEP-pathway in higher plants. In addition, these results gave further evidence for the plastidic localisation of isoprene biosynthesis as the isoprene synthase is known to be bound to chloroplasts. With the incorporation of d-DOX into isoprene from seven plants described in this thesis the labelling of an isoprenoid by DOX was published in a original scientific paper for the first time (ZEIDLER *et al.*, 1997).

4) The antibiotic fosmidomycin, with hitherto unknown mode of action, was shown here to be an efficient inhibitor of the DOXP/MEP-pathway and of isoprene emission. As predicted from theoretical considerations discussed in this thesis, fosmidomycin inhibits the second enzyme of the DOXP/MEP-pathway, the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR). This was shown for plants in the group of H. K. Lichtenthaler (ZEIDLER *et al.*, 1998; SCHWENDER *et al.*, 1999) and independently for *E. coli* by the group of H. Seto (KUZUYAMA *et al.*, 1998) and later also for other bacteria by other groups (ALTINCICEK *et al.*, 2000; GROLLE *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2000). In a joint publication with the group of H. Jomaa it was described, that fosmidomycin also inhibits the DXR from *Plasmodium falciparum* and cures mice infected with the rodent malaria parasite *Plasmodium vinckei* (JOMAA *et al.*, 1999b).

5) A first insight into the mode of action of the herbicide clomazone was produced with the isoprene inhibition test (UV method), inhibition and rescue experiments with greening barley seedlings and enzyme assays by C. Müller in the Lichtenthaler group. Apparently clomazone is activated within the plant to 5-ketoclomazone by cytochrome P₄₅₀. 5-ketoclomazone inhibits isoprene emission and inhibits DXS, the first enzyme of the DOXP/MEP-pathway.

6) The strong inhibition of isoprene emission by the herbicide DCMU (diuron) confirmed the tight coupling of isoprene formation to photosynthetic ATP and NADPH formation and CO₂ assimilation.

7) Aminoethoxyvinylglycine, aminooxyacetate, cycloserine and gabaculine, all of these inhibitors of vitamin B₆ (pyridoxal phosphate = PLP) dependent enzymes, were found as inhibitors of isoprene emission. The exact mode of action of these compounds remains unknown. Presumably, an inhibition of PLP-dependent steps of the photorespiratory cycle can directly reduce isoprene emission or indirectly lead to an inhibition of photosynthesis and thus result in a decreased isoprene production. Alternatively, the late enzymic steps of the DOXP/MEP-pathway, not known so far, might contain vitamin B₆ dependent enzymes. This aspect needs further investigations.

8) The volatile hemiterpene 2-methyl-3-buten-2-ol (MBO) emitted by *Pinus ponderosa* instead of isoprene was labelled by d-DOX but not by ¹³C-MVA as shown by GC/MS. MBO emission was also inhibited by fosmidomycin. Thus, another atmospherically important volatile isoprenoid was shown to be formed via the DOXP/MEP-pathway.

9) The current knowledge (end of 2000) of the distribution and function of isoprene emission in plants, bacteria and animals was summarised in this Ph. D. thesis. The currently known steps of the DOXP/MEP-pathway and certain restrictions on its unknown further steps, which are imposed by labelling studies with plants and bacteria, were presented. The biosynthesis of different classes of isoprenoids in plants via the acetate/mevalonate pathway or the DOXP/MEP-pathway as well as compartmentation, cross-talk, phylogeny and distribution of the two pathways of IPP biosynthesis in plants and bacteria were discussed.

10) In an outlook proposals were made for future research into the regulation of isoprene emission, into the further elucidation of the DOXP/MEP-pathway and into the possible discovery of new herbicides and antibiotics.

1 Einführung

Der flüchtige Kohlenwasserstoff 2-Methyl-1,3-butadien oder Isopren (C_5H_8 , Abbildung 1-1) wurde zum erstenmal 1860 von C.E. Williams durch die Pyrolyse von natürlichem Gummi dargestellt (siehe WEITZ und LOSER, 1989). Lange Zeit wurde versucht, auch den umgekehrten Prozess, die Polymerisation von Isopren zu Poly(cis-1,4-isopren) mit der Struktur des natürlichen Kautschuks, zu verwirklichen. Seit den ersten Erfolgen zu Beginn der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts bis heute ist dieses Vorhaben Gegenstand intensiver Bemühungen der Chemischen Industrie. Isopren wurde zunächst durch Erhitzen von Terpentinöl unter Luftausschluss gewonnen und bei der Pyrolyse verschiedener pflanzlicher Produkte nachgewiesen, wie z.B. in geröstetem Kaffee und Tabakrauch. Das Vorkommen von freiem Isopren in der Natur konnte lange Zeit nicht nachgewiesen werden. Dennoch wurde früh erkannt, dass zahllose Naturstoffe sich formal als durch Polymerisation von zwei bis zu hunderttausenden Isoprenmolekülen entstanden denken lassen. Otto Wallach formulierte daher die Isoprenregel, nach der Terpene wie z.B. Kampfer und Kautschuk aus Isopreneinheiten aufgebaut sind (WALLACH, 1885). Ruzicka erweiterte dieses Konzept zur biogenetischen Isoprenregel durch die Annahme, dass die Isoprenoide nicht nur formal aus Isopreneinheiten bestehen, sondern durch die Verknüpfung biologischer Isopreneinheiten gebildet werden (RUZICKA *et al.*, 1953). Diese biologischen Isopreneinheiten wurden bald als Isopentenylpyrophosphat (Abbildung 1-1) identifiziert (LYNEN *et al.*, 1958; BLOCH *et al.*, 1959).

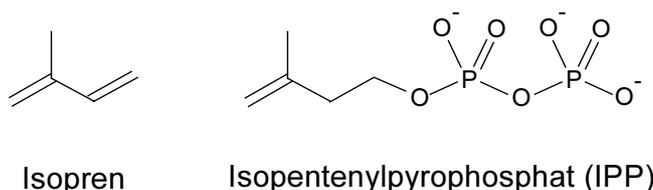


Abbildung 1-1 Chemische Struktur von Isopren und der aktiven biologischen Isopreneinheit IPP.

Eine Ironie der Wissenschaftsgeschichte ist es, dass sehr lange übersehen wurde, dass Isopren nicht nur ein Artefakt beim Erhitzen von Naturstoffen, Rohstoff für synthetischen Kautschuks und formaler Namensgeber der Isoprenoide ist, sondern wahrscheinlich der mengenmässig bedeutendste, natürlich gebildete Vertreter dieser Substanzklasse. Die von vielen Pflanzen weltweit freigesetzten Mengen an Isopren überschreiten sowohl die anthropogenen Kohlenwasserstoffemissionen als auch die Biosyntheseraten anderer Isoprenoide, wie Mono- (C_{10}), Sesqui- (C_{15}), Di- (C_{20}) und Sesterterpene (C_{25}), Steroide und Triterpene (C_{30}), Carotinoide (C_{40}) und Polyterpene ($>C_{40}$) (siehe 1.6, S. 25). Als weitere Ironie kann man die Tatsache betrachten, dass auch der Biosyntheseweg nicht nur des häufigsten Isoprenoids Isopren, wie in dieser Arbeit beschrieben, sondern vielleicht der Hauptmenge aller Isoprenoide von dem als ubiquitär verbreitet angenommenen Acetat/Mevalonat-Weg völlig verschieden ist und noch vor einigen Jahren unbekannt war.

1.1 Vorkommen und Bedeutung der Isoprenoide

Die Begriffe Terpene und Terpenoide legen einen C_{10} -Körper als Monomer zugrunde (Monoterpene = C_{10} , Diterpene = C_{20} usw.). Die Bezeichnung Isoprenoide beruht auf der Erkenntnis, dass die eigentlichen biologischen Grundbausteine dieser Substanzklasse C_5 -Körper mit der Struktur des Isoprens sind. Isoprenoide sind ubiquitär verbreitet, wie z.B. der

Name des Ubichinons, eines essentiellen Isoprenoids der Atmungskette, andeutet. Es sind bisher keine Organismen bekannt, die nicht irgendwelche Isoprenoide enthielten. Selbst Viren können Gene der Isoprenoidbiosynthese enthalten (ALEJO *et al.*, 1999). Insbesondere enthalten alle Biomembranen Isoprenoide. Es wurde sogar spekuliert, dass Isoprenoide die ersten präbiotischen Membranvesikel bildeten, und somit von einzigartiger Bedeutung für den Ursprung zellulären Lebens gewesen seien (OURISSON und NAKATANI, 1994). Es gibt kaum einen zellulären Vorgang, an dem nicht in irgendeiner Weise Isoprenoide beteiligt sind. Isoprenoide sind in diesem Sinne für die Biologie von mindestens ebenso universeller Bedeutung wie Fettsäuren, Proteine und DNA.

Die wichtigsten Isoprenoide in Säugetieren sind Cholesterol als lebenswichtiger Membranbestandteil und Vorläufer von Steroidhormonen und Gallensäuren, Dolichole für die Synthese N-verknüpfter Glycoproteine, das schon erwähnte Ubichinon sowie Cytochrom a in der Elektronentransportkette der Zellatmung, Isopentenyladenosin in tRNA, Retinal (Vitamin A) als prosthetische Gruppe des Photorezeptors Rhodopsin im Auge, die Vitamine E, D und K, sowie farnesylierte und geranylgeranylierte Proteine, die in Membranen dirigiert werden und an Regulationsvorgängen beteiligt sind (vgl. VOET und VOET, 1995).

Der Großteil der über 30.000 bis 1998 bekannten Isoprenoide (DAVIS und CROTEAU, 2000) wird von Pflanzen produziert. Auf Isopren selbst, das auch im menschlichen Atem vorkommt, wird später noch eingegangen. Pflanzen enthalten „reine“ und „gemischte“ Isoprenoide. Zum Beispiel werden die Carotinoide, die nur aus Isopreneinheiten bestehen, zu den reinen Prenyllipiden gezählt, wogegen beispielsweise die Chlorophylle, die neben Phytol einen nicht-isoprenoiden Anteil enthalten, zu den gemischten Prenyllipiden zählen (GOODWIN, 1977; LICHTENTHALER, 1993). Die Funktionen der pflanzlichen Isoprenoide liegen in der Photosynthese (Carotinoide; Chlorophylle, α -Tocopherol und Phyllochinon-K₁ mit diterpener Seitenkette, Nonaprenyl-Seitenkette von Plastochinon-9; LICHTENTHALER und PARK, 1963; LICHTENTHALER und CALVIN, 1964), in der Atmung (Cytochrom a, Ubichinon-9 und -10 mit isoprenoiden Seitenketten aus 9 bzw. 10 Isopreneinheiten; LICHTENTHALER, 1980; SCHINDLER und LICHTENTHALER, 1984), im Membranaufbau (Sterole, Triterpene; vgl. z.B. RICHTER, 1996), in der Regelung von Wachstum und Entwicklung durch Phytohormone (Abscisinsäure, Gibberelline, Cytokinine, Brassinosteroide; vgl. z.B. RICHTER, 1996), in den Interaktionen mit Insekten (Monoterpene, Homoterpene; vgl. PIEL *et al.*, 1998) und in der Pathogenabwehr (sesquiterpene Phytoalexine; vgl. z.B. RICHTER, 1996). Weitere Beispiele für pflanzliche Isoprenoide sind die Farnesyl- und Geranylgeranyl-Seitenketten prenylierter Proteine (PARMRYD *et al.*, 1999), Triterpensaponine, Monoterpen-Indolalkaloide und Steroidalkaloide (vgl. z.B. RICHTER, 1996), Polyprenole und Dolichole (JANKOWSKI *et al.*, 1994), Kautschuk und Guttapercha (BENEDICT, 1983). Zu den verschiedenen ökologischen Funktionen der pflanzlichen Isoprenoide siehe auch HARBORNE und TOMAS-BARBERAN (1991) und LANGENHEIM (1994).

Nicht nur wegen der Bedeutung der pflanzlichen Isoprenoide für den Menschen z.B. als Aromastoffe (Monoterpene), Werkstoffe (Kautschuk), Medikamente (z.B. das Diterpen Taxol) und Nahrungszusätze (Vitamine, Carotinoide), ist die Erforschung der ersten gemeinsamen Biosyntheseschritte, die erst vor wenigen Jahren eine neue Wendung genommen hat, von besonderem Interesse. Da Isoprenoide in allen Organismen vitale Funktionen erfüllen, stellt ihre Biosynthese einen erfolgversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Herbizide und Wirkstoffe gegen pathogene Mikroorganismen dar (siehe Kapitel 1.5, S. 24 und Kapitel 4.2.2, S. 86).

1.2 Biosynthese von Isoprenoïden aus Isopreneinheiten

Die Kohlenstoffgerüste der verschiedenen Isoprenoïde entstehen alle aus linearen Prenylketten, die von Prenyltransferasen gebildet werden (MCGARVEY und CROTEAU, 1995; KELLOGG und POULTER, 1997; OGURA und KOYAMA, 1998). Dabei wird aus einem allylischen Pyrophosphat zunächst ein Pyrophosphat-Ion unter Bildung eines allylischen Kations eliminiert. Dieses Kation greift dann die Doppelbindung eines IPP-Moleküls an, wobei unter Abspaltung eines Protons vom IPP eine neue C-C-Bindung und eine neue Doppelbindung im Produkt gebildet werden. Voraussetzung für diese Kondensation von Isopreneinheiten zu Prenylketten (Kopf-Schwanz-Addition) ist die Bildung des Startermoleküls Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, Abbildung 1-2). Dieses erste allylische Pyrophosphat wird aus IPP mithilfe des Enzyms IPP-Isomerase (RAMOS-VALDIVIA *et al.*, 1997) gebildet¹. Die nächsten allylischen Pyrophosphate heißen Geranylpyrophosphat (C₁₀, GPP), Farnesylpyrophosphat (C₁₅, FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat² (C₂₀, GGPP). FPP und GGPP können von weiteren Prenyltransferasen verlängert werden, im Fall des Kautschuks bis zu Kettenlängen von mehreren Millionen C-Atomen. Im allgemeinen sind die Prenyltransferasen hochspezifisch für die Stereochemie der Doppelbindungen und die Kettenlänge sowohl von Substraten als auch Produkten (TARSHIS *et al.*, 1996; OHNUMA *et al.*, 1997). FPP-Synthasen und GGPP-Synthasen können jedoch auch ausgehend von IPP und DMAPP in mehreren Verlängerungsschritten ohne Freisetzung der Intermediate ihre Produkte bilden (POULTER und RILLING, 1981).

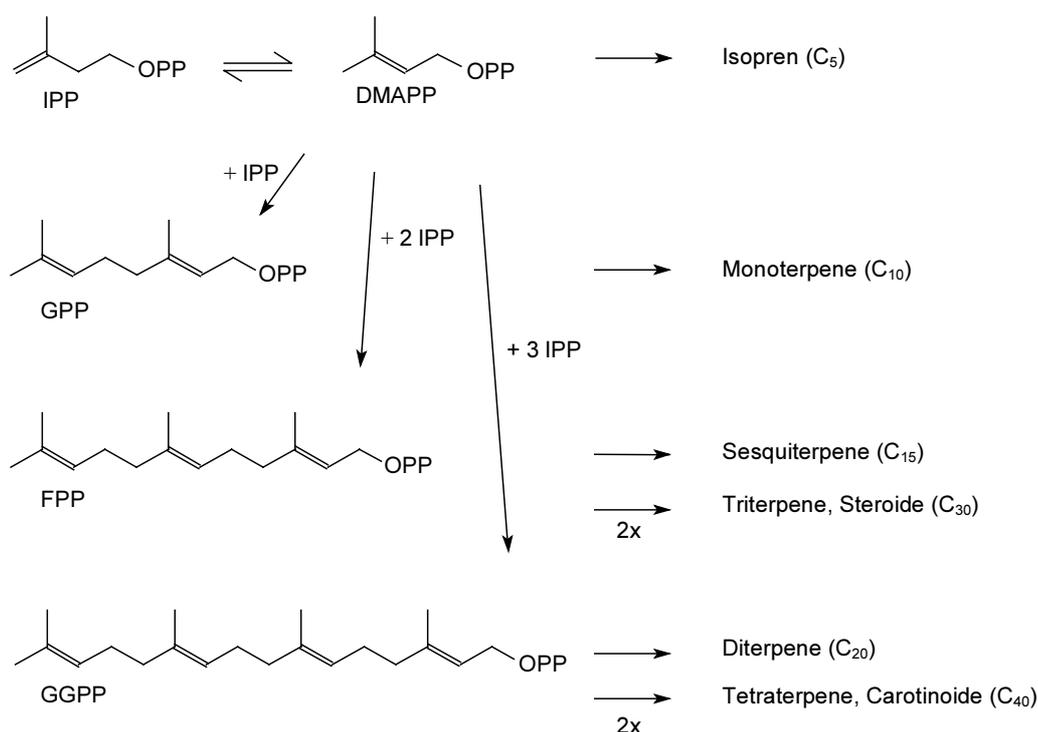


Abbildung 1-2 Verknüpfung der Isopreneinheiten IPP und DMAPP zu Geranylpyrophosphat (GPP), Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Biosynthese der Isoprenoïde aus den Prenylpyrophosphaten. Für weitere Beispiele von Isoprenoïden siehe Text.

¹ Nach neuesten Ergebnissen scheint DMAPP jedoch zumindest in *E. coli* und zwei Cyanobakterien parallel zu IPP gebildet werden zu können, ohne dass eine IPP-Isomerase nötig wäre (siehe 4.3.2, S. 106).

² Nach neuerer Nomenklatur wird Pyrophosphat durch Diphosphat ersetzt und DP statt PP in den entsprechenden Abkürzungen verwendet. Da die Bezeichnungen IPP, DMAPP usw. aber noch sehr verbreitet sind, wird hier aus Gründen der Konsistenz von Pyrophosphaten gesprochen.

Ein weiterer Typ der Verknüpfung von Prenylpyrophosphaten ist die Dimerisierung von FPP und GGPP durch Schwanz-Schwanz- bzw. Kopf-Kopf-Addition unter zweimaliger Abspaltung von Pyrophosphat. Aus zwei Molekülen FPP wird so das Squalen (C₃₀) als Vorstufe von Triterpenen und Steroiden gebildet. Zwei Moleküle GGPP bilden in ähnlicher Weise das Phytoen (C₄₀) als Vorstufe der Carotinoide.

Andere Arten von Prenyltransferasen sind an der Proteinprenylierung beteiligt und wieder andere an der Prenylierung weiterer nicht-isoprenoider Moleküle. Die letzteren Enzyme sind für die Bildung von gemischten Prenyllipiden des Primärstoffwechsels (s.o.) und von Meroterpenoiden verantwortlich. Meroterpenoide sind gemischte Isoprenoide des Sekundärstoffwechsels, zu denen außer den schon in 1.1 genannten Beispielen z.B. die Bittersäuren des Hopfens, prenylierte Isoflavone und die Cannabinoide zählen (u.a. zitiert in RAMOS-VALDIVIA *et al.*, 1997).

1.3 Subzelluläre Kompartimentierung der Isoprenoidbiosynthese in Pflanzen

Kompartimentierung der Biosynthesen von Isoprenoiden aus IPP

Grundsätzlich werden im Cytosol/ER pflanzlicher Zellen die Sesqui- und Triterpene sowie die Sterole (Triterpenderivate) synthetisiert. In den Plastiden werden die Mono-, Di- und Tetraterpene sowie deren Derivate gebildet. Die wichtigsten Vertreter plastidärer Isoprenoide sind die bereits in 1.1 (S. 15) erwähnten Substanzen, die als Bestandteile der Thylakoidmembranen essentielle Funktionen in der Photosynthese erfüllen: die Chlorophylle mit diterpener Phytolseitenkette, die tetraterpenoiden Carotinoide, Plastochinon-9 (Nonaprenyl-Seitenkette), α -Tocopherol und Phyllochinon-K₁ mit diterpener Seitenkette. In den Mitochondrien wird Ubichinon gebildet.

Das Vorkommen eines Stoffwechselprodukts in einem Zellkompartiment ist ein Hinweis darauf, dass es dort gebildet werden könnte (zumindest die letzten Schritte der Biosynthese), wenn auch kein Beweis. Die Isoprenoide der Thylakoidmembranen der Chloroplasten (die diterpenen Phytol-Seitenketten von Chlorophyllen, Phyllochinon-K₁ und α -Tocopherol, die tetraterpenen Carotinoide und die Nonaprenyl-Seitenkette von Plastochinon-9) werden im Plastiden gebildet (LICHTENTHALER und PARK, 1963; LICHTENTHALER, 1993). Sterole kommen hauptsächlich in den cytoplasmatischen Membranen Plasmalemma, Tonoplast und Endoplasmatisches Retikulum vor, nicht jedoch in den Chloroplasten (EICHENBERGER und MENKE, 1966; EICHENBERGER 1977). Ubichinon wird nur in den Mitochondrien gefunden (vgl. LICHTENTHALER, 1977).

Ein Beleg für die Kompartimentierung von Biosynthesewegen ist die Lokalisierung der entsprechenden Enzyme in den Kompartimenten. So kommen GPP- und GGPP-Synthasen in Plastiden vor (DOGBO und CAMARA, 1987; KUNTZ *et al.*, 1992; SOLER *et al.*, 1992) und FPP-Synthasen im Cytosol und in Mitochondrien (GRAY, 1987, CUNILERA *et al.*, 1996; 1997). Es gibt auch Belege für die plastidäre Lokalisierung von Mono- und Diterpen-Synthasen, die jeweils GPP bzw. GGPP umsetzen (AACH *et al.*, 1995; BOHLMANN *et al.*, 1998; TURNER *et al.*, 1999). Sesquiterpen-Synthasen sind hingegen cytosolisch (BOHLMANN *et al.*, 1998).

Allerdings existieren, wie man seit kurzem weiss, auch Ausnahmen zu dieser generellen Kompartimentierung der Enzyme. So wurde sowohl von einer plastidären FPP-Synthase in Weizen und Tabak (SANMIYA *et al.*, 1999) als auch von GGPP-Synthasen außerhalb des Plastiden bei *Arabidopsis thaliana* (OKADA *et al.*, 2000) berichtet. Dies ist verständlich unter der Annahme, dass Protein-Farnesylierung und -Geranylgeranylierung sowohl innerhalb als auch außerhalb des Chloroplasten stattfindet (PARMRYPD *et al.*, 1999). Eine weitere Ausnahme

wurde mit einer cytosolischen GPP-Synthase in *Lithospermum erythrorhizon* gefunden (SOMMER *et al.*, 1995). GPP wird in dieser Pflanze offenbar für die Biosynthese von Shikonin im Cytosol verwendet (siehe 4.3.2, S. 106).

Kompartimentierung der Biosynthese von IPP

Das oben beschriebene Modell der Verteilung der späten Schritte der Biosynthesen verschiedener Isoprenoide aus IPP in verschiedenen Zellkompartimenten wird von der Mehrheit der Forscher akzeptiert. Einen ganz anderen Aspekt zur Kompartimentierung der Isoprenoid-Biosynthesewege in Pflanzen beleuchteten aber frühe Markierungsexperimente von Goodwin und Mitarbeitern, und dies hängt mit der Bildung von IPP zusammen (siehe 1.4.1): Es hatte sich gezeigt, dass plastidäre Isoprenoide verschiedener Pflanzen sehr effizient aus $^{14}\text{CO}_2$ markiert wurden, die cytosolischen Sterole jedoch nicht. Umgekehrt wurden Sterole und Ubichinon von ^{14}C -Mevalonsäure hoch markiert, β -Carotin und Chlorophyll aber nicht (MERCER und GOODWIN, 1962; TREHARNE *et al.*, 1964, 1966). Ähnliches wurde später immer wieder für andere Pflanzen und viele weitere Isoprenoide gefunden (z.B. LICHTENTHALER *et al.*, 1982; Übersichten in GRAY, 1987; LICHTENTHALER *et al.*, 1997a). Dies führte zu einer langjährigen Diskussion unterschiedlicher Kompartimentierungsmodelle der IPP-Biosynthese in Pflanzen. Es war z.B. lange umstritten, ob Cytosol, Plastid und Mitochondrion jeweils eigene Biosynthesewege für IPP besitzen (GRAY, 1987). Erst Mitte der 1990er Jahre wurde eine plausible Erklärung für viele schwer verständliche Resultate gefunden (siehe 1.4.2, S. 21; 4.3, S. 103).

1.4 Biosynthese der Isopreneinheiten

1.4.1 Der Acetat-Mevalonat-Weg

Die Bildung von IPP wurde Ende der 1950er Jahre in Hefe und tierischen Geweben aufgeklärt (LYNEN und HENNING, 1960; BLOCH, 1965; NES und MCKEAN, 1977; QURESHI und PORTER, 1981). Ausgehend von drei Molekülen Acetyl-Coenzym A (Acetyl CoA) entsteht über Acetoacetyl-CoA 3-(S)-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), welches mithilfe von zwei Molekülen NADPH zu 3-(R)-Mevalonsäure (MVA) reduziert wird. Mevalonsäure wird anschließend zweimal ATP-abhängig an C-5 phosphoryliert. Unter Verbrauch eines weiteren ATP und Decarboxylierung wird die OH-Gruppe an C-3 eliminiert und es entsteht IPP (Abbildung 1-3).

Da Mevalonsäure das erste für die IPP-Biosynthese spezifische Intermediat ist, wurde aus vielen erfolgreichen Einbauexperimenten von ^{14}C -markierter Mevalonsäure in pflanzliche Isoprenoide (siehe 1.3), z.B. in Kautschuk (LYNEN und HENNING, 1960), geschlossen, dass der Acetat-Mevalonat-Weg auch in Pflanzen für die Bildung aller Isoprenoide verantwortlich ist.

Außer durch Markierungsstudien wurde der MVA-Weg in höheren Pflanzen auch durch die Charakterisierung seiner Gene und Enzyme zweifelsfrei nachgewiesen (vgl. BACH, 1995; BACH *et al.*, 1999):

cDNA-Klone für cytosolische Acetoacetyl-CoA Thiolase (AACT, EC 2.3.1.9) aus *Raphanus sativus* wurden funktionell in Hefe exprimiert (VOLLACK und BACH, 1996).

Die HMG-CoA Synthase aus *Arabidopsis* wurde kloniert und funktionell untersucht (MONTAMAT *et al.*, 1996; BACH und BENVENISTE, 1997).

Mevalonat Kinase wurde aus *Catharanthus roseus* gereinigt und charakterisiert (SCHULTE *et al.*, 2000). Die Expression des klonierten Gens aus *Arabidopsis* wurde untersucht (LLUCH *et al.*, 2000).

Phosphomevalonat Kinase wurde aus *Catharanthus roseus* gereinigt und charakterisiert (SCHULTE *et al.* 1999).

cDNA für die Mevalonatpyrophosphat Decarboxylase aus *Arabidopsis* wurde in Hefe funktionell exprimiert (CORDIER *et al.*, 1999).

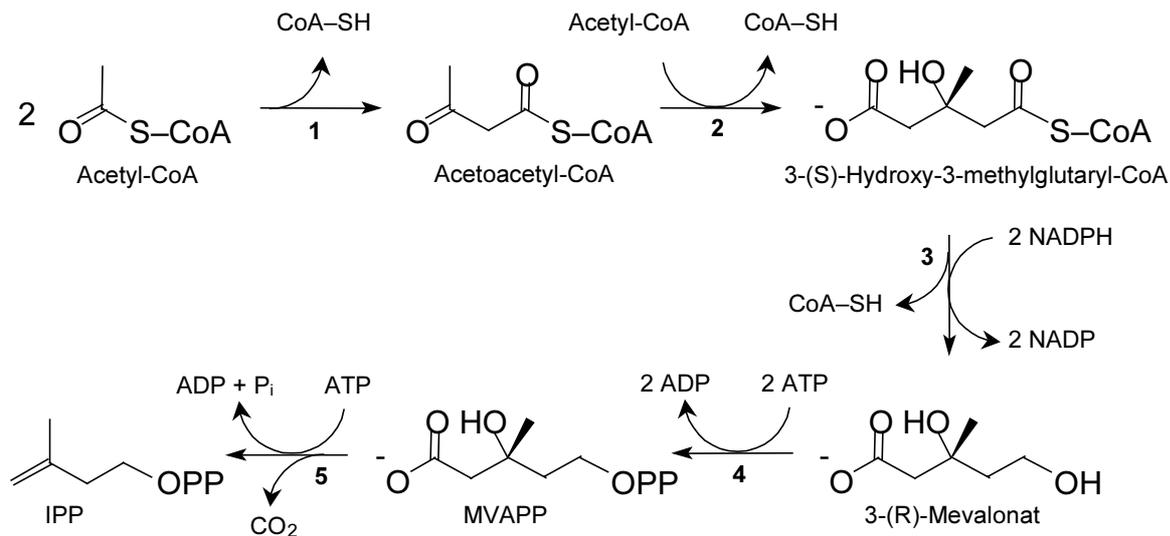


Abbildung 1-3 Der Acetat/Mevalonat-Weg der IPP-Biosynthese. **1** Acetoacetyl-CoA Thiolase, **2** HMG-CoA Synthase, **3** HMG-CoA Reduktase, **4** Mevalonat Kinase + Mevalonat-5-phosphat Kinase, **5** Mevalonat-5-pyrophosphat Decarboxylase.

Die HMG-CoA Reduktase (HMGR) ist das bestuntersuchte Enzym des Mevalonatweges und wurde in verschiedenen höheren Pflanzen beschrieben. HMG-CoA Reduktase liefert in einer irreversiblen Reaktion das erste für die Isoprenoidbiosynthese spezifische Zwischenprodukt Mevalonsäure und wird als die entscheidende Regulationsstelle des Acetat-Mevalonat-Weges in Tieren und Pflanzen betrachtet (GOLDSTEIN und BROWN, 1990; BACH *et al.*, 1999, NEWMAN und CHAPPELL, 1999). Säugetiere enthalten offenbar nur ein HMGR-Gen, höhere Pflanzen dagegen mehrere Isogene, die eine differenzierte Regulation in Abhängigkeit von Gewebetyp, Entwicklungszustand, Umwelteinflüssen und Bedarf an spezifischen Isoprenoiden ermöglichen (z.B. LOGUERCIO *et al.*, 1999; JAIN *et al.*, 2000; Übersicht in STERMER *et al.*, 1994).

HMG-CoA Reduktasen lassen sich durch Mevinolin und andere sogenannte Statine hocheffektiv hemmen (BACH und LICHTENTHALER, 1987). Diese sind deshalb von hohem Nutzen als Medikamente zur Senkung des Cholesterinspiegels (vgl. MANNES, 1999)³ und für die Untersuchung der Isoprenoidbiosynthese. Mevinolin hemmt in höheren Pflanzen (wie auch in Pilzen und Tieren) die Sterolbiosynthese, nicht jedoch die Biosynthesen der

³ Eigentliches Ziel der Statinbehandlung ist die Verhinderung von Herzinfarkt und Schlaganfall, Folgen der Arteriosklerose. Nach neueren Studien beruht die verminderte Sterblichkeit durch Gabe von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern nicht allein auf einer Senkung des Cholesterinspiegels, sondern auch auf direkten, positiven Effekten auf erkrankte Gefäße (vgl. LAUFS *et al.*, 1997).

plastidären Prenyllipide (Chlorophylle, β -Carotin und Plastochinon-9) (BACH und LICHTENTHALER, 1983; SCHINDLER *et al.*, 1985).

Obwohl der Acetat-Mevalonat-Weg schon seit 1958 bekannt ist, ist das z.B. auch für die Arzneimittelentwicklung wichtige Studium seiner Verbreitung in Bakterien gerade erst am Anfang (siehe 4.3.1, S. 104; WILDING *et al.*, 2000a). Die Beschleunigung der Genomsequenzierung lässt viele interessante Erkenntnisse über die Phylogenie der IPP-Biosynthese in Eubakterien, Archaea und Eukaryonten erwarten (BOCHAR *et al.*, 1999). Dies gilt insbesondere im Hinblick auf das Vorhandensein eines zweiten Biosyntheseweges für IPP, der im nächsten Abschnitt eingeführt wird, und dessen Untersuchung Motivation für diese Arbeit war.

1.4.2 Der alternative IPP-Biosyntheseweg

1991 wurden von Zhou und White Markierungsstudien von Ubichinon-8 in *E. coli* mit verschiedenen ^2H - und ^{13}C -markierten Vorstufen veröffentlicht (ZHOU und WHITE, 1991). Die Autoren folgerten aus dem Markierungsmuster im Ubichinon-8 von Zellen, die auf uniform mit ^{13}C markierter Glucose gewachsen waren, dass aus Pyruvat stammende C_2 - und C_3 -Einheiten die Vorläufer von IPP seien, und nicht Acetyl-CoA. Ebenso stellten sie fest, dass kein Einbau von ^{13}C -Acetat messbar war und das Wachstum von *E. coli* nicht durch Mevinolin hemmbar war. Dennoch wurde versucht das Markierungsmuster mit dem Acetat-Mevalonat-Weg zu erklären. Es gab für die Autoren keinen Grund, das bis dahin allgemein akzeptierte Biosyntheschema anzuzweifeln.

Es gab sogar schon in der Zeit der Aufklärung des Acetat-Mevalonat-Wegs Unstimmigkeiten bei Einbauexperimenten: Zum Beispiel wurde bei der Markierung von Lycopin in reifenden Tomaten mit $[1-^{14}\text{C}]$ - und $[2-^{14}\text{C}]$ -Acetat ein Einbauverhältnis von 1:5,5 gemessen statt 1:1,5, wie nach einem Einbau über Mevalonsäure zu erwarten gewesen wäre (ZABIN, 1957; genauere Erläuterung bei SCHWENDER, 1999). Diese und viele andere schwierig mit dem Mevalonatweg in Einklang zu bringende Resultate ließen sich erklären, nachdem von M. Rohmer und Mitarbeitern in Mulhouse zu Beginn der 1990er Jahre ein alternativer, von Mevalonsäure unabhängiger IPP-Biosyntheseweg in verschiedenen Bakterien entdeckt worden war (ROHMER *et al.*, 1993). In der Karlsruher Arbeitsgruppe Lichtenthaler wurden daraufhin von J. Schwender in Zusammenarbeit mit M. Seemann und A. Disch (Arbeitsgruppe Rohmer) die gleichen Charakteristika der IPP-Biosynthese in Grünalgen für alle Prenyllipide und in höheren Pflanzen für die plastidären Prenyllipide (Chlorophylle, Carotinoide, Plastochinon) nachgewiesen (SCHWENDER, 1995; SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996; LICHTENTHALER *et al.*, 1995; SCHWENDER, 1999; Übersichten in LICHTENTHALER *et al.*, 1997a; LICHTENTHALER, 1999).

Seit 1997 ist in einer rasanten Entwicklung von mehreren anderen Arbeitsgruppen die mevalonatunabhängige Biosynthese vieler verschiedener Isoprenoide in unterschiedlichen Organismen, hauptsächlich Pflanzen, nachgewiesen worden. Fünf der möglicherweise ca. 10 Enzyme des alternativen Biosyntheseweges sind aus Bakterien und Pflanzen kloniert und charakterisiert worden. Ein Arzneimittel, das auf der Existenz dieses Stoffwechselweges im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* basiert, befindet sich in der Entwicklung. Der aktuelle Stand dieser Forschungen und der Anteil der eigenen Arbeit daran wird im Diskussionsteil beschrieben (siehe 4.3.2, S. 106). Hier soll zunächst der Wissensstand zu Beginn der Promotionsarbeit zusammengefasst werden. Der mevalonatunabhängige IPP-Biosyntheseweg wird im Folgenden nach den heute bekannten ersten beiden Intermediaten 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) und 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) DOXP/MEP-Weg genannt (siehe dazu 4.3.2, S. 106).

Die ersten Vorläufer: Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat

Durch Einbau von an verschiedenen Positionen mit ^{13}C markierten Glucosen, Acetat, Pyruvat und Erythrose in verschiedenen Eubakterien wurde von den Arbeitsgruppen Rohmer und Sahn gezeigt, dass die Biosynthese von Hopanoiden (pentazyklischen triterpenoiden Sterolsurrogaten) in *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense* und *Alicyclobacillus acidoterrestris* und Ubichinon in *E. coli* über einen mevalonatunabhängigen Weg läuft (ROHMER *et al.*, 1993). Dazu wurden die Positionen der ^{13}C -Markierungen in den extrahierten Isoprenoiden mit ^{13}C -NMR gemessen. Die gefundenen Markierungsmuster schlossen Acetyl-CoA und HMG-CoA als Vorläufer von IPP aus. Die Isopreneinheiten mussten aus einer C_2 -Einheit (höchstwahrscheinlich aus der Decarboxylierung von Pyruvat) und einer C_3 -Einheit, einem Triosephosphat (Glycerinaldehyd-3-phosphat oder Dihydroxyacetonphosphat), zusammengesetzt werden. Es lies sich weiterhin folgern, dass der zunächst gebildete C_5 -Körper eine Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts erfahren musste, bei der die C_2 -Einheit aus Pyruvat zwischen C-1 und C-2 des Triosephosphats wandert (Abbildung 1-4). Dies konnte anhand von ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von mit $[4,5\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Glucose markierten Isoprenoiden gezeigt werden. Die Vorläufer der C_2 - und C_3 -Einheit wurden schließlich durch Markierungsstudien mit *E. coli*-Mutanten, denen jeweils ein Enzym des Triosephosphat-Stoffwechsels fehlt, als Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) identifiziert (ROHMER *et al.*, 1996). Eine detaillierte Beschreibung dieser Schlussfolgerungen findet sich bei ROHMER (1999a).

Das erste Intermediat: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat

Aus GAP und Pyruvat entsteht in einer Transketolase-ähnlichen Acyloin-Kondensation unter Abspaltung von CO_2 der erste C_5 -Körper, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) (Abbildung 1-4). Diese Verbindung hatte man als erstes Intermediat vermutet, weil sie als Naturstoff in Form des freien Zuckers 1-Deoxy-D-xylulose (DOX) schon bekannt war (HOEKSEMA und BACZYNSKYJ, 1976; SLECHTA und JOHNSON, 1976). Die enzymatische Bildung von DOX war auch schon beschrieben worden, allerdings als eher unspezifische Nebenreaktion verschiedener Thiamin-abhängiger Enzympräparationen aus mehreren Bakterien, Hefen und niederen Pilzen (YOKOTA und SASAJIMA, 1984; 1986). Weiterhin war DOX als Vorstufe für Thiamin (Vitamin B_1) und Pyridoxalphosphat (Vitamin B_6)⁴ in *E. coli* und Spinat-Chloroplasten bekannt (JUILLARD, 1992; ESTRAMAREIX und DAVID, 1996; HILL *et al.*, 1996). Den ersten Nachweis für DOX als Vorläufer eines Isoprenoids lieferte S. Broers in seiner Dissertation in der Arbeitsgruppe Arigoni, Zürich, durch Einbau von $[1\text{-}^2\text{H}_1]$ - und $[5,5\text{-}^2\text{H}_2]$ -DOX in die Prenyl-Seitenkette von Ubichinon in *E. coli* (BROERS, 1994). Diese Arbeit wurde allerdings nicht in einer Fachzeitschrift publiziert. Der Einbau von $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ - und $[2,4\text{-}$

⁴ Es gibt wahrscheinlich zwei verschiedene Biosynthesewege für Vitamin B_6 . Neuere Analysen von Gensequenzen komplett und teilweise sequenzierter Organismen haben ergeben, dass sich diese in zwei Gruppen einteilen lassen: Die erste Organismengruppe (verschiedene Eubakterien) enthält Orthologe zu zwei Genen der Pyridoxalphosphat-Biosynthese in *E. coli* (pdxA und pdxJ), nicht aber Orthologe eines hochkonservierten Gens für einen alternativen Weg zu Vitamin B_6 (SOR1 aus *Cercospora nicotianae* bzw. pyroA aus *Aspergillus nidulans*). Die zweite Gruppe enthält stattdessen SOR1/pyroA-Orthologe, nicht aber Orthologe zu pdxA und pdxJ. Zu dieser zweiten Gruppe mit dem SOR1/pyroA-Gen gehören sechs Pflanzen sowie verschiedene Pilze, Eubakterien und Archaeobakterien (EHRENSHAFT *et al.*, 1999; OSMANI *et al.*, 1999). Wie Pflanzen DOX zur Synthese von Vitamin B_6 verwenden können (JUILLARD, 1992), ohne möglicherweise die entsprechende Gene wie *E. coli* (pdxA, pdxJ) zu enthalten, ist bisher unbekannt (Das von pdxJ kodierte Protein katalysiert die Bildung von Pyridoxinphosphat aus DOXP und 3-Phosphohydroxy-1-aminoaceton; CANE *et al.*, 1999; LABER *et al.*, 1999). Allerdings wurde $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glucose in gleicher Weise in 4'-O-Methylpyridoxin aus *Ginkgo biloba* eingebaut wie in Pyridoxin aus *E. coli* (FIEHE *et al.*, 2000). Markierungsstudien zum Ursprung des Stickstoffatoms von Pyridoxin deuten ebenfalls auf zwei Wege hin (TANAKA *et al.*, 2000).

$^{13}\text{C}_2$]-DOX in Ubichinon aus *E. coli* (ROSA PUTRA *et al.*, 1998b) und von [2,3,4,5- $^{13}\text{C}_4$]-DOX in Phytol und Carotinoide aus Zellkulturen der höheren Pflanze *Catharanthus roseus* (ARIGONI *et al.*, 1997) sowie weitere Markierungsexperimente der Karlsruher und anderer Arbeitsgruppen (siehe 4.3.2, S. 106) bestätigte DOX als Isoprenoid-Vorläufer. Die erste Veröffentlichung des Einbaus von 1-Deoxy-D-xylulose ([1- $^2\text{H}_1$]-DOX) in ein Isoprenoid, das von vielen Pflanzen gebildete Isopren, entstand aus der vorliegenden Arbeit (siehe 3.2.1, S. 55; ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997). Die Markierung des häufigsten pflanzlichen Isoprenoids im Photosyntheseapparat, der Phytolseitenkette von Chlorophyll in verschiedenen Algen und einer höheren Pflanze aus DOX, wurde ebenfalls erstmals von der Karlsruher Arbeitsgruppe publiziert (SCHWENDER *et al.*, 1997).

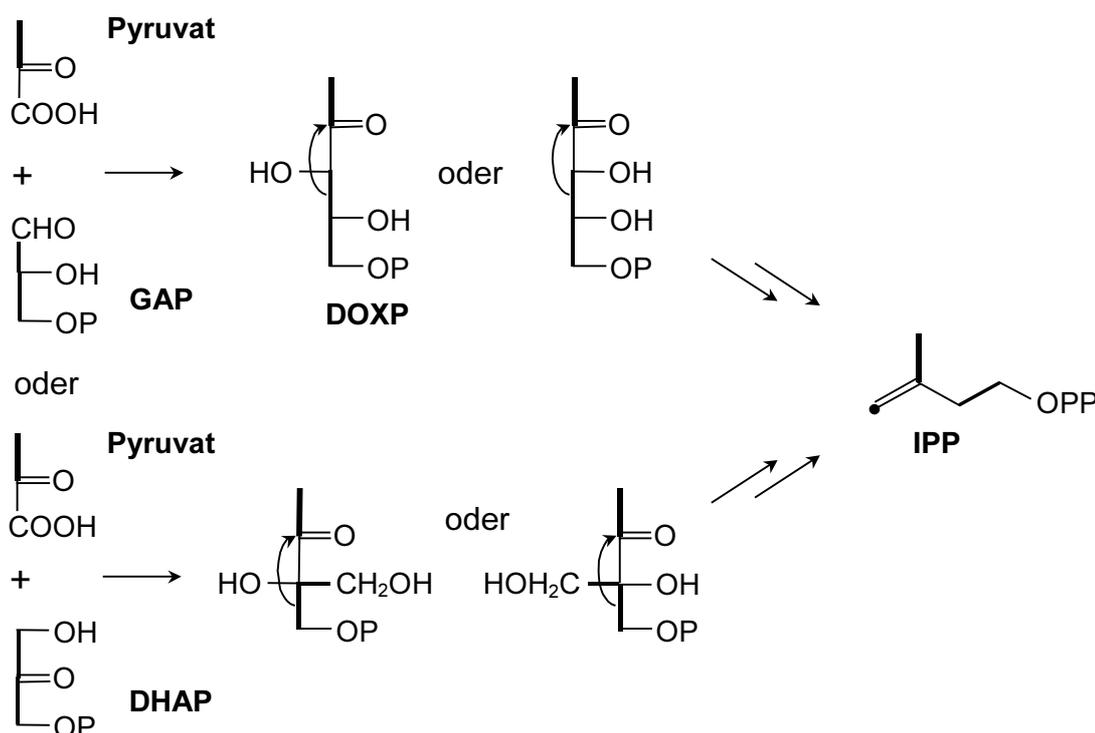


Abbildung 1-4 Alternative IPP-Biosynthese aus Pyruvat und Triosephosphat. Aus dem Einbau ^{13}C -markierter Glucosen und Acetat in Isoprenoide aus Bakterien und Grünalgen konnte die Bildung eines intermediären C5-Körpers aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) oder Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) abgeleitet werden (ROHMER *et al.*, 1993; SCHWENDER *et al.*, 1995; LICHTENTHALER *et al.*, 1995). Durch die Entstehung eines neuen chiralen Zentrums gibt es theoretisch vier mögliche Deoxypentosephosphate, die nach Umlagerung des Kohlenstoffskeletts das gleiche Markierungsmuster in IPP erzeugen. Das Triosephosphat wurde schließlich als GAP identifiziert (ROHMER *et al.*, 1996). Einbau von [1- $^2\text{H}_1$]- und [5,5- $^2\text{H}_2$]-DOX in Ubichinon aus *E. coli* (BROERS, 1994) machte DOXP als ersten C5-Körper wahrscheinlich.

Der DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese in Pflanzen

In der Diplomarbeit von J. Schwender in der Arbeitsgruppe Lichtenthaler wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Rohmer gezeigt, dass die Grünalge *Scenedesmus obliquus* ebenfalls den DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese besitzt (SCHWENDER, 1995; SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996). Durch Einbau verschieden markierter ^{13}C -Glucosen und ^{13}C -Acetat mit anschließender Analyse der Markierungsmuster mit ^{13}C -NMR wurde das

Pyruvat/Triosephosphat-Muster für Phytol (Chlorophyllseitenkette), die Prenyl-Seitenkette von Plastochinon-9, β -Carotin, Lutein und Chondrillasterol nachgewiesen. Offensichtlich nutzt *Scenedesmus* ausschließlich den DOXP/MEP-Weg für die Biosynthese aller Isoprenoide.

1994 wurde von M. Schwarz (Arbeitsgruppe Arigoni, Zürich) mit ^{13}C -Markierungsversuchen das in Bakterien gefundene Pyruvat/Triosephosphat-Muster in den Diterpenen Ginkgolid A und Bilobalid aus *Ginkgo biloba* nachgewiesen (SCHWARZ, 1994). Die Experimente dieser Dissertation wurden allerdings erst 1999 in einem Buchbeitrag ohne Angabe der experimentellen Details veröffentlicht (SCHWARZ und ARIGONI, 1999). Sie zeigten aber, das zumindest in *Ginkgo biloba* bestimmte isoprenoide sekundäre Pflanzenstoffe nach dem mevalonatunabhängigen IPP-Biosyntheseweg gebildet werden. Die ersten Publikationen über die Biosynthese von plastidären Isoprenoiden in Grünalgen und höheren Pflanzen nach dem DOXP/MEP-Weg, nämlich der Carotinoide und des Phytols der Chlorophylle des Photosyntheseapparats (in Grünalgen und höheren Pflanzen) und der Sterole (in Grünalgen), kamen von der Karlsruher Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit M. Rohmer (SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996; LICHTENTHALER *et al.*, 1995, 1997a).

1.5 Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese

Hemmstoffe sind von Bedeutung in der Grundlagenforschung, in der Landwirtschaft als Fungizide, Insektizide und Herbizide und in der Medizin, z.B. als Antibiotika oder Mittel zur Regulation des menschlichen Stoffwechsels. Statine wie z.B. Mevinolin sind vielgenutzte Hilfsmittel bei der Untersuchung des Acetat/Mevalonat-Weges der IPP-Biosynthese als auch Medikamente zur Senkung des Cholesterolspiegels (siehe 1.4.1, S. 19). Es ist deshalb wünschenswert, auch für die Enzyme des DOXP/MEP-Weges Hemmstoffe zu finden. Insbesondere ein vermutlich essentieller Stoffwechselweg, der bei vielen Bakterien und, wie sich im Laufe dieser Arbeit herausstellte, vermutlich allen Pflanzen vorkommt, sehr wahrscheinlich jedoch nicht bei Tieren und Menschen, eröffnet die Perspektive zu neuen hochwirksamen Antibiotika und Herbiziden. Solche Substanzen sind dann mit guter Wahrscheinlichkeit ungiftig für den Menschen, wenn sie kein menschliches Enzym blockieren können.

Ein Weg zu einem solchen Inhibitor des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese ist die Synthese und Untersuchung von Substrat- und Übergangszustandsanaloga der vermuteten Intermediate dieses Biosyntheseweges. Dieser Ansatz ist nur möglich, wenn die Enzyme und Substrate des Stoffwechselweges bekannt sind. Diese Kenntnis ist ohnehin nötig, um den genauen Zielort und Wirkungsmechanismus des Hemmstoffs herauszufinden. Häufig liefert diese Methode jedoch trotz hohen Aufwands wenig befriedigende Ergebnisse, selbst wenn die dreidimensionale Struktur des Zielenzym vorliegt und mögliche Hemmstoffe mithilfe von Computermodellierung in eine Bindenische eingepasst werden.

Ein weiterer Weg ist das Durchmustern von Substanzbibliotheken (z.B. aus der kombinatorischen Chemie oder Naturstoffquellen) an geeigneten Testsystemen. Schwierigkeiten dieser Methode liegen z.B. in Aufwand, Preis und Verfügbarkeit der Substanzen.

Ein dritter Weg ist die Suche nach schon bekannten Stoffen, deren genauer Wirkungsmechanismus bisher unbekannt war, deren Wirkungsprofil jedoch (sowohl im Hinblick auf die Symptome eines behandelten Zielorganismus als auch auf das Spektrum der sensitiven Zielorganismen) im Licht neuer Erkenntnisse auf einen Zielort hindeutet. Für den DOXP/MEP-Weg bedeutet dieser Ansatz einerseits die Suche nach Antibiotika, die die Isoprenoidbiosynthese in Bakterien hemmen, welche den DOXP/MEP-Weg besitzen, und

andererseits die Suche nach Herbiziden, die die Biosynthesen der plastidären Isoprenoide hemmen. Wie sich im Laufe der vorliegenden Arbeit herausstellte, werden nämlich nur die plastidären Isoprenoide höherer Pflanzen nach dem mevalonatunabhängigen IPP-Weg gebildet. Literaturrecherchen schränkten die nach diesem Ansatz in Frage kommenden Kandidaten im wesentlichen auf das Antibiotikum Fosmidomycin und das Herbizid Clomazone ein. Die Überlegungen, die zur Untersuchung dieser und einiger anderer Hemmstoffe geführt haben, werden im Diskussionsteil (siehe 4.2, S. 85) näher erläutert.

1.6 Isoprenemission bei Pflanzen und Tieren

Charakteristika der Isoprenemission von Pflanzen

„Isopren ist ein chemischer Stoff, der in der Natur nicht vorkommt.“ Dies und ähnliches jedenfalls behaupten manche Biochemie-Lehrbücher (u.a. KARLSON, 1994). Im Widerspruch dazu wurde die pflanzliche Isoprenbildung 1957 erstmals von G. A. Sanadze beschrieben (siehe SANADZE, 1991) und unabhängig von R. A. Rasmussen entdeckt (siehe SHARKEY, 1996). Schätzungen für die weltweit emittierten Mengen an Kohlenstoff in Form von biogenem Isopren liegen zwischen 175 und 503 Millionen Tonnen pro Jahr und liegen damit in der gleichen Größenordnung wie die jährlichen globalen Methanemissionen von ca. 500 Millionen Tonnen Kohlenstoff und über den anthropogenen Nichtmethan-Kohlenwasserstoffemissionen von etwa 100 Millionen Tonnen pro Jahr (vgl. SHARKEY *et al.*, 1991; KESSELMEIER und STAUDT, 1999)⁵. Vermutlich wurde die Isoprenemission deshalb lange übersehen, weil die Luftkonzentrationen nur im Bereich ppt - ppb liegen (vgl. KESSELMEIER und STAUDT, 1999). Dies liegt an der hohen Reaktivität von Isopren mit OH-Radikalen. Die Folgen der komplexen Atmosphärenchemie von Isopren sind einerseits die Bildung von bodennahem Ozon und andererseits eine mögliche positive Rückkoppelung bei der Klimaerwärmung, da durch den Verbrauch von OH-Radikalen die Oxidationskapazität der Atmosphäre vermindert wird und somit weniger vom langlebigeren Treibhausgas Methan abgebaut werden kann (MONSON *et al.*, 1991). Zu einer positiven Rückkoppelung könnte es kommen, weil die Isoprenemission stark mit der Temperatur zunimmt. Die Temperaturabhängigkeit der Isoprenemission spielt sich sowohl langfristig, als auch vor allem kurzfristig in der Größenordnung von Sekunden bis Minuten ab (SINGSAAS und SHARKEY, 1998; SINGSAAS und SHARKEY, 2000; SINGSAAS *et al.*, 1999; SHARKEY *et al.*, 1999). Bis etwa 35°C steigt die Isoprenemission exponentiell mit einem Q₁₀-Wert von 3-6, um oberhalb von 40-42°C wieder abzufallen (siehe HARLEY *et al.*, 1999). Die starke Temperaturabhängigkeit der pflanzlichen Isoprenemission ist keine Folge einer verstärkten Verflüchtigung (Isopren hat einen Siedepunkt von 34°C), da Isopren praktisch nicht gespeichert wird, sondern sie lässt sich vor allem durch die Temperaturabhängigkeit der Isoprensynthese erklären (siehe KREUZWIESER *et al.*, 1999). Die plastidäre Isoprensynthese (WILDERMUTH und FALL, 1996; 1998) bildet Isopren aus DMAPP durch Elimination von Pyrophosphat (siehe LICHTENTHALER und ZEIDLER, 2000; Abbildung 1-5). Isopren ist also das am einfachsten gebaute Isoprenoid und seine Biosynthese benötigt von IPP ausgehend nur zwei weitere Enzyme (IPP-Isomerase und Isopren-Synthase).

Ein weiteres Charakteristikum der Isoprenemission ist die starke Lichtabhängigkeit. Diese folgt im Gegensatz zur Temperaturabhängigkeit in etwa derjenigen der Photosynthese mit einer ähnlichen Sättigung bei hohen Lichtintensitäten um 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HARLEY *et al.*, 1999). In manchen tropischen Pflanzen tritt die Lichtsättigung der Isoprenemission allerdings

⁵ Zum Vergleich: Die jährliche Produktionskapazität an synthetischem Isopren lag 1987 bei etwa 1,3 Millionen Tonnen weltweit (WEITZ und LOSER, 1989). Die jährliche Nettoprimärproduktion durch Photosynthese weltweit wird auf ca. 163 Milliarden Tonnen Kohlenstoff geschätzt (FLINDT, 2000).

erst bei $2500 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ein (LERDAU und KELLER, 1997). Auch metabolisch gesehen ist die Isoprenemission an die Photosynthese gekoppelt. So wird $^{13}\text{CO}_2$ schnell in Isopren eingebaut, was auf eine plastidäre Lokalisation aller Enzyme der Isoprenbildung deutet (DELWICHE und SHARKEY, 1993). Unter bestimmten Stressbedingungen (Salz, Trockenheit, Hitze, Starklicht) kann die Isoprenemission jedoch noch stattfinden oder sogar steigen, wenn die Photosynthese abnimmt (SHARKEY und LORETO, 1993; LORETO und DELFINE, 2000), so dass noch andere C-Quellen neben dem unmittelbar photosynthetisch fixierten Kohlenstoff für die Isoprenemission in Betracht gezogen werden müssen.

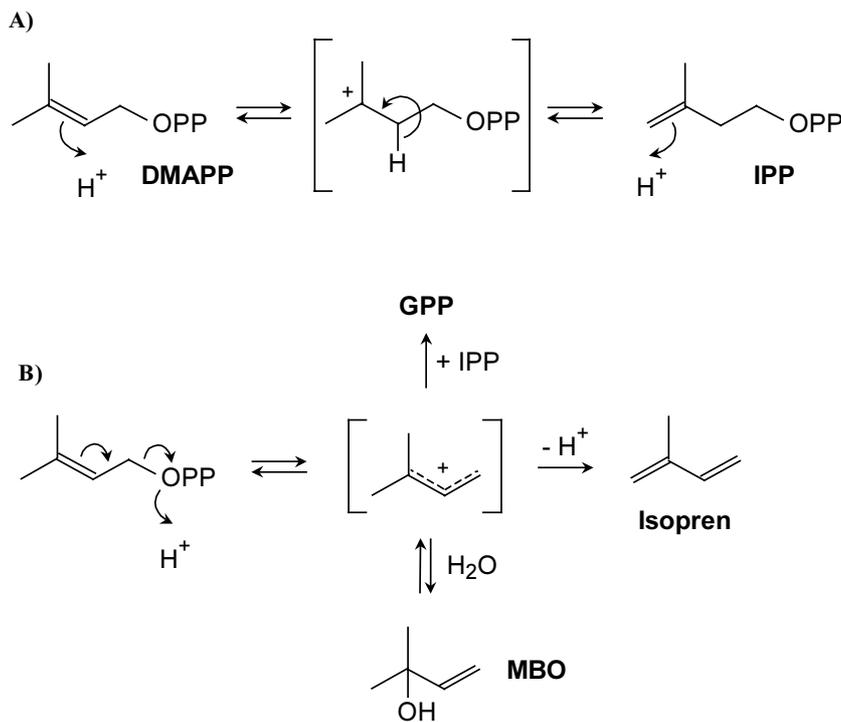


Abbildung 1-5 Mutmaßliche intermediäre Carbokationen bei der IPP-Isomerase- (A) und der Isopren-Synthase-Reaktion (B). B): Dasselbe resonanzstabilisierte kationische Intermediat [in Klammer] tritt vermutlich bei drei Enzymen auf: der Isopren-Synthase, der 3-Methyl-2-buten-3-ol (MBO)-Synthase und der GPP-Synthase.

Die Isoprenemission ist unter höheren Pflanzen, Farnen und Moosen weit verbreitet, ist jedoch nicht bei allen Pflanzen vorhanden bzw. unter der Nachweisgrenze (HARLEY *et al.*, 1999; HANSON *et al.*, 1999; CSIKY und SEUFERT, 1999; KESSELMEIER und STAUDT, 1999). Zum Beispiel produzieren Eichen, Pappeln, Platanen, Weiden und Schöllkraut große Mengen Isopren, während Ahorn, Buchen, Birken und die meisten landwirtschaftlich genutzten Pflanzen kein Isopren bilden. Warum dies so ist und was überhaupt der Grund für das Vorkommen der Isoprenbildung ist, scheint zunächst unklar. Immerhin werden in der Regel 2 Prozent, in Extremfällen bis zu 50 Prozent und mehr, des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs bei der Isoprenemission scheinbar als Abfallprodukt verschwendet (siehe SHARKEY, 1996). Es wurde vorgeschlagen, dass Isopren das Produkt einer fehlgesteuerten IPP-Isomerase sei, da das carbokationische Intermediat dieser Enzymreaktion dem intermediären Carbokation bei der säurekatalysierten, nichtenzymatischen Umwandlung von DMAPP zu Isopren ähnlich sei (BACH, 1995). Das intermediäre Carbokation der IPP-Isomerasereaktion enthält die Pyrophosphatgruppe, das Carbokation, das intermediär bei der säurekatalysierten Bildung von Isopren aus DMAPP auftritt, jedoch nicht, da es durch

Abspaltung der Pyrophosphatgruppe entsteht (siehe Abbildung 1-5). Solche Intermediate ohne die Pyrophosphatgruppe treten bei den Reaktionen von Prenyltransferasen (z.B. GPP Synthase) und Terpenyclasen auf, die von einem allylischen Pyrophosphat (z.B. DMAPP oder GPP) Pyrophosphat unter Bildung eines resonanzstabilisierten Kations abspalten (MCGARVEY und CROTEAU, 1995). Das Kation, das auf diese Weise z.B. bei der GPP-Synthase aus DMAPP entsteht, könnte durch Abspaltung eines Protons in Isopren überführt werden, so dass ein „metabolisches Leck“ nicht bei der IPP-Isomerase, sondern eher bei Prenyltransferasen und Terpenyclasen zu suchen wäre, wie von Silver und Fall vorgeschlagen wurde (SILVER und FALL, 1995). Dennoch ist eine Isopren-bildende Aktivität von Prenyltransferasen, Terpenyclasen oder IPP-Isomerase bisher noch nicht gefunden worden. Partielle Aminosäure-Sequenzen von gereinigter Isoprensynthase und Datenbankvergleiche scheinen die Identität von Isoprensynthase mit anderen Prenylpyrophosphat-Enzymen auszuschließen, so dass von einer eigenständigen Isoprensynthase auszugehen ist (SILVER und FALL, 1995).

Die Annahme einer physiologischen Funktion der Isoprenemission im Gegensatz zu einem metabolischen Fehler passt außerdem eher ins gängige Paradigma der Evolution, so dass in der Arbeitsgruppe von T. Sharkey nach einer Funktion gesucht wurde. Sharkey und Mitarbeiter konnten mit verschiedenen experimentellen Ansätzen zeigen, dass Isopren in physiologischen Konzentrationen einen Schutz des Photosyntheseapparates vor Schädigung durch hohe Temperaturen (gemessen als Chlorophyllfluoreszenz) vermittelt (SHARKEY und SINGSAAS, 1995; SINGSAAS *et al.*, 1997; HANSON *et al.*, 1999). Dieser Effekt konnte jedoch kürzlich von anderen nicht nachvollzogen werden (LOGAN und MONSON, 1999). Ein möglicher Schutz von isolierten Thylakoiden und Phosphatidylcholin-Liposomen vor Peroxidation und Permeabilisierung bei hohen Temperaturen durch Isopren konnte ebenfalls nicht gefunden werden (LOGAN *et al.*, 1999). Dennoch ist die Hitzeschutzhypothese damit nicht endgültig widerlegt, denn unter bestimmten Umständen kann es sein, dass schon bei Kontrollen ohne Isoprenzugabe die Chlorophyllfluoreszenz beim Erwärmen erst bei höherer Temperatur ansteigt (SHARKEY, 1999, persönliche Mitteilung). Für den Nachweis des Hitzeschutzeffekts von Isopren werden verschiedene Methoden verwendet, um die interne Isoprenproduktion zu unterdrücken und dann den Effekt einer externen Isoprenzugabe im Vergleich zu Kontrollblättern ohne Isopren nachzuweisen (SINGSAAS *et al.*, 1997). Eine neue Möglichkeit dazu ergab sich, nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass sich die Isoprenbildung mit dem Antibiotikum Fosmidomycin sehr effektiv hemmen lässt (siehe 3.3.1, S. 60; 4.2.2, S. 86). So konnte dann von Sharkey und Mitarbeitern der Wärmeschutzeffekt von Isopren erneut mithilfe von Fosmidomycin demonstriert werden. Diese neue Methode zur Hemmung der Isoprenemission hat den großen Vorteil, dass sie spezifisch nur die Isoprenemission und nicht auch die Photosynthese blockiert, im Gegensatz z.B. zu Dunkelheit, Stickstoffatmosphäre oder anderen Hemmstoffen (SHARKEY, 1999, persönliche Mitteilung).

Andere denkbare Nutzeffekte der Isoprenemission wären z.B. Schutz des Photosyntheseapparates vor Photoinhibition und Photooxidation durch hohe Lichtintensitäten und aggressive Sauerstoffspezies, Verbrauch von überschüssigem NADPH und ATP oder eine ökologische Rolle, wie sie anderen Sekundärstoffen zugeschrieben wird, z.B. Abwehr von Fraßfeinden und Mikroorganismen. Keine dieser Funktionen konnte jedoch bisher eindeutig für Isopren nachgewiesen werden. Obwohl es keinen strengen Beweis gibt, lassen daher folgende Fakten Sharkeys Wärmeschutzhypothese als die derzeit beste Antwort auf die Frage nach dem Grund für die Isoprenemission erscheinen:

1) Wärmeschutz ist der bisher einzige experimentell nachgewiesene und für die Pflanze vorteilhafte Effekt bei physiologischen Isoprenkonzentrationen. Andere nachgewiesene biologische Effekte von Isopren gelten bisher nur für unrealistisch hohe Konzentrationen

(Induktion des Blühens anderer Pflanzen, TERRY *et al.*, 1995) oder lassen keinen Nutzen erkennen (Anziehung von Kollembolen (= Springschwänze, Insekten), MICHELOZZI *et al.*, 1997).

2) Die Wärmeschutzhypothese ist besonders plausibel angesichts der sehr schnellen Induktion der Isoprenemission und dem Auftreten bei Pflanzen, die schnellen Temperaturänderungen ausgesetzt sind, wie z.B. Waldbäumen, deren Blätter abwechselnder Beschattung und Belichtung ausgesetzt sind und die dadurch schlagartig erwärmt werden. Während längerer Hitzeepisoden lässt die Isoprenemission nach. Dann können andere Mechanismen wie Hitzeschockproteine effizienter sein, da sie nicht auf kontinuierlichem Verbrauch neufixierten Kohlenstoffs beruhen. Im Einklang damit findet man Isoprenemittenten kaum in Wüsten sondern vermehrt in waldigen und buschigen Ökosystemen (SINGSAAS und SHARKEY, 2000).

3) Ebenfalls im Einklang mit der Hypothese, dass Isopren Schutz gegen schnelle Temperaturwechsel bietet, ist die taxonomische Verbreitung der Isoprenemission. So wurde spekuliert, dass Isopren bei der Besiedelung des Landes durch Pflanzen evolvierte, da in Luft wegen der niedrigen Wärmekapazität des Mediums stärkere Temperaturschwankungen auftreten als in Wasser. Möglicherweise ist deshalb die Isoprenemission kaum in Algen, sehr stark in Moosen und weniger stark in Farnen und höheren Pflanzen verbreitet. Während der Diversifikation der Pflanzen könnte die Isoprenemission mehrfach durch andere Mechanismen wie Hitzeschockproteine verdrängt worden sein (HANSON *et al.*, 1999).

Nach welchem Mechanismus der Wärmeschutzeffekt von Isopren funktionieren könnte, ist noch völlig unbekannt. Erste Hinweise ergaben Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen mit verschiedenen synthetischen Substanzen: Offenbar sind Doppelbindungen ein gemeinsames Merkmal von niedermolekularen Kohlenwasserstoffen, die einen Wärmeschutz des Photosyntheseapparats vermitteln (SHARKEY 2000, persönliche Mitteilung).

Isoprenemission in anderen Organismen

Isoprenemission wurde bei verschiedenen Bakterien (z.B. *E. coli*, *Bacillus subtilis*) gefunden, wobei die Biosyntheseraten jedoch wesentlich geringer sind als in Pflanzen (KUZMA *et al.*, 1995; SCHÖLLER *et al.*, 1997; WAGNER *et al.*, 1999; WAGNER *et al.*, 2000). Das Cyanobakterium *Anacystis nidulans* produziert wie viele Pflanzen licht- und temperaturabhängig deutlich messbare Mengen an Isopren, wenn auch in geringeren Mengen als Pflanzen (W. ZIMMER, 1999, persönliche Mitteilung).

Es gibt wenige Berichte über Isoprenemissionen aus dem Meer, die vermutlich von Algen herrühren (BROADGATE *et al.*, 1997; Zitate in HANSON *et al.*, 1999). Bakterielle Kontamination oder nichtenzymatischer Abbau anderer Verbindungen konnten von den Autoren jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Emissionsraten von Isopren sind auf jeden Fall wesentlich geringer als die von Pflanzen.

Eine Publikation beschreibt Isoprenproduktion durch einen Pilz, *Eurotium amstelodami* (BERENQUER *et al.*, 1991).

Gelmont *et al.* untersuchten verschiedene Säugetiere auf Gasausdünstungen des gesamten Körpers und fanden Isoprenemission bei Menschen (im Atem) und säugenden Rattenjungen, nicht jedoch bei Mäusen, Meerschweinchen, Hühnern, Kaninchen und Hunden. Die Isoprenproduktion entwöhnter Ratten hörte nach einigen Tagen auf, konnte aber durch erneutes Säugen oder Verfütterung von Sauerrahm und Hüttenkäse wiederhergestellt werden (GELMONT *et al.*, 1981). Im Gegensatz dazu berichteten Peter *et al.*, ohne Besonderheiten des

Alters oder der Ernährung der Tiere zu erwähnen, dass sowohl Ratten als auch Mäuse Isopren produzierten (PETER *et al.*, 1987). Im Vergleich zur Isoprenemission des Menschen von 2-4 mg pro Tag (GELMONT *et al.*, 1981) produzierten Ratten und Mäuse etwa zehnmal soviel Isopren bezogen auf das Körpergewicht (PETER *et al.*, 1990). Isopren wurde ebenfalls nachgewiesen im Blut von Ratten, Kaninchen, Ponies, Hunden, Kühen, Schafen und Menschen, wobei menschliches Blut mindestens 30 mal mehr Isopren enthielt (15 - 70 nmol/l) als das der Tiere (CAILLEUX *et al.*, 1992). Neben anderen flüchtigen organischen Substanzen wurde Isopren in Blut, Urin und Schläfendrüsensekret von männlichen asiatischen Elefanten vor und während des Zustands der Musth⁶ nachgewiesen (RASMUSSEN und PERRIN, 1999).

Isopren ist neben Aceton der häufigste Kohlenwasserstoff im menschlichen Atem und wurde darin schon 1969 nachgewiesen (JANSSON und LARSSON, 1969; GELMONT *et al.*, 1981; PHILLIPS, 1997; FENSKE und PAULSON, 1999). Isopren wird endogen gebildet, entstammt nicht von Bakterien in der Mundhöhle und unterliegt einem Tagesrhythmus, wobei die Produktion während des Schlafs ansteigt und die größten Mengen kurz nach dem Erwachen gemessen wurden (DEMASTER und NAGASAWA, 1978; CAILLEUX und ALLAIN, 1989; JONES *et al.*, 1995; TAUCHER *et al.*, 1997). Unter Vollnarkose sank die Isoprenkonzentration im Blut und stieg eine Stunde nach dem Aufwachen auf gleiche oder höhere Werte als vor der Narkose (CAILLEUX *et al.*, 1993). Bei Dialysepatienten mit chronischem Nierenversagen wurde ein Anstieg des Isoprengehalts im Atem während und nach der Dialyse festgestellt (CAPODICASA *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2000). Akuter Herzinfarkt sowie Ozonexposition führten auch zu vermehrter Isoprenausscheidung im Atem (MENDIS *et al.*, 1995; FOSTER *et al.*, 1996). Leichte körperliche Anstrengung führte dagegen zu einer vorübergehenden Reduktion der Isoprenemission (FOSTER *et al.*, 1996). Akute und chronische Verabreichung des HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffs Lovastatin oder von Cholesterol führten zu einer Verringerung der morgendlichen Isoprenemission und der Cholesterolsynthese (STONE *et al.*, 1993). Sharkey fand hingegen ähnliche Emissionsraten bei Patienten, die Lovastatin einnahmen, wie bei Menschen, die das Medikament nicht einnahmen (SHARKEY, 1996). Eine geringe Isoprenproduktion wurde in Gewebeschnitten von Rattenleber und -niere gefunden (GELMONT *et al.*, 1981). Die Isoprenbildung in einer cytosolischen Rattenleberfraktion war abhängig von der Zugabe von Mevalonat und ATP (DENERIS *et al.*, 1984). Weitere Studien an diesem System ergaben, dass vermutlich enzymatisch gebildetes DMAPP nichtenzymatisch durch saure Katalyse in Isopren umgewandelt werden kann (DENERIS *et al.*, 1985). Außerdem wurde gezeigt, dass *in vitro* durch Peroxidation von Squalen Isopren entstehen kann (STEIN und MEAD, 1988).

Flüchtige organische Verbindungen (= Gerüche) im Atem spielen mindestens seit der Antike eine Rolle in der Diagnose von Krankheiten (PHILLIPS, 1992). In diesem Zusammenhang ist die bisher noch nicht untersuchte Frage von Interesse, ob Isopren vom menschlichen Körper selbst gebildet wird, oder ob Bakterien der Darmflora dies tun oder zumindest dazu beitragen. Isopren ist jedoch wie Butadien auch eine Massenchemikalie für die Herstellung synthetischer Polymere. Die Exposition des Menschen gegenüber diesen Stoffen ist deshalb von toxikologischem Interesse. Isopren (Methylbutadien) und Butadien werden von Tieren metabolisiert, wobei die Carcinogene Isoprendiepid und Butadienepoxid gebildet werden können (siehe z.B. SMALL *et al.*, 1997). Da Isopren aber auch endogen entsteht, ist dies bei einer toxikologischen Bewertung zu berücksichtigen. Insbesondere kann vom Menschen ausgeatmetes Isopren zu einer Hauptquelle der Luftbelastung in Innenräumen werden (BJÖRKQVIST *et al.*, 1997).

⁶ Mehrmals im Jahr auftretendes Verhalten bei Elefantenbullen, dass mit erhöhtem Testosteronspiegel und gesteigerter Aggressivität einhergeht.

1.7 Emission weiterer pflanzlicher Isoprenoide

Außer Isopren werden von Pflanzen auch Monoterpene in großen Mengen und in geringerem Maße Sesquiterpene in die Atmosphäre abgegeben. Die Größenordnung der weltweiten Monoterpenemissionen von Pflanzen, hauptsächlich Nadelbäumen und Sträuchern, ähnelt der der Isoprenemission und ist deshalb auch von Bedeutung für die Atmosphärenchemie (LERDAU *et al.*, 1997; KREUZWIESER *et al.*, 1999; KESSELMEIER und STAUDT, 1999; FUENTES *et al.*, 2000). Monoterpenemissionen werden zum Teil für die Aerosolbildung in der Atmosphäre verantwortlich gemacht (ANDREAE und CRUTZEN, 1997; HOFFMANN und KLOCKOW, 1998). Aerosole führen durch Lichtstreuung zu blauem Dunst über der Vegetation, der schon von Leonardo da Vinci beschrieben wurde (siehe HOFFMANN und KLOCKOW, 1998), die Namensgebung von bewaldeten Bergen z.B. in den USA beeinflusst hat (Blue Mountains, Smoky Mountains), und erstmals von F. Went mit Terpenemissionen der Vegetation in Verbindung gebracht wurde (WENT, 1960). Monoterpene werden normalerweise in speziellen Strukturen wie Drüsenhaaren und Harzkanälen gespeichert. Im Gegensatz dazu gibt es einige Eichenarten ohne größere Speicherorgane, wie z.B. *Quercus ilex* L., die statt Isopren Monoterpene emittieren, wobei die Lichtabhängigkeit jener der Isoprenemission ähnelt (STAUDT und BERTIN, 1998; CSIKY und SEUFERT, 1999). Dass die Emission nicht aus größeren Reservoirs stammt, wurde durch den schnellen Einbau von $^{13}\text{CO}_2$ in Monoterpene belegt (LORETO *et al.*, 1996a, 1996b). Bei einigen Pflanzen, z.B. der Fichte *Picea abies* (SCHÜRMAN *et al.*, 1993), kommen die Monoterpenemissionen sowohl aus Reservoirs als auch aus der Neusynthese (siehe KESSELMEIER und STAUDT, 1999). Die von *Quercus ilex* emittierten Monoterpene vermitteln offenbar einen ähnlichen Schutz der Photosynthese vor Hitzeschäden wie Isopren bei anderen Pflanzen (LORETO *et al.*, 1998; DELFINE *et al.*, 2000; SINGSAAS, 2000).

Ein weiteres Isoprenoid, das ein ähnliches Emissionsverhalten zeigt wie Isopren und die Monoterpene aus *Quercus ilex*, ist das Hemiterpen 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO). MBO wird hauptsächlich im Nordwesten der USA von bestimmten Kiefernarten (*Pinus ponderosa* Laws., *Pinus contorta* Dougl. var. *latifolia* Engelm. und anderen) gebildet (HARLEY *et al.*, 1998; BAKER *et al.*, 1999; SCHADE *et al.*, 2000). Die MBO-Emissionen überschreiten dort die Emissionsraten von Isopren und könnten zumindest lokal eine bisher unterschätzte biogene Quelle für beträchtliche Kohlenwasserstoffeinträge in die Atmosphäre sein. MBO wird wie Isopren enzymatisch aus DMAPP gebildet (FISHER *et al.*, 2000). Die MBO-Synthese bildet wie die Isoprensynthese durch Elimination von Pyrophosphat vermutlich zunächst ein intermediäres allylisches Carbokation, welches dann unter Protonenabspaltung ein Molekül Wasser anlagert. Bei der Isoprensynthesereaktion wird das hypothetische Kation durch Abspaltung eines Protons stabilisiert (siehe Abbildung 1-5; Abschnitt 1.6, S. 25).

1.8 Problemstellung

Nachdem von J. SCHWENDER (1995) gezeigt worden war, dass die Grünalge *Scenedesmus obliquus* sämtliche Isoprenoide nicht über den Acetat/Mevalonat-Weg, sondern über den alternativen DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese bildet, der 1993 bei Bakterien entdeckt (ROHMER *et al.*, 1993) und auch bei einem Diterpen in *Ginkgo* gefunden wurde (SCHWARZ *et al.*, 1994), sollten dieser alternative Biosyntheseweg und sein Vorkommen in höheren Pflanzen näher untersucht werden. Mögliche chemische Intermediate sowie Hemmstoffe des alternativen Biosyntheseweges sollten gefunden werden.

Entwicklung eines Modellsystems der pflanzlichen alternativen IPP-Biosynthese für Einbauexperimente

Zur Durchführung von Markierungsexperimenten mit stabilen Isotopen (^2H und ^{13}C) sollte, in Ergänzung zu den parallelen Markierungsversuchen von J. SCHWENDER (1999) mit $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose, ein Modellsystem entwickelt werden, das es erlaubt, auf einfache Weise verschiedene Pflanzen mit potentiellen Vorläufern des DOXP/MEP-Weges zu markieren und den Markierungsgrad isoprenoider Endprodukte mit GC-MS zu bestimmen. Dazu sollte untersucht werden, ob sich die bei vielen Pflanzen vorkommende Isoprenemission als Testsystem eignet und ob Isopren (C_5H_8) nach dem alternativen IPP-Biosyntheseweg gebildet wird.

Synthesen möglicher Intermediate

Um Informationen über bisher unbekannte enzymatische Schritte des DOXP/MEP-Weges zu erhalten, sollten für Markierungsexperimente mögliche Vorläufersubstanzen in isotopenmarkierter Form hergestellt werden. Insbesondere sollte zunächst eine Synthese für 1-Deoxy-D-xylulose entwickelt werden, da diese Substanz aufgrund erster Hinweise (siehe 1.4.2, S. 22) das aussichtsreichste Intermediat war.

Entwicklung eines Modellsystems der pflanzlichen alternativen IPP-Biosynthese für Hemmexperimente

Da zu Beginn dieser Arbeit noch keine Enzymtests für den alternativen DOXP/MEP-Weg zur Verfügung standen, sollte ein pflanzliches Testsystem entwickelt werden, das die Untersuchung der Wirkung von Hemmstoffen auf die mevalonatunabhängige IPP-Biosynthese so spezifisch wie möglich erlaubt. Falls Isopren über den DOXP/MEP-Weg gebildet würde, sollten Methoden entwickelt werden, mit denen eine Hemmung der pflanzlichen Isoprenemission durch potentielle Inhibitoren gemessen werden kann. Die Isoprenbiosynthese sollte ein gutes *in vivo*-Modell für den DOXP/MEP-Weg sein, da sie von IPP ausgehend nur zwei weitere Enzyme benötigt (IPP-Isomerase und Isopren-Synthase). Mögliche Hemmstoffe sollten insbesondere unter Herbiziden bzw. Hemmstoffen der Isoprenoidbiosynthese gesucht werden, deren Wirkungsmechanismus noch unbekannt war. Falls Hemmstoffe gefunden würden, sollte versucht werden, den oder die Wirkorte soweit wie möglich einzugrenzen.

Untersuchung weiterer, noch nicht untersuchter Isoprenoide

Parallel zu den von J. SCHWENDER (1999) in erster Linie untersuchten Hauptisoprenoiden der Plastiden (Chlorophyll, Carotinoide, Plastochinon-9) und des Cytosols (Sterole) in Grünalgen und höheren Pflanzen sollte die Biosynthese weiterer pflanzlicher Isoprenoide untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Zur Untersuchung der Isoprenemission wurden voll entwickelte Blätter der Bäume Schwarzpappel (*Populus nigra* L.), Korbweide (*Salix viminalis* L.), Stieleiche (*Quercus robur* L.), Robinie (*Robinia pseudoacacia* L.), Platane (*Platanus x acerifolia*) und der krautigen Pflanze Schöllkraut (*Chelidonium majus* L.) im Sommer von Pflanzen genommen, die im Freien auf dem Gelände der Universität Karlsruhe wuchsen. Es wurden Blätter verwendet, die möglichst lange gleichmäßig direktem Sonnenlicht ausgesetzt waren. Das Pflanzenmaterial wurde unter Wasser abgeschnitten oder nach dem Schneiden sofort in Wasser gestellt. Es wurde jeweils frisch eingesetzt. *Eucalyptus globulus* L. wurde im Gewächshaus des Botanischen Gartens der Universität Karlsruhe angezogen.

Im Winter wurden Pflanzen verwendet, die im Gewächshaus des Botanischen Gartens oder im Pflanzenanzuchtsraum des Instituts für Botanik II bei 20-30°C angezogen wurden. Im Gewächshaus wurde zusätzlich zum natürlichen Tageslicht von 7.00-19.30 Uhr mit Leuchtstoffröhren bei einer Quantenstromdichte von 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ belichtet. Im Pflanzenanzuchtsraum wurde mit Osram L 40 Leuchtstoffröhren (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$) belichtet. Die Lichtperiode betrug 16 h pro Tag. Einige Tage vor der Verwendung wurden die Pflanzen jeweils bei ca. 30°C unter Quecksilberhochdrucklampen (Philips HLRG 400 W) oder Natriumdampflampen (Philips SON-T AGRO 400) gestellt, um eine höhere Lichtintensität zu erreichen (ca. 400-500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$).

Chelidonium majus L. wurde aus dem Freiland in Torfkultursubstrat (TKS II) umgepflanzt und im Pflanzenanzuchtsraum weiterkultiviert.

Von *Populus nigra* L. wurden im Herbst Stecklinge bewurzelt, die noch Blätter trugen. Dazu wurden im Gewächshaus frisch geschnittene Zweige in Töpfe mit Lavagranulat gesetzt und, um Blattverluste zu vermeiden, in einem Vermehrungshaus bei hoher Luftfeuchtigkeit gehalten, bis Wurzeln ausgebildet waren. Anschließend wurden die Stecklinge in TKS II umgepflanzt und im Versuchsgewächshaus und im Pflanzenanzuchtsraum weiter angezogen.

Keimlinge von *Populus alba x tremula* aus steriler Mikropropagation in Reagenzgläsern auf Agar wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Rennenberg, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt. Die Pflanzen wurden in ein Gemisch aus 50 % Perlite, 25 % Quarzsand Körnung 12 und 25 % TKS I umgepflanzt und im Versuchsgewächshaus angezogen. In der ersten Woche wurden Marmeladengläser über die Pflanzen gestülpt. In der zweiten Woche wurden die Gläser schräggestellt und anschließend entfernt. Die Bäumchen wurden alle zwei Wochen mit Hakaphos grün (0,6 g in 200 ml Wasser pro Pflanze) gedüngt.

Platanus x acerifolia und *Quercus robur* L. wurden auf TKS II aus Samen angezogen, die im Herbst auf dem Universitätsgelände gesammelt wurden. Zusätzlich wurden im Winter 1998/99 und 1999/2000 Platanenbäumchen verwendet, die während der Sommer 1998 und 1999 stark zurückgeschnitten im Dunkeln bei 4°C im Kühlraum „überwintert“ hatten und anschließend im Pflanzenanzuchtsraum neue Blätter ausgetrieben hatten.

Nadeln der nordamerikanischen Kiefer *Pinus ponderosa* zur Untersuchung der Emission von 2-Methyl-3-buten-2-ol stammten von einem Baum mit halbschattigem Standort aus dem Freiland des Botanischen Gartens.

Gerstensamen (*Hordeum vulgare* L., cv. Alexis) für Ergünungsversuche wurden 2 h in Wasser eingeweicht und im Dunkeln auf TKS II gekeimt.

Blätter von Pistaziensträuchern (*Pistacia lentiscus* L.) zur Markierung flüchtiger Monoterpene wurden dem Freiland des Botanischen Gartens entnommen.

Zur aseptischen Anzucht von Fichten (*Picea abies* L.) für Markierungsexperimente des ätherischen Öls wurden 4g Samen (Nr. 84029, Fa. Geigle, D-72192 Nagold) 20 min in NaOCl-Lösung gelegt (1 ml konzentrierte Lösung, 12-13 % aktives Chlor, Riedel-de Haën + 30 ml autoklaviertes Wasser) und mit sterilem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser farblos war (6 mal). Die Samen wurden dann auf 3 autoklavierte 250 ml Erlenmeyerkolben mit feuchter Watte verteilt. Die Kolben wurden mit Watte und Aluminiumfolie verschlossen und in den Pflanzenanzuchtraum gestellt und die Samen keimten im Licht-/Dunkelwechsel.

2.2 Chemikalien und Synthesen

[3-¹³C]-Pyruvat wurde bezogen von Omicron Biochemical Inc., IN, USA.

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

D,L-[1-²H₂]-2-C-Methyl-D-erythritol wurde von Prof. M. Rohmer, Strasbourg erhalten.

Von Herrn H. U. May wurden am Institut für Organische Chemie, Universität Darmstadt (Herr Prof. F. W. Lichtenthaler) folgende Deoxyxylulosederivate synthetisiert (ZEIDLER *et al.*, 1997): 1-Fluor-1-deoxy-2,3-isopropyliden-β-D-xylulofuranose, das Methylglykosid von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose (Methyl-[1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulofuranosid) und [1-²H₁]-1-Deoxy-2,3-isopropyliden-β-D-xylulofuranose.

Fosmidomycin und FR-900098 wurden zunächst von Herrn Dr. Hassan Jomaa, Universität Giessen, erhalten (JOMAA *et al.*, 1999b). Fosmidomycin war gegen Ende der Arbeit kommerziell erhältlich und wurde bei der Firma Molecular Probes gekauft.

Cerivastatin war ein Geschenk der Bayer AG, Wuppertal.

Clomazone wurde von Herrn Dr. C. Fedtke, Bayer AG, Wuppertal erhalten. Clomazone wurde später bezogen von Riedel-de Haën. 5-Ketoclomazone wurde von der Firma TeLA Technische Lebensmittel- und Umweltanalytik GmbH Berlin nach KONZ (1981) synthetisiert.

Dimethylallylmethylendisulfonamid = (1-(3-Methyl-2-butenyl)sulfamoyl)methansulfonamid und Dimethylallylcarbamylsulfamid = 3-Methyl-2-butenylsulfamoylcarbamat wurden von Herrn Prof. Th. A. Spencer, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, erhalten (CASTRO *et al.*, 1996).

Dimethylaminoethylpyrophosphat (DMAEPP) wurde von Herrn Prof. R. Croteau, Washington State University, Pullman, Washington, erhalten.

Sonstige Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Unternehmen der Sigma-Aldrich Gruppe, von den Firmen Merck (Darmstadt), oder Roth (Karlsruhe), bezogen.

2.2.1 Eigene Synthesen von ¹³C und ²H-markierten Substraten

Synthesen Deuterium- und ¹³C-markierter Verbindungen wurden zunächst mit unmarkierten Edukten erprobt und dann mit den entsprechenden markierten Vorstufen durchgeführt. Die Produkte wurden, wenn nicht anders vermerkt, mittels ¹H-NMR-Spektroskopie identifiziert.

[1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose

[1-²H₁]-1-Deoxy-2,3-isopropyliden-β-D-xylulofuranose wurde nach einer modifizierten Vorschrift von H. U. May durch saure Hydrolyse (5-10 mg/ml in 40 mM HCl, 3h bei 60 °C) zu [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose umgesetzt. Anschließend wurde ein kleiner Volumenanteil am Rotavapor bei 30°C abgezogen, um entstandenes Aceton zu entfernen und vorsichtig mit 5% NaHCO₃ neutralisiert. Per DC (Chloroform/Methanol 4:1, v/v, Detektion mit 50 % H₂SO₄ und Erhitzen) wurde die Reinheit überprüft: Meist war nur Produkt sichtbar (R_f 0,37), begleitet von Spuren des Edukts (R_f 0,85). Die Lösungen wurden ohne weitere Aufarbeitung direkt verwendet oder bei -20°C gelagert. 1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose wurde nach dem gleichen Verfahren aus 1-Fluor-1-deoxy-2,3-isopropyliden-β-D-xylulofuranose hergestellt.

[1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylitol und [1-²H₁]-1-Deoxy-D-lyxitol

50 mg [1-²H₁]-1-Deoxy-2,3-isopropyliden-β-D-xylulofuranose wurden in 6,8 ml 40 mM Salzsäure entschützt und neutralisiert (siehe oben). Die Lösung wurde eingefroren, nach unvollständigem Auftauen tropfenweise mit einer Aufschlammung von 250 mg KBH₄ in 7 ml Methanol versetzt und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 1 M HClO₄ auf pH 3 gebracht, nach kurzem Stehen auf Eis vom entstandenen KClO₄ abfiltriert und bei Raumtemperatur im Vakuum eingeeengt bis der pH-Wert etwa 1 war. Die Lösung wurde mit methanolischer K₂CO₃-Lsg. auf pH 6 gebracht, filtriert und bei Raumtemperatur im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Methanol aufgenommen und auf einer Kieselgel-DC-Platte (20 x 20 cm, 0,5 mm Dicke) mit Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgetrennt. Die Hauptbande bei R_f 0,55 (Detektion am Rand der Platte mit 50% H₂SO₄ und Erhitzen) wurde mit Methanol eluiert und im Vakuum eingeeengt. Es wurden 30 mg eines Gemischs aus [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylitol und [1-²H₁]-1-Deoxy-D-lyxitol erhalten.

[1-¹³C]-2-C-Methyl-D,L-erythrono/threono-1,4-lacton

Es wurde versucht, das oben genannte Lacton als Diastereomeregemisch (4 Isomere) aus 3,4-Dihydroxybutan-2-on und K¹³CN durch Cyanhydrinsynthese in wässriger Schwefelsäure herzustellen. 3,4-Dihydroxybutan-2-on wurde aus 1-Buten-3-on mit OsO₄ und NaClO₃ hergestellt (VOLK, 1989). Das Lacton konnte jedoch nicht sauber erhalten werden.

(R)-[1,1,4,4-²H₄]-2-C-Methylbutan-1,2,4-triol

Eine Lösung von 1,5 g (R)-Citramalsäure und 0,5 g p-Toluolsulfonsäure in 11,5 ml Ethanol und 10 ml CHCl₃ wurde bei 70 °C und Atmosphärendruck am Rotationsverdampfer azeotrop überdestilliert, bis keine Wasserabscheidung im Destillat mehr zu beobachten war. Der Destillationsrückstand wurde im Vakuum eingeeengt und über Säulenchromatographie an Kieselgel durch Gradientenelution mit Hexan/Ether 1:1 - 1:2 gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen (DC) wurden vereinigt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es wurden 1,2 g (R)-Citramalsäurediethylester erhalten.

Eine Lösung von 0,6 g des Diesters in frisch destilliertem, über Na-Draht getrocknetem THF wurde tropfenweise unter Rühren bei Raumtemperatur in Argonatmosphäre mit einer Spritze durch ein Gummiseptum zu 0,5 g LiAlD₄ in 12 ml THF gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend unter Rühren und Eiskühlung nacheinander mit 0,5 ml H₂O, 0,5 ml 1,5 % NaOH und 0,5 ml H₂O versetzt und durch eine Glasfritte filtriert. Der Niederschlag wurde portionsweise mit 50 ml THF

gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeengt und über Säulenchromatographie an Kieselgel durch Elution mit Chloroform/Methanol (3:1, v/v) gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen (DC) wurden vereinigt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 0,28 g (*R*)-[1,1,4,4-²H₄]-2-*C*-Methylbutan-1,2,4-triol erhalten.

[1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ol

Eine Lösung von 2 g Dimethylacrylsäure und 0,5 g *p*-Toluolsulfonsäure in 14 ml Ethanol und 11 ml CHCl₃ wurde bei 70 °C und Atmosphärendruck am Rotationsverdampfer azeotrop überdestilliert, bis keine Wasserabscheidung im Destillat mehr zu beobachten war. Der Destillationsrückstand wurde im Vakuum eingeengt und mit Hexan und Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Hexan extrahiert. Die Hexanextrakte wurden mit 5 % NaHCO₃ und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Es wurden 1,6 g Dimethylacrylsäureethylester erhalten.

Eine Lösung von 0,5 g Dimethylacrylsäureethylester in 7 ml trockenem THF wurde tropfenweise unter Rühren in Argonatmosphäre zu 180 mg LiAlD₄ in 15 ml THF gegeben, 2h unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde unter Eis/NaCl-Kühlung bis zum Verschwinden der Trübung mit 10% H₂SO₄ versetzt und mit Ether (6 x 25 ml) extrahiert. Die Etherphase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum eingeengt und durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Ether (1:1, v/v) gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen (DC) wurden vereinigt und vorsichtig bei Raumtemperatur im Argonstrom eingeengt. Es wurden 180 mg [1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ol erhalten. Dieses wurde per GC/MS durch Vergleich mit käuflichem 3-Methyl-2-buten-1-ol identifiziert.

[1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat (deuteriertes DMAPP)

Deuteriertes DMAPP wurde nach KELLER und THOMPSON (1993) synthetisiert. 23 µl [1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ol wurden in 0,5 ml Trichloracetonitril gelöst und mit 0,5 ml einer Bis-Triethylammoniumphosphat-Lösung (TEAP) in Acetonitril auf 37 °C erwärmt. Nach 5 und 10 min. wurden jeweils weitere 0,5 ml TEAP-Lösung zugegeben. Die TEAP-Lösung wurde hergestellt durch vorsichtiges Mischen von 0,91 ml Lösung A und 1,5 ml Lösung B unter Rühren (Lösung A: 25 ml konzentrierte Phosphorsäure + 94 ml Acetonitril; Lösung B: 110 ml Triethylamin + 100 ml Acetonitril). Nach insgesamt 15 min. wurde die Mischung auf eine Kieselgelsäule gegeben und mit Isopropanol/25 % NH₃/Wasser (60:25:10, v/v) eluiert. Mit analytischer DC (Kieselgel, Isopropanol/25 % NH₃/Wasser (60:30:10, v/v), Visualisierung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure) waren 3 Banden erkennbar, die nach KELLER und THOMPSON (1993) das entsprechenden Mono-, Di- und Triphosphat enthalten. Die zweitpolarste Bande cochromatographierte mit käuflichem DMAPP. Die Fraktionen der Säulenchromatographie, die das zweitpolarste Produkt enthielten, wurden bei Raumtemperatur im Vakuum eingeengt, mit 3,3 ml 10 mM NH₄HCO₃/Methanol (1:2, v/v) aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Der DMAPP-Gehalt der Lösung wurde mit einer Ausbeute von 25 % nach KELLER und THOMPSON (1993) auf 15 mM geschätzt.

2.2.2 Enzymatische Synthese von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat

Die Synthese wurde in der von mir betreuten Staatsexamensarbeit von Frau Claudia Gemünden entwickelt (GEMÜNDEN, 2000) und dann auch von Frau Melanie Siehler durchgeführt.

1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat wurde aus Fructose-1,6-bisphosphat und Natriumpyruvat nach einer Variation der Methode von TAYLOR *et al.* (1998) synthetisiert. Den Substraten wurde Kaninchenmuskelaldolase (Sigma), Triosephosphatisomerase (Sigma) und gereinigte, rekombinante 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) aus *Chlamydomonas reinhardtii* (SCHWENDER, 1999; SCHWENDER *et al.*, 1999) zugesetzt. Die Reinigung der DXS mit N-terminalem Histidin-Tag über Zn-Affinitätschromatographie per HPLC wurde von Herrn Christian Müller in seiner Doktorarbeit bei Botanik II entwickelt und betreut und ist beschrieben in GEMÜNDE (2000) und MÜLLER *et al.* (2000)⁷. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes war wie folgt (Ansatzgröße 4 ml in Falcon-Reaktionsgefäßen):

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6	50 mM
Thiaminpyrophosphat	1,5 mM
DTT	0,75 mM
MgCl ₂	5 mM
NaF	5 mM
Na-EDTA	0,5 mM
Na-Pyruvat	50 mM
Na ₃ -Fructose-1,6-diphosphat	25 mM
Kaninchenmuskelaldolase	4 Units
Triosephosphatisomerase	20 Units
DXS	2 ml auf 4 ml Gesamtvolumen

Nach ca. 24 h bei 30° C im Wasserbad wurde die Reaktionsmischung auf die Konzentrationszone einer präparativen Merck Kieselgel 60 Chromatographieplatte aufgetragen (2 ml pro Platte, 20 x 20 cm, 2 mm Schichtdicke) und über Nacht in n-Propanol/Ethylacetat/Wasser (6:1:3, v/v/v) entwickelt. Die DOXP-Bande wurde mit Ethylendiaminsulfatreagenz (IWAKAWA *et al.*, 1980) durch Fluoreszenz bei 355 nm sichtbar gemacht, ausgekratzt, mit Wasser eluiert und über Nacht gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 50 mg. Das ¹H-NMR Spektrum in D₂O entsprach Literaturdaten (TAYLOR *et al.*, 1998) und zeigte keine Verunreinigungen. Allerdings enthielten die DOXP-Präparate eine anorganische Verunreinigung, vermutlich kolloidales Kieselgel vom Eluieren der Schicht mit Wasser. Der Gehalt an DOXP wurde sowohl enzymatisch mithilfe von rekombinanter DXR aus *Arabidopsis thaliana* (SCHWENDER, 1999; SCHWENDER *et al.*, 1999)⁷ als auch durch Integration eines ¹H-NMR-Spektrums mit internem Standard (Acetonitril) bestimmt. Gehalt enzymatisch: 25 %, NMR: 22 %. Die Hauptmenge an Verunreinigung lies sich durch Lösen des Präparats in einer kleinen Menge Wasser und anschließendes Abzentrifugieren abtrennen. Um bei Versuchen mit dem so hergestellten DOXP einen Effekt der Verunreinigung ausschließen zu können, wurde in gleicher Weise wie beim Eluieren der DOXP-Bande reines Kieselgel von einer DC-Platte eluiert und gefriergetrocknet (siehe 2.7.1, S. 47, Kieselgeleextrakt). Die DOXP-Lösungen hatten einen neutralen pH-Wert. Mit einer DOXP-Summenformel von C₅H₉O₇PNa (Molmasse 235) lässt sich die molare Ausbeute auf 23% abschätzen.

⁷ Die Bestimmung der DOXP-Menge anhand des NADPH-Verbrauchs beim Umsatz mithilfe der DXR wurde von Christian Müller im Rahmen seiner noch laufenden Doktorarbeit am Institut für Botanik II durchgeführt.

2.3 Experimente zur Markierung von Isopren

2.3.1 GC/MS-Bestimmung von Isopren

Tropfenmethode

Zur einfachen gaschromatographischen Bestimmung von Isopren wurde eine statische Headspace-Methode entwickelt, bei der Isopren im Mikromaßstab in einer lipophilen Flüssigkeit angereichert wird:

Unter Wasser abgeschnittene Blätter oder Teile davon wurden senkrecht in runde 4ml-Gläschen plaziert. Diese enthielten Lösungen einer ^2H - oder ^{13}C -markierten Substanz (s. Abschnitt 2.2) oder Wasser (0,1 - 0,6 ml). Die Aufnahme der Lösung erfolgte während mehrerer Stunden, meist über Nacht. In einigen Fällen wurden die offenen Gläser zur Verbesserung der Aufnahme durch Transpiration im Licht bei 25°C einem leichten Luftstrom ausgesetzt, wobei von Zeit zu Zeit verdunstetes Wasser nachgefüllt wurde. Um die Isoprenemission einzuleiten, wurde die Gläser mit einem Schraubdeckel mit Teflonbeschichtetem Siliconseptum verschlossen und bei höheren Temperaturen ($30\text{-}40^\circ\text{C}$) für 30 min. bis zu einigen Stunden mit einem Diaprojektor belichtet ($1500 - 2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Temperatur wurde mit einem Wasserbad oder über den Abstand einer zusätzlichen Glühlampe kontrolliert. Anschließend wurde eine GC-Spritze durch das Septum gestochen, die $2 \mu\text{l}$ Decan oder Amylbenzol enthielt. Das hochsiedende Lösungsmittel wurde in Form eines hängenden Tropfens aus der Spritze gedrückt und dem Luftraum für 15-45 min ausgesetzt (Abbildung 2-1). Dies geschah bei Raumtemperatur ohne Beleuchtung, um eine vorzeitige Verdunstung des Tropfens zu vermeiden. Anschließend wurde der Tropfen mit Isopren in die Spritze zurückgezogen und sofort ins GC-MS injiziert. Isopren eluiert im GC vor dem schwererflüchtigen Lösungsmittel.

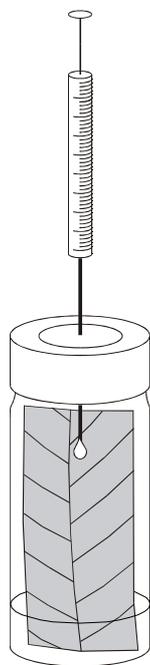


Abbildung 2-1 Tropfenmethode zur Anreicherung von Isopren aus dem Luftraum um ein Blatt in einem hängenden Tropfen von $2 \mu\text{l}$ Decan oder Amylbenzol für die anschließende GC/MS-Analyse.

Die Identität des biogenen Isoprens mit synthetischem Isopren (Fluka) wurde unter gleichen GC-Elutionsbedingungen durch Vergleich von Retentionszeit und Fragmentierungsmuster verifiziert.

Für diese wie auch alle anderen Experimente wurde ein Hewlett Packard 5890 II Gaschromatograph mit einer *crosslinked methylsilicone* Säule von Hewlett Packard (20 m x 0,32 mm) gekoppelt an einen Hewlett Packard 5971A Massendetektor mit einem Säulenvordruck von 11 psi Helium verwendet. Temperaturprogramm: 80 °C (5 min), Aufheizen auf 280 °C, 20 min bei 280 °C. Die Retentionszeit von Isopren beträgt unter diesen Bedingungen 1,1 min.

SPME-Methode (Solid Phase Micro Extraction)

Bei der SPME-Methode der Firma Supelco handelt es sich um eine Festphasenextraktion im Miniaturmaßstab. Eine mit einem polymeren Adsorbens beschichtete Faser wird in das untersuchende Gemisch gehalten. Letzteres kann flüssig oder gasförmig sein. Über die Art der Beschichtung der Faser lässt sich steuern, welche Art von Analyten bevorzugt adsorbiert wird. Die Faser befindet sich zunächst in einer Spritzennadel und kann nach Durchstechen eines Septums herausgeschoben werden. Nach Exposition und Beladung der Faser mit dem oder den Analyten wird die Faser in die Spritzennadel zurückgezogen, die Nadel wird in den heißen Injektor eines Gaschromatographen eingeführt und die Faser wieder ausgefahren. Die an die Faser adsorbierten Substanzen desorbieren und werden auf die GC-Säule gespült. Die Methode hat den Vorteil, dass keine Lösungsmittel verwendet werden, die als Kontaminationsquelle in Frage kommen. Diese Methode stand allerdings erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung.

Zur Untersuchung von Isopren wurde eine Faser des Typs PDMS/DVB (Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene) mit 65 µm Schichtdicke gewählt. Die Expositionszeiten zur Adsorption betragen 15-30 min. Die Desorption im Injektor des GC wurde bei 260 °C für 60-120 Sekunden durchgeführt. Detektortemperatur (MS): 310 °C, Temperaturprogramm: 80°C (5min.), Aufheizen auf 280 °C (20 °C/min.), 20 min. bei 280 °C. Bei vielen nacheinander durchgeführten Messungen wurde isotherm bei 80°C gemessen.

2.3.2 Abschätzung des Markierungsgrades von Isopren aus dem Massenspektrum

Da die stabilen Isotope Deuterium (^2H) und ^{13}C um jeweils eine Masseneinheit schwerer sind als die in der Natur vorwiegend vorkommenden Isotope ^1H und ^{12}C , kann ein Einbau ^2H - und ^{13}C -markierter Verbindungen mit Massenspektroskopie nachgewiesen werden. Voraussetzung für eine quantitative Auswertung ist allerdings, dass das untersuchte Fragmentation (z.B. das Molekülion $[\text{M}]^+$) im Massenspektrum isoliert ist, d.h. nicht von Nebenpeaks⁸ umgeben ist, die sich in der Masse um eine oder wenige Einheiten unterscheiden. Dies gilt insbesondere, wenn der Einbau nur eines ^2H - oder ^{13}C -Atoms zu erwarten ist. Eine Einschränkung ergibt sich hierbei durch die natürliche Häufigkeit des Isotops ^{13}C von ca. 1,1 %, die zum Auftauchen der Isotopomer-Peaks $[\text{M}+1]^+$, $[\text{M}+2]^+$, $[\text{M}+3]^+$ usw. im Massenspektrum führt. Beim Isoprenmolekül mit 5 C-Atomen (Molekülmasse 68) ergibt sich rechnerisch eine Intensität des M+1 Fragments (69) von ca. 5,2 %, was in etwa den gemessenen Daten entspricht (Abbildung 2-2). Die Intensität des M+2 Fragments (70) von etwa 0,1 % liegt unterhalb der Nachweisgrenze. Der natürliche

⁸ Signale im Massenspektrometer und chromatographische Banden werden heute auch im Deutschen als Peaks bezeichnet.

Deuterium-Gehalt von ca. 0,015 % kann vernachlässigt werden. Eine größere Schwierigkeit entsteht allerdings dadurch, dass im Massenspektrum von Isopren das Fragment mit der Masse 67 (entstanden durch Verlust eines Wasserstoffatoms im Massenspektrometer) die höchste Intensität hat. Beim in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer betrug das Intensitätsverhältnis der Peaks M/M-1 etwa 0,67.

Um dennoch in etwa abschätzen zu können, welcher Anteil der Isoprenmoleküle aus den angebotenen Vorläufersubstanzen gebildet wurde, wurden Massenspektren unter der Annahme verschiedener Einbauverhältnisse berechnet und visuell mit den gemessenen Spektren verglichen. Die Berechnungen wurden nur für den Fall des Einbaus eines Deuterium- bzw. ^{13}C -Atoms durchgeführt, da bei den mehrfach markierten Vorläufern ohnehin kein nennenswerter spezifischer Einbau gemessen wurde (siehe 3.2, S. 55). Dazu wurde die gemessene Intensitätsverteilung im Massenspektrum von unmarkiertem Isopren mit derselben, aber um eine Einheit zu höheren Massen verschobenen und entsprechend gewichteten, Intensitätsverteilung überlagert.

Die Intensität I_m des Fragments der Masse m für einen Markierungsgrad von k % wurde wie folgt berechnet:

$$I_m^{\text{ber}}(k) = \left(1 - \frac{k}{100}\right) \cdot I_m^{\text{gem}} + \frac{k}{100} \cdot I_{m-1}^{\text{gem}}$$

($^{\text{ber}}$ = berechnet für markiertes Isopren, $^{\text{gem}}$ = gemessen an unmarkiertem Isopren)

Anschließend wurden die Intensitäten auf eine relative Intensität von 100 % für den höchsten Massenpeak (Basispeak) normiert.

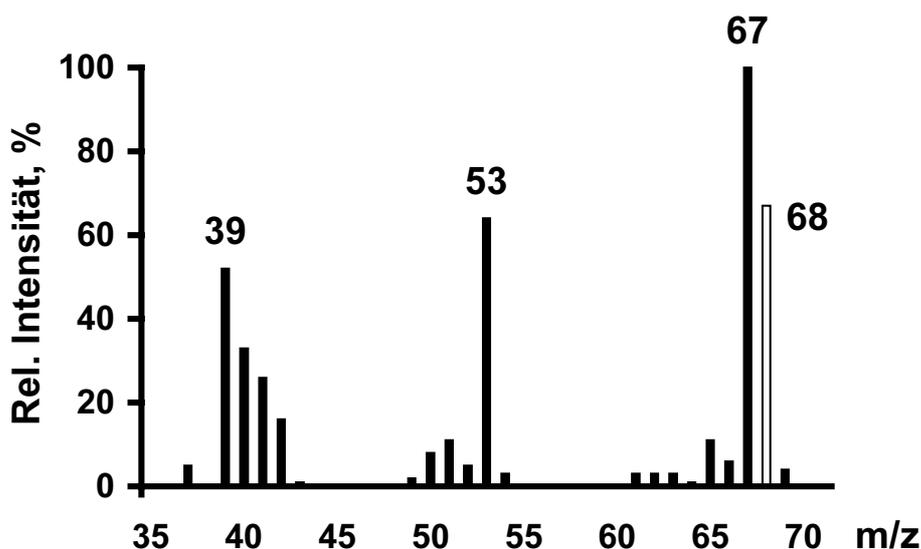


Abbildung 2-2 Massenspektrum von Isopren. m/z = Verhältnis Masse zu Ladung. Das intensivste Signal (Basispeak) stammt von einem Fragment der Masse 67, das durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus dem Molekülion der Masse 68 entsteht.

Dieses Verfahren soll an folgendem Beispiel verdeutlicht werden:

Die Intensität des Fragments der Masse 68 (Molekülion, $m = 68$) soll berechnet werden für den Fall, dass 10 % der Moleküle einfach mit Deuterium markiert sind ($k = 10$). Die Intensität setzt sich dann zu 90% aus der natürlichen, an unmarkiertem Isopren gemessenen Intensität I_m des Fragments 68 und zu 10 % aus der Intensität des um eine Einheit leichteren Fragments 67 zusammen, da letzteres durch den Einbau eines Deuteriums zur Intensität des Fragments 68 im Massenspektrum des markierten Isoprens beiträgt.

Auf diese Weise wurden in 10 %-Schritten die Massenverteilungen berechnet und mit dem gemessenen Spektrum verglichen (siehe Abbildung 2-3) (ZEIDLER *et al.*, 1997). Dazu wurde nur das C_5 -Fragment (der Molekülionencluster um die Massen 67 und 68 herum) herangezogen, da die C_4 - und C_3 -Fragmente aufgrund der teilweisen Abspaltung des schweren Isotops weniger Anreicherung aufweisen. Da für die Entscheidung, ob ein guter Einbau vorliegt oder nicht, eine halbquantitative Abschätzung ausreichend ist, wurde der natürlich ^{13}C -Gehalt vernachlässigt. Beim Einbau von Deuterium ist damit zu rechnen, dass auch 2H im Massenspektrometer zum Teil abgespalten wird, so dass mit dieser Methode der tatsächliche Markierungsgrad vermutlich eher unterschätzt wird. Aufgrund der Schwankungen des Verhältnisses $M/M-1$ um maximal $\pm 2 \%$ bei häufig wiederholten Messungen kann man davon ausgehen, dass ein Einbau von etwa $> 5 \%$ signifikant nachweisbar ist.

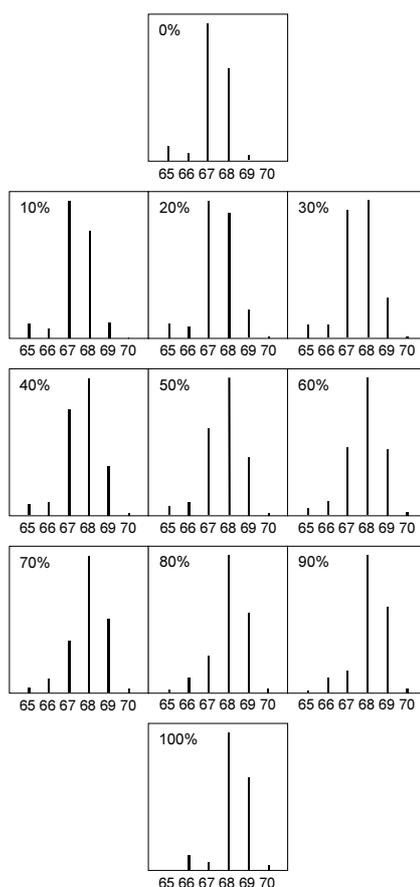


Abbildung 2-3 Berechnete Massenspektren von Isopren im Bereich des Molekülions (Masse 68) unter Annahme eines Markierungsgrades zwischen 0 und 100 % durch Einbau eines um eine Masseneinheit schwereren Vorläufers. Durch Vergleich eines Massenspektrums von Isopren, das in einem Einbauexperiment (z.B. mit $[1-^2H_1]$ -DOX) gemessenen wurde, mit den hier in 10 %-Schritten dargestellten berechneten Verteilungen, kann der Markierungsgrad abgeschätzt werden.

Überprüfung der MS-Methode zur Bestimmung des Markierungsgrades von Isopren durch NMR

Um das oben beschriebene massenspektrometrische Verfahren zur Abschätzung des Einbauverhältnisses mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen und um den spezifischen Einbau des Methylglykosids von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose (d-Me-DOX) in das von *Populus nigra* emittierte Isopren abzusichern (siehe 4.1.2, S. 81), wurde die Deuterium-Markierung von Isopren zusätzlich mit ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde im Rahmen der von mir betreuten Staatsexamensarbeit von Herrn Rainer Gröner eine Kühlfallenapparatur entwickelt, um ausreichende Mengen Isopren zu erhalten (GRÖNER, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997). Da das NMR-Experiment eine entscheidende Ergänzung der GC-MS Experimente darstellt, von mir entworfen wurde und die Entwicklung der Apparatur unter meiner Anleitung geschah, wird das Experiment hier nochmals beschrieben:

Mithilfe einer Aquarienpumpe wurde über Aktivkohle gereinigte Umgebungsluft mit $1,4 \text{ l h}^{-1}$ durch eine durchsichtige Kunststoffröhre gepumpt. Diese enthielt einen abgeschnittenen Pappelzweig mit 15 Blättern, der in 30 ml einer wässrigen Lösung von 30 mg des Methylglykosids von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose stand. Die aus der Röhre austretende Luft wurde durch zwei mit Trockeneis/Aceton gekühlte Kühlfallen und ein mit $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ gefülltes Trockenrohr geleitet, um die großen Mengen Transpirationswasser weitgehend zu entfernen. In einer dritten Kühlfalle (Trockeneis/Aceton) mit 100 mg Aktivkohle (Aktivkohle 20/40, Supelco) wurde das Isopren adsorbiert. Die Apparatur wurde 8h pro Tag bei einer Belichtung mit $1200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und einer Temperatur von 30°C mit Luft gespült. Weitere 30 mg des Methylglykosids von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose und zusätzliches Wasser wurden nach und nach durch einen gasdicht eingepassten Teflonschlauch zugeführt, um ein Austrocknen des Zweiges zu verhindern. Nach drei Tagen wurde die Aktivkohle aus der letzten Kühlfalle mit 1 ml CDCl_3 in drei Portionen eluiert und mit ^1H -NMR untersucht.

Sowohl das NMR-Spektrum als auch die GC-MS-Analyse derselben Probe zeigten einen Einbaugrad von d-Me-DOX von etwa 35% im Isopren an (SCHWENDER *et al.*, 1997). Im NMR-Spektrum war die Deuteriummarkierung nur in der Methylgruppe des Isoprens nachweisbar, wie bei einem Einbau von intaktem d-DOX zu erwarten war (siehe 1.4.2). Damit war die grundsätzliche Gültigkeit der MS-Methode bestätigt.

2.4 Quantifizierung von Isopren mittels UV-Spektroskopie

Zur Quantifizierung von Isopren für Hemmversuche wurde eine Methode entwickelt, die auf UV-Absorption beruht. Die Methode wurde auch in der von mir betreuten Staatsexamenarbeit von Herrn R. Gröner (GRÖNER, 1997) und in ZEIDLER und LICHTENTHALER (1998) beschrieben:

Frisch geschnittene rechteckige Blattstücke wurden an einer Innenseite einer Quatzküvette von 1 cm Kantenlänge plaziert. Diese enthielten entweder ca. 0,5 ml wässriger Lösungen von zu untersuchenden Substanzen oder die gleiche Menge Wasser. Sowohl für die Behandlung als auch für die Kontrolle (Wasser) wurden 2 - 6 verschiedenen Küvetten mit je einem Blattstück verwendet (siehe Abbildung 2-4). Anschließend wurden die Küvetten behandelt wie bei der GC-MS Methode (s. Abschnitt 2.3.1). Dazu wurden die Küvetten mit Teflonstopfen gasdicht verschlossen. Zur Bestimmung der Isoprenmenge wurde die jeweilige Küvette in ein UV-Spektrometer gestellt. Das Blatt in der Küvette stand dabei parallel zum Strahlengang, so dass der Messstrahl ungestört vom Blatt durch die freien Küvettenwände dringen konnte. Anschließend wurden UV-Absorptionsspektren im Bereich 200-250 nm aufgenommen (siehe Abbildung 2-5), die eine Identifizierung und Quantifizierung des

gasförmigen Isoprens in der Küvettenluft ermöglichten. Um den störenden Einfluss lichtstreuender Wassertröpfchen an den Küvettenwänden und die unterschiedlichen Eigenabsorptionen der Küvetten zu eliminieren, wurden die Küvetten jeweils ein zweites Mal gemessen, nachdem der Stopfen entfernt und das Isopren nach einigen Minuten entwichen war. Das eigentliche Isoprenspektrum wurde dann durch Differenzbildung erhalten. UV-Spektren synthetischer Isoprenstandards sahen identisch aus.

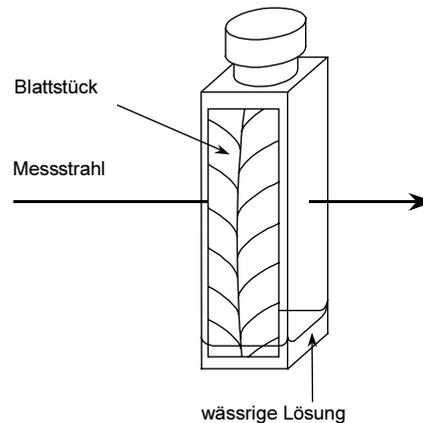


Abbildung 2-4 UV-Methode zur Quantifizierung von gasförmigem Isopren, das von einem Blattstück innerhalb einer Quarzküvette während Belichtung und Erwärmung emittiert wurde. Der Messstrahl im Photometer passiert die Küvette ungestört vom Blatt im rechten Winkel zur Richtung der Belichtung.

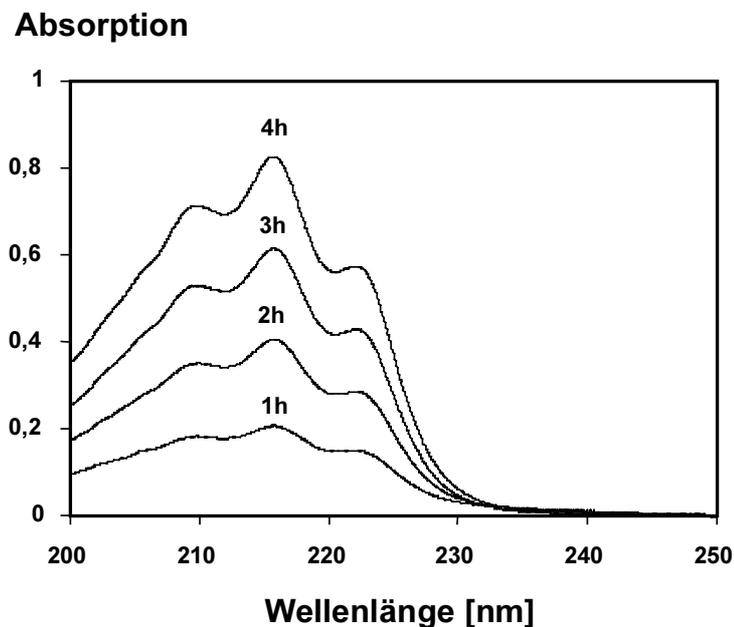


Abbildung 2-5 Akkumulation von Isopren, das während einer vierstündigen Belichtung von einem Platanenblattstück innerhalb einer Quarzküvette emittiert wurde, gemessen durch UV-Absorption des gasförmigen Isoprens.

2.5 Markierungs- und Hemmexperimente mit 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO)

2.5.1 Markierung von MBO mit [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose und D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton

Die nordamerikanische Kiefernart *Pinus ponderosa* emittiert das Hemiterpen 2-Methyl-3-buten-2-ol anstelle von Isopren. Ein Bündel von drei zusammenhängenden Nadeln von *Pinus ponderosa* wurde mit einer Rasierklinge vom Zweig abgeschnitten. Die Nadeln wurden sofort in ein NMR-Röhrchen (19mm x 5mm) überführt, das 100 µl Wasser enthielt, und mit einem Silikonseptum verschlossen. Um die Messbarkeit des von den Nadeln emittierten 2-Methyl-3-buten-2-ol mittels GC-MS zu testen, wurde anschließend das Röhrchen mit den Nadeln wie unter 2.3.1, S. 38 beschrieben mit einem Diaprojektor belichtet und mittels SPME/GC-MS beprobt. Dieselben Nadeln wurden dann mit einer Lösung von 4 mg [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose in 200 µl Wasser versetzt und im offenen Röhrchen im Pflanzenanzuchtsraum inkubiert. Nach 3, 12 und 14 Tagen wurden entsprechende SPME/GC-MS-Messungen unter folgenden Bedingungen wiederholt: Belichtung mit Silikonseptum für 4-7-h bei 35 °C, SPME-Faser: 65 µm PDMS/DVB (siehe 2.3.1, S. 38), Expositionszeit 20 min. - 1 h, Desorption 1 min. bei 260 °C, Temperaturprogramm: 30 °C 5 min., 20 ° / min. auf 250 °C, 10 min. Für eine maximale Empfindlichkeit wurde der Splitfluss so gering gehalten, wie ohne Abfall des Säulenvordrucks möglich.

Ein entsprechendes Experiment wurde mit drei weiteren Nadeln in einer Lösung von 3 mg [2-¹³C]-Mevalonsäurelacton in 300 µl Wasser durchgeführt. Nach 12 Tagen wurde wie oben durch SPME/GC-MS der Einbaugrad bestimmt.

Die Identität des MBO wurde durch Vergleich des Massenspektrums mit der im Softwarepaket Chemstation von Hewlett-Packard installierten Spektrenbibliothek nbs49k bestätigt. Zusätzlich wurde authentisches 2-Methyl-3-buten-2-ol wie oben per Headspace-SPME/GC-MS gemessen. Retentionszeit und Massenspektrum stimmten mit denen des aus den Nadeln emittierten MBO überein.

2.5.2 Abschätzung des Markierungsgrades von MBO aus dem Massenspektrum

Das Massenspektrum von 2-Methyl-3-buten-2-ol enthält im wesentlichen Peaks der Massen 71, 43 und 59, wobei die Intensität in dieser Reihenfolge fällt (Abbildung 2-6). Das Molekülion der Masse 86 ist nicht sichtbar. Die Fragmentation 71 (C₄H₇O⁺) entsteht hauptsächlich durch Abspaltung einer der Methylgruppen. Die Fragmentation 59 (C₃H₇O⁺) wird durch Abspaltung der Vinylgruppe gebildet. Der Peak der Masse 43 kommt durch zwei ununterscheidbare Fragmente (C₃H₇⁺ bzw. C₂H₃O⁺) zustande, die aus Fragment 71 durch Abspaltung von CO bzw. Ethylen entstehen (Abbildung 2-7, ZWINSELMAN und NIBBERING, 1981).

Die drei Fragmentationen 71, 59 und 43 sind nicht nennenswert von Nebenpeaks umgeben, die sich um eine Masseneinheit unterscheiden. Alle C-Atome von MBO sind in ihnen repräsentiert. Daher eignen sie sich, um den Einbau einer einfach ²H- oder ¹³C-markierten Verbindung nachzuweisen. Beim Einbau von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose ist mit einer monodeutierten Methylgruppe im MBO zu rechnen (siehe 1.4.2). Diese sollte bei 100% Markierung die Fragmentation 59 vollständig nach m/z 60 verschieben, da es beide Methylgruppen enthält. Die Fragmente 71 und 43 sollten (bei Vernachlässigung von Isotopeneffekten) von Peaks gleicher Intensität bei m/z 72 bzw. 44 begleitet sein, da jeweils

entweder die markierte oder die unmarkierte Methylgruppe verloren geht. Für einen Einbau von $[2-^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton über den Acetat-Mevalonat-Weg gelten analoge Überlegungen, da die Markierung in einer der Methylgruppen zu finden sein müsste. Der Markierungsgrad ergibt sich also aus dem Intensitätsverhältnis $I_{60} / (I_{59} + I_{60})$ bzw. aus $2 I_{72} / (I_{71} + I_{72})$ und $2 I_{44} / (I_{43} + I_{44})$.

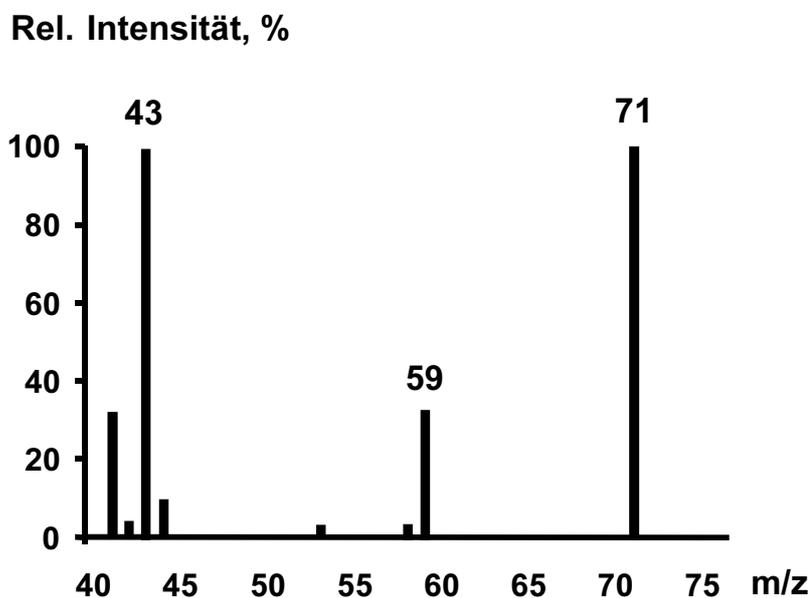


Abbildung 2-6 Massenspektrum von 2-Methyl-3-buten-2-ol. aus Nadeln der Ponderosa-Kiefer. Das Molekülion mit der Masse 86 ist nicht sichtbar.

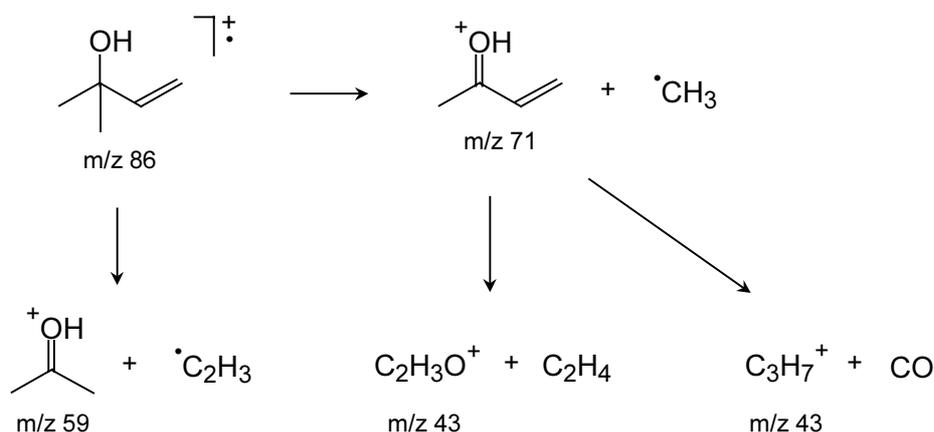


Abbildung 2-7 Fragmentierung von Methylbutenol im Massenspektrometer. m/z: Verhältnis von Masse zu Ladung

2.5.3 Hemmung der MBO-Emission mit Fosmidomycin

Je drei zusammenhängende Nadeln von *Pinus ponderosa* wurden wie oben beschrieben abgeschnitten und in 19mm lange Glasröhrchen mit 5 mm Innendurchmesser eingeführt. 6 Röhrchen enthielten je 300 μl Wasser und 6 weitere je 300 μl wässrige Fosmidomycin-

Lösung. Die Röhrchen wurden offen im Pflanzenanzuchtraum inkubiert. Nach einigen Tagen wurden die Röhrchen mit Silikonsepten verschlossen und wie in 2.5.1 (S. 44) für 3-4 h bei 30°C belichtet. Anschließend wurde in allen Röhrchen nacheinander mit SPME/GC-MS die MBO-Konzentration bestimmt. SPME-Faser: 65 µm PDMS/DVB, Expositionszeit der Faser: 5 min., Desorption 2 min. bei 260 °C, Temperaturprogramm: 80° C 2 min., mit 20° C pro min. auf 240° C, 2 min. halten. Es wurden drei Versuche dieser Art durchgeführt:

- 1) 5 µM Fosmidomycin, 11 Tage Inkubation
- 2) 50 µM Fosmidomycin, 8 Tage Inkubation
- 3) 500 µM Fosmidomycin, 12 Tage Inkubation

Zur Auswertung wurden die gaschromatographischen MBO-Peaks integriert. Die Integrale wurden wegen der unterschiedlichen Länge der Nadeln auf die jeweiligen Frischgewichte bezogen.

2.6 Experimente zur Markierung von Monoterpenen

2.6.1 Markierung des etherischen Öls aus Keimlingen von *Picea abies* L. mit [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose

Picea abies L. (Fichte) wurde im Licht-/Dunkelwechsel aseptisch in drei Erlenmeyerkolben auf feuchter Watte aus Samen angezogen wie unter 2.1, S. 33 beschrieben. Nach 8 Tagen waren alle Samen ausgekeimt. Eine Lösung von ca. 47 mg [1-²H₂]-1-Deoxy-D-xylulose in 3 ml Wasser (siehe 2.2, S. 34) wurde sterilfiltriert und auf die drei Kolben verteilt. Nach weiteren 17 Tagen waren die Keimlinge voll ergrünt und hatten Kotyledonen und Primärblätter entwickelt. Die Keimlinge (ca. 3,5 g Frischgewicht) wurden abgeschnitten und kurz mit Quarzsand und Wasser gemörsert. Der Brei wurde mit Wasser und Pentan (je 25 ml) in einen 100 ml Rundkolben überführt und 2h einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Die Pentanphase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, vorsichtig im Argonstrom bei Raumtemperatur eingengt und im GC/MS gemessen (70°C 2 min., 20°C/min. auf 280°C). Massenspektren und Retentionszeiten der Terpene wurden mit einem Referenzdestillat verglichen, das wie oben aus Keimlingen ohne d-DOX-Zusatz gewonnen wurde. Durch Vergleich der Massenspektren mit der im Softwarepaket Chemstation von Hewlett-Packard installierten Spektrenbibliothek nbs49k wurden die Monoterpene α-Pinen, β-Pinen, Camphen und Limonen identifiziert.

2.6.2 Markierung flüchtiger Monoterpene aus *Pistacia lentiscus* L. mit [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose

Ein Blatt von *Pistacia lentiscus* L. wurde in einem 4 ml Rundglas mit 5 mg [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose in 400 µl Wasser inkubiert. Zur Messung flüchtiger Terpene wurden einige Körnchen Aktivkohle (20/40, Supelco) in einem Becherglas aus Aluminiumfolie in das Glas eingebracht. Das Glas wurde dann verschlossen und 3h belichtet wie zur Isoprenbestimmung (siehe 2.3.1, S. 38). Die Aktivkohle wurde anschließend in einem Mikoreagenzglas mit 200 µl Methylenchlorid geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde abpipettiert, kurz im Argonstrom bei Raumtemperatur eingengt und ins GC/MS injiziert (70°C 2 min., 20°/min. auf 280°C). Massenspektren und Retentionszeiten der Terpene wurden mit einer Lösung verglichen, die wie oben aus Blättern ohne d-DOX-Zusatz gewonnen wurde. Dieses Verfahren wurde an 6 aufeinanderfolgenden Tagen mit demselben Blatt wiederholt. Durch Vergleich der

Massenspektren mit der Spektrenbibliothek nbs49k wurden die Monoterpene α -Pinen, β -Pinen, und Linalool identifiziert.

2.7 Weitere Hemmexperimente

2.7.1 Ergrünungsexperimente mit Gerste zum Wirkungsmechanismus von Clomazone

Um zu untersuchen, ob oxidierte Metaboliten an der Wirkung des Herbizids Clomazone beteiligt sind, wurden an Gerstenkeimlingen Ergrünungshemmtests mit Clomazone und dem Metaboliten 5-Ketoclomazone gemacht. Ferner wurde versucht, die Hemmung der Ergrünung durch Clomazone und 5-Ketoclomazone durch Zugabe von DOXP und des Cytochrom P₄₅₀-Hemmstoffs Aminobenzotriazol (ABT) aufzuheben (siehe Tabelle 2-1).

Etiolierte Primärblätter von 6-7 Tage alten Gerstenkeimlingen (siehe 2.1, S. 33) wurden im Dunkeln abgeschnitten und in wässrige Lösungen von Clomazone, 5-Ketoclomazone bzw. in Kombinationen davon DOXP, Aminobenzotriazol (ABT), Phosphatpuffer pH 7 oder wässrigem Kieselgeleextrakt (K, siehe 2.2.2, S. 36) gestellt. Die Aufnahme der Lösungen durch Transpirationsförderung erfolgte im Dunkeln über 5 h im Luftstrom eines Ventilators. Anschließend wurde 17 h lang belichtet. Aus den ergrüneten Sprossen wurden dann die Chlorophylle und Carotinoide durch Mörsern mit Sand unter Aceton extrahiert und spektrophotometrisch bestimmt (LICHTENTHALER, 1987). Etiolierte Keimlinge wurden genauso extrahiert und deren geringe Carotinoidgehalte mit Spuren von Chlorophyll von denen der ergrüneten Keimlinge abgezogen, um die Menge der neugebildeten Pigmente zu erhalten. Der Grad der Hemmung wurde jeweils berechnet nach $[1 - (\text{Pigmentgehalt}_{\text{Behandlung}}) / (\text{Pigmentgehalt}_{\text{Kontrolle}})] \times 100 \%$.

2.7.2 Hemmtests mit Algen und *E. coli*

E. coli und die einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus* und *Gloeotilopsis planctonica* wurden unter sterilen Bedingungen angezogen und mit Hemmstoffen versetzt. Die Stämme und Kulturbedingungen der Algen und *E. coli* wurden von Herrn Dr. Jörg Schwender übernommen (SCHWENDER, 1999). Wenn nicht anders angegeben wurden die Unterschiede im Wachstum durch Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspensionen bei 560 nm bestimmt (OD₅₆₀).

Test von 1-Fluor-1-Deoxy-D-xylulose an E. coli

Der *E. coli*-Stamm BHB2600 (erhalten von Herrn Dr. M. Goldtschmidt-Clermont, Universität Genf) mit dem Genotyp F⁻, SupE, SupF, met⁻, λ CH616 wurde in flüssigem LB-Medium über Nacht unter Schütteln bei 30 °C angezogen.

LB-Medium (Luria-Bertani): 1% Bacto-Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,0.

Die Kultur wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt und in 3 ml-Portionen auf 6 Reagenzgläser verteilt. Je zwei Reagenzgläser wurden mit 333 μ l Wasser, 10⁻⁴ oder 10⁻³ M Fluorodeoxyxylulose-Lösung versetzt (Endkonzentrationen 10⁻⁵ und 10⁻⁴ M) und unter Schütteln bei 30 °C weiterkultiviert. Nach 30 min., 1,5 h, 2,5 h, 3,67 h, 4,75 h, 5,83 h und 7,5 h wurde die optische Dichte der Zellsuspension bestimmt.

Tabelle 2-1 Versuchsreihen zur Wirkung des Herbizids Clomazone und dessen Metaboliten 5-Ketoclomazone auf die Ergrünung von etiolierter Gerste. Kontrolle = Wasser.

Versuch Nr.	Anzahl der Keimlinge je Behandlung	Zusammensetzung der Lösungen
1	25	Kontrolle Clomazone 10^{-4} M Clomazone 10^{-5} M Clomazone 10^{-6} M
2	25	Kontrolle Clomazone 10^{-4} M Clomazone 10^{-5} M Clomazone 10^{-6} M
3	21	Kontrolle Ketoclomazone 10^{-4} M Ketoclomazone 10^{-5} M
4	10	Kontrolle Ketoclomazone 10^{-5} M Ketoclomazone 10^{-5} M + DOXP 7 mM Clomazone 10^{-5} M Clomazone 10^{-5} M + DOXP 7 mM
5	25	Kontrolle Ketoclomazone 10^{-5} M Ketoclomazone 10^{-5} M + DOXP 11 mM Clomazone 10^{-5} M Clomazone 10^{-5} M + DOXP 11 mM Phosphat 22 mM
6	25	Kontrolle Ketoclomazone 10^{-5} M Ketoclomazone 10^{-5} M + DOXP 11 mM Clomazone 10^{-5} M Clomazone 10^{-5} M + DOXP 11 mM Clomazone 10^{-5} M + Phosphat 11 mM
7	13	Kontrolle Clomazone 10^{-5} M Clomazone 10^{-5} M + Kieselgeleextrakt (20 mg / 3,5 ml) Clomazone 10^{-5} M + ABT 0,5 mM ABT 0,5 mM
8	13	Kontrolle Clomazone 10^{-5} M Clomazone 10^{-5} M + Kieselgeleextrakt (20 mg / 3,5 ml) Clomazone 10^{-5} M + ABT 0,5 mM ABT 0,5 mM
9	25	Kontrolle Ketoclomazone 10^{-5} M Ketoclomazone 10^{-5} M + ABT 0,5 mM ABT 0,5 mM

Test von Clomazone und 5-Ketoclomazone an E. coli

E. coli BHB2600 wurde in LB-Medium (s.o.) unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₅₆₀ von 0,13 angezogen, auf OD₅₆₀ 0,04 mit LB-Medium verdünnt und in 3 ml-Portionen auf 9 Reagenzgläser verteilt. Je drei Reagenzgläser wurden mit 300 µl Wasser, 1 mM Clomazone-Lösung oder 1 mM 5-Ketoclomazone-Lösung versetzt (Endkonzentrationen 0,09 mM) und unter Schütteln bei 37 °C weiterinkubiert. Nach 30 min, 1 h, 2 h und 2,5 h wurde die optische Dichte bestimmt. Anschließend wurde über Nacht bei 30 °C unter Schütteln weiterinkubiert und die OD₅₆₀ nochmals nach 13,3 h bestimmt.

Test von Fosmidomycin und Cerivastatin an Chlamydomonas reinhardtii

Chlamydomonas reinhardtii (Stamm 83.81, Sammlung für Algenkulturen Göttingen) wurde in 50 ml Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben bei einer Belichtung von 100 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ in einem Schüttelinkubator bei 22 °C autotroph angezogen.

Medium A (SURZYCKI, 1971): TRIS/HCl 20 mM, pH 7,0, NH₄Cl 8 mM, K₂HPO₄ 0,54 mM, KH₂PO₄ 0,46 mM, MgSO₄ 1,5 mM, CaCl₂ 0,4 mM. Mikroelemente: FeSO₄/Titriplex III 36 µM, H₃BO₃ 8 µM, MnCl₂ 2,5 µM, ZnSO₄ 0,7 µM, CoSO₄ 0,4 µM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 16 nM.

Je 3 ml Medium in Reagenzgläsern wurden mit 60 µl einer dicht gewachsenen Vorkultur beimpft. Drei Ansätze dienten als Kontrolle, drei weitere enthielten 4 x 10⁻⁷ M Cerivastatin, zwei enthielten 6,5 x 10⁻⁵ M Fosmidomycin und drei 4 x 10⁻⁷ M Cerivastatin und 6,5 x 10⁻⁵ M Fosmidomycin. Die Algen wurden unter Schütteln bei 22 °C autotroph weiterkultiviert. Nach 2, 4, 5, 6, 8 und 12 Tagen wurde die OD₅₆₀ bestimmt.

Test von Clomazone und 5-Ketoclomazone an Chlamydomonas reinhardtii

Chlamydomonas reinhardtii wurde wie oben angezogen. Eine gerade erkennbar grüne Kultur mit jedoch noch unmessbarer OD₅₆₀ wurde in 1,8 ml-Portionen auf 20 Reagenzgläser verteilt. Sieben Reagenzgläser wurden mit 200 µl Wasser, sechs mit 200 µl 1 mM Clomazone-Lösung und sieben mit 200 µl 1 mM 5-Ketoclomazone-Lösung versetzt (Endkonzentrationen 0,1 mM) und unter Schütteln bei 22 °C weiterinkubiert. Nach 5 und 11 Tagen wurde die OD₅₆₀ der Zellsuspensionen bestimmt.

Test von Clomazone und 5-Ketoclomazone an Gloeotilopsis planctonica

Gloeotilopsis planctonica Lyengar et Philipose (Stamm 29.93, Sammlung für Algenkulturen Göttingen) wurde in 50 ml Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben bei einer Belichtung von 100 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ in einem Schüttelinkubator bei 22 °C autotroph angezogen.

Medium B (verändert nach BISHOP und SENGER, 1971): KNO₃ 8 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 3 mM, pH 6,8, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM. Mikroelemente wie bei *Chlamydomonas reinhardtii*.

Je 3 ml Medium in Reagenzgläsern wurden mit 50 µl einer dicht gewachsenen Vorkultur beimpft. Je drei Ansätze wurden mit 300 µl Wasser, 1 mM Clomazone-Lösung oder 1 mM 5-Ketoclomazone-Lösung versetzt (Endkonzentrationen 0,09 mM). Die Algen wurden unter Schütteln bei 22 °C autotroph weiterkultiviert. Da *Gloeotilopsis* beim Wachstum keine homogenen Zellsuspensionen bildet, sondern Zellfäden, wurde nach 4 Tagen abzentrifugiert,

kurz mit je 3 ml Methanol geschüttelt und zentrifugiert. Die bei 438 nm gemessenen Absorptionsmaxima der Extrakte wurden als Maß für die Algenmenge genommen.

Test von Clomazone und 5-Ketoclomazone an Scenedesmus obliquus

Scenedesmus obliquus Kützing (Stamm 276-3c, Sammlung für Algenkulturen Göttingen) wurde in 50 ml Medium B (siehe oben bei *Gloeotilopsis*) in 250 ml Erlenmeyerkolben bei einer Belichtung von $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einem Schüttelinkubator bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ autotroph angezogen. Eine gerade erkennbar grüne Kultur mit jedoch noch unmessbarer OD_{560} wurde in 1,8 ml-Portionen auf 9 Reagenzgläser verteilt. Drei Reagenzgläser wurden mit 200 μl Wasser, drei mit 1 mM Clomazone-Lösung und drei mit 1 mM 5-Ketoclomazone-Lösung versetzt (Endkonzentrationen 0,1 mM) und unter Schütteln bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ weiterinkubiert. Nach 3, 4, 5 und 10 Tagen wurde die OD_{560} der Zellsuspensionen bestimmt.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob DOXP die Hemmung des Wachstums von *Scenedesmus* durch Ketoclomazone kompensieren kann.

Kompensationsexperiment 1:

Je 3 Reagenzgläser mit 3 ml Medium wurden mit 200 μl einer dicht gewachsenen Vorkultur beimpft. Drei Reagenzgläser enthielten keine Zusätze, drei enthielten 0,6 mM DOXP, drei enthielten 0,1 mM Ketoclomazone und drei 0,16 mM DOXP und 0,1 mM Ketoclomazone. Die Algen wurden unter Schütteln bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ autotroph weiterkultiviert. Nach 2 und 7 Tagen wurde die OD_{560} bestimmt.

Kompensationsexperiment 2:

Je 3 Reagenzgläser mit 2,8 ml Medium wurden mit 200 μl einer dicht gewachsenen Vorkultur beimpft. Drei Reagenzgläser enthielten keine Zusätze, drei enthielten 0,01 mM Ketoclomazone und drei 4 mM DOXP und 0,01 mM Ketoclomazone. Die Algen wurden unter Schütteln bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ autotroph weiterkultiviert. Nach 7 Tagen wurde die OD_{560} bestimmt.

Weiteres Hemmexperiment mit 0,01 mM Ketoclomazone

Reagenzgläser mit 2,8 ml Medium wurden mit 200 μl einer dicht gewachsenen Vorkultur beimpft. Sieben Reagenzgläser enthielten keine Zusätze, sieben enthielten 0,01 mM Ketoclomazone. Die Algen wurden unter Schütteln bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ autotroph weiterkultiviert. Nach 7 Tagen wurde die OD_{560} bestimmt.

2.7.3 Anstau von 1-Deoxy-D-xylulose in Platanenblättern durch Fosmidomycin

Je 6 Blattstanzstücke von *Platanus x acerifolia* von $0,63 \text{ cm}^2$ Fläche wurden mit der Blattunterseite nach oben in 6 Petrischalen (= 6 Ansätze) mit je 10 ml der folgenden wässrigen Lösungen gegeben und über Nacht ohne Belichtung 16 h schwimmend inkubiert:

Schale 1 und 2:	DOX 6mM
Schale 3 und 4:	Wasser
Schale 4 und 5:	DOX 6 mM + Fosmidomycin 0,24 mM

Am zweiten Tag wurden die Lösungen in Schale 1 und 2 abpipettiert und nach zweimaligem Durchschwenken mit je 5 ml Wasser durch 10 ml der folgenden Lösungen ersetzt:

Schale 1:	Fosmidomycin 0,24 mM
Schale 2:	Wasser
Schale 3:	Auffüllen auf 10 ml mit Wasser, Zugabe von Fosmidomycin 0,24 mM
Schalen 4-6:	Auffüllen auf 10 ml mit Wasser

Die Petrischalen wurden dann auf einen langsam rotierenden Drehteller gestellt und 6 h lang mit einem Diaprojektor im Luftstrom eines Ventilators von oben beleuchtet. Die Temperatur wurde mit einem zusätzlichen Strahler auf 31°C erhöht. Währenddessen wurde mehrmals Wasser zugegeben, um den Verdunstungsverlust auszugleichen. Anschließend wurden die Schalen 16 h ohne Belichtung über Nacht inkubiert. Am dritten Tag wurden die Lösungen in Schale 5 und 6 abpipettiert und nach zweimaligem Durchschwenken mit je 5 ml Wasser durch 10 ml der folgenden Lösungen ersetzt:

Schale 5:	Fosmidomycin 0,24 mM
Schale 6:	Wasser
Schalen 1-4:	Auffüllen auf 10 ml mit Wasser

Die 6 Ansätze wurden anschließend 8h lang wie oben im Licht auf dem Drehteller inkubiert und 15 h über Nacht ohne Belichtung. Am vierten Tag wurde wiederum 10 h ohne weitere Zusätze zu den Petrischalen wie oben im Licht inkubiert.

Während des Versuchs wurde zu verschiedenen Zeiten aus jeder Schale 1 Blattstanzstück entnommen, kurz gewaschen und abgetupft und mit 100 µl 5% Trichloressigsäure 1 min. mit einem Dismembrator in einer auf Eis vorgekühlten Teflonkapsel mit Edelstahlkugel homogenisiert. Die Extrakte wurden 18 min. zentrifugiert (14.500 Upm, -1 °C) und die Überstände mit 500 µl Diethylether geschüttelt, um Lipide und Trichloressigsäure zu entfernen. Nach der Phasentrennung wurde das Gemisch bei -60 °C in einem Alkoholbad eingefroren, der Ether dekantiert und 1 µl der wässrigen Phase auf Kieselgel-Dünnschichtfolien mit 1-Propanol/Ethylacetat/Wasser (6:1:3, v/v/v) aufgetrennt. Die Flecken wurden durch Besprühen mit Methanol/Eisessig/Schwefelsäure/Anisaldehyd (85:10:5:0,5 v/v/v/v) und Erhitzen mit einer Heißluftpistole sichtbar gemacht. DOX und DOXP werden damit dunkelblau angefärbt.

2.7.4 *Raphanus*-Wurzeltest mit Cerivastatin

Um die Wirksamkeit des HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffs Cerivastatin bei Pflanzen zu bestätigen, wurde der Effekt auf das Wurzelwachstum von Radieschen (*Raphanus sativus* L. cv. Saxa Treib) untersucht, der von Bach zu einem Wurzeltest entwickelt worden war (BACH und LICHTENTHALER, 1983). Radieschensamen wurden 10 min. mit einem chlorhaltigen WC-Reiniger (Dan Klorix/Wasser 1:1, v/v) behandelt und gründlich dekantierend mit Leitungswasser gewaschen. Je 14 Samen wurden in Glaspetrischalen auf mit Wasser oder Lösungen von Cerivastatin (10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} M) getränktem Filterpapier gekeimt. Das Filterpapier war in 70% Ethanol gewaschen und bei 110°C getrocknet worden. Die Petrischalen wurden in mit Glasplatten abgedeckte Kunststoffwannen gestellt. Glasplatten und Kunststoffwannen wurden vor dem Versuch mit Dan Klorix gereinigt. Die

Kunststoffwannen wurde in den Pflanzenanzuchtsraum gestellt und die Samen keimten unter Licht-/Dunkelwechsel. Nach 17 Tagen wurden die Wurzellängen beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung von Methoden zur Messung der Isoprenemission bei Pflanzen

Als Modellsystem der plastidären IPP- und Isoprenoid-Biosynthese wurde aus folgenden Gründen die Isoprenemission von Pflanzenblättern gewählt:

- Isoprenemission ist taxonomisch in vielen verschiedenen Pflanzen und anderen Organismen (u. a. Bakterien) verbreitet und dadurch repräsentativ für die Isoprenoidbiosynthese.
- Isopren wird von Pflanzen schneller gebildet als andere Isoprenoide, dadurch werden die Analysezeiten mit Vorstufen und Hemmstoffen verkürzt.
- Aufgrund seiner Flüchtigkeit kann Isopren ohne auf verschiedene Pflanzen und Gewebe abgestimmte aufwendige Extraktions- und Reinigungsschritte auf einfachem Weg rein erhalten und gaschromatographisch untersucht werden.
- Isopren wird im Plastiden aus DMAPP gebildet, dass durch eine Isomerase aus IPP gebildet wird. Seine Biosynthese schließt sich somit sehr eng an die IPP-Bildung an. Bei Hemmexperimenten lassen sich deshalb die z.B. bei der Carotinoidbildung erforderlichen späteren Schritte der Isoprenoidbiosynthese (z.B. Prenyltransferasen oder Phytoensynthase) als mögliche Zielorte von vornherein ausschließen.
- Die Biosynthese von Isopren lässt sich sehr einfach durch Belichtung und Erwärmung von Blättern steuern.
- Die Aufklärung der Biosynthese von Isopren ist auch notwendig, um mechanistische Emissionsmodelle, die den Eintrag eines einflussreichen Spurengases in die Atmosphäre simulieren, aufstellen zu können.

3.1.1 GC/MS-Methoden zur Messung des Einbaus stabiler Isotope

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob das in den Chloroplasten gebildete Isopren verschiedener Pflanzen nach dem Acetat/Mevalonat-Weg oder dem DOXP/MEP-Weg gebildet wird. Dazu sollten Markierungsexperimente mit $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose (d-DOX), $[2-^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton (^{13}C -MVA) und einigen weiteren, z.T. selbst synthetisierten, möglichen Vorläufern durchgeführt werden. Der Einbaugrad der Deuterium- oder ^{13}C -markierten Vorstufen in Isopren sollte mittels GC/MS massenspektrometrisch ermittelt werden. Um das von Blättern gasförmig emittierte Isopren mit ausreichender Empfindlichkeit gaschromatographisch bestimmen zu können, war eine Anreicherung des Isoprens aus dem Luftraum notwendig. Da eine entsprechende Einrichtung wie z.B. ein gekühlter Probeneinlass am vorhandenen Gaschromatografen nicht gegeben war, wurde eine Methode entwickelt, mit der dies schnell und mit geringem apparativen Aufwand möglich ist und die in ZEIDLER *et al.* (1997) und ZEIDLER und LICHTENTHALER (1998) beschrieben wurde (siehe 2.3.1, *Tropfenmethode*, S. 38). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Abwandlung der Methode von MONSON und FALL (1989), eine statische Headspace-Methode im Mikromaßstab. Die Anreicherungstechnik ähnelt der noch komfortableren SPME-Methode der Firma Supelco, die zunächst nicht eingesetzt werden konnte, später jedoch ebenfalls verwendet wurde (siehe *SPME-Methode*, S. 39). Eine stärkere Anreicherung von Isopren kann mit dynamischen Headspace-Methoden erreicht werden, d.h. mit Durchleiten oder Umwälzen von Luft über Aktivkohle oder andere Adsorbentien in einer Apparatur, die die emittierende Pflanze enthält wie dies beim NMR-Versuch mit Isopren geschah (siehe 2.3.2., S. 42).

Um den technischen Aufwand gering zu halten, wurde jedoch auch eine statische Methode entwickelt. Dies schien für GC-Messungen erfolgversprechend, da Isopren in relativ großen Mengen gebildet wird und die Anreicherung deshalb nicht maximal sein muss. Nachdem Versuche mit Aktivkohle wenig befriedigende Ergebnisse lieferten (geringe Nachweisempfindlichkeit), wurden verschiedene Alkane als Lösungsmittel zur Anreicherung von Isopren in verschiedenen Versuchsanordnungen getestet. Um im GC gut von Isopren getrennt zu werden, musste ein schwerflüchtiges Lösungsmittel gefunden werden. Dieses durfte jedoch nicht so hochsiedend sein, dass es nicht mehr von der GC-Säule eluiert wird. Außerdem sollte das Lösungsmittel keine toxischen Effekte auf die Blätter haben. Eine geringe Flüchtigkeit war besonders entscheidend, nachdem die Methode soweit miniaturisiert worden war, dass nur noch ein Tropfen von 2 µl verwendet wurde. Decan und Amylbenzol erfüllten diese Anforderungen. Wesentlich war auch, Decan oder Amylbenzol regelmäßig durch Erwärmen im Vakuum von geringen Mengen flüchtiger Verunreinigungen zu befreien, die sich sonst im Gaschromatogramm mit Isopren überlagert hätten. Neben schon vorhandenen Verunreinigungen können sich flüchtige Kohlenwasserstoffe, z.B. Lösungsmittel aus der Laborluft, in Decan oder Amylbenzol anreichern, wenn diese längere Zeit im Labor stehen.

3.1.2 UV-Methode zur Quantifizierung von Isopren

Um die Isoprenemission als Testsystem für Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese zu nutzen, ist es notwendig, die von Blättern abgegebene Isoprenmenge quantitativ vergleichen zu können. Die unter 2.3.1 beschriebenen GC-MS Methoden erwiesen sich dazu jedoch nicht als so gut geeignet, da Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Extraktionszeiten sehr exakt konstant gehalten werden müssen, um reproduzierbare Werte zu erhalten. Außerdem ergaben sich bei Messungen von Parallelansätzen per GC recht lange Messzeiten, da Anreicherung und Injektion nur nacheinander durchgeführt werden können. Deshalb wurde eine einfache Methode entwickelt, die auf dem charakteristischen UV-Absorptionsspektrum von gasförmigem Isopren beruht (Abbildung 2-4) (siehe auch ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998). Konjugierte Diene wie Isopren absorbieren UV-Strahlung zwischen etwa 200 und 300 nm, Wellenlängen, die mit Quarzküvetten gut zugänglich sind. Das Absorptionsmaximum von gasförmigem Isopren liegt bei 216 nm. Bei Isoprenproduzierenden Pflanzen ist Isopren meist der dominierende Bestandteil der emittierten Substanzen. Andere in diesem Bereich absorbierende Substanzen kommen sehr selten vor. Auch hier muss nacheinander gemessen werden, jedoch dauert eine Messung im Spektrophotometer nur einige Sekunden. UV-Absorption als Detektionsprinzip für Isopren wurde beschrieben für die Kopplung eines Gaschromatographen mit einem UV-Detektor (JONES *et al.*, 1995). Die hier entwickelte Methode kombiniert den Vorteil der spezifischen Detektion durch UV-Absorption mit technischer Vereinfachung und Beschleunigung der Messung mehrerer Proben. Mit dieser Methode kann die Isoprenemission auch über Stunden verfolgt werden (siehe Abbildung 2-5).

3.2 Experimente zur Markierung von Isopren

Die Markierungsexperimente mit Isopren wurden zum Teil bereits veröffentlicht (ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997; ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998).

3.2.1 Markierung von Isopren mit [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose und D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton

Blätter verschiedener Pflanzen wurden mit Methyl-[1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulofuranosid (d-Me-DOX), [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose (d-DOX), [1-²H₁]-1-Deoxy-2,3-isopropyliden-β-D-xylulofuranose (d-Iso-DOX) und D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton (¹³C-MVA) in Rundgläsern inkubiert und der Einbaugrad wurde per GC/MS mit der Tropfenmethode (Decan) bestimmt (siehe 2.3, S. 38). Bei *Eucalyptus* wurde die SPME-Methode verwendet. Der Markierungsgrad von Isopren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem DOX-Angebot ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1 Einbau von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose und Derivaten sowie D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton in Isopren bestimmt per GC/MS. **a**: NMR-Experiment (siehe 2.3.2, S. 42). ^b 18h vor der MVA-Zugabe mit 0,1 mM Cerivastatin inkubiert, um endogene MVA Produktion zu unterdrücken.

Substanz	Angebote Menge	Inkubationszeit in h	Pflanze	Markierungsgrad in %
d-Me-DOX	a	72	<i>Populus nigra</i> L.	35
d-Me-DOX	5,5 mg in 150 µl	24	<i>Populus nigra</i> L.	40
d-Me-DOX	3,6 mg in 300 µl	20	<i>Populus nigra</i> L.	30
d-Me-DOX	4,0 mg in 200 µl	24	<i>Salix viminalis</i> L.	50
d-Me-DOX	6,0 mg in 200 µl	24	<i>Chelidonium majus</i> L.	60
d-DOX	8,0 mg in 850 µl	24	<i>Populus nigra</i> L.	40
d-DOX	2,0 mg in 500 µl	20	<i>Platanus x acerifolia</i>	80
d-DOX	2,0 mg in 500 µl	24	<i>Quercus robur</i> L.	40
d-DOX	2,0 mg in 500 µl	24	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	35
d-DOX	4,0 mg in 300 µl	20	<i>Eucalyptus globulus</i> L.	100
d-Iso-DOX	2,3 mg in 400 µl	18	<i>Populus nigra</i> L.	<10
¹³ C-MVA	3,3 mg in 300 µl	24	<i>Populus nigra</i> L.	20
¹³ C-MVA	2,5 mg in 500 µl	27	<i>Populus nigra</i> L.	<10
¹³ C-MVA	2 mg in 500 µl ^b	50	<i>Chelidonium majus</i> L.	10

Isopren der 7 Pflanzen *Populus nigra* L., *Salix viminalis* L., *Chelidonium majus* L., *Platanus x acerifolia*, *Quercus robur* L., *Robinia pseudoacacia* L. und *Eucalyptus globulus* L. wurde in hohem Maß von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose bzw. dessen Methylglykosid (d-Me-DOX) markiert (siehe Abbildung 3-1; ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997; ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998). d-DOX wurde allerdings nicht in die von *Eucalyptus globulus* L. emittierten Monoterpene eingebaut. Durch Vergleich der Massenspektren im Gaschromatogramm mit einer Spektrenbibliothek (siehe 2.6.1, S. 46) war außer Isopren hauptsächlich Cineol als flüchtige Komponente identifiziert worden. D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton wurde deutlich schlechter in Isopren eingebaut (siehe auch 4.1.2, S. 81). Mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren kann die endogene Mevalonatbildung blockiert werden und somit eventuell ein verstärkter Einbau exogener Mevalonsäure erreicht werden. Der Zusatz des hochwirksamen HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Cerivastatin führte bei

Chelidonium jedoch zu keinem markanten Einbau exogener MVA. Die zuvor beschriebenen Markierungsstudien zeigen somit, dass die Biosynthese von Isopren vorwiegend über den DOXP/MEP-Weg und nicht über den Acetat/Mevalonat-Weg der IPP-Bildung verläuft.

Der Einfluss von Cerivastatin und Fosmidomycin auf die Markierung von Isopren durch [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose (d-DOX) und D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton (¹³C-MVA) wurde noch einmal systematisch in allen Kombinationen an einem Platanenblatt per SPME-GC/MS (siehe 2.3.1, S. 39) untersucht (Fosmidomycin hemmt die Isoprenemission, wie unter 3.3.1, S. 60 beschrieben wird). Bei diesem Versuch wurde nicht versucht, die Isoprenmenge exakt zu quantifizieren, da dies mit der SPME-Methode schwieriger ist als mit der UV-Methode (siehe 3.1.2, S. 54). Hier sollte untersucht werden, welchen Einfluss spezifische Inhibitoren der beiden IPP-Biosynthesewege auf den Markierungsgrad von Isopren aus d-DOX und ¹³C-MVA haben. Jeweils zwei Stücke (1 x 3,5 cm) aus demselben Blatt wurden getrennt in 4 ml Rundgläschen mit je 850 µl der in Tabelle 3-2 angegebenen Lösungen behandelt. Nach 21 h Vorinkubation wurden mit jeweils 150 µl DOX und MVA-Lösungen die in Tabelle 3-2 angegebenen Endkonzentrationen eingestellt:

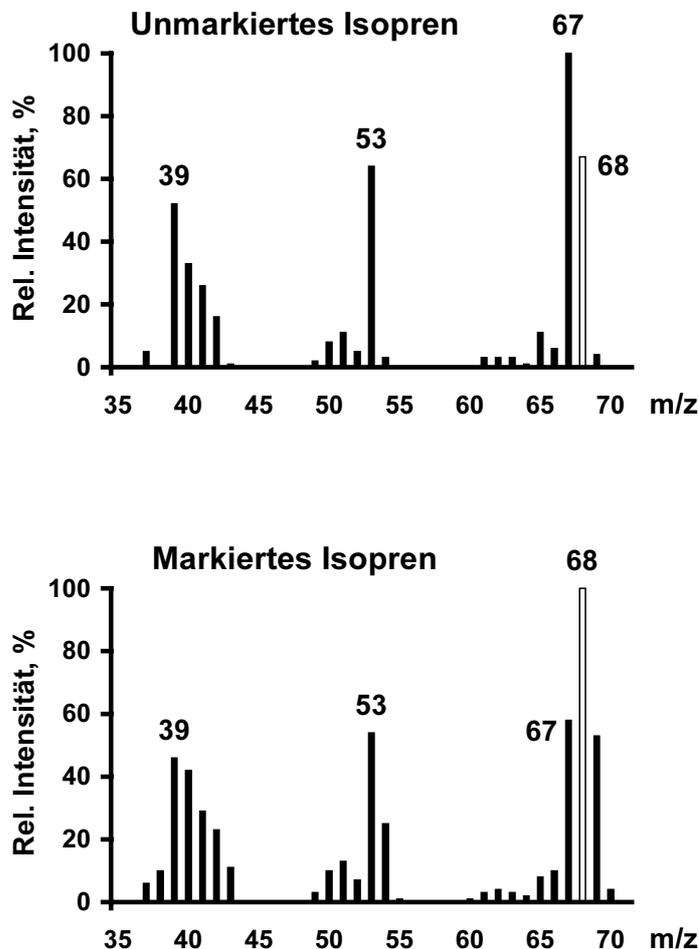


Abbildung 3-1 Massenspektren von unmarkiertem Isopren und Deuterium-markiertem Isopren, das von einem Blatt von *Chelidonium majus* nach Verabreichung des Methyl-Glykosids von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose (d-Me-DOX) emittiert wurde. Der Markierungsgrad beträgt etwa 60% (siehe Tabelle 3-1).

Tabelle 3-2 Einbau von d-DOX und ^{13}C -MVA in Isopren aus Platane unter Zusatz von Fosmidomycin oder Cerivastatin bestimmt per SPME-GC/MS. Reihenfolge der Zugabe der Lösungen.

Name	Behandlung 0h	Nach 21h Zusatz von
D	Wasser	DOX 2 mg/ml
D + F	Fosmidomycin 10^{-4} M	DOX 2 mg/ml
D + C	Cerivastatin 10^{-4} M	DOX 2 mg/ml
M	Wasser	MVA 3 mg/ml
M + F	Fosmidomycin 10^{-4} M	MVA 3 mg/ml
M + C	Cerivastatin 10^{-4} M	MVA 3 mg/ml

Nach weiteren 24 und 23 h (Gesamtinkubationszeit 68h) wurde jeweils der Markierungsgrad des emittierten Isoprens per SPME-GC/MS bestimmt (siehe Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 Einbau von d-DOX und ^{13}C -MVA in Isopren aus Platane unter Zusatz von Fosmidomycin oder Cerivastatin bestimmt per SPME-GC/MS. Ergebnisse der Versuche aus Tabelle 3-2. * = kein Isopren nachweisbar.

Name	Markierung nach 45 h in %	Markierung nach 68 h in %
D	55	60
D + F	65	60
D + C	50	65
M	0	0
M + F	*	*
M + C	0	0

Tabelle 3-3 zeigt, dass DOX gut in Isopren aus Platane eingebaut wurde, während MVA zu keiner signifikanten Markierung führte. Fosmidomycin und Cerivastatin hatten keinen erkennbaren Einfluss auf die Markierungsgrade. Allerdings hatte Fosmidomycin einen Einfluss auf die gebildete Isoprenmenge (siehe 3.3.1, S. 60): Bei der Kombination von Fosmidomycin mit MVA war kein Isopren messbar, so dass kein Markierungsgrad bestimmt werden konnte, bei der Kombination Fosmidomycin mit DOX wurde eine geringe, aber noch messbare Menge Isopren gebildet. Soweit sich dies mit der SPME-Methode abschätzen ließ (siehe 3.1.2, S. 54), hatte Cerivastatin keinen Einfluss auf die Isoprenmenge. Die DOX-Ansätze produzierten dagegen eher mehr Isopren als die MVA-Ansätze.

Dass Cerivastatin überhaupt bei Pflanzen wirksam ist, wurde mithilfe eines *Raphanus*-Wurzelwachstumstests überprüft (BACH und LICHTENTHALER, 1983; siehe 2.7.4, S. 51; 3.6.4, S. 78). Das Wurzelwachstum von Radieschenkeimlingen wird von Statinen wie Lovastatin (= Mevinolin) sehr effizient gehemmt.

3.2.2 Markierungsexperimente mit anderen möglichen IPP-Vorläufern

Folgende weitere Substanzen wurden mit der Tropfenmethode (Decan) auf einen Einbau in Isopren bei *Populus nigra* L. und *Chelidonium majus* L. getestet (siehe Abbildung 3-2 und Tabelle 3-4):

D,L-[1,1-²H₂]-2-C-Methyl-D,L-erythritol (ME)

(R)-[1,1,4,4-²H₄]-2-C-Methylbutan-1,2,4-triol (TRIOIOL)

Na [3-¹³C]-Pyruvat

Na [2-¹³C]-Acetat

NaH¹³CO₃

[1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylitol/-lyxitol (XYLIT)

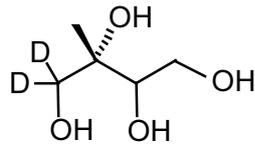
[1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ol (DMA)

[1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat (DMAPP)

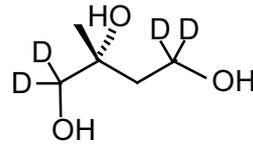
Tabelle 3-4 Einbau verschiedener, markierter Verbindungen in Isopren von Pflanzenblättern, der per GC/MS mit der Tropfenmethode bestimmt wurde.

Substanz	Angebotene Menge	Inkubationszeit in h	Pflanze	Markierungsgrad in %
ME	3,5 mg in 400 µl	25	<i>Populus nigra</i> L.	0
ME	6,5 mg in 500 µl	24	<i>Populus nigra</i> L.	0
TRIOIOL	5,7 mg in 400 µl	17	<i>Populus nigra</i> L.	0
Pyruvat	1,0 mg in 1000 µl	27	<i>Populus nigra</i> L.	10
Acetat	5,0 mg in 200 µl	36	<i>Populus nigra</i> L.	10
NaH ¹³ CO ₃ + KH ₂ PO ₄	2,0 mg in 400 µl 1,0 mg	30 min.	<i>Populus nigra</i> L.	Basispeak 70, M+5 (73) deutlich
XYLIT	8,0 mg in 500 µl	40	<i>Chelidonium majus</i> L.	0
DMA	7,5 mg in 1000 µl	48	<i>Chelidonium majus</i> L.	0
DMAPP	400 µl, 11mM	21	<i>Chelidonium majus</i> L.	0

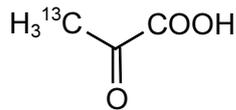
Methylerythritol, das Triol, reduzierte 1-Deoxy-D-xylulose, DMAPP und der entsprechende Alkohol wurden nicht in Isopren eingebaut. Pyruvat und Acetat zeigten einen leichten Einbau. Pyruvat in größeren Mengen führte zu einer Braunfärbung des Blatts und einer geringeren Isoprenemission. ¹³C-Hydrogencarbonat führte schnell zum Auftreten vollständig markierter Isoprenmoleküle (Masse 73).



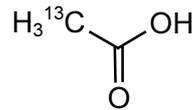
[1,1-²H₂]-2-C-Methyl-D,L-erythritol



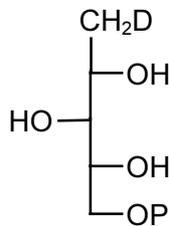
(R)-[1,1,4,4-²H₄]-2-C-Methylbutan-1,2,4-triol



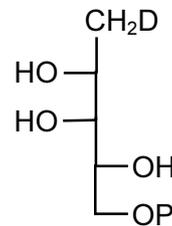
[3-¹³C]-Pyruvat



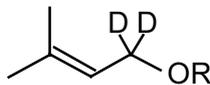
[2-¹³C]-Acetat



[1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylitol



[1-²H₁]-1-Deoxy-d-lyxitol



R = H: [1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ol

R = OPP: [1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat

Abbildung 3-2 Mit stabilen Isotopen markierte Substanzen, die als potentielle Vorstufen von Isopren untersucht wurden.

3.3 Experimente zur Hemmung der Isoprenemission

Der Einfluss verschiedener weiterer Substanzen auf die Isoprenemission wurde mit der UV-Methode (siehe 2.4, S. 42; ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998) anhand der Gasphasen-Absorption bei 216 nm bestimmt, sowohl um die Markierungsexperimente zu ergänzen, als auch um neue Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges zu finden. Um den Einfluss unterschiedlicher Kapazitäten der Isoprenbildung verschiedener Blätter zu eliminieren, wurde für jedes behandelte Blattstück zur Kontrolle (Wasser) ein Stück aus dem selben, möglichst gleichmässig belichteten Blatt verwendet. Bei *Platanus x acerifolia* L. konnten für einen Versuch alle Stücke aus einem Blatt geschnitten werden. Die Variation der Isoprenemission innerhalb eines Blattes wurde mit 12 Stücken aus einem Platanenblatt bestimmt. Es ergab sich eine Standardabweichung von 14 % (Bereich der Absorptionswerte 0,27 - 0,41 nach 1h Belichtung bei 30 °C).

3.3.1 Hemmung durch Fosmidomycin, FR-900098 und Statine

Statine wie Mevinolin hemmen die HMG-CoA-Reduktase des klassischen Mevalonat-Wegs. Analog dazu hemmen das Antibiotikum Fosmidomycin und das Derivat FR-900098 (Abbildung 3-3) den DOXP/MEP-Weg auf der Stufe der DOXP-Reduktoisomerase, wie sich im Lauf dieser Arbeit herausstellte. Am Anfang der Arbeiten zu Fosmidomycin bei Botanik II standen jedoch Hemmversuche mit Isopren. Die Überlegungen, die zur Untersuchung von Fosmidomycin als möglichem Hemmstoff der IPP-Bildung führten, bevor sein Wirkungsmechanismus bekannt war, sind in der Diskussion (siehe 4.2.2, S. 86) beschrieben.

Tabelle 3-5 zeigt, das Fosmidomycin und das Homologe FR-900098 in Konzentrationen der Größenordnung 5 μM zu einer deutlichen Hemmung der Isoprenemission führen (ZEIDLER *et al.*, 1998). Compactin, Mevinolin (=Lovastatin) und Cerivastatin hemmten die Isoprenemission nicht. Cerivastatin in sehr hoher Konzentration (1 mM) führte bei Platane zwar zu einer Hemmung, jedoch zu keiner totalen, obwohl die Blätter am Rand bereits braun verfärbt waren und somit offenbar unspezifische oder indirekte Effekte auf die Isoprenbildung auftraten (siehe 3.2.1, S. 55).

Tabelle 3-5 Hemmung der Isoprenemission durch Fosmidomycinderivate und Statine, die durch UV-Absorption erfasst wurde. N: Anzahl der jeweils für Behandlung und Kontrolle (Wasser) verwendeten Blattstücke. Die Werte der Hemmung in % wurden berechnet nach $[1 - (A_{\text{gehemmt}}/A_{\text{Kontrolle}})] \times 100\%$. A = Absorption bei 216 nm. ^a Hier wurde als Kontrolle 2,2 mM Fosfomycin⁹ verwendet. ^{b,c} Parallel mit Stücken desselben Blatts durchgeführte Versuche.

Substanz	Konzentration in mol l ⁻¹	Inkubations- zeit in h	Spezies	Hemmung in %	N
Fosmidomycin	5 x 10 ⁻⁴ ^a	20	<i>Populus nigra</i> L.	93	2
Fosmidomycin	5 x 10 ⁻⁷	14	<i>Chelidonium majus</i> L.	60	1
Fosmidomycin	5 x 10 ⁻⁶	51	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	79	2
Fosmidomycin	3,2 x 10 ⁻⁶ ^b	39	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	84	2
Fosmidomycin	1,6 x 10 ⁻⁶ ^b	39	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	55	2
FR-900098	10 ⁻⁵ ^c	21	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	77	3
FR-900098	10 ⁻⁶ ^c	21	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	55	3
FR-900098	10 ⁻⁷ ^c	21	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	22	3
FR-900098	5 x 10 ⁻⁶	20	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	53	6
Mevinolin	10 ⁻⁴	23	<i>Populus nigra</i> L.	4	1
Compactin	7,5 x 10 ⁻⁵	19	<i>Populus alba x tremula</i>	3	1
Cerivastatin	10 ⁻⁴	76	<i>Populus alba x tremula</i>	5	1
Cerivastatin	10 ⁻³	19	<i>Platanus x acerifolia</i> L.	72	6

⁹ Fosfomycin (*cis*-1,2-Epoxypropylphosphonsäure) ist wie Fosmidomycin ein Phosphonat-Antibiotikum, das die bakterielle Zellwandbiosynthese hemmt. Im Gegensatz zu Fosmidomycin ist sein Wirkort lange bekannt: Es hemmt eine Pyruvyltransferase, einen frühen Schritt der Zellwandbiosynthese (GREENWOOD *et al.*, 1987). Fosfomycin wurde hier als Kontrollsubstanz verwendet, die die IPP-Biosynthese nicht hemmen sollte.

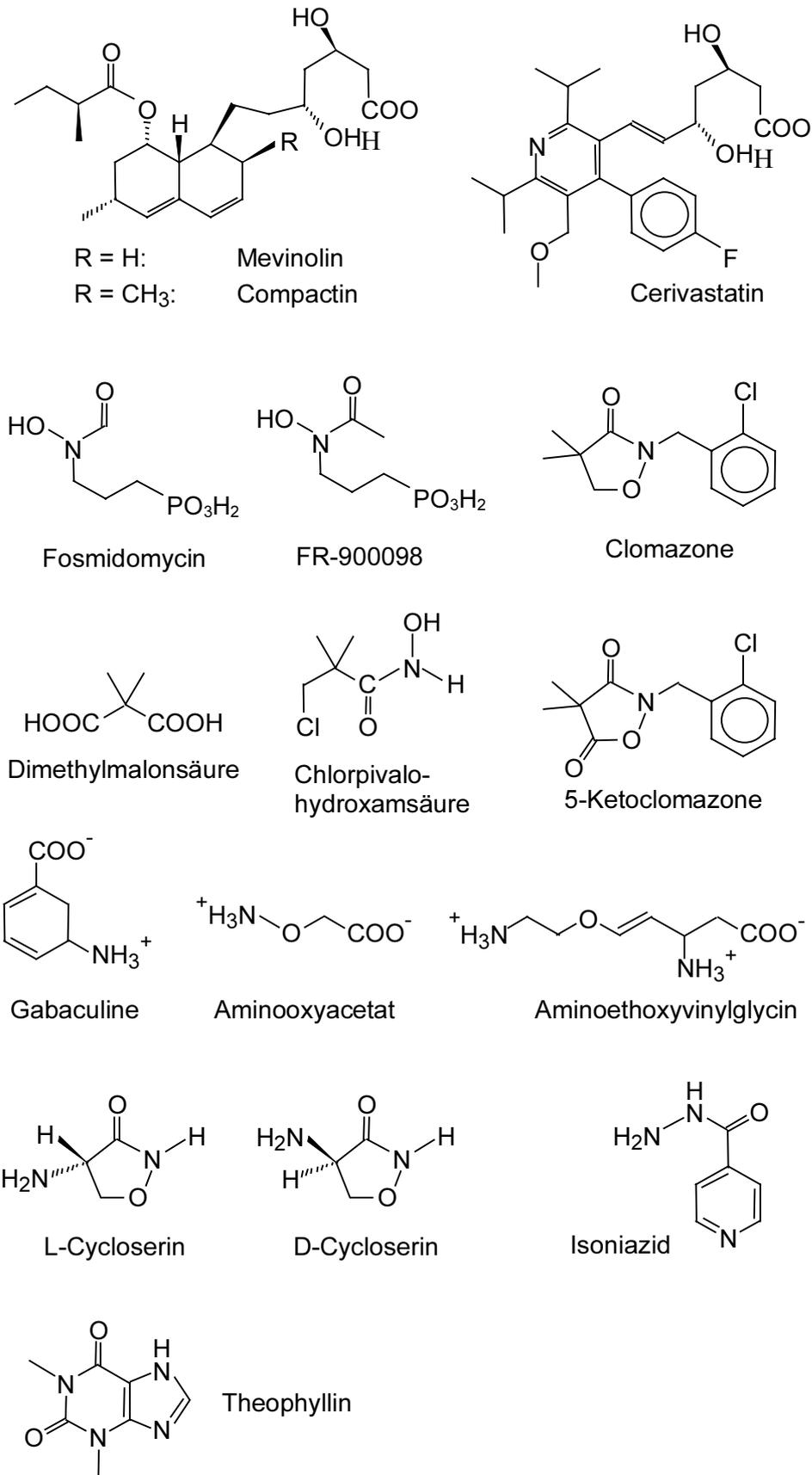


Abbildung 3-3 Strukturformeln verschiedener Substanzen, deren Einfluss auf die Isoprenemission und andere Isoprenoidbiosynthesen in dieser Arbeit untersucht wurde.

Es wurde versucht, die Hemmung der Isoprenemission durch Fosmidomycin durch Zusatz von DOX, MVA und DMAPP aufzuheben. Wie aus Tabelle 3-6 ersichtlich, nahm die Hemmung der Isoprenemission von Platane durch Fosmidomycin mit der Zeit zu und konnte durch hohe Konzentrationen an DOX, nicht jedoch mit MVA und DMAPP aufgehoben werden.

Tabelle 3-6 Hemmung der Isoprenemission von *Platanus x acerifolia* L. durch 5 μ M Fosmidomycin gegenüber Wasser in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Zusatz von DOX, MVA oder DMAPP. Gemessen durch UV-Absorption, Hemmwerte berechnet wie in Tabelle 3-5. Es wurden für alle Behandlungen je zwei Stücke aus demselben Blatt verwendet. Negative Hemmwerte zeigen eine höhere prozentuale Emission als in der Kontrolle an.

Zusatz	Hemmung in % nach einer Inkubationszeit von				
	1h	4h	20h	25h	51h
Fosmidomycin (F)	15	22	25	50	79
F + DOX 32 mM	-112	-91	-65	-25	-15
F + MVA 33 mM	5	22	50	41	100
F + DMAPP 11 mM	4	30	63	56	74

Weiterhin wurden 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO), Fosmidomycin oder beide Substanzen gleichzeitig an Platanen-Blattstücke verabreicht und der Effekt auf die Isoprenemission untersucht. MBO könnte im Gleichgewicht mit dem intermediären Carbokation bei der Isoprensynthesereaktion stehen und somit eventuell als alternatives Substrat für die Isoprenbildung dienen (siehe 1.7, S. 30) und die Hemmung durch Fosmidomycin vermindern. 1 mM MBO allein hatte einen leicht stimulierenden Effekt auf die Isoprenbildung und führte zu einer etwas schwächeren Hemmung der Isoprenemission bei Platane durch Fosmidomycin.

Tabelle 3-7 Einfluss von 5 μ M Fosmidomycin, 1 mM 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO) und der Kombination auf die Isoprenemission von *Platanus x acerifolia* L. Gemessen durch UV-Absorption, Hemmwerte berechnet wie in Tabelle 3-5. Es wurden für alle Behandlungen je drei Blattstücke verwendet (n = 3). ^{a, b, c} Parallel mit Stücken desselben Blatts durchgeführte Versuche. Negative Hemmwerte zeigen eine höhere Emission als in der Kontrolle an.

Substanzen	Inkubationszeit in h	Hemmung in %
Fosmidomycin	24 ^a	52
MBO	24 ^a	-10
Fosmidomycin + MBO	24 ^a	19
Fosmidomycin	27 ^b	42
MBO	27 ^b	-21
Fosmidomycin + MBO	27 ^b	53
Fosmidomycin	24 ^c	37
MBO	24 ^c	10
Fosmidomycin + MBO	24 ^c	17
Mittelwerte der drei Versuche:		
Fosmidomycin		44
MBO		-7
Fosmidomycin + MBO		30

3.3.2 Hemmung durch Clomazone und Derivate

Von dem selektiven Herbizid Clomazone war bekannt, dass es die Chlorophyll- und Carotinoidakkumulation bestimmter Pflanzen hemmt. Der genaue Wirkmechanismus war jedoch unbekannt. Um einen möglichen Einfluss auf den DOXP/MEP-Weg der IPP-Bildung zu untersuchen, wurden die Effekte von Clomazone, seines Umwandlungsproduktes 5-Ketoclomazone und verwandten Substanzen (siehe Abbildung 3-3) auf die Isoprenemission verschiedener Pflanzen untersucht (Tabelle 3-8; siehe auch 3.6.1, S. 70). Ausführliche Überlegungen zur Wirkungsweise von Clomazone finden sich in der Diskussion (siehe 4.2.3, S. 91). Effekte von Clomazone und 5-Ketoclomazone auf die Isoprenemission waren erst bei Konzentrationen ab 1 mM sichtbar. 5-Ketoclomazone wirkte tendenziell stärker hemmend als Clomazone, welches z. T. sogar stimulierend wirkte, insbesondere bei *Chelidonium*, welches offenbar keine Clomazone-sensitive Pflanze ist. Bei *Robinia pseudoacacia* wirkte 1 mM Clomazone allerdings deutlich hemmend. Die mit Clomazone verwandten Substanzen Chlorpivalohydroxamsäure und Dimethylmalonsäure hatten keinen ausgeprägten Effekt auf die Isoprenemission von Platane (siehe 4.2.3, S. 91).

Tabelle 3-8 Die Hemmung der Isoprenemission durch Clomazone, 5-Ketoclomazone und verwandte Substanzen wurde durch UV-Absorption gemessen. N: Anzahl der jeweils für Behandlung und Kontrolle (Wasser) verwendeten Blattstücke. Die Werte der Hemmung in % wurden berechnet wie für Tabelle 3-5. Negative Werte zeigen eine höhere Emission als in der Kontrolle an. ^{a, b, c, d, e, f} Parallel mit Stücken desselben Blatts durchgeführte Versuche.

Substanz	Konzentration in mol l ⁻¹	Inkubationszeit in h	Spezies	Hemmung in %	N
Clomazone	10 ⁻⁴	21	1	-6	5
Clomazone	10 ⁻³ ^a	20	1	18	5
Ketoclomazone	10 ⁻³ ^a	20	1	62	4
Ketoclomazone	10 ⁻³ ^b	22	1	20	4
Ketoclomazone	10 ⁻⁴ ^b	22	1	-13	4
Ketoclomazone	1,4 x 10 ⁻³	25	1	44	6
Ketoclomazone	10 ⁻³	23	1	2	4
Ketoclomazone	10 ⁻³	21	2	64	6
Ketoclomazone	1,4 x 10 ⁻³	24	3	65	6
Ketoclomazone	10 ⁻³ ^c	24	3	56	4
Clomazone	10 ⁻³ ^c	24	3	-3	4
Ketoclomazone	10 ⁻³ ^d	24	4	19	4
Clomazone	10 ⁻³ ^d	24	4	-19	4
Ketoclomazone	10 ⁻³ ^e	14	5	37	4
Clomazone	10 ⁻³ ^e	14	5	-56	4
Ketoclomazone	10 ⁻³ ^f	22	6	57	4
Clomazone	10 ⁻³ ^f	22	6	59	4
Chlorpivalohydroxamsäure	10 ⁻³	19	1	3	6
Kalium-Dimethylmalonat	10 ⁻³	21	1	15	6

Spezies: 1 = *Platanus x acerifolia* L., 2 = *Eucalyptus globulus* L., 3 = *Quercus robur* L., 4 = *Populus nigra* L., 5 = *Chelidonium majus* L., 6 = *Robinia pseudoacacia* L.

3.3.3 Hemmung durch Vitamin B₆-Antagonisten

Verschiedene Substanzen, die direkt oder indirekt von Vitamin B₆ (Pyridoxalphosphat) abhängige Reaktionen hemmen, wurden an Platanen-Blattstücken hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die Isoprenemission untersucht (siehe Abbildung 3-3 und Tabelle 3-9). Da Aminoethoxyvinylglycin (AVG) auch zur (unspezifischen) Hemmung der Ethylenbiosynthese verwendet wird, werden hier auch die Versuche mit CoCl₂ und Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC) wiedergegeben. CoCl₂ ist ebenfalls ein unspezifischer Hemmstoff der Ethylenbiosynthese und ACC eine biosynthetische Vorstufe von Ethylen. Genauere Erläuterungen dazu finden sich unter 4.2.4, S. 97. Wie in Tabelle 3-9 erkennbar, sind die Substanzen AVG, AOA, CoCl₂, D- und L-Cycloserin sowie Gabaculine geeignet, die Isoprenemission von Platane zu hemmen. Da mehrere Vitamin B₆-abhängige Enzyme die Photorespiration steuern, könnte dies anzeigen, dass eine Hemmung der Photorespiration indirekt die Isoprenemission hemmt. Möglicherweise enthält aber auch der DOXP/MEP-Weg bisher unbekannte Vitamin B₆-abhängige Enzyme.

Tabelle 3-9 Hemmung der Isoprenemission von *Platanus x acerifolia* L. durch verschiedene Substanzen gemessen durch UV-Absorption. N: Anzahl der jeweils für Behandlung und Kontrolle (Wasser) verwendeten Blattstücke. Die Werte der Hemmung in % wurden berechnet wie für Tabelle 3-5. Negative Werte zeigen eine höhere Emission als in der Kontrolle an. ^{a, b, c, d, e, f, g} Parallel mit Stücken desselben Blatts durchgeführte Versuche.

Substanz	Konzentration in mol l ⁻¹	Inkubations- zeit in h	Hemmung in %	N
Aminoethoxyvinylglycin (AVG)	10 ⁻³	18	96	4
Aminoethoxyvinylglycin	10 ⁻⁵ ^a	14	37	4
CoCl ₂	10 ⁻³ ^a	14	78	4
Aminoxyacetat (AOA)	10 ⁻³	17	99	4
Aminoxyacetat	10 ⁻⁴ ^b	23	76	4
Aminoxyacetat	10 ⁻⁵ ^b	23	9	4
D-Cycloserin	10 ⁻³ ^c	23	74	3
L-Cycloserin	10 ⁻³ ^c	23	97	3
L-Cycloserin	1,25 x 10 ⁻⁴ ^d	21	58	3
L-Cycloserin	1,25 x 10 ⁻⁵ ^d	21	22	3
L-Cycloserin	1,25 x 10 ⁻⁶ ^d	21	17	3
Gabaculine	10 ⁻³ ^e	20	70	4
Gabaculine	10 ⁻⁴ ^e	20	11	4
Hydroxylamin HCl	10 ⁻³ ^f	17	21	4
Theophyllin	10 ⁻³ ^f	17	-1	4
Isoniazid	10 ⁻³ ^g	22	-9	4
Isoniazid	10 ⁻⁴ ^g	22	-6	4

Tabelle 3-10 zeigt Versuche, die Hemmung der Isoprenemission von Platanenblättern durch L-Cycloserin mit Pyridoxamin, Pyridoxin, DOX oder Pyruvat aufzuheben. Dies gelang ebensowenig wie der Versuch, die Hemmung durch Aminoethoxyvinylglycin mit Aminocyclopropan-carbonsäure aufzuheben:

Tabelle 3-10 Einfluss von 10^{-4} M L-Cycloserin in Kombination mit 1 mM Pyridoxamin, Pyridoxin HCL, DOX oder Na-Pyruvat sowie von 10^{-5} M Aminoethoxyvinylglycin (AVG) in Kombination mit 1 mM Aminocyclopropansäure (ACC) auf die Isoprenemission von *Platanus x acerifolia* L. Gemessen durch UV-Absorption, Hemmwerte berechnet wie in Tabelle 3-5. Es wurden für alle Behandlungen je drei Blattstücke verwendet. ^{a, b, c, d, e} Parallel mit Stücken desselben Blatts durchgeführte Versuche. ^d $1,7 \times 10^{-4}$ M L-Cycloserin. Negative Werte zeigen eine höhere Emission als in der Kontrolle an.

Substanzen	Inkubationszeit in h	Hemmung in %
L-Cycloserin	21 ^a	33
Pyridoxamin	21 ^a	-2
L-Cycloserin + Pyridoxamin	21 ^a	51
L-Cycloserin	20 ^b	54
Pyridoxin	20 ^b	4
L-Cycloserin + Pyridoxin	20 ^b	46
L-Cycloserin	23 ^c	40
DOX	23 ^c	-26
L-Cycloserin + DOX	23 ^c	35
L-Cycloserin	19 ^d	59
Pyruvat	19 ^d	-6
L-Cycloserin + Pyruvat	19 ^d	63
AVG	21 ^e	43
ACC	21 ^e	10
AVG + ACC	21 ^e	46

3.3.4 Hemmung durch weitere Substanzen

Verschiedene andere Substanzen (siehe Abbildungen 3-4 und 3-5) wurden hinsichtlich einer möglichen Hemmwirkung auf die Isoprenemission untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-11 aufgelistet. Erläuterungen zu den einzelnen Stoffen werden im Diskussionsteil gegeben (siehe 4.2.5, S. 101).

3.4 Markierungs- und Hemmexperimente mit 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO)

Die nordamerikanische Kiefernart *Pinus ponderosa* emittiert das Hemiterpen 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO) anstelle von Isopren. Die MBO-Emission von *Pinus ponderosa* und anderen nordamerikanischen Kiefern ist in ähnlicher Weise licht- und temperaturabhängig wie die Isoprenemission von Laubbäumen und trägt lokal erheblich zu den Kohlenwasserstoffemissionen in die Atmosphäre bei. Um neben Isopren für ein weiteres Hemiterpen zu untersuchen, ob es nach dem Acetat/Mevalonat-Weg oder dem DOXP/MEP-Weg gebildet wird, wurden Markierungsexperimente mit $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose (d-DOX) und $[2-^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton (^{13}C -MVA) an Nadeln von *P. ponderosa* durchgeführt. Das emittierte MBO wurde mittels SPME-GC/MS massenspektrometrisch auf einen Einbau getestet. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die MBO-Emission von *P. ponderosa*-Nadeln durch Fosmidomycin, den Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges hemmen lässt (siehe 2.5, S. 44).

Tabelle 3-11 Hemmung der Isoprenemission durch verschiedene Substanzen gemessen durch UV-Absorption. N: Anzahl der jeweils für Behandlung und Kontrolle (Wasser) verwendeten Blattstücke. Die Werte der Hemmung in % wurden berechnet wie für Tabelle 3-5. Negative Werte zeigen eine höhere Emission als in der Kontrolle an. ^{a, b, c, d, e, f, g, h} Parallel mit Stücken desselben Blatts durchgeführte Versuche. ^d Behandlung und Kontrolle in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5.
 Phosphonat 1 = D,L-2-Amino-3-phosphonopropionsäure
 Phosphonat 2 = 3-Aminopropylphosphonsäure
 Phosphonat 3 = 3-Phosphonopropionsäure
 Phosphonat 4 = D,L-2-Amino-4-phosphonobuttersäure

Substanz	Konzentration in mol l ⁻¹	Inkubations- zeit in h	Spezies	Hemmung in %	N
Phosphonothrixin	10 ⁻³	24	1	-13	5
Phosphonothrixin	10 ⁻³ ^a	24	1	27	3
Phosphonothrixin	10 ⁻⁴ ^a	24	1	13	3
Acetylmethylphosphinat	10 ⁻³ ^b	24	1	-12	3
Acetylmethylphosphinat	10 ⁻⁴ ^b	24	1	-61	3
Acetylmethylphosphinat	5 x 10 ⁻⁴	21	2	-30	1
Phosphonat 1	1 mg/ml ^c	21	1	43	2
Phosphonat 2	1 mg/ml ^c	21	1	50	2
Phosphonat 3	1 mg/ml ^c	21	1	64	2
Phosphonat 4	1 mg/ml ^c	21	1	29	2
Phosphonat 1	1 mg/ml ^d	21	1	17	2
Phosphonat 2	1 mg/ml ^d	21	1	41	2
Phosphonat 3	1 mg/ml ^d	21	1	36	2
Phosphonat 4	1 mg/ml ^d	21	1	22	2
Na-Salicylat	10 ⁻³	17	1	8	4
Dimethylallylmethylendisulfonamid	10 ⁻⁴ ^e	21	1	-28	4
Dimethylallylcarbamylsulfamid	10 ⁻⁴ ^e	21	1	-11	4
Dimethylallylmethylendisulfonamid	10 ⁻³ ^f	21	1	-59	4
Dimethylallylcarbamylsulfamid	10 ⁻³ ^f	21	1	-38	4
Chloramphenicol	10 ⁻³ ^g	19	1	71	3
Chloramphenicol	10 ⁻⁴ ^g	19	1	17	3
DCMU	10 ⁻⁴ ^g	19	1	100	3
Foroxymithine	10 ⁻⁴	44	1	9	5
3-Chlor-5-hydroxypentan-2-on	7,3 x 10 ⁻³	19	1	44	5
DMAEPP	3,6 x 10 ⁻³	24	3	-3	5
Metolachlor	10 ⁻³	18	1	-15	4
1-Fluor-1-Deoxy-D-xylulose	10 ⁻³	95	4	18	1
1-Fluor-1-Deoxy-D-xylulose	10 ⁻⁴ ^h	45	1	15	2
1-Fluor-1-Deoxy-D-xylulose	10 ⁻³ ^h	45	1	28	2

Spezies: 1 = *Platanus x acerifolia* L., 2 = *Chelidonium majus* L., 3 = *Populus nigra* L., 4 = *Populus alba x tremula*.

3.4.1 Markierung von MBO mit [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose und D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton

Je ein Bündel von drei zusammenhängenden Nadeln (Brachyplast) von *Pinus ponderosa* wurde in einem langen Glasröhrchen in eine Lösung von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose (d-DOX) bzw. [2-¹³C]-Mevalonsäurelacton (¹³C-MVA) gestellt (siehe 2.5.1, S. 44). Nach mehreren Tagen Inkubation wurde per Headspace-GC/MS mit SPME der Einbaugrad in das

von den Nadeln emittierte MBO bestimmt. Außer MBO wurden nur Spuren von nicht näher identifizierten flüchtigen Substanzen gefunden, vermutlich Monoterpene, aus deren Massenspektren im Vergleich zu GC/MS-Analysen unmarkierter Nadeln jedoch kein Einbau schwerer Isotope zu erkennen war. Bis zu ca. 50% des MBO wurden aus $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose gebildet (siehe Abbildung 3-6) während $[2-^{13}\text{C}]$ -Mevalonsäurelacton nicht signifikant eingebaut wurde.

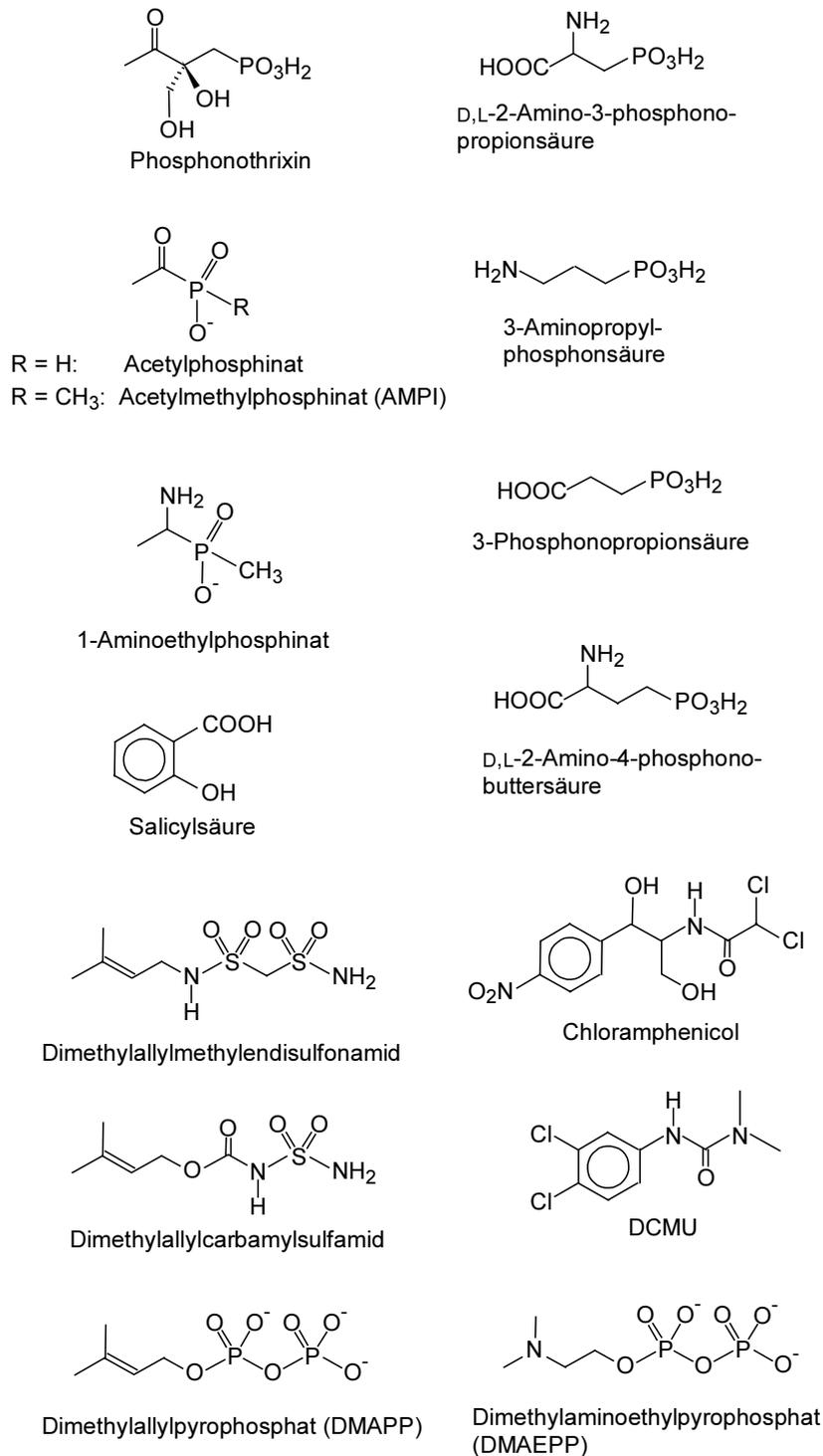


Abbildung 3-4 Strukturformeln verschiedener Substanzen, deren Einfluss auf die Isoprenemission in dieser Arbeit untersucht wurde.

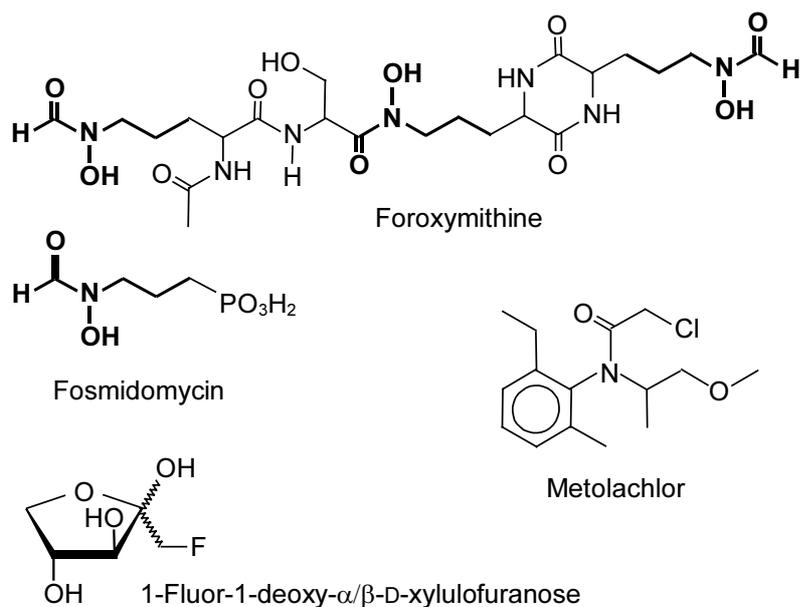


Abbildung 3-5 Strukturformeln verschiedener Substanzen, deren Einfluss auf die Isoprenemission und andere Isoprenoidbiosynthesen in dieser Arbeit untersucht wurde.

Die Abschätzung der Einbauraten von d-DOX in MBO aus GC/MS-Daten nach Abschnitt 2.5.2 führte für die Fragmente 71/72 und 43/44 zu höheren Werten als für Fragment 59/60 (Tabelle 3-12). Dies könnte an einem Isotopeneffekt bei der Abspaltung der Methylgruppe liegen, der beim Fragment 59/60 keine Rolle spielen sollte (siehe Abschnitt 2.5.2). Letztere Werte kommen also dem tatsächlichen Markierungsgrad vermutlich näher. Jedenfalls lässt sich insgesamt ein hoher, mit der Zeit steigender Markierungsgrad des MBO aus d-DOX erkennen. Die Biosynthese von MBO aus *Pinus ponderosa* verläuft somit über den DOXP/MEP-Weg.

Tabelle 3-12 Einbau von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose in Methylbutenol von *Pinus ponderosa*.

Einbau berechnet aus Fragment	Prozent Einbau aus [1- ² H ₁]-1-Deoxy-D-xylulose nach einer Inkubationsdauer von		
	3 d	12 d	14 d
43/44	50	56	55
59/60	29	48	52
71/72	40	62	87

3.4.2 Hemmung der MBO-Emission mit Fosmidomycin

Jeweils 6 Bündel drei zusammenhängender Nadeln von *Pinus ponderosa* wurden in Fosmidomycinlösungen oder Wasser inkubiert und die Menge des emittierten Methylbutenols wurde durch SPME-GC/MS mit der von Kontroll-Nadeln verglichen (siehe 2.5.3, S. 45). Die Experimente mit 5 μ M und 50 μ M Fosmidomycin führten noch nicht zu einer signifikanten Hemmung nach 11 bzw. 8 Tagen Inkubationszeit. 500 μ M Fosmidomycin hemmte die MBO-Emission jedoch bei einer Messung nach 12 Tagen um 75 %. Die durchschnittlich emittierte MBO-Menge der Nadeln in willkürlichen Einheiten war bei der Kontrolle 1168 ± 393 und bei der Behandlung 292 ± 165 . Fosmidomycin hemmte somit die Emission von 2-Methyl-3-buten-2-ol von *Pinus ponderosa*.

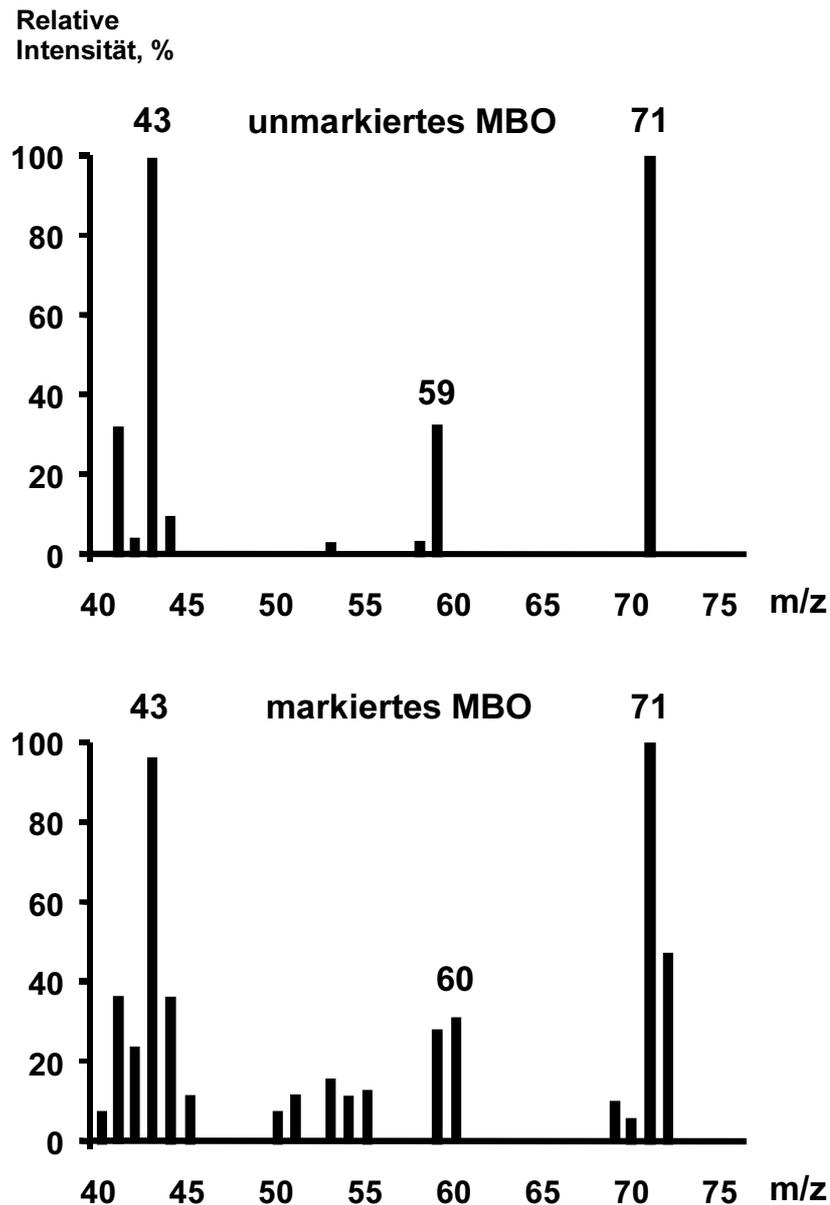


Abbildung 3-6 Einbau von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose (d-DOX) in 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO), dass von Nadeln von *Pinus ponderosa* nach 14 Tagen Vorinkubationszeit mit d-DOX emittiert wurde. Der Markierungsgrad beträgt etwa 50% und wurde mittels SPME-GC/MS bestimmt. Zum Vergleich ist ein Massenspektrum von unmarkiertem MBO dargestellt.

3.5 Experimente zur Markierung von Monoterpenen

3.5.1 Markierung des etherischen Öls aus Keimlingen von *Picea abies* L. mit $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose

Nadelbäume akkumulieren Monoterpene u.a. in ihren Nadeln. Die Biosynthese der Monoterpene von Fichtenkeimlingen wurde durch Einbauexperimente mit d-DOX untersucht, um festzustellen, ob der DOXP/MEP-Weg für ihre Bildung verantwortlich ist. Fichtenkeimlinge (*Picea abies* L.) wurden aseptisch auf Watte 17 Tage lang mit markiertem d-DOX angezogen, das als wässrige Lösung über die Wurzeln angeboten wurde. Das

etherische Öl wurde durch Wasserdampfdestillation gewonnen (siehe 2.6.1, S. 46). Obwohl sich die Keimlinge entwickelten, konnte in den im GC/MS gefundenen Terpenen keine Markierung nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Massenspektren mit einer Spektrenbibliothek wurden im wesentlichen die Monoterpene α -Pinen, β -Pinen, Camphen und Limonen vorläufig identifiziert. Auf eine genauere Identifizierung der Substanzen, z.B. durch GC/MS-Analyse authentischer Standards, wurde verzichtet, da im Vergleich zu einem etherischen Öl aus Fichtenkeimlingen, die ohne d-DOX angezogen worden waren, bei keiner Substanz aus dem Chromatogramm des markierten Ansatzes ein Einbau in den Massenspektren zu finden war. Offenbar waren die Monoterpene bereits vor der Keimung vorhanden.

3.5.2 Markierung flüchtiger Monoterpene aus *Pistacia lentiscus* L. mit [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose

Pistacia lentiscus L. und einige andere im Mittelmeerraum verbreitete Sträucher emittieren flüchtige Monoterpene, die ähnlich wie Isopren die Atmosphärenchemie beeinflussen (HANSEN *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob auch diese Substanzen nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet werden, wurden untersucht, ob ein Einbau von d-DOX in flüchtige Monoterpene aus *Pistacia lentiscus* L. massenspektrometrisch festzustellen ist. Ein Pistazienblatt wurde in einem Rundgläschen mit einer Lösung von markiertem d-DOX inkubiert und die unter Starklicht und Wärme in dem mit einem Septum verschlossenen Glas emittierten Monoterpene wurden an Aktivkohle adsorbiert und nach Elution der Aktivkohle mit Methylenchlorid im GC/MS analysiert (siehe 2.6.2, S. 46). Ein Kontrollblatt in Wasser wurde genauso behandelt. Nach bis zu 6 Tagen Inkubationszeit konnte jedoch massenspektrometrisch im Vergleich zur Kontrolle kein Einbau von d-DOX in die Monoterpene festgestellt werden. Die Monoterpene α -Pinen, β -Pinen, und Linalool wurden anhand der Massenspektren im Gaschromatogramm mithilfe einer Spektrenbibliothek vorläufig identifiziert. Auf eine genauere Identifizierung der Substanzen wurde verzichtet, da im Vergleich zur Kontrolle ohne d-DOX bei keiner Substanz aus dem Chromatogramm des markierten Ansatzes ein Einbau massenspektrometrisch nachweisbar war. Offenbar war die Hauptmenge der Monoterpene bereits gebildet und wurde aus Speichern emittiert.

3.6 Weitere Hemmexperimente

3.6.1 Ergrünungsexperimente mit Gerste zum Wirkungsmechanismus von Clomazone

Aus der Literatur lassen sich Hinweise entnehmen, dass das selektive Herbizid Clomazone mit unbekanntem Wirkungsmechanismus einen oder mehrere gemeinsame, frühe Schritte der Biosynthese photosynthetischer Isoprenoidpigmente (β -Carotin und Chlorophyll) hemmt (siehe 4.2.3, S. 91). Daher war es von Interesse, zu prüfen, ob Clomazone den DOXP/MEP-Weg blockiert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Clomazone selbst evtl. inaktiv ist und von sensitiven Pflanzen erst zu einem oder mehreren aktiven Metaboliten verstoffwechselt wird, die für die Wirkung von Clomazone verantwortlich sind. Über diese Frage war im Zusammenhang mit dem DOXP/MEP-Weg bisher nichts bekannt. In Ergänzung der Versuche zur Hemmung der Isoprenemission durch Clomazone und einen seiner Metaboliten, 5-Ketoclomazone (siehe 3.3.2, S. 63), wurde deshalb näher untersucht, welchen Anteil der Clomazone-Metabolit 5-Ketoclomazone an der Wirkung von Clomazone hat. 5-Ketoclomazone entsteht in der Pflanze vermutlich über eine Cytochrom P₄₅₀-abhängige Reaktion und hat die gleiche herbizidale Wirkung wie Clomazone. Die Wirkung von

Clomazone könnte daher durch Hemmung von Cytochrom P₄₅₀-Enzymen wiederaufhebbar sein, während die Wirkung von 5-Ketoclomazone durch Hemmung von Cytochrom P₄₅₀-Enzymen nicht wieder aufgehoben werden sollte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Clomazone und 5-Ketoclomazone an etiierte Gerstenkeimlinge verabreicht. Nach Ergrünung der belichteten Gerstensprosse wurden Chlorophyll- und Carotinoidgehalte bestimmt. Die Hemmung der Pigmentakkumulation im Vergleich zu Wasserkontrollen wurde berechnet. In weiteren Versuchen wurden der Einfluss des Cytochrom P₄₅₀-Hemmstoffs Aminobenzotriazol (ABT) und jener von DOXP auf die Hemmung der Pigmentbildung von Gerste untersucht (siehe 2.7.1, S. 47).

In Tabelle 3-13 sind die Effekte von Clomazone und Ketoclomazone auf die Pigmentbildung dargestellt. Beide Hemmstoffe hemmten dosisabhängig die Bildung der photosynthetischen Isoprenoidpigmente.

Tabelle 3-13 Mengen der neugebildeten Chlorophylle (a+b) und Carotinoide (x+c, x = Xanthophylle, c = β -Carotin) aus ergrünenden Gerstenhalmen nach Behandlung mit Clomazone (je 25 Halme) und 5-Ketoclomazone (21 Halme) in $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Der Grad der Hemmung im Vergleich zu Wasserkontrollen ist in Klammern angegeben. Negative Werte bedeuten eine verstärkte Pigmentakkumulation gegenüber der Kontrolle. a/b = Verhältnis Chlorophyll a/b, (a+b)/(x+c) = Verhältnis Chlorophylle zu Carotinoide.

Versuch Nr.	Behandlung	a+b		x+c		a/b	(a+b)/(x+c)
1	Kontrolle	175		33		3,8	2,9
	Clomazone 10 ⁻⁴ M	18	(90%)	7	(79%)	9,7	0,7
	Clomazone 10 ⁻⁵ M	88	(50%)	14	(42%)	5,3	2,2
	Clomazone 10 ⁻⁶ M	162	(7%)	33	(0%)	4,1	2,7
2	Kontrolle	163		20		3,7	3,1
	Clomazone 10 ⁻⁴ M	31	(81%)	8	(60%)	7,0	0,8
	Clomazone 10 ⁻⁵ M	86	(47%)	10	(50%)	4,8	2,1
	Clomazone 10 ⁻⁶ M	138	(15%)	24	(-20%)	4,0	2,5
3	Kontrolle	129		17		4,7	1,8
	Ketoclomazone 10 ⁻⁴ M	10	(92%)	5	(71%)	9,5	0,3
	Ketoclomazone 10 ⁻⁵ M	83	(36%)	13	(24%)	5,4	1,3

Bei Zusatz von DOXP zu mit Clomazone oder Ketoclomazone behandelten Keimlingen fiel die Hemmung der Pigmentbildung geringer aus als ohne DOXP-Zusatz (Tabelle 3-14). Die mit Hemmstoff + DOXP behandelten Blätter enthielten teilweise sogar mehr Carotinoide als die Kontrolle. Bei Versuch 5 (Tabelle 3-14) wurde die Hemmung der Carotinoidakkumulation nicht in Prozenten angegeben, da bei allen Ansätzen außer der Phosphatkontrolle nach der Ergrünung weniger Carotinoide als in der Wasserkontrolle vorhanden waren. Die Kontrolle Clomazone + Phosphat in Versuch 6 (Tabelle 3-14) zeigt, dass Phosphat die Hemmung durch Clomazone nicht wieder aufheben konnte, d.h. dass das in DOXP enthaltene Phosphat nicht für die Aufhebung der Hemmung verantwortlich war.

Tabelle 3-14 Einfluss von DOXP auf die Hemmung der Pigmentbildung durch 10 µM Clomazone bzw. 5-Ketoclomazone. Versuch 4: 10 Halme je Behandlung, 7 mM DOXP. Versuch 5: 25 Halme je Behandlung, 11 mM DOXP, 22 mM Kalium-Phosphat, pH 7. Versuch 6: 25 Halme je Behandlung, 11 mM DOXP, 11 mM Kalium-Phosphat, pH 7. Gehalte neugebildeter Chlorophylle a+b bzw. Carotinoide x+c sind in µg/g Frischgewicht angegeben. Der Grad der Hemmung im Vergleich zu Wasserkontrollen ist in Klammern angegeben. Negative Werte zeigen eine Förderung der Pigmentbildung an.

Versuch Nr.	Behandlung	a+b	x+c	a/b	(a+b)/ (x+c)
4	Kontrolle	381	23	3,5	3,9
	Clomazone	142 (63%)	3 (87%)	1,8	1,8
	Clomazone + DOXP	287 (25%)	33 (-43%)	2,7	2,7
	Ketoclomazone	183 (52%)	15 (35%)	2,1	2,1
	Ketoclomazone + DOXP	274 (28%)	25 (-9%)	2,7	2,7
5	Kontrolle	199	-6	3,3	5,2
	Clomazone	136 (32%)	-7	4,1	3,7
	Clomazone + DOXP	158 (21%)	-14	3,2	5,2
	Ketoclomazone	106 (47%)	-17	3,6	4,0
	Ketoclomazone + DOXP	161 (19%)	-9	3,4	4,6
	Phosphat	179 (10%)	17	3,6	3,0
6	Kontrolle	260	26	3,5	2,9
	Clomazone	165 (37%)	6 (77%)	4,6	2,4
	Clomazone + DOXP	238 (8%)	27 (-4%)	3,8	2,6
	Clomazone + Phosphat	177 (32%)	11 (58%)	4,6	2,4
	Ketoclomazone	122 (53%)	7 (73%)	4,9	1,8
	Ketoclomazone + DOXP	247 (5%)	26 (0%)	3,6	2,7

Der Cytochrom P₄₅₀-Inhibitor Aminobenzotriazol (ABT) hob die Hemmung der Chlorophyllakkumulation durch Clomazone vollständig wieder auf (Tabelle 3-15). Bei den Carotinoiden war der Effekt nicht sichtbar. Die Hemmung der Pigmentbildung durch Ketoclomazone wurde durch ABT verstärkt. Kieselgeleextrakt war in gleichen Mengen wie DOXP in den Versuchen von Tabelle 3-14 zugesetzt worden, um auszuschließen, dass die im DOXP enthaltenen Kieselgelverunreinigungen eine Wirkung ausüben. Kieselgeleextrakt (siehe 2.2.2, S. 36) hob die Hemmung durch Clomazone nicht auf. Die Versuche 7, 8 und 9 (Tabelle 3-15) sind in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass Clomazone selbst den DOXP/MEP-Weg und die Bildung der isoprenoiden Pigmente nicht hemmt, sondern durch Cytochrom P₄₅₀ zu einem aktiven Metaboliten umgesetzt wird. Letzterer könnte 5-Ketoclomazone sein, oder ein Folgemetabolit, der nicht durch Cytochrom P₄₅₀ gebildet wird. Der Wirkort von 5-Ketoclomazone könnte das erste Enzym des DOXP/MEP-Weges, die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase sein, da DOXP die Hemmung der Pigmentbildung von Gerste durch Clomazone und 5-Ketoclomazone teilweise wieder aufheben kann (Versuche 4, 5 und 6, Tabelle 3-14).

Tabelle 3-15 Einfluss von ABT auf die Hemmung der Pigmentbildung durch 10 µM Clomazone bzw. 5-Ketoclomazone. Versuch 7: Je 13 Halme, 0,5 mM ABT. Versuch 8: Je 13 Halme, 0,5 mM ABT. Versuch 9: Je 25 Halme, 0,5 mM ABT. Gehalte neugebildeter Chlorophylle a+b bzw. Carotinoide x+c sind in µg/g Trockengewicht (Versuch 7 und 9) bzw. Frischgewicht (Versuch 8) angegeben. Der Grad der Hemmung im Vergleich zu Wasserkontrollen ist in Klammern angegeben. K = Kieselgeleextrakt. Negative Werte zeigen eine Förderung der Pigmentbildung an.

Versuch Nr.	Behandlung	a+b	x+c	a/b	(a+b)/(x+c)
7	Kontrolle	2528	890	4,3	2,1
	Clomazone	1966 (22%)	547 (39%)	5,0	2,2
	Clomazone + K	1681 (34%)	495 (44%)	4,7	2,0
	Clomazone + ABT	3024 (-20%)	592 (44%)	3,6	3,2
	ABT	2355 (7%)	644 (28%)	4,1	2,4
8	Kontrolle	217	-5	3,3	5,4
	Clomazone	179 (18%)	-7	3,5	4,7
	Clomazone + K	156 (28%)	-14	3,4	5,0
	Clomazone + ABT	240 (-11%)	-18	3,4	3,9
	ABT	234 (-8%)	4	4,8	4,8
9	Kontrolle	4638	577	3,6	3,3
	Ketoclomazone	3926 (15%)	524 (9%)	4,0	2,9
	Ketoclomazone + ABT	3160 (32%)	307 (47%)	4,2	2,8
	ABT	4134 (11%)	353 (39%)	3,7	3,5

3.6.2 Hemmtests mit Algen und *E. coli*

E. coli und die einzelligen Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus* und *Gloeotilopsis planctonica* wurden angezogen, mit verschiedenen Hemmstoffen versetzt und nach einigen Tagen durch Bestimmung der optischen Dichte bei 560 nm (OD_{560}) auf Wachstumshemmung untersucht (siehe 2.7.2, S.47). Hier sollten insbesondere Organismen gefunden werden, die sich für weitere Versuche mit Clomazone und 5-Ketoclomazone eignen.

Test von 1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose an *E. coli*

1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose angeboten bis zu 10^{-4} M zeigte keinen nennenswerten Hemmeffekt auf das Wachstum von *E. coli* (Tabelle 3-16). Die optische Dichte von behandelten Kulturen zeigte von der frühen bis zur späten logarithmischen Phase denselben Verlauf wie die unbehandelten Kulturen.

Tabelle 3-16 Wachstum von *E. coli* mit 1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose (FDX) oder Wasser (Kontrolle) bei 30 °C gemessen über die Entwicklung der optischen Dichte im Verlauf von 7,5 h. Mittelwerte aus zwei parallelen Ansätzen je Behandlung.

Behandlung	OD_{560} nach						
	0,5 h	1,5 h	2,5 h	3,67 h	4,75 h	5,83 h	7,5 h
Kontrolle	0,06	0,09	0,17	0,29	0,58	1,01	1,59
FDX 10^{-5} M	0,04	0,10	0,15	0,27	0,56	1,03	1,56
FDX 10^{-4} M	0,06	0,09	0,18	0,29	0,57	1,00	1,55

Test von Clomazone und 5-Ketoclozazone an *E. coli*

Clomazone oder 5-Ketoclozazone zeigten im Vergleich zu Wasserkontrollen bei einer Konzentration von 0,09 mM von der frühen logarithmischen bis zur stationären Phase keinen nennenswerten Hemmeffekt auf das Wachstum von *E. coli* (Tabelle 3-17).

Tabelle 3-17 Wachstum von *E. coli* mit Clomazone, 5-Ketoclozazone oder Wasser (Kontrolle) bei 37 °C gemessen über die Entwicklung der optischen Dichte im Verlauf von 13,3 h. Mittelwerte aus drei parallelen Ansätzen je Behandlung.

Behandlung	OD ₅₆₀ nach				
	0,5 h	1 h	2 h	2,5 h	13,3 h
Kontrolle	0,13	0,28	0,58	0,83	2,20
Clomazone 0,09 mM	0,12	0,28	0,57	0,83	2,21
5-Ketoclozazone 0,09 mM	0,12	0,29	0,56	0,82	2,20

Test von Fosmidomycin und Cerivastatin an *Chlamydomonas reinhardtii*

Tabelle 3-18 zeigt, dass $6,5 \times 10^{-5}$ M Fosmidomycin (F, Hemmung des DOXP/MEP-Weges) das Wachstum von *Chlamydomonas* bei allen Messungen zu über 30 % hemmte. 4×10^{-7} M Cerivastatin (C, Hemmung des Mevalonatweges) allein oder in Kombination mit Fosmidomycin hatte keine Wirkung auf das Wachstum und verstärkte auch die Wirkung von Fosmidomycin nicht. Dies bestätigt, dass die Grünalge *Chlamydomonas* nur den DOXP/MEP-Weg besitzt und nicht den Mevalonatweg.

Tabelle 3-18 Wachstum von *Chlamydomonas reinhardtii* mit 4×10^{-7} M Cerivastatin (C), $6,5 \times 10^{-5}$ M Fosmidomycin (F), der Kombination beider Substanzen (C + F) oder Wasser (Kontrolle). Mittelwerte aus zwei (C und F) bzw. drei (Kontrolle und C + F) parallelen Ansätzen.

Behandlung	OD ₅₆₀ nach					
	2 d	4 d	5 d	6 d	8 d	12 d
Kontrolle	0	0,16	0,24	0,31	0,46	0,70
Cerivastatin	0	0,16	0,22	0,30	0,45	0,67
Fosmidomycin	0	0,09	0,16	0,21	0,31	0,45
C + F	0	0,08	0,16	0,21	0,31	0,46

Test von Clomazone und 5-Ketoclozazone an *Chlamydomonas reinhardtii*

0,1 mM Clomazone oder 5-Ketoclozazone hatten keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum von *Chlamydomonas reinhardtii* (Tabelle 3-19). *Chlamydomonas reinhardtii* ist offenbar nicht sensitiv gegenüber dem Selektiv-Herbizid Clomazone und seinem Metaboliten 5-Ketoclozazone und somit nicht geeignet für weitere *in vivo*-Versuche zur Untersuchung der Hypothese, dass Clomazone zu der wirksamen Substanz 5-Ketoclozazone oder weiteren Metaboliten aktiviert wird.

Tabelle 3-19 Wachstum von *Chlamydomonas reinhardtii* mit Clomazone, 5-Ketoclozazone oder Wasser (Kontrolle). Mittelwerte aus sieben (Kontrolle, Ketoclozazone) bzw. sechs (Clomazone) parallelen Ansätzen. Prozent der Kontrolle in Klammern.

Behandlung	OD ₅₆₀ nach			
	5 d		11 d	
Kontrolle	0,25		0,59	
Clomazone 0,1 mM	0,23	(91 %)	0,57	(97 %)
5-Ketoclozazone 0,1 mM	0,29	(115 %)	0,66	(112 %)

Test von Clomazone und 5-Ketoclozazone an *Gloeotilopsis planctonica*

0,09 mM Clomazone oder 5-Ketoclozazone hatten keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum von *Gloeotilopsis planctonica*. Die Absorptionsspektren der Methanol-Extrakte sahen sehr ähnlich aus (Tabelle 3-20). Hier wurde nicht die optische Dichte als Maß für das Wachstum verwendet, da *Gloeotilopsis planctonica* keine homogenen Zellsuspensionen bildet. Auch *Gloeotilopsis planctonica* ist offensichtlich weder sensitiv gegenüber Clomazone noch gegenüber 5-Ketoclozazone und somit nicht für weitere Versuche geeignet.

Tabelle 3-20 Wachstum von *Gloeotilopsis planctonica* mit Clomazone, 5-Ketoclozazone oder Wasser (Kontrolle) gemessen durch Absorption des methanolischen Zellextrakts im Maximum bei 438 nm (A₄₃₈) nach 4 Tagen. Mittelwerte aus je drei parallelen Ansätzen. Prozent der Kontrolle in Klammern.

Behandlung	A ₄₃₈
Kontrolle	0,344
Clomazone 0,09 mM	0,337 (98 %)
5-Ketoclozazone 0,09 mM	0,331 (96 %)

Test von Clomazone und 5-Ketoclozazone an *Scenedesmus obliquus*

Tabelle 3-21 zeigt, dass 0,1 mM Clomazone keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* hatte. 0,1 mM Ketoclozazone führte jedoch zu einer drastischen Wachstumshemmung und zu einem kompletten Absterben der Zellen. Nach 10 Tagen waren die Ansätze mit Ketoclozazone farblos, während Kontrollen und Clomazone-Ansätze eine normale grüne Farbe aufwiesen.

Tabelle 3-21 Wachstum von *Scenedesmus obliquus* mit Clomazone, 5-Ketoclozazone oder Wasser (Kontrolle). Mittelwerte aus je drei parallelen Ansätzen.

Behandlung	OD ₅₆₀ nach			
	3 d	4 d	5 d	10 d
Kontrolle	0,14	0,37	0,51	1,22
Clomazone 0,1 mM	0,14	0,38	0,54	1,32
5-Ketoclozazone 0,1 mM	0,07	0,12	0,09	0,04

Nachdem gezeigt war, dass Ketoclozazole das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* hemmt, wurde versucht, diese Hemmung durch Zusatz von DOXP im Sinne einer Kompensation wieder aufzuheben:

Kompensationsexperiment 1:

Tabelle 3-22 Wachstum von *Scenedesmus obliquus* mit 5-Ketoclozazole, DOXP, 5-Ketoclozazole und DOXP oder Wasser (Kontrolle). Mittelwerte aus je drei parallelen Ansätzen. Prozent der Kontrolle in Klammern.

Behandlung	OD ₅₆₀ nach	
	2 d	7 d
Kontrolle	0,07	0,47
5-Ketoclozazole 0,1 mM	0,00	0,00
DOXP 0,16 mM	0,06	0,83
5-Ketoclozazole 0,1 mM + DOXP 0,16 mM	0,00	0,00

Der Hemmeffekt von Ketoclozazole auf das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* konnte reproduziert werden (Tabelle 3-22). Diesmal fand sogar überhaupt kein Wachstum statt. Nach 7 Tagen war ein wachstumsfördernder Effekt von DOXP allein zu erkennen. DOXP konnte die Hemmwirkung von Ketoclozazole jedoch nicht aufheben. Deshalb wurde ein weiteres Experiment durchgeführt mit geringerer Ketoclozazole- und höherer DOXP-Konzentration:

Kompensationsexperiment 2:

Tabelle 3-23 Wachstum von *Scenedesmus obliquus* mit 5-Ketoclozazole, DOXP, 5-Ketoclozazole und DOXP oder Wasser (Kontrolle). Mittelwerte aus je drei parallelen Ansätzen.

Behandlung	OD ₅₆₀ nach 7 d
Kontrolle	0,30
5-Ketoclozazole 0,01 mM	0,13
5-Ketoclozazole 0,01 mM + DOXP 4 mM	0,41

Tabelle 3-23 zeigt, dass Ketoclozazole auch in der Konzentration 0,01 mM noch einen deutlichen Hemmeffekt auf das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* ausübte. Der Zusatz von DOXP konnte die Hemmung vollständig wiederaufheben. Allerdings hatte in einem der drei Reagenzgläser mit Ketoclozazole normales Wachstum stattgefunden (ODs: 0,32; 0,04; 0,02). Deshalb wurde die Reproduzierbarkeit der Wachstumshemmung durch 5-Ketoclozazole noch einmal mit einer grösseren Stichprobe wiederholt (Tabelle 3-24).

Tabelle 3-24 Wachstum von *Scenedesmus obliquus* mit 0,01 mM 5-Ketoclozazole oder Wasser (Kontrolle). Mittelwerte aus je sieben parallelen Ansätzen.

Behandlung	OD ₅₆₀ nach 7 d
Kontrolle	0,22
5-Ketoclozazole 0,01 mM	0,06

Der Hemmeffekt von Ketoclozazole konnte reproduziert werden. Die Grünalge *Scenedesmus obliquus* ist also tolerant gegenüber Clomazone, jedoch sensitiv gegenüber dem Metaboliten 5-Ketoclozazole und somit ein geeigneter Organismus für weitere

3.6.4 Test von Cerivastatin an *Raphanus*-Wurzeln

Radieschen-Samen waren auf Wasser und Cerivastatin-Lösungen nach dem Wurzeltest von BACH und LICHTENTHALER (1983) angekeimt worden. Mit diesem Test lässt sich die Wirkung des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Mevinolin nachweisen. Nach 17 Tagen waren alle Samen im Licht-/Dunkelwechsel gekeimt und hatten etwa gleich große, grüne Kotyledonen entwickelt. Bei 10^{-4} und 10^{-5} M Cerivastatin hatte jedoch im Gegensatz zur Kontrolle kein Wurzelwachstum stattgefunden und auch die Hypokotyle waren kürzer als jene der Kontrolle. Bei 10^{-6} M Cerivastatin waren Ansätze von Wurzeln, jedoch ohne Seitenwurzeln zu erkennen. Die Kontrollpflanzen hingegen hatten alle Wurzeln von 11-15 cm Länge mit feinen Seitenwurzeln. Die starke Hemmung des Wurzelwachstums und insbesondere des Wachstums der Seitenwurzeln von Radieschenkeimlingen ist typisch für Mevinolin. Der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Cerivastatin führte ebenfalls zu dieser Symptomatik, was anzeigt, dass sein Wirkungsmechanismus in der Pflanze offenbar der gleiche ist wie jener von Mevinolin.

4 Diskussion

Isopren als Modell der plastidären Isoprenoidbiosynthese von Pflanzen

Isopren-emittierende Pflanzen finden sich fast überall. Es gibt verschiedene Gründe, diese Tatsache in der Forschung auszunutzen. Einige davon wurden schon im Abschnitt 3.1 (S. 53) genannt. Die Motivation dieser Arbeit war, den seit 1993 aus Bakterien (ROHMER *et al.*, 1993) und Grünalgen (SCHWENDER *et al.*, 1995; LICHTENTHALER *et al.*, 1995) bekannten DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese mit seinen möglichen Intermediaten zu untersuchen. Es stand zu vermuten, dass dieser Weg, falls er in höheren Pflanzen verbreitet sein sollte, in den Plastiden vorkommt. Viele ältere Befunde über die Biosynthese plastidärer Isoprenoide standen im Widerspruch zu einem plastidären Acetat/Mevalonat-Weg und lassen sich heute durch den plastidären DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese erklären. Es wurde mehrfach berichtet, dass ^{14}C -markierte Mevalonsäure von Pflanzen in die cytosolischen Sterole eingebaut wird, nicht aber in plastidäre Isoprenoide wie β -Carotin, Phytol und Plastochinon-9 (siehe z.B. MERCER und GOODWIN, 1962; TREHARNE *et al.*, 1964; LICHTENTHALER *et al.*, 1982; SCHULZE-SIEBERT *et al.*, 1987). Bei Einsatz von Mevinolin, eines spezifischen Hemmstoffs der HMG-CoA-Reduktase des Acetat/Mevalonat-Wegs, wurde die Sterolbiosynthese stark gehemmt, nicht jedoch die Biosynthese der plastidären Prenyllipide wie β -Carotin, der Phytolseitenkette der Chlorophylle und Plastochinon-9 (BACH und LICHTENTHALER, 1983; DÖLL *et al.*, 1984; SCHINDLER *et al.*, 1985). In neueren Arbeiten über *Ginkgo biloba* wurde eine plastidäre Lokalisierung des DOXP/MEP-Weges nahegelegt. *Ginkgo biloba* bildet Sitosterol nach dem Mevalonat-Weg und diterpenoide (und damit vermutlich in Plastiden gebildete) Ginkgolide nach dem DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese. Dieses Ergebnis sowie der Einbau von 1-Deoxy-D-xylulose in Ubichinon aus *E. coli* und in das Diterpen Ferruginolacetat aus *Salvia miltiorrhiza* stammten aus zwei Doktorarbeiten der Arbeitsgruppe Arigoni an der ETH Zürich (BROERS, 1994; SCHWARZ, 1994; siehe 1.4.2, S. 21). Diese waren vor Mitte 1995 nicht zugänglich. Erstaunlicherweise wurden die Arbeiten über *E. coli* und *Salvia* nach Kenntnis des Autors bis heute nicht publiziert und die über *Ginkgo* nur ohne Methodenteil in einem „Conference Report“ (SCHWARZ, 1996) und einem Buchbeitrag (SCHWARZ und ARIGONI, 1999). Die Ergebnisse mit *Salvia* sind in allen diesen Arbeiten nur am Rande erwähnt. Um nun zu untersuchen, ob der DOXP/MEP-Weg nur als Besonderheit zur Bildung einiger Sekundärstoffe in zwei Pflanzen vorkommt, oder möglicherweise weitergehende Bedeutung hat, wurde die 1993 in Kooperation mit der Gruppe Rohmer begonnene Arbeit der Karlsruher Gruppe zum DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese von Grünalgen auf weitere Algen und höhere Pflanzen ausgedehnt. In diesem Rahmen wurde für die vorliegende Arbeit im Wesentlichen die Isopren-Emission als Modellsystem gewählt, um weitere Erkenntnisse über den DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese in verschiedenen Pflanzen zu gewinnen. Wie oben erwähnt, gab es Hinweise auf eine plastidäre Lokalisation des Weges, und somit bot sich Isopren als Untersuchungsobjekt an, da es im Plastiden gebildet wird. Dafür sprechen die plastidäre Lokalisierung der Isopren-Synthase, welche DMAPP in Isopren umsetzt, sowie die rasche Markierung von Isopren durch photosynthetisch fixiertes $^{13}\text{CO}_2$ (siehe 1.6, S. 25). Zur Biosynthese von Isopren sind nur zwei enzymatische Schritte nach IPP nötig, die IPP-Isomerase und die Isopren-Synthase. Isopren wird auf Belichtung und Erwärmung hin in großen Mengen gebildet und direkt emittiert, ohne gespeichert zu werden. Die pflanzliche Isoprenemission spiegelt also unmittelbar die plastidäre Biosynthese von IPP wider und sollte geeignet sein, Intermediate und Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges durch Markierungs- und Hemmexperimente zu identifizieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten Markierungs- und Hemmexperimente mit Isopren und weiteren Testsystemen werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Markierungsexperimente mit Isopren und anderen Isoprenoiden

Als Ergänzung zu den Einbauexperimenten von Jörg Schwender (SCHWENDER, 1999) mit [1-¹³C]-Glucose und anschließender ¹³C-NMR-Untersuchung sollten Markierungsexperimente mit möglichen spezifischen ²H- oder ¹³C-markierten Vorläufern und GC/MS-Analyse durchgeführt werden. Spezifische Vorstufen des DOXP/MEP-Weges standen zunächst nicht zur Verfügung, so dass solche synthetisiert werden sollten (siehe 1.8, S. 30). Zum einen waren zu Beginn der Arbeit die Gene, Enzyme und Intermediate dieses Weges noch gar nicht bekannt, zum anderen waren plausible mögliche Intermediate nicht in markierter Form kommerziell erhältlich.

4.1.1 Synthesen möglicher Intermediate

Synthese von DOX und DOXP

Zu Beginn der Arbeit gab es Hinweise darauf, dass 1-Deoxy-D-xylulose (DOX), bzw. deren an C-5 phosphorylierte Form (DOXP), das erste Zwischenprodukt des mevalonatunabhängigen IPP-Biosyntheseweges ist (siehe 1.4.2, S. 21). Es war also im Hinblick auf spätere Einbaustudien am aussichtsreichsten, zunächst diese Verbindung herzustellen. Eine elegante enzymatische Einschnitt-Synthese aus Pyruvat bzw. Acetoin und Glycerinaldehyd war von YOKOTA und SASAJIMA beschrieben worden (1984; 1986) und schien einer längeren chemischen Synthese überlegen. Pyruvat und Glycerinaldehyd sind in ¹³C-markierter Form erhältlich, so dass die Herstellung ein- oder zweifach markierter DOX einfach möglich schien. Gemäß den Angaben dieser Autoren wurde versucht 1-Deoxy-D-xylulose mithilfe von zellfreien Extrakten aus *Bacillus pumilus* IFO 12089 oder Rinderherz-Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (teilweise gereinigt nach STANLEY und PERHAM, 1980) zu gewinnen. Es gelang auch, kleine Mengen Produkt zu gewinnen, jedoch waren die Ausbeuten gering und die Aufreinigung schwierig. Der Einsatz der sehr teuren ¹³C-markierten Substrate kam damit nicht in Frage (deuterierte Verbindungen sind in der Regel preiswerter, deuteriertes Pyruvat, Acetoin oder Glycerinaldehyd waren aber nicht erhältlich). Vermutlich stören andere Enzymaktivitäten, wenn keine reinen Enzyme verwendet werden. Über ähnliche Probleme bei einer enzymatischen DOX-Synthese mit zellfreiem Gesamt-Proteinextrakt aus einem transformierten *E. coli*-Stamm, der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) überexprimiert, berichteten auch ROSA PUTRA *et al.* (1998b).

Schließlich stand dann an C-1 einfach deuterierte DOX (synthetisiert von Herrn H. U. May, Arbeitsgruppe F. W. Lichtenthaler, Universität Darmstadt; ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997) zur Verfügung und die eigenen Optimierungsversuche zur Synthese von DOX wurden zunächst zurückgestellt. Allerdings berichtete auch H. U. May über Schwierigkeiten bei der Aufreinigung von DOX über Kieselgel. Mit anderen Chromatographie-Materialien (Al₂O₃, Sephadex) wurden keine ausreichenden Trenneffekte erzielt (H. U. May, persönliche Mitteilung). Offenbar ist freie 1-Deoxy-D-xylulose auf Kieselgel instabil. Deshalb wurde die deuterierte DOX zunächst als Methylglykosid und später als 2,3-Isopropyliden-Derivat aus Darmstadt erhalten. Das Methylglykosid konnte erfolgreich direkt für Markierungsexperimente mit Isopren eingesetzt werden (3.2.1. S. 55; s.a. ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997). Vermutlich wird es *in vivo* von ubiquitären Glykosidasen in DOX überführt. Das Isopropylidenderivat wurde direkt vor den (ebenfalls erfolgreichen, siehe 3.2.1, S. 55; 3.4.1, S. 66) Einbauexperimenten in Isopren und 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO) jeweils durch saure Hydrolyse entschützt und das Reaktionsgemisch nach Neutralisieren ohne

Aufreinigung eingesetzt (siehe 2.2.1, S. 34). Als später rekombinante DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii* zur Verfügung stand (SCHWENDER, 1999), wurden von Claudia Gemünden und Melanie Siehler unter meiner Betreuung wieder Versuche zur Synthese von DOX aus Pyruvat und Glycerinaldehyd aufgenommen, da dieses Enzym dank eines Histidin-Tag einfach zu reinigen und zur DOX-Synthese wesentlich besser geeignet ist, als Enzymrohextrakte aus Bakterien oder Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex. Das Ziel war, nach Ausbeuteoptimierung mit unmarkierten Substraten ^{13}C -DOX herzustellen als Ersatz für die in Markierungsexperimenten inzwischen weitgehend aufgebrauchte ^2H -DOX. Auch hier gab es jedoch Ausbeuteprobleme, vermutlich wegen der mangelnden Stabilität von DOX auf Kieselgel. Deshalb und auch wegen der viel besseren Umsätze mit dem natürlichen Substrat Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) im Vergleich zu Glycerinaldehyd wurde dann DOXP hergestellt (siehe 2.2.2, S. 36; GEMÜNDE, 2000). Dabei wurde die von TAYLOR *et al.* (1998) beschriebene Strategie beschrrieben, nach der D-Glycerinaldehyd-3-phosphat *in situ* aus Fructose-1,6-bisphosphat mithilfe von Kaninchenmuskel-Aldolase und Triosephosphat-Isomerase erzeugt wird. Vorteile dieser Methode sind der geringe Preis von Fructose-1,6-bisphosphat im Vergleich zu GAP und dass enantiomerenreines D-GAP ohne störende Nebenprodukte (die in käuflichem GAP immer vorhanden sind) zum Einsatz kommt. Die Ausbeuten um 25 % waren für den Einsatz teurer ^{13}C -Substrate zu gering, reichten aber aus, um unmarkiertes DOXP für andere Versuche herzustellen.

Weitere Synthesen

Einfach zugänglich aus $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose war das Gemisch aus $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylitol und $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-lyxitol durch Reduktion mit KBH_4 (siehe 2.2.1, S. 34). Markierungsversuche damit führten jedoch zu keinem Einbau (siehe 4.1.2, S. 81).

Versuche zur Darstellung von $[1-^{13}\text{C}]$ -2-C-Methyl-D,L-erythrono/threono-1,4-lacton durch Cyanhydrinsynthese gelangen nicht. Ein Versagen dieser Strategie berichteten auch KIS *et al.* (2000). Der Grund ist offenbar eine Dehydratisierung des Ausgangsmaterials 3,4-Dihydroxy-2-butanon zu Butan-2,3-dion unter den gegebenen Reaktionsbedingungen.

Synthesen von (R)- $[1,1,4,4-^2\text{H}_4]$ -2-C-Methylbutan-1,2,4-triol, $[1-^2\text{H}_2]$ -3-Methyl-2-buten-1-ol und $[1-^2\text{H}_2]$ -3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat (deutertes DMAPP) gelangen mit Standardmethoden, jedoch konnte auch mit diesen Substraten kein Einbau in Isopren gemessen werden (siehe 4.1.2, S. 81).

4.1.2 Experimente zur Markierung von Isopren

Einbauexperimente mit DOX und MVA in Isopren

Isopren der 7 Pflanzen *Populus nigra* L., *Salix viminalis* L., *Chelidonium majus* L., *Platanus x acerifolia*, *Quercus robur* L., *Robinia pseudoacacia* L. und *Eucalyptus globulus* L. wurde in hohem Maß von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose bzw. dessen Methylglykosid (Me-DOX) markiert (siehe 3.2.1, S. 55; ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997; ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998). Für *Populus nigra* L. wurde in einem größeren Experiment der gleiche Einbaugrad von Me-DOX in Isopren mit ^1H -NMR und GC/MS gefunden (siehe 2.3.2, S. 42). Die Deuteriummarkierung war nur in der Methylgruppe von Isopren nachweisbar. Dadurch wurde der intakte Einbau von DOX in Isopren ohne metabolische Umwege plausibel gemacht (SCHWENDER *et al.*, 1997). Bei *Eucalyptus* gefundene Monoterpene waren nicht von DOX markiert worden. Dies liegt vermutlich daran, dass die Hauptmenge der gefundenen Monoterpene (vorwiegend Cineol) durch das Schneiden der Blattstücke aus internen Speichern freigesetzt wurde und während der Inkubationszeit kaum Neusynthese stattfand.

Der effiziente Einbau von DOX in Isopren ist im Einklang mit einem Vorkommen des DOXP/MEP-Weges in den Plastiden der verwendeten Pflanzen. Die plastidäre Lokalisierung des DOXP/MEP-Weges wurde inzwischen vielfach bestätigt (siehe 4.3.2, S. 106). Deshalb kann man auch umgekehrt sagen, dass der Nachweis des mevalonatunabhängigen Weges für die Isoprenbiosynthese im Einklang mit der plastidäre Lokalisierung der Isoprenbiosynthese ist. Die Isoprensynthese ist im Plastiden lokalisiert (WILDERMUTH und FALL, 1996; 1998).

In *Populus nigra* L. und *Chelidonium majus* L. wurde D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton deutlich schlechter als DOX eingebaut. Selbst ein Zusatz des hochwirksamen HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Cerivastatin führte bei *Chelidonium* zu keinem markanten Einbau von markierter Mevalonsäure, wie man aufgrund der Hemmung der internen MVA-Bildung hätte erwarten können. Auch diese Ergebnisse bestätigen das heutige Kompartimentierungsmodell der zwei IPP-Biosynthesewege, nach welchem der Mevalonatweg im Cytosol/ER und der DOXP/MEP-Weg im Plastiden lokalisiert sind (siehe 4.3.2, S. 106). Schon früher war nur ein sehr geringer Einbau von ¹⁴C-MVA in Isopren aus *Hamamelis virginiana* L. im Vergleich zum Einbau in die Sterole gemessen worden (JONES und RASMUSSEN, 1975). In einem Fall wurde in dieser Arbeit allerdings aus GC/MS-Daten für MVA ein Einbaugrad von etwa 20 % in Isopren aus *Populus nigra* L. abgeschätzt. Einschränkend ist dazu zu sagen, dass die Schätzung des Einbaugrads zum Einen nur recht grob ist (siehe 2.3.2, S. 39). Zum Anderen wurde in der Karlsruher Gruppe ebenfalls einmal ein geringer, nichtreproduzierbarer Einbau von ¹³C-MVA in Isoprenoide der Grünalge *Scenedesmus obliquus*, die den Mevalonatweg nach aller bisherigen Kenntnis überhaupt nicht besitzt, festgestellt (Schwender, persönliche Mitteilung). Vermutlich wurde hier wie im Isoprenexperiment eine ältere Charge ¹³C-MVA verwendet. Diese Probe könnte metabolisch verwertbare Zersetzungsprodukte enthalten haben. Ein geringfügiger „echter“ Einbau von MVA in Isopren kann aber nicht prinzipiell ausgeschlossen werden. Schließlich wurden seit jeher geringe Einbauraten von MVA in plastidäre Isoprenoide gemessen. Ein geringer Austausch¹⁰ zwischen plastidärer und cytosolischer Isoprenoidbiosynthese ist in vielen Fällen gefunden worden (siehe 4.3.2, S. 106), aber offenbar nicht die Regel.

Weitere Einbauexperimente in Isopren

Folgende weitere Verbindungen wurden nicht oder kaum in Isopren eingebaut: [1,1-²H₂]-2-C-Methyl-D,L-erythritol (ME), (R)-[1,1,4,4-²H₄]-2-C-Methylbutan-1,2,4-triol (TRIOL), Na [3-¹³C]-Pyruvat, Na [2-¹³C]-Acetat, NaH¹³CO₃, [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylitol/-lyxitol (XYLIT), [1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ol (DMA) und [1-²H₂]-3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat (DMAPP) (siehe 3.2.2, S. 58). [1,1-²H₂]-2-C-Methyl-D,L-erythritol wurde auch nicht in Isoprenoide aus Grünalgen eingebaut (SCHWENDER, 1999). Dies liegt vermutlich daran, dass der angebotene Alkohol entweder Zellmembranen nicht passiert, oder dass daraus das eigentliche Intermediat 2-C-Methyl-D,L-erythritol-4-phosphat (MEP) nicht gebildet werden kann. Dass MEP eine Zwischenstufe des DOXP/MEP-Weges ist, ist inzwischen für Bakterien und Pflanzen gut belegt (siehe 4.3.2, S. 106). So wurde z.B. freies Methylerythritol von *E. coli* eingebaut und konnte das Wachstum von Mutanten wiederherstellen, denen das DXS- oder DXR-Gen fehlt (DUVOLD *et al.*, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 1998; KUZUYAMA *et al.*, 1999; CHARON *et al.*, 2000).

Den fehlenden Einbau von (R)-[1,1,4,4-²H₄]-2-C-Methylbutan-1,2,4-triol (TRIOL) und [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylitol/-lyxitol kann man heute dadurch erklären, dass weder diese freien

¹⁰ In der englischen Fachliteratur wird in diesem Zusammenhang oft der Begriff „crosstalk“ verwendet, was im Deutschen mit „Übersprechen“ übersetzt werden kann. Dies ist eine unerwünschte Signalübertragung zwischen parallellaufenden Kabeln durch gegenseitige Induktion; sie bewirkt z.B. beim Telefonieren, dass auf einer Leitung geführte Gespräche auf der anderen mitgehört werden können.

Alkohole noch ihre phosphorylierten Formen Zwischenstufen des DOXP/MEP-Weges sind (siehe 4.3.2, S. 106). Ein Phosphatester des Triols lässt sich als Intermediat noch nicht ganz ausschließen, jedoch machen Isotopenstudien anderer Autoren dies sehr unwahrscheinlich (siehe 4.3.2, S. 106). Der nicht messbare Einbau von $[1-^2\text{H}_2]$ -3-Methyl-2-buten-1-ol, der dephosphorylierten Form von deuteriertem DMAPP, könnte wiederum durch das Fehlen von Kinasen erklärt werden, die daraus DMAPP (das Substrat der Isopren-Synthase) bilden können. Das Cyanobacterium *Synechocystis* ist jedoch in der Lage, die Alkohol-Analoga von IPP und DMAPP für die Isoprenoid-Biosynthese zu nutzen (CUNNINGHAM *et al.*, 2000). Ähnliche Versuche mit *E. coli* (CUNNINGHAM *et al.*, 2000) und *Chlamydomonas reinhardtii* (Ergebnisse von Frau Dr. Anja Motel in der Karlsruher Gruppe) waren ebenfalls erfolglos, so dass es vielleicht ein glücklicher Zufall ist, einen Organismus zu finden, der diese Alkohole in aktives Isopren überführen kann. $[1-^2\text{H}_2]$ -3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat (deuteriertes DMAPP) wurde ebenfalls nicht in Isopren eingebaut. Aufgrund ihrer Polarität kann diese Verbindung wohl die Plastidenmembran nicht ohne weiteres überwinden, oder sie wird von Phosphatasen hydrolysiert und kann dann nicht mehr zu DMAPP aktiviert werden.

Na- $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat und Na- $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat wurden beide schlecht in Isopren eingebaut in Übereinstimmung mit älteren Experimenten (JONES und RASMUSSEN, 1975). Mit Pyruvat und Acetat als zentralen Intermediaten des Stoffwechsels, die leicht in alle möglichen Zwischenstufen überführt werden könnten, lassen sich über reine Messungen des Markierungsgrades ohnehin keine tieferen Erkenntnisse über die IPP-Biosynthese gewinnen. $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ wurde übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (DELWICHE und SHARKEY, 1993) schnell in Isopren eingebaut, ein weiterer Beleg für die plastidäre Lokalisierung und Kopplung der Isoprenbiosynthese an die Photosynthese.

Zusammenfassung der Isopren-Markierungsexperimente

Die Markierungsexperimente mit Isopren belegen einerseits durch den spezifischen Einbau von DOX, dass Isopren nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet wird, andererseits zeigen sie auch die Grenzen von *in vivo*-Markierungsexperimenten mit spezifischen Vorläufern zur Aufklärung des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese auf. Alle Intermediate des mevalonatunabhängigen Weges sind phosphoryliert und somit ionischer Natur. Solche hochpolaren Verbindungen können in der Regel nicht durch Biomembranen diffundieren und sind daher für Markierungsexperimente mit intakten Geweben wenig geeignet. Die entsprechenden freien Alkohole sind ebenfalls noch sehr polar (wenn auch nicht ionisch) und können unter Umständen nur in geringer Konzentration in die Zellen und in die Plastiden gelangen. Außerdem müssen sie durch Kinasen phosphoryliert werden, um in den Stoffwechselweg eingeschleust werden zu können. Wenn der untersuchte Organismus keine Kinasen enthält, die in der Lage sind, die unnatürlichen Substrate zu aktivieren, kann kein Einbau gemessen werden. Der effiziente Einbau von 1-Deoxy-D-xylulose erscheint als ein Glücksfall und kann nur mit dem Vorhandensein einer Kinase erklärt werden, die DOX als Substrat akzeptiert. Das Methylglykosid von DOX wurde ebenfalls gut in Isopren eingebaut. Diese Verbindung ist weniger polar als DOX und kann deshalb möglicherweise Biomembranen leichter passieren. Die Methylgruppe wird in der Zelle vermutlich von unspezifischen Glykosidasen abgespalten, wobei dann DOX entsteht.

Dass Isopren aus DOXP gebildet wird und nicht aus Mevalonsäure, wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt und auch publiziert wurde (ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997; ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998) ist in der wissenschaftlichen Literatur inzwischen allgemein akzeptiert (siehe z.B. KESSELMEIER und STAUDT, 1999). Weiterer Beleg dafür ist, dass die Isoprenemission durch Fosmidomycin, dem Hemmstoff der DOXP-Reduktoisomerase, dem zweiten Enzym des DOXP/MEP-Weges, gehemmt wird, nicht aber

durch Statine, welche die Bildung von MVA hemmen (siehe 3.3.1, S. 60; 3.2.1, S. 55; 4.2, S. 85). Es ist von großem Interesse für die Modellierung der Isoprenemission (z.B. für exaktere regionale Ozon-Vorhersagen während des Sommers) den enzymatischen Mechanismus zu kennen, denn biochemisch basierte Modelle scheinen rein empirischen Modellen an Genauigkeit überlegen zu sein. Deshalb wird heute solchen Modellierungen der DOXP/MEP-Weg anstelle des Mevalonatwegs zugrundegelegt (NIINEMETS *et al.*, 1999; ZIMMER *et al.*, 2000).

4.1.3 Experimente zur Markierung von 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO)

Einbauexperimente mit DOX und MVA in MBO

Während viele Laubbäume Isopren emittieren, geben *Pinus ponderosa* L. und andere nordamerikanische Fichten das Hemiterpen 2-Methyl-3-buten-2-ol (MBO) in die Atmosphäre ab. [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose wurde gut in MBO aus *Pinus ponderosa* L. eingebaut, D,L-[2-¹³C]-Mevalonsäurelacton jedoch nicht (siehe 3.4.1, S. 66). Dies ist im Einklang mit einer Bildung von MBO nach dem DOXP/MEP-Weg. Unterstützt wird dies weiterhin durch die Hemmung der Methylbutenolemission durch Fosmidomycin (siehe 3.4.2, S. 68; 4.2.2, S. 86). Neben Isopren (diese Arbeit) sowie den hemiterpenen Einheiten in den Furanocumarinen von *Apium graveolens* (STANJEK *et al.*, 1999), der Bittersäure Humulon aus *Humulus lupulus* (GOESE *et al.*, 1999) und der Dimethylallyl-Seitenkette des Flavanons Gabrol aus *Gycyrrhiza glabra*-Haarwurzelkulturen (ASADA *et al.*, 2000) wurde mit 2-Methyl-3-buten-2-ol in dieser Arbeit für ein weiteres pflanzliches Hemiterpen gezeigt, dass es auf dem mevalonatunabhängigen Biosyntheseweg gebildet wird. Die MBO-Produktion von nordamerikanischen Kiefern ist wie die Isoprenemission licht- und temperaturabhängig (HARLEY *et al.*, 1998) und hat (zumindest lokal) möglicherweise einen ähnlichen Einfluss auf die Atmosphärenchemie wie Isopren (SCHADE *et al.*, 2000). Der enzymatische Bildungsmechanismus von MBO aus DMAPP ist vermutlich ebenfalls mit dem von Isopren verwandt (FISHER *et al.*, 2000). Dass MBO eine ähnliche physiologische Funktion in der Thermoprotektion des Photosyntheseapparates erfüllt wie Isopren, wäre eine weitere Parallele, deren Nachweis jedoch noch aussteht.

4.1.4 Experimente zur Markierung von Monoterpenen

Von Pistazien- und Eukalyptusblättern emittierte Monoterpene und in Fichtenkeimlingen akkumulierte Monoterpene wurden von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose nicht markiert (siehe 3.5, S. 69). Vermutlich werden die Monoterpene aus Pistazie nicht in kurzer Zeit licht- und wärmeabhängig neusynthetisiert, wie dies bei Isopren der Fall ist, sondern über längere Zeiträume gebildet und gespeichert und nur temperaturabhängig (nicht lichtabhängig) emittiert (HANSEN *et al.*, 1997). Dies scheint bei Monoterpenemissionen der häufigere Fall zu sein (KESSELMEIER und STAUDT, 1999). Sofern DOX überhaupt zum Zielort gelangen und von Pistazie phosphoryliert werden kann, könnte die Markierung dadurch unter die Nachweisgrenze verdünnt werden. Bei der Messung des Einbaus von DOX in Isopren aus *Eucalyptus* per SPME-GC/MS wurden auch emittierte Monoterpene (hauptsächlich Cineol) detektiert, die im Gegensatz zu Isopren nicht markiert wurden. Für *Eucalyptus* muss man annehmen, dass DOX zwar aufgenommen und phosphoryliert wurde (siehe 3.2.1, S. 55, Einbau in Isopren), jedoch wenig Monoterpen-Neusynthese stattfand. In einer ähnlichen Studie einer anderen Arbeitsgruppe wurde Cineol aus *Eucalyptus* ebenfalls nicht von DOX markiert (PIEL *et al.*, 1998). Eine weitere Arbeitsgruppe fand selbst nach fünf Tagen Inkubationszeit von *Eukalyptus*-Zweigen mit DOX einen mittels ¹³C-NMR bestimmten

Einbau von nur 0,6 % in das aus den Blättern isolierte Cineol (RIEDER *et al.*, 2000). Die Autoren erklärten den mangelnden Einbau damit, dass von vornherein eine große Menge des Monoterpens in den Blättern vorlag und kaum Neusynthese stattfand. Bei den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten GC/MS-Analysen musste ein Markierungsgrad von mindestens 5-10 % erreicht werden, um einen Einbau deutlich nachweisen zu können. Bei den Versuchen, Monoterpene in steril angezogenen Fichtenkeimlingen mit DOX zu markieren, wurde ebenfalls kein Einbau festgestellt. DOX konnte wahrscheinlich entweder nicht über die Wurzeln aufgenommen und/oder phosphoryliert werden, oder die Bildung des etherischen Öls aus Speicherstoffen des Samens war schon in den ersten Tagen der Keimung vor der Zugabe von DOX weitgehend abgeschlossen, so dass dann nicht mehr genügend Neubildung von Monoterpenen stattfand, um einen Einbau zu messen.

Trotz dieser negativen Ergebnisse erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die untersuchten Pflanzen ihre Monoterpene vorwiegend nach dem Mevalonat-Weg erzeugen. Die inzwischen gesammelten Belege für den DOXP-Weg in Plastiden verschiedenster Pflanzen sind zu zahlreich (siehe 4.3.2, S. 106). Monoterpene verschiedener höherer Pflanzen und Lebermoose werden eindeutig mevalonatunabhängig gebildet (EISENREICH *et al.*, 1997; ADAM *et al.*, 1998; PIEL *et al.*, 1998; FOWLER *et al.*, 1999). Dennoch treten in manchen Fällen Schwierigkeiten bei Markierungsstudien auf wie z.B. zu geringe Neusynthesen während der Inkubationszeiten oder eine effizientere Nutzung endogener Vorstufen im Vergleich zu exogen angebotenen Substanzen. SCHWENDER (1999) berichtete z.B., dass [1-¹³C]-Glucose in vom Endosperm getrennte Gerstensprosse ineffizient eingebaut wurde und dass ein Einbau von [1-²H₁]-1-Deoxy-D-xylulose in Lycopin in reifenden Tomaten nicht messbar war, obwohl durch Einbau von [1-¹³C]-Glucose und ¹³C-NMR-Untersuchung sowie Hemmung der Lycopin-Bildung durch Fosmidomycin der DOXP/MEP-Weg für Lycopin klar nachgewiesen wurde. Verschiedene Grünalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii* und *Klebsormidium flaccidum* inkorporierten DOX auch vergleichsweise schlecht (SCHWENDER, 1999). Sehr geringe Einbauquoten ¹³C- oder ¹⁴C-markierter DOX wurden ebenfalls für Monoterpene aus *Mentha x piperita*, *Pelargonium graveolens* und *Thymus vulgaris* berichtet (SAGNER *et al.*, 1998b).

4.2 Hemmung der Biosynthese von Isopren und anderen Isoprenoiden

Verschiedene organische Substanzen wurden auf eine mögliche Hemmung der Isoprenemission hin untersucht (siehe Abbildungen 3-3, 3-4 und 3-5). Einige wurden auch an anderen Testsystemen der Isoprenoidbiosynthese untersucht. Ziel dieser Versuche war es, Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges zu finden, die zur weiteren Untersuchung dieses Stoffwechsels nützlich sein könnten. Da der Isoprentest nicht für ein Hochdurchsatz-Screening eingerichtet ist, wurden hauptsächlich ausgewählte Substanzen untersucht, bei denen ein „Verdacht“ auf Hemmung der Isoprenemission bestand. Im Folgenden werden die Überlegungen angegeben, die zur Untersuchung dieser Stoffe führten, und die Ergebnisse diskutiert.

4.2.1 Statine als spezifische Hemmstoffe des Mevalonatwegs

Spezifische¹¹ Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase, die Statine, werden in großem Umfang als Medikamente zur Prophylaxe und Therapie der Arteriosklerose eingesetzt (vgl. z.B. MANNS, 1999). Auch in der biochemischen Grundlagenforschung sind Statine ein Standardwerkzeug zur Untersuchung des Acetat-Mevalonat-Weges der IPP-Biosynthese und wurden schon zu Beginn der 1980er Jahre bei Pflanzen eingesetzt (BACH und LICHTENTHALER, 1983). Deshalb wurde in dieser Arbeit als Ergänzung der Markierungsstudien und der Hemmversuche mit Fosmidomycin (siehe 4.2.2, S. 86) die Wirkung verschiedener Statine auf die Isoprenemission untersucht. Mevinolin (= Lovastatin), Compactin und Cerivastatin (Abbildung 3-3) hatten bei Pappeln (siehe 3.3.1, S. 60) und Platanen (siehe 3.2.1, S. 55) keinen Effekt auf die Isoprenemission. Dies ist im Einklang mit den übrigen Experimenten und bestätigt, dass Isopren mevalonatunabhängig gebildet wird. Cerivastatin in sehr hoher Konzentration (1 mM) führte bei Platane zwar zu einer Hemmung der Isoprenemission, jedoch zu keiner totalen, obwohl die Blätter am Rand bereits braun verfärbt waren und somit offenbar unspezifische oder indirekte Effekte auf die Isoprenbildung aufgetreten waren. Cerivastatin ist der bisher wirksamste HMG-CoA-Reductase-Hemmer mit einer bis zu 200fach höheren Affinität zu diesem Enzym als andere Substanzen (HELLWIG, 1997; MANNS, 1999). Seine prinzipielle Wirksamkeit bei Pflanzen wurde durch die drastische Hemmung des Wurzelwachstums und des Wachstums der Seitenwurzeln von Radieschen bestätigt (siehe 2.7.4, S. 51). Dieser Effekt ist typisch für die Wirkung von Mevinolin auf Radieschen (BACH und LICHTENTHALER, 1983).

4.2.2 Fosmidomycin als spezifischer Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese

Zu Fosmidomycin hinführende Überlegungen

Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Hemmstoffe des DOXP/MEP-Weges bekannt. Selbst die Kenntnis des Biosyntheseweges an sich war noch nicht sehr weit verbreitet. Deshalb wurden von mir Literaturrecherchen durchgeführt, um Hinweise auf Antibiotika und Herbizide zu erhalten, die Biosynthesen von Isoprenoiden hemmen, deren Wirkungsmechanismus jedoch noch nicht bekannt war. Von Hemmstoffen des mevalonatunabhängigen Weges war einerseits zu erwarten, dass sie die Chlorophyll- und Carotinoidakkumulation in Pflanzen oder Algen blockieren würden (siehe 4.2.3, S. 91), und andererseits, dass sie die Isoprenoidbiosynthesen bestimmter Bakterien hemmen sollten, die ebenfalls den DOXP/MEP-Weg besitzen (siehe 1.5, S. 24). Bei Bakterien, die nur den DOXP/MEP-Weg enthalten, war eine lethale Wirkung zu erwarten, da Isoprenoide viele essentielle Funktionen erfüllen. Deshalb fiel insbesondere eine Arbeit mit dem Titel „Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic“ auf (SHIGI, 1989). Dort wurde beschrieben, dass das Antibiotikum Fosmidomycin (FR-31564), welches von der Fujisawa Pharmaceutical Co. aus *Streptomyces lavendulae* isoliert worden war (OKUHARA *et al.*, 1980), bei wachsenden *E. coli*-Zellen zur Bildung von Sphäroplasten, kugelförmig geschwollenen Zellen, führte, ein Zeichen für eine gestörte Zellwandbiosynthese. Bakterien benötigen zur Zellwandbiosynthese das Isoprenoid Undecaprenylpyrophosphat zum Transport von Zuckern. Weiterhin wurde berichtet, dass der

¹¹ Dass Statine möglicherweise nicht immer so spezifisch sind, wurde von RAO *et al.* (1999) gezeigt: Die Hemmung des Zellzyklus einer Tumor-Zelllinie durch die Lactonform von Lovastatin beruhte auf einer Hemmung des Proteasoms. HMG-CoA-Reduktase (HMGR) wurde nicht gehemmt. Die hydrolysierte Form mit offenem Ring hemmte dagegen die HMGR (Cerivastatin enthält ebenfalls einen geöffneten Ring).

Gehalt an Menachinonen und Ubichinonen in wachsenden *E. coli*-Zellen durch Fosmidomycin vermindert wurde. Außerdem wurde eine Hemmung der Carotinoid- und Menachinon-Biosynthese in *Micrococcus luteus* beschrieben. Damit lag es nahe, zu vermuten, dass Fosmidomycin die Bildung einer frühen Isoprenoidvorstufe hemmte. Shigi hielt Farnesylpyrophosphat für den wahrscheinlichsten Kandidaten. Die erstaunlichste Beobachtung von Shigi war jedoch, dass verschiedene Bakterienspezies, die in der Lage waren, ¹⁴C-Mevalonat aufzunehmen, resistent gegenüber Fosmidomycin waren. Andere Bakterien zeigten ein umgekehrtes Verhalten: Sie konnten kaum Mevalonsäure inkorporieren, waren jedoch empfindlich gegenüber Fosmidomycin. Diese klare Korrelation zwischen der Unfähigkeit Mevalonsäure aufzunehmen und der Fosmidomycin-Suszeptibilität wurde von Shigi so interpretiert, dass die Fosmidomycin-empfindlichen Bakterien auf eine eigene Isoprenoidbiosynthese angewiesen seien, da sie auch keine anderen Isoprenoide wie z.B. Deoxycholsäure aufnehmen könnten. Angesichts der Existenz eines zweiten Biosyntheseweges für Isoprenoidvorstufen, der 1989 aber noch nicht bekannt war, ergab sich aus den eigenen Überlegungen jedoch eine plausiblere Vermutung für den Wirkungsmechanismus von Fosmidomycin: Fosmidomycin-resistente Bakterien könnten den Mevalonatweg besitzen, Fosmidomycin-sensitive Bakterien dagegen den DOXP/MEP-Weg, welcher von Fosmidomycin gehemmt wird.

Unterstützt wurde diese Vermutung durch Patente, die Fosmidomycin eine herbizide Wirksamkeit bescheinigten (PATTERSON, 1997; KAMURO *et al.*, 1988). Als physiologische Wirkung von Fosmidomycin wurde eine Hemmung der Chlorophyllproduktion angegeben, die zu Chlorosen führe (KAMURO *et al.*, 1988). Die Phytolseitenkette von Chlorophyll wird nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet (siehe 4.3.2, S. 106).

Eine Reihe anderer Überlegungen machte es möglich, die Vermutung weiter einzugrenzen und als Wirkort von Fosmidomycin die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) anzunehmen. DXR ist das zweite Enzym des DOXP/MEP-Weges (siehe 4.3.2, S. 106). Die DXR katalysiert eine Umlagerung der linearen C₅-Kette von DOXP mit einer anschließenden NADPH-abhängigen Reduktion. Produkt der Reaktion ist 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, das erste Intermediat mit derselben verzweigten Struktur wie IPP. Einen analogen Reaktionsmechanismus hat die Ketolsäure-Reduktoisomerase (KARI, *ketol acid reductoisomerase*). KARI katalysiert einen Schritt in der Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Für KARI existiert ein spezifischer, hochwirksamer Hemmstoff, das Übergangszustands-Analogon N-Isopropyl-Oxalylhydroxamat (IpOHA), welches aus theoretischen Überlegungen heraus synthetisiert wurde (AULABAUGH und SCHLOSS, 1990). Wenn man diese Überlegungen auf den Übergangszustand der DXR überträgt, erhält man Strukturen, die Fosmidomycin sehr ähnlich sind (siehe Abbildung 4-1). Sinnvoll ist hier der Ersatz der Phosphatgruppe durch eine isostere Phosphonatgruppe mit einer C-P-Bindung anstelle einer O-P-Bindung, da Phosphonate nicht von ubiquitären Phosphatasen gespalten werden können und somit eine längere Lebensdauer im Zielorganismus haben als Phosphate. Substanzen mit einer C-P-Bindungen werden häufig als synthetische Hemmstoffe eingesetzt (ENGEL, 1977; BLACKBURN, 1981; LABER und AMRHEIN, 1987; BAILLE *et al.*, 1988; CUSHMAN *et al.*, 1999; CROMARTIE *et al.*, 1999; KELLER und FLIESLER, 1999; BERGSTROM *et al.*, 2000), kommen aber auch natürlich vor, wie z.B. Fosmidomycin und Fosfomycin (KANIMOTO und GREENWOOD, 1987), Phosphinothricin (vgl. RAY, 1989) und Phosphonotrixin (NAKAMURA *et al.*, 1999)¹².

¹² Eine weitere im Hinblick auf die alternative IPP-Biosynthese interessante Verbindung ist 3-Hydroxy-4-oxobutyl-1-phosphonat, ein isosteres Analogon zu Glycerinaldehyd-3-phosphat. Das Phosphonat hemmt das Wachstum von *E. coli* auf Succinat, nicht aber auf Glucose als Kohlenstoffquelle (GOLDSTEIN *et al.*, 1974; TANG

Weitere Hemmstoffe, die Strukturen analog zu IpOHA besitzen, sind Übergangszustandsanaloga bei der Triosephosphat-Isomerase-Reaktion sowie der Isomerisierung von Xylose zu Xylulose und von Glucose zu Fructose (ALLEN *et al.*, 1995; GAUDEMER *et al.*, 1996). Es handelt sich hier wie bei Fosmidomycin und IpOHA um Hydroxamsäurederivate. Man nimmt an, dass die N(OH)-C=O Gruppierung an der Komplexierung zweiwertiger Metallkationen im aktiven Zentrum beteiligt ist (BIOU *et al.*, 1997).

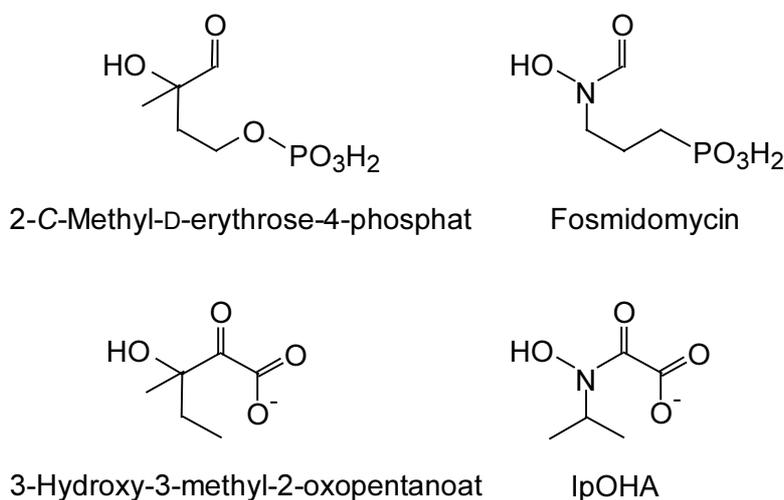


Abbildung 4-1 Hemmung von 2 Reduktoisomerasen durch Strukturanaloga. 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat, ein mutmaßliches Zwischenprodukt der Umsetzung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, die von DOXP-Reduktoisomerase (DXR) katalysiert wird, ist ein Strukturanalogon zu Fosmidomycin, einem Hemmstoff der DXR. 3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoat, ein mutmaßliches Zwischenprodukt der Umsetzung von 2-Aceto-2-hydroxybutyrat zu 2,3-Dihydroxy-3-methylvalerat, die von Ketolsäure-Reduktoisomerase (KARI) katalysiert wird, ähnelt in analoger Weise IpOHA, einem Hemmstoff der KARI. 3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoat ist ein Vorläufer von Isoleucin. KARI katalysiert auch die Reaktion von 2-Acetylactat zu 2,3-Dihydroxy-3-isovalerat für die Biosynthesen von Valin und Leucin. KARI ist wie DXR eine Reduktoisomerase mit C-Skelett-Umlagerung.

Als 1998 Experimente mit Fosmidomycin durchgeführt werden sollten, war die Substanz noch nicht kommerziell erhältlich. Eine von der Firma BASF im Juli 1998 zur Verfügung gestellte Probe synthetischen Fosmidomycins war von so geringer Reinheit, dass damit keine erfolgreichen Versuche durchgeführt werden konnten. Daraufhin wurde mit Herrn Dr. Jomaa, Universität Giessen, eine Kooperation begonnen, um den Wirkungsmechanismus von Fosmidomycin aufzuklären. Zuvor hatte sich Herr Dr. Jomaa schon mit unserer Arbeitsgruppe in Verbindung gesetzt, um zu beraten, wie der DOXP/MEP-Weg in dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* nachgewiesen werden könnte. Dazu hatten wir ihm eine Probe Deuterium-markierter 1-Deoxy-D-xylulose zukommen lassen. Herr Dr. Jomaa hatte in unabhängiger Arbeit Fosmidomycin ebenfalls als möglichen Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges erkannt und konnte uns die Substanz für Experimente zur Verfügung stellen.

et al., 1979). Der Wirkungsmechanismus ist noch unbekannt. Eine offene Frage ist auch, ob die Enzyme des alternativen IPP-Weges Phosphonate als Substrate akzeptieren.

Hemmung der Isoprenemission durch Fosmidomycin

Auf dem Hintergrund obiger Überlegungen wurden zunächst Hemmtests mit Isopren durchgeführt. Zum Testen von Hemmstoffen an der Isoprenemission war eine einfache Methode basierend auf der UV-Absorption gasförmigen Isoprens entwickelt worden (ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998). In Abschnitt 3.1 (S. 53) wurden bereits Gründe genannt, weshalb Isopren ein besonders geeignetes Modell zur Untersuchung der pflanzlichen IPP-Biosynthese ist. Insbesondere lassen sich bei Hemmexperimenten spätere Schritte der Isoprenoidbiosynthese nach der IPP-Isomerase, die z.B. für die Carotinoidbiosynthese nötig sind, als mögliche Zielorte von vornherein ausschließen¹³. Da es hier um den Nachweis einer Hemmung des DOXP/MEP-Weges durch Fosmidomycin ging, war eine Voraussetzung zum sinnvollen Einsatz des Isoprentests, dass Isopren auch auf dem DOXP/MEP-Weg entsteht. Dies war zuvor durch Markierungsexperimente gezeigt worden (4.1.2, S. 81). Es zeigte sich, dass Fosmidomycin ein effizienter Hemmstoff der Isoprenemission von *Populus nigra* L., *Chelidonium majus* L. und *Platanus x acerifolia* ist. Auch das Fosmidomycin-Derivat FR-900098 hemmte die Isoprenemission von *Platanus x acerifolia* (siehe 3.3.1, S. 60; ZEIDLER *et al.*, 1998). Nach dem oben Gesagten schränkten diese Ergebnisse den Wirkort von Fosmidomycin mit großer Wahrscheinlichkeit auf den DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese ein.

Weitere Hemmtests mit Fosmidomycin

Solange noch kein Enzymtest für die DXR zur Verfügung stand, wurden von der Karlsruher Gruppe zur näheren Untersuchung von Fosmidomycin weitere *in vivo*-Tests und Hemmversuche mit DOXP-Synthase (DXS), dem ersten Enzym des DOXP/MEP-Weges, durchgeführt. Von Jörg Schwender wurde gezeigt, dass die Biosynthese von Chlorophyllen und Carotinoiden in etiolierten, ergrünenden Gerstensprossen und in sich vermehrenden *Lemna gibba*-Pflanzen durch Fosmidomycin gehemmt wird, ebenso wie die Biosynthese des Carotinoids Lycopin in reifenden Tomaten (ZEIDLER *et al.*, 1998). Von Christian Müller wurde gezeigt, dass Wachstum und Pigmentakkumulation der Rotalge *Cyanidium caldarium* durch Fosmidomycin gehemmt wurden. Das erste Enzym des DOXP/MEP-Weges, die DXS aus *E. coli*, wurde von Fosmidomycin-Konzentrationen bis zu 1 mM nicht gehemmt (ZEIDLER *et al.*, 1998). Die bisher erwähnten Hemmeffekte waren im Konzentrationsbereich 5×10^{-6} bis 5×10^{-5} M sichtbar. In weiteren Experimenten mit Isopren wurde gezeigt, dass die Hemmung der Isoprenemission durch Fosmidomycin bei Platane durch hohe Konzentrationen an DOX, nicht aber MVA, wieder aufgehoben werden kann (siehe 3.3.1, S.60; ZEIDLER *et al.*, 1998). Weiter wurde gezeigt, dass mit Fosmidomycin im Gegensatz zu Wasserkontrollen ein Anstieg von exogener DOX in Platanenblättern erreicht werden kann (3.6.3, S. 77 und ZEIDLER *et al.*, 1998). Desweiteren wurde eine Hemmung der Methylbutenolemission von *Pinus ponderosa* (siehe 3.4.2, S. 68) und eine Wachstumshemmung bei *Chlamydomonas* durch Fosmidomycin gezeigt (siehe 3.6.2, S. 73). Die Hemmung der MBO-Emission war erst bei relativ hoher Konzentration messbar. Vielleicht liegt dies an schlechter Aufnahme oder einer geringen Empfindlichkeit des Zielenzym 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR):

¹³ Einschränkung sei hier bemerkt, dass sich beim Isoprenhemmtest mögliche Zielorte vor der IPP-Biosynthese nicht ausschließen lassen. Insbesondere Photosynthesehemmstoffe wie DCMU blockieren aufgrund der engen metabolischen Kopplung zwischen Photosynthese und Isoprenbildung und der fehlenden Bereitstellung von photosynthetisch gebildetem ATP und NADPH auch die Isoprenemission (siehe 4.2.5, S. 101). Dies kann aber auch vorteilhaft sein, wenn mit einer schnellen Methode nach einer Hemmwirkung mit einem breiteren Spektrum möglicher Wirkmechanismen gesucht werden soll. So wurde der Isoprenhemmtest in Patenten kürzlich als Herbizid-Screening-Methode erwähnt (JOMAA, 2000b; 2000c).

Für verschiedene Organismen wurden sehr unterschiedliche *in vitro*-Hemmkonzentrationen berichtet (siehe nächster Abschnitt).

Alle diese Experimente sind in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass Fosmidomycin den DOXP/MEP-Weg, und insbesondere die DXR hemmt. Die Aufhebung der Isoprenhemmung durch DOX wäre erklärbar, wenn sich Fosmidomycin als kompetitiver oder gemischter Inhibitor gegenüber DOXP verhielte und durch Inkubation mit hohen Konzentrationen DOX auch hohe Konzentrationen an DOXP im Gewebe erreicht würden. Wie im nächsten Abschnitt beschrieben, gibt es Hinweise darauf, dass Fosmidomycin die DXR kompetitiv oder gemischt hemmt.

1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase wird von Fosmidomycin gehemmt

Die Vermutung, dass Fosmidomycin die DXR hemmt, konnte schließlich bestätigt werden, nachdem von Christian Müller im Rahmen seiner noch laufenden Doktorarbeit in der Karlsruher Arbeitsgruppe ein Enzymtest für DXR entwickelt worden war: Das aus Gerstenkeimlingen isolierte Enzym wurde von Fosmidomycin mit einem IC_{50} -Wert von 0,7 μ M bei einer DOXP-Konzentration von 0,5 mM (MÜLLER *et al.*, 2000) gehemmt. Nachdem Jörg Schwender während seiner Doktorarbeit die DXR aus *Arabidopsis thaliana* kloniert hatte (SCHWENDER, 1999; SCHWENDER *et al.*, 1999), konnte auch für diese eine Hemmung durch Fosmidomycin gezeigt werden (SCHWENDER *et al.*, 1999; IC_{50} 0,28 μ M bei 0,25 mM DOXP, Müller *et al.*, 2000). Während der Karlsruher Experimente zu Fosmidomycin, die in der Arbeit von ZEIDLER *et al.* (1998) beschrieben wurden, veröffentlichten KUZUYAMA *et al.* (1998) in einer unabhängigen Arbeit, dass Fosmidomycin rekombinante DXR aus *E. coli* hemmt (IC_{50} 8,2 nM, K_i 38 nM bei 0,3 mM DOXP). Die Hemmung des Wachstums von *E. coli* durch Fosmidomycin konnte mit 2-C-Methyl-D-erythritol wieder aufgehoben werden (KUZUYAMA *et al.*, 1998). Außerdem wurde in einer gemeinsamen Publikation der Karlsruher Arbeitsgruppe mit der Arbeitsgruppe von Dr. Hassan Jomaa, Universität Giessen, die Hemmung von rekombinanter DXR aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* durch Fosmidomycin und sein Derivat FR-900098 beschrieben (IC_{50} ca. 40 nM bzw. 10 nM, JOMAA *et al.*, 1999b). Eine Hemmung der DXR wurde inzwischen ebenfalls gefunden für das rekombinante Enzym aus dem Cyanobakterium *Synechococcus leopoliensis* (IC_{50} 7,5 μ M, MILLER *et al.*, 2000), aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (IC_{50} 0,15 μ M bei 1 mM DOXP, ALTINCICEK *et al.*, 2000) und dem Bakterium *Zymomonas mobilis* (K_i 0,6 μ M, GROLLE *et al.*, 2000). Für *Capsicum annuum*-Chromoplasten wurde gezeigt, dass Fosmidomycin den Einbau von 14 C-DOXP in β -Carotin hemmt, aber nicht den Einbau von 3 H-MEP (2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat) (FELLERMEIER *et al.*, 1999). Die Bildung von MEP aus DOXP in *Capsicum*-Chromoplasten wurde ebenfalls von Fosmidomycin gehemmt (FELLERMEIER *et al.*, 1999). Der kinetische Hemmtyp von Fosmidomycin ist noch unklar. Für DXR aus *E. coli* wurde gemischte Hemmung angegeben, die Originaldaten (Lineweaver-Burk-Plots) wurden aber nicht veröffentlicht (KUZUYAMA *et al.*, 1998). Das Enzym aus *Z. mobilis* soll kompetitiv gehemmt werden, allerdings wurden auch hier die Messdaten nicht angegeben (GROLLE *et al.*, 2000).

Fosmidomycin: Hilfsmittel in der Grundlagenforschung und potentiell es Medikament

Fosmidomycin und seine Derivate als spezifische Hemmstoffe des mevalonatunabhängigen IPP-Biosyntheseweges werden in Zukunft möglicherweise eine ähnliche Rolle spielen wie die Statine als Hemmstoffe des Mevalonatweges: Als nützliche Werkzeuge in der Grundlagenforschung und vielversprechende Medikamente. Das in Vergessenheit geratene Antibiotikum und Herbizid Fosmidomycin ist seit kurzem sogar als Feinchemikalie im

Handel. Fosmidomycin bietet eine einfache Möglichkeit, den DOXP/MEP-Weg für die Biosynthesen verschiedener Isoprenoide in verschiedenen Organismen nachzuweisen. Auf diese Art wurde z.B. kürzlich gezeigt, dass die Grünalge *Haematococcus pluvialis* ihre außerhalb der Plastiden akkumulierten Sekundäracarotinoide nach dem DOXP/MEP-Weg bildet (IC₅₀ 50 µM *in vivo*, HAGEN und GRÜNEWALD, 2000). Eine weitere Forschungsanwendung von Fosmidomycin liegt darin, physiologische Effekte bestimmter Isoprenoide, die mevalonatunabhängig gebildet werden, zu untersuchen. Z.B. gelang es T. Sharkey kürzlich, mithilfe von Fosmidomycin die Thermotoleranz-Hypothese der Isoprenemission zusätzlich zu untermauern (siehe 1.6, S. 25).

Da der DOXP/MEP-Weg in Eubakterien bei weitem häufiger vorzukommen scheint als der Mevalonatweg (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000), ist seine Hemmung eine verfolgenswerte Strategie zur Bekämpfung zahlreicher Infektionskrankheiten, insbesondere da der DOXP/MEP-Weg auch bei sehr vielen pathogenen Bakterien vorkommt (LICHTENTHALER *et al.*, 2000). Besonders interessant ist ein erster Schritt zur Entwicklung neuer Medikamente gegen den parasitären, eukaryontischen Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* ist ein Vertreter der Apikomplexa, welche einen rudimentären Plastiden enthalten, der vermutlich auf eine sekundäre Endosymbiose mit einer Alge zurückgeht (siehe FICHERA und ROOS, 1997). Offenbar enthält dieser Apicoplast den (zumindest für *Plasmodium*) essentiellen DOXP/MEP-Weg. Fosmidomycin und sein Derivat FR-900098 hemmten die rekombinante DOXP-Reduktoisomerase aus *P. falciparum*, sie hemmten das Wachstum verschiedener mehrfach resistenter *P. falciparum*-Stämme *in vitro* und konnten mit dem verwandten *Plasmodium vinckei* infizierte Mäuse vollständig heilen. Unbehandelte Tiere starben. Fosmidomycin ist beim Menschen gut verträglich (JOMAA *et al.*, 1999b und Zitate). Fosmidomycin ist das erste aussichtsreiche Beispiel dafür, dass der DOXP/MEP-Weg Angriffspunkte zur Entwicklung neuer Antibiotika und Herbizide bietet (siehe 1.5, S. 24).

Der Wirkungsmechanismus von Fosmidomycin als Antibiotikum beruht möglicherweise nicht nur primär auf einer Hemmung des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese, sondern könnte das Immunsystem mit einbeziehen: Eine bestimmte Klasse von T-Zellen, die V γ 9/V δ 2 T-Lymphocyten, werden durch verschiedene niedermolekulare, phosphorylierte Antigene, die keine Proteine sind, aktiviert (siehe KABELITZ *et al.*, 2000). IPP ist ein Vertreter dieser Phosphoantigene. Offenbar sind jedoch Intermediate des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese wesentlich aktiver als IPP selbst (JOMAA *et al.*, 1999a). Ein potentieller Vorläufer von IPP, der nach dem mevalonatunabhängigen Weg entstehen könnte und als potentes Phosphoantigen im nanomolaren Bereich wirkt, wurde aus *Mycobacterium fortuitum* isoliert und als 3-Formyl-1-butylpyrophosphat identifiziert (BELMANT *et al.*, 1999). Welche Funktion die V γ 9/V δ 2 T-Lymphocyten genau ausüben und wie diese durch Fosmidomycin beeinflusst wird, ist noch unklar. Die Aktivierung von V γ 9/V δ 2 T-Zellen könnte jedoch eine zusätzliche Strategie zur Identifizierung weiterer Intermediate des DOXP/MEP-Weges aus Bakterien, Apikomplexa und Pflanzen sein. Möglicherweise werden sich auch neue Therapiemöglichkeiten (bzw. neue Erklärungen für bekannte Therapien) mit pflanzlichen Phosphoantigen-Extrakten ergeben, z.B. aus Misteln (FISCHER *et al.*, 1996).

4.2.3 Das Herbizid Clomazone und Derivate

Zu Clomazone hinführende Überlegungen

2-(2-Chlorbenzyl)-4,4-dimethylisoxazolidinon, auch bekannt als FMC 57020, Command, Dimethazone oder unter dem neueren Namen Clomazone (siehe Abbildung 4-2), ist ein selektives Herbizid, das Bleichsymptome und verringerte Chlorophyll- und Carotinoidgehalte bei suszeptiblen Pflanzen hervorruft. Seit seiner Einführung vor etwa 15 Jahren ist Clomazone

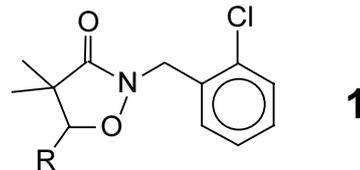
eingehend untersucht worden. Bisher konnte jedoch noch kein Wirkungsmechanismus bestimmt werden. Clomazone beeinträchtigt die Bildung plastidärer Isoprenoide stärker als die Biosynthese außerplastidärer Isoprenoide (SANDMANN und BÖGER, 1987). Von SANDMANN und BÖGER (1986; 1987) wurde vorgeschlagen, dass Clomazone ein Enzym zwischen IPP-Isomerase und GGPP-Synthase hemmt, jedoch konnte von anderen Autoren kein Wirkort vor oder nach GGPP bestimmt werden (CROTEAU, 1992; LÜTZOW *et al.*, 1990; SCOTT *et al.*, 1994; WEIMER *et al.*, 1992a). Vor diesem Hintergrund war Clomazone ein vielversprechender Kandidat für einen neuen Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese (siehe 1.5, S. 24). Folgende von mir angestellte Überlegungen führten zu dem weiteren potentiellen Hemmstoff 5-Ketoclomazone (siehe Abbildung 4-2): Die Ursachen von Sensitivität oder Toleranz verschiedener Pflanzen gegenüber Clomazone sind bisher unbekannt. Aufnahme und Verlagerung innerhalb der Pflanze sind vermutlich nicht verantwortlich dafür. Unterschiede im Metabolismus und am Wirkort wurden kontrovers diskutiert und könnten beide für die Selektivität eine Rolle spielen (LIEBL und NORMAN, 1991; NORMAN *et al.*, 1990a; 1990b; SCOTT *et al.*, 1992; WEIMER *et al.*, 1991; WEIMER *et al.*, 1992b; WESTON *et al.*, 1989). Einer der Clomazone-Metaboliten aus Sojabohnen, 5-Ketoclomazone¹⁴ (ELNAGGAR *et al.*, 1992), hat die gleiche Herbizidwirkung wie Clomazone. Dies war bekannt, da 5-Ketoclomazone schon vor Clomazone als Bleichherbizid patentiert worden war. Nachteilig war jedoch seine Instabilität im Boden. Chemische Modifikationen führten zu Clomazone als stabilerem Derivat, welches zur kommerziellen Nutzung gelangte (siehe CHANG *et al.*, 1987). Da 5-Ketoclomazone ein aktiver Metabolit von Clomazone ist, lag die Vermutung nahe, dass die Wirkung von Clomazone zum Teil, wenn nicht sogar vollständig, auf einer Bioaktivierung zu Ketoclomazone oder Metaboliten von Ketoclomazone beruht. Vermutlich wird Clomazone durch Cytochrom P₄₅₀ zu 5-Hydroxyclozomazone (siehe Abbildung 4-2) oxidiert, welches zu 5-Ketoclozomazone weiteroxidiert wird. 5-Hydroxyclozomazone und 5-Ketoclozomazone haben eine ähnliche herbizide Wirkung wie Clomazone (CHANG *et al.*, 1987) und wurden als Clomazone-Metaboliten in Sojabohne und verschiedenen Mikroorganismen gefunden (s.u.; ELNAGGAR *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1996; SCHOCKEN, 1997). Um die Bioaktivierungs-Hypothese zu untersuchen, wurden sowohl Clomazone als auch 5-Ketoclozomazone verschiedenen Tests unterzogen: Von mir wurden die Hemmung der Isoprenemission verschiedener höherer Pflanzen, die Hemmung der Ergrünung von etiolierter Gerste mit und ohne Zusatz von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) und dem Cytochrom P₄₅₀-Hemmstoff Aminobenzotriazol (ABT) sowie die Wachstumshemmung bei verschiedenen Algen und *E. coli* untersucht. Parallel dazu wurden von Herrn C. Müller im Rahmen seiner noch laufenden Doktorarbeit bei Botanik II die ersten beiden Enzyme des DOXP/MEP-Weges, DXS und DXR, auf eine Hemmung durch Clomazone und 5-Ketoclozomazone untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im Folgenden diskutiert.

Hemmung der Isoprenemission

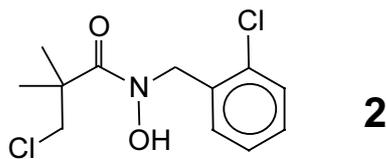
Wirkungen von Clomazone und Ketoclozomazone auf die Isoprenemission verschiedener Pflanzen waren bei Konzentrationen unter 1 mM nicht zu beobachten. In einer Konzentration von 1 mM wirkte Clomazone tendenziell stimulierend und Ketoclozomazone eher hemmend. Eine Ausnahme war *Robinia pseudoacacia*, bei der sowohl Clomazone als auch Ketoclozomazone klar hemmend wirkten (siehe 3.3.2, S. 63). Die fehlende Hemmung von Clomazone wurde zunächst als Hinweis gewertet, dass Clomazone nicht in den DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese eingreift. Da Clomazone aber ein selektives Herbizid ist, ist es

¹⁴ Auch von Ratten sowie verschiedenen Bakterien und Pilzen wird Clomazone u.a. zu 5-Ketoclozomazone metabolisiert (LIU *et al.*, 1996).

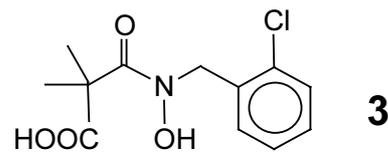
denkbar, dass die Isoprenbildung der untersuchten Pflanzen deshalb nicht gehemmt wurde, da diese vielleicht nicht sensitiv sind. Deshalb wurden zusätzlich Blätter von intakten, jungen Platanen und Eichen mit 0,1 mM Clomazone-Lösungen bestrichen. Bei Platanen, nicht jedoch Eichen, trat dabei manchmal Bleichung am Rand von noch wachsenden Blättern auf. Dieser Effekt war allerdings nicht immer reproduzierbar. Da die Aussagekraft dieser Experimente begrenzt ist, wurden von mir weitere Hemmtests mit Clomazone und 5-Ketoclomazone an ergrünender Gerste sowie Sterilkulturen verschiedener Algen und *E. coli* durchgeführt.



R = H ₂ :	Clomazone
R = -OH:	5-Hydroxycloamzone
R = =O:	5-Ketocloamzone
R = -OCH ₃ :	5-Methoxycloamzone
R =: -Cl	5-Chlorocloamzone



3-Chloro-N-(2-chlorobenzyl)-N-hydroxy-2,2-dimethylpropanamid



2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[(2-chlorobenzyl)-hydroxyamino]-propansäure

Abbildung 4-2 Verschiedene Derivate des Herbizids Clomazone. Die Verbindungen (1) und (2) besitzen die gleiche herbizidale Wirkung (CHANG *et al.*, 1987). (2) ist ein Hydroxamsäure-Vorläufer zur Synthese von Clomazone (CHANG *et al.*, 1987). Verbindung (3) wird evtl. enzymatisch von Pflanzen *in vivo* aus Clomazone über 5-Hydroxycloamzone und 5-Ketocloamzone gebildet (ELNAGGAR *et al.*, 1992). 5-Ketocloamzone wurde aufgrund meiner Überlegungen in dieser Promotionsarbeit verschiedenen *in vivo*-Tests unterzogen und erwies sich als Hemmstoff des ersten Enzyms des DOXP/MEP-Weges (DXS) von *Chlamydomonas reinhardtii* (MÜLLER *et al.*, 2000). (3) hemmt das zweite Enzym des DOXP/MEP-Weges (DXR) aus *E. coli* (JOMAA, 2000a). Die Clomazone-Metaboliten 5-Ketocloamzone und (3) könnten für den Wirkungsmechanismus von Clomazone verantwortlich sein.

Hemmtests mit Gerste

Etiolierte, ergrünende Gerstenkeimlinge erwiesen sich hinsichtlich ihrer Carotinoid- und Chlorophyllbildung als sensitiv gegenüber Clomazone und Ketocloamzone in Konzentrationen von 10 µM (siehe 3.6.1, S. 70). Deshalb konnten mit diesem System weitere Versuche gemacht werden, um die Ergrünungshemmung wieder aufzuheben. Die Hemmung durch Clomazone und 5-Ketocloamzone konnte mit DOXP teilweise aufgehoben werden. Dies wäre verständlich, wenn die DOXP-Synthase durch Clomazone oder einen Metaboliten

gehemmt würde, oder wenn wie im Fall von Fosmidomycin eine (zumindest partiell) kompetitive Hemmung der DOXP-Reduktoisomerase vorläge. Die Kontrollen mit Kieselgeleextrakt (siehe 2.2.2, S. 36) und anorganischem Phosphat zeigen, dass der Effekt von DOXP auf die Hemmung weder von der Kieselgelverunreinigung kommt, noch ein „Düngungseffekt“ des in DOXP enthaltenen Phosphors ist.

Um die Hypothese, dass Clomazone einer Bioaktivierung durch Oxidation zu 5-Ketoclomazone unterliegt, zu testen, wurde ein Hemmstoff von Cytochrom P₄₅₀ Monooxygenasen, Aminobenzotriazol (ABT, GONNEAU *et al.*, 1988; MCFADDEN *et al.*, 1989), zusammen mit Clomazone bzw. Ketoclomazone verabreicht. Wenn Clomazone selbst keine Wirkung hat, sondern ein oxidiertes Metabolit, sollte ABT den Effekt von Clomazone wieder aufheben. Wenn 5-Ketoclomazone oder ein Metabolit von 5-Ketoclomazone, der nicht durch Cytochrom P₄₅₀ entsteht, das wirksame Prinzip ist, sollte der Effekt von 5-Ketoclomazone durch ABT nicht wieder aufgehoben werden, sondern möglicherweise sogar verstärkt werden. Die Experimente bestätigten diese Erwartungen: ABT hob die Ergrünungshemmung durch Clomazone komplett wieder auf und führte sogar zu einer etwas intensiveren Ergrünung. Die Hemmung der Ergrünung durch 5-Ketoclomazone wurde durch ABT nicht aufgehoben sondern verstärkt.

Die Versuche zur Hemmung der Isoprenemission sowie die Hemmversuche mit ergrünender Gerste lassen sich also durch eine Bioaktivierung von Clomazone zu 5-Ketoclomazone durch Cytochrom P₄₅₀ erklären. Weitere von Cytochrom P₄₅₀ unabhängige Reaktionen von 5-Ketoclomazone zu evtl. weiteren aktiven Metaboliten lassen sich nicht ausschließen. Die Wirkung von Clomazone als Herbizid könnte somit darin liegen, dass mehrere seiner oxidierten Abbauprodukte Enzyme des DOXP/MEP-Weges hemmen.

Enzymtests

Clomazone und 5-Ketoclomazone wurden von C. Müller im Rahmen seiner Dissertation bei Botanik II, Karlsruhe, an rekombinanter DXS aus *Chlamydomonas reinhardtii* und *E. coli* sowie an rekombinanter DXR aus *Arabidopsis thaliana* getestet. Eine Hemmung wurde nur festgestellt bei *Chlamydomonas*-DXS (MÜLLER *et al.*, 2000) und *E. coli*-DXS (MÜLLER, Dissertation in Arbeit) mit 5-Ketoclomazone. Die IC₅₀-Werte lagen bei ca. 100 µM. Dies bestätigt die Hypothese der Bioaktivierung von Clomazone zu 5-Ketoclomazone und zeigt das Enzym DXS als möglichen neuen Angriffspunkt für Herbizide und Antibiotika auf. Die Konzentration von 5-Ketoclomazone, bei denen die DXS gehemmt wird, sind allerdings nicht besonders niedrig, so dass eine spezifische Hemmung der DXS durch einen Metaboliten als einziges Prinzip der Clomazone-Wirkung fraglich erscheint. Möglicherweise sind noch weitere Wirkorte von Clomazone oder seinen Metaboliten in Betracht zu ziehen. Denkbar wäre aber auch, dass Unterschiede am Enzym DXS zwischen sensiblen und toleranten Organismen vorliegen. *Chlamydomonas* und *E. coli* sind tolerant gegenüber 0,1 mM Clomazone oder Ketoclomazone (s.u.).

Es ist schon längst bekannt, dass Clomazone die Chloroplastenentwicklung von *Vigna unguiculata* L. verzögert. Die Ultrastruktur der Plastiden in behandeltem Gewebe wies Vesikel, eine verminderte Anzahl von Thylakoiden sowie einen geringeren Stapelungsgrad der Thylakoide auf (DUKE *et al.*, 1986). Die gleichen ultrastrukturellen Merkmale von Plastiden wurden für die Albino-Mutante *cla1-1* von *Arabidopsis thaliana* mit defekter DXS beschrieben (MANDEL *et al.*, 1996). Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass eine Hemmung der DXS, des ersten Enzyms des DOXP/MEP-Weges, eine Rolle im Wirkungsmechanismus von Clomazone spielt.

Hemmtests mit Algen und E. coli

Um für weitere Untersuchungen geeignete Organismen zu finden, die sensitiv gegenüber Clomazone oder Ketoclozomazone sind, wurden *E. coli* sowie die Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Gloeotilopsis planctonica* und *Scenedesmus obliquus* untersucht (siehe 3.6.2, S. 73). Das Wachstum von *E. coli*, *Chlamydomonas* und *Gloeotilopsis* wurde durch beide Hemmstoffe (0,1 mM) nicht beeinträchtigt. *Scenedesmus* tolerierte 0,1 mM Clomazone, wurde aber von 0,1 mM Ketoclozomazone gebleicht und vollständig abgetötet. 0,01 mM Ketoclozomazone wirkte ebenfalls stark wachstumshemmend und bleichend. Generell scheint *Scenedesmus obliquus* also ein interessanter Organismus zur weiteren Untersuchung der Wirkungsweise von Clomazone und seinen Metaboliten zu sein. Möglicherweise enthält die Alge geringere Aktivitäten des entsprechenden Cytochrom P₄₅₀-Enzyms als andere Organismen, so dass Clomazone nicht aktiviert werden kann. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch ein Vergleich der Enzymausstattungen von *Scenedesmus obliquus* und *Scenedesmus acutus*: Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit untersuchten *S. obliquus* konnten das Wachstum und die Pigmentbildung von *Scenedesmus acutus* durch 20 µM Clomazone gehemmt werden (SANDMANN und BÖGER, 1986).

Weitere Clomazone-Derivate

Beim *in vivo*-Metabolismus von Clomazone in verschiedenen Mikroorganismen und Sojabohnen kann durch N-Dealkylierung die Chlorbenzylgruppe angespalten werden (SCHOCKEN, 1997). Weiterhin wurde postuliert, dass 5-Ketoclozomazone einer hydrolytischen Öffnung seines heterozyklischen Rings unterliegen kann (s.u.). Kombiniert man beide Reaktionen mit einer Reaktion der so entstandenen Hydroxamsäure zur Carbonsäure, gelangt man zu Dimethylmalonsäure (siehe Abbildung 3-3). Dimethylmalonsäure wurde zwar in keinem Organismus als Metabolit von Clomazone nachgewiesen, wäre aber bei der Sojabohnen-Studie der Analyse entgangen, da ¹⁴C-Clomazone verwendet wurde, das im Chlorbenzylrest markiert war (ELNAGGAR *et al.*, 1992). Metaboliten ohne den radioaktiven Chlorbenzyl-Rest wurden nicht detektiert. 1 mM K-Dimethylmalonat wirkte nicht hemmend auf die Isoprenemission von Platane (siehe 3.3.2, S. 63). Dimethylmalonsäure ist also entweder kein aktiver Metabolit von Clomazone oder Platane ist ihr gegenüber tolerant.

CHANG *et al.* (1987) berichteten, dass verschiedene Isoxazolidinone (wie z.B. Clomazone) ähnliche herbizidale Aktivitäten wie ihre synthetischen Vorläufer, chlorierte Hydroxamsäuren (siehe Abbildung 4-2), aufweisen. Beide Substanzklassen, Hydroxamsäuren und Isoxazolidinone, zeigen zudem parallele Substituenteneffekte am aromatischen Ring, d.h. die Reihenfolge der herbiziden Aktivitäten für unterschiedliche Substituenten ist bei beiden Substanzklassen die Gleiche. Diese Tatsache allein ist schon ein Hinweis darauf, dass eventuell nicht Clomazone selbst die aktive Substanz ist, sondern ein gemeinsamer Metabolit von Clomazone und dem entsprechenden synthetischen Hydroxamsäure-Vorläufer. Durch N-Dealkylierung dieses Clomazone-Vorläufers könnte Chlorpivalohydroxamsäure entstehen, welche möglicherweise zu einer herbiziden Substanz weitermetabolisiert wird. 1 mM Chlorpivalohydroxamsäure konnte allerdings die Isoprenemission von Platane nicht hemmen (siehe Abbildung 3-3; 3.3.2, S. 63). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass die herbizide Aktivität von Isoxazolidin-3-onen (Bsp. Clomazone), ihren Hydroxamsäure-Vorläufern sowie den Isoxazolidin-3,5-dionen (Bsp. 5-Ketoclozomazone) sehr empfindlich vom Substitutionsmuster des aromatischen Rings abhängt: Die höchste Aktivität wurde bei Verbindungen mit Chlor in der Position 2 (ortho) gefunden. Andere Substituenten und

Substituenten in anderen Positionen am Aromaten führten zu weniger aktiven bis inaktiven Substanzen (CHANG *et al.*, 1987). Offenbar ist der 2-Chlorbenzyl-Rest für die Wechselwirkung mit der oder den Bindestellen optimal. Die durch N-Dealkylierung entstehenden Metaboliten 2-Chlorbenzylalkohol, 2-Chlorbenzaldehyd und 2-Chlorbenzoesäure sind sicherlich nicht für die Wirkung von Clomazone verantwortlich, denn sie wurden auch beim Metabolismus anderer Herbizide beschrieben (siehe ELNAGGAR *et al.*, 1992) und führten nicht zu Bleichsymptomen bei Tomatenkeimlingen (Konzentration 0,1 mM, SCOTT *et al.*, 1994). Auch die Substitution des heterocyclischen Rings ist entscheidend für die Clomazone-Wirkung: Optimal sind zwei Methylgruppen an C₄ (CHANG *et al.*, 1987).

Offenbar ist das gesamte Kohlenstoffgerüst von Clomazone für seine Wirkung notwendig, da nur wenige Veränderungen am Molekül möglich sind, ohne dass die herbizide Wirkung verlorengelht. Die ausführliche Studie der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CHANG *et al.* (1987) zeigt, dass die interessanteste Stelle in Clomazone-verwandten Molekülen die Position 5 des Heterozyklus zu sein scheint: Die wirksamsten Herbizide enthalten an dieser Stelle keinen Substituenten (Clomazone), =O (5-Ketoclomazone), -OCH₃, -Cl oder -OH (5-Hydroxycloamzone) (siehe Abbildung 4-2). Wie das Beispiel der Hydroxamsäure-Vorläufer (s.o.) zeigt, ist zwischen C5 und O auch eine Ringöffnung möglich, ohne die herbizide Aktivität zu verlieren. Die Vermutung liegt nahe, dass eventuell ein gemeinsamer Metabolit all dieser Verbindungen vorwiegend für die herbizide Wirkung verantwortlich ist. Ein solcher Metabolit könnte 2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[(2-chlorbenzyl)-hydroxyamino]-propansäure sein (siehe Abbildung 4-2). Diese Verbindung wurde als Hydrolyseprodukt von 5-Ketocloamzone beim Metabolismus von Clomazone in Soyabohne postuliert (ELNAGGAR *et al.*, 1992). In dieser Studie wurde 5-Ketocloamzone aus der Aglykon-Fraktion der Metaboliten extrahiert, d.h. dass es vermutlich zunächst als Glykosid-Konjugat vorlag und dann im Trennungsgang der Aufarbeitung durch Hydrolyse mit Cellulase freigesetzt wurde. Da Ketocloamzone aber gar keine funktionellen Gruppen besitzt, die üblicherweise der Konjugation mit Zuckern dienen, wurde das oben genannte Propansäure-Derivat als Zwischenstufe angenommen: Beim Metabolismus könnte es aus Ketocloamzone durch Hydrolyse (katalysiert z.B. durch Esterasen) entstehen und dann mit einem Zucker über die N-OH-Gruppe zum Glykosid verknüpft werden. Umgekehrt könnte das Propansäurederivat bei der Aufarbeitung aus dem Glykosid durch enzymatische Hydrolyse entstanden und dann im sauren Milieu zu Ketocloamzone lactonisiert worden sein. Dieser Vorgang war bei einer Clomazone-Metabolismusstudie mit Ratten beobachtet worden (siehe ELNAGGAR *et al.*, 1992). Die Hypothese, dass das Propansäurederivat der gemeinsame wirksame Metabolit der oben genannten Verbindungen ist, erhielt durch eine kürzlich veröffentlichte Patentanmeldung der Arbeitsgruppe Jomaa Unterstützung, in der eine Hemmung rekombinanter DXR aus *E. coli* durch 2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[(2-chlorbenzyl)-hydroxyamino]-propansäure¹⁵ beschrieben wurde (JOMAA, 2000a). Der IC₅₀-Wert wurde mit 20 µM bei 1 mM DOXP angegeben. Auch das Wachstum *in vitro* von *Plasmodium falciparum* wurde durch die Substanz gehemmt (IC₅₀: 28 µM). 20 µM ist jedoch ebenso wie der in der Karlsruher Arbeitsgruppe bestimmte IC₅₀-Wert 100 µM von Ketocloamzone bei der DXS-Hemmung (s.o.) keine ausgesprochen niedrige Konzentration für einen effizienten Hemmstoff, so dass eine Hemmung der DXR nach Bioaktivierung von Clomazone als sein Wirkmechanismus noch nicht endgültig befriedigt. Hierbei ist wiederum zu bedenken, dass *E. coli*, die von JOMAA (2000a) verwendete Enzymquelle für DXR, kein Clomazone-sensitiver Organismus ist, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde (s.o.). Auch die Soyabohne (*Glycine max* L.), zu der im Vergleich zu anderen Pflanzen die bisher umfangreichste Clomazone-Metabolismusstudie publiziert worden ist, ist tolerant gegenüber Clomazone (ELNAGGAR *et al.*, 1992).

¹⁵ Diese Verbindung enthält interessanterweise wie Fosmidomycin, IpOHA und die Aldose/Ketose-Isomerase-Hemmer eine Hydroxamat-Gruppierung (O=C-N-OH, siehe 4.2.2, S. 86).

Es bleibt die Aufgabe, den Metabolismus von Clomazone in toleranten *und* sensitiven Spezies näher zu untersuchen, sowie verschiedene Metabolite an allen verfügbaren Enzymen des DOXP/MEP-Weges zu testen, um den Wirkungsmechanismus und die Ursachen der Selektivität von Clomazone aufzuklären. Vermutlich sind Toleranz und Sensitivität gegenüber Clomazone durch ein komplexes Wechselspiel von Aktivierungs- oder Giftingsreaktionen (Hydroxylierung und Weiteroxidation an C5, Hydrolyse) und Entgiftungsreaktionen (Hydroxylierungen, Bildung von Glykosiden, N-Dealkylierung) bedingt, das von Spezies zu Spezies unterschiedlich arbeitet. In jedem Fall stehen nun neue Leitstrukturen für Inhibitoren der DXS (2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[(2-chlorbenzyl)-hydroxyamino]-propansäure) und der DXR (5-Ketoclomazone) für die Entwicklung neuer Herbizide und Antibiotika zur Verfügung.

4.2.4 Vitamin B₆-Antagonisten

Bei der Suche nach Strukturanaloga zu Clomazone in Chemikaliendatenbanken fielen D- und L-Cycloserin auf (siehe Abbildung 3-3), welche wie Clomazone einen Isoxazolidinon-Ring enthalten. L-Cycloserin wurde aus *Streptomyces*-Arten isoliert und wird als orales Antibiotikum gegen Tuberkulose eingesetzt (vgl. OLSON *et al.*, 1998). 1 mM L-Cycloserin hemmte die Isoprenemission von Platane zu 97%, D-Cycloserin zu 74% (siehe 3.3.3, S. 64). Die Hemmung durch L-Cycloserin war konzentrationsabhängig und bei einer Konzentration von 0,1 mM noch deutlich messbar. Dieser Hemmeffekt beruht sicher nicht auf einer Clomazone-ähnlichen Wirkungsweise von L-Cycloserin. Es ist bekannt, dass D- und L-Cycloserin Vitamin B₆-abhängige Reaktionen wie z.B. Transaminierungen hemmen (PEISACH *et al.*, 1998; OLSON *et al.*, 1998). Um zu bestätigen, ob die Hemmung Pyridoxalphosphat-abhängiger Reaktionen die Isoprenemission zu hemmen vermag, wurden weitere solche Inhibitoren (siehe Abbildung 3-3) an *Platanus x acerifolia* L. untersucht (siehe 3.3.3, S. 64). 1 mM Hydroxylamin hatte keine besondere Wirkung auf die Isoprenemission. In Enzymtests deaktiviert Hydroxylamin, welches unspezifisch mit Carbonylgruppen zu Oximen reagiert (VOLLHARDT, 1988), den Cofaktor Pyridoxalphosphat und führt so zu einer Hemmung (GIVAN, 1980). *In vivo* wird Hydroxylamin vermutlich abgefangen, bevor es an den Wirkort gelangen kann. Auch 1 mM Theophyllin, ein Hemmstoff von Pyridoxalkinase (UBBINK *et al.*, 1989), hatte keine Wirkung. Isoniazid, ein Transaminase-Hemmstoff (GORE *et al.*, 1971), hatte ebenfalls bei 1 mM keinen Effekt. 1 mM Gabaculine, eine weiterer Transaminase-Hemmstoff (KEDY *et al.*, 1994), führte zu 70 % Hemmung. Der Transaminase-Hemmer Aminoxyacetat (AOA; CORNELL *et al.*, 1984) war ähnlich wirksam wie L-Cycloserin bis zu einer Konzentration von 0,1 mM. Der letzte Hemmstoff dieser Art, Aminoethoxyvinylglycin (AVG; CLAUSEN *et al.*, 1997), war bei 0,01 mM gerade noch wirksam. DOX, Pyruvat, Pyridoxin und Pyridoxamin konnten die Hemmung der Isoprenemission in Platane durch Cycloserin nicht aufheben (siehe 3.3.3, S. 64). Möglicherweise konnten Pyridoxin und Pyridoxamin nicht in die aktiven Phosphate überführt werden, oder letztere konnten nicht bis zum aktiven Zentrum der gehemmten Enzyme vordringen.

Wie könnten diese Stoffe die Isoprenbildung beeinflussen? Es wurde schon von DALAKISHVILI *et al.* (1989) berichtet, dass D,L-Cycloserin die Isoprenemission von *Populus deltoides*-Protoplasten hemmt. Bei Zugabe von Pyridoxalphosphat oder Acetyl-CoA war die Hemmung geringer. Die Interpretation der Autoren war, dass Acetyl-CoA in Chloroplasten zumindest teilweise durch Transaminierung gebildet wird. Mit der Kenntnis des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese für Isopren (vgl. 3.2.1, S. 55 sowie ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.* 1997; ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998) und andere plastidäre Isoprenoide bietet sich jedoch eine andere Interpretation an: Enthält vielleicht der DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosyntheseweg einen von Vitamin B₆ abhängigen Schritt? Dies wäre durchaus denkbar, da z.B. von Pyridoxaminphosphat abhängige Dehydratisierungen

beschrieben worden sind (LEI *et al.*, 1995). Wahrscheinlich enthält der DOXP/MEP-Weg Dehydratisierungsschritte, bei denen die in DOXP noch enthaltenen OH-Gruppen auf dem Weg zum IPP abgespalten werden. Eine von Pyridoxaminphosphat abhängige Wasserabspaltung im mevalonatunabhängigen IPP-Biosyntheseweg war bereits von SCHWARZ (1994) vorgeschlagen worden.

Die Hemmung eines noch unbekanntes, von Vitamin B₆ abhängigen Schrittes im DOXP/MEP-Weg durch Cycloserin oder andere Vitamin B₆-Hemmstoffe kann offenbar jedoch nicht die einzige Wirkung dieser Substanzen sein. DALAKISHVILI *et al.* (1989) beschrieben auch eine Hemmung der Photosynthese durch Cycloserin. Es ist verständlich, dass die Isoprenemission nachlässt, wenn die Photosynthese blockiert ist. Ein solcher Effekt ist bekannt von DCMU (wie unter 3.3.4, S. 65, 4.2.5, S. 101 berichtet und schon von RASMUSSEN und JONES, 1973; JONES und RASMUSSEN, 1975 bekannt war). Es ist allerdings nicht unmittelbar einsichtig, auf welche Weise die Photosynthese durch Hemmung eines von Vitamin B₆ abhängigen Schrittes beeinträchtigt werden sollte. Aus Lehrbüchern kann man keinen Hinweis auf eine direkte Verbindung zwischen Vitamin B₆ und Photosynthese entnehmen. Eine solche Verbindung wurde aber von BLACK (1968) vorgeschlagen: Pyridoxalphosphat unterstütze die Photophosphorylierung in Spinat-Chloroplasten, wobei es als reversibles Redoxreagenz wirken sollte. Eine solche Rolle von Pyridoxalphosphat in der Photosynthese konnte jedoch bis heute nicht bestätigt werden.

Es bietet sich eine plausiblere Verknüpfung zwischen Vitamin B₆ und der Photosynthese an, die Photorespiration (siehe Abbildung 4-3). In diesen Stoffwechselweg sind von Vitamin B₆ abhängige Schritte involviert, nämlich Glycin-Decarboxylase, Glycin-Aminotransferase und Serin-Aminotransferase (vgl. RICHTER, 1996). Verschiedene Hemmstoffe der Photorespiration wie z.B. Isoniazid (siehe Abbildung 3-3) hemmten auch die Photosynthese und die Isoprenemission bei *Arundo donax* L. (HEWITT *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu wirkte Isoniazid in der vorliegenden Arbeit kaum auf die Isoprenemission von Platane (siehe 3.3.3, S. 64). Ebenso wenig hemmte Isoniazid die Isoprenemission von *Hamamelis virginiana* L. (JONES und RASMUSSEN, 1975). Auch Aminoxyacetat (AOA; Abbildung 3-3) ist bekannt dafür, dass es Photorespiration und Photosynthese hemmt (GONZALEZ-MORO *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass AOA die Isoprenemission von Platane hemmt (siehe 3.3.3, S. 64).

Unter physiologischen Bedingungen (wenig CO₂, viel O₂) ist Photorespiration bei C₃-Pflanzen aufgrund der Oxygenase-Aktivität der Rubisco unvermeidlich und auch notwendig, um die Photosynthese teilweise aufrecht zu erhalten und den Pigmentapparat der Photosynthese zu schützen. Eine Unterbrechung des Photorespirationszyklus kann zur Anreicherung von toxischen Stoffwechsel-Intermediaten, z.B. Ammoniak, und zu einer Verarmung des Calvin-Zyklus an Substraten führen (BÖGER, 1989). Deshalb muss bei einer Hemmung der Photorespiration mit einer Hemmung der Photosynthese (und damit indirekt einer Hemmung der Isoprenemission) gerechnet werden. Die Photorespiration wurde aus diesem Grund auch für einen vielversprechenden Wirkort von zukünftigen Herbiziden gehalten (BÖGER, 1989). Rechnet man auch die Ammoniak-Assimilation durch Glutaminsynthetase (GS) zum Photorespirationszyklus (RICHTER, 1996), so existiert schon ein kommerziell erfolgreiches Herbizid, welches indirekt über Hemmung eines Teilschrittes der Photorespiration die Photosynthese hemmt, der GS-Hemmer Phosphinothricin, auch bekannt als Glufosinat. Phosphinothricin war ursprünglich als Teil eines antibiotischen Peptids aus *Streptomyces viridichromogenes* isoliert worden (RAY, 1989). Das Ammonium-Salz von Phosphinothricin ist der aktive Bestandteil des Herbizids „Basta“.

Die Isoprenemission wird bei Gabe von Vitamin-B₆-Inhibitoren wohl eher wegen der Hemmung der Photosynthese als direkt durch Hemmung der Photorespiration blockiert. Die direkte Verbindung zwischen Photosynthese und Isoprenemission durch metabolische

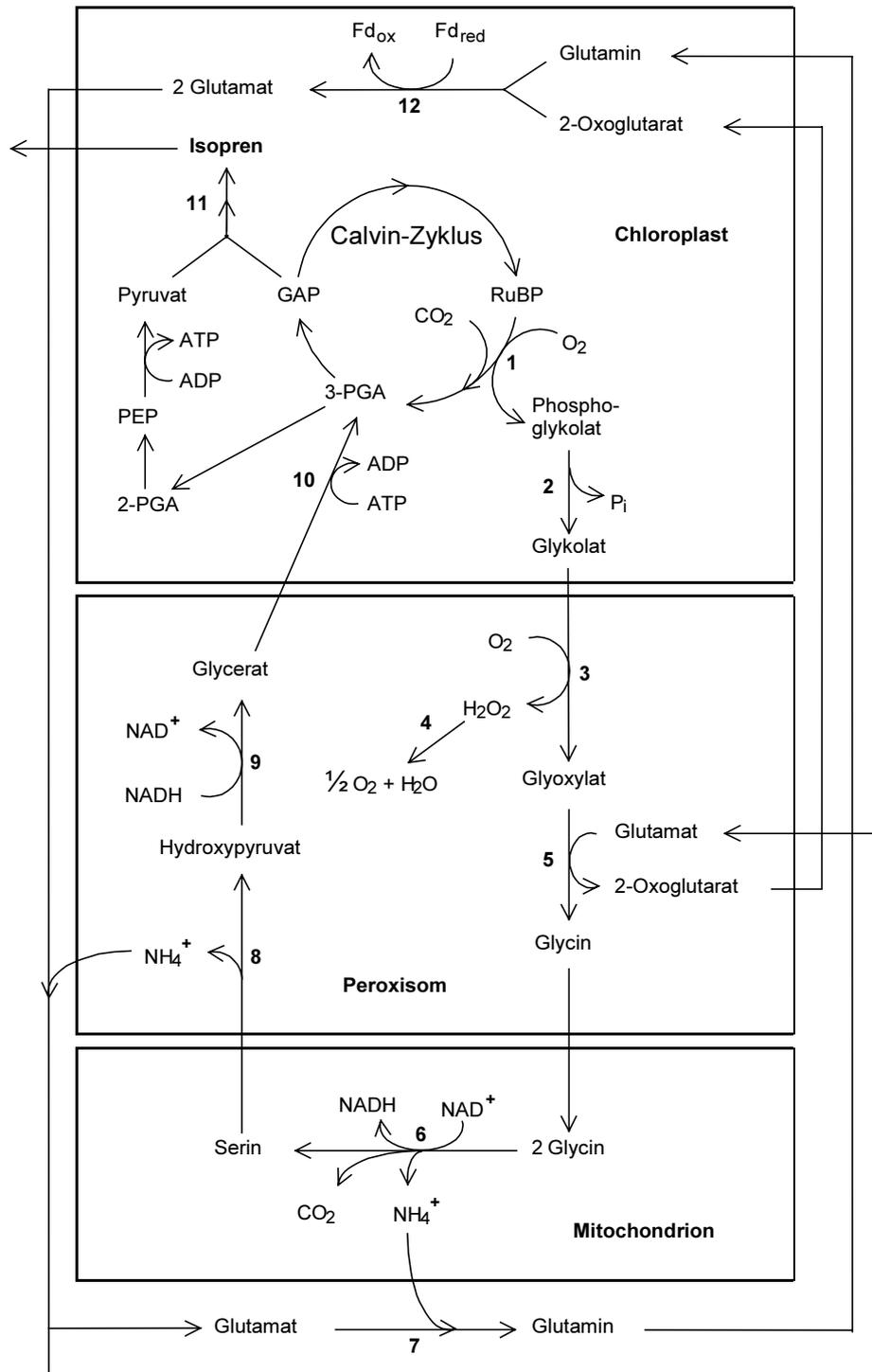


Abbildung 4-3 Verbindung zwischen Photorespiration, reduktivem Pentosephosphatzyklus (Calvin-Zyklus) und Isoprenemission. Involvierte Enzyme: **1** Rubisco, **2** Phosphoglycolat-Phosphatase, **3** Glykolat-Oxidase, **4** Katalase/Peroxidase, **5** Glycin-Aminotransferase, **6** Glycin-Decarboxylase-Komplex, **7** Glutamin-Synthetase, **8** Serin-Aminotransferase, **9** Hydroxyppyruvat-Reductase, **10** D-Glycerat-Kinase, **11** DOXP/MEPWeg + IPP-Isomerase + Isopren-Synthase, **12** Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase. Die Enzyme **5**, **6** und **8** sind Vitamin B₆-abhängig. Die Hemmung eines oder mehrerer dieser enzymatischen Schritte könnte durch einen Anstau toxischer Intermediate oder Verarmung des reduktiven Pentosephosphatzyklus an Kohlenstoff zu einer Hemmung der Photosynthese und damit zu einer Hemmung der Isoprenemission führen.

Kopplung ist bekannt, eine direkte Verbindung zwischen Photorespiration und Isoprenemission konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (MONSON und FALL, 1989; HEWITT *et al.*, 1990). Dass dieser Mechanismus (Hemmung der Photorespiration führt zu Hemmung der Photosynthese und damit zur Hemmung der Isoprenemission) jedoch nicht zwingend bei jeder Art von Hemmung der Photorespiration auftreten muss, zeigt das Beispiel Aminoacetonitril (AAN): Dieser Photorespirations-Hemmer blockiert die Glycin-Decarboxylase, verhindert damit die Entstehung von Ammoniak, einem Substrat der Glutamin-Synthetase, und führt damit zu einem Anstau von Glutamat (SCOTT-TAGGART, 1999). AAN führte bei *Arundo donax* L. jedoch nicht zu einer Hemmung, sondern zu einer Steigerung der Isoprenemission (HEWITT *et al.*, 1990). Gegensätzlich dazu verhält sich Aminoxyacetat (AOA). AOA hemmt verschiedene von Vitamin B₆ abhängige Transaminasen und Decarboxylasen (BÖGER, 1989). Ein Derivat von AOA, Benzadox, übt eine herbizide Wirkung inklusive Photosynthese-Hemmung aus, indem es *in vivo* zu AOA hydrolysiert wird (BÖGER, 1989). In der vorliegenden Arbeit hemmte AOA auch die Isoprenemission von Platane (s.o.).

Aminoethoxyvinylglycin (AVG; Abbildung 3-3) wird häufig als Hemmstoff der Ethylenbiosynthese für physiologische Untersuchungen verwendet (WENZEL *et al.*, 1995). AVG hemmt neben anderen, von Vitamin B₆ abhängigen Reaktionen die Bildung von Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC) aus S-Adenosylmethionin. ACC ist eine direkte biosynthetische Vorstufe von Ethylen (vgl. RICHTER, 1996) und wird eingesetzt, um Ethyleneffekte zu induzieren bzw. um Effekte von AVG wieder aufzuheben (BABIKER *et al.*, 1993). Deshalb wurde nach Literatur gesucht, die einen möglichen Zusammenhang zwischen Ethylen- und Isoprenbildung beschreibt. Tatsächlich war spekuliert worden, dass Ethylen ein natürliches Signal für die Stimulierung der Isoprenemission sein könnte. Eine Verstärkung der Isoprenemission von *Populus nigra* L. wurde bei Begasung mit 2 % (Vol.) Ethylen gemessen (MEHLHORN *et al.*, 1998). Die unphysiologisch hohe Ethylenkonzentration stellt die Bedeutung dieses Ergebnisses jedoch in Frage. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass Ethylen die Isoprenbildung stimuliert, untersucht, indem die Wirkung von AVG, ACC und der Kombination beider Substanzen auf die Isoprenemission von Platane verglichen wurde (siehe 3.3.3, S. 64). ACC allein hatte keinen Effekt und konnte die Hemmung der Isoprenemission durch AVG nicht aufheben. Dies spricht dagegen, dass Ethylen ein Signalgeber für die Isoprenemission von Platane ist. 1 mM CoCl₂, ein Hemmstoff der Umwandlung von ACC in Ethylen durch ACC-Oxidase, hemmte zwar ebenfalls die Isoprenemission von Platane (siehe 3.3.3, S. 64), dies kann die Ethylenhypothese jedoch nicht stützen, da CoCl₂ ebenfalls unspezifisch wirkt (WENZEL *et al.*, 1995).

Die Inhibition der Isoprenemission von Platane durch AVG, AOA, Gabaculine und Cycloserin lässt sich also durch eine Hemmung der Photorespiration und eine daraus resultierende Hemmung der Photosynthese erklären. Wenn der Pigmentapparat mit seinem Elektronentransport gestört wird, können weniger bzw. kein ATP oder NADPH mehr gebildet werden. Außerdem werden dann weniger oder kein Triosephosphat und Pyruvat für den DOXP/MEP-Weg mehr zur Verfügung gestellt. Eine solche Verarmung an Isoprenvorstufen sowie ATP und Reduktionsäquivalenten können zu einer Hemmung der Isoprenemission führen. Dieser Mechanismus könnte durch simultane Messung von Photorespiration, Photosynthese, Isoprenemission und Metabolit-Stau nachgewiesen werden. Andere indirekte Effekte oder eine direkte Hemmung des DOXP/MEP-Weges, der IPP-Isomerase oder der Isopren-Synthase lassen sich jedoch nicht ausschließen. In jedem Fall sind Experimente mit unspezifischen Inhibitoren mit Vorsicht zu interpretieren. Dies gilt insbesondere für den Einsatz von AVG als Ethylenbiosynthese-Hemmstoff.

4.2.5 Weitere Hemmstoffe

Eine Reihe weiterer Substanzen, die nicht in die bisherigen Kategorien passen, wurde hauptsächlich an Platane auf Hemmung der Isoprenemission getestet (siehe Abbildungen 3-4 und 3-5; 3.3.4, S. 65).

Phosphonothrixin, ein Naturstoff mit Phosphonatgruppe aus *Saccharothrix* sp. (NAKAMURA *et al.*, 1999), hat breite, nicht-selektive, Glyphosat-ähnliche Herbizidwirkung, die zu Chlorosen führt. Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch nicht bekannt. Die Isoprenemission wurde von 1 mM Phosphonothrixin in der vorliegenden Arbeit nicht wesentlich gehemmt. Vermutlich wirkt es nicht auf Photosynthese oder IPP- und Isopren-Biosynthese.

Acetylmethylphosphinat (AMPI) ist ein Hemmstoff des mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC) mit herbizider Wirkung (BAILLIE *et al.*, 1988). Bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch PDC reagiert Pyruvat zunächst mit Thiaminpyrophosphat (TPP) zu einem Intermediat, welches zu Hydroxyethyl-TPP decarboxyliert. AMPI bindet vermutlich anstelle von Pyruvat an TPP, es kann aber keine Decarboxylierung stattfinden und der Hemmstoff bindet dann irreversibel ans Enzym (BAILLIE *et al.*, 1988). Auch der plastidäre PDC wird durch AMPI gehemmt (GOLZ und LICHTENTHALER, 1994). Da Isopren, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, nicht aus Acetyl-CoA nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet wird, sollte eine Hemmung des PDC die Isoprenemission nicht hemmen. Die DXS-Reaktion wird jedoch wahrscheinlich von derselben Sequenz eingeleitet wie die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat durch PDC: Pyruvat reagiert mit TPP und decarboxyliert zu Hydroxyethyl-TPP, welches dann von der DXS auf GAP übertragen wird. Deshalb war es denkbar, dass AMPI neben PDC auch die DXS hemmen könnte. Dies sollte zur Hemmung der Isoprenemission führen. Bei *Platanus x acerifolia* und *Chelidonium majus* L. kam es jedoch zu einer Steigerung der Isoprenemission durch 0,1 - 1 mM AMPI (diese Arbeit). AMPI führt zu einer starken Anreicherung von Pyruvat und Alanin in Gerste (BAILLIE *et al.*, 1988). Wenn AMPI die DXS nicht hemmt, könnte das erhöhte Pyruvatangebot in einem Isoprenemitter zu verstärkter Isoprenbiosynthese führen. Es wäre in diesem Zusammenhang von Interesse, auch 1-Aminoethylphosphinat auf Hemmung der Isoprenemission zu untersuchen. Diese Substanz wird offenbar *in vivo* durch Transaminasen in Acetylphosphinat überführt, einen noch potenteren Hemmstoff des mitochondrialen PDC als AMPI (LABER und AMRHEIN, 1987; BAILLIE *et al.*, 1988). Der Wirkung von 1-Aminoethylphosphinat kann gemäß der Aktivierung durch Transaminasen mit L-Cycloserin und Aminooxyacetat (s.o.) entgegengewirkt werden (LABER und AMRHEIN, 1987).

Vier verschiedene käufliche Phosphonate wurden wegen ihrer entfernten Verwandtschaft mit Fosmidomycin an Platane untersucht: Phosphonat 1 = D,L-2-Amino-3-phosphonopropionsäure, Phosphonat 2 = 3-Aminopropylphosphonsäure, Phosphonat 3 = 3-Phosphonopropionsäure und Phosphonat 4 = D,L-2-Amino-4-phosphonobuttersäure. Alle übten eine gewisse Hemmwirkung aus, allerdings bei Konzentrationen grösser als 6 mM. Da somit unspezifische Effekte zu vermuten waren, wurde dies nicht weiterverfolgt.

Salicylsäure ist eine Signalsubstanz, die im Rahmen der systemisch erworbenen Resistenz bei Pflanzen Abwehrmechanismen gegen Pathogene stimuliert (vgl. RICHTER, 1996). 1 mM Na-Salicylat hatte keinen Einfluss auf die Isoprenbildung von Platane. Der Salicylat-Signalweg hat demnach vermutlich mit der Isoprenemission nichts zu tun.

Dimethylallylmethylendisulfonamid und Dimethylallylcarbamylsulfamid sind DMAPP-Analoga. Diese Verbindungen sowie entsprechende Analoga zu GPP und FPP wirkten in Zellkulturen menschlicher Haut-Fibroblasten hemmend auf den Acetat-Einbau in Fettsäuren

und in Cholesterol sowie auf den Einbau von Thymidin in DNA (CASTRO *et al.*, 1996). Da diese Prenylpyrophosphat-Analoga nichtionisch sind, sollten sie membrangängig sein und könnten evtl. die Bildung oder den weiteren Metabolismus von DMAPP, d.h. hier insbesondere die Isoprensynthese, hemmen. Gefunden wurde jedoch eine Stimulierung der Isoprenemission von Platane bei 1 mM und 0,1 mM. Über den Wirkmechanismus von Dimethylallylmethylendisulfonamid und Dimethylallylcarbamy-sulfamid ist nichts bekannt, insbesondere nicht, ob die polaren Gruppen tatsächlich als Pyrophosphat-Surrogate wirken (CASTRO *et al.*, 1996).

Chloramphenicol hemmt die prokaryotische Translation und damit auch die plastidäre Proteinbiosynthese. Die Isoprenemission von Platane wurde durch 1 mM Chloramphenicol gehemmt, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. In unabhängigen Experimenten in der Arbeitsgruppe Sharkey (persönliche Mitteilung, 2000) hemmten Chloramphenicol und Cycloheximid (Hemmung der eukaryontischen bzw. cytosolischen Translation) sowohl die Isoprenemission als auch die Photosynthese. Cycloheximid hemmte die Photosynthese stärker als die Isoprenemission. Möglicherweise vermindert die Hemmung der cytosolischen Proteinbiosynthese die Fähigkeit Triosephosphat zu verwerten und führt so zu einer Rückkoppelungshemmung der Photosynthese durch Cycloheximid. Wenn Calvinzyklus und photosynthetischer Elektronentransport unbeeinflusst blieben, könnten der DOXP/MEP-Weg und die Isoprenemission weiterlaufen.

3-[3,4-Dichlorphenyl]-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) hemmt den photosynthetischen Elektronentransport am Photosystem II. Es ist bekannt, dass 0,1 mM DCMU auch zu einer Hemmung der Isoprenemission von *Hamamelis virginiana* L. führt (RASMUSSEN und JONES, 1973; JONES und RASMUSSEN, 1975). Die Wirkung von DCMU auf die Isoprenbiosynthese wird oft zitiert, wurde jedoch nach Wissen des Autors bisher nur für *Hamamelis virginiana* L. publiziert. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit für *Platanus x acerifolia* bestätigt werden. 0,1 mM DCMU hemmte die Isoprenbildung komplett. Die Kopplung der Isoprenemission an die Photosynthese wird damit bestätigt.

Foroxymithine ist ein aus Actinomyceten gewonnenes Peptid, welches Komplexe mit Eisenionen bildet und als Transportmolekül für Eisen dient. Foroxymithine wird als Hemmstoff des Angiotensin-umsetzenden Enzyms (*angiotensine converting enzyme*) eingesetzt (UMEZAWA *et al.*, 1985). Foroxymithine enthält zwei (N-Formyl-N-hydroxyamino)-propyl-Gruppierungen. Fosmidomycin, welches die Isoprenemission hemmt, ist (N-Formyl-N-hydroxyamino)-propylphosphonat. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde auch Foroxymithine auf Hemmung der Isoprenemission getestet. Eine 0,1 millimolare Lösung hatte allerdings keinen Einfluss auf die Isoprenbildung von Platane. Vermutlich kann die Substanz nicht aufgenommen und zum potentiellen Wirkort transportiert werden.

Dimethylaminoethylpyrophosphat (DMAEPP) ist ein potenter Hemmstoff der IPP-Isomerase ($K_i < 1,4 \times 10^{-11}$ M für das Enzym aus Hefe). Das positiv geladene Stickstoffatom von DMAEPP ahmt den carbokationischen Übergangszustand der IPP-Isomerase nach. (MUEHLBACHER und POULTER, 1988; SCHWAB und HENDERSON, 1990). Die Isoprenemission von *Populus nigra* L. wurde durch 3,6 mM DMAEPP nicht gehemmt, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Es ist anzunehmen, dass der Wirkstoff aufgrund seiner Polarität nicht an den Wirkort gelangen konnte. Eine andere Erklärung wäre, dass DMAPP für die Isoprenbildung unabhängig von IPP gebildet wird (siehe 4.3.2, S. 106).

Metolachlor ist ein wachstumshemmendes Herbizid aus der Klasse der Chloracetamide mit vermutlich mehreren Wirkorten (BÖGER und SANDMANN, 1989). Die stärkste bis jetzt beschriebene Wirkung der Chloracetamide ist die Hemmung der Biosynthese sehr langkettiger (C24) Fettsäuren (SCHMALFUSS *et al.*, 2000). Da auch ein Einfluss von Metolachlor auf Carotinoid und Gibberellin-Biosynthese beschrieben wurde (WILKINSON,

1981), sollte eine mögliche Hemmung des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese am Isoprenemissionstest untersucht werden. 1 mM Metolachlor hemmte die Isoprenemission von Platane allerdings nicht. Somit hat Metolachlor vermutlich keinen direkten Hemmeffekt auf die plastidäre IPP-Biosynthese.

1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose wurde von Prof. F. W. Lichtenthaler, Universität Darmstadt, erhalten und als möglicher Hemmstoff untersucht, da fluorierte Analoga zu Stoffwechselintermediaten häufig inhibitorisch wirken. 1-Deoxy-D-xylulose wird, wie durch zahlreiche Einbauexperimente belegt, in der Regel gut aufgenommen, phosphoryliert und in den DOXP/MEP-Weg eingeschleust. Dasselbe wurde auch vom 1-Fluor-Derivat erwartet. Zudem wurde an der Methylgruppe fluoriertes IPP (3-Fluormethy-3-butenylpyrophosphat) als irreversibler Hemmstoff der IPP-Isomerase beschrieben (MUEHLBACHER und POULTER, 1988; SCHWAB und HENDERSON, 1990). Falls 1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose phosphoryliert und von den Enzymen des DOXP/MEP-Weges akzeptiert würde, wäre spätestens auf der Stufe der IPP-Isomerase eine Hemmung zu erwarten. Die Isoprenemission von Platane und *Populus alba x tremula* wurde jedoch nicht wesentlich von 1 mM 1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose gehemmt. Auch das Wachstum von *E. coli* wurde durch 0,1 mM nicht gehemmt. Letzteres wurde bestätigt von BOUVET und O'HAGAN (1999). Die Autoren hatten das 1-Fluor- und das 1,1-Difluorderivat von DOX auf antibiotische Aktivität an *E. coli* und *Staphylococcus aureus* getestet und keine Wirkung gefunden. Als mögliche Erklärung stellten Bouvet und O'Hagan fest, dass 1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose und 1,1-Difluor-1-deoxy-D-xylulose in wässriger Lösung ausschließlich in der Ringform vorlägen, während 1-Deoxy-D-xylulose in wässriger Lösung vorwiegend in der offenkettigen Ketoform vorliegt. Die OH-Gruppe an C5 von 1-Fluor-1-deoxy-D-xylulose wäre damit blockiert und keiner Phosphorylierung zugänglich.

Hemmung der Isoprenemission als neue Methode zum Wirkstoffscreening?

Für das Screening von herbiziden Wirkstoffen werden sowohl spezifische Tests (z.B. Enzym-Assays) als auch unspezifische Tests benötigt. Unspezifische Bioassays sollten möglichst viele potentielle Wirkorte in verschiedenen Geweben und Entwicklungszuständen erfassen (BÖGER, 1989). Screening-Tests sollten einfach und empfindlich sein. Der in dieser Arbeit entwickelte UV-basierte Isoprenemissionstest liegt in seiner Spezifität in der Mitte. Er erfasst zumindest den ganzen DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese, die Photosynthese, die Photorespiration und die Proteinbiosynthese. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Isoprenemissions-Hemmtest kann sehr einfach in jedem Labor ohne teure Spezialgeräte durchgeführt werden (siehe auch Fußnote 13, S. 89). Seine Anwendbarkeit und Empfindlichkeit wurde insbesondere am Beispiel Fosmidomycin belegt. In diesem Fall liessen sich die Ergebnisse sogar auf die Bekämpfung des Malariaerregers übertragen (JOMAA *et al.*, 1999b). Da der DOXP/MEP-Weg nicht auf Pflanzen beschränkt ist, sind die Isoprenemission und weitere pflanzliche Testsysteme geeignet, zum Auffinden neuer Leitstrukturen nicht nur für die Entwicklung neuer Herbizide, sondern auch neuer Antibiotika und Mittel gegen Malaria und andere Parasitenerkrankungen beizutragen (LICHTENTHALER *et al.*, 2000). Wünschenswert wäre hierzu eine Weiterentwicklung des Isoprentests in Richtung eines höheren Durchsatzes und Automatisierung (high throughput screening), so dass er z.B. in Mikrotiterplatten mit Isopren-emittierenden Algen oder Cyanobakterien durchgeführt werden könnte.

4.3 Neuere Erkenntnisse über die IPP-Biosynthese

In den letzten Jahren lieferten biochemische Untersuchungen viele neue Erkenntnisse über die IPP-Biosynthese. In besonderem Maße wird aber auch die immer schneller zunehmende

Kenntnis von Gensequenzen helfen, mittels Homologiesuchen und phylogenetischen Analysen die Fragen nach Verbreitung, Ursprung und Alter der beiden IPP-Biosynthesewege zu beantworten. Der rasche Wissenszuwachs kann hier nicht umfassend wiedergegeben werden. Neuentwicklungen auf dem Gebiet des Mevalonat-Weges sollen anhand einiger Beispiele aufgezeigt werden.

4.3.1 Der Acetat-Mevalonatweg

Eubakterien und Archaea

Neue Erkenntnisse über den Acetat-Mevalonat-Weg der IPP- und Isoprenoid-Biosynthese haben sich in den letzten Jahren bei den Eubakterien und Archaea ergeben. In diesen Organismen war der Acetat-Mevalonat-Weg seit seiner Entdeckung 1958 (siehe 1.4.1, S. 19) nur wenig untersucht worden. Die evolutionäre Geschichte dieses Stoffwechselweges scheint wesentlich komplexer zu sein als erwartet. Ein wichtiger Befund auf der Basis von Sequenzvergleichen ist, dass es zwei zwar homologe, aber klar unterscheidbare Klassen von HMG-CoA-Reduktasen (HMGR) gibt. Archaea und Eukaryonten enthalten meist die Klasse 1 HMGR und Eubakterien die Klasse 2 HMGR (BOCHAR *et al.*, 1999). Die Klasse 2 HMGR von *Pseudomonas mevalonii* verwendet NAD^+ als Cosubstrat und dient dem Katabolismus von Mevalonat als Kohlenstoffquelle, im Gegensatz zu den Klasse 1 HMGRs, die NADPH verwenden und zur IPP-Biosynthese dienen. Andere Klasse 2 HMGRs wie die von *Staphylococcus aureus* akzeptieren sowohl NADH als auch NADPH und sind essentiell für die IPP-Biosynthese. Die HMGR von *Staphylococcus aureus* wird von Fluvastatin mit einem 10^4 fach höheren K_i (320 μM) gehemmt als Klasse 1 HMGRs (WILDING *et al.*, 2000b). Wenn die bakteriellen Klasse 2 HMGRs weniger stark von Statinen gehemmt werden, zeigt dies an, dass es evtl. möglich ist, Inhibitoren zu finden, die spezifisch Klasse 2 HMGRs hemmen, ohne z.B. die menschliche Klasse 1 HMGR zu beeinflussen. Klasse 2 HMGRs sind damit ebenso wie die DOXP-Reduktoisomerase des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese potentielle Wirkorte für spezifische Antibiotika.

Ein anderer interessanter Befund ist die Tatsache, dass sich die Verbreitung der Gene des MVA-Wegs und des DOXP/MEP-Wegs nicht durch einfache vertikale Vererbung erklären lässt. Phylogenetische Analysen und Sequenzvergleiche zeigen, dass offenbar innerhalb und zwischen Bakterien, Archaea und Eukaryonten häufig lateraler Gentransfer stattgefunden hat. Dies gilt insbesondere für den Mevalonat-Weg (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Beispielsweise besitzt das Bakterium *Vibrio cholerae*, welches die Gene des DOXP/MEP-Wegs enthält, auch eine Klasse 1 HMGR, die ein Vorfahre von *V. cholerae* offenbar von einem Archaeon erworben hat. Umgekehrt hat das Archaeobakterium *Archaeoglobus fulgidus* eine Klasse 2 HMGR durch lateralen Transfer von einem Eubakterium erhalten (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Archaeobakterien verwenden den MVA-Weg und haben keine Gene des DOXP/MEP-Weges. Erstaunlicherweise fehlen ihnen aber auch Orthologe zu Proteinen, die Phosphomevalonat zu Geranylpyrophosphat umsetzen¹⁶. Welche Enzyme diese scheinbar fehlenden Funktionen ersetzen, werden erst zukünftige biochemische Untersuchungen zeigen (vgl. BOUCHER und DOOLITTLE, 2000; SMIT und MUSHEGIAN, 2000).

Bei Bakterien, in denen der MVA-Weg zusammen mit dem DOXP/MEP-Weg vorkommt, scheint der MVA-Weg hauptsächlich zur Biosynthese von Sekundärstoffen zu dienen (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Nur eine Minderheit der Bakterien scheint ausschließlich den Mevalonat-Weg zu verwenden (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Eine interessantes

¹⁶ Offenbar fehlen in den sequenzierten Genomen von 19 Bakterien und 5 Archaea auch Orthologe zum IPP-Isomerase-Gen (CUNNINGHAM *et al.*, 2000; siehe auch 4.3.2, S. 106)

Beispiel ist das fakultativ anaerobe, photosynthetische Bakterium *Chloroflexus aurantiacus*, welches den MVA-Weg für die Biosynthese des Diterpens Verrucosanol benutzt (RIEDER *et al.*, 1998). Damit ist *Chloroflexus* einer der wenigen bisher bekannten photosynthetischen Organismen, in denen wahrscheinlich ausschließlich der MVA-Weg aktiv ist. Eine weitere Ausnahme ist der eukaryontische Einzeller *Euglena gracilis* (MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998b; siehe 4.3.2, S. 106). *Euglena* könnte den MVA-Weg im Zuge der genetische Umorganisation nach dem zweiten Endosymbioseereignis, welches zum Erwerb eines von drei Biomembranen umgebenen Plastiden geführt hatte, verloren haben (vgl. LICHTENTHALER, 1999).

Pilze und Hefen

Aufgrund von Sequenzanalysen und Markierungsexperimenten nimmt man an, dass Hefen und Pilze nur den Mevalonatweg enthalten (DISCH und ROHMER, 1998). Nicht ganz in dieses Bild passt der Befund, dass Lovastatin (= Mevinolin) die Bildung von Gibberellinen, nicht aber jene von Sterolen und Carotinoiden in *Gibberella fujikoroii* hemmt (GIORDANO *et al.*, 1999). Vielleicht liegt dies an der unterschiedlichen Kompartimentierung der verschiedenen Isoprenoidbiosynthesen, oder *G. Fujikoroii* enthält zusätzlich eine Lovastatin-resistente HMG-CoA-Reductase mit geringer Homologie zu der einzigen bisher gefundenen HMGR. Isoprenoidbiosynthesen in verschiedenen Zellkompartimenten wurden auch für Carotinoide und Sterole in dem Pilz *Phycomyces blakeleeanus* nachgewiesen (BEJARANO und CERDÁ-OLMEDO, 1992).

Andere Eukaryonten

Homologiesuchen in Gendatenbanken und Markierungsexperimente konnten für nichtphotosynthetische Eukaryonten bisher nur den gut dokumentierten Mevalonat-Weg nachweisen, so dass der DOXP/MEP-Weg dort vermutlich nicht vorhanden ist. Eine Ausnahme ist das zu den Apikomplexa zählende *Plasmodium falciparum* (siehe 4.2.2, S. 86; JOMAA *et al.*, 1999b).

Bisher wurde allgemein angenommen, dass die Cholesterolsynthese in Säugetieren im Cytosol/ER abläuft. Neuerdings wurde jedoch nachgewiesen, dass auch Peroxisomen HMGR, Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Decarboxylase und FPP-Synthase enthalten (ABOUSHADI *et al.*, 1999). Die Bedeutung dieses Befundes ist noch unklar.

Pflanzen

Das Vorkommen des Mevalonat-Wegs im Cytosol von Pflanzen ist gut belegt (siehe z.B. BACH, 1995; BACH *et al.*, 1999) und wurde auch in neuerer Zeit im Zuge der Aufklärung des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese immer wieder bestätigt (siehe die in 4.3.2, S. 106 zitierten Übersichtsartikel). Da dieser Weg in den Plastiden vorkommt (siehe 4.3.2, S. 106), wurde auch das mitochondrielle Kompartiment von Pflanzen einer neuen Untersuchung unterzogen. Mitochondrien leiten sich wie Plastiden von ehemals endosymbiontischen Bakterien ab (MARTIN, 1999). Plastiden und Cyanobakterien haben gemeinsame Vorfahren und besitzen beide den DOXP/MEP-Weg (LICHTENTHALER, 1999). Die Vorläufer der Mitochondrien waren vermutlich Vorfahren heutiger α -Proteobakterien (vgl. SCHINDLER und LICHTENTHALER, 1984; GRAY *et al.*, 1999). Zu den letzteren gehören z.B. *Zymomonas mobilis* und *Rhodobacter capsulatus*, welche den DOXP/MEP-Weg besitzen (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Deshalb läge der Verdacht nahe, dass auch Mitochondrien den

DOXP/MEP-Weg enthalten könnten. Dieser Verdacht konnte aber für die Biosynthese von Ubichinon-10 in Tabak-Zellkulturen ausgeräumt werden (DISCH *et al.* 1998a). Durch Einbau verschiedener ¹³C-markierter Glucosen wurde in Übereinstimmung mit älteren Experimenten gezeigt, dass Sterole und die Prenyl-Seitenkette des mitochondrialen Ubichinons aus Mevalonat gebildet werden. Anders als Plastiden besitzen Mitochondrien vermutlich keine eigene IPP-Biosynthese, sondern sind auf die Versorgung aus dem cytosolischen Mevalonatweg angewiesen, worauf auch Fütterungsversuche mit Mevinolin hingewiesen hatten (DÖLL *et al.*, 1984; SCHINDLER *et al.*, 1985).

Monoterpene werden generell in Plastiden nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet (siehe 4.3.2, S. 106). Eine Ausnahme hierzu ist der rote Farbstoff Shikonin aus *Lithospermum erythrorhizon*, welcher einen von GPP abgeleiteten hemiterpenen Anteil besitzt. Shikonin wird aus Mevalonat synthetisiert (LI *et al.*, 1998). Im Einklang damit enthält *Lithospermum erythrorhizon* auch eine cytosolische GPP-Synthase (siehe 1.3, S. 18; SOMMER *et al.*, 1995). Shikonin ist der bisher einzige Monoterpen-abgeleitete pflanzliche Naturstoff, für den eine Bildung über den Acetat/Mevalonat-Weg nachgewiesen wurde.

4.3.2 Der DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese

Seit der ersten Beschreibung des DOXP/MEP-Weges in Bakterien (ROHMER *et al.*, 1993) und in Grünalgen (SCHWENDER *et al.*, 1995; LICHTENTHALER *et al.*, 1995) (siehe 1.4.2, S. 21) sind sehr viele Erkenntnisse über seine Verbreitung und seine enzymatischen Schritte von verschiedenen Arbeitsgruppen erarbeitet worden. Viele Aspekte sind im Detail in mehreren Übersichtsartikeln beschrieben worden (LICHTENTHALER *et al.*, 1997a; LICHTENTHALER, 1998, 1999; KNÖSS und REUTER, 1998; EISENREICH *et al.*, 1998; KNÖSS, 1999; ROHMER, 1998, 1999a, 1999b, 1999c; BOUCHER und DOOLITTLE, 2000; LICHTENTHALER *et al.*, 2000). Die wichtigsten Entdeckungen und einige neuere Literatur werden hier noch einmal dargestellt.

Nomenklatur des DOXP/MEP-Weges

Es ist wünschenswert, einen kurzen und aussagekräftigen Namen für den alternativen oder mevalonatunabhängigen IPP-Biosyntheseweg zu finden. Häufig wurde dieser Stoffwechselweg deshalb GAP/Pyruvat-Weg genannt, oder nach dem ersten Zwischenprodukt 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg, DOXP-Weg, wie von Lichtenthaler vorgeschlagen wurde (LICHTENTHALER, 1998), oder DXP-Weg. Da DOXP aber auch Vorläufer für Thiaminpyrophosphat (Vitamin B₁) und Pyridoxalphosphat (Vitamin B₆) ist (siehe 1.4.2, S. 21), wurde auf dem „4th European Symposium on Plant Isoprenoids“ (Barcelona, 21.-23.4.1999) vorgeschlagen, den Weg entweder nach seinem Entdecker Michel Rohmer zu benennen, oder ihn nach dem ersten, vermutlich für die IPP-Biosynthese spezifischen Intermediat 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (s.u.) als MEP-Weg zu bezeichnen. Eine Mehrheit der Teilnehmer der Konferenz sprach sich für MEP-Weg aus. Die Ansicht, dass MEP das erste spezifisch nur für die Isoprenoidbiosynthese verwendete Intermediat des alternativen IPP-Biosyntheseweges sei, kann aber insofern angezweifelt werden, als sich in vielen Organismen aus MEP gebildete Verbindungen anhäufen, die nicht von IPP oder DMAPP abgeleitet und somit auch keine Isoprenoide sind. Diese Nebenprodukte sind 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat, welches von bestimmten Bakterien unter oxidativem Stress produziert wird (OSTROVSKY *et al.*, 1998; LYSAK *et al.*, 1999), sowie 2-C-Methyl-D-erythritol und 2-C-Methyl-D-erythrono-1,4-lacton, welche in vielen Pflanzen gebildet werden (FELLERMEIER *et al.*, 1998, SAGNER *et al.*, 1998a). 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat ist zwar inzwischen als weiteres echtes Intermediat des DOXP/MEP-

Weges bekannt (s.u.), 2-C-Methyl-D-erythritol und 2-C-Methyl-D-erythrono-1,4-lacton müssen jedoch als Nebenprodukte angesehen werden. Ob die Bildung dieser Verbindungen aus MEP ähnlich weit verbreitet ist wie die der Vitamine B₁ und B₆ aus DOXP, d.h. ob MEP eine „echte“ Verzweigungsstelle darstellt wie DOXP, wird sich zeigen.

Der Name DOXP- oder DXP-Weg ist früh geprägt worden (LICHTENTHALER, 1998) und die Erfahrung zeigt, dass sich der Sprachgebrauch nicht nach Empfehlungen richtet, sondern eher nach Gewohnheiten. Schon die Gewohnheit, von der IPP-Biosynthese zu sprechen, kann jedoch in Frage gestellt werden, da zumindest für *E. coli* gezeigt wurde, dass sich der Weg in Richtung IPP und DMAPP gabelt (s.u.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN *et al.*, 2000). Als Kompromiss bietet sich hier für die mevalonatunabhängige IPP- und DMAPP-Biosynthese der Doppelname DOXP/MEP-Weg an, wie er in dieser Arbeit und in einigen Publikationen schon genannt wurde. Auch für den Mevalonatweg der IPP-Bildung wird häufig der Doppelname Acetat/Mevalonat-Weg verwendet.

Intermediate, Enzyme und Gene des DOXP/MEP-Weges

Der erste Schritt des DOXP/MEP-Weges besteht in der Bildung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) aus Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Pyruvat. Dabei wird in einer Transketolase-artigen Reaktion Pyruvat decarboxyliert und auf Thiaminpyrophosphat übertragen und der entstandene aktivierte Acetaldehyd wird mit GAP verknüpft (siehe Abbildung 4-4). Die Reaktion wird durch die DOXP-Synthase (DXS) katalysiert. DXS wurde kloniert und charakterisiert aus der Grünalge *Chlamydomonas* (SCHWENDER *et al.*, 1999) und verschiedenen Pflanzen (LANGE *et al.*, 1998; BOUVIER *et al.*, 1998; DELLAPENNA und MOEHS, 1999; ARAKI *et al.*, 2000; ESTEVEZ *et al.*, 2000; Lois *et al.*, 2000) sowie verschiedenen Bakterien (SPRENGER *et al.*, 1997; LOIS *et al.*, 1998; HARKER und BRAMLEY, 1999; MILLER *et al.*, 1999; ALTINCICEK *et al.*, 2000; KUZUYAMA *et al.*, 2000c). ¹⁴C-DOXP wurde in Chromoplasten aus *Capsicum annuum* und Narzissenblüten in β -Carotin eingebaut (FELLERMEIER *et al.*, 1999). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Einbauexperimente mit [1-²H₁]-DOX in Isopren und 2-Methyl-3-buten-2-ol sowie die weiteren Einbauexperimente der Karlsruher und anderer Arbeitsgruppen mit DOX bestätigen DOXP als das erste Intermediat des DOXP/MEP-Wegs der Isoprenoidbiosynthese. Die ersten in einer Fachzeitschrift publizierten Berichte über einen Einbau von DOX in Isoprenoide entstanden aus dieser Arbeit (ZEIDLER *et al.*, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997).

DOXP wird im nächsten Schritt von DOXP-Reduktoisomerase (DXR) in 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) umgewandelt. Die Reaktion besteht in einer Ketol-Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts, gefolgt von einer NADPH-abhängigen Reduktion. DXR wurde kloniert und charakterisiert aus verschiedenen Pflanzen (LANGE und CROTEAU, 1999b; SCHWENDER *et al.*, 1999), Bakterien (TAKAHASHI *et al.*, 1998; ALTINCICEK *et al.*, 2000; GROLE *et al.*, 2000; KUZUYAMA *et al.*, 2000d; MILLER *et al.*, 2000) und *Plasmodium falciparum* (JOMAA *et al.*, 1999b). Der stereochemische Verlauf des Reduktionsschrittes in der DOXP-Reduktoisomerase-Reaktion ist für die Bakterien *E. coli* (RADYKEWICZ *et al.*, 2000), *Synechocystis* sp. PCC6803 (PROTEAU *et al.*, 1999) und die Pflanze *Liriodendron tulipifera* (ARIGONI *et al.*, 1999b) untersucht worden. In allen Fällen wurde festgestellt, dass ein Hydrid-Ion von NADPH auf der *Re*-Seite des intermediären Aldehyds übertragen wird. Das C3-Proton von DOXP wird zum H_{Si} an C1 von MEP. DXR ist somit eine Klasse B-Dehydrogenase. Der Verlauf entspricht stereochemisch dem der Ketolsäure-Reduktoisomerase in der Biosynthese von Valin, Leucin und Isoleucin. ¹⁴C-MEP wurde in Chromoplasten aus *Capsicum annuum* und Narzissenblüten in β -Carotin eingebaut (FELLERMEIER *et al.*, 1999).

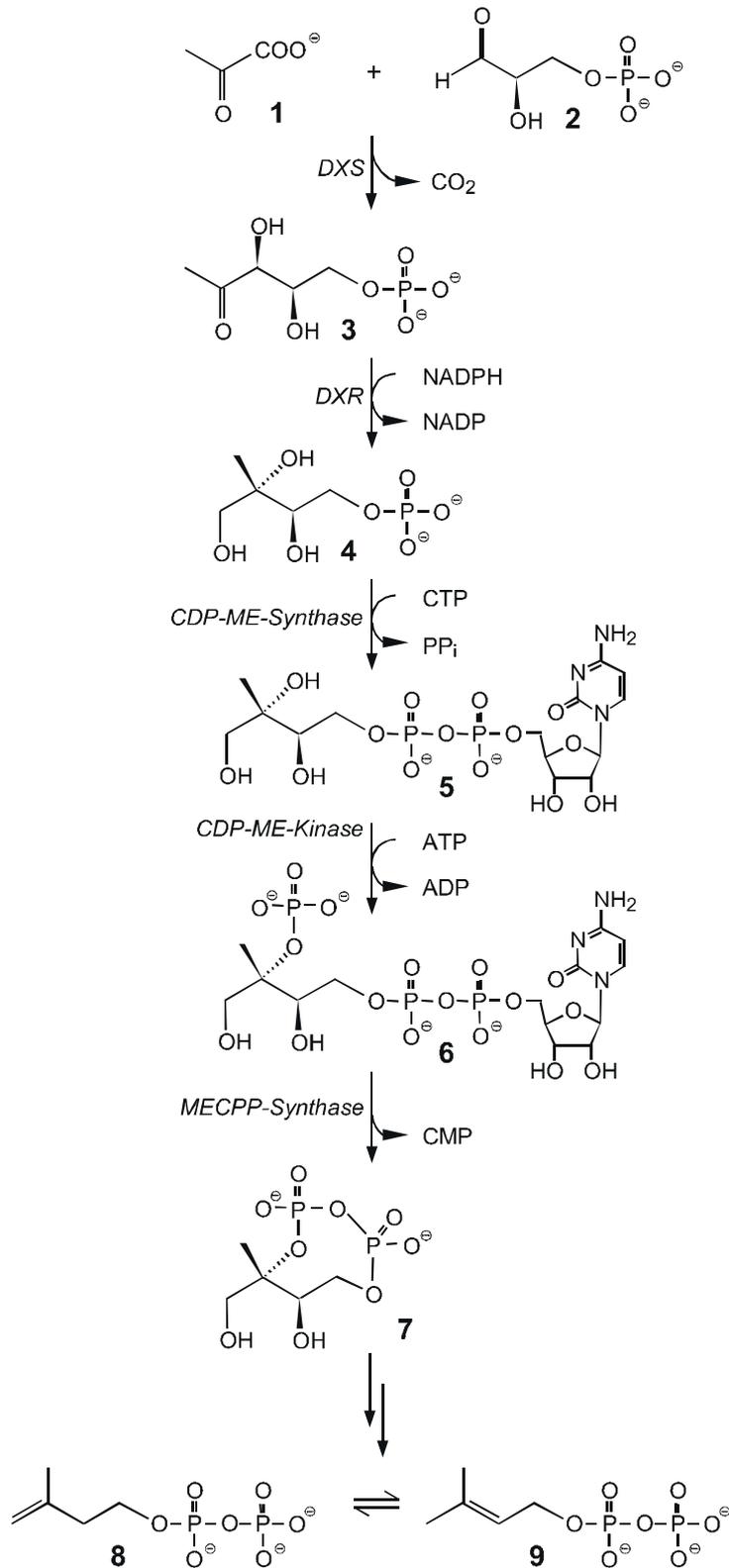


Abbildung 4-4 Der DOXP/MEP-Weg der IPP- und DMAPP-Biosynthese in Bakterien und den Plastiden von Pflanzen. **1** Pyruvat, **2** D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP), **3** 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP), **4** 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP), **5** 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME), **6** 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-ME2P), **7** 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MECPP), **8** Isopentenylpyrophosphat (IPP), **9** Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). Der DOXP/MEP-Weg bildet in *E. coli* und möglicherweise auch in Pflanzen IPP und DMAPP auf getrennten Routen.

Die folgenden enzymatischen Schritte sind erst seit kurzem bekannt und waren von ihrem Verlauf her unerwartet: MEP reagiert mit CTP zu 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) und anorganischem Pyrophosphat. Die CDP-ME-Synthase wurde aus *E. coli* (ROHDICH *et al.*, 1999; KUZUYAMA *et al.*, 2000a) und *Arabidopsis* (ROHDICH *et al.*, 2000a) kloniert. [2-¹⁴C]-CDP-ME wurde in Carotinoide in *Capsicum annuum*-Chromoplasten eingebaut (ROHDICH *et al.*, 1999).

CDP-ME wird im vierten Schritt durch CDP-ME-Kinase ATP-abhängig an der 2-OH-Gruppe phosphoryliert. Es entsteht 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-ME2P). CDP-ME-Kinase wurde aus *E. coli* (KUZUYAMA *et al.*, 2000b; LÜTTGEN *et al.*, 2000) und aus Tomate (ROHDICH *et al.*, 2000b) kloniert. Dasselbe Enzym aus *E. coli*, welches von dem Gen *ychB* codiert wird, und das Orthologe aus *Mentha x piperita*, wurden zuvor als Isopentenylmonophosphat-Kinase beschrieben (LANGE und CROTEAU, 1999a). Diese IPP-bildende Enzymaktivität konnte von ROHDICH *et al.* (2000b) und KUZUYAMA *et al.* (2000b) nicht gemessen werden. Von LANGE und CROTEAU (1999a) wurde für das partiell gereinigte *E. coli*-Enzym eine spezifische Isopentenylmonophosphat-Kinase-Aktivität von ca. 1,1 pmol mg⁻¹ min⁻¹ (= ca. 1μUnit pro mg Protein) angegeben. Bei einer aus dem publizierten Elektropherogramm geschätzten Reinheit von 1% „verbessert“ sich die spezifische Aktivität auf ca. 0,1 mUnits pro mg. Dem stehen die von ROHDICH *et al.* (2000b) für das Enzym aus Tomate und von KUZUYAMA *et al.* (2000b) für das *E. coli*-Enzym gemessenen CDP-ME-Kinase-Aktivitäten von 33 bzw. 40 Units pro mg gegenüber. Die Isopentenylmonophosphat-Kinase-Aktivität ist also um mindestens 5 Größenordnungen kleiner und kann daher kaum relevant sein. [2-¹⁴C]-CDP-ME2P wurde in Carotinoide in *Capsicum annuum*-Chromoplasten eingebaut (LÜTTGEN *et al.*, 2000).

Im fünften Schritt des DOXP/MEP-Weges wird CDP-ME2P unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat (CMP) zu 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MECPP) umgesetzt. MECPP-Synthase wurde aus *E. coli* kloniert (HERZ *et al.*, 2000; TAKAGI *et al.*, 2000). [2-¹⁴C]-MECPP wurde in Carotinoide in *Capsicum annuum*-Chromoplasten eingebaut und [2-¹⁴C]-DOXP, [2-¹⁴C]-MEP, [2-¹⁴C]-CDP-ME und [2-¹⁴C]-CDP-ME2P wurden in MECPP in *Capsicum annuum*-Chromoplasten eingebaut (HERZ *et al.*, 2000). MECPP ist damit nicht nur ein Nebenprodukt des DOXP/MEP-Wegs, dass sich bei oxidativem Stress in bestimmten Bakterien anhäuft (s.o., Abschnitt Nomenklatur), sondern auch ein echtes Zwischenprodukt auf dem Weg zu IPP und DMAPP. Vielleicht ist die Anhäufung von MECPP bei gleichzeitig verminderter Akkumulation von Isoprenoiden unter oxidativem Stress in einigen Bakterien (OSTROVSKY *et al.*, 1998) durch eine Hemmung des Folgeschritts bedingt.

Der DOXP/MEP-Weg verbraucht also CTP (CDP-ME-Synthase) unter Bildung von CMP (MECPP-Synthase). Es ist vernünftig, anzunehmen, dass CMP durch Nucleosidmonophosphat-Kinasen und Nucleosiddiphosphat-Kinasen im Sinne eines „salvage pathway“ über CDP wieder in CTP überführt wird. Der Bedarf von 2 ATP für dieses CTP-Recycling sollte in Energiebilanzen berücksichtigt werden. Dies kann z.B. eine Rolle für die mathematische Modellierung industriell genutzter Isoprenoidbiosynthesen oder der Isoprenemission spielen (siehe Abschnittsende 4.1.2, S. 81). Die Notwendigkeit von CTP-Recycling für den DOXP/MEP-Weg in Plastiden könnte erklären, weshalb Spinatchloroplasten aus [³³P]-ATP bevorzugt [³³P]-CTP gegenüber GTP und UTP bilden (BOVET *et al.*, 1999). Von der CDP-ME-Synthase wird anorganisches Pyrophosphat aus CTP abgespalten. Die Isoprenoidbiosynthese nach dem DOXP/MEP-Weg produziert also mehr Pyrophosphat, als nur aus den kettenverlängernden Prenyltransferase-Schritten zu erwarten ist. Gerade in Isopren-produzierenden Pflanzen mit ihrem hohen Stofffluss durch den

DOXP/MEP-Weg dürften so beträchtliche Mengen an Pyrophosphat entstehen¹⁷. Ob Pyrophosphat einfach nur hydrolysiert wird und damit die Reaktionen irreversibel macht oder noch weitere Bedeutung für den Stoffwechsel haben könnte, ist unbekannt.

Die endständige Phosphatgruppe des Pyrophosphatrestes von IPP und DMAPP stammt also nicht wie zunächst erwartet aus einer von ATP abhängigen Phosphorylierung, sondern aus der eher ungewöhnlichen Anlagerung von CTP¹⁸. Diese Reaktion, die von CDP-ME-Synthase katalysiert wird, wurde durch zwei interessante Strategien gefunden. KUZUYAMA *et al.* (2000b) konstruierten dazu einen *E. coli*-Stamm, der den Teil des Mevalonat-Wegs von Mevalonat zu IPP besitzt. Dieser Stamm enthält zusätzlich die Gene für Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Kinase und Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase. Mevalonat-auxotrophe Mutanten eines solchen Organismus müssen einen Defekt im DOXP/MEP-Weg haben. Damit können Gene kloniert werden, die den Defekt aufheben. ROHDICH *et al.* (1999) gingen einen anderen Weg. Bei der Inkubation von Protein-Extrakten aus *E. coli* mit markiertem MEP wurde eine CTP-abhängige Reaktion gefunden und das Produkt identifiziert. Anstatt nun das Enzym zu reinigen und partiell zu sequenzieren und mit dieser Information das Gen zu klonieren, wurde in Datenbanken nach Enzymen gesucht, von denen bekannt war, dass sie die analoge Bildung von CDP-Konjugaten katalysieren. Es wurde *acsI* aus *Haemophilus influenzae* gefunden, das ähnlich zu einem weiteren Gen namens *ygbP* ist. Das Vorkommen von Orthologen zu *ygbP* in verschiedenen Bakterien- und Pflanzen-Genomen korrelierte mit der Gegenwart der bis dahin bekannten Gene für DXS und DXR. Mit dieser Strategie wurden schließlich auch die Gene für die weiteren Schritte, CDP-ME-Kinase und MECPP-Synthase gefunden (s.o.). Diese Studien zeigen, welche Bedeutung Genomsequenzierung und Bioinformatik in Verbindung mit dem biochemischen Nachweis der Genfunktion und der Produktidentifizierung enzymatischer Reaktionen für die Aufklärung von Stoffwechselwegen in der Zukunft haben werden.

Weitere Schritte des DOXP/MEP-Weges

Mit der oben beschriebenen Strategie, in Datenbanken nach Genen zu suchen, die nur in Organismen mit bekannten Genen des DOXP/MEP-Wegs auftreten, nicht aber in Organismen mit dem Mevalonat-Weg, fand eine andere Arbeitsgruppe inzwischen zwei weitere Kandidaten, *lytB* und *gcpE* (CUNNINGHAM *et al.*, 2000). Eine weitere Strategie half, die Beteiligung von *lytB* am DOXP/MEP-Weg zu belegen: *E. coli*-Stämme wurden so modifiziert, dass sie farbige Carotinoide bilden können. Transformation solcher Stämme mit genomischen Bibliotheken aus Bakterien und pflanzlichen cDNA-Bibliotheken führte zu Kolonien mit sichtbar verstärkter Lycopin-Produktion. Orthologe des *E. coli*-Gens *lytB* aus *Synechocystis* und der Pflanze *Adonis aestivalis* konnten die Carotinoid-Akkumulation verstärken. Dasselbe wurde für DXS aus *Tagetes erecta* und IPP-Isomerase aus *Arabidopsis* gefunden¹⁹. Die Mutation von *lytB* in *Synechocystis* durch Insertion war lethal. Das Wachstum wurde durch Zugabe der Alkohol-Analoga von IPP und DMAPP, 3-Methyl-3-buten-1-ol und 3-Methyl-2-buten-1-ol, zum Medium wiederhergestellt (CUNNINGHAM *et al.*, 2000; siehe auch 4.1.2, S. 81). Die Funktion von *lytB* und *gcpE* wurde noch nicht nachgewiesen. Ein anderes Gen, das mit dem hier betrachteten nicht verwandt ist, ist leider auch mit *lytB* bezeichnet worden (GARCÍA *et al.*, 1999).

¹⁷ Zusätzlich zur CDP-ME-Synthase wird auch von der Isopren-Synthase Pyrophosphat gebildet, d.h. je Isoprenmolekül entstehen zwei Pyrophosphat-Ionen.

¹⁸ Analoge Cytidyltransferase-Reaktionen kommen z.B. in der Phospholipidbiosynthese (vgl. VOET und VOET, 1995) und der Biosynthese bestimmter Deoxy-Zucker in Bakterien vor (LIU und THORSON, 1994).

¹⁹ Mit einer verwandten Strategie von HEMMI *et al.* (1998) zur Identifizierung möglicher Isoprenoidbiosynthese-Gene wurden Mutationen in 29 Loci kartiert, die die Lycopinakkumulation in *E. coli* verminderten. *LytB*, *gcpE* und *dxs* wurden nicht gefunden, aber das IPP-Isomerase-Gen.

Obwohl die letzten Schritte des DOXP/MEP-Wegs noch nicht bekannt sind, können inzwischen aufgrund von Markierungsexperimenten und genetischen Untersuchungen entscheidende Aussagen über den weiteren Verlauf gemacht werden. Ein wichtiger Befund betrifft die unabhängige Bildung von IPP und DMAPP sowie die Rolle der IPP-Isomerase: Für *E. coli* ist eindeutig nachgewiesen worden, dass der DOXP/MEP-Weg eine Verzweigung haben muss, die auf getrennten Wegen zu DMAPP und IPP führt (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN *et al.*, 2000; siehe Abbildung 4-5). Für diesen Nachweis wurde ein *E. coli*-Stamm analog zu dem von KUZUYAMA *et al.* (2000b) konstruiert, der exogenes Mevalonat zu IPP umsetzen kann (s.o.) und der zusätzlich einen Defekt in der DXR enthält. Das Wachstumsmedium für diesen Stamm muss Mevalonsäure oder Methylerythritol (ME) enthalten²⁰. Als nächstes wurde das *idi*-Gen für IPP-Isomerase ausgeschaltet. Dieser Defekt hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum in Gegenwart von ME in Übereinstimmung mit dem früheren Befund, dass *idi* kein essentielles Gen für *E. coli* ist (HAHN *et al.*, 1999). Wenn *E. coli* nur einen Weg zur Biosynthese von IPP oder DMAPP hat, müsste ein unbekanntes Enzym ohne Sequenzähnlichkeit zu bekannten IPP-Isomerasen IPP mit DMAPP ins Gleichgewicht setzen, oder aber es existiert eine Verzweigung nach MEP. Aufgrund von Markierungsexperimenten mit Deuterium-markiertem ME war dies schon vorher vorgeschlagen worden (CHARON *et al.*, 2000). Das Deuterium an C3 von [3,5,5,5-²H₄]-ME blieb in den DMAPP-abgeleiteten Isopreneinheiten erhalten, fehlte aber in den IPP-abgeleiteten Isopreneinheiten. Auch Einbauexperimente mit [4-²H]-DOX in Ubichinon aus *E. coli* (GINER *et al.*, 1998) in Verbindung mit der Stereochemie der von *idi* codierten *E. coli*-IPP-Isomerase und FPP-Synthase (LEYES *et al.*, 1999a; LEYES *et al.*, 1999b) deuteten auf eine Verzweigung des DOXP/MEP-Wegs hin. Deuterium aus [4-²H]-DOX blieb nur an C2 der endständigen, DMAPP-abgeleiteten Isopreneinheit von Ubichinon erhalten (C4 von DOX entspricht C3 von MEP und C2 von IPP bzw. DMAPP, siehe Abbildung 4-6). Da IPP-Isomerase und FPP-Synthase dieselbe Stereochemie wie die eukaryontischer Enzyme aufweisen, konnte DMAPP für die endständige Isopreneinheit nicht mithilfe der *idi*-codierten Isomerase aus IPP gebildet worden sein. Das bedeutet, dass entweder IPP und DMAPP unabhängig entstehen, oder das eine unbekannte Isomerase mit anomaler Stereospezifität in *E. coli* existiert. Die letztere Möglichkeit wurde eindeutig dadurch ausgeschlossen, dass der oben beschriebene *E. coli*-Stamm mit defekter DXR, defekter IPP-Isomerase und zusätzlichen Genen für die IPP-Synthese aus Mevalonat nicht auf einem Medium ohne ME und mit Mevalonsäure-Zusatz wachsen konnte (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN *et al.*, 2000). D.h., dass aus MVA gebildetes IPP nicht in DMAPP überführt werden konnte. Das von *idi* codierte Enzym ist also die einzige funktionsfähige IPP-Isomerase in *E. coli* und der DOXP/MEP-Weg muss eine Verzweigung enthalten. Obwohl IPP-Isomerase nicht essentiell für *E. coli* ist, ist sie offenbar funktionell und unter Umständen vorteilhaft, wie die erhöhte Carotinoidproduktion bei Überexpression zeigt (CUNNINGHAM *et al.*, 2000 und Zitate). Eine Verzweigung des DOXP/MEP-Wegs liegt offenbar auch beim Cyanobakterium *Synechocystis* vor, bei dem eine IPP-Isomerase weder biochemisch noch im sequenzierten Genom nachgewiesen werden konnte (ERSHOV *et al.*, 2000, siehe auch Fußnote 16, S. 104).

Etwas anders ist die Situation in dem Bakterium *Zymomonas mobilis* (CHARON *et al.*, 1999) und der Pflanze *Catharanthus roseus* (ARIGONI *et al.*, 1999a). Der Verbleib der Protonen von DOXP in diesen Organismen ist konsistent mit einer Route, die nur zu IPP führt oder mit einer Gabelung, bei der hauptsächlich der IPP-Zweig beschriftet wird, so dass eine IPP-Isomerase-Aktivität essentiell sein muss. Auch in *Mentha x piperita* erzeugt der DOXP/MEP-Weg offenbar IPP und nicht DMAPP: Bei Hemmung der IPP-Isomerase wurde eine

²⁰ Zuvor war gezeigt worden, dass *E. coli* exogenes ME zur Isoprenoidbiosynthese verwenden kann und dass eine DXS-Defektmutante quantitativen Einbau von ME in Ubichinon und Menachinon zeigt (CHARON *et al.*, 2000 und Zitate).

Anhäufung von IPP beobachtet (MCCASKILL und CROTEAU, 1999). Ob also eine Verzweigung im DOXP/MEP-Weg vorliegt hängt vermutlich vom untersuchten Organismus ab.

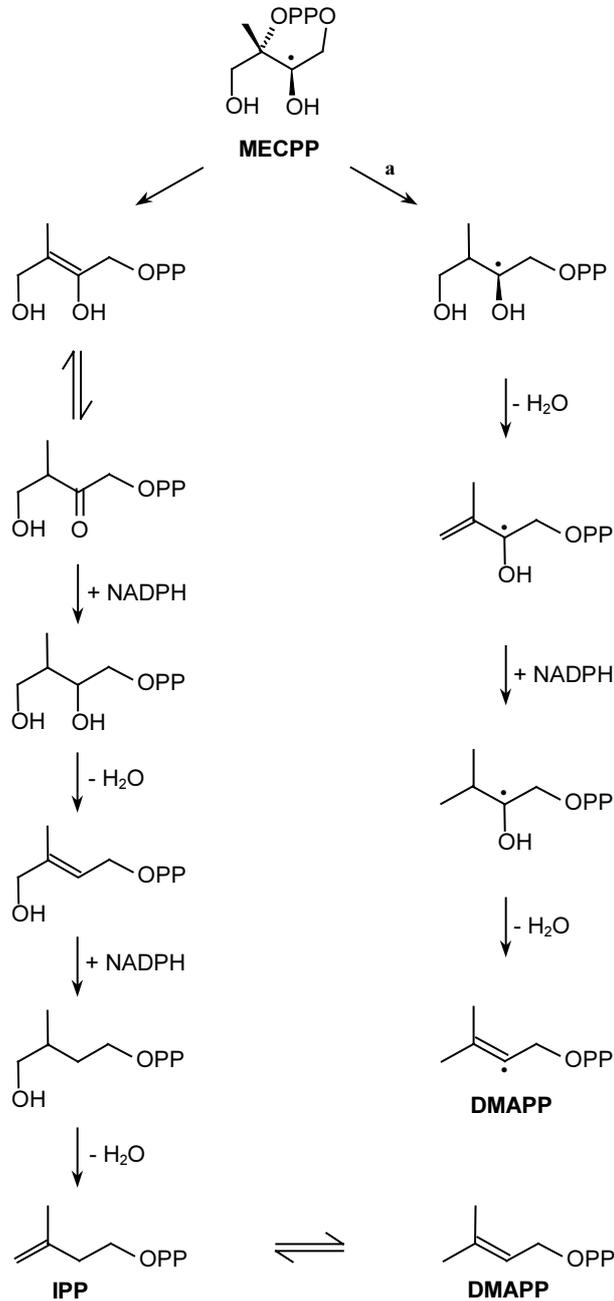
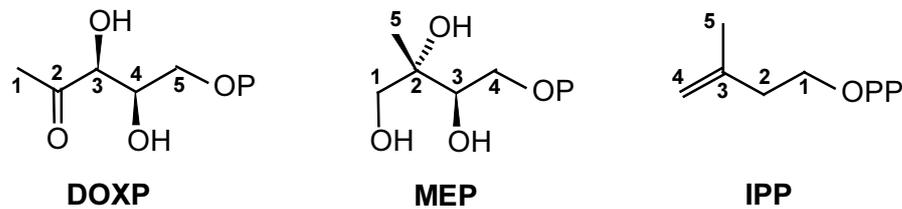


Abbildung 4-5 Mögliche Intermediate zwischen 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MECPP) und IPP und DMAPP. • Deuterium-Markierung aus C4 von DOX bzw. C3 von MEP.
a: Direkte reduktive Verdrängung der OPPO-Gruppe durch Wasserstoff. Alle übrigen Reaktionen sind Isomerisierungen, Eliminierungen von Wasser oder NADPH-abhängige Reduktionen.

Der Verbleib der übrigen Protonen von DOX und ME in Ubichinon und Menachinon wurde ebenfalls in *E. coli* mit verschiedenen Deuterium-markierten Substraten untersucht und ermöglicht weitere einschränkende Aussagen über den möglichen Verlauf des DOXP/MEP-Wegs: Alle Protonen der Methylgruppe von DOX (GINER und JAUN, 1998) bzw. ME (CHARON *et al.*, 2000) blieben in den entsprechenden Methylgruppen aller Isopreneinheiten erhalten. Das Proton an C3 von DOX (GINER *et al.*, 1998) bzw. beide Protonen an C1 von ME (CHARON *et al.*, 2000) blieben an C4 aller Isopreneinheiten erhalten (C3 von DOX entspricht C1 von MEP und C4 von IPP/DMAPP, siehe Abbildung 4-6). Die Protonen an C5 von DOX (BROERS, 1994) bzw. C4 von ME (DUVOLD *et al.*, 1997) blieben an C1 aller Isopreneinheiten erhalten (C5 von DOX entspricht C4 von MEP und C1 von IPP/DMAPP). Für *Synechocystis* wurde derselbe Schluss indirekt gezogen durch Einbau von an C6 doppelt deuterierter Glucose (PROTEAU, 1998b).



C-Atom-Nummer in		
DOXP	MEP	IPP
1	5	5
2	2	3
3	1	4
4	3	2
5	4	1

Abbildung 4-6 Numerierung der C-Atome in DOXP, MEP und IPP. Die Zeilen der Tabelle enthalten die Nummern der einander entsprechenden C-Atome.

Auch in Pflanzen ist das Schicksal aller Protonen von DOX durch Einbau Deuterium-markierter DOX-Proben untersucht worden: Die Markierung der einfach deuterierten Methylgruppe (C1) von DOX blieb in allen Isopreneinheiten von Isoprenoiden verschiedener Algen und Pflanzen erhalten (diese Arbeit; SCHWENDER *et al.*, 1997; ZEIDLER *et al.*, 1997; ZEIDLER und LICHTENTHALER, 1998; SCHWENDER *et al.*, 2000). Durch Einbau von [3-²H₃]-Alanin wurde für das Monoterpen Linalylacetat aus *Mentha citrata* indirekt der Erhalt aller drei Protonen in beiden Isopreneinheiten nachgewiesen (FOWLER *et al.*, 1999). Das Proton an C3 von DOX blieb in Lutein und Phytol aus *Catharanthus roseus* in allen Isopreneinheiten erhalten (ARIGONI *et al.*, 1999a). Das Proton an C4 von DOX dagegen wurde in Lutein und Phytol aus *Catharanthus roseus* in keiner der Isopreneinheiten wiedergefunden, entweder als Folge der IPP-Isomerase- und Prenyltransferase-Reaktionen oder durch einen Schritt des DOXP/MEP-Wegs (ARIGONI *et al.*, 1999a). Die Protonen an C5 von DOX blieben in Mono- und Sesquiterpenen verschiedener Pflanzen (PIEL *et al.*, 1998), im DMAPP-abgeleiteten Teil von Umbelliferon aus *Apium graveolens* (STANJEK *et al.*, 1999) und in dem Monoterpen Linalylacetat aus *Mentha citrata* (FOWLER *et al.*, 1999) erhalten. Der Nachweis für *Mentha citrata* wurde indirekt durch Einbau von [6,6-²H₂]-Glucose erbracht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Die Protonen an C1, C3 und C5 von DOX bleiben in *E. coli* und Pflanzen erhalten; Das Proton von C4 bleibt in *E. coli* nur in der DMAPP-abgeleiteten Isopreneinheit erhalten, geht aber im Bakterium *Zymomonas mobilis*²¹ und der Pflanze *Catharanthus roseus* in den IPP- und DMAPP-abgeleiteten Isopreneinheiten verloren. Für *E. coli* ist zusätzlich bekannt, dass die beiden Protonen an C1 von MEP (= C3 von DOX und C4 von IPP) in DMAPP und IPP erhalten bleiben. Der DOXP/MEP-Weg unterscheidet sich offensichtlich in verschiedenen Organismen.

Die oben beschriebenen Informationen über den Erhalt oder Verlust der Wasserstoffatome von DOXP auf dem Weg zu IPP und DMAPP schränken die Möglichkeiten des weiteren Verlaufs ein. Die OH-Gruppen von DOXP und MEP müssen auf irgend eine Weise entfernt werden. Häufig geschieht dies durch säure- oder basenkatalysierte Elimination von Wasser. Beispiele hierfür sind Enolase in der Glykolyse, Fumarase im Citratzyklus oder β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase in der Fettsäure-Biosynthese (vgl. VOET und VOET, 1995). Manchmal wird die OH-Gruppe zuvor phosphoryliert und somit zu einer besseren Abgangsgruppe (WESTHEIMER, 1987). Dies geschieht z.B. bei der von ATP abhängigen Elimination der tertiären OH-Gruppe von Mevalonatpyrophosphat durch Mevalonatpyrophosphat-Decarboxylase im Mevalonat-Weg oder bei der Bildung von Chorismat aus 3-Enoylpyruvylshikimat-5-phosphat im Shikimat-Weg. Beim DOXP/MEP-Weg könnte man sich deshalb vorstellen, dass die tertiäre OH-Gruppe an C2 von MEP, die im MECPP als Phosphatester vorliegt, durch eine intramolekulare Elimination des Cyclopyrophosphatrests erfolgt. Die anderen beiden OH-Gruppen können im nächsten Schritt nach MECPP auf diese Weise nicht eliminiert werden: Der OH-Gruppe an C1 steht kein Wasserstoff am benachbarten C2 zur Verfügung. Die OH-Gruppe an C3 könnte nur zusammen mit einem der Protonen an C4 eliminiert werden, letztere bleiben jedoch im isoprenoiden Endprodukt erhalten. Die intramolekulare Elimination des Cyclopyrophosphatrests könnte auf zwei Weisen erfolgen: Zusammen mit H-3 oder H-1 (MECPP). Für *E. coli* ist die Elimination mit H1 ausgeschlossen, da beide Protonen von C1 aus MEP in allen Isopreneinheiten erhalten bleiben. H-3 bleibt in der DMAPP-Einheit erhalten, die Abstraktion dieses Protons kann dann nur noch zu IPP führen. Wenn dasselbe abgespaltene Proton nicht vom Enzym in einem Folgeschritt, z.B. einer von NADPH abhängigen Reduktion, wieder zurückübertragen wird, muss es offensichtlich noch einen anderen Mechanismus zur Entfernung der Sauerstoffatome von MECPP in *E. coli* geben, bei dem H3 erhalten bleibt. Denkbar wäre ein direkter reduktiver Ersatz einer der OH-Gruppen oder der Cyclopyrophosphat-Gruppe an C3 durch Wasserstoff, z.B. nach einem radikalischen Mechanismus wie bei der Biosynthese von Deoxyribonucleotiden. Letzterer Mechanismus beinhaltet zwar auch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einem der COH-Gruppe benachbarten C-Atom, jedoch wird dieser Wasserstoff vom Enzym an der selben Stelle wieder zurückübertragen (vgl. VOET und VOET, 1995). In Pflanzen ist als nächster Schritt nach MECPP eine intramolekulare Elimination des Cyclopyrophosphats von C2 zusammen mit dem Proton an C3 denkbar, da dieses in keiner der Isopreneinheiten erhalten bleibt. Von den beiden Protonen an C1 von MECPP ist aus dem Einbau von [3-²H]-DOX bekannt, dass zumindest eines erhalten bleibt, das andere könnte jedoch vom heutigen Wissensstand her durch Elimination entfernt werden, da bisher keine Markierungsstudien mit ME in Pflanzen bekannt sind.

Kurz vor Beendigung dieser Dissertation erschien eine Arbeit, die eine Verzweigung des DOXP/MEP-Wegs auch in einer Pflanze nahelegt, nämlich bei der Biosynthese des

²¹ Der Nachweis für *Zymomonas* wurde indirekt durch Wachstum auf [1-²H]-Glucose erbracht. Diese Studie wurde so interpretiert, dass der Wasserstoff an C4 von DOX (entspricht H an C2 von IPP) vor der Bildung von IPP entfernt wird und dass Wasserstoff in der pro-S-Position an C2 von IPP durch einen unbekanntes NADH- oder NADPH-abhängigen Schritt eingeführt wird (CHARON *et al.*, 1999; 2000).

Monoterpens Cineol in *Eucalyptus globulus* aus [2-¹³C, 4-²H]-DOX (RIEDER *et al.*, 2000): ¹³C wurde in beide Isopreneinheiten gleich gut eingebaut und ²H blieb zu 57% (im Vergleich zu ¹³C) in der DMAPP-Einheit erhalten. In der IPP-abgeleiteten Einheit wurde ²H fast komplett ausgewaschen. Dies ist im Einklang mit der Situation in *E. coli*, steht aber im Gegensatz zu den Ergebnissen mit *Catharanthus*, bei denen Deuterium aus [2-¹³C, 4-²H]-DOX in keiner der Isopreneinheiten von Lutein und Chlorophyll erhalten blieb (ARIGONI *et al.*, 1999a). Ob das Deuteron an C4 von DOX vor der Bildung von IPP oder bei der Kettenverlängerung durch GPP-Synthase abgespalten wird lässt sich noch nicht entscheiden. Möglicherweise ist die Verzweigung in allen DOXP/MEP-Weg-Organismen vorhanden und es unterscheiden sich nur die Flussraten durch den einen oder anderen Zweig und die IPP-Isomerase. Generell ist es sinnvoll anzunehmen, dass der grössere Fluss durch den IPP-Zweig läuft, da zur Bildung längerer Isoprenoidketten mehr IPP als DMAPP benötigt wird (DMAPP wird nur als Startermolekül gebraucht). Interessant ist in dieser Hinsicht die Frage, ob in Isoprenemittierenden Pflanzen vielleicht der DMAPP-Zweig stärker beschriftet wird, da während der Isoprenemission mehr DMAPP als IPP gebraucht wird.

In Abbildung 4-5 sind mögliche Reaktionssequenzen von MECPP zu IPP unter der Voraussetzung einer Verzweigung des DOXP/MEP-Wegs und Berücksichtigung der oben diskutierten Ergebnisse dargestellt. Andere Mechanismen lassen sich jedoch noch nicht ausschließen.

Ein mögliches Intermediat des DOXP/MEP-Wegs könnte 3-Formyl-1-butylpyrophosphat sein. Diese Substanz wurde als hochwirksames $\gamma\delta$ -T-Zellen stimulierendes Phosphoantigen aus *Mycobacterium fortuitum* isoliert (siehe letzter Absatz in 4.2.2, S. 86). Allerdings ist die Bildung von 3-Formyl-1-butylpyrophosphat mit dem Verlust eines Protons an C1 von MEP verbunden, so dass die Verbindung vielleicht ein Nebenprodukt und kein Intermediat des DOXP/MEP-Weges ist.

Verbreitung des DOXP/MEP-Weges in Eubakterien und Archaea

Die unerwarteten Markierungsmuster von Hopanoiden, die u.a. aus den photosynthetischen schwefelfreien Purpurbakterien *Rhodospseudomonas palustris* und *Rhodospseudomonas acidophila* nach Einbau von [1-¹³C]-Acetat und [2-¹³C]-Acetat isoliert wurden (FLESCHE und ROHMER, 1988), führten in der Arbeitsgruppe Rohmer letztlich zur Entdeckung des DOXP/MEP-Wegs in verschiedenen Eubakterien (ROHMER *et al.*, 1993). Rohmer suchte 1998 zwar zunächst nach einer anderen Erklärung für die nichtklassischen Markierungsmuster, z.B. indirekter Einbau von Acetat über den Glyoxylat-Zyklus unter der Annahme zweier getrennter Acetat-Pools (FLESCHE und ROHMER, 1988), jedoch ist heute klar, dass der DOXP/MEP-Weg der IPP- und DMAPP-Biosynthese unter Eubakterien vermutlich weiter verbreitet ist als der Mevalonat-Weg, insbesondere unter den Proteobakterien und den Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt. Er wird entweder alleine gefunden, zusammen mit einigen Genen des MVA-Weges oder zusammen mit dem kompletten MVA-Weg (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Das Verteilungsmuster der zwei IPP-Biosynthesewege in Bakterien ähnelt dem der Thermophilie oder der Fähigkeit zur Photosynthese. Nicht verwandte Bakterien können denselben Weg enthalten und verwandte Bakterien verschiedene Wege (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Der DOXP/MEP-Weg hat vermutlich einen einzigen Ursprung nahe der Basis der Bakterien, da ihn nur Bakterien und Plastiden besitzen und er ist vermutlich evolutionsgeschichtlich älter als der MVA-Weg (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). LANGE *et al.* (2000) haben vorgeschlagen, dass lateraler Gentransfer (siehe 4.3.1, S. 104) zwischen Eubakterien nach der Entstehung der Plastiden durch Endosymbiose eines Cyanobakteriums eine wichtige Rolle in der Evolution des DOXP/MEP-Wegs gespielt haben soll. Bei Homologiesuchen in Sequenzdatenbanken stößt man auf viele pathogene Bakterien, die den

DOXP/MEP-Weg enthalten, wie z.B. *Haemophilus influenza*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa* (siehe z.B. LICHTENTHALER *et al.*, 2000). Durch Markierungsexperimente wurde der DOXP/MEP-Weg in weiteren pathogenen Bakterien identifiziert (ROSA PUTRA *et al.*, 1998a). Da der DOXP/MEP-Weg bei Säugetieren bisher nicht gefunden wurde, könnte es sich lohnen, Antibiotika zu entwickeln, die in den DOXP/MEP-Weg eingreifen (siehe 4.2.2, S. 86). Viele neuere Einbauexperimente mit ^{13}C -markierter Glucose und/oder Acetat wurden der Biosynthese von Sekundär-Isoprenoiden und Antibiotika aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten (Actinomyceten, Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt) gewidmet. Die meisten benutzen nur den DOXP/MEP-Weg zur Synthese primärer (z.B. Menachinon) und sekundärer Isoprenoide. Einige haben aber auch den MVA-Weg, verwenden ihn aber nur zur Synthese der Sekundärstoffe während der späten Wachstumsphase (siehe BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Der DOXP/MEP-Weg scheint in *Streptomyces*-Arten der ältere zu sein, während der MVA-Weg offenbar durch lateralen Gentransfer aus Archaea erworben wurde (BOUCHER und DOOLITTLE, 2000). Im Hinblick auf die Endosymbiontentheorie der Plastidenentstehung ist der Befund wichtig, dass, wie aus Markierungsexperimenten und Homologierecherchen in Gendatenbanken ersichtlich, die Cyanobakterien nur den DOXP/MEP-Weg besitzen (DISCH *et al.*, 1998a; PROTEAU, 1998a). Keines der bisher untersuchten Archaeobakterien besitzt den DOXP/MEP-Weg (SMIT und MUSHEGIAN, 2000; BOUCHER und DOOLITTLE, 2000).

Existiert der DOXP/MEP-Weg in Pilzen und Tieren?

Bisher wurde durch Markierungsstudien und Homologierecherchen in Gendatenbanken kein Hinweis auf ein Vorkommen des DOXP/MEP-Wegs in plastidenlosen Eukaryonten gefunden. Völlig ausschließen lässt sich dies aber noch nicht. Denkbar wäre z.B., dass endosymbiontische Vorläufer von Mitochondrien den DOXP/MEP-Weg in bestimmte Organismen eingebracht haben. Zumindest für Tabak ist jedoch gezeigt worden, dass die mitochondrielle Ubichinon-Synthese vermutlich auf den Import von IPP aus dem cytosolischen MVA-Weg angewiesen ist (siehe Abschnitt *Pflanzen* in 4.3.1, S. 104).

Verbreitung und Kompartimentierung des DOXP/MEP-Wegs in Algen und Pflanzen

Die Vielzahl der Markierungsstudien, Genklonierungen und biochemischen Arbeiten, die inzwischen von der Karlsruher Gruppe und anderen durchgeführt wurde, lässt kaum einen Zweifel daran, dass Pflanzen generell den DOXP/MEP-Weg für die Biosynthese ihrer plastidären Isoprenoide (Monoterpene, Diterpene, Tetraterpene) verwenden, während die cytosolischen Isoprenoide (Sesquiterpene, Triterpene) hauptsächlich nach dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden (siehe die am Anfang des Kapitels zitierten Übersichtsartikel, Abbildung 4-7). Die bisher aus Pflanzen klonierten Gene des DOXP/MEP-Wegs sind alle kerncodiert und weisen mutmaßliche Plastiden-Transitsequenzen auf (siehe die oben unter *Intermediate, Enzyme und Gene des DOXP/MEP-Weges* zitierten Arbeiten). Wie in der Kooperation der Arbeitsgruppe Lichtenthaler mit der Gruppe von M. Rohmer durch Markierungsstudien mit ^{13}C -Glucose und ^2H -DOX gezeigt wurde, werden die primären Isoprenoide der Plastiden verschiedener Algen und höherer Pflanzen (Carotinoide, Phytolseitenkette der Chlorophylle, Plastochinon) nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet (DISCH *et al.*, 1998b; LICHTENTHALER *et al.*, 1997a, 1997b, 1999; SCHWENDER *et al.*, 1995, 1996, 1997). Algen weisen dieselbe Kompartimentierung der IPP-Biosynthesewege auf wie Pflanzen (DOXP/MEP-Weg im Plastiden, MVA-Weg im Cytosol), mit Ausnahme der Grünalgen, die offenbar den Mevalonat-Weg verloren haben und daher auch die cytosolischen

Sterole nach dem DOXP/MEP-Weg bilden (MÜLLER, 1997; SCHWENDER *et al.*, 1997; DISCH *et al.*, 1998b; CVEJIC und ROHMER, 2000; HAGEN und GRÜNEWALD, 2000; SCHWENDER *et al.*, 2000; ZHOU und NES, 2000). Ob der DOXP/MEP-Weg bei den Grünalgen in verschiedenen Zellkompartimenten vorkommt, ist noch nicht genau bekannt. Umgekehrt scheint die Euglenophyte *Euglena gracilis* nur den MVA-Weg für die Biosynthese plastidärer wie cytosolischer Isoprenoide zu verwenden, obwohl ein geringer Beitrag des DOXP/MEP-Wegs nicht ausgeschlossen werden kann (MÜLLER, 1997; DISCH *et al.*, 1998b).

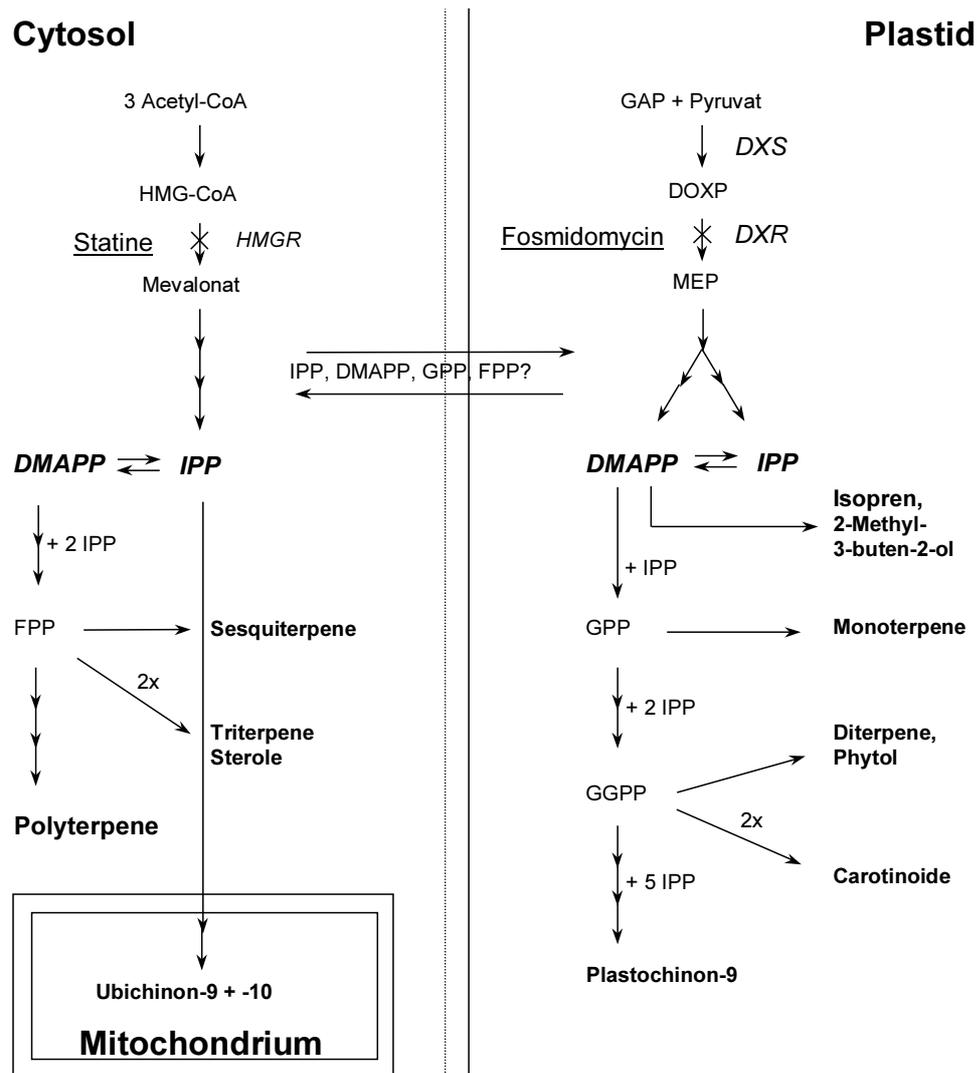


Abbildung 4-7 Kompartimentierung der IPP- und DMAPP-Biosynthese in höheren Pflanzen. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, werden die Hemiterpene Isopren und 2-Methyl-3-buten-2-ol im Plastiden nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet, der auch die Biosynthesen von Monoterpenen, Diterpenen, Phytol, Carotinoiden und Plastochinon-9 speist. Der DOXP/MEP-Weg verzweigt sich vermutlich und bildet IPP und DMAPP unabhängig voneinander (vgl. Abb 4-5). Fosmidomycin hemmt den DOXP/MEP-Weg, wie in dieser Arbeit anhand theoretischer Vorüberlegungen und der Hemmung der Isoprenemission gezeigt wurde. Der Wirkort von Fosmidomycin ist die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR). Im Cytosol werden Sesquiterpene und Sterole nach dem Mevalonat-Weg synthetisiert. Der Mevalonat-Weg kann auf der Stufe der HMG-CoA-Reduktase (HMGR) durch Statine wie Mevinolin und Cerivastatin gehemmt werden. Das mitochondrielle Ubichinon wird aus cytosolischem IPP gebildet. Ein Austausch von noch nicht näher bestimmten Prenyl-Pyrophosphaten oder anderen Isoprenoidvorläufern, kann vermutlich zwischen Plastid und Cytosol stattfinden.

Die Bildung der Primärisoprenoide des Plastiden nach dem DOXP/MEP-Weg im Gegensatz zur Bildung der cytosolischen Sterole nach dem MVA-Weg wurde von anderen Arbeitsgruppen bestätigt: ^{13}C -DOX wurde intakt und signifikant in β -Carotin, Phytol und Lutein aus Zellkulturen von *Catharanthus roseus* eingebaut, während Sitosterol kaum markiert wurde (ARIGONI *et al.*, 1997). ^{14}C -DOX wurde in Chlorophylle und β -Carotin aus *Mentha x piperita* eingebaut (SAGNER *et al.*, 1998b). ^{14}C -DOXP und ^{14}C -MEP wurden in Chromoplasten aus Paprika und Narzissenblüten in β -Carotin eingebaut (Fellermeier *et al.*, 1999). In den Lebermoosen *Conocephalum conicum* und *Ricciocarpos natans* wurde Phytol von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose nach dem DOXP/MEP-Weg und Stigmasterol nach dem MVA-Weg markiert (ADAM *et al.*, 1998). In dem Lebermoos *Heteroscyphus planus* wurden Phytol aus Chlorophyll und β -Carotin offensichtlich vorwiegend nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet, obwohl die Autoren ihre Markierungsergebnisse mit $[2-^{13}\text{C}]$ -Glycerin über eine Reassimilierung von $^{13}\text{CO}_2$ zu deuten versuchten (s.u., NABETA *et al.*, 1998b). Phytol wurde in *Scoparia dulcis* L. von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose nach dem DOXP/MEP-Weg und Sitosterol nach dem MVA-Weg markiert (HAYASHI *et al.*, 1999). β -Carotin und die wahrscheinlich durch Abbau daraus entstandene Abscisinsäure (ABA) aus *Liriodendron tulipifera* wurde aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose nach dem DOXP/MEP-Weg markiert (HIRAI *et al.*, 2000). Sesquiterpenoide Cyclohexenon-Derivate, die während der Besiedlung von Wurzeln mit Mykorrhiza-Pilzen vermutlich ähnlich wie ABA durch oxidativen Abbau von Carotinoiden entstehen, wurden in Gerste aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose und $[U-^{13}\text{C}_6]$ -Glucose nach dem DOXP/MEP-Weg markiert (MAIER *et al.*, 1998). Die Akkumulation solcher Carotinoid-Abbauprodukte bei der Mykorrhiza wurde auch in Weizen, Mais und Reis beschrieben und ging einher mit einer Induktion von DXS- und DXR-Transkripten (WALTER *et al.*, 2000). Das plastidäre Plastochinon-9 wurde in heterotrophen Tabak-Zellkulturen aus verschiedenen ^{13}C -markierten Glucosen nach dem DOXP/MEP-Weg markiert, Sterole und Ubichinon-10 jedoch nach dem MVA-Weg (DISCH *et al.*, 1998a).

Verschiedene Hemiterpene werden aus DOXP gebildet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das im Plastiden gebildete Isopren von verschiedenen Pflanzen effizient von DOX markiert wird und dass dessen Bildung durch Fosmidomycin gehemmt wird (siehe 4.1.2, S. 81; 4.2.2, S. 86; SCHWENDER *et al.*, 1997; ZEIDLER *et al.*, 1997; ZEIDLER und LICHTENTHALER 1998; ZEIDLER *et al.*, 1998). Weitere nach dem DOXP/MEP-Weg gebildete Hemiterpene sind 2-Methyl-3-buten-2-ol aus *Pinus ponderosa* (diese Arbeit, siehe 4.1.3, S. 84; 4.2.2, S. 86), der Hemiterpenanteil von Umbelliferon aus *Apium graveolens* (STANJEK *et al.*, 1999), die drei hemiterpenen Seitenketten in den Bittersäuren aus Hopfen (GOESE *et al.*, 1999) und der Dimethylallyl-Teil des Flavanons Glabrol aus *Glycyrrhiza glabra* (ASADA *et al.*, 2000). Die Synthesekompartimente der drei letztgenannten Stoffe sind nicht genau bekannt. Alle nachgewiesenermaßen nach dem DOXP-Weg gebildeten Hemiterpene leiten sich von DMAPP ab. Da IPP und DMAPP auch im Cytosol gebildet werden können, lässt sich nicht ausschließen, dass auch Hemiterpene existieren, die vorwiegend aus Mevalonat gebildet werden.

Durch Einbauexperimente wurde auch die Biosynthese verschiedener Monoterpene aus höheren Pflanzen und Lebermoosen nach dem DOXP/MEP-Weg nachgewiesen (EISENREICH *et al.*, 1997; THIEL *et al.*, 1997; ADAM *et al.*, 1998; CONTIN *et al.*, 1998; SAGNER *et al.*, 1998b; PIEL *et al.*, 1998; FOWLER *et al.*, 1999; FUJITA *et al.*, 2000). Eine Ausnahme ist Shikonin, ein Farbstoff mit einem aus GPP abgeleiteten hemiterpenen Anteil, welcher aus MVA gebildet wird (siehe 4.3.1, S. 104).

Sesquiterpene können sowohl über den DOXP/MEP-Weg als auch über den MVA-Weg gebildet werden: Die Sesquiterpene Cubebanol aus dem Lebermoos *Conocephalum conicum* und Ricciocarpin A aus dem Lebermoos *Ricciocarpos natans* wurden aus $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose nach dem MVA-Weg markiert (ADAM *et al.*, 1998). Auch die Sesquiterpene

Methoxydihydrocadalen und β -Barbaten aus dem Lebermoos *Heteroscyphus planus* wurden aus MVA gebildet (NABETA *et al.*, 1995; 1998a). Einige flüchtige Sesquiterpene verschiedener Pflanzen wurden zum Teil massiv aus [5-²H₂]-DOX markiert (PIEL *et al.*, 1998). Für die Sesquiterpene Bisabololoxid A, Bisabololoxid B und Chamazulen aus Kamille wurde durch Markierung mit [1-¹³C]-Glucose und [1-¹³C]-DOX und ¹³C-NMR-Analyse nachgewiesen, dass die dritte Isopreneinheit zu etwa gleichen Teilen aus MVA und DOXP synthetisiert wurde, die ersten beiden Isopreneinheiten stammten nur aus dem DOXP/MEP-Weg (ADAM und ZAPP, 1998; ADAM *et al.*, 1999). Die Bildung von ABA und sesquiterpenen Cyclohexenon-Derivaten in den Wurzeln einiger Pflanzen nach dem DOXP/MEP-Weg ist vermutlich dadurch zu erklären, dass sie durch oxidativen Abbau aus Carotinoiden entstehen (s.o.).

Neben der Phytolseitenkette von Chlorophyll wurden auch alle in jüngster Zeit in Markierungsstudien untersuchten sekundären pflanzlichen Diterpene über den DOXP/MEP-Weg gebildet: Taxol aus *Taxus chinensis* (EISENREICH *et al.*, 1996), Marrubiin aus *Marrubium vulgare* (KNÖSS *et al.*, 1997), Ginkgolid A aus *Ginkgo biloba* (SCHWARZ und ARIGONI, 1999), ein Neo-epi-Verrucosan-Diterpen aus dem Lebermoos *Fossombronia alaskana* (EISENREICH *et al.*, 1999), zwei Diterpene aus *Scoparia dulcis* L. (HAYASHI *et al.*, 1999) und Steviol aus *Stevia rebaudiana* Bertoni (TOTTÉ *et al.*, 2000).

Austausch zwischen den beiden Isoprenoid-Biosynthesewegen

Die Biosynthese der verschiedenen Klassen pflanzlicher Isoprenoide (Hemiterpene, Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene, Triterpene und Tetraterpene) wird meist vorwiegend oder ausschließlich aus einem der beiden IPP-Biosynthesewege gespeist. Jedoch ist diese Trennung nicht immer so eindeutig: In älteren Studien, erstmalig 1958-1960 im Arbeitskreis Goodwin und von vielen anderen Arbeitsgruppen bestätigt, wurde immer auch ein geringer Einbau von ¹⁴C-Mevalonsäure in plastidäre Isoprenoide gefunden (siehe 1.3, S. 18). Die Frage, wie spezifisch ein solcher Spureneinbau ist, d.h. ob er tatsächlich über IPP erfolgt oder über andere metabolische Umwege, kann mit den heute zur Verfügung stehenden modernen Methoden der Markierungstechnik genauer untersucht werden. Die beste Vorgehensweise ist eine Kombination möglichst vieler unabhängiger Methoden: Eine Methode ist der Einbau spezifischer, mit stabilen Isotopen (z.B. ²H und ¹³C) markierter Vorläufer mit anschließender NMR-Analyse. Nachteil dieser Methode ist, dass durch unphysiologisch hohe Konzentrationen der markierten Vorstufen der Anteil eines Stoffwechselweges möglicherweise überschätzt wird. Diesen Nachteil vermeidet der Einbau ¹³C-markierter Glucose mit anschließender NMR-spektroskopischer Feststellung des Markierungsmusters, aus dem unter geeigneten Umständen dann Rückschlüsse auf die Anteile verschiedener metabolischer Routen gezogen werden können. Man könnte zwar einwenden, dass die Verfütterung von Glucose an Pflanzen, möglicherweise sogar bei geringer Belichtung, einen unphysiologischen Zustand darstellt, jedoch ist nicht klar, ob dadurch der DOXP/MEP-Weg oder der MVA-Weg begünstigt wird. Die Nachteile der letzten beiden Methoden vermeiden Tracerstudien mit geringsten Mengen radioaktiver Vorstufen. Bei radioaktivem Einbau ist es allerdings sehr aufwändig, die Markierung genau im Molekül zu lokalisieren, da dazu der komplette chemische Abbau der endogenen Produkte C-Atom für C-Atom nötig ist. Hemmexperimente mit spezifischen Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges und des Acetat/Mevalonat-Weges können zusätzliche Informationen liefern. Die Lokalisierung sämtlicher an einem Stoffwechselweg beteiligter Enzyme und Transportproteine und die Lokalisierung der Endprodukte in der Zelle ist eine langwierige Aufgabe, sie ist aber letztlich notwendig, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

Mittels Einbau von ^{13}C -Glucose sowie ^2H - oder ^{13}C -markierter DOX oder MVA wurden in einigen Pflanzen Mischmarkierungen von Isoprenoiden nachgewiesen. Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, werden Sesquiterpene aus Kamille überwiegend aus DOXP gebildet und die Hälfte der zuletzt angefügten IPP-Moleküle stammt aus MVA. Eine Erklärung dafür wäre ein Export von IPP, DMAPP, GPP und/oder FPP aus den Plastiden ins Cytosol. Denkbar wäre auch ein Import von cytosolischem IPP in den Plastiden. Weiterhin wäre ein cytosolischer DOXP/MEP-Weg denkbar oder eine plastidäre Sesquiterpen-Biosynthese. Letztere ist deshalb nicht auszuschließen, da neuerdings auch FPP-Bildung in Plastiden von Weizen und Tabak nachgewiesen wurde (SANMIYA *et al.*, 1999). Allerdings muss abgewartet werden, ob das für alle Pflanzen gilt.

Es gibt Hinweise für einen Import von cytosolischem FPP in den Plastiden bei der Biosynthese des Diterpens Heteroscyphinsäure A (NABETA *et al.*, 1995), Phytol und β -Carotin (NABETA *et al.*, 1997) in dem Lebermoos *Heteroscyphus planus*. Deuterium- und ^{13}C -markierte Mevalonsäure wurden laut NMR-Analyse vorwiegend in die ersten drei Isopreneinheiten des Di- und Tetraterpen-Vorläufers GGPP eingebaut. Das gleiche Ergebnis wurde bei dem Hornmoos *Anthoceros punctatus* für die Bildung der Phytolseitenkette von Chlorophyll erhalten (DAISUKE *et al.*, 2000). Analog dazu wurde mittels NMR-Spektroskopie bei der Biosynthese von Ginkgolid A ein geringfügiger Einbau von ^{13}C -MVA in den FPP-Anteil des Diterpens gefunden (SCHWARZ und ARIGONI, 1999).

Schließlich wurde durch Einbau von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose und $[1-^2\text{H}_1]$ -DOX ein Anteil des DOXP/MEP-Wegs an der Biosynthese der Sterole aus *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare* und *Daucus carota* von 15-30% nachgewiesen (SCHWENDER, 1999). Dies lässt auf einen beträchtlichen Export von IPP, GPP und/oder FPP aus den Plastiden schließen.

Der jeweilige Anteil des DOXP-Weges und des MVA-Weges an der Biosynthese eines Isoprenoids hängt offensichtlich vom untersuchten Produkt, der untersuchten Pflanze und vermutlich auch vom Entwicklungszustand und den Anzuchtbedingungen ab. Die interessanteste Frage ist vielleicht, welche Isoprenoidvorstufen über die Plastidenmembranen hinweg ausgetauscht werden. Bisher konnte noch kein Transportmechanismus für Isoprenoid-Pyrophosphate identifiziert werden.

4.4 Ausblick

Angesichts der grundlegenden Bedeutung des DOXP/MEP-Wegs im Stoffwechsel von Pflanzen und Bakterien ist die wichtigste Aufgabe die weitere Aufklärung seiner Intermediate, Enzyme und Gene. Dieses Projekt wird derzeit von einer wachsenden Zahl von Forschungsgruppen in Universitäten und Firmen bearbeitet. Es ist zu erwarten, dass der Verlauf des DOXP/MEP-Wegs in verschiedenen pflanzlichen und bakteriellen Modellorganismen in einigen Jahren im wesentlichen bekannt sein wird.

Die Entdeckung eines bis vor wenigen Jahren noch völlig unbekanntes Biosynthesewegs des Primärstoffwechsels der Pflanzen und Bakterien wirft naturgemäß viele neue Fragen auf, die für verschiedene Organismen jeweils neu gestellt werden müssen. Z.B. stellen sich folgende Fragen vor allem für Pflanzen:

- Wie wird der DOXP/MEP-Weg im Zusammenhang mit den Umweltbedingungen und dem Entwicklungszustand reguliert?
- Welche seiner Schritte sind geschwindigkeitsbestimmend?
- An welcher Stelle tritt die Verzweigung auf und wie wird sie reguliert?
- Wie ist der DOXP/MEP-Weg mit anderen Stoffwechselwegen vernetzt?
- In welchen Zellkompartimenten sind seine Enzyme lokalisiert?
- Welchen Anteil haben MVA- und DOXP/MEP-Weg an der Biosynthese von primären und sekundären isoprenoiden Pflanzenstoffen?
- Welche Intermediate der Isoprenoid-Biosynthese werden auf welche Weise über Membranen ausgetauscht?
- Wie sind die beiden Isoprenoid-Biosynthesewege entstanden?
- In welchen Organismen sind sie allein bzw. gleichzeitig vertreten?
- Welche evolutionären Drücke wirkten und wirken auf sie ein?
- Welche Rolle spielt der horizontale Gentransfer innerhalb und zwischen den Eukaryonten und Eubakterien?
- Ist der DOXP/MEP-Weg an der Synthese weiterer Isoprenoide beteiligt (Dolichole, Polyprenole, Cytokinine, Isopentenyl-Adenosin in tRNA, Sesterterpene (C₂₅)?)
- In welchem Zellkompartiment und von welchen Enzymen wird DOX bei Markierungsexperimenten phosphoryliert?
- Wirkt das Herbizid Clomazone nur über 5-Ketoclomazone oder evtl. über weitere seiner Abbauprodukte?
- Nach welchem Mechanismus hemmt Fosmidomycin die DOXP-Reduktoisomerase (kompetitive oder gemischte Hemmung)?
- Gibt es weitere Hemmstoffe des DOXP/MEP-Wegs, die in der Forschung und als Antibiotika und Herbizide nützlich sein könnten?

Aufgrund der Analyse zahlreicher Markierungsexperimente mehrerer Arbeitsgruppen mit verschiedenen Formen von Deuterium-markierter 1-Deoxy-D-xylulose (DOX) und 2-C-Methyl-D-erythritol (ME) in Bakterien und Pflanzen wurde in der vorliegenden Arbeit der Schluss gezogen, dass der DOXP/MEP-Weg in seinem weiteren Verlauf wahrscheinlich einen Reaktionsschritt enthält, bei dem eine der ursprünglich in DOXP und MEP vorhandenen OH-Gruppen nicht durch Elimination von Wasser oder Phosphat entfernt wird sondern mittels direkter Reduktion durch Wasserstoff ersetzt wird (siehe 4.3.2, S. 106). Es erscheint

besonders plausibel, dass in dem nächsten enzymatischen Schritt nach dem letzten bekannten Intermediat 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat eine reduktive Abspaltung der Cyclopyrophosphat-Gruppe von C2 von MEP auftritt. Dieser Schritt könnte z.B. nach einem radikalischen Mechanismus wie in der Biosynthese von Deoxyribonucleotiden verlaufen und gleichzeitig die Verzweigung des DOXP/MEP-Weges zu DMAPP hin einleiten (siehe Abbildung 4-5). Es wäre interessant, zu prüfen, ob ein solcher hypothetischer, radikalischer Schritt im Zusammenhang mit der Anhäufung von 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat unter oxidativem Stress in bestimmten Bakterien steht. Die Hypothese des reduktiven Ersatzes der Cyclopyrophosphat-Gruppe könnte Hinweise auf den Cofaktorbedarf des nächsten Enzyms geben und helfen, mechanistisch verwandte Enzyme in Sequenzdatenbanken zu finden.

Einen entscheidenden Erkenntnisgewinn für das Verständnis der Isoprenemission von Pflanzen, Bakterien und Tieren verspricht die Klonierung der Isoprensynthase, die trotz des Vorliegens partieller Proteinsequenzen und der Anstrengung mehrerer Arbeitsgruppen bisher noch nicht gelang. Vielleicht könnten Sequenzvergleiche mit anderen DMAPP-verarbeitenden Enzymen, z.B. der erst kürzlich entdeckten 2-Methyl-3-butenol-Synthase aus *Pinus sabiniana* (FISHER *et al.*, 2000), zum Erfolg führen. Mit Kenntnis der Primärstruktur der Isopren-Synthase könnte durch Homologierecherchen die Verbreitung der Fähigkeit zur Isoprenbildung in den verschiedenen Reichen der Organismen untersucht werden. Ebenso könnte die Frage der Bedeutung der Isoprenemission in Pflanzen zusätzlich mit molekulargenetischen Methoden angegangen werden, z.B. durch Ausschalten des Isopren-Synthase-Gens und der Untersuchung des Thermotoleranz-Effekts von Isopren auf Pflanzen und weiterer möglicher physiologischer Wirkungen. Die nähere Charakterisierung des DOXP/MEP-Weges und der Isoprensynthase sind Voraussetzungen, um zu verstehen, wie die Faktoren Licht und Wärme die Isopren-Biosynthese induzieren und regulieren. Isoprenemittierende Pflanzen bieten u.U. eine günstige Gelegenheit, die Verzweigung des DOXP/MEP-Weges hin zu IPP und DMAPP und ihre Regulation zu untersuchen: Markierungsexperimente mit an C4 deuterierter 1-Deoxy-D-xylulose könnten die Frage klären, ob DMAPP für die Isoprenbildung direkt vom DOXP/MEP-Weg erzeugt wird, oder ob es durch IPP-Isomerase aus IPP gebildet wird. Interessant ist auch die Frage, auf welche Weise die verschiedenen Inhibitoren Vitamin-B₆-abhängiger Reaktionen die Isoprenemission hemmen. Die Untersuchung dieser Frage verspricht ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von Photosynthese, Photorespiration, Isoprenemission und evtl. weiterer Stoffwechselforgänge von Pflanzen. Möglicherweise könnte schließlich der Isoprenemissions-Hemmtest für die Suche nach neuen Herbiziden und Antibiotika in Richtung eines „High Throughput Screening“-Verfahrens, z.B. mit Isopren-emittierenden Algen oder Bakterien in Mikrotiterplatten, weiterentwickelt werden.

5 Zusammenfassung

Einführung

In der vorliegenden Arbeit wurden an mehreren höheren Pflanzen die Verbreitung, mögliche Intermediate und Hemmstoffe des alternativen Isoprenoid-Biosyntheseweges (DOXP/MEP-Weg) für plastidäre Isoprenoide untersucht. DOXP und MEP steht für die zwei heute bekannten Intermediate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat und 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat. Der DOXP/MEP-Weg unterscheidet sich grundlegend vom Acetat/Mevalonat-Weg, dem einzigen bis vor kurzem bekannten Weg zur Biosynthese der isoprenoiden C₅-Bausteine Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). Vor Beginn der Arbeit 1996 war die ¹³C-Markierung von Isoprenoiden über den heute bekannten DOXP/MEP-Weg zwischen 1993 und 1995 von den Gruppen M. Rohmer, H. K. Lichtenthaler und D. Arigoni für isoprenoide Hopanoide in einigen Eubakterien (ROHMER *et al.*, 1993), für Carotinoide, Plastochinon-9 und die Phytolseitenkette der Chlorophylle in einer Grünalge (LICHTENTHALER *et al.*, 1995; SCHWENDER *et al.*, 1995 and 1996) und für ein Diterpen in einer höheren Pflanze (SCHWARZ, 1994) beschrieben worden.

Seit der Beschreibung des Acetat-Mevalonatwegs 1958 stand eine steigende Anzahl von Befunden zur Bildung plastidärer Isoprenoide aus Mevalonsäure im Widerspruch. Mit der Entdeckung des DOXP/MEP-Weges für plastidäre Isoprenoide 1995 nahm man an, dass er in den Plastiden lokalisiert ist. Zu Beginn der Arbeit 1996 waren die Intermediate und die Verbreitung des DOXP/MEP-Weges in höheren Pflanzen noch nicht bekannt. Für die weitere Untersuchung dieses Biosyntheseweges wurde nach einem in Plastiden gebildeten Isoprenoid gesucht, dessen Bildung aus IPP möglichst wenige weitere enzymatische Schritte benötigt. Als Modellsystem der plastidären Isoprenoid-Biosynthese wurde die Isoprenemission gewählt, da die C₅-Verbindung Isopren wahrscheinlich das in den größten Mengen gebildete Isoprenoid in der Natur überhaupt ist. Da Isopren durch die plastidäre Isoprensynthese aus DMAPP gebildet und unmittelbar gasförmig emittiert wird, spiegelt die Isoprenemission direkt die Bildung von IPP und DMAPP in den Plastiden wider. Während die Biosynthese höherer Isoprenoide wie z.B. Carotinoide aus IPP viele weitere enzymatische Schritte benötigt, sind nur zwei zusätzliche Enzyme zur Isoprenbildung erforderlich: IPP-Isomerase und Isopren-Synthase.

Problemstellung

Bevor Untersuchungen über mögliche Intermediate und Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges durchgeführt werden konnten, musste die folgende Frage geklärt werden: Wird Isopren nach dem Acetat/Mevalonat-Weg oder nach dem DOXP/MEP-Weg gebildet?

Diese Frage sollte durch Einbauexperimente mit möglichen spezifischen Vorstufen des DOXP/MEP-Weges und mit Mevalonat angegangen werden. Die Verbindungen sollten mit den stabilen Isotopen ²H oder ¹³C markiert sein und der Einbau in Isopren sollte mittels GC/MS bestimmt werden. Potentielle Vorläufer des DOXP/MEP-Weges sollten chemisch synthetisiert werden, um Informationen über seine unbekanntes Intermediate zu erhalten. Markierungsstudien mit Isopren sollten bei verschiedenen Pflanzen durchgeführt werden, um die Verbreitung des plastidären DOXP/MEP-Weges unter den höheren Pflanzen zu untersuchen.

Weiterhin sollte ein pflanzliches Testsystem auf der Basis der Isoprenemission entwickelt werden, um neue Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges zu finden. Der Wirkort potentieller Inhibitoren der Isoprenemission sollte so weit wie möglich eingegrenzt werden. Schließlich

sollten weitere plastidäre Isoprenoide daraufhin untersucht werden, ob sie nach dem DOXP/MEP-Weg oder dem Acetat/Mevalonat-Weg gebildet werden.

Ergebnisse

1) Zur Messung der Isoprenemission aus Blättern wurden zwei neue Methoden entwickelt: Die erste Methode ermöglicht die Anreicherung von Isopren aus der Gasphase in einem Tropfen Decan und eine schnelle Bestimmung des Einbaus ^2H - und ^{13}C -markierter Vorstufen mittels GC/MS. Die zweite Methode erlaubt die schnelle und bequeme Quantifizierung des von Blättern abgegebenen Isoprens durch UV-Absorption im Spektrophotometer. Diese Methode ist besonders dazu geeignet, die Wirkung potentieller Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges zu messen.

Es wurden einige potentielle Isopren-Vorstufen chemisch synthetisiert (s.u.). Verschiedene potentielle Inhibitoren des DOXP/MEP-Weges wurden auf ihre Hemmung der Isoprenemission, des Wachstums verschiedener Algen und von *E. coli* sowie der Ergrünung von Gerstenkeimlingen hin untersucht.

Zusätzlich wurde die Biosynthese eines weiteren flüchtigen Hemiterpens, 2-Methyl-3-buten-2-ol aus *Pinus ponderosa*, durch ähnliche Einbau- und Hemmstudien untersucht. 2-Methyl-3-buten-2-ol wird ähnlich wie Isopren von Laubbäumen in großen Mengen von amerikanischen *Pinus*-Arten licht- und temperaturabhängig in die Atmosphäre abgegeben.

2) Folgende mögliche IPP-Vorläufer wurden synthetisiert: Von Prof. F. W. Lichtenthaler (Universität Darmstadt) erhaltene $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-2,3-isopropyliden- β -D-xylulofuranose wurde durch saure Hydrolyse zu $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose umgesetzt; aus letzterer wurde durch Reduktion mit KBH_4 eine Mischung aus $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylitol und $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-lyxitol erhalten. $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-2,3-isopropyliden- β -D-xylulofuranose wurde außerdem durch saure Methanolyse zum Methylglykosid von $[1-^2\text{H}_1]$ -1-Deoxy-D-xylulose umgesetzt, da letzteres wegen seiner geringeren Polarität möglicherweise Biomembranen besser passieren könnte. Weiterhin wurden (*R*)- $[1,1,4,4-^2\text{H}_4]$ -2-*C*-Methylbutan-1,2,4-triol, $[1-^2\text{H}_2]$ -3-Methyl-2-buten-1-ol und $[1-^2\text{H}_2]$ -3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat (deuteriertes DMAPP) synthetisiert, sowie 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat mithilfe des von J. Schwender in der Karlsruher Arbeitsgruppe klonierten Enzyms 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) aus *Chlamydomonas reinhardtii*.

3-Methyl-2-buten-1-ol und 3-Methyl-2-buten-1-ylpyrophosphat (DMAPP) wurden bei *Chelidonium majus* L. nicht in Isopren inkorporiert. Vermutlich konnte 3-Methyl-2-buten-1-ol nicht durch entsprechende Kinasen zu DMAPP aktiviert werden. DMAPP wurde wahrscheinlich aufgrund seiner Polarität nicht in die Zellen bzw. Plastiden aufgenommen. 1-Deoxy-D-xylitol, 1-Deoxy-D-lyxitol und 2-*C*-Methylbutan-1,2,4-triol wurden ebenfalls nicht in Isopren aus *Chelidonium majus* L. eingebaut. Diese Verbindungen sind wahrscheinlich keine Vorläufer des DOXP/MEP-Weges, da keine offensichtliche biochemische Verbindung zwischen Ihnen und den heute bekannten Intermediaten des DOXP/MEP-Weges besteht. $[1,1-^2\text{H}_2]$ -2-*C*-Methyl-D,L-erythritol (d-ME) wurde nicht in Isopren aus *Populus nigra* L. eingebaut, obwohl der Phosphatester MEP heute als Intermediat des DOXP/MEP-Weges bekannt ist. d-ME kann vermutlich wegen seiner Polarität nicht aufgenommen werden oder es kann nicht von Kinasen zu MEP phosphoryliert werden.

3) Deuterium-markierte 1-Deoxy-D-xylulose (DOX) wurde in Isopren aus allen in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen (*Populus nigra*, *Salix viminalis*, *Chelidonium majus*, *Platanus x acerifolia*, *Quercus robur*, *Robinia pseudoacacia* und *Eucalyptus globulus*) eingebaut. Damit wurde DOX als Vorstufe des DOXP/MEP-Weges bestätigt. ^{13}C -markierte Mevalonsäure (^{13}C -MVA) wurde hingegen nur in geringem Maße in Isopren eingebaut. Damit wurde

nachgewiesen, dass Isopren nach dem DOXP/MEP-Weg und nicht nach dem Mevalonatweg gebildet wird. Dieser Nachweis lieferte auch weitere Belege sowohl für die vermutlich ubiquitäre Verbreitung des DOXP/MEP-Weges in höheren Pflanzen als auch für die plastidäre Lokalisierung der Isoprenbiosynthese (Die Isopren-Synthase ist im Plastiden lokalisiert). Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Einbau von d-DOX in Isopren aus verschiedenen Pflanzen wurde erstmalig die Markierung eines Isoprenoids durch 1-Deoxy-D-xylulose in einer wissenschaftlichen Zeitschrift publiziert (ZEIDLER *et al.*, 1997).

4) Das aufgrund theoretischer Erwägungen ausgewählte Antibiotikum *Fosmidomycin* wurde als ein effizienter Hemmstoff des DOXP/MEP-Weges und der Isopren-Biosynthese charakterisiert. Als Wirkort von Fosmidomycin wurden 1998 in der Arbeitsgruppe H. K. Lichtenthaler bei Pflanzen (ZEIDLER *et al.*, 1998; SCHWENDER *et al.*, 1999) und unabhängig in der Arbeitsgruppe H. Seto bei *E. coli* (KUZUYAMA *et al.*, 1998) die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR), das zweite Enzym des alternativen IPP-Biosyntheseweges, identifiziert. Die Hemmung der DXR durch Fosmidomycin wurde auch für andere Bakterien beschrieben (ALTINCICEK *et al.*, 2000; GROLE *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2000). In einer gemeinsamen Publikation mit der Arbeitsgruppe Jomaa, Universität Giessen, wurde die Hemmung der DXR aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und die Heilung einer Malariaform der Maus durch Fosmidomycin beschrieben (JOMAA *et al.*, 1999b).

5) Wirkungsweise des Herbizids *Clomazone*: Mithilfe des Hemmtests der Isoprenemission von Blattstücken (UV-Methode), mit verschiedenen Untersuchungen an ergrünenden Gerstenkeimlingen sowie mit enzymatischen Hemmtests von C. Müller in der Karlsruher Gruppe, konnten erste Belege für den bisher unbekanntem Wirkungsmechanismus des Herbizids Clomazone erbracht werden, der offenbar in der Bioaktivierung zu 5-Ketoclomazone mithilfe von Cytochrom P₄₅₀ besteht. 5-Ketoclomazone, ein oxidiertes Metabolit von Clomazone, hemmt die DXS, das erste Enzym des DOXP/MEP-Weges und die Isoprenemission verschiedener Pflanzen.

6) Die starke Hemmung der Isoprenemission von Platane durch das Herbizid DCMU (Diuron) bestätigte, dass die Isoprenemission nur dann erfolgen kann, wenn ATP und NADPH sowie C-Skelette aus der Photosynthese zur Verfügung gestellt werden.

7) Einige Inhibitoren Vitamin B₆-abhängiger Reaktionen (Aminoethoxyvinylglycin, Aminoxyacetat, Cycloserin und Gabaculine) wurden erstmals als Hemmstoffe der Isoprenemission beschrieben. Ihr genauer Wirkungsmechanismus muss allerdings noch näher untersucht werden. Es wird vermutet, dass eine Hemmung Vitamin B₆-abhängiger Schritte der Photorespiration direkt die Isoprenemission hemmt oder indirekt zu einer Hemmung der Photosynthese führen kann (z.B. durch Verarmung des Calvin-Zyklus an C-Skeletten), so dass in der Folge auch die Isoprenemission zum Erliegen kommt. Alternativ ist es denkbar, dass bisher unbekannte Enzyme des DOXP/MEP-Weges Vitamin B₆-abhängig sind.

8) Das flüchtige Hemiterpen 2-Methyl-3-buten-2-ol, das bei *Pinus ponderosa* anstelle von Isopren emittiert wird, wurde effizient von [1-²H₁]-DOX markiert, nicht aber von [2-¹³C]-Mevalonsäure. Außerdem wurde seine Emission aus *Pinus ponderosa* durch Fosmidomycin gehemmt. Somit wurde für 2-Methyl-3-buten-2-ol, ein weiteres für die Atmosphärenchemie bedeutsames Isoprenoid, die Bildung nach dem alternativen DOXP/MEP-Weg der IPP-Biosynthese nachgewiesen.

9) Der gegenwärtige Stand (Ende 2000) der Verbreitung und Funktion der Isoprenemission in Pflanzen, Bakterien und Tieren wurde in der Einleitung und in der Diskussion zusammengefasst. Außerdem wurden im Diskussionsteil die bisher bekannten Schritte des DOXP/MEP-Weges sowie die aus Markierungsexperimenten möglichen Schlussfolgerungen über seinen weiteren Verlauf in Pflanzen und Bakterien dargestellt. Auch die unterschiedliche

Herkunft verschiedener Klassen von Isoprenoiden in Pflanzen aus dem Mevalonat- oder dem DOXP/MEP-Weg, die Kompartimentierung des Acetat/Mevalonat-Weges und des DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese in Pflanzen sowie der Austausch von Intermediaten der Isoprenoidbiosynthese zwischen den Zellkompartimenten in Pflanzen wurden diskutiert sowie die Verbreitung und Phylogenie der beiden IPP-Biosynthesewege in Pflanzen und Bakterien.

10) Am Ende des Diskussionsteils wurde als Ausblick aufgezeigt, wie künftig weitere Forschung zur Regulation der Isoprenemission, zur weiteren Aufklärung des DOXP/MEP-Weges und zum Auffinden möglicher neuer Herbizide und Antibiotika durchgeführt werden kann.

6 Literatur

- AACH, H., BÖSE, G. und GRAEBE, J. E.: *ent*-Kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings and the localization of *ent*-kaurene synthase in plastids of three species. - *Planta* **197**, 333-342 (1995).
- ABOUSHADI, N., ENGFELT, W. H., PATON, V. G. und KRISANS, S. K.: Role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. - *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1127-1132 (1999).
- ADAM, K.-P. und ZAPP, J.: Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. - *Phytochemistry* **48**, 953-959 (1998).
- ADAM, K.-P., THIEL, R., ZAPP, J. und BECKER, H.: Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde-pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpos natans* 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).
- ALEJO, A., ANDRÉS, G., VIÑUELA, E. und SALAS, M. L.: The African Swine Fever Virus prenyltransferase is an integral membrane *trans*-geranylgeranyl-diphosphate synthase. - *J. Biol. Chem.* **274**, 18033-18039 (1999).
- ALLEN, K. N., LAVIE, A., PETSKO, G. A. und RINGE, D.: Design, synthesis, and characterization of a potent xylose isomerase inhibitor, D-threono-hydroxamic acid, and high-resolution X-ray crystallographic structure of the enzyme-inhibitor complex. - *Biochemistry* **34**, 3742-3749 (1995).
- ALTINCICEK, B., HINTZE, M., SANDERBRAND, S., WIESNER, J., BECK, E. und JOMAA, H.: Tools for the discovery of the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. - *FEMS Microbiol. Lett.* **190**, 329-333 (2000).
- ANDREAE, M. O. und CRUTZEN, P. J.: Atmospheric aerosols: biogeochemical sources and role in atmospheric chemistry. - *Science* **276**, 1052-1058 (1997).
- 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 pathway of isoprenoid biosynthesis. - *Physiol. Plant.* **108**, 19-24 (2000).
- ARIGONI, D., SAGNER, S., LATZEL, C., EISENTEICH, W., BACHER, A. und ZENK, M. H.: Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. - *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**, 10600-10605 (1997).
- ARIGONI, D., EISENREICH, W., LATZEL, C., SAGNER, S., RADYKEWICZ, T., ZENK, M. H. und BACHER, A.: Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. - *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**, 1309-1314 (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).

- ASADA, Y., LI, W. und YOSHIKAWA, T.: Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of glabrol in *Glycyrriza glabra* hairy root cultures via a non-mevalonate pathway. - *Phytochemistry* **55**, 323-326 (2000).
- AULABAUGH, A. und SCHLOSS, J. V.: Oxalyl hydroxamates as reaction intermediate analogues for ketol-acid reductoisomerase. - *Biochemistry* **29**, 2824-2830 (1990).
- BABIKER, A. G. T., BUTLER, L. G., EJETA, G. und WOODSON, W. R.: Enhancement of ethylene biosynthesis and germination by cytokinines and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Striga asiatica* seeds. - *Physiol. Plant.* **89**, 21-26 (1993).
- 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. und LICHTENTHALER, H. K.: Plant growth regulation by mevinolin and other sterol biosynthesis inhibitors. - In: Fuller, G., Nes, W. D. (Hrsg.): Ecology and Metabolism of Plant Lipids. *American Chemical Society, Washington D.C.*, S. 109-139 (1987).
- BACH, T. J. und BENVENISTE, P.: Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: Heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization. - *Prog. Lipid Res.* **36**, 197-226 (1997).
- 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).
- BAKER, B., GUENTHER, A., GREENBERG, J., GOLDSTEIN, A. und FALL, R.: Canopy fluxes of 2-methyl-3-buten-2-ol over a ponderosa pine forest by relaxed eddy accumulation: Field data and model comparison. - *J. Geophys. Res. D* **104**, 26107-26114 (1999).
- BEJARANO, E. R. und CERDÁ-OLMEDO, E.: Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. - *FEBS Lett.* **306**, 209-212 (1992).
- 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).
- BENEDICT, C. R.: Biosynthesis of rubber. - In: Spurgeon, S. L., Porter, J. W. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 2, *John Wiley & Sons, New York*, S. 355-370 (1983).
- BERENQUER, J. A., CALDÉRON, V., HERCE, M. D. und SÁNCHEZ, J. J.: Spoilage of a bakery product by isoprene-producing molds. - *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **31**, 580-583 (1991).
- BERGSTROM, J. D., BOSTEDOR, R. G., MASARACHIA, P. J., RESZKA, A. A. und RODAN, G.: Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. - *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 231-241 (2000).

- BIOU, V., DUMAS, R., COHEN-ADDAD, C., DOUCE, R., JOB, D. und PEBAY-PEYROULA, E.: The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroreductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1.65 Å resolution. - *EMBO J.* **16**, 3405-3415 (1997).
- BISHOP, N. I. und SENGER, H.: Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. - *Meth. Enzymol.* **23A**, 53-66 (1971).
- BJÖRKQVIST, S., SPETZ, A., RAMNÄS, O. und PETERSSON, G.: Isoprene from expired air inside a private car. - *Sci. Total Environ.* **207**, 63-67 (1997).
- BLACK, C. C.: Vitamin B₆ activity in photosynthetic reactions. - *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 482-487 (1968).
- BLACKBURN, G. M.: Phosphonates as analogues of biological phosphates. - *Chem. Ind.* **5**, 134-138 (1981).
- 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).
- BOCHAR, D. A., STAUFFACHER, C. V. und RODWELL, V. W.: Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. - *Molec. Gen. Metab.* **66**, 122-127 (1999).
- BÖGER, P.: New plant-specific targets for future herbicides. - In: Böger, P., Sandmann, G. Hrsg.): Target Sites of Herbicide Action. *CRC Press, Inc., Boca Raton*, S. 247-282 (1989).
- BÖGER P. und SANDMANN, G.: Target Sites of Herbicide Action. *CRC Press, Inc., Boca Raton* (1989).
- BOHLMANN, J., MEYER-GAUEN, G. und CROTEAU, R.: Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4126-4133 (1998).
- 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).
- BOUVET, D. und O'HAGAN, D.: The synthesis of 1-fluoro- and 1,1 -difluoro-analogues of 1-deoxy-D-xylulose. - *Tetrahedron* **55**, 10481-10486 (1999).
- 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).
- BOVET, L., MEYLAN-BETTEX, M., EGGMAN, T., MARTINOIA, E. und SIEGENTHALER, P.-A.: CDP phosphotransferase activity in spinach intact chloroplasts: possible involvement of nucleoside diphosphate kinase II. - *Plant. Physiol. Biochem.* **37**, 645-652 (1999).
- BROADGATE, W. J., LISS, P. S. und PENKETT, S. A.: Seasonal emission of isoprene and other reactive hydrocarbon gases from the ocean. - *Geophys. Res. Lett.* **24**, 2675-2678 (1997).
- BROERS, S. T. J.: Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. - *Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich* (1994).
- CAILLEUX, A. und ALLAIN, P.: Isoprene and sleep. - *Life Sci.* **44**, 1877-1880 (1989).

- CAILLEUX, A., COGNY, M. und ALLAIN, P.: Blood isoprene concentrations in humans and in some animal species. - *Biochem. Med. Metab. Biol.* **47**, 157-160 (1992).
- CAILLEUX, A., MOREAU, X., DELHUMEAU, A. und ALLAIN, P.: Decrease of isoprene concentrations in blood during general anesthesia. - *Biochem. Med. Metab. Biol.* **49**, 321-325 (1993).
- CANE, D. E., DU, S., ROBINSON, J. K., HSIUNG, Y. und SPENSER, I. D.: Biosynthesis of vitamin B6: enzymatic conversion of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to pyridoxol phosphate. - *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7722-7723 (1999).
- CAPODICASA, E., TROVARELLI, G., DE MEDIO, G. E., PELLI, M. A., LIPPI, G., VERDURA, C. und TIMIO, M.: Volatile alkanes and increased concentrations of isoprene in exhaled air during hemodialysis. - *Nephron* **82**, 331-337 (1999).
- CASTRO, A., ERICKSON, S. K., SHECHTER, I. und SPENCER, T. A.: Synthesis and biological evaluation of nonionic prenyl, geranyl, and Farnesyl diphosphate surrogates. - *Bioorg. Chem.* **24**, 242-250 (1996).
- CHANG, J. H., KONZ, M. J., 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).
- CHARON, L., PALE-GROSDÉMANGE, 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-GROSDÉMANGE, C., LOIS, L.-M., CAMPOS, N., BORONAT, A. und ROHMER, M.: Deuterium-labelled 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).
- CLAUSEN, T., HUBER, R., MESSERSCHMIDT, A. und POHLENZ, H.-D.: Slow-binding inhibition of *Escherichia coli* cystathione β -lyase by L-aminoethoxyvinylglycine: a kinetic and X-ray study. - *Biochemistry* **36**, 12633-12643 (1997).
- CONTIN, A., VAN DER HEIJDEN, R., LEFEBER, A. W. und VERPOORTE, R.: The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. - *FEBS Lett.* **434**, 413-416 (1998).
- CORDIER, H., KARST, F. und BERGÈS, T.: Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase. - *Plant Molec. Biol.* **39**, 953-968 (1999).
- CORNELL, N. W., ZUURENDONK, P. F., KERICH, M. J. und STRAIGHT, C. B.: Selective inhibition of alanine aminotransferase in rat hepatocytes. - *Biochem. J.* **220**, 707-716 (1984).
- CROMARTIE, T. H., FISHER, K. J. und GROßMANN, J. N.: The discovery of a novel site of action for herbicidal bisphosphonates. - *Pestic. Biochem. Physiol.* **63**, 114-126 (1999).
- CROTEAU, R.: Clomazone does not inhibit the conversion of isopentenyl pyrophosphate to geranyl, farnesyl or geranylgeranyl pyrophosphate *in vitro*. - *Plant Physiol.* **98**, 1515-1517 (1992).

- CSIKY, O. und SEUFERT, G.: Terpenoid emissions of mediterranean oaks and their relation to taxonomy. - *Ecol. Appl.* **9**, 1138-1146 (1999).
- CUNILLERA, N., MONTSERRAT, A., DELOURME, D., KARST, F., BORONAT, A. und FERRER, A.: *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. - *J. Biol. Chem.* **271**, 7774-7780 (1996).
- CUNILLERA, N., BORONAT, A. und FERRER, A.: The *Arabidopsis thaliana* Fps1 gene generates a novel messenger-RNA that encodes a mitochondrial farnesyl diphosphate synthase isoform. - *J. Biol. Chem.* **272**, 15381-15388 (1997).
- CUNNINGHAM, F. X., LAFOND, T. P. und GANTT, E.: Evidence of a role for lytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. - *J. Bacteriol.* **182**, 5841-5848 (2000).
- CUSHMAN, M., MIHALIC, J. T., KIS, K. und BACHER, A.: Design, synthesis, and biological evaluation of homologous phosphonic acids and sulfonic acids as inhibitors of lumazine synthase. - *J. Org. Chem.* **64**, 3838-3845 (1999).
- CVEJIC, 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 tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. - *Phytochemistry* **53**, 21-28 (2000).
- CSIKY, O. und SEUFERT, G.: Terpenoid emissions of mediterranean oaks and their relation to taxonomy. - *Ecol. Appl.* **9**, 1138-1146 (1999).
- 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).
- DALAKISHVILI, K. G., MGALOBLSHVILI, M. P. und SANADZE, G. A.: Relation between photosynthetic assimilation of carbon dioxide and formation of isoprene with transamination (in russischer Sprache, nur Abstract auf Englisch). - *Soobshch. Akad. Nauk Gruz. SSR* **136**, 129-133 (1989).
- DAVIS, E. D. und CROTEAU, R.: Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. - *Top. Curr. Chem.* **209**, 53-95 (2000).
- DELFINE, S., CSIKY, O., SEUFERT, G. und LORETO, F.: Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): Monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. - *New Phytol.* **146**, 27-36 (2000).
- DELLAPENNA, D. und MOEHS, C.: Methods of modifying the production of isopentenyl pyrophosphate, dimethylallyl pyrophosphate and/or isoprenoids. - *Internationales Patent* WO 99/58649 (1999).
- DELWICHE, C. F. und SHARKEY, T. D.: Rapid appearance of ¹³C in biogenic isoprene when ¹³CO₂ is fed to intact leaves. - *Plant Cell Environ.* **16**, 587-591 (1993).
- DEMASTER, E. G. und NAGASAWA, H. T.: Isoprene, an endogenous constituent of human alveolar air with a diurnal pattern of excretion. - *Life Sci.* **22**, 91-98 (1978).
- DENERIS, E. S., STEIN, R. A. und MEAD, J. F.: *In vitro* biosynthesis of isoprene from mevalonate utilizing a rat liver cytosolic fraction. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 691-696 (1984).

- DENERIS, E. S., STEIN, R. A. und MEAD, J. F.: Acid-catalyzed formation of isoprene from a mevalonate-derived product using a rat liver cytosolic fraction. - *J. Biol. Chem.* **260**, 1382-1388 (1985).
- 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).
- DÖLL, M., SCHINDLER, S., LICHTENTHALER, H. K. und BACH, T. J.: Differential inhibition by mevinolin of prenyllipid accumulation in cell suspension cultures of *Silybum marianum* L.. - In: Siegenthaler, P. A., Eichenberger, W. (Hrsg.): Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, S. 277-280 (1984).
- DOGBO, O. und CAMARA, B.: Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. - *Biochem. Biophys. Acta* **920**, 140-148 (1987).
- 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).
- DUVOLD, T., CALÍ, P., BRAVO, J.-M. und ROHMER, M.: Incorporation of 2-C-Methyl-D-erythritol, a Putative Isoprenoid Precursor in the Mevalonate-Independent Pathway, into Ubiquinone and Menaquinone of Escherichia Coli. - *Tetrahedron Lett.* **38**, 6181-6184 (1997).
- EHRENSHAFT, M., BILSKI, P., CHIGNELL, C. F. und DAUB, M. E.: A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9374-9378 (1999).
- EICHENBERGER, W.: Steryl glycosides and acylated steryl glycosides. - In: Tevini, M., Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): Lipids and Lipid Polymers in Higher plants. Springer-Verlag, Berlin, S. 169-179 (1977).
- EICHENBERGER, W. und MENKE, W.: Sterole in Blättern und Chloroplasten. - *Z. Naturforsch.* **21b**, 859-867 (1966).
- EISENREICH, W., MENHARD, B., HYLANDS, P. J., ZENK, M. H. und BACHER, A.: Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6431-6436 (1996).
- EISENREICH, W., SAGNER, S., ZENK, M. H. und BACHER, A.: Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. - *Tetrahedron Lett.* **38**, 3889-3892 (1997).
- EISENREICH, W., SCHWARZ, M., CARTAYRADE, A., ARIGONI, D., ZENK, M. H. und BACHER, A.: The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. - *Chem. Biol.* **5**, R221-R233 (1998).

- EISENREICH, W., RIEDER, C., GRAMMES, C., HEßLER, G., ADAM, K.-P., BECKER, H., ARIGONI, D. und BACHER, A.: Biosynthesis of a Neo-*epi*-verrucosane diterpene in the liverwort *Fossmbronia alaskana*. - *J. Biol. Chem.* **274**, 3612-3620 (1999).
- ELNAGGAR, S. F., CREEKMORE, W., SCHOCKEN, M. J., ROSEN, R. T. und ROBINSON, R.: Metabolism of clomazone herbicide in soybean. - *J. Agric. Food Chem.* **40**, 880-883 (1992).
- ENGEL, R.: Phosphonates as analogues of natural phosphates. - *Chem. Rev.* **77**, 349-367 (1977).
- ERSHOV, Y., GANTT, R. R., CUNNINGHAM, F. X. und GANTT, E.: Isopentenyl diphosphate isomerase deficiency in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. - *FEBS Lett.* **473**, 337-340 (2000).
- ESTÉVEZ, 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 *CLA1*, 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).
- ESTRAMAREIX, B., und DAVID, S.: Biosynthesis of thiamine. - *New J. Chem.* **20**, 607-629 (1996).
- FELLERMEIER, M., MAIER, U. H., SAGNER, S., BACHER, A. und ZENK, M. H.: (-)-2-C-methyl-D-erythrono-1,4-lactone is formed after application of the terpenoid precursor 1-deoxy-D-xylulose. - *FEBS Lett.* **437**, 278-280 (1998).
- FELLERMEIER, M., KIS, K., SAGNER, S., MAIER, U., BACHER, A. und ZENK, M. H.: Cell-free conversion of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate and 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate into β -carotene in higher plants and its inhibition by fosmidomycin. - *Tetrahedron Lett.* **40**, 2743-2746 (1999).
- FENSKE, J. D. und PAULSON, S. E.: Human breath emissions of VOCs. - *J. Air Waste Manage. Assoc.* **49**, 594-598 (1999).
- FICHERA, M. E. und ROOS, D. S.: A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. - *Nature* **390**, 407-409 (1997).
- FIEHE, K., ARENZ, A., DREWKE, C., HEMSCHIEDT, T., WILLIAMSON, R. T. und LEISTNER, E.: Biosynthesis of 4'-O-methylpyridoxine (Gingkotoxin) from primary precursors. - *J. Nat. Prod.* **63**, 185-189 (2000).
- FISCHER, S., SCHWEFFLER, A. und KABELITZ, A.: Activation of human gamma delta T cells by heat-treated mistletoe extracts. - *Immunol. Lett.* **52**, 69-72 (1996).
- FISHER, A. J., BAKER, B. M., GREENBERG, J. P. und FALL, R.: Enzymatic synthesis of methylbutenol from dimethylallyl diphosphate in needles of *Pinus sabiniana*. - *Arch. Biochem. Biophys.* **383**, 128-134 (2000).
- FLESCH, G. und ROHMER, M.: Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. - *Eur. J. Biochem.* **175**, 405-411 (1988).
- FLINDT, R.: Biologie in Zahlen. *Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg* (2000).
- FOSTER, W. M., JIANG, L., STETKIEWICZ, P. T. und RISBY, T. H.: Breath isoprene: temporal changes in respiratory output after exposure to ozone. - *J. Appl. Physiol.* **80**, 706-710 (1996).

- FOWLER, D. J., HAMILTON, J. T. G., HUMPHREY, A. J. und O'HAGAN, D.: Plant terpene biosynthesis. The biosynthesis of linalyl acetate in *Mentha citrata*. - *Tetrahedron Lett.* **40**, 3803-3806 (1999).
- FUENTES, J. D., LERDAU, M., ATKINSON, R., BALDOCCHI, D., BOTTENHEIM, J. W., CICCIOI, P., LAMB, B., GERON, C., GU, L., GUENTHER, A., SHARKEY, T. D. und STOCKWELL, W.: Biogenic hydrocarbons in the atmospheric boundary layer. - *Bull. Am. Meteor. Soc.* **81**, 1537-1575 (2000).
- FUJITA, K., YAMAGUCHI, T., ITOSE, R. und SAKAI, K.: Biosynthetic pathway of β -thujaplicin in the *Cupressus lusitanica* cell culture. - *J. Plant Physiol.* **156**, 462-467 (2000).
- GARCÍA, P., GONZÁLEZ, M. P., GARCÍA, E., LÓPEZ, R. und GARCÍA, J. L.: LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. - *Molec. Microbiol.* **31**, 1275-1281 (1999).
- GAUDEMER, A., FANET, C., GAUDEMER, F. und SALMON, L.: Synthesis of D-arabinohydroxamic acid and D-threonohydroxamic acid, potent inhibitors of D-xylose isomerases. - *Tetrahedron Lett.* **37**, 2237-2240 (1996).
- GELMONT, D., STEIN, R. A. und MEAD, J. F.: Isoprene - the main hydrocarbon in human breath. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1456-1460 (1981).
- GEMÜNDEN, C.: Enzymatische Synthese von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat und Markierung von Isoprenoiden in Grünalgen. *Staatsexamensarbeit, Botanisches Institut, Lehrstuhl II, Universität Karlsruhe* (2000).
- GINER, J.-L. und JAUN, B.: Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: retention of the methyl H-atoms of 1-deoxy-D-xylulose. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 8021-8022 (1998).
- GINER, J.-L., JAUN, B. und ARIGONI, D.: Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: the fate of the 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. - *Chem. Commun.*, 1857-1858 (1998).
- GIORDANO, W., AVALOS, J., FERNÁNDEZ-MARTÍN, R., CERDÁ-OLMEDO, E. und DOMENECH, C. E.: Lovastatin inhibits the production of gibberellins but not sterol or carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikoroii*. - *Microbiology* **145**, 2997-3002 (1999).
- GIVAN, C.V.: Aminotransferases in higher plants. - In: Stumpf, P. K., Conn, E.E. (Hrsg.): *The Biochemistry of Plants, Vol. 5, Amino Acids and Derivatives* (B.J. Mifflin Hrsg.). *Academic Press, New York*, S. 329-357 (1980).
- GOESE, M., KAMMhuber, K., BACHER, A., ZENK, M. H. und EISENREICH, W.: Biosynthesis of bitter acids in hops. A ^{13}C -NMR and ^2H -NMR study on the building blocks of humulone. - *Eur. J. Biochem.* **263**, 447-454 (1999).
- GOLDSTEIN, J. L. und BROWN, M.: Regulation of the mevalonate pathway. - *Nature* **343**, 425-430 (1990).
- GOLDSTEIN, S. L., PULCRANO, M., TROPP, B. E. und ENGEL, R.: Isosteres of natural phosphates. 3. Synthesis of the dilithium salt of 4,4-diethoxy-3-hydroxybutyl-1-phosphonic acid, an isostere of glyceraldehyde 3-phosphate. - *J. Med. Chem.* **17**, 1115-1117 (1974).
- GOLZ, A. und LICHTENTHALER, H. K.: Inhibition of the plastidic pyruvate dehydrogenase complex in isolated plastids of oat. - *Z. Naturforsch* **49c**, 421-426 (1984).
- GONNEAU, M., PASQUETTE, B., CABANNE, F. und SCALLA, R.: Metabolism of chlortoluron in tolerant species: possible role of cytochrome P 450. - *Weed Res.* **28**, 19-25 (1988).

- GONZALES-MORO, B., LACUESTA, M., BECERILL, J. M., GONZALEZ-MURUA, C. und MUNOZ-RUEDA, A.: Glycolate accumulation causes a decrease of photosynthesis by inhibiting RUBISCO activity in maize. - *J. Plant Physiol.* **150**, 388-394 (1997).
- GOODWIN T. W.: The prenillipids of the membranes of higher plants. - In: Tevini, M., Lichtenthaler, H. K. (Hrsg.): Lipid and Lipid Polymers in Higher Plants. *Springer Verlag, Berlin*, S. 29-47 (1977).
- GORE, M. G., EVANS, R. B., HILL, H. M. und ROGERS, L. J.: The effect of isonicotinyl hydrazide on the greening of maize and barley. - *Biochem. J.* **121**, 7p-8p (1971).
- GRAY, J. C.: Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. - *Adv. Bot. Res.* **14**, 25-91 (1987).
- GRAY, M. W., BURGER, G. und LANG, B. F.: Mitochondrial Evolution. - *Science* **283**, 1476-1481 (1999).
- GREENWOOD, D., COYLE, S. und ANDREW, J.: The trometamol salt of fosfomycin: microbiological evaluation. - *Eur. Urol.* **13**, 69-75 (1987).
- GRÖNER, R.: Untersuchungen zur Isoprenemission bei höheren Pflanzen. *Staatsexamensarbeit, Botanisches Institut, Lehrstuhl II, Universität Karlsruhe* (1997).
- GROLLE, S., BRINGER-MEYER, S. und SAHM, 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).
- HAGEN, C. und GRÜNEWALD, K.: Fosmidomycin as an inhibitor of the non-mevalonate terpenoid pathway depresses synthesis of secondary carotenoids in flagellates of the green alga *Haematococcus pluvialis*. - *J. Appl. Bot.* **74**, 137-140 (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).
- HANSEN, U., VAN EIJK, J., BERTIN, N., STAUDT, M., KOTZIAS, D., SEUFERT, G., FUGIT J.-L., CECINATO, A., BRANCALEONI, E., CICCIOI, P. und BOMBOI MINGARRO, M. T.: Biogenic emissions and CO₂ gas exchange investigated on four mediterranean shrubs. - *Atmos. Environ.* **31** (SI), 157-167 (1997).
- HANSON, D. T., SWANSON, S., GRAHAM, L. E. und SHARKEY, T. D.: Evolutionary significance of isoprene emission from mosses. - *Am. J. Bot.* **86**, 634-639 (1999).
- HARBORNE, J. B., TOMAS-BARBERAN, F. A. (Hrsg.): Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Proc. Phytochemical Society of Europe, Vol. 31. *Clarendon Press, Oxford* (1991).
- HARKER, M. und BRAMLEY, P. M.: Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. - *FEBS Lett.* **448**, 115-119 (1999).
- HARLEY, P., FRIDD-STROUD, V., GREENBERG, J., GUENTHER, A. und VASCONCELLOS, P.: Emission of 2-methyl-3-buten-2-ol by pines: a potentially large natural source of reactive carbon to the atmosphere. - *J. Geophys. Res. D* **103**, 25479-25486 (1998).
- HARLEY, P. C., MONSON, R. K. und LERDAU, M. T.: Ecological and evolutionary aspects of isoprene emission from plants. - *Oecologia* **118**, 109-123 (1999).

- HAYASHI, T., ASAI, T. und SANKAWA, U.: Mevalonate-independent biosynthesis of bicyclic and tetracyclic diterpenes of *Scoparia dulcis* L.. - *Tetrahedron Lett.* **40**, 8239-8243 (1999).
- HELLWIG, B.: Neuer CSE-Hemmer Cerivastatin. - *Deutsche Apotheker Zeitung* **137**, 3278-3279 (1997).
- HEMMI, H., OHNUMA, S., NAGAOKA, K. und NISHINO, T.: Identification of genes affecting lycopene formation in *Escherichia coli* transformed with carotenoid biosynthetic genes: Candidates for early genes in isoprenoid biosynthesis. - *J. Biochem.* **123**, 1088-1096 (1998).
- HERZ, S., WUNGSINTAWEEKUL, J., SCHUHR, C. A., HECHT, S., LÜTTGEN, H., SAGNER, S., FELLERMEIER, M., 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).
- HEWITT, C. N., MONSON, R. K. und FALL, R.: Isoprene emissions from the grass *Arundo donax* L. are not linked to photorespiration. - *Plant Sci.* **66**, 139-144 (1990).
- HILL, R. E., HIMMELDIRK, K., KENNEDY, I. A., PAULOSKI, R. M., SAYER, B. G., WOLF, E. und SPENSER, I. D.: The biogenetic anatomy of vitamin B6. - *J. Biol. Chem.* **271**, 30426-30435 (1996).
- HIRAI, N., YOSHIDA, R., TODOROKI, Y. und OHIGASHI, H.: Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. - *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1448-1458 (2000).
- HOEKSEMA, H. und BACZYNSKYJ, L.: A new metabolite from *Streptomyces hygroscopicus*. II. Identification as 1-Deoxy-D-threo-pentulose. *J. Antibiot.* **29**, 688-691 (1976).
- HOFFMANN, T. und KLOCKOW, D.: Atmosphärenchemie biogener Kohlenwasserstoffe. - *Chem. unserer Zeit* **4**, 182-191 (1998).
- IWAKAWA, J., KOBATAKE, H., SUZUKI, I. und KUSHIDA, H.: Fluorodensitometric microdetermination of reducing sugars on thin-layer chromatograms. - *J. Chromatogr.* **193**, 333-337 (1980).
- JAIN, A. K., VINCENT, R. M. und NESSLER, C. L.: Molecular characterization of a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). - *Plant Mol. Biol.* **42**, 559-569 (2000).
- JANKOWSKI, W. J., SWIEZEWSKA, E., SASAK, W. und CHOJNACKI, T.: Occurrence of polyprenols and dolichols in plants. - *J. Plant. Physiol.* **143**, 448-452 (1994).
- JANSSON, B. O. und LARSSON, B. T.: Analysis of organic compounds in human breath by gas chromatography-mass spectrometry. - *J. Lab. Clin. Med.* **74**, 961-966 (1969).
- JOMAA, H.: Use of 3-isoxazolidinones and hydroxylamine acids for the treatment of infections. - *Internationales Patent* WO 00/41473 (2000a).
- JOMAA, H.: Use of phosphonoformic acid derivatives for treating infections. - *Internationales Patent* WO 00/30653 (2000b).
- JOMAA, H.: Verwendung von phosphororganischen Verbindungen zur therapeutischen und prophylaktischen Behandlung von Infektionen. - *Deutsches Patent- und Markenamt, Offenlegungsschrift* DE 198 59 426 A 1 (2000c).

- 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 (1999a).
- 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**, 1573-1576 (1999b).
- JONES, A. W., LAGESSON, V. und TAGESSON, C.: Determination of isoprene in human breath by thermal desorption gas chromatography with ultraviolet detection. - *J. Chromatogr. B* **672**, 1-6 (1995).
- JONES, C. A. und RASMUSSEN, R. A.: Production of isoprene by leaf tissue. - *Plant Physiol.* **55**, 982-987 (1975).
- JUILLARD, J.H.: Biosynthesis of the pyridoxal ring (vitamin B₆) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B₁). - *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III* **314**, 285-290 (1992).
- KABELITZ, D., GLATZEL, A. und WESCH, A.: Antigen recognition by human $\gamma\delta$ T lymphocytes. - *Int. Arch. Allergy Immunol.* **122**, 1-7 (2000).
- KAMURO, Y., KAWAI, T. und KAKIUCHI, T.: - *Europäisches Patent* EP 0 256 785 B1 (1988).
- KANIMOTO, Y. und GREENWOOD, D.: Comparison of the response of *Escherichia coli* to Fosfomycin and Fosmidomycin. - *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**, 386-391 (1987).
- KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* (1994).
- KEDY, P., BRUYANT, P. und BALANGÉ, A. P.: Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity by gabaculine. - *Phytochemistry* **36**, 1169-1175 (1994).
- KELLER, R. K. und THOMPSON, R.: Rapid synthesis of isoprenoid diphosphates and their isolation in one step using either thin layer or flash chromatography. - *J. Chromatogr.* **645**, 161-167 (1993).
- KELLER, R. K. und FLIESLER, S. J.: Mechanism of aminobisphosphonate action: Characterization of alendronate inhibition of the isoprenoid pathway. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 560-563 (1999).
- KELLOGG, B. A. und POULTER, C. D.: Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. - *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 570-578 (1997).
- KESSELMEIER, J. und STAUDT, M.: Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. - *J. Atmos. Chem.* **33**, 23-88 (1999).
- KIS, K., WUNGSINTAWEEKUL, J., EISENREICH, W., ZENK, M. H. und BACHER, A.: An efficient preparation of 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphoric acid and its derivatives. - *J. Org. Chem.* **65**, 587-592 (2000).
- KNÖSS, W.: Terpenbiosynthese in Bakterien und Pflanzen - neue Perspektiven. - *Pharm. unserer Zeit* **5**, 247-254 (1999).
- KNÖSS, W. und REUTER, B.: Biosynthesis of isoprenic units via different pathways: occurrence and future prospects. - *Pharm. Acta Helv.* **73**, 45-52 (1998).

- KNÖSS, W., REUTER, B. und ZAPP, J.: Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. - *Biochem. J.* **326**, 449-454 (1997).
- KONZ, M. J.: Herbicidal isoxazolidine-3,5-diones. - *US Patent* 4.302.238 (1980).
- KREUZWIESER, J., SCHNITZLER, J.-P. und STEINBRECHER, R.: Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. - *Plant Biol.* **1**, 149-159 (1999).
- KUNTZ, M., RÖMER, S., SUIRE, C., HUHUENEY, P., WEIL, J. H., SCHANTZ, R. und CAMARA, B.: Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. - *Plant J.* **2**, 25-34 (1992).
- KUZMA, J., NEMECEK-MARSHALL, M., POLLOCK, W. H. und FALL, R.: Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. - *Curr. Microbiol.* **30**, 97-103 (1995).
- KUZUYAMA, T., SHIMIZU, T., TAKAHASHI, S. und SETO, H.: Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 7913-7916 (1998).
- KUZUYAMA, T., TAKAHASHI, S. und SETO, H.: Construction and characterization of *Escherichia coli* disruptants defective in the *yaem* gene. - *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 776-778 (1999).
- 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 (2000a).
- 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 (2000b).
- KUZUYAMA, T., TAKAGI, M., TAKAHASHI, S. und SETO, H.: Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. - *J. Bacteriol.* **182**, 891-897 (2000c).
- 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 (2000d).
- LABER, B. und AMRHEIN, N.: Metabolism of 1-aminoethylphosphinate generates acetylphosphinate, a potent inhibitor of pyruvate dehydrogenase. - *Biochem. J.* **248**, 351-358 (1987).
- LABER, B., MAURER, W., SCHARF, S., STEPUSIN, K. und SCHMIDT, F. S.: Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate by PdxA and Pdx J protein. - *FEBS Lett.* **449**, 45-48 (1999).
- LANGE, B. M. und CROTEAU, R.: Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13714-13719 (1999a).

- LANGE, B. M. und CROTEAU, R.: Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. - *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 170-174 (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.: Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13172-13177 (2000).
- LANGENHEIM, J. H.: Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. - *J. Chem. Ecol.* **20**, 1223-1280 (1994).
- LAUFS, U., BÖHM, M. und LIAO, J. K.: Neue Erkenntnisse über die Wirkung von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern. - *Dtsch. med. Wschr.* **122**, 1255-1259 (1997).
- LEI, Y., PLOUX, O. und LIU, H.-W.: Mechanistic studies on CDP-6-deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose 3-dehydrase: identification of His-220 as the active-site base by chemical modification and site-directed mutagenesis. - *Biochemistry* **34**, 4643-4654 (1995).
- LERDAU, M. und KELLER, M.: Controls on isoprene emission from trees in a subtropical dry forest. - *Plant Cell Environ.* **20**, 569-578 (1997).
- 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. Commun.*, 717-718 (1999a).
- LEYES, A. E., BAKER, J. A. und POULTER, C. D.: Biosynthesis of isoprenoids in *E. coli*: stereochemistry of the reaction catalyzed by farnesyl diphosphate synthase. - *Org. Lett.* **1**, 1071-1073 (1999b).
- LI, S.-M., HENNIG, S. und HEIDE, L.: Shikonin: a geranyl diphosphate-derived plant hemiterpenoid formed via the mevalonate pathway. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 2721-2724 (1998).
- LICHTENTHALER, H. K.: Regulation of prenylquinone synthesis in higher 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.: Prenylchinones in plant leaves. - In: Mazliak, P., Benveniste, P., Costes, C. Douce, R. (Hrsg.): Advances in the Biogenesis and Function of Plant Lipids. *Elsevier Biochemical Press, Amsterdam*, S. 299-310 (1980).
- LICHTENTHALER, H. K.: Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. - *Methods Enzymol.* **148**, 350-382 (1987).
- LICHTENTHALER, H. K.: The plant prenyllipids, including carotenoids, chlorophylls and prenylchinones. - In: Moore, T. S. (Hrsg.): Lipid Metabolism in Plants. *CRC Press, Boca Raton*, S. 427-470 (1993).
- LICHTENTHALER, H. K.: The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. - *Fett/Lipid* **4-5**, 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**, 1070-1072 (1963).
- LICHTENTHALER, H. K. und CALVIN, M.: Chinone and pigment composition of chloroplasts and quantasome aggregates from Spinacea oleracea. - *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 30-40 (1964).
- LICHTENTHALER, H. K. und ZEIDLER, J.: Isoprene and terpene biosynthesis. In: Gasche, R., Pape, H., Rennenberg, H. (Hrsg.): Trace Gas Exchange in Forest Ecosystems. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, im Druck (2000).
- LICHTENTHALER, H. K., BACH, T. J. und WELLBURN, A. R.: Cytoplasmatic and plastidic isoprenoid compounds of oat seedlings and their distinct labelling from ¹⁴C-mevalonate. - In: Wintermanns, J. F. G. M., Kuiper, P. J. C. (Hrsg.): Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids. *Elsevier Biochemical Press, Amsterdam*, S. 489-500 (1982).
- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., SEEMANN, M. und ROHMER, M.: Carotenoid biosynthesis in green algae proceeds via a novel biosynthetic pathway. - In: Mathis, P. (Hrsg.): Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. III. *Kluwer Academic Publ., Dordrecht*, S.1000-1003 (1995).
- LICHTENTHALER, H. K., ROHMER, M. und SCHWENDER, J.: Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. - *Physiol. Plant.* **101**, 643-652 (1997a).
- LICHTENTHALER, H. K., SCHWENDER, J., DISCH, A. und ROHMER, M.: Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. - *FEBS Lett.* **400**, 271-274 (1997b).
- 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*), soybean (*Glycine max*), smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*), and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). - *Weed Science* **39**, 329-332 (1991).
- LIU, S. Y., SHOCKEN, M., und ROSAZZA, J. P. N.: Microbial transformations of clomazone. - *J. Agric. Food Chem.* **44**, 313-319 (1996).
- LIU, H.-W. und THORSON, J. S.: Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. - *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 223-256 (1994).
- 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 Molec. Biol.* **42**, 365-376 (2000).
- LOGAN, B. A. und MONSON, R. K.: Thermotolerance of leaf discs from four isoprene emitting species is not enhanced by exposure to exogenous isoprene. - *Plant Physiol.* **120**, 821-825 (1999).
- LOGAN, B. A., ANCHORDOQUY, T. J., MONSON, R. K. und PAN, R. S.: The effect of isoprene on the properties of spinach thylakoids and phosphatidylcholine liposomes. - *Plant Biol.* **1**, 602-606 (1999).

- LOGUERCIO, L. L., SCOTT, H. C., TROLINDER, N. L. und WILKINS, T. A.: HMG-CoA reductase family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): unique structural features and differential expression of *hmg2* potentially associated with synthesis of specific isoprenoids in developing embryos. - *Plant Cell Physiol.* **40**, 750-761 (1999).
- LOIS, L. M., CAMPOS, N., ROSA-PUTRA, S., DANIELSEN, K., ROHMER, M. und BORONAT, A.: Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a 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., 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 DELFINE, S.: Emission of isoprene from salt-stressed *Eucalyptus globulus* leaves. - *Plant Physiol.* **123**, 1605-1610 (2000).
- LORETO, F., CICCIOIOLI, P., BRANCALEONI, E., CECINATO, A., FRATTONI, M. und SHARKEY, T. D.: Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9966-9969 (1996a).
- LORETO, F., CICCIOIOLI, P., CECINATO, A., BRANCALEONI, E., FRATTONI, M., FABOZZI, C. und TRICOLI, D.: Evidence of the photosynthetic origin of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* L. leaves by ¹³C labeling. - *Plant Physiol.* **110**, 1317-1322 (1996b).
- LORETO, F., FÖRSTER, A., DÜRR, M., CSIKY, O. und SEUFERT, G.: On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. - *Plant Cell Environ.* **21**, 101-107 (1998).
- 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 diphosphat-forming enzymes in plastids. - *Z. Naturforsch.* **45c**, 856-858 (1990).
- LYNEN, F. und HENNING, U.: Über den biologischen Weg zum Naturkautschuk. - *Angew. Chem.* **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).
- LYSAK, E. I., DEMINA, G. R., MATEEVA, E. V., OGREL, O. D., TRUTKO, S. M. und OSTROVSKII, D. N.: Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate in bacteria. - *Microbiol.* **68**, 1-9 (1999).
- MAIER, W., SCHNEIDER, B. und STRACK, D.: Biosynthesis of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives in mycorrhizal barley roots proceeds via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 521-524 (1998).
- MANDEL, M. A., FELDMANN, K. A., HERRERA-ESTRELLA L., ROCHA-SOSA, M. und LEON, P.: CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. - *Plant J.* **9**, 649-658 (1996).

- MANN, D.: HMG-CoA-Reduktase Hemmer im Überblick. - *Pharmazie in unserer Zeit* **28**, 147-152 (1999).
- MARTIN, W.: A briefly argued case that mitochondria and plastids are descendants of endosymbionts, but that the nuclear compartment is not. - *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 1387-1395 (1999).
- MCGARVEY, D. J. und CROTEAU, R.: Terpenoid metabolism. - *Plant Cell* **7**, 1015-1026 (1995).
- MCCASKILL, D. und CROTEAU, C.: Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. - *Tetrahedron Lett.* **40**, 653-656 (1999).
- MCFADDEN, J. J., FREAR, D. S. und MANSAGER, E. R.: Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P450 dependent monooxygenase from wheat. - *Pestic. Biochem. Physiol.* **34**, 92-100 (1989).
- MEHLHORN, H., NAGELS, U. und GUDERIAN, R.: Ethylene induces rates of isoprene emissions in black poplar leaves. - In: De Kok, L. J., Stulen, I. (Hrsg.): Responses of plant metabolism to air pollution and global change. *Backhuys Publishers, Leiden*, S. 375-377 (1998).
- MENDIS, S., SOBOTKA, P. A. und EULER, D. E.: Expired hydrocarbons in patients with acute myocardial infarction. - *Free Radic. Res.* **23**, 117-122 (1995).
- MERCER, E. I. und GOODWIN, T. W.: The incorporation of [2-¹⁴C]mevalonic acid and ¹⁴CO₂ into the phytol side chain of chlorophyll in maize seedlings. - *Biochem. J.* **85**, 13P (1962).
- MICHELOZZI, M., RASCHI, A., TOGNETTI, R. und TOSI, L.: Eco-ethological analysis of the interaction between isoprene and the behaviour of Collembola. - *Pedobiologia* **41**, 210-214 (1997).
- MILLER, B., HEUSER, T. und ZIMMER, W.: A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. - *FEBS Lett.* **460**, 485-490 (1999).
- 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).
- MONSON, R. K. und FALL, R.: Isoprene emission from aspen leaves. - *Plant Physiol.* **90**, 267-274 (1989).
- MONSON, R. K., GUENTHER, A. B. und FALL, R.: Physiological reality in relation to ecosystem- and global-level estimates of isoprene emission. - In: Sharkey, T. D., Holland, E. A., Mooney, H. A. (Hrsg.): Trace Gas Emissions by Plants. *Academic Press, Inc., San Diego*, S. 185-207 (1991).
- 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).
- MUEHLBACHER, M. und POULTER, C. D.: Isopentenyl-diphosphate isomerase: inactivation of the enzyme with active-site-directed irreversible inhibitors and transition state analogs. - *Biochemistry* **27**, 7315-7328 (1988).

- MÜLLER, C.: Untersuchungen zur IPP-Biosynthese bei Algen aus unterschiedlichen Abteilungen. *Diplomarbeit, Botanisches Institut, Lehrstuhl II, 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 ¹³C-labelled mevalonates and ¹³C-labelled glycine in cultured cells of liverworts, *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. - *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 261-267 (1997).
- NABETA, K., KOMURO, K., UTOH, T., TAZAKI, H. und KOSHINO, H.: Biosynthesis of (-)-β-barbatene from ¹³C- and ²H-labelled acetate, mevalonate and glycerol. - *Chem. Commun.*, 169-170 (1998a).
- NABETA, K., SAITOH, T., ADACHI, K. und KOMURO, K.: Biosynthesis of phytyl side-chain of chlorophyll a: apparent reutilization carbon dioxide evolved during acetate assimilation in biosynthesis of chloroplastidic isoprenoids. - *Chem. Commun.*, 671-672 (1998b).
- NAKAMURA, K., KIMURA, T. und TAKAHASHI, E.: Synthesis and biological activities of phosphonothrixin. - *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **144-146**, 613-616 (1999).
- NES, W. R. und MCKEAN, M. L.: Biochemistry of steroids and other isopentenoids. *University Park Press, Baltimore* (1977).
- NEWMAN, J. D. und CHAPPELL, J.: Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. - *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **34**, 95-106 (1999).
- NIINEMETS, Ü., TENHUNEN, J. D., HARLEY, P. C. und STEINBRECHER, R.: A model of isoprene emission based on energetic requirements for isoprene synthesis and leaf photosynthetic properties for *Liquidambar* and *Quercus*. - *Plant Cell Environ.* **22**, 1319-1335 (1999).
- 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 (1990a).
- NORMAN, M. A., LIEBL, R. A. und WIDHOLM, J. M.: Site of clomazone action in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. - *Plant Physiol.* **94** 704-709 (1990b).
- OGURA, K. und KOYAMA, T.: Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. - *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276 (1998).
- OHNUMA, S., HIROOKA, K., OHTO, C. und NISHINO, T.: 1997. Conversion from archaeal geranylgeranyl diphosphate synthase to farnesyl diphosphate synthase - 2 amino-acids before the first aspartate-rich motif solely determine eukaryotic farnesyl diphosphate synthase activity. - *J. Biol. Chem.* **272**, 5192-5198 (1997).

- OKADA, K., SAITO, T., NAKAGAWA, T., KAWAMUKAI, M. und KAMIYA, Y.: Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localised into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. - *Plant Physiol.* **122**, 1045-1056 (2000).
- OKUHARA M., KURODA Y., GOTO T., OKAMOTO M., TERANO H., KOHSAKA M., AOKI H. und IMANAKA H.: Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. - *J. Antibiotics* **33**, 24-28 (1980).
- OLSON, G. T., FU, M., LAU, S., RINEHART, K. L. und SILVERMAN, R. B.: An aromatization mechanism of inactivation of γ -aminobutyric acid aminotransferase for the antibiotic L-cycloserine. - *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2256-2267 (1998).
- OSMANI, A. H., MAY, G. S. und OSMANI, S. A.: The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. - *J. Biol. Chem.* **274**, 23565-23569 (1999).
- 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. - *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., ANDERSSON, B. und DALLNER, G.: Protein prenylation in spinach chloroplasts. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10074-10079 (1999).
- PATTERSON, D. R.: Herbicidal hydroxyamino phosphonic acids and derivatives. - *US Patent* 4.693.742 (1987).
- PEISACH, D. CHIPMAN, D. M., VAN OPHEM, P. W., MANNING, J. M. und RINGE, D.: D-Cycloserine inactivation of D-amino acid aminotransferase leads to a stable noncovalent protein complex with an aromatic cycloserine-PLP derivative. - *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2268-2274 (1998).
- PETER, H., WIEGAND, H.-J., BOLT, H. M., GREIM, H., WALTER, G., BERG, M. und FILSER, J. G.: Pharmacokinetics of isoprene in mice and rats. - *Toxicol. Lett.* **36**, 9-14 (1987).
- PETER, H., WIEGAND, H.-J., FILSER, J. G., BOLT, H. M. und LAIB, R. J.: Inhalation pharmacokinetics of isoprene in rats and mice. - *Environ. Health Perspect.* **86**, 89-92 (1990).
- PHILLIPS, M.: Breath tests in medicine. - *Sci. Am.* **267**, 74-79 (1992).
- PHILLIPS, M.: Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. - *Anal. Biochem.* **247**, 272-278 (1997).
- PIEL, J., DONATH, J., BANDEMER, K. und BOLAND, W.: Induzierte und konstitutiv emittierte Pflanzendüfte: Mevalonat-unabhängige Biosynthese terpenoider Duftstoffe. - *Angew. Chem.* **110**, 2622-2625 (1998).
- POULTER, C. D. und RILLING, H. C.: Prenyl transferases and isomerase. - In: Porter, J. W., Spurgeon, S. L. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 1. *John Wiley & Sons, New York*, S. 161-224 (1981).
- PROTEAU, P. J.: Biosynthesis of phytol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470: utilization of the non-mevalonate pathway. - *J. Nat. Prod.* **61**, 841-843 (1998a).

- PROTEAU, P. J.: Probing the non-mevalonate pathway to phytol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470 using deuterium labeled glucose. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 9373-9376 (1998b).
- 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 isomeroreductase. - *Org. Lett.* **1**, 921-923 (1999).
- QURESHI, N. und PORTER, J. W.: Conversion of acetyl-Coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. - In: Porter, J. W., Spurgeon, S. L. (Hrsg.): Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 1. *John Wiley & Sons, New York*, S. 47-94 (1981).
- 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**, 157-169 (2000).
- RAMOS-VALDIVIA, A. C., VAN DER HEIJDEN, R. und VERPOORTE, R.: Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. - *Nat. Prod. Rep.* **14**, 591-604 (1997).
- RAO, S., PORTER, D. C., CHEN, X., HERLICHEK, T., LOWE, M. und KEYOMARSI, K.: Lovastatin-mediated G₁ arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7797-7802 (1999).
- RASMUSSEN, R. A. und JONES, C. A.: Emission of isoprene from leaf discs of *Hamamelis*. - *Phytochemistry* **12**, 15-19 (1973).
- RASMUSSEN, L. E. L. und PERRIN, T. E.: Physiological correlates of musth: lipid metabolites and chemical composition of exudates. - *Physiol. Behav.* **67**, 539-549 (1999).
- RAY, T. B.: Herbicides as inhibitors of amino acid biosynthesis. - In: Böger, P., Sandmann, G. (Hrsg.): Target Sites of Herbicide Action. *CRC Press, Inc., Boca Raton*, S. 105-125 (1989).
- RICHTER, G.: Biochemie der Pflanzen. *Thieme, Stuttgart* (1996).
- 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*. A retrobiosynthetic NMR study. - *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., CAMPOS, N., LOIS, L. M., MALDONADO, C., HOFFLER, J.-F., GROSDÉMANGE-BILLIARD, C., ROHMER, M. und BORONAT, A.: 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).
- 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 of tomato. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8251-8256 (2000b).
- ROHMER, M.: Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? - *Prog. Drug Res.* **50**, 136-154 (1998).
- ROHMER, M.: A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. In: Barton, D., Nakanishi, K. (Hrsg.): *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 2: Isoprenoids including Carotenoids and Steroids (D. E. Cane Hrsg.). *Elsevier Science, Oxford*, S. 45-67 (1999a).
- ROHMER, M.: The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. - *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565-574 (1999b).
- ROHMER, M.: The mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis, including carotenoids. - *Pure Appl. Chem.* **71**, 2279-2284 (1999c).
- 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., DISCH, A., BRAVO, J.-M. und ROHMER, M.: Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some Gram-negative bacteria and mycobacteria. - *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, 169-175 (1998a).
- ROSA PUTRA, S., LOIS, L. M., CAMPOS, N., BORONAT, A. und ROHMER, M.: Incorporation of [2,3-¹³C₂]- and [2,4-¹³C₂]-D-1-deoxyxylulose into ubiquinone of *Escherichia coli* via the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. - *Tetrahedron Lett.* **39**, 23-26 (1998b).
- 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, (1998a).
- SAGNER, S., LATZEL, C., EISENREICH, W., BACHER, A. und ZENK, M. H.: Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into monoterpenes and carotenoids in higher plants. - *Chem. Commun.*, 221-222, (1998b).

- SANADZE, G. A.: Isoprene effect - light-dependent emission of isoprene by green parts of plants. - In: Sharkey, T. D., Holland, E. A., Mooney, H. A. (Hrsg.): Trace Gas Emissions by Plants. *Academic Press, Inc., San Diego*, S. 135-152 (1991).
- 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 prenylpyrophosphates 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).
- SCHADE, G. W., GOLDSTEIN, A. H., GRAY, D. W. und LERDAU M. T.: Canopy and leaf level 2-methyl-3-buten-2-ol fluxes from a ponderosa pine plantation. - *Atmos. Environ.* **34**, 3535-3544 (2000).
- SCHINDLER, S. und LICHTENTHALER, H. K.: Comparison of the ubiquinone homologue pattern in plant mitochondria and their possible prokaryote ancestors. - In: Siegenthaler, P. A., Eichenberger, W. (Hrsg.): Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids. *Elsevier Science Publishers, Amsterdam*, S. 273-276 (1984).
- 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).
- SCHMALFUSS, J., MATTHES, B., KNUTH, K. und BÖGER, P.: Inhibition of Acyl-CoA elongation by chloroacetamide herbicides in microsomes from leek seedlings. - *Pestic. Biochem. Physiol.* **67**, 25-35 (2000).
- SCHOCKEN, M. J.: Microbial synthesis of agrochemical metabolites. - *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 392-400 (1997).
- SCHÖLLER, C., MOLIN, S. und WILKINS, K.: Volatile metabolites from some gram-negative bacteria. - *Chemosphere* **35**, 1487-1495 (1997).
- SCHULTE, A. E., VAN DER HEIJDEN, R. und VERPOORTE, R.: Purification and characterization of phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus*. - *Phytochemistry* **52**, 975-984 (1999).
- SCHULTE, A. E., VAN DER HEIJDEN, R. und VERPOORTE, R.: Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. - *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 287-298 (2000).
- SCHULZE-SIEBERT, D., HEINTZE, A. und SCHULTZ, G.: Substrate flow from photosynthetic carbon metabolism to chloroplast isoprenoid synthesis in spinach. Evidence for a plastidic phosphoglycerate mutase. - *Z. Naturforsch.* **42c**, 570-580 (1987).
- SCHÜRSMANN, W., ZIEGLER, H., KOTZIAS, D., SCHÖNWITZ, R. und STEINBRECHER, R.: Emission of biosynthesized monoterpenes from needles of Norway Spruce. - *Naturwissenschaften* **80**, 276-278 (1993).
- SCHWAB, J. M. und HENDERSON, B. S.: Enzyme-catalyzed allylic rearrangements. - *Chem. Rev.* **90**, 1203-1245 (1990).
- SCHWARZ, M. K.: Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. - *Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich* (1994).
- SCHWARZ, M.: Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Wenn doch sein kann, was nicht sein darf... - *Chimia* **50**, 280-281 (1996).

- SCHWARZ, M. und ARIGONI, D.: Ginkgolide biosynthesis. *In*: Barton, D., Nakanishi, K. (Hrsg.): *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 2: Isoprenoids including Carotenoids and Steroids (D. E. Cane Hrsg.). *Elsevier Science, Oxford*, S. 367-400 (1999).
- SCHWENDER, J.: Untersuchungen zur Biosynthese der Isoprenoide bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* mittels ¹³C-Isotopenmarkierung (Diplomarbeit, Universität Karlsruhe). - *Karlsru. Beitr. Pflanzenphysiol.* **31**, 1-85 (1995).
- SCHWENDER, J.: Die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-Biosynthese und deren Verbreitung in Pflanzen (Dissertation, Universität Karlsruhe). - *Karlsru. 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, K., 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*, in Druck (2000).
- SCOTT, J. E. und WESTON, L. A.: Cole crop (*Brassica oleracea*) tolerance to clomazone. - *Weed Sci.* **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 Sci.* **42**, 509-516 (1994).
- SCOTT-TAGGART, C. P., VAN CAUWENBERGHE, O. R., MCLEAN, M. D. und SHELPS, B. J.: Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in situ by glutamate availability. - *Physiol. Plant.* **106**, 363-369 (1999).
- SHARKEY T. D.: Isoprene synthesis by plants and animals. - *Endeavour* **20**, 74-78 (1996).
- SHARKEY T. D. und LORETO F.: Water stress, temperature, and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. - *Oecologia* **95**, 328-333 (1993).
- SHARKEY, T. D., HOLLAND, E. A. und MOONEY, H. A. (Hrsg.): Trace Gas Emissions by Plants. *Academic Press, Inc., San Diego* (1991).
- SHARKEY T. D. und SINGSAAS E. L.: Why plants emit isoprene. - *Nature* **374**, 769 (1995).

- SHARKEY, T. D., SINGSAAS, E. L., LERDAU, M. T. und GERON, C. D.: Weather effects on isoprene emission capacity and applications in emissions algorithms. - *Ecol. Appl.* **9**, 1132-1137 (1999).
- SHIGI, Y.: Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. - *J. Antimicrob. Chemother.* **24**, 131-145 (1989).
- SILVER, G. M. und FALL, R.: Characterization of aspen isoprene synthase, an enzyme responsible for leaf isoprene emission to the atmosphere. - *J. Biol. Chem.* **270**, 13010-13016 (1995).
- SINGSAAS, E. L.: Terpenes and the thermotolerance of photosynthesis. - *New Phytol.* **146**, 1-4 (2000).
- SINGSAAS, E. L. und SHARKEY, T. D.: The regulation of isoprene emission responses to rapid leaf temperature fluctuations. - *Plant Cell Environ.*, **21**, 1181-1188 (1998).
- SINGSAAS, E. L. und SHARKEY, T. D.: The effects of high temperature on isoprene synthesis in oak leaves. - *Plant Cell Environ.*, **23**, 751-758 (2000).
- SINGSAAS, E. L., LERDAU, M., WINTER, K. und SHARKEY, T. D.: Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting leaves. - *Plant Physiol.* **115**, 1413-1420 (1997).
- SINGSAAS, E. L., LAPORTE, M. M., SHI, J. Z., MONSON, R. K., BOWLING, D. R., LERDAU, M., JASENTULIYTANA, A. und SHARKEY, T. D.: Kinetics of leaf temperature fluctuation affect isoprene emission from red oak (*Quercus rubra*) leaves. - *Tree Physiol.*, **19**, 917-924 (1999).
- SLECHTA, L. und JOHNSON, L. E.: A new metabolite from *Streptomyces hygroscopicus*. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.* **29**, 685-687 (1976).
- SMALL, R. D., GOLDING, B. T. und WATSON, W. P.: Species differences in the stereochemistry of the metabolism of isoprene *in vitro*. - *Xenobiotica* **27**, 1155-1164 (1997).
- SMIT, A. und MUSHEGIAN, A.: Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in archaea: The lost pathway. - *Genome Res.* **10**, 1468-1484 (2000).
- SMITH, D., DAVIES, S. und SPANEL, P.: SIFT-MS analysis of breath isoprene: a marker of treatment stress in haemodialysis patients? - *FASEB J.* **14**, A573 (2000).
- SOLER, E., FERON, G., CLASTRE, M., DARGENT, R., GLEIZES, M. und AMBID, C.: Evidence for a geranyl-diphosphate synthase located within the plastids of *Vitis vinifera* L. cultivated *in vitro*. - *Planta* **187**, 171-175 (1992).
- SOMMER, S., SEVERIN, K., CAMARA, B. und HEIDE, L.: Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. - *Phytochemistry* **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).
- STANJEK, V., PIEL, J. und BOLAND, W.: Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae). - *Phytochemistry* **50**, 1141-1145 (1999).

- STANLEY, C. und PERHAM, R. N.: Purification of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes from ox heart by a new method. - *Biochem. J.* **191**, 147-154 (1980).
- STAUDT, M. und BERTIN, N.: Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. - *Plant Cell Environ.* **21**, 385-395 (1998).
- STEIN, R. A. und MEAD, J. F.: Small hydrocarbons formed by the peroxidation of squalene. - *Chem. Phys. Lipids* **46**, 117-120 (1988).
- STERMER, B. A., BIANCHINI, G. M. und KORTH, K.: Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. - *J. Lipid Res.* **35**, 1133-1140 (1994).
- STONE, B. G., BESSE, T. J., DUANE, W. C., EVANS, C. D. und DEMASTER, E.: Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. - *Lipids* **28**, 705-708 (1993).
- SURZYCKI, S.: Synchronously grown cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. - *Methods Enzymol.* **23A**, 67-73 (1971).
- 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 (2000).
- 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).
- TANAKA, K., TAZUYA, K., YAMADA, K. und KUMAOKA, H.: Biosynthesis of pyridoxine: origin of the nitrogen atom of pyridoxine in microorganisms. - *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **46**, 55-57 (2000).
- TANG, C.-T., ENGEL, R. und TROPP, B.: Glycerol 3-phosphate analogues as metabolic inhibitors in *Escherichia coli*. 3-Hydroxy-4-oxobutyl-1-phosphonate, a drug that interferes with normal phosphoglyceride metabolism. - *Biochim. Biophys. Acta* **572**, 472-482 (1979).
- TARSHIS, L. C., PROTEAU, P. J., KELLOGG, B. A., SACCHETTINI, J. C. und POULTER, C. D.: Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15018-15023 (1996).
- TAUCHER, J., HANSEL, A., ALFONS, J. und RAY, F.: Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry. - *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1230-1234 (1997).
- TAYLOR, S. V., VU, L. D. und BEGLEY, T.D.: Chemical and enzymatic synthesis of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. - *J. Org. Chem.* **63**, 2375-2377 (1998).
- TERRY, G. M., STOKES, N. J., HEWITT, C. N. und MANSFELD, T. A.: Exposure to isoprene promotes flowering in plants. - *J. Exp. Bot.* **46**, 1629-1631 (1995).
- THIEL, R., ADAM, K. P. und BECKER, H.: Isopentenyl diphosphate biosynthesis in liverworts. - *Pharm. Pharmacol.* **2/3**, 103-105 (1997).
- TOTTÉ, N., CHARON, L., ROHMER, M., COMPERNOLLE, F., BABOEUF, I. und GEUNS, J. M. C.: Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. - *Tetrahedron Lett.* **41**, 6407-6410 (2000).

- TREHARNE, K. J., MERCER, E. I. und GOODWIN, T. W.: Incorporation of [2-¹⁴C]mevalonic acid lactone into sterol, β -carotene or phytol in developing leaves of monocotyledonous and dicotyledonous plants. - *Biochem. J.* **90**, 39P-40P (1964).
- TREHARNE, K. J., MERCER, E. I. und GOODWIN, T. W.: Incorporation of [¹⁴C] carbon dioxide and [2-¹⁴C]mevalonic acid into terpenoids of higher plants during chloroplasts development. - *Biochem. J.* **99**, 239-245 (1966).
- TURNER, G., GERSHENZON, J., NIELSON, E. E., FROELICH, J. E. und CROTEAU, R.: Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. - *Plant Physiol.* **120**, 879-886 (1999).
- UBBINK, J. B., DELPORT, R., BECKER, P. J. und BISSPORT, S.: Evidence of a theophylline-induced vitamin B₆ deficiency caused by noncompetitive inhibition of pyridoxal kinase. - *J. Lab. Clin. Med.* **113**, 15-22 (1989).
- UMEZAWA, H., AOYAGI, T., OGAWA, K., OBATA, T., IINUMA, H., NAGANAWA, H., HAMADA, M. und TAKEUCHI, T.: Foroxymithine, a new inhibitor of angiotensin-converting enzyme, produced by actinomycetes. - *J. Antibiot.* **38**, 1813-1815 (1985).
- VOET, D. und VOET, J. G.: Biochemistry. *John Wiley & Sons, Inc., New York* (1995).
- VOLK, R.: Biosynthese der Riboflavinvorstufe 3,4-Dihydroxybutanon-4-phosphat. - *Dissertation, Technische Universität, München* (1989).
- 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).
- VOLLHARDT, K. P. C.: Organische Chemie. *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim* (1988).
- WAGNER, W. P., NEMECEK-MARSHALL, M. und FALL, R.: Three distinct phases of isoprene formation during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. - *J. Bacteriol.* **181**, 4700-4703 (1999).
- WAGNER, W. P., HELMIG, D. und FALL, R.: Isoprene biosynthesis in *Bacillus subtilis* via the methylerythritol phosphate pathway. - *J. Nat. Prod.* **63**, 37-40 (2000).
- 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 of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. - *Plant J.* **21**, 571-578 (2000).
- WEIMER, M. R., BUHLER, D. D. und BALKE, N. E. Clomazone selectivity: Absence of differential uptake, translocation, or detoxication. - *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).

- WEITZ, H. M. und LOSER, E.: Isoprene. - In: Elvers, B., Hawkins, S., Ravenscroft, M., Schulz, G. (Hrsg.): Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 627-644 (1989).
- WENT, F. W.: Organic matter in the atmosphere, and its possible relation to petroleum formation. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 212-221 (1960).
- WENZEL, A. A., SCHLAUTMANN, H., JONES, C. A., KÜPPERS, K. und MEHLHORN, H.: Aminoethoxyvinylglycine, cobalt and ascorbic acid all reduce ozone toxicity in mung beans by inhibition of ethylene biosynthesis. - *Physiol. Plant.* **93**, 286-290 (1995).
- WESTHEIMER, F. H.: Why nature chose phosphates. - *Science* **235**, 1173-1178 (1987).
- WESTON, L. A. und BARRETT, M.: Tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and bell pepper (*Capsicum annuum*) to clomazone. - *Weed Science* **37**, 285-289 (1989).
- WILDERMUTH, M. C. und FALL, R.: Light-dependent isoprene emission. Characterisation of a thylakoid-bound isoprene synthase in *Salix discolor* chloroplasts. - *Plant Physiol.* **112**, 171-182 (1996).
- WILDERMUTH, M. C. und FALL, R.: Biochemical characterisation of stromal and thylakoid-bound isoforms of isoprene synthase in willow leaves. - *Plant Physiol.* **116**, 1111-1124 (1998).
- WILDING, E. I., BROWN, J., 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 biosynthesis in gram-positive cocci. - *J. Bacteriol.* **182**, 4319-4327 (2000a).
- WILDING, E. I., KIM, D.-Y., BRYANT, A. P., GWYNN, M. N., LUNSFORD, R. D., MCDEVITT, D., MYERS, J. E. JR., ROSENBERG, M., SYLVESTER, D., STAUFFACHER, C. V. und RODWELL, V. W.: Essentiality, expression, and characterization of the class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Staphylococcus aureus*. - *J. Bacteriol.* **182**, 5147-5152 (2000b).
- WILKINSON, R. E.: Metolachlor influence on growth and terpenoid synthesis. - *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**, 63-71 (1981).
- YOKOTA, A. und SASAJIMA, K.: 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.: Formation of 1-Deoxy-ketoses by pyruvate dehydrogenase and acetoin dehydrogenase. - *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2517-2524 (1986).
- ZABIN, I.: The formation of radioactive lycopene in ripening tomatoes. - *J. Biol. Chem.* **226**, 851-859 (1957).
- ZEIDLER, J. G. und LICHTENTHALER, H. K.: Two simple methods for measuring isoprene emission of leaves by UV-spectroscopy and GC-MS. - *Z. Naturforsch.* **53c**, 1078-1089 (1998).
- ZEIDLER, J. G., LICHTENTHALER, H. K., MAY, H. U. und LICHTENTHALER, F. W.: Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway ?. - *Z. 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).
- ZHOU, D. und WHITE, R. H.: Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. - *Biochem. J.* **273**, 627-634 (1991).
- 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).
- ZIMMER, W., BRÜGGEMANN, N., EMEIS, S., GIERSCH, C., LEHNING, A., STEINBRECHER, R. und SCHNITZLER, J.-P.: Process-based modelling of isoprene emission by oak leaves. - *Plant Cell Environ.* **23**, 585-595 (2000).
- ZWINSELMAN, J. J. und NIBBERING, N. M. M.: A field ionization kinetics and metastable ion study of the fragmentation of some pentenols. - *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **38**, 163-179 (1981).

- 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**, 1573-1576 (1999).
- LICHTENTHALER, H. K. und ZEIDLER, J.: Isoprene and terpene biosynthesis. *In*: Gasche, R., Papen, H., Rennenberg, H. (Hrsg.): Trace Gas Exchange in Forest Ecosystems. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, in Druck (2001).
- 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., 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).
- ZEIDLER, J. G. und LICHTENTHALER, H. K.: Two simple methods for measuring isoprene emission of leaves by UV-spectroscopy and GC-MS. - *Z. Naturforsch.* **53c**, 1078-1089 (1998).
- ZEIDLER, J. G., LICHTENTHALER, H. K., MAY, H. U. und LICHTENTHALER, F. W.: Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway ?. - *Z. Naturforsch.* **52c**, 15-23 (1997).
- ZEIDLER, J. G., MAY, H. U., LICHTENTHALER, F. W. und LICHTENTHALER, H. K.: Isoprene emitted by plants is formed via the 1-deoxy-D-xylulose phosphate pathway of isopentenyl diphosphate biosynthesis. *In*: Sanchez, J., Cerda-Olmedo, E., Martinez-Force, E. (Hrsg.): Advances in Lipid Research. *Universidad de Sevilla, Sevilla*, S. 425-428 (1998).
- 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).

Abstracts in wissenschaftlichen Zeitschriften:

- LICHTENTHALER, H. K., ZEIDLER, J. G., MAY, H. U. und LICHTENTHALER, F. W.: Isoprene emitted by plants is formed via the new GAP/pyruvate pathway of isoprenoid formation. - *Plant Physiol.* **114**, Suppl. Abstract No. 940, 189-190 (1997).
- LICHTENTHALER, H. K., MÜLLER, C., SCHWENDER, J., JOMAA, H. und ZEIDLER, J.: Specific inhibition of isoprenoid (carotenoid, chlorophyll and isoprene) biosynthesis in plants by fosmidomycin. - *Plant Physiol.* **120**, Suppl. Abstract No. 263, 75-76 (1999).
- MÜLLER, C., SCHWENDER, J., ZEIDLER, J., JOMAA, H. und LICHTENTHALER, H. K.: Fosmidomycin - ein wirkungsvoller Inhibitor des Mevalonat-unabhängigen 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Weges der IPP Biosynthese in Pflanzen. - *Phytomedizin* **29**, 18-19 (1999).
- MÜLLER, C., SCHWENDER, J., ZEIDLER, J. und LICHTENTHALER, H. K.: Enzyme und Gene des Mevalonat-unabhängigen DOXP/MEP-Weges der IPP-Biosynthese in Pflanzen. - *Phytomedizin* **30**, 32-33 (2000).
- ZEIDLER, J. G. und LICHTENTHALER, H. K.: Messung der Isopren-Emission von Blättern zur Untersuchung von Hemmstoffen des Mevalonat-unabhängigen Isoprenoid-Biosyntheseweges. - *Phytomedizin* **29**, 17-18 (1999).
- ZEIDLER, J. G. und LICHTENTHALER, H. K.: Die pflanzliche Isoprenoidbiosynthese als Testsystem für Wirkstoffe gegen Malaria und pathogene Bakterien. - *Phytomedizin* **30**, 33 (2000).

Lebenslauf von Johannes Zeidler

21.04.1968	Geboren in Oberhausen (Ruhrgebiet)
1974-1978	Grundschule in Karlsruhe
1978-1987	Gymnasium in Karlsruhe (Abitur 1987)
1987-1994	Studium der Chemie an der Universität Karlsruhe Abschluss Diplom 1994
1994-1995	Zivildienst in Karlsruhe
Seit Frühjahr 1996	Beginn der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Botanik II, Universität Karlsruhe, bei Prof. H. K. Lichtenthaler