

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

***In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu
Terpenbiosynthesen und Stoffwechselnetzwerken**

Petra Helga Adam

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 30.09.02 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.11.02 angenommen.

*In der Idee leben heißt,
das Unmögliche behandeln,
als wenn es möglich wäre.*

(Johann Wolfgang von Goethe)

Für meine Eltern

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von April 1999 bis Juni 2002 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Danksagung

Meinen Doktorvater Prof. Dr. Dr. A. Bacher danke ich für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung und Förderung während meiner Promotion.

Prof. Dr. D. Arigoni (ETH Zürich) danke ich für die Diskussionsbereitschaft und Mithilfe bei der Aufklärung der Biosynthese von Hyperforin.

Dr. Wolfgang Eisenreich danke ich für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie seine Unterstützung bei der NMR-Spektroskopie.

Dr. Felix Rohdich danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Terpenprojekt.

Dr. Markus Gütlich danke ich für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Insektenzellen.

Ferner gilt mein Dank:

Herrn Fritz Wendling für die schnelle Hilfe bei allen HPLC- und Computerproblemen.

C. Schwarz, K. Gärtner, I. Obersteiner, A. König, T. Gräwert und M. Lee für die Mithilfe bei meinen Projekten.

Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Terpengruppe, Dr. Stefan Hecht (Meister), Dr. Christoph Schuhr, Tanja Radykewicz, Ferdinand Zepeck (Sugar), Dr. Wolfgang Eisenreich, Dr. Felix Rohdich, Johannes Kaiser, Stephan Bathe (Junior), Sabine Amslinger (Amsel), Dr. Juraithip Wungsintaweekul (Ju), Dr. Cornelia Krieger, Dr. Klaus Kis und Ralf Laupitz danke ich für die gute Zusammenarbeit und wünsche allen weiterhin viel Erfolg.

Dr. Wolfgang Eisenreich, Dr. Felix Rohdich und Dr. Stefan Hecht danke ich für die Korrektur meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Kollegen und Kolleginnen unseres Arbeitskreises für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht bedanken.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits publiziert:

Adam, P., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002). Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. *J. Med. Chem.*, in press.

Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Gräwert, T., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F. (2002). Biosynthesis of terpenes. Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12108-12113.

Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1158-63.

Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2001). Studies on the non-mevalonate pathway to terpenes: The role of GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14837-14842.

Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Kis, K., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Zenk, M. H. (2001). Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis. The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4 cyclodiphosphate in plants. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6302-6310.

Amslinger, S., Kis, K., Hecht, S., Adam, P., Rohdich, F., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002). Biosynthesis of terpenes. Preparation of (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-diphosphate, an intermediat of the deoxyxylulose phosphate pathway. *J. Org. Chem.* **67**, 4590-4594.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. TERPENBIOSYNTHESE	1
1.1.1. Der Mevalonatweg	3
1.1.2. Der Desoxyxylulosephosphat-Weg	5
1.2. HYPERFORIN, EIN WIRKSTOFF AUS DEM JOHANNISKRAUT (<i>HYPERICUM PERFORATUM</i>)	9
1.3. ZIELSETZUNG.....	11
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. MATERIALIEN.....	12
2.2. GERÄTE.....	14
2.2.1. Radioaktivitätsmessungen	14
2.2.2. NMR Spektroskopie	14
2.2.3. Ultraschallgerät	15
2.2.4. Gefriertrocknung.....	15
2.2.5. HPLC	15
2.2.6. Gaschromatographie / EI-Massenspektrometrie	15
2.3. METHODEN	16
2.3.1. Bestimmung der Radioaktivität	16
2.3.2. Berechnung der ¹³ C-Anreicherungen.....	16
2.3.2.1. Relative ¹³ C-Anreicherung	16
2.3.2.2. Absolute ¹³ C-Anreicherung	16
2.3.2.3. Analyse der ¹³ C ¹³ C-Kopplungen	17
2.3.3. HPLC-Analytik	18
2.3.3.1. Anionenaustauscher-HPLC.....	18
2.3.3.2. Ionenpaarchromatographie	18
2.3.4. DC-Analytik	20
2.3.5. Dialyse von Rohextrakten	21
2.3.6. Chromoplastenpräparation aus <i>Capsicum annuum</i>	21
2.3.6.1. Isolierung der Rohchromoplasten	21
2.3.6.2. Isolierung der Stroma- und Membranfraktion.....	22
2.3.7. Herstellung von ¹⁴ C-markierten Substraten	22
2.3.7.1. Herstellung von [2- ¹⁴ C]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat.....	22
2.3.7.2. <i>In vivo</i> Synthese von ¹⁴ C-markierten [2- ¹⁴ C]1-Hydroxy-2-methyl-2(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat ...	23
2.3.8. Radioaktive Enzymassays zur Bestimmung der IspG Aktivität.....	24
2.3.8.1. Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Rohextrakt aus M15 <i>E. coli</i> Wildtyp-Zellen.....	24
2.3.8.2. Enzymassay zur Bestimmung der IspG Aktivität mit Rohextrakt aus dem <i>E. coli</i> Stamm XL1- pACYCgcpe.....	24

3.1.2.8. Assay mit isolierten Chromoplasten aus <i>Capsicum annuum</i> und ^3H -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat	53
3.1.3. <i>In vitro</i> Assay mit gereinigtem IspH Protein	54
3.1.3.1. Rekonstitution von IspH Protein	55
3.1.3.2. NMR-Umsetzung von ^{13}C -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat zu ^{13}C -markiertem IPP / DMAPP mit Rohextrakt aus <i>E. coli</i> XL1-pMALlytB Zellen	58
3.1.4. Diskussion der Ergebnisse der enzymatischen Reaktionen der IspG und IspH Proteine	63
3.1.4.1. Darstellung von $[2-^{14}\text{C}]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat	64
3.1.4.2. Die enzymatische Reaktion des IspG Proteins	64
3.1.4.3. Die enzymatische Reaktion des IspH Proteins	67
3.2. AUFLÄRUNG DER BIOSYNTHESE VON HYPERFORIN.....	73
3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von Hyperforin.....	74
3.2.1.1. Derivatisierung von Hyperforin mit Acetylchlorid.....	76
3.2.1.2. Stabilität von Hyperforin	81
3.2.2. Einbauversuche mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glukose und $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukose an <i>Hypericum perforatum</i> ..	82
3.2.2.1. Durchführung der Einbauversuche.....	82
3.2.2.2. Ergebnisse des Einbauversuchs mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glukose	82
3.2.2.3. Ergebnisse des Einbauversuchs mit $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukose	88
3.2.3. Diskussion der Ergebnisse des Einbauversuchs mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glukose und $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukose	89
3.2.3.1. Mechanismus der Biosynthese von Hyperforin	92
3.3. STOFFWECHSELFLUß UND AMINOSÄURENBIOSYNTHESE IN INSEKTENZELLEN SPODOPTERA	
<i>FRUGIPERDA</i>	95
3.3.1. Einbauversuche mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose in <i>S. frugiperda</i> Zellen.....	96
3.3.2. Einbauversuch von ^{15}N -markierten Phenylalanin an <i>S. frugiperda</i> Zellen.....	101
3.3.3. Diskussion der Ergebnisse der Einbauversuche mit ^{15}N -markierten Aminosäuren und $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose an <i>S. frugiperda</i> Zellen	105
4. ZUSAMMENFASSUNG.....	107
5. LITERATURVERZEICHNIS	110

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
br	breit
COSY	correlated spectroscopy
CDP	Cytidindiphosphat
Ci	Curie
CTP	Cytidintriphosphat
d	Dublett
dd	Doppeldublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
DX	1-Desoxy-D-xylulose
DXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOAc	Essigsäureethylester
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mono-Nucleotid
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GcpE	IspG, 1-Hydroxy-2-methyl-2(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat-Synthase
h	Stunden
Hepes	N-2-Hydroxymethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high pressure / performance liquid chromatography
Hz	Hertz
INADEQUATE	incredible natural abundance double quantum transfer experiment
IPP	Isopentenylidiphosphat

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactose
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase
IspG	früher: GcpE
IspH	früher: LytB
J	skalare Kopplungskonstante
LytB	IspH, 1-Hydroxy-2-methyl-2(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase
m	Multipllett
M	molar
MBP	Maltosebindeprotein
Me	Methyl
min	Minute
NAD ⁺	Nicotinamadenindinucleotid
NADH	Nicotinamadenindinucleotid, red. Form
NADP ⁺	Nicotinamadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamadenindinucleotidphosphat, red. Form
n.b.	nicht bestimmt
NMR	nuclear magnetic resonance / magnetische Kernresonanz
NOESY	nucler Overhauser spectroscopy
OD	Optische Dichte
ppm	parts per million
q	Quartett
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor
RP	reversed phase / Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Singulett
SAM	S-Adenosylmethionin
t	Triplett

VI

TBAS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TPP	Thiaminpyrophosphat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
Yxit-P	2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat
Yxit-CDP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol
Yxit-CDP-P	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat
% v/v	Volumenprozent
% w/w	Massenprozent

1. Einleitung

1.1. Terpenbiosynthese

Terpene sind mit ihren 30 000 bis jetzt bekannten Verbindungen eine der größten Naturstoffklassen. Viele Verbindungen besitzen wichtige biologische Funktionen (Sacchetti und Poulter, 1997). Beispiele bekannter Vertreter der Terpene sind u.a. Cineol, β -Carotin, Ubichinon, Steroide und Phytol (vgl. Abbildung 1).

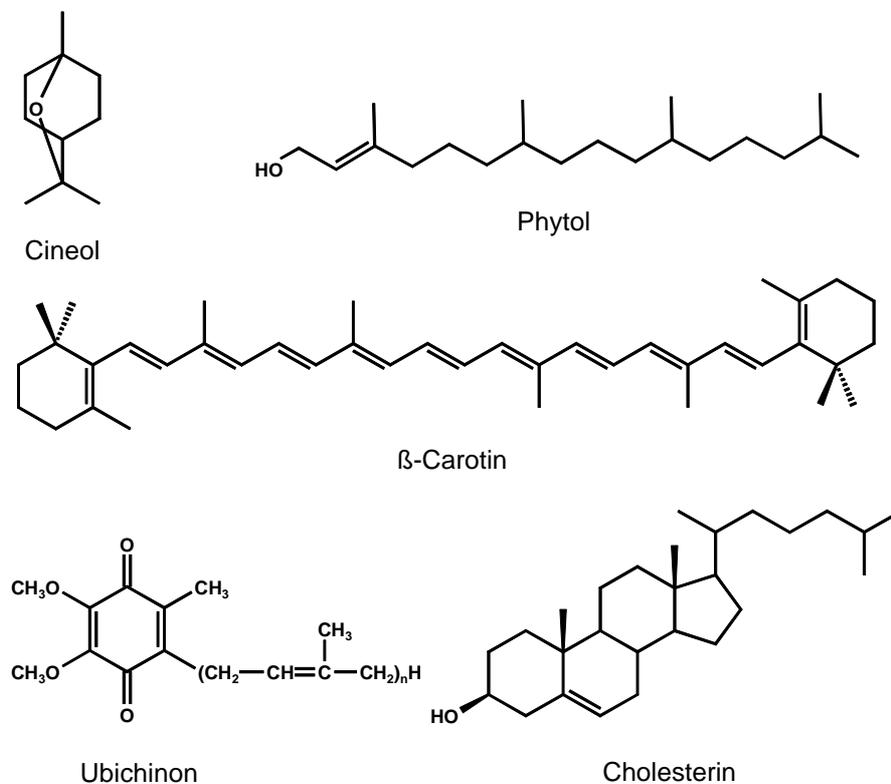


Abbildung 1: Strukturformeln von β -Carotin, Cineol, Phytol, Cholesterin und Ubichinon

Carotine finden als Lichtschutzpigmente in Pflanzen Verwendung und werden außerdem als Antioxidantien eingesetzt. Cholesterin, das sich von Squalen, einem Triterpen ableitet, hat u. a. eine wichtige Funktion als Bestandteil der Zellmembranen eukaryontischer Zellen. Phytol stellt als Phitylrest die Seitenkette im Blattfarbstoff Chlorophyll dar und verankert Chlorophyll in der Membran.

Einige Terpene sind von kommerziellem Interesse, da sie für pharmazeutische und lebensmitteltechnische Zwecke eingesetzt werden. So werden die beiden Monoterpene Eucalyptol und Menthol u.a. als Aromastoffe genutzt. Taxol, ein Diterpen aus der Eibe, hat cytostatische Eigenschaften und wird bei der chemotherapeutischen Behandlung von Krebs verwendet (vgl. Abbildung 2).

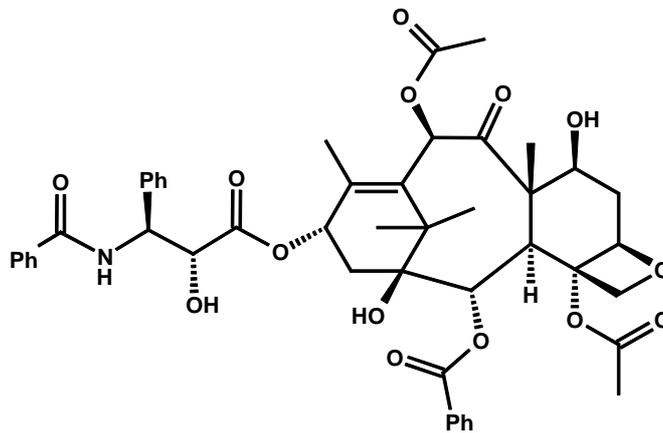


Abbildung 2: Strukturformel von Taxol

Trotz ihrer hohen Diversität leiten sich alle Terpene von den zwei Grundbausteinen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) ab. Die Biosynthese aller höheren Terpene erfolgt durch Kondensation von DMAPP und IPP zu Geranylidiphosphat. Durch weitere Addition von IPP werden Farnesylidiphosphat, Geranylgeranioldiphosphat und im weiteren Verlauf Polyprenylidiphosphat gebildet (vgl. Abbildung 3).

Je nachdem wie viele Grundbausteine aneinander geknüpft sind, unterteilt man in Hemiterpene (C_5), Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Triterpene (C_{30}), Tetraterpene (C_{40}) und Polyterpene (C_5)_n. Die hohe Diversität der Verbindungen wird anschließend durch Veränderungen am Grundgerüst wie Cyclisierungen, Oxidationen, Reduktionen, Isomerisierungen und anderen Reaktionen erreicht (Review: Rohmer, 1999; Eisenreich *et al.*, 1998).

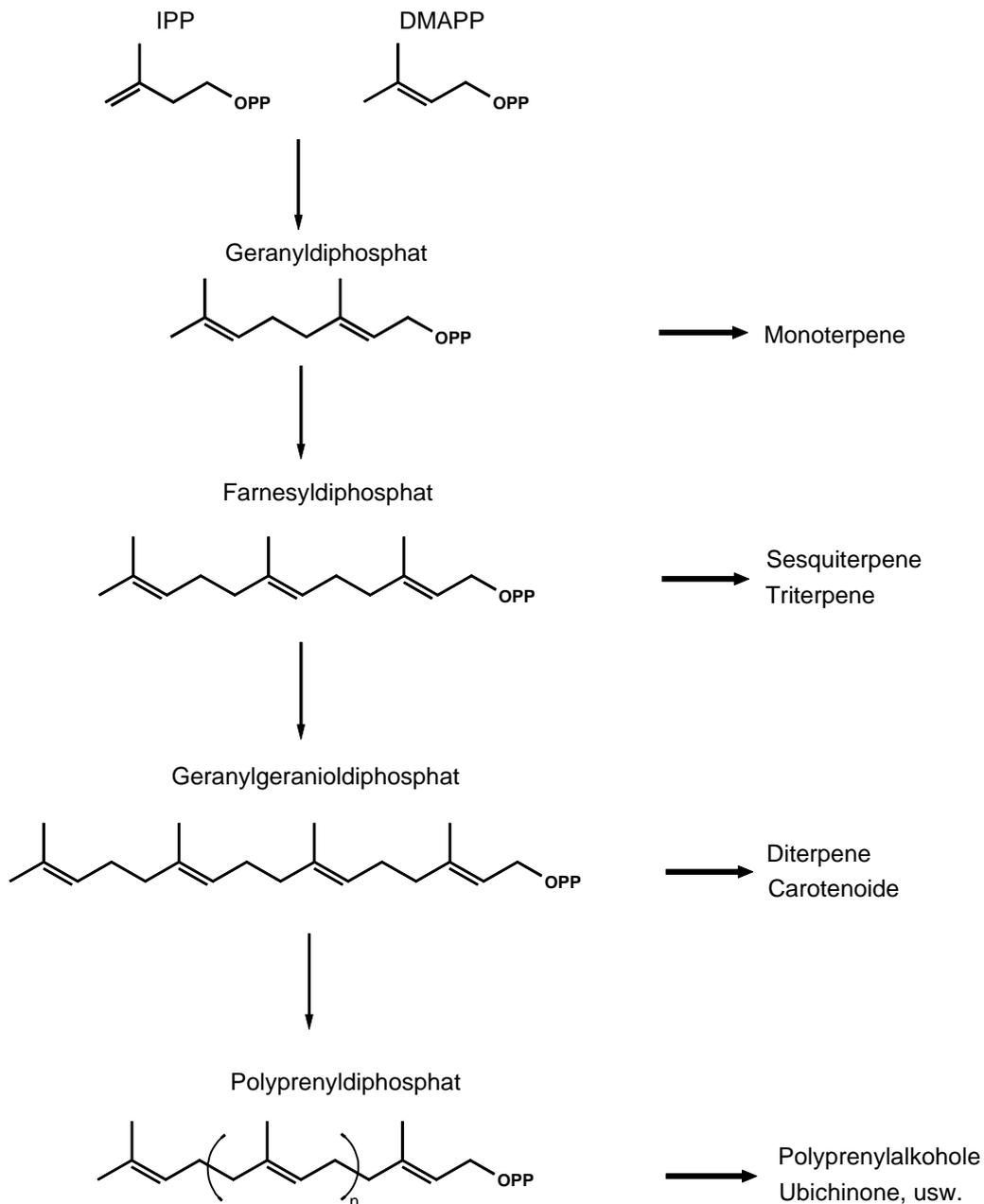


Abbildung 3: Biosynthese höherer Isoprenoide ausgehend von IPP und DMAPP

1.1.1. Der Mevalonatweg

Bis vor einigen Jahren ging man davon aus, daß alle Terpene nach einem einzigen Weg, dem sogenannten Acetat-Mevalonat-Weg, gebildet werden (Bloch, 1992; Bochar *et al.*, 1999; Bach, 1995). Zuerst werden zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA kondensiert. Diese Verbindung wird mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA umgesetzt (vgl. Abbildung 4). Dieses

wird anschließend reduziert, wodurch Mevalonsäure entsteht, die im weiteren Verlauf zu 5-Diphosphomevalonat pyrophosphoryliert wird. Im letzten Reaktionsschritt wird CO_2 eliminiert, wobei IPP gebildet wird, welches durch Isomerisierung mit DMAPP im Gleichgewicht steht (Qureshi und Porter, 1981; Spurgeon und Porter, 1981).

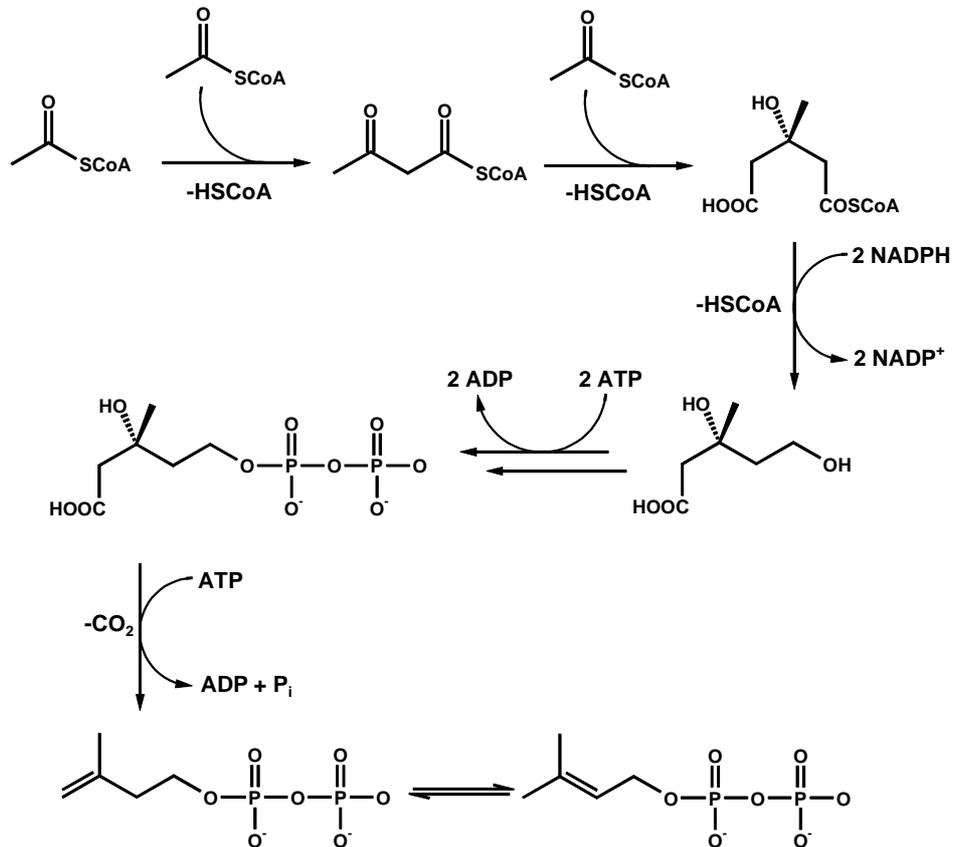


Abbildung 4: Der Mevalonatweg

Einbauversuche mit radioaktiv-markierter Mevalonsäure in eine Vielzahl von pflanzlichen Terpenen führten zu Einbauraten unter 1 % (Banthorpe *et al.*, 1972). Diese niedrigen Einbauraten wurden dadurch erklärt, daß die Mevalonsäure schlecht aufgenommen wurde. Im Laufe der nächsten Jahrzehnte lieferten unterschiedliche Forschungsarbeiten Ergebnisse, die sich nicht mit dem Mevalonatweg in Einklang bringen ließen. Nach Applikation von radioaktiv-markierter Mevalonsäure an Chromoplasten von *Narcissus pseudonarcissus* konnte z. B. keine Markierung von Carotinen beobachtet werden. Statt dessen konnte nach Applikation von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, $[\text{U}-^{14}\text{C}]\text{3-Phosphoglycerat}$ und $[\text{2-}^{14}\text{C}]\text{Pyruvat}$ an Spinatchloroplasten markiertes β -Carotin gefunden werden (Beyer *et al.*, 1980). Außerdem wurden unerwartete ^{13}C -Markierungen in Hopanoiden aus einigen Bakterien gefunden, die mit ^{13}C -markierten

Acetat gefüttert wurden (Rohmer *et al.*, 1993). Einbauversuche mit ^{13}C -markierter Glukose an *E. coli* und Sämlingen von *Ginkgo biloba* führten zu Markierungsmustern in Ubichinonen, die nicht mit dem herkömmlichen Mevalonatweg in Einklang zu bringen waren (Schwarz, 1994; Broers, 1994).

Letzten Endes waren es diese und weitere Versuche der beiden unabhängigen Arbeitsgruppen von Rohmer und Arigoni, die zur Entdeckung des Desoxyxylulosephosphat-Weges (DXP-Weg) führte (Review: Eisenreich *et al.*, 1998). Andere Bezeichnungen dieses Weges lauten alternativer Terpenbiosyntheseweg oder Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg).

1.1.2. Der Desoxyxylulosephosphat-Weg

Die Ausgangsverbindungen des alternativen Terpenbiosyntheseweges sind D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Pyruvat (Broers, 1994; Schwarz, 1994). Pyruvat wird unter CO_2 -Abspaltung in einen aktivierten Aldehyd überführt, der zusammen mit GAP zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) kondensiert. Diese Reaktion wird von der Thiamindiphosphat abhängigen 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase katalysiert. Hierbei handelt es sich um ein vom *dxs* Gen codiertes Enzym, welches zuerst aus *Escherichia coli* (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998) isoliert wurde. Zu dieser Zeit war bereits bekannt, daß DXP die Vorstufe der Biosynthese von Thiamin und Pyridoxal darstellt (White, 1978; Hill *et al.*, 1989). Im zweiten Schritt kommt es zu einer Kohlenstoff-Skelett-Umlagerung. Die Bindung zwischen C3 und C4 von DXP wird dabei gebrochen und zwischen C2 und C4 neu geknüpft (vgl. Abbildung 5), wobei nach einer Reduktion als nächstes Zwischenprodukt auf dem Weg zu IPP 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) entsteht (Kuzuyama *et al.*, 1998). Diese Reaktion wird von der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (Dxr Protein) bewerkstelligt (Radykewicz *et al.*, 2000; Proteau *et al.*, 1999). Dieses Enzym gehört zur sogenannten Klasse B Dehydrogenase Familie, welche stereospezifisch das H_{Si} des NADPH bei der Reduktion übertragen.

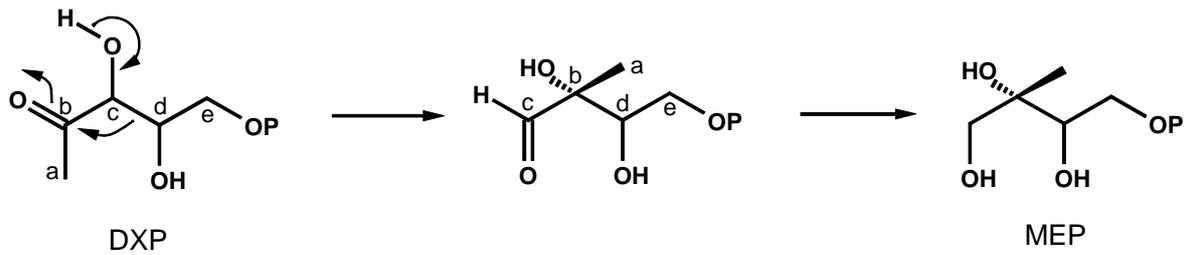


Abbildung 5: Reduktive Gerüstumlagerung von DXP zu MEP

Im dritten Schritt (vgl. Abbildung 6) wird MEP mit Hilfe der 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase (IspD) in Gegenwart von Cytidintriphosphat (CTP) zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) umgesetzt, wobei anorganisches Diphosphat eliminiert wird (Rohdich *et al.*, 1999).

Im vierten Schritt wird CDP-ME in einer ATP-abhängigen Reaktion durch das IspE Protein zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat umgesetzt (Lüttgen *et al.*, 2000).

Im weiteren Verlauf wird 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat durch das IspF Protein zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat umgesetzt (Herz *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich um das letzte bekannte Intermediat des DXP-Weges, das zu Beginn dieser Arbeit neben IPP bekannt war (vgl. Abbildung 6). IPP wurde bereits früher als Endprodukt identifiziert (McCaskill und Croteau, 1999), da diese Verbindung bei Hemmung der IPP-Isomerase im pflanzlichen DXP-Weg akkumuliert wird. Beide Wege, der Mevalonatweg und der DXP-Weg, enden somit im gleichen Produkt. Um diese Endprodukte zu erreichen, muß es sich bei den noch fehlenden Schritten um eine Ringöffnung, zwei Dehydratisierungen und um zwei Reduktionen handeln. Außerdem gab es Hinweise darauf, daß die beiden Gene *gcpE* und *lytB* aus *E. coli* in die letzten Schritte involviert sind. Die Verteilungsmuster innerhalb der Organismen dieser beiden Gene sind mit anderen orthologen Gruppen des alternativen Terpenbiosyntheseweges identisch (Rohdich *et al.*, 2001). Außerdem zeigten knock-out Experimente mit beiden Genen bei *E. coli* und *Synechocystis* sp., daß beide Enzyme für die Terpenbiosynthese essentiell sind (Cunningham *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001).

Die Tatsache, daß der alternative Terpenbiosyntheseweg beim Menschen im Gegensatz zu verschiedenen pathogenen Mikroorganismen nicht vorhanden ist,

kann zur Entwicklung von Antibiotika und Chemotherapeutika genutzt werden (Rohmer, 1998; Lichtenthaler *et al.*, 2000). Analog gilt dies natürlich auch für die Entwicklung von Herbiziden und Wachstumsregulatoren in der Pflanzenwelt (Fellermeier *et al.*, 1999; Knöss, 1999). In der Pflanze sind der Mevalonatweg und der Methylerythritolphosphat-Weg kompartimentiert, d.h. der Mevalonatweg findet im Cytosol und in den Mitochondrien statt, der alternative Weg hingegen in den Plastiden. Es ist jedoch bekannt, daß diese beiden Wege miteinander im Austausch stehen können. Man spricht in diesem Fall vom sogenannten Crosstalk (Arigoni *et al.*, 1997; Schuhr *et al.*, 2002). Einige Bakterien, Hefen, Archae oder Pilze scheinen den Mevalonatweg zu nutzen, während viele Bakterien und Grünalgen nur den neuen Weg verfolgen. Streptomyceten, einige Algen, Moose und höhere Pflanzen können hingegen ihre Terpene nach beiden Wegen herstellen.

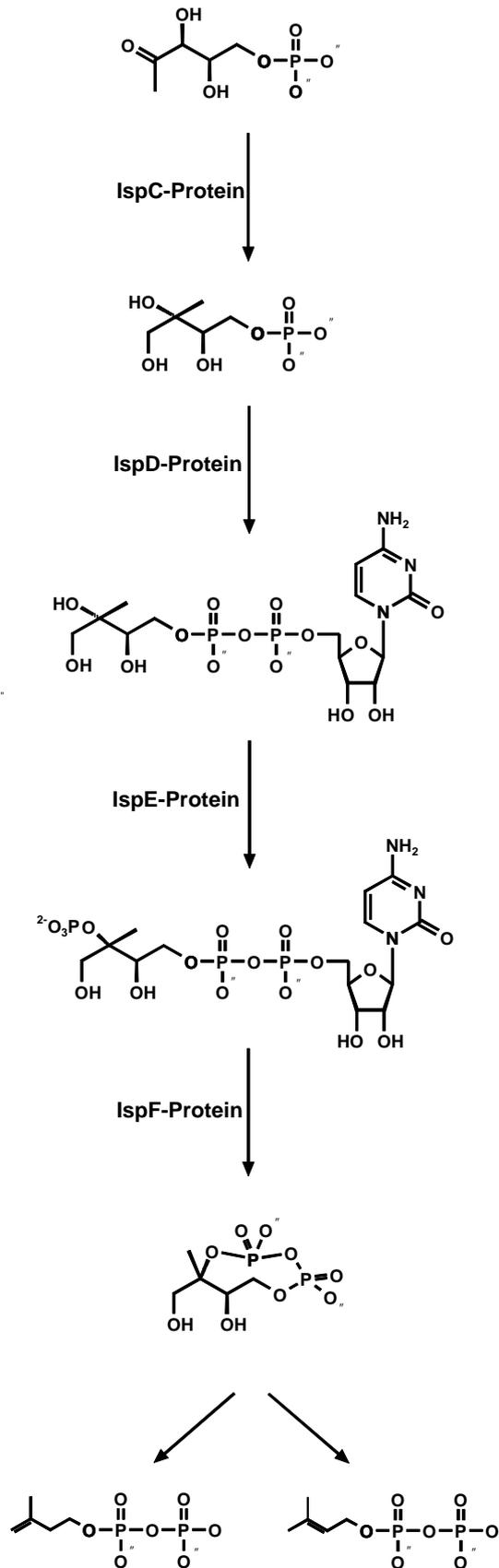


Abbildung 6: Die zu Beginn der Arbeit bekannten Schritte des alternativen Terpen-Biosyntheseweges

1.2. Hyperforin, ein Wirkstoff aus dem Johanniskraut (*Hypericum perforatum*)

Die Verwendung von Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) als Heilpflanze ist seit 2000 Jahren bekannt. So erwähnte Plinius die Verwendung dieser Pflanze in der „*Historia Naturalis*“ zur Behandlung von Brandwunden. Der Name stammt aus dem Griechischen und leitet sich von *hyper* (über) und *eikon* (Bild) ab. Es gehört zur Familie der Hypericaceae und zur Ordnung der Guttiferales. *Hypericum perforatum* L. ist in Europa, Asien, Nordafrika und Nordamerika weit verbreitet. Die Pflanze wird bis zu 60 cm hoch, hat gelbe Blüten und ist fünfstrahlig. Die Blätter sind mit durchscheinenden Öldrüsen punktiert. Da die Blütezeit von Juni bis Juli reicht und somit in der Zeit des 24. Juni, dem Geburtstag von Johannes des Täufers liegt, wird es auch „Johanniskraut“ (engl. „St. John´s wort“) genannt.

Extrakte dieser Pflanze beinhalten ein breites Spektrum an Verbindungen, wobei man folgende Hauptgruppen zusammenfassen kann (vgl. Abbildung 7): Naphthodianthron (Hypericin, Pseudohypericin), Acylphloroglucinole (Hyperforin, Adhyperforin), Flavonglykoside (Quercetin, Quercitin, Isoquercitin, Rutin, Kampferol, Myricetin und Hyperosid), Biflavone (Il-Biapiogenin, Amentoflavon), Proanthocyanidine (Procyanidin B₂), Xanthone (Kielcorin) und Phenylpropane (Chlorogensäure, Kaffeesäure).

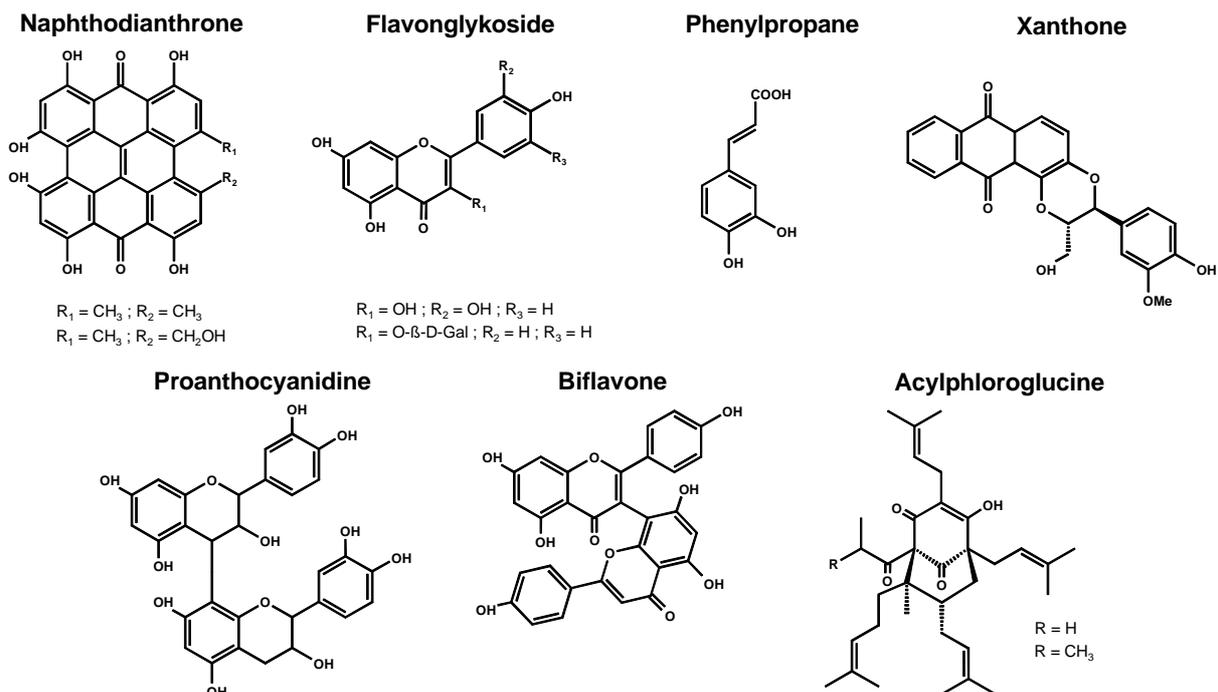


Abbildung 7: Hauptbestandteile von *Hypericum perforatum*

Acylphloroglucine stellen dabei mit ca. 7% die größte Gruppe dar (Repcak *et al.*, 1997). Phloroglucinderivate, wie Hyperforin, sind hauptsächlich in den Blüten und in den Früchten zu finden. Ihr Gehalt ist somit stark von der Jahreszeit abhängig.

Hyperforin wurde 1971 als antibakterielles Mittel entdeckt (Gurevich *et al.*, 1971). Die Struktur dieser Verbindung konnte durch chemische Abbaureaktionen, Derivatisierungen sowie durch spektroskopische Methoden gelöst werden. Durch Röntgenstrukturanalyse des 3,5-Dinitrobenzoesäureester konnte die relative Stereochemie (Brondz *et al.*, 1982), sowie kurz danach die absolute Konfiguration durch einen Einkristall des p-Brombenzoesäureesters gelöst werden (Brondz *et al.*, 1983).

Es hat sich gezeigt, daß Hyperforin gegenüber grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* bakterozid wirkt (Schempp *et al.*, 1999). Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß Hyperforin das Zellwachstum von Tumorzellen hemmt (Schempp *et al.*, 2002). Extrakte von *Hypericum perforatum* werden zur Behandlung von Depressionen eingesetzt. Dazu werden standardisierte alkoholische Extrakte (60 % Ethanol oder 80 % Methanol) verwendet. Diese Extrakte enthalten in der Regel 0.1-0.3 % Hypericin, 2-4 % Flavone und bis zu 6 % Hyperforin (Viticello, 1999). Zuerst wurde angenommen, daß die Wirkung der Extrakte auf die Inhibierung von Monoaminoxidase (MAO) durch Hypericin zurückzuführen ist. Dies wurde jedoch durch einige Studien widerlegt (Nathan *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1996, 1997). Hyperforin wurde als wichtigster antidepressiv wirkender Bestandteil der Johanniskrautextrakte identifiziert (Müller *et al.*, 1998; Laakmann *et al.*, 1998). Dabei zeigte sich, daß die Extrakte die neuronale Aufnahme aller fünf Neurotransmitter Noradrenalin, Serotonin, Dopamin, GABA und L-Glutamat hemmen (Wurglics *et al.*, 2002). Dieses nichtselektive Inhibierungsprofil deutet darauf hin, daß Hyperforin einen anderen Wirkungsmechanismus als andere bekannte Antidepressiva haben muß. Dieser Effekt wird nicht durch eine direkte Bindung an Transportproteine der neuronalen Membran bewirkt, sondern offensichtlich durch eine Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration. Dadurch wird der Natriumgradient, der die treibende Kraft der Transportproteine darstellt, verringert (Singer *et al.*, 1999; Wonneman *et al.*, 2000). Damit läßt sich erklären, warum Hyperforin unterschiedliche Transportmechanismen hemmen kann. Außerdem erhöht Hyperforin die extrazelluläre Konzentration der Neurotransmitter und ihrer Metabolite im Gehirn bei Tierversuchen an Mäusen (Serdarevic *et al.*, 2001). Die Wirksamkeit der Extrakte in

herkömmlichen pharmakologischen Modellen korreliert stark mit dem Gehalt an Hyperforin (Kusnick, 2001; Chatterjee *et al.*, 1998; Zanolli *et al.*, 2002). Hyperforin führt zu einer adaptiven Veränderung von Rezeptorstrukturen (Beta-down-regulation) und bewirkt in Elektroenzephalogrammen von Ratte und Mensch Veränderungen, die mit anderen Antidepressiva vergleichbar sind. Hyperforin ist bei der Behandlung von leichten bis mittelschweren Depressionen mit der Wirkung anderer tricyclischer Antidepressiva vergleichbar. Erst vor kurzem zeigten Studien, daß Hyperforin Enzyme des Cytochrom P450 Enzymsystems aktiviert. Dadurch wird der Metabolismus anderer Wirkstoffe beeinflusst, da diese Enzyme die Detoxifizierung von lipophilen organischen Substanzen steuern. Bei gleichzeitiger Einnahme einiger Medikamente wird deren Konzentration im Blut und folglich ihre Wirksamkeit herabgesetzt. Bekannt sind Interaktionen mit Cyclosporin, oralen Kontrazeptiva, HIV-Protease-Inhibitoren, oralen Anti-Koagulantien vom Cumarin-Typ und oralen Antidiabetika (Di Carlo *et al.*, 2001; Vogel, 2001).

1.3. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein System für *in vitro* Enzymassays in *E. coli* und Chromoplasten aufzubauen, um die letzten Schritte der Biosynthese von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat zu klären. Dazu sollten radioaktiv-markierte Substrate verwendet werden.

Ferner sollte die Biosynthese von Hyperforin aus *Hypericum perforatum* durch Verfütterung von Stabilisotopen (¹³C-markierte Glukosen) und anschließender NMR-Analyse untersucht werden. In einem weiteren Einbauexperiment in *Spodoptera frugiperda* Zellen sollten Untersuchungen zur Biosynthese und Aufnahme von Aminosäuren in Insektenzellen gemacht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei kommerziellen Anbietern, in der Regel bei Fluka (CH), Sigma-Aldrich (D) oder Merck (D) erworben. Stabilisotopmarkierte Verbindungen stammten von Omicron (USA). Radioaktives Pyruvat wurde bei NEN (USA) gekauft.

Chromatographie-Materialien

Kieselgel 60 (70-230 mesh) stammte von Fluka Chemie (CH), DOWEX-Harze 50WX8 und 1X8 (200-400 mesh) von Serva (D). DC-Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten wurden von Merck (D) oder POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ von Macherey & Nagel (D), DC-Cellulose Avicel 1440 Platten von Schleicher und Schüll (D) bezogen.

Verwendete Kulturmedien

LB-Medium (Luria Bertani): Für einen Liter LB-Medium wurden 10 g Casein Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl verwendet.

TB-Medium (Terrific Broth): Für einen Liter TB-Medium wurden 12 g Casein Hydrolysat, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, 2.31 g Kaliumdihydrogenphosphat und 12.54 g Dikaliumhydrogenphosphat verwendet.

Die Bestandteile der Medien wurden in destilliertem Wasser gelöst. Die Medien wurden durch Autoklavieren (121 °C, 1.3 bar, 25 min) sterilisiert. Die benötigten Phosphate wurden getrennt autoklaviert und zum erkalteten Medium gegeben.

Verwendete Enzyme

Tabelle 1: Verwendete Enzyme

Enzym	EC-Nummer	Quelle
<i>Triosephosphatisomerase</i>	5.3.1.1	Kaninchenmuskel
<i>1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase</i> ¹	-	<i>B. subtilis</i> (Expression in <i>E. coli</i>)
<i>IPP-Isomerase</i> ¹	-	<i>E. coli</i>
<i>Alkalische Phosphatase</i>	3.1.3.1	Rindermagenschleimhaut

¹ Klontiert von Dr. F. Rohdich

Verwendete Klone

Tabelle 2: Verwendete Klone

Stamm	Exprimierte Proteine
XL1-pBsXylBispC-G ¹	XylB, IspC, IspD, IspE, IspF und GcpE aus <i>E. coli</i>
XL1-pMALlytB ¹	MBP-LytB aus <i>E. coli</i>
XL1-pACYCgcpElytB ¹	GcpE, LytB aus <i>E. coli</i>
XL1-pQEyfgB ¹	Yfgb aus <i>E. coli</i>
XL1-pACYCgcpE ¹	GcpE aus <i>E. coli</i>

¹ Klontiert von Dr. F. Rohdich

Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von Bradford mit Rinderserumalbumin als Standard. Das Meßprinzip beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung. 950 μ l Bradford Reagenz wird zu 50 μ l der Proteinlösung bzw. einer Proteinstandardlösung gegeben. Die Absorption wird bei 578 nm gemessen (Read und Northworth, 1981).

Herstellung der Szintillatorflüssigkeit

5.5 g Permablend® (Hewlett Packard) wurden in 180 ml 2-Phenylethylamin und 250 ml Methanol gelöst und anschließend mit Toluol auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.2. Geräte

2.2.1. Radioaktivitätsmessungen

Radioaktivitäten gelöster oder flüssiger Verbindungen wurden mit dem Flüssig-Szintillationszähler bF (betascint BF 5000, D) bestimmt.

Radioaktive Dünnschichtchromatogramme wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm 860, Molecular Dynamics, USA) ausgezählt. Das Radiogramm konnte danach mit dem Auswerteprogramm ImageQuant™ 1.0 bearbeitet werden.

2.2.2. NMR Spektroskopie

Die Proben wurden in 0.5 ml eines deuterierten Lösungsmittel gelöst (D₂O, MeOD, CDCl₃). ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden bei 17 °C mit einem Bruker Avance DRX 500 Spektrometer aufgenommen. Bei einer Magnetfeldstärke von 11.75 Tesla betrug die ¹H-NMR-Frequenz 500.13 MHz und die ¹³C-NMR-Frequenz 125.76 MHz.

Für alle eindimensionalen ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren sowie alle zweidimensionalen Experimente mit Detektion von Kohlenstoff wurde ein ¹³C/¹H-Dualprobenkopf verwendet. Für alle anderen zweidimensionalen Experimente wurde ein ¹H/¹³C/¹⁵N-Tripelresonanzprobenkopf benutzt. Eindimensionale Spektren wurden am rotierenden (20 Hz) Röhrchen, mehrdimensionale Spektren hingegen am stehenden Röhrchen gemessen.

Die Spektrenprozessierung und -auswertung erfolgte mit der Software von Bruker (1D bzw. 2D-WINNMR 5.0).

Bei den eindimensionalen Experimenten wurde der Datensatz mit einer Gauß-Lorentz-Funktion multipliziert (gb: 0.01-0.2, lb: -1 bis -2).

2.2.3. Ultraschallgerät

Der Aufschluß von Bakterien erfolgte mit Hilfe eines Ultraschallgerätes von Branson Sonifier (Branson SONIC Power, USA). Die Leistung wurde bei einer Kontrollstellung 4 auf 80 % eingestellt.

2.2.4. Gefriertrocknung

Gefriertrockner Alpha 1-4 von Christ (D) mit angeschlossener Chemie-Hybrid-Pumpe RC5 von Vacuubrand (D).

2.2.5. HPLC

Es wurde ein computergesteuertes HPLC-System von Knauer (D), bestehend aus der Pumpe K-1001 und dem UV-Detektor K-2600 benutzt. Weiterhin konnte das System mit dem Autosampler AS-100 (Biorad, D) und einem Radioaktivitätsdetektor β -RAM (β -RAM Flow-Through System Model 2, Biostep GmbH, D) verknüpft werden. Bei ^{14}C -markierten Proben wurde eine YtSi-Feststoffzelle (200 μl Zellvolumen), bei ^3H -markierten Proben eine Flüssigzumischzelle (400 μl Zellvolumen, Mischverhältnis Probe / Szintillatorflüssigkeit Ultima Gold M, Packard, USA 1 : 5) verwendet.

Alle Proben wurden vor dem Einspritzen durch Ultrazentrifugation (100 kD Nanosep, Pall Gelman, D) behandelt.

2.2.6. Gaschromatographie / EI-Massenspektrometrie

Die Proben wurden in den Gaschromatographen GC 17A mit angeschlossenen Electro-Impact-Massenspektrometer MS QP 5000 von Shimadzu (D) und ausgestattet mit einer DB 5-Säule (Länge 30 m, J + W Scientific, USA) bei einem Fluß des Trägergases Helium von 0.8 ml / min und einer Temperatur von 260 °C injiziert. Nach 3 min wurde die Säule von 90 °C mit einer Heizrate von 10 °C / min auf 280 °C erhitzt.

2.3. Methoden

2.3.1. Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität von Flüssigkeiten wurde bestimmt, indem die ^{14}C - oder ^3H -markierte Probe mit 15 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt wurde. Die Lösung wurde dann mit einem Szintillationszähler ausgezählt und die Radioaktivität berechnet (2.2×10^6 dpm entsprechen 1 μCi).

Die Einbauraten wurden nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Einbaurate (\%)} = \text{Gesamtradioaktivität (Produkt)} / \text{Gesamtradioaktivität (Vorstufe)}$$

2.3.2. Berechnung der ^{13}C -Anreicherungen

2.3.2.1. Relative ^{13}C -Anreicherung

Die relative ^{13}C -Anreicherung $\%^{13}\text{C}_{\text{rel}}$ aller ^{13}C -Atome wurde nach Gleichung 1 berechnet. Dazu wurden die Signalintegrale im ^{13}C -Spektrum der angereicherten Probe mit der gleichen Probe natürlichen ^{13}C -Gehalts ins Verhältnis gesetzt.

$$\%^{13}\text{C}_{\text{rel}} = [c_{I^*} / c_I] \times [1/f] \quad \text{Gleichung 1}$$

- c_{I^*} : Integralwert des ^{13}C -Signals der angereicherten Probe
- c_I : Integralwert des ^{13}C -Signals der Probe mit natürlichen ^{13}C -Gehalt
- f : Kalibrierungsfaktor f , kleinster Wert für c_{I^*}/c_I

2.3.2.2. Absolute ^{13}C -Anreicherung

Absolute ^{13}C -Anreicherungen einer angereicherten Probe wurden berechnet, indem die relativen ^{13}C -Anreicherungen eines isotopmarkierten Moleküls auf ein Kohlenstoffatom einer nachträglich chemisch eingeführten Gruppe mit natürlicher Häufigkeit von 1.1 % kalibriert wurde.

Ansonsten wurden die absoluten Anreicherungen durch Integration der ^{13}C -Satelliten im ^1H -NMR Spektrum einer Verbindung gemäß Gleichung 2 berechnet:

$$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}} = [H_{\text{Is}} / H_{\text{Is}} + H_{\text{Iz}}] \times 100 \quad \text{Gleichung 2}$$

- $\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$: absolute ^{13}C -Anreicherung in Prozent
 H_{Is} : Integral der beiden ^{13}C -Satelliten eines bestimmten Protonensignals im ^1H -Spektrum
 H_{Iz} : Integral des entsprechenden Zentralsignals im ^1H -Spektrum

2.3.2.3. Analyse der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplungen

Der prozentuale Anteil eines ^{13}C -Isotopomers am ^{13}C -Signal eines Kohlenstoffatoms wurde nach Gleichung 3 aus der Summe der Integrale der durch eine bestimmte Spezies verursachten ^{13}C -Satelliten in Relation zur Summe aller Isotopomere und dem Integral des Zentralsignals berechnet.

$$\% \text{ Isotopomer} = [c_{\text{Is}} / c_{\text{Is ges}} + c_{\text{Iz}}] \times 100 \% \quad \text{Gleichung 3}$$

- c_{Is} : Summe der Integralwerte der ^{13}C -Satelliten eines Isotopomers
 $c_{\text{Is ges}}$: Summe der Integralwerte der ^{13}C -Satelliten aller Isotopomere
 c_{Iz} : Integralwert des dazugehörigen ^{13}C -Zentralsignals

Durch Kombination aus Isotopomeranteil und der absoluten ^{13}C -Anreicherung an der zur Berechnung herangezogenen Position konnten die Molprozent ($\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) des entsprechenden Isotopomers berechnet werden (vgl. Gleichung 4)

$$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C} = [c_{\text{Is}} / c_{\text{Is ges}} + c_{\text{Iz}}] \times \%^{13}\text{C}_{\text{abs}} \quad \text{Gleichung 4}$$

2.3.3. HPLC-Analytik

2.3.3.1. Anionenaustauscher-HPLC

¹⁴C-markiertes 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat, hergestellt durch *in vivo* Einbau von ¹⁴C-Desoxyxylulose an *E. coli* pBsXylBIspC-G¹ (vgl. Kapitel 2.3.7.2), wurde durch folgende Bedingungen gereinigt:

Säule: Nucleosil 10 SB, Anionenaustauscher

Eluent A: bidestilliertes Wasser

Eluent B: 1 M Ammoniumformiat

Gradient:

<i>min</i>	<i>Eluent A (%)</i>	<i>Eluent B (%)</i>
0	90	10
35	75	25

Fluß: 2 ml/min

Retentionszeiten: 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat 22.5 min

2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat 12.5 min

2.3.3.2. Ionenpaarchromatographie

Zur Detektion der Intermediate des alternativen Terpenwegs erwies sich Umkehrphasen Ionenpaar-HPLC (McCaskill und Croteau, 1993; van Beck, 1999) am geeignetsten. Es wurden folgende Bedingungen gewählt:

Eluent A: 10 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat pH 6.0

Eluent B: 10 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 70 % Methanol pH 6.0

Gradient A:

Säule: Multospher 120 RP 18 AQ-5 (3 × 250 mm, CS-Chromatographie Service GmbH, D)

Gradient:

<i>min</i>	<i>Eluent A (%)</i>	<i>Eluent B (%)</i>
0	85	15
20	65	35
35	25	75
40	25	75
45	85	15
55	85	15

Fluß: 0.55 ml/min

Retentionszeiten: 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat 15.8 min
 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat 30.5 min
 Isopentenylidiphosphat / Dimethylallyldiphosphat 42.0 min

Gradient B:

Säule: Multospher 120 RP 18 AQ-5 (4.6 × 250 mm, CS-Chromatographie Service GmbH, D)

Gradient:

<i>min</i>	<i>Eluent A (%)</i>
0	100
25	100

Fluß: 0.75 ml/min

Retentionszeiten: DX 5.6 min
 DXP 20.1 min

Gradient C:

Säule: Multospher 120 RP 18 AQ-5 (4.6 × 250 mm, CS-Chromatographie Service GmbH, D)

Gradient:

<i>min</i>	<i>Eluent A (%)</i>	<i>Eluent B (%)</i>
0	100	0
20	100	0
80	40	60
85	100	0
100	100	0

Fluß: 1 ml/min

Retentionszeiten:

2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat	42 min
1-Hydroxy-2-methyl-2(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat	56 min
Isopentenylidiphosphat	77 min
Dimethylallyldiphosphat	78 min

2.3.4. DC-Analytik

Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung von organischen ¹⁴C-markierten Substanzen wurden Kieselgel-DC-Folien (POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄) verwendet. Dabei wurden folgende zwei Laufmittelsysteme verwendet:

Laufmittel A Hexan : Diethylether 6 : 4

Laufmittel B Hexan : Toluol 9 : 1

Für die Auftrennung ¹⁴C-markierter phosphorylierter wässriger Verbindungen wurden POLYGRAM® SIL N-HR/UV₂₅₄ Kieselgel-Folien) verwendet. In diesem Fall wurde folgendes Laufmittel verwendet:

Laufmittel C n-Propanol : Ethylacetat : Wasser 6 : 1 : 3

Die Dünnschichtchromatogramme wurden über Nacht auf einem Kodak Identifying Screen exponiert und mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm 860) ausgezählt.

Tabelle 3: R_F-Werte der untersuchten Verbindungen

Laufmittelsystem	Verbindung	R_F-Wert
A	Carotine	0.91
	Geranylgeraniol	0.43
B	β-Carotin	0.65
	Phytoen	0.60
	Phytofluen	0.55
C	2C-Methyl-D-erythritol- 2,4-cyclodiphosphat	0.41
	1-Hydroxy-2-methyl-2(E)- butenyl-4-diphosphat	0.54

2.3.5. Dialyse von Rohextrakten

2 ml Rohextrakt (vgl. Kapitel 2.3.10.1) wurden in einem Dialyseschlauch (10 x 0.6 cm, Biomol, D) in 1 l 50 mM Tris/HCl pH 7.4 oder Phosphatpuffer pH 7.0 unter Rühren 5 h bei 4 °C dialysiert. Danach wurde der Puffer gewechselt und die Dialyse über Nacht bei 4 °C fortgesetzt.

2.3.6. Chromoplastenpräparation aus *Capsicum annuum*

2.3.6.1. Isolierung der Rohchromoplasten

Chromoplasten wurden in Anlehnung an die Vorschrift von Camara (Camara 1985, Camara, 1993) isoliert. Die verwendeten Puffer und Geräte waren vorgekühlt, außerdem wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt.

Das Perikarp (ca. 650 g) wurde von Samen befreit und in kleine Stücke geschnitten. Danach wurden 750 ml 50 mM Hepes pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM EDTA und 0.4 M Saccharose zugegeben und 3 × 3 sec mit einem Haushaltsmixer zerkleinert. Die Suspension wurde danach durch ein 4-lagiges Nylongewebe (50 µm Maschenweite, Verseidag Techfab GmbH, D) abfiltriert und für 10 min bei 4500 rpm (GS3 Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml 50 mM Hepes pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM

EDTA und 0.4 M Saccharose aufgenommen. Durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm (GS3) wurden die Rohchromoplasten gewonnen. Vor der weiteren Verwendung wurde das Pellet nochmal mit Hilfe eines Pinsels in 5 ml Puffer (50 mM Hepes pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM EDTA und 0.4 M Saccharose) aufgenommen und durch ein einlagiges Nylonnetz (50 µm Maschenweite) filtriert.

Die so erhaltenen Rohchromoplasten wurden direkt nach der Isolierung oder bis zu einen Tag danach (Lagerung bei 4 °C) für Einbauversuche verwendet (vgl. 2.3.9.)

2.3.6.2. Isolierung der Stroma- und Membranfraktion

Zur Isolierung von Stroma- und Membranfraktion wurden die Rohchromoplasten in 50 mM Hepes pH 7.6 und 1 mM DTT aufgenommen und durch ein einlagiges Nylonnetz (50 µm Maschenweite) filtriert. Danach wurde mit dem gleichen Puffer 1 : 10 verdünnt und die Suspension 60 min bei 4 °C stehengelassen. Anschließend wurde eine Stunde bei 35000 rpm zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Beckman, Rotor Ti 70). Der Überstand (Stromafraktion) wurde abdekantiert und über eine 10 kD Makrosep (Pall Gelman, D) bis zu einer Konzentration 4 mg / ml aufkonzentriert. Das Pellet (Membranfraktion) wurde in 2 ml 50 mM Hepes pH 7.6 und 1 mM DTT suspendiert. Die Proteinkonzentration betrug typischerweise 5 mg/ml.

2.3.7. Herstellung von ¹⁴C-markierten Substraten

2.3.7.1. Herstellung von [2-¹⁴C]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

In ein mittels Septum verschlossenes Sicherheitsgefäß, in dem 250 µCi (18 µCi / µmol) Pyruvat enthalten waren, wurde mit einer Spritze eine Lösung bestehend aus 4.5 mg (21 µmol) Dihydroxyacetonphosphat Lithiumsalz, 1.3 mM Thiaminpyrophosphat, 150 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM MgCl₂ und 5 mM DTT, gegeben. Anschließend wurden 0.5 mg (1.5 U) 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (vgl. Tabelle 1) und 250 U Triosephosphatisomerase (vgl. Tabelle 1) zupipettiert. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für Einbauversuche an *E. coli* Stämme dephosphoryliert. Dazu wurde zusätzlich 2 mg alkalische Phosphatase zugegeben,

die Mg^{2+} -Konzentration auf 30 mM und die Tris-Konzentration auf 200 mM erhöht. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M NaOH auf pH 8 bis 9 eingestellt. Die Reaktion wurde mittels RP-18 Ionenpaarchromatographie untersucht (vgl. Kapitel 2.3.3., Gradient B).

2.3.7.2. *In vivo* Synthese von ^{14}C -markierten [2- ^{14}C]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat

Der *E. coli* Stamm XL1-pBsXylBispC-G (Hecht *et al.*, 2001b) wurde in 100 ml TB-Medium, das 18 mg Ampicillin enthielt, bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 5.0 bei 37 °C angezogen. Danach wurde 2 mM IPTG zugegeben und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Nun wurden 15 mg Cytidin (0.05 mmol) zugegeben. Nach 20 min wurde 5.5 μmol [2- ^{14}C]1-Desoxy-D-xylulose (18 $\mu\text{Ci } \mu\text{mol}^{-1}$; vgl. Kapitel 2.3.7.1) und 1.2 g Lithiumlactat (12.5 mmol) in 10 ml 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 zugegeben. Nach 80 min wurden die Zellen geerntet, 15 min bei 4 °C und 4800 rpm zentrifugiert und mit Saline gewaschen.

Die Zellen, die *in vivo* hergestelltes ^{14}C -markiertes 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-phosphat enthielten, wurden je nach Verwendungszweck in 2.4 ml 20 mM NaF oder in 2.4 ml 20 mM NaF und 2 mM DTT aufgenommen, auf Eis gekühlt und 3×7 sec mit einem Branson Sonifier 250 aufgeschlossen. Die Suspension wurde 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde im Überstand der Gehalt an Radioaktivität bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.1). Zur Kontrolle der Reaktion wurde ein Aliquot durch Ionenpaarchromatographie (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient C) analysiert. Die Ausbeute an [2- ^{14}C]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat betrug typischerweise 10 %.

Vor der Verwendung des Überstandes als Substrat für Enzymassays wurde die Lösung durch Ultrazentrifugation (10 kD Nanosep, Pall Gelman, D) von Proteinen befreit.

2.3.8. Radioaktive Enzymassays zur Bestimmung der IspG Aktivität

2.3.8.1. Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Rohextrakt aus M15 *E. coli* Wildtyp-Zellen

0.25 g M15 *E. coli* Wildtyp-Zellen wurden in 1 ml 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT suspendiert und mit 10 mg Lysozym 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt und 10 × 3 sec mit einem Branson Sonifier beschallt. Danach wurde eine Stunde bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 2 mM Co²⁺ und 0.5 mM S-Adenosylmethionin (SAM) bis zu 8 h bei 37 °C inkubiert. Die Mischung wurde anschließend 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Aliquots wurden durch RP 18 Ionenpaarchromatographie analysiert (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient A).

2.3.8.2. Enzymassay zur Bestimmung der IspG Aktivität mit Rohextrakt aus dem *E. coli* Stamm XL1-pACYCgcp

0.2 g Zellen aus dem *E. coli* Stamm XL1-pACYCgcp wurden in 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.4 und 1 mM DTT suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 × 7 sec mit einem Branson Sonifier beschallt. Die Suspension wurde 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der Assay wurde in 100 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM Co²⁺, 2 mM NADH, 1.0 mM DTT, 10 mM NaF, 20 μM (18 μCi mol⁻¹) [2-¹⁴C]2C-Methyl-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und 125 μl Rohextrakt (Proteinkonzentration in der Regel 10 mg / ml) in einem Gesamtvolumen von 150 μl durchgeführt. Die Mischung wurde 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl 30 % Trichloressigsäure unter Eiskühlung gestoppt. Um Dephosphorylierungen zu vermeiden, wurde mit 20 μl 1M NaOH neutralisiert. Die Mischung wurde anschließend 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Aliquots wurden durch RP 18 Ionenpaarchromatographie analysiert (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient A).

2.3.8.3. NMR-Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Rohextrakt aus M15 *E. coli* Wildtyp-Zellen

25 g M15 *E. coli* Wildtyp-Zellen wurden in 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT suspendiert und mit 100 mg Lysozym 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt und 10 × 3 sec mit einem Branson Sonifier beschallt. Danach wurde eine Stunde bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml Tris/HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT aufgenommen und mit 3.6 mg [U-¹³C₅]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (Schuhr *et al.*, 2001b), 2 mM Co²⁺ und 0.5 mM S-Adenosylmethionin (SAM) 8 h bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zentrifugation und Zugabe von Kationenaustauscher DOWEX WX8 (H⁺-Form) gestoppt. Danach wurde nochmals zentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 2.0 ml D₂O/MeOD gelöst und NMR-spektroskopisch vermessen.

2.3.9. Einbau von ¹⁴C-markierten Substraten in Chromoplasten

Die nach Kapitel 2.3.6 isolierten Chromoplasten (Rohchromoplasten, Stromafraktion bzw. Membranfraktion) wurden mit 100 mM Hepes pH 7.6, 2 mM Mn²⁺, 10 mM MgCl₂, 2 mM NADP⁺, 20 μM FAD, 1 mM NADPH, 5 mM NaF, 6 mM ATP und 220000 dpm ¹⁴C-markierten Isopentenylidiphosphat, 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat oder 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (spezifische Aktivitäten 15.8 μCi/μmol) bei 30°C inkubiert. Die Reaktionszeiten betragen 6-16 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 μl Methylenchlorid abgebrochen. Die Mischung wurde einige Minuten gemixt, zur Phasentrennung 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die organische Phase abpipettiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter einem N₂-Strom zur Trockene eingeeengt und in 100 μl Methylenchlorid gelöst. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Einbaurrate ausgezählt (vgl. Kapitel 2.3.1), der Rest wurde für die Dünnschichtchromatographie verwendet (vgl. Kapitel 2.3.4). Die wässrige Phase wurde durch RP 18 Ionenpaarchromatographie analysiert (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Methode C).

Als Kontrollversuch wurde der Assay entweder ohne Protein oder mit Chromoplasten durchgeführt, die vorher 15 min auf 100 °C erhitzt wurden.

2.3.10. Radioaktive Enzymassays zur Bestimmung der IspH Aktivität

2.3.10.1. Test auf IspG und IspH Aktivität mit Rohextrakt aus dem *E. coli* Stamm XL1-pACYClytbgcpe

0.2 g Zellen des *E. coli* Stamms XL1-pACYCgcpelytb wurden in 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.4 und 2 mM DTT suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 × 7 sec mit einem Branson Sonifier beschallt. Die Suspension wurde 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert .

Der Assay zur Detektion der IspH Aktivität wurde typischerweise in 100 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM Co²⁺, 2 mM NADH, 1.2 mM DTT, 20 mM NaF, 20 μM (18 μCi mol⁻¹) [2-¹⁴C]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat bzw. 20 μM (18 μCi mol⁻¹) [2-¹⁴C]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, 0.5 mM Pamidronat (Aredia®, Novartis) (Dunford *et al.*, 2001) und 125 μl Rohextrakt (Proteinkonzentration in der Regel 10 mg / ml) in einem Gesamtvolumen von 150 μl durchgeführt. Die Mischung wurde in der Regel 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl 30 % Trichloressigsäure unter Eiskühlung gestoppt und wie in Kapitel 2.3.8.2 beschrieben weiter behandelt.

2.3.10.2. Enzymassay zur Bestimmung der IspH Aktivität mit Rohextrakt aus dem *E. coli* Stamm XL1-pMALlytB

0.2 g Zellen des *E. coli* Stammes XL1-pMALlytB wurden in 1 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 × 7 sec mit einen Branson Sonifier beschallt. Die Suspension wurde 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der Assay wurde in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.0, 0.7 mM DTT, 20 μM FMN, 0.5 mM Co²⁺, 1 mM NADH, 20 mM NaF, 20 μM (18 μCi mol⁻¹) [2-¹⁴C]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat bzw. 7 μM (84 μCi mol⁻¹) [³H]1-Hydroxy-2-methyl-

2(*E*)-butenyl-4-diphosphat, 0.5 mM Pamidronat (Aredia®, Novartis) und 20 µl Rohextrakt (Proteinkonzentration in der Regel 10 mg / ml) in einem Gesamtvolumen von 150 µl durchgeführt. Die Mischung wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde wie in Kapitel 2.3.8.2 beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

2.3.11. NMR-Umsetzung zur Bestimmung der IspH Aktivität mit ¹³C-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat

0.5 g Zellen des *E. coli* Stammes XL1-pMALlytb und 3 µmol [U-¹³C₅], [1,3,4-¹³C₃] oder [2,2'-¹³C₂]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat, hergestellt durch *in vivo* Einbau von [U-¹³C₅]DX bzw. [3,4,5-¹³C₃]DX, [1,2-¹³C₂]DX an *E. coli* Zellen des Stammes XL1-pBsXylBispC-G (Hecht *et al.*, 2001a, 2001b), wurden in 5.63 ml 70 mM Phosphatpuffer pH 7.0, 0.8 mM DTT, 20 mM NaF, 0.5 mM Pamidronat (Aredia®, Novartis) suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 × 7 sec mit einen Branson Sonifier beschallt.

Danach wurde 65 µM FAD, 0.5 mM Co²⁺ und 1.3 mM NADH zugegen, wobei das Gesamtvolumen 6 ml betrug. Die Mischung wurde 60 min bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zentrifugation und Zugabe von Kationenaustauscher DOWEX WX8 (Na⁺-Form) gestoppt. Danach wurde nochmals zentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 0.6 ml D₂O/MeOD (3/7) gelöst und NMR-spektroskopisch vermessen.

2.3.12. Enzymassay mit ³H-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat und isolierten Chromoplasten aus *Capsicum annuum*

Die nach Kapitel 2.3.6 isolierten Chromoplasten (Rohchromoplasten, Stromafraktion bzw. Membranfraktion) wurden mit 100 mM Hepes pH 7.6, 20 µM FAD, 1 mM NADPH, 1 mM Co²⁺ bzw. Zn²⁺, 0.5 mM Pamidronat (Aredia®, Novartis), 1 mM DTT, 10 mM NaF, 7 µM (84 µCi mol⁻¹) [³H]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl Methylenchlorid abgebrochen. Die Mischung wurde einige Minuten gemixt, zur Phasentrennung 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase

abpipettiert. Proteine wurden durch Zugabe von 10 µl 30 % Trichloressigsäure unter Eiskühlung gefällt. Um Dephosphorylierungen zu vermeiden, wurde mit 20 µl 1M NaOH neutralisiert. Die Mischung wurde anschließend 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde durch RP 18 Ionenpaar-chromatographie analysiert (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient A).

Als Kontrollversuch wurde der Assay entweder ohne Protein oder mit Chromoplasten durchgeführt, die vorher 15 min auf 100 °C erhitzt wurden.

2.3.13. Quantifizierung von DMAPP und IPP

Um zu bestimmen, in welchem Verhältnis IPP und DMAPP bei den Enzymumsetzungen mit rekombinaten Rohextrakten aus *E. coli* (vgl. Kapitel 2.3.10.2) und isolierten Chromoplasten aus *C. annuum* (vgl. Kapitel 2.3.12) entstehen, wurde nach der Methode von Satterwhite (Satterwhite, 1985) verfahren.

Ein nach Kapitel 2.3.10.2 oder 2.3.12 durchgeführter Assay mit 100 % Umsatz (Kontrolle durch vorherige HPLC Analytik durch Ionenpaarchromatographie, vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient A) wurde mit 100 µl 25 % HCl in MeOH und 350 µl H₂O versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde mit NaCl gesättigt und zweimal mit je 0.5 ml Toluol extrahiert. Zur Phasentrennung wurde 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und ein Aliquot im Szintillationszähler analysiert. Auswertung: 25 % der eingesetzten Radioaktivität befand sich in der Toluolphase.

Als Kontrollen wurden folgende Experimente durchgeführt:

a) 90000 dpm ¹⁴C-IPP wurde mit 100 µl 25 % HCl in MeOH und 350 µl H₂O versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde wie oben beschrieben behandelt.

Auswertung: < 2 % der eingesetzten Radioaktivität befand sich in der Toluolphase.

b) 90000 dpm ¹⁴C-IPP wurde wie in Kapitel 2.3.14 beschrieben mit IPP-Isomerase inkubiert und danach wie in unter a) beschrieben weiter umgesetzt.

Auswertung: 15 % der eingesetzten Radioaktivität befand sich in der Toluolphase.

c) 90000 dpm 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat wurden wie oben beschreiben behandelt.

Auswertung: < 3 % der eingesetzten Radioaktivität befand sich in der Toluolphase.

d) 90000 dpm 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat wurden wie oben beschreiben behandelt

Auswertung: < 2 % der eingesetzten Radioaktivität befand sich in der Toluolphase.

2.3.14. Assay zur Bestimmung der IPP Isomerase Aktivität

90000 dpm ^{14}C -IPP ($58.7 \mu\text{Ci } \mu\text{mol}^{-1}$) wurde in 50 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM MgCl_2 und 30 μg IPP Isomerase (vgl. Tabelle 1) in einem Gesamtvolumen von 100 μl bei 37 °C für 20 min inkubiert.

2.3.15. Reinigung von IspH Protein im Batchverfahren

Das Amylose-Resin Säulenmaterial (BioLabs) (ca. 100 μl) wurde mit 0.5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8 und 100 mM NaCl aufgeschlämmt und danach bei 1000 rpm 1 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde der Rohextrakt des *E. coli* Stammes XL1-pMALlytB aufgetragen und das Material unter gelegentlichen Aufschlämmen 30 min auf Eis stehengelassen. Danach wurde der Überstand abpipettiert und das abgesetzte Säulenmaterial unterschiedlich oft mit je 1 ml 100 mM Tris/HCl pH 8 und 100 mM NaCl aufgeschlämmt und bei 1000 rpm 1 min zentrifugiert. Das mit IspH Protein beladene Säulenmaterial wurde anstelle von Rohextrakt wie in Kapitel 2.3.10.2 beschrieben eingesetzt.

2.3.16. Einbauversuche von $[1-^{13}\text{C}]$ bzw. $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose in *Hypericum perforatum*

30 Stengel von *Hypericum perforatum* mit einer Länge von ca. 20 cm wurden abgeschnitten und sofort in eine Lösung gesetzt, die 1 % (w/w) $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose (99 %

^{13}C Anreicherung) enthielt. Die Stengel wurden so ausgesucht, daß bereits einige Blütenknospen vorhanden waren. Die Stengel wurden zwei Wochen bei 20 °C im Dunkeln inkubiert, wobei mindestens einmal pro Tag mit einer Rasierklinge die Stengel abgeschnitten wurden. Dadurch wurde eine gute Wasseraufnahme gewährleistet.

Das gleiche Experiment wurde mit einer 0.05 %igen (w/w) [$U\text{-}^{13}\text{C}_6$] Glukoselösung (99 % Anreicherung, 0.95 % (w/w) unmarkierte Glukose) durchgeführt.

2.3.17. Isolierung von Hyperforin aus *Hypericum perforatum*

Alle Vorgänge wurden möglichst unter Stickstoffatmosphäre und in abgedunkelten Gefäßen durchgeführt. Das Pflanzenmaterial (ca. 25 g Feuchtgewicht) wurde mit flüssigen Stickstoff gemörsert, bis ein feines Pulver entstanden war. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Stickstoff nie völlig abgedampft war. Das Pulver wurde unter Rühren 15 min mit 150 ml n-Heptan unter einer Stickstoffatmosphäre extrahiert. Danach wurde das Gemisch abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wurde in 100 ml n-Heptan (gesättigt mit Methanol) aufgenommen. Die gelbe Lösung wurde dreimal mit 50 ml Methanol (gesättigt mit n-Heptan) ausgeschüttelt und die alkoholischen Fraktionen am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (20 × 1 cm) mit Kieselgel 60 aufgereinigt. Dabei wurde mit einer Mischung von Hexan : Ethylacetat 9 : 1 eluiert und Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F_{254}) analysiert. Die Platten wurden mit Hexan : Ethylacetat 9 : 1 entwickelt und mit Anisaldehyd : Schwefelsäure : Essigsäure 1 : 2 : 100 (v/v) besprüht. Hyperforin wurde als blauer Spot mit einem R_f -Wert von 0.42 identifiziert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und eingeeengt. Die Ausbeute an Hyperforin betrug 95.8 mg.

2.3.18. Darstellung von 2-Acetyl-Hyperforin

40 mg Hyperforin wurden in 1.2 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und unter Eiskühlung gerührt. Danach wurden 150 µl Triethylamin und 10 µl Acetylchlorid zugegeben. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Wasser

gestoppt. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Stickstoffstrom eingengt. Die Reaktionsmischung wurde auf eine Kieselgelsäule (10 × 1 cm) aufgetragen und mit Hexan : Ethylacetat 9 : 1 eluiert. Die Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F₂₅₄) analysiert und mit Anisaldehyd : Schwefelsäure : Essigsäure 1 : 2 : 100 (v/v) besprüht. 2-Acetyl-Hyperforin wurde als grüner Spot mit einem R_f-Wert von 0.61 detektiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Die Ausbeute an 2-Acetyl-Hyperforin betrug 38 mg (89 %).

2.3.19. Lipidextraktion

3.5 g Zelltrockenmasse einer *Spodoptera frugiperda* Zellkultur (SFII) wurden nach Bligh & Dyer (Bligh und Dyer, 1959) extrahiert. Dazu wurde das Zellmaterial 15 min mit 5.2 ml Wasser, 6.6 ml Chloroform und 13.2 ml Methanol extrahiert. Zur Phasentrennung wurde 9.4 ml Wasser und 8.0 ml Chloroform zugegeben. Anschließend wurde 15 min bei 4800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet (2.7 g), das sich zwischen der organischen und der wässrigen Phase befindet, wurde weiter verwendet (vgl. Kapitel 2.3.20).

2.3.20. Isolierung von Aminosäuren und Nukleotiden aus Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* SF21

Aminosäuren und Nukleotide aus *Spodoptera frugiperda* SF21 wurden nach etablierten Methoden (saure Hydrolyse, Ionenaustauschchromatographie, präparative HPLC) isoliert, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer eingegangen wird (Eisenreich *et al.*, 1991). Dazu wurde von 2.7 g Zellmaterial ausgegangen, das nach der Lipidextraktion (vgl. Kapitel 2.3.19) erhalten wurde.

2.3.21. Derivatisierung der Aminosäuren mit Trifluoressigsäureanhydrid und Butanol

Nach der Hydrolyse (vgl. Kapitel 2.3.20) der Proteine wurde ein Aliquot entnommen, lyophilisiert und in 200 μ l butanolischer HCl aufgenommen. Die Lösung wurde eine Stunde bei 100 °C erhitzt. Danach wurde überschüssiges Butanol im N₂-Strom abgeblasen. Der Rückstand wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 50 μ l Trifluoressigsäureanhydrid umgesetzt. Überschüssiges Reagenz wurde bei 80 °C abgedampft und der Rückstand in 500 μ l Essigsäureethylester aufgenommen. 1 μ l der Lösung wurden zur GC / MS-Analyse eingesetzt (vgl. Kapitel 2.2.6).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Biosynthese von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat das letzte bekannte Intermediat des alternativen Terpenbiosyntheseweges (vgl. Kapitel 1.1.2). Weder *in vitro* noch *in vivo* Bedingungen für die noch fehlenden Schritte auf dem Weg zu Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), den Endverbindungen des Desoxyxyluloseweges (McCaskill und Croteau, 1999), waren bekannt.

Wie in der Einleitung (vgl. Kapitel 1.1) beschrieben, muß es sich bei den nächsten Reaktionsschritten formal um eine Ringöffnung, zwei Dehydratisierungen und um zwei Reduktionen handeln. Sowohl durch chromosomale knock-out-Mutanten (Altincicek *et al.*, 2001a; Altincicek *et al.*, 2001b; Seemann, *et al.*, 2002; Cunningham *et al.*, 2000; Campos, *et al.*, 2001) als auch durch vergleichende Genomuntersuchungen (Rohdich *et al.*, 2001) war bekannt, daß die beiden Gene *gcpE* und *lytB* essentiell für die Biosynthese von IPP und DMAPP sind und für die letzten Reaktionsschritte benötigt werden.

Ausgehend von diesen Daten wurde nach Reaktionsbedingungen gesucht, um eine Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu erreichen.

3.1.1. *In vitro* Assay zur Bestimmung der IspG Aktivität

An unserem Lehrstuhl wurde eine enzymatische Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat entwickelt (Schuhr *et al.*, 2001b), die es ermöglichte, eine ¹⁴C-Markierung in das Molekül einzuführen. Durch die ¹⁴C-Markierung war eine sehr empfindliche und selektive Detektion der Intermediate mittels HPLC und angeschlossenen Radiodetektor möglich. In der Literatur (McCaskill und Croteau, 1993) war ein HPLC-Methoden mittels Ionenpaarchromatographie beschrieben, mit dessen Hilfe die Intermediate des Mevalonatweges bis zu IPP und DMAPP in einem HPLC-Lauf detektiert werden können. Diese HPLC-Methoden sollte als Grundlage zur

Detektion der Intermediate des Desoxyxyluloseweges dienen und entsprechend der Problemstellung verändert werden.

Mit Zellextrakten aus Wildtyp *E. coli* Zellen wurde versucht, 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat unter Zugabe verschiedener Cofaktoren umzusetzen. Es konnte gezeigt werden, daß unter Verwendung von zweiwertigen Cobaltionen und SAM eine neue Verbindung mit einer Retentionszeit von 56 min entsteht. Die Inkubationsdauer betrug in diesem Fall 5 h (vgl. Kapitel 2.3.8.1). Um zu untersuchen, ob es sich lediglich um ein Zersetzungsprodukt, was aufgrund der langen Inkubationsdauer möglich wäre, oder um eine tatsächliche enzymatische Umsetzung handelte, wurde zum einen der Rohextrakt durch Puffer ersetzt und zum anderen der Rohextrakt vor der Inkubation auf 100 °C erhitzt. In keinem der Fälle entstand dieser neue HPLC-Peak. Damit sollte es sich tatsächlich um ein enzymatisches Reaktionsprodukt handeln.

Aufgrund der höheren Retentionszeit des neu entstandenen radioaktiven HPLC-Peaks, die sich um 14 min von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat unterscheidet, konnte es sich nicht um ein Dephosphorylierungsprodukt handeln (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient C). 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat ist außerdem stabil gegenüber Phosphataseeinwirkung.

Um die Struktur der neuen Verbindung mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen, wurde ein up-scale des Enzymassays benötigt, der eine Umsetzung von ^{13}C -markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat erlaubte. ^{13}C -markierte Substanzen haben den Vorteil, daß bei der NMR-Spektroskopie die Empfindlichkeit gegenüber Verbindungen mit natürlicher ^{13}C -Anreicherung (1.1 %) beträchtlich erhöht ist. Dadurch können ungereinigte Reaktionsmischungen spektroskopiert werden. Zusätzlich treten bei mehrfach markierten Verbindungen im ^{13}C -NMR Spektrum $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Kopplungen auf, die charakteristisch für mehrfach markierte Moleküle sind.

Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung durch Behandlung mit einem schwachen Kationentauscher von Metallionen befreit, die bei der NMR-Messung zu einer Linienverbreiterung führen würden, und lyophilisiert (vgl. Kapitel 2.3.11). Bei der NMR-Messung konnten kaum ^{13}C -Signale von markierten Verbindungen detektiert werden, obwohl die eingesetzte Substratmenge ausreichend war. Daraus

konnte geschlossen werden, daß sich das entstandene Reaktionsprodukt bei der Aufarbeitung zersetzte.

3.1.1.1. Assays zur Bestimmung der IspG Aktivität mit isolierten Chromoplasten aus *Capsicum annuum*

Da die Biosynthese vieler terpenoider Sekundärstoffe in den Plastiden von Pflanzen abläuft, erschien es sinnvoll, die geplanten enzymatischen Untersuchungen nicht nur in *E. coli*, sondern auch an isolierten Plastiden wie Chloroplasten, Chromoplasten oder Etioplasten durchzuführen, weil der Desoxyxyluloseweg in diesen Zellkompartimenten abläuft. Der Vorteil von Chromoplasten liegt darin, daß in diesen Organellen eine gesteigerte Carotinsynthese stattfindet. Chromoplasten sind normalerweise sehr labile Organelle. Bei den Chromoplasten aus dem Perikarp von *Capsicum annuum* oder aus den Blüten von *Narcissus pseudonarcissus* handelt es sich jedoch um Ausnahmen. Die Systeme sind in der Literatur gut untersucht, da zahlreiche Enzyme der Carotinbiosynthese aus Chromoplasten bereits gereinigt wurden und radioaktiv-markierte Intermediate wie DXP und IPP in Carotine eingebaut werden konnten (Beyer *et al.*, 1980; Camara *et al.*, 1983; Fellermeier *et al.*, 1999).

Analog zu obigen Einbauexperimenten wurde deshalb ¹⁴C-markiertes 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Chromoplasten umgesetzt. Nach Extraktion der lipophilen Substanzen wurde die wässrige Phase auf Intermediate des alternativen Terpenbiosyntheseweges durch HPLC untersucht. Zusätzlich wurde die Einbaurrate der applizierten Vorstufen in die lipophilen Verbindungen bestimmt.

In Anlehnung an die Arbeit von Fellermeier (Fellermeier *et al.*, 2001) wurde ¹⁴C-markiertes IPP mit einer Reaktionsmischung bestehend aus 100 mM Hepespuffer pH 7.6, 2 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 2 mM NADP, 20 μM FAD, 1 mM NADPH, 5 mM NaF, 6 mM ATP und isolierten Chromoplasten (vgl. Kapitel 2.3.9, 2.3.6.1) umgesetzt. Die Reaktion wurden nach 16 h durch Zugabe von CH₂Cl₂ gestoppt und die lipophilen Substanzen extrahiert.

Danach wurde die Radioaktivität der Carotin haltigen Fraktion bestimmt. Es zeigte sich, daß 61.1 % der eingesetzten Radioaktivität in dieser Fraktion vorhanden war. Ausgehend von diesem Ergebnis wurden weitere Vorstufen des Desoxy-

xyluloseweges, die radioaktiv an unserem Lehrstuhl vorlagen (Rohdich *et al.*, 2000), getestet. Das Ergebnis der relativen Radioaktivität der entsprechenden Methylenchloridextrakte sind in Tabelle 4 dargestellt. Bei Verwendung der späteren Intermediate waren die relativen Radioaktivitäten im Methylenchloridextrakt höher. So stieg der Einbau von DXP über IPP von 15.3 % auf 61.1 %. Dieses Ergebnis wäre damit zu erklären, daß IPP von Prenyltransferasen in höhere Terpene eingebaut wird, wohingegen auf dem Weg zu IPP noch einige Enzymschritte liegen, die limitierend sein können.

Tabelle 4: Einbau radioaktiver Vorstufen des alternativen Terpenbiosyntheseweges in den Methylenchloridextrakt von isolierten Chromoplasten aus *Capsicum annuum*

Substrat	Relative Radioaktivität (%)
1-Desoxy- <i>D</i> -xylulose-5-phosphat (DXP)	15.3
2 <i>C</i> -Methyl- <i>D</i> -erythrithol-4-phosphat	15.6
4-Diphosphocytidyl-2 <i>C</i> -methyl- <i>D</i> -erythritol	23.8
4-Diphosphocytidyl-2 <i>C</i> -methyl- <i>D</i> -erythritol-2-phosphat	30.4
2 <i>C</i> -Methyl- <i>D</i> -erythritol-2,4-cyclodiphosphat	35.1
Isopentenylidiphosphat (IPP)	61.1

Die organische Phase wurde außerdem durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Dazu wurde ein Laufmittelsystem (Laufmittelsystem B, vgl. Kapitel 2.3.4) verwendet, das relativ unpolar ist. Hierbei haben nur die Carotinoide wie β -Carotin, Phytoen usw. einen großen R_f -Wert ($R_f = 0.65$), wohingegen niedrigere Terpene wie Geranylgeraniol auf der Startlinie liegen bleiben (vgl. Tabelle 3, Kapitel 2.3.4, Abbildung 8). Durch Vergleich mit Referenzmaterial wurde gezeigt, daß radioaktiv-markierte Carotine gebildet werden.

In Abbildung 8 ist das entwickelte Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel Hexan : Toluol 9 : 1) der Methylenchloridextrakte der Umsetzungen von 1-Desoxy-*D*-xylulose-5-phosphat (C), 2*C*-Methyl-*D*-erythrithol-4-phosphat (D), 4-Diphosphocytidyl-2*C*-methyl-*D*-erythritol (E), 4-Diphosphocytidyl-2*C*-methyl-*D*-erythritol-2-phosphat (F) bzw. 2*C*-Methyl-*D*-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (G) mit Chromoplasten

aus *C. annuum* dargestellt. Wie man erkennen kann, nimmt auch hier die Intensität der radioaktiven Spots, die markierten Carotinoiden entsprechen, von DXP (C) über 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (G) zu (vgl. Tabelle 4). In Spur A und B sind die entsprechenden Kontrollversuche mit DXP (A) und 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (B) ohne Chromoplasten zu sehen. Erwartungsgemäß sind in diesem Fall keine markierten Carotinoide entstanden. Wurde ein polares Laufmittel verwendet (Laufmittelsystem A), werden die Carotine nicht aufgetrennt, sondern laufen zusammen und können damit beispielsweise von Geranylgeraniol unterschieden werden (vgl. Kapitel 2.3.4). Die Dünnschichtchromatogramme wurden mittels eines Phosphoimager ausgewertet (vgl. Kapitel 2.3.4).

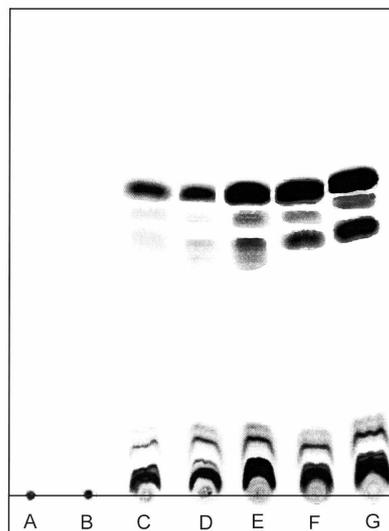


Abbildung 8: Phosphoimagerabbildung von Enzymansätzen mit ^{14}C -markierten Substraten und Chromoplasten aus *C. annuum* nach Extraktion mit Methylenchlorid und Entwicklung der Chromatogramme mit Hexan : Toluol 9 : 1

Über die Höhe des Einbaus der ^{14}C -markierten Vorstufen in die organische Phase war eine Abschätzung möglich, wie lange die Inkubationsdauer gewählt werden mußte, damit die frühen Enzymschritte, die vor IPP liegen, beobachtet werden können.

Wurden die Reaktionszeiten im Assay mit ^{14}C -markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat als Substrat auf 6 h reduziert, so wurde bei der Analyse der wässrigen Phase durch HPLC (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient C) ein neuer Peak bei

56 min beobachtet, der die gleiche Retentionszeit wie das Reaktionsprodukt der Umsetzung mit Zellextrakten aus *E. coli* hatte (vgl. Abbildung 9).

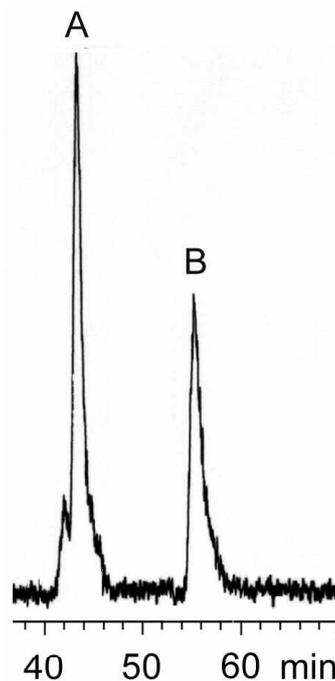


Abbildung 9: Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von ^{14}C -markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (A) mit Chromoplasten aus *C. annuum* zu einer neuen Verbindung (B) mit einer Retentionszeit von 56 min.

Ebenso wurde die wässrige Phase durch Dünnschichtchromatographie ausgewertet. Dazu wurde das Laufmittelsystem n-Propanol : EtOAc : H_2O 6 : 1 : 3 verwendet (vgl. Kapitel 2.3.4). Der R_f -Wert von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat betrug 0.41. Zusätzlich wurde eine neue Verbindung mit einem R_f -Wert von 0.54 detektiert.

Im weiteren Verlauf wurde nun versucht, ob man auf einzelne Cofaktoren verzichten kann. Die Ergebnisse waren jedoch nicht eindeutig, da je nach Chromoplastenisolierung die Umsatzrate zu dieser neuen Verbindung variierte. Als Problem erwies sich ferner, daß die isolierten Chromoplasten sehr schnell ihre Aktivität verloren und deshalb immer noch am gleichen Tag verarbeitet werden mußten.

Um weitere Informationen über die Reaktion zu erhalten, wurden die intakten Chromoplasten durch plötzliche Veränderung des osmotischen Drucks lysiert. Nach

Zentrifugation in der Ultrazentrifuge erhielt man im Überstand die sogenannte Stromafraktion, während sich im Pellet die sogenannte Membranfraktion befand (vgl. Kapitel 2.3.6.2). Wurden nun die entsprechenden Versuche mit diesen beiden Fraktionen durchgeführt, so zeigte sich, daß ausgehend von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat die enzymatischen Schritte bis 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in der Stromafraktion verfolgbar waren (vgl. Tabelle 5). Bei der Umsetzung der letztgenannten Verbindung hingegen war kein neuer Peak erkennbar. Führt man die Reaktion mit der Membranfraktion durch, so trat der Peak bei 56 min wieder auf. Zur Kontrolle wurden die beiden Fraktionen wieder vereinigt. Die Umsatzrate war in diesem Fall mit der oben besprochenen Umsetzungen vergleichbar. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß der nächste Schritt von einem membranständigen Protein katalysiert wird.

Tabelle 5: Vorkommen der Enzymaktivitäten IspC-G in Chromoplasten aus *C. annuum*.

Enzymschritt	Überstand der Chromoplasten	Pelletfraktion der Chromoplasten
IspC	+	-
IspD	+	-
IspE	+	-
IspF	+	-
IspG	-	+

3.1.1.2. Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Rohextrakt aus rekombinanten *E. coli* Zellen

In der Zwischenzeit wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. F. Rohdich rekombinante *E. coli* Stämme hergestellt, die die Proteine GcpE und LytB überexprimiert hatten. Wenn diese Proteine Reaktionen stromabwärts von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat katalysieren (vgl. Kapitel 3.1.1), dann müßte man unter Verwendung von ¹⁴C-markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat eine Umsetzung zu einem neuen Intermediat des alternativen Terpenbiosyntheseweges feststellen können, die schneller sein sollte, als die Umsetzung mit *E. coli* Wildtyp.

Zuerst wurde mit Rohextrakten des *E. coli* Stammes XL1-pACYCgcpE, der das Gen *gcpE* auf den low-expression Vektor pACYC 184 (Chang und Cohen, 1978) enthält, begonnen (vgl. Tabelle 2).

Durch Ionenpaarchromatographie konnte bei Verwendung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (42 min) und des oben beschriebenen Rohextraktes sowie 1.5 mM NADH und 1 mM Co^{2+} ein zusätzliches Signal bei 56 min beobachtet werden (vgl. Kapitel 2.3.8.2, 2.3.3.2, Gradient C). Der neue Peak hatte die gleiche Retentionszeit wie derjenige der Wildtyp- und Chromoplastenumsetzung. Die Reaktion war aber mit einer spezifischen Aktivität von $12.5 \text{ pmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ um den Faktor 30 schneller als die Reaktion mit Rohextrakt aus *E. coli* Wildtyp.

Für die Reaktion wurden Metallionen benötigt, da die Aktivität auf $5.78 \text{ pmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ abnahm, wenn Co^{2+} weggelassen wurde. Außerdem geht die Aktivität durch Zusatz von EDTA verloren. Mn^{2+} hatte für die Reaktion keinen wesentlichen Einfluß, während durch Zugabe von Zn^{2+} die Aktivität noch weiter erniedrigt wurde. Wurde nur 1 mM Co^{2+} und kein NADH zugegeben, so lief die Reaktion etwas verlangsamt ab. Die besten Umsätze wurden jedoch eindeutig bei gleichzeitiger Zugabe von NADH und Co^{2+} erzielt (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Cofaktorenabhängigkeit der vom IspG Protein katalysierten Reaktion

Cofaktoren					Relative
1 mM Co^{2+}	1.5 mM NADH	1 mM Mn^{2+}	1 mM Zn^{2+}	1 mM EDTA	Aktivität (%)
+	+	-	-	-	100
-	+	+	-	-	47.4
+	-	-	-	-	78.1
+	+	-	-	+	< 5
-	+	-	-	-	46.2
-	+	-	+	-	34.7

Zeitgleich wurden an unserem Lehrstuhl durch *in vivo* Einbauversuche mit ^{13}C -markierter 1-Desoxy-D-xylulose an einem *E. coli* Stamm, der die Proteine XylB, IspC, IspD, IspE, IspF und IspG überexprimierte, die Struktur des nächsten Intermediates nach 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat geklärt (Hecht *et al.*, 2001b). Die Struktur der neu entstandenen Verbindung, die durch das GcpE Protein katalysiert

wird, wurde NMR-spektroskopisch geklärt. Es handelt sich dabei um 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Die Struktur dieser Verbindung wurde von der Arbeitsgruppe Jomaa durch immunologische Assays bestätigt (Hintz *et al.*, 2001). Das IspG Protein katalysiert damit die reduktive Ringöffnung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und die Bildung einer Doppelbindung zwischen Kohlenstoff 2 und 3 (vgl. Abbildung 10).

Wenig später publizierte die Arbeitsgruppe von Rohmer (Seemann *et al.*, 2002), daß mit zellfreien Rohextrakten eines *E. coli* Stammes, der die Proteine YfgA, YfgB und GcpE überexprimierte, 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat umgesetzt wurde. Die Inkubationsdauer lag mit 7 bis 20 h sehr hoch. Das Reaktionsprodukt der IspG-Reaktion konnte in dem verwendeten System nicht direkt gefaßt werden. Anhand der dephosphorylierten Verbindung 2-Methyl-2(*E*)-butenyl-1,4-diol wurde jedoch auf 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat als eigentliches Enzymprodukt zurückgeschlossen.

Um den Einfluß des YfgB Proteins auf die IspG-Reaktion zu überprüfen, wurde an unserem Lehrstuhl ein *E. coli* Stamm erzeugt, der dieses Protein überexprimierte (vgl. Tabelle 2). Der Rohextrakt des *E. coli* Stammes XL1-pQEyfgB wurde mit dem Rohextrakt des *E. coli* Stammes XL1-pACYCgcpE vereinigt. Vor Zugabe des Substrats wurden die Rohextrakte fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Es konnte jedoch keine Erhöhung der Aktivität beobachtet werden.

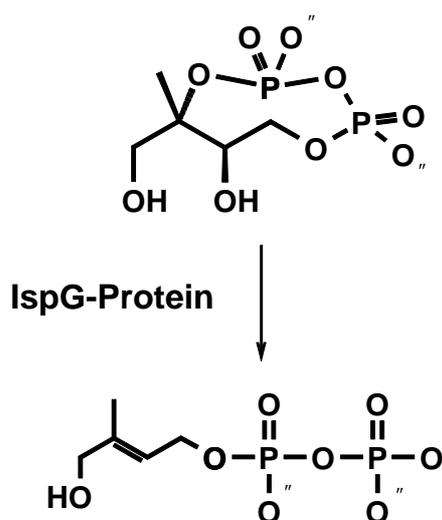


Abbildung 10: Die vom IspG Protein katalysierte Reaktion

Durch die Enzymassays konnte nicht eindeutig bewiesen werden, daß es sich bei dem HPLC-Peak um 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat handelt. Ein NMR-Versuch, der Aussagen über die Struktur der Verbindung hätte treffen können, war nicht möglich, da eine Zersetzung der Verbindung während des Aufkonzentrierens auftrat (vgl. Kapitel 3.1.1). Es spricht jedoch viel dafür, daß die durch die *in vivo* Umsetzung gefundene Verbindung mit der aus den *in vitro* Assays übereinstimmt. Ein Beweis konnte erst später gebracht werden, als die Synthese von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat bekannt war (vgl. Kapitel 3.1.2.1).

3.1.2. In vitro Assay zur Bestimmung der IspH Aktivität

Wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben, katalysiert das IspG Protein die Reaktion von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Da bekannt war, daß bei der Biosynthese von IPP sowohl IspH als auch IspG Protein benötigt werden (Altincicek *et al.*, 2001a; Altincicek *et al.*, 2001b; Seemann *et al.*, 2002), mußte somit das IspH Protein in den letzten Enzymschritt des Desoxyxyluloseweges involviert sein.

3.1.2.1. Biotechnologische Produktion von [2-¹⁴C₁]-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat

Wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben wird 1-Desoxy-D-xylulose von *E. coli* Stämmen, die neben der D-Xylulokinase die Proteine IspC-G überexprimieren, zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat umgesetzt.

Durch Verwendung dieses Stammes sollte es möglich sein, ¹⁴C-markiertes 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat *in vivo* herzustellen und zu isolieren. Aus ¹⁴C-markiertem DXP kann nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase ¹⁴C-markiertes DX erhalten werden (vgl. Kapitel 2.3.7.1). DXP kann ausgehend von käuflichen ¹⁴C-markiertem Pyruvat und unmarkiertem Glycerinaldehyd-3-phosphat enzymatisch hergestellt werden (Hecht *et al.*, 2001a, vgl. Kapitel 2.3.7.2).

In das Medium, das die *E. coli* Zellen enthielt, wurde eine Stunde nach Induktion eine Lösung aus 1.2 mmol Lactat und 100 mM Tris/HCl pH 7.4 zugegeben. Weitere 15 min später wurde das ¹⁴C-markierte DX zugegeben. Nach 80 min wurden die

Zellen geerntet, gewaschen und in 20 mM NaF aufgeschlossen, um Dephosphorylierungen zu vermeiden. Der Überstand wurde mittels Ultrafiltration von Proteinen befreit und durch Ionenpaar-HPLC analysiert (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient A). Dabei zeigte sich, daß in der Regel neben 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat noch zu 30 % 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat vorhanden war. Andere Intermediate des alternativen Terpenbiosyntheseweges waren nicht detektierbar. Da 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat aber vom IspH Protein nicht umgesetzt wird, sollte diese Verbindung für die geplanten Enzymassays mit rekombinanten Proteinen nicht stören.

Eine Inkubationsdauer von 80 min erwies sich am besten, weil bei kürzerer Versuchsdauer in *E. coli* zu wenig ¹⁴C-markiertes DX aufgenommen und dadurch nur wenig 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat gebildet wurde. Bei längeren Inkubationszeiten wurde jedoch 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat durch die Aktivität der im Hintergrund wirkenden Wildtyp-Enzyme zu höheren Terpenen umgesetzt, welche dann in der organischen Phase nachweisbar waren. Aufgrund dieser Schwierigkeiten konnten nur Ausbeuten von ca. 10 % erreicht werden.

Weiterhin wurde versucht, das proteinfreie Rohprodukt durch HPLC-Chromatographie zu reinigen, um 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat voneinander zu trennen, sowie die im Rohextrakt befindlichen niedermolekularen Verbindungen zu entfernen. Dies konnte durch Verwendung einer Anionentauschersäule und Elution mit Ammoniumformiat erreicht werden (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Bei der anschließenden Konzentration durch Gefriertrocknung ging ein Großteil der gereinigten Verbindung verloren. Dieses Phänomen wurde auch schon bei der NMR-Umsetzung von 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit *E. coli* Wildtyp (vgl. Kapitel 3.1.1) beobachtet. Da die Endausbeute deshalb zu gering war, wurde für die Enzymassays das ungereinigte 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat eingesetzt.

Es zeigte sich, daß ¹⁴C-markiertes 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat die gleiche Retentionszeit hat, wie der Peak, der durch die *in vitro* Umsetzungen ausgehend von 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Chromoplasten bzw. *E. coli* Rohextrakten gefunden wurde (vgl. Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2). Somit konnte durch die *in vitro* Assays die enzymatische Umsetzung von 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat beobachtet werden.

3.1.2.2. *In vitro* Assay zur Bestimmung der IspH Aktivität mit Rohextrakt aus dem *E. coli* Stamm XL1-pMALlytB

Zur Bestimmung der IspH Aktivität wurden Rohextrakte des *E. coli* Stammes XL1-pMALlytB eingesetzt (vgl. Tabelle 2). Das *ispH* Gen von *E. coli* wurde mit dem 3' Ende des *malE* Gens aus *E. coli* fusioniert. Mit dem resultierenden Plasmid pMALlytB wurden *E. coli* Zellen XL1-Blue transformiert. Dieses rekombinante Protein hat den Vorteil, daß es durch die Fusion mit dem Maltosebindeprotein (MalE) löslicher ist als das Wild-Typ Protein. Außerdem war so eine Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie über eine Amylose-Säule möglich.

Bei der Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu Isopentenylidiphosphat bzw. Dimethylallyldiphosphat handelt es sich formal um eine Reduktion eines allylischen Alkohols. Deshalb sollte ein Reduktionsmittel wie NADH oder NADPH an der Reaktion beteiligt sein. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit zweiwertigen Metallionen und NADH als Reduktionsmittel inkubiert. Durch HPLC-Chromatographie konnte ein Umsatz von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat (28.5 min) zu einer neuen Verbindung mit einer Retentionszeit von 42.0 min festgestellt werden (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Methode A). Durch Co-Chromatographie wurde gezeigt, daß es sich hierbei um ¹⁴C-markiertes IPP handelte. Dies konnte später außerdem durch NMR-Daten belegt werden (vgl. Kapitel 3.1.3.2).

Die Reaktion war jedoch mit einer spezifischen Aktivität von 0.8 nmol min⁻¹mg⁻¹ sehr langsam. Deshalb wurde nach weiteren Cofaktoren gesucht. Dabei wurde u.a. S-Adenosylmethionin, Adenosintriphosphat (ATP), Thioredoxin und Flavine getestet. Die Aktivität der Reaktion konnte nur durch Zugabe von 20 μM FMN oder FAD um den Faktor fünf auf 4.8 nmol min⁻¹mg⁻¹ gesteigert werden. Alle anderen getesteten Cofaktoren hatten keinen Einfluß auf die untersuchte Reaktion.

3.1.2.3. *In vitro* Assay zur Bestimmung der IspG und IspH Aktivität mit Rohextrakt des *E. coli* Stammes XL1-pACYClytBgcpE

Die gemessenen Aktivitäten von 4.8 nmol min⁻¹mg⁻¹ bzw. 0.012 pmol min⁻¹mg⁻¹ für die vom IspH und IspG Protein katalysierten Reaktionen waren sehr niedrig. Da eine

breite Variation der Cofaktoren keine Steigerung der Aktivitäten bewirkte, wurde überlegt, ob die beiden Proteine nur im Komplex miteinander aktiv sind. Deshalb wurde ein *E. coli* Stamm verwendet, der beide Proteine exprimiert.

Im Assay mit rekombinanten Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pACYClytBgcpE konnte eine Reaktion ausgehend von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu IPP beobachtet werden (vgl. Kapitel 2.3.10.1, 3.1.2.2). 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat konnte unter optimierten Bedingungen nur bei Reaktionszeiten kleiner fünf Minuten beobachtet werden (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient C). Daraus läßt sich schließen, daß 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat durch das IspG Protein zu einer Verbindung umgesetzt wird, die im nächsten Schritt sofort vom IspH Protein weiter zu IPP umgesetzt wird.

Als Cofaktoren wurden 1 mM Co^{2+} und 1.5 mM NADH eingesetzt. Zusätzliche Zugabe von FMN oder FAD konnte die Gesamtaktivität der an den beiden Reaktionsschritten beteiligten Enzyme nicht erhöhen. Für die Aktivität des IspG Proteins scheint somit kein FAD nötig zu sein. Gebildetes 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat wurde sofort weiter zu IPP umgesetzt. Damit wäre die vom IspG Protein katalysierte Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktionsfolge.

Desweiteren wurden verschiedene Metallionen im Enzymassay getestet. Die HPLC-Chromatogramme (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient C) in Abbildung 11 zeigen, daß die Reaktion am besten durch Zugabe von 1 mM Co^{2+} und 2 mM NADH verläuft (untere Spur). Ersetzt man Co^{2+} beispielsweise durch Mn^{2+} , so verläuft sowohl die Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (A) zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat (B) als auch zu IPP (C) wesentlich schlechter (vgl. obere Spur).

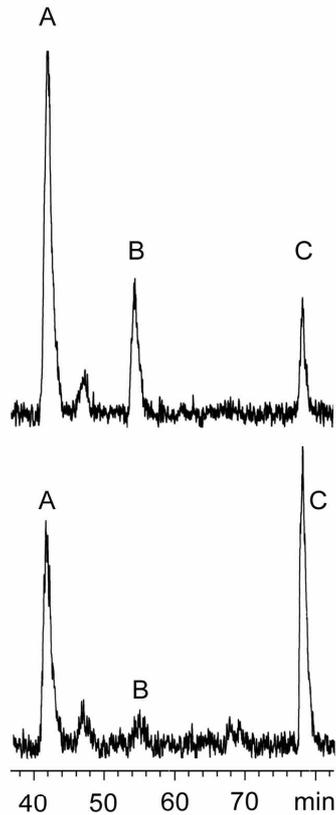


Abbildung 11: Umsetzung von ^{14}C -markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (A, 42.0 min) zu IPP / DMAPP (C, 78 min) mit Rohextrakt aus Zellen des *E. coli* Stammes XL1-pACYCgcpElytB. Untere Spur: durch Zugabe von 1 mM Co^{2+} und 2 mM NADH. Obere Spur: durch Zugabe von 1 mM Mn^{2+} und 2 mM NADH.

Wie im Fall der Umsetzungen von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Rohextrakten aus *E. coli* XL1-pACYCgcpE Zellen (vgl. Kapitel 3.1.1.2) ging auch hier die katalytische Aktivität durch Dialyse verloren. Möglicherweise wird für die IspG-Reaktion ein weiterer niedermolekularer Cofaktor benötigt, der bei der Dialyse verdünnt wird. Alternativ ist es denkbar, daß das IspG Protein leicht denaturiert wird.

Die spezifischen Aktivitäten lagen mit $11.3 \text{ pmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ nicht wesentlich höher als bei den rekombinanten Rohextrakten, bei denen jeweils nur ein Gen überexprimiert war. Damit ist es eher unwahrscheinlich, daß beide Proteine an beiden Reaktionen beteiligt sind.

3.1.2.4. Einfluß von Pamidronat auf die IspH-Reaktion

Bei den ersten Versuchen zur Bestimmung der IspH-Aktivität mit Rohextrakten aus Zellen von *E. coli* XL1-pMALlytB und XL1-pACYCgcpElytB war auffällig, daß die Summe der Integrale von Substrat- und Produktpeak nicht der Gesamtradioaktivität der eingesetzten Substratmenge entsprach, sondern geringer war. Dies deutete darauf hin, daß unter den gegebenen Bedingungen die Reaktion nicht auf der nächsten Biosynthesestufe, also IPP bzw. DMAPP, stehen blieb, sondern die entstandenen Produkte weiter in höhere Terpene und somit in die organische Phase eingebaut wurden.

In der Literatur war bekannt, daß stickstoffhaltige Bisphosphonate wie Pamidronat, Olpadronat oder Alendronat (vgl. Abbildung 12) als Pharmazeutika bei Osteoporose, Paget's Krankheit oder Knochenkrebs eingesetzt werden. Sie hemmen die Farnesyldiphosphat Synthase (vgl. Abbildung 3) und verhindern somit die Prenylierung von Proteinen (Dunford *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 1999).

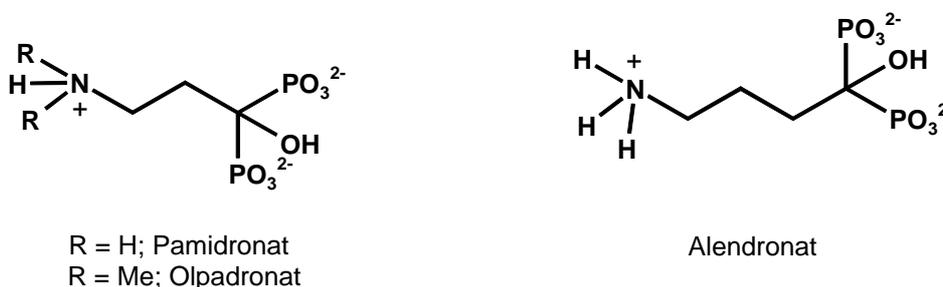


Abbildung 12: Strukturformeln der N-haltigen Bisphosphonate Pamidronat, Olpadronat und Alendronat

Auf Grund dieser Tatsache sollte es bei Verwendung dieser Verbindungen zu einem Anstau der Intermediate kommen, die vor Farnesyldiphosphat liegen. Pamidronat ist als Hauptbestandteil von Aredia® (Novartis) käuflich. Wurde 0.5 mM Pamidronat zum Assay gegeben, wurde unter den gleichen Bedingungen mehr IPP angestaut, so daß das Gesamtintegral mit der ursprünglichen Substratmenge identisch war (vgl. Tabelle 9). Damit war es möglich, den Abfluß von IPP bzw. DMAPP in die organische Phase zu verhindern.

3.1.2.5. Enzymassay zur Bestimmung der IspH Aktivität unter Verwendung von dialysiertem Rohextrakt

Der Nachteil des bis dahin verwendeten ^{14}C -markierten 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphates bestand darin, daß das verwendete Substrat zwar durch Ultrazentrifugation von Proteinen befreit werden konnte, aber niedermolekulare Substanzen, die sich im Rohextrakt befanden, nicht abtrennbar waren. Wie oben bereits erwähnt war eine Reinigung durch HPLC mittels Anionenaustauscher und Elution mit Ammoniumformiat möglich (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Beim Einengen der gesammelten Fraktionen durch Lyophilisation trat jedoch ein Zerfall des ^{14}C -markierten 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphates auf (vgl. Kapitel 3.1.2.1). Um Aussagen über Cofaktoren und deren Konzentration machen zu können, war es für die weitere Versuchsplanung entscheidend, ein System zu finden, in dem möglichst keine endogenen niedermolekularen Substanzen interferieren können.

Mittlerweile war eine chemische Synthese von ^3H -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat an unserem Lehrstuhl bekannt (Hecht, unveröffentlicht). Hierbei wird die Tritiummarkierung im letzten Syntheseschritt durch Reduktion des entsprechenden Aldehyds mit NaBT_4 eingeführt. Deshalb wurde für die nachfolgenden Experimente ^3H -markiertes 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat eingesetzt.

Bis zu diesem Zeitpunkt war es nicht möglich, gereinigtes und aktives IspH Protein zu erhalten. Deshalb mußte versucht werden, den Rohextrakt zu dialysieren, um somit die niedermolekularen Substanzen abzutrennen. Der Rohextrakt wurde deshalb in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 über Nacht bei 4°C dialysiert. Danach wurde der Rohextrakt zusammen mit den Cofaktoren Co^{2+} , NADH und FAD getestet (vgl. Kapitel 2.3.10.2). Bei der anschließenden HPLC-Analyse konnte ein Umsatz zu IPP in der gleichen Größenordnung wie mit nicht dialysiertem Rohextrakt festgestellt werden. Dadurch wurde gezeigt, daß bei der Dialyse kein weiterer Cofaktor verloren geht und für die Reaktion kein weiterer niedermolekularer Cofaktor benötigt wird.

Mit diesem System wurden die Konzentrationen der folgenden Cofaktoren optimiert (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Die nach Dialyse ermittelten Reaktionsbedingungen für die katalytische Aktivität von *E. coli* XL1-pMALlytB Rohextrakt

Verbindung	Konzentration
Co ²⁺	0.5 mM
NADH/ NADPH	1.5 mM
FMN/FAD	60 μ M
DTT	0.7 mM
NaF	10 mM
Pamidronat	0.5 mM
Phosphatpuffer pH 7	100 mM

Außerdem wurde gezeigt, daß die relativen Aktivitäten bei Verwendung von NADPH etwas niedriger waren als mit NADH. Der Einfluß von FAD war höher als FMN. Die Rohextrakte von *E. coli* XL1-pMALlytB konnten ohne DTT hergestellt und über Nacht dialysiert werden. Dabei war kein Unterschied in der Aktivität feststellbar. Für die *in vitro* Umsetzungen wurde jedoch standardmäßig 0.7 mM DTT in den Reaktionsmix gegeben, da dann die Aktivität in der Regel um etwa 25 % höher war (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8: Abhängigkeit der Cofaktoren von dialysiertem zellfreiem Rohextrakt von *E. coli* XL1-pMALlytB. Alle Assays enthielten zusätzlich 100 mM Tris/HCl pH 8 , 10 mM NaF, 0.5 mM Co²⁺ und 0.5 mM Pamidronat

1.5 mM NADH	1.5 mM NADPH	60 μM FAD	60 μM FMN	0.7 mM DTT	Relative Aktivität (%)
-	+	+	-	+	95
+	-	+	-	+	100
+	-	-	+	+	85
+	-	+	-	-	74

Wurde einer der drei Cofaktoren FAD, Co²⁺ oder NADH weggelassen, so sank die Aktivität um einen Faktor von 5 bis 8 (vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9: Cofaktorenabhängigkeit von dialysiertem Rohextrakt von *E. coli* XL1-pMALlytB; es wurde jeweils ein Cofaktor aus dem Assaygemisch weggelassen

<i>ohne</i>	<i>Relative Aktivität (%)</i>
-	100
Pamidronat	42
Co ²⁺	20
FAD	17
NADH	12

In Abbildung 13 A ist das HPLC-Chromatogramm von ³H-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat (Retentionszeit 30.5 min) vor der Umsetzung mit rekombinanten Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytB Zellen dargestellt. Spur B zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm nach einer enzymatischen Umsetzung von ³H-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat (Retentionszeit 30.5 min) zu IPP / DMAPP (Retentionszeit 42.0 min) mit oben genanntem Rohextrakt und den entsprechenden Cofaktoren (vgl. Tabelle 7).

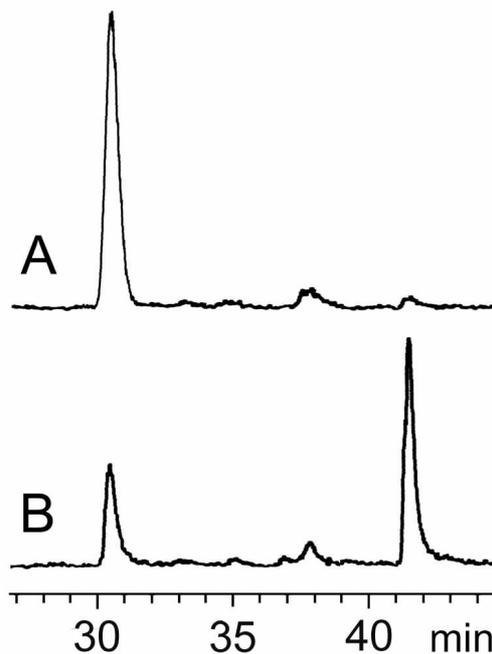


Abbildung 13 A: 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat vor der Umsetzung mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytb Zellen. B: Typisches HPLC-Chromatogramm einer Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytB Zellen (1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat: 30.5 min, IPP /DMAPP 42.0 min)

3.1.2.6. Metallionenabhängigkeit der *in vitro* Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat mit dialysiertem Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALIytB Zellen

Die Geschwindigkeit der Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu IPP / DMAPP hängt sehr von den zugesetzten zweiwertigen Metallionen ab. So konnte bei Zugabe von 0.5 mM Zn²⁺, Ni²⁺ oder Mg²⁺ zu den Standardbedingungen (0.06 mM FAD, 1.5 mM NADH, 0.5 mM Pamidronat, 10 mM NaF, 0.7 mM DTT) nur ein sehr geringer Umsatz gemessen werden. Durch Zugabe von 20 mM EDTA konnte die Reaktion fast vollständig unterdrückt werden, was deutlich belegte, daß die Reaktion Metallionen abhängig war (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Abhängigkeit der IspH Aktivität von verschiedenen zugesetzten zweiwertigen Metallionen

Metallionen (0.5 mM)	Relative Aktivität (%)
Co ²⁺	100
Mn ²⁺	48
Mg ²⁺	17
Fe ²⁺	21
Ni ²⁺	17
Zn ²⁺	17
Co ²⁺ , 20 mM EDTA	< 3

3.1.2.7. Die Reaktionsprodukte des IspH Proteins

Alle höheren Terpene leiten sich von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat ab (vgl. Abbildung 3). Beim Mevalonatweg entsteht primär IPP, welches mit DMAPP durch die IPP-Isomerase im Gleichgewicht steht (vgl. Abbildung 4; Qureshi und Porter, 1981; Spurgeon und Porter, 1981). Deshalb ist es interessant, ob bei der IspH-Reaktion, als offensichtlich letztem Schritt im Desoxyxyluloseweg, nur IPP, oder aber auch DMAPP entsteht. Bei der verwendeten HPLC-Analytik mittels Ionenpaarchromatographie konnte jedoch nicht zwischen diesen beiden Verbindungen unterschieden werden, da sie aufgrund ihrer ähnlichen

Struktur die gleiche Retentionszeit hatten. Deshalb wurde versucht, eine andere Methode zu finden, bei der man zwischen den beiden Verbindungen unterscheiden konnte.

In der Literatur war eine Methode zur Quantifizierung von ^{14}C -markiertem IPP und DMAPP beschrieben (Satterwhite, 1985). Hierbei wird die zu untersuchende Probe mit 25 % HCl in MeOH versetzt und bei 37 °C inkubiert. Das allylische Diphosphat ist unter diesen Bedingungen nicht stabil und wird hydrolysiert. Bei der anschließenden Extraktion mit Toluol wird dadurch nur Dimethylallylalkohol extrahiert, während IPP unverändert in der wässrigen Phase bleibt. Durch Bestimmung der Radioaktivität in der organischen Phase kann somit auf das Verhältnis von DMAPP zu IPP geschlossen werden (vgl. Kapitel 2.3.13).

Die inkubierte Assaymischung (vgl. Kapitel 2.3.10.2), bestehend aus ^{14}C -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat, Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytB Zellen und den entsprechenden Cofaktoren, wurde wie oben beschrieben behandelt. Beim Auszählen der organischen Phase ergab sich ein Verhältnis von DMAPP : IPP zu 1 : 5, wobei vorher durch Ionenpaar-HPLC die Umsatzrate überprüft wurde. Dieser Wert stimmte gut mit den Daten überein, die später bei der NMR-Umsetzung von ^{13}C -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat mit IspH-Rohextrakt bestimmt wurde (vgl. Kapitel 3.1.3.2).

Als Kontrollversuche wurde ^{14}C -markiertes IPP und ^{14}C -markiertes 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, welches als Nebenprodukt bei der biotechnischen Synthese von 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat anfiel, wie oben beschrieben behandelt. Erwartungsgemäß konnte in der organischen Phase der Toluolphase keine Radioaktivität gefunden werden. Somit schien dieses System für das vorliegende Problem geeignet zu sein.

Außerdem wurde ^{14}C -markiertes IPP mit IPP-Isomerase inkubiert (vgl. Kapitel 2.3.14, vgl. Tabelle 1). Der Reaktionsansatz wurde wie oben beschrieben behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich 15 % der eingesetzten Radioaktivität in der organischen Phase befand. Somit war belegt, daß durch die Isomerase-Reaktion IPP zu DMAPP umgesetzt wird und daß diese beiden Verbindungen nach Satterwhite unterscheidbar sind.

3.1.2.8. Assay mit isolierten Chromoplasten aus *Capsicum annuum* und ^3H -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat

Aus Versuchen mit *E. coli* Rohextrakten waren inzwischen Cofaktoren gefunden, die für die Reaktion von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat benötigt werden (vgl. Kapitel 3.1.2.5 und 3.1.2.6).

Deshalb wurden die für das *E. coli* IspH Protein optimierten Bedingungen auf die isolierten Chromoplasten übertragen. Die isolierten Rohchromoplasten (vgl. Kapitel 2.3.6.1) wurden mit 1.5 mM NADH, 60 μM FAD und 1 mM Co^{2+} 1 h inkubiert (vgl. Kapitel 2.3.12). Die organische Phase wurde wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben extrahiert und die wässrige Phase durch Ionenpaar-HPLC analysiert (vgl. Kapitel 2.3.3.2, Gradient A). Bei Verwendung von 1 mg Gesamtprotein und den oben genannten Cofaktoren wurde 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu Isopentenylidiphosphat umgesetzt.

Im Vergleich zur Umsetzung in *E. coli* war der die Geschwindigkeit steigernde Effekt durch Zugabe von FMN oder FAD nicht vorhanden. Anstelle von Co^{2+} kann im Fall der Chromoplasten auch Zn^{2+} oder Mn^{2+} verwendet werden. Die Aktivitäten unterschieden sich dabei nur um den Faktor 1.8 (vgl. Tabelle 11). Die Inkubationsdauer betrug in der Regel eine Stunde, um den Abfluß in die organische Phase, der trotz Zugabe von Pamidronat zu beobachten ist, möglichst gering zu halten.

Tabelle 11: Cofaktorenabhängigkeit der vom IspH Protein katalysierten Reaktion mit isolierten Chromoplasten aus *Capsicum annuum*. Zusätzlich zu den unten aufgeführten Cofaktoren wurde 50 mM Hepes pH 7.6, 0.5 mM Pamidronat, 1 mM DTT und 5 mM NaF in die Reaktionsmischung gegeben.

Cofaktoren	Relative Aktivität (%)
1 mM Co ²⁺ , 1.5 mM NADH	100
1 mM Mn ²⁺ , 1.5 mM NADH, 0.02 mM FMN	55
1 mM Mg ²⁺ , 1.5 mM NADH, 0.02 mM FMN	36
1 mM Co ²⁺ , 1.5 mM NADH, 0.02 mM FMN	57
1 mM Zn ²⁺ , 1.5 mM NADH, 0.02 mM FMN	92
1 mM Co ²⁺ , 0.02 mM FMN	20

3.1.3. *In vitro* Assay mit gereinigtem IspH Protein

An unserem Lehrstuhl wurde versucht, das IspH Protein über eine Nickel-Säule als His-tag-Protein (vgl. Tabelle 2) oder als Maltosebindeprotein MalE/IspH durch Affinitätschromatographie über eine Amylosesäule zu reinigen.

In Abbildung 14 ist das SDS-Gel der Reinigung des Maltosebindeproteins dargestellt. Auf Spur A ist der Proteinmarker aufgetragen, die Spuren B und C zeigen die Rohextrakte von *E. coli* Wildtyp bzw. rekombinanten *E. coli* Zellen, die MalE/IspH als Fusionsprotein überexprimieren. In Spur D ist das über Affinitätschromatographie mit Amylose gereinigte rekombinante IspH Maltosebindeprotein dargestellt. Die Größe des MalE/IspH Proteins beträgt ca. 76 kDa. Das rekombinante Fusionsprotein befindet sich zu etwa 4 % im löslichen Rohextrakt und reagiert in Westernblots mit Antiserum gegen rekombinantes IspH Protein (Rohdich *et al.*, 2002).

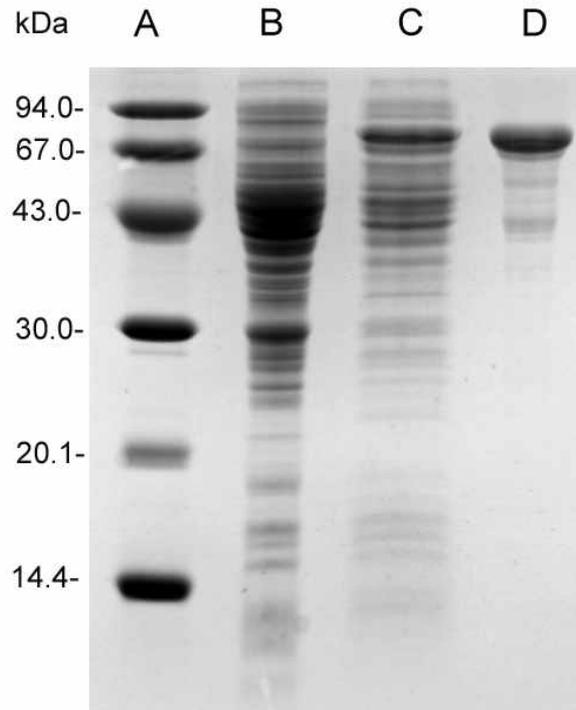


Abbildung 14: SDS-Gel der Proteinreinigung von MalE/IspH Fusionsprotein. Spur A: Proteinmarker. Spur B: Rohextrakt von *E. coli* Wildtyp. Spur C: Rohextrakt von rekombinanten *E. coli* Zellen, die MalE/IspH als Fusionsprotein überexprimieren. Spur D: gereinigtes MalE/IspH Protein

Alle Versuche, 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat mit gereinigtem IspH Protein und den oben aufgeführten Cofaktoren umzusetzen, scheiterten. Daraus ließ sich schließen, daß ein weiterer Faktor für die Reaktion nötig ist. Da eine Vielzahl von niedermolekularen Verbindungen getestet wurde, die keinen Einfluß auf die Reaktion hatten, mußte es sich bei dem fehlenden Faktor wahrscheinlich um eine höhermolekulare Verbindung oder um ein weiteres Protein handeln.

Es war auch denkbar, daß das Protein bei der Reinigung seine Aktivität verlor. Deshalb wurden Rekonstitutionsversuche durchgeführt, die im nächsten Kapitel näher erläutert werden.

3.1.3.1. Rekonstitution von IspH Protein

Nach der Reinigung aus rekombinanten Rohextrakt ist das IspH Protein nicht mehr aktiv (vgl. Kapitel 3.1.3). Um zu überprüfen, ob das Protein seine katalytische Aktivität im an das Säulenmaterial gebundenen Zustand noch besaß und diese erst

durch die Elution verlor, wurde eine Reinigung im sogenannten Batch-Verfahren durchgeführt.

Dazu wurde Rohextrakt und Säulenmaterial in einem 1.5 ml Plastikgefäß geschüttelt und einige Zeit gewartet, bis sich das Säulenmaterial abgesetzt hatte. Danach wurde mehrmals (bis zu 8 mal) mit jeweils 1 ml Puffer (vgl. Kapitel 2.3.15) gewaschen und die Überstände, die nicht gebundenes IspH Protein und andere Proteine enthielten, abpipettiert und mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung von 100 mM NaCl anstelle von 200 mM NaCl mehr IspH Protein auf der Amylose gebunden war und bei den Waschvorgängen weniger IspH Protein eluiert wurde.

Pro Enzymansatz wurde ca. 100 µl des mit dem IspH Protein gebundenen Säulenmaterial verwendet. Unter den oben aufgeführten Bedingungen (vgl. Kapitel 3.1.2.5) war noch Aktivität vorhanden, wenn das Amylose-Material nur ein- bis zweimal gewaschen wurde. Je öfter der Waschvorgang jedoch wiederholt wurde, um so mehr ging die Aktivität verloren. Das konnte bedeuten, daß bei den Waschvorgängen ein für die Reaktion wichtiges Protein oder Stabilisierungsfaktor eluiert wurde und somit die Aktivität des IspH Proteins verloren ging. Deshalb wurde der Durchlauf des ersten Waschvorgangs mit dem mehrmals gewaschenen Amylose-Material vereinigt. Aber auch in diesem Fall wurde keine Aktivität mehr erhalten.

Dieses Ergebnis bedeutet nicht zwangsläufig, daß kein weiterer hochmolekularer Faktor für die IspH Reaktion gebraucht wird. Es sind viele Beispiele beschrieben, bei denen sich einmal getrennte Proteine nicht mehr vereinigen bzw. aktivieren lassen.

Um zu untersuchen, ob für die IspH-Reaktion noch ein weiterer hochmolekularer Faktor benötigt wird, wurde zum gereinigten IspH Protein Rohextrakt aus *E. coli* XL1-Wildtyp Zellen gegeben. Als Kontrollversuch wurde die gleiche Menge an XL1-Wildtyp-Rohextrakt mit Substrat und den bekannten Cofaktoren, aber ohne Protein umgesetzt. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist, wurde 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat bereits von *E. coli* Wildtyp Rohextrakt zu IPP / DMAPP umgesetzt. Die relative Aktivität konnte jedoch um den Faktor 4.5 erhöht werden, wenn das IspH Protein zu einer konstanten Menge an *E. coli* XL1-Rohextrakt zutitriert wurde. In Abbildung 15 ist zum einen die Zunahme von IPP/DMAPP (●), die zuerst linear verläuft und dann in eine Sättigung übergeht, und zum anderen die

Abnahme von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat (\blacktriangle) in Abhängigkeit steigender Mengen an IspH Protein graphisch dargestellt.

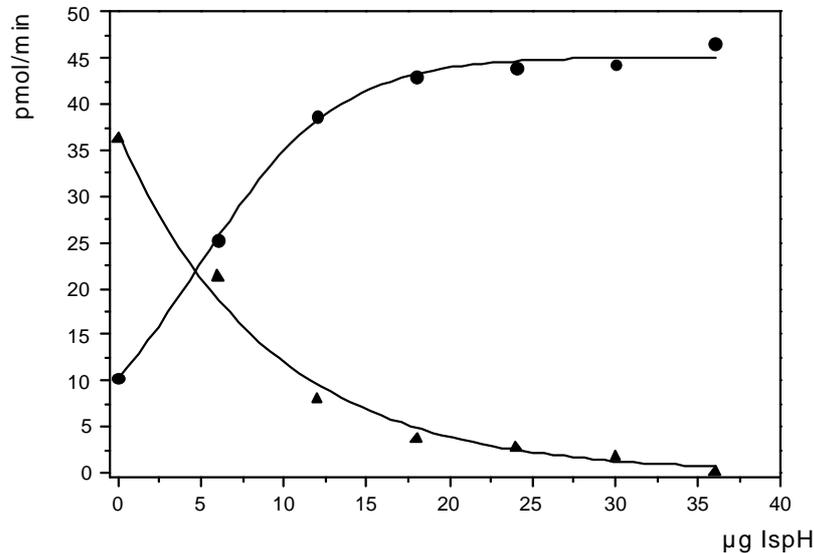


Abbildung 15: Titrationsexperiment von Rohextrakt aus *E. coli* XL1-Wildtyp Zellen mit gereinigtem IspH Protein. •: Zunahme von IPP / DMAPP. ▲: Abnahme von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat in Abhängigkeit steigender Mengen an IspH Protein

Die Rekonstitutionsversuche wurden sowohl mit dialysierten Rohextrakten als auch mit nicht dialysierten Rohextrakten durchgeführt, wobei kein Unterschied festgestellt wurde. Daraus läßt sich schließen, daß für die vom IspH Protein katalysierte Reaktion offensichtlich kein weiterer Cofaktor sondern ein weiteres Enzym benötigt wird. Dieses könnte entweder als Regulator oder zur Regeneration des IspH Proteins nötig sein.

Wie in Kapitel 3.1.2.8 beschrieben, konnte auch mit Rohchromoplasten die Reaktion von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu IPP / DMAPP verfolgt werden (vgl. Kapitel 2.3.12). Wurde ähnlich wie bei den Versuchen mit *E. coli* Wildtyp zusätzlich zu den Rohchromoplasten noch gereinigtes IspH Protein zugegeben, so erhöhte sich auch hier die ursprüngliche Aktivität um den Faktor 4.

In Abbildung 16 ist in Zeile B ein Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat mit Rohchromoplasten dargestellt. In Zeile A sieht man die Umsatzerhöhung durch Zugabe von

Protein. In Zeile C ist dargestellt, daß das Protein ohne Zusatz von *E. coli* oder Rohchromoplasten aus *Capsicum annuum* inaktiv ist.

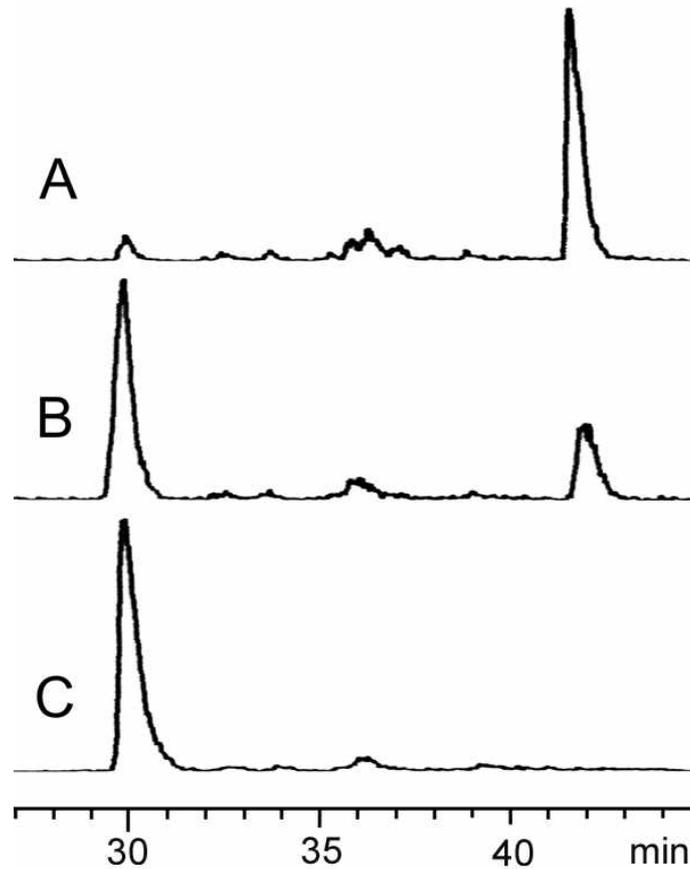


Abbildung 16: Zeile A zeigt die Umsetzung von Chromoplasten mit IspH Protein, Zeile B zeigt die Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu IPP / DMAPP mit Rohchromoplasten aus *C. annuum*, Zeile C zeigt die Umsetzung mit IspH Protein allein

3.1.3.2. NMR-Umsetzung von ^{13}C -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu ^{13}C -markiertem IPP / DMAPP mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALytB Zellen

Durch einen Up-Scale der Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu IPP / DMAPP mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALytB Zellen wurde versucht, die Stoffmenge des eingesetzten Substrats soweit zu erhöhen, daß die gebildeten Produkte mittels NMR detektiert werden konnten. An unserem Lehrstuhl war die *in vivo* Herstellung von ^{13}C -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat in einem rekombinanten *E. coli* Stamm, der die Proteine XylB und IspC-G

überexprimiert, etabliert (Hecht *et al.*, 2001b). Somit standen sowohl [U-¹³C₅]-, [2,2'-¹³C₂]- als auch [1,3,4-¹³C₃]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat in ungereinigter Form aus *E. coli* zur Verfügung. Der Reaktionsansatz wurde nach der Inkubation mit einem starken Kationenaustauscher (DOWEX WX8, Na⁺-Form) behandelt, um Metallionen abzutrennen, die bei der NMR-Messung zu einer Linienverbreiterung führen würden (vgl. Kapitel 2.3.11).

Danach wurde der Ansatz lyophilisiert und in einem Gemisch aus D₂O/MeOD (3 : 7) aufgenommen und die unlöslichen Proteine abgetrennt. Die NMR-Messung erfolgte am ungereinigten Rohextrakt.

Die Auswertung der ¹³C-NMR Signale zeigte, daß sowohl ¹³C-markiertes IPP als auch DMAPP entstanden waren. Dies wurde durch Vergleich der chemischen Verschiebungen von IPP und DMAPP, die als Referenzmaterial vorlagen, bestätigt. Durch Integration der ¹³C-NMR-Signale war eine Abschätzung der Umsatzrate möglich. Zu etwa 5 % lag noch nicht umgesetztes Substrat vor. Das Verhältnis von IPP zu DMAPP lag bei 6 : 1. Dies stimmt innerhalb der Fehlergrenzen sehr gut mit den *in vitro* Daten überein, bei denen nach der Methode von Satterwhite (Satterwhite, 1985) eine Quantifizierung von IPP zu DMAPP vorgenommen wurde (vgl. Kapitel 3.1.2.7). Da DMAPP bei der Biosynthese von höheren Terpenen lediglich als Startereinheit dient und die Kettenverlängerung durch IPP-Einheiten entsteht, erscheint dieser Wert durchaus sinnvoll.

In Abbildung 17 sind die Signale von [U-¹³C₅]IPP zu sehen, welche aus [U-¹³C₅]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat durch Inkubation mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALytB Zellen entstanden sind. Die Signale des Substrats [U-¹³C₅]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat sind nahezu verschwunden. C-3 von [U-¹³C₅]IPP zeigte bei 145.3 ppm ein dupliziertes Triplet, das ¹³C-Kopplungen zu C-2, C-5 und C-4 trägt. Nach der Inkubation sieht man für C-4 von [U-¹³C₅]IPP ein Signal mit der chemischen Verschiebung von 111.2 ppm, welches vor der Inkubation noch nicht vorhanden war (vgl. Tabelle 12).

Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten für [U-¹³C₅]IPP sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten von [U-¹³C₅]IPP nach der Inkubation von ¹³C-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytB Zellen

Position	¹³C-NMR chem. Verschiebung (d, ppm)	Kopplungskonstante J_{CC} (Hz)	Kopplungskonstante J_{PC} (Hz)
1	64.1 (d)	41.3	n.b.
2	37.8 (t)	40, 40	n.b.
3	145.3 (dt)	71.4, 41.1, 41.5	
4	111.2 (d)	70.7	
5	21.6 (d)	41.5	

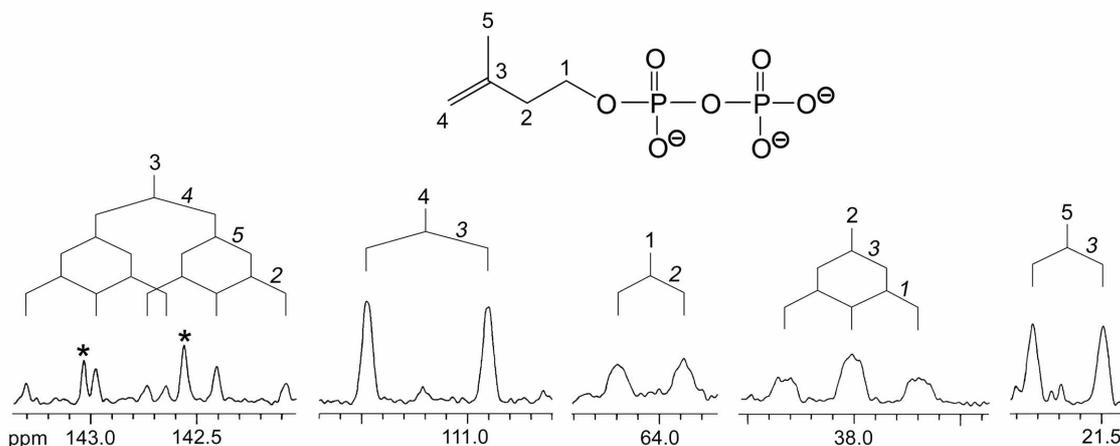


Abbildung 17: Ausschnitt aus dem ¹³C-NMR Spektrum von [U-¹³C₅]IPP nach Inkubation von [U-¹³C₅]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytB Zellen

Ein weiterer Beleg für die Bildung von IPP wurde mit Hilfe von [2,2'-¹³C₂]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat und [1,3,4-¹³C₃]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat als Substrat erbracht. Das enzymatisch entstandene IPP zeigte das erwartete charakteristische Markierungsmuster. Im Fall von [2,2'-¹³C₂]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat wurden die beiden Kohlenstoffe 3 und 5 von IPP markiert und koppelten mit einer Kopplungskonstante von 41.5 Hz. Wurde [1,3,4-¹³C₃] markiertes Substrat eingesetzt, so fanden sich die ¹³C-angereicherten Positionen im Endprodukt IPP an Position 1, 2 und 4 (vgl. Tabelle 13, Abbildung 18).

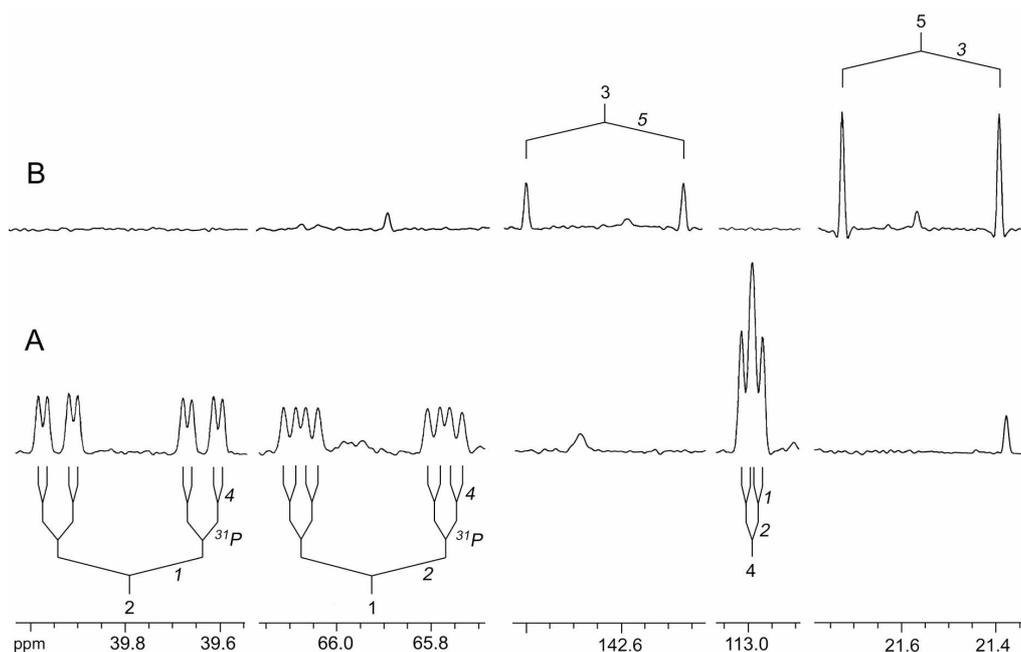


Abbildung 18: Ausschnitt aus dem ¹³C-NMR-Spektrum von [1,2,4-¹³C₃]IPP (A) und [2,2'-¹³C₂]IPP (B) nach Inkubation von [1,3,4-¹³C₃]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat bzw. [2,2'-¹³C₂]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytB Zellen

Tabelle 13: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten von [1,2,4-¹³C₃]IPP nach der Umsetzung von [1,3,4-¹³C₃]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pMALlytB Zellen

Position	¹³ C-NMR chem.	Kopplungskonstante	Kopplungskonstante
	Verschiebung (d, ppm)	J _{CC} (Hz)	J _{PC} (Hz)
1	64.1 (d)	41.0, 3.7	6.5
2	37.8 (t)	41.1, 2.8	8.7
3	145.3		
4	111.2 (d)	2.2, 4.1	
5	21.6		

Damit wurde gezeigt, daß 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat *in vitro* von *E. coli* Rohextrakt, welcher rekombinantes IspH Protein enthielt, und den Cofaktoren FAD, NADH und Co²⁺ zu Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat umgesetzt wurde (vgl. Abbildung 19).

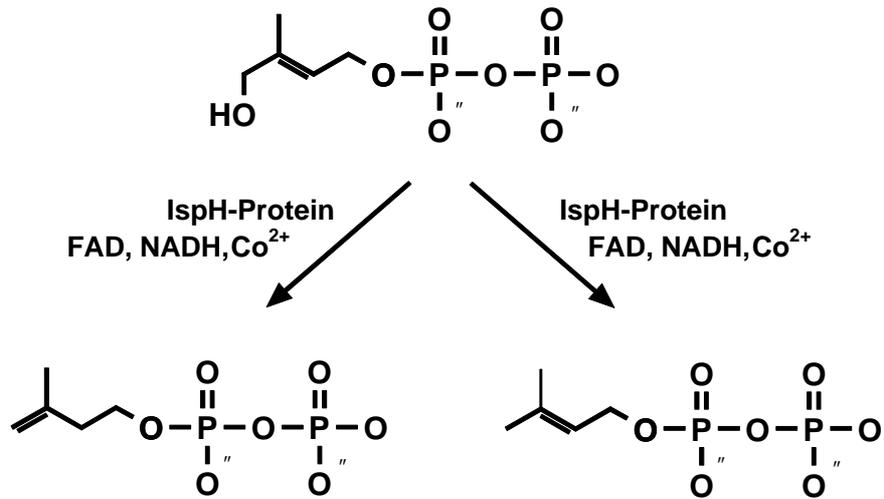


Abbildung 19: Die vom IspH Protein katalysierte Reaktion

3.1.4. Diskussion der Ergebnisse der enzymatischen Reaktionen der IspG und IspH Proteine

An unserem Lehrstuhl wurden mittels einer Datenbank-Recherche mehrere Gene entdeckt, die möglicher Weise für die Biosynthese von IPP und DMAPP benötigt werden (Lüttgen *et al.*, 2000; Rohdich *et al.*, 2001). Dabei wurden die komplett sequenzierten Genome der Organismen, die den alternativen Terpenbiosyntheseweg benutzen, miteinander verglichen. Solche Gene, die in allen Desoxyxyluloseweg beschriebenen Organismen vorkamen, wurden anschließend mit den komplett sequenzierten Genomen von solchen Organismen verglichen, die den Mevalonatweg betreiben. Gene, die in allen Organismen auftraten, wurden gestrichen. Als Ergebnis wurden solche Gene erwartet, die für den alternativen Terpenbiosyntheseweg verantwortlich waren. Die entsprechenden Genprodukte waren somit weitere mögliche Kandidaten für Enzyme dieses Weges. Auf diesem Weg wurde unter anderem IspE, IspF, GcpE (später IspG) und LytB (später IspH) gefunden (Adam *et al.*, 2000). Außerdem war bekannt, daß die Gene *gcpe* und *lytb* essentiell für die Biosynthese von IPP sind (Altincicek *et al.*, 2001a; Altincicek *et al.*, 2001b; Campos *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2000).

Durch *in vivo* Einbauversuche mit rekombinanten *E. coli* Stämmen, die die Proteine XylB und IspC-G überexprimiert hatten, wurde gezeigt, daß 1-Desoxy-D-xylulose *in vivo* zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat umgesetzt wird (Hecht *et al.*, 2001b). Mit chromosomalen *lytB* Gen Knock-out Mutanten wurde unabhängig davon 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat aus *E. coli* isoliert (Hintz *et al.*, 2001). Die Verbindung war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Naturstoff bekannt. Aus *Ornithogalum montanum* war allerdings das strukturell verwandte 1-O- β -D-Glucosid von 1,4-Dihydroxy-2-methyl-2(*E*)-buten isoliert worden (Nicoletti *et al.*, 1992). Wurde zusätzlich noch das rekombinante Gen *lytb* eingeführt, so konnte die *in vivo* Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose zu Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat beobachtet werden (Rohdich *et al.*, 2002). Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, daß das IspH Protein die Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu IPP und DMAPP katalysiert.

3.1.4.1. Darstellung von [2-¹⁴C]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat

Die Verwendung von radioaktiv-markierten Substraten hat den Vorteil, daß man bei der Detektion sehr empfindlich ist und nur die Verbindungen detektiert, die tatsächlich aus der radioaktiven Vorstufe gebildet wurden. Überlagerungen mit anderen nicht markierten Cofaktoren oder Verbindungen, die sich im Rohextrakt befinden und die gleiche Retentionszeit wie das Substrat oder Produkt haben, stören deshalb bei der HPLC-Analyse nicht.

Es war bekannt, daß ¹³C-markierte 1-Desoxy-D-xylulose von *E. coli* aufgenommen (Broers, 1994) und von der D-Xylulokinase phosphoryliert wird (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001). DXP wird dann von den Proteinen IspC-G weiter zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat umgesetzt (Hecht *et al.*, 2001b; Hecht, 2002). Dieses Verfahren mußte für ¹⁴C-markiertes DX angepaßt werden. Aufgrund der geringen Stoffmenge traten verschiedene Probleme auf. Bei zu langer Inkubationsdauer wurde das gebildete 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat durch die Wildtyp-Aktivität des IspH Proteins und der Prenyltransferasen sehr schnell in die organische Phase eingebaut. Bei kürzeren Zeiten war die Ausbeute jedoch sehr gering. Ein Mittelweg mit einer Inkubationsdauer von 80 min erwies sich am geeignetsten. Dabei wurde in Kauf genommen, daß zu ca. 30 % auch 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat vorhanden war. Dies sollte aber bei den Enzymassays nicht stören.

3.1.4.2. Die enzymatische Reaktion des IspG Proteins

Durch Verwendung von radioaktiv-markierten Vorstufen (Schuhr *et al.*, 2001a) konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Ionenaenchromatographie die *in vitro* Umsetzung von ¹⁴C-markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu ¹⁴C-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat mit Rohextrakt aus rekombinanten Zellen von *E. coli* XL1-pACYCgcpE unter Zugabe von NADH und zweiwertigen Cobaltionen beobachtet werden. Diese Umsetzung konnte auch mit isolierten Chromoplasten aus *Capsicum annuum* verfolgt werden. Ein Strukturbeweis

der Verbindung durch NMR-Spektroskopie war nicht möglich, da die ^{13}C -markierte Verbindung beim Einengen zerfiel. Ein Beweis, daß es sich bei dem HPLC-Peak aber dennoch um ein echtes Intermediat des Desoxyxyluloseweges handelt, konnte dadurch erbracht werden, daß bei der Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Rohextrakt aus *E. coli* XL1-pACYCgcpElytB unter optimalen Bedingungen 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat durch die katalytische Aktivität von IspH komplett weiter zu IPP umgesetzt wurde. Dies konnte durch Co-Chromatographie mit käuflichem ^{14}C -markiertem IPP belegt werden. Unter nicht optimalen Bedingungen oder sehr kurzen Reaktionszeiten wurde das gebildete 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat nur teilweise weiter zu IPP bzw. DMAPP umgesetzt (vgl. Kapitel 3.1.2.3).

In den Gendatenbanken gibt es nur orthologe, keine paraloge Sequenzen zum *ispG* Gen aus *E. coli*. Vergleicht man die IspG Proteine aus verschiedenen Organismen, so fällt auf, daß drei Cysteine streng konserviert sind (vgl. Abbildung 20). Dieses Motiv könnte eine Metallbindungsstelle sein, z. B. eines Fe-S-Clusters.

<i>Arabidopsis thaliana</i>	: KT--EYVSCPSCGRTLFDLQEI SAEIREKTSHLP-GVSTAI MGCIVNGPGEMADADFG
<i>Synechocystis</i> sp.	: KTMVEYVACPSCGRTLFDLQEDV LHEVREATKHLT-GLDIAVMGCIVNGPGEMADADYG
<i>Chlamydia trachomatis</i>	: SVTVEYVSCPSCGRTLFDLQAVSQRIRERTQHLP GGLKIAVMGCIVNGPGEMADADFG
<i>Plasmodium falciparum</i>	: KT--DYIACPSCGRTLFDLQETTKIMKLTGHLK-GVKIAVMGCIVNGPGEMADAHFG
<i>Helicobacter pylori</i>	: KEGINWISCPSCGRIEANLVDMAIKVEKRLSHIKTPLDISVMGCVVNALGEAKHADMA
<i>Campylobacter jejuni</i>	: KSGVNIISCPSCGRIQSDLLSAIKIVEEKT KHIKEPLNISVMGCVVNALGEAKGADVA
<i>Haemophilus influenzae</i>	: SRGINFIACPTCSRQEFDVIGTVNALEQRLEDI ITPMDVSIIGCVVNGPGEALVSDLG
<i>Pasteurella multocida</i>	: SRGINFIACPTCSRQEFDVIGTVNALEQRLEDI ITPMDVSIIGCVVNGPGEALVSDLG
<i>Escherichia coli</i>	: SRGINFIACPTCSRQEFDVIGTVNALEQRLEDI ITPMDVSIIGCVVNGPGEALVSTLG
<i>Vibrio cholerae</i>	: SRGINFIACPTCSRQEFDVIGTVNALEQRLEDV LTPMDVSIIGCVVNGPGEAEVSHLG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	: SRGINFIACPTCSRQNFVDVVKTMNELEGRLED LLVPMDDAVIIGCVVNGPGEAKEAHVG
<i>Buchnera</i> sp.	: ARGINFIACPTCSRQEFDVINTVNQLEKNLEDI STPIDVSIIGCVVNGI GFSKIATLG
<i>Caulobacter crescentus</i>	: HRGVNIISCPSCARQGFNVIKTVEALEERLAHISTPMSLSIIGCVVNGPGEALMTDIG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	: PRSLEIVSCPSCGRAQVDVYTLANEVTAGLDGLD VPLRVAVMGCVVNGPGEAREADLG
<i>Streptomyces coelicolor</i>	: QRGLEIVSCPSCGRAQVDVYKLAEEVTAGLEGMEVPLRVAVMGCVVNGPGEAREADLG
<i>Aquifex aeolicus</i>	: RRGVEIVACPTCGRIEVDLPKVVKEVQEKLSGVK TPLKVAVMGCVVNAI GEAREADIG
<i>Bacillus subtilis</i>	: SNAATLISCPSCGRIEIDLLSIANEVEEYISKIKAPIKVAVLCCAVNGPGEAREADIG
<i>Thermotoga maritima</i>	: E-GVEVIACPTCGRAEIDVENMAKMI EENFFHVQKRLKIAVMGCVVNGI GEGKDADLG
<i>Treponema pallidum</i>	: AGGVRLVSCPSCGRIGFDVHAFVRRWQKELFSLK KDIIVAVMGCVVNGPGE GKHADLG

Abbildung 20: Eine hochkonservierte Aminosäureregion in IspG Proteinen aus verschiedenen Organismen. Identische Aminosäuren sind in grün dargestellt, ähnliche Aminosäuren in gelb. Die konservierten Cysteine sind in rot dargestellt.

In der Literatur war aus Einbauversuchen mit deuteriummarkierter 1-Desoxy-D-xylulose (Giner *et al.*, 1998a; Giner *et al.*, 1998b) und deuteriummarkiertem 2C-

Methyl-D-erythritol (Charon *et al.*, 2000) bekannt, daß alle Wasserstoffe des 2C-Methyl-D-erythritol Grundgerüsts erhalten bleiben müssen. Aufgrund dieser Daten kann sowohl ein radikalischer (vgl. Abbildung 21) als auch ein ionischer Mechanismus (vgl. Abbildung 22) diskutiert werden (Hecht *et al.*, 2001b).

Der radikalische Mechanismus wurde in Anlehnung an die von der Ribonucleotid Reduktase katalysierten Reaktion formuliert (Licht *et al.*, 1999). Der Wasserstoff aus Position 1 wird radikalisch abstrahiert. Bei diesem Reaktionsschritt könnte das dritte Cystein involviert sein. Das entfernte Wasserstoffradikal muß dann im letzten Reaktionsschritt wieder übertragen werden.

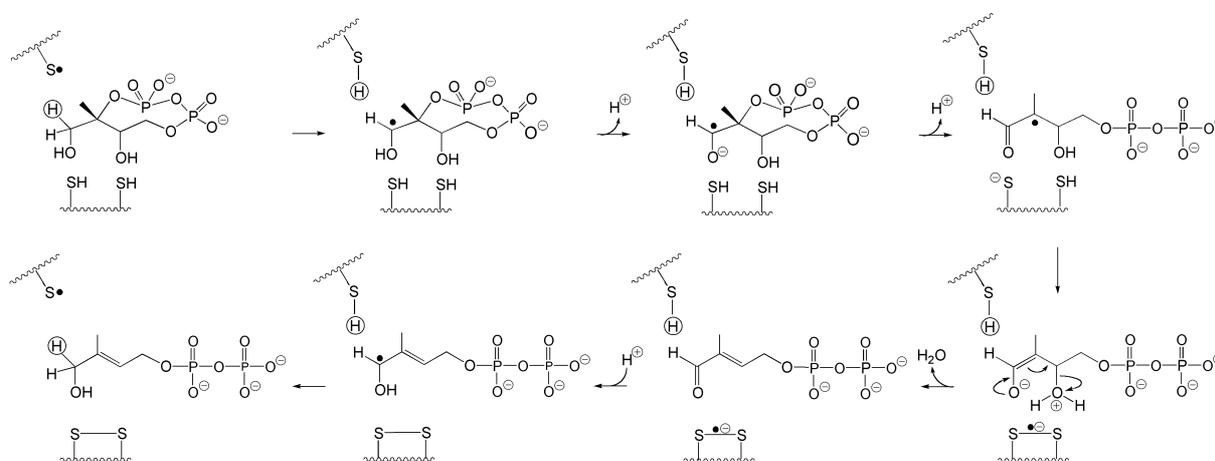


Abbildung 21: Postulierter radikalischer Mechanismus der vom IspG Protein katalysierten Reaktion

In Abbildung 22 ist der ionische Mechanismus dargestellt. Dieser Mechanismus wurde in Anlehnung an die von der Vitamin K Epoxychinon-Reduktase katalysierten Reaktion formuliert (Silverman und Nandi, 1988). Im ersten Schritt erfolgt eine Oxidation an der Hydroxylgruppe an Position 1. Das Thiolation greift unter gleichzeitiger Bildung des Disulfides und eines Enolat-Ions nucleophil an der Pyrophosphatgruppe an. Nach der anschließenden β -Eliminierung von Wasser wird die Aldehydgruppe reduziert. Dabei wird das Proton, das im ersten Schritt entfernt wurde, wieder übertragen.

von dem bekannt ist, daß es Farnesyltransferasen hemmt (Dunford *et al.*, 2001), konnte IPP und DMAPP angestaut werden. Dadurch war es möglich, die Aktivitäten der Enzymumsetzungen zu bestimmen.

Durch Versuche mit dialysierten Rohextrakten aus *E. coli* XL1-pMALlytB, die zu dem Ergebnis kamen, daß durch Zugabe von NADH, FAD und einem zweiwertigen Metallion (vorzugsweise Co^{2+}) die Reaktion mit einer spezifischen Aktivität von $4 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ abläuft (vgl. Kapitel 3.1.2.5 und 3.1.2.6), scheint kein weiterer niedermolekularer Faktor zu fehlen. Wurde FMN anstelle von FAD bzw. NADPH anstelle von NADH eingesetzt, so waren die Unterschiede in den Aktivitäten nur minimal. Im Rohextrakt sind diese Cofaktoren jedoch ineinander umwandelbar, so daß eigentlich nur mit gereinigtem Protein definitive Aussagen zu den exakten Konzentrationen der Cofaktoren gemacht werden können.

Gereinigtes Protein war jedoch nicht in der Lage, allein die Reaktion zu katalysieren. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen war es möglich, daß das gereinigte Protein nicht stabil war und bei der Proteinreinigung denaturiert wurde. Zum anderen war nicht auszuschließen, ob ein weiterer sich im Rohextrakt befindlicher Faktor durch die Reinigungsprozedur verloren ging.

Sollten für die vom IspH Protein katalysierte Reaktion zusätzlich noch andere Proteine eine Rolle spielen, dann sollten diese beim Genomvergleich auftreten (vgl. Kapitel 3.1.4). Dies war jedoch nicht der Fall. Deshalb könnte es sich bei den fehlenden Enzymen um unspezifische Proteine handeln, deren Funktion je nach Organismus von unterschiedlichen Enzymen wahrgenommen werden kann.

Um zu untersuchen, ob ein weiterer hochmolekularer Faktor fehlt, wurde der Rohextrakt von XL1-Wildtyp Zellen zum Protein gegeben. Im Wildtyp sind alle essentiellen Enzyme vorhanden, wenn auch nur in kleinen Mengen. Deshalb wurde die Proteinkonzentration mit ca. 25 mg/ml sehr hoch gewählt. Unter diesen Bedingungen konnten bereits kleine Umsätze von 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat zu IPP und DMAPP erzielt werden. Diese geringe Aktivität konnte jedoch durch Zugabe von IspH Protein um den Faktor 4 erhöht werden. Wie in Abbildung 15 schematisch dargestellt ist, verläuft die Steigerungsrate zuerst linear und läuft dann in eine Sättigungsphase über. Dieser Verlauf ist leicht damit zu erklären, daß zunächst beide Komponenten in ausreichender Menge vorhanden sind

und damit der Aktivitätsanstieg kontinuierlich verläuft. Ab einer bestimmten Proteinmenge wird einer der beiden Faktoren limitierend. Entweder ist das rekonstituierbare Protein verbraucht oder der sich im Wildtyp-Rohextrakt befindliche unbekannte Faktor wird limitierend. Aus ähnlichen Versuchen ist jedoch bekannt, daß mit einer geringeren Wildtyp-Proteinkonzentration auch der Aktivierungsfaktor sinkt. Somit schien der Faktor aus dem Rohextrakt limitierend zu sein.

Diese Ergebnisse lassen sich auch mit den Daten aus dem Batch-Reinigungsverfahren in Einklang bringen, bei dem gezeigt wurde, daß das IspH Maltosebindeprotein im gebundenen Zustand auf dem Amylose-Säulenmaterial noch aktiv war, solange man nicht oder nur wenig wäscht. Nach mehrmaligen Waschen ging die Aktivität jedoch verloren (vgl. Kapitel 3.1.3.1).

Ähnlich wie der Wildtyp-Rohextrakt konnten auch isolierte Chromoplasten aus *Capsicum annuum* das IspH Protein aktivieren (vgl. Abbildung 16).

Bereits früher wurde gezeigt, daß 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in die Carotinvorstufe Phytoen eingebaut wird (Fellermeier *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß IPP, die Vorstufe von Phytoen, von Chromoplasten aus *Capsicum annuum* aus 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat gebildet wird.

All diese Gründe sprechen dafür, daß für die vom IspH Protein katalysierte Reaktion wahrscheinlich ein Protein oder eventuell auch mehrere Proteine nötig sind. Ein eindeutiger Beweis für diese Hypothese war aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Die enzymatische Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat zu IPP / DMAPP konnte durch Zugabe von ^{13}C -markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat und rekombinanten Rohextrakten aus *E. coli* XL1-pMALlytB im NMR verfolgt werden. Die Entstehung von Isopentenylidiphosphat konnte eindeutig durch Vergleich mit den chemischen Verschiebungen von käuflichem IPP bewiesen werden. Außerdem stimmten die Kopplungskonstanten und Kopplungsmuster des entstandenen $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$, $[\text{3,5-}^{13}\text{C}_2]$ bzw. $[\text{1,2,4-}^{13}\text{C}_3]$ IPP mit publizierten Daten überein (Rohdich *et al.*, 2002). Durch Integration der Methylgruppen von IPP und DMAPP konnte auf das Verhältnis dieser beiden Verbindungen geschlossen werden. Dabei ergab sich ein Wert von ca. 6 : 1, der auch im *in vitro* Assay nach der Methode von Satterwhite erhalten (Satterwhite, 1985) wurde. Dieser Wert erscheint durchaus

sinnvoll, wenn man bedenkt, daß höhere Terpene ausgehend von DMAPP durch schrittweise Verlängerung mit IPP gebildet werden.

Um von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu IPP und DMAPP zu kommen, muß formal reduktiv Wasser eliminiert werden. Dabei ist ein ionischer Mechanismus denkbar, der darauf beruht, daß zuerst eine Protonierung der OH-Gruppe in Position 1 und eine Wassereliminierung erfolgt. Das daraus resultierende Carbokation ist durch die Doppelbindung resonanzstabilisiert. Durch Reduktion mit beispielsweise NADH entsteht IPP und DMAPP (vgl. Abbildung 23). Dieser Mechanismus läßt sich gut mit den Daten aus den *in vitro* Assays in Einklang bringen, da ein Reduktionsmittel wie NADH oder NADPH für die *in vitro* Reaktion von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu IPP und DMAPP nötig ist.

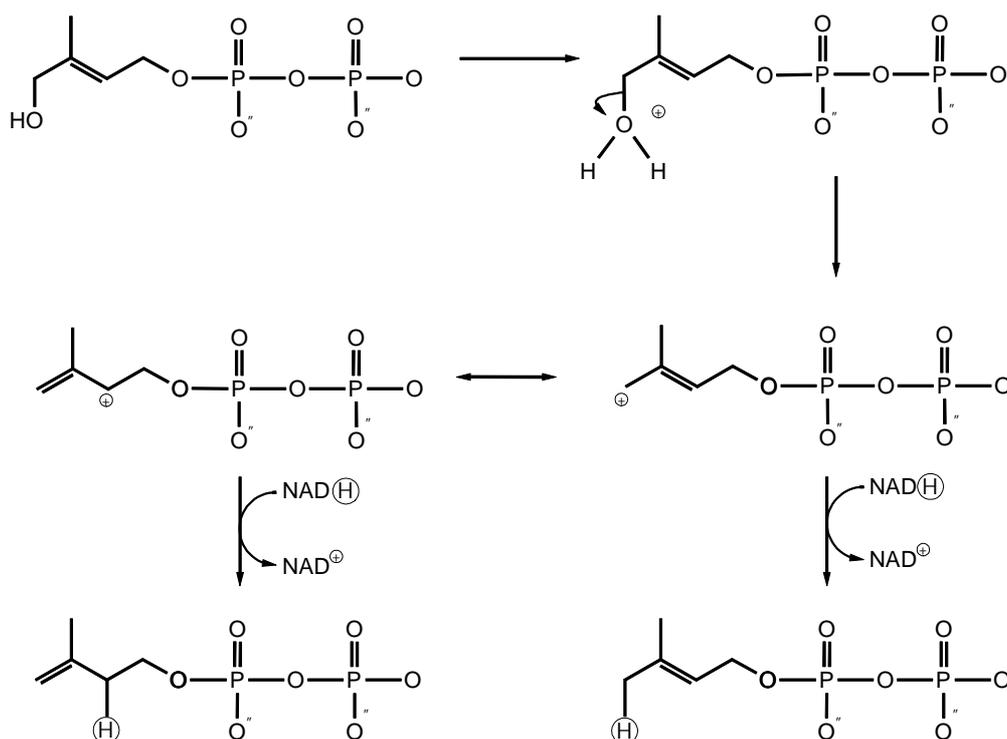


Abbildung 23: Postulierter ionischer Mechanismus der IspH-Reaktion für die Bildung von IPP und DMAPP aus 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat

Weiterhin ist auch ein radikalischer Mechanismus der Reaktion nicht auszuschließen. In der Literatur sind nur sehr wenige Reaktionen bekannt, die Cobaltionen als Cofaktor benötigen. Es gibt für einige *in vitro* Umsetzungen Beispiele, bei denen das

Enzym durch Zugabe von Co²⁺ rekonstituiert werden kann (Bender *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 1994; Yamashiro *et al.*, 1997; Lieder *et al.*, 1998). Es gibt jedoch keine Beispiele für Reaktionen, die ausschließlich von Cobaltionen abhängig sind (Walker *et al.*, 1998).

Erwähnenswert ist weiterhin, daß das IspH Protein drei absolut konservierte Cysteinreste besitzt, die ein Teil eines Eisen-Schwefel-Cluster Motivs sein können, das eine Rolle bei der Übertragung von Elektronen spielen könnte (vgl. Abbildung 24).

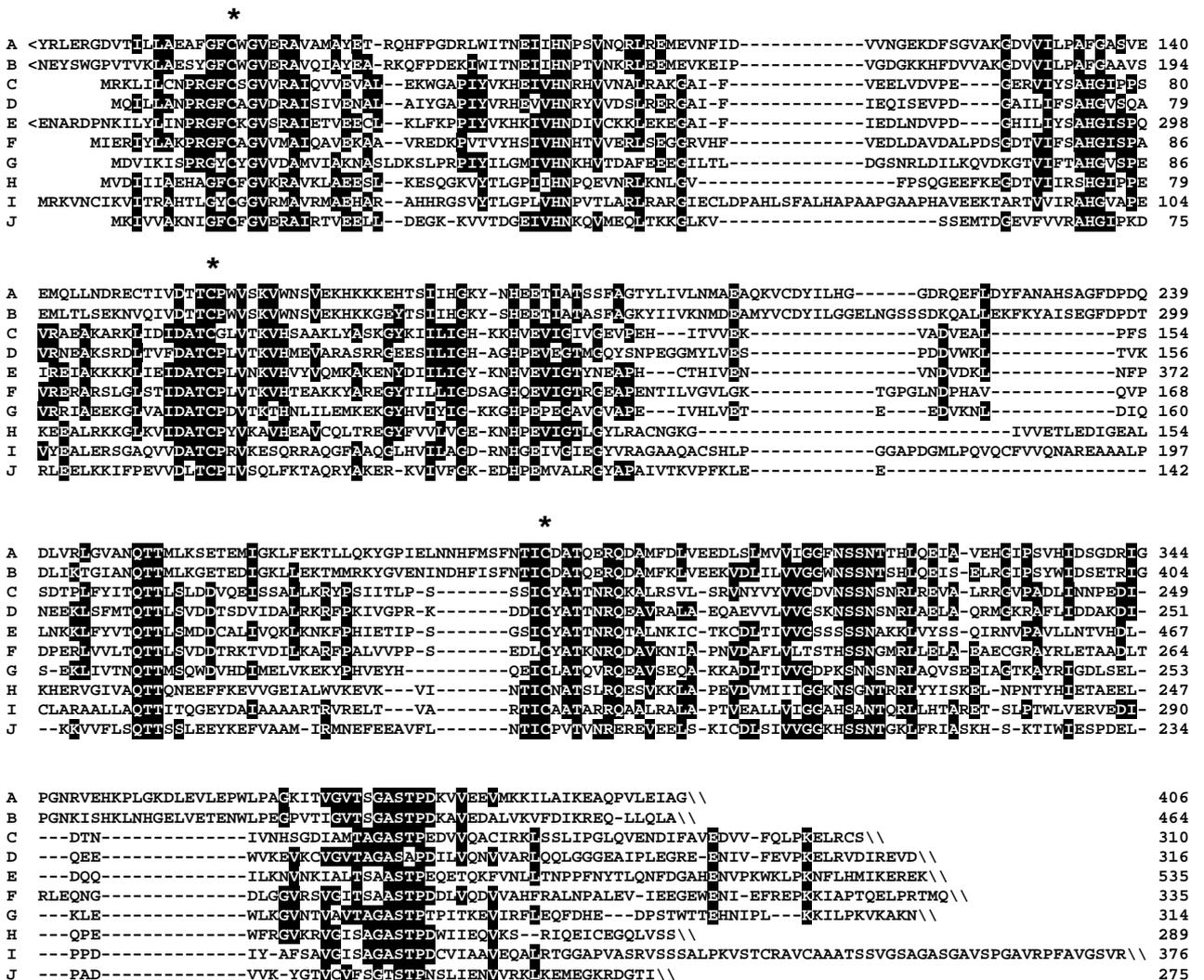


Abbildung 24: Alignment von IspH Proteinen aus verschiedenen Organismen. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, konservierte Cysteine sind mit * markiert. A: Cyanobakterium (*Synechocystis* sp.), B: Pflanzen (*Adonis aestivales*), C: Chlamydien (*Chlamydomonas reinhardtii*), D: Proteobakterium (*Escherichia coli*), E: Protozoen (*Plasmodium falciparum*), F: Deinococcus (*Deinococcus radiodurans*),

G: Firmicutes (*Bacillus subtilis*), H: Aquificales (*Aquifex aeolicus*), I: Spirochaetales (*Treponema pallidum*), J: Thermotogales (*Thermotoga maritima*).

Die katalytische Rate des IspH Proteins (durch Aktivierung mit Rohextrakt) beträgt $4.8 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Andere Enzymen des Desoxyxyluloseweges haben spezifische Aktivitäten im Bereich von 10 bis $500 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Rohdich *et al.*, 2001). Die scheinbar niedrige Aktivität des IspH Proteins spiegelt wider, daß die Bedingungen für die Reaktion noch nicht optimal sind.

Es wurde auch versucht, die Enzymassays anaerob durchzuführen. Die Umsatzraten waren mit den aeroben Assays vergleichbar. An dieser Stelle ist jedoch zu bemerken, daß dadurch, daß nur sehr geringe Substratmengen eingesetzt wurden, bereits Spuren von Sauerstoff genügen würden, um die Reaktion, falls sie wirklich anaerob sein sollte, zu inhibieren. Außerdem könnte es sich bei dem IspH Protein um den „Flaschenhals“ des alternativen Terpenbiosyntheseweges handeln.

Der alternative Terpenbiosyntheseweg ist für viele pathogene Eubakterien und *Plasmodium* spp. die einzige Quelle für Terpene (Rohdich *et al.*, 2001). Aus diesem Grund stellen die Enzyme dieses Biosyntheseweges potentielle Targets für die Suche nach Inhibitoren dar.

Fosmidomycin beispielsweise hemmt die 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Synthase (Kuzuyama *et al.*, 1998) und heilt Mäuse, die mit *Plasmodium vinckei* infiziert sind (Jomaa *et al.*, 1999). Hierbei wird die Isoprenoidbiosynthese des Malariaerregers inhibiert, die in den Apicoplasten, plastidähnlichen Zellorganellen, lokalisiert ist.

3.2. Aufklärung der Biosynthese von Hyperforin

Hyperforin (vgl. Abbildung 25) ist mit einem Gehalt von bis zu 7 % der Hauptbestandteil des Johanniskrauts, dem *Hypericum perforatum*.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war in der Literatur wenig über die Biosynthese von Hyperforin bekannt (Bystrov *et al.*, 1975). Es wurde vermutet, daß der Phloroglucinolring von Hyperforin über den Polyketid-Weg synthetisiert wird (Repcak und Martonfi, 1997).

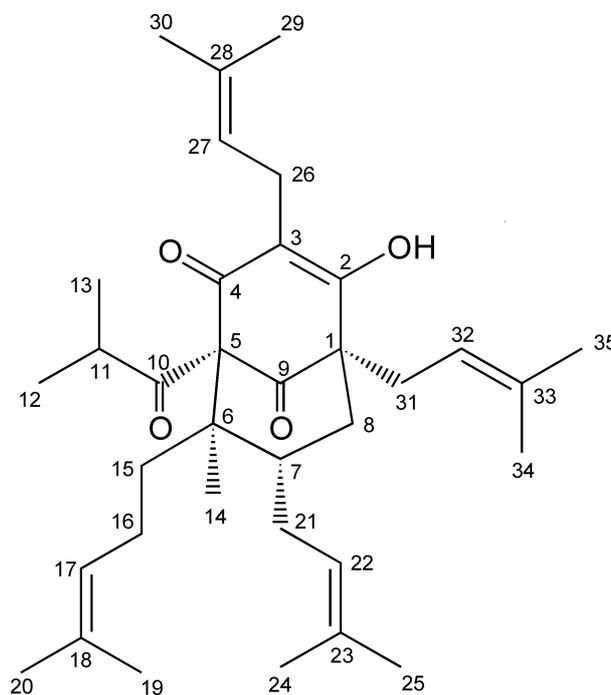


Abbildung 25: Strukturformel von Hyperforin

Aufgrund der Struktur der Seitenketten liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei dieser Verbindung um ein Meroterpen handeln könnte. Terpene können auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert werden: nach dem Mevalonatweg und dem Desoxyxylulosephosphatweg (vgl. Kapitel 1.1).

Beide Wege laufen in Pflanzen nebeneinander ab, jedoch in unterschiedlichen Zellkompartimenten. Der Desoxyxylulosephosphatweg ist in den Plastiden, der Mevalonatweg hingegen im Cytoplasma, in dem die Bausteine für Phytosterole und Sesquiterpene synthetisiert werden, lokalisiert (Eisenreich *et al.*, 1998).

Um die Biosynthese von Hyperforin zu klären, wurden die beiden Stabilisotopen [1-¹³C]Glukose und [U-¹³C₆]Glukose an *Hypericum perforatum* verfüttert.

Im Vorfeld des Versuchs wurde unmarkiertes Hyperforin isoliert und durch NMR-Spektroskopie analysiert (vgl. Kapitel 3.2.1). Damit wurde die natürliche Anreicherung der C-Atome von Hyperforin erhalten.

3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von Hyperforin

Um Hyperforin zu isolieren (vgl. Kapitel 2.3.17) wurde das Pflanzenmaterial mit flüssigen Stickstoff gemörsert, das entstandene Pulver mit Heptan extrahiert und anschließend gegen Methanol ausgeschüttelt (in Anlehnung an Erdelmeier, 1998). Die in der alkoholischen Phase gelösten Verbindungen wurden über Kieselgel 60 mit Hexan : Essigester 9 : 1 chromatographiert. Die Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Hexan : Ethylacetat 9 : 1, Ansprühreagenz: Anisaldehyd : Schwefelsäure : Essigsäure 1 : 2 : 100 (v/v)) analysiert und anschließend vereinigt. Der R_f-Wert von Hyperforin betrug 0.42. Das so erhaltene Hyperforin wurde mittels 1D und 2D NMR-Spektroskopie, insbesondere durch HMBC, HMQC, COSY und NOESY Spektren charakterisiert. Die bis dahin bekannten NMR-Daten (Erdelmeier, 1998; Bilia *et al.*, 2001; Orth *et al.*, 1999b) konnten dahingehend erweitert werden, daß durch die 2D-Experimente eine exakte Zuordnung der oft sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe als auch der dazugehörigen Wasserstoffe möglich war (vgl. Tabelle 14, Abbildung 25).

Tabelle 14 : NMR-Daten und NMR-Korrelationen von Hyperforin

Position	chem. Verschiebung (δ,ppm)		Kopplungs- konstante	NMR-Korrelationen		
	¹³ C	¹ H		J _{HH} (Hz)	HMBC	NOESY
1	60 breit					
3	122.12			26a, 26b		
5	82 breit			14		
6	49.10			14		
7	42.95	1.60-1.68 (m)		8a, 8b, 14		
8	40.82	Ha:1.26-1.33 Hb:1.76-1.86			8a (8b), 8b (8a), 21	7, 8a(8b), 8b(8a)
9	208.85			31a, 31b		
10	211.78			12, 13		
11	43.00	1.98-2.05 (m)		12, 13		
12	21.98	0.99 (d)	6.5	10, 11	13	11
13	21.16	0.94	6.5	10, 11	12	12, 13
14	15.30	0.88 (s)		6, 7, 15	7, 14, 15	
15	37.92	1.59 (m)		14, 16a, 16b		16
16	25.42	Ha:1.8-1.9 Hb:1.8-1.9		17, 18	15, 16a(16b), 16b(16a)	12, 13, 16a(16b), 16b(16a)
17	126.04	4.92 (m)		16a, 16b, 19, 20		20
18	131.84			16a, 16b, 19, 20		
19	18.09 ^a	1.49 (d)		17, 18	16a, 16b	
20	25.87	1.56 (s)		17, 18		27
21	28.62	Ha:1.93-1.99 (m) Hb:1.60-1.69 (m)		22, 23	8a, (21), 8b 21), 21a(21b), 21b(21a)	7, 21a(21b), 21b(21a)
22	123.77	4.90 (m)		21a, 21b, 24, 25		25
23	134.25			21a, 21b, 24, 25		
24	18.15	1.48 (d)		28, 22	25	
25	25.97	1.59 (s)		22, 28		
26	22.50	Ha:3.05 (d,d) Hb:2.99 (d,d)	7.1, 14.8 7.1, 14.8	28, 27	26a(26b), 26b(26a)	26a(26b), 26b(26a)
27	122.53	5.00 (m)		26a, 26b, 29, 30		26
28	133.60			26a, 26b, 29, 30		
29	26.05	1.55 (s)		27		
30	17.84	1.61 (s)		27		
31	30.69	Ha: 2.32 (d,d) Hb :2.41 (d,d)	7.1, 14.8 6.7, 14.9	9, 32, 33	31a (31b), 31b (31a)	31a(31b), 31b(31a), 32
32	120.86	4.87 (m)		31a, 31b, 34, 35		31
33	134.71			31a, 31b, 34, 35		
34	18.25	1.59 (s)		32, 33	35	
35	26.15	1.53 (s)		32, 33		

3.2.1.1. Derivatisierung von Hyperforin mit Acetylchlorid

Einige Kohlenstoffsignale (Positionen 1, 2, 4, 5, und 8) waren aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie im aromatischen Ring verbreitert (vgl. Abbildung 25). Um dies zu unterbinden, war es nötig, durch eine gezielte Derivatisierung von Hyperforin die Keto-Enol-Tautomerie aufzuheben. In der Literatur war bereits bekannt, daß Hyperforin mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid verestert werden kann. Diese Verbindung wurde von Bystrov *et al.* zur Bestimmung der relativen Stereochemie von Hyperforin hergestellt (Bystrov *et al.*, 1983).

Nach einigen Vorversuchen mit verschiedenen Säurechloriden, erwies sich die Acetylierung mit Acetylchlorid in Triethylamin am besten geeignet, da nur zwei weitere Kohlenstoffe eingefügt werden und es dabei zu keiner Signalüberlappung mit den bereits vorhandenen Kohlenstoffen kommt. Das dabei entstandene Acetyl-Hyperforin wurde NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei wurden sowohl 1D als auch 2D NMR-Experimente (HMBC, HMQC, COSY und NOESY) durchgeführt (vgl. Abbildung 26, Abbildung 27, Abbildung 28, Tabelle 15).

In Abbildung 26 ist ein Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Acetyl-Hyperforin zu sehen. Bei diesem Experiment werden Kohlenstoff-Wasserstoff-Korrelationen über mehrere Bindungen gemessen. Dadurch konnte zugeordnet werden, welche Signale zu einer Seitenkette gehören. So zeigen z. B. alle olefinischen Kohlenstoffatome long-range CH-Korrelationen mit den ^1H -Signalen der Methylgruppen sowie mit den ^1H -Signalen der benachbarten Methylengruppen einer Seitenkette.

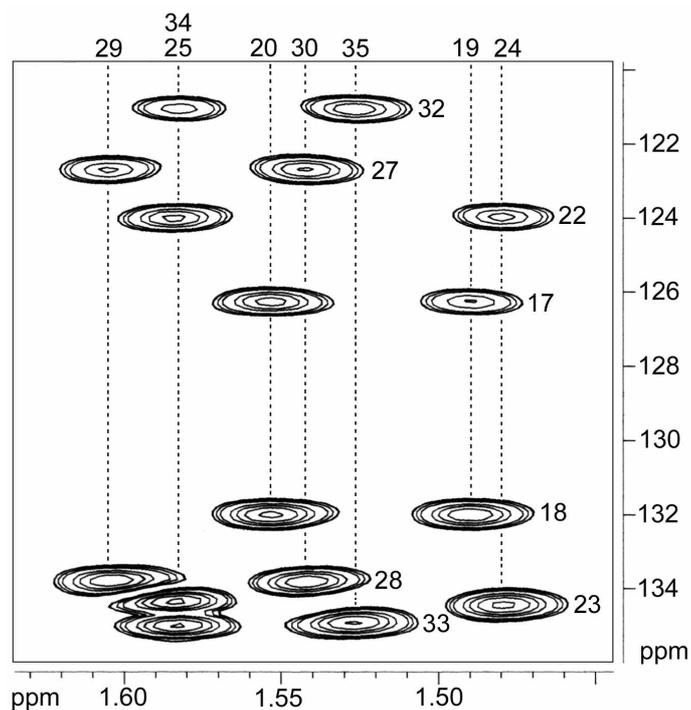


Abbildung 26: Ausschnitt aus dem HMBC von 2-Acetyl-Hyperforin

Im NOESY-Spektrum, bei dem Wasserstoff-Wasserstoff-Korrelationen über den Raum bestimmt werden können, korreliert jeweils die *E*-ständige Methylgruppe der Seitenketten mit dem Wasserstoff der CH-Gruppe (vgl. Abbildung 27).

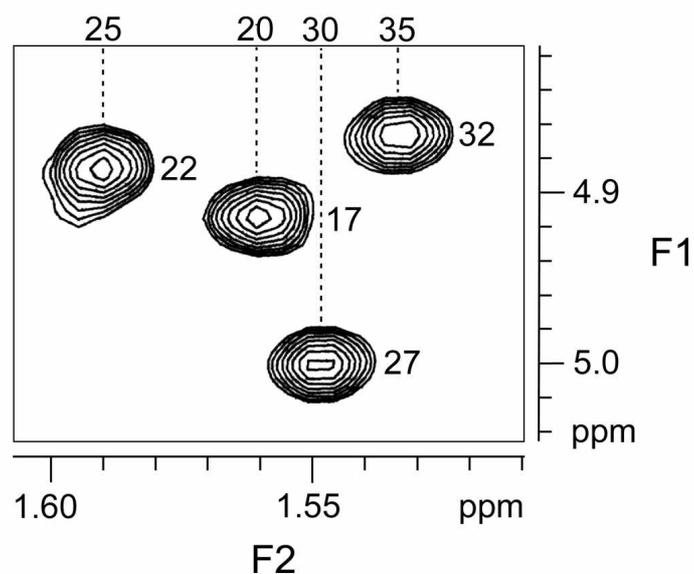


Abbildung 27: Ausschnitt aus dem NOESY von 2-Acetyl-Hyperforin

Dadurch konnten alle Kohlenstoffe und Wasserstoffe einer Seitenkette zugeordnet werden. Unter Berücksichtigung der Korrelationen zum Bicyklus konnten letzten Endes die Kohlenstoffe zugeordnet werden, die die Seitenketten tragen und schließlich die Struktur von Acetyl-Hyperforin bestimmt werden. Interessanter Weise wurde ausschließlich Position 2 acetyliert, was dadurch belegt werden konnte, daß C-2 mit H-8, H-26 und H-31 korrelierte, wohingegen C-4 nur mit H-26 korrelierte.

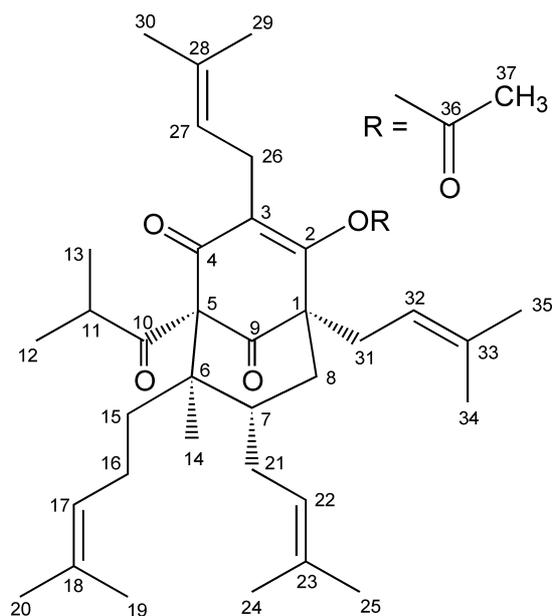


Abbildung 28: Strukturformel von 2-Acetyl-Hyperforin

Somit wurde die Struktur der bis dahin noch nicht bekannten Verbindung 2-Acetyl-Hyperforin gelöst. Die Kohlenstoffe 1, 2, 4, 5 und 8 gaben nun scharfe Signale. Dadurch konnte mit dieser Verbindung, die sich in einem Schritt aus Hyperforin synthetisieren läßt, die Analysen zur Biosynthese von Hyperforin durchgeführt werden.

Tabelle 15: Beobachtete NMR Korrelationen von 2-Acetyl-Hyperforin

<i>Position</i>	<i>HMBC</i>	<i>NOESY</i>	<i>COSY</i>	<i>INADEQUATE</i>
1	8a, 8b, 31a, 31b, 32(w)			
2	8a, 8b, 26a, 26b, 31a, 31b(w)			
3	26a, 26b			
4	26a, 26b			
5	14, 15b			
6	8b, 14, 15b			14
7	8a, 8b, 14		8a, 8b, 21a, 21b	8
8	21a, 21b, 31a, 31b	8a(8b), 8b(8a), 14(8a), 31a(8a), 31b(8b)	8a(8b), 8b(8a), 7	7
9	8b, 31a, 31b			
10	11, 12, 13			
11	12, 13	12, 13, 26a	12, 13	12
12	11, 13	11	11	11
13	11, 12	11	11	11
14		8a, 15a, 15b(w), 16a, 16b,		6
15	14, 16a, 16b	15a(15b), 15b(15a), 14(15b)	15a(15b), 15b(15a), 16a, 16b	
16		14, 16a(16b), 16b(16a), 19	16a(16b), 16b(16a), 15a, 15b, 17	17
17	15a(w), 15b(w), 16a, 16b(w), 19, 20	20	16a, 16b, 19, 20	16
18	16a, 16b(w), 19, 20			19
19	17, 20	16a(w), 16b(w)	17	18
20	17, 19	17	17	
21	7, 8a, 8b, 22	21a(21b), 21b(21a)	21a(21b), 21b(21a), 7, 22	22
22	21a, 21b, 24, 25	25	21a, 21b, 24,	21
23	21a(w), 21b(w), 24, 25			24
24	22, 25		22	23
25	22, 24	22		
26	27	26a(26b), 26b(26a), 27(26a, 26b)	26a(26b), 26b(26a), 27	27
27	26a, 26b, 29, 30	26a, 26b, 30	26a, 26b	26
28	26a, 26b, 29, 30			29
29	27, 30			28
30	27, 29	27		
31	8a, 8b, 32	8a(31a), 8b(31b), 31a(31b), 31b(31a), 32(31a, 31b), 34(31a, 31b)	31a(31b), 31b(31a), 32	32
32	31a, 31b, 34, 35	35, 31a, 31b	31a, 31b	31
33	31a, 31b, 34, 35			
34	32, 35	31a, 31b		
35	32, 34	32		
36	37			
37				

Tabelle 16: Beobachtete NMR Daten von 2-Acetyl-Hyperforin

<i>Position</i>	¹³ C chem. Verschiebung (<i>d, ppm</i>)	¹ H chem. Verschiebung (<i>d, ppm</i>)	<i>J_{HH}</i> (Hz)
1	58.70		
2	164.47		
3	135.28		
4	195.04		
5	85.80		
6	51.08		
7	42.82	1.82 (m)	
8	39.42	Ha: 1.40 (m), Hb: 2.02 (m)	
9	207.60		
10	210.03		
11	44.08	1.89 (m)	
12	20.75	1.04 (d)	6.5
13	21.61	0.95 (d)	6.6
14	14.64	0.96 (s)	
15	37.67	Ha: 1.50(m), Hb: 1.70 (m)	
16	25.66	Ha: 1.99 (m), Hb: 1.81 (m)	
17	125.67	4.96 (m)	
18	132.08		
19	17.95	1.58 (s)	
20	25.86	1.61-1.66	
21	28.17	Ha: 2.05 (m) Hb: 1.74 (m)	7.2, 14.9
22	123.57	4.99 (m)	
23	133.85		
24	18.02	1.66 (s)	
25	25.89	1.61-1.66	
26	24.72	Ha: 2.97 (d,d) Hb: 2.86 (d,d)	7.3, 14.7
27	121.04	5.00 (m)	
28	134.81		
29	17.74	1.64 (s)	
30	25.92	1.61-1.66	
31	30.98	Ha: 2.75 (d,d) Hb: 2.35 (d,d)	6.4, 15.0
32	120.39	5.00 (m)	
33	135.11		
34	18.28	1.71 (s)	
35	26.08	1.61-1.66	
36	168.41		
37	20.55	2.26 (s)	

3.2.1.2. Stabilität von Hyperforin

In der Literatur war bekannt, daß Johanniskrautextrakte und speziell deren Hauptbestandteil Hyperforin instabil sind (Maisenbacher *et al.*; 1992, Berghöfer *et al.*, 1986). Dies ist jedoch insofern fraglich, da handelsübliche, industriell hergestellte Extrakte bei ihrer Herstellung mehrfach thermischer Belastung und oxidativen Einflüssen ausgesetzt sind (Melzer *et al.*, 1998) und ihre Wirksamkeit und somit der Gehalt an Hyperforin erhalten bleibt.

Es konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, daß Hyperforin hingegen anderen Meinungen (Orth *et al.*, 1999a) in Methanol sehr stabil ist. Wurde die Verbindung in Methylenchlorid an der Luft bei Raumtemperatur stengelassen, so konnten mittels NMR-Spektroskopie mehrere Zersetzungsprodukte gefunden werden, die im einzelnen jedoch nicht zuzuordnen waren. Der Gehalt an Hyperforin nahm innerhalb eines Tages schnell ab. Führte man parallel dazu den Versuch in Methanol durch, so war die Verbindung erstaunlicher Weise einige Tage stabil, ohne das ein Verlust an Hyperforin NMR spektroskopisch beobachtbar war. Orthofofin, welches nach (Orth *et al.*, 1999a) unter diesen Bedingungen als Hauptprodukt entstehen soll, konnte nicht gefunden werden. Somit scheint Methanol im Gegensatz zu anderen Lösungsmitteln einen stabilisierenden Effekt zu haben.

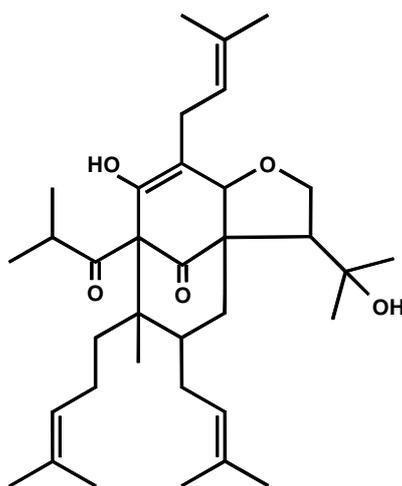


Abbildung 29: Strukturformel von Orthofofin

3.2.2. Einbauversuche mit [U-¹³C₆]-Glukose und [1-¹³C]-Glukose an *Hypericum perforatum*

3.2.2.1. Durchführung der Einbauversuche

Für die Einbauversuche wurden im Frühsommer (Ende Mai) je 30 Stengel *Hypericum perforatum* abgeschnitten und sofort mit einer Lösung von 1 % (w/w) [1-¹³C]Glukose (99 % ¹³C-Anreicherung) bzw. mit einer 0.05 % (w/w) [U-¹³C₆]Glukoselösung (99% Anreicherung, 0.95 % (w/w) unmarkierte Glukose) inkubiert. Da in dieser Vegetationsperiode die Biosynthese von Hyperforin vermehrt stattfindet, wurden die Pflanzen so ausgewählt, daß bereits Knospen ausgebildet waren (Maisenbacher und Kovar, 1992; Melzer *et al.*, 1998). Das Johanniskraut wurde im Dunkeln bei 20 °C inkubiert. Dadurch sollte gewährleistet sein, daß möglichst wenig Glukose in den Stoffwechsel der Photosynthese abfließt. Damit während der Versuchsdauer möglichst viel der markierten Nährlösung aufgenommen wurde, wurden die Stielenden mit einer Rasierklinge täglich um wenige Millimeter verkürzt. Nach ca. 14 Tagen war die Wasseraufnahme nur noch minimal und die Pflanzen wurden aufgearbeitet (vgl. Kapitel 2.3.17. und 2.3.18).

Das isolierte Hyperforin wurde NMR-spektroskopisch untersucht und anschließend in sein 2-Acetyl-Derivat überführt. Dadurch konnten die Kohlenstoffe aus dem Bicyclus, die vorher breite Signale ergaben und nicht auswertbar waren, analysiert werden. Außerdem war durch die Einführung der Acetylgruppe eine Referenzierung auf diese beiden Kohlenstoffe mit natürlichen ¹³C-Gehalt möglich, wodurch die absoluten Anreicherungen der markierten Verbindungen bestimmt werden konnten (vgl. Kapitel 2.3.2.2).

3.2.2.2. Ergebnisse des Einbauversuchs mit [U-¹³C₆]-Glukose

Nach der NMR-spektroskopischen Auswertung der isolierten Verbindung konnte die Isotopomerzusammensetzung von Hyperforin bzw. 2-Acetyl-Hyperforin analysiert werden.

In Abbildung 30 sieht man, daß C-2 sowohl mit C-3 (Kopplungskonstante 79 Hz) als auch mit C-1 (Kopplungskonstante 47.6 Hz) koppelt. Ebenso koppelt C-4 mit C-3 und C-5. Die Kopplungskonstanten sind jeweils unterschiedlich groß (vgl. Abbildung 30 und Tabelle 17). Bei C-9 hingegen sieht man nur ein Dublett (Kopplungskonstante 37.0 Hz). Dieses ist jedoch doppelt so hoch wie die Satelliten der anderen Kohlenstoffe des Sechsrings. Das bedeutet, dass in diesem Fall die Kopplungskonstanten der Isotomere $[5,9-^{13}\text{C}_2]$ - und $[9,1-^{13}\text{C}_2]$ gleich groß sind und damit zusammenfallen (vgl. Abbildung 30).

Für die Kohlenstoffe 1-5 und 9 lassen sich zusammenfassend die Isotomere $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$, $[3,4-^{13}\text{C}_2]$, $[4,5-^{13}\text{C}_2]$, $[5,9-^{13}\text{C}_2]$ und $[9,1-^{13}\text{C}_2]$ ableiten.

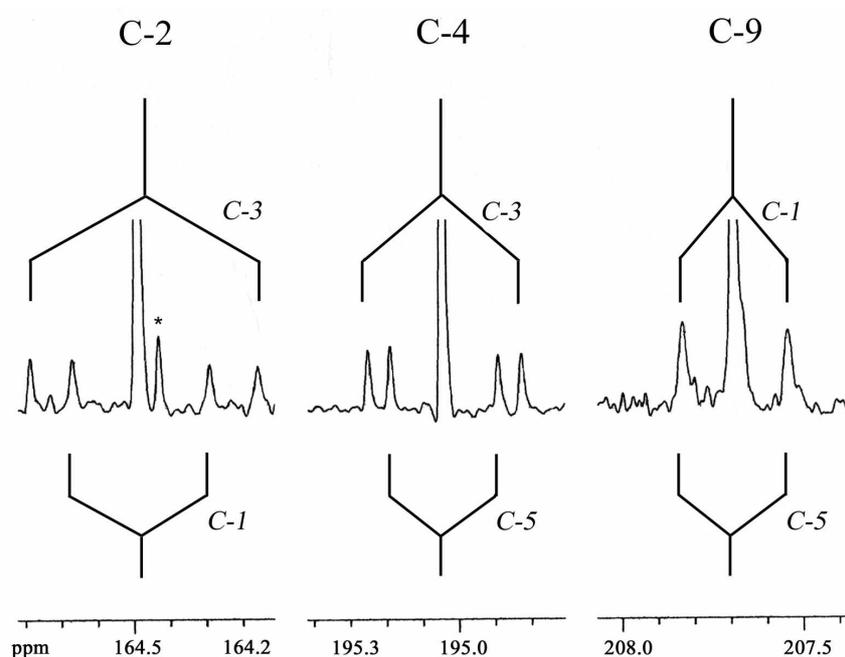


Abbildung 30: ^{13}C -NMR Signale und die dazugehörigen Kopplungsbäume der Kohlenstoffe C-2, C-4, C-9 aus 2-Acetyl-Hyperforin nach Einbau von $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose

Für die Seitenketten (C-21-25, C-31-35, C-26-30) ergibt sich folgendes Kopplungsmuster: es koppelt jeweils die *Z*-ständige Methylgruppe mit dem quartären Kohlenstoff, sowie die CH-Gruppe der Doppelbindung mit der Methylengruppe. Außerdem sind Isotomere vorhanden, deren Signale zusätzlich long-range Kopplungen von C-16, C-17, C-21, C-22, C-26, C-27, C-31 und C-32 zu den *E*-ständigen Methylgruppen zeigen (30, 35, 25) (vgl. Abbildung 31, gekennzeichnet mit

*)). Damit ergibt sich die die Anwesenheit der Isotopomere $[26,27,29-^{13}\text{C}_3]$, $[21,22,25-^{13}\text{C}_3]$ und $[31,32,35-^{13}\text{C}_3]$.

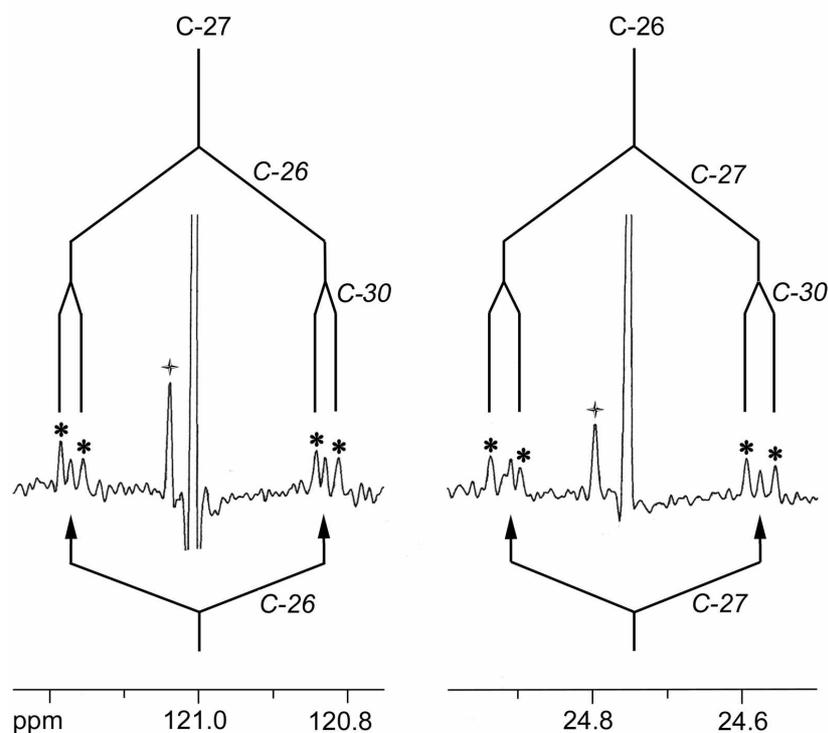


Abbildung 31: Ausschnitt der ^{13}C -NMR-Spektren von 2-Acetyl-Hyperforin. Gezeigt sind die Signale und die dazugehörigen Kopplungsbäume der Kohlenstoffe 26 und 27. +: Verunreinigung.

Die Positionen 20, 25, 30 und 35 weisen ferner eine ^{13}C -Anreicherung (vgl. Abbildung 33, gekennzeichnet mit *).

Die C_{10} -Einheit von Hyperforin, bestehend aus C-6-8 und C-14-20 zeigt vier $^{13}\text{C}_2$ Isotopomere, sowie ein $^{13}\text{C}_3$ Isotopomer ($[16, 17, 20-^{13}\text{C}_3]$). In der Acylseitenkette gibt es Isotopomere mit einem Zweierblock ($[10, 12-^{13}\text{C}_2]$).

In Abbildung 32 ist ein Ausschnitt aus dem INADEQUATE abgebildet. Auch hier ist eine weitere Beleg für die Anwesenheit von ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen über eine Bindung dargestellt (z.B. korreliert C-26 mit C-27).

Damit ergibt sich das in Abbildung 33 dargestellte Markierungsmuster, wobei insgesamt 21 verschiedene Isotopomere erkennbar sind. Die abgebildeten Zahlen, deren Berechnung in Kapitel 2.3.2.3 erklärt ist, entsprechen mol %.

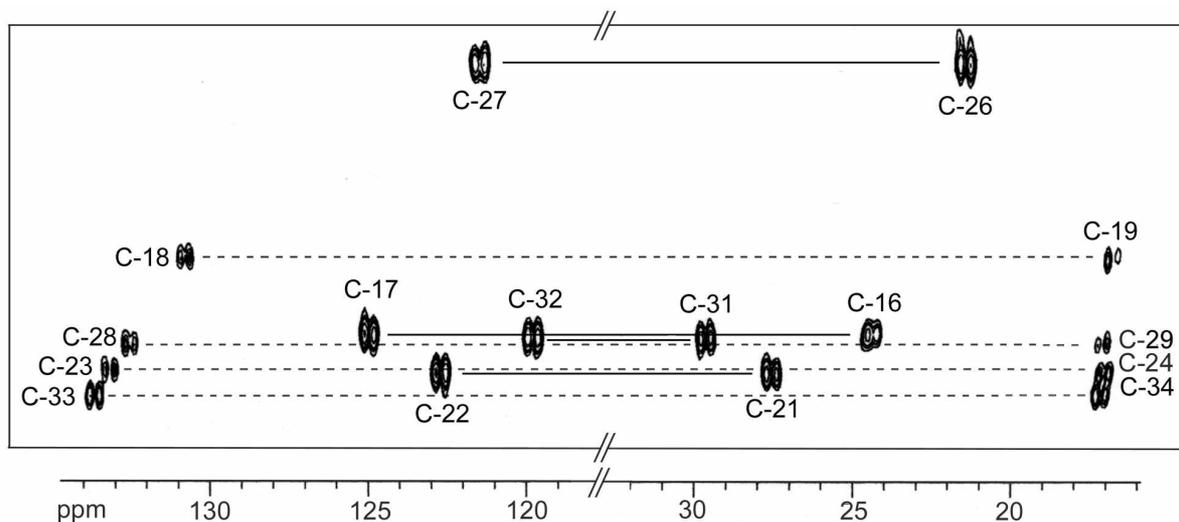


Abbildung 32: Ausschnitt aus dem INADEQUATE von 2-Acetyl-Hyperforin

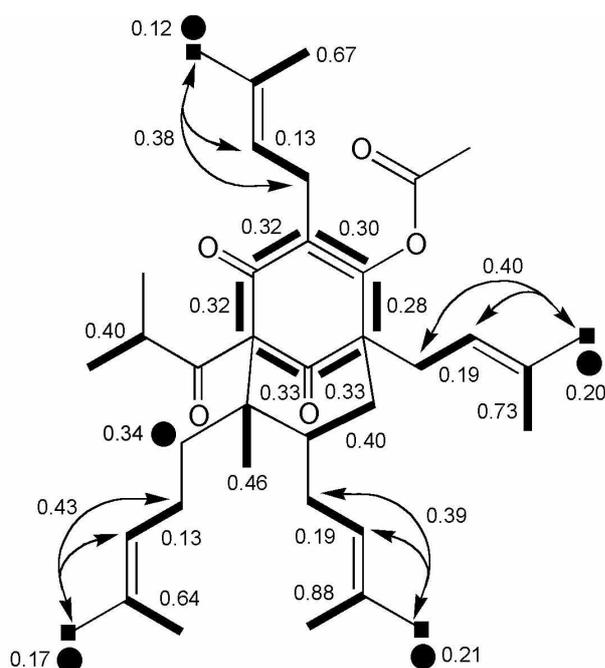


Abbildung 33: Beobachtetes Markierungsmuster von 2-Acetyl-Hyperforin nach Einbau von $[U-^{13}C_6]$ Glukose. Zweifach markierte Isotopomere, die markierte Kohlenstoffe eines Moleküls miteinander verbinden, sind mit durchgezogenen dicken Linien gekennzeichnet; dreifach markierte Isotopomere sind mit Pfeilen dargestellt; ^{13}C -Anreicherungen an einzelnen Positionen mit schwarzen Kreisen.

In Tabelle 17 sind alle Kopplungskonstanten, Kopplungspartner, absoluten Anreicherungen und % Isotopomer tabellarisch zusammengefaßt.

Bei der Berechnung der durchschnittlichen ^{13}C -Anreicherung über alle Kohlenstoffe von Hyperforin und 2-Acetyl-Hyperforin ergibt sich ein Wert von 1.8 ± 0.3 %. Würde man davon ausgehen, daß das isolierte Hyperforin ausschließlich aus der markierten Glukose gebildet wurde, müßte die absolute Anreicherung ungefähr 6 % betragen. Diesen Wert erhält man, wenn man berücksichtigt das 5 % der verfütterten Glukose ^{13}C -markiert war und der natürliche ^{13}C -Gehalt 1.1 % beträgt. Vergleicht man diesen hypothetischen Wert mit den beobachteten Wert, so kommt man zu dem Ergebnis, daß ungefähr 30 % von Hyperforin während des Einbauexperiments neu gebildet wurde bzw. 70 % bereits zu Beginn des Einbauversuchs vorhanden waren (ausgenommen ist die Fixierung von unmarkierten CO_2 bzw. der Abbau von Lipiden und Eiweißen).

Tabelle 17: Kopplungskonstanten, ^{13}C -Anreicherungen und relative Mengen an mehrfach ^{13}C -markierten Isotopomeren in Hyperforin (**1**) und 2-Acetyl-Hyperforin (**2**) nach Einbau mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose und $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -Glukose

Position	Precursor						
	$[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -Glukose		$[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose				J_{CC} (Hz)
	$\%^{13}\text{C}$		$\%^{13}\text{C}$		$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$		
1	2	1	2	1	2	2	
1	n.d.	2.7	n.d.	2.2	n.d.	29.9 (2, 9)	37.0 (9), 47.6 (2)
2	n.d.	1.3	n.d.	1.8	n.d.	14.9 (3), 15.3 (1)	79.0 (3), 47.6 (1)
3	2.4	2.4	1.6	1.9	n.d.	16.9 (2), 16.3 (4)	53.1 (4), 79.0 (2)
4	n.d.	1.3	n.d.	2.0	n.d.	15.7 (2), 15.7 (3)	53.1 (3), 37.0 (5)
5	n.d.	2.5	n.d.	2.2	n.d.	29.6 (1, 9)	37.0 (4, 9)
6	n.d. ^a	1.0	n.d. ^a	1.6	n.d. ^a	28.1 (14)	36.1 (14)
7	1.1	1.1	1.5	1.3	23.3 (8)	23.6 (8)	35.0 (8)
8	2.8	2.0	n.d.	1.6	n.d.	28.9 (7)	35.0 (7)
9	1.2	1.3	1.8	2.2	31.4 (1, 9)	31.1 (1, 9)	37.0 (1,5)
10	1.2	1.2	1.5	1.5			
11	1.0	1.1	n.d.	1.6	n.d.	31.5 (12)	34.1 (12)
12	2.0	1.9	1.5	1.4	23.7 (11)	22.0 (11)	34.1 (11)
13	2.0	2.0	1.5	1.3			
14	2.5	2.5	1.7	1.7	30.5 (6)	28.2 (6)	36.1 (6)
15	1.2	1.2	1.4	1.4			
16	2.2	2.3	1.6	1.7	10.1 (17), 24.9 (17, 20)	10.4 (17), 25.2 (17, 20)	43.3 (17), 4.2 (20)
17	1.2	1.1	1.8	1.7	8.4 (16), 24.9 (16, 20)	7.8 (16), 25.2 (16, 20)	43.3 (16), 3.5 (20)
18	1.3	1.3	1.8	2.1	32.1 (19)	31.0 (19)	42.2 (19)
19	2.9	3.0	1.8	2.3	33.1 (18)	n.d.	42.2 (18)
20	1.5	1.3	1.7	1.7			
21	2.2	2.3	1.6	1.7	11.1 (22), 24.3 (22, 25)	10.7 (22), 22.4 (22, 25)	44.0 (32), 4.2 (25)
22	1.1	1.1	1.8	1.7	10.2 (21), 23.7 (21, 25)	10.7 (21), 22.4 (21, 25)	43.9 (21), 3.8 (25)
23	1.2	1.4	1.8	2.3	33.0 (24)	33.2 (24)	42.2 (24)
24	2.8	2.7	1.8	n.d.	31.4 (23)	n.d.	42.2 (23)
25	1.4	1.4	1.7	1.7			
26	2.1	2.1	1.8	1.8	10.2 (27), 25.6 (27, 30)	10.4 (27), 25.2 (27, 30)	43.4 (27), 4.6 (30)
27	1.1	1.1	1.9	1.8	10.0 (26), 24.9 (26, 30)	10.4 (26), 25.6 (26, 30)	43.4 (26), 3.3 (30)
28	1.3	1.3	1.8	2.2	32.2 (30)	33.3 (30)	42.2 (29)
29	1.5	1.5	1.6	n.d.			42.2 (28)
30	2.8	2.9	1.8	2.2	32.0 (28)	27.2 (28)	
31	2.2	2.0	1.6	1.7	10.1 (32), 27.2 (32, 35)	8.8 (32), 24.5 (32, 35)	44.4 (32), 3.3 (35)
32	1.1	1.1	1.8	1.7	9.2 (31), 25.4 (31, 35)	8.8 (31), 24.5 (31, 35)	44.8 (31), 3.2 (35)
33	1.4	1.4	2.0	2.3	34.9 (34)	37.4 (34)	42.2 (34)
34	2.6	2.6	1.8	1.9	34.8 (33)	32.1 (33)	42.2 (33)
35	1.4	1.4	1.6	2.1			
36		1.2		1.4			
37		1.1		1.1			

^a nicht bestimmt wegen Signalüberlappung mit d^4 MeOD

3.2.2.3. Ergebnisse des Einbauversuchs mit [1-¹³C]-Glukose

Die NMR-Analyse von Hyperforin bzw. 2-Acetyl-Hyperforin ergab, daß die Signalintensitäten einiger Kohlenstoffe die Intensität der Methylgruppe aus der Acetylseitenkette (C-37, nachträglich eingeführt aus Acetylchlorid mit einer natürlichen Anreicherung von 1.1 %) ungefähr um den Faktor 2 übertreffen (vgl. Abbildung 34).

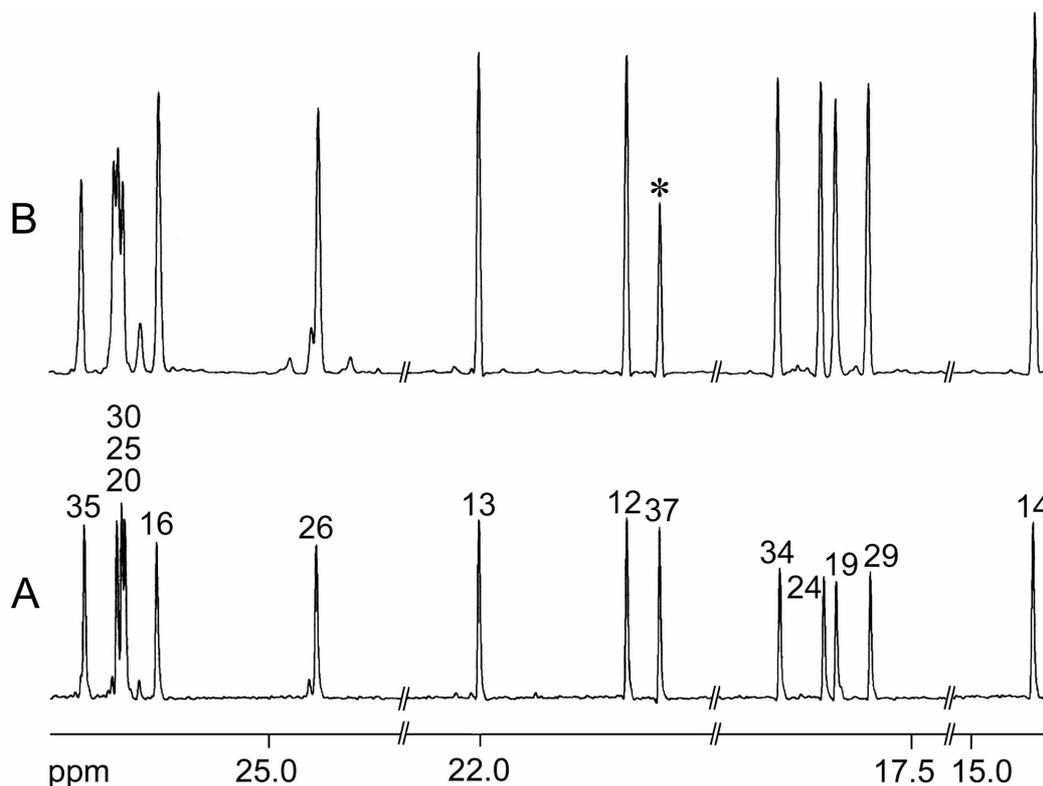


Abbildung 34: Ausschnitt aus dem ¹³C-Spektrum von 2-Acetyl-Hyperforin. Spur A: Spektrum mit natürlicher Anreicherung. Spur B: aus dem Experiment mit [1-¹³C]-Glukose

Es sind jeweils die Z-ständigen Methylgruppen, sowie die Methylengruppen der Seitenketten angereichert. Außerdem sind die beiden Methylgruppen der Acylseitenketten, sowie C-1, C-3, C-5 und C-8 aus dem Bicyklus und die Methylgruppe C-14 markiert.

Damit sind insgesamt 15 Kohlenstoffatome von 2-Acetyl-Hyperforin ¹³C angereichert, wobei der Durchschnittswert 2.4 ± 0.3 % beträgt. Die unmarkierten Kohlenstoffe zeigen hingegen eine ¹³C-Anreicherung von 1.2 ± 0.1 %, was innerhalb der Fehlergrenzen im Rahmen der natürlichen Anreicherung liegt (vgl. Abbildung 35).

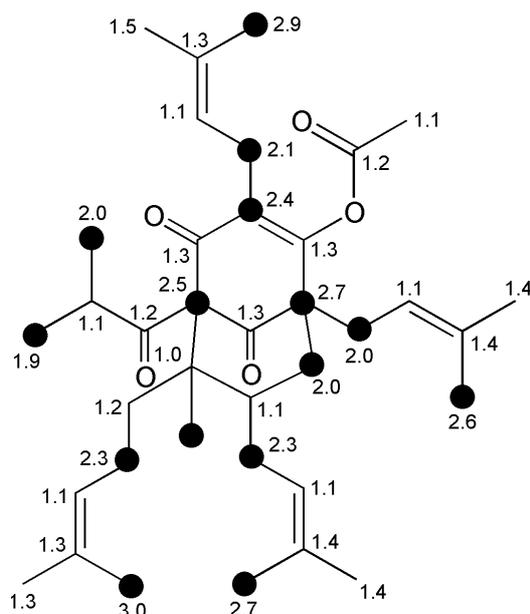


Abbildung 35: Beobachtetes Markierungsmuster von 2-Acetyl-Hyperforin nach Einbau von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukose. Kohlenstoff 37 wurde auf 1.1 % natürliche Anreicherung kalibriert

3.2.3. Diskussion der Ergebnisse des Einbauversuchs mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -Glukose und $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukose

Es ist bekannt, daß Pflanzen Glukose über die Glykolyse und den Pentosephosphatzyklus abbauen (Goese *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Aus diesem Grund können die Markierungsmuster potentieller terpenoider Intermediate, wie z. B. Acetyl-CoA als Vorstufe des Mevalonatweges oder Pyruvat als Vorstufe des alternativen Terpenbiosyntheseweges, vorhergesagt werden (Eisenreich und Bacher, 2000).

Ausgehend von $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose entstehen bei der Glykolyse und dem reduktiven Pentosephosphatzyklus $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ - und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Glyceraldehyd-3-phosphat. Außerdem ist Position 1 ^{13}C -angereichert (vgl. Abbildung 36,). Analog entsteht aus $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose $[3-^{13}\text{C}]$ Glyceraldehyd-3-phosphat. Im weiteren Verlauf entsteht $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ - und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glucose und $[3-^{13}\text{C}]$ Pyruvat aus $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose. Durch Decarboxylierung entsteht $[\text{U}-^{13}\text{C}_2]$ Acetyl-CoA aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose bzw. $[2-^{13}\text{C}]$ Acetyl-CoA aus $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose. Aus diesen Vorstufen des DXP-Weges und Mevalonatweges lassen sich nun die Markierungsmuster von IPP und DMAPP vorhersagen (vgl. Abbildung 36).

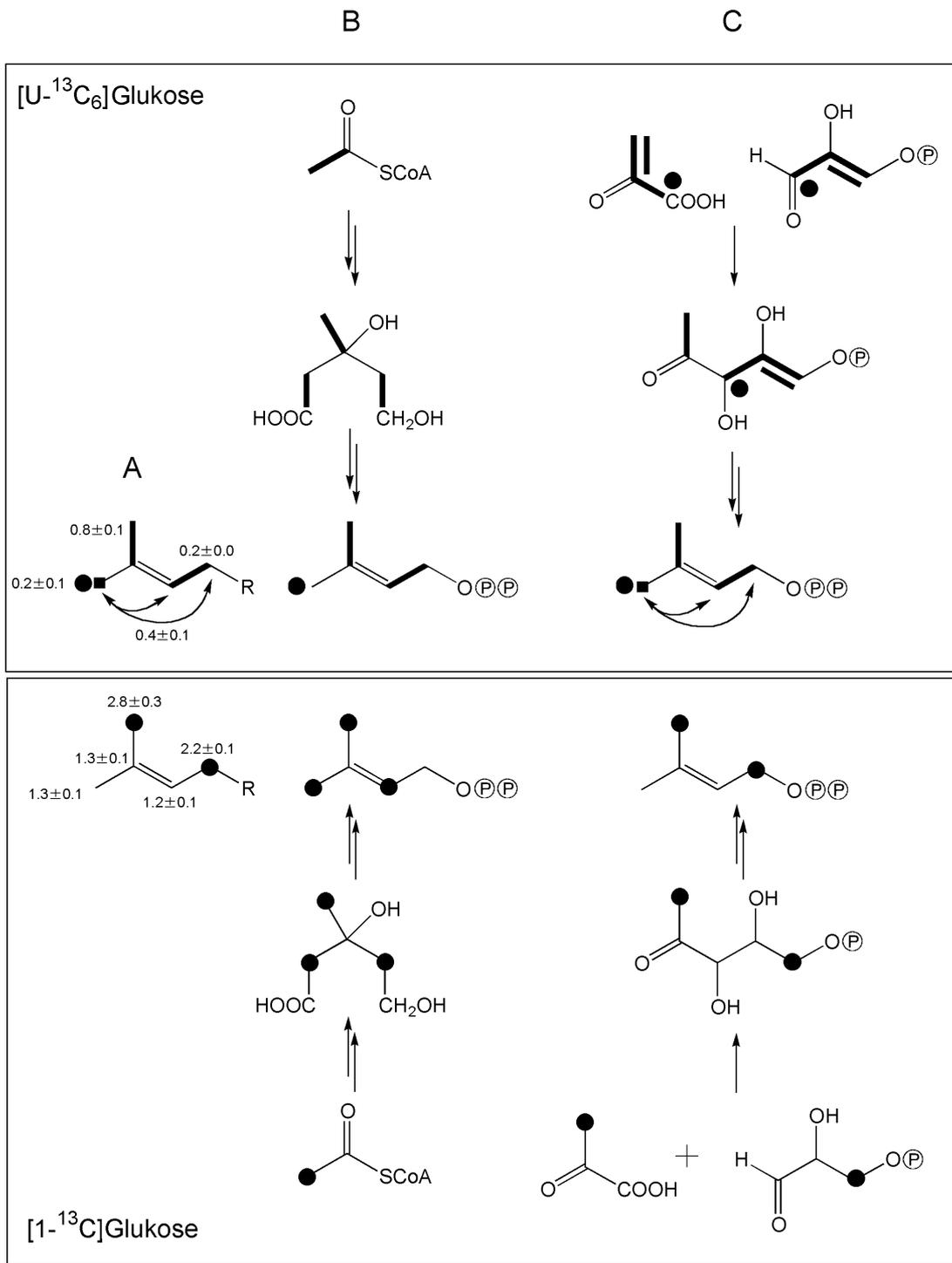


Abbildung 36: Beobachtetes (A) und erwartetes Markierungsmuster von DMAPP nach Applikation von [U-¹³C₆]Glukose und [1-¹³C]Glukose nach dem Mevalonatweg (B) und dem DXP-Weg (C)

Ein Vergleich mit den beobachteten Markierungsmuster zeigt, daß die DMAPP-Einheiten in Hyperforin bzw. 2-Acetyl-Hyperforin hauptsächlich (> 95 %) über den

DXP-Weg synthetisiert werden. Die $^{13}\text{C}_3$ -markierten Isotopomere lassen sich nicht mit dem Markierungsmuster aus dem Mevalonatweg vereinbaren (vgl. Abbildung 36).

Bei den zehn Kohlenstoffen C-6-8 und C-14-20 könnte es sich um eine Geranyleinheit, bestehend aus DMAPP (C-16-20) und IPP (C-6-8, C-15 und C-14) handeln. Um dies zu überprüfen wurden die Markierungsmuster der entsprechenden Einheiten in Abbildung 37 gegenübergestellt.

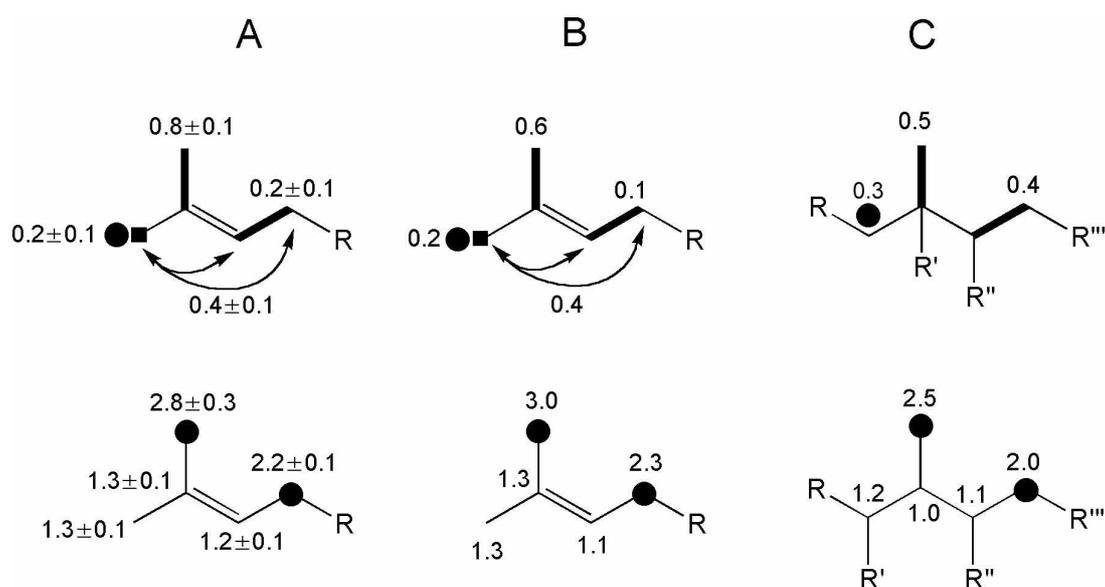


Abbildung 37: Beobachtetes Markierungsmuster von DMAPP (A) und der Geranyleinheit, bestehend aus einer DMAPP-Einheit (B) und einer IPP-Einheit (C) nach Einbau von $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose (untere Zeile) und $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose (obere Zeile)

Die C_5 -Einheit bestehend aus C-8, C-7, C-6, C-15 und C-14 (Spalte C) ist biologisch äquivalent mit IPP. Das Markierungsmuster aus dem Einbauversuch mit $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose stimmt gut mit dieser Hypothese überein. Das Markierungsmuster ist ähnlich zu den gemittelten Werten der anderen drei Seitenketten von DMAPP, mit der Ausnahme, daß das C_3 -Isotopomer aus dem Versuch mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose nicht vorhanden ist (vgl. Abbildung 37). Dafür ist jedoch der Zweierblock zwischen C-7 und C-8 größer. Das Gleiche gilt für die ^{13}C -Anreicherung von Position 15 (). Der Dreierblock ist offensichtlich vorhanden, die $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ long-range Kopplungskonstante liegt jedoch unterhalb der Detektionsgrenze und ist deshalb nicht sichtbar.

3.2.3.1. Mechanismus der Biosynthese von Hyperforin

Das Markierungsmuster des Phloroglucinolring deutet darauf hin, daß der Ring ausgehend von Isobutyryl-CoA synthetisiert wird, wobei nach Anlagerung von drei Einheiten Malonyl-CoA ein lineares Polyketid entsteht, welches im nächsten Schritt zyklisiert. Das vorhergesagte Markierungsmuster aus [1-¹³C]Glukose und [U-¹³C₆]Glukose würde sehr gut mit den beobachteten Daten übereinstimmen. Vor allem könnte das symmetrische Markierungsmuster aus dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]Glukose erklärt werden, da man durch das zyklische Intermediat eine C2-Rotationsachse legen kann. Damit können die Kopplungsblöcke entsprechend gespiegelt vorliegen.

Ähnlich wie bei der Biosynthese von Humulon (Goese *et al.*, 1999) scheint sich auch hier die aliphatische Seitenkette der Phloroglucin-Einheit von einer Aminosäure, in diesem Fall Valin, abzuleiten. Das Markierungsmuster der Startereinheit Isobutyryl-CoA, daß sich aufgrund der Biosynthese ausgehend von zwei Molekülen Pyruvat, über Acetolactat und α -Ketoisovalerat ergibt, stimmte mit dem beobachteten Ergebnis überein (vgl. Abbildung 38).

Im Experiment mit [U-¹³C₆]Glukose zeigen die beiden diastereotopen Methylgruppen C-12 und C-13 von Hyperforin unterschiedliche Markierungsmuster. Kohlenstoff 12 mit einer chemischen Verschiebung von 20.75 ppm koppelt mit Kohlenstoff 11 (Kopplungskonstante 34.1 Hz), wohingegen Kohlenstoff 13 mit einer chemischen Verschiebung von 21.61 ppm ein Singulett ist. Da die Stereospezifität der Reduktoisomerase aus der Valinbiosynthese bekannt ist (Crout *et al.*, 1980), muß die ¹³C-gekoppelte Methylgruppe in Hyperforin pro-*R* sein.

Die Bildung von Hyperforin aus der nicht substituierten Acylphloroglucinol-Vorstufe benötigt eine dreifache elektrophile Substitution am aromatischen Ring. Dabei sind ein Geranylpyrophosphat und zwei DMAPP-Einheiten involviert. Außerdem kommt es zur Ausbildung des Bicyklus, indem eine dritte DMAPP-Einheit an der 2'-3'-Doppelbindung der vorher eingeführten Geranyleinheit angreift. Mechanistische Überlegungen führen zum Ergebnis, daß der Cyclisierung die Quaternisierung des Kohlenstoffs, an dem die Geranyleinheit hängt, vorausgehen muß, da sonst ein Brückenkopf-Enolat-Ion auftreten würde. Diese Schlußfolgerung stimmt mit den Überlegungen von Bystrov überein (Bystrov *et al.*, 1975). Aufgrund der Stereochemie von C-6 und C-7 in Hyperforin (Brondz *et al.*, 1982, 1983) muß der Ringschluß durch eine Anti-Addition an der (*E*)-Doppelbindung der Vorstufe stattfinden.

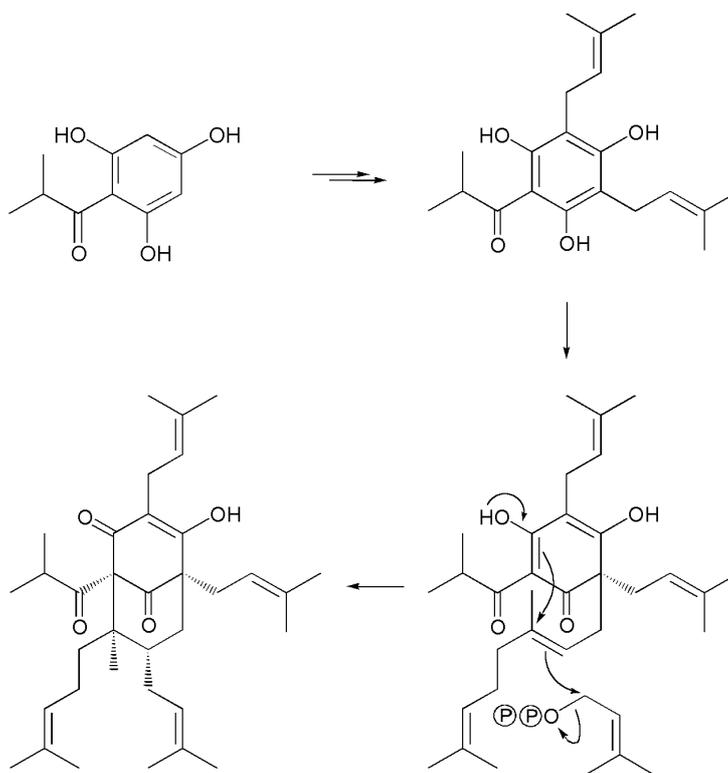


Abbildung 39: Biosyntheseschema von Hyperforin

3.3. Stoffwechselfluß und Aminosäurebiosynthese in Insektenzellen *Spodoptera frugiperda*

Der Stoffwechselfluß der zentralen Intermediate von Eukaryonten und Prokaryonten kann mittels NMR Analyse unter Verwendung von stabilisotopmarkierten Vorstufen untersucht werden.

Die metabolischen Reaktionen sind in einem hohen Ausmaß durch enzymkatalysierte Reaktionen miteinander verbunden. Deshalb reicht es aus, die große Anzahl von Metaboliten auf eine relativ kleine Anzahl von Verbindungen zu reduzieren. Die Zusammensetzung der Isotopomere der daraus resultierenden Stoffwechselprodukte kann dann aufgrund bekannter Enzymreaktionen abgeleitet werden.

Primärmetaboliten wie Aminosäuren und Nucleinsäuren stammen biosynthetisch aus sogenannten Pools kleiner Moleküle ab, die durch anabolische Reaktionen entstehen. Diese Primärmetaboliten leiten sich von einfachen Kohlenhydraten, Carbonsäuren und Dicarbonsäuren ab. Die Produkte des primären Stoffwechsels werden in Polymere wie Proteine und Nucleinsäuren eingebaut, wo sie in der Regel nicht weiter umgesetzt werden. Aus diesem Grund reflektieren diese Endprodukte die Isotopanreicherung des zentralen Pools der Intermediate zum Zeitpunkt ihrer Bildung wieder. Damit kann das Markierungsmuster der zentralen Metabolite eines Pools durch Analyse der Grundbausteine von Proteinen und Nucleinsäuren bestimmt werden (Eisenreich und Bacher, 2000; Bacher *et al.*, 1999).

Die Anwendung dieser Technik ist an Bakterien (Rieder *et al.*, 1998), Pilzen (Werner *et al.*, 1997), Pflanzenkulturen (Eichinger *et al.*, 1999) und Pflanzenteilen (Goese *et al.*, 1999) in den letzten Jahren beschrieben worden.

Insektenzellen können als effiziente Quelle zur Expression bestimmter eukaryontischer Proteine dienen, die nicht in üblichen bakteriellen Stämmen exprimiert werden können.

Für die Strukturaufklärung von Proteinen mittels mehrdimensionaler NMR Spektroskopie ist die Einführung von Stabilisotopen unersetzlich. Die Verfütterungsexperimente wurden deshalb anfangs geplant, um in Insektenzellen Bedingungen für die vollständige bzw. differentielle Markierung von Proteinen mit Stabilisotopen zu finden.

3.3.1. Einbauversuche mit [U-¹³C₆]Glukose in *S. frugiperda* Zellen

Die folgenden Experimente wurden an unserem Lehrstuhl in enger Zusammenarbeit mit Dr. M. Gütlich durchgeführt, der die Insektenzellen kultivierte.

Um die Verwertung von Glukose bei der Biosynthese von Aminosäuren in Insektenzellkulturen zu untersuchen, wurden *S. frugiperda* Zellen in einem käuflichen Medium (SF 900 II, Gibco) kultiviert, das [U-¹³C₆]Glukose und unmarkierte Glukose im Verhältnis 1 : 99 enthielt. Zuerst wurden die Zellen in SF 900 II Medium in 250 ml Flaschen kultiviert, die 20 ml Kulturvolumen enthielten. Bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen / ml wurden die Zellen mit 100 ml Medium versetzt, das die markierte Glukose enthielt. Bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen / ml wurden die Zellen abzentrifugiert, in 300 ml ¹³C-markierten Medium aufgenommen und in eine 1 l Spinnerflasche überführt. Als die Zellen eine Dichte von 1×10^6 Zellen / ml erreichten, wurde die Kultur auf 700 bzw. 1200 ml Volumen verdünnt. Die Zellen wurden in 3 l Spinnerflaschen überführt. Bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen / ml wurden die Zellen geerntet, gewaschen und die Lipide durch Extraktion entfernt (vgl. Kapitel 2.3.19). Ribonukleotide wurden durch Hydrolyse von RNA mit Natronlauge gewonnen, dephosphoryliert und durch HPLC-Chromatographie gereinigt (vgl. Kapitel 2.3.20). Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde durch Zugabe von Salzsäure hydrolysiert und die enthaltenen Aminosäuren durch Säulenchromatographie isoliert (vgl. Kapitel 2.3.20).

Von den isolierten Ribonukleotiden und Aminosäuren wurden ¹H- und ¹³C-NMR Spektren aufgenommen. Die ¹³C-Signale von Isotopomeren, die zwei oder mehr Kohlenstoffe tragen, zeigen Satelliten, die durch ¹³C-¹³C Kopplungen zustande kommen. Die Anreicherung von markierten Isotopomeren kann aus dem Verhältnis von Zentralsignal, das die natürliche ¹³C-Anreicherung widerspiegelt, und dem Integral der Satellitensignale, das die markierte Substanz widerspiegelt, berechnet werden (vgl. Kapitel 2.3.2.1). Der jeweilige Anteil eines Isotopomers wird am besten in Molprozent ausgedrückt (vgl. Kapitel 2.3.2.3). Dazu werden die relativen Mengen der angereicherten Isotopomere mit der absoluten Anreicherung multipliziert.

Bei der ¹³C-NMR Analyse zeigte sich, daß die Riboseseitenkette von Cytidin markiert war. So waren für die Positionen 1', 2', 3' und 5' im ¹³C-NMR Spektrum neben dem Zentralsignal zusätzliche Dubletts vorhanden (vgl. Abbildung 40). Das

Kopplungsmuster des Ribosekohlenstoffs 4' war komplexer und zeigte die Gegenwart von verschiedenen molekularen Spezies.

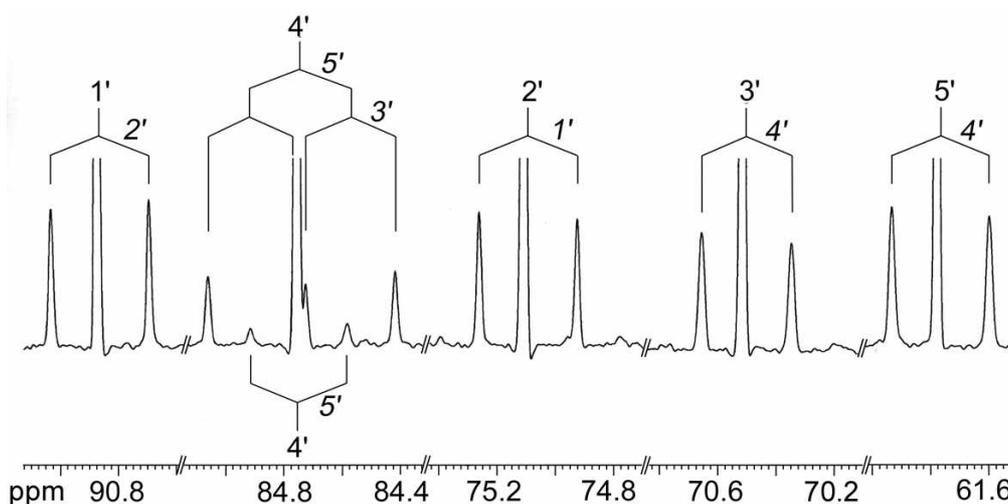


Abbildung 40: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR Spektrum der Zuckersignale von Cytidin

Das Isotopomer $[1,2\text{'-}^{13}\text{C}_2]$ Cytidin war zu $22.3 \pm 0.3\%$ vorhanden (vgl. Tabelle 18). Durch Multiplikation der absoluten Anreicherungen von Kohlenstoff 1' (1.6 %) bzw. 2' (1.6 %) ergab sich eine Konzentration dieses Isotopomers zu $0.37 \pm 0.6\text{ mol}\%$. Wendet man dieses Verfahren auf die restlichen Kohlenstoffe an, so ergab sich, daß Isotopomer $[3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_3]$ zu 0.37 % und $[3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_3]$ Cytidin zu 0.05 % gebildet wurde.

Das Markierungsmuster der Riboseseitenketten von Adenosin und Guanosin waren mit dem von Cytidin vergleichbar (vgl. Abbildung 41, Tabelle 18), da die Biosynthese der Riboseeinheiten aller Nukleotide über den selben Biosyntheseweg abläuft.

$[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ Ribose oder andere mehrfach markierte Isotopomere waren nicht vorhanden. Daraus folgt, daß Ribose hauptsächlich über der reduktiven Zweig des Pentosephosphatzykluses gebildet wurde und die oxidative Decarboxylierung kaum eine Rolle spielte.

Im Pyrimidinteil von Cytidin konnten bei Kohlenstoff 4 und 5 jeweils ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 55.5 bzw. 55.3 Hz (vgl. Tabelle 18) beobachtet werden. Dies entsprach dem Vorhandensein des Isotopomers $[4,5\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Cytidin.

Die Kohlenstoffe des Purinringsystems von Adenosin und Guanosin zeigten keine signifikant höheren Werte molekularer Spezies, die mehr als zwei ^{13}C -Atome tragen.

Diese Daten belegen, daß Purine unter den gegebenen Bedingungen aus dem Medium aufgenommen und nicht neu gebildet werden.

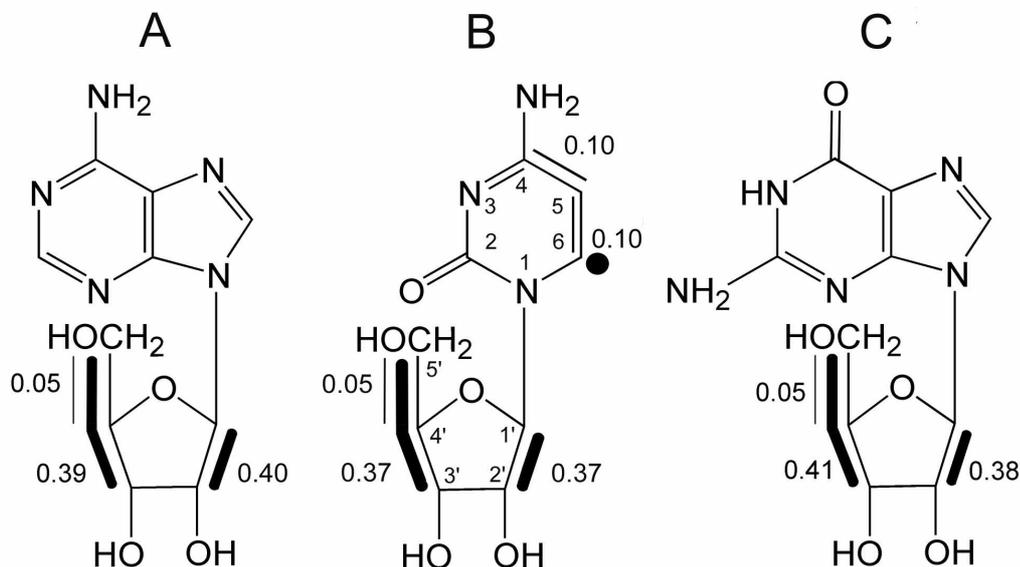


Abbildung 41: Beobachtetes Markierungsmuster von Adenosin (A), Cytidin (B), und Guanidin (C) nach Einbau von $[U-^{13}C_6]$ Glukose in *S. frugiperda* Zellen. Markierte Isotopomere sind mit durchgezogenen dicken Linien gekennzeichnet; ^{13}C -Anreicherungen an einzelnen Positionen mit schwarzen Kreisen.

Die chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten, absoluten Anreicherungen und relativen Mengen der ^{13}C -markierten Isotopomere der isolierten und spektroskopierten Nukleoside, sind in Tabelle 18 zusammengefaßt.

Tabelle 18: Chemische Verschiebungen, Kopplungskonstanten, ^{13}C -Anreicherungen und relative Mengen an mehrfach ^{13}C -markierten Isotopomeren der isolierten Nukleoside nach Einbau von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose in *S. frugiperda* Zellen

Verbindung	Position	^{13}C NMR Chem. Verschiebung (d, ppm)	Kopplungskonstante J_{CC} (Hz)	% ^{13}C	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Guanosin	6	156.4		1.3	
	2	153.8		1.1	
	4	150.1		1.1	
	5	115.7		1.0	
	8	135.6		1.2	
	1'	86.5	42.9 (2')	1.7	22.8 (2')
	2'	73.7	42.9 (1')	1.7	22.3 (1')
	3'	70.2	38.4 (4')	1.7	24.1 (4')
	4'	85.2	41.8 (5'), 38.0 (3')	1.6	26.0 (5'), 2.8 (3')
5'	61.3	42.0 (4')	1.7	26.5 (4')	
Cytidin	2	159.7		1.1	
	4	168.4	55.5 (5)	1.3	7.3 (5)
	5	98.9	55.3 (4)	1.2	8.5 (4)
	6	144.4		1.2	
	1'	92.2	42.7 (2')	1.6	22.1 (2')
	2'	76.6	42.5 (1')	1.6	22.8 (1')
	3'	71.9	38.7 (4')	1.5	25.3 (4')
	4'	86.4	38.7 (3'), 42.0 (5')	1.6	23.7 (5'), 2.8 (3')
	5'	63.5	42.0 (4')	1.5	27.4 (4')
Adenosin	2	154.7		1.1	
	4	150.6		n.b.	
	5	121.3		n.b.	
	6	157.8		2.7	
	8	142.7		1.1	
	1'	90.4	42.7 (2')	1.7	23.5 (2')
	2'	75.8	42.5 (1')	1.8	22.8 (1')
	3'	72.7	38.5 (4')	1.7	26.0 (4')
	4'	87.9	41.8 (5'), 38.3 (3')	1.6	24.6 (5'), 2.9 (5')
5'	63.6	41.3 (4')	1.7	25.9 (4')	

Erwartungsgemäß zeigten die Aminosäuren, die essentiell für Säugetiere sind, keine erhöhte ^{13}C -Anreicherung innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen (vgl. Tabelle 19). Eine signifikant erhöhte ^{13}C -Anreicherung wurde für Glutamat, Aspartat und

Alanin gefunden. [5,6-¹³C₂]Glutamat hatte eine Konzentration von 0.30 mol %. Diese Werte wurden wie oben beschrieben aus den absoluten Anreicherungen und der relativen Menge des Isotopomers berechnet (vgl. Tabelle 19). Bei Aspartat konnten die beiden Isotopomere [3,4-¹³C₂]Aspartat und [1,2-¹³C₂]Aspartat zu 0.14 mol % bzw. 0.13 mol % bestimmt werden (vgl. Abbildung 42). Die Anreicherung dieser markierten Spezies war vergleichbar mit der Anreicherung von [4,5-¹³C₂]Cytidin. Da Aspartat als biosynthetische Vorstufe der Pyrimidinbasen dient, kann aufgrund der Ähnlichkeit der Anreicherungen der Isotopomere geschlossen werden, daß diese vom gleichen Pool abstammen.

Alanin zeigte drei verschiedene Isotopomere. Der größte Anteil hatte hierbei [1,2,3-¹³C₃]Alanin mit 0.41 mol %. Darüber hinaus konnte [1,2-¹³C₂]Alanin zu 0.02 % und [2,3-¹³C₃]Alanin zu 0.07 mol % beobachtet werden. Daraus läßt sich schließen, daß Alanin hauptsächlich aus dem Triosepool gebildet wurde.

Die chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten, absoluten Anreicherungen und relativen Mengen der ¹³C-markierten Isotopomere der einzelnen Aminosäuren sind in Tabelle 19 zusammengefaßt.

Tabelle 19: Chemische Verschiebungen, Kopplungskonstanten, ¹³C-Anreicherungen und relative Mengen an mehrfach ¹³C-markierten Isotopomeren der isolierten und markierten Aminosäuren nach Einbau von [U-¹³C₆]Glukose in *S. frugiperda* Zellen

Verbindung	Position	¹³C NMR Chem. Verschiebung (d, ppm)	Kopplungskonstante J_{CC} (Hz)	%¹³C	%¹³C¹³C
Aspartat	1	182.9	n.b.	n.d.	n.b.
	2	61.3	60.4 (1)	1.8	7.4 (1)
	3	45.9	55.3 (4)	1.9	7.2 (4)
	4	185.1	55.7 (3)	1.8	7.6 (3)
Alanin	1	175.7	n.b.	n.b.	n.b.
	2	51.4	59.6 (1), 34.9 (3)	1.8	3.8 (3), 22.2 (1, 3)
	3	18.4	35.1 (2)	1.7	26.5 (2)
Glutamat	1	176.1		1.3	
	2	56.2		1.0	
	3	27.9		1.1	
	4	32.5	55.1 (5)	1.8	17.1 (5)
	5	179.6	55.1 (4)	1.7	17.2 (4)

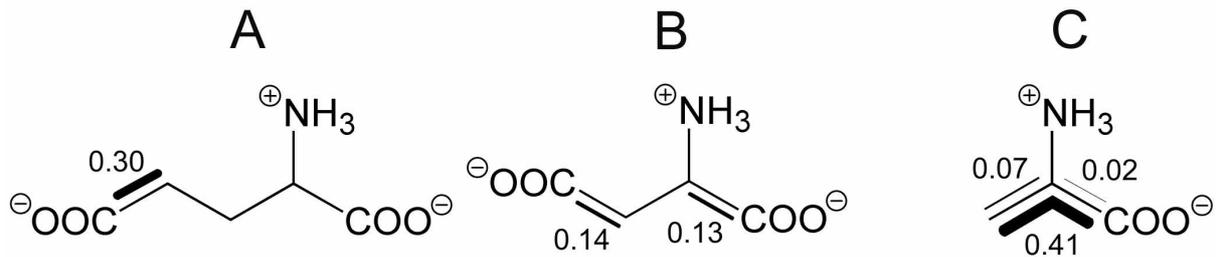


Abbildung 42: Beobachtetes Markierungsmuster von Glutamat (A), Aspartat (B) und Alanin (C) nach Einbau von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose in *S. frugiperda* Zellen. Zweifach markierte Isotopomere, die markierte Kohlenstoffe eines Moleküls miteinander verbinden, sind mit durchgezogenen dicken Linien gekennzeichnet.

3.3.2. Einbauversuch von ^{15}N -markierten Phenylalanin an *S. frugiperda* Zellen

Um den Einbau von Aminosäuren aus dem Kulturmedium durch *S. frugiperda* Zellen zu untersuchen, wurde ein zweites Experiment mit ^{15}N -markierten Aminosäuren durchgeführt.

Hierzu wurde die Wachstumsrate der Zellen bestimmt, die auf einem Medium wachsen, das unterschiedliche Mengen der Aminosäure enthielt, die im Einbauversuch ^{15}N -markiert verfüttert werden sollte. Im Fall von Phenylalanin enthielt das Standardmedium 1000 mg/l der Aminosäure. Die Menge konnte auf 100 mg/l reduziert werden, ohne dass die Wachstumsrate beeinträchtigt wurde.

Somit konnte das Einbauexperiment in einem Medium durchgeführt werden, das 100 mg/l $[\text{}^{15}\text{N}]$ Phenylalanin enthielt. Alle anderen Komponenten des Mediums wurden in den Standardmengen zugegeben.

Die erhaltenen Zellen wurden gewaschen und wie in Kapitel 2.3.19 und 2.3.20 beschrieben aufgearbeitet. Nach der Hydrolyse der Proteine wurde je ein Aliquot der sauren, basischen und neutralen Aminosäuren entnommen und mit Trifluoressigsäureanhydrid und butanolischer HCl zu den entsprechenden N-TFA-Butylestern derivatisiert (vgl. Kapitel 2.3.21, Abbildung 43). Bei der anschließenden GC/MS-Analyse wurden die Signalintensitäten der Bruchstücke mit denen der derivatisierten Standardaminosäuren verglichen (Leimer *et al.*, 1977). Zur Auswertung des ^{15}N -Einbaus erwies sich im Fall von Phenylalanin das Bruchstück $m/z = 216$ des

entsprechenden N-Trifluoracetyl-n-butylesters am geeignetsten (vgl. Abbildung 43). Dabei ergab sich ein Einbau von $30\% \pm 8\%$. Die Interpretation des Molekülions war nicht möglich, da die Intensität zu gering war. Die anderen isolierten Aminosäuren wurden in gleicher Weise untersucht. Tyrosin, daß biosynthetisch aus Phenylalanin durch Hydroxylierung entsteht, trug keine ^{15}N -Markierung mehr. Bei allen anderen Aminosäuren wurde erwartungsgemäß keine ^{15}N -Markierung detektiert.

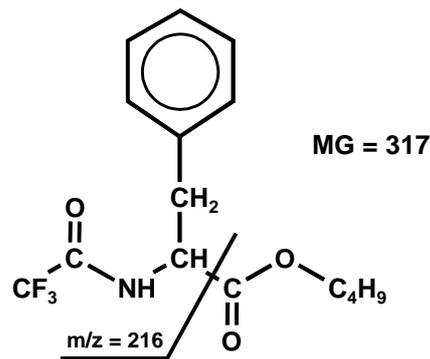


Abbildung 43: Strukturformel des N-Trifluoracetyl-n-Butylesters von Phenylalanin

Neben einer Analyse über GC/MS wurden die Aminosäuren auch durch NMR-Spektroskopie untersucht. Es wurde sowohl ein ^{13}C -NMR Spektrum (vgl. Abbildung 44) als auch ein ^{15}N -NMR Spektrum (vgl. Abbildung 45) aufgenommen. In Abbildung 44 sind die Kohlenstoffe 2 und 3 von Phenylalanin abgebildet. Kohlenstoff 2 mit einer chemischen Verschiebung von 55.91 ppm zeigte neben dem Signal der unmarkierten Verbindung ein um 50.9 ppb zu höheren Feld verschobenes Signal der ^{15}N -markierten Verbindung. Auch bei dem Signal von Kohlenstoff 3 mit einer chemischen Verschiebung von 38.93 ppm war ein kleineres Signal mit einem Shift von 37.6 ppb zu erkennen. Diese Verschiebungen waren stark pH abhängig und stimmten mit Literaturdaten überein (Blomberg *et al.*, 1976; Rabenstein und Mariappan, 1993). Zusätzlich war bei Kohlenstoff 2 eine $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -Kopplung mit 3.7 Hz zu beobachten. Durch Integration der NMR-Signale von Kohlenstoff 2 der markierten und der unmarkierten Verbindung ergab sich auch hier ein ^{15}N -Gehalt von 30 %, der sich gut mit den GC/MS-Daten deckte.

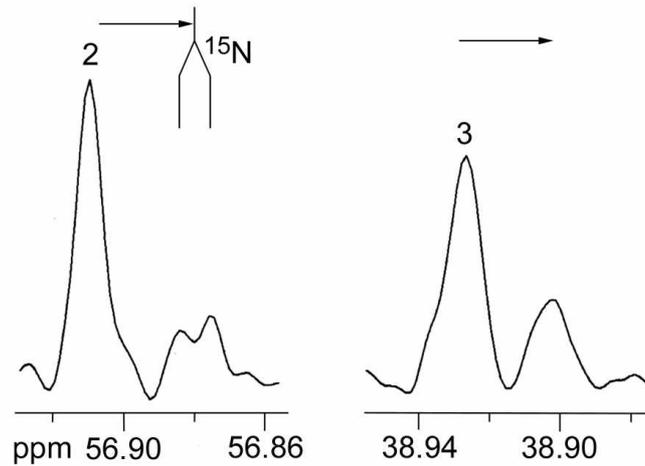


Abbildung 44: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR des Einbauversuches von ^{15}N -markierten Phenylalanin an *S. frugiperda* Zellen. Dargestellt sind Kohlenstoff 2 und 3 von Phenylalanin. Die intensiveren ^{13}C -Signale stammen von der unmarkierten Verbindung, die zu hohem Feld verschobenen Signale stammen von der ^{15}N -markierten Verbindung.

Von der isolierten Aminosäure wurde zusätzlich ein ^{15}N -NMR Spektrum aufgenommen. Wie in Abbildung 45 A zu sehen ist, beträgt die chemische Verschiebung des ^{15}N -NMR-Signals von ^{15}N -Phenylalanin 35.8 ppm. Um zu beweisen, daß es sich bei diesem Signal nicht lediglich um einen Artefakt handelt, wurde käufliches ^{15}N -Phenylalanin zutitriert und erneut ein Spektrum aufgenommen (vgl. Abbildung 45 B). Die Intensität des Signals bei 35.8 ppm konnte dadurch eindeutig erhöht werden.

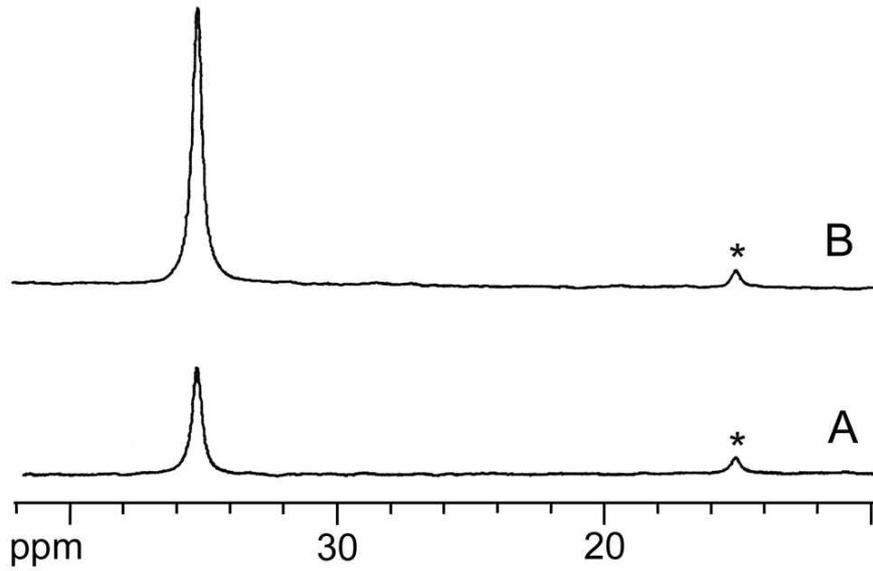


Abbildung 45: Ausschnitt aus dem ^{15}N -NMR des Verfütterungsversuches von ^{15}N -markierten Phenylalanin in *S. frugiperda* Zellen. A: ^{15}N -NMR des isolierten Phenylalanin. B: ^{15}N -NMR des isolierten Phenylalanin und zutitrierten käuflichen ^{15}N -Phenylalanin. *: Verunreinigung.

3.3.3. Diskussion der Ergebnisse der Einbauversuche mit ^{15}N -markierten Aminosäuren und $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose an *S. frugiperda* Zellen

Kulturen von *Spodoptera frugiperda* Zellen wurden basierend auf einem käuflichen Medium zusätzlich mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose versetzt (vgl. Kapitel 3.3.1), um die Aufnahme und Biosynthese von Aminosäuren in Insektenzellen zu untersuchen. Nach der Hydrolyse wurden die Aminosäuren und Ribonukleoside isoliert und durch ^1H - und ^{13}C -NMR Spektroskopie analysiert.

Das Zustandekommen der Isotopomere $[1',2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -, $[3',4',5'\text{-}^{13}\text{C}_3]$ und $[4',5'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Ribose der Nukleoside läßt sich über den reduktiven Zweig des Pentosephosphatzyklus durch Transketolase- und Transaldolasereaktion erklären. Würde auch der oxidative Zweig des Pentosephosphatzyklus durchlaufen, so müßte die Konnektivität aller fünf Kohlenstoffe erhalten bleiben. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die Pyrimidinbase von Cytidin wurde nur zu einem geringen Teil durch *de novo* Synthese gebildet. Der Pyrimidinring entsteht biosynthetisch aus Carbamoylphosphat und Aspartat. Im weiteren Verlauf der Biosynthese wird Kohlenstoff 4 des eingebauten Aspartatmoleküls decarboxyliert. Der Kopplungsblock zwischen C4 und C5 von Cytidin (entspricht C1 und C2 von Aspartat) stimmt innerhalb der Fehlergrenzen gut mit dem Markierungsmuster von Aspartat überein (vgl. Abbildung 41, Abbildung 42). Damit sollte Kohlenstoff 6 von Cytidin (entspricht C3 von Aspartat) eine erhöhte ^{13}C -Anreicherung zeigen. Durch Integration der ^{13}C -Satelliten im ^1H -Spektrum von H-6 ergab sich (vgl. Kapitel 2.3.2.2), daß die natürliche ^{13}C -Anreicherung dieser Position mit 1.2 % erhöht ist (vgl. Abbildung 41).

Die Kohlenstoffe der Purinbasen von Adenosin und Guanosin zeigten innerhalb des NMR Detektionslimit keine signifikant erhöhten ^{13}C -Anreicherungen. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, daß die Purinbasen unter den gegebenen Bedingungen nicht neu gebildet, sondern aus dem Medium aufgenommen wurden.

Glutamat und Aspartat zeigten ein Markierungsmuster, welches sich durch Durchlaufen des Citratzyklus erklären läßt. Das Isotopomer $[4,5\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Glutamat spiegelt aufgrund seiner Biosynthese über α -Ketoglutarat den Acetyl-CoA-Pool wider. Das symmetrische Markierungsmuster von Aspartat leitet sich von Oxalacetat

ab. Dieses wird beim Durchlaufen des Citratzyklus aus Succinat gebildet, das ein rotationssymmetrisches Zwischenprodukt in diesem Zyklus darstellt (Stryer, 1996).

Alanin zeigte hauptsächlich das Isotopomer (0.41 mol %), bei dem die Konnektivität der drei Kohlenstoffe erhalten blieb. Dies läßt sich durch direkten Abbau der Glukose zu Pyruvat über die Glykolyse und den Pentosephosphatzyklus ohne weitere Bindungsbrüche erklären. Das Isotopomer $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Alanin war mit 0.02 mol % nur zu einem sehr geringen Anteil vorhanden und läßt sich möglicherweise aus der Decarboxylierung von Oxalacetat durch die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase und nachfolgender Transaminierung erklären. Das Vorhandensein des Isotopomers $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Alanin mit nur 0.07 mol % konnte ausgehend von vollmarkierter Glukose über den reduktiven Pentosephosphatzyklus und anschließender Glykolyse erklärt werden.

Andere Aminosäuren wie Prolin, Arginin, Methionin, Threonin, Isoleucin, Lysin, Valin, Leucin und Histidin, die sich aus Glutamat, Aspartat, Alanin und Ribose ableiten, wurden unter den experimentellen Bedingungen nicht *de novo* biosynthetisiert.

Wie aus dem Versuch mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose bekannt war, werden unter den gegebenen Bedingungen Phenylalanin und Tyrosin nicht neu gebildet. Aufgrund dieser Erkenntnis, wurde ein weiteres Einbauexperiment geplant, wobei diesmal ^{15}N -Phenylalanin verfüttert wurde (vgl. Kapitel 3.3.2). Nach Hydrolyse der Proteine wurden Phenylalanin und Tyrosin isoliert. Sowohl durch NMR Spektroskopie (^{13}C und ^{15}N NMR) als auch durch GC/MS Analyse konnte gezeigt werden, daß ^{15}N -Phenylalanin ca. 70 % seiner Markierung durch Transaminierung verliert. Tyrosin, daß biosynthetisch aus Phenylalanin durch Hydroxylierung entsteht, trug keine ^{15}N -Markierung mehr.

Somit konnte gezeigt werden, daß unter den gegebenen Bedingungen nur sehr wenige Aminosäuren *de novo* gebildet werden. Das ursprüngliche Ziel, die Markierung von Aminosäuren von Proteinen, die in Insektenzellen exprimiert sind, durch Verfütterung mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose zu erzielen, konnte nicht erreicht werden. Statt dessen konnten aber interessante Informationen über die Biosynthese und Aufnahme von Aminosäuren in Insektenzellen gewonnen werden.

4. Zusammenfassung

Lange Zeit wurde angenommen, daß die Biosynthese der Terpenvorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) ausschließlich über den Mevalonatweg erfolgt. Durch Einbauversuche mit stabilisotop-markierten Vorstufen wurde vor wenigen Jahren in den Arbeitsgruppen von Arigoni und Rohmer gezeigt, daß ein zweiter Mevalonat-unabhängiger Biosyntheseweg von IPP und DMAPP in vielen Bakterien und in Pflanzen existiert. Die einzelnen Enzymschritte waren zu Beginn dieser Arbeit teilweise bekannt. Ausgehend von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat wird durch Beteiligung der Proteine IspC-F 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat gebildet.

Die folgenden Schritte dieses alternativen Terpenbiosyntheseweges wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* ausgehend von radioaktiv- und stabilisotop-markierten Verbindungen mittels HPLC und NMR-Spektroskopie untersucht.

Durch Verwendung von Zellextrakten aus rekombinanten *E. coli* Zellen, die das IspG Protein überexprimierten, wurde gezeigt, daß für die Umsetzung von ¹⁴C-markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat NADH und ein zweiwertiges Metall (vorzugsweise Co²⁺) als Cofaktoren essentiell sind (Abbildung 46).

Die weitere Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat wurde unter Verwendung von Extrakten aus IspH Expressionsklonen zu IPP und DMAPP durch HPLC beobachtet. Diese Reaktion benötigt ähnlich wie die vom IspG Protein katalysierte Reaktion NADH, ein zweiwertiges Metall (vorzugsweise Co²⁺) und zusätzlich FAD (vgl. Abbildung 46).

Außerdem wurde durch Verwendung von ¹³C-markiertem 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat mithilfe von Zellextrakten aus IspH Expressionsklonen mittels NMR-Spektroskopie gezeigt, daß bei der vom IspH Protein katalysierten Reaktion Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat, die Endprodukte dieses Stoffwechselweges, gebildet werden. Das molare Verhältnis von IPP und DMAPP betrug 6 : 1.

Ferner war es möglich, nach der Reinigung inaktives IspH Protein sowohl durch Rohextrakt aus *E. coli* Wildtyp Zellen als auch durch Zugabe von isolierten Chromoplasten aus *Capsicum annuum* zu aktivieren.

Mit Chromoplasten aus *Capsicum annuum* wurde sowohl die Umsetzung von ^{14}C -markiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat als auch die weitere Umsetzung zu Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat beobachtet.

Damit ergibt sich folgendes Schema für die letzten beiden Schritte des alternativen Terpenbiosyntheseweges:

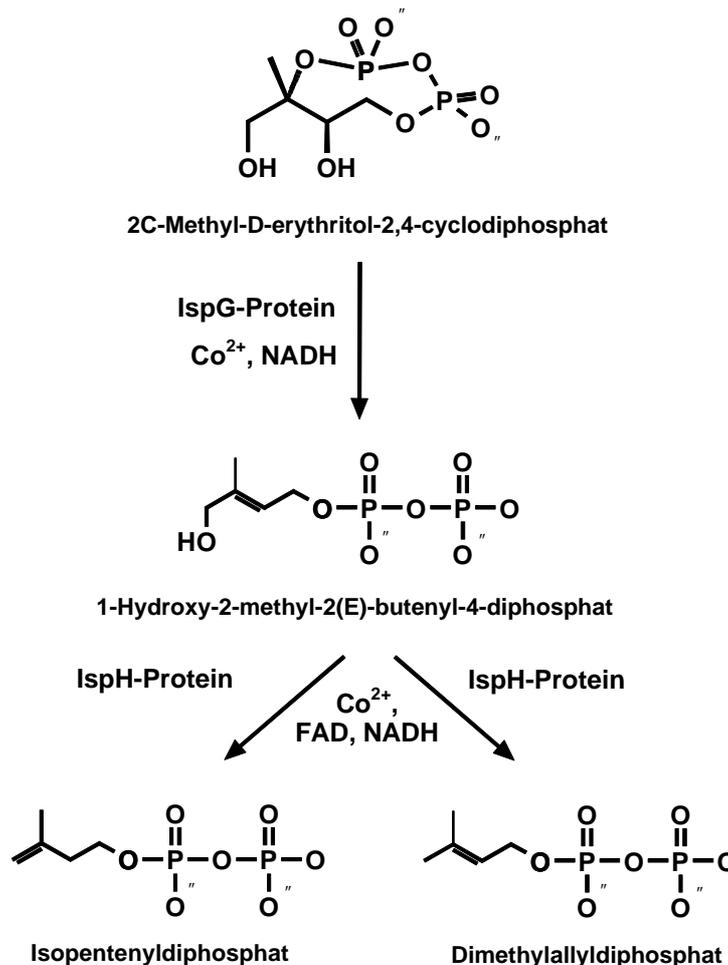


Abbildung 46: Schema der vom IspG und IspH Protein katalysierten Reaktionen

Desweiteren wurde durch Verfütterung von ^{13}C -markierten Glukosen die Biosynthese des Terpens Hyperforin (vgl. Abbildung 25) aus *Hypericum perforatum* untersucht. Sämtliche ^1H - und ^{13}C -NMR Signale von Hyperforin konnten über ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie zugeordnet werden.

Durch Stabilisotop-Einbauversuche mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ - bzw. $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose und anschließender ein- und zweidimensionaler NMR-Analyse von Hyperforin bzw. des entsprechenden Acetylderivats von Hyperforin wurde belegt, daß die

Isopreneinheiten nach dem Desoxyxyluloseweg gebildet werden. Insgesamt sind vier Dimethylallyleinheiten und eine Isopentenyleinheit vorhanden. Der aromatische Sechsring wird über den Polyketidweg synthetisiert. Die Acylseitenkette stammt offensichtlich aus der Biosynthese von Valin ab. Damit konnte ein Biosynthesevorschlag (vgl. Abbildung 39) ausgehend von Isobutyryl-CoA abgeleitet werden.

Durch Einbauversuche mit [U-¹³C₆]Glukose und ¹⁵N-markiertem Phenylalanin an *S. frugiperda* Zellen wurde das Markierungsmuster der isolierten Aminosäuren und Nukleoside untersucht.

Es zeigte sich, daß unter den verwendeten Kulturbedingungen nur wenige Aminosäuren markiert werden. Die Markierungsmuster von Aspartat und Glutamat sind im Einklang mit der Bildung von Oxalacetat und α -Ketoglutarat, die vom Citratzyklus gespeist werden. Das Alaninmuster kann erklärt werden durch Transaminierung von Pyruvat, das mit dem Triose-Pool austauscht. Phenylalanin wurde unter den gegebenen Bedingungen nicht in Tyrosin umgewandelt. Ferner deutete das Markierungsmuster der Riboseeinheiten der Nukleoside darauf hin, daß Glukose hauptsächlich durch den reduktiven Pentosephosphatzyklus metabolisiert wird.

5. Literaturverzeichnis

A

Adam, P., Eisenreich, W., Fellermeier, M., Hecht, S., Rohdich, F., Schuhr, C. A., Wungsintaweeikul, J., Zenk, M. H., Bacher, A. (2000). Deutsche Patentanmeldung Nr. 10027821.3

Altincicek, B., Kollas, A.-K., Sanderband, S., Wiesner, J., Beck, E., Jomaa, H. (2001a). GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 2411-2416.

Altincicek, B., Kollas, A.-K., Eberl, M., Wiesner, J., Sanderband, S., Hintz, M., Beck, E., Jomaa, H. (2001b). LytB, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **499**, 37-40.

Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10600-10605.

B

Bach, T. J. (1995). Some aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. A review. *Lipids* **30**, 191-202.

Bacher, A., Rieder, C., Eichinger, D., Arigoni, D., Fuchs, G., Eisenreich, W. (1999). Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 567-598.

- Banthorpe, D. V., Charwood, B. V., Francis, M. J. O. (1972). The biosynthesis of monoterpenes. *Chem. Rev.* **72**, 115-155.
- van Beek, E, Pietermann, E., Cohen, L., Löwik, C., Papapoulos, S. (1999). Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem. Biophys Research. Commun.* **264**, 108-111.
- Bender, S. L., Mehdi, S., Knowles, J. R. (1989). Dehydroquinate synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis. *Biochemistry* **28**, 7555-7560.
- Berghöfer, R., Hölzl, J. (1986). Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). *Dtsch. Apoth. Ztg.* **126**, 2569-2573.
- Beyer, P., Kreuz, K., Kleinig, H. (1980). β -Carotene synthesis in isolated chromoplasts from *Narcissus pseudonarcissus*. *Planta* **150**, 435-438.
- Bilia, A. R., Bergozzi, M. C., Mazzi, G., Vincieri, F. F. (2001). Analysis of plant complex matrices by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy: St. John's wort extract. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2115-2124.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- Bloch, K. (1992). Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. *Steroids* **57**, 378-383.
- Blomberg, F., Maurer, W., Rüterjans, H. (1976). ^{15}N nuclear magnetic resonance investigations on amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **73**, 1409-1413.
- Bochar, D. A., Friesen, J. A., Stauffacher, C. V., Rodwell, V. W. (1999). Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. In: *Comprehensive Natural Product Chemistry* (Vol. 2), Cane, D. (ed). Pergamon, 15-44.

- Broers, S. T. J. (1994). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli.*, Dissertation Nr. 10978, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz.
- Brondz, I., Greibrokk, T., Groth, P. A., Aasen, A. J. (1982). The relative stereochemistry of hyperforin - an antibiotic from *Hypericum perforatum* L.. *Tetrahedron Letters* **23**, 1299-1300.
- Brondz, I, Greibrokk, T., Groth, P., Aasen, A. J. (1983). The absolute configuration of Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L. based on the crystal structure determination of its p-bromobenzoate ester. *Acta Chem. Scand. A* **37**, 263-265.
- Brown, S. A. (1972). Biosynthesis – Vol. 1 Specialist periodical reports, The Chemical Society, London, 1-40.
- Bystrov, N. S., Chernov, B. K., Dobryin, V.N., Kolosov, M. N. (1975). The structure of hyperforin. *Tetrahedron Lett.* **16**, 2791-2794.

C

- Camara, B. (1985). Carotene synthesis in *Capsicum* chromoplasts. In: Methods in Enzymology, Vol. 110, Law, J. H. and Rilling, H.C. (eds), London: Academic Press, 267-273.
- Camara, B. (1993). Plant phytoene synthase complex: Component enzymes, immunology, and biogenesis. In: Methods in Enzymology, Vol. 214, Parker, L. (ed), London: Academic Press, 352-365.
- Campos, N., Rodriguez-Concepcion, M., Seemann, M., Rohmer, M., Boronat, A. (2001). Identification of *gcpe* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **488**, 170-173.

- Chang, A. C. Y., Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
- Charon, L., Hoeffler, J.-F., Pale-Grosdemange, C., Lois, L.-M., Campos, N., Boronat, A., Rohmer, M. (2000). Deuterium-labelled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem. J.* **346**, 737-742.
- Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S. K., Wonneman, M., Singer, A., Müller, W. E. (1998). Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extract. *Life Sci.* **63**, 499-510.
- Crout, D. H. G., Hedgecock, C. J. R., Lipscomb, E. L., Armstrong, F. B. (1980). Stereochemistry of valine biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **110**, 439-444.
- Cunningham, F. X., Jr., Lafond, T. P. T., Gantt, E. J. (2000). Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 5841-8.

D

- Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E., Izzo, A. A. (2001). St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *TRENDS in Pharmacological Sciences* **22**, 292-297.
- Dunford, J. E., Thompson, K., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Hahn, F. M., Poulter, C. D., Ebetino, F. H., Rogers, M. J. (2001). Structure-Activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *Pharmacology*, **296**, 235-242.

E

Eichinger, D., Bacher, A., Zenk, M. H., Eisenreich, W. (1999). Analysis of metabolic pathways via quantitative prediction of isotope labeling patterns: a retrobiosynthetic ¹³C NMR study on the monoterpene loganin.. *Phytochemistry* **51**, 223-236.

Eisenreich, W., Bacher, A. (2000). Elucidation of biosynthetic pathways by retrodictiv/predictiv comparison of isomer patterns determined by NMR spectroscopy. In: Genetic engineering, principles and methods, Vol. 22, Setlow, J. K. (ed.), Kluwer academic/Plenum Publisher, 121-151.

Eisenreich W., Schwarz, M., Cartayrade A., Arigoni, D., Zenk, M. H., Bacher, A. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Biol.* **5**, R221-R233.

Eisenreich, W., Schwarzkopf, B., Bacher, A. (1991). Biosynthesis of nucleotides, flavines, and deazaflavines in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* **226**, 9622-9631.

Erdelmeier, C. A. J. (1998). Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L., *Pharmacopsychiat. (Suppl.)* **31**, 2-6.

F

Fellermeier, M., Kis, K., Sagner, S., Maier, U., Bacher, A., Zenk, M. H. (1999). 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 Letters* **40**, 2743-2746.

Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Kis, K., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (2001). Studies on the nonmevalonate pathway of

terpene biosynthesis: The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6302-6310.

G

Giner, J. L., Jaun, B., Arigoni, D. (1998a). Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: the fate of 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **17**, 1857-1858.

Giner, J. L., Jaun, B. (1998b). Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: retention of the methyl H-atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *Tetrahedron Lett.* **39**, 8021-8022.

Goese, M., Kammhuber, K., Bacher, A., Zenk, M. H., Eisenreich, W. (1999). 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.

Gurevich, A. I., Dobrynin, V. N., Kolosov, M. N., Popravko, S. A., Ryabova, I. D., Chernov, B. K., Derbentzeva, N. A., Aizeman, B. E., Garagulya, A. D. (1971). Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. . *Antibiotiki* **16**, 510.

H

Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Amslinger, S., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Rohdich, F., Bacher, A. (2001a). Enzyme-assisted preparation of isotope-labeled 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *J. Org. Chem.* **66**, 3948-3952.

Hecht, S. (2002). Dissertation, Technische Universität München.

Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2001b). Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14837-14842.

Herbert, R. B. (1989). The biosynthesis of secondary metabolites, Chapman and Hall, N. Y., Routledge (ed.), 17-30.

Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A., Rohdich, F. (2000). 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. U.S.A.* **97**, 2486-2490.

Hill, R.E., Sayer, B. G., Spenser, J. D. (1989). Biosynthesis of vitamin B₆: incorporation of D-1-deoxyxylulose. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1916-1917.

Hintz, M., Reichenberg, A., Altincicek, B., Bahr, U., Gschwind, R. M., Kollas, A.-K., Beck, E., Wiesner, J., Eberl, M., Jomaa, H. (2001). Identification of (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human T cells in *Escherichia coli*. *FEBS letters* **509**,317-322.

I

Itoh, N., Morinaga, N., Kouzai, T. (1994). Purification and characterization of a novel metal-containing nonheme bromoperoxidase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 208-216.

J

Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., Beck, E. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**, 1573-1576.

K

Knöss, W. (1999). Terpenbiosynthese in Bakterien und Pflanzen - neue Perspektiven. *Pharmazie in unserer Zeit* **28**, 247-254.

Kusnick, C. (2001). Johanniskraut-Therapie 2001. *DAZ Suppl.* **141**, 2-8.

Kuzuyama, T., Shimizu, T., Takahashi, S., Seto, H. (1998). Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **39**, 4509-4512.

L

Laakmann, G., Schüle, C., Baghai, T., Kieser, M. (1998). St. John`s Wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* **31**(Suppl. I), 54-59.

Leimer, K. R., Rice, R. H., Gehrke, C. W. (1977). Complete mass spectra of N-trifluoroacetyl-*n*-butyl esters of amino acids. *J. Chromatogr.* **141**, 121-144.

Licht, S., Stubbe, J. (1999). In *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Poulter C. D. (ed.), Pergamon, Oxford, Vol. 5, 163-203.

Lichtenthaler, H. K., Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C. (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. *Zeitschrift für Naturforschung* **55C**, 305-313.

Lieder, K. W., Bookere, S., Ruzicka, F. J., Beinert, H., Reed, G. H., Frey, P. (1998). S-adenosylmethionine-dependent reduction of lysine 2,3-aminomutase and observation of the catalytically functional iron-sulfur centers by electron paramagnetic resonance. *Biochemistry* **37**, 2578-2585.

Lois, L. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K., Rohmer, M. (1998). Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyze the synthesis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxal biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2105-2110.

Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A., Eisenreich, W. (2000). Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 1062-1067.

M

Maisenbacher, P., Kovar, K. A. (1992). Analysis and stability of Hyperici Oleum. *Planta Med.* **58**, 351-354.

Martin, M. B., Arnold, W., Heath, H. T. 3rd, Urbina, J. A., Oldfield, E. (1999). Nitrogen-containing bisphosphonates as carbocation transition state analogs for isoprenoid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Research Commun.* **263**, 754-758.

McCaskill, D., Croteau, R. (1993). Procedures for the isolation and quantification of the intermediates of the mevalonic acid pathway. *Anal. Biochem.* **215**, 142-149.

McCaskill, D., Croteau, R. (1999). Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Tetrahedron Letters* **40**, 653-656.

Melzer, M., Fuhrken, D., Kolkmann, R. (1998). Hyperforin im Johanniskraut. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **138**, 4754, 4757-4760.

Müller, W. E., Schäfer, C. (1996). Johanniskraut. In vitro-Studie über Hypericum Extrakt, Hypericin und Kämpferol als Antidepressiva. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **136**, 1015-1022.

Müller, W. E., Rolli, M., Schäfer, C., Hafner, U. (1997). Effects of Hypericum extract (Li 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **30** (Suppl. II), 102-107.

Müller, W. E., Singer, A., Wonneman, M., Hofner, U., Rolli, M., Schäfer, C. (1998). Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry* **31**, 16-21.

N

Nathan, P. J. (1999). The experimental and clinical pharmacology of St. John`s wort (*Hypericum perforatum* L.). *Mol. Psychiatry* **4**, 333-338.

Nicolletti, M., Tomassini, L., Foddai, S. (1992). A new hemiterpene glucoside from *Ornithogalum montanum*. *Planta Med.* **58**, 472.

O

Orth, H. C. J., Hauer, H., Erdelmeier, C. A. J., Schmidt, P. C. (1999a). Orthofofin: The main degradation product of hyperforin from *hypericum perforatum* L.. *Pharmazie* **54**, 76-77.

Orth, H. C. J., Rentel, C., Schmidt, P. C. (1999b). Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *hypericum perforatum* L.. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 76-77.

P

Proteau, P. J., Woo, Y. H., Williamson, R. T., Phaosiri, C. (1999). Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Isomerase. *Org. Lett.* **1**, 921-923.

Q

Qureshi, N., Porter, J. W. (1981). Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. In: Biosynthesis of isoprenoid compounds, Vol. 1, Porter, J.W. and Spurgeon, S.L. (eds.), Wiley, New York, 49-86.

R

Rabenstein, D. L., Mariappan, S. V. S. (1993). Determination of ^{15}N Isotop Effects on the Acid-Base Equilibria of Amino Groups in Amino Acids by ^{13}C -NMR. *J. Org. Chem.* **58**, 4487-4489.

Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H., Arigoni, D. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS Letters* **465**, 157-160.

Read, S. M., Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**, 53-64.

Repcak, M., Martonfi, P. (1997). The localization of secondary substances in *hypericum perforatum* flower. *Biologia, Bratislava* **52**, 91-94.

Rieder, C., Eisenreich, W., O'Brien, J., Richter, G., Götze, E., Boyle, P., Blanchard, S., Bacher, A., Simon, H. (1998). Rearrangement reactions in the biosynthesis of molybdopterin. An NMR study with multiply $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled precursors. *Biochemistry* **255**, 24-36.

- Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Amslinger, S., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1158-1163.
- Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 535-540.
- Rohdich, F., Schuhr, C. A., Hecht, S., Herz, S., Wungsintaweeikul, J., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. (2000). Biosynthesis of terpenoids. A rapid method for the preparation of isotope-labeled 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9571-9574.
- Rohdich, F., Wungsintaweeikul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1999). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11758-11763.
- Rohmer, M. (1998). Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs?. *Prog. Drug. Res.* **50**, 135-154.
- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565-574.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524.

S

- Sacchettini, J. C., Poulter, C. D. (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science* **277**, 1788-89.
- Satterwhite, D. M. (1985). Isopentenylidiphosphate delta-isomerase. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 110, 92-99.
- Schmepp, C. M., Pelz, K., Wittmer, A., Schöpf, A. Simon, J. C. (1999). Antibacterial activity of hyperforin St. John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *The Lancet* **353**, 2129.
- Schempp, C. M., Kirkin, V., Simon-Haarhaus, B., Kersten, A., Kiss, J., Termeer, C. C., Gilb, B., Kaufmann, T., Borner, C., Sleeman, J. P., Simon, J. C. (2002). Inhibition of tumor cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* **21**, 1242-50.
- Schuhr, C. A. (2001a), Dissertation, Technische Universität München.
- Schuhr, C. A., Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Wungsintaweeikul, J., Bacher, A., Rohdich, F. (2001b). Studies on the non-mevalonate pathway-preparation of isotope-labeled 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Eur. J. Org. Chem.* **17**, 3221-3226.
- Schuhr, C. A., Radykiewicz, T., Sagner, S., Latzel, C., Zenk, M. H., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002). Quantitative assessment of metabolite exchange between plant cell compartments. Crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways. submitted
- Schwarz, M. K. (1994). Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. Dissertation Nr. 10951, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz.

- Seemann, M., Campos, N., Rodriguez-Conception, M., Ibanez, E., Duvold, T., Tritsch, D., Boronat, A., Rohmer, M. (2002). Isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli* via the methylerythritol phosphate pathway: enzymatic conversion of methylerythritol cyclodiphosphate into a phosphorylated derivative of (*E*)-2-methylbut-2-ene-1,4-diol. *Tetrahedron Letters* **43**, 1413-1415.
- Serdarevic, N., Eckert, G. P., Müller, W. E. (2001). The effects of extract's from St. John's wort and Kava Kava on brain neurotransmitter levels in the mouse. *Pharmacopsychiatry* **34** (Suppl. I), 134-136.
- Silverman, R. B. und Nandi, D. L. (1988). Reduced thioredoxin: a possible physiological cofactor for vitamin K epoxide reductase. Further support for an active site disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1555**, 1248-1254.
- Singer, A., Wonnemann, M., Müller, W. E. (1999). Hyperforin, a major, antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1363-1368.
- Sprenger, G. A., Schorke, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1997). Identification of a thiamin-independent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12857-12862.
- Spurgeon, S. L., Porter, J. W. (1981). Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. In: Biosynthesis of isoprenoid compounds, Vol. 1, Porter, J.W. und Spurgeon, S.L. (eds.), Wiley, New York, 5-38.
- Stryer, L. (1996). Biochemie. Spektrum, Akademischer Verlag, 4. Auflage, S. 547.

V

Viticello, B. (1999). Hypericum perforatum extracts as potential antidepressants. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 513-517.

Vogel G. (2001). How the body's garbage disposal may inactive drugs. *Science* **291**, 35-7.

W

Walker, K. W., Bradshaw, R. A. (1998). Yeast methionine aminopeptidase I can utilize either Zn²⁺ or Co²⁺ as a cofactor. A case of mistaken identity? *Protein Science*, **7**, 2684-2687.

Wang, C-Z., Maier, U. H., Eisenreich, W., Adam, P., Obersteiner, I., Keil, M., Bacher, A., Zenk, M. H. (2001). Unexpected biosynthetic precursors of amarogentin - a retrobiosynthetic ¹³C-NMR study. *Eur. J. Org. Chem.*, 1459-1465.

Werner, I., Bacher, A., Eisenreich, W. (1997). Retrobiosynthetic NMR studies with ¹³C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and funghi. *J. Biol. Chem.* **272**, 25474-25482.

White, R.H. (1978). Stable isotope studies on the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **17**, 3833-3840.

Wonnemann, M., Singer, A., Müller, W. E. (2000). Inhibition of synaptosomal uptake of ³H-L-glutamat and ³H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's wort: the role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *Neuropsychopharmacology* **23**, 188-197.

Wungsintaweekul, J., Herz, S., Hecht, S., Eisenreich, W., Feicht, R., Rohdich, F., Bacher, A., Zenk, M. H. (2001). Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 310-316.

Wurglics, M., Westerhoff, K., Holoubek, G., Schubert-Zsilavecz, M., Müller, W. E. (2002). Aktuelle Johanniskrautforschung. *DAZ* **10**, 1153-1175.

Y

Yamashiro, K., Itoh, H., Yamagishi, M., Natsuka, S., Mega, T., Hase, S. (1997). Purification and characterization of neutral α -mannosidase from hen oviduct: Studies on the activation mechanism of Co^{2+} . *J. Biochem.* **122**, 1174-1181.

Young, D. W. (1979). In: *Isotopes: Essential chemistry and applications*, The Chemical Society, London, Elvidge, J. A. (ed.), 276-307.

Z

Zanoli, P., Muscatello, C., Baraldi, C., Rivasi, M., Avallone, R. (2000). Characterization of pharmacological activity of hyperforin in comparison with hypericum extract. Workshop on: Depression anxiety spectrum disorders: from neurobiology to novel pharmacological treatments. Milan (Italy), September 6-7.