

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

Störexperimente an photosynthetisch
aktiven Organismen.
Untersuchungen zu Primär- und
Sekundärstoffbiosynthesen in komplexen
Stoffwechselnetzwerken.

Tanja St. Radykewicz

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. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 27.10.04 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 17.01.05 angenommen.

für Angus

„Und siehe, dass wir nicht's wissen können!
Das will mir schier das Herz verbrennen.“

Goethe

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Januar 1998 bis Oktober 2004 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität durchgeführt.

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. A. Bacher danke ich für die interessante Themenstellung und die Förderung während der Promotion.

Herrn Dr. W. Eisenreich danke ich für die intensive Betreuung und die stete Bereitschaft auftretende Probleme zu lösen. Sowie für seine „Zauberfinger“, die das NMR Gerät jedesmal wieder zum Laufen brachten.

Herrn Prof. Dr. H.-U. Koop danke ich für die interessante Zusammenarbeit. Frau Dr. W. Kofer danke ich für die freundliche Aufnahme und ihrem Mitarbeiter Stefan Kirchner für die Anzucht der *Nicotiana tabacum*.

Ferner gilt mein Dank

- meinen ersten LaborkollegInnen Dr. Klaus Kis und Dr. Eva Götze für die freundliche Aufnahme und stete Bereitschaft einen Schwall von Fragen zu beantworten. Besonders Klaus, der tapfer das ewige Zerbrechen von Glasgeräten ertragen hat.
- meinen späteren Laborkollegen Dr. Stefan Hecht, Stefan Bathe und Ferdinand Zepeck für eine fruchtbare, wenn auch chaotische Laboratmosphäre. Nach dem Auszug der „Jungs“ war es nicht mehr dasselbe. Mein Dank gilt auch ihren Nachfolgerinnen Dr. Lilla Margl und Elena Ostrojenkova für ein ruhiges und freundliches Klima.
- Fritz Wendling für die Hilfe bei allen Computer- und HPLC-Problemen. Er schaffte es die Anzahl der von mir abgedrehten Schrauben drastisch zu reduzieren.
- Dr. Petra Adam, Dr. Sabine Amslinger, Ralf Laupitz, Werner Römisch, Dr. Nick Schramek und Dr. Ju Wungsintaweekul für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei den guten Geistern des Lehrstuhls:

Richard Feicht, Kathrin Gärtner, Christoph Graßberger, Heidi Hofner, Astrid König, Cindy Montag, Ingrid Obersteiner, Sebastian Schwamb, Christine Schwarz, Angela Stetter, Thomas Wajtulewicz und Angelika Werner.

Diese Arbeit wäre nicht ohne alle die ungenannten, aber nicht vergessenen Kolleginnen und Kollegen, Kommilitoninnen und Kommilitonen, Freundinnen und Freunde möglich gewesen, die mir zur Seite standen. Danke euch allen.

Publikationsliste:

Arigoni, D.; Eisenreich, W.; Latzel, C.; Sagner, S.; Radykewicz, T.; Zenk, M.H. und Bacher, A. (1999) Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1309 - 1314

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

Hecht, S.; Wungsintaweekul, J.; Rohdich, F.; Kis, K.; Radykewicz, T.; Schuhr, C.A.; Eisenreich, W.; Richter, G. und Bacher A. (2001) Biosynthesis of terpenoids: Efficient multistep biotransformation procedures affording isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate using recombinant 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase. *The Journal of Organic Chemistry* **66** (23), 7770 - 7775

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

Schuhr, C.A.; Radykewicz, T.; Sagner, S.; Latzel, C.; Zenk, M.H.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Rohdich, F. und Eisenreich, W. (2003) Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **R 2**, 3 - 16

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
	1.1 Isotopenmarkierung	11
	1.2 Retrobiosynthese	13
	1.3 Kompartimentierung	17
	1.4 Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
	2.1 Geräte	20
	2.2 Materialien	22
	2.2.1 Chemikalien	22
	2.2.2 Enzyme	23
	2.2.3 Trennmedien	24
	2.2.4 Reagenzien	24
	2.2.4.1 Sprühreagenz für die DC	24
	2.2.4.2 Reagenzien für die Proteinreinigung	25
	2.2.4.3 Reagenzien für den Bradford - Nachweis	25
	2.2.4.4 Reagenzien für die SDS-PAGE	25
	2.2.4.5 Reagenzien für die Sepiapterinreduktase Umsetzung	26
	2.2.5 Kulturmedien	27
	2.2.5.1 <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	27
	2.2.5.2 <i>E.coli</i>	28
	2.2.5.3 <i>Catharanthus roseus</i>	29
	2.2.5.4 <i>Nicotiana tabacum</i>	29
	2.3 Organismen	30
	2.3.1 Mikroorganismen	30
	2.3.1.1 <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	30
	2.3.1.2 <i>E. coli</i>	30
	2.3.2 Pflanzen	31
	2.3.2.1 <i>Beta vulgaris</i>	31
	2.3.2.2 <i>Catharanthus roseus</i>	31
	2.3.2.3 <i>Nicotiana tabacum</i>	31
	2.4 Anzucht	31
	2.4.1 <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	31
	2.4.2 <i>E. coli</i> (mit SR Mal)	31
	2.4.2.1 Stammhaltung	31
	2.4.2.2 Zellanzucht	32
	2.4.3 <i>Catharanthus roseus</i>	32
	2.4.4 <i>Nicotiana tabacum</i>	32
	2.4.4.1 Glucose-Anzuchten	32
	2.4.4.2 CO ₂ Anzuchten	32

Inhaltsverzeichnis

2.5 Isotopeneinbaustudien	32
2.5.1 Einbau von [U- ¹³ C ₆]D-Glucose	32
2.5.2 Einbau von [1- ¹³ C ₁]D-Glucose	33
2.5.3 Einbau mit ¹³ CO ₂	33
2.5.4 [1,2- ¹³ C ₂]Glycin / [1,2- ¹⁴ C ₂]Glycin	33
2.5.5 [1- ² H ₁]D-Glucose	33
2.6 Naturstoffisolierungen	34
2.6.1 Isolierung von D-Glucose	34
2.6.1.1 Extraktion	34
2.6.1.2 Reinigung	34
2.6.2 Isolierung von Nicotin	34
2.6.2.1 Identifizierung	34
2.6.2.2 Isolierung.....	34
2.6.3 Isolierung von Terpenoiden.....	35
2.6.3.1 Identifizierung	35
2.6.3.2 Extraktion.....	35
2.6.3.3 Säulenchromatographie.....	36
2.6.3.4 Reinigung	37
2.6.3.5 HPLC.....	37
2.6.4 Isolierung von Aminosäuren (Eisenreich <i>et al.</i> , 1991)	38
2.6.4.1 Alkalische Hydrolyse	38
2.6.4.2 Isolierung der Ribonukleoside	38
2.6.4.3 Saure Hydrolyse der zellulären Proteine	39
2.6.4.4 Trennung und Reinigung der Aminosäuren	39
2.7 Isolierung und Reinigung von Enzymen	42
2.7.1 Sepiapterinreduktase	42
2.7.1.1 Zellaufschluss mit Ultraschall	42
2.7.1.2 Bestimmung des Proteingehalts	42
2.7.1.3 Chromatographie als Maltosebindeprotein	42
2.7.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.8 Organisch-chemische Methoden	43
2.8.1 Synthese von deuteriertem NADPH	43
2.8.1.1 Synthese von [4- ² H ₁] NADP ⁺ (Cyanidreaktion)	43
2.8.1.2 Herstellung von [4(S)- ² H ₁]-NADPH und [4(R)- ² H ₁]-NADPH	43
2.9 Enzymreaktionen	44
2.9.1 Reduktoisomerase	44
2.9.1.1 Umsetzung mit 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase	44
2.9.1.2 Reinigung von 2-C-Methyl-D-erythriol-4-phosphat.....	44
2.9.2 Sepiapterinreduktase	44
2.9.2.1 Umsetzung mit Sepiapterinreduktase	44

Inhaltsverzeichnis

2.9.2.2	Reinigung von Biopterin	44
2.10	NMR Spektroskopie.....	45
2.10.1	Probenvorbereitung.....	45
2.10.2	Eindimensionale Spektroskopie.....	45
2.10.3	Zweidimensionale Spektroskopie.....	46
2.10.4	NMR Auswertung.....	46
2.10.4.1	Berechnung der Anreicherung	46
2.10.4.2	Quantitative Bestimmung der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Kopplung	48
2.10.4.3	Formale Darstellung von Markierungsmustern.....	50
2.10.5	Signalzuordnung	53
3	Ergebnisse und Diskussion.....	54
3.1	Naturstoffisolierungen.....	54
3.2	Eingesetzte Organismen für die Einbaustudien.....	55
3.2.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	56
3.2.2	<i>Catharanthus roseus</i>	57
3.2.3	<i>Nicotiana tabacum</i>	58
3.2.3.1	RPO Mutante.....	59
3.2.3.2	NDH Mutanten.....	60
3.2.3.3	Erscheinungsbild.....	61
3.3	Untersuchungen zum Primärstoffwechsel.....	63
3.3.1	Zentrale Stoffwechselwege.....	63
3.3.1.1	Glykolyse	63
3.3.1.2	Oxidativer Pentosephosphatweg	64
3.3.1.3	CO ₂ -Fixierung	64
3.3.1.4	Photorespiration (Lichtatmung)	70
3.3.1.5	Citratzyklus	70
3.3.1.6	Glyoxalat-Zyklus.....	71
3.3.1.7	Gluconeogenese	71
3.3.1.8	Biosynthese der Aminosäuren.....	72
3.3.1.9	Biosynthese der Ribonukleoside	75
3.3.2	Einbauexperiment mit [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin in <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	76
3.3.3	Einbauexperiment mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose in <i>Catharanthus roseus</i>	89
3.3.4	Einbauexperimente in <i>Nicotiana tabacum</i> (Wildtyp und Mutanten)	100
3.3.4.1	Einbauexperiment mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i>	101
3.3.4.2	Einbauexperiment mit [1- $^{13}\text{C}_1$]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i>	119
3.3.4.3	Einbauexperiment mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> RPO	125
3.3.4.4	Einbauexperiment mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> NDH 53-25	135
3.3.4.5	Einbauexperiment mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> NDH 54-3IV	143
3.3.5	Diskussion.....	148
3.4	Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel.....	150
3.4.1	Biosynthesewege ausgewählter Sekundärstoffwechselprodukte.....	152

Inhaltsverzeichnis

3.4.1.1	Geranylgeraniol, Phytol und cis-Abienol	152
3.4.1.2	Sterole	155
3.4.1.3	Nicotin	155
3.4.2	Einbauexperiment mit [1,2- ¹³ C ₂]Glycin in <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	162
3.4.3	Einbauexperiment mit [U- ¹³ C ₆]D-Glucose in <i>Catharanthus roseus</i>	172
3.4.4	Einbauexperimente in <i>Nicotiana tabacum</i> (Wildtyp und Mutanten)	186
3.4.4.1	Einbauexperiment mit [U- ¹³ C ₆]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> (Wildtyp)	186
3.4.4.2	Einbauexperiment mit [1- ¹³ C ₁]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> (Wildtyp)	228
3.4.4.3	Einbauexperiment mit ¹³ CO ₂ in <i>Nicotiana tabacum</i> (Wildtyp).....	251
3.4.4.4	Einbauexperiment mit [U- ¹³ C ₆]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> RPO	255
3.4.4.5	Einbauexperiment mit [U- ¹³ C ₆]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> NDH 53-25	266
3.4.4.6	Einbauexperiment mit [U- ¹³ C ₆]D-Glucose in <i>Nicotiana tabacum</i> NDH 54-3IV	290
3.4.5	Diskussion.....	312
3.5	Stereochemie von Reduktasen	316
3.5.1	Stereospezifische Deuterierung von NADPH	316
3.5.2	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase.....	319
3.5.3	Sepiapterinreduktase.....	323
3.5.4	Diskussion.....	329
4	Zusammenfassung	330
5	Literatur	332

Abkürzungen

Rubisco	Ribulosebiphosphat-Carboxylase/Oxygenase
δ	chemische Verschiebung
μg	Mikrogramm
A	<i>cis</i> -Abienol
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BChl	Bakteriochlorophyll
bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CMP	Cytidinmonophosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
Δs	Standartabweichung
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMNT	4,6 Dimethylnona-1,3,7-trien
DMSO	Dimethylsulfoxid
1-DOXP	Deoxyxylulosephosphatweg
DX	1-Deoxy-D-xylulose
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (später IspC)
DXS	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase
FPP	Farnesyldiphosphat
GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
G	Geranylgeraniol
GG	Geranylgeraniol
HETTP	Hydroxyethylthiamin-diphosphat
HPLC	Hochflüssigkeitschromatographie
Hz	Herz
IPP	Isopentenylidiphosphat
IspC	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase
J	skalare Kopplungskonstante
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	Molar
MEP	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol%	Molprozent
NADP ⁺	Nicotinamidadenin-dinucleotriphosphat
NADPH	Nicotinamidadenin-dinucleotriphosphat (reduziert)
n.d.	nicht detektiert
NDH-Komplex	Homolog der NAD(P)H-Dehydrogenase

<i>ndhK</i>	Gen eines Homologs der NAD(P)H-Dehydrogenase
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance / magnetische Kernresonanz
P	Phytol
RNA	Ribonucleinsäure
<i>rpoA</i>	RNA Polymerase Gene
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S	Sitosterol
SR	Sepiapterinreduktase
St	Stigmasterol
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TMPS	Trimethylsilylpropansulfonsäure
TMS	Tetramethylsilan
TPP	Tiamindiphosphat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UMP	Uridinmonophosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

Die Aminosäuren wurden mit ihrem Dreibuchstabencode abgekürzt.

1 Einleitung

Isoprenoide sind in allen lebenden Organismen vorhanden, z.B. als Steroidhormone in Säugtieren, Carotinoide in Pflanzen und Ubiquinone in Bakterien. Sie bauen sich aus Isopren-Einheiten auf, die durch Kondensation der biologischen Vorstufen Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **1**) und Isopentenylidiphosphat (IPP, **2**) höhere Homologe bilden (Abbildung 1). Geranyldiphosphat (**3**), Farnesyldiphosphat (**4**) und Geranylgeranyldiphosphat (**5**) sind Vorstufen für Mono-, Sesqui- bzw. Diterpene. Zyklisierung, Umlagerung, Oxidation und/oder Einführung von neuen Substituenten und/oder Intermediaten anderer Biosynthesewegen am Kohlenstoffskelett führen zu einer Fülle von Verbindungen. Bis jetzt wurden schon mehr als 30.000 strukturell unterschiedliche Isoprenoide beschrieben, und es kommen jedes Jahr neue hinzu (Sacchettini und Poulter, 1997).

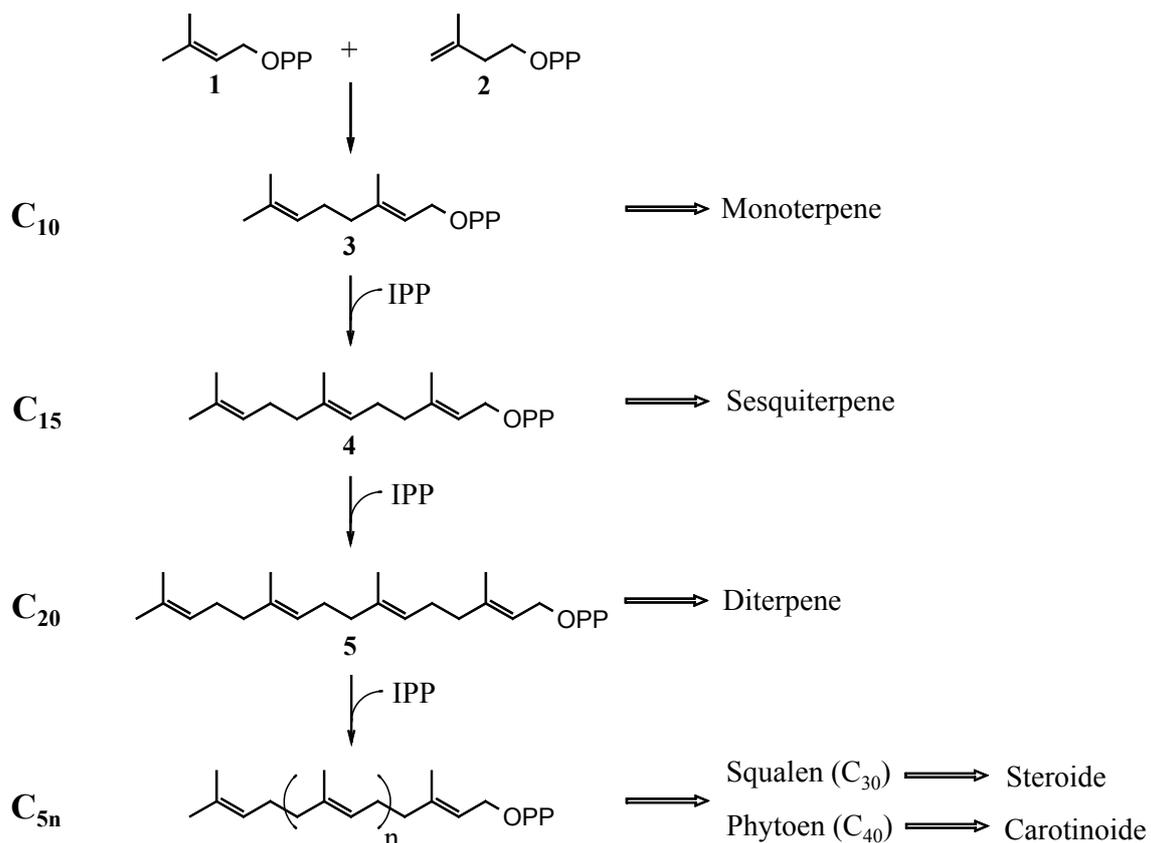


Abbildung 1. Schema der Biosynthese der Isoprenoide aus IPP (**2**) und DMAPP (**1**).

Einleitung

Isoprenoide sind am primären und sekundären Stoffwechsel beteiligt. Sterole sind integrale Bestandteile von biologischen Membranen und Vorstufen für Hormone. Die Carotinoide, in den Membranen der Chloro- und Chromoplasten sind Antennenpigmente für die Photosynthese und dienen dem photooxidativem Schutz (Bartley und Scolink, 1995). β -Carotin (Provitamin A) ist Vorstufe des, für den Menschen, essenziellen Vitamin A.

Isoprenoide sind Bestandteile von Ölen, Harzen und Wachsen. Sie sind Pigmente und Duftstoffe in Blüten und Früchten. Sie schützen vor Herbivoren und pathogenen Mikroorganismen. Sie dienen der Anlockung von Insekten und sind an der Signalweiterleitung bei Pflanzen und Tieren beteiligt (Sacchetti und Poulter, 1997).

Die wirtschaftliche Bedeutung der Isoprenoide nimmt immer stärker zu. Sie werden als Aromastoffe (Menthol) und Farbstoffe (β -Carotin; Abbildung 2, **6**) Lebensmitteln und Kosmetika zugesetzt. Man nutzt sie als natürliche Insektizide (Pyrethrine) und Medikamente (Taxol; Abbildung 2, **9**).

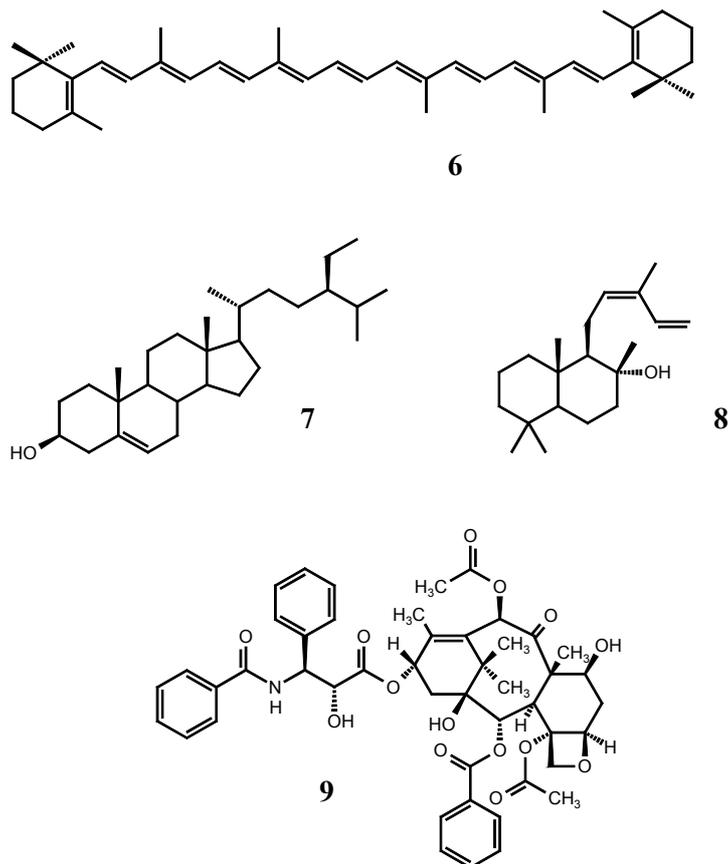


Abbildung 2. Beispiele für Isoprenoide - β -Carotin (**6**), Sitosterol (**7**), cis-Abienol (**8**), Taxol (**9**).

Einleitung

Archaeobakterien, Hefen, Pilze und Säugetiere benutzen den in den 50er Jahren beschriebenen Terpenbiosyntheseweg: Bloch-Lynen-Weg (Mevalonatweg). Durch ausführliche Arbeiten an Rattenleber und Hefen konnte Acetyl-CoA (**10**) als Ausgangsverbindung des Biosynthesewegs bestimmt werden (Abbildung 3; Review: Qureshi und Porter, 1981; Bloch, 1992; Bach, 1995; Bochar *et al.*, 1999).

Am Anfang der Biosynthese kondensieren zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA (**11**). Anschließend reagiert dieses mit einem weiteren Acetyl-CoA Molekül zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (**12**), das zu Mevalonsäure (**13**) reduziert wird. Die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase gilt als Schlüsselenzym für die Regulierung des Biosynthesewegs. Dies führte zur Entwicklung von zahlreichen Arzneimitteln gegen einen erhöhten Cholesterinspiegel.

Die Mevalonsäure wird anschließend über zwei Stufen zum Diphosphat (**14**) phosphoryliert. Das Diphosphat wird an der freien Hydroxygruppe phosphoryliert und unter Eliminierung der im letzten Schritt eingeführten Phosphatgruppe decarboxyliert, wobei IPP entsteht. Das gebildete IPP (**2**) steht über eine Isomerase mit DMAPP (**1**) im Gleichgewicht (Lehninger *et al.*, 1998).

Dieser Biosyntheseweg wurde viele Jahre als allgemein gültig anerkannt, obwohl immer mehr Ergebnisse im Widerspruch zum Mevalonatweg standen. Acetat und Mevalonat wurden in höheren Pflanzen nicht oder nur in sehr niedrigen Raten (oft < 0,01 %) in Monoterpene, Diterpene und Carotine eingebaut (Banthorpe *et al.*, 1972). Jedoch wurden in Einbauversuchen mit radioaktiv markierten NaHCO₃, 3-Phosphoglycerat und Pyruvat in gereinigten Spinatchloroplasten ein Einbau in β -Carotin beobachtet. Zugewetztes unmarkiertes Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat, jedoch nicht Acetat, führten zu einer Isotopenverdünnung im β -Carotin (Schulz-Siebert und Schultz, 1987). Das Cytoplasma konnte nicht der einzige Syntheseort der Isoprenoide sein, auch wenn reife Chloroplasten auf Importe von IPP/DMAPP angewiesen sind (Heinze *et al.*, 1990).

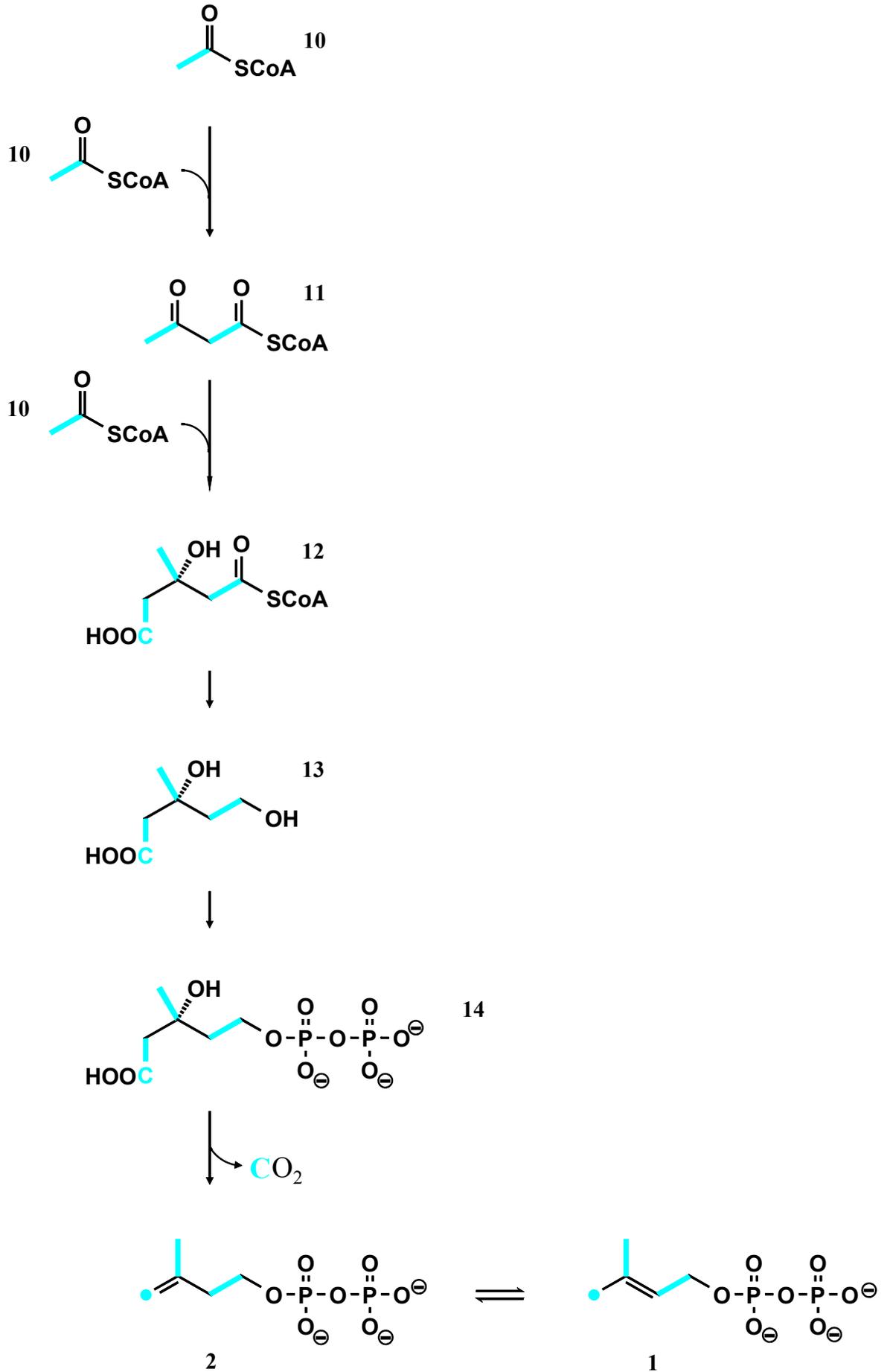


Abbildung 3. Mevalonatweg - Biosynthese von IPP (2) und DMAPP (1), ausgehend von Acetyl-CoA.

Potente Hemmstoffe der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase hemmten die Sterolsynthese in Spinatchloroplasten erfolgreich, aber beeinflussten die Synthese der plastidären Plastochinone und β -Carotin nicht (Schulz-Siebert und Schultz, 1987; Lichtenthaler *et al.*, 1997c). Die Plastiden weisen eine gewisse Autonomie auf und man nahm an, dass im Cytosol und Plastiden getrennte Biosynthesen von IPP/DMAPP statt finden. Jedoch wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei in beiden Kompartimenten um die gleiche Synthese, den Mevalonatweg, handelt. Die fehlende Hemmung bzw. die geringen Einbauraten in den Plastiden wurden über die Impermeabilität der Plastidenmembran erklärt.

Die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase konnte nicht in Plastiden nachgewiesen werden. Alles deutete auf die Existenz eines zum Mevalonatweg alternativen Terpenbiosynthesewegs in den Plastiden.

Vor ca. zehn Jahren wurden durch die bahnbrechenden Arbeiten der Gruppen von Prof. Dr. Arigoni (Zürich) und Prof. Dr. Rohmer (Straßburg) mittels Stabilisotopen die Existenz eines alternativen Terpenbiosynthesewegs (Deoxyxylulosephosphatweg) zu IPP und DMAPP bewiesen (Rohmer *et al.*, 1993a; Cartayrade *et al.*, 1994; Schwarz, 1994; Broers, 1994). Der Acetat und D-Glucose Einbau in bakterielle Hapanoide zeigte ein nicht mit dem Mevalonatweg in Einklang zu bringendes Markierungsmuster (Flesch und Rohmer, 1988; Rohmer *et al.*, 1993a). Erste Interpretationen zogen getrennte Acetyl-CoA Pools in Betracht. Später wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Terpenoidbiosynthese durch Kondensation von Pyruvat und einer Triose, voraussichtlich Dihydroxyacetonphosphat, gestartet wird. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arigoni, die mit Bakterien und Pflanzen arbeitete, schlug eine Kondensation von aktiviertem Acetaldehyd, aus der Decarboxylierung von Pyruvat, mit Glycerinaldehyd-3-phosphat vor. Der entscheidende Beweis gelang durch den Einbau von 1-Deoxy-D-xylulose in Ubichinon von *E. coli* und in Ginkgolide von *Ginkgo biloba* (Broers, 1994; Schwarz, 1994).

Einleitung

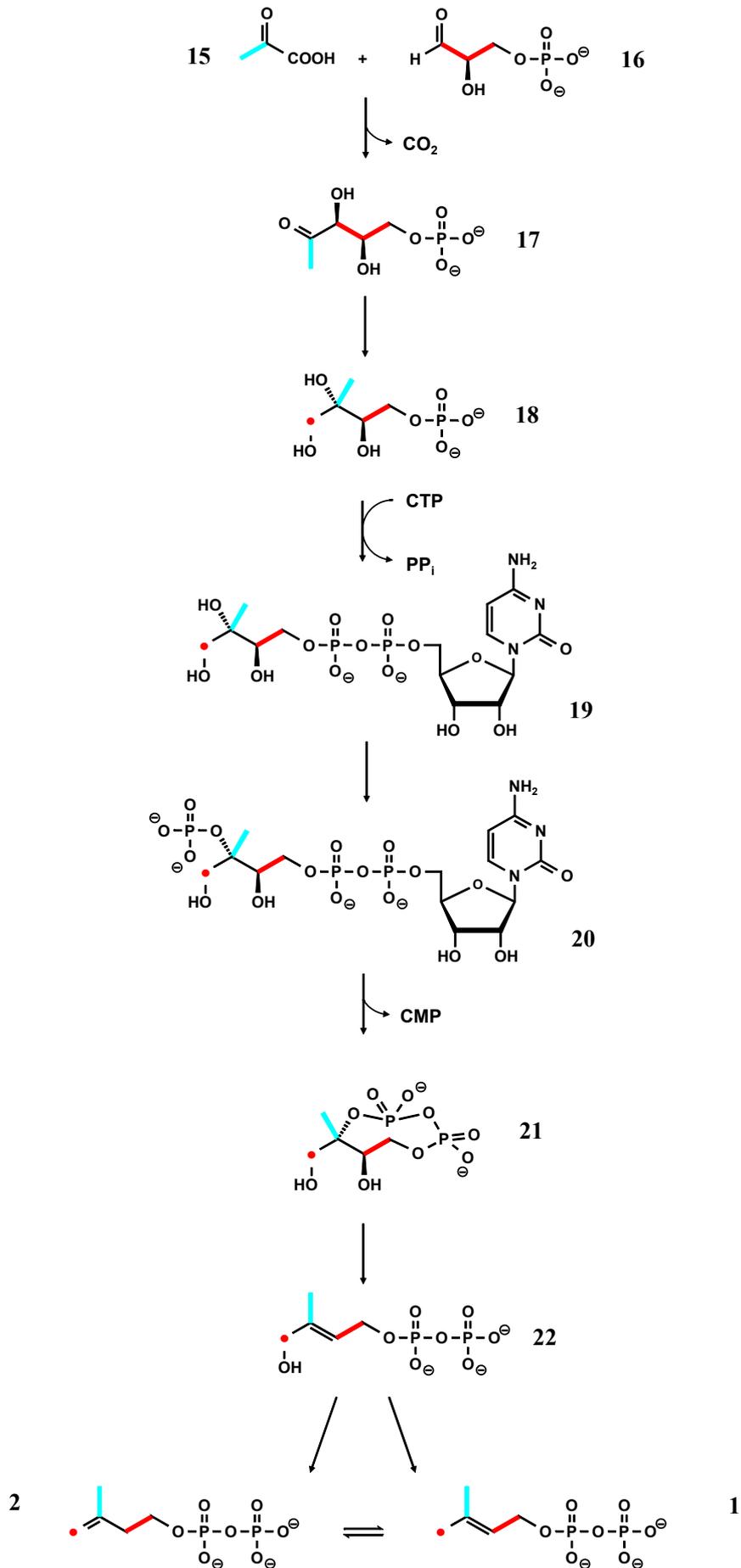


Abbildung 4. Deoxyxylulosephosphatweg - Biosynthese von IPP (**2**) und DMAPP (**1**), ausgehend von GAP und Pyruvat.

Die Ausgangsprodukte des alternativen Biosynthesewegs sind Pyruvat (**15**) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP, **16**) (Review: Rohmer, 1998, 1999a, 1999b; Eisenreich *et al.*, 1998, 2001; Rohdich *et al.*, 2001a). Im ersten Schritt der Biosynthese (Abbildung 4) katalysiert 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase (DXS) in einer thiaminabhängiger Decarboxylierung die Umsetzung von Pyruvat und GAP zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP, **17**) unter Abspaltung von CO₂ (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998). Anschließend erfolgt eine intramolekulare Umlagerung zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP, **18**) in Anwesenheit eines NADPH abhängigen Enzyms, der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (DXR, später umbenannt in IspC-Protein) (Takahashi *et al.*, 1998). Im dritten Schritt wird 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**19**) durch Transfer eines Cytidylrestes auf MEP unter Abspaltung eines Diphosphats gebildet. Katalysiert wird der Schritt von der 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase (kodiert vom IspD Gen) (Rohdich *et al.*, 1999; Kuzuyama, 2000). Das IspE-Protein katalysiert die anschließende Reaktion zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**20**) (Schuhr *et al.*, 2001). Anschließend erfolgt eine, von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase (IspF-Protein) katalysierte Zyklisierung zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**21**), unter Abspaltung des Cytidylrestes (Rohdich *et al.*, 2001b; Seto und Kuzuyama, 2001; Steinbacher *et al.*, 2002).

In Anwesenheit des IspG-Proteins erfolgt eine Spaltung des Ringsystems unter Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat (**22**) (Hecht, *et al.*, 2001b; Hintz *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 2002; Kollas *et al.*, 2002; Rohdich *et al.*, 2003). Im anschließenden Schritt werden IPP (**2**) und DMAPP (**1**) mit Hilfe des IspH-Proteins gebildet (Adam *et al.*, 2002; Altincicek *et al.*, 2002; Rohdich *et al.*, 2002 und 2003).

Tabelle 1. Biosynthesewege der Terpenoide in verschiedenen Organismen (nächste Seite).

Organismen	Terpenbiosyntheseweg		Literatur
	1-DOXP	Mevalonat	
Bakterien			
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>		Verrucosanol	(Rieder <i>et al.</i> , 1998)
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Menaquinon, 2-Methyl-D-erythritol		(Duvold <i>et al.</i> ; 1997)
<i>Escherichia coli</i>	Ubiquinon, Menaquinon		(Zhou and White; 1991; Rohmer <i>et al.</i> , 1993, 1996; Broers, 1994; Rohmer <i>et al.</i> , 1993a; Putra <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Flavobacterium</i>		Zeaxanthin	(Britton <i>et al.</i> , 1979)
<i>Halobacterium cutirubrum</i>		Carotinoide	(Ekiel <i>et al.</i> , 1986; Moldoveanu and Kates, 1988)
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	Ubiquinon, Hopanoid		(Rohmer <i>et al.</i> , 1993a)
<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	Hopanoid		(Fleisch und Rohmer, 1988)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Hopanoid		(Fleisch und Rohmer, 1988)
<i>Streptomyces aeriovivifer</i>	Menaquinon	Furachinocin, Naphterpin	(Funayama <i>et al.</i> , 1990; Shin-ya <i>et al.</i> , 1990; Seto <i>et al.</i> , 1996)
<i>Synechocystis sp.</i>	Phytol, β -Carotin		(Disch <i>et al.</i> , 1998a; Lichtenthaler, 1998)
Chlorophyta			
<i>Charophyceae</i>	Phytol	Sterol	(Schwender <i>et al.</i> , 2001)
<i>Chlorophyceae</i>	Phytol, Sterol		(Schwender <i>et al.</i> , 2001)
<i>Euglena gracilis</i>		Sterol, Phytol	(Lichtenthaler, 1998; Rontani und Volkman, 2003)
<i>Nitzschia ovalis</i>	Phytol		(Rontani und Volkman, 2003)
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Phytol		(Rontani und Volkman, 2003)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Phytol, Plastoquinon, β -Carotin, Ergost-7-enol, Chondrillasterol, Lutein, Ubiquinon-10		(Schwender <i>et al.</i> , 1996, 1997; Disch <i>et al.</i> , 1998b)

Organismen	Terpenbiosyntheseweg		Literatur
	1-DOXP	Mevalonat	
Pflanzen			
<i>Catharanthus roseus</i>	β -Carotin, Phytol, Lutein	Sitosterol	(Arigoni <i>et al.</i> , 1997)
<i>Daucus carota</i>	Phytol	Sitosterol, Stigmasterol	(Lichtenthaler <i>et al.</i> , 1997b)
<i>Fossombronina alaskana</i>	Epineoverrucosan		(Rieder <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolid A	Sitosterol	(Schwarz, 1994)
<i>Heteroscyphus planus</i>	Phytol	β -Carotin, Phytol, Heteroscyphicsäure A	(Cane <i>et al.</i> , 1981; Rohmer <i>et al.</i> , 1989; Funayama <i>et al.</i> , 1990; Shin-ya <i>et al.</i> , 1990; Nabeta <i>et al.</i> , 1995, 1997 und 1998; Seto <i>et al.</i> , 1996; Zeidler <i>et al.</i> , 1997; Thiel <i>et al.</i> , 1997; Lichtenthaler <i>et al.</i> , 1997b; Rieder <i>et al.</i> , 1997b)
<i>Hordeum vulgare</i>	β -Carotin, Phytol,	Sitosterol, Stigmasterol	(Lichtenthaler <i>et al.</i> , 1997b)
<i>Lemna gibba</i>	β -Carotin, Phytol, Plastoquinon, Lutein	Sitosterol, Stigmasterol	(Schwender <i>et al.</i> , 1997; Lichtenthaler <i>et al.</i> , 1997b)
<i>Liriodendron tulipifera</i>	2-C-Methyl-D-erythritol		(Sagner <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Lococolea heterophylla</i>		β -Carotin, Phytol	(Nabeta <i>et al.</i> , 1997)
<i>Mentha piperita</i>	Menthon		(Sagner <i>et al.</i> , 1998b; Eisenreich <i>et al.</i> , 1997)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Plastoquinon	Sterol, Ubiquinon	(Disch <i>et al.</i> , 1998b)
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Loganin		(Eichinger, 1993; Eichinger, 1997)
<i>Rubia tinctorum</i>	Lucidin-3 β -primverosid, Rubiadin-3 β -primverosid		(Eichinger, 1997)
<i>Taxus chinensis</i>	Taxuyunnanin C		(Eisenreich <i>et al.</i> , 1996)
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol		(Sagner <i>et al.</i> , 1998b; Eisenreich <i>et al.</i> , 1997)

Einleitung

Tabelle 2. Verteilung der beiden Terpenbiosynthesen in der Natur (Übersicht aus: Eisenreich *et al.*, 2001).

Organismen	Terpenbiosyntheseweg		
	Mevalonat		1-DOXP
Bakterien	√	(und)/oder	√
Archaeobakterien	√		
Pilze	√		
Algen	√	und/oder	√
Höhere Pflanzen	√	und	√
Protozoen	√	oder	√
Tiere	√		

Die Verbreitung des Deoxyxylulosephosphatweg in den verschiedenen Organismen wird derzeit intensiv untersucht. Bei den Eubakterien gibt es momentan noch kein klares Bild über das Vorkommen der beiden Biosynthesewege. Beide Wege wurden bereits in verschiedenen Eubakterien nachgewiesen, allerdings nie im gleichen Organismus (Putra *et al.*, 1998b). Die untersuchten Archaeobakterien, Hefen, Pilze, einige Protozoen und Tiere verwenden den Mevalonatweg (Disch und Rohmer, 1998). Einige Bakterien (darunter viele human-pathogene), Cyanobakterien und der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (Protozoa) nutzen den Deoxyxylulosephosphatweg. In Streptomyceten (in Abhängigkeit des Entwicklungszustandes; Seto *et al.*, 1996), einigen Algen, Moosen und höheren Pflanzen konnte eine Koexistenz beider Synthesewege nachgewiesen werden (Tabelle 2 und Tabelle 1).

In höheren Pflanzen sind die Enzyme des Mevalonatwegs im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert. Sterole, Ubiquinonen und Triterpene werden hauptsächlich über diesen Biosyntheseweg synthetisiert. Die Enzyme des Deoxyxylulosephosphatwegs tragen Plastid codierende Sequenzen. Man vermutet den Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden, wo er die Vorstufen für Monoterpene, einige Sesquiterpene, Diterpene und Carotinoide synthetisiert (Review: Eisenreich *et al.*, 1998, 2001; Rohdich *et al.*, 2001a). Sesquiterpene wurden früher dem Mevalonatweg zugeordnet, heute ist dies mit den vielen Gegenbeispielen nicht mehr haltbar (Tabelle 1). Die Biosynthese von plastidären Isoprenoiden über den Deoxyxylulosephosphatweg scheint weitgehend bei photosynthese aktiven Organismen verbreitet zu sein (Bach, 1995; Lichtenthaler *et al.*, 1997a; Schwender *et al.*, 1997; Review: Rohmer, 1999a).

1.1 Isotopenmarkierung

Zur Bestimmung von Biosynthesewegen hat sich der Einbau von isotopmarkierten Verbindungen als geeignete Methode herausgestellt. Die Nutzung von organischen isotopmarkierten Verbindungen als Tracer zur Aufklärung von Biosynthesewegen in Organismen, Geweben und Zellen ist ein altes Konzept. Die ersten Tracerstudien wurden bereits in den 30er Jahren mit Deuterium durchgeführt (Schönheimer und Rittenberg, 1935). Die ersten mit ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S und später auch mit ^3H markierten Verbindungen waren in den 50er bzw. in den 60er Jahren kommerziell erhältlich. Vor- und Nachteil der radioaktiven Verbindungen, ist ihre hohe Nachweisempfindlichkeit (Rauschenbach *et al.*, 1974). Des Weiteren stellte es sich als Nachteil heraus, dass mit den eingesetzten Messmethoden keine exakte Positionsbestimmung der Markierung möglich war. Der chemische Abbau, selbst von einfachen Verbindungen, in einzelne C- und/oder H-Atome ist sehr aufwendig (Simon und Floss, 1967).

Durch die Entwicklung von Massenspektroskopie und NMR Spektroskopie konnte die routinemäßige Anwendung von Stabilisotopen (z.B. ^2H , ^{13}C) bei der Aufklärung von Biosynthesewegen etabliert werden. Die NMR Spektroskopie ermöglicht eine direkte positionsspezifische Detektion und Quantifizierung von ^{13}C -Anreicherungen in den Zielverbindungen, selbst bei niedrigen Einbauraten. Das natürliche Vorkommen von ^{13}C liegt bei 1,1 %. Die Detektion von ^{13}C als Tracer in biochemischen Studien ist bereits möglich, wenn es zu einer 1,5 mal höheren ^{13}C -Anreicherung als die Natürliche kommt (Leete, 1977; Bacher *et al.*, 1999).

Eine Interpretationsart von Einbauversuchen mit stabilen Isotopen geht davon aus, dass die Markierung von einer spezifischen Position im Ausgangsmolekül exakt in eine spezifische Position des Biosyntheseprodukts transferiert wird. Basierend auf dieser Hypothese beinhaltet die traditionelle Vorgehensweise bei Isotop Einbaustudien üblicherweise eine Vermutung über die mögliche Vorstufe, basierend auf der chemischen Struktur des Stoffwechselprodukts. Diese mögliche Vorstufe wird dann markiert den Organismen oder der Zellkultur zu gefügt. Das zu untersuchende Stoffwechselprodukt wird ausschließlich isoliert und die Isotopenverteilung bestimmt. Der Nachweis einer Markierung wird dann meist als Beweis akzeptiert, dass es sich bei der angebotenen Verbindung um eine direkte Vorstufe für das isolierte Stoffwechselprodukt handelt. Diese Ableitung setzt voraus, dass es nur einen Stoffwechselweg von der Vorstufe zum Endprodukt gibt.

In Wirklichkeit aber darf der Stoffwechsel selbst in primitiven Organismen nicht als eindimensionales System betrachtet werden, sondern muss als hochdimensionales Netzwerk behandelt werden (sog. Free-scaled oder small world network). In solchen Netzwerken

Einleitung

können Metabolite als Substrate von verschiedenen Stoffwechselwegen dienen. Die Konsequenz hieraus ist, dass die Markierung (vor allem von einfachen Metaboliten) in verschiedene Stoffwechsellpools (in der Regel) mit unterschiedlicher Effektivität verteilt wird und letztlich wird ggf. ein Teil der Isotopenmarkierung das Endprodukt erreichen. Die Interpretation dieser Ergebnisse im Sinne der Ableitung eines eindeutigen Biosynthesewegs ist gefährlich und die ältere Literatur ist behaftet mit vielen Über- und Fehlinterpretationen. Eine weitere Folge des vernetzten Stoffwechselsystems ist, dass über die intermediären Stoffwechselprodukte eine Vielfalt von verschiedenen Isotopomeren des untersuchten Metabolits entstehen können. In anderen Worten, die Markierung von einer spezifischen Position in der Vorstufe kann am Ende in verschiedenen Positionen im Zielmolekül vorliegen. Die exakte Zusammensetzung solcher Mischungen stellt eine hohe Anforderung an die analytischen Methoden dar und kann erst in jüngster Zeit gelöst werden (Abbildung 5).

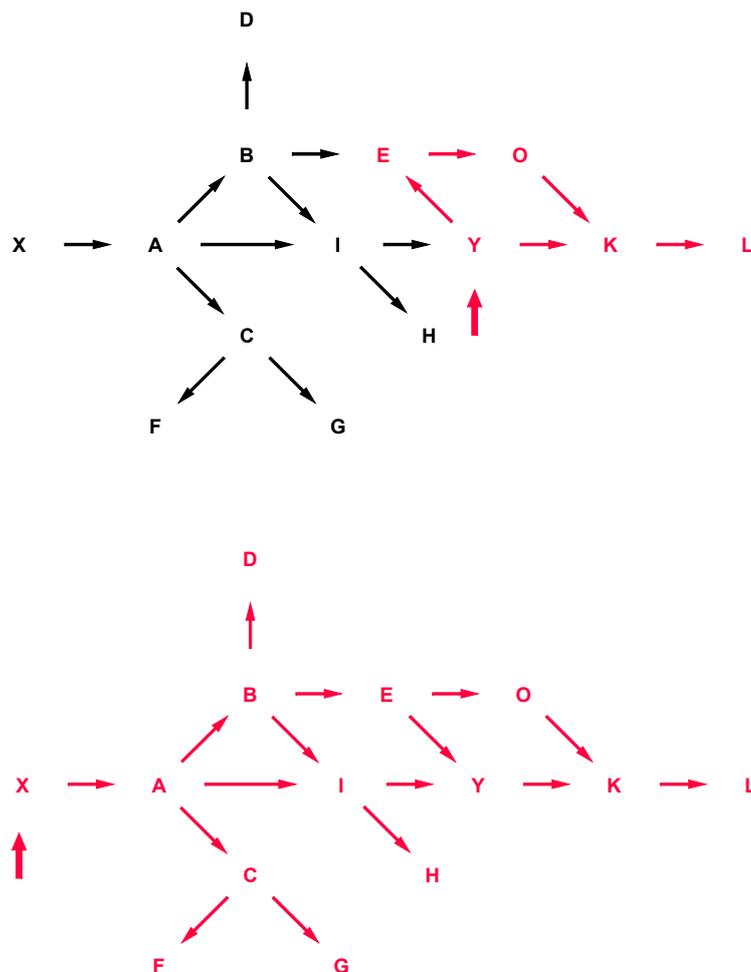


Abbildung 5. Modellvorstellungen für den Fluss von speziellen Metaboliten (Verbindung Y) oder genereller Vorstufen (Verbindung X) bei biosynthetischen Tracerstudien (Rieder, 1999, Bacher *et al.*, 1999).

1.2 Retrobiosynthese

Im Gegensatz zum Einsatz von spezifischen Vorstufen mit naher struktureller Verwandtschaft zum gesuchten Metabolit, nutzt man bei der Retrobiosynthese vorzugsweise generelle Stoffquelle, wie D-Glucose, Ribose, Glycerol, Pyruvat und Acetat. Jede dieser Verbindungen kann mit einer hohen Variationsbreite in verschiedene Metabolite umgewandelt werden. Analog zum Konzept der Retrobiosynthese in der synthetischen organischen Chemie wird das Symbol \Rightarrow benutzt um die biosynthetische Verknüpfung der Markierungsmuster des Endprodukts mit seinem biosynthetischen Vorläufer darzustellen (Bacher, *et al.*, 1999). Die retrobiosynthetischen Verwandtschaften zwischen Endprodukt und Vorläufer sind nicht universell, sondern müssen jeweils für den untersuchten Organismus speziell bestimmt werden.

Alle Biosynthesewege beziehen ihre Ausgangsverbindungen von einer überschaubaren Zahl von Intermediaten des zentralen Stoffwechsels (z.B. Acetyl-CoA, Triosen, Dicarbonsäuren). Hierbei handelt es sich um Verbindungen aus den zentralen Stoffwechselwegen (z.B. wie Glykolyse, Pentosephosphatweg, Citratzyklus, u.a.). Die Markierungsmuster dieser zentralen Intermediate sind gewöhnlich schwer messbar, weil sie in der Regel nur in geringen Mengen in der Biomasse vorliegen. Jedoch können die Markierungsmuster der Zentralmetabolite mit hoher Genauigkeit aus den Markierungsmustern der Aminosäuren und Ribonukleotiden rekonstruiert werden. Den Beweis dafür liefern frühere Studien an *Chloroflexus aurantiacus* (Eisenreich *et al.*, 1993; Rieder, 1999), *Taxus chinensis* (Lee, 1996), *Rauwolfia. serpentina* (Eichinger, 1993; Eichinger, 1997, Eichinger et al, 1999) und *Fossombronina alaskana* (Rieder *et al.*, 1998; Rieder, 1999) mit ^{13}C -markierten Vorstufen. Durch überlappende Informationen aus der grossen Zahl an messbaren Aminosäuren und Ribonukleosiden führen zu einer hohen Datensicherheit.

Das markierte Material wird zusammen mit einer großen Menge an unmarkiertem eingesetzt. Allgemeine, markierte Vorstufen können im Katabolismus gespalten werden und die gebildeten Metabolite dann wieder als Bausteine für Biosynthesen verwendet werden. Wenn die markierte Vorstufe mit einer großen Menge an unmarkierter angeboten wird, dann sind die gebildeten Produkte ein zusammengesetztes Mosaik aus maximal einem markierten und zahlreichen unmarkierten Modulen. Die isolierten Metabolite sind ein komplexes Gemisch aus Isotopomeren, die über mehr als einen Syntheseweg aus einem speziellen Metaboliten gebildet werden. Vorallem kann die markierte Vorstufe über zyklische Stoffwechselwege recycled werden, was zu positionellen Neuformierungen der Isotopmarkierung führen kann.

Einleitung

Wenn stabilisotopmarkierte Metabolite, wie D-Glucose, biologischen Systemen zugesetzt werden, entstehen komplexe Mischungen von Isotopologen in allen Zweigen der intermolekularen Mechanismen. Die Markierungsmuster der Intermediate des zentralen Stoffwechsellpools, wie Zuckerphosphate, Dicarbonsäuren und Acetyl-CoA, sind über Retrobiosynthese aus den primären Metaboliten (Aminosäuren und Ribonukleoside) erhältlich. Über den Vergleich der Markierungsmuster von primären und sekundären Metaboliten (z.B. Isoprenoide) ist es möglich, die Biosynthesewege, sowie den Fluss der Metabolite innerhalb eines Organismus zu interpretieren.

Acetyl-CoA nimmt eine Schlüsselposition im Stoffwechsel ein. Es bildet den Knotenpunkt zwischen katabolen und anabolen Reaktionswegen. Man spricht bei dieser Art von Sammelbecken von intermediären Stoffwechselprodukten von einem „Pool“ bzw. einem „Stoffwechsellpool“. Das in den Mitochondrien gebildete Acetyl-CoA wird ins Cytosol exportiert. Es bilden sich mehr oder weniger unabhängige Pools von Acetyl-CoA in Mitochondrien, Plastiden (vorallem junge Chloroplasten) und Cytosol (Richter, 1998).

Die Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat und α -Ketoglutarat können direkt aus den korrespondierenden Transaminierungsprodukten Alanin, Aspartat und Glutamat abgeleitet werden (Abbildung 6). Das Markierungsmuster von α -Ketoglutarat ist neben Glutamat auch in Prolin und Arginin zu finden. Das Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat spiegelt sich neben Alanin, in den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin wieder. Acetyl-CoA erhält man aus der Aminosäure Leucin und über die Verknüpfung mit dem Citratzyklus aus den Aminosäuren Glutamat, Prolin und Arginin. Oxalacetat reflektiert sich in Aspartat, Threonin, Isoleucin, Lysin und den Pyrimidinnukleosiden Cytidin und Uridin. Auch hier besteht eine Verknüpfung über den Citratzyklus mit Acetyl-CoA und α -Ketoglutarat. Die Markierung von Ribose-5-phosphat kann aus den Ribose-Einheiten der Nukleoside und aus Histidin rekonstruiert werden. Der Aromatenring von Tyrosin und Phenylalanin erlaubt Rückschlüsse auf das Markierungsmuster von Erythrose-4-phosphat. Die Markierung der von Tetrahydrofolat-Verbindungen übertragenen C_1 -Einheiten kann aus dem C_3 von Serin, sowie aus den Purinen abgeleitet werden.

Durch die Vielzahl an isolierten Aminosäuren und Ribonukleosiden kommt es bei den Markierungsmustern der Zentralmetabolite zu Mehrfachbestimmungen, die zu einer hohen statistischen Genauigkeit führen.

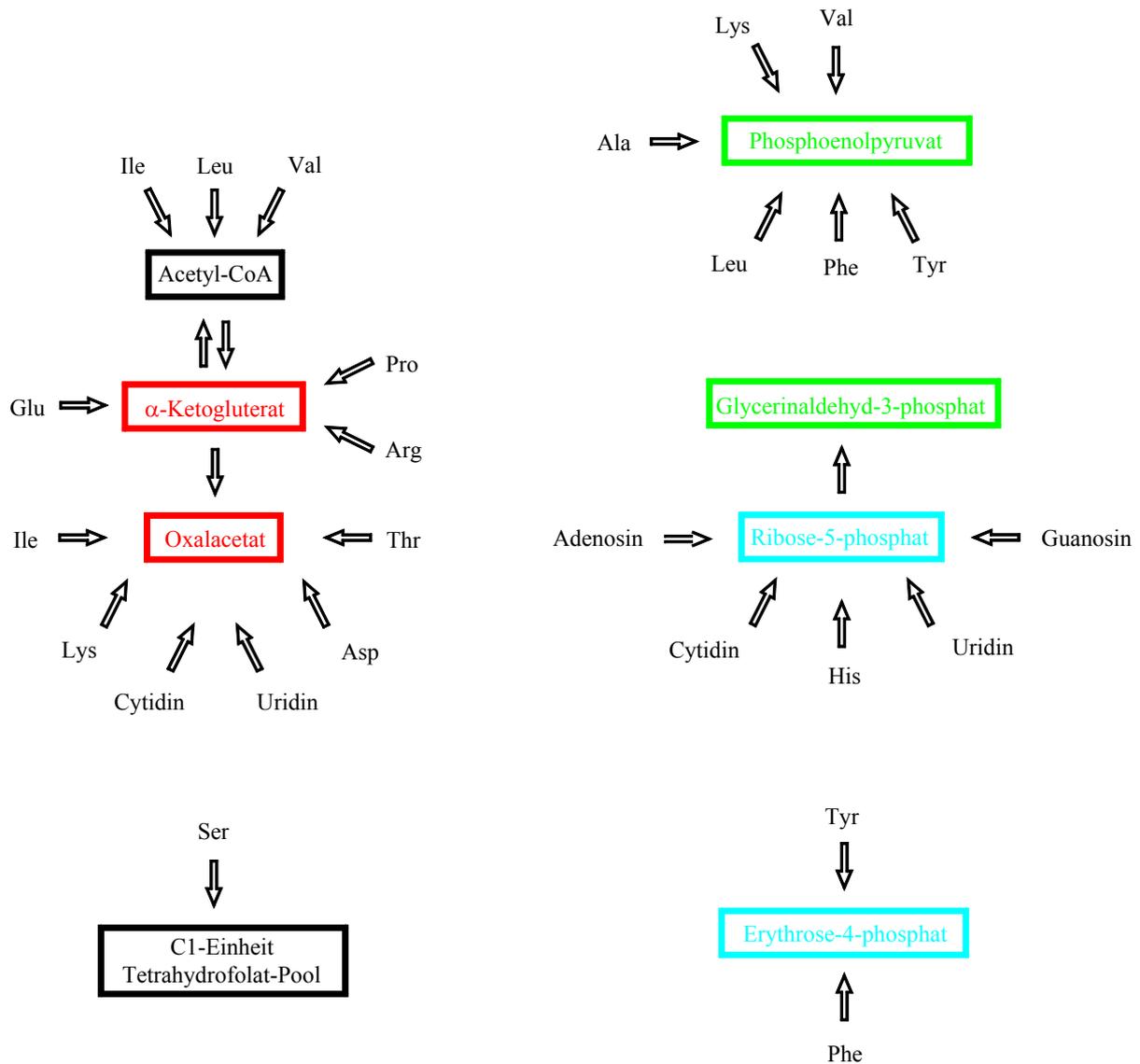


Abbildung 6. Rekonstruktion der ^{13}C -Markierungen der Zentralmetabolite durch Retrobiosynthese aus den Aminosäuren und Ribonucleosiden. Es sind die Metabolite aus der Glykolyse (grün), dem Citratzyklus (rot) und dem Pentosephosphatweg (blau) dargestellt.

Es erfolgt der Einsatz von mehrfach oder einfach ^{13}C -markierten Vorstufen (z.B. $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, $[\text{1-}^{13}\text{C}_1]\text{D-Glucose}$).

Die Technik der *einfach ^{13}C -markierten Vorstufen* hat sich als wertvoll bei Einbaustudien in Mikroorganismen erwiesen, da hohe spezifische Einbauten möglich sind. Bei vergleichbaren Vorstufen in höheren Pflanzen sind die spezifischen Einbauten üblicherweise geringer (Hutchinson *et al.*, 1974; Battersby *et al.*, 1974; Leete und Bodem, 1976).

Einleitung

Bei mehrfach ^{13}C -markierten Vorstufen sind höhere Verdünnungen möglich. In den NMR Spektren bilden sich Satellitensignale aufgrund der skalaren Kopplung zwischen den benachbarten ^{13}C -Atomen. Die Wahrscheinlichkeit, dass unter natürlichen Bedingungen zwei ^{13}C -Atome nebeneinander liegen, liegt bei 0,01% (1,1% x 1,1%). Der natürliche Hintergrund von Satellitensignalen im ^{13}C -NMR Spektrum ist daher klein. Als Konsequenz ergibt sich die hohe Empfindlichkeit bei der Bestimmung von mehrfach ^{13}C -angereicherten Strukturmodulen aus mehrfach ^{13}C -markierten Vorstufen (auch bei niedrigen Einbauraten).

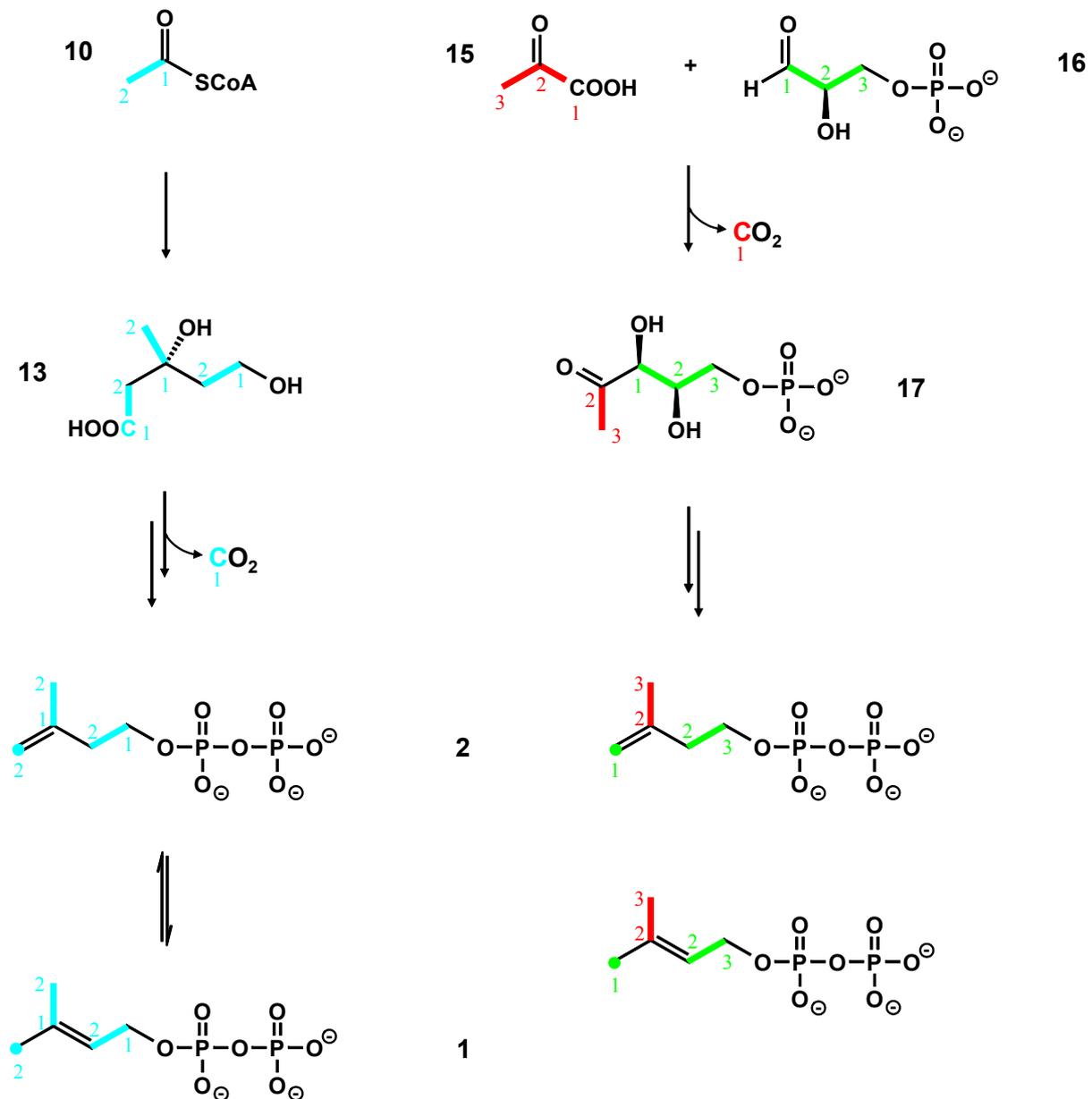


Abbildung 7. Weg der einzelnen C-Atome in den beiden Terpenbiosynthesewegen.

Die Retrobiosynthese lässt sich besonders leicht anwenden, wenn Hypothesen zu Biosynthesewegen überprüft werden sollen. Da sowohl die Reaktionen des Mevalonatwegs, sowie des Deoxyxylulosephosphatwegs bekannt sind, ist das Verfahren in der Lage, die Existenz der beiden Wege nachzuweisen, aber auch ggf. Anteile aus den beiden Wegen zu bestimmen.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, kann jedes C-Atom von IPP bzw. DMAPP über die beiden Terpenbiosynthesewege, einem entsprechenden C-Atom aus den Intermediaten des zentralen Stoffwechselfpools zugeordnet werden. Über den Vergleich der retrobiosynthetisch gewonnenen Markierungsmuster der Intermediate des zentralen Stoffwechselfpools, aus den primären (Aminosäuren, Ribonukleotide) und sekundären Metaboliten (Terpenoide), erfolgt die Zuordnung des eingesetzten Biosynthesewegs im Organismus.

1.3 Kompartimentierung

Die in der Pflanze vorkommenden Plastiden (Chloroplasten, Chromoplasten, Mitochondrien, Peroxisome und Glyoxysome) bilden Kompartimente innerhalb der Zelle. Es handelt sich dabei um, in sich geschlossene Systeme, die teilweise autonom sind. Die Kompartimentierung der eukaryotischen Zelle ermöglicht es, dass gegenläufige bzw. unterschiedliche Stoffwechselwege zur gleichen Zeit stattfinden können. Ein Beispiel hierfür ist die Makroalge *Charophyceae*, die in ihrer Struktur den Pflanzenzellen ähnlich ist. In *Charophyceae* werden beide Terpenbiosynthesewege durchgeführt, d.h. Der Mevalonatweg findet im Cytosol statt, während gleichzeitig der Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden durchgeführt wird (Tabelle 1). Durch die räumliche Trennung wird die gegenseitige Beeinflussung der Stoffwechselwege stark reduziert. Im Gegensatz dazu verwendet die Mikroalge *Chlorophyceae*, die in ihrer Struktur den Bakterienzellen ähnelt und keine Plastiden hat, nur einen der beiden Terpenbiosynthesewege (Tabelle 1).

Die Chloroplasten sind funktionelle, selbstregulierende Einheiten, die eine gewisse Autonomie besitzen (Endosymbiontenhypothese). In ihnen finden Synthesen von Proteinen, Lipiden und Isoprenoiden statt. Dennoch befinden sich extraplastidäre proteinogene Aminosäuren in den Chloroplasten. Auch α -Ketoglutarat und Aspartat wird aus dem Cytosol exportiert. Im Gegenzug werden Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat an das Cytosol abgegeben. Die Verbindungen werden in der Saccharosesynthese oder als 3-Phosphoglycerat in die Glykolyse eingeschleust. Der Eintrag von 3-Phosphoglycerat in die Chloroplasten für den Calvin-Zyklus ist bei Licht eingeschränkt (Richter, 1998).

Biosynthesen wie der Calvin-Zyklus und die Photorespiration wurden in isolierten Chloroplasten untersucht (z.B.: Stitt und Rees, 1979; Bryan, 1980; Bagge und Larsson, 1986;

Coruzzi, 1991). Die in Chloroplasten vorkommenden Enzyme haben häufig Isozyme in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten, wie den Mitochondrien, den Plastiden oder dem Cytosol. Das ist nicht ungewöhnlich, da Plastiden sich prinzipiell ineinander umwandeln können und aus einer gemeinsamen Vorstufe gebildet werden. Beispiele für die Existenz von Isozymen sind die Katalysatoren der Glykolyse und des oxidativen Pentosephosphatwegs (Gottlieb, 1982).

Es stellt sich die Frage, inwieweit sich die Forschungsergebnisse über die Biosynthesewege einzelner Organellen sich auf die ganze Zelle bzw. andere Teile des Organismus übertragen lassen. Aufgrund der nachgewiesenen Isozyme in vielen Pflanzenkompartimenten sollte es möglich sein Stoffwechselwege aus z.B. den Chloroplasten auf chloroplasten-freie Gewebe zu übertragen.

Untersuchungen zu den beiden Terpenbiosynthesewegen zeigten, dass die Kompartimentierung nicht absolut ist. Der Mevalonatweg wird im Cytoplasma und der Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden durchgeführt. Bei Einbauexperimenten mit markiertem Mevalonat in *Ginkgo biloba* wurden 0,5 % Einbau in das, über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisierte, Ginkgolid beobachtet (Tabelle 3, Schwarz, 1994; Schwarz und Arigoni, 1999). Über die charakteristischen Markierungsmuster wurden IPP und cytosolisches Farnesyldiphosphat (FPP) als Intermediate des Crosstalks diskutiert. Es wurde angenommen, dass cytosolisches FPP in den Plastiden mit einem IPP Molekül, aus dem Deoxyxylulosephosphatweg, zu Geranylgeranyldiphosphat weiterreagiert (Schwarz, 1994; Schwarz und Arigoni, 1999). Der Import von IPP und/oder DMAPP bzw. späteren Produkten der Terpenbiosynthese aus den Plastiden in das Cytosol wurde bei Einbauversuchen mit markierter 1-Deoxy-D-xylulose in Zellkulturen von *Catharanthus roseus* beobachtet (Tabelle 4, Arigoni *et al.*, 1997). Inzwischen haben Fütterungsexperimente in verschiedenen Organismen wiederholt bewiesen, dass ein Austausch zwischen den beiden Terpenbiosynthesewegen stattfindet: Tabelle 3 und Tabelle 4, sowie *Heteriscyphus planus* (Nabeta *et al.*, 1995b, 1995c und 1997), *Matricaria recutita* (Nabeta *et al.*, 1998), Actinomyceten (Seto *et al.*, 1996 und 1998), *Anthroceros punctatus* (Itoh *et al.*, 2000) und *Torreya nucifera* (Yang und Orihara, 2002).

Der als Crosstalk bezeichnete Austausch von Intermediaten der Terpenbiosynthese wurde bei Einbauversuchen mit Mevalonat in Konzentrationen bis zu 15 % beobachtet (Tabelle 3). Der Einbau von 1-Deoxy-D-xylulose fiel meist deutlich geringer aus, mit Ausnahme von *Phaseolus lunatus*, das mit 31 % einen deutlich höheren Einbau von 1-Deoxy-D-xylulose in ein cytosolisches Terpen zeigt (Tabelle 4).

Einleitung

Tabelle 3. Einbauraten (%) von Mevalonat in Terpenoide von *Ginkgo biloba* (Schwarz, 1994; Schwarz und Arigoni, 1999), *Phaseolus lunatus* (Piel *et al.*, 1998) und *Catharanthus roseus* (Schuhr *et al.*, 2003).

		<i>G. biloba</i>	<i>P. lunatus</i>	<i>C. roseus</i>
im Cytosol	Sitosterol	40		48
	DMNT ¹		88	
in Plastiden	Gingkolid	0,5		
	Linalool		15	
	Lutein			7

Tabelle 4. Einbauraten (%) von 1-Deoxy-D-xylulose in Terpenoide von *Phaseolus lunatus* (Piel *et al.*, 1998) und *Catharanthus roseus* (Arigoni *et al.*, 1997).

		<i>P. lunatus</i>	<i>C. roseus</i>
im Cytosol	Sitosterol		0,4
	DMNT	40	
in Plastiden	Linalool	90	
	Lutein		16

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nach Anzuchten von *Chloroflexus aurantiacus*, *Catharanthus roseus* und *Nicotiana tabacum* (Wildtyp und Mutanten) mit Stabilisotopen markierten Vorstufen, die primären und sekundären Metabolite zu isolieren. Über die primären Metabolite (Aminosäuren und Ribonukleotide) sollten die Markierungsmuster des zentralen Stoffwechsellpools der Organismen retrobiosynthetisch bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Daten sollten die Biosynthesewege der sekundären Metabolite (Terpen und Alkaloide) bestimmt bzw. bestätigt werden.

Nach Etablierung der stereospezifischen Deuterierung von NADPH sollten Reduktasen auf ihre Stereospezifität untersucht werden.

¹ DMNT: 4,6 Dimethylnona-1,3,7-trien; biosynthetisches Derivat von Farnesyldiphosphat (Piel *et al.*, 1998)

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Anlage zur Proteinreinigung	Fraktionssammler: Pharmacia LKB, GradiFrac Schlauchpumpe: Pharmacia LKB, Pump P-1 Mischer: Pharmacia Mixer 5 mPa Schreiber: Pharmacia LKB, REC 102 Photometer: Pharmacia LKB, Optical Unit UV-1 Pharmacia LKB, Control Unit UV-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
Brutschrank	Psychrotherm (New Brunswick Scientific Corp., New Brunswick, USA)
CO ₂ Inkubator	Advance Optima (Schroff, Straubenhardt, Deutschland)
Differenzialrefraktometer, GAT LCD 201	Gamma Analysen Technik GmbH (Bremerhaven, Deutschland)
Elektrophoresekammer	H6 „Baby Gel“, Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland) mit Spannungsquelle LKB-GPS 200/400 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
Flüssigszentrifugations-spektrometer	Beckman LS 7800 (Fullerton, USA)
Fraktionssammler	Pharmacia LKB - SuperFrac (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
Heizblock	Techne DRI.BLOCK DB-2A (Wertheim, Deutschland)
HPLC	Pumpen: HPLC Pumpe 64 (Knauer, Bad Homburg, Deutschland) Detektoren: Dioden-array Photometer (J & M, Aalen, Deutschland) Software: Eurochom 2000 (Knauer, Bad Homburg, Deutschland) TIDAS (J & M, Aalen, Deutschland)

Material und Methoden

Lyophylle	Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) Anlagensteuerung LDC-1M Elekt. Anschluss 230 V, 50 Hz Temp. -50 °C Druck 0,200 mbar
Mixer	Moulinex, TURBO Blender (Moulinex, Deutschland)
NMR	FT-NMR Spektrometer DRX 500 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) Aspect Station XWINNMR Software 1:0 FT-NMR Spektrometer AM 360 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) Array Processor Aspect 3000 Computer Selektivanregungseinheit, SEU
pH-Meter	E512 Metrohm AG CH-9100 (Herisau, Schweiz)
Rotationsverdampfer	Membranpumpe - Vakuumpumpe (Vacuumbrand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland) Rotavator RE 120 (Büchi, Deutschland) Wasserbad (Köttermann, Deutschland)
Spektralphotometer	UV-VIS Spektrometer Ultraspec Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) mit Quarzküvetten mit Plastikküvetten
Ultra Turax T 25	Jank & Kunkel (IKA Labortechnik, Stauffen, Deutschland)
Ultraschallgerät	Branson Sonifier B-12A mit „L“-Converter (Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut, USA)

Material und Methoden

Waage	SCALTEC SBA 32, max. 120 g, d = 0,0001 g SCALTEC SBA 52, max. 2200 g, d = 0,01 g
Zentrifugen	Kühlzentrifugen RC2-B mit GSA-Rotor (Sovall, Connecticut, USA) Tischzentrifuge (Eppendorf, Deutschland) GS-15R Zentrifuge, Rotor S4180 (Beckman, Fullerton, USA)

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Die bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merk (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Die markierten Verbindungen stammen von:

NaOD (10 M, 40 %) (99 atom-% ^2H)	Aldrich Chem. Co. (Steinheim, Deutschland)
DCI (37 %) (99 atom-% ^2H)	Aldrich Chem. Co. (Steinheim, Deutschland)
D ₂ O (99,9 atom-% ^2H)	ISOTEC inc. A Matheson, USA Company (USA)
CDCl ₃ (99,8 atom-% ^2H)	Cortec (Paris, Frankreich)
DMSO-d ₆	ISOTEC inc. A Matheson, USA Company (USA)
[U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose	Omicron (South Bend, Indiana, USA)
[1- $^2\text{H}_1$] D-Glucose (98 atom-% ^2H)	Omicron (South Bend, Indiana, USA)
[1- $^3\text{H}_1$]D-Glucose	ICN Biochemicals NV/SA
[1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)
[1,2- $^{14}\text{C}_2$]Glycin	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)
KD ₂ PO ₄ (~95 atom-% ^2H)	KH ₂ PO ₄ mehrmals in D ₂ O aufgenommen und lyophilisiert (0,5 mg / 3 ml D ₂ O)

Referenzsubstanzen für DC, HPLC und NMR wurden zu einem Teil gekauft und zum anderen Teil im Laufe dieser Arbeit isoliert und identifiziert (siehe unten).

Material und Methoden

Aminosäuren	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merk (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).
1-Deoxy- <i>D</i> -xylulose-5-phosphat	hergestellt von Dr. S. Herz (Hecht <i>et al.</i> 2001a)
Nicotin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Sitosterol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Pteridine	Schricks (Jona, Schweiz)

β -Carotin, Lutein und Chlorophyll, sowie Phytol wurden aus Stielmangold (*Beta vulgaris convar. vulgaris var. flavescens*), Geranylgeraniol aus *Chloroflexus aurantiacus* und Stigmasterol, sowie Abienol aus *Nicotiana tabacum* isoliert.

Alle organischen Lösungsmittel für die Analytik und präparative Isolierungen wurden destilliert.

2.2.2 Enzyme

Glucose Dehydrogenase von <i>Bacillus megaterium</i> (E.C. 1.1.1.47)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
1-Deoxy- <i>D</i> -xylulose-5-phosphat Synthase von <i>Bacillus subtilis</i>	(Expression in <i>E. coli</i>) isoliert und gereinigt von Dr. Wungsintaweeikul (Herz, 2000)
1-Deoxy- <i>D</i> -xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase von <i>E. coli</i> M15 pQEYAEM	isoliert und gereinigt von Dr. Wungsintaweeikul (Wungsintaweeikul, 2001)
alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (E.C. 3.1.3.1)	Boeringer Mannheim (Mannheim)
Sepiapterinreduktase (E.C. 1.1.1.153)	aus <i>E. coli</i> Klon mit Plasmid p-Mal c 2 von NEB (Herrman, 1999), im Lauf der Arbeit isoliert und gereinigt

2.2.3 Trennmedien

- SC: Amylose; Serva (Heidelberg, Deutschland)
Dowex 50 Wx8 (200-300 mesh); Serva (Heidelberg, Deutschland)
Dowex 1x8 (100-200 mesh); Serva (Heidelberg, Deutschland)
Dowex 1x8 (200-300 mesh); Serva (Heidelberg, Deutschland)
Kieselgel 60; Merk (Darmstadt, Deutschland)
RP18-Katuschen (2 x 10 cm); Accubond SPE, 6 ml, ODS 1, J & W Scientific
- DC: Cellulose (140 μ , 20 x 20 cm, auf PE); Stürmer + Schüle GmbH (Deutschland)
Kieselgel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm, auf Aluminium); Merk (Darmstadt, Deutschland)
- HPLC: RP 18 Säule, Lichrosorb (präparativ, 250 x 4,5)
RP 18 Säule, Lichrosorb (analytisch, 5 μ m)
Nucleosil SB 10 (präparativ); Macherey Nagel (Düren, Deutschland)
Rezex RNM-Kohlenhydrat HPLC-Säule, Phenomenex (Torrance CA, USA)
- SDS-Page: Polyacrylamidgele (Trenngel (8 %) und Sammelgel (4 %))

2.2.4 Reagenzien

2.2.4.1 Sprühreagenz für die DC

- Anisaldehydreagenz 50 ml Eisessig
(Jork *et al.*, 1998) 1 ml konz. Schwefelsäure
0,5 ml Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd)

gut gekühlt mischen,
DC in Lösung tauchen,
bei 100 °C, bis zu 15 min entwickeln.

- Ninhydrin-Reagenz 3 mg Ninhydrin
(Jork *et al.*, 1998) 100 ml Butanol

lichtgeschützt aufbewahren,
DC mit Lösung besprühen,
bei 100 °C, bis zu 15 min entwickeln.

Material und Methoden

2.2.4.2 Reagenzien für die Proteinreinigung

Chromatographie-Puffer 1 50 mM Tris /HCl (pH 8,0)

Chromatographie-Puffer 2 50 mM Tris /HCl (pH 8,0), 500 mM Maltose

Die Chromatographie-Puffer und das Säulenmaterial (Amylose) wurden entgast eingesetzt.

2.2.4.3 Reagenzien für den Bradford - Nachweis

Bradford-Puffer
2,0 g Na_2HPO_4
0,6 g NaH_2PO_4
7,0 g NaCl
0,2 g NaN_3
in 1 Liter

Bradford-Reagenz
0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250
in 10 ml Ethanol und 25 ml H_3PO_4 lösen,
mit Wasser auf 250 ml auffüllen und filtrieren,
(lichtgeschützt aufbewahren).
Eichkurve mit BSA-Lösung (Proteinstandard) erstellen.

2.2.4.4 Reagenzien für die SDS-PAGE

Trenngel (8 %)
2 ml Acrylamid-Lösung
2,5 ml Trennpuffer
5,5 ml Wasser
50 μl 10% APS
5 μl TEMED
ausreichend für 2 Gel-Platten 10 x 10 cm.

Sammelgel (4 %)
0,5 Acrylamid
2,5 Sammelpuffer
2 ml Wasser
50 μl 10% APS
5 μl TEMED

Material und Methoden

Acrylamid-Lösung	149 g Acrylamid 6 g N,N'-Methylenbisacrylamid auf 500 ml mit entgastem bidest. Wasser auffüllen.
Trennpuffer	1,5 M TRIS/HCl (pH 8,3) 0,4 % SDS entgast
Sammelpuffer	0,5 M TRIS/HCl (pH 6,8) 0,2 % SDS entgast
Elektrophorese-Puffer	25 mM TRIS 192 mM Glycerin 0,1 % SDS
2x - Sampelpuffer	62 mM TRIS/HCl, pH 6,8 6 % Mercaptoethanol 10 % Glycerin 6 % SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Färbelösung	5 g Coomassie Brilliant Blue G-250 454 ml Methanol 454 ml dest. Wasser 92 ml Eisessig
Entfärber	50 % Methanol 10 % Eisessig 40 % Wasser

2.2.4.5 Reagenzien für die Sepiapterinreduktase Umsetzung

J ₂ /KJ - Lösung	1% Jod 2% Kaliumjodid in 1 N HCl (lichtgeschützt aufbewahren)
-----------------------------	--

2.2.5 Kulturmedien

2.2.5.1 *Chloroflexus aurantiacus*

Medium (Strauß *et al.*, 1992)

50 ml Stocklösung A
1 ml Stocklösung B
1 ml Stocklösung C
2 ml Stocklösung D
10 ml Stocklösung E

Stocklösungen A und B mischen,
auf 1 Liter auffüllen,
mit 6 M NaOH auf pH 8 einstellen,
autoklavieren,
Stocklösung C, D und E zugeben,
Medium 1h mit N₂ begasen,
mit 6 M NaOH auf pH 8 einstellen.

Stocklösung A

12 mg NH₄Cl
2,35 g K₂HPO₄
3 g MgSO₄ · 6 H₂O
1 g CaCl₂ · 2 H₂O
0,16 g NaCl
2 g N,N-bis(carboxymethyl)glycin
für 1 Liter Lösung

Stocklösung B

2,5 ml konz. H₂SO₄
2,28 g MnSO₄ · 6 H₂O
0,5 g ZnSO₄ · 7 H₂O
0,5 g H₃BO₃
0,025 g CuSO₄ · 5 H₂O
0,025 g Na₂MoO₄ · 2 H₂O
0,045 g CoCl₂ · 6 H₂O
für 1 Liter Lösung

Stocklösung C

0,9 g Thiamin-HCl

Material und Methoden

	0,2 g Biotin 0,8 g Folsäure für 1 Liter Lösung mit 6 M NaOH auf pH 7 einstellen sterilfiltrieren
Stocklösung D	0,6 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,8 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ für 1 Liter Lösung autoklavieren
Stocklösung E	40 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ für 1 Liter Lösung unter N_2 -Gas setzen autoklavieren

2.2.5.2 *E.coli*

Die Medien wurden bei 120 °C und ca. 1,5 bar für 20 min autoklaviert. Die Antibiotikaelösungen wurden dem kalten Medium zugesetzt.

LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Caseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 1 ml Ampicilin-Lösung 1 ml Kanamycin-Lösung für 1 Liter Lösung
LB-Medium/Glycerin	10 g Caseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 50 % (v/v) Glycerin für 1 Liter Lösung
Terrific-Broth-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	900 ml TB-Grundmedium 100 ml TB-Puffer 1 ml Ampicilin-Lösung

Material und Methoden

	1 ml Kanamycin-Lösung
TB-Grundmedium	12 g Hefe 24 g Caseinhydrolysat 4 ml Glycerin auf 900 ml mit dest. Wasser auffüllen, autoklavieren
TB-Puffer	0,5 g KH_2PO_4 2,8 g K_2HPO_4 in 200 ml Wasser, autoklavieren
Ampicilin-Lösung	170 mg Ampicilin, steril eingewogen in 1 ml Wasser _{steril} für 1 Liter Lösung
Kanamycin-Lösung	60 mg Kanamycin, steril eingewogen in 1 ml Wasser _{steril} für 1 Liter Lösung

2.2.5.3 *Catharanthus roseus*

LS-Medium
(Linsmaier und Skoog, 1965)

2.2.5.4 *Nicotiana tabacum*

Die Medien wurde mit 1M KOH auf pH 5,7 - 5,8 eingestellt. Es wurden 7 g Agar pro Liter zugesetzt und anschließend bei 120 °C und ca. 1,5 bar für 20 min autoklaviert.

B5 Medium	3,1 g Salz-Mischung 10 ml Vitamin-Lösung 0,983g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 20 g Saccharose für 1 Liter Lösung
VDW Medium	4,4 g Salz-Mischung 10 ml Vitamin-Lösung 30 g Saccharose

Material und Methoden

2 mg β -Indolessigsäure
0,2 mg Kinetin
0,5 g Caseinhydrolysat
für 1 Liter Lösung

Tabelle 5. Salz- und Vitamin-Mischung für die Kulturmedien B5 und VDW

		B5 mg/l	VDW mg/l
Salz-Mischung	EDTA F(III) Na	40,00	40,00
	KJ	0,75	0,83
	H ₃ BO ₃	3,00	6,20
	MnSO ₄ · H ₂ O	10,00	22,30
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,00	8,60
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	0,25
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	0,025
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	0,025
Vitamin Lösung	Inosit	100	100
	Pyridoxin-HCl	1	0,5
	Thiamin-HCl	10	0,1
	Glycin		2
	Nicotinsäure	1	0,5

2.3 Organismen

2.3.1 Mikroorganismen

2.3.1.1 *Chloroflexus aurantiacus*

Chloroflexus aurantiacus (DSM 636) stammt aus der Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, FRG). Die Fermentation und Fütterungsexperimente wurden von Dr. Strauß und Prof. Dr. Fuchs an der Universität Freiburg durchgeführt.

2.3.1.2 *E. coli*

Es wurde ein *E. coli* XL-1 blue pMAL-SR verwendet, der nach Induktion mit IPTG ein Maltosebindeprotein der Sepiapterinreduktase aus Maus exprimiert.

Der verwendete Expressionsklon stand am Lehrstuhl zur Verfügung. Herstellung und Charakterisierung des Klons erfolgte im Rahmen der Doktorarbeiten von Dr. Hausman und Dr. Herrmann (Bracher *et al.*, 1998).

2.3.2 Pflanzen

2.3.2.1 *Beta vulgaris*

Der, aus käuflich erhältlichen Samen gezogene, Stielmangold (*convar. vulgaris var. flavescens*) diente als Quelle von Lutein, β -Carotin und Chlorophyll.

2.3.2.2 *Catharanthus roseus*

Die Gewinnung und die Pflege der Zellkulturen von *Catharanthus roseus* (aus Blattzellen) erfolgte an der Fakultät für Chemie und Pharmazie von Prof. Dr. Zenk der Ludwig Maximilian Universität München.

2.3.2.3 *Nicotiana tabacum*

Nicotiana tabacum, var. *havanna piperita* (Wildtyp)

Nicotiana tabacum, var. *havanna piperita* RPO

Nicotiana tabacum, var. *havanna piperita* NDH 53-25

Nicotiana tabacum, var. *havanna piperita* NDH 54-3IV

Die markierten Anzuchten der Pflanzen erfolgte im botanischen Institut der Ludwig Maximilian Universität München. Die Mutanten stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Koop (Botanisches Institut, Ludwig Maximilian Universität München).

Die Pflanzen für die CO₂-Experimente stammen aus dem botanischen Garten von Augsburg.

2.4 Anzucht

2.4.1 *Chloroflexus aurantiacus*

Chloroflexus aurantiacus wurde phototroph unter anaeroben Bedingungen bei 55 °C angezogen. Die Kultur wurde mit einem Gasgemisch aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ begast (70 ml / min) und mit 60 W Lampen bestrahlt (Strauß *et al.*, 1992).

2.4.2 *E. coli* (mit SR Mal)

2.4.2.1 Stammhaltung

Zur Erneuerung der Lagerbestände wurden 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium aus den Stickstoffkulturen von Dr. Herrmann *E. coli* p Mal angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer Zelldichte von 0,6 OD₆₀₀ angezogen. Nach Zentrifugation (4500 Upm, 15 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in 600 μ l LB-Medium/Glycerin suspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert (Herrmann, 1999).

2.4.2.2 Zellanzucht

Die Vorkultur wurde in 100 ml antibiotikahaltigem LB-Medium angesetzt und bei 37 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. Nach Erreichen der stationären Phase wurde 1 Liter TB-Medium mit 5 - 10 ml Vorkultur angeimpft. Bei einer Zelldichte von 0,6 bis 0,7 OD₆₀₀ wurden die Zellen mit 2 mM IPTG (480 mg/l) zu Expression von Sepiapterinreduktase induziert. Nach 24 Stunden bei 37 °C und 200 Upm wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 Upm, 4 °C, 10 min), mehrmals mit Saline (0,9 % NaCl) gewaschen und anschließend bis zur Isolierung der Sepiapterinreduktase bei - 20 °C gelagert (Herrmann, 1999).

2.4.3 *Catharanthus roseus*

Die grüne, photosynthesefähige Kultur wuchs unter kontinuierlicher Beleuchtung (2400 lux) auf einem rotierenden Schüttler (100 Upm) bei 21 °C (Schuhr *et al.*, 2003).

2.4.4 *Nicotiana tabacum*

2.4.4.1 Glucose-Anzuchten

Das B5 Medium wurde bei der Anzucht des Wildtyps und den NDH Mutanten und das VDW Medium wurde für die Anzucht der RPO Mutante verwendet.

Die Samen der Tabakpflanzen wurden sterilisiert und anschließend innerhalb von 8 - 10 Tagen auf den Medien zum Keimen gebracht. Nach 2 - 3 Wochen wurden die Pflanzen vereinzelt. Von den ausreichend großen Pflanzen wurden einzelne Blätter entfernt und auf das markierte Medium (100 - 120 ml pro Kulturglas) gelegt. Die Pflanzen wurden bei 25 °C mit einem 8/16 h dunkel/hell Zyklus bei der Lichtintensität von 0,5 - 1 Wm⁻² belichtet. Nach 3 - 4 Wochen waren die Pflanzen groß genug zum Ernten (Kofer *et al.*, 1998).

2.4.4.2 CO₂ Anzuchten

Die erwachsenen Pflanzen, in Erde, wurden nur für die Dauer der Begasung mit markiertem CO₂ in den CO₂-Inkubator gestellt. Anschließend bis zur Ernte wuchsen die Pflanzen bei normalen Lichtverhältnissen für 10 Tage auf dem Fensterbrett weiter.

2.5 Isotopeneinbaustudien

2.5.1 Einbau von [U-¹³C₆]D-Glucose

Die Anzucht von *Catharanthus roseus* wurde in LS-Medium mit 1,2 g [U-¹³C₆]D-Glucose, neben 28,8 g unmarkierter D-Glucose pro Liter durchgeführt. Die Kulturen wurden 7 Tage bei kontinuierlicher Beleuchtung inkubiert. Die Zellausbeute lag bei 50 g (Frischgewicht).

Für die Anzuchten des Wildtyps und der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* wurden 280 mg [U-¹³C₆]D-Glucose, neben 13,72 g unmarkierter Saccharose dem Kulturmedium B5 (700 ml) zugesetzt. Die Ausbeute an verwertbarem Pflanzenmaterial betrug 100 g beim Wildtyp und 83 g bei der RPO Mutante (Frischgewicht).

Die Einbauten bei *Nicotiana tabacum* NDH 53-25 und *Nicotiana tabacum* NDH 54-3IV erfolgten mit je 2,8 g [U-¹³C₆]D-Glucose, neben 11,2 g unmarkierter Saccharose im Kulturmedium B5 (700 ml). Die Ausbeute an verwertbarem Material lag bei 67 g für die Mutante NDH 53-25 und 55 g für die Mutante NDH 54-3IV (Frischgewicht).

2.5.2 Einbau von [1-¹³C₁]D-Glucose

Bei der Anzucht von *Nicotiana tabacum* (Wildtyp) mit [1-¹³C]D-Glucose wurden 4,6 g markierte D-Glucose, neben 4,6 g unmarkierter D-Glucose dem Kulturmedium B5 (700 ml) zugesetzt. Die Ausbeute an verwertbarem Pflanzenmaterial betrug 70 g (Frischgewicht).

2.5.3 Einbau mit ¹³CO₂

Bei dem Einbauversuch von *Nicotiana tabacum* mit ¹³CO₂ wurden 6 Pflanzen mit 80 ml ¹³CO₂ über 5 Stunden begast. Die Ausbeute an Blattmaterial betrug 85 g (Frischgewicht).

2.5.4 [1,2-¹³C₂]Glycin / [1,2-¹⁴C₂]Glycin

Bei der Anzucht von *Chloroflexus aurantiacus* mit [1,2-¹³C₂]Glycin wurde das markierte Material kontinuierlich über einen Zeitraum von 140 Stunden zugesetzt. Die kontinuierliche Zugabe von [1,2-¹³C₂]Glycin ermöglichte ein autotrophes Wachstum der Mikroorganismen. Es wurde eine sterile Lösung (50 ml) aus 0,20 g [1,2-¹³C₂]Glycin und 5 µCi [1,2-¹⁴C₂]Glycin für 5 Liter Kulturmedium verwendet (Rieder, 1999). Aus der Anzucht wurden 2,58 g (lyophilisiert) verwertbares Zellmaterial gewonnen.

2.5.5 [1-²H₁]D-Glucose

Mit Hilfe von [1-²H₁]D-Glucose wurde im Rahmen einer Synthese Deuterium in NADPH eingeführt, um die Stereoselektivität von Enzymen *in vitro* nachweisen zu können.

2.6 Naturstoffisolierungen

2.6.1 Isolierung von D-Glucose

2.6.1.1 Extraktion

15 g frische Pflanzenproben wurden mit flüssigem Stickstoff verrieben. Anschließend wurde das zerkleinerte Material mit 100 ml bidest. Wasser versetzt und für 1h bei 37 °C extrahiert. Nach dem Abfiltrieren wurde die klare Lösung lyophilisiert. Ein Teil des trockenen Rückstands (100 - 400 mg) wurde in D₂O bzw. Methanol/D₂O (1/1, v/v) aufgenommen und am NMR vermessen.

2.6.1.2 Reinigung

Anschließend wurde die Glucoselösung über eine Rezex RNM-Kohlenhydrat HPLC-Säule gereinigt. die Säule wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 ml/min und 75 °C mit Wasser entwickelt. Die Detektion erfolgte über ein Differenzialrefraktometer.

Glucose wurde nach 14 ml eluiert. Die Fraktion wurde lyophilisiert, in D₂O aufgenommen und am NMR vermessen.

2.6.2 Isolierung von Nicotin

2.6.2.1 Identifizierung

Zur Identifizierung des Nicotins wurden die Proben auf Kieselgel 60 F₂₄₅ in Ether/Isopropanol/konz. Ammoniak (v/v/v, 80/10/3) entwickelt (Leete und Slattera, 1976). Die Detektion erfolgte bei 245 nm. Der R_F-Wert von Nicotin lag bei 0,60.

2.6.2.2 Isolierung

Die frischen, oder bei -20 °C gelagerten Pflanzenproben (ca. 100 g) wurden mit dem Ultra Turax zerkleinert und mit 700 ml Methanol extrahiert. Die tief grüne Lösung wurde mit einer Nutsche abgesaugt. Der Extrakt wurde bei max. 20 °C unter Vakuum auf 5 - 10 ml methanol-freien Rückstand eingengt. Die Lösung (mit ausgeflocktem Chlorophyll) wurde mit 500 ml Ether extrahiert. Die grüne Ether-Fraktion wurde für spätere Arbeiten separiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Die wässrige Phase mit dem Nicotin wurde mit 25 % Ammoniak auf pH 11 eingestellt. Anschließend wurde mit 300 ml Ether extrahiert. Der Ether wurde im Vakuum weitgehend eingengt und anschließend mit Stickstoff abgeblasen (List und Hörhammer, 1977; Bilck *et al.*, 1974). Der Rückstand aus 1 - 2 ml Wasser wurde mit 500 µl CDCl₃ extrahiert. Das CDCl₃ wurde für die NMR Messung eingesetzt.

2.6.3 Isolierung von Terpenoiden

2.6.3.1 Identifizierung

Die Terpenoide (β -Carotin, Phytoen, Lutein), Sitosterol und Chlorophyll wurden auf Kieselgel 60 F₂₅₄ in Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v) getrennt. Die Identifizierung erfolgte bei sichtbarem Licht, sowie bei 254 nm und 366 nm. Sitosterol wurde mit Anisaldehyd-Reagenz angefärbt.

Zur Identifizierung von Phytoen neben β -Carotin wurde Hexan/Ethylacetat (19/1, v/v) als Fließmittel eingesetzt. Phytoen hat in diesem System einen R_F-Wert von 1,0 und β -Carotin von 0,95. Phytoen ist bei 366 nm als grüner Spot sichtbar.

Tabelle 6. R_F-Werte von β -Carotin, Phytoen, Lutein, Sterole und Chlorophylle (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel: Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v), Detektion: sichtbares Licht, 254 nm und 366 nm).

	R _F -Werte	Farbe	254 nm	366 nm
β -Carotin	0,95	gelb	+	
Phytoen	0,95		+	+
Lutein	0,41	gelb	+	
Chlorophyll	0 - 0,90	grün	+	+
Sitosterol	0,75			

2.6.3.2 Extraktion

Je nach Zusammensetzung der zu isolierenden Terpenoide wurden verschiedene Lösungsmittel gewählt. Eine schnelle Möglichkeit war eine Kombination aus polarem und unpolarem Lösungsmittel, wie Methanol/Dichlormethan (1/1, v/v) (Rieder, 1999). Gute Ergebnisse lieferte auch Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v) (Arigoni *et al.*, 1997). Die letzt genannte Mischung wurde aus umwelttechnischen und gesundheitlichen Gründen bevorzugt eingesetzt. Beide Isolierungen liefern das gewünschte Ergebnis.

2.6.3.2.1 Chloroflexus aurantiacus

Das Zellmaterial (unmarkiert: feucht 20 g; markiert: lyophilisiert 2,58 g) wurde, nach Zerstörung der Zellmembranen mit Ultraschall (15 min, Stärke 7), mit 600 ml Methanol/Dichlormethan (1/1, v/v) extrahiert. Anschließend wurde das unmarkierte Material an Kieselgel 60 (S. 36) weiter gereinigt. Das markierte Material wurde an Kieselgel 40 (S. 36) aufgearbeitet.

2.6.3.2.2 *Catharanthus roseus*

Das Zellmaterial (50 g) wurde mit dem Ultra-Turax zerkleinert und mit 600 ml Hexan/ Ethylacetat (1/1, v/v) extrahiert. Anschließend wurde an Kieselgel 60 (S. 36) weiter aufgereinigt.

2.6.3.2.3 *Nicotiana tabacum*

Der Zellrückstand, aus der Nicotinisolierung, wurde mit 200 ml Dichlormethan extrahiert. Der Dichlormethan-Extrakt und der Ether-Extrakt aus der Nicotiningewinnung wurden vereinigt und im Vakuum eingeeengt. Der so gewonnene Rückstand wurde an Kieselgel 60 (S. 36) weiter aufgereinigt.

2.6.3.3 Säulenchromatographie

2.6.3.3.1 Kieselgel 60

Der trockene Extrakt wurde in 5 - 20 ml Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v) aufgenommen und auf eine Kieselgel 60 Säule (3 x 40 cm) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 2 Liter Hexan/Ethylacetat (1/1; v/v), 1 Liter Ethylacetat und 300 ml Methanol eluiert (Arigoni *et al.*, 1997). Bei der Abwesenheit von Chlorophyll verringern sich die Mengen der beiden ersten Fließmittel auf 800 ml Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v) und 300 ml Ethylacetat. Bei maximalem Durchfluss wurden 15 ml Fraktionen aufgefangen. Nach 400 ml eluierten die Fette, dicht gefolgt von β -Carotin, Xanthophyllen und Phytoen (rote Fraktion). Anschließend wurde in 450 - 800 ml der Hauptanteil an Chlorophyll und Sitosterol, sowie Stigmasterol (500 -550 ml) eluiert (grüne Fraktion). Nach Wechsel des Fließmittels zu Ethylacetat eluiert Lutein ab 1500 ml als gelbe Fraktion. Restliche auf der Säule verbliebene Verbindungen wurden mit Methanol heraus gespült.

Die Vereinigung der Fraktionen erfolgte in erster Linie über die Farbe und in zweiter Linie nach Identifizierung über DC. Die Proben wurden im Vakuum eingeeengt. Die Fraktionen, außer der Chlorophyll-Fraktion, wurden vor einer weiteren Reinigung in CDCl_3 am NMR Spektrometer vermessen. Lagerung erfolgte in Lösung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.6.3.3.2 Kieselgel 40

Der Extrakt wurde mit 20 ml Hexan auf eine gekühlte ($-10\text{ }^\circ\text{C}$) Chromatographiesäule mit Kieselgel 40 (10 x 40 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 1 Liter Hexan, 1 Liter Dichlormethan und 1,5 Liter Methanol/Dichlormethan/Wasser (6/3/1, v/v/v) eluiert. Bei maximalem Durchfluss wurden 30 ml Fraktionen aufgefangen. Es bildete sich rein farblich nur eine rot/gelbe bei 1000 ml und eine grün/schwarze Fraktion bei 2000 ml. Die Proben wurden im Vakuum eingeeengt und in Lösung unter $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.6.3.4 Reinigung

2.6.3.4.1 Lutein - und β -Carotin - Fraktion

Die Proben aus der Säulenchromatographie wurden über präparative HPLC (S. 38) weiter aufgereinigt.

2.6.3.4.2 Chlorophyll-Fraktion

Die trockene Chlorophyll-Fraktion wurde mit 100 ml 3 % methanolischer KOH versetzt und anschließend 30 min bei 80 °C unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurden Sitosterol, Stigmasterol, Abienol, Phytol und/oder Geranylgeraniol mit 150 ml Hexan extrahiert. Die intensiv grüne wässrige Phase wurde verworfen. Die gelb gefärbte organische Phase wurde anschließend mit 30 ml bidest. Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet (Arigoni *et al.*, 1997). Nach Einengen im Vakuum wurde die Probe über präparative HPLC (S. 38) weiter aufgereinigt.

2.6.3.5 HPLC

2.6.3.5.1 Analytische HPLC

Zur Identifizierung wurden die in CHCl_3 gelösten Fraktionen aus der Säulenchromatographie auf eine RP-18 HPLC-Säule mit Methanol als Fließmittel aufgetragen (Tabelle 7). Zur Identifizierung wurde das UV-Spektrum (Messung online am Dioden-array) herangezogen. Abienol wurde durch NMR Spektroskopie in einer HPLC-Fraktion, nach der Chlorophyll-verseifung, identifiziert.

Tabelle 7. Die Retentionszeiten von β -Carotin, Lutein, Phytol, Geranylgeraniol und Sitosterol/Stigmasterol im HPLC (RP-18, Fließmittel: Methanol, Flow: 2 ml/min, Detektion: 436 nm, 210 nm).

	Zeit [min]	Detektion
Geranylgeraniol	2	210 nm
Lutein	2	436 nm
Phytol	3	210 nm
Sitosterol/Stigmasterol	7	210 nm
β -Carotin/Phytoen	18	436 nm

Bei den Fraktionen von *Chloroflexus aurantiacus* wurden verschiedene Aceton Konzentrationen als Fließmittel der RP-18 HPLC-Säule eingesetzt.

2.6.3.5.2 Präparative HPLC

Die β -Carotin-, Lutein-Fraktionen und die verseifte Chlorophyll-Fraktion wurden präparativ auf einer RP-18 HPLC-Säule (5 μ m) mit Methanol als Fließmittel (2 ml/min) getrennt. Detektiert wurden die Carotinoide bei 436 nm und Phytol, Geranylgeraniol und die Sterole bei 210 nm.

Lutein eluierte nach bei 5 ml, Abienol bei 4 ml, Phytol bei 8 ml, die Sterole bei 14 ml, Geranylgeraniol bei 20 ml und β -Carotin bei 30 ml.

2.6.4 Isolierung von Aminosäuren (Eisenreich *et al.*, 1991)

2.6.4.1 Alkalische Hydrolyse

Der verbleibende Zellrückstand (2-3 mg) nach Extraktion der Terpenoide (S. 35) wurde in 100 ml 1M NaOH suspendiert und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Durch Zusatz von 10 ml konz. HCl und 10 ml 25 % Trichloressigsäure wurden die zellulären Proteine ausgefällt und durch anschließende Zentrifugation (GS3 Rotor, 5000 Upm, 4 °C, 15 min) von den in Lösung befindlichen Ribonukleotiden abgetrennt.

2.6.4.2 Isolierung der Ribonukleoside

Der nach der Proteinfällung (S. 38) erhaltene Überstand (120 ml) wurde sofort nach der Zentrifugation mit Ammoniak auf pH 8,0 eingestellt. Nach dem sich die zugesetzten 50 mg Bariumacetat gelöst haben, wurden 650 ml Ethanol zugesetzt. Bei 4 °C fielen die Nukleotide als Bariumsalze im Laufe einer Woche aus. Diese wurden anschließend durch Zentrifugation (GS3 Rotor, 5000 Upm, 4 °C, 30 min / Falkontube, 4800 Upm, 15-20 min) abgetrennt.

Das Pellet wurde in 50 ml 50 mM Salzsäure gelöst. Nach Zugabe von 2 ml gesättigter Natriumsulfat-Lösung fällt Bariumsulfat aus, das durch Zentrifugation (Falkontube, 4800 Upm, 15 min) abgetrennt wurde. Der Überstand wurde sofort auf Dowex 50 Wx8 (H⁺-Form, 200-300 mesh, 2 x 20 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 160 ml 50 mM Salzsäure und anschließend mit Wasser entwickelt. Bei einer Flussrate von 150 ml/h wurden Fraktionen von 15 ml aufgefangen. Die Detektion der Nukleotide erfolgte über Photometrie bei 254 nm und DC (Tabelle 8, Cellulose F₂₄₅ Plastikfolie, Laufmittel: 3 % Ammoniumchlorid, Detektion: 254 nm). UMP eluierte bei 100 ml, GMP bei 300ml, CMP und AMP bei 1000 ml. Die Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum eingengt, lyophilisiert und in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

Material und Methoden

Tabelle 8. R_F-Werte der Nucleoside und 2', 3'-Nucleotide (Cellulose F₂₄₅ Plastikfolie, Laufmittel: 3 % Ammoniumchlorid, Detektion: 254 nm).

	R _F -Werte
Adenosin	0,45
Cytidin	0,77
Guanosin	0,51
Uridin	0,79
2',3'- AMP	0,65, 0,56
2',3'- CMP	0,95
2',3'- GMP	0,73, 0,65
2',3'- UMP	0,92

CMP und AMP wurden über präparative HPLC an einer RP 18 Säule, mit 100 mM Ammoniumformiat/100 mM Ameisensäure als Fließmittel, getrennt. 2'-CMP und 3'-CMP eluiert bei 100 ml, 2'-Amp bei 260 ml und 3'-AMP bei 560 ml. Die Fraktionen der einzelnen Nucleotide wurden vereinigt, im Vakuum eingengt und lyophilisiert. Die fertigen Proben wurden in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

Die gereinigten Nucleotide wurden mit jeweils 5 ml 0,5 mM Magnesiumchlorid in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 10,4) gelöst und mit alkalischer Phosphatase 7 h bei 37 °C inkubiert. Die Nucleoside wurden anschließend über präparative HPLC an einer RP 18 Säule weiter aufgereinigt. Als Fließmittel diente 5 % Methanol bei Adenosin und Wasser bei Cytidin, Uridin und Guanosin. Detektiert wurde mit einem Durchflussphotometer bei 254 nm. Adenosin eluierte bei 530 ml, Uridin bei 135 ml, Cytidin bei 145 ml und Guanosin bei 420 ml. Die entsprechenden Fraktionen der Nucleoside wurden im Vakuum eingengt, lyophilisiert und in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

2.6.4.3 Saure Hydrolyse der zellulären Proteine

Das bei der sauren Hydrolyse gewonnene zelluläre Protein (S. 38) wurde mit 100 ml 6M HCl und 4 ml Thioglykolsäure versetzt. Anschließend wurde die Suspension 24 h bei 110 °C unter Rückfluss gekocht. Die ganze Apparatur wurde während der Heiz- und Abkühlungsphasen mit Stickstoff begast. Die braune Lösung wurde filtriert und unter Wasserstrahlvakuum eingengt.

2.6.4.4 Trennung und Reinigung der Aminosäuren

Zur Identifizierung der Aminosäuren wurden die einzelnen Fraktionen aus der Säulenchromatographie auf eine Cellulose Plastikfolie aufgetragen. Nach der Entwicklung in

Material und Methoden

n-Butanol/Eisessig/Wasser (50/20/30, v/v/v) wurden die trockenen Platten mit Ninhydrin-Reagenz entwickelt (Tabelle 9).

Tabelle 9. R_f -Werte der Aminosäure (Cellulose Plastikfolie, Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (50/20/30, v/v/v), Detektion: Ninhydrin-Reagenz).

	R_f -Werte	Farbe
Alanin	0,48	violett
Arginin	0,42	violett
Asparaginsäure	0,39	violett
Glutaminsäure	0,44	violett
Glycin	0,39	violett
Histidin	0,39	braun
Isoleucin	0,71	violett
Leucin	0,71	violett
Lysin	0,39	violett
Methionin	0,63	violett
Phenylalanin	0,68	violett
Prolin	0,53	gelb
Serin	0,39	violett
Threonin	0,44	violett
Tyrosin	0,55	braun
Valin	0,63	violett

2.6.4.4.1 Erste Säule - Abtrennung der neutralen und sauren Aminosäuren

Das durch die saure Hydrolyse (S. 39) gebildete Gemisch aus freien Aminosäuren wurde in 20-30 ml bidest. Wasser (pH 1) auf eine Säule mit Dowex 50 Wx8 (Formiat-Form, 200-300 mesh, 2,5 × 30 cm) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 300 ml bidest. Wasser, 1,5 Liter 0.2 M Ammoniumformiat (pH 4.5), 2,5 Liter 0.2 M Ammoniumformiat (pH 6.5) und 1 Liter 0.5 M Ammoniumformiat (pH 4.5) entwickelt. Bei einer Flussrate von 100 ml/h wurden Fraktionen von 15 ml aufgefangen. Die neutralen und sauren Aminosäuren eluierten bei 150 - 300 ml, Phenylalanin und Tyrosin bei 350 - 500 ml, Lysin bei 1000 - 1300 ml, Histidin bei 1400 - 1500 ml und Arginin ab 2500 ml.

Die Fraktionen der einzelnen Aminosäuren wurden über DC identifiziert und vereinigt. Anschließend wurden die Fraktionen im Vakuum eingengt und lyophilisiert. Die fertigen Proben wurden in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

2.6.4.4.2 Zweite Säule - Abtrennung der sauren Aminosäuren

Die formiatfreie Fraktion der neutralen und sauren Aminosäuren wurde in 10 - 20 ml bidest. Wasser (pH 7.4 - 7.6) auf eine Säule mit Dowex 1x8 (Formiat-Form, 200 - 300 mesh, 2,5 × 35 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 500 ml Wasser und 1 Liter 10 mM

Ameisensäure entwickelt. Bei einer Flussrate von 100 ml/h wurden 15 ml Fraktionen aufgefangen. Die neutralen Aminosäuren eluierten bei 30 - 190 ml, Glutaminsäure und Asparaginsäure bei 600 - 900 ml.

Die Fraktionen der über DC identifizierten Aminosäuren wurden vereinigt, unter Vakuum eingengt und lyophilisiert. Die fertigen Proben wurden in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

2.6.4.4.3 Dritte Säule - Auftrennung der neutralen Aminosäuren

Die formiatfreie Lösung der neutralen Aminosäuren wurde in 10 - 20 ml bidest. Wasser (pH 1.5) auf eine Säule mit Dowex 50 Wx8 (H⁺-Form, 200 - 300 mesh, 2.5 × 40 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 200 ml Wasser und anschließend mit einem Gradient von 0 - 3 M HCl (Gesamtvolumen 2 Liter) entwickelt. Bei einer Flussrate von 80 ml/h wurden Fraktionen von 15 ml aufgefangen. Serin und Threonin eluierten bei 600 - 700 ml, Glycin und Alanin bei 750 - 850 ml, Valin bei 900 - 1000 ml, Prolin bei 1050 - 1150 ml, Isoleucin und Leucin bei 1170 - 1600 ml.

Die Fraktionen der über DC identifizierten Aminosäuren wurden vereinigt, unter Vakuum eingengt und lyophilisiert. Die fertigen Proben wurden in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

2.6.4.4.4 Trennung von Phenylalanin und Tyrosin

Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin wurden über präparative HPLC an einer RP-18 Lichrosorb Säule aufgetrennt. Als Fließmittel diente bidest. Wasser. Die Detektion erfolgt bei 254 nm und 280 nm, zur Identifizierung von Tyrosin. Die Retentionsvolumina betragen 60 ml beim Tyrosin und 80 ml beim Phenylalanin. Die Fraktionen von Phenylalanin und Tyrosin wurden getrennt gesammelt, im Vakuum eingengt und lyophilisiert. Die fertigen Proben wurden in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

2.6.4.4.5 Trennung von Serin und Threonin

Die neutralen Aminosäuren Serin und Threonin wurden über präparative HPLC an Nucleosil SB 10 aufgetrennt. Als Fließmittel diente bidest. Wasser. Die Detektion erfolgte bei 260 nm und mit dem Refraktometer. Serin wurde bei 35 ml und Threonin bei 40 ml eluiert. Die Fraktionen wurden aufgefangen, im Vakuum eingengt und lyophilisiert. Die fertigen Proben wurden in D₂O am NMR Spektrometer vermessen.

2.7 Isolierung und Reinigung von Enzymen

2.7.1 Sepiapterinreduktase

2.7.1.1 Zellaufschluss mit Ultraschall

0,5 - 1 g Zellmaterial, aus der Anzucht (S. 32) mit dem *E. coli* Expressionsklon, wurde in 30 ml Chromatographie-Puffer 1 suspendiert und bei 4 °C mit Ultraschall (3 x 15 Pulse, 60 %, Stufe 6) aufgeschlossen. Anschließend wurde das unlösliche Protein und die Zellmembranbestandteile abzentrifugiert (30 min, 15 000 U/min, 4 °C). In der überstehenden Lösung wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (S. 42) bestimmt.

2.7.1.2 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Zu stark konzentrierte Proben wurden mit Bradford-Puffer verdünnt. Für den Testansatz wurden je 50 µl Probe bzw. Bradford-Puffer und 1000 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach 20 min im Dunklen und bei Raumtemperatur wurden die Proben gegen den Blindwert bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte anschließend aus einer Eichkurve abgelesen werden. Die Eichkurve wurde über eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin in Dreifachbestimmung erstellt.

2.7.1.3 Chromatographie als Maltosebindeprotein

Die überstehende Lösung aus dem Aufschluss der Zellen (S. 42) wurde mit Chromatographie-Puffer 1 auf 100 ml aufgefüllt und auf eine Amylose-Säule (2,5 x 6 cm) aufgetragen. Dann wurde die Säule bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min mit Chromatographie-Puffer 1 gespült, bis die Extinktion bei 280 nm zurück ging. Anschließend wurde mit Chromatographie-Puffer 2 in 80 ml ein Gradient von 0 - 100 % gefahren. Der während des Gradienten kommende Peak bei 280 nm wurde gesammelt und über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (S. 42) als Sepiapterinreduktase-Maltosebindeprotein identifiziert.

2.7.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Über SDS-PAGE erfolgte der Nachweis, ob Exprimierung und Reinigung erfolgreich waren. Als Proteinstandard diente ein Marker mit Proteinbanden bei 94, 67, 43, 30, 20,1 und 14,4 kDa.

Die Lösung des Trenngels (8 %) wurde blasenfrei zwischen die montierten Glasplatten gegossen. Das mit 30 % Isopropanol überschichtete Gel polymerisierte in einer Stunde aus. Anschließend wurde das Isopropanol mit Wasser entfernt, der Auftragskamm eingesetzt und das Sammelgel (4 %) eingefüllt. Nach 15 min wurde das fertige Gel in die Elektrophorese-

apparatur eingesetzt und der Elektrophoresepuffer eingefüllt. Anschließend wurde der Auftragskamm entfernt und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde ca. 1 Stunde bei 20 mA pro Gel durchgeführt (Bromphenolblau läuft in der Front).

100 - 500 µl der Proben wurden für 15 min bei 100 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung abpipettiert. Nach der Zugabe von 50 µl 2x - Sampelpuffer wurden die Proben 7 min bei 95 °C gekocht. Je 10 µl der fertigen Proben bzw. 2 - 3 µl Marker wurden auf die Gele aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 1 Stunde in Färbelösung und danach eine weitere in Entfärber gelegt. Die fertigen Gele wurden photographisch dokumentiert.

2.8 Organisch-chemische Methoden

2.8.1 Synthese von deuteriertem NADPH

2.8.1.1 Synthese von [4-²H₁] NADP⁺ (Cyanidreaktion)

100 µmol NADP wurden in 0,5 ml D₂O gelöst. Anschließend wurde der pD-Wert mit 40 % NaOD (w/v) auf 7 eingestellt. Nach dem Zusatz von 2 M KCN, in 0,5 ml D₂O, wurde der pD auf 11,3 eingestellt. Die Reaktion wurde am Photometer bei 260 nm (NADP) und 327 nm (NADPCN) beobachtet (Aliquot in 1 ml 1M NaOH). Nach 90 min war die Reaktion abgeschlossen und der pD-Wert wurde durch die Zugabe von 130 mg KD₂PO₄ und 150 µl 37 % DCl (w/v) auf pD 6,7 eingestellt. Das frei werdende Cyanid-Gas wurde mit Stickstoff aus der Lösung ausgetrieben. Anschließend wurde das NADP als brauner Niederschlag mit 9 ml Aceton/0,6 % H₃PO₄ (w/v) aus gefällt und bei 4800 Upm/ 5 min abzentrifugiert. Nach dem Abblasen des Acetons mit Stickstoff wurde die Probe lyophilisiert (Podschn, 1992).

2.8.1.2 Herstellung von [4(S)-²H₁]-NADPH und [4(R)-²H₁]-NADPH

Zur Herstellung von [4(S)-²H₁]-NADPH wurde [1-²H₁]D-Glucose und NADP verwendet. Bei [4(R)-²H₁]-NADPH wurden D-Glucose und [4-²H₁] NADP eingesetzt (Podschn, 1992).

Eine Lösung aus 30 mM TRIS/HCl (pH 7,4), 3 mM MgCl₂, 56 mM D-Glucose, 100 µmol NADPH und 30 u Glucosedehydrogenase wurde in einem Gesamtvolumen von 20 ml für 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 340 nm am Photometer verfolgt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung auf Eis abgekühlt und das Protein mit einer 30 kD Membran (7000 U/min, 25 min, 4 °C) abgetrennt. Die filtrierte Lösung wurde lyophilisiert, dann in D₂O NMR spektroskopisch vermessen und anschließend sofort umgesetzt.

2.9 Enzymreaktionen

2.9.1 Reduktoisomerase

2.9.1.1 Umsetzung mit 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase

Die Mischung aus 0,15 M TRIS/HCl (pH 8,0), 20 mM MgCl₂, 45 mM 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, 5 mM [4(S)-²H₁]-NADPH oder [4(R)-²H₁]-NADPH und 525 µg recombinante 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase von E. coli wurde in 20 ml für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 340 nm beobachtet. Nach 3 Stunden wurde das Enzym durch Zugabe von 500 µl 32 % Salzsäure ausgefällt (pH 1) und durch Zentrifugation (4800 U/min, 15 min, 4 °C). Die Lösung wurde anschließend mit 300 µl 8 M NaOH auf pH 8 eingestellt (Herz, 2000).

2.9.1.2 Reinigung von 2-C-Methyl-D-erythriol-4-phosphat

Die proteinfreie Lösung wurde auf eine Dowex 1x8 (Formiat-Form, 100-200 mesh, 2 × 12 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 200 ml Wasser und anschließend mit 250 ml 1 M Ameisensäure entwickelt. Bei Maximaler Flussrate wurden Fraktionen von 10 ml gesammelt. Der größte Teil an D-Glucose und TRIS eluierten innerhalb der ersten 50 ml. 2-C-Methyl-D-erythriol-4-phosphat eluierte bei 60 ml. Die Fraktionen mit 2-C-Methyl-D-erythriol-4-phosphat wurden vereinigt und lyophilisiert (Wungsintaweekul, 2001).

2.9.2 Sepiapterinreduktase

2.9.2.1 Umsetzung mit Sepiapterinreduktase

Die Mischung aus 40 mM TRIS/HCl (pH 7,5), 1,3 mM Sepiapterin, 3 µmol mM [4(S)-²H₁]-NADPH oder [4(R)-²H₁]-NADPH und 2 mg Sepiapterinreduktase (Maltosebindeprotein) von E. coli wurde in 20 ml für 140 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 440 nm beobachtet. Anschließend wurde 2 ml J₂/KJ - Lösung zugesetzt und für 30 min im Dunklen bei Raumtemperatur das Dihydrobiopterin zu Biopterin umgesetzt. Überschüssiges Jod wurde mit 400 µl 3 % Ascorbinsäure entfernt (Herrmann, 1999).

2.9.2.2 Reinigung von Biopterin

Die proteinfreie Lösung wurde auf eine RP 18 Katusche aufgetragen. Die Säule wurde mit 100 ml 1,4 % Ammoniak entwickelt. Bei maximaler Flussrate wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Das bei 15 - 20 ml eluierte Biopterin fluoresziert bläulich im UV. Die identifizierten Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert (Herrmann, 1999).

2.10 NMR Spektroskopie

Die NMR Spektren wurden bei 11,75 bzw. 8,46 Tesla mit den NMR Spektrometern DRX 500 bzw. AM 360 von Bruker gemessen. Die Frequenzen für das ^1H -NMR betragen 500,13 bzw. 360,13 MHz, für das ^{13}C -NMR 125,60 bzw. 90,56 MHz.

Die ^{13}C - und ^1H -NMR Spektren, sowie die zweidimensionalen Experimente mit ^{13}C -Detektion wurden an beiden NMR Spektrometern mit einer 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ Dualsonde gemessen.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software WinNMR bzw. X-WinNMR von Bruker.

2.10.1 Probenvorbereitung

Das Volumen der NMR Proben betrug 500 - 750 μl . Unlösliche Bestandteile der Probe wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Die Füllhöhe im 5 mm NMR Röhrchen betrug 3,5 - 4 cm.

Nicotin, Terpene und Sterole wurden in CDCl_3 gemessen. Glutaminsäure, Asparaginsäure, Tyrosin wurden in 0,1 M NaOD, Histidin, Serin, Threonin, Glycin, Alanin, Valin, Prolin und Isoleucin in 0,1 M DCl gemessen. Lysin und Arginin wurden in 0,1 - 0,5 M DCl gemessen. Die Nukleotide und Nukleoside wurden in D_2O bzw. in 0,1 M Deuterophosphatpuffer (pH 6,6) gemessen. Guanosin wurde unter anderem in DMSO-d_6 vermessen. NADP und NADPH wurden (falls vorher lyophilisiert) in reinem D_2O oder in 10 % D_2O gemessen. Biopterin wurde in 1 M DCl bzw. HCl gemessen.

2.10.2 Eindimensionale Spektroskopie

Typische Parameter für eindimensionale Spektroskopie:

^1H -NMR: DXR 500 NMR	Senderfrequenz 500,13 MHz; 45° Pulswinkel (3 μs); spektrale Breite 5,5 Hz; Datensatz 32 K; Temperatur 300 K
AM 360 NMR	Senderfrequenz 360,13 MHz; 45° Pulswinkel (4 μs); spektrale Breite 5,5 Hz; Datensatz 16 K; Temperatur 300 K
^2H -NMR: DXR 500 NMR	Senderfrequenz 500,13 MHz; 45° Pulswinkel (3 μs); spektrale Breite 5,5 Hz; Datensatz 32 K; Temperatur 300 K

Die Daten wurden vor der Fourier-Transformation zur Optimierung der Signalauflösung mit einer Gauss-Lorentz-Funktion (GB: 0,10; LB: -1,0) multipliziert.

Die Proben mit D_2O wurden mit Unterdrückung des Wassersignals vermessen.

^{13}C -NMR: DXR 500 NMR Senderfrequenz 125,60 MHz; 30° Pulswinkel (3 μs); spektrale Breite 28,9 Hz; Relaxationsdelay 2 s; Datensatz 16 K; Temperatur 300 K; Breitband ^1H Entkopplung

AM 360 NMR Senderfrequenz 90,56 MHz; 30° Pulswinkel (2 μs); spektrale Breite 14,7 Hz; Relaxationsdelay 2 s; Datensatz 32 K; Temperatur 300 K; Breitband ^1H -Entkopplung

Vor der Fourier-Transformation wurden die Daten auf 265 K mit Nullen aufgefüllt („zero filling“) und mit einer Gauss-Lorentz-Funktion (GB: 0,05 - 0,20; LB: -1,0 - -2,0) multipliziert.

Die Signalverschiebungen wurden extern auf Tetramethylsilan (TMS) bzw. Trimethylsilylpropansulfonsäure (TMBS) kalibriert.

2.10.3 Zweidimensionale Spektroskopie

INADEQUATE Experimente erfolgten nach Standard Bruker Software am DXR 500 NMR.

2D INADEQUATE: 64 Pulse pro t_1 -Inkrement; 2,0 s Relaxationsdelay; Phasenzzyklus nach Ernst; 16 ms Delay zur Entwicklung von $^1J_{\text{CC}}$; 289 x 2048 Rohdatenmatrix, welche in t_1 und t_2 über zero-filling auf 4096 Wörter aufgefüllt wurde. Die Spektren wurden in t_1 mit Sinusfunktion und in t_2 mit Gauss-Funktion prozessiert.

2.10.4 NMR Auswertung

2.10.4.1 Berechnung der Anreicherung

Die Anreicherung von ^{13}C -Atomen in einer Verbindung wird, nach einem *in vivo* Inkorporationsexperiment, über eine quantitative Analyse der ^1H ^{13}C -Kopplungssatelliten im ^1H -NMR Spektrum berechnet. Auf Basis dieser Daten werden die Anreicherungen der anderen C-Atome aus den relativen Anreicherungen berechnet. Die relativen Anreicherungen pro C-Atom erhält man beim Vergleich der Integrale der angereicherten Probe mit einer Probe mit natürlichem ^{13}C -Gehalt (1,1 %).

Absolute Anreicherung (Häufigkeit):

Mit den Integralen der ^{13}C -Satelliten (Kopplungskonstante: 140 - 200 Hz) aus eindimensionalen ^1H -Spektren kann die Anreicherung von protonentragenden ^{13}C -Atomen berechnet werden.

Material und Methoden

Geeignet ist diese Methode nur für ausreichend aufgelöste Signale und einfache Kopplungssignale, bevorzugt Singulets, Dubletts und Triplets.

$$\text{Gleichung A} \quad \% {}^{13}\text{C}_{abs.} = \frac{{}^H I_S}{{}^H I_S + {}^H I_Z} * 100\%$$

${}^H I_S$ Integral der beiden ${}^{13}\text{C}$ -Satelliten eines Protonensignals im ${}^1\text{H}$ -Spektrum

${}^H I_Z$ Integral des entsprechenden Zentralsignals im ${}^1\text{H}$ -Spektrum

Relative Anreicherung:

Durch den Vergleich der Integrale im ${}^{13}\text{C}$ -Spektrum einer angereicherten Probe mit einer Probe natürlichen ${}^{13}\text{C}$ -Gehalts (1,1 %) kann die relative Anreicherung berechnet werden.

Die ${}^{13}\text{C}$ -Spektren wurden hierfür unter identischen Bedingungen am gleichen NMR Gerät aufgenommen, um einer Verfälschung durch unterschiedliche Relaxationseffekte zu vermeiden.

$$\text{Gleichung B} \quad \% {}^{13}\text{C}_{rel.} = \frac{{}^C I^*}{{}^C I} * \frac{1}{f}$$

${}^C I^*$ Integral eines ${}^{13}\text{C}$ -Signal im ${}^{13}\text{C}$ -Spektrum der angereicherten Probe

${}^C I$ Integral des entsprechenden ${}^{13}\text{C}$ -Signal im ${}^{13}\text{C}$ -Spektrum der Probe mit natürlichem ${}^{13}\text{C}$ -Gehalt

f Kalibrierungsfaktor, $f = \text{kleinstes Ergebnis für } \frac{{}^C I^*}{{}^C I} \text{ in der Probe}$

Durch Kombination von Gleichung A und Gleichung B konnten die absoluten Anreicherungen (Häufigkeit) aller C-Atome berechnet werden. Durch quantitative Auswertung der Intensitäten der ${}^{13}\text{C}$ -Satelliten im ${}^1\text{H}$ -Spektrum wurde die Anreicherung von mindestens einem protonentragenden C-Atom (C_{\triangleright}) bestimmt. Diese absolute Anreicherung ($\% {}^{13}\text{C}_{\triangleright}$) wurde als interner Standard zur Berechnung der Anreicherung der anderen C-Atome verwendet.

$$\text{Gleichung C} \quad \% {}^{13}\text{C}_x = \frac{{}^C I_x^*}{{}^C I_x} * \frac{\% {}^{13}\text{C}_{\triangleright}}{{}^C I_{\triangleright}^* / {}^C I_{\triangleright}}$$

${}^C I_x^*$ Integral eines ${}^{13}\text{C}$ -Signals im ${}^{13}\text{C}$ -Spektrum der angereicherten Probe

${}^C I_x$ Integral des entsprechenden ${}^{13}\text{C}$ -Signals im ${}^{13}\text{C}$ -Spektrum der Probe mit natürlichem ${}^{13}\text{C}$ -Gehalt

$\% \text{ } ^{13}\text{C}_\triangleright$ absolute Anreicherung eines protonenträgenden C-Atoms (C_\triangleright), bestimmt über die Integrale der ^{13}C -Satelliten im ^1H -Spektrum

$^c I_\triangleright^*$ Integral von C_\triangleright im ^{13}C -Spektrum der angereicherten Probe

$^c I_\triangleright$ Integral des entsprechenden C_\triangleright im ^{13}C -Spektrum der Probe mit natürlichem ^{13}C -Gehalt

2.10.4.2 Quantitative Bestimmung der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Kopplung

Bei Einbauexperimenten mit mehrfach oder universell ^{13}C -markierten Verbindungen (z.B. $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$) werden diese in hohen Verdünnungen (z.B. 1:24) zusammen mit der unmarkierten Verbindung (z.B. D-Glucose) eingesetzt. Bei der Neusynthese einer Verbindung werden somit hauptsächlich unmarkierte ^{12}C -Biosyntheseblöcke nebeneinander liegen. Die statistische Wahrscheinlichkeit, dass zwei ^{13}C -Blöcke nach dem z.B. glykolytischen Abbau der markierten D-Glucose nebeneinander zu liegen kommen, beträgt bei einer Anreicherung von 5,1 % (4 % + 1,1 %) nur $\%^{\text{stat}} \text{ } ^{13}\text{C} \text{ } ^{13}\text{C}$ 0,26 %. Entstehende $^{13}\text{C} \text{ } ^{12}\text{C}$ Bindungen sind im NMR nicht detektierbar. Wenn jedoch aus einer unmarkierten Verbindung ein ^{13}C -Biosyntheseblock unter Erhaltung der ^{13}C -Konnektivität in eine Verbindung inkorporiert wird, kann im Zielmolekül eine $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Bindung detektiert werden.

Die Isotopologe können in einem eindimensionalen ^{13}C -Spektrum identifiziert und quantifiziert werden. Skalare Kopplungen zwischen benachbarten ^{13}C -Atomen werden unter Berücksichtigung der charakteristischen J_{cc} -Kopplungskonstanten (30 bis 70 Hz) bestimmt. Das Gesamtsignal eines koppelnden ^{13}C -Atoms setzt sich aus dem Zentralsignal und aus den Satellitensignalen zusammen. Da die Isotopologe biosynthetisch in unterschiedlichen Mengen in die Zielmoleküle inkorporiert werden, sind auch die Intensitäten der Satellitsignale verschieden.

Fernkopplungen über zwei Kohlenstoffbindungen haben Kopplungskonstanten von 2-3 Hz und werden nur bei ausreichender spektraler Auflösung detektiert. Die spektrale Auflösung für Fernkopplungen über mehrere Kohlenstoffbindungen und sich überlappender Signale ist oft unzureichend.

In Abbildung 8 ist die Häufigkeit der IPP-Isotopologe bei einem hypothetischen Einbauexperiment mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ (1:24 verdünnt) über den Mevalonatweg (Abbildung 3) dargestellt. 82,5 % der gebildeten IPP-Isotopologe sind unmarkiert (**A**). 5 % der Markierung stammt aus der natürlichen Anreicherung von 1,1 % ^{13}C -Atomen (**B**). 12,0 % der IPP-Isotopologe werden aus zwei unmarkierten und einer markierten Acetyl-CoA Einheit synthetisiert (**C**). Diese für die biosynthetische Betrachtung interessanten IPP-Isotopologe haben drei unterschiedliche ^{13}C -Markierungsverteilungen im Molekül. Die unter **D** und **E**

Material und Methoden

aufgeführten IPP-Isotopologe entstehen durch statistische Rekombination aus zwei bzw. drei $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetyl-CoA Bausteinen. Zur Lösung biosynthetischer Fragen liefern sie keine brauchbaren Informationen und sind deswegen unerwünscht. Durch ausreichend hohe Verdünnung der $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ D-Glucose mit unmarkierter D-Glucose wird sichergestellt, dass diese Isotopologe nur mit geringer Wahrscheinlichkeit entstehen.

Die statistische Wahrscheinlichkeit für skalar gekoppelte ^{13}C -Spinsysteme reduziert sich bei der natürlichen Anreicherung von 1,1 % auf 0,012 % für ein Isotopolog mit zwei benachbarten ^{13}C -Kernen und auf 0,00013 % mit drei benachbarten ^{13}C -Kernen.

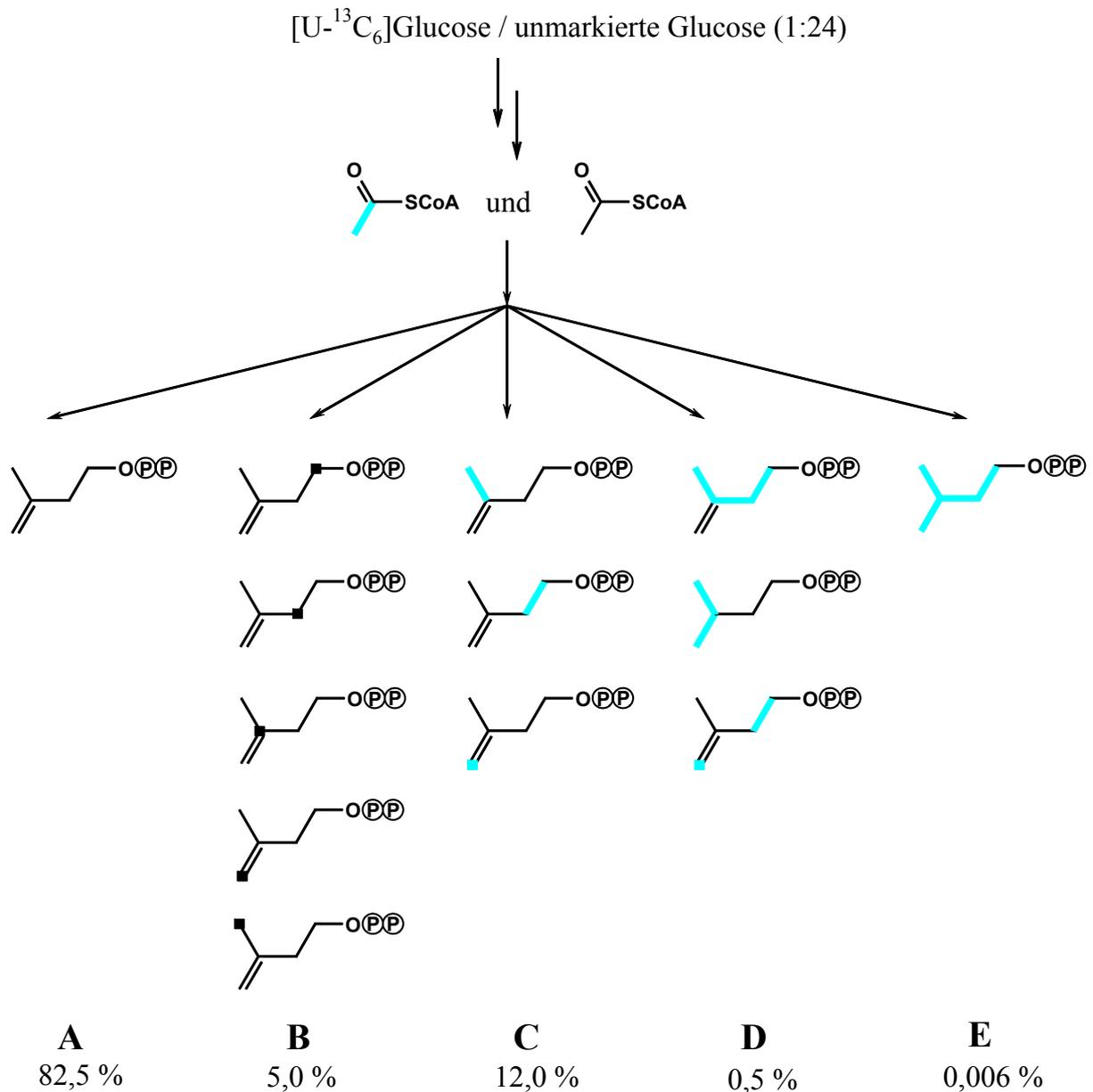


Abbildung 8. Häufigkeiten der theoretisch möglichen IPP-Isotopologe über den Mevalonatweg bei einem Einbau mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose.

$^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Kopplung:

Durch Vergleich der Integrale von $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Kopplungssatelliten (${}^c I_S$) mit dem Gesamtintegral des entsprechenden ^{13}C -Signals (${}^c I_S + {}^c I_Z$) wurde die prozentuale Kopplung ($\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) zwischen den C-Atomen berechnet. Beim Einsatz der Gauss-Lorentz Funktion im Bereich von GB: 0,2 zeigen große Signale verstärkt periodische Schwingungen, die ober- und unterhalb der Basislinie auftreten (Wiggel). Für eine exakte Ermittlung der Integrale wurde auch über diesen Bereich mit integriert.

$$\text{Gleichung D} \quad \%^{13}\text{C}^{13}\text{C} = \frac{{}^c I_S}{{}^c I_S + {}^c I_Z} * 100\%$$

${}^c I_S$ Integral der beiden ^{13}C -Satelliten im ^{13}C -Spektrum

${}^c I_Z$ Integral des entsprechenden Zentralsignals im ^{13}C -Spektrum

Durch Bezug der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Kopplung (Gleichung D) auf die absolute ^{13}C -Anreicherung (Häufigkeit, Gleichung A) wurde der Anteil (Konzentration) von $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ gekoppelten Isotopologen berechnet.

$$\text{Gleichung E} \quad \text{mol}\% = \%^{13}\text{C}^{13}\text{C} * \%^{13}\text{C}_{abs.}$$

$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ Kopplung eines C-Atoms im ^{13}C -Spektrum

$\%^{13}\text{C}_{abs.}$ absolute Anreicherung des entsprechenden C-Atoms

Beim Einsatz von einfach ^{13}C -markierten Vorstufen und unter Annahme einer statistischen Isotopologenverteilung lässt sich der Anteil von $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ gekoppelten Isotopologen ($\%stat^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) gleichzeitig als Produkt der ^{13}C -Anreicherung von C_1 und C_2 ($\%^{13}\text{C}$) berechnen.

$$\text{Gleichung F} \quad \%stat^{13}\text{C}^{13}\text{C} = \frac{\%^{13}\text{C}_1 * \%^{13}\text{C}_2}{100}$$

2.10.4.3 Formale Darstellung von Markierungsmustern

Ein Punkt steht für eine ^{13}C angereicherte Position ohne signifikante Anreicherung an ^{13}C -Atomen in den Nachbarpositionen (Punktmarkierung; Abbildung 9, A). Die Zahl gibt die absolute Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Material und Methoden

Durch einen Balken werden in einer Verbindung benachbarte ^{13}C -angereicherte Positionen hervorgehoben, die als ^{13}C -Block aus der Vorstufe entstanden sind und unter Erhalt der ^{13}C -Konnektivität inkorporiert wurden. (Bindungsmarkierung; Abbildung 9, **B**). Die Zahl gibt die jeweilige Konzentration in mol% nach Gleichung E an (S. 50).

Zwei Quadrate über einen Bogenpfeil verbunden (Abbildung 9, **C**) stehen für eine Bindungsmarkierung, die während der Biosynthese gebrochen wurde, jedoch über Fernkopplung im ^{13}C -Spektrum noch sichtbar ist.

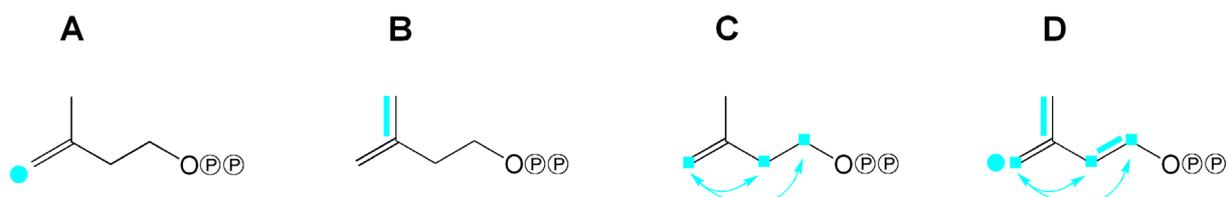


Abbildung 9. Formalismus der Darstellung von ^{13}C -Markierungen am Beispiel von IPP. (A) Punktmarkierung, (B) Bindungsmarkierung, (C) Bindungsmarkierung, die während der Biosynthese gebrochen wurde und (D) Kombination der drei Markierungsmöglichkeiten.

Mehrere vorkommende Punkt- und Bindungsmarkierungen einer Verbindung können im gleichen Molekül abgebildet werden (Abbildung 9, **D**). Die vorliegende Verbindung weist $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, $[1,2,4-^{13}\text{C}_3]$ und $[3,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe auf.

Die dargestellten IPP-Moleküle werden im Text als (**B**) $[3,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopolog oder als (**C**) $[1,2,4-^{13}\text{C}_3]$ Isotopolog bezeichnet (Abbildung 9). Eine weitere Möglichkeit der Darstellung von Isotopologen ist über so genannten X-Gruppen. Diese Nomenklatur wurde entwickelt um komplizierte Markierungsmuster besser beschreiben zu können (Eisenreich *et al.*, 2004). Jedes Kohlenstoffatom im Molekül wird über einen binären Code („1“ oder „0“) charakterisiert. Beim Beispiel der D-Glucose entsteht eine sechs stellige Nummer, deren 1. Ziffer für C-1, die 2. Ziffer für C-2, usw. steht. Hierbei werden die ^{13}C - und ^{12}C -Atome voneinander unterschieden, wobei „1“ für ein ^{13}C -Atom und „0“ für ein ^{12}C -Atom steht. Falls eine Unterscheidung zwischen ^{13}C - und ^{12}C -Atom nicht möglich ist, werden diese Positionen mit „X“ bezeichnet. Somit werden, die in Abbildung 9 dargestellten Isotopologe durch die X-Gruppen (**B**) {00101} und (**C**) {11010} charakterisiert. In komplexen Molekülen sind die Interaktionen von ^{13}C -Kopplungen nur über eine begrenzte Anzahl von Bindungen zu beobachten und für eine in sich geschlossene Beschreibung von Isotopologen erscheint die Einführung von „X“ notwendig.

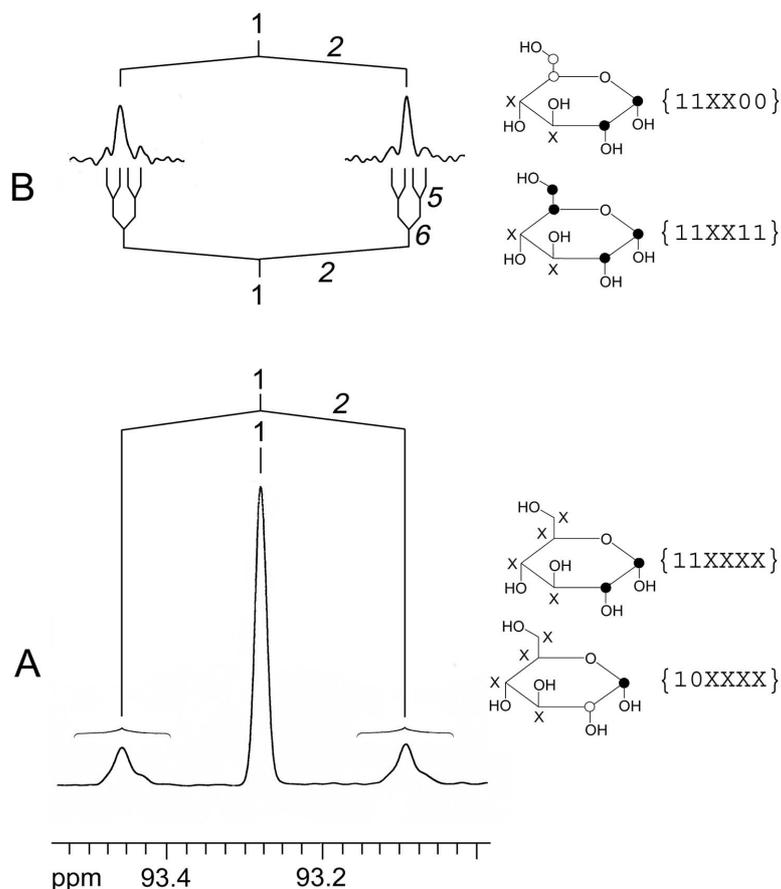


Abbildung 10. ^{13}C -NMR Signale des 1β C-Atoms von D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$. Die koppelnden C-Atome sind als kursive Zahlen, gemäß der Kopplungskonstanten aus Tabelle 15 angegeben. Neben dem Kopplungsmuster sind die dazugehörigen Isotopologe graphisch dargestellt. Gefüllte Punkte stehen für ^{13}C -Atome und ungefüllte für ^{12}C -Atome. Das Spektrum des 1β C-Atoms von D-Glucose ist (A) „schwach“ gegast und (B) „stark“ gegast (nur die Satelliten) dargestellt.

Der Zusammenhang zwischen dem Markierungsmuster und den NMR Signalen wird am vorliegenden Beispiel eines 1β C-Atoms aus D-Glucose deutlich gemacht (Abbildung 10). Das zentrale Signal im NMR Spektrum des α -Anomers eines Glucosemoleküls steht für alle Isotopologe, die ein ^{13}C -Atom in Position 1 (das beobachtete C-Atom) und ein ^{12}C -Atom in Position 2 tragen (Abbildung 10, A). Das unter (A) dargestellte Satellitenpaar, rechts und links vom Hauptsignal steht für die Summe der Isotopologe, die in Position 1 und 2 ein ^{13}C -Atom tragen. Die in der Aufspaltung der Satelliten sichtbaren Fernkopplungen können durch eine andere Berechnung der Spektren-Rohdaten (FID stärker gegast) bestimmt werden (Abbildung 10, B). Mit Hilfe der Kopplungskonstanten und des Isotopenshifts können den vorliegenden Satelliten zwei X-Gruppen ($\{11\text{XX}00\}$ und $\{11\text{XX}11\}$) zugeordnet werden.

Für die leichtere Zuordnung in Text und Darstellung werden den X-Gruppen zusätzlich Buchstaben zugeordnet. Großbuchstaben stehen für die Übergruppen und Kleinbuchstaben für die Untergruppen (Beispiel: Tabelle 18).

2.10.5 Signalzuordnung

Die Signalzuordnung und Identifizierung der Verbindungen erfolgte mit Hilfe von Literaturdaten (Aminosäuren und Ribonukleoside: Hesse *et al.*, 1987; Pretsch *et al.*, 1990), NMR Datenbanken (SpecInfo) und Vergleichssubstanzen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Naturstoffisolierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aminosäuren, Ribonukleotide, Terpene und Nicotin (*Nicotiana tabacum*) aus Pflanzen- und Mikroorganismen-Proben isoliert. Hierfür wurden die in Abbildung 11, für *Nicotiana tabacum* exemplarisch, dargestellten Methoden der Isolierung und Reinigung angewendet.

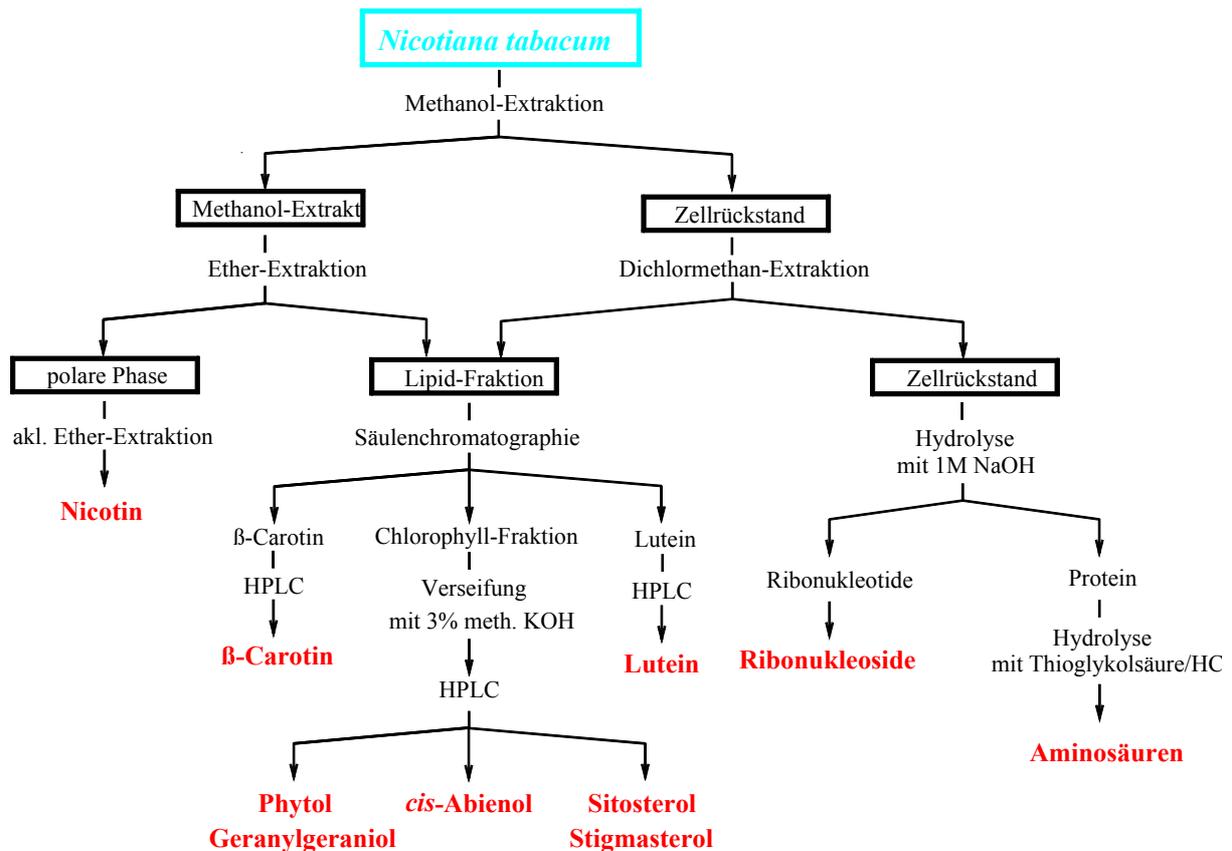


Abbildung 11. Schematische Übersicht der Isolierung und Reinigung primärer und sekundärer Metabolite aus *Nicotiana tabacum*.

Das fein zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde mit Methanol extrahiert. Aus dem gewonnenen Extrakt konnte, nach Entfernung des Methanols, durch Ether-Extraktion das Chlorophyll abgetrennt werden. Die wässrige Phase wurde anschließend im alkalischen (pH 11) erneut mit Ether extrahiert. Das isolierte Nicotin wurde in CDCl_3 NMR spektroskopisch vermessen.

Das abgetrennte Chlorophyll wurde mit dem Dichlormethan-Extrakt des Zellmaterials zur Lipid-Fraktion vereinigt. Die weitere Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie an Kieselgel 60. Die isolierte Chlorophyll-Fraktion wurde mit methanolischer KOH verseift und

Ergebnisse und Diskussion

anschließend, wie die anderen Fraktionen aus der Säulenchromatographie, über präparative HPLC (RP18-Säule) weiter gereinigt. Die gereinigten Verbindungen β -Carotin, Lutein, Phytol, Geranylgeraniol, *cis*-Abienol, Sitosterol und Stigmasterol wurden in CDCl_3 NMR spektroskopisch vermessen.

Aus dem Zellrückstand konnten nach Hydrolyse mit 1M NaOH Protein und Ribonukleotide isoliert werden. Die Reinigung der Ribonukleotide erfolgte an einem Kationenaustauscher, sowie anschließend nach Dephosphorylierung über präparative HPLC (RP18-Säule). Aus dem Protein wurden die Aminosäuren über saure Hydrolyse freigesetzt und anschließend über drei Ionenaustauscher voneinander abgetrennt. Die isolierten Aminosäuren und Ribonukleoside wurden in D_2O bzw. DMSO NMR spektroskopisch vermessen.

Im Vorfeld jedes Markierungsexperiments wurden die sekundären Metabolite aus den unmarkierten Mikroorganismen bzw. Pflanzen, wie oben beschrieben, isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Aus den NMR Spektren wurde die natürliche Anreicherung der sekundären Metabolite bestimmt. Die natürliche Anreicherung der Metabolite wurde bei der Berechnung der Häufigkeiten ($\% \text{}^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) in den entsprechenden markierten Metaboliten benötigt (S.46). Bei den Aminosäuren und Ribonukleosiden wurden die natürlichen Anreicherungen aus den kommerziell käuflichen Verbindungen bestimmt.

Aus den NMR Spektren der markierten Verbindungen wurden jeweils Kopplungen ($\% \text{}^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten ($\% \text{}^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) berechnet (S.46).

3.2 Eingesetzte Organismen für die Einbaustudien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedlich komplexe Systeme für Einbaustudien mit verschiedenen markierten Vorstufen herangezogen. Als relativ einfaches System wurde der Mikroorganismus *Chloroflexus aurantiacus* und die pflanzliche Zellkultur von *Catharanthus roseus* verwendet. Als komplexeres System diente die ganze Pflanze *Nicotiana tabacum* var. *havanna piperita*. Bei allen drei Systemen handelt es sich um Organismen, die Photosynthese durchführen können.

Es wurden charakteristische Markierungsmuster durch die unterschiedliche Verstoffwechslung der zugesetzten Vorstufen über verschiedene Biosynthesewege der Organismen erwartet. Auch wurde bei der ganzen Pflanze *Nicotiana tabacum* var. *havanna piperita* eine Fülle von Interaktionen bzw. Verflechtungen der Biosynthesen erwartet.

3.2.1 *Chloroflexus aurantiacus*

Man unterscheidet bei den photosynthetisch aktiven Bakterien zwischen den Purpurbakterien, den grünen Schwefelbakterien und den Heliobakterien. Die Familie Chloroflexaceae („grüne Bakterien“) gehört zur Ordnung der grünen Schwefelbakterien. Der Einzige, bis jetzt näher untersuchte Vertreter ist *Chloroflexus aurantiacus* (Genom: Xiang *et al.*, 2000).

Chloroflexus aurantiacus hat eine fädige, flexible Struktur (Abbildung 12). Er kommt weltweit in heißen Schwefelquellen, mit Temperaturen zwischen 50 °C und 60 °C, vor. Das bewegliche Bakterium ist obligat anaerob, photolithothroph und photoorganotroph (Freudig und Sauerma, 2001).

Die Photosynthese erfolgt ohne Sauerstoffproduktion. Die Hauptkohlenstoffquelle ist CO₂. Die Fixierung erfolgt über den 3-Hydroxypropionat-Zyklus (Holo und Sirevåg, 1986; Holo und Grace, 1987; Holo, 1989). *Chloroflexus aurantiacus* wird als der ursprünglichste, photosynthetisch aktive Organismus angesehen (Gibson *et al.*, 1985; Oyaizu *et al.*, 1987; Woese, 1987; Richter, 1998).

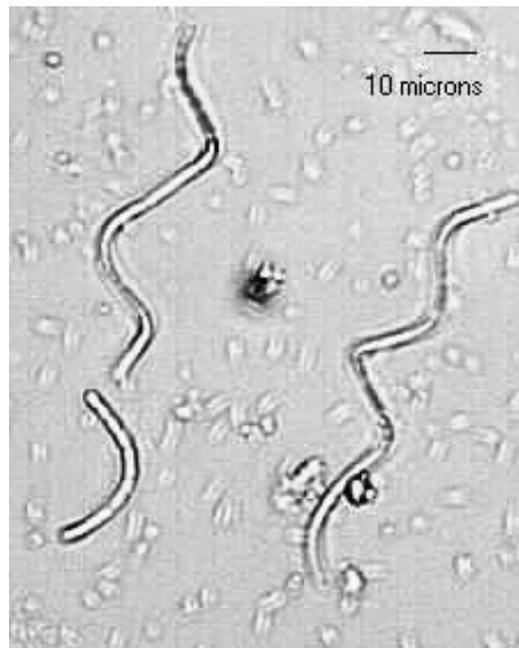


Abbildung 12. Mikroskopische Aufnahme von *Chloroflexus aurantiacus*.

3.2.2 *Catharanthus roseus*

Catharanthus roseus (L.) (Madagaskar-Immergrün) gehört zu der Familie der Hundsgiftgewächse (Apocynaceae). Synonyme Bezeichnungen in der Literatur sind *Vinca rosea* L., *Lochnera rosea* und *Ammocallis rosea*.

Catharanthus roseus ist ein mehrjähriger, immergrüner Halbstrauch, der ursprünglich aus Madagaskar stammt, inzwischen jedoch in den ganzen Tropen verbreitet vorkommt. Der 15 - 60 cm hohe Strauch trägt ledrige, dunkelgrüne Blätter und weiße, rosarote, rote oder violette Stieltellerblüten mit weißen Adern (Abbildung 13).

Catharanthus roseus ist sehr giftig. Verzehr und Kontakt mit offenen Wunden führt zu Erbrechen, Fieber, neuromuskulären und vegetativen Störungen. Zubereitungen der Pflanze wurden unter anderem von Völkern aus Europa, Südamerika, China und Indien als Naturheilmittel verwendet. Die pharmakologische Wirkung von *Catharanthus roseus* beruht auf seinen Alkaloiden, von denen inzwischen bis zu 70 verschiedene identifiziert wurden. Sie finden Einsatz in der modernen Medizin als Medikamente zur Senkung vom Blutzuckerspiegel (Catharanthin, Leurosin, Lochnerin, Tetrahydroalstonin, Vindolin, Vindolinin), als Beruhigungsmittel (Reserpin, Serpentin) und als Mittel gegen Leukämie (Vincristin) (Brintnall und Conner-Ogorzaly, 1986; Dobelis, 1989; Heywood, 1993).



Abbildung 13. *Catharanthus roseus* (L.) (Madagaskar-Immergrün).

Ergebnisse und Diskussion

Die Pharmaindustrie versucht mit Hilfe von Pflanzenzellkulturen schnell und in guten Ausbeuten an die gewünschten Alkaloide zu gelangen (Heß, 1992; Endreß, 1994). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Suspensionskultur wurde aus Blattzellen gewonnen.

Die zu erwartenden Biosynthesen entsprechen den typischen Reaktionen innerhalb der Blätter von *Catharanthus roseus*. Inwieweit die Photosynthese der Pflanzenzellen im Nährmedium eingeschränkt wird, ist nicht bekannt.



Abbildung 14. *Nicotiana tabacum*.

3.2.3 *Nicotiana tabacum*

Nicotiana tabacum (Virginia Tabak) stammt aus der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae). Sie gehört neben *N. rustica* zu den kultivierten Tabakpflanzen, die aus den wilden Arten in Süd- und Nord-Amerika gezüchtet wurden.

Tabak ist ein einjähriges Kraut. Die bis zu 2 m hohen Pflanzen tragen große, länglich-elliptische Blätter und glockig-trichterförmig, fleischrote Blüten (Abbildung 14). Stängel und Blätter sind drüsig behaart. *Nicotiana tabacum* var. *havanna piperita* ist eine kleinwüchsiger

Verwandte von *Nicotiana tabacum* (Cheeke und Shull, 1985). Durch ihre geringe Größe eignet sie sich gut für die Anzucht im Labor.

Tabak ist die weltweit am häufigsten eingesetzte und legalisierte Droge. Er fand schon bei den Ureinwohnern Amerikas Verwendung bei religiösen Riten und als Universalheilmittel gegen Tierbisse und Vergiftungen. Nach neuesten Schätzungen der WHO sind heute jährlich 4.8 Mio. Tote direkt auf Tabakgenuss zurückzuführen („preventable deaths“). Im Vergleich dazu rechnet man mit ca. 3 Mio. Tote pro Jahr durch Malaria und ca. 3 Mio. Tote durch das HIV-Virus. Diese Dimensionen belegen die Droge Tabak als eine der Hauptgeiseln der gesamten menschlichen Kultur.

Ein wichtiger Inhaltsstoff des Tabaks ist das in den Wurzeln gebildete Pyridinalkaloid Nicotin. Nicotin ist in allen Teilen der Pflanze, mit Ausnahme der Samen, in Konzentrationen von 0,6 % bis 9 % enthalten. Das Alkaloid ist ein starkes Gift, das anregend auf das Zentralnervensystem wirkt und in höheren Dosen (40 - 60 mg bei Erwachsenen) zum Tod führt.

Es folgt eine kurze Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Mutanten der *Nicotiana tabacum* var. *havanna piperita*.

3.2.3.1 RPO Mutante

Die Plastidchromosome kodieren vier RNA Polymerase Gene (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2*), die den drei RNA Polymerase Genen der Eubakterien ähneln (Review: Igloi und Kössel, 1992). Die Ähnlichkeit entspricht dem endocytobiologischem Ursprung der Plastiden. Da die Gene für die σ -Subunits der RNA Polymerasen aus dem Zellkern stammen, spricht man bei den RNA Polymerasen aus den Plastiden von einer dualen genetischen Herkunft. Vergleichbares trifft auch auf andere Strukturen des Stomas, der Thylakoide und der inneren Membran zu (Review: Herrmann, 1997).

Eines der bemerkenswertesten Erkenntnisse in der Biologie der Organelle, wie in der Biologie der Eukaryonten im allgemeinen (Herrmann, 1997), war die Demonstration, dass eine kern-kodierte, im Plastid vorliegende, RNA Polymerase (Gen: *rpoY*) den Phagen-artigen und mitochondrialen Enzymen gleicht (Gen: *rpoZ*; Hedtke *et al.*, 1997). Die RNA Polymerase (Gen: *rpoY*) scheint das Resultat einer internen Verdoppelung von *rpoZ* zu sein, unter Begleitung eines passenden Promoters und einer Peptidsequenz für den Transport.

Die RNA Polymerasen sind in verschiedenen Zellkompartimenten kodiert und wahrscheinlich von unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft. Die Promotoren weisen unterschiedliche Komplexitäten auf. Vermutlich durchliefen die Promotoren der Plastidchromosome, wie die

Gene in den Mitochondrien, substantielle Qualitätsänderungen während der Evolution. Die Transkription in den Organellen ist deutlich komplexer als bei Prokaryonten. Das Wissen über die ontogenetischen und phylogenetischen Auswirkungen des Aufbaus der RNA Polymerase Gene ist offensichtlich entscheidend für das Verständnis der Integration der genetischen Maschinerie des Organells in den zellulären Kontext, aber auch für das Verständnis der Eukaryonten und ihrer Evolution (Herrman, 1997).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Koop wurden Mutanten mit einem Defizit an *rpoB* hergestellt.

Die RPO-Pflanzen weisen einen stabilen Phänotyp auf (Allison *et al.*, 1996) und sind morphologisch vom Wildtyp, außer über die weiße Farbe, nicht unterscheidbar. Zum kompletten Farbverlust der Blätter kommt es erst im Alterungsprozess. Alte Chloroplasten enthalten eine homogene Matrix mit wenigen Strukturen, die Ribosomen ähneln (Santis-Maciassek, *et al.* 1999).

Es wurde eine reduzierte Transkription der Polypeptide für die Photosyntheseapparatur festgestellt. Alte Blätter enthalten kein Chlorophyll. Es kommt zu einer Licht abhängigen Bleichung des Chlorophylls (Santis-Maciassek, *et al.* 1999). Zellen ohne Chloroplasten sind zur Photosynthese nicht fähig (Richter, 1998). Die in den Blättern nachgewiesenen Carotinoide (Antheraxanthin, Zeaxanthin), treten üblicherweise bei Lichtstress auf. In den Plastiden bilden sich Stärkekörner, obwohl keine Photosynthese möglich ist (Santis-Maciassek, *et al.* 1999).

Des Weiteren sind funktionsfähige Ribosome in den Plastiden enthalten. Die rRNAs und mRNAs, ohne funktionellen Bezug zur Photosynthese, sind in der RPO Mutante in vergleichbaren Mengen, wie im Wildtyp enthalten (Santis-Maciassek, *et al.* 1999).

3.2.3.2 NDH Mutanten

NADH-Ubiquinon-Oxidoreductase (Komplex I) ist der erste Protonen transportierende Komplex in der Atmungskette von Bakterien und Mitochondrien (Friedrich *et al.*, 1995). In den Plastidchromosomen von höheren Pflanzen gibt es 11 Genhomologe zum kodierenden Gen des Komplex I in *E. coli*. Daraus wurde geschlossen, dass Plastide eine Komplex I Homologe von NAD(P)H-Dehydrogenase haben, welche als NDH-Komplex bezeichnet wird (Ohayama *et al.*, 1988; Sugiura, 1992). Das Enzym selbst konnte noch nicht isoliert und charakterisiert werden. Es wird vermutet, dass der NDH-Komplex Plastoquinon als Elektronenakzeptor benutzt. Als Elektronendonator ist reduziertes Ferredoxin oder eine Verknüpfung des NDH-Komplexes mit der Ferredoxin-NADP-Oxidoreductase in der Diskussion (Friedrich *et al.*, 1995; Guedeny *et al.*, 1996).

Die Funktion des NDH-Komplexes im Plastidenmetabolismus ist noch weitgehend unbekannt. Die Untereinheiten *ndhK* und *ndhH* sind auf die Stroma Thylakoide beschränkt (Nixon *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1993), wo der Elektronentransport stattfindet (Anderson, 1992). Es wird vermutet dass der NDH-Komplex an diesem Prozess beteiligt ist. Weiter wird vermutet, dass der NDH-Komplex überschüssige Reduktionsäquivalente entfernt (Bennoun, 1982).

Durch Veränderungen der Plastide in höheren Pflanzen hofft man die Funktionen der NDH-Gene direkt untersuchen zu können (Svab *et al.*, 1990; Golds *et al.*, 1993; Svab und Maliga, 1993).

Der NDH-Komplex ist essentiell für das Wachstum von Pflanzen, somit ist immer ein Anteil an Wildtyp NDH-Genkopien notwendig, damit die Mutanten überlebensfähig sind. Erfahrungsgemäß enthalten Mutanten nie unter 1 - 5 % NDH-Genkopien. Da die Menge an Wildtypkopien des Gens in den Mutanten nicht bestimmt werden konnten, ist eine Verknüpfung der Effekte mit einzelnen Untereinheiten vom NDH-Gen schwierig (Kofer *et al.*, 1998).

Die NDH 53-25 Mutante enthält reduzierte Mengen an Chlorophyll und besitzt beide Photosysteme. Sie wächst jedoch schlecht, d.h. der Anteil an funktionsfähigen NDH Kopien ist gering. Die Mutante hat Probleme mit dem Energiehaushalt der Plastiden. Der Abbau von Stärke ist gehemmt (Kofer *et al.*, 1998).

Die NDH 54-3IV Mutante hat einen höheren Anteil an funktionsfähigen NDH-Genkopien als die NDH 53-25 Mutante. Die Störung im Energiehaushalt in den Plastiden ist geringer. Es wird angenommen, dass die Mutante den Defekt umgeht. Möglich wäre dies durch Zunahme der Genkopien in den Chloroplasten. Der Stärkeabbau ist nicht gehemmt und somit mit dem Wildtyp vergleichbar (Kofer *et al.*, 1998).

3.2.3.3 Erscheinungsbild

Der Wildtyp von *Nicotiana tabacum var. havanna piperita* hat großlappige Blätter (4 - 5 cm lang) mit kräftiger grüner Farbe. Der Spross ist nach einer Wachstumsperiode von 4 - 6 Wochen gut entwickelt (Höhe 20 - 25 cm) und neigt zur Verholzung.

Die Mutanten unterscheiden sich in der Erscheinungsform vom Wildtyp. Bei allen Mutanten handelt es sich um stabile Phänotypen.

Die RPO Mutante hat sehr kleine und zierliche Blätter. Die ganze Pflanze ist weiß und wirkt verkümmert (Abbildung 15). Unter den vorliegenden Wachstumsbedingungen werden die Pflänzchen nicht groß und bilden aus Mangel der entsprechenden Wachstumshormone im VDW-Medium keine Wurzeln aus. Versuche, die RPO Mutante auf dem gleichen Medium,

Ergebnisse und Diskussion

wie Wildtyp und NDH Mutanten wachsen zu lassen, scheiterten, da sie zu stark von den im VDW-Medium enthaltene Metaboliten abhängig ist.

Beide NDH Mutanten sind grün. Die Blätter von NDH 54-3IV sind jedoch deutlich zierlicher als beim Wildtyp oder bei NDH 53-25. Die Pflanzen werden bei vergleichbaren Wachstumsperioden nicht ganz so groß wie der Wildtyp. Die Ausbildung des Sprosses ist gut und es erfolgt eine Verholzung.



Abbildung 15. *Nicotiana tabacum* var. *havanna piperita* RPO.

3.3 Untersuchungen zum Primärstoffwechsel

Eine direkte Isolierung und Analyse des zentralen Stoffwechsellpools aus Eukaryonten und Prokaryonten ist schwierig. Da das ganze System der Zelle auf Fließgleichgewichten beruht, liegen die gesuchten Verbindungen nur in geringen Konzentrationen vor. Die Reaktionen des Stoffwechsels sind jedoch in hohem Maße durch enzymatische Reaktionen miteinander verbunden. Somit ist eine Ableitung der Metabolite des zentralen Stoffwechsellpools aus gut isolierbaren Verbindungen über bekannte Enzymreaktionen möglich.

Der zentrale Pool setzt sich aus einfachen Kohlenhydraten, Carbonsäuren und Dicarbonsäuren zusammen, die über anabolische Reaktionen gebildet werden. Die primären Metabolite, Aminosäuren und Ribonukleotide, stammen biosynthetisch aus diesem zentralen Pool ab. Sie werden in Polymeren, wie Proteinen und Nukleinsäuren, eingebaut und werden in der Regel nicht weiter umgesetzt. Somit reflektieren sie die Intermediate des zentralen Stoffwechsellpools zum Zeitpunkt ihrer Bildung.

Studien mit ^{13}C markierten Vorstufen haben bewiesen, dass die Markierungsmuster des zentralen Stoffwechsellpools aus den experimentellen Daten der Aminosäuren und Ribonukleotide rekonstruiert werden können (Eisenreich *et al.*, 1993; Lee, 1996; Werner *et al.*, 1997; Eichinger, 1997; Eisenreich und Bacher, 1999; Bacher *et al.*, 1999; Eichinger *et al.*, 1999). Das Verfahren ist inzwischen eine etablierte Methode.

3.3.1 Zentrale Stoffwechselwege

3.3.1.1 Glykolyse

Die Glykolyse dient dem Energiegewinn, in Form von ATP, durch Abbau von D-Glucose zu Pyruvat. Sie ist, neben dem oxidativen Pentosephosphatweg, einer der zwei Hauptwege des Glucoseabbaus.

D-Glucose wird über D-Glucose-6-phosphat zu D-Fructose-6-phosphat isomerisiert. Das daraus gebildete D-Fructose-1,6-diphosphat wird in D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat gespalten. Anschließend erfolgt die Bildung von Pyruvat.

Die Phosphorylierung der Zucker benötigt ATP. Die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Pyruvat liefert ein NADH und zwei ATP Moleküle. Bei der Nettoreaktion der Umwandlung von D-Glucose zu Pyruvat werden, pro Molekül D-Glucose, zwei ATP und zwei NADH gebildet.

Das Pyruvat reagiert zu Acetyl-CoA weiter und durchläuft anschließend den Citrat-Zyklus, wobei weitere Reduktionsäquivalente gebildet werden. Die Reduktionsäquivalente werden in

der Atmungskette zu ATP umgewandelt. Die vollständige Glucoseoxidation zu CO_2 liefert 36 ATP.

Über die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat besteht eine Verbindung der Glykolyse zum Acetyl-CoA und somit zum Citrat-Zyklus.

Das während der Glykolyse gebildete 3-Phosphoenolpyruvat kann entweder zu Pyruvat oder durch CO_2 -Assimilierung zu Oxalacetat umgewandelt werden (anaplerotischer Weg). Es gibt Hinweise für diese Reaktionsverläufe in photosynthetischen und nicht photosynthetischen Geweben. Oxalacetat ist Vorstufe für die Aminosäuren der Aspartat-Familie. 3-Phosphoenolpyruvat kann über den anaplerotischen Weg in den Citratsäure-Zyklus geschleust werden (Bryan, 1990; Lea und Leegood, 1993; Kindl, 1994).

3.3.1.2 Oxidativer Pentosephosphatweg

Der oxidative Pentosephosphatweg ist, durch die Bereitstellung von reduziertem NADPH und C_5 -Zuckerphosphaten, neben der Glykolyse ein wichtiger Bestandteil der Biosynthesewege in Pflanzen. Hierbei wird D-Glucose zu den wichtigen Zwischenstufen Erythrose-4-phosphat und Ribose-5-phosphat umgewandelt. Erythrose-4-phosphat ist Bestandteil der Aromatenbiosynthese und Ribose-5-phosphat ist an den Biosynthesen der Nukleinsäuren, sowie der Aminosäuren Histidin, Tryptophan und Glycin beteiligt (Bryan, 1990; Lea und Leegood, 1993; Kindl, 1994).

Die Reaktion startet mit der Umwandlung von D-Glucose-6-phosphat zu Ribulose-5-phosphat. Bei NADPH Bedarf erfolgt anschließend eine Reaktion mit Transketolase und Transaldolase. Das Ribulose-5-phosphat wird zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat umgewandelt. Die Enzyme stellen eine reversible Verbindung zwischen dem Pentosephosphatweg und der Glykolyse dar.

Die Reaktionen des oxidativen Pentosephosphatwegs finden im Cytosol statt.

3.3.1.3 CO_2 -Fixierung

Auf die Besonderheiten der CO_2 -Fixierung bei C_4 - und CAM-Pflanzen wird im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen, da es sich bei den eingesetzten Pflanzen (*Catharanthus roseus* und *Nicotiana tabacum*) um C_3 -Pflanzen handelt.

Die Aufnahme von CO_2 bei Pflanzen erfolgt über die Spaltöffnungen. Das Gas diffundiert in das Blattgewebe. Das innerhalb der Pflanze freiwerdende CO_2 über die Atmungsaktivität der Mitochondrien und über die Photorespiration der Peroxisome wird über die gleichen Wege, wie das von außerhalb stammende CO_2 , umgesetzt (Richter, 1998).

Calvin-Zyklus (reduktiver Pentosephosphat-Zyklus)

Mit dem Calvin-Zyklus synthetisieren die Chloroplasten Kohlenhydrate über primäre Carboxylierung. Der Zyklus wird in Carboxylierungs-, Reduktion- und Regenerationsphase unterteilt (Abbildung 16, rot). In der Carboxylierungsphase wird CO_2 in Anwesenheit von Ribulosediphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) an Ribulose-1,5-bisphosphat (**23**) gebunden. Das Enzym katalysiert neben dem Einbau von CO_2 auch die Spaltung von Ribulose-1,5-bisphosphat in Anwesenheit von Sauerstoff (Abbildung 16, blau; Photorespiration, S. 70).

In der anschließenden Reduktionsphase wird das gebildete 2'-Carboxy-3-keto-D-arabinitol-1,5-bisphosphat (**24**) zu 3-Phosphoglycerat (**25**) gespalten. Im weiteren Verlauf der Reaktion wird Glycerinaldehyd-3-phosphat (**16**) gebildet, das über eine Gleichgewichtsreaktion mit Dihydroxyacetonphosphat in Verbindung steht (Abbildung 16).

Die C_3 -Zucker können die Chloroplasten verlassen und in die Glykolyse und der Gluconeogenese einfließen, oder es kommt zur Bildung von D-Fructose-1,6-diphosphat, als Umkehr der glykolytischen Spaltung aus D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Die Weiterreaktion von D-Fructose-1,6-diphosphat zu D-Fructose-6-phosphat (**26**) ist irreversibel. Die gebildeten C_6 -Zuckerphosphate können zu Assimilationsstärke umgewandelt, in den oxidativen Pentosephosphatweg eingeschleust oder in der Regenerationsphase des Calvin-Zyklus als Ribulose-1,5-bisphosphat (**23**) zurückgewonnen werden (Abbildung 16, Richter, 1998). Die Regenerationsphase hat gemeinsame Enzyme und Zwischenprodukte mit dem oxidativen Pentosephosphatweg. Die Reaktionen verlaufen entgegengesetzt, weswegen der Calvin-Zyklus auch reduktiver Pentosephosphat-Zyklus genannt wird (Lea und Leegood, 1993; Kindl, 1994; Voet und Voet, 1995; Richter, 1998). Wegen der Gemeinsamkeit der Enzyme werden Überschneidungen des Calvin-Zyklus mit dem katabolischen oxidativen Pentosephosphatweg und den Aminosäurebiosynthesen vermutet (Stitt und Rees, 1979; Gottlieb, 1982; Bagge und Larsson, 1986).

Die über den Calvin-Zyklus gebildete Assimilationsstärke wird bei Dunkelheit wieder in C_3 -Zuckerphosphate gespalten und aus den Chloroplasten exportiert (Richter, 1998).

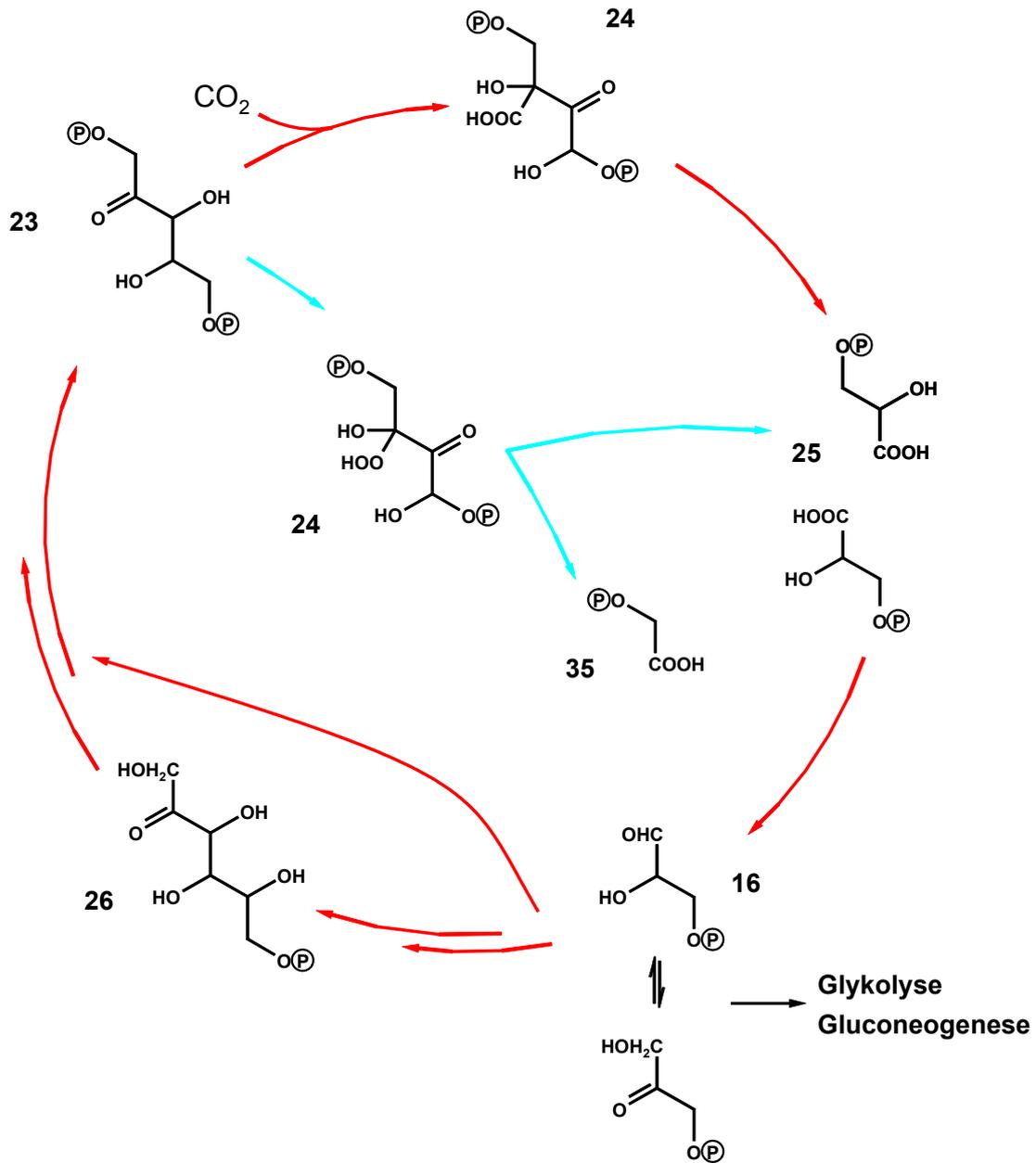


Abbildung 16. Calvin-Zyklus (rot - Carboxylierungs-, Reduktions- und Regenerationsphase; blau - Photorespiration).

Es sind vier Wege der CO₂-Fixierung bei Bakterien bekannt: (I) der reduktive Pentosephosphat-Zyklus, (II) der reduktive Citrat-Zyklus, (III) der reduktive Acetyl-CoA/Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase-Weg und (IV) der 3-Hydroxypropionat-Weg (Review: Fuchs, 1989). *Chloroflexus aurantiacus* fixiert CO₂ mit dem zuletzt genannten Biosyntheseweg (Holo und Sirevåg, 1986; Holo and Grace, 1987; Fuchs, 1989; Holo, 1998; Eisenreich *et al.*, 1993; Herter *et al.*, 2002).

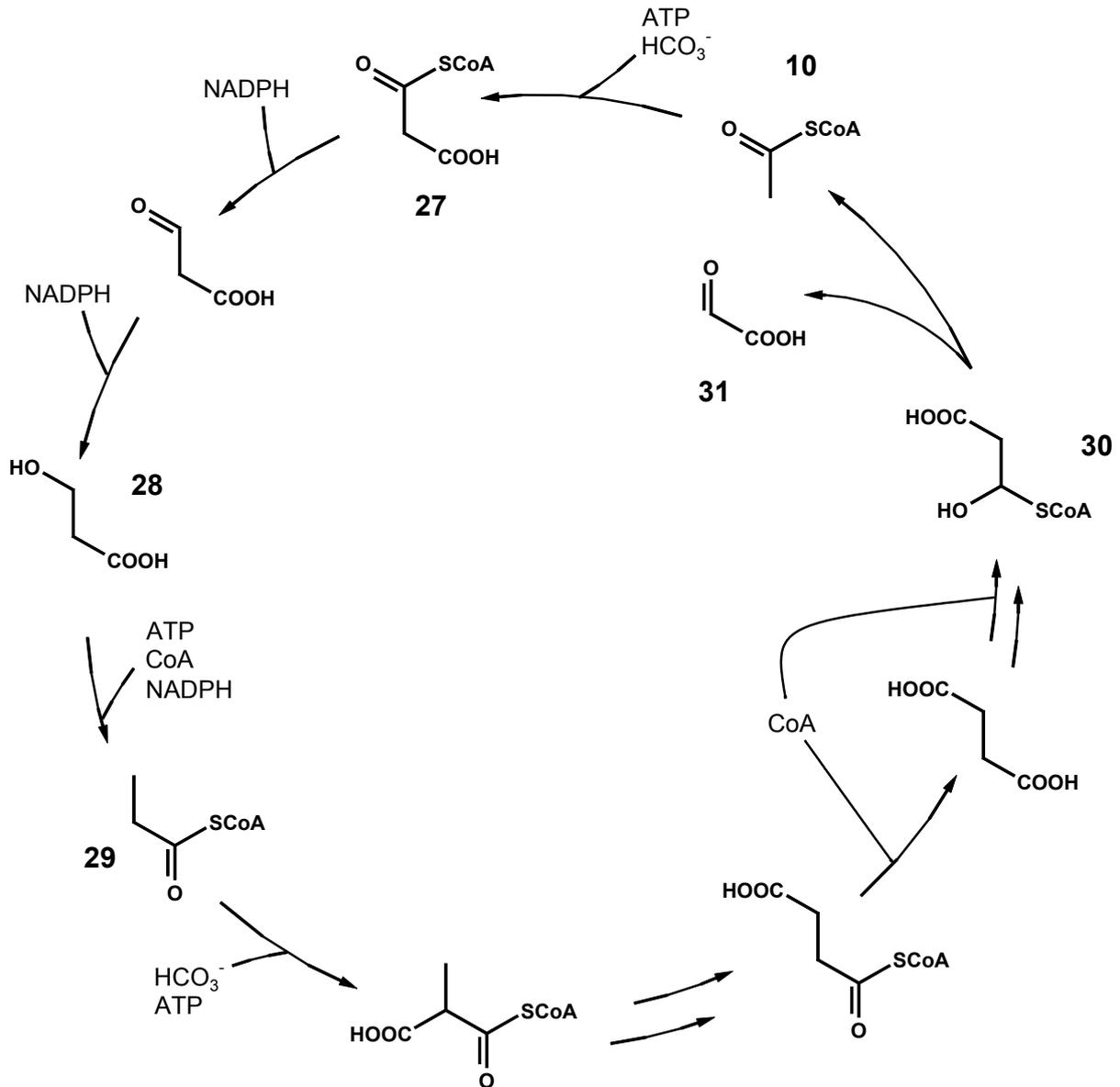


Abbildung 17. 3-Hydroxypropionat-Zyklus (Eisenreich *et al.*, 1993; Herter *et al.*, 2002).

3-Hydroxypropionat-Zyklus

Zu Beginn bindet CO₂ in einer Biotin-abhängigen Reaktion an Acetyl-CoA (10). Es bildet sich Malonyl-CoA (27). Über eine Serie von Dehydrierungen und Reduktionen wird erst 3-Hydroxypropionat (28) und anschließend Propionyl-CoA (29) gebildet. Propionyl-CoA (29) bindet ein weiteres CO₂. Die daraus gebildete Dicarbonsäure reagiert über mehrere Schritte weiter zu Malyl-CoA (Abbildung 17, 30; Strauß *et al.*, 1992; Eisenreich *et al.*, 1993; Herter *et al.*, 2002).

Der Zyklus, der Acetyl-CoA (10) in Malyl-CoA (30) umwandelt, verbraucht zwei HCO₃⁻ und drei NADPH. Die Malyl-CoA Lyase regeneriert bei der Spaltung von Malyl-CoA (30) das

Primärstoffwechsel

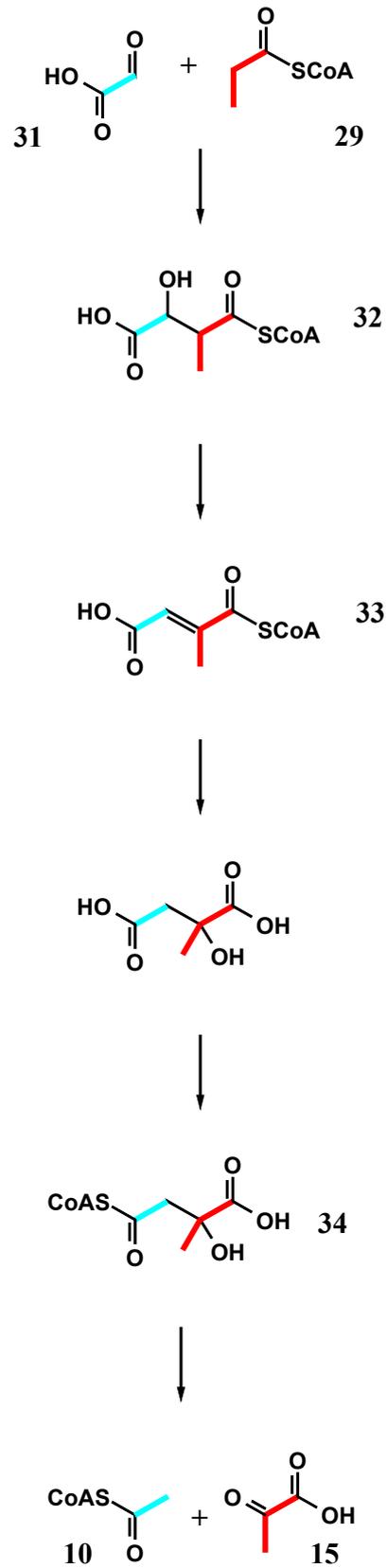


Abbildung 19. Hypotetischer Biosyntheseweg für die Transformation von Glyoxylat (31) und Propionyl-CoA (29) zu Acetyl-CoA (10) und Pyruvat (Herter *et al.*, 2001, 15).

Die Ausgangsverbindungen der Transformation von Glyoxylat (**31**) und Propionyl-CoA (**29**) sind Bestandteile der CO₂-Fixierung über den 3-Hydroxypropionat-Zyklus (Strauß *et al.*, 1992, 1993; Eisenreich *et al.*, 1993, Herter *et al.*, 2001). Der Reaktionszyklus beschreibt die Bildung von Pyruvat aus drei CO₂ Molekülen und der Regeneration des Startermoleküls Acetyl-CoA. Die beiden Biosynthesewege greifen ineinander und werden in der Literatur als Bizyclus dargestellt (Abbildung 18, Herter *et al.*, 2002). Im äußeren Zyklus wird aus dem Glyoxylat (**31**) das Acetyl-CoA (**10**) regeneriert, d.h. der Innerezyklus ist in sich geschlossen.

3.3.1.4 Photorespiration (Lichtatmung)

Bei steigender Beleuchtungsstärke kommt es zur Photorespiration. Es handelt sich um eine typische Erscheinung bei C₃-Pflanzen, die ihr CO₂ ausschließlich über den Calvin-Zyklus fixieren (Richter, 1998). Es wird vermutet, dass der Prozess, durch andauernden Auf- und Abbau von Intermediaten („futile cycling“) bei intensiver Lichteinstrahlung und geringem CO₂-Angebot, das Photosynthesesystem vor Schaden schützt (Hatch, 1987; Lea und Leegood, 1993; Kindl, 1994).

Die Ribulosediphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) des Calvin-Zyklus spaltet Ribulose-1,5-bisphosphat (**23**) in Anwesenheit von Sauerstoff zu 2-Phosphoglykolat (**35**) und 3-Phosphoglycerat (**25**) (Abbildung 16, blau). Das aus 2-Phosphoglykolat (**35**) gebildete Glykolat verlässt den Chloroplasten und wird im Peroxisom in Glycin oder in den Mitochondrien weiter zu Serin umgewandelt. Das gebildete 3-Phosphoglycerat (**25**) wird wieder dem Calvin-Zyklus zugeführt.

Die Photorespiration führt zum Verlust von CO₂, Energieäquivalenten und Stickstoff. Der Prozess ist jedoch auch eine schnelle Möglichkeit zur Bildung von Serin und Glycin, wobei des gebildeten Serins als 3-Phosphoglycerat in den Calvin-Zyklus zurückfließt. Das freigesetzte Ammonium-Ion wird im Cytosol an Glutamat gebunden und geht in den „photorespiratorischen Stickstoffzyklus“ ein (Richter, 1998).

3.3.1.5 Citratzyklus

Der in den Mitochondrien lokalisierte Citrat-Zyklus nimmt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Pflanzen ein. Pro Umlauf des Zyklus wird ein Acetyl-CoA-Molekül gebunden und zwei Moleküle CO₂, die nicht vom Acetyl-CoA des gleichen Zyklus stammen, abgespalten (Lea und Leegood, 1993; Voet und Voet, 1995; Stryer, 1995; Barret, 1985).

Acetyl-CoA bindet im ersten Schritt an Oxalacetat und bildet das symmetrische Citrat. Es kommt zu keiner Randomisierung, wie über ¹⁴C-Markierung einer endständigen Säuregruppe bewiesen werden konnte (Voet und Voet, 1994; Stryer, 1995). Anschließend kommt es zur

Abspaltung von zwei CO₂-Molekülen unter Bildung von α -Ketoglutarat bzw. Succinat. Das symmetrische Succinat randomisiert und bildet in drei Schritten Oxalacetat. Die Reaktionen zwischen Succinat und Oxalacetat sind reversibel.

Die Verbindungen des Citrat-Zyklus sind wichtige Produkte des intermediären Stoffwechsels. So ist α -Ketoglutarat Vorstufe für die Aminosäuren der Glutamat-Gruppe und Oxalacetat für die Aspartat-Gruppe. Mangel an einzelnen Zwischenverbindungen wird über die anaplerotischen Reaktionen beseitigt. Beispiele für anaplerotische Wege des Citrat-Zyklus sind die Neusynthese von Oxalacetat über 3-Phosphoenolpyruvat aus der Glykolyse und über Succinat aus dem Glyoxalat-Zyklus.

3.3.1.6 Glyoxalat-Zyklus

Der in den Glyoxysomen statt findende Glyoxalat-Zyklus bildet aus zwei Acetyl-CoA Molekülen Malat. Der Glyoxalat-Zyklus findet vorallem in Samen, mit überwiegender oder ausschließlicher Fettspeicherung, statt. Das eingesetzte Acetyl-CoA stammt aus der β -Oxidation der Fettsäuren.

Einzelne Reaktionsschritte stimmen mit dem Citrat-Zyklus überein. So wird auch im Glyoxalat-Zyklus Acetyl-CoA an Oxalacetat gebunden. Es wird Citrat gebildet, das zu Isocitrat weiter reagiert. Isocitrat wird zu Glyoxalat und Succinat gespalten. Durch die Reaktion von Glyoxalat mit einem weiteren Acetyl-CoA wird Malat gebildet aus dem Oxalacetat regeneriert wird. Das gebildete Succinat fließt in die Mitochondrien, wo es zu Malat weiterreagiert. Das Malat geht in den Citrat-Zyklus über (anaplerotischer Weg) oder fließt ins Cytosol, wo es in der Gluconeogenese weiter reagiert (Dose, 1991; Lea und Leegood, 1993, Kindl, 1994; Richter, 1998).

3.3.1.7 Gluconeogenese

Die Gluconeogenese ist die Umkehrung der Glykolyse. Sie wird vorallem durchgeführt, wenn es zu Mangel an Fructose-6-phosphat kommt. Einzelne stark exergonische und somit praktisch irreversible Reaktionen werden umgangen.

Die Pyruvat-Carboxylase setzt Pyruvat in Oxalacetat um. Das gebildete Oxalacetat wird je nach Bedarf im Citrat-Zyklus oder bei ATP-Überschuss in der Gluconeogenese umgesetzt. Hierbei handelt es sich auch um einen anaplerotischen Reaktionsweg (Stryer, 1995). Das Enzym liegt in den Mitochondrien vor.

3.3.1.8 Biosynthese der Aminosäuren

Die vorhandenen Kenntnisse zu den Biosynthesewegen der Aminosäuren beschränken sich weitgehend auf Untersuchungen mit Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen) und Säugetieren. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die Biosynthesen der Aminosäuren in Pflanzen den bekannten Synthesewegen folgen. Die Struktur der Pflanzenzellen ist komplexer als die von Mikroorganismen. Die Zelle enthält verschiedene Organellen (Kompartimentierung), die gleiche oder verschiedene Biosynthesewege nutzen können. Durchgeführte Studien auf der Enzymebene der Pflanzen scheinen einen gemeinsamen Biosyntheseweg der Aminosäuren zu bestätigen. *In vivo* Experimente zu Aminosäurebiosynthesen in Pflanzen sind selten.

3.3.1.8.1 Aspartat-Familie

Aspartat wird durch direkte Transaminierung aus Oxalacetat, ein wichtiges Zwischenprodukt des Citrat-Zyklus, gebildet (Bryan, 1990). Da es sich beim Aspartat um die Vorstufe von Asparagin, Isoleucin, Methionin, Lysin und Threonin handelt, fasst man diese Aminosäuren zur Aspartat-Familie zusammen.

Als Vorläufer von Oxalacetat sind nur Acetyl-CoA und 3-Phosphoenolpyruvat als Stoffwechselintermediate möglich. Acetyl-CoA wird über den Citrat- und den Glyoxalat-Zyklus, 3-Phosphoenolpyruvat über die Pyruvatcarboxylase (anaplerotische Reaktion) in Oxalacetat überführt (Bryce und Rees, 1985; Champigny und Foyer, 1992).

Beobachtet man die Isotopenverteilung nach ein oder zwei Umdrehungen des Citrat-Zyklus, erkennt man eine Anreicherung von [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologen, da eine der zwei ursprünglichen COOH-Gruppen im Rahmen des Biosynthesewegs abgespalten wurde. Nach der zweiten Umdrehung ist im Oxalacetat statistisch noch $\frac{3}{4}$ der Markierung in der inkorporierten Acetyl-CoA Einheit erhalten. Dies führt zu einer hohen Randomisierung des ursprünglichen Acetyl-CoA, was durch die symmetrische Fumarsäure noch verstärkt wird.

Threonin bildet sich über Homo- und Phosphohomoserin aus Aspartat (Bryan, 1990; Giovannelli *et al.*, 1989). Das durch Transaminierung aus Threonin gebildete α -Ketobutyrat, wird unter Kondensation mit Hydroxyethylthiamin-diphosphat und Umlagerung des ursprünglichen Kohlenstoffgerüsts von Aspartat in einer Benzoin-Kondensation in Isoleucin umgewandelt (Barret, 1985; Richter, 1988; Bryan, 1990; Kindl, 1994).

Der für Lysin beschriebene Biosyntheseweg in Bakterien, Algen und Pflanzen verläuft über 2,6-Diaminopimelat (Richter, 1988; Bryan, 1990; Coruzzi, 1991; Kindl, 1994). Hierbei wird Pyruvat und Aspartat über 2,3-Dihydrodipicolinat zu 2,6-Diaminopimelat überführt. Unklar

ist, ob die Randomisierung des symmetrischen (L,L)-2,6-Diaminopimelat, die bei *Beta vulgaris* nachgewiesen wurde, allgemein üblich ist (Werner, 1996). Bei Randomisierung würde das CO₂ zu gleichen Teilen aus C1 von Pyruvat und C1 von Aspartat freigesetzt.

Neben dem Diaminopimelat-Weg wird für die Synthese von Lysin in Hefen, Pilzen und Algen der Aminoadiapat-Weg beschrieben (Bryan, 1990; Coruzzi, 1991; Kindl, 1994). Das Lysin wird bei der Kondensation von α -Ketoglutarat mit Acetyl-CoA gebildet.

Methionin bildet sich, wie Threonin über Homo- und Phosphohomoserin aus Aspartat (Richter, 1988; Kindl, 1994).

Die Chloroplasten sind der Syntheseort für die Aspartat- Familie und Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten. Durch Isotopmarkierung und Enzymlokalisierung wurden die Chloroplasten als bevorzugter Syntheseort von Lysin, Threonin, Isoleucin, Valin und Leucin identifiziert (Bryan, 1990).

3.3.1.8.2 Aminosäuren aus C-3 Vorstufen

Die Aminosäuren Glycin und Serin werden innerhalb der Gruppe der Aminosäuren aus C-3 Vorstufen zusammengefasst.

Es gibt zwei mögliche Synthesewege für Glycin. Glycin wird über eine direkte Konvertierung von Glyoxylsäure im Glyoxalat-Zyklus oder bei der Photorespiration gebildet (Barret, 1985; Lea und Leegood, 1993; Kindl, 1994). Des Weiteren ist eine Bildung über den Abbau von Serin mit der Serinhydroxymethyltransferase möglich (Bryan, 1990; Lea und Leegood, 1993). Serin ist über Hydroxypyruvat oder 3-Phosphoserin (aus 3-Phosphoglycerat) mit der Alaninbiosynthese verknüpft (Bryan, 1990). Ein weiterer Vorläufer kann Glycin über den Phosphoglycerat-Zyklus sein, wobei eine intakte Glycerin-Einheit und ein decarboxyliertes Glycin im Serin in die Positionen C-1/C-2 und C-3 eingebaut werden.

Glycin und Serin sind wichtige End- bzw. Zwischenprodukte der Photorespiration. Serin wurde in den Chloroplasten, und Glycin in Chloroplasten (Shah und Cossins, 1970) und Plastiden (Boland *et al.*, 1982; Boland und Schubert, 1983) nachgewiesen.

Die Aminosäuren Valin, Leucin und Alanin werden zu der Pyruvat-Familie zusammengefasst. Valin und Leucin werden aus je zwei Pyruvat Molekülen synthetisiert, wobei Leucin zusätzlich noch ein Molekül Acetyl-CoA enthält (Barret, 1985; Coruzzi, 1991; Bryan, 1980, 1990; Walters und Steffens, 1990; Werner, 1996)

Alanin leitet sich durch direkte Transaminierung von Pyruvat ab (Barret, 1985; Lea und Leegood, 1993; Kindl, 1994). Die Biosynthese von Alanin wurde in den Chloroplasten von Spinat nachgewiesen (Schulze-Siebert *et al.*, 1984).

3.3.1.8.3 Glutamat-Familie

Glutamat wird aus α -Ketoglutarat gebildet. α -Ketoglutarat ist eine wichtige Zwischenstufe des Citrat-Zyklus. Die Aminosäuren Glutamin, Prolin, Arginin werden über Glutamat synthetisiert und zählen deswegen zur Glutamat-Familie.

Prolin und Arginin entstehen ohne Bindungsbrüche des Kohlenstoffskeletts aus Glutamat (Bryan, 1990). Prolin entsteht durch die spontane Zyklisierung von Glutamat-5-semialdehyd (Richter, 1988; Kindl, 1994). Bei der Biosynthese von Arginin wird Glutamat durch Transaminierung in Ornithin umgewandelt. Anschließend bindet ein Carbamoylphosphat an die endständige Aminogruppe. Abschließend wird auf das entstandene Citrullin eine Aminogruppe übertragen (Kindl, 1994; Richter, 1988).

60 % der, in der Zelle enthaltenden, Carbamoylphosphatsynthase, das an der Synthese von Arginin beteiligt ist, liegt in den Chloroplasten vor (Bryan, 1890). Die Glutamat-Dehydrogenase kommt in Mitochondrien, Chloroplasten (*V. faba*, *Lactuca sativa*) und Plastiden (*Nicotiana*: Washitani und Sato, 1977) vor. Die Glutamat-Synthase wurde in Chloroplasten (Angiospermen) und in den Plastiden (Erbse) nachgewiesen (Stewart *et al.*, 1980).

3.3.1.8.4 Aromatische Aminosäuren

Die aromatischen Aminosäuren nehmen eine Sonderstellung ein, da sie sowohl am primären, wie am sekundären Metabolismus beteiligt sind (Bryan, 1990).

Sie werden ausgehend von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat über den Shikimat-Weg gebildet. Die beiden Ausgangsprodukte kondensieren und bilden die Shikimisäure. Anschließend wird unter Ankondensation eines zweiten 3-Phosphoenolpyruvats Chorisminsäure gebildet. Durch Umlagerung entsteht Prephenat, aus dem sich, bei höheren Pflanzen, über Arogenat Phenylalanin und Tyrosin bilden (Bryan, 1990; Schmidt *et al.*, 1990; Kindl, 1994). Die Seitenkette von Tyrosin und Phenylalanin wird als 3-Phosphoenolpyruvat auf der Stufe der 3-Enolpyruvatshikimisäure bzw. beim folgenden Prephenat eingeführt.

Die frühen Biosynthesevorläufer 3-Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat wurden in Pflanzen wenig experimentell überprüft (Gilchrist und Kosuge, 1980; Coggins *et al.*, 1985; Jensen, 1985; Connelly und Conn, 1986; Coruzzi, 1991). Man hat die Biosyntheseschritte bis zur Chorisminsäure analog von *E. coli*, anderen Bakterien und Eukaryonten (z.B. *Euglena gracilis*) übernommen (Jensen, 1985). Die Biosynthese ab der Chorisminsäure dagegen ist in

Pflanzen gut dokumentiert (Buchholz *et al.*, 1979; Rubin und Jensen, 1979; Byng *et al.*, 1981; Gaines *et al.*, 1982; Connelly und Conn, 1986; Bryan, 1990).

Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren findet in den Chloroplasten statt. Es wurden in *Nicotiana*, *Sorghum* und *Spinacia* Isozyme der Biosynthese im Cytosol identifiziert (3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat Synthase und Chorismatmutase).

3.3.1.8.5 Histidin

Die Biosynthese von Histidin wurde in Mikroorganismen untersucht. Die Ergebnisse werden allgemein auf Pflanzen übertragen, obwohl bis jetzt nicht alle Enzyme in Pflanzen identifiziert wurden (Barret, 1985; Bryan, 1990; Lea und Leegood, 1993).

In Histidin ist ein intaktes Ribose-Kohlenstoffskelett enthalten. Der Stickstoff und das einzelne Kohlenstoff im Ring stammen aus ATP.

3.3.1.9 Biosynthese der Ribonukleoside

Die Ribonukleoside setzen sich aus den Nukleobasen und einer N-glykosidisch gebundenen Ribose zusammen. Man unterscheidet bei den Nukleosiden die Pyrimidin-Derivate (Cytosin und Uracil) und die Purin-Derivate (Adenin und Guanin).

Bei den Pyrimidin-Nukleotiden wird der Ring der Base in einem mehrstufigem Prozess aufgebaut. Aus CO₂ bildet sich in Anwesenheit von ATP Carbamoylphosphat. Anschließend wird eine Aminogruppe aus Glutamin auf das Kohlenstoff übertragen. Bei der Weiterreaktion mit Aspartat bildet sich Orotsäure, die Stammsubstanz für alle Pyrimidin-Nucleotide. Jetzt erst erfolgt die Bindung an den 5-Phosphoribosyl-Rest. Orotidin-5'-phosphat decarboxyliert zu Uridin-5'-phosphat. Aus Uridin-5'-phosphat bildet sich nach Austausch der Oxogruppe gegen eine Aminogruppe Cytidin-5'-phosphat (Lea und Leegood, 1993; Stryer, 1995).

Bei der Biosynthese der Purinbasen erfolgt der Aufbau der Ringsysteme an der Ribose. Es werden nacheinander Aminogruppen aus Glutamin und Aspartat, Glycin, CO₂ und C₁-Fragmente von N¹⁰-Formyltetrahydrofolsäure auf den 5-Phosphoribosyl-Rest übertragen. Endprodukt dieser heterocyclischen Ringsynthese ist Inosin-5'-monophosphat. Aus Inosin-5'-monophosphat werden durch Aminierung bzw. Oxidation mit anschließender Aminierung Adenosin- bzw. Guanosin-5'-phosphat gebildet (Lea und Leegood, 1993; Stryer, 1995).

3.3.2 Einbauexperiment mit [1,2-¹³C₂]Glycin in *Chloroflexus aurantiacus*

Den Zellkulturen von *Chloroflexus aurantiacus*, in 5 Liter Kulturmedium, wurden insgesamt 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin zugesetzt. Um einen chemoheterotrophen Umsatz zu verhindern wurde das Glycin kontinuierlich der autotrophen Zellkultur zugesetzt. Aus der Anzucht konnten 2,6 g verwertbares Zellmaterial (trocken) gewonnen werden.

Die Markierungsmuster der isolierten Nucleoside sind in Tabelle 10 und Abbildung 20, sowie die isolierten Aminosäuren in Tabelle 11 und Abbildung 21 zusammengefasst. Die daraus abgeleiteten Zentralmetabolite sind in Tabelle 12 und Abbildung 24 zusammengefasst.

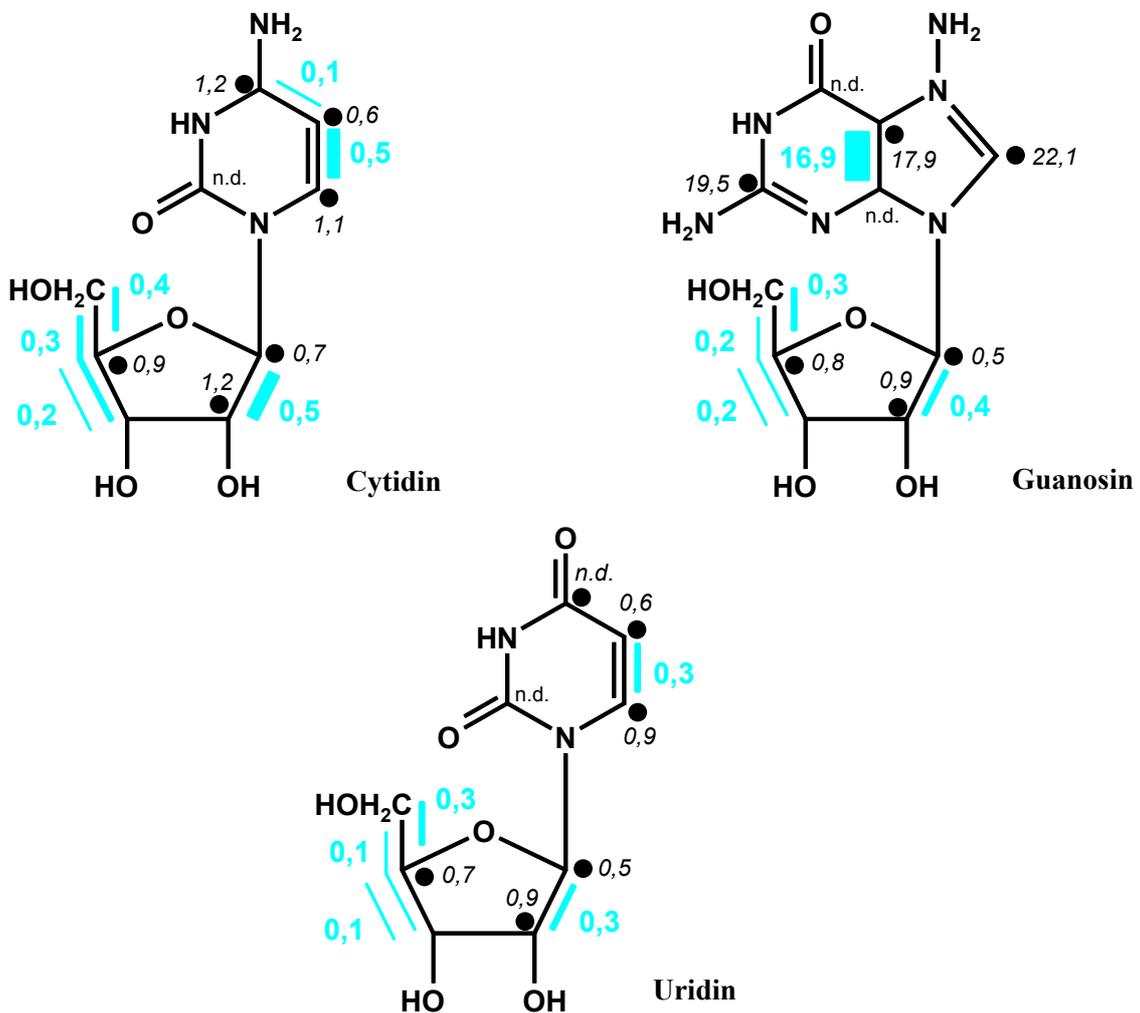


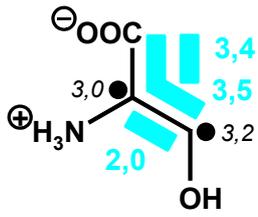
Abbildung 20. Kopplungsmuster der Nucleoside aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus dem [1,2-¹³C₂]Glycin, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Primärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

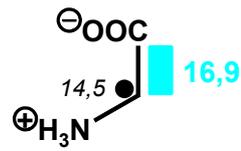
Tabelle 10. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Nucleoside aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Glycin}$.

	Position	chem.	Kopplungskonstante ²	Häufigkeit	Kopplung
		Verschiebung δ [ppm]			
Cytidin	2	156,5		n.d.	
	4	165,7	n.d. (5)	2,4	n.d.
	5	97,5	56,3 (4)	2,3	3,6
			68,2 (6)		19,9
	6	144,0	68,3 (5)	2,7	18,4
	1'	91,9	42,8 (2')	2,3	19,8
	2'	75,6	42,8 (1')	2,8	18,3
	3'	70,8	39,0 (4')	1,7	29,8
	4'	85,5	41,5 (3', 5')	2,9	20,8
			40,5 / 38,6 (3'/5')		9,7
5'	62,2	41,80 (4')	2,2	29,5	
Guanosin	2	154,3		20,6	
	4	152,0	n.d. (5)	n.d.	n.d.
	5	117,1	62,7 (4)	42,7	54,7
	6	157,3	n.d.	n.d.	n.d.
	8	135,9		32,2	
	1'	86,8	44,0 (2')	2,0	17,5
	2'	74,1	42,8 (1')	2,4	16,5
	3'	70,7	38,4 (4')	1,5	26,5
	4'	85,6	41,5 (3', 5')	2,6	18,4
			40,3 / 38,5 (3'/5')		7,2
5'	61,8	42,13 (4')	2,0	27,3	
Uridin	2	151,6		n.d.	
	4	166,1	n.d.	n.d.	n.d.
	5	102,2	67,1 (4, 6)	2,0	17,6
	6	141,7	67,2 (5)	2,3	14,1
	1'	89,3	42,9 (2')	1,9	13,6
	2'	73,5	43,1 (1')	2,3	12,7
	3'	69,3	38,6 (4')	1,5	16,3
	4'	84,1	41,4 (3', 5')	2,3	14,1
			40,8 / 39,3 (3'/5')		4,5
5'	60,7	41,91 (4')	2,0	20,0	

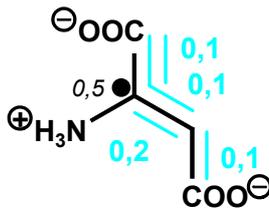
² Kopplungspartner in Klammern



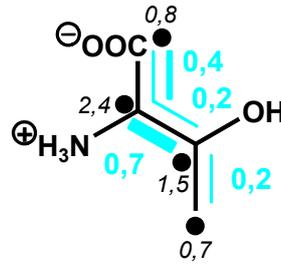
Serin



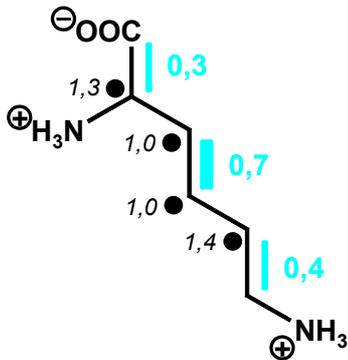
Glycin



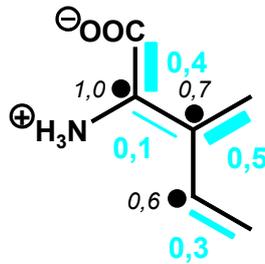
Aspartat



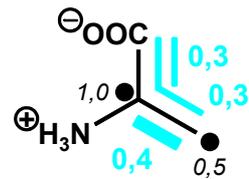
Threonin



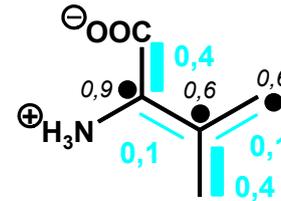
Lysin



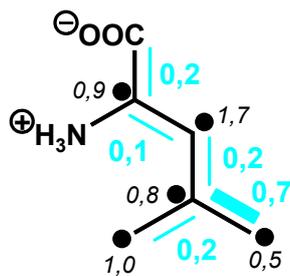
Isoleucin



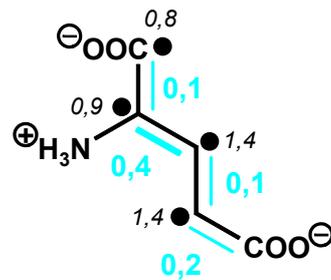
Alanin



Valin



Leucin



Glutamat

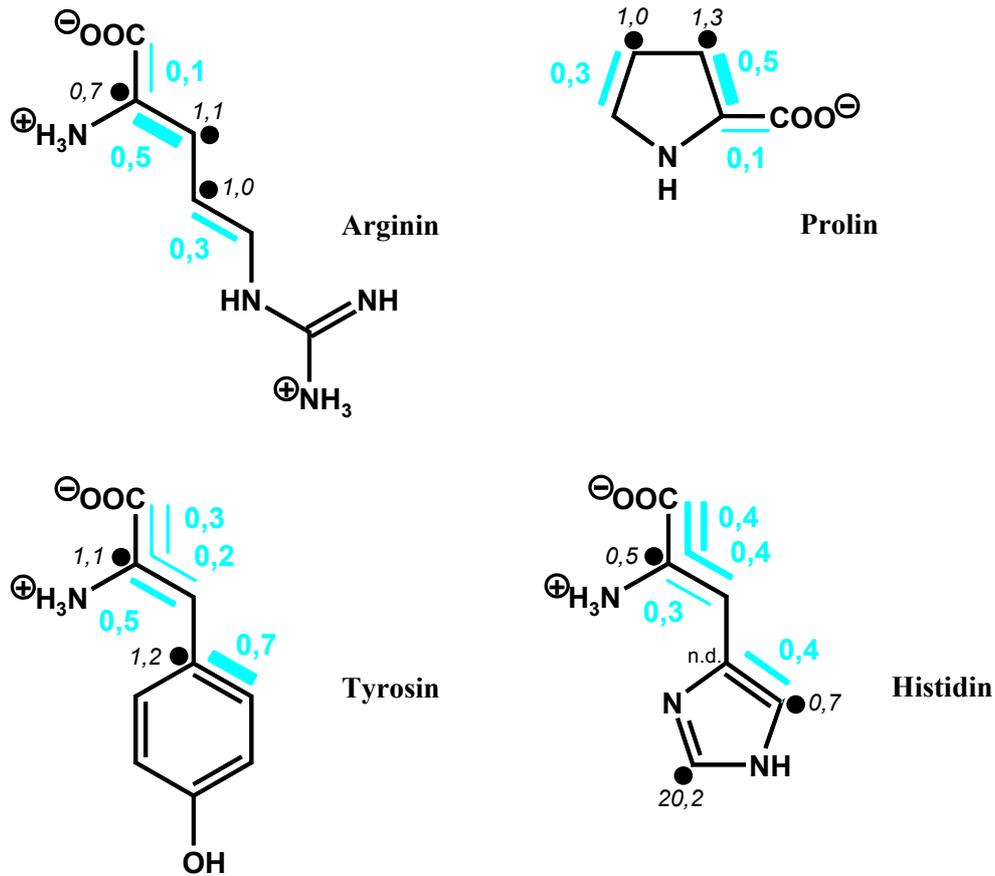


Abbildung 21. Kopplungsmuster der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus dem [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Primärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

Tabelle 11. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Glycin}$.

	Position	chem.	Kopplungskonstante ³	Häufigkeit	Kopplung
		Verschiebung δ [ppm]			
Alanin	1	176,4	55,7 (2, 2/3)	2,1	28,2
	2	51,4	55,4 (1)	3,1	8,9
			34,61 (3)		12,8
			54,9 / 35,1 (1/3)		8,9
3	17,3	34,6 (2, 1/2)	2,3	27,2	
Arginin	1	174,3	59,2 (2)	1,5	9,2
	2	55,2	60,3 (1)	2,4	2,6
			34,1 (3)		22,3
	3	29,6	34,0 (2)	2,7	20,5
	4	26,5	35,7 (5)	2,4	14,8
	5	43,1	35,7 (4)	1,4	18,4
6	159,5		1,2		
Aspartat	1	183,6	54,2 (2, 2/3)	1,5	15,5
	2	61,3	53,7 (1)	2,0	6,6
			36,4 (3)		10,3
			53,8 / 36,3 (1/3)		4,0
	3	45,9	36,4 (2)	1,8	16,6
4	186,7	50,5 (4)		4,0	
		51,0 (3)	1,5	6,2	
Glutamat	1	182,5	52,5 (2)	2,0	7,8
	2	56,2	53,0 (1)	2,5	3,6
			34,6 (3)		15,9
			34,6 (2, 4)		18,1
	3	28,4	34,8 (3)	2,8	5,2
	4	34,8	51,8 (5)		8,5
56,7 / 35,3 (3/5)				0,5	
5	176,1	53,5 (4)	1,3	12,9	
Glycin	1	173,1	55,0 (2)	17,9	n.d.
	2	42,5	54,9 (1)	32,5	52,1

³ Kopplungspartner in Klammern

Primärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

Fortsetzung von Tabelle 11

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Histidin	1	173,3	52,3 (2, 2/3)	n.d.	n.d.
	2	56,9	53,9 (1)	2,7	14,1
			35,1 (3)		9,3
			52,5 / 34,6 (1/3)		12,9
	3	29,8	35,1 (2, 1/2)	1,3	24,2
	4	130,8	73,9 (5)	n.d.	19,3
5	121,1	73,8 (4)	2,2	19,0	
	6	137,4		21,3	
Isoleucin	1	174,1	59,0 (2)	1,5	20,0
	2	59,9	59,1 (1)	2,6	19,0
			32,6 (3)		3,1
	3	38,4	34,8 (2, 6)	2,4	25,4
	4	27,4	34,6 (5)	2,0	13,1
	5	13,6	34,8 (4)	1,8	14,0
6	16,8	34,8 (3)	1,7	29,3	
Leucin	1	175,3	59,5 (2)	1,5	17,5
	2	54,2	59,6 (1)	2,3	9,1
			33,1 (3)		5,1
	3	41,6	34,0 (2, 4)	3,1	11,3
	4	26,8	35,1 (3, 5, 6)	3,0	16,6
	5	24,5	34,8 (4)	2,3	30,3
6	23,8	34,9 (4)	2,3	7,6	
Lysin	1	178,0	50,7 (2)	1,7	13,8
	2	57,8	53,9 (1)	2,7	10,6
	3	33,2	34,4 (4)	2,8	24,3
	4	24,9	34,4 (3)	2,8	28,7
	5	29,8	35,1 (6)	2,9	14,5
	6	42,5	35,7 (5)	1,9	15,9
Methionin	1	174,3	59,8 (2)	1,7	n.d.
	2	54,4	59,3 (1)	n.d.	8,1
			33,7 (3)		15,7
	3	31,5	34,06 (2)	2,7	24,4
	4	31,2	n.d.	1,4	n.d.
5	16,6	n.d.	22,9	n.d.	
Phenylalanin	n.d.				

Primärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

Fortsetzung von Tabelle 11

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Prolin	1	174,7	57,5 (2)	1,2	9,2
	2	62,2	58,5 (1)	2,1	5,6
			32,3 (3)		20,9
	3	30,7	32,3 (2)	2,9	21,5
	4	19,7	32,5 (5)	2,4	16,4
5	19,1	33,3 (4)	1,5	17,0	
Serin	1	173,6	59,4 (2, 2/3)	8,2	n.d.
	2	58,2	59,4 (1)	13,0	26,2
			36,4 (3)		16,7
	3	62,9	59,4 / 36,4 (1/3) 36,4 (2, 1/2)	9,8	26,8 54,4
Threonin	1	173,9	59,4 (2, 2/3)	2,5	22,5
	2	61,9	59,2 (1)	4,8	8,0
			36,4 (3)		13,9
			57,8 / 35,8 (1/3)		n.d.
	3	68,8	36,5 (2, 4, 1/2)	3,7	22,8
4	22,6	37,9 (3)	2,0	10,4	
Tyrosin	1	177,2	59,6 (2, 2/3)	1,8	32,7
	2	60,0	59,8 (1)	3,1	7,7
			32,5 (3)		16,0
			53,9 / 35,5 (1/3)		7,7
	3	40,6	32,6 (2, 1/2)	2,1	28,2
	4	131,5	57,5 (5)	3,0	23,0
	5/9	136,8	57,6 (4, 6)	2,3	30,8
	6/8	121,9	65,1 (7)	2,6	7,3
58,1 (5)			9,5		
7	161,0	65,9 / 57,4 (5/7) 65,4 (5/9, 6/8)	1,9	5,8 29,9	
Valin	1	174,1	58,3 (2)	1,5	30,4
	2	60,8	58,3 (1)	2,5	15,5
			32,5 (3)		4,9
	3	31,3	34,4 (2, 4, 5)	2,4	23,7
	4	19,7	34,5 (3)	1,8	26,9
5	19,1	34,5 (3)	1,8	7,1	

Im Glycin deuten die hohe Anreicherung von Position C-2 (14,5 %), sowie die hohe Konzentration des [1,2-¹³C₂]Isotopologs (16,9 mol%) auf einen großen Anteil an direkt inkorporiertes [1,2-¹³C₂]Glycin in das zelluläre Protein. Auch das, mit Glycin biosynthetisch verwandte, Serin ist deutlich höher markiert, als die restlichen Aminosäuren. Die Anreicherung im Serin liegt bei 3 %. In den restlichen Aminosäuren liegt die Anreicherung zwischen 0,5 % und 2 %. Die Konzentration der [¹³C₂] und [¹³C₃]Isotopologe liegt im Serin bei 3 mol%, in den restlichen Aminosäuren bei maximal 0,7 mol%.

In Glycin und Serin ist Position C-2 höher angereichert als Position C-1. Der Transport der Markierung von Glycin in den Acetyl-CoA Pool wird als möglicher Auslöser für die Anreicherung von Position C-2 diskutiert. Ein weiterer Auslöser für die Anreicherung wird im Mechanismus der Übertragung von C₁-Einheiten vermutet (Rieder, 1999). Die Anreicherung von Glycin in Position C-2 (14,5 %) steht in guter Übereinstimmung mit der Anreicherung der Positionen C-2 (19,5 %) und C-8 (19,9 %) in der Purin-Hälfte des Guanosins, die über C₁-Einheiten gebildet werden. Das Markierungsmuster der Positionen C-4 und C-5 in Guanosin spiegelt das eingebaute Glycin wieder.

Glycin und Serin werden über N⁵, N¹⁰-Methylen tetrahydrofolat ineinander umgewandelt. Das decarboxylierte und desaminierte Glycin reagiert mit einem weiteren Glycin Molekül zu Serin. Darüber erklärt sich die Anreicherung in Position C-3 im Serin, und die höhere Markierung des [1,2-¹³C₂]Isotopologs.

Serin leitet sich biosynthetisch unter anderem von 3-Phosphoglycerat ab. Damit besteht über die Glykolyse eine Verbindung zwischen Serin und dem 3-Phosphoenolpyruvat-Pool. Das im Serin gefundene [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog stammt wahrscheinlich aus dem 3-Phosphoenolpyruvat. Serin und 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus den aromatischen Aminosäuren) unterscheiden sich im Verhältnis ihrer [1,2-¹³C₂], [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe. Im 3-Phosphoenolpyruvat ist die Konzentration an [2,3-¹³C₂]Isotopologen deutlich höher. Eine mögliche Erklärung für die hohe Konzentration der [2,3-¹³C₂]Isotopologe in 3-Phosphoenolpyruvat ist eine Übertragung der Markierung von Acetyl-CoA über den hypothetischen bizyklischen Biosyntheseweg der autotrophen CO₂ Fixierung (Abbildung 18, Herter *et al.*, 2002). Das [¹³C₂]Isotopolog aus dem Acetyl-CoA (**10**) wird über den 3-Hydroxypropionat-Zyklus auf Propionyl-CoA (**29**) übertragen (Abbildung 17). Im zweiten Zyklus erfolgt eine Transformation von Glyoxylat (**31**) und Propionyl-CoA (**29**) zu Acetyl-CoA (**10**) und Pyruvat (**15**) (Abbildung 19). Die Markierung aus Propionyl-CoA (**29**) wird auf 3-Phosphoenolpyruvat übertragen (Abbildung 22).

Im Serin kommt es im Gegensatz dazu, durch die direkte Verbindung zum Glycin, zu einer höheren Konzentration von [1,2-¹³C₂] Isotopologen.

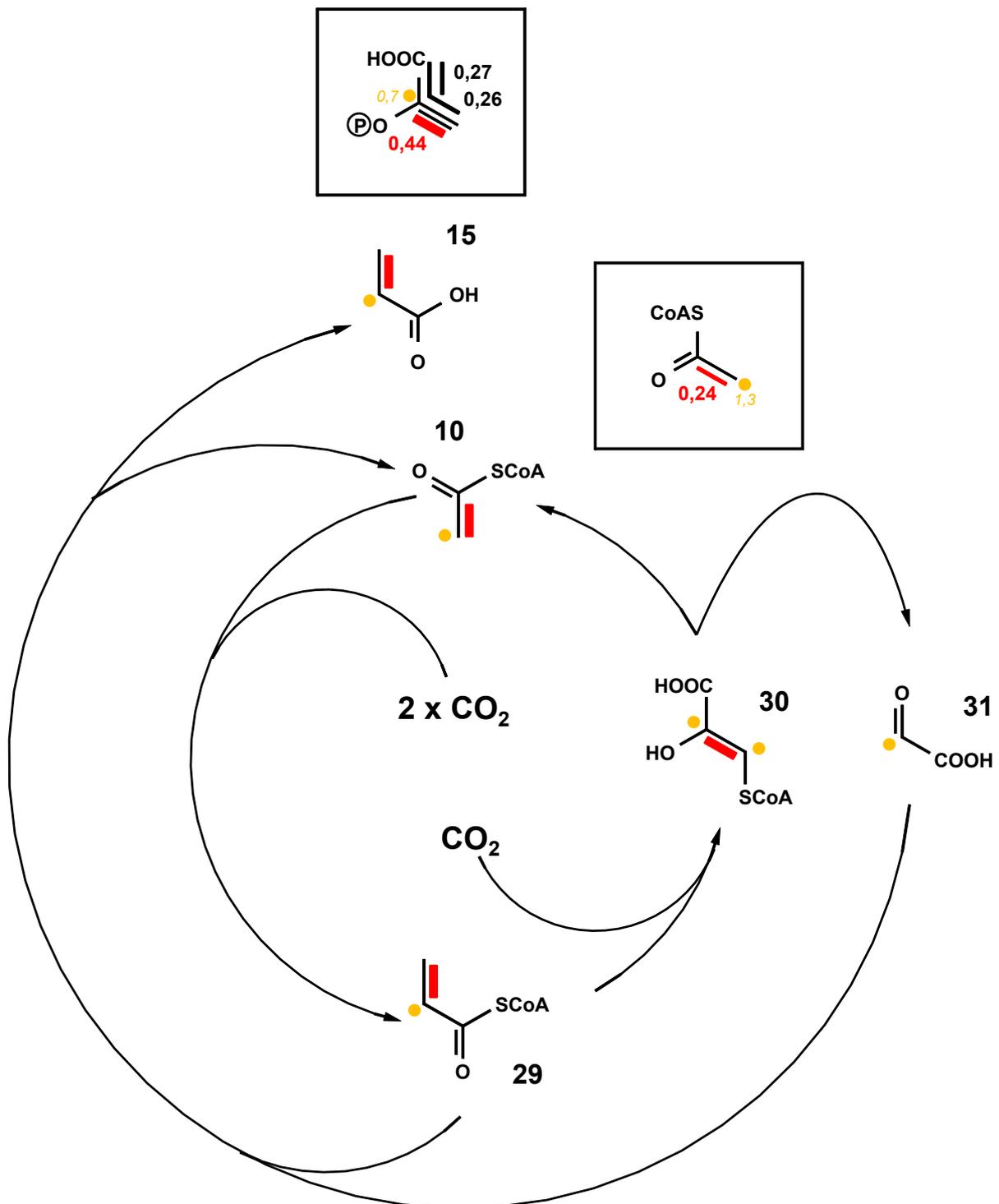


Abbildung 22. Hypotetischer bizyklischer Biosyntheseweg der autotrophen CO₂ Fixierung aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g mit [1,2-¹³C₂]Glycin (rot - erster Umlauf, orange - zweiter Umlauf des 3-Hydroxypropionat-Zyklus; Herter *et al.*, 2002).

Die Anreicherungen der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in den Positionen C-2 und C-3 in α -Ketoglutarat (**36**) stammen aus Oxalacetat (**38**) nach dem 1. Umlauf im Citrat-Zyklus (Abbildung 23, orange). Das [$^{13}\text{C}_2$]Isotopolog zwischen den Positionen C-2 und C-3 stammt aus der bizyclischen CO_2 Fixierung (blau). Es wird über das 3-Phosphoenolpyruvat in den Citrat-Zyklus eingeführt (Abbildung 22 und Abbildung 23). Die Anreicherung von Position C-4 im α -Ketoglutarat (**36**) stammt von dem neu hinzukommenden Acetyl-CoA (**10**) im Citrat-Zyklus (Abbildung 23, rot).

Das [$2,3\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopolog im α -Ketoglutarat (**36**) stammt aus der CO_2 -Fixierung (blau). Das [$4,5\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopolog im α -Ketoglutarat entsteht im 1. Umlauf vom Citrat-Zyklus (rot). Das [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopolog bildet sich im wiederholten Verlauf vom Citrat-Zyklus (orange) über das symmetrische Succinat (Abbildung 23, **37**).

Keine der bekannten Biosynthesewege führt zu den [$3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3$]Isotopologen im α -Ketoglutarat. Die Anreicherungen an den Positionen C-3 und C-4 sind für eine Bildung der Isotopologe über statistische Kopplungen zu gering.

Im Markierungsmuster weist das Oxalacetat (**38**) eine Asymmetrie auf. Es hat eine hohe Konzentration an [$2,3\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopologen, neben einer geringen Konzentration von [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopologen. Das [$2,3\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopolog stammt aus der CO_2 -Fixierung (blau). Die beiden geringer konzentrierten [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopologe entstehen über das symmetrische Succinat (**37**) bei wiederholtem Durchlauf vom Citrat-Zyklus (Abbildung 23, orange). Hierbei kommt es zu einer Anreicherung im Oxalacetat an den Positionen C-2 und C-3 über beide Biosynthesewege.

Zusätzlich wurde ein [$1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$]Isotopolog im Oxalacetat bestimmt (Abbildung 23, grün). Da die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe niedrig ist, stammt dieses Isotopolog nicht aus einer statistischen Rekombination. Über den anaplerotischen Weg gibt es eine Verbindung zwischen 3-Phosphoenolpyruvat (**39**) und Oxalacetat (Abbildung 23, **38**). Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe von 3-Phosphoenolpyruvat und das [$1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$]Isotopolog im Oxalacetat stimmen gut überein. Jedoch ist die Intensität der Kopplungsblöcke im 3-Phosphoenolpyruvat höher, als im Oxalacetat.

Das Verhältnis der [$2,3\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$]Isotopologe im Glycerinaldehyd-3-phosphat (aus Histidin und den Ribonukleosiden, Tabelle 12) unterscheiden sich mit 1,5 : 1,0 nur geringfügig vom Verhältnis in 3-Phosphoenolpyruvat (aus den Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin und Valin, Tabelle 12) mit 1,7 : 1,0.

Primärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

Gemäß der vorliegenden Daten wird Lysin in *Chloroflexus aurantiacus* über den Amino-adiapat-Weg synthetisiert.

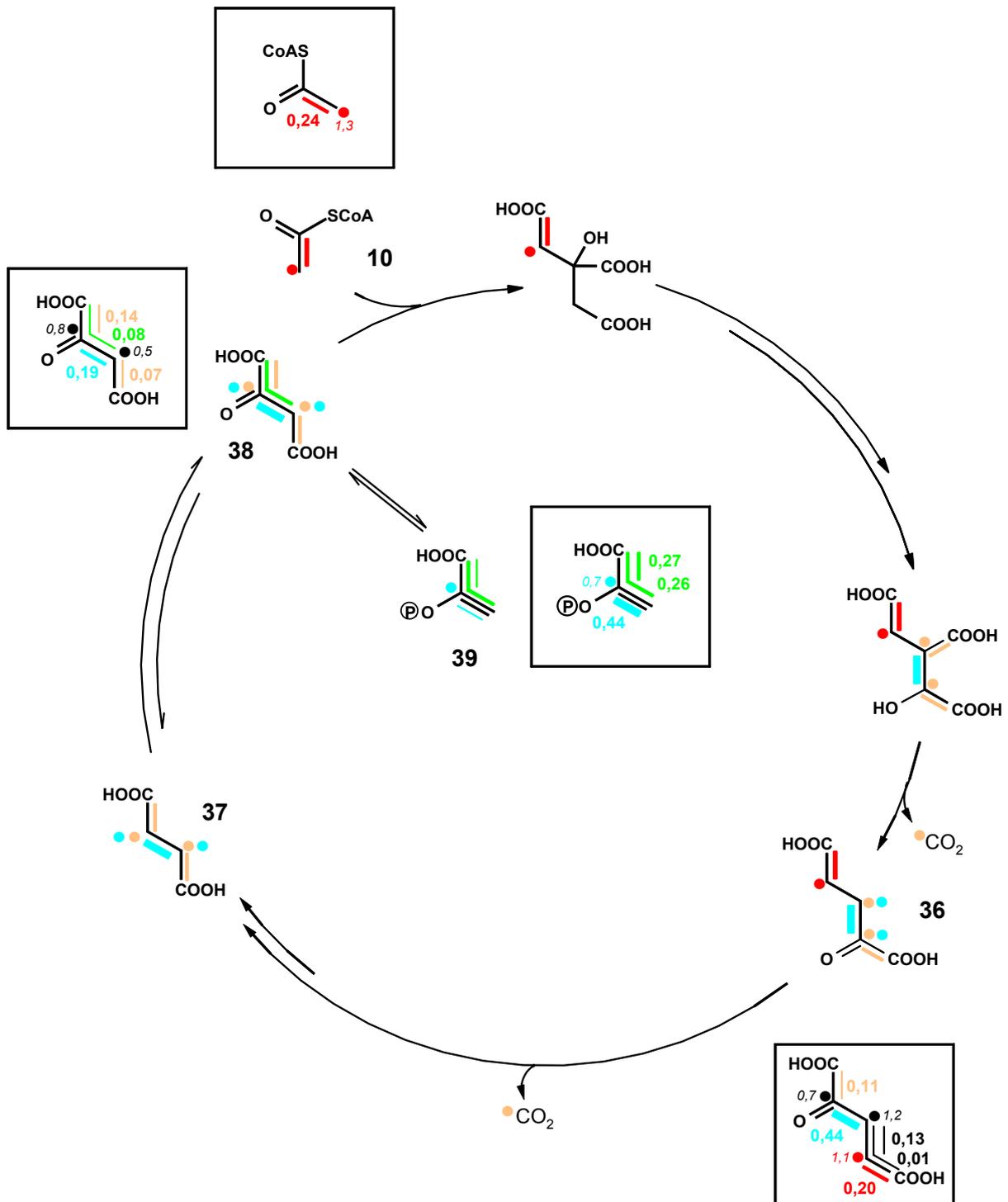


Abbildung 23. Metabolitenfluss im Citrat-Zyklus aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [1,2-¹³C₂]Glycin (rot - erster Zyklus, orange - zweiter Zyklus, grün - 3-Phosphoenolpyruvat über anaplerotischen Weg).

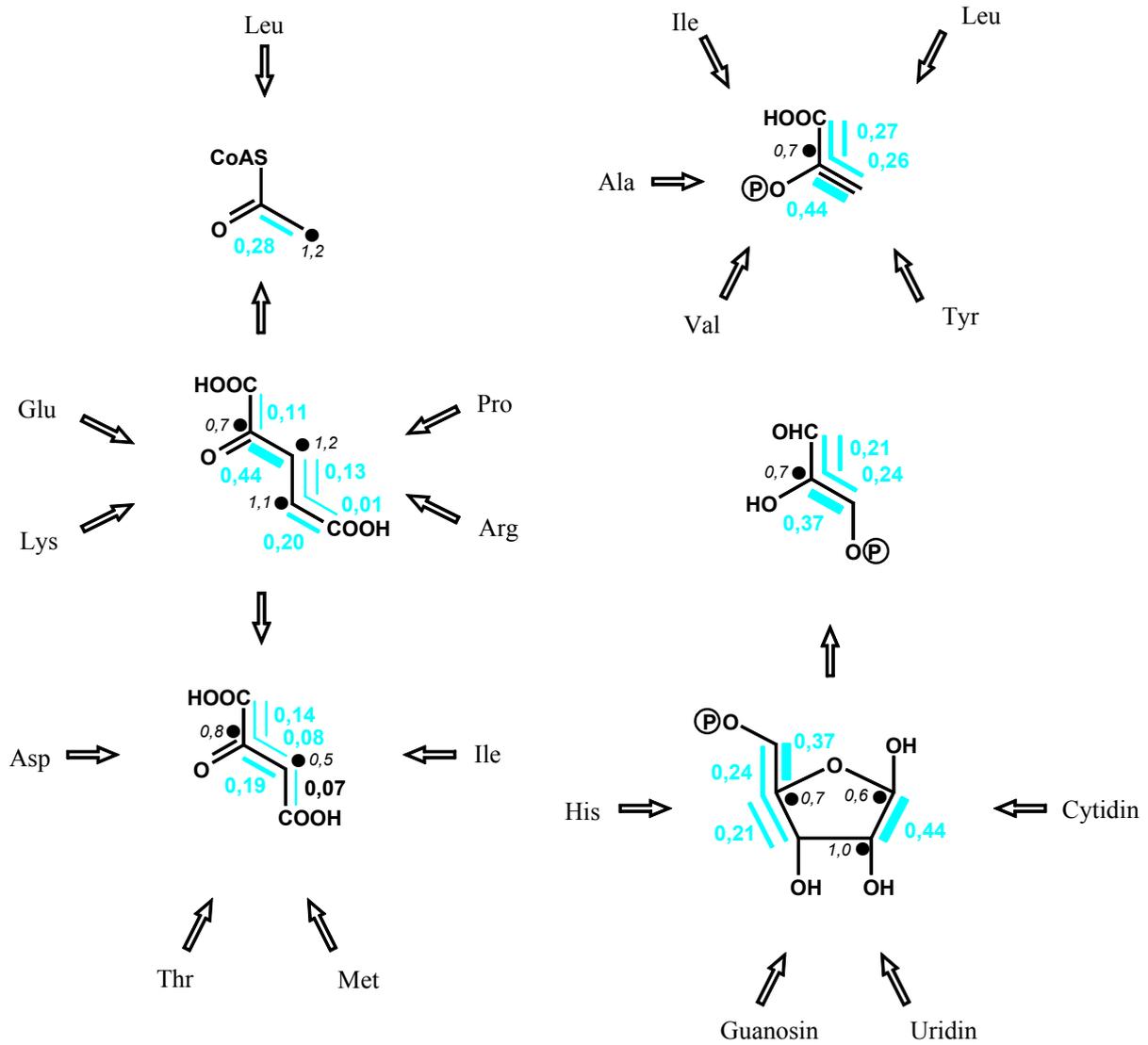


Abbildung 24. Kopplungsmuster der Zentralmetabolite Acetyl-CoA, 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat, Ribose-5-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus dem [1,2-¹³C₂]Glycin, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Primärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

Tabelle 12. Aus den Aminosäuren und Nucleosiden retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Zentralmetabolite aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin.

	Position	koppelt mit	Häufigkeit			Kopplung		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^4	{}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	{}
Acetyl-CoA	1	(2)	1,6	0,2	{6}	15,3	3,2	{6}
	2	(1)	2,6	0,2	{6}	12,3	3,0	{6}
3-Phosphoenolpyruvat	1	(2, 2/3)	1,8	0,2	{3}	n.d.		
	2	(1)	2,8	0,3	{8}	8,3	0,6	{2}
		(3)				14,4	1,6	{2}
		(1/3)				8,3	0,6	{2}
	3	(2, 1/2)	2,1	0,2	{8}	28,8	1,5	{6}
Oxalacetat	1	(2, 2/3)	1,7	0,1	{3}	17,8	2,3	{2}
	2	(1)	2,3	0,3	{2}	7,5	0,9	{2}
		(3)				13,0	2,7	{2}
		(1/3)				4,0		{1}
	3	(2, 4, 1/2)	1,9	0,1	{2}	21,7	2,4	{2}
	4	(3)	1,3	0,2	{3}	6,2		{1}
α - Ketoglutarat	1	(2)	1,6	0,3	{3}	8,7	0,7	{3}
	2	(1)	2,3	0,2	{3}	3,9	1,2	{3}
		(3)				19,7	2,7	{3}
	3	(2)	2,9	0,1	{3}	20,0	1,4	{3}
	4	(5)	2,5	0,2	{3}	15,1	0,9	{3}
	5	(4)	1,4	0,1	{3}	16,1	2,3	{3}
Ribose-5-phosphat	1	(2)	2,1	0,2	{4}	18,8	1,0	{3}
	2	(1)	2,5	0,2	{3}	18,0	1,2	{3}
	3	(4, 4/5)	1,5	0,1	{4}	26,8	2,3	{3}
	4	(3)	2,6	0,2		9,3		{1}
		(5)			{4}	14,1		{1}
		(3/5)				8,4	1,2	{2}
	5	(4, 3/4)	2,1	0,1	{3}	28,4	1,1	{2}
Erythrose-4-phosphat	1/3		2,6		{1}	22,6		{1}
	2		1,9		{1}	29,9		{1}
	4		n.d.			n.d.		

⁴ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

3.3.3 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Catharanthus roseus*

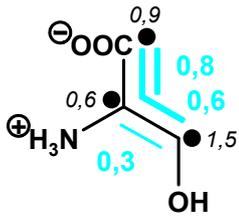
Zellkulturen von *Catharanthus roseus* wurden unter Belichtung mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose, inkubiert. Aus dem geernteten Material (50 g) wurden die Aminosäuren isoliert. Die Markierungsmuster der Aminosäuren sind in Tabelle 13 und Abbildung 25 zusammengefasst. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Zentralmetabolite sind in Tabelle 14 und Abbildung 28 zusammengefasst.

Zur Biosynthese der primären Metabolite in Pflanzen ist noch nicht alles bekannt. Bis jetzt wurden erst wenige retrobiosynthetische Isotopenmarkierungsstudien an Pflanzen durchgeführt (Lee, 1996; Werner, 1996; Eichinger, 1997; Bacher *et al.*, 1999; Rieder, 1999). Die Studien zeigten, dass die Retrobiosynthese eine geeignete Methode zur Untersuchung der Effekte im Pflanzenstoffwechsel ist. Durch einen Vergleich der Markierungsmuster ist es möglich die festgelegten oder angenommen Biosynthesewege der Aminosäuren in Pflanzen zu bestätigen.

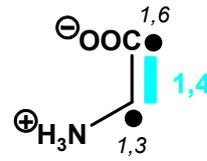
Glutamat leitet sich von α -Ketoglutarat ab. Aus Glutamat werden die beiden Aminosäuren Arginin und Prolin synthetisiert. Arginin und Prolin weisen eine, mit Glutamat vergleichbare, Verteilung und Konzentration bei den Isotopologen auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass in der vorliegenden Zellkultur von *Catharanthus roseus* die Biosynthese der beiden Aminosäuren über Glutamat als Vorstufe verläuft.

Das aus den Aminosäuren Glutamat, Arginin und Prolin retrobiosynthetisch bestimmte α -Ketoglutarat (**36**) ist ein Produkt aus dem Citrat-Zyklus (Abbildung 26). Das [4,5-¹³C₂]Isotopolog (rot) stammt vom neu eingeführten Acetyl-CoA (**10**). Über die symmetrische Struktur des Succinats (**37**) wird der Kopplungsblock auf die [1,2-¹³C₂] und [3,4-¹³C₂]Isotopologe im Oxalacetat (orange) verteilt. Die Konzentration der Markierung halbiert sich hierbei. Das [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog (grün) im α -Ketoglutarat stammt aus dem 3-Phosphoenolpyruvat. 3-Phosphoenolpyruvat wird über den anaplerotischen Weg in Oxalacetat eingebaut. Das hierbei gebildete [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog im Oxalacetat wird über den Citrat-Zyklus in der Rückreaktion zum symmetrischen Succinat auf das [2,3,4-¹³C₃]Isotopolog im Oxalacetat übertragen. Das aus Aspartat und Threonin retrobiosynthetisch abgeleitete Oxalacetat stimmt in Verteilung und Höhe der Markierungsmuster gut mit dem, über den Citrat-Zyklus verknüpften, α -Ketoglutarat überein.

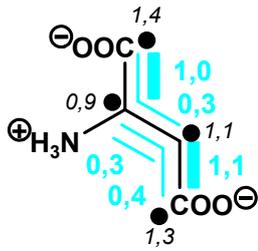
Primärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*



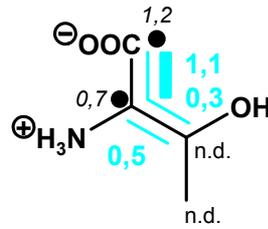
Serin



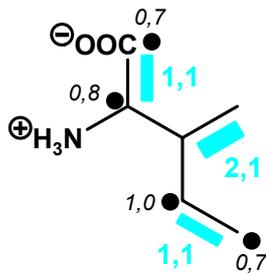
Glycin



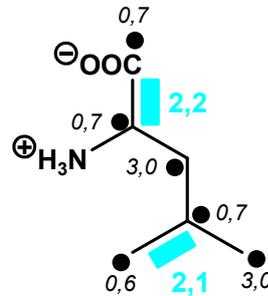
Aspartat



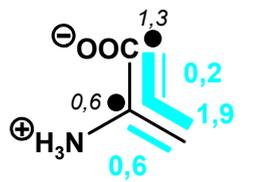
Threonin



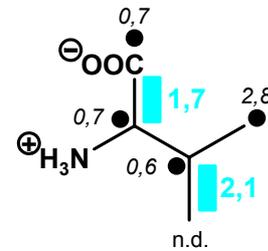
Isoleucin



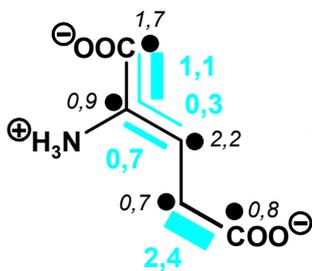
Leucin



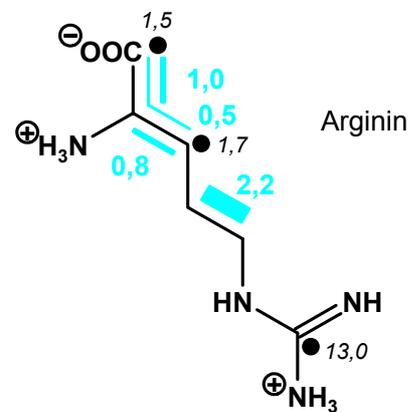
Alanin



Valin



Glutamat



Arginin

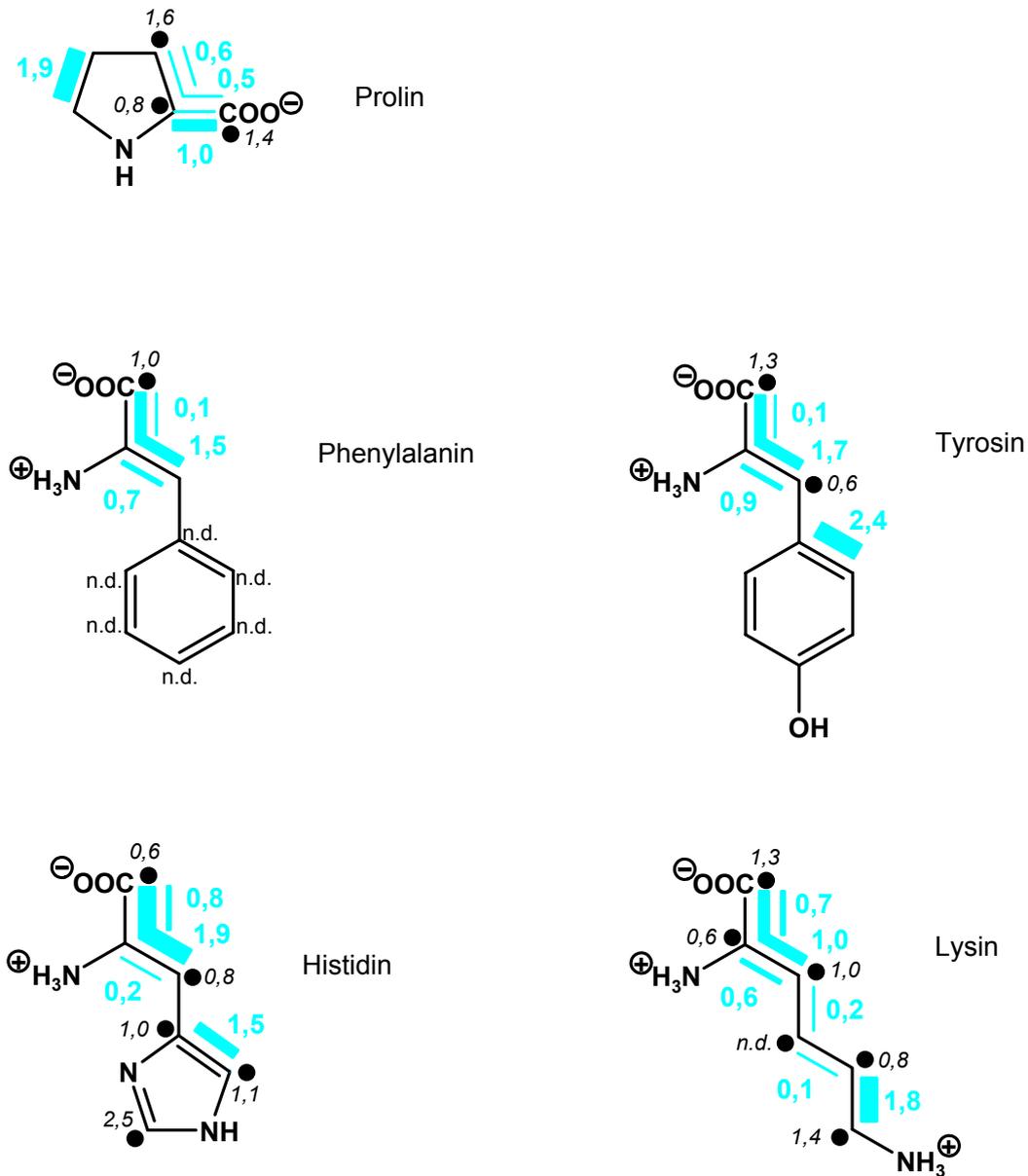


Abbildung 25. Kopplungsmuster der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der $[^{13}C_1]$ Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Primärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

Tabelle 13. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

	Position	chem.	Kopplungskonstante ⁵	Häufigkeit	Kopplung					
		Verschiebung δ [ppm]				J_{CC} [Hz]	% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$		
Alanin	1	175,1	59,0 (2, 2/3)	4,5	46,0					
	2	51,4	58,2 (1)	4,4	n.d.					
			n.d. (3)		17,2					
			60,7 / 32,0 (1/3)		43,6					
3	18,0	33,8 (2, 1/2)	4,1	59,0						
Arginin	1	175,7	53,2 (2, 2/3)	4,0	33,5					
	2	158,2	53,4 (1)	3,8	27,4					
			34,6 (3)		15,6					
			53,1 / 34,4 (1/3)		11,9					
	3	55,2	34,2 (2, 1/2)	4,0	33,9					
	4	41,7	35,8 (5)	3,8	59,8					
5	28,9	35,9 (4)	3,8	55,0						
Aspartat	1	187,1	51,1 (2, 2/3)	3,9	34,0					
						2	61,3	53,7 (1)	4,0	26,8
								35,9 (3, 3/4)		13,2
	3	48,1	53,6 / 36,1 (1/3)	4,3	8,5					
			51,0 (4)		26,0					
			36,1 (2, 1/2)		14,4					
4	186,5	51,1 / 35,9 (2/4)	3,9	8,7						
		53,6 (3, 2/3)		37,0						
Glutamat	1	180,4	53,6 (2, 2/3)	4,2	35,2					
	2	56,2	53,5 (1)	4,1	26,8					
			34,8 (3)		16,3					
			52,5 / 34,8 (1/3)		8,3					
	3	28,0	34,8 (2, 1/2)	4,3	23,6					
	4	33,1	53,5 (5)	4,2	57,3					
5	176,2	53,5 (4)	4,3	56,2						
Glycin	1	172,3	58,7 (2)	4,1	35,9					
	2	42,9	58,7 (1)	3,8	35,5					

⁵ Kopplungspartner in Klammern

Primärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

Fortsetzung von Tabelle 13

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Histidin	1	174,9	53,3 (2, 2/3)	4,4	61,0
	2	55,8	53,4 (1)	4,5	18,9
			37,0 (3)		4,7
			53,7 / 36,0 (1/3)		42,1
	3	28,1	35,2 (2, 1/2)	4,0	43,9
	4	129,9	73,9 (5)	3,6	41,2
5	119,9	73,9 (4)	3,7	41,4	
6	136,3		3,6		
Isoleucin	1	174,1	58,6 (2)	2,9	36,4
	2	59,9	58,5 (1)	3,0	35,3
	3	38,2	34,8 (6)	3,4	57,0
	4	27,2	34,8 (5)	3,2	36,4
	5	13,5	34,7 (4)	2,9	34,2
	6	16,7	34,7 (3)	3,7	57,6
Leucin	1	175,3	58,9 (2)	3,9	56,8
	2	54,0	58,8 (1)	3,9	56,5
	3	41,4		4,1	
	4	26,4	34,9 (5)	3,9	54,1
	5	24,2	34,9 (4)	3,8	53,4
	6	23,5		4,1	
Lysin	1	178,0	53,6 (2, 2/3)	4,0	40,8
	2	57,8	53,6 (1)	4,0	16,3
			34,5 (3)		15,8
			53,6 / 34,4 (1/3)		24,9
	3	33,25	34,4 (2, 4, 1/2)	3,7	50,3
	4	24,9	34,4 (n.d.)	n.d.	35,3
5	29,8	35,5 (4, 6)	3,7	50,1	
6	42,4	35,6 (5)	4,3	41,0	
Phenylalanin	1	185,2	53,3 (2)	3,7	45,5
	2	57,8	54,2 (1)	3,7	2,3
			33,8 (3)		17,8
			54,4 / 33,7 (1/3)		40,4
	3	40,3	33,8 (2)	3,8	59,4
	4	138,0	n.d.	n.d.	n.d.
	5/8	131,0	n.d.	n.d.	n.d.
6/9	131,7	n.d.	n.d.	n.d.	
7	129,3	n.d.	n.d.	n.d.	

Primärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

Fortsetzung von Tabelle 13

	Position	chem.	Kopplungskonstante	Häufigkeit	Kopplung
		Verschiebung δ [ppm]			
Prolin	1	174,5	56,4 (2, 2/3)	4,0	36,6
	2	62,3	58,9 (1)	4,0	27,0
			30,5 (3)		14,6
			59,9 / 32,0 (1/3)		12,3
	3	30,6	32,0 (2, 1/2)	3,8	27,8
4	25,8	33,3 (5)	3,3	56,9	
	5	48,7	33,2 (4)	3,4	56,5
Serin	1	174,2	60,0 (2, 2/3)	3,4	40,0
	2	58,3	59,3 (1)	3,4	23,8
			36,6 (3)		7,6
			59,1 / 36,7 (1/3)		17,3
3	62,9	36,0 (2, 1/2)	3,5	27,3	
Threonin	1	173,6	60,7 (2, 2/3)	3,6	35,0
	2	61,9	59,4 (1)	3,6	29,4
			36,4 (3)		13,9
			n.d. / 37,7 (1/3)		7,2
	3	68,8	37,0 (2, 1/2)	n.d.	43,0
4	23,1		3,5	n.d.	
Tyrosin	1	185,3	53,3 (2, 2/3)	4,1	44,4
	2	59,8	53,2 (1)	4,1	2,1
			36,2 (3)		20,9
			52,9 / 33,6 (1/3)		38,1
			33,1 (2, 1/2)		60,4
	4	126,1	56,6 (5)	3,8	59,8
	5/9	133,0	56,3 (4)	3,8	59,2
	6/8	121,0	56,2	3,4	13,5
56,1			18,9		
7	167,0	60,9	3,6	39,6	
Valin	1	173,9	58,7 (2)	3,5	47,3
	2	60,8	59,3 (1)	3,6	47,7
	3	31,3	34,5 (4)	3,8	56,3
	4	20,0	34,4 (3)	3,9	54,6
	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Die Aminosäure Aspartat leitet sich direkt von Oxalacetat ab (Bryan, 1990). Die Biosynthesen von Threonin, Isoleucin und Lysin erfolgen, gemäß der Literatur (S.72), über Aspartat. Die Anreicherungen und Kopplungen von Threonin stimmen gut mit den Messergebnissen von Aspartat überein. Die Häufigkeit im Isoleucin fällt mit 3 % niedriger aus, als die 4 % bei

Aspartat und Threonin. Das Verhältnis der Kopplungsblöcke von Aspartat und Isoleucin ist, unter Beachtung des Bindungsbruchs zwischen C-2 und C-3, vergleichbar. Somit scheint eine stärkere Verdünnung der Markierung auf dem Biosyntheseweg zum Isoleucin wahrscheinlich.

Der anerkannte Biosyntheseweg von Lysin bei Pflanzen ist der Diaminopimelat-Weg (Richter, 1988; Bryan, 1990; Coruzzi, 1991; Kindl, 1994). Die Biosynthese geht von Pyruvat und Aspartat aus, somit müsste die Isotopologenverteilung im Lysin zwischen den Positionen C-1 bis C-4 Aspartat entsprechen. Das Verhältnis der $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$, $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe im Lysin unterscheidet sich mit $1,7 : 1,2 : 1,0$ von Aspartat mit einem Verhältnis von $1,0 : 3,0 : 1,0$. Das Verhältnis der $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe im Lysin ist mit keiner $[^{13}\text{C}_3]$ Isotopolog enthaltenen Verbindung des zentralen Stoffwechselfpools vergleichbar. Die Höhe des $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ Isotopologs ist am ehesten mit dem 3-Phosphoenolpyruvat vergleichbar. Mit den vorliegenden Messergebnissen scheint eine Biosynthese von Lysin über den Diaminopimelat-Weg unwahrscheinlich.

Als weiterer Biosyntheseweg von Lysin wird der Aminoadiapat-Weg diskutiert (Richter, 1988; Kindl, 1994), der noch nicht in höheren Pflanzen bewiesen werden konnte. Beim Aminoadiapat-Weg reagiert α -Ketoglutarat unter Decarboxylierung mit einem Acetyl-CoA. Wenn *Catharanthus roseus* diesem Biosyntheseweg folgt, müsste das Markierungsmuster der Positionen C-1 bis C-4 im Lysin den Positionen C-5 bis C-2 von α -Ketoglutarat entsprechen. Das zu erwartende Markierungsmuster mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ und $[5,6-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologen stimmt nicht mit den experimentellen Ergebnissen überein. Die Messergebnisse von Lysin in der vorliegenden Pflanzenprobe weisen $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$, $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe auf. Womit eine Übereinstimmung mit dem Aminoadiapat-Weg ausgeschlossen werden kann. Die Mengenverteilung der Isotopologe schließt ein Überlappen der beiden hier genannten Biosynthesewege von Lysin aus.

Die Tatsache, dass die Biosynthese des Lysins im vorliegenden Einbauversuch nicht einem der beiden beschriebenen Biosynthesewege der Literatur zugeordnet werden kann, könnte eine Besonderheit der Pflanze *Chloroflexus aurantiacus* bzw. der Anzucht in einer Zellkultur sein.

Möglicherweise kann die Synthese des Lysins keinem bekannten Biosyntheseweg zugeordnet werden, da sich die Markierung aus mehreren Synthesen zusammensetzt. Auffallend ist das Verhältnis der $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$, $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe im Lysin ($1,7 : 1,2 : 1,0$), das sich deutlich vom Aspartat ($1,0 : 3,0 : 1,0$) unterscheidet. Mögliche weitere Quellen für das

Primärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

[¹³C₃]Isotopolog sind Aspartat, Glutamat, 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Unter der Annahme ein Teil der Markierung im Lysin stammt aus dem Diaminopimelat-Weg, wie es gemäß der Literatur zu erwarten wäre, ist es möglich ein zentrales Stoffwechselmetabolit der restlichen Markierung zuzuordnen.

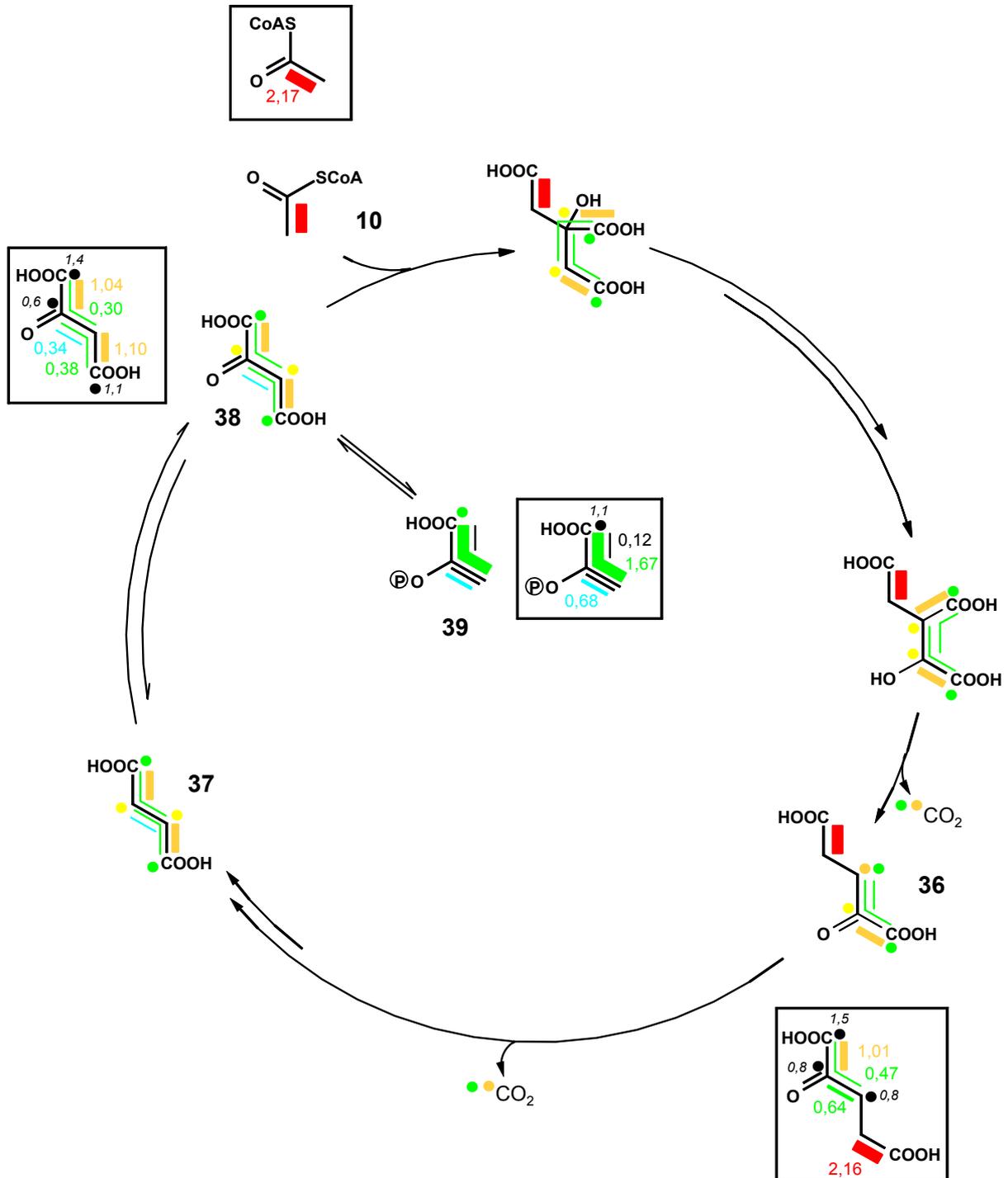


Abbildung 26. Metabolitenfluss im Citrat-Zyklus bei dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose (rot- erster Zyklus, orange - zweiter Zyklus, gelb - dritter Zyklus, grün/blau - 3-Phosphoenolpyruvat über anaplerotischen Weg).

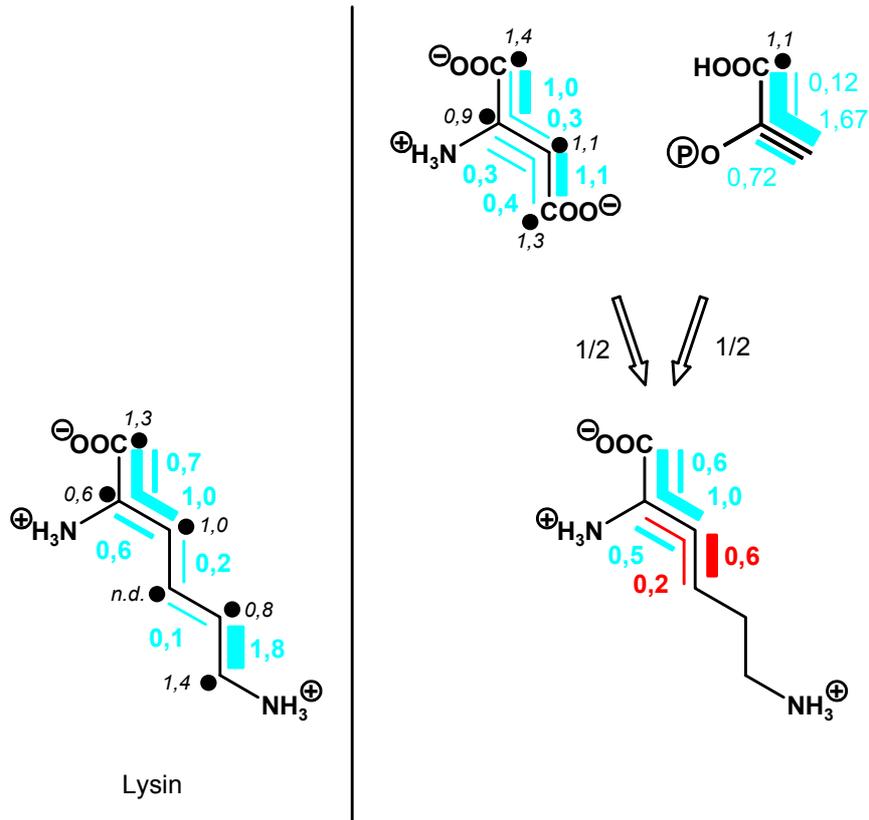


Abbildung 27. Hypothetische Bildung von Lysin aus je der Hälfte der Markierungen von Aspartat und 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Phenylalanin, Tyrosin, Isoleucin, Leucin, Alanin und Valin, Tabelle 14) aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose.

Wenn das Markierungsmuster im Lysin sich je zur Hälfte aus Aspartat (Diaminopimelat-Weg) und 3-Phosphoenolpyruvat zusammensetzt entsteht ein Verhältnis der $[1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3]$, $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ und $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe von 2,0 : 1,2 : 1,0 (Abbildung 27). Es bilden sich jedoch parallel $[2,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ und $[2,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe aus dem Aspartat (rot). Vorallem das $[2,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Isotopolog ist im rekonstruierten Lysin deutlich höher, als in den experimentell bestimmten Lysin (Abbildung 27).

Acetyl-CoA ist retrobiosynthetisch aus Glutamat, Prolin, Arginin und Leucin erhältlich. Die Daten aus den vier Aminosäuren passen gut zueinander. Die Anreicherungen und die Konzentration des $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologs im Acetyl-CoA entspricht, gemäß der Verknüpfung der Glykolyse, dem Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat

3-Phosphoenolpyruvat wurde retrobiosynthetisch aus Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Valin, Isoleucin und Leucin bestimmt. Die Daten der Aminosäuren stimmen gut überein. Das aus

Histidin rekonstruierte Glycerinaldehyd-3-phosphat ist etwas höher markiert als 3-Phosphoenolpyruvat.

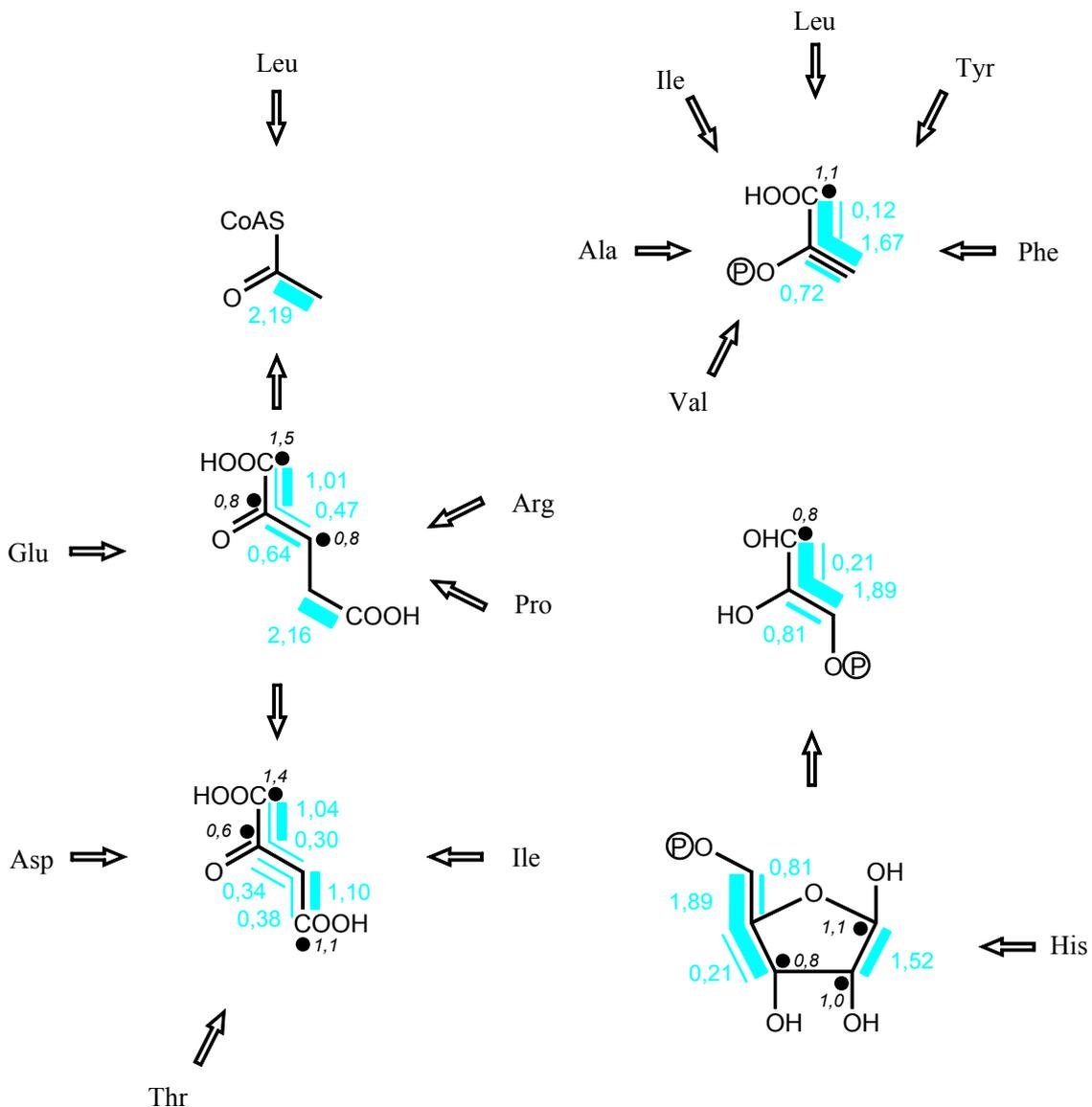


Abbildung 28. Kopplungsmuster der Zentralmetabolite Acetyl-CoA, 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat, Ribose-5-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Primärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

Tabelle 14. Aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Zentralmetabolite aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

	Position	koppelt mit	Häufigkeit			Kopplung		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^6	{}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	{}
Acetyl-CoA	1	(2)	3,9	0,3	{4}	56,1	0,7	{4}
	2	(1)	3,8	0,3	{4}	57,6	1,3	{4}
3-Phosphoenolpyruvat	1	(2, 2/3)	4,0	0,4	{4}	45,8	1,0	{4}
	2	(1)	3,9	0,2	{7}	2,2	0,1	{2}
		(3)				18,6	1,6	{3}
		(1/3)				40,7	2,3	{3}
3	(2, 1/2)	4,0	0,2	{7}	57,7	2,5	{6}	
Oxalacetat	1	(2, 2/3)	3,8	0,2	{2}	35,1	1,0	{3}
	2	(1)	3,8	0,2	{2}	28,1	1,3	{2}
		(3, 3/4)				13,6	0,4	{2}
		(1/3)				7,9	0,7	{2}
	3	(2, 4)	3,5	0,9	{2}	46,1	3,1	{2}
4	(3, 2/3)	3,7	0,2	{2}	35,6	1,4	{2}	
α - Ketoglutarat	1	(2, 2/3)	4,1	0,1	{3}	35,1	1,3	{3}
	2	(1)	4,0	0,1	{3}	27,1	0,2	{3}
		(3)				15,5	0,7	{3}
		(1/3)				12,3	0,2	{2}
	3	(2, 1/2)	4,0	0,2	{3}	28,4	4,2	{3}
	4	(5)	3,8	0,4	{3}	58,0	1,3	{3}
5	(4)	3,8	0,4	{3}	55,9	0,6	{3}	
Ribose-5-phosphat	1	(2)	3,7		{1}	41,4		{1}
	2	(1)	3,6		{1}	41,2		{1}
	3	(4, 4/5)	4,0		{1}	43,9		{1}
	4	(3)	4,5		{1}	4,7		{1}
		(5)				18,9		{1}
		(3/5)				42,1		{1}
5	(4, 3/4)	4,4		{1}	61,0		{1}	
Erythrose-4-phosphat	1/3		3,4		{1}	32,4		{1}
	2		3,6		{1}	39,6		{1}
	4		n.d.			n.d.		

⁶ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

3.3.4 Einbauexperimente in *Nicotiana tabacum* (Wildtyp und Mutanten)

Der Eintrag von isotopmarkierten Verbindungen in Zellkompartimente einer ganzen, lebenden Pflanze sollte prinzipiell über die Wurzeln möglich sein. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Fütterungskonzept an ganzen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* var. *havanna piperita* mit einer Mischung aus markierter D-Glucose und unmarkierter Saccharose getestet. Die Zucker wurden dem festen Agar, in dem die Pflanzen steril wuchsen, zugesetzt. Nach einer Wachstumsperiode von 3 - 4 Wochen wurden die Pflanzen geerntet und einzelne Inhaltsstoffe isoliert (Abbildung 11).

Es wurde der Wildtyp in getrennten Anzuchten mit [U-¹³C₆]D-Glucose und mit [1-¹³C₁]D-Glucose markiert. Daneben wurden drei Mutanten von *Nicotiana tabacum* (RPO, NDH 53-25, NDH 54-3IV) mit [U-¹³C₆]D-Glucose gefüttert.

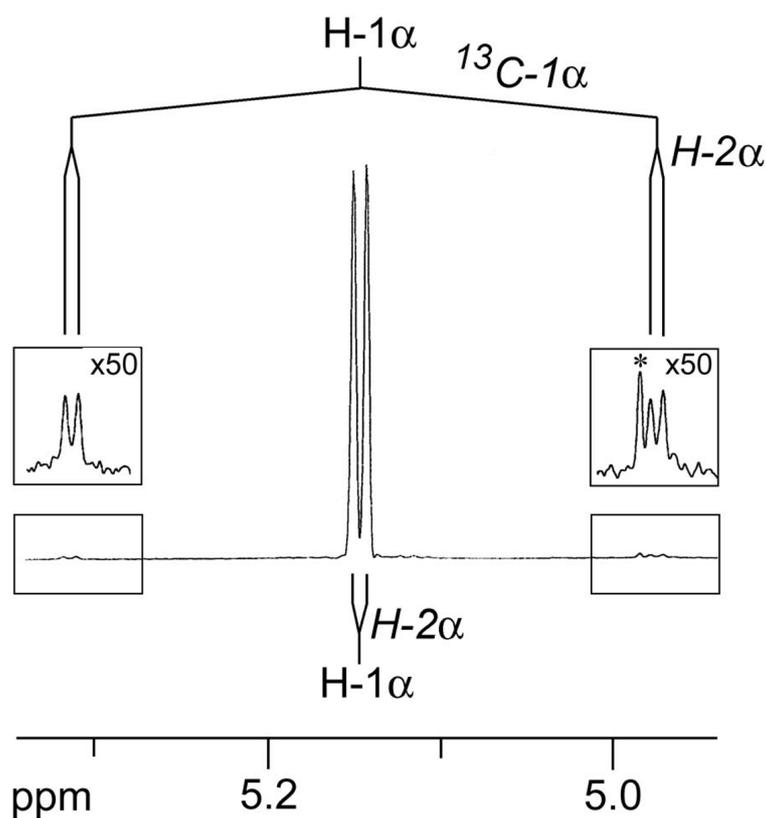


Abbildung 29. ¹H-NMR Signal vom H-1α von D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

3.3.4.1 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum*

In der vorliegenden Arbeit wurden die primären Metabolite (Glucose und Aminosäuren) von *Nicotiana tabacum* untersucht. Die Pflanzen wuchsen auf Medien mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

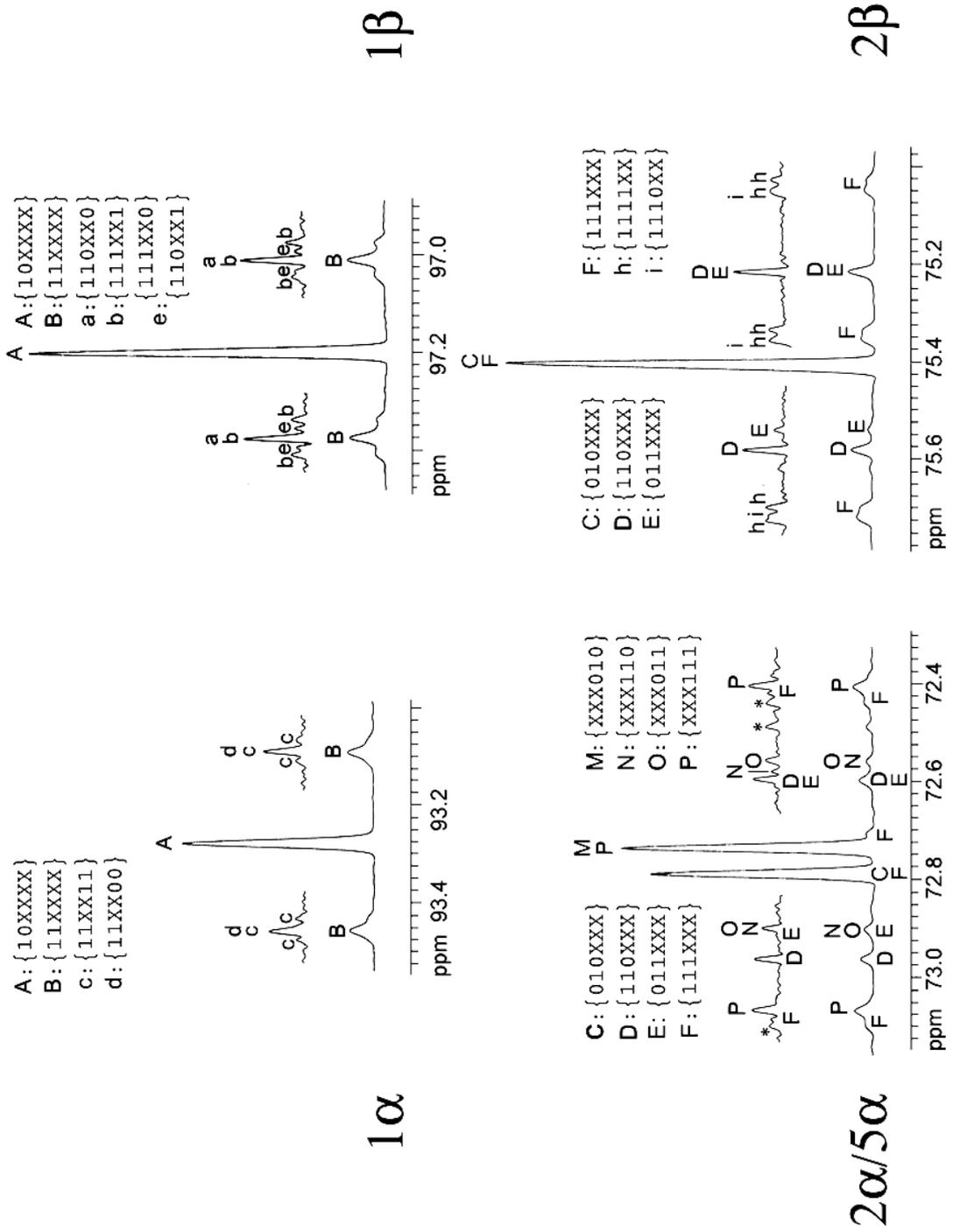
3.3.4.1.1 Glucose

Aus den ganzen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* (ohne Wurzeln; 15 g, Frischgewicht) wurde D-Glucose isoliert, gereinigt und NMR spektroskopisch vermessen. Der Querschnitt der Isotopologe von α - und β -Glucose ist in Tabelle 18 zusammengefasst.

Die Häufigkeit der [¹³C₁]Isotopologe wurde über das Signal von H-1 α (5,26 ppm) im ¹H-NMR Spektrum über die Gleichung A (S.46) berechnet (Abbildung 29). Der bestimmte Wert von 2,4 % wurde als Referenz für die Häufigkeit der [¹³C₁]Isotopologe auf die anderen C-Atome in der D-Glucose übertragen. Anschließend wurden die Signale der D-Glucose im ¹³C-Spektrum getrennt voneinander integriert. Der prozentuale Anteil der einzelnen Satellitenpaare zum Gesamtintegral der Signale wurden für jedes C-Atom berechnet (Gleichung D, S.47). Über die prozentualen Anteile der Satelliten und des Hauptsignals wurden die Konzentrationen (mol%), im Bezug auf die Häufigkeit (2,4 %) bestimmt (Gleichung E, S.50).

Die Zuordnung der Signale von α - und β -Glucose ist in Tabelle 15 wiedergegeben. Die Konzentration der Isotopologgruppen (X-Gruppen) von α -/ β - Glucose sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 zusammengefasst. Die ¹³C-Signale und die Zuordnung der einzelnen Satelliten sind in Abbildung 30 mit Hilfe der X-Gruppen (S.50) dargestellt. Die überlappenden Informationen aus α - und β -Glucose führen zu einer hohen Datensicherheit (Tabelle 18).

Da jedes C-Atom in einem D-Glucose Molekül sowohl als ¹²C, wie als ¹³C vorliegen kann, sind rein mathematisch $2^6 = 64$ Isotopologe möglich. Die natürlich vorkommende D-Glucose liegt zu 93 % als [U-¹²C₆]D-Glucose vor. Die restlichen 7 % der D-Glucose enthalten je ein ¹³C-Atom in einer der sechs möglichen Positionen. Moleküle mit mehrfacher ¹³C Markierung sind aus statistischem Grund sehr selten, da die natürliche Anreicherung von ¹³C-Atomen bei 1,1 % liegt.



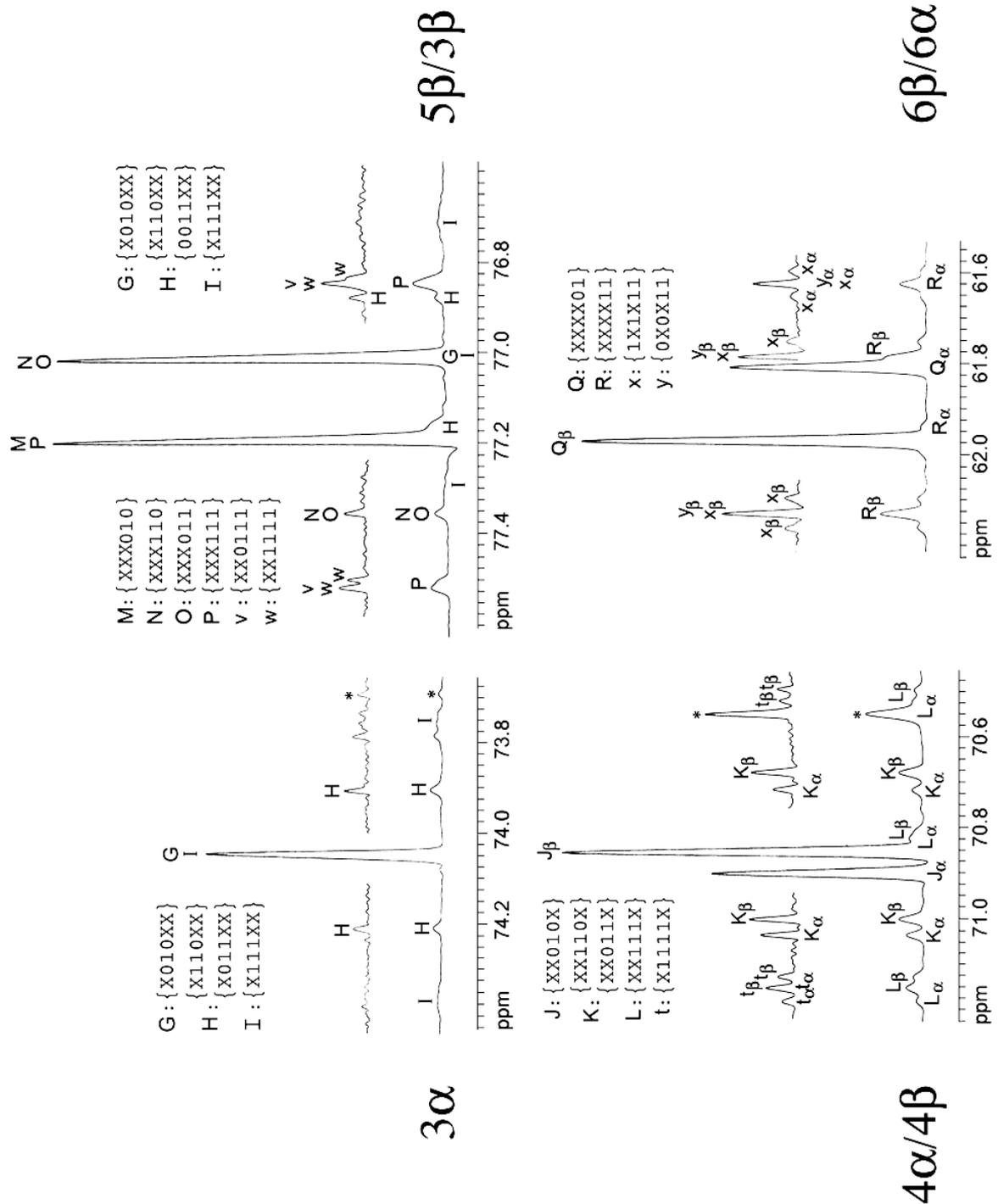


Abbildung 30. ¹³C-NMR Signale von D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Den Signalen sind X-Gruppen aus Tabelle 16 und Tabelle 17 zugeordnet. Die großen Buchstaben stehen für Übergruppen, die kleinen Buchstaben für Untergruppen. Die Buchstabengruppen die zu je einem C-Atom gehören, stehen alle oberhalb bzw. unterhalb der Spektren.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Im Einbauversuch von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, wurden 27 Isotopologe in der D-Glucose bestimmt (Tabelle 18). Die Isotopologe dokumentieren die Biosynthesewege, die von der [U-¹³C₆]D-Glucose ausgehend, durchlaufen wurden. Der Einbau der [U-¹³C₆]D-Glucose bildet eine hoch spezifische Isotopologverteilung. Bestimmt wurden 0,39 mol% [U-¹³C₆]-, 0,24 mol% [1,2-¹³C₂]-, 0,22 mol% [4,5,6-¹³C₃]-, 0,16 mol% [1,2,3-¹³C₃]-, 0,08 mol% [5,6-¹³C₂]-, 0,02 mol% [2,3-¹³C₂]-, sowie 0,01 mol% [3,4,5,6-¹³C₄]-Glucose (Tabelle 18 und Abbildung 31). Daneben liegen [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung von 0,5 - 0,7 % vor. Die Anreicherungen werden beim Vergleich der Isotopologkonzentrationen aus dem Einbauversuch, mit der natürlichen Verteilung deutlich (Abbildung 31).

Tabelle 15. NMR Daten der D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose (Signalzuordnung von α- und β-Glucose: Eisenreich, *et al.*, 2004)

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante ⁷ J _{CC} [Hz]	Isotopenshift [ppb]
1α	93,28	46,3(2α), 3,0(6α), 2,0(5α)	8 (2α)
2α	72,79	45,6(1α), 38,2(3α), 2,7(4α)	11 (1α), 29 (3α), 40 (1α, 3α)
3α	74,05	38,2(2α), 38,7(4α), 3,5(6α), 1,4(5α)	-7 (2α), -3 (2α, 4α)
4α	70,90	40,9(5α), 39,2(3α), 3,0(2α)	22 (5α), 42 (3α, 5α)
5α	72,55	43,4(6α), 40,3(4α), 2,0(1α), 1,7(3α)	6 (6α)
6α	61,85	43,4(5α), 3,5(1α), 3,6(3α)	11 (6α)
1β	97,20	46,1(2β), 4,2(3β), 4,1(6β)	8 (2β)
2β	75,41	45,8(1β), 38,9(3β), 2,3(4β)	12 (1β), 22 (3β), 34 (1β, 3β)
3β	77,10	39,4(4β), 38,9(2β), 2,3(5β), 4,0(6β), 4,2(1β)	- 8 (2β)
4β	70,83	40,5(5β), 38,7(3β), 3,5(2β)	13 (5β), 30 (3β, 5β)
5β	77,19	43,2(6β), 40,8(4β), 2,3(3β)	6 (6β), 5 (4β)
6β	61,97	43,2(5β), 4,1(1β), 4,2(3β)	12 (5β)

⁷ Kopplungspartner in Klammern

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 16. NMR Daten des α -Isomers von D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Signal	X-Gruppen	Anteil am Signal [%]	Konzentration [mol%]
1 α	93,280	A	10XXXX	69,5	1,67
	93,458, 93,094	B	11XXXX	30,5	0,73
	93,473, 93,458, 93,429, 93,109, 93,092, 93,067	c	11XX11	11,8	0,28
	93,458, 93,092	d	11XX00	18,7	0,45
2 α	72,790	C	010XXX	80,3	1,93
	72,966, 72,598	D	110XXX	9,8	0,24
	72,914, 72,610	E	011XXX	1,9	0,05
	73,087, 72,790, 72,725, 72,417	F	111XXX	8,0	0,19
3 α	74,050	G	X010XX	76,4	1,83
	74,210, 73,908	H	X110XX X011XX	8,2	0,20
	74,359, 74,050, 73,755	I	X111XX	15,4	0,37
4 α	70,900	J	XX010X	68,2	1,64
	71,037, 70,717	K	XX110X XX011X	10,3	0,25
	71,165, 70,852, 70,548	L	XX111X	21,5	0,52
	71,183, 71,153, 70,852, 70,561, 70,532	t	X1111X	21,5	0,52
	71,165, 70,852, 70,548	u	X0111X	< 1	< 0,02
5 α	72,737	M	XXX010	71,6	1,72
	72,905, 72,580	N	XXX110	1,0	0,02
	72,905, 72,560	O	XXX011	4,0	0,10
	73,070, 72,747, 72,405	P	XXX111	23,4	0,56
6 α	61,812	Q	XXXX01	71,2	1,71
	61,970, 61,630	R	XXXX11	28,8	0,69
	62,000, 61,974, 61,940, 61,655, 61,630, 61,600	x	1X1X11	16,4	0,39
	61,970, 61,630	y	0X0X11	12,4	0,30

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 17. NMR Daten des β -Isomers von D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Signal	X-Gruppen	Anteil am Signal [%]	Konzentration [mol%]
1 β	97,200	A	10XXXX	69,0	1,67
	97,376, 97,012	B	11XXXX	30,6	0,73
	97,376, 97,012	a	110XX0	10,5	0,25
	97,409, 97,376, 97,337, 97,045, 97,010, 96,975	b	111XX1	16,2	0,39
	97,395, 97,356, 97,031, 96,992	e	111XX0 110XX1	4,7	0,11
2 β	75,410	C	010XXX	67,5	1,62
	75,582, 75,217	D	110XXX	9,1	0,22
	75,540, 75,234	E	011XXX	1,7	0,04
	75,712, 75,41, 75,348, 75,041	F	111XXX	21,5	0,52
	75,723, 75,698, 75,410, 75,389, 75,359, 75,336, 75,051, 75,028	h	1111XX	15,2	0,36
	75,712, 75,410, 75,348, 75,041	i	1110XX	6,6	0,16
3 β	77,090	G	X010XX	65,3	1,57
	77,160, 76,890	H	X110XX X011XX	19,5	0,47
	77,320, 77,090, 76,700	I	X111XX	15,2	0,36
4 β	70,853	J	XX010X	69,0	1,65
	70,002, 70,678	K	XX110X XX011X	12,4	0,30
	71,142, 70,823, 70,502	L	XX111X	18,6	0,45
	71,153, 71,129, 70,823, 70,518, 70,494	t	X1111X	18,6	0,45
	71,143, 70,823, 70,506	u	X0111X	0,01	< 0,01
5 β	77,190	M	XXX010	72,00	1,73
	77,350, 77,023	N	XXX110	3,61	0,09
	77,352, 77,012	O	XXX011	3,61	0,09
	77,517, 77,190, 76,847	P	XXX111	24,39	0,59
	77,519, 77,501, 77,190, 76,847, 76,835	w	XX1111	15,1	0,36
	77,515, 77,190, 76,845	v	XX0111	9,3	0,23
6 β	61,970	Q	XXXX01	70,7	1,70
	62,132, 61,787	R	XXXX11	29,3	0,70
	62,165, 62,132, 62,098, 61,815, 61,789, 61,756	x	1X1X11	14,5	0,35
	62,132, 61,787	y	0X0X11	14,8	0,36

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 18. Querschnitt der Konzentrationen (mol%) der X-Gruppen in α - und β -Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

X-Gruppen	Signale	Konzentration [mol%]		
		α -Glucose	β -Glucose	Durchschnitt
10XXXX	A	1,67	1,67	1,67
11XXXX	B	0,73	0,73	0,73
110XX0	a		0,25	
111XX1	b		0,39	
11XX11	c	0,28		
11XX00	d	0,45		
111XX0	e		0,11	
010XXX	C	n.d.	1,62	
110XXX	D	n.d.	0,22	
011XXX	E	n.d.	0,04	
111XXX	F	n.d.	0,52	
1111XX	h		0,36	
1110XX	i		0,16	
X010XX	G	1,83	n.d.	
X110XX	H	0,20	n.d.	
X011XX	I	0,37	n.d.	
X111XX	I	0,37	n.d.	
XX010X	J	1,64	1,65	1,65
XX110X	K	0,25	0,30	0,28
XX011X	L	0,52	0,45	0,49
XX111X	L	0,52	0,45	0,49
X1111X	t			
XXX010	M	1,72	1,73	1,73
XXX110	N	0,02	0,09	
XXX011	O	0,10	0,09	
XXX111	P	0,56	0,59	0,58
XX1111	v			
XX0111	w			
XXXX01	Q	1,71	1,70	1,71
XXXX11	R	0,69	0,70	0,70
1X1X11	x	0,39		
0X0X11	y	0,30		

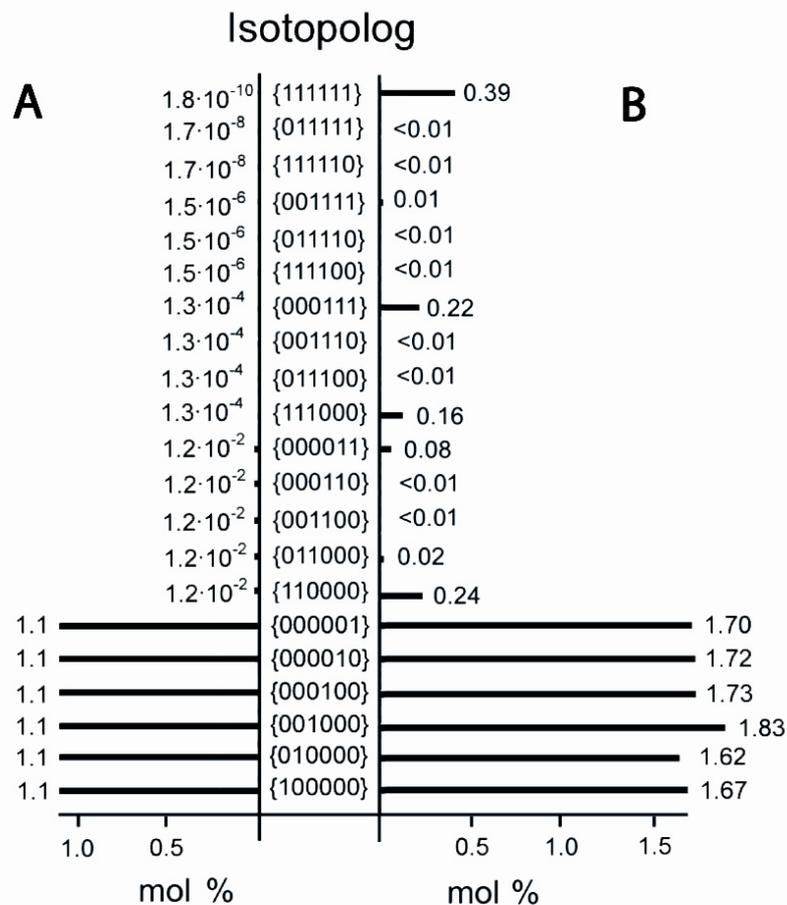


Abbildung 31. Konzentrationsvergleich der Isotopologe der D-Glucose aus *Nicotiana tabacum* (**A**) mit einer natürlichen Anreicherung und (**B**) der D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Die detektierten Isotopologe in der D-Glucose werden durch die Bindungsbrüche der [U-¹³C₆]D-Glucose in den Biosynthesewegen gebildet. Die detektierte Konzentration von 0,39 mol% [U-¹³C₆]D-Glucose entspricht dem konservierten Anteil der eingesetzten Vorstufe im Einbauexperiment. Die [1,2,3-¹³C₃] und [4,5,6-¹³C₃]Isotopologe bilden sich bei der Gluconeogenese aus [1,2,3-¹³C₃]Glycerinaldehyd-3-phosphat und [1,2,3-¹³C₃]Dihydroxyacetonphosphat (Abbildung 33, **B**).

Die [1,2-¹³C₂] und [3,4,5,6-¹³C₄]Isotopologe entstehen über den Pentosephosphatweg aus [U-¹³C₆]Fructose-6-phosphat (Abbildung 33, **A**). Auf Grund der Konzentrationsverteilung der markierten Stoffwechselintermediate ist eine Reaktion mit unmarkierten Verbindungen am wahrscheinlichsten. Wenn zu Beginn des Pentosephosphatwegs ein [U-¹³C₆]Fructose-6-phosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat reagiert, entsteht [U-¹³C₆]Erythrose und

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

[1,2-¹³C₂]Xylulose. Im weiteren Verlauf des Stoffwechselwegs entstehen dann [1,2-¹³C₂]Fructose-6-phosphat und [3,4,5,6-¹³C₄]Fructose-6-phosphat (Abbildung 32).

Das [2,3-¹³C₂]Isotopolog wird aus markiertem Acetyl-CoA gebildet, das über den Citrat-Zyklus, mit anschließender Gluconeogenese, in die D-Glucose zurückgeführt wird (Abbildung 33, C und Abbildung 34).

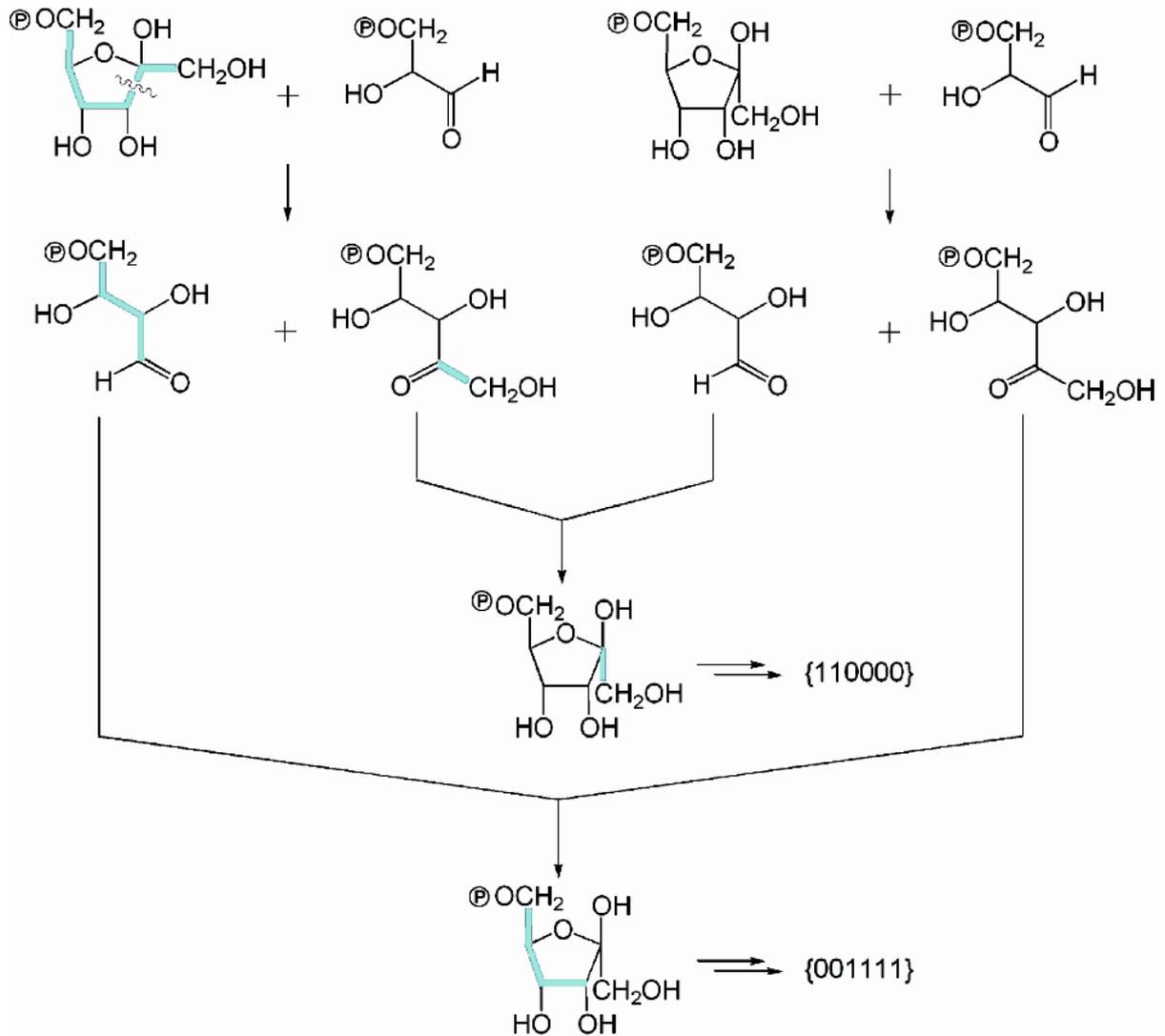


Abbildung 32. Bildung der X-Gruppen {110000} und {001111} aus [U-¹³C₆]Fructose-6-phosphat bei der katalytischen Reaktion der Transketolase im Pentose-phosphatweg. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

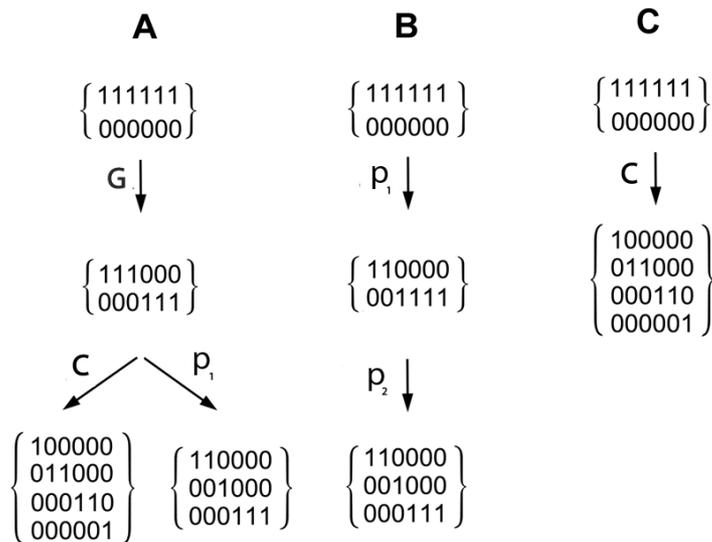


Abbildung 33. Schematische Darstellung der Bildung der Isotopologe in der D-Glucose aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose (G – Glykolyse/Gluconeogenese, P₁ – Transketolase Reaktion im Pentosephosphatweg, P₂ – Transaldolase Reaktion im Pentosephosphatweg und C – Citrat-Zyklus/Gluconeogenese).

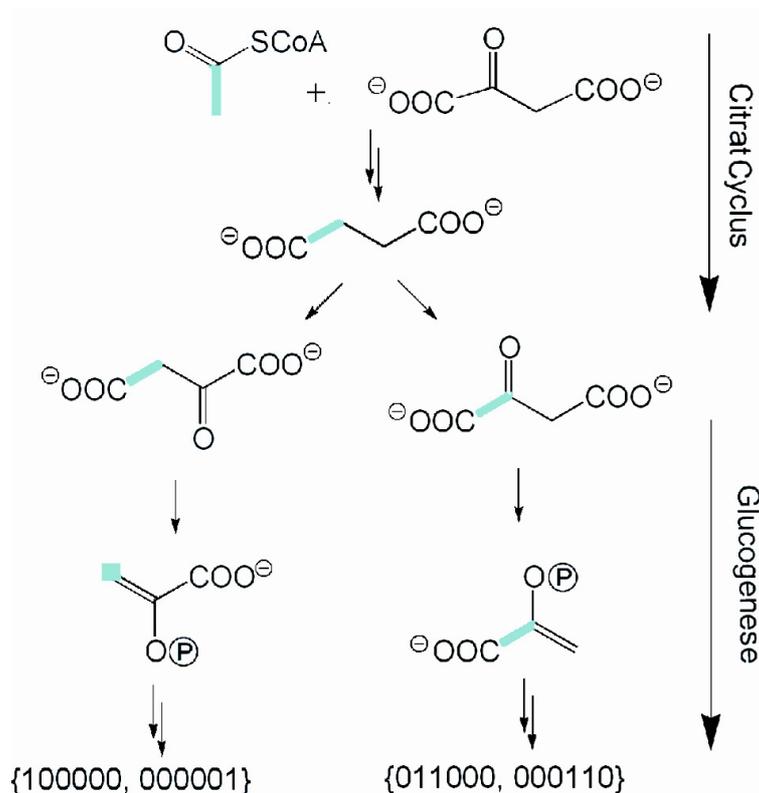


Abbildung 34. Bildung der X-Gruppen {100000}, {000001}, {011000} und {000110} durch Kombination von Citrat-Zyklus und Gluconeogenese. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

3.3.4.1.2 Aminosäuren

Aus den Pflanzen von *Nicotiana tabacum* (ohne Wurzeln; 100 g Frischgewicht) wurden die Aminosäuren isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Die Markierungsmuster der Aminosäuren sind in Tabelle 19 und Abbildung 35 zusammengefasst. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Zentralmetabolite sind in Tabelle 19 und Abbildung 36 zusammengefasst.

Tabelle 19. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) der Aminosäuren aus den Einbauversuchen in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose oder mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungs- konstante ⁸ J _{CC} [Hz]	[1- ¹³ C ₁]D-Glucose		[U- ¹³ C ₆]D-Glucose	
				% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
Alanin	1	174,7		4,6			
	2	51,3		2,9			
	3	17,9		4,2			
Arginin	1	174,4	59,3 (2, 2/3)	4,6		3,2	17,8
	2	55,2	59,4 (1)	5,6		3,2	16,5
			33,8 (3)				7,8
			62,3 / 34,9 (1/3)				2,9
	3	29,7	33,8 (2, 1/2)	6,8		3,6	12,8
	4	26,6	35,9 (5)	6,8		3,6	27,8
5	43,2	35,9 (6)	2,3		3,4	27,1	
6	159,5		4,0		6,0		
Aspartat	1	187,7	n.d. (2)	3,0	n.d.		
	2	61,3	52,4 (1)	5,7	5,0		
			34,9 (3)			6,9	
	3	48,6	35,8 (2)	4,8		5,0	
4	185,6	51,8 (4)			5,2		
		n.d. (3)	3,4	n.d.			
Glutamat	1	188,4	n.d. (2)	3,1	n.d.		
	2	59,4	54,0 (1)	4,5	3,8		
			35,2 (3)			8,5	
	3	37,2	34,4 (2, 4)	6,6		13,1	
	4	39,5	35,0 (3)	7,1		7,1	
51,4 (5)					3,6		
5	188,3	n.d. (4)	2,8		n.d.		
Glycin	1	172,0		4,3			
	2	42,8		2,4			

⁸ Kopplungspartner in Klammern

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Fortsetzung von Tabelle 19

	Position	chem.	Kopplungs- konstante J _{CC} [Hz]	[1- ¹³ C ₁]D-Glucose		[U- ¹³ C ₆]D-Glucose	
		Verschiebung δ [ppm]		% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
Histidin	1	174,1	60,2 (2, 2/3)	4,8		3,5	33,0
	2	55,8	59,3 (1)	1,6		3,4	4,5
			36,6 (3)				0,7
			59,7 / 34,4 (1/3)				27,2
	3	28,9	34,5 (2, 1/2)	3,4		3,5	27,6
	4	130,3	74,0 (5)	1,8		3,5	17,9
5	122,3	74,3 (4)	6,4		3,5	17,0	
	6	138,3		6,1		4,0	
Isoleucin	1	174,1	58,7 (2)	3,2		3,9	15,5
	2	60,0	58,5 (1)	3,5		3,7	15,6
	3	38,5	34,8 (6)	2,9		3,4	18,7
	4	27,6	34,8 (5)	4,1		3,6	18,3
	5	13,8	34,7 (4)	3,2		3,5	19,5
	6	17,0	34,7 (3)	4,4		3,2	19,0
Leucin	1	175,2	59,6 (2)	1,8		3,1	18,2
	2	54,2	59,1 (1)	3,7		3,1	18,0
	3	41,5		2,3		3,7	
	4	26,7	34,8 (5)	1,9		3,5	17,6
	5	24,5	35,0 (4)	3,7		3,3	18,2
	6	23,9		4,1		3,4	
Lysin	1	177,1	59,4 (2, 2/3)	3,1		3,0	14,2
	2	57,8	59,3 (1)	4,5		2,2	11,8
			33,8 (3)				5,4
			58,5 / 34,2 (1/3)				4,5
	3	34,4	34,1 (2, 1/2, 4)	7,0		2,2	19,4
	4	26,7	34,5 (3, 5)	4,9		2,2	17,7
5	31,5	34,2 (4)	6,3		2,1	8,6	
	6	44,4	35,6 (6)				12,1
			35,3 (5)	4,2		2,5	12,1
Phenylalanin	1	174,9	53,3 (2, 2/3)	2,1		3,8	12,8
	2	57,9	n.d. (1, 3, 1/3)	1,9		n.d.	n.d.
	3	39,3	35,4 (2, 1/2)	3,0		n.d.	n.d.
	4	137,6	56,2 (5)	1,8		3,2	19,1
	5/9	133,3	n.d.	2,6		n.d.	n.d.
	6/8	133,1	n.d.	1,8		n.d.	n.d.
	7	131,9	n.d.	1,8		n.d.	n.d.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Fortsetzung von Tabelle 19

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungs- konstante J _{CC} [Hz]	[1- ¹³ C ₁]D-Glucose		[U- ¹³ C ₆]D-Glucose	
				% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
Prolin	1	174,1		n.d.			
	2	62,0		5,2			
	3	30,6		5,5			
	4	26,0		7,7			
	5	49,0		3,3			
Serin	1	173,5	n.d. (2, 2/3)		n.d.	n.d.	
	2	53,7	36,3 (1, 3, 1/3)		n.d.	33,6	
	3	57,3	36,3 (2, 1/2)		n.d.	27,3	
Threonin	1	137,8	n.d. (2)	4,4	n.d.	n.d.	
	2	57,0	59,5 (1)	5,8	n.d.	13,6	
	3	64,3	39,9 (4)	5,6	3,4	15,6	
	4	18,2	38,2 (3)	4,5	3,5	15,2	
Tyrosin	1	185,4	53,3 (2, 2/3)	3,5	4,1	12,8	
	2	60,0	54,1 (1)	2,1	3,6	1,3	
			34,4 (3)			7,0	
			52,6 / 32,7 (1/3)			11,7	
	3	42,3	33,3 (2, 1/2)	4,1	3,3	17,0	
	4	126,2	56,3 (5)	2,3	3,7	16,9	
	5/9	121,0	56,3 (4, 8, 7/8)	3,7	3,3	18,5	
	6/8	133,1	56,0 (9)	2,1	3,2	3,6	
			62,0 (7)			2,5	
67,6 / 53,6 (9/7)				6,4			
7	167,0	61,6 (8, 8/9)	3,0	3,7	10,1		
Valin	1	174,0		n.d.			
	2	60,8		3,2			
	3	31,6		3,0			
	4	20,0		4,7			
	5	19,5		4,7			

Alle bis jetzt in der Literatur beschriebenen Isotopenmarkierungstudien an Pflanzen, die auf die Aminosäurebiosynthese eingehen, wurden an Zellkulturen durchgeführt (Lee, 1996; Werner, 1996; Eichinger, 1997; Bacher *et al.*, 1999; Rieder, 1999). Es ist nicht geklärt inwieweit die Daten aus dem geschlossenen System der ganzen Pflanze auf die in der Literatur angegebenen Biosynthesewege übertragen werden können.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

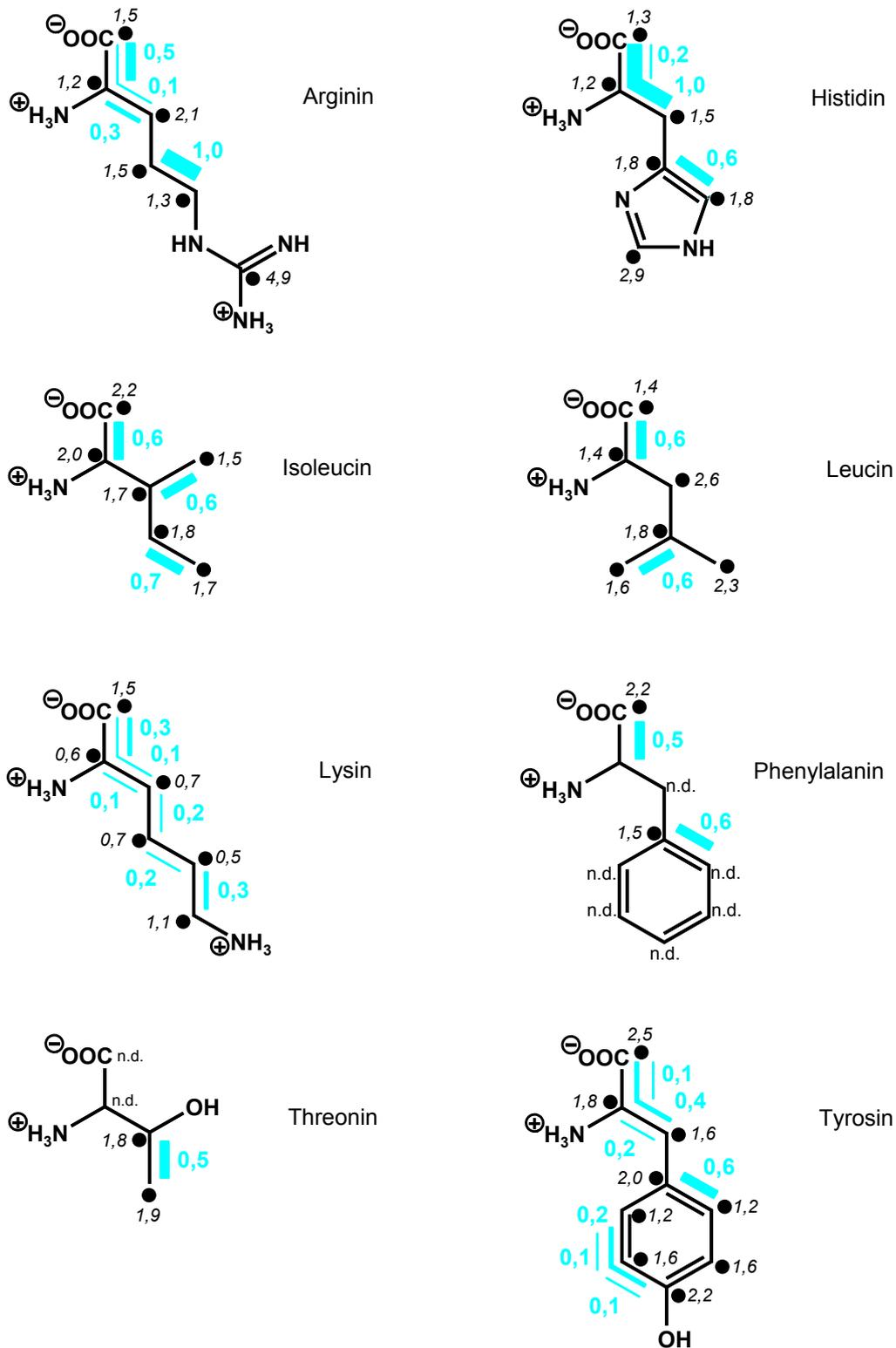


Abbildung 35. Kopplungsmuster der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

α -Ketoglutarat ist ein Produkt des Citrat-Zyklus und wird retrobiosynthetisch aus Arginin bestimmt. α -Ketoglutarat weist [1,2-¹³C₂], [2,3-¹³C₂], [4,5-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe auf. Das [4,5-¹³C₂]Isotopolog stammt von dem neu eingeführten Acetyl-CoA zu Beginn des Citrat-Zyklus. Die restlichen Isotopologe stammen aus dem Oxalacetat. Die [1,2-¹³C₂], [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe von α -Ketoglutarat spiegeln das Verteilungsmuster vom Oxalacetat wieder. Arginin, als retrobiosynthetische Ausgangsverbindung von α -Ketoglutarat, hat ein Verhältnis der [1,2-¹³C₂], [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe von 5,1 : 3,0 : 1,0. Im Vergleich dazu hat Lysin, das in der Literatur als retrobiosynthetische Vorstufe von Oxalacetat angegeben ist, ein Verhältnis von 2,6 : 1,2 : 1,0. Es muss davon ausgegangen werden, dass Lysin in *Nicotiana tabacum* nicht über den in der Literatur beschrieben Diaminopimelat-Weg, d.h. über Pyruvat und Aspartat, synthetisiert wird. Die Synthese von Lysin über den alternativen Aminoadiapat-Weg, d.h. aus Glutamat und Acetyl-CoA muss über das Verhältnis der [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe ausgeschlossen werden. Das Verhältnis unterscheidet sich mit 3,0 : 1,0 in Arginin deutlich von Lysin mit 1,2 : 1,0. Auch wenn beide Synthesewege nebeneinander in der Pflanze vorliegen würden, gäbe es keine Erklärung für die vorhandenen Verhältnisse der [1,2-¹³C₂], [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe. Über den Aminoadiapat-Weg würde eine höhere Menge an [1,2-¹³C₂]Isotopolog eingebaut werden und zu einer Verschiebung im Verhältnis führen. Der Anteil an [1,2-¹³C₂]Isotopolog ist deutlich niedriger, im Verhältnis zum [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog, als dass die Anwesenheit beider Biosynthesewege zu erwarten ist.

Bei Einbauversuchen mit [U-¹³C₆]D-Glucose an Lebermoosen (*Fossombronina alaskana*) wurde die Biosynthese des Lysins über den Diaminopimelat-Weg bestimmt (Rieder, 1999). Die Tatsache, dass die Markierungsmuster des Lysins in der vorliegenden Pflanze nicht einem der beiden beschriebenen Biosynthesewege der Literatur bzw. einem Gemisch aus beiden zugeordnet werden können, kann eine Besonderheit von *Nicotiana tabacum* sein. Innerhalb ganzer Pflanzen ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass mehrere Biosynthesewege nebeneinander stattfinden. Mit den vorliegenden Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben einer unbekanntem Biosynthese des Lysins eine der beiden bzw. beide oben erwähnten Synthesewege stattfinden.

3-Phosphoenolpyruvat wurde retrobiosynthetisch aus den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Leucin und Isoleucin bestimmt. Die Daten der Aminosäuren stimmen gut überein.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Acetyl-CoA ist retrobiosynthetisch aus Glutamat, Prolin, Arginin und Leucin erhältlich. Die vorhandenen Daten von Arginin und Leucin sind nicht vergleichbar. Das Isotopolog in Leucin ist mit 18,1 % deutlich niedriger als im Arginin (27,5 %). Es besteht die Möglichkeit, dass in *Nicotiana tabacum* unterschiedliche Acetyl-CoA Pools existieren. Das [2,3-¹³C₂]Isotopolog von 3-Phosphoenolpyruvat, eine Vorstufe von Acetyl-CoA im Stoffwechsel, passt zum Acetyl-CoA aus Leucin (Acetyl-CoA (Pool I), Tabelle 19). Der Schwerpunkt der Biosynthese von 3-Phosphoenolpyruvat und Acetyl-CoA (Pool I, rekonstruiert aus Leucin) bzw. der verknüpften Aminosäuren liegt in den Plastiden.

Das aus Histidin retrobiosynthetisch bestimmte Glycerinaldehyd-3-phosphat besitzt ein anderes Isotopologen Verhältnis, wie das biosynthetisch verwandte 3-Phosphoenolpyruvat (Abbildung 36). Das Verhältnis der [1,2-¹³C₂], [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe von Glycerinaldehyd-3-phosphat unterscheidet sich mit 1,0 : 8,0 : 48,0 von 3-Phosphoenolpyruvat mit 1,0 : 4,0 : 6,8. Glycerinaldehyd-3-phosphat hat eine deutlich höhere Menge an [1,2,3-¹³C₃]Isotopologen. Die Daten von Glycerinaldehyd-3-phosphat, eine Vorstufe von Acetyl-CoA im Stoffwechsel, passt zu den Werten von Acetyl-CoA aus Arginin (Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Arginin), Tabelle 19). Der Schwerpunkt der Biosynthese von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Arginin) bzw. der verknüpften Aminosäuren liegt im Cytosol.

Wie bereits ausgeführt, spiegeln sich die Biosynthesewege in der markierten D-Glucose wieder (S.101). Ein Vergleich der zentralen Stoffwechselmetabolite, retrobiosynthetisch aus den Aminosäuren gewonnen, mit der D-Glucose zeigt Gemeinsamkeiten in den Markierungsmustern auf.

3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat sind die zentralen Stoffwechselintermediate aus denen die [1,2,3-¹³C₃] und [4,5,6-¹³C₃]Isotopologe in der D-Glucose gebildet werden. Neben den [¹³C₃]Isotopologen führen 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat [1,2-¹³C₂] und [5,6-¹³C₂]Isotopologe in die D-Glucose ein. Vorallem das Verhältnis der [1,2-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe mit 1,0 : 1,5 in der D-Glucose deutet auf eine weitere Quelle des [1,2-¹³C₂]Isotopologs. Die Verhältnisse der [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe in 3-Phosphoenolpyruvat liegt bei 1,7 : 1,0 und im Glycerinaldehyd-3-phosphat bei 6,0 : 1,0. Wie bereits bei der D-Glucose ausgeführt, wird für das [1,2-¹³C₂]Isotopolog in der D-Glucose ein Eintrag über [U-¹³C₆]Fructose-6-phosphat über den Pentosephosphatweg diskutiert.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 20. Aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) der Zentralmetabolite aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

	Position	koppelt mit	Häufigkeit		Kopplung		
			% ¹³ C _{abs}	Δs ⁹	% ¹³ C ¹³ C	Δs	
Acetyl-CoA (Pool I) (rekonstruiert aus Leucin)	1	(2)	3,1		{1}	18,2	{1}
	2	(1)	3,1		{1}	18,0	{1}
Acetyl-CoA (Pool II) (rekonstruiert aus Arginin)	1	(2)	3,4		{1}	27,1	{1}
	2	(1)	3,6		{1}	27,8	{1}
3-Phosphoenolpyruvat	1	(2, 2/3)	4,0	0,2	{2}	12,8	0,0 {2}
	2	(1)	3,5	0,2	{6}	1,3	{1}
		(3)				7,0	{1}
		(1/3)				11,7	{1}
	3	(2, 1/2)	3,3	0,1	{5}	18,4	0,8 {5}
Oxalacetat	1	(2, 2/3)	3,9		{1}	15,5	{1}
	2		3,7		{1}	n.d.	{2}
	3	(2, 4, 1/2)	3,5	0,1	{2}	17,0	1,4 {2}
	4	(3)	3,5	0,0	{2}	17,4	2,2 {2}
α - Ketoglutarat	1	(2, 2/3)	3,2		{1}	17,8	{1}
	2	(1)	3,2		{1}	16,5	{1}
		(3)				7,8	{1}
		(1/3)				2,9	{1}
	3	(2, 4, 1/2)	3,6		{1}	12,8	{1}
	4	(4)	3,6		{1}	27,8	{1}
5	(5)	3,4		{1}	27,1	{1}	
Ribose-5-phosphat	1	(2)	3,5		{1}	17,0	{1}
	2	(1)	3,5		{1}	17,9	{1}
	3	(4, 4/5)	3,5		{1}	27,6	{1}
	4	(3)	3,4		{1}	0,7	{1}
		(5)				4,5	{1}
		(3/5)				27,2	{1}
5	(4, 3/4)	3,5		{1}	33,0	{1}	
Erythrose-4-phosphat	1	n.d.	3,2		{1}	n.d.	
	2	(3, 3/4)	3,7		{1}	10,1	{1}
	3	(2)	3,2		{1}	2,5	{1}
		(4)				3,6	{1}
		(2/4)				6,4	{1}
4	(3, 2/3)	3,3		{1}	n.d.	{1}	

⁹ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Der Vergleich der zentralen Stoffwechselmetabolite mit der D-Glucose kann die Herkunft des noch offen gebliebenen [5,6-¹³C₂]Isotopologs erklären. Das Verhältnis der [5,6-¹³C₂] und [4,5,6-¹³C₃]Isotopologe in der D-Glucose mit 2,8 : 1,0 legt die Vermutung nahe, dass sich die Markierung aus einem gemischten Einbau von 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat über die Gluconeogene ergibt.

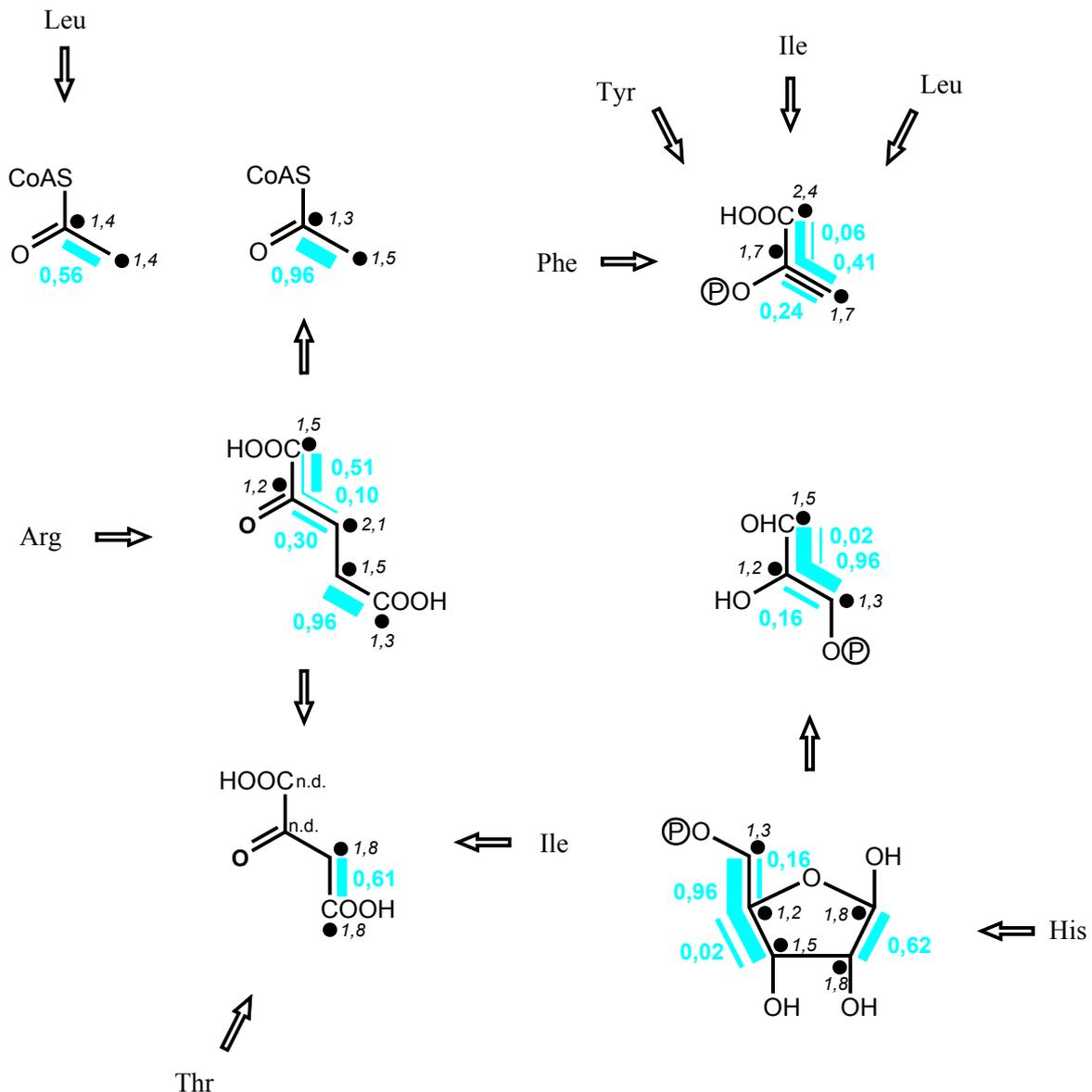


Abbildung 36. Kopplungsmuster der Zentralmetabolite Acetyl-CoA, 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat, Ribose-5-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

3.3.4.2 Einbauexperiment mit [1-¹³C₁]D-Glucose in *Nicotiana tabacum*

In der vorliegenden Arbeit wurden die primären Metabolite (Aminosäuren) von *Nicotiana tabacum* untersucht. Die Pflanzen wuchsen auf einem Medium mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose.

Aus den ganzen Pflanzen (ohne Wurzeln; 70 g, Frischgewicht) wurden die Aminosäuren isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Die Markierungsmuster der Aminosäuren sind in Tabelle 19 und Abbildung 37 zusammengefasst. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Zentralmetabolite sind in Tabelle 21 und Abbildung 39 zusammengefasst.

Glutamat und Aspartat weisen [¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 0,3 mol% auf. Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe von 3 - 5 %, sowie die Verteilung der [¹³C₂]Isotopologe deuten auf statistische Kopplungen. Die unterschiedlich guten Auflösungen der Signale in den Spektren erklärt, warum in den biosynthetisch verwandten Aminosäuren von Glutamat und Aspartat keine statistischen Kopplungen sichtbar sind.

α -Ketoglutarat (**36**) wird retrobiosynthetisch aus Glutamat, Arginin und Prolin bestimmt. In den Positionen C-4 und C-5 spiegelt sich das über den Citrat-Zyklus eingebaute Acetyl-CoA (**10**, rot) wieder (Abbildung 38). Auffällig ist die Anreicherung des [¹³C₁]Isotopologs in Position C-4 (rot) von α -Ketoglutarat. Im Verlauf des Citrat-Zyklus wird das [¹³C₁]Isotopolog, über das symmetrische Succinat (**37**), auf die Positionen C-2 und C-3 (orange) übertragen. Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe spiegeln sich in den Positionen C-2 und C-3 von Oxalacetat (**38**, rekonstruiert aus Aspartat, Threonin und Isoleucin) wieder.

In der vorliegenden Anzucht können zwei Acetyl-CoA Pools unterschieden werden. Das aus Glutamat, Arginin und Prolin retrobiosynthetisch bestimmte Acetyl-CoA (Pool II) hat Verbindung zum Cytosol. Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe spiegeln sich im Glycerinaldehyd-3-phosphat aus Histidin wieder.

Der zweite Acetyl-CoA Pool kann retrobiosynthetisch aus Leucin bestimmt werden. Das mit dem Stoffwechsel in den Plastiden verknüpfte Acetyl-CoA (Pool I) hat vergleichbare Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe wie 3-Phosphoenolpyruvat.

Die Anreicherung im Lysin ist mit keiner der beiden, in der Literatur beschrieben, Biosynthesen zu vereinbaren. Die Positionen C-2 und C-3 im Lysin müssten bei beiden

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Biosynthesen vergleichbar hohe Anreicherungen in den [¹³C₁]Isotopologen aufweisen. Das [3-¹³C₁]Isotopolog ist deutlich höher als das [2-¹³C₁]Isotopolog.

Der Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* bestätigt die Ergebnisse der Aminosäuren vom Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose. Es wurden in beiden Anzuchten zwei Acetyl-CoA Pools identifiziert. Lysin konnte keinem, in der Literatur erwähnten, Biosyntheseweg zugeordnet werden.

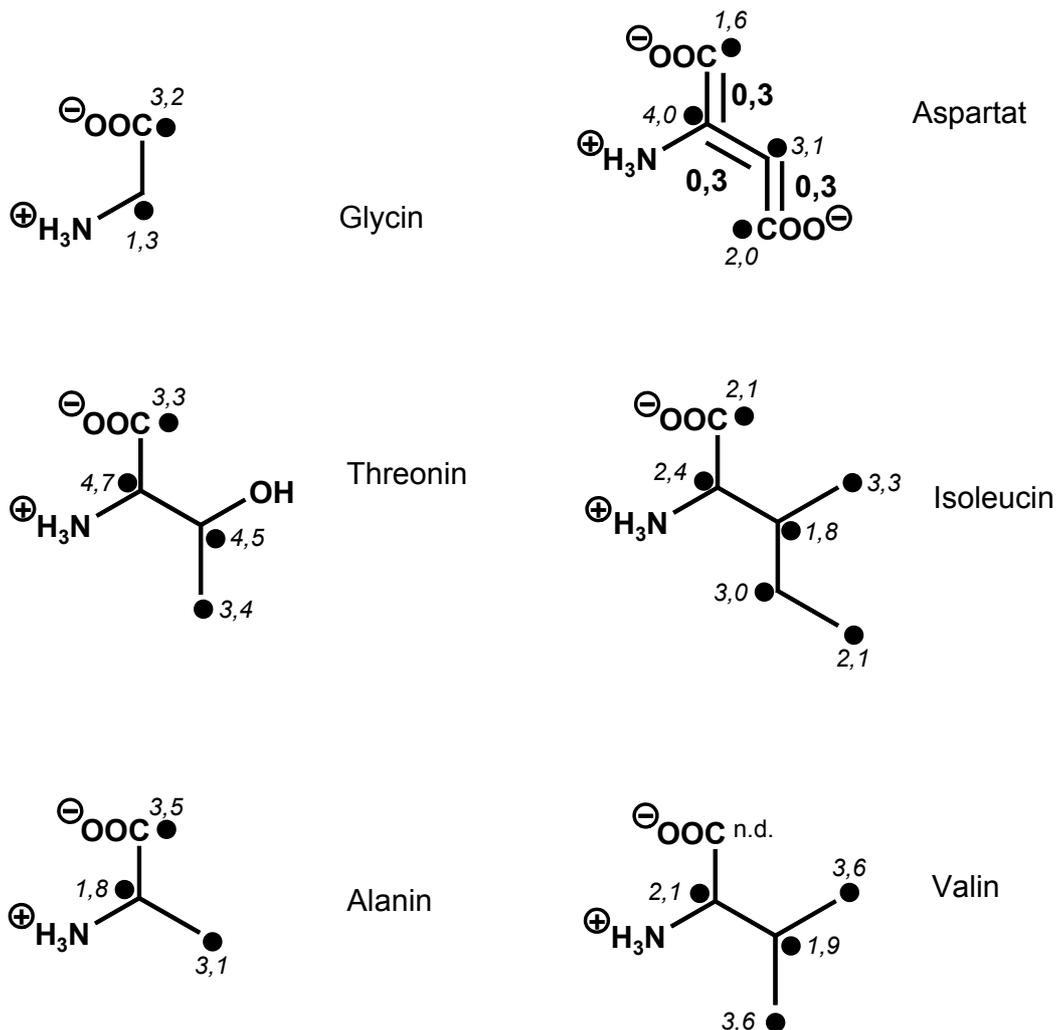
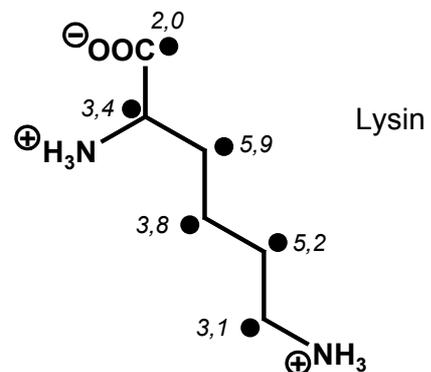
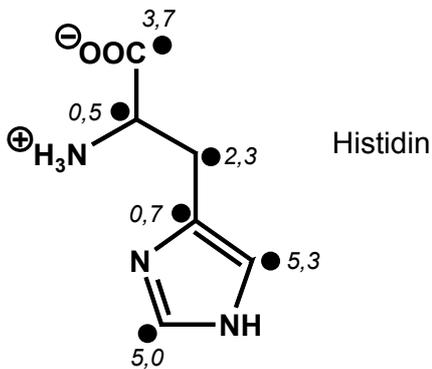
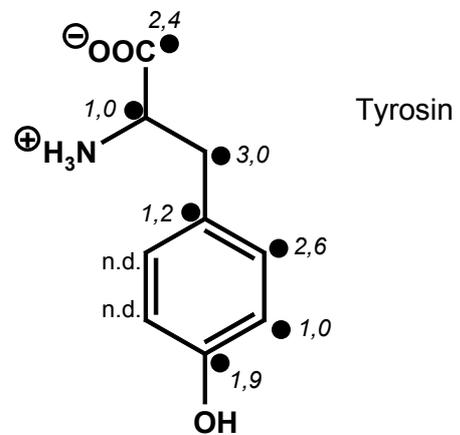
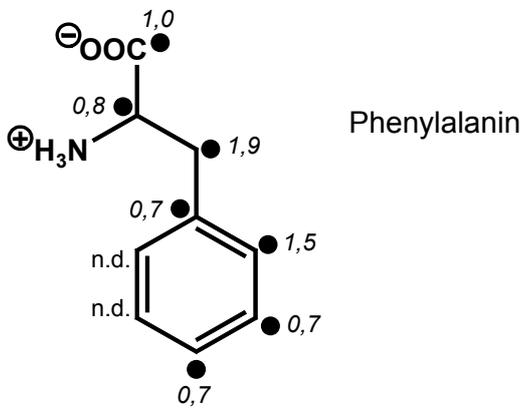
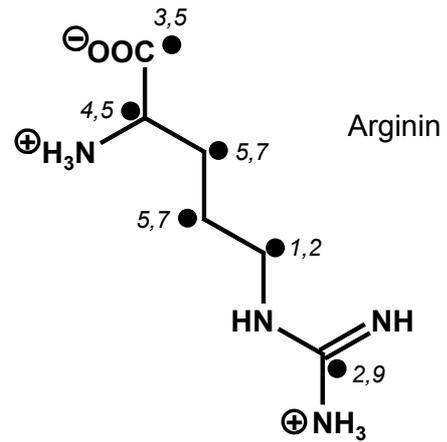
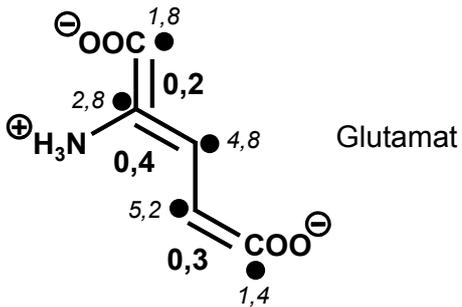
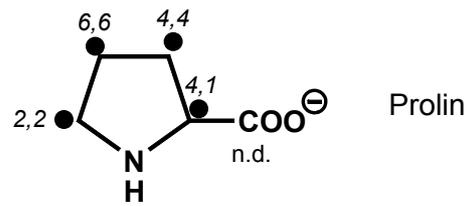
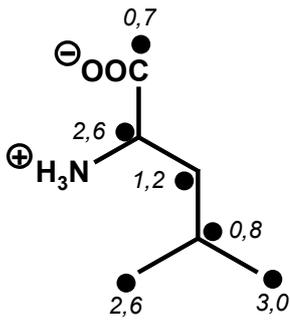


Abbildung 37. Kopplungsmuster der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die Balken kennzeichnen die über statistische Kopplung gebildeten Blöcke. Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)



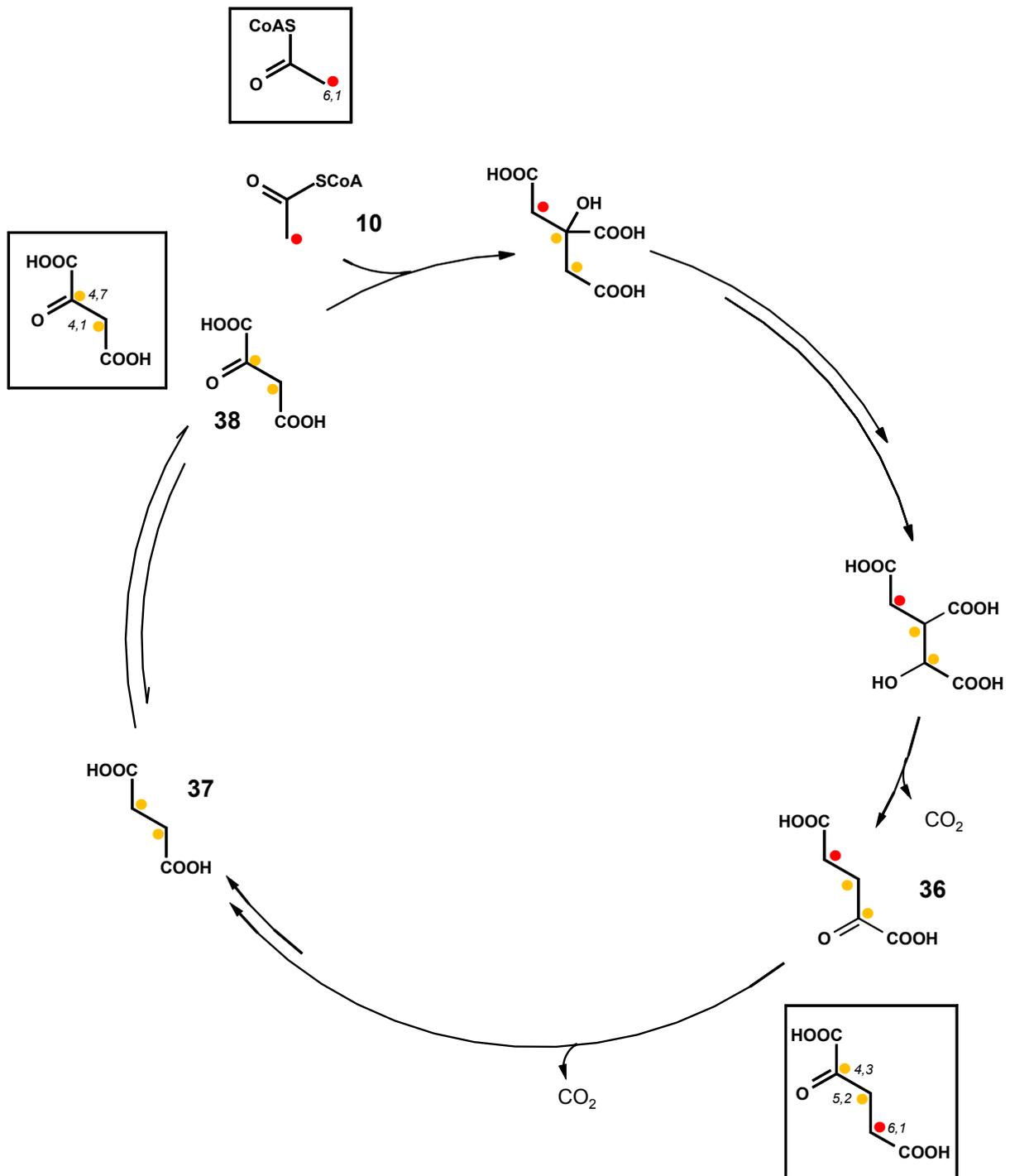


Abbildung 38. Metabolitenfluss im Citrat-Zyklus aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose (rot - erster Zyklus, orange - zweiter Zyklus).

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Tabelle 21. Aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) der Zentralmetabolite aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

	Position	Häufigkeit	
		% ¹³ C _{abs}	Δs ¹⁰
Acetyl-CoA (Pool I) (rekonstruiert aus Leucin)	1	1,8	{1}
	2	3,7	{1}
Acetyl-CoA (Pool II) (rekonstruiert aus Arginin)	1	2,8	0,4 {3}
	2	7,2	0,4 {3}
3-Phosphoenolpyruvat	1	2,8	0,7 {2}
	2	2,1	0,3 {6}
	3	3,8	0,6 {8}
Oxalacetat	1	3,5	0,6 {3}
	2	5,8	0,1 {2}
	3	5,2	0,4 {2}
	4	3,7	0,6 {3}
α - Ketogluterat	1	3,9	0,8 {2}
	2	5,4	0,2 {2}
	3	6,3	0,6 {3}
	4	7,2	0,4 {3}
	5	2,8	0,4 {3}
Ribose-5-phosphat	1	6,4	{1}
	2	1,8	{1}
	3	3,4	{1}
	4	1,6	{1}
	5	4,8	{1}
Erythrose-4-phosphat	1/3	2,0	0,2 {2}
	2	2,4	0,6 {2}
	4	n.d.	{2}

¹⁰ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

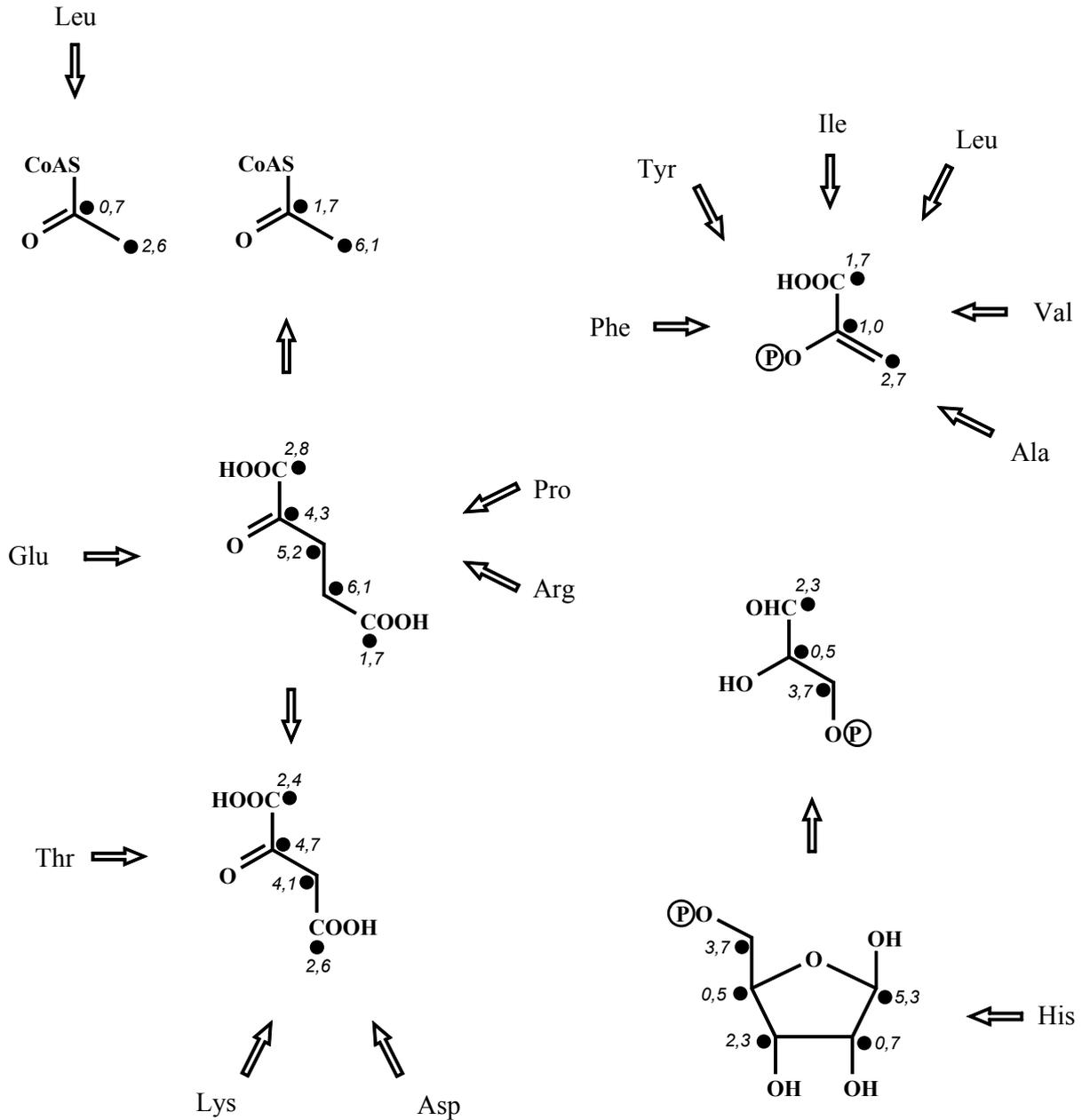


Abbildung 39. Kopplungsmuster der Zentralmetabolite Acetyl-CoA, 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat, Ribose-5-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

3.3.4.3 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* RPO

In der vorliegenden Arbeit wurden die primären Metabolite (Aminosäuren) der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* untersucht. Die Pflanzen der RPO Mutante wuchsen auf Medien mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Aus den Pflanzen (83 g, Frischgewicht) wurden die Aminosäuren isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Die Markierungsmuster der Aminosäuren sind in Tabelle 22 und Abbildung 40 zusammengefasst. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Zentralmetabolite sind in Tabelle 23 und Abbildung 42 zusammengefasst.

Tabelle 22. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

	Position	chem.	Kopplungskonstante ¹¹	Häufigkeit	Kopplung
		Verschiebung		% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
		δ [ppm]	J _{CC} [Hz]		
Alanin	1	174,9	60,0 (2, 2/3)	3,2	44,3
	2	51,4	n.d. (1, 3, 1/3)	3,1	58,1
	3	18,0	35,1 (2, 1/2)	1,79	57,8
Arginin	1	173,5	59,7 (2, 2/3)	n.d.	30,2
	2	55,2	n.d. (1, 3, 1/3)	3,9	n.d.
	3	29,4	35,3 (2, 1/2)	4,2	19,1
	4	26,5	34,4 (5)	3,3	48,3
	5	43,2	35,3 (4)	3,3	n.d.
	6	159,0		8,0	
Aspartat	1	169,4	53,6 (2, 2/3)	3,5	32,8
	2	61,3	53,6 (1)	3,5	26,9
			53,8 / 35,6 (1/3)		3,7
			35,6 (3, 2/4)		7,5
	3	50,6	51,4 (4)	3,8	26,9
			51,4 / 35,6 (2/4)		3,4
			35,6 (2, 1/2)		7,8
4	187,6	51,4 (3, 3/2)	3,8	30,1	
Glutamat	1	183,4	52,9 (2, 2/3)	3,6	33,8
	2	56,2	52,9 (1)	3,4	28,9
			34,7 (3)		11,1
			52,8 / 34,8 (1/3)		7,7
	3	32,1	34,6 (2, 1/2)	3,4	19,8
4	34,4	51,4 (5)	3,2	55,4	
5	183,2	51,4 (4)	3,4	53,0	

¹¹ Kopplungspartner in Klammern

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* RPO

Fortsetzung von Tabelle 22

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Glycin	1	172,2	59,4 (2)	3,1	31,6
	2	42,8	59,3 (1)	3,0	32,5
Histidin	1	174,0	59,8 (2, 2/3)	3,3	55,8
	2	55,8	59,5 (1)	3,2	10,8
			59,9 / 34,8 (1/3)		46,8
	3	28,9	34,6 (1/2)	3,1	46,0
	4	130,3	74,4 (5)	3,0	34,8
	5	122,4	74,3 (4)	3,1	31,5
	6	138,3		3,2	
Isoleucin	1	173,4	59,2 (2)	n.d.	29,1
	2	59,9	59,2 (1)	3,0	23,7
	3	38,2	33,8 (6)	3,4	38,3
	4	27,3	33,7 (5)	3,2	31,7
	5	13,7	32,3 (4)	2,6	30,5
	6	16,9	34,9 (3)	2,9	44,4
Leucin	1	174,5	59,5 (2)	3,0	53,5
	2	54,1	59,5 (1)	3,2	47,6
	3	41,1	33,1	3,4	
	4	26,5	34,9 (5)	3,2	41,5
	5	24,3	34,9 (4)	2,4	43,2
	6	23,7		2,1	
Lysin	1	176,2	59,3 (2, 2/3)	n.d.	30,2
	2	57,8	n.d. (1, 3, 1/3)	2,9	n.d.
	3	34,05	33,8 (2, 4, 1/2)	2,9	33,7
	4	26,6	36,0 (3, 5)	2,7	36,0
	5	31,2	35,1 (4, 6)	2,6	37,4
	6	44,5	n.d. (5)	n.d.	n.d.
Phenylalanin	1	174,4	60,3 (2, 2/3)	3,2	42,0
	2	57,8	n.d. (1, 3, 1/3)	2,5	n.d.
	3	38,9	33,4 (2, 1/2)	1,6	62,8
	4	137,2	56,6 (5)	3,3	61,8
	5/9	133,2	59,2	2,7	42,4
			50,0		31,1
	6/8	132,9	64,0	1,8	62,4
7	131,8	52,0	2,1	76,9	

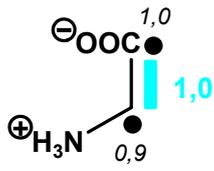
Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* RPO

Fortsetzung von Tabelle 22

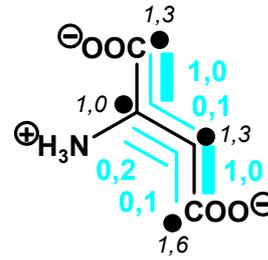
	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Prolin	1	173,4	58,3 (2, 2/3)	n.d.	36,3
	2	61,9	n.d. (1, 3, 1/3)	n.d.	n.d.
	3	30,7	33,5 (2, 1/2)	3,9	18,2
	4	25,9	33,2 (5)	3,7	53,8
	5	49,1	33,3 (4)	3,3	54,1
Serin	1	173,6	59,5 (2, 2/3)	n.d.	40,3
	2	58,3	n.d. (1, 3, 1/3)	n.d.	n.d.
	3	62,9	36,8 (2, 1/2)	n.d.	n.d.
Threonin	1	173,9	63,0 (2, 2/3)	3,4	27,9
	2	61,9	59,3 (1, 1/3)	2,4	39,9
	3	68,8	32,6 (1/2, 4)	n.d.	40,9
	4	22,9	n.d. (3)	2,7	n.d.
Tyrosin	1	185,4	53,2 (2, 2/3)	3,2	45,5
	2	60,0	52,7 (1)	3,1	1,3
			33,0 (3)		13,3
			53,5 / 33,2 (1/3)		38,6
	3	42,3	33,2 (2, 1/2)	3,3	56,3
	4	126,2	56,6 (5)	3,2	58,3
	5/9	133,1	56,5 (4, 8, 7/8)	3,2	57,3
	6/8	121,0	56,6 (7, 9)	3,1	9,9
	7	167,0	32,03 / 54,8 (7/8)	1,9	23,2
61,0 (8, 8/9)			45,6		
Valin	1	173,2	59,7 (2)	3,3	n.d.
	2	60,8	55,81 (1)	n.d.	n.d.
	3	31,3	34,6 (4)	2,7	42,0
	4	20,0	34,4 (3)	3,4	45,3
	5	19,6		3,4	

Bei dem vorliegenden Einbauversuch wurde eine Mutante von *Nicotiana tabacum* verwendet, deren Biosynthesewege noch nicht erschöpfend untersucht wurden. Inwieweit Besonderheiten im Einbau der [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose auf ein Defizit an *rpoB* oder auf sekundäre Veränderungen in der Mutante zurückzuführen sind, kann mit dem vorliegenden Einbauversuch nicht geklärt werden.

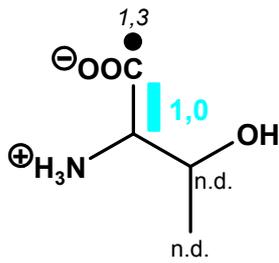
Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* RPO



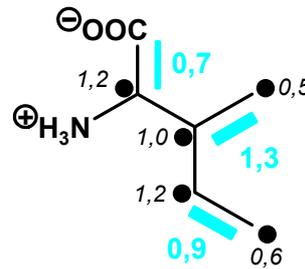
Glycin



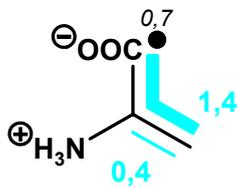
Aspartat



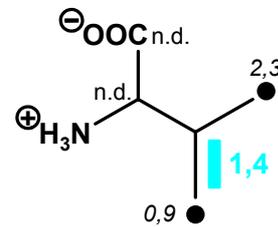
Threonin



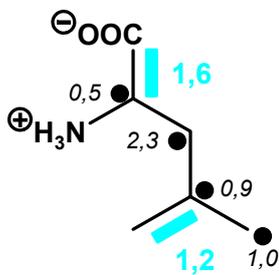
Isoleucin



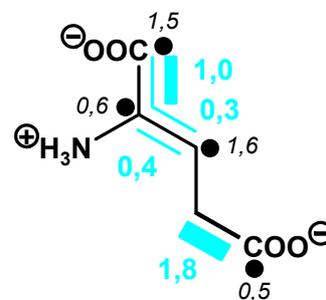
Alanin



Valin



Leucin



Glutamat

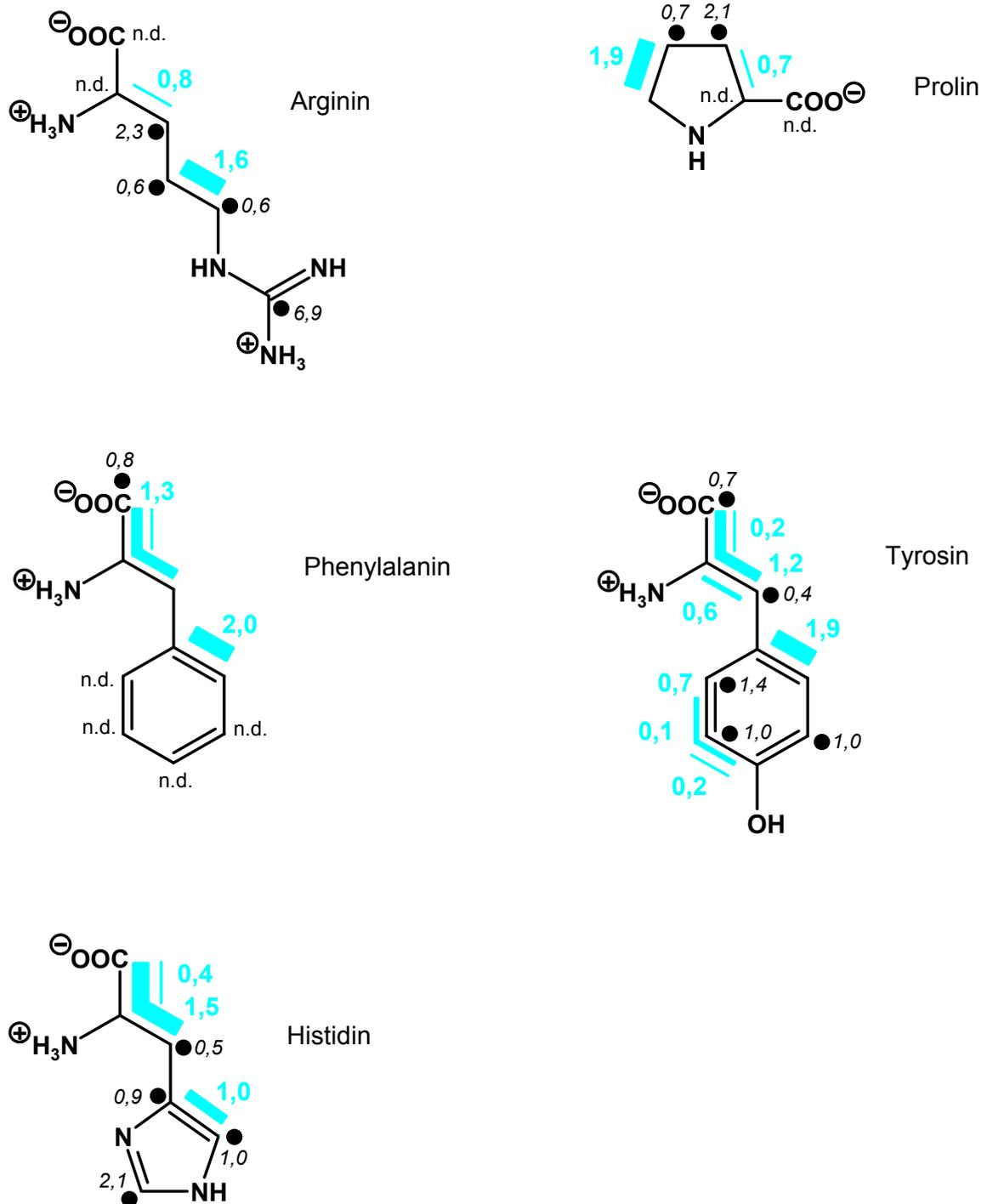


Abbildung 40. Kopplungsmuster der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der $[^{13}C_1]$ Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

α -Ketoglutarat wird retrobiosynthetisch aus den Aminosäuren Glutamat, Arginin und Prolin bestimmt. Das α -Ketoglutarat besitzt $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$, $[4,5-^{13}\text{C}_2]$ und $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ Isotopologe. α -Ketoglutarat (**36**) ist ein Produkt aus dem Citrat-Zyklus (Abbildung 43). Das $[4,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopolog (rot) spiegelt die Markierung von Acetyl-CoA (**10**) zu Beginn des Citrat-Zyklus wieder. Über die symmetrische Struktur des Succinats (**37**) wird der Kopplungsblock auf die Isotopologe $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ im Oxalacetat (orange) übertragen, wobei sich die Konzentration halbiert. Das $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ Isotopolog (grün) im α -Ketoglutarat stammt aus 3-Phosphoenolpyruvat. Die Markierung wird über den anaplerotischen Weg in Oxalacetat eingebaut, das über den Citrat-Zyklus mit α -Ketoglutarat in Verbindung steht. Durch die Rückreaktion im Citrat-Zyklus zum Succinat wird das $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ Isotopolog auf das $[2,3,4-^{13}\text{C}_3]$ Isotopolog im Oxalacetat übertragen.

Die Daten von Glutamat, Arginin, Prolin und Leucin für die retrobiosynthetische Bestimmung von Acetyl-CoA passen gut zusammen. Eine Abweichung der Kopplungsblockintensitäten zwischen Leucin und den restlichen Aminosäuren, wie sie bei der Anzucht des Wildtyps beschrieben wurde, ist bei der RPO Mutante nicht zu beobachten. Somit werden in der RPO Mutante keine Acetyl-CoA Pools unterschieden.

Im Wildtyp konnte das Markierungsmuster des Lysins keinem aus der Literatur bekannten Biosyntheseweg zugeordnet werden. Auf Grund der mangelnden Auflösung der Signale an Position C-2 im NMR-Spektrum, kann eine Abweichung der Biosynthese von Lysin in der RPO Mutante weder bestätigt noch widerlegt werden.

Das Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat wurde aus den Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin bestimmt. Die Daten passen gut zusammen. Das $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ Isotopolog im 3-Phosphoenolpyruvat hat in der vorliegenden RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* die dreifache Konzentration, wie im Verhältnis dazu das 3-Phosphoenolpyruvat im Wildtyp. Der große Konzentrationsunterschied in den Isotopologen wird im Spektrum des Tyrosins deutlich (Abbildung 41). Beide Einbauversuche wurden mit den gleichen Glucosekonzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Mutation die Schwerpunkte der Biosynthesen verschoben wurden.

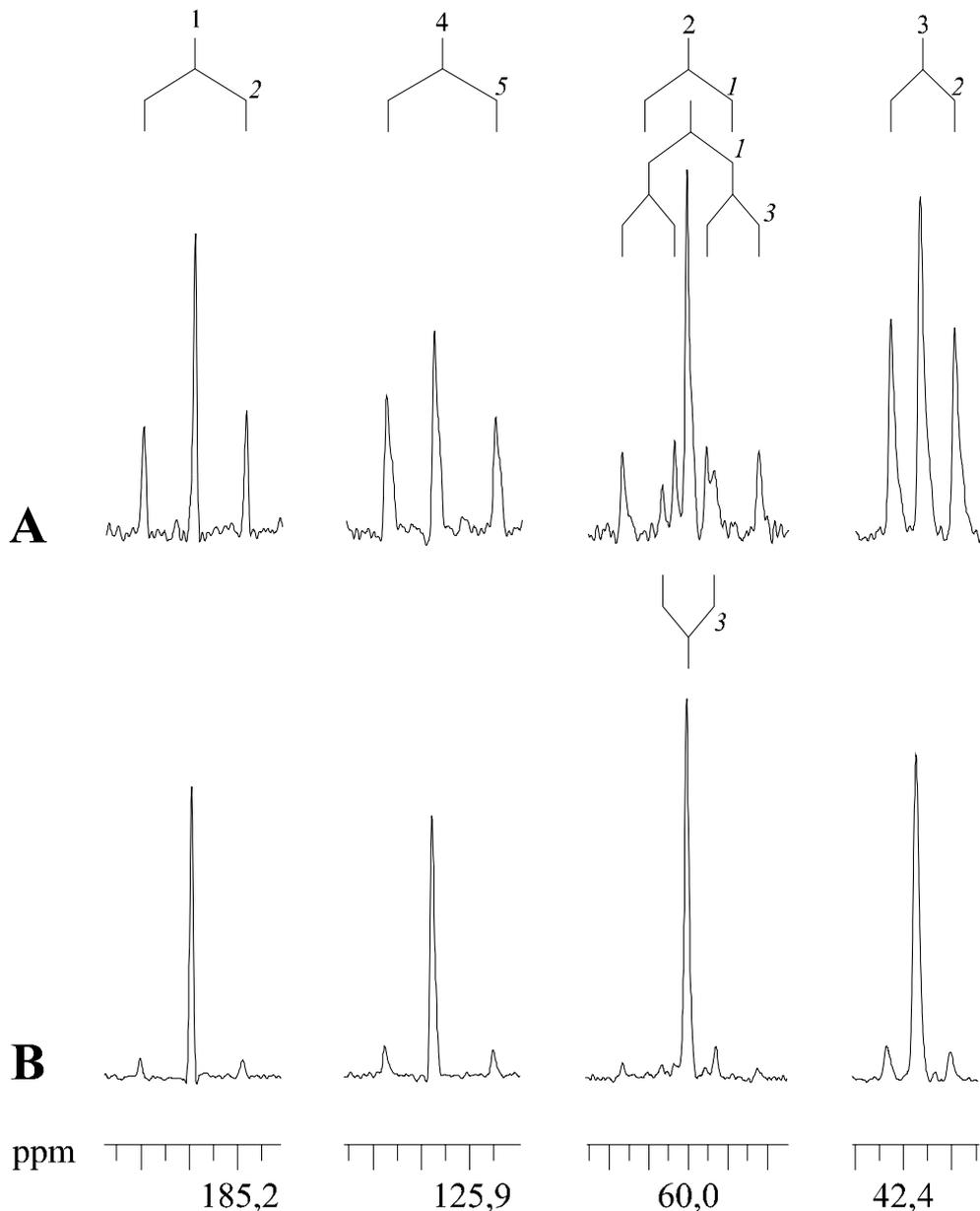


Abbildung 41. NMR Signale der Positionen C-1, C-2, C-3 und C-4 von Tyrosin aus dem Einbauversuch in (A) die RPO Mutante und (B) dem Wildtyp von *Nicotiana tabacum* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

Das aus Histidin retrobiosynthetisch bestimmte Glycerinaldehyd-3-phosphat besitzt [2,3- $^{13}\text{C}_2$] und [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]Isotopologe. Das Verhältnis der Isotopologe liegt bei 1,0 : 4,2. Im Vergleich dazu liegt das Verhältnisse derselben Isotopologe im 3-Phosphoenolpyruvat bei 1,0 : 2,5. Die Konzentration an [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]Isotopologen ist im Glycerinaldehyd-3-phosphat doppelt so hoch, wie im 3-Phosphoenolpyruvat.

Diese Unterschiede in der Konzentration an [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]Isotopologen wurde bereits im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* beobachtet. Das Ergebnis deutet auf unterschiedlich verlaufende Biosynthesewege bei Glycerinaldehyd-3-phosphat und 3-Phosphoenolpyruvat hin.

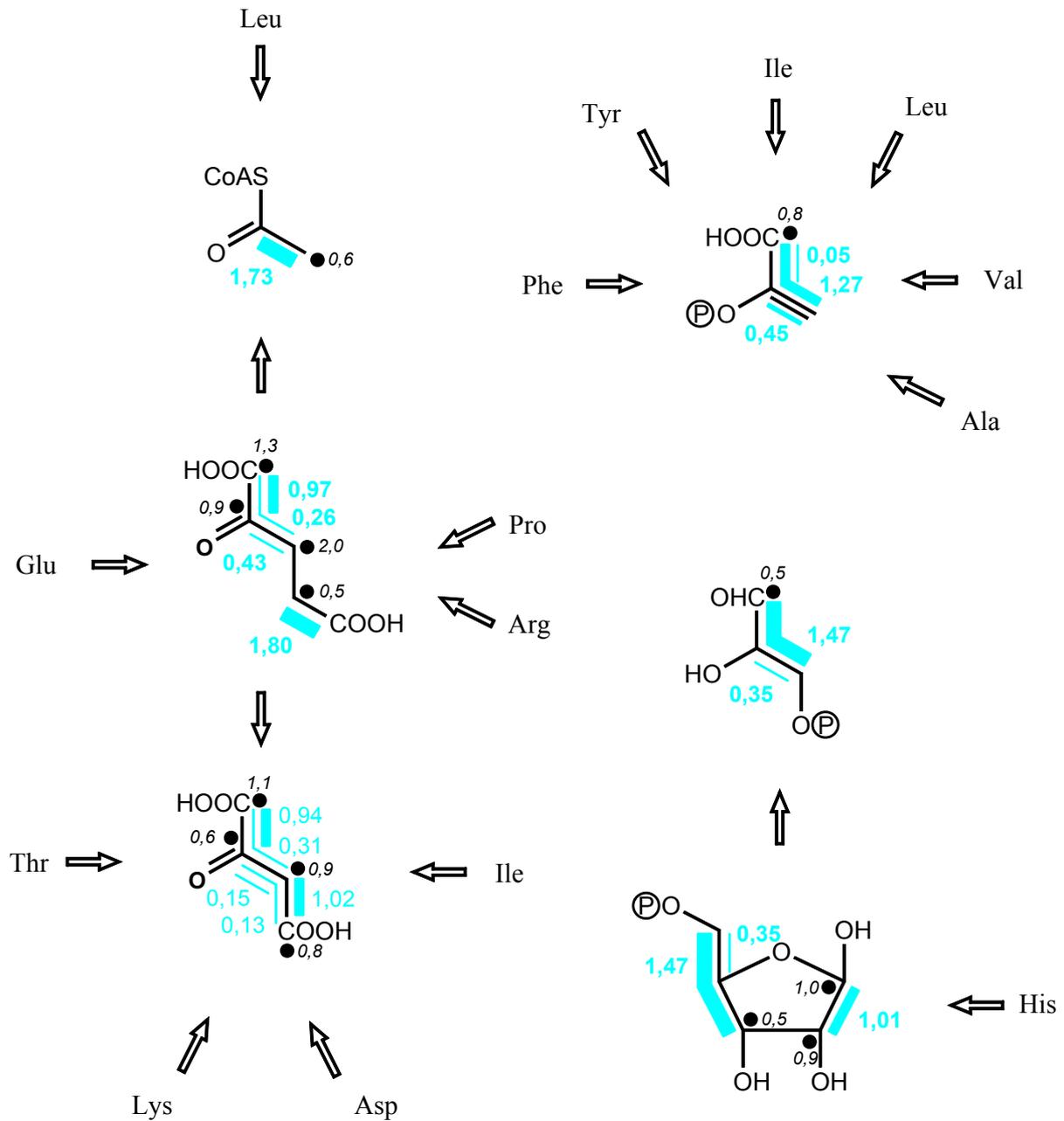


Abbildung 42. Kopplungsmuster der Zentralmetabolite Acetyl-CoA, 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat, Ribose-5-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50).

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* RPO

Tabelle 23. Aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Zentralmetabolite aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

	Position	koppelt mit	Häufigkeit			Kopplung		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{12}	{}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	{}
Acetyl-CoA	1	(2)	3,3	0,2	{4}	53,5	0,4	{3}
	2	(1)	3,4	0,2	{4}	51,3	3,4	{4}
3-Phosphoenolpyruvat	1	(2, 2/3)	3,2	0,1	{4}	43,9	1,5	{3}
	2	(1)	3,1	0,3	{6}	1,3		{1}
		(3)				13,3		{1}
		(1/3)				38,6		{1}
3	(2, 1/2)	3,0	0,4	{6}	58,6	2,5	{4}	
Oxalacetat	1	(2, 2/3)	3,3	0,2	{3}	30,0	1,8	{4}
	2	(1)	3,0	0,4	{4}	26,9		{1}
		(3, 2/4)				7,5		{1}
		(1/3)				3,7		{1}
	3	(4)	3,3	0,4	{3}	26,9		{1}
		(2, 1/2)				7,8		{1}
	4	(2/4)				3,4		{1}
		(3)	3,0	0,5	{4}	32,2	2,7	{3}
α - Ketoglutarat	1	(2, 2/3)	3,6		{1}	33,4	2,5	{3}
	2	(1)	3,7	0,3	{2}	28,9		{1}
		(3)				11,1		{1}
		(1/3)				7,7		{1}
	3	(2, 4, 1/2)	3,8	0,3	{3}	19,0	0,7	{3}
	4	(4)	3,4	0,2	{3}	52,5	3,0	{3}
	5	(5)	3,3	0,1	{3}	53,6	0,6	{2}
Ribose-5-phosphat	1	(2)	3,1		{1}	31,5		{1}
	2	(1)	3,0		{1}	34,8		{1}
	3	(4/5)	3,1		{1}	46,0		{1}
	4	(5)	3,2		{1}	10,8		{1}
		(3/5)				46,8		{1}
5	(4, 3/4)	3,3		{1}	55,8		{1}	
Erythrose-4-phosphat	1		n.d.			n.d.		
	2	(3, 3/4)	1,9		{1}	45,6		{1}
	3	(2, 4)	3,1		{1}	9,9		{1}
		(2/4)				23,2		{1}
4	(3, 2/3)	3,2		{1}	57,3		{1}	

¹² Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

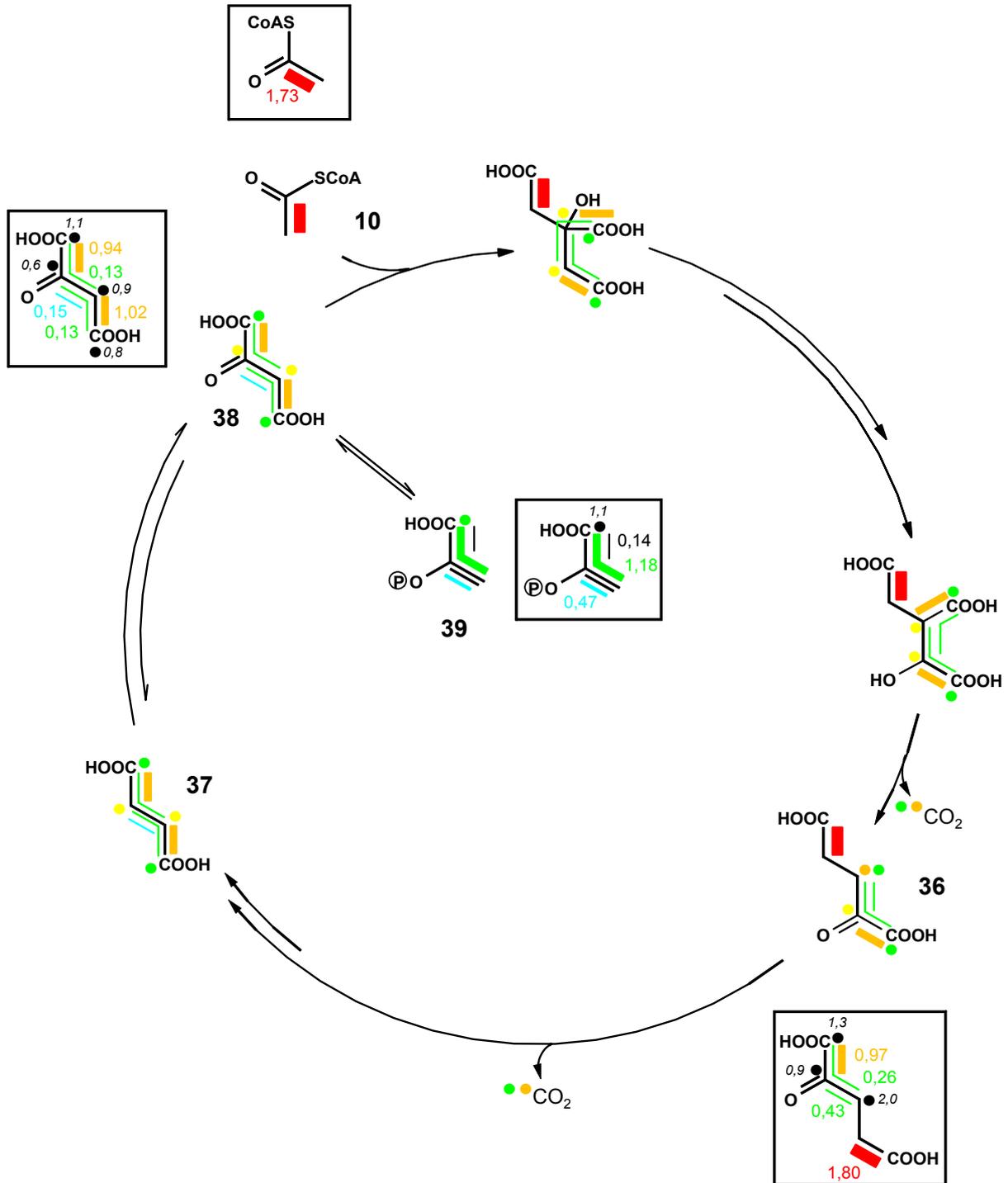


Abbildung 43. Metabolitenfluss im Citrat-Zyklus aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose (rot - erster Zyklus, orange - zweiter Zyklus, gelb - dritter Zyklus, grün/blau - 3-Phosphoenolpyruvat über anaplerotischen Weg).

3.3.4.4 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* NDH 53-25

In der vorliegenden Arbeit wurden die primären Metabolite (Aminosäuren) der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* untersucht. Die Pflanzen der NDH 53-25 Mutante wuchsen auf Medien mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose.

Aus den Pflanzen (ohne Wurzel, 67g, Frischgewicht) wurden die Aminosäuren isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Die Markierungsmuster der Aminosäuren sind in Tabelle 24 und Abbildung 44 zusammengefasst. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Zentralmetabolite sind in Tabelle 25 und Abbildung 46 zusammengefasst.

Tabelle 24. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) der Aminosäuren aus den Einbauversuchen der beiden NDH Mutanten von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungs- konstante ¹³ J _{CC} [Hz]	NDH 53-25		NDH 54-3IV	
				% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
Alanin	1	174,8		n.d.		n.d.	
	2	51,4		1,9		1,9	
	3	17,9		1,9		1,8	
Aspartat	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	61,3	53,5 (1) 36,7 (3)	2,2	11,8 7,9	1,5	n.d.
	3	50,6	n.d. (2) 51,6 (4)	2,0	n.d. 16,7	2,0	n.d.
	4	189,6	n.d.	n.d.	n.d.	1,6	n.d.
Glutamat	1	183,6	52,6 (2)	2,1	23,2	3,0	22,4
	2	56,2	53,3 (1) 34,1 (3) n.d. (1/3)	2,6	18,7 4,8	2,6	15,1 7,0 n.d.
	3	32,2	33,6 (2)	n.d.	n.d.	2,1	11,0
	4	34,5	51,3 (5)	2,2	31,3	2,1	31,2
	5	183,3	51,5 (4)	2,2	31,4	2,1	31,2
Glycin	1	171,4		1,5		n.d.	
	2	43,2		1,2		1,6	

¹³ Kopplungspartner in Klammern

Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* NDH 53-25

Fortsetzung von Tabelle 24

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungs- konstante J_{CC} [Hz]	NDH 53-25		NDH 54-3IV	
				% $^{13}C_{abs}$	% $^{13}C^{13}C$	% $^{13}C_{abs}$	% $^{13}C^{13}C$
Histidin	1	n.d.		n.d.			
	2	n.d.		n.d.			
	3	30,0		2,0			
	4	131,1		2,0			
	5	123,7		1,9			
	6	139,5		2,5			
Isoleucin	1	172,7				n.d.	
	2	59,9				1,8	
	3	38,4				1,9	
	4	27,4				2,1	
	5	16,9				1,9	
	6	13,7				1,7	
Leucin	1	174,8	58,5 (2)	3,6	20,6	n.d.	10,7
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	3	41,3		2,1		1,8	
	4	26,6		n.d.		2,5	
	5	24,3		1,8		2,3	
	6	23,7		2,2		2,0	
Lysin	1	n.d.		n.d.		n.d.	
	2	57,8		2,3		2,0	
	3	34,2		1,7		n.d.	
	4	26,5		2,1		2,0	
	5	31,3		n.d.		1,7	
	6	44,4		2,0		n.d.	
Phenylalanin	1	n.d.		n.d.		n.d.	
	2	57,8		2,2		2,0	
	3	39,2		2,0		1,6	
	4	137,5		2,6		2,1	
	5/9	133,2		2,4		2,5	
	6/8	133,0		2,6		2,0	
	7	131,8		2,5		1,8	
Tyrosin	1	185,4		2,3		1,8	
	2	60,0		1,9		2,0	
	3	42,3		1,9		1,7	
	4	126,2		n.d.		1,8	
	5/9	133,1		2,3		2,2	
	6/8	121,0		2,5		3,1	
	7	167,2		2,1		2,6	

Fortsetzung von Tabelle 24

	Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungs-konstante J_{CC} [Hz]	NDH 53-25		NDH 54-3IV	
				% $^{13}C_{abs}$	% $^{13}C^{13}C$	% $^{13}C_{abs}$	% $^{13}C^{13}C$
Valin	1	n.d.			n.d.		
	2	60,8			1,8		
	3	31,4			2,5		
	4	20,0			1,9		
	5	19,5			2,1		

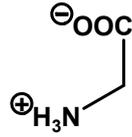
Bei dem vorliegenden Einbauversuch wurde eine Mutante von *Nicotiana tabacum* verwendet, deren Biosynthesewege noch nicht erschöpfend untersucht wurden. Inwieweit Besonderheiten im Einbau der [U- $^{13}C_6$]D-Glucose auf ein Defizit vom NDH-Komplex oder auf sekundäre Veränderungen in der Mutante zurückzuführen sind, kann mit dem vorliegenden Einbauversuch nicht geklärt werden.

Phenylalanin, Tyrosin und Alanin, die für die retrobiosynthetische Bestimmung des 3-Phosphoenolpyruvat-Pools herangezogen werden, weisen in den NMR Spektren keine Satelliten auf (Abbildung 45, **B**). Alle Positionen des retrobiosynthetisch bestimmten 3-Phosphoenolpyruvat weisen eine Anreicherung der [$^{13}C_1$]Isotopologe von 1 % auf.

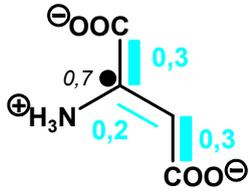
Das Mengenverhältnis der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ist in der NDH 53-25 Mutante, im Vergleich zum Wildtyp verschoben. Der Wildtyp synthetisiert mehr Tyrosin als Phenylalanin, in der NDH 53-25 Mutante verhält es sich andersherum.

Die aus Glutamat, Lysin und Aspartat retrobiosynthetisch bestimmten Verbindungen des Citrat-Zyklus, α -Ketoglutarat und Oxalacetat, weisen [$^{13}C_2$]Isotopologe auf. Die [$^{13}C_2$]Isotopologe stammen aus dem Acetyl-CoA. Die [$^{13}C_3$]Isotopologe, die im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* über den anaplerotischen Weg aus 3-Phosphoenolpyruvat in α -Ketoglutarat und Oxalacetat eingetragen werden, fehlen.

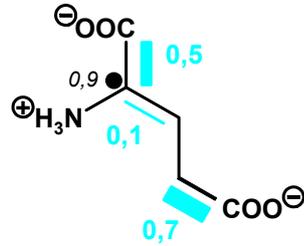
α -Ketoglutarat weist [1,2- $^{13}C_2$], [2,3- $^{13}C_2$] und [4,5- $^{13}C_2$]Isotopologe auf. Das [4,5- $^{13}C_2$]Isotopolog mit 0,7 mol% spiegelt das zu Beginn des Citrat-Zyklus eingebaute Acetyl-CoA wieder. Die anderen Isotopologe bilden sich im Verlauf des Citrat-Zyklus. Durch das symmetrische Succinat entstehen im Oxalacetat [1,2- $^{13}C_2$] und [3,4- $^{13}C_2$]Isotopologe. Die Konzentration der Isotopologe im Oxalacetat hat sich mit 0,3 mol%, im Verhältnis zum α -Ketoglutarat, halbiert. Die Anreicherung der [2- $^{13}C_1$]Isotopologe von α -Ketoglutarat und Oxalacetat liegt bei 1 %.



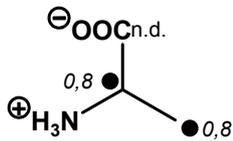
Glycin



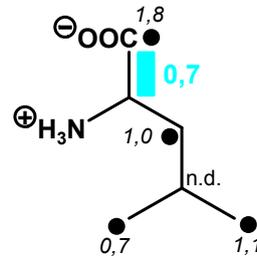
Aspartat



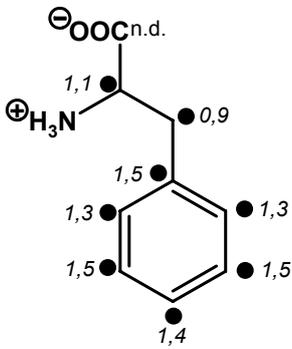
Glutamat



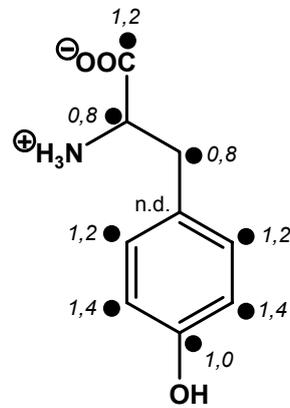
Alanin



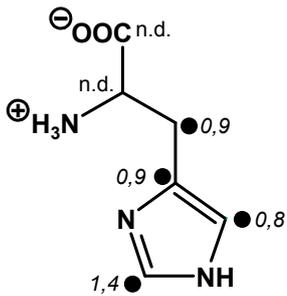
Leucin



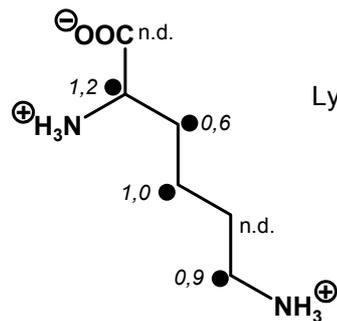
Phenylalanin



Tyrosin



Histidin



Lysin

Abbildung 44. Kopplungsmuster der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Im Wildtyp wurden zwei Acetyl-CoA Pools identifiziert. Im vorliegenden Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* konnten zwei Acetyl-CoA Pools bestimmt werden. Die Anreicherung des [1-¹³C₁]Isotopologs im Acetyl-CoA (Pool I, rekonstruiert aus Leucin) ist doppelt so hoch, wie im Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Glutamat). Im Wildtyp wurden die zwei Acetyl-CoA Pools im Zusammenhang mit den Zellkomponenten unterschieden.

Der Schwerpunkt der Biosynthese von Acetyl-CoA (Pool I, rekonstruiert aus Leucin) wird, wie das 3-Phosphoenolpyruvat, in den Plastiden vermutet. Auffällig ist jedoch, dass im Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* neben einem markierten Acetyl-CoA unmarkiertes 3-Phosphoenolpyruvat vorkommt. Die Verbindungen sind über die Stoffwechselwege miteinander verknüpft. Die Markierungsmuster im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* bestätigen diese Verknüpfung.

Im Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose kommt es nur zu einem geringen Eintrag von Einfachmarkierungen in die aromatischen Aminosäuren. Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren findet in den Plastiden statt. Es muss davon ausgegangen werden, dass der Schwerpunkt der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren auf der Fixierung von CO₂ über die Photosynthese liegt. Der geringe Eintrag von [¹³C₁]Isotopologen in die aromatischen Aminosäuren erklärt sich über die Refixierung von freiwerdendem ¹³CO₂.

Da die Pools von 3-Phosphoenolpyruvat und Acetyl-CoA innerhalb des Wildtyps von *Nicotiana tabacum* eine Verknüpfung unter den gleichen Retrobiosynthesebedingungen aufweisen, muss es sich bei der Trennung in der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* um eine Besonderheit der Mutation handeln.

Zum Beweis der hier dargestellten Interpretation der Daten, sind weitere Anzuchten notwendig. Einbauexperimente mit ¹³CO₂ könnten eine Trennung der Biosynthesewege der aromatischen Aminosäuren und der Aminosäuren, die mit dem Citrat-Zyklus verknüpft sind, bestätigen.

Auch das, aus Histidin retrobiosynthetisch bestimmte, Glycerinaldehyd-3-phosphat weist keine Kopplungsblöcke auf. Ein Vergleich der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe von Glycerinaldehyd-3-phosphat und 3-Phosphoenolpyruvat ist mit den vorhandenen Daten nicht möglich.

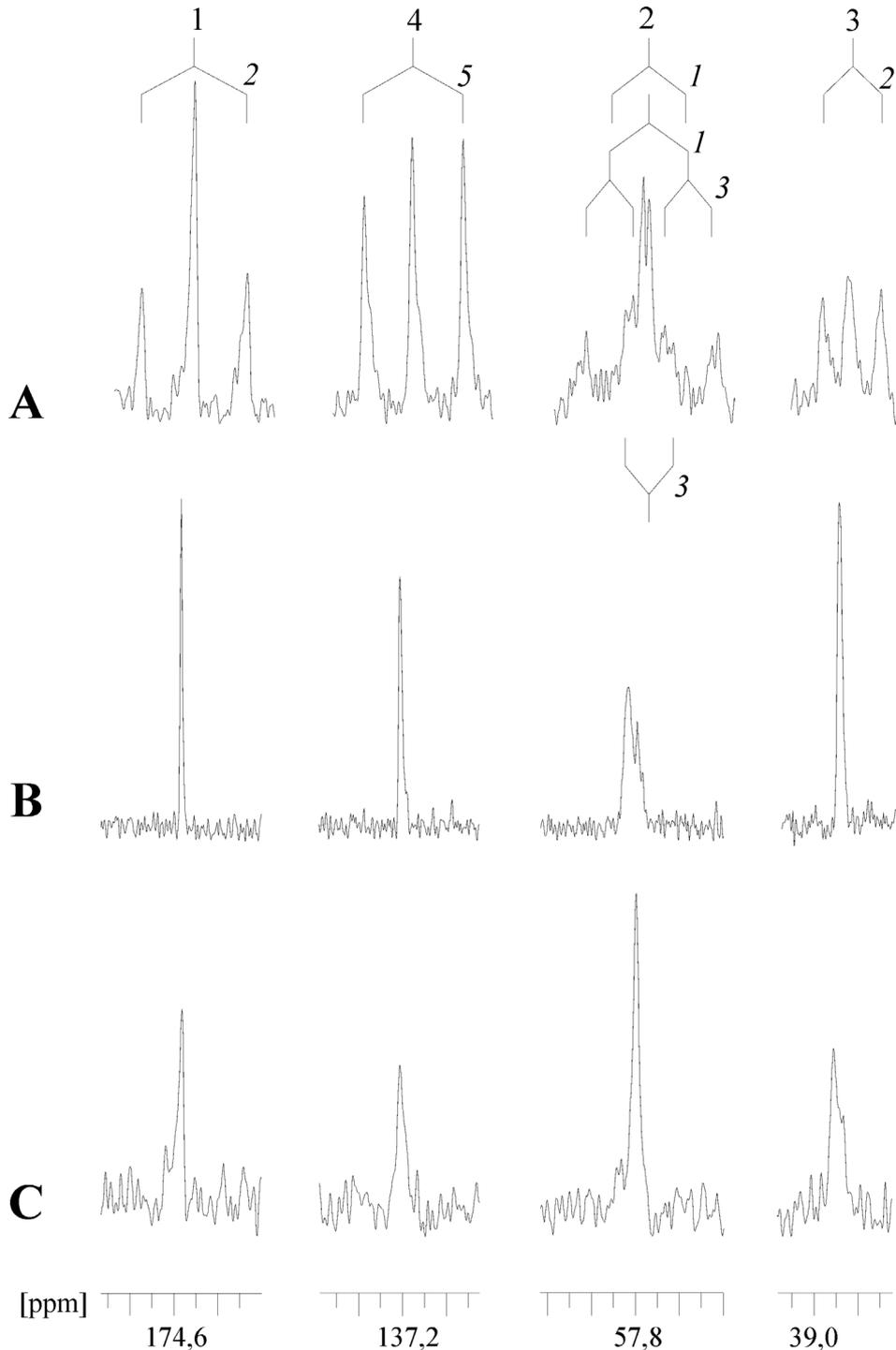


Abbildung 45. NMR Signale der Positionen C-1, C-2, C-3 und C-4 von Phenylalanin aus dem Einbauversuch (A) in die RPO Mutante, (B) in die NDH 53-25 Mutante und (C) in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

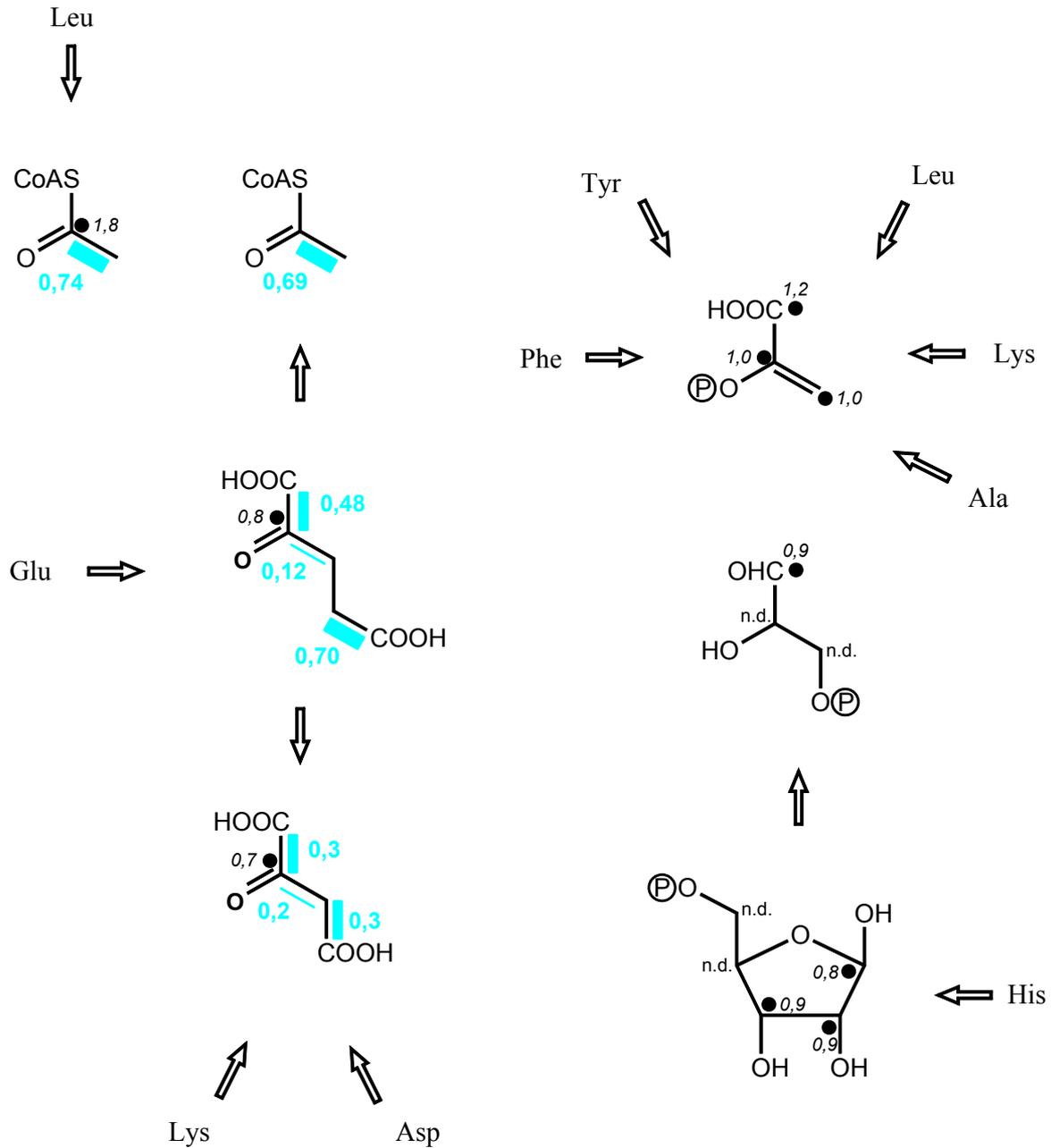


Abbildung 46. Kopplungsmuster der Zentralmetabolite Acetyl-CoA, 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat, Ribose-5-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der $^{13}\text{C}_1$ Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Tabelle 25. Aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Zentralmetabolite aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

	Position	koppelt mit	Häufigkeit		Kopplung		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{14}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	
Acetyl-CoA (Pool I) (rekonstruiert aus Leucin)	1	(2)	3,6		{1}	20,6	{1}
	2	(1)	n.d.		{1}	n.d.	{1}
Acetyl-CoA (Pool II) (rekonstruiert aus Glutamat)	1	(2)	2,2		{1}	31,4	{1}
	2	(1)	2,2		{1}	31,3	{1}
3-Phosphoenolpyruvat	1		2,3		{1}		
	2		2,1	0,2	{6}		
	3		2,1	0,2	{6}		
Oxalacetat	1	(2)	n.d.		{2}	n.d.	{1}
	2	(1)	2,3	0,1	{2}	11,8	{1}
		(3)				7,9	{1}
	3	(2, 4)	1,9	0,2	{2}	16,7	{1}
α - Ketoglutarat	4	(3)	2,1		{1}	n.d.	{1}
	1	(2)	2,1		{1}	23,2	{1}
	2	(1)	2,6		{1}	18,7	{1}
		(3)				4,8	{1}
	3	(2)	n.d.		{1}	n.d.	{1}
Ribose-5-phosphat	4	(4)	2,2		{1}	31,3	{1}
	5	(5)	2,2		{1}	31,4	{1}
	1		1,9		{1}		
	2		2,0		{1}		
	3		2,0		{1}		
Erythrose-4-phosphat	4		n.d.		{1}		
	5		n.d.		{1}		
	1		2,6	0,1	{2}		
	2		2,3	0,2	{2}		
	3		2,6	0,1	{2}		
	4		2,4	0,1	{2}		

¹⁴ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

3.3.4.5 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* NDH 54-3IV

In der vorliegenden Arbeit wurden die primären Metabolite (Aminosäuren) der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* untersucht. Die Pflanzen der NDH 54-3IV Mutante wuchsen auf Medien mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose.

Aus den Pflanzen (ohne Wurzel, 55 g, Frischgewicht) wurden die Aminosäuren isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Die Markierungsmuster der Aminosäuren sind in Tabelle 24 und Abbildung 47 zusammengefasst. Die aus den Aminosäuren abgeleiteten Zentralmetabolite sind in Tabelle 26 und Abbildung 48 zusammengefasst.

Bei dem vorliegenden Einbauversuch wurde eine Mutante von *Nicotiana tabacum* verwendet, deren Biosynthesewege noch nicht erschöpfend untersucht wurden. Inwieweit Besonderheiten im Einbau der [U-¹³C₆]D-Glucose auf ein Defizit vom NDH-Komplex oder auf sekundäre Veränderungen in der Mutante zurückzuführen sind, kann mit dem vorliegenden Einbauversuch nicht geklärt werden.

Die NDH 54-3IV Mutante hat im Gegensatz zur NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* einen höheren Anteil an NDH-Gen Aktivität. Es wird davon ausgegangen, dass die Mutante den Defekt umgehen kann (Kofer *et al.*, 1998).

Die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Alanin, Valin, Leucin und Lysin werden für die retrobiosynthetische Bestimmung des 3-Phosphoenolpyruvat-Pools herangezogen. Alle Aminosäuren weisen in den NMR Spektren keine Satelliten auf (Abbildung 45, C). Alle Positionen des retrobiosynthetisch bestimmten 3-Phosphoenolpyruvat weisen eine Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe von 0,5 - 1 % auf.

Das Mengenverhältnis der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ist in der NDH 54-3IV Mutante, im Vergleich zum Wildtyp verschoben. Der Wildtyp synthetisiert mehr Tyrosin als Phenylalanin, in der NDH 54-3IV Mutante verhält es sich andersherum.

α-Ketoglutarat, als Verbindung des Citrat-Zyklus, wird bei dieser Anzucht retrobiosynthetisch aus Glutamat bestimmt. Es konnten [1,2-¹³C₂] und [4,5-¹³C₂]Isotopologe bestimmt werden. Das [4,5-¹³C₂]Isotopolog mit 0,7 mol% spiegelt das zu Beginn des Citrat-Zyklus eingeführte Acetyl-CoA wieder. Das [1,2-¹³C₂]Isotopolog wird im Verlauf des Citrat-Zyklus gebildet. Durch das symmetrische Succinat entstehen im Oxalacetat [1,2-¹³C₂] und [3,4-¹³C₂]Isotopologe, die wiederum auf das α-Ketoglutarat übertragen werden und das

[1,2-¹³C₂]Isotopolog bilden. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe liegt im α-Ketoglutarat bei 1 %.

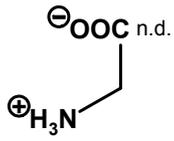
Neben den oben genannten Isotopologen kommen noch geringe Mengen an [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologen im α-Ketoglutarat vor. Ursprung dieser Isotopologe im Wildtyp ist üblicherweise das 3-Phosphoenolpyruvat, das seine Markierung über den anaplerotischen Weg in die Verbindungen des Citrat-Zyklus trägt. Im vorliegenden Einbauexperiment in der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* ist das retrobiosynthetisch bestimmte 3-Phosphoenolpyruvat unmarkiert. Wie bereits bei der NDH 53-25 Mutante erwähnt, muss davon ausgegangen werden, dass der Schwerpunkt der Biosynthese der Aminosäuren, aus denen 3-Phosphoenolpyruvat retrobiosynthetisch bestimmt wird, auf der CO₂ Fixierung liegt. Die Anwesenheit von [¹³C₃]Isotopologen im Glutamat könnte ein Beweis für die, in der Literatur vermutete, Umgehung des Defektes in der Mutante sein (Kofer *et al.*, 1998).

Zum Beweis der hier dargestellten Interpretation der Daten, sind weitere Anzuchten notwendig.

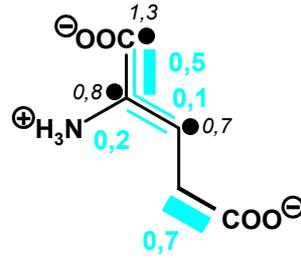
Aus den vorliegenden Spektren von Aspartat, Lysin und Isoleucin, die zur retrobiosynthetischen Bestimmung von Oxalacetat herangezogen wurden, konnten keine Daten über Kopplungen bestimmt werden. Die drei Aminosäuren konnten nicht in ausreichenden Mengen aus dem Zellrückstand isoliert werden. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe liegt im Oxalacetat bei 1 %.

Abbildung 47. Kopplungsmuster der Aminosäuren aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

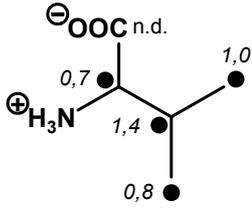
Primärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* NDH 54-3IV



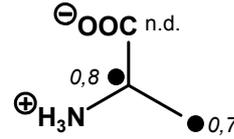
Glycin



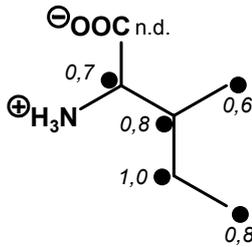
Glutamat



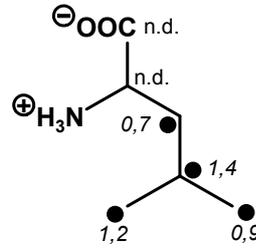
Valin



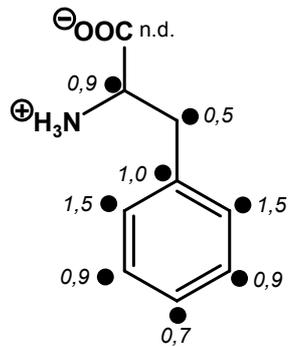
Alanin



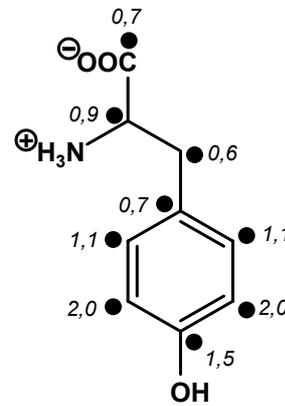
Isoleucin



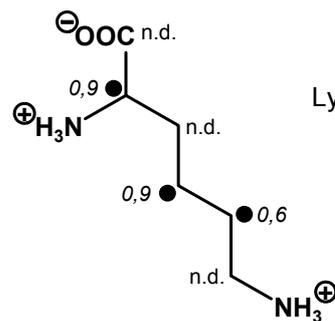
Leucin



Phenylalanin



Tyrosin



Lysin

Wie bereits für den Wildtyp und die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* beschrieben, konnten auch in der vorliegenden Anzucht mit der NDH 54-3IV Mutante zwei getrennte Acetyl-CoA Pools aus den Aminosäuren Leucin und Glutamat bestimmt werden. Die Intensität der Kopplung (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) im Acetyl-CoA (Pool I, rekonstruiert aus Leucin) entspricht nur einem Drittel der Intensität im Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Glutamat).

Neue Anzuchten der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $^{13}\text{CO}_2$ oder Pyruvat könnten die hier dargelegten Interpretationen der Daten bestätigen.

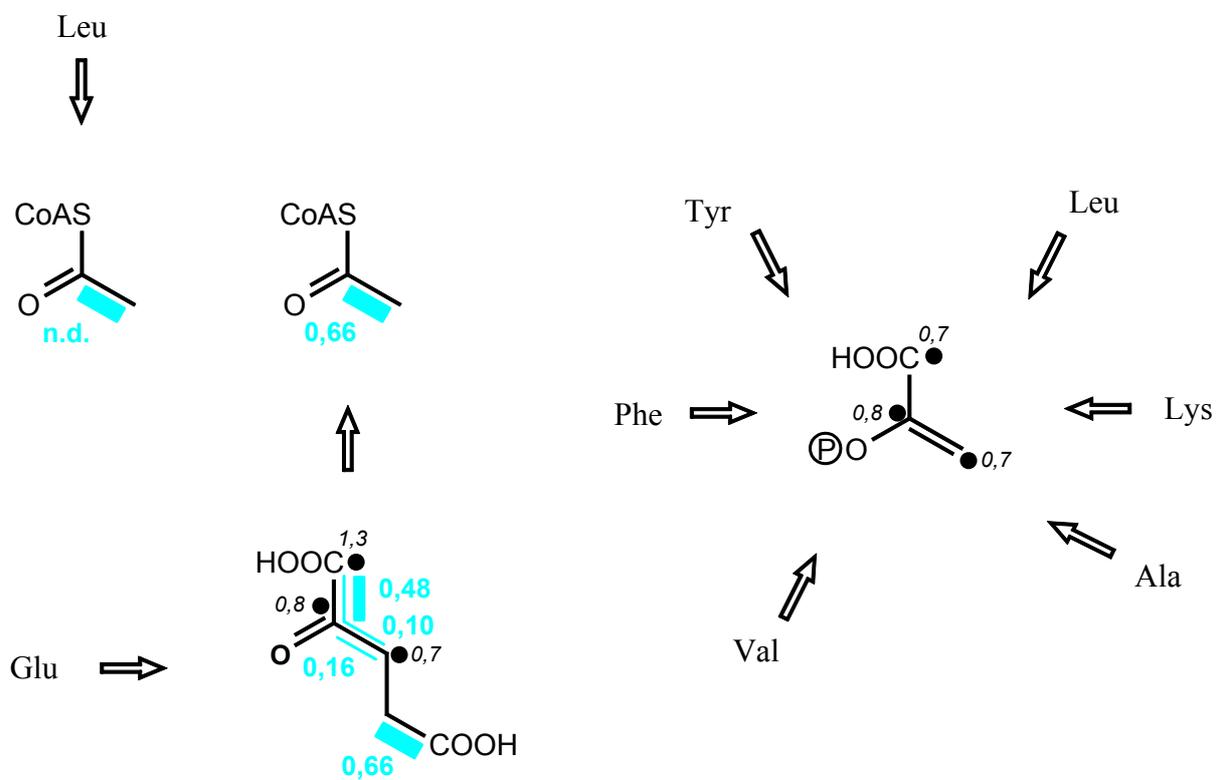


Abbildung 48. Kopplungsmuster der Zentralmetabolite Acetyl-CoA, 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat und α -Ketoglutarat aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der $^{13}\text{C}_1$ Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Tabelle 26. Aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) der Zentralmetabolite aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

	Position	koppelt mit	Häufigkeit		Kopplung			
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	ΔS^{15}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	ΔS		
Acetyl-CoA (Pool I) (rekonstruiert aus Leucin)	1	(2)	n.d.		{1}	10,7	{1}	
	2	(1)	n.d.		{1}	n.d.	{1}	
Acetyl-CoA (Pool II) (rekonstruiert aus Glutamat)	1	(2)	2,1		{1}	31,2	{1}	
	2	(1)	2,1		{1}	31,2	{1}	
3-Phosphoenolpyruvat	1		1,8		{1}			
	2		1,9	0,1	{7}			
	3		1,8	0,1	{6}			
Oxalacetat	1	(2)	1,8		{1}	n.d.	{3}	
	2	(1)	1,8	0,2	{3}	n.d.	{3}	
	3	(4)	2,1	0,1	{2}	n.d.	{3}	
	4	(3)	1,8	0,2	{3}	n.d.	{3}	
α - Ketogluterat	1	(2, 2/3)	3,0		{1}	22,4	{1}	
	2	(1)	2,6		{1}	15,1	{1}	
		(3)				7,0	{1}	
	3	(1/3)	2,1		{1}	4,0	11,0	{1}
		(2)				11,0		
		(4)				31,2		
4	(4)	2,1		{1}	31,2	{1}		
5	(5)	2,1		{1}	31,2	{1}		
Erythrose-4-phosphat	1		3,0	0,2	{2}			
	2		2,6		{1}			
	3		3,0	0,2	{2}			
	4		2,4	0,2	{2}			

¹⁵ ΔS : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

3.3.5 Diskussion

Aus Mangel der Kompartimentierung können verschiedene Biosynthesewege im *Chloroflexus aurantiacus* nicht räumlich, sondern nur zeitlich voneinander getrennt stattfinden. Beim Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [1,2-¹³C₂]Glycin stellte sich heraus, dass die retrobiosynthetisch bestimmten Verbindungen des zentralen Stoffwechsellpools je über einen Biosyntheseweg synthetisiert wurden. Auch in den Zellkulturen von *Catharanthus roseus* im Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose wurden keine getrennten Stoffwechsellpools festgestellt. Im Gegensatz dazu konnten im *Nicotiana tabacum* zwei Acetyl-CoA Pools bestimmt werden. Die Einbauexperimente in *Fossombronia* zeigten bereits, dass verschiedene Synthesewege in Pflanzen nebeneinander vorkommen. Aminosäuren, die bekannterweise gleichen Synthesewegen folgen sollten, wiesen hier unterschiedliche Markierungsmuster auf (Rieder, 1999). Dass Verbindungen des zentralen Stoffwechsellpools verschiedenen Markierungsmustern über die Retrobiosynthese aus den Aminosäuren zugeordnet werden, wird als Effekt der Kompartimentierung der Zelle ausgelegt. So wurde zum Beispiel in *Fossombronia* bei einem Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose wurde Pyruvat aus Alanin rekonstruiert, 3-Phosphoenolpyruvat aus Phenylalanin und Tyrosin rekonstruiert und TPP-acetaldehyd aus Valin, Isoleucin und Leucin rekonstruiert (Rieder, 1999).

Die Biosynthese der Acetyl-CoA's im *Nicotiana tabacum* ist wegen der Kompartimentierung der pflanzlichen Zelle zeitgleich möglich. Auch in den NDH Mutanten von *Nicotiana tabacum* wurden getrennte Acetyl-CoA Pools festgestellt. Die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* weist nur einen Acetyl-CoA Pool auf. Die Prozesse in der NDH Mutante liegen gemäß der Literatur nahe am Wildtyp (Kofer *et al.*, 1998). Die Mutation in der RPO Mutante diskriminiert anscheinend die Bildung des zweiten Acetyl-CoA Pools, oder er ist so weit zurück gefahren, dass der Mangel aus dem Acetyl-CoA Pool II (üblicherweise rekonstruiert aus Glutamat, Arginin und Prolin) ausgeglichen wird.

Ob es sich um eine Besonderheit von *Nicotiana tabacum* handelt, oder ob es üblich es in ganzen Pflanzen ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht bestimmt werden. Auch ist ungeklärt ob *Catharanthus roseus* grundsätzlich keine getrennten Acetyl-CoA Pools besitzt oder ob es sich hierbei um eine Besonderheit der Anzucht als Zellkultur handelt.

Bei den hier untersuchten Pflanzen treten verschiedene Glycerinaldehyd-3-phosphat und 3-Phosphoenolpyruvat Pools auf, obwohl die beiden Verbindungen im Stoffwechsel direkt ineinander überführbar sind. Im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* liegt das Verhältnis der

[2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe im Glycerinaldehyd-3-phosphat bei 6,0 : 1,0 und im 3-Phosphoenolpyruvat bei 1,7 : 1,0. Im *Catharanthus roseus* unterschieden sich Glycerinaldehyd-3-phosphat (1,0 : 9,0 : 3,6) und 3-Phosphoenolpyruvat (1,0 : 13,9 : 6,0) im Verhältnis der [1,2-¹³C₂], [2,3-¹³C₂] und [1,2,3-¹³C₃]Isotopologe. Das Eubakterium *Chloroflexus aurantiacus* zeigt keine Unterschiede in den Markierungsmustern von Glycerinaldehyd-3-phosphat und 3-Phosphoenolpyruvat. Die Unterschiede in den Markierungsmustern der beiden Verbindungen in den vorliegenden Pflanzen entstehen anscheinend über die räumliche Trennung der Aminosäurebiosynthesewege voneinander. Die aromatischen Aminosäuren (Rekonstruktion von 3-Phosphoenolpyruvat) werden in den Chloroplasten gebildet. Im Histidin (Rekonstruktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat) befindet sich Ribose. Die Histidinbiosynthese ist eng mit der Ribosebiosynthese für die Ribonukleotide verknüpft. Der Schwerpunkt der Ribonukleotidbiosynthese liegt in den Mitochondrien.

Es ist zu beachten, dass die Aminosäurebiosynthese in Pflanzen nicht gut untersucht ist. Man hat bis jetzt die Ergebnisse aus den Mikroorganismen auf den Metabolismus der Pflanze übertragen. Wenn man die Markierungsmuster der Aminosäuren im *Nicotiana tabacum* und *Catharanthus roseus* im Zusammenhang der früher bestimmten oder vermuteten Biosynthesen in Pflanzen analysiert, fällt auf, dass Lysin sich keiner bekannten Biosynthese zuordnen lässt.

Bei dem Einbauversuch in *Fossombronia* wird Lysin über den Diaminopimelat-Weg synthetisiert (Rieder, 1999). Somit scheint es auch zwischen den Pflanzen Unterschiede bei der Lysinbiosynthese zu geben.

Es war nicht möglich einen Synthesevorschlag mit den vorliegenden Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite für das Lysin in *Nicotiana tabacum* bzw. in *Catharanthus roseus* zu machen.

3.4 Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus Pflanzen und Mikroorganismen verschiedene Verbindungen aus der Gruppe der Terpene (S.54), sowie das Alkaloid Nicotin (**43**) aus *Nicotiana tabacum* isoliert (Abbildung 49).

Die Terpene wurden mit Methanol/Dichlormethan (1/1, v/v) bzw. Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v) extrahiert. Das erstgenannte Lösungsmittelgemisch hat eine günstigere Zusammensetzung zur Isolierung der polaren Chlorophylle neben den unpolaren Carotinoiden. Vorallem die gute Löslichkeit von β -Carotin in Dichlormethan macht es zu einem vorzüglichen Extraktionsmittel. Bei dem Lösungsmittelgemisch Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v) wurde üblicherweise etwas mehr Lösungsmittel benötigt um die polaren Carotinoide zu isolieren. Es hat sich jedoch durch die spätere Verwendung als Fließmittel bei der Säulenchromatographie als sinnvoller erwiesen.

Zur Auftrennung der isolierten Lipid-Fractionen wurden zwei verschiedene Kieselgelsäulen eingesetzt. Ein Vergleich zeigte, dass bei der Säulenchromatographie mit Kieselgel 40 bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Hexan, Dichlormethan und Methanol/Dichlormethan/Wasser (6/3/1, v/v/v) als Fließmittel nur zwei Fraktionen eluiert wurden. Die Carotinoide und das Chlorophyll wurden optimal voneinander getrennt, jedoch erfolgte keine Trennung der Carotinoide untereinander. Zusätzlich wurden mit der Chlorophyll-Fraktion alle anderen polaren Verbindungen vereinigt, die bei der Kieselgel 60 Säule erst in der Methanol-Front von der Säule eluierten. Die bei Raumtemperatur durchgeführte Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Hexan/Ethylacetat (1/1, v/v), Ethylacetat und Methanol ergab eine bessere Auftrennung der einzelnen Bestandteile. Nach Abtrennung der ersten beiden Fraktionen (1. Fraktion (rot): β -Carotin bzw. unpolare Carotinoide; 2. Fraktion (grün): Chlorophylle und Sterole) konnte bald nach dem Wechsel des Lösungsmittels eine 3. Fraktion (gelb, Lutein bzw. polare Carotinoide) eluiert werden. Alle Verbindungen, die sich dann noch auf der Säule befanden, wurden mit Methanol eluiert.

Die analytische und präparative HPLC wurde an einer RP-18 Säule durchgeführt. Zu Beginn wurden Fließmittel mit unterschiedlichen Aceton Konzentrationen eingesetzt. Das System stellte sich als ungeeignet für höhere Carotinoid-Konzentrationen heraus. Im Laufe der Arbeiten hat sich reines Methanol, vorallem für die präparative HPLC, durch seine Reinheit, seine Verfügbarkeit im Lehrstuhl, sowie seine besseren gerätetechnischen Eigenschaften, als vorteilhafter herausgestellt.

Sekundärstoffwechsel

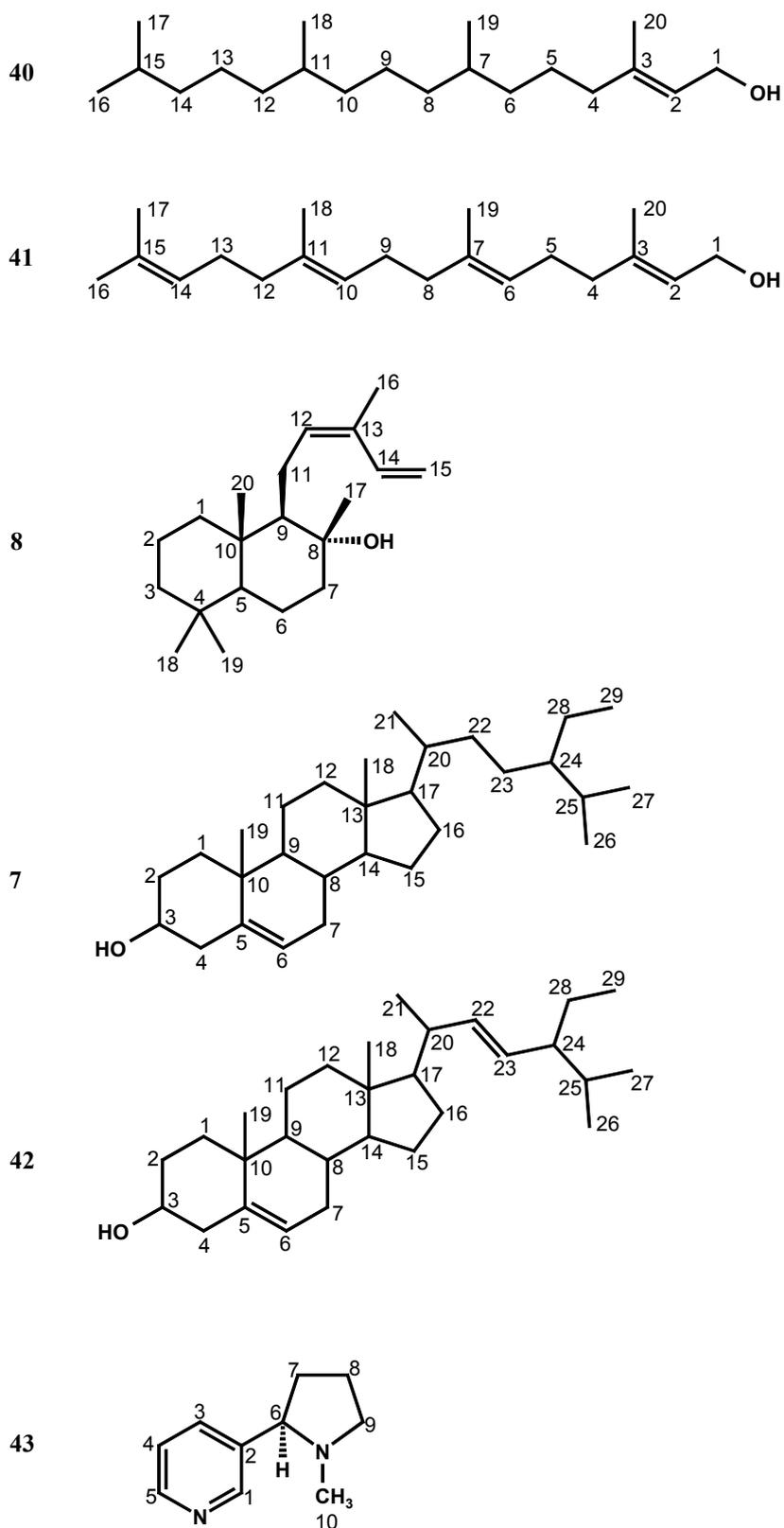


Abbildung 49. Im Rahmen dieser Arbeit isolierte und NMR spektroskopisch analysierte sekundäre Stoffwechselprodukte aus der Familie der Terpene: Phytol (**40**), Geranylgeraniol (**41**), *cis*-Abienol (**8**), Sitosterol (**7**), Stigmasterol (**42**), sowie Nicotin (**43**) aus der Familie der Alkaloide.

3.4.1 Biosynthesewege ausgewählter Sekundärstoffwechselprodukte

3.4.1.1 Geranylgeraniol, Phytol und *cis*-Abienol

Die Biosynthesen der drei Terpene Geranylgeraniol (**41**), Phytol (**40**) und *cis*-Abienol (**8**) erfolgt, gemäß Literatur, über die Zwischenstufe Geranylgeranyldiphosphat (Abbildung 50; Guo, *et al.*, 1994; Michal, 1999). Geranylgeranyldiphosphat (**5**) ist der biosynthetische Vorläufer aller Diterpene und der Carotinoide (Mann, 1980; Herbert, 1981). Gebildet wird es über Kondensation eines DMAPP (**1**) und drei IPP (**2**) Molekülen (Abbildung 50).

Geranylgeraniol kommt unter anderem als Seitenkette in Ubichinonen, Plastochinonen und Rhodochinonen vor (Falbe und Regitz, 1998).

Phytol (**40**) wird biosynthetisch aus dem Vorläufer Geranylgeranyldiphosphat (**5**) gebildet (Abbildung 50; Michal, 1999). Phytol ist ein optisch aktiver Diterpen-Alkohol mit der Konfiguration (*2E*, *7R*, *11R*). Das mit Porphyrin bzw. Phäophorbid veresterte Phytol bildet den lipophilen Bestandteil des Chlorophylls bzw. des Phäophytins und ist somit ein Bestandteil aller grünen Pflanzen. Des Weiteren ist Phytol in den Vitaminen E und K₁ enthalten (Falbe und Regitz, 1998).

In den zwei Kieselalgen *Phaeodactylum tricornutum* und *Nitzschia ovalis* konnte bewiesen werden, dass CO₂ die eigentliche Kohlenstoff-Quelle für Phytol in den Chloroplasten ist. Die Biosynthese in den Algen erfolgt über den Deoxyxylulosephosphatweg (Cvejic und Rohmer, 2000).

Das cyclische Diterpen *cis*-Abienol (**8**) wird aus der allgemein anerkannten Vorstufe dieser Terpengruppe, aus all-trans Geranylgeranyldiphosphat (**44**) synthetisiert (Abbildung 50). Die cyclische Oxidation zum *cis*-Abienol erfolgt über ein lösliches, in den Trichomen lokalisiertes Enzym, das typische Eigenschaften einer Terpencyclase aufweist (Guo, *et al.*, 1994). Da natürliches *cis*-Abienol nur in optisch reiner Form vorliegt (Carman und Duffield, 1993), wird von einem sterisch festgelegten Zyklisierungsmechanismus ausgegangen.

Das für Biosynthese des *cis*-Abienol im Tabak benötigte Geranylgeranyldiphosphat wird über den in den Chloroplasten ablaufenden, Deoxyxylulosephosphatweg für die Terpenbiosynthese zur Verfügung gestellt (Lichtenthaler, 1999; Wang und Wagner, 2003). Im Tabak kommt *cis*-Abienol, neben weiteren Diterpenen (dicyclische Labdanoide und macrocyclische Cembrenoide) ausschließlich in den Trichomen vor (Severson *et al.*, 1985). Trichome sind spezialisierte Epidermiszellen, deren Sekrete zur Bekämpfung von Schädlingen und

Sekundärstoffwechsel

Pathogenen eingesetzt werden (Duffey, 1986; Wagner, 1991). Trichome von Pflanzen sind eine spezialisierte Struktur, die sich auf der Oberfläche einiger blühender Pflanzen befindet. Sie sind als erste Verteidigungslinie gegen Insekten, pathogene Mikroorganismen und Pflanzenfresser gedacht (Wang und Wagner, 2003).

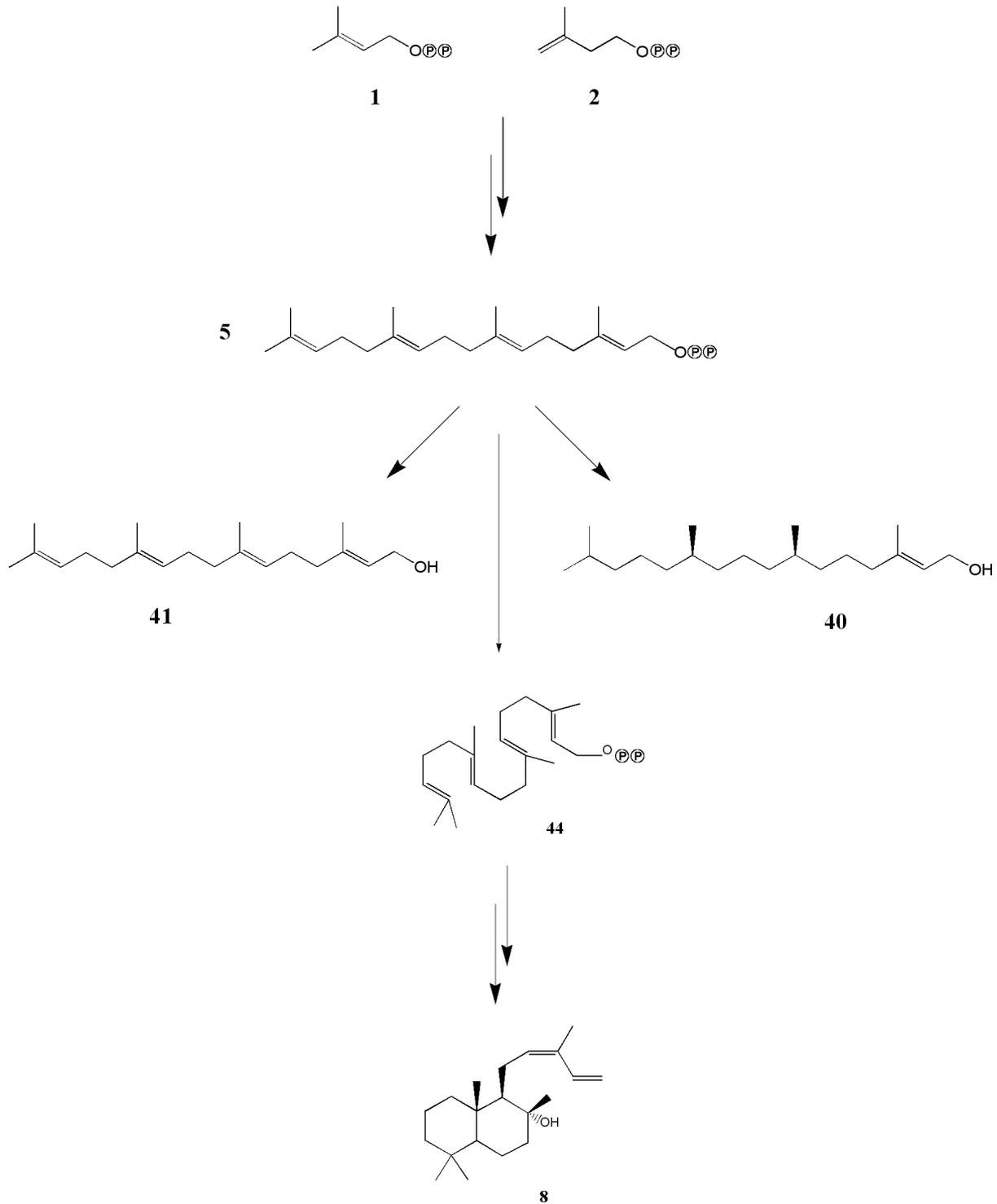


Abbildung 50. Biosynthese von Diterpenen, am Beispiel von Geranylgeraniol (**41**), Phytol (**40**) und *cis*-Abienol (**8**).

Sekundärstoffwechsel

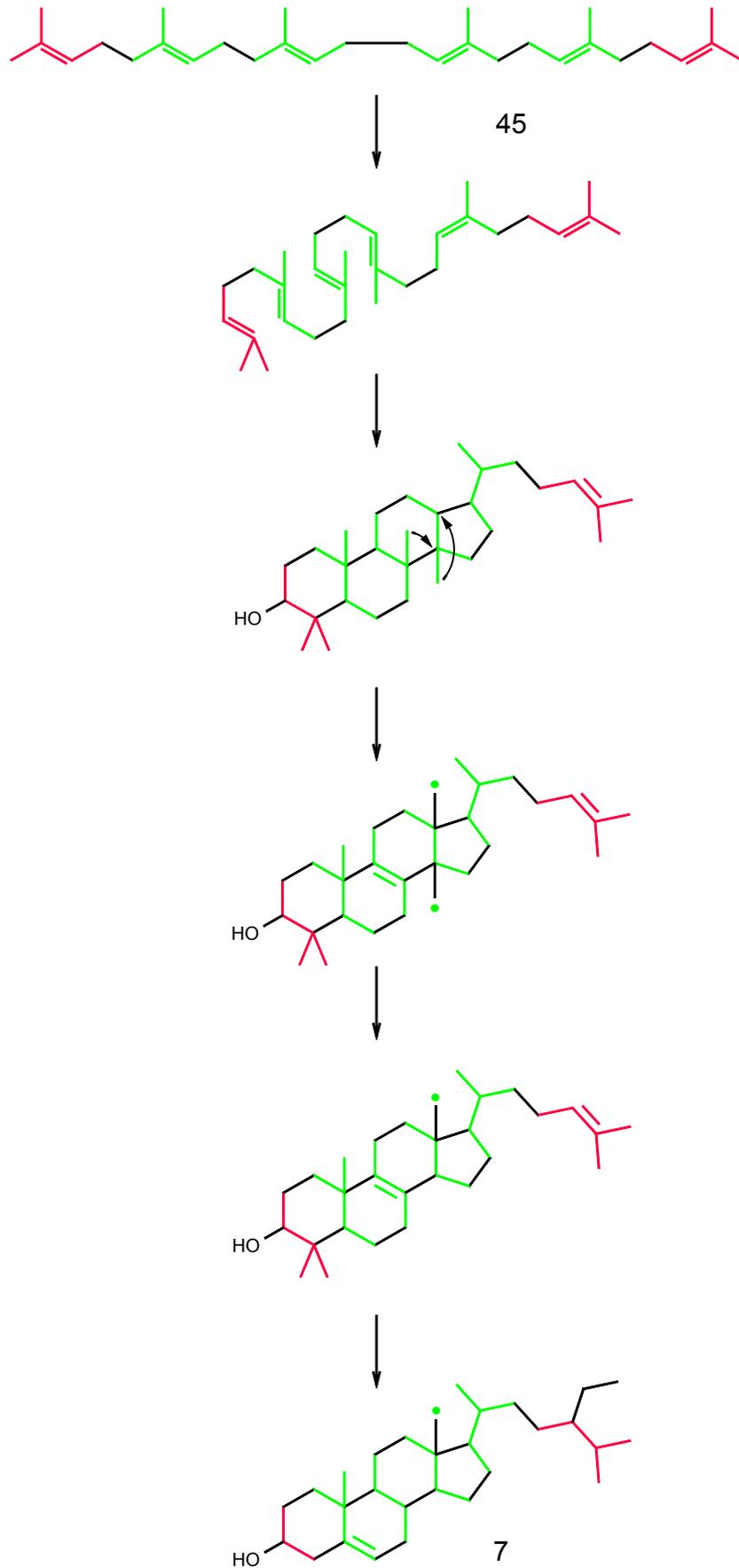


Abbildung 51. Biosynthese von Sitosterol (7) (DMAPP: rot; IPP: grün; Michal, 1999).

3.4.1.2 Sterole

Die Biosynthese der Sterole führt über Kondensation von zwei DMAPP und vier IPP Molekülen zum Squalen (45). Über eine Reaktionskaskade bildet sich aus dem linearen Zwischenprodukt das Ringsystem der Sterole (Abbildung 51). Durch unterschiedliche Anzahl und Lage der Doppelbindungen, sowie der Substituenten werden die Vertreter der Stoffklasse gebildet (Michal, 1999).

Untersuchungen des Sterolstoffwechsels zeigten, dass Leucin scheinbar komplett in Sterole inkorporiert wird. Es wurde keine Umsetzung in Acetyl-CoA über die Intermediatbildung des HMG-CoA mit anschließender Konvertierung im Mevalonatweg beobachtet (Ginger *et al.*, 2001). Diese Vorgänge finden bei Pflanzen und Tieren in den Mitochondrien statt.

In höheren Pflanzen wird Sterol im Cytosol über den Mevalonatweg gebildet, während in den Plastiden die Isoprenoide über den Deoxyxylulosephosphatweg gebildet werden (Disch *et al.*, 1998b; Schwender *et al.*, 2001).

Die in Pflanzen gebildeten Sterole werden auch als Phytosterole bezeichnet. Die wichtigsten Vertreter sind Ergosterol, Stigmasterol und Sitosterol. Die, meist aus pflanzlichen Ölen, isolierten Sterole dienen als Ausgangsprodukte für die synthetische Herstellung von Steroiden, wie Corticoid, Estrogen und anderen Sexualhormonen. Sitosterol bildet mit Cholesterin einen Komplex, der die Darmwand nicht passieren kann und wird deswegen als Lipidsenker, als Prophylaxe für Arteriosklerose und Hyperlipidämie, sowie gegen Prostatabeschwerden eingesetzt (Falbe und Regitz, 1998).

3.4.1.3 Nicotin

Nicotin kommt in Konzentrationen zwischen 0,05 % (Virginia-Tabak) und 7,5 % (russ. „Machorka“) in Tabakpflanzen (*Nicotiana spec.*), sowie in geringeren Konzentrationen in anderen Pflanzen (Asclepia-, Bärlapp-, Schachtelhalm-, Duboisia-Arten) vor (Falbe und Regitz, 1989). Es ist ein starkes Humangift und ist bereits bei 40-60 mg (oral) für einen Erwachsenen tödlich. Das Alkaloid beeinträchtigt das Zentralnervensystem. Bei Überdosen kommt es zum Tod durch Atemlähmung (Falbe und Regitz, 1989).

Die Nicotinbiosynthese findet bei den Tabakpflanzen in den wachsenden Wurzelspitzen statt (Wagner, 1987). Hier wird Nicotin durch Kondensation von zwei Vorstufen gebildet. Das *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium-Kation reagiert mit einer Verbindung aus dem Pyridin-Nucleotid-Zyklus, bei der es sich vermutlich um die Nicotinsäure handelt. Die Betrachtung verschiede-

ner regulierender Enzyme im dem Pyridin-Nucleotid-Zyklus bestätigen die Vermutung, dass Nicotinsäure der Schlüsselmetabolit aus dem Zyklus für die Synthese zum Nicotin ist. Dies konnte indirekt durch Einbauversuche mit Nicotinsäure an Zellkulturen bestätigt werden. Erst nach Verbrauch der zugesetzten Nicotinsäure treten gesteigerte Enzymaktivitäten im Pyridin-Nucleotid-Zyklus auf (Wagner, 1987). Leete und Coworkers lehnen die Nicotinamidnucleotide NAD und NADP aus dem Pyridin-Nucleotid-Zyklus als Vorstufen für Nicotin ab, wegen ihres ubiquitären Vorkommens in der Natur (Leete, 1977).

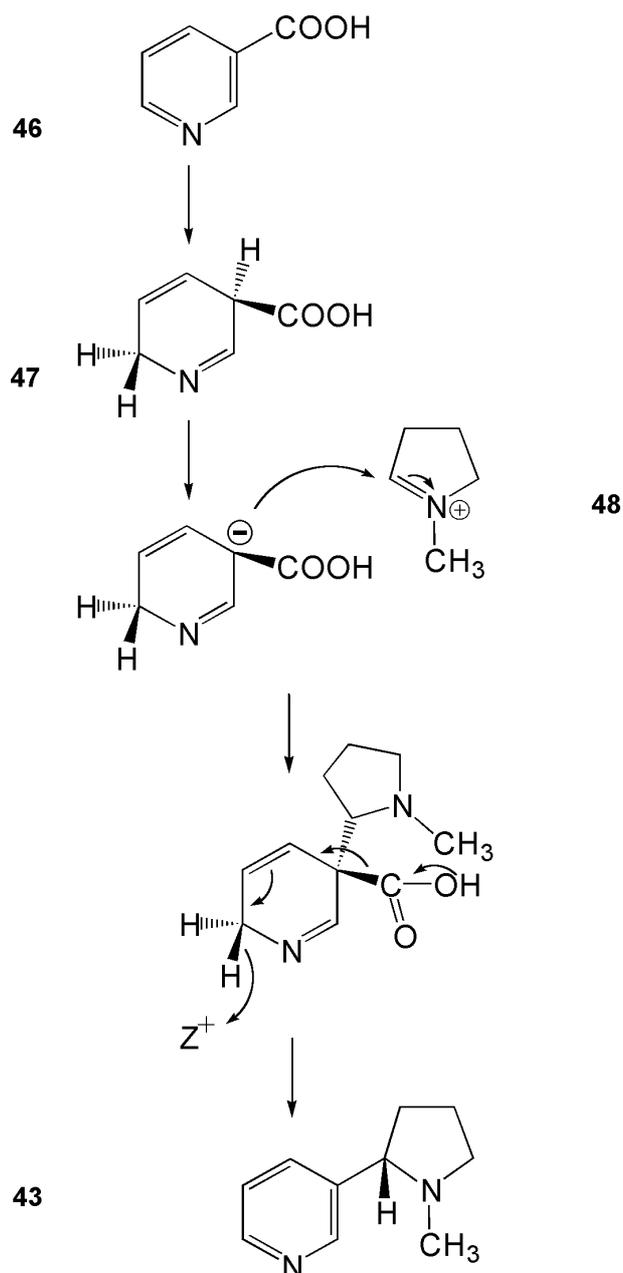


Abbildung 52. Postulierter Mechanismus des Biosynthesewegs zum Nicotin (**43**): Kondensation von Nicotinsäure (**46**) und Methyl- Δ^1 -pyrrolium-Kation (**48**) (Leete, 1977).

Die Enzymologie der Kondensation zum Nicotin ist unbekannt (Wagner, 1987). In einem von Leete und Coworkers postuliertem Mechanismus für die Bildung von Nicotin erfolgt die Aktivierung der meta-Position in der Nicotinsäure (**46**) durch Reduktion zum Dihydro-Derivat (Abbildung 52). Als aktive Form der Nicotinsäure bei der Kondensation mit dem *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium-Kation (**48**) wird die 3,6-Dihydronicotinsäure (**47**) diskutiert (Abbildung 52, Leete, 1977). Das gleiche Intermediat wurde auch schon von Dawson als das wahrscheinlichste Intermediat zwischen Nicotinsäure und Nicotin erachtet (Dawson, 1962; Dawson und Osdene, 1972).

Es wird erwartet, dass die biochemische Reduktion der Nicotinsäure stereospezifisch erfolgt. Die im postulierten Mechanismus von Leete und Coworkers dargestellte Stereochemie der einführenden Reduktion in Abbildung 52 ist in dieser Form nicht bewiesen. Die 3,6-Dehydronicotinsäure (**47**) ist eine β -Iminosäure und es wird angenommen, dass sie wie eine β -Ketosäure ein Proton verliert um ein Carboanion zu bilden. Bei der Reaktion des Carboanions mit *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium-Kation (**48**) bildet sich eine Zwischenstufe, die unter Decarboxylierung und unter Verlust des Protons am C-5, in Nicotin (**43**) übergeht. Das frei werdende Proton wird von einem nicht näher definierten Protonen-Akzeptor (Z^+) entfernt (Leete, 1977).

Die Biosynthese des *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium-Kation (**48**) erfolgt, ausgehend von den Aminosäuren Ornithin (**49**) und/oder Arginin (Abbildung 53, **50**; Wagner, 1987). Welche der beiden Aminosäuren als Ausgangsverbindung des Syntheseweges im Tabak bevorzugt wird, ist noch nicht endgültig geklärt. Hinweise sprechen für die Arginin-Route (Tiburcio und Galston, 1986). Arginin (**50**) reagiert über sein Amid Agmatin zu Carbamoylputrescin und weiter zum symmetrischen Putrescin (**51**), aus dem anschließend über *N*-Methyl-4-aminobutanal das *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium-Kation (**48**) gebildet wird (Abbildung 53). Hierbei scheint die Arginindecarboxylase das wichtigste Enzym zu sein (Wagner, 1987).

Der Biosyntheseweg des *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium-Kations (**48**) ist über Tracer Experimente in ganzen Pflanzen (Dewey *et al.*, 1955; Leete, 1955, 1958, 1967; Leete und McDonell, 1981) und Gewebekulturen (Kisaki *et al.*, 1966) von *Nicotiana tabacum*, sowie über enzymatische Studien (Mizusaki *et al.*, 1971; Mizusaki *et al.*, 1972) nachgewiesen worden. Durch selektive Deuterierung konnte bewiesen werden, dass es bei der *N*-Methylierung und Oxidation von Putrescin (**51**) zum Verlust des pro-S Wasserstoffes am C-4 kommt. Das entstandene *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium-Kation (**48**) wird an der 1-si, 2-re Seite von der Vorstufe der

Pyridin-Einheit angegriffen und es entsteht (S)-Nicotin (Abbildung 52, 43; Wigle *et al.*, 1982).

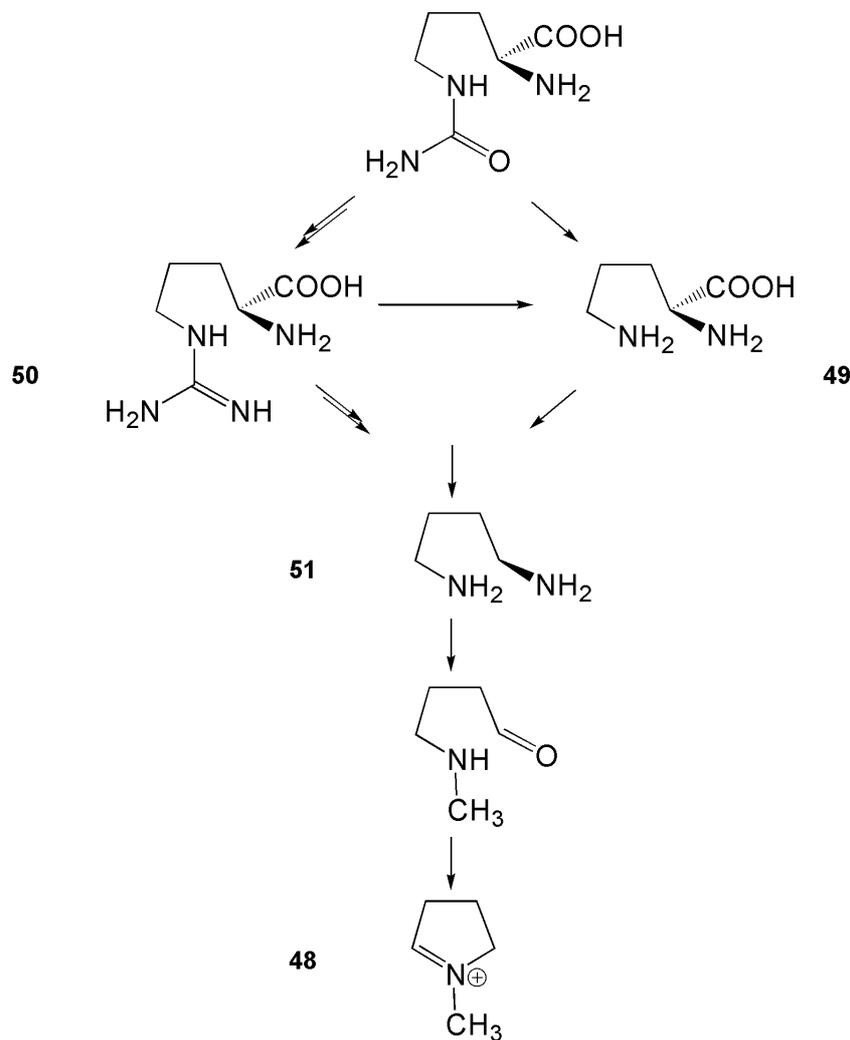


Abbildung 53. Biosynthese des *N*-Methyl- Δ^1 -pyrrolium-Kation (48).

Es werden in Bakterien, Tieren und Pflanzen drei verschiedene Biosynthesewege für Nicotinsäure bzw. für die Verbindungen des Pyridin-Nucleotid-Zyklus als Zwischenstufe der Nicotinbiosynthese beschrieben (Review: Forster und Moat, 1980). Die drei Biosynthesewege der Pyridin-Einheit im Nicotin unterscheiden sich nur bis zur Bildung des Chinolinats (52), der Eingangsverbindung in den Pyridin-Nucleotid-Zyklus, beschrieben (Abbildung 55).

In höheren Pflanzen und *E. coli* erfolgt die Synthese von Chinolinat (52) ausgehend von Glycerinaldehyd-3-phosphat (16) und Aspartat (Abbildung 55, 53, oben; Wagner, 1987; Luckner, 1990; Review: Forster und Moat, 1980).

Die Bildung von Chinolinat aus Aspartat (53) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (16) wird als die primitivste Biosynthese angesehen (Review: Forster und Moat, 1980). Man vermutet, dass

Sekundärstoffwechsel

sich die frühen Biosynthesewege zu den Coenzymen vor der Anwesenheit von Enzymen etabliert haben. Es konnte bewiesen werden, dass sich Chinolinat (**52**) (Ausbeute 7 %) nicht enzymatisch in einer sechs stufigen Reaktion aus Aspartat (**53**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**16**) bildet (Abbildung 54; Cleaves und Miller, 2001).

Der von Cleaves und Miller beschriebene nicht enzymatische Mechanismus ist nur eine Möglichkeit des Reaktionsverlaufs. Die Intermediate bei der Cyclisierung und der Aromatisierung sind unbekannt. Bei Anwesenheit von Aspartat und Ribose bzw. Desoxyribose wurden, unter den gleichen Reaktionsbedingungen, auch die Bildung von Chinolinat und Nicotinsäure beobachtet (Cleaves und Miller, 2001).

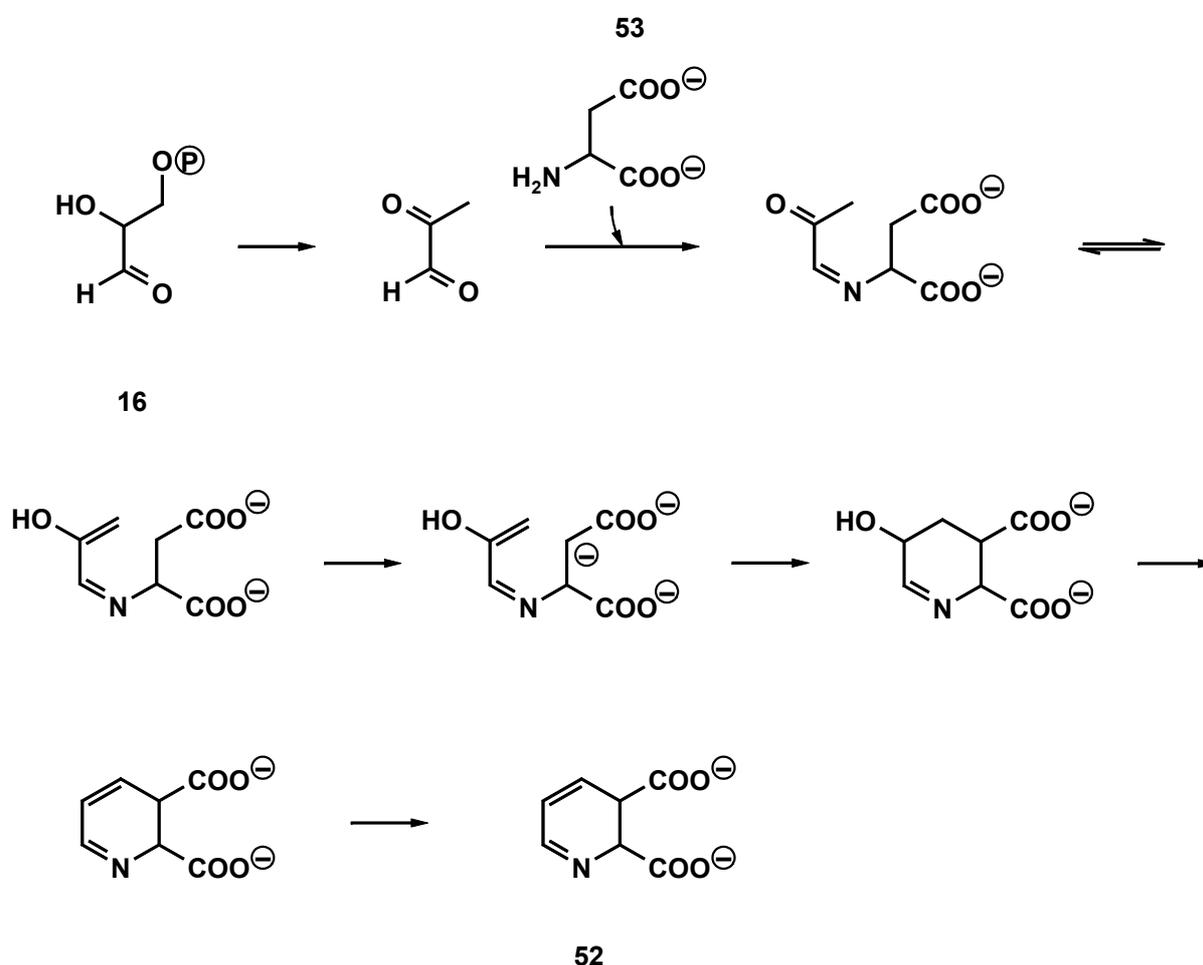


Abbildung 54. Diskutierter Mechanismus einer nicht enzymatischen Bildung von Chinolinat (**52**) aus Aspartat (**53**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**16**) (Cleaves und Miller, 2001).

Sekundärstoffwechsel

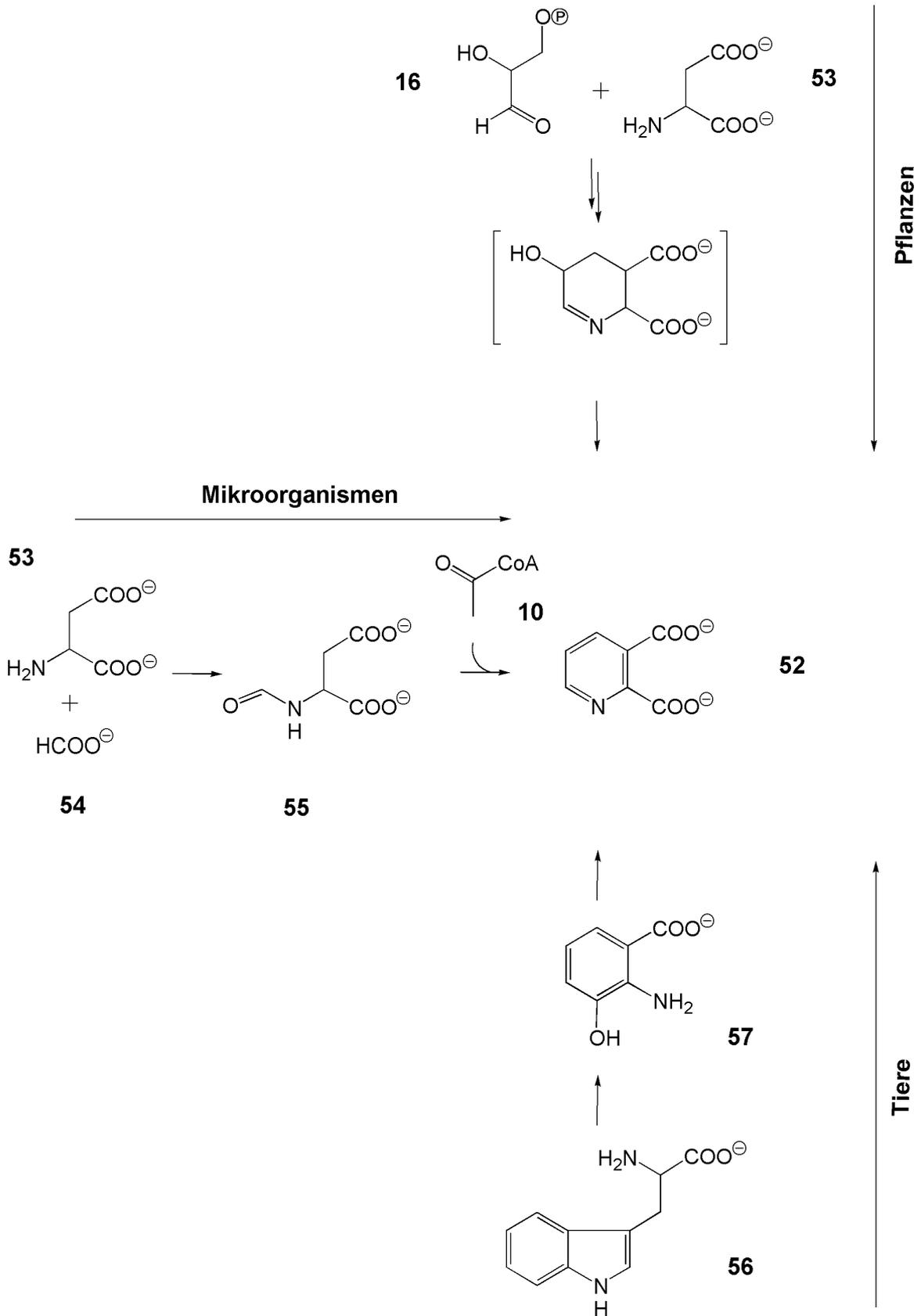


Abbildung 55. Biosynthesewege in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren zum Chinolinat (52).

Die anaerobe Biosynthese des Chinolinat (**52**) aus Aspartat (**53**), Formiat (**54**) und Acetyl-CoA (**10**) wurde bis jetzt nur in Clostridien, obligat anaerobe Bakterien, beobachtet (Gaertner und Shetty, 1977; Wagner, 1987; Review: Forster und Moat, 1980).

Die Kondensation von Aspartat (**53**) und Formiat (**54**) bildet N-Formylaspartat (**55**), dem anschließend mit Acetyl-CoA (**10**) der Ringschluss zum Chinolinat (**52**) folgt (Abbildung 55, links).

Die Eukaryonten sind auf die aerobe Biosynthese des Chinolinats (**52**), ausgehend vom Tryptophan (**56**), beschränkt (Cleaves und Miller, 2001; Wagner, 1987). Beim Säugetier erfolgt die Reaktion in der Leber. Die Biosynthese wurde unter anderem bei dem Bakterium *Xanthomonas pruni*, dem Pilz *Neurospora* und bei Hefen beobachtet (Wagner, 1987; Review: Foster und Moat, 1980).

Der Pyrrolidin-Ring des Tryptophans (**56**) wird aerob geöffnet. Durch die Abspaltung von Formiat wird Kynurenin gebildet. Kynurenin kann anschließend katabolisch weiter über Anthranil abgebaut werden oder über 3-Hydroxyabthranilat (**57**) zu Chinolinat (**52**) weiterreagieren (Abbildung 55, unten). Es besteht die Hypothese, dass die Enzyme der Biosynthese von Chinolinat, ausgehend vom Tryptophan, sich aus Enzymen des Katabolismus entwickelt haben. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Enzymen der Biosynthesewege, bei niedriger und höher entwickelten Organismen, könnten ein Zeichen der Anpassung der Enzyme an ihre anabole Rolle, im Rahmen der Evolution, sein (Gaertner und Shetty, 1977).

3.4.2 Einbauexperiment mit [1,2-¹³C₂]Glycin in *Chloroflexus aurantiacus*

Aufgrund seiner phylogenetischen Sonderstellung ist das Eubakterium *Chloroflexus aurantiacus* von besonderem Interesse. Bei ersten Untersuchungen der Terpene des Eubakteriums, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Bacher, konnte durch Markierungsexperimente mit ¹³C-markiertem Acetat und Glycerin die Biosynthese des Diterpen Verrucosan-2β-ol über den Mevalonatweg bewiesen werden (Abbildung 56; Rieder, 1999; Bacher *et al.*, 1999; Eisenreich *et al.*, 1993).

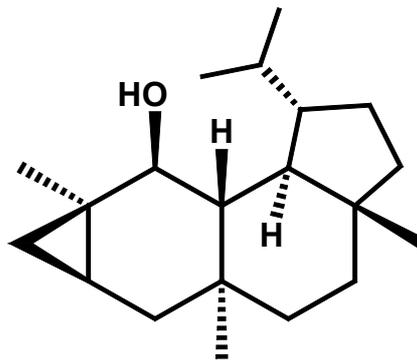


Abbildung 56. Verrucosan-2β-ol.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Terpene aus *Chloroflexus aurantiacus* isoliert und identifiziert. Die Terpene wurden im Einbauversuch mit 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin hinsichtlich ihrer Biosynthesewege untersucht.

Messergebnisse

Die Zusammensetzung der Lipid-Fraktion von *Chloroflexus aurantiacus* ist weitgehend unbekannt. Für die Isolierung der Terpenoide wurde der Lipid-Extrakt von *Chloroflexus aurantiacus* (20 g, nicht lyophilisiert, unmarkiert) über Säulenchromatographie an Kieselgel 60 aufgetrennt. Von den vier verschiedenfarbigen Fraktionen (F1: gelb, F2: grün, F3: braun, F4 (Methanol-Front): grün/braun) wurden anschließend an der HPLC mit Dioden-Array die UV-Spektren aufgenommen.

Beim Vergleich der UV-Spektren mit den Daten aus *Beta vulgaris* und der Literatur (Halfen, 1972) konnten β-Carotin (F1), γ-Carotin (F1) und Bakteriochlorophylle c (F2) identifiziert werden (Tabelle 27).

Die NMR Spektren der Bakteriochlorophylle sind für eine direkte Auswertung der terpenoiden Seitenketten zu komplex. Die Kohlenstoffatome im Porphyrin-Ring überlagern die Signale der Seitenkette. Die Seitenketten des Bakteriochlorophylls wurden für die Auswer-

tung am Propionsäure-Rest mit 3 % methanolischer KOH abgespalten. Das Hauptphotosynthesepigment in *Chloroflexus aurantiacus* ist mit 59 % das Bakteriochlorophyll mit Stearol (R₁) als Seitenkette. Daneben sind Bakteriochlorophylle mit Geranylgeraniol (14 %, R₃) und Phytol (7 %, R₂) als Seitenketten in *Chloroflexus aurantiacus* enthalten (Abbildung 57; Risch *et al.*, 1979).

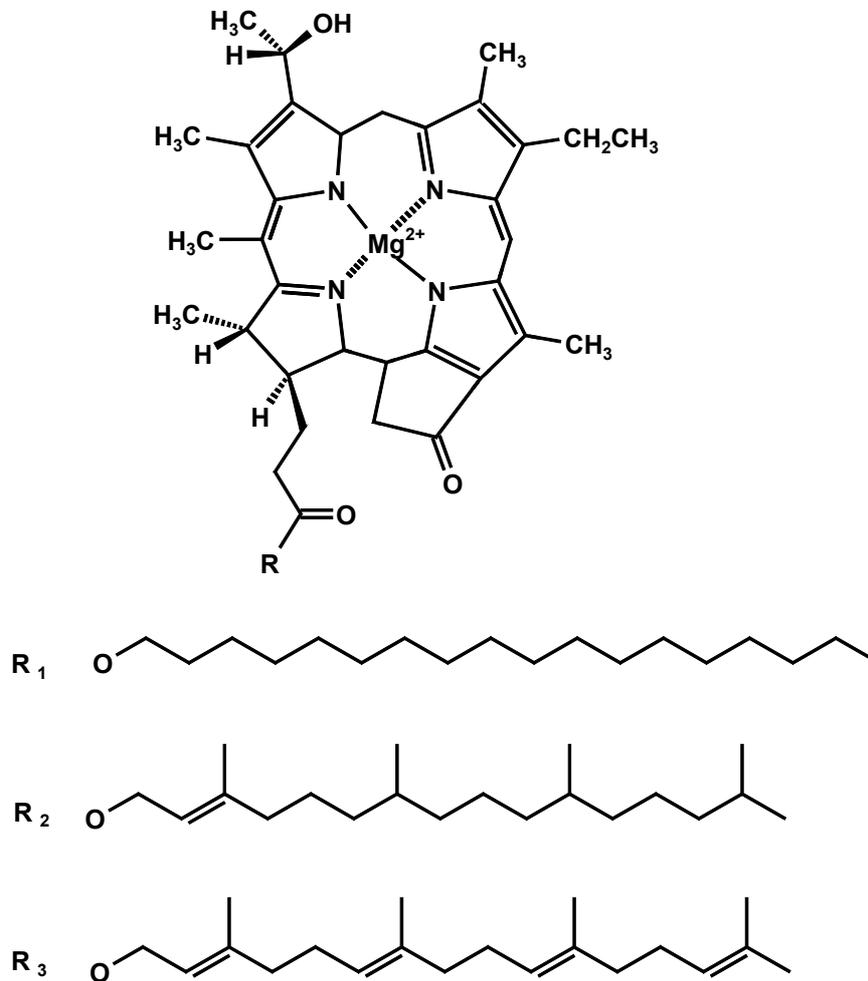


Abbildung 57. Bakteriochlorophylle (R₁: Stearyl-, R₂: Phytol-, R₃: Geranylgeranyl-)

Das Zellmaterial (2,6 g, lyophilisiert) aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin wurde über Kieselgel 40 bei -10 °C aufgearbeitet. Vergleichende Chromatographieläufe zeigten, dass die Auftrennung der Verbindungen an Kieselgel 40 deutlich schlechter war, als mit Kieselgel 60.

Die Menge an γ -Carotin und β -Carotin erwies sich für die NMR spektroskopische Messung als zu gering. Aus dem Rückstand der Verseifung mit 3 % methanolischer KOH konnten Geranylgeraniol und Phytol über HPLC isoliert und NMR spektroskopisch identifiziert werden. Das Markierungsmuster von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus*

Sekundärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

aurantiacus mit 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin ist in Tabelle 28 und Abbildung 58 (A) zusammengefasst. Das Markierungsmuster von Phytol ist in Tabelle 29 und Abbildung 58 (B) zusammengefasst.

Tabelle 27. UV-Spektren der isolierten Verbindungen aus *Chloroflexus aurantiacus* und Literaturwerte.

Verbindungen	λ max ¹⁶ [nm]			Literatur
β -Carotin	430	451 ¹⁷	476	(Halfen, 1972)
γ -Carotin	440	461	491	(Halfen, 1972)
Bakteriochlorophyll a	357	392	573	(Sauer <i>et al.</i> , 1966)
Bakteriochlorophyll c	385	415	445	(Brune <i>et al.</i> , 1987)
Fraktion 1	437	464	494	γ -Carotin
Fraktion 1	429	454	481	β -Carotin
Fraktion 2	391	415	435	BChl c
Fraktion 2	383	413	519	BChl

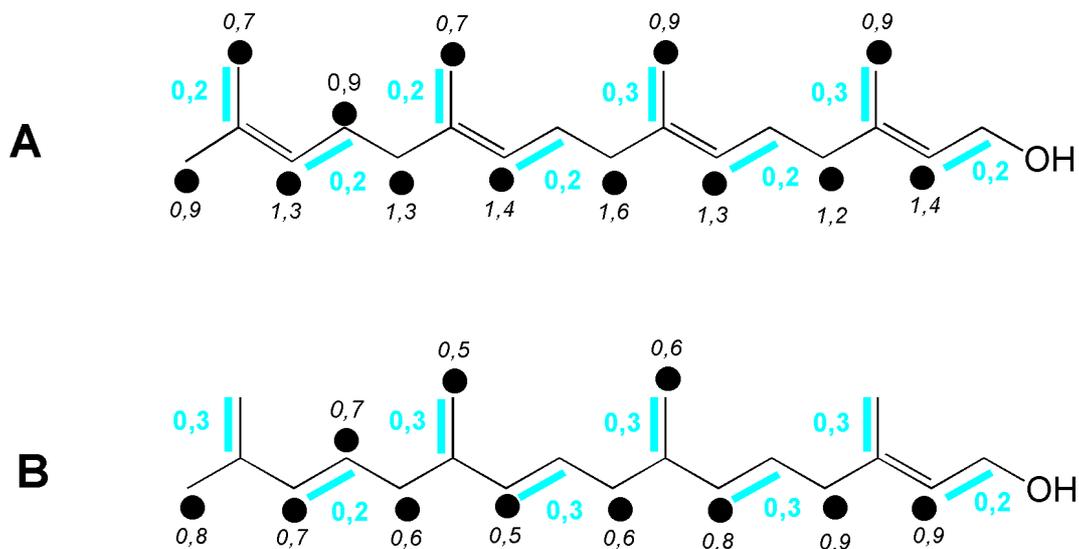


Abbildung 58. Kopplungsmuster von Geranylgeraniol (A) und Phytol (B) aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus [1,2-¹³C₂]Glycin, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

¹⁶ in Aceton

¹⁷ Die Maxima sind hervorgehoben.

Geranylgeraniol und Phytol weisen ausschließlich [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe auf. Im NMR Spektrum der beiden Verbindungen sind keine Fernkopplungen zu beobachten (Abbildung 59).

Die [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe von Phytol mit 0,3 mol% weisen eine höhere Konzentration als Geranylgeraniol mit 0,2 mol% auf. Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe ist im Phytol mit 0,7 % niedriger, als im Vergleich dazu die [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe im Geranylgeraniol mit 1,1 % (Abbildung 58).

Gemäß der Literatur ist Geranylgeraniol der biosynthetische Vorläufer der Diterpene (C_{20} ; Herbert, 1981; Mann, 1980). Es kann davon ausgegangen werden, dass Phytol im Stoffwechsel aus Geranylgeraniol gebildet wird. Die Markierungsmuster von Geranylgeraniol und Phytol sind im vorliegenden Einbauversuch vergleichbar. Somit bestätigt der Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]Glycin die biosynthetische Verknüpfung der Diterpene am Beispiel von Geranylgeraniol und Phytol.

Tabelle 28. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]Glycin.

Position	chem.	Kopplungskonstante ¹⁸	Häufigkeit Kopplung	
	Verschiebung δ [ppm]		J_{CC} [Hz]	% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1 ¹⁹	59,4	47,6 (2)	n.d.	n.d.
2	124,3	43,3 (1)	2,7	6,8
3	139,9	41,6 (20)	1,7	11,0
4	39,7		2,3	
5	26,7	n.d. (6)	n.d.	n.d.
6	124,1	44,0 (5)	2,6	6,7
7	135,4	42,1 (19)	1,7	13,4
8	39,7		2,7	
9	26,6	n.d. (10)	n.d.	n.d.
10	123,7	43,9 (5)	2,7	7,2
11	135,0	42,2 (18)	1,8	11,0
12	39,6		2,4	
13	26,3	43,8 (14)	2,2	7,9
14	123,2	47,4 (13)	2,6	6,7
15	131,3	42,2 (17)	1,8	13,3
16/17	17,7	42,2 (17)	2,0	12,1
18	16,3	41,7 (11)	2,0	12,8
19/20	16,0	43,7 (3, 7)	2,3	13,3

¹⁸ Kopplungspartner in Klammern

¹⁹ Position C-1 von Phytol und Geranylgeraniol überlagern sich im gemeinsamen NMR Spektrum.

Tabelle 29. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Phytol aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin.

Position	chem.	Kopplungskonstante ²⁰	Häufigkeit Kopplung	
	Verschiebung δ [ppm]		J_{CC} [Hz]	% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1 ²¹	59,4	47,6 (2)	n.d.	n.d.
2	123,0	47,7 (1)	2,2	10,9
3	140,3	41,8 (20)	1,9	17,5
4	39,8		2,0	
5	25,1	33,8 (6)	1,9	15,0
6	36,6	34,9 (5)	2,2	12,3
7	32,7	35,3 (19)	1,7	18,7
8	37,3		1,7	
9	24,4	39,3 (10)	1,7	18,0
10	37,4	34,5 (5)	1,9	15,0
11	32,8	37,6 (18)	n.d.	n.d.
12	37,3		1,7	
13	24,78	36,4 (14)	2,0	13,8
14	39,3	34,7 (13)	2,0	10,5
15	28,0	35,1 (17)	1,9	16,8
16	22,7		1,9	
17	22,7	34,8 (15)	n.d.	16,8
18	19,7	35,3 (11)	1,9	17,4
19	19,7	35,2 (7)	2,0	17,5
20	16,2	39,6 (3)	n.d.	n.d.

Retrobiosynthese

Mit den NMR spektroskopischen Daten der Aminosäuren und Nukleosiden (S.76), aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin wurden die Markierungsmuster der zentralen Stoffwechselmetabolite bestimmt (Acetyl-CoA, α -Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Phosphoenolpyruvat, u.a.; Tabelle 12 und Abbildung 24). Unter Verwendung der Zentralmetabolite ist es möglich die hypothetischen Markierungsmuster von IPP und DMAPP, den Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese, über die beiden bekannten Biosynthesewege zu rekonstruieren (Abbildung 3 und Abbildung 4). Die hypothetischen Daten von IPP und DMAPP aus den beiden Biosynthesen Mevalonatweg (C) und Deoxyxylulosephosphatweg (D) sind in Tabelle 30 und Abbildung 60 zusammengefasst.

²⁰ Kopplungspartner in Klammern

²¹ Position C-1 von Phytol und Geranylgeraniol überlagern sich im gemeinsamen NMR Spektrum.

Sekundärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

Der Mevalonatweg synthetisiert aus drei Acetyl-CoA Molekülen (rekonstruiert aus den Aminosäuren Leucin, Glutamat, Prolin, Arginin und Lysin, Tabelle 12) die Vorstufen IPP und DMAPP (Abbildung 60, C). Bei der hypothetischen Rekonstruktion von IPP und DMAPP mit dem retrobiosynthetisch abgeleiteten Acetyl-CoA entstehen $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe mit einer Konzentration von 0,28 mol%, sowie $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe an den Positionen C-2, C-4 und C-5 mit einer Anreicherung von 1,3 %.

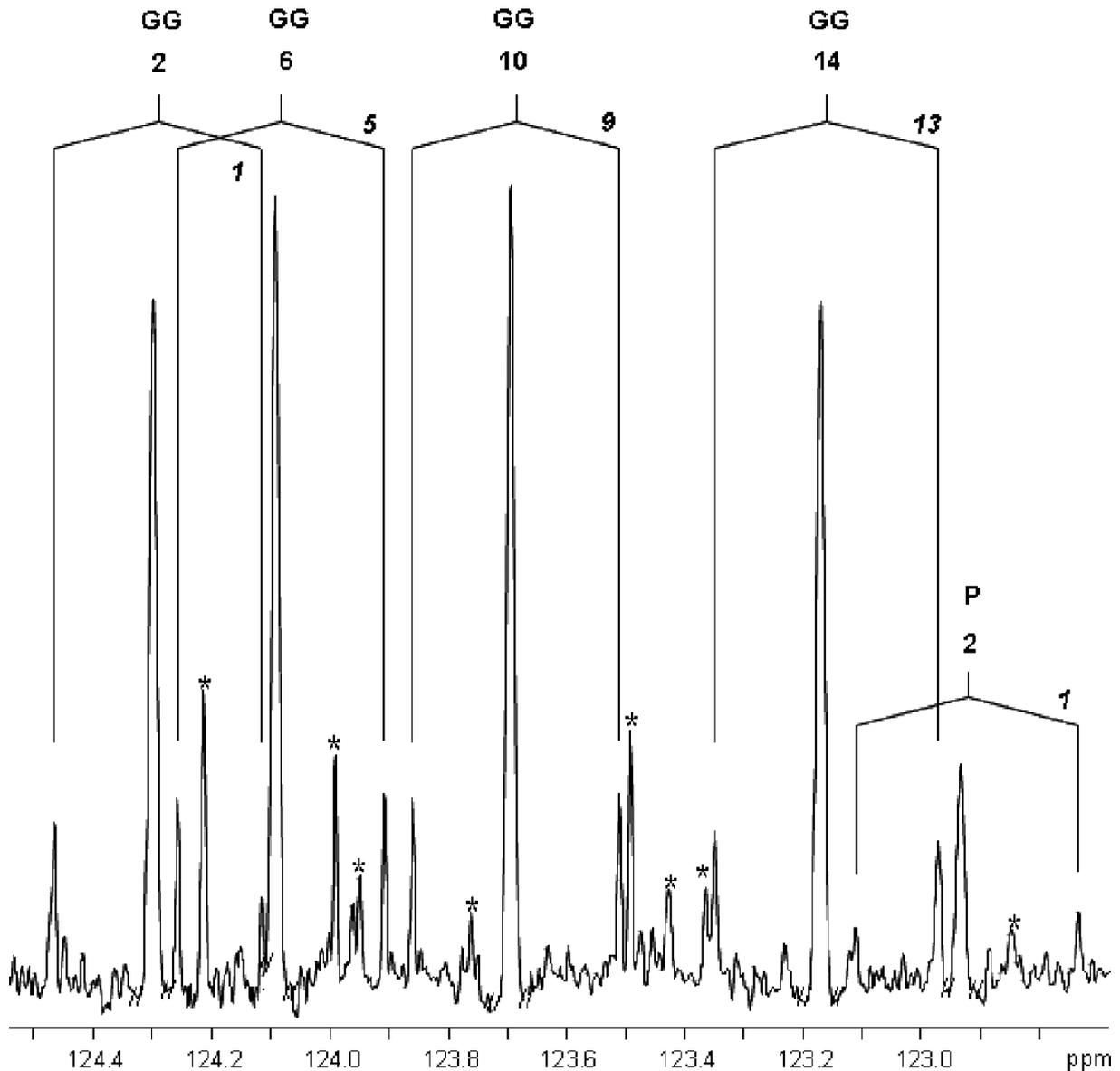


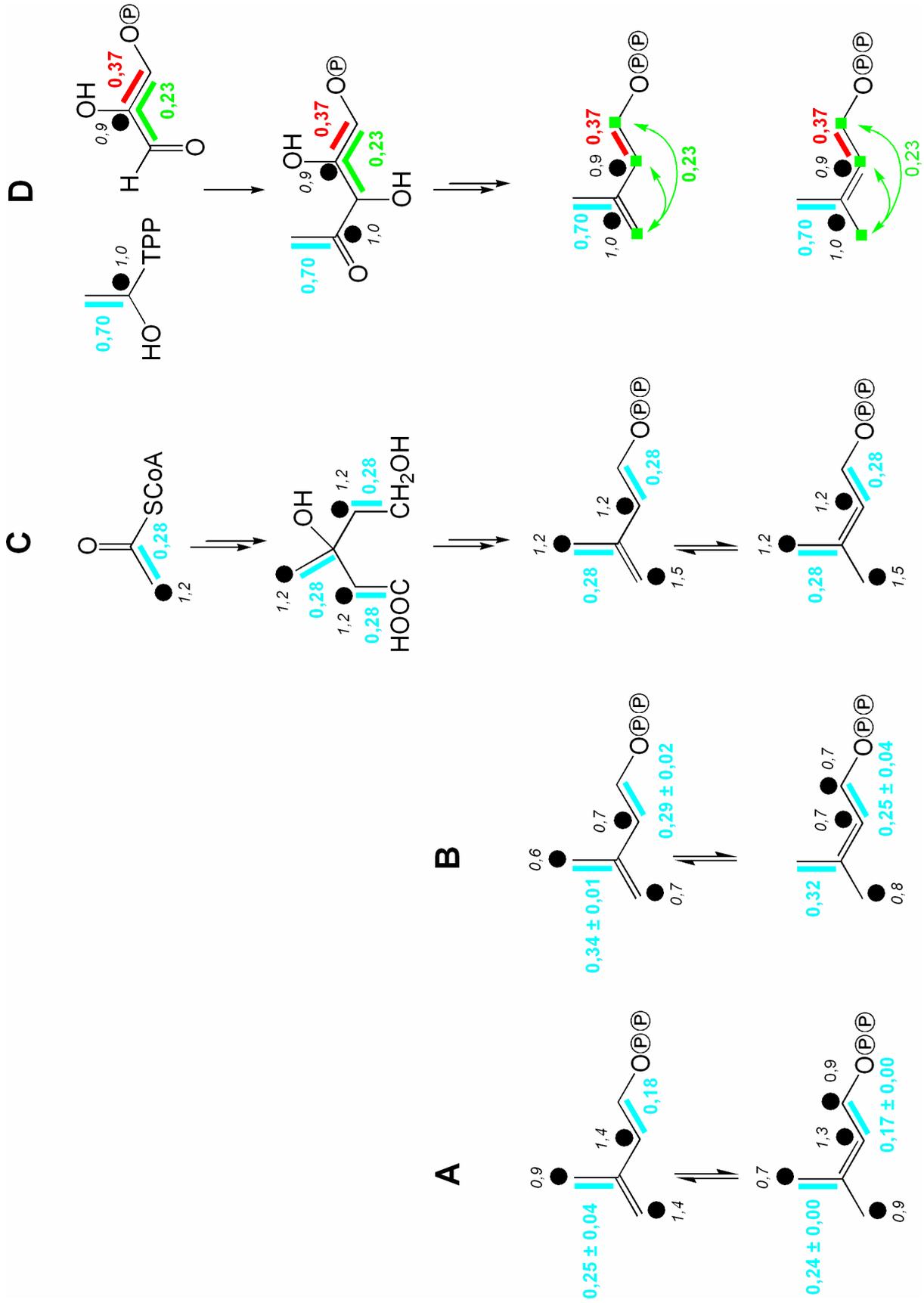
Abbildung 59. NMR Signale der Positionen C-2, C-6, C-10, C-14 von Geranylgeraniol (GG) und Position C-2 von Phytol (P) aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glycin.

Beim Deoxyxylulosephosphatweg reagiert der „aktivierte Acetaldehyd“ Hydroxyethylthiamin-diphosphat (rekonstruiert aus den Aminosäuren Tyrosin, Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin, Tabelle 12) mit Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin und den Nucleosiden, Tabelle 12) zu IPP und DMAPP (Abbildung 60, **D**). Es bilden sich, in Analogie zum Mevalonatweg, [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, wobei die Konzentration des [1,2-¹³C₂]Isotopologs (rot) mit 0,37 mol% niedriger ist als das [3,5-¹³C₂]Isotopolog (blau) mit 0,70 mol%. Daneben entsteht in den IPP/DMAPP Molekülen über das [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat ein [1,2,4-¹³C₃]Isotopolog (grün) mit einer Konzentration von 0,23 mol%. Die [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe liegen in einem charakteristischen Verhältnis von 1,5 : 1,0 vor. Die Positionen C-2 und C-3 weisen [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung von 1,0 % auf.

Tabelle 30. Hypothetische Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP, rekonstruiert über den Mevalonat- und Deoxyxylulosephosphatweg, mit den Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 12), aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [1,2-¹³C₂]Glycin.

Vorhersagen		Position	koppelt mit	Häufigkeit % ¹³ C _{abs}	Kopplung % ¹³ C ¹³ C
Mevalonat	IPP/DMAPP	1	(2)	1,6	15,3
		2	(1)	2,6	12,3
		3	(5)	1,6	15,3
		4		2,6	
		5	(3)	2,6	12,3
1-DOXP	IPP/DMAPP	1	(2)	2,1	28,4
		2	(1)	2,6	8,4
			(1/4)		14,1
		3	(5)	2,8	31,0
		4		1,5	
		5	(3)	2,1	28,8

Abbildung 60. Vergleich der Kopplungsmuster von IPP/DMAPP Molekülen aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g [1,2-¹³C₂]Glycin. Die hypothetisch bestimmten Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle über den Mevalonatweg (**C**) und den Deoxyxylulosephosphatweg (**D**). Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Geranylgeraniol (**A**) und Phytol (**B**).



Gemäß der Biosynthese bauen sich Geranylgeraniol und Phytol aus drei IPP und einem DMAPP Molekül zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Geranylgeraniol (**A**) und Phytol (**B**) sind in Tabelle 31 und Abbildung 60 zusammengefasst.

Die aus Geranylgeraniol (**A**) und Phytol (**B**) retrobiosynthetisch bestimmten IPP/DMAPP Moleküle weisen ausschließlich $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe, sowie $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe an den Positionen C-2, C-4 und C-5 auf (Tabelle 30 und Abbildung 60). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle von beiden Verbindungen weist auf den Mevalonatweg. Die Konzentration der $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe liegt im Geranylgeraniol bei 0,2 mol% und im Phytol bei 0,3 mol%.

Damit ist im Geranylgeraniol nur zwei Drittel der Isotopologkonzentration vorhanden, wie im Vergleich dazu in den hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Molekülen über den Mevalonatweg (Tabelle 30 und Abbildung 60, **D**). Die $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopologen Konzentration im Phytol stimmt gut mit den hypothetischen Daten der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Mevalonatweg überein. Die Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe dagegen ist im Phytol (0,7 %) nur halb so hoch, wie in den hypothetischen Daten der IPP/DMAPP Moleküle über den Mevalonatweg (1,3 %). Die Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von Geranylgeraniol ist mit den hypothetischen Daten aus dem Mevalonatweg vergleichbar.

Eine mögliche Erklärung für die geringere Konzentration der $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe im Geranylgeraniol und der höheren Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe ist eine Refixierung von, bei der Biosynthese frei werdende, $^{13}\text{CO}_2$ über den 3-Hydroxypropionat-Zyklus. Die Unterschiede bei der Konzentration der $[^{13}\text{C}_2]$ und $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe von Geranylgeraniol und Phytol lassen vermuten, dass nicht ausschließlich das isolierte Geranylgeraniol als Vorstufe für Phytol in der Biosynthese verwendet wird. Anscheinend werden die beiden Terpene bis zu einem gewissen Teil getrennt voneinander synthetisiert.

Im Einbauversuch von *Chloroflexus aurantiacus* mit 0,2 g $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glycin wurde nachgewiesen, dass Geranylgeraniol und Phytol über den Mevalonatweg synthetisiert werden. Innerhalb von Bakterien gibt es keine Kompartimentierung und es wird davon ausgegangen, dass unter diesen Bedingungen die beiden Terpenbiosynthesewege nicht gemeinsam vorkommen. Das bereits früher isolierte Verrucosan-2 β -ol wird auch über den Mevalonatweg synthetisiert (Rieder, 1999; Bacher *et al.*, 1999).

Sekundärstoffwechsel – *Chloroflexus aurantiacus*

Tabelle 31. Aus Geranylgeraniol und Phytol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit			Kopplung		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{22}		% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	
GG	IPP	1	(2)	n.d.			n.d.	
		2	(1)	2,7	0,1	{3}	6,9	0,2 {3}
		3	(5)	1,7	0,1	{3}	11,8	1,1 {3}
		4		2,5	0,2	{3}		
		5	(3)	2,2	0,1	{3}	13,1	0,2 {3}
	DMAPP	1	(2)	2,2		{1}	7,9	{1}
		2	(1)	2,6		{1}	6,7	{1}
		3	(5)	1,8		{1}	13,3	{1}
		4		2,0		{1}		
		5	(3)	2,0		{1}	12,1	{1}
Phytol	IPP	1	(2)	1,8	0,1	{2}	16,5	1,5 {2}
		2	(1)	2,1	0,1	{3}	12,7	1,7 {3}
		3	(5)	1,8	0,1	{2}	18,1	0,6 {2}
		4		1,8	0,1	{3}		
		5	(3)	2,0	0,1	{2}	17,5	0,1 {2}
	DMAPP	1	(2)	2,0		{1}	13,8	{1}
		2	(1)	2,0		{1}	10,5	{1}
		3	(5)	1,9		{1}	16,8	{1}
		4		1,9		{1}		
		5	(3)	n.d.			16,8	{1}

²² Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

3.4.3 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Catharanthus roseus*

Zellkulturen von *Catharanthus roseus* dienen schon seit mehreren Jahren als Modell für die Untersuchung des Terpenstoffwechsels. Es wurden bereits Markierungsversuche mit [1-¹³C₁]1-Deoxy-D-xylulose (Arigoni *et al.*, 1997) und (R,S)-[2-¹³C₁]Mevalonolacton (Schuhr *et al.*, 2003) an Zellkulturen von *Catharanthus roseus* durchgeführt. Mit den Einbauversuchen wurde der Austausch der Vorstufen IPP und DMAPP zwischen Cytosol und Plastiden, mit Hilfe der Verbindungen Lutein und Sitosterol, untersucht. Der Austausch einzelner Metabolite zwischen den Zellkompartimenten konnte bereits in anderen Organismen nachgewiesen werden (Schwarz, 1994; Nabeta *et al.*, 1995b, 1995c, 1997, 1998; Adam und Zapp, 1998; Piel *et al.*, 1998; Rohmer, 1999a). Die Höhe dieses, als Crosstalk bezeichneten, Austauschs ist vom Organismus und von der Ausgangskonzentration der Vorläufer abhängig. Die Art des Metabolitenaustauschs zwischen den Zellkompartimenten und die Regulierung des Prozesses ist unbekannt.

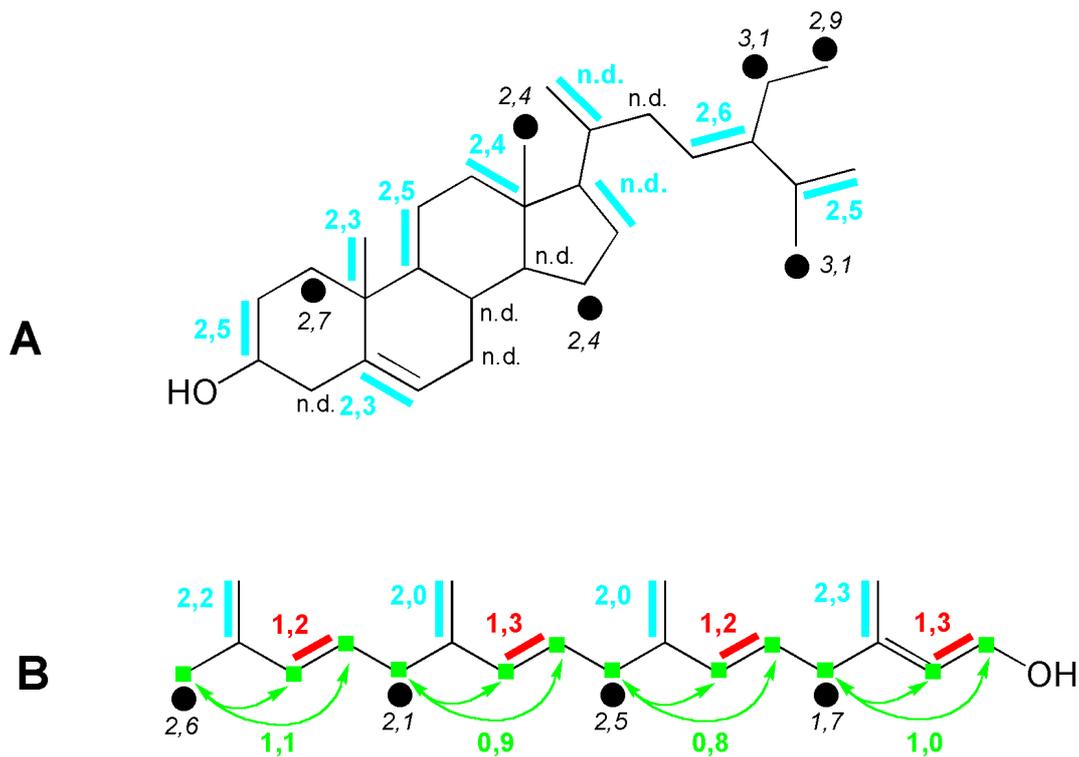


Abbildung 61. Kopplungsmuster von Sitosterol (A) und Phytol (B) aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose. Die Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Terpene aus *Catharanthus roseus* hinsichtlich ihres Crosstalks, bei dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose, untersucht.

Messergebnisse

In dem, mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Extrakt von *Catharanthus roseus* (50 g, Frischgewicht) konnten β -Carotin, Lutein, Phytol, Geranylgeraniol und Sitosterol identifiziert werden. Die Menge an β -Carotin, Lutein und Geranylgeraniol waren für die NMR spektroskopische Messung zu gering. Das Markierungsmuster von Sitosterol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose, ist in Tabelle 33 und Abbildung 61 (A) zusammengefasst. Das Markierungsmuster von Phytol ist in Tabelle 32 und Abbildung 61 (B) zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Sitosterol sind ausschließlich [¹³C₂]Isotopologe sichtbar. Die Konzentration der [¹³C₂]Isotopologe liegt zwischen 2,3 mol% und 2,6 mol% (Tabelle 33 und Abbildung 61, A). In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Fernkopplungen > 0,1 % zu beobachten (Abbildung 62). Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe liegt zwischen 2,4 % und 3,1 %.

Im NMR Spektrum von Phytol weisen die Positionen C-1, C-2, C-5, C-9 und C-13 Fernkopplungen auf. Die Abbildung 63 zeigt die Zusammensetzung der Satellitenmuster exemplarisch an Position C-1 des Phytols mit Hilfe einer Simulation. Das [1,2-¹³C₂]Isotopolog bildet, mit einer Kopplungskonstante von 47,5 Hz, ein Dublett (A). Die Kopplung zwischen den Positionen C-1, C-2 und C-4 ([1,2,4-¹³C₃]Isotopolog) wird im Spektrum als Doppeldublett sichtbar (B). Wenn man die Satelliten der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe entsprechend des, im Spektrum für das C-1 Atom bestimmten, Verhältnisses von 1,3 : 1,0 kombiniert, erhält man die unter (C) simulierten Satellitensignale. Die Differenz (E) von den simulierten Satelliten (C) und dem original Signal (D) der Position C-1 von Phytol bestätigt durch Eliminierung aller Signale, die oben ausgeführte Zusammensetzung der Satelliten.

Gemäß der Biosynthese baut sich Phytol aus drei IPP und einem DMAPP Molekülen zusammen. Die IPP/DMAPP Moleküle im Phytol weisen [3,5-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 2,2 mol% auf. Daneben kommen [1,2-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 1,3 mol% und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe mit einer Konzentration von 1,0 mol% vor (Tabelle 32 und Abbildung 61, B). Die [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe

Sekundärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

liegen in einem charakteristischen Verhältnis vor. Das Verhältnis im DMAPP Molekül liegt bei 1,1 : 1,0. Die Verhältnisse in den IPP Molekülen unterscheiden sich mit 1,3 : 1,0 (3. IPP), 1,5 : 1,0 (2. IPP) und 1,4 : 1,0 (1. IPP) nur minimal (Tabelle 34). Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in Position C-4 liegt zwischen 2,1 % und 2,6 % (Abbildung 61, **B**).

Tabelle 32. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante ²³		Häufigkeit	
		J_{CC} [Hz]		% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
1	59,4	47,5 (2)		4,5	31,2
		47,6 (2), 4,9 (4)			24,2
2	123,1	47,5 (1)		4,2	30,1
		47,5 (1), 2,6 (4)			21,7
3	140,3	41,6 (20)		n.d.	50,6
4	39,4	7,3 (1/2)		3,8	15,2
5	25,1	33,6 (6)		3,6	32,5
		33,5 (6), 2,8 (8)			19,7
6	36,7	34,9 (5)		3,7	54,8
7	32,7	35,3 (19)		4,0	53,1
8	37,4	3,2 (5/6)		4,3	23,9
9	24,5	34,7 (10)		4,3	31,4
		34,8 (10), 2,9 (12)			22,9
10	37,4	34,7 (9)		3,5	59,0
11	32,8	35,3 (18)		4,0	51,1
12	37,3	3,1 (9/10)		4,1	18,3
13	24,8	34,9 (14)		4,3	30,6
		34,8 (14), 2,8 (16)			26,6
14	39,7	34,7 (13)		3,9	54,8
15	28,0	35,1 (17)		4,3	49,3
16	22,6	2,9 (13)		4,8	14,4
17	22,7	35,1 (15)		4,3	52,0
18	19,7	35,3 (11)		3,8	48,9
19	19,7	35,5 (7)		3,8	49,1
20	16,2	41,6 (3)		4,2	55,4

²³ Kopplungspartner in Klammern

Sekundärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

Tabelle 33. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Sitosterol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem.	Kopplungskonstante ²⁴	chem. Shift	Häufigkeit	Kopplung
	Verschiebung		[ppb]		
	δ [ppm]	J_{CC} [Hz]		% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
1	37,2			3,8	
2	31,6	36,5 (3)	9,5	4,1	61,0
3	71,8	36,5 (2)	6,4	4,1	59,5
4	42,2			n.d.	
5	140,7	71,8 (6)	29,0	3,6	59,8
6	121,7	71,7 (5)	29,2	4,0	60,1
7	31,8			n.d.	
8	31,8			n.d.	
9	50,0	35,1 (11)	8,4	4,1	59,8
10	36,4	35,2 (19)	11,4	3,7	59,7
11	21,0	35,1 (9)	7,5	4,2	59,8
12	39,7	35,2 (13)	15,6	3,9	60,2
13	42,3	n.d. (12)	n.d.	n.d.	n.d.
14	56,7			n.d.	
15	24,3			3,5	
16	28,2	33,3 (17)	6,8	n.d.	60,5
17	55,9	n.d. (16)	n.d.	n.d.	n.d.
18	11,8			3,5	
19	19,4	35,2 (10)	7,9	4,1	60,0
20	36,1	n.d. (21)	n.d.	n.d.	n.d.
21	18,7	34,5 (20)	7,7	n.d.	61,5
22	33,8			n.d.	
23	25,9	35,1 (24)	8,8	4,3	61,2
24	45,7	35,1 (23)	9,3	n.d.	60,0
25	29,0	35,3 (26)	8,4	4,1	60,3
26 (pro-S)	19,8			4,2	
27 (pro-R)	19,0	n.d. (25)	n.d.	n.d.	n.d.
28	23,0			4,2	
29	11,9			4,0	

²⁴ Kopplungspartner in Klammern

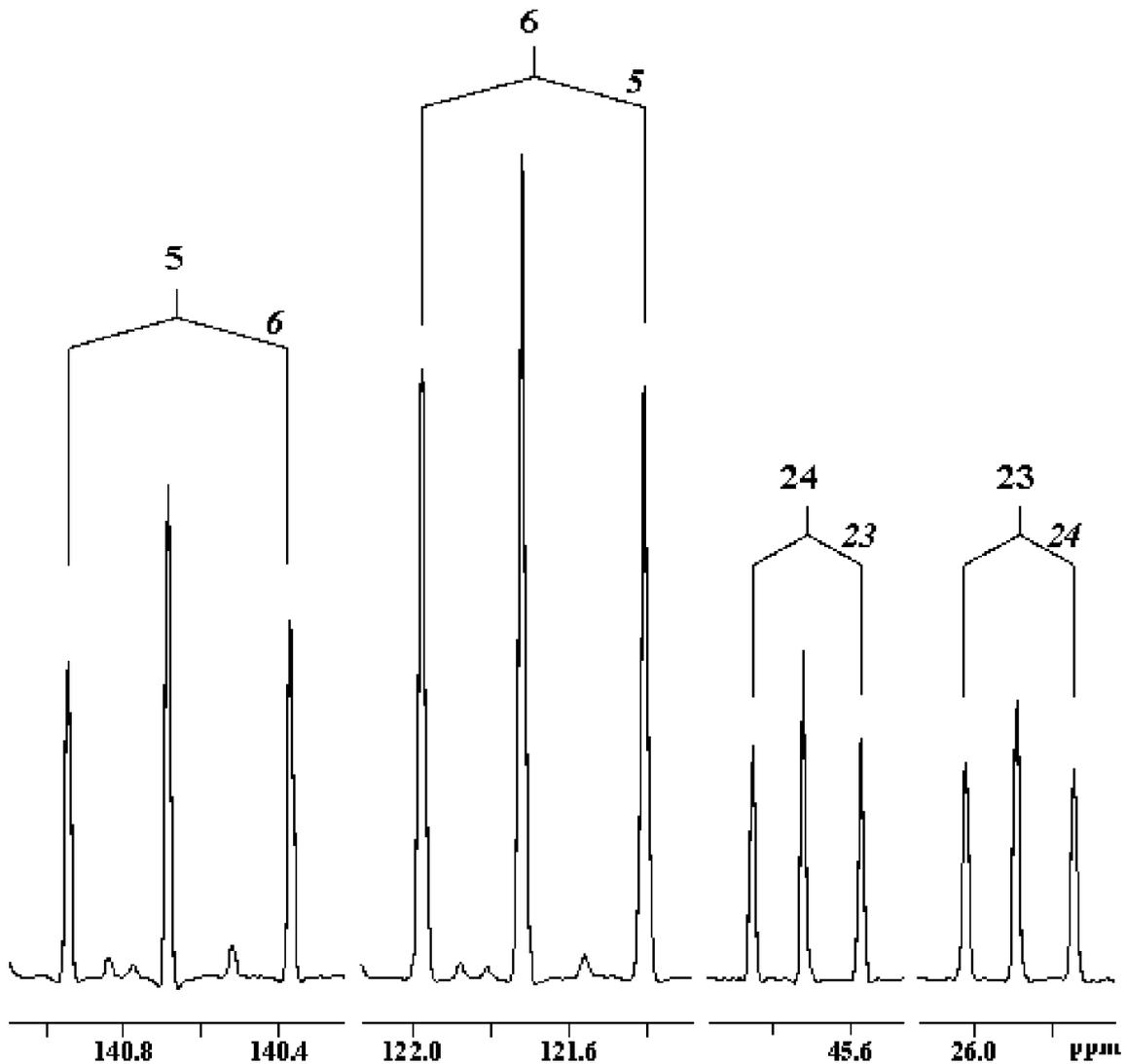


Abbildung 62. Die NMR Signale der Positionen C-5, C-6, C-23 und C-24 von Sitosterol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose.

Abbildung 63. ^{13}C -NMR Signal der Position C-1 von Phytol. (A) simuliertes Signal des $[1,2-^{13}C_2]$ Isotopologs; (B) simuliertes Signal des $[1,2,4-^{13}C_3]$ Isotopologs; (C) Signale von (A) und (B) im Verhältnis 1,3 : 1,0; (D) gemessenes Signal der Position C-1 von Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose; (E) Differenz der Signale von (D) und (C).

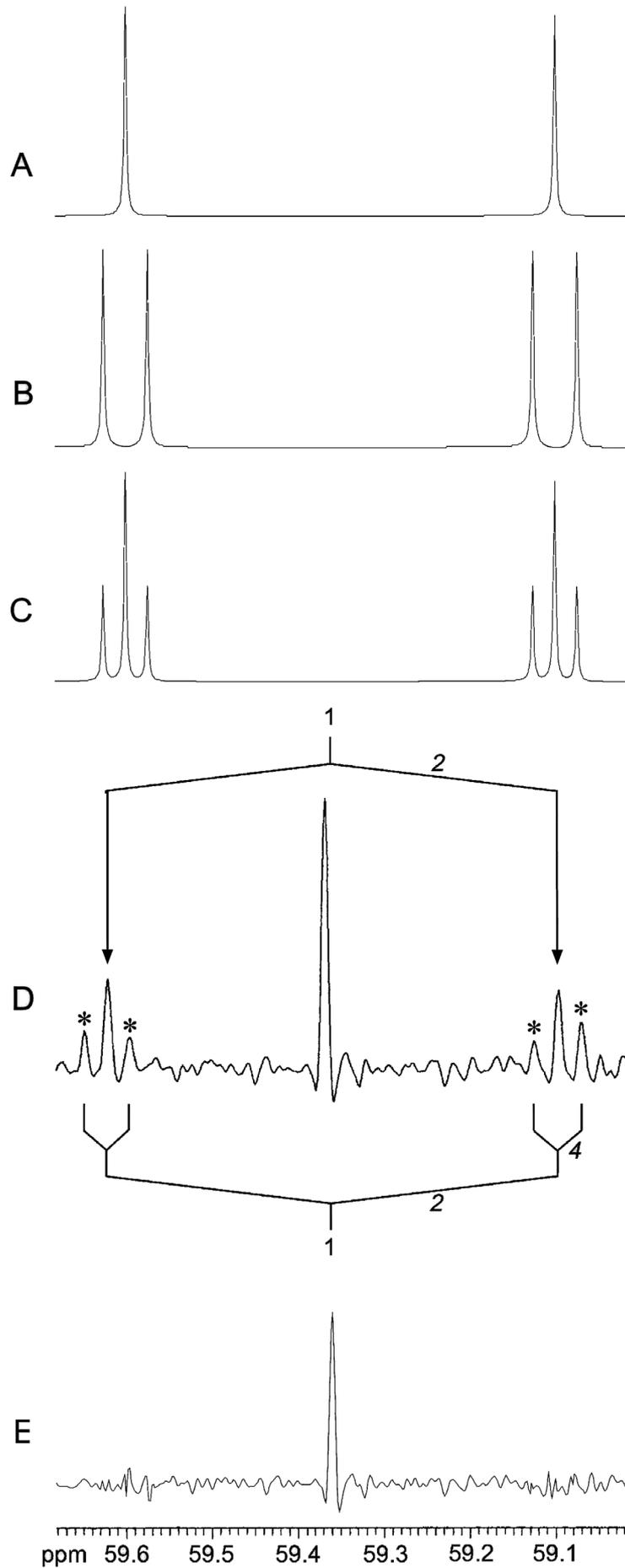


Tabelle 34. Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe, sowie ihr Verhältnis, aus den IPP/DMAPP Vorläufern von Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose und aus den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs (1-DOXP, Tabelle 35).

	Isotopologe		Verhältnis
	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]	
DMAPP	1,2	1,1	1,1 : 1,0
1. IPP	1,3	0,9	1,4 : 1,0
2. IPP	1,2	0,8	1,5 : 1,0
3. IPP	1,3	1,0	1,3 : 1,0
1-DOXP	0,8	1,9	1,0 : 2,4

Retrobiosynthese

Mit den NMR spektroskopischen Daten der Aminosäuren (S. 89), aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, wurden die Markierungsmuster der zentralen Stoffwechselmetabolite bestimmt (Acetyl-CoA, α-Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Phosphoenolpyruvat, u.a.; Tabelle 14 und Abbildung 28). Unter Verwendung der Zentralmetabolite ist es möglich die hypothetischen Markierungsmuster von IPP und DMAPP, den Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese, über die beiden bekannten Biosynthesewege zu rekonstruieren (Abbildung 3 und Abbildung 4). Die hypothetischen Daten von IPP und DMAPP aus den beiden Biosynthesen, Mevalonatweg (B) und Deoxyxylulosephosphatweg (C), sind in Tabelle 35 und Abbildung 64 zusammengefasst.

Der Mevalonatweg synthetisiert aus drei Acetyl-CoA Molekülen (rekonstruiert aus den Aminosäuren Glutamat, Arginin, Prolin und Leucin, Tabelle 14) die Vorstufen IPP und DMAPP (Abbildung 64, B). Bei der hypothetischen Rekonstruktion von IPP und DMAPP mit dem retrobiosynthetisch abgeleiteten Acetyl-CoA entstehen [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 2,2 mol%, sowie ein [¹³C₁]Isotopolog in Position C-4 mit einer Anreicherung von 2,7 %.

Beim Deoxyxylulosephosphatweg reagiert der „aktivierte Acetaldehyd“ Hydroxyethylthiamin-diphosphat (rekonstruiert aus den aromatischen Aminosäuren, Tabelle 14) mit Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin, Tabelle 14) zu IPP und DMAPP (Abbildung 64, C). Es bilden sich, in Analogie zum Mevalonatweg, [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂] Isotopologe, wobei die Konzentration des [1,2-¹³C₂]Isotopologs (rot) mit 0,8 mol% deutlich niedriger, ist als das [3,5-¹³C₂]Isotopolog (blau) mit 2,3 mol%. Daneben entsteht in den

IPP/DMAPP Molekülen, über das [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat, ein [1,2,4-¹³C₃]Isotopolog (grün) mit einer Konzentration von 1,9 mol%. Die [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe liegen in einem charakteristischen Verhältnis von 1,0 : 2,4 vor. Die Position C-4 weist ein [¹³C₁]Isotopolog mit einer Anreicherung von 1,0 % auf.

Tabelle 35. Hypothetische Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP, rekonstruiert über den Mevalonat- und Deoxyxylulosephosphatweg, mit den Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 14), aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Vorhersagen		Position	koppelt mit	Häufigkeit % ¹³ C _{abs}	Kopplung % ¹³ C ¹³ C
Mevalonat	IPP/DMAPP	1	(2)	3,9	56,1
		2	(1)	3,8	57,6
		3	(5)	3,9	56,1
		4		3,8	
		5	(3)	3,8	57,6
1-DOXP	IPP/DMAPP	1	(2)	4,4	61,7
		2	(1)	4,5	18,9
			(1/4)		42,1
		3	(5)	3,9	59,3
		4		4,0	43,7
		5	(3)	4,0	57,7

Gemäß der Biosynthese baut sich Sitosterol aus vier IPP und zwei DMAPP Molekülen zusammen (Abbildung 51). Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Sitosterol sind in Tabelle 36 und Abbildung 64 (A) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sitosterol weist ausschließlich [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, sowie [¹³C₁]Isotopologe in höheren Konzentrationen in der Position C-4 auf (Tabelle 36 und Abbildung 64 A). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Mevalonatweg. Die Konzentration der [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe liegt im IPP bei 2,3 mol% und im DMAPP bei 2,5 mol%.

Damit ist die Konzentration der [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen aus dem Sitosterol nur geringfügig höher, wie in den hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Molekülen über den Mevalonatweg mit 2,2 mol% (Tabelle 35 und Abbildung 64, B). Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe in Position C-4 der IPP/DMAPP Moleküle

Sekundärstoffwechsel – *Catharanthus roseus*

aus Sitosterol (2,6 % und 3,1 %) sind mit den hypothetisch bestimmten Daten über den Mevalonatweg (2,7 %) vergleichbar.

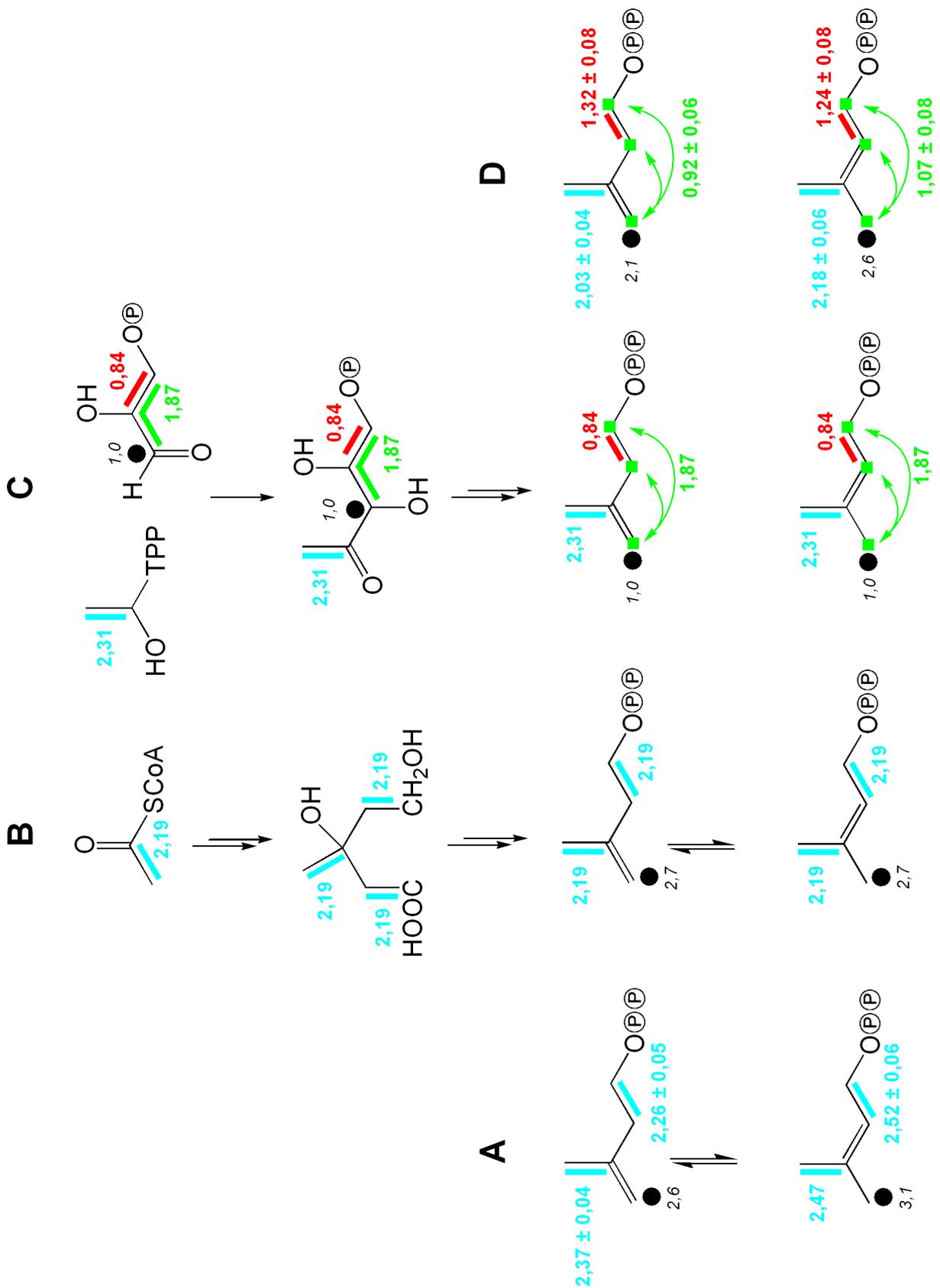


Abbildung 64. Vergleich der Kopplungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit D-Glucose. Die hypothetisch bestimmten Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle über den Mevalonatweg (**B**) und den Deoxyxylulosephosphatweg (**C**). Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sitosterol (**A**) und Phytol (**D**).

Tabelle 36. Aus Sitosterol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit			Kopplung			
			% ¹³ C _{abs}	Δs ²⁵	{}	% ¹³ C ¹³ C	Δs	{}	
Sitosterol	IPP	1	(2)	4,0	0,1	{3}	60,2	0,3	{4}
		2	(1)	3,9	0,3	{2}	59,8		{2}
		3	(5)	3,7		{1}	59,7		{1}
		4		3,7	0,2	{2}			
		5	(3)	3,8	0,3	{2}	60,8	0,8	{2}
	DMAPP	1	(2)	4,2	0,1	{2}	61,1	0,1	{2}
		2	(1)	4,1		{1}	60,0	0,3	{2}
		3	(5)	4,1		{1}	60,3		{1}
		4		4,2		{1}			
		5	(3)	n.d.			n.d.		

Phytol setzt sich, gemäß der Biosynthese, aus einem DMAPP und drei IPP Molekülen zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Phytol sind in Tabelle 37 und Abbildung 64 (**D**) zusammengefasst.

Die IPP und DMAPP Moleküle aus Phytol weisen [1,2-¹³C₂], [1,2,4-¹³C₃] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, sowie [¹³C₁]Isotopologe in höheren Konzentrationen in Position C-4 auf (Tabelle 37 und Abbildung 64, **D**). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Konzentration des [3,5-¹³C₂]Isotopologs liegt bei 2,1 mol%. Sie stimmt gut mit der hypothetisch bestimmten Konzentration der [3,5-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen über den Deoxyxylulosephosphatweg mit 2,3 mol% überein (Tabelle 35 und Abbildung 64, **C**).

²⁵ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Tabelle 37. Aus Phytol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit			Kopplung			
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{26}	{}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	{}	
Phytol	IPP	1	(2)	4,1	0,4	{3}	54,0	1,3	{3}
		2	(1)	3,8	0,3	{3}	31,7	0,6	{3}
			(1/4)				22,3	1,9	{3}
		3	(5)	4,4	0,5	{3}	51,6	1,1	{3}
		4		4,1	0,2	{3}			
	5	(3)	3,9	0,2	{3}	51,1	3,0	{3}	
	DMAPP	1	(2)	4,3		{1}	56,2		{1}
		2	(1)	3,9		{1}	30,6		{1}
			(1/4)				22,9		{1}
		3	(5)	4,3		{1}	49,3		{1}
4			4,8		{1}			{1}	
5	(3)	4,3		{1}	52,0		{1}		

Die in den IPP und DMAPP Molekülen bestimmten Verhältnisse der $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ und $[1,2,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ Isotopologe entsprechen mit 4 : 1,0 (IPP) bzw. 1,1 : 1,0 (DMAPP) nicht dem Verhältnis aus dem Deoxyxylulosephosphatweg mit 1,0 : 2,4 (Tabelle 38). Die IPP/DMAPP Moleküle aus Phytol enthalten einen höheren Anteil an $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologen. Wenn in *Catharanthus roseus*, neben den Isoprenoidvorstufen aus dem Deoxyxylulosephosphatweg, auch Vorstufen aus dem Mevalonatweg bei der Biosynthese von Phytol eingesetzt werden, kann dies das andere Verhältnis der $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ und $[1,2,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ Isotopologe erklären. Der, als Crosstalk bezeichnete Austausch von Vorstufen der Terpenbiosynthese, zwischen den Kompartimenten der Zelle, wurde bereits bei anderen Anzuchten in Zellkulturen von *Catharanthus roseus*, in Sitosterol und Lutein, beobachtet (Tabelle 3; Arigoni et al, 1997; Schuhr *et al.*, 2003).

Das $[1,2,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ Isotopolog stammt ausschließlich aus dem Deoxyxylulosephosphatweg. Über das bekannte Verhältnis der $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ und $[1,2,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ Isotopologe von 1,0 : 2,4, aus den hypothetisch bestimmten Daten der IPP/DMAPP Moleküle, kann auf den Anteil an $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologen im Phytol, die über dem Deoxyxylulosephosphatweg gebildet wurden, geschlossen werden. Der Anteil der $[1,2,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen liegt bei den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs bei 70 %. Die Konzen-

²⁶ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

tration der [1,2-¹³C₂]Isotopologe, die über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurden, entsprechen damit 30 % des Gesamtsignals (Tabelle 39). Dementsprechend wurden nur 0,5 mol% (DMAPP) bzw. 0,4 mol% (IPP) der [1,2-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen aus Phytol über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert (Tabelle 39). Die Differenz von 0,7 mol% (DMAPP) bzw. 0,9 mol% (IPP) [1,2-¹³C₂]Isotopologe, aus den IPP/DMAPP Molekülen von Phytol, stammt nicht aus dem Deoxyxylulosephosphatweg, sondern aus dem Mevalonatweg (Tabelle 40). Die Konzentrationen der [1,2-¹³C₂]Isotopologe, die über den Mevalonatweg synthetisiert wurden, im Verhältnis zum Gesamtsignal, spiegeln die Höhe des Austausches (Crosstalk) zwischen den Kompartimenten (Plastiden und Cytosol) wieder. Der Crosstalk im Phytol liegt bei 30 % im DMAPP bzw. bei 41 % im IPP (Tabelle 40). Auffällig hierbei ist, dass sich der Crosstalk zwischen den DMAPP und IPP Molekülen unterscheidet. Eine mögliche Erklärung liegt, wie in der Literatur beschrieben, bei den diskutierten Metaboliten die am Crosstalk zwischen den Kompartimenten beteiligt sind (Schwarz, 1994; Schwarz und Arigoni, 1999). Wenn ausschließlich IPP und Farnesyldiphosphat (FPP) am Crosstalk beteiligt sind, ergibt sich eine mögliche statistische Verteilung der Moleküle, die aus dem Cytosol für die Biosynthese von Phytol in die Plastiden importiert werden. Der, im Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, beobachtete Crosstalk kann durch den Import von FPP, das in der Biosynthese ausschließlich an DMAPP gebunden wird, sowie den Import von IPP, das sich mit der gleichen Wahrscheinlichkeit über das ganze Phytolmolekül verteilt, erklärt werden (Abbildung 65).

Tabelle 38. Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe, sowie ihre Verhältnisse, aus den IPP/DMAPP Molekülen von Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose und aus den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs (1-DOXP, Tabelle 35).

	Isotopologe		Verhältnis
	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]	
DMAPP	1,2	1,1	1,1 : 1,0
IPP	1,3	0,9	1,4 : 1,0
1-DOXP	0,8	1,9	1,0 : 2,4

Tabelle 39. Bestimmung der Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, die über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurden.

	Isotopologe	
	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]
		70 %
1-DOXP	0,8	1,9
DMAPP	0,5	1,1
IPP	0,4	0,9

Tabelle 40. Bestimmung der Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, die über den Mevalonatweg synthetisiert wurden, sowie der Anteil dieser Konzentrationen am Gesamtsignal.

	[1,2- ¹³ C ₂] Isotopologe		Differenz	Anteil am Gesamtsignal
	im Phytol	aus 1-DOXP ²⁷		
DMAPP	1,2	0,5	0,7	30 %
IPP	1,3	0,4	0,9	41 %

Schwarz und Arigoni vertreten, anhand der Markierungsergebnisse bei *Ginkgo biloba*, die Meinung, dass FPP nach dem Import mit IPP aus dem Deoxyxylulosephosphatweg weiterreagiert (Schwarz und Arigoni, 1999). Die vorliegenden Daten weisen auf eine Reaktion von FPP mit DMAPP hin.

Das Markierungsmuster kann auch durch den ausschließlichen Import von IPP/DMAPP Molekülen erklärt werden. Voraussetzung wäre das Gleichgewicht der Isomerisierung, das auf der Seite des IPP Moleküls liegt.

Crosstalk wurde bereits in früheren Einbauversuchen mit den Zellkulturen von *Catharanthus roseus* beobachtet. Lutein aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit (R,S) [2-¹³C₁]Mevalonolacton weist einen Crosstalk von 16 % auf (Schuhr *et al.*, 2003; Tabelle 3). Der Crosstalk von Phytol aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose, ist mit 30 % (DMAPP) bzw. 41 % (IPP) deutlich höher.

Möglicherweise kann der unterschiedlich hohe Einbau auf die Verstoffwechslung der beiden Ausgangsmetabolite zurückgeführt werden. D-Glucose hat, im Gegensatz zu Mevalonolacton,

²⁷ siehe Tabelle 39

einen direkten Zugang zu allen Stoffwechselprozessen. Der direkte Zugang zum Stoffwechsel kann eine stärkere Verteilung bewirken. Die Wahrscheinlichkeit, dass markierte IPP/DMAPP Moleküle entstehen nimmt zu. Somit kann auch der damit verbundene Crosstalk steigen. Der Crosstalk kann jedoch auch vom Syntheseort (z.B. Blatt) und von den isolierten Terpenen abhängig sein. Es ist möglich, dass verschiedene Terpene einen unterschiedlich hohen Crosstalk innerhalb eines Einbauversuchs aufweisen.

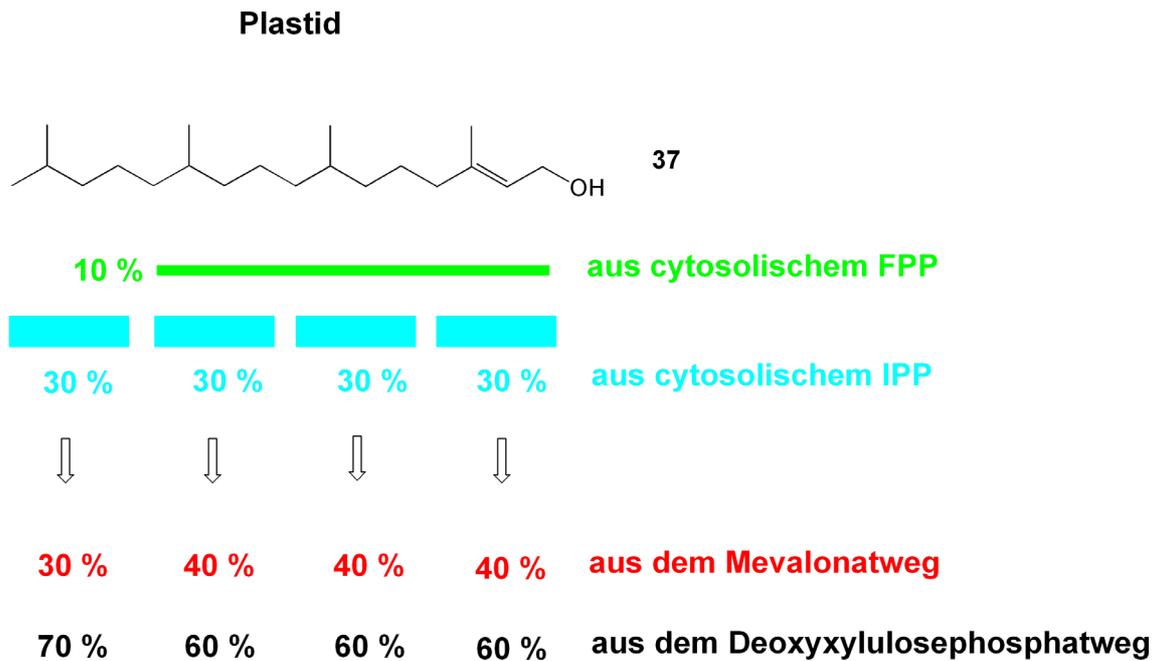


Abbildung 65. Hypothetischer Einbau der Terpenbiosynthesevorläufer IPP und Farnesyldiphosphat (FPP), die für die Phytolbiosynthese aus dem Cytosol in die Plastiden importiert wurden. Hypothese zur Bestätigung des beobachteten Crosstalks im Phytol (40) aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht geklärt werden, ob der hohe Crosstalk bei Phytol eine Besonderheit der Pflanze *Catharanthus roseus* ist, oder ob es sich um eine Besonderheit der Phytolbiosynthese handelt. Weitere Einbauversuch mit D-Glucose und Mevalonolacton in *Catharanthus roseus* können helfen die offenen Fragen zu klären. In den jeweiligen Einbauversuchen müssten dafür mehrere Terpene isoliert werden, die über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert werden.

Im Sitosterol konnte kein Crosstalk beobachtet werden (< 5 %). Das Ergebnis stimmt gut mit den beobachteten 0,4 % Einbau von [1-¹³C₁]1-Deoxy-D-xylulose in Sitosterol von *Catharanthus roseus* überein (Arigoni *et al.*, 1997, Tabelle 4).

3.4.4 Einbauexperimente in *Nicotiana tabacum* (Wildtyp und Mutanten)

Der Einbau von markiertem CO₂ über die Photosynthese in einer ganzen, wachsenden Pflanze entspricht den natürlichen Mechanismen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Fütterungskonzept an ganzen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* angewandt. Die erwachsenen Pflanzen wurden mit einem definierten Volumen an ¹³CO₂ begast, nach 10 Tagen geerntet und für die Isolierung einzelner Inhaltsstoffe genutzt.

Die Literatur beschreibt Einbauversuche in Bright Yellow-2 Zellkulturen (Hemmerlin *et al.*, 2003) und in ganzen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana glauca* mit der Docht-Methode (Leete, 1977). Der Eintrag von isotopmarkierten Verbindungen in Zellkompartimente einer ganzen, wachsenden Pflanze sollte prinzipiell über die Wurzeln möglich sein. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Fütterungskonzept an ganzen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* var. *havanna piperita* mit einer Mischung aus markierter D-Glucose und Saccharose getestet. Die Zucker wurden dem festen Agar, in welchem die Pflanzen steril wuchsen, zugesetzt. Nach einer Wachstumsperiode von 3 - 4 Wochen wurden die Pflanzen geerntet und für die Isolierung einzelner Inhaltsstoffe genutzt.

Der Wildtyp wurde in getrennten Anzuchten mit [U-¹³C₆]D-Glucose, mit [1-¹³C₁]D-Glucose und mit ¹³CO₂ angezogen. Daneben wurden Anzuchten mit einer RPO Mutante und zwei NDH Mutanten (NDH 53-25, NDH 54-3IV) mit [U-¹³C₆]D-Glucose durchgeführt.

3.4.4.1 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* (Wildtyp)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Markierungsmuster der Terpene und des Alkaloids Nicotin in *Nicotiana tabacum*, aus dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, untersucht.

Aus dem methanolischen Extrakt der frischen Pflanzenproben (ohne Wurzeln, 100 g) wurde Nicotin isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Aus dem, mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Extrakt wurden die Terpene β-Carotin, Lutein, Phytol, Geranylgeraniol und Sitosterol isoliert und über HPLC identifiziert. Die Menge an β-Carotin und Lutein erwies sich für eine NMR spektroskopische Messung für zu gering. Bei den NMR spektroskopischen Messungen konnte neben Sitosterol, Phytol und Geranylgeraniol noch Stigmasterol und *cis*-Abienol identifiziert werden.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

3.4.4.1.1 Retrobiosynthese der Terpene

Mit den NMR spektroskopischen Daten der Aminosäuren (S.110), aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, wurden die Markierungsmuster der zentralen Stoffwechselmetabolite bestimmt (Acetyl-CoA, α-Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Phosphoenolpyruvat, u.a.; Tabelle 20 und Abbildung 36). Unter Verwendung der Zentralmetabolite ist es möglich die hypothetischen Markierungsmuster von IPP und DMAPP, den Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese, über die beiden bekannten Biosynthesewege zu rekonstruieren (Abbildung 3 und Abbildung 4).

Da im vorliegenden Organismus verschiedene Markierungshöhen in den von Cytosol und Plastiden beeinflussten Pools der zentralen Stoffwechselmetabolite existieren, wird bei der Retrobiosynthese von IPP und DMAPP der jeweilig typische Ort der Terpenbiosynthesen beachtet, d.h. Mevalonatweg im Cytosol und Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden. Die Retrobiosynthese erfolgt beim Mevalonatweg mit den Daten von Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Arginin) und beim Deoxyxylulosephosphatweg mit den Daten von 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus den aromatischen Aminosäuren, Tabelle 20). Die hypothetischen Daten von IPP und DMAPP aus den beiden Biosynthesen, Mevalonatweg (**C**) und Deoxyxylulosephosphatweg (**D**), sind in Tabelle 41 und Abbildung 66 zusammengefasst.

Tabelle 41. Hypothetische Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP, rekonstruiert über den Mevalonat- und Deoxyxylulosephosphatweg, mit den Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 20) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Vorhersagen		Position	koppelt mit	Häufigkeit % ¹³ C _{abs}	Kopplung % ¹³ C ¹³ C
Mevalonat	IPP/DMAPP	1	(2)	3,4	27,1
		2	(1)	3,6	27,8
		3	(5)	3,4	27,1
		4		3,6	
		5	(3)	3,6	27,8
1-DOXP	IPP/DMAPP	1	(2)	3,3	18,4
		2	(1)	3,5	7,0
			(1/4)		11,7
		3	(5)	3,5	18,7
		4		4,0	
		5	(3)	3,3	18,4

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Der Mevalonatweg synthetisiert aus drei Acetyl-CoA Molekülen (Pool II, rekonstruiert aus Arginin, Tabelle 20) die Vorstufen IPP und DMAPP (Abbildung 66, C). Bei der hypothetischen Rekonstruktion von IPP und DMAPP mit dem retrobiosynthetisch abgeleiteten Acetyl-CoA entstehen [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 0,96 mol%, sowie [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-1, C-2, C-3 und C-5 mit einer Anreicherung von jeweils 1,4 %. Die Position C-4 weist ein [¹³C₁]Isotopolog mit einer Anreicherung von 2,5 % auf.

Beim Deoxyxylulosephosphatweg reagiert der „aktivierte Acetaldehyd“ Hydroxyethylthiamin-diphosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu IPP und DMAPP (Abbildung 66, D). Die Markierungsmuster von Hydroxyethylthiamin-diphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat wurden aus den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren rekonstruiert (Tabelle 20). Es bilden sich, in Analogie zum Mevalonatweg, [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, wobei die Konzentration des [1,2-¹³C₂]Isotopologs (rot) mit 0,24 mol% niedriger ist als das [3,5-¹³C₂]Isotopolog (blau) mit 0,65 mol%. Daneben entsteht über das [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat ein [1,2,4-¹³C₃]Isotopolog (grün) in den IPP/DMAPP Molekülen mit einer Konzentration von 0,41 mol%. Die [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe liegen in einem charakteristischen Verhältnis von 1,0 : 1,7 vor. Die Position C-4 weist ein [¹³C₁]Isotopolog mit einer Anreicherung von 2,4 % auf. Die restlichen Positionen der IPP/DMAPP Moleküle zeigen [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung von je 1,7 %.

3.4.4.1.2 Sitosterol und Stigmasterol

Messergebnisse

Die Sterolfraction setzt sich, nach der HPLC-Reinigung, aus zwei Sterolen zusammen. Im NMR Spektrum überlagern sich die Signale der Ringsysteme. Über die charakteristischen Verschiebungen der Seitenkettenatome (C-22 und C-23) konnten Sitosterol und Stigmasterol identifiziert werden. Die beiden Sterole liegen in einem Verhältnis von 1 : 2 (Sitosterol : Stigmasterol) in der Probe vor.

Das Markierungsmuster von Sitosterol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 42 und Abbildung 67 (A) zusammengefasst. Das Markierungsmuster von Stigmasterol ist in Tabelle 43 und Abbildung 67 (B) zusammengefasst.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Im NMR Spektrum der Sterole sind ausschließlich [¹³C₂]Isotopologe sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Fernkopplungen > 0,1 % zu beobachten.

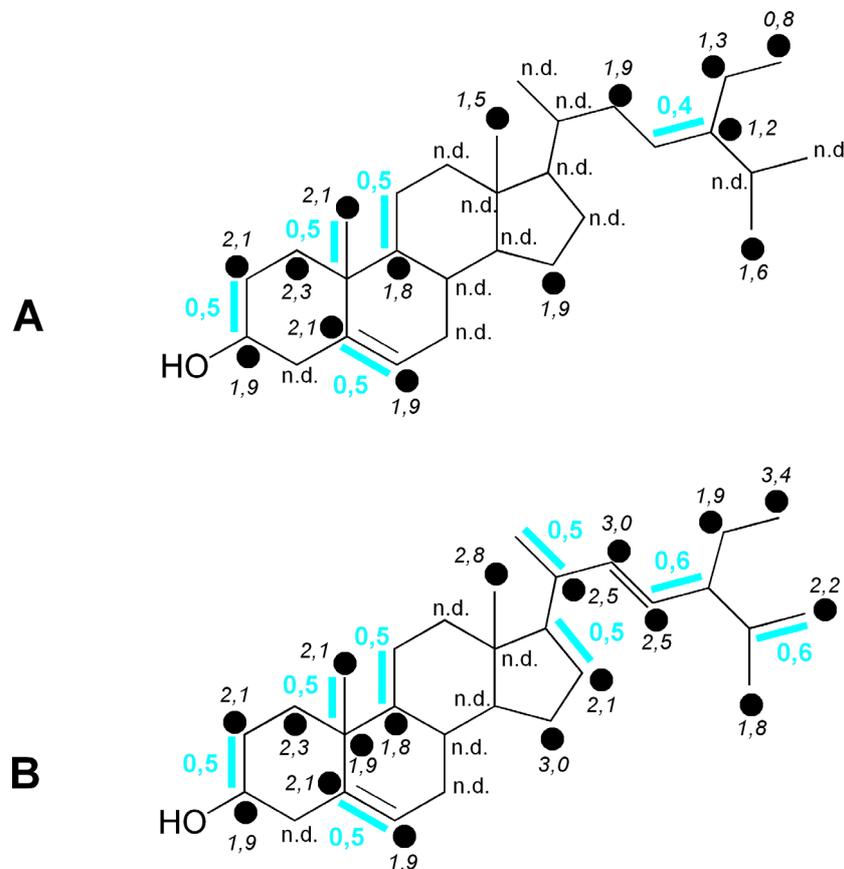


Abbildung 67. Kopplungsmuster von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Die Konzentration der [¹³C₂]Isotopologe aus den überlagerten Signalen des Ringsystems der beiden Sterole liegt bei 0,5 mol% (Abbildung 68, oben). In den Seitenketten liegt die Konzentration der [¹³C₂]Isotopologe im Sitosterol bei 0,4 mol% (Tabelle 42 und Abbildung 68, A, unten) und im Stigmasterol bei 0,5 mol% im IPP und bei 0,6 mol% im DMAPP (Tabelle 43 und Abbildung 68, B, unten). Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe im Ringsystem der beiden Sterole liegt bei 2%. Die, im NMR Spektrum nicht überlagerten, Positionen C-28 und C-29 haben im Sitosterol mit 1,3 % und 0,8 % eine geringere Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe, wie in Stigmasterol mit 1,9 % und 3,4 %. Die höhere Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe der Positionen C-28 und C-29 im Stigmasterol spiegelt sich auch in den

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

nicht überlagerten Signalen der Seitenkette wieder (Positionen C-15, C-16, C-18, sowie C-20 bis C-27). Es kann davon ausgegangen werden, dass Sitosterol eine Anreicherung von 2 % und Stigmasterol von 3 % hat (Abbildung 67, **A** und **B**). Die überlagerten Signale liefern ein Gemisch der beiden Anreicherungen, in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses der beiden Sterole (Sitosterol : Stigmasterol 1 : 2).

Tabelle 42. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Sitosterol aus den Einbauversuchen in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose oder mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ²⁸	[1- ¹³ C ₁]D-Glucose	[U- ¹³ C ₆]D-Glucose	
	Verschiebung δ [ppm]		J _{CC} [Hz]	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C _{abs}
1	37,2		3,8	3,4	
2	31,7	36,3 (3)	3,7	3,7	12,6
3	71,8	36,5 (2)	3,3	3,5	14,3
4	42,3		n.d.	n.d.	
5	140,7	71,8 (6)	4,2	3,7	13,1
6	121,7	71,8 (5)	3,4	3,5	14,2
7	31,9		n.d.	n.d.	
8	31,9		n.d.	n.d.	
9	50,2	35,4 (11)	3,7	3,4	13,9
10	36,5	n.d. (19)	2,9	n.d.	n.d.
11	21,1	n.d. (9)	n.d.	n.d.	n.d.
12	39,8	n.d. (13)	n.d.	n.d.	n.d.
13	42,2	n.d. (12)	n.d.	n.d.	n.d.
14	56,8		3,4	n.d.	
15	24,4		3,9	3,0	
16	28,2	n.d. (17)	3,5	n.d.	n.d.
17	56,0	n.d. (16)	n.d.	n.d.	n.d.
18	11,9		4,7	2,6	
19	19,4	35,2 (10)	4,5	3,7	13,2
20	36,1	n.d. (21)	3,6	n.d.	n.d.
21	19,0	n.d. (20)	n.d.	n.d.	n.d.
22	33,9		3,7	3,0	
23	26,1	35,5 (24)	n.d.	n.d.	14,1
24	45,8	35,3 (23)	4,1	2,7	13,3
25	29,2	n.d. (27)	n.d.	n.d.	n.d.
26 (pro-S)	19,8		4,0	2,7	
27 (pro-R)	n.d.	n.d. (25)	n.d.	n.d.	n.d.
28	23,1		n.d.	2,4	
29	12,0		4,6	1,9	

²⁸ Kopplungspartner in Klammern

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 43. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Stigmasterol aus den Einbauversuchen in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose oder mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ²⁹	[1- ¹³ C ₁]D-Glucose	[U- ¹³ C ₆]D-Glucose	
	Verschiebung δ [ppm]		J _{CC} [Hz]	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C _{abs}
1	37,2		3,8	3,4	
2	31,7	36,3 (3)	3,7	3,7	12,6
3	71,8	36,5 (2)	3,3	3,5	14,3
4	42,3		n.d.	n.d.	
5	140,7	71,8 (6)	4,2	3,7	13,1
6	121,7	71,8 (5)	3,4	3,5	14,2
7	31,9		n.d.	n.d.	
8	31,9		n.d.	n.d.	
9	50,2	35,4 (11)	3,7	3,4	13,9
10	36,5	n.d. (19)	2,9	n.d.	n.d.
11	21,1	n.d. (9)	n.d.	n.d.	n.d.
12	39,8	n.d. (13)	n.d.	n.d.	n.d.
13	42,2	n.d. (12)	n.d.	n.d.	n.d.
14	56,9		3,4	n.d.	
15	24,3		3,9	4,1	
16	28,9	33,9 (17)	n.d.	3,7	14,7
17	56,0	n.d. (16)	n.d.	n.d.	n.d.
18	12,0		3,8	3,9	
19	19,4	35,2 (10)	4,5	3,7	13,2
20	40,5	34,4 (21)	2,4	4,1	12,9
21	n.d.	n.d. (20)	n.d.	n.d.	n.d.
22	138,3		3,8	4,1	
23	129,3	43,6 (24)	3,0	4,2	13,3
24	51,2	43,5 (23)	3,0	n.d.	15,2
25	31,9	n.d. (27)	n.d.	n.d.	n.d.
26 (pro-S)	18,8		n.d.	2,9	
27 (pro-R)	21,2	32,5 (25)	4,7	3,9	14,4
28	25,4		4,3	3,0	
29	12,2		4,2	4,5	

²⁹ Kopplungspartner in Klammern

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese bauen sich Sterole aus vier IPP und zwei DMAPP Molekülen zusammen (Abbildung 51). Wie bereits ausgeführt, können nur die Daten der Seitenkette für die Bestimmung der Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle von Sitosterol bzw. Stigmasterol herangezogen werden (Abbildung 68). Die sich überlagernden Signale der beiden Sterole werden bei den weiteren Auswertungen nicht herangezogen.

Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Sitosterol (**A**) und Stigmasterol (**B**) sind in Tabelle 44 und Abbildung 66 zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sitosterol (**A**) und Stigmasterol (**B**) weist ausschließlich [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, sowie [¹³C₁]Isotopologe in höheren Konzentrationen auf (Tabelle 44 und Abbildung 66). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Mevalonatweg. Die Konzentration der [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe liegt im IPP von Sitosterol bei 0,4 mol%, sowie im IPP von Stigmasterol bei 0,5 mol% und im DMAPP bei 0,6 mol%.

Damit ist die Konzentration der [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen des Stigmasterols nur etwas halb so hoch, im Vergleich zu den hypothetischen Daten über den Mevalonatweg mit 1,0 % (Tabelle 41 und Abbildung 66, C). Der Konzentrationsanteil in dem IPP Molekül von Sitosterol ist noch niedriger. Im Gegensatz dazu ist die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe mit 2 % in Sitosterol und mit 3 % in Stigmasterol deutlich höher, als die 1,4 % bzw. 2,5 % der hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Moleküle aus dem Mevalonatweg.

Die höhere Konzentration der [¹³C₁]Isotopologe in den Sterolen wird durch den Einbau von [¹³C₁]Markierungen verursacht. Je stärker die Verstoffwechslung der [U-¹³C₆]D-Glucose voranschreitet, desto mehr [¹³C₁]Bruchstücke entstehen. Wenn es bei den Biosynthesen der Aminosäure und der Sterole einen zeitlichen Unterschied gibt, erklärt sich die erhöhte Konzentration an [¹³C₁]Isotopologen durch die spätere Bildung der Sterole. Eine weitere Quelle für [¹³C₁]Markierungen ist das ¹³CO₂. Bei den Biosynthesen, zum Beispiel zu Beginn des Pentosephosphatwegs, wird ¹³CO₂ abgespalten. Das ¹³CO₂ diffundiert durch die Zellwände und kann anschließend über die Photosynthese refixiert werden.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

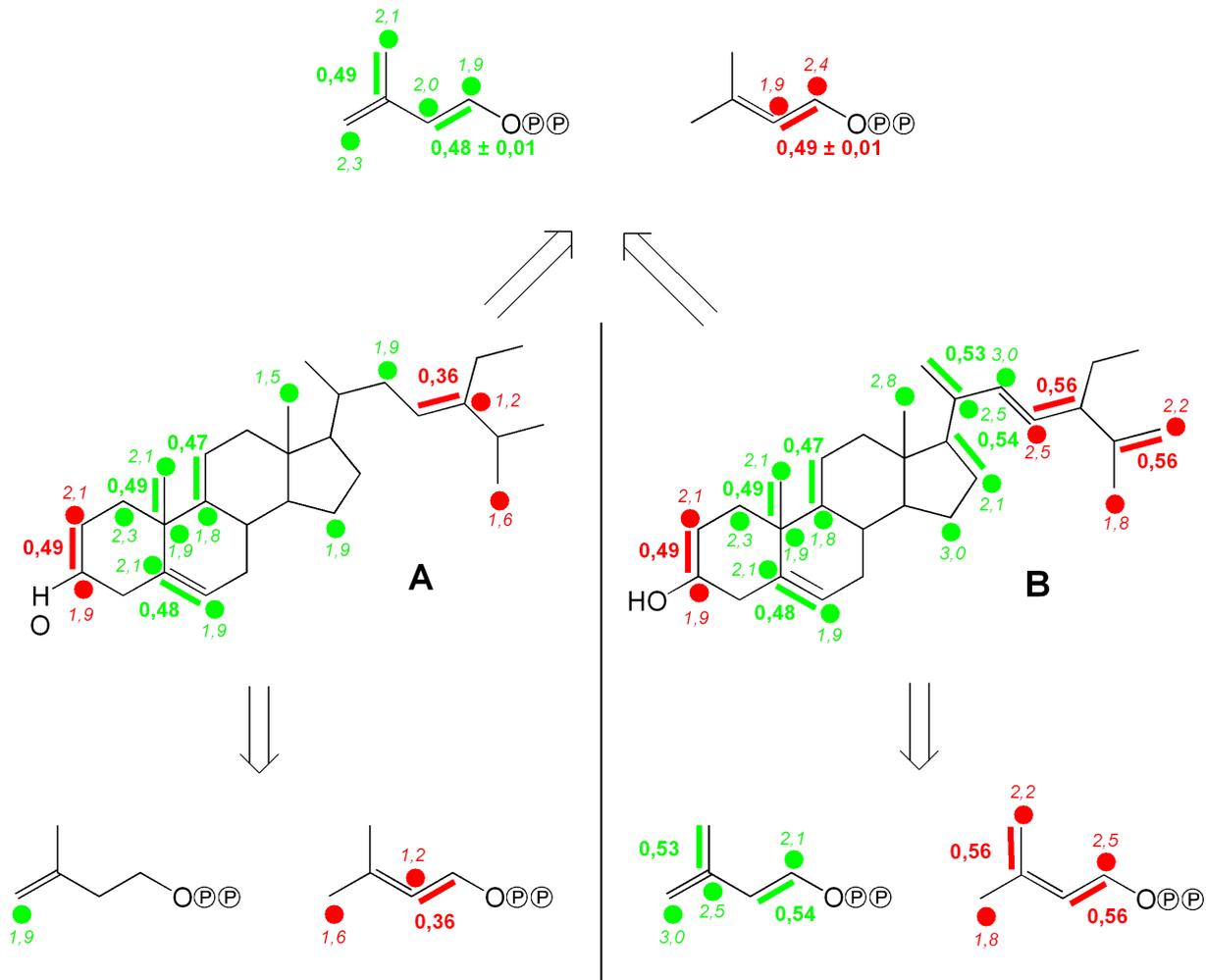


Abbildung 68. Das Markierungsmuster der IPP (grün) und DMAPP (rot) Moleküle von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, getrennt nach überlagerten Signalen aus dem Ringsystem (oben) und Signalen aus der Seitenkette (unten).

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) weist ausschließlich [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, sowie [¹³C₁]Isotopologe in höheren Konzentrationen auf (Tabelle 44 und Abbildung 66). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Mevalonatweg. Die Konzentration der [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe liegt im IPP von Sitosterol bei 0,4 mol%, sowie im IPP von Stigmasterol bei 0,5 mol% und im DMAPP bei 0,6 mol%. Damit ist die Konzentration der [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen des Stigmasterols nur etwas halb so hoch, im Vergleich zu den hypothetischen Daten über den Mevalonatweg mit 1,0 % (Tabelle 41 und Abbildung 66, C). Der Konzentrationsanteil in dem IPP Molekül von Sitosterol ist noch niedriger. Im Gegensatz dazu ist die

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe mit 2 % in Sitosterol und mit 3 % in Stigmasterol deutlich höher, als die 1,4 % bzw. 2,5 % der hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Moleküle aus dem Mevalonatweg.

Tabelle 44. Aus Sitosterol und Stigmasterol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit		Kopplung			
			% ¹³ C _{abs}	ΔS ³⁰	% ¹³ C ¹³ C	Δs		
Sitosterol (Seitenkette)	DMAPP	1	(2)	n.d.		14,1	{1}	
		2	(1)	2,7	{1}	13,3	{1}	
		3	(5)	n.d.		n.d.		
		4		2,7	{1}			
		5	(3)	n.d.		n.d.		
Stigmasterol (Seitenkette)	IPP	1	(2)	3,7	{1}	14,7	{1}	
		2	(1)	n.d.		n.d.		
		3	(5)	4,1	{1}	n.d.		
		4		4,1	{1}			
		5	(3)	n.d.		12,9	{1}	
	DMAPP	1	(2)	4,2	{1}	13,3	{1}	
		2	(1)	n.d.		15,2	{1}	
		3	(5)	n.d.		n.d.		
		4		2,9	{1}			
		5	(3)	3,9	{1}	14,4	{1}	
Ringsystem	IPP	1	(2)	3,5	{1}	14,2	{1}	
		2	(1)	3,6	0,2 {2}	13,5	0,4 {2}	
		3	(5)	n.d.		n.d.		
		4		3,4	{1}			
		5	(3)	3,7	{1}	13,2	{1}	
	DMAPP	1	(2)	3,7	0,1 {1}	12,6	0,8 {1}	
		2	(1)	3,5	0,1 {1}	14,3	0,5 {1}	
		3	(5)	n.d.		n.d.		
		4		n.d.				
		5	(3)	n.d.		n.d.		

³⁰ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Die höhere Konzentration der [¹³C₁]Isotopologe in den Sterolen wird durch den Einbau von [¹³C₁]Markierungen verursacht. Je stärker die Verstoffwechslung der [U-¹³C₆]D-Glucose voranschreitet, desto mehr [¹³C₁]Bruchstücke entstehen. Wenn es bei den Biosynthesen der Aminosäure und der Sterole einen zeitlichen Unterschied gibt, erklärt sich die erhöhte Konzentration an [¹³C₁]Isotopologen durch die spätere Bildung der Sterole. Eine weitere Quelle für [¹³C₁]Markierungen ist das ¹³CO₂. Bei den Biosynthesen, zum Beispiel zu Beginn des Pentosephosphatwegs, wird ¹³CO₂ abgespalten. Das ¹³CO₂ diffundiert durch die Zellwände und kann anschließend über die Photosynthese refixiert werden.

3.4.4.1.3 Phytol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 46 und Abbildung 69 zusammengefasst.

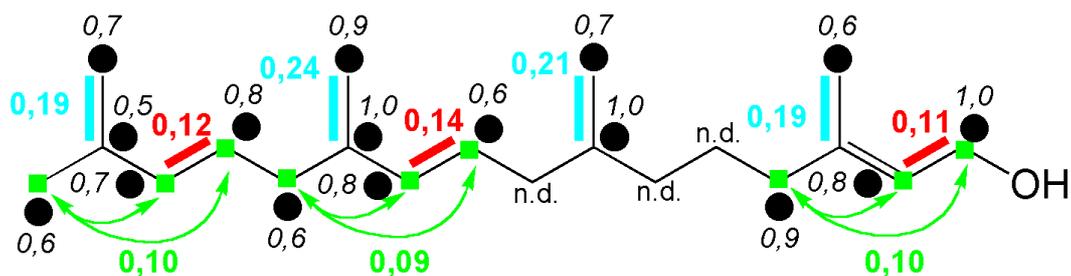


Abbildung 69. Kopplungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die farbigen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Im NMR Spektrum von Phytol sind neben [¹³C₂]Isotopologen Fernkopplungen an den Positionen C-1, C-13 und C-9 sichtbar (Abbildung 70).

Gemäß der Biosynthese baut sich Phytol aus drei IPP und einem DMAPP Molekül zusammen. Im nachfolgenden Text werden die IPP Moleküle, zum besseren Verständnis, entsprechend der Biosynthese von Phytol, nach der Reihenfolge, wie sie in Phytol eingeführt werden, von 1 bis 3 durchnummeriert (d.h. Position C-1 liegt im 3. IPP; Abbildung 71, A).

Die IPP/DMAPP Moleküle im Phytol weisen [3,5-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 0,2 mol%, sowie [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe deren Konzentrationen und

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Verhältnisse sich unterscheiden. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe liegt bei 1 % (Abbildung 69).

Beim Runden der Konzentrationen der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe auf zwei Stellen hinter dem Komma, wird deutlich, dass die Verhältnisse der Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen nicht vergleichbar sind (Tabelle 45 und Abbildung 71, A). Das Verhältnis der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe liegt im DMAPP bei 1,2 : 1,0. Von den IPP Molekülen können nur die Verhältnisse des 1. und 3. IPP Moleküls bestimmt werden. Im 1. IPP liegt das Verhältnis bei 1,6 : 1,0 und im 3. IPP bei 1,1 : 1,0. Alle drei IPP/DMAPP Moleküle weisen einen höheren Anteil an [1,2-¹³C₂]Isotopologen auf. Die Verhältnisse von DMAPP und dem 3. IPP sind vergleichbar. Auffällig ist der hohe Anteil von [1,2-¹³C₂]Isotopologen im 1. IPP. Der Satellit des [1,2-¹³C₂]Isotopologs im 1. IPP (C-9) ist im Verhältnis zu den Satelliten des [1,2,4-¹³C₃]Isotopologs deutlich höher, als im 3. IPP (C-1) und im DMAPP (C-13; Abbildung 70).

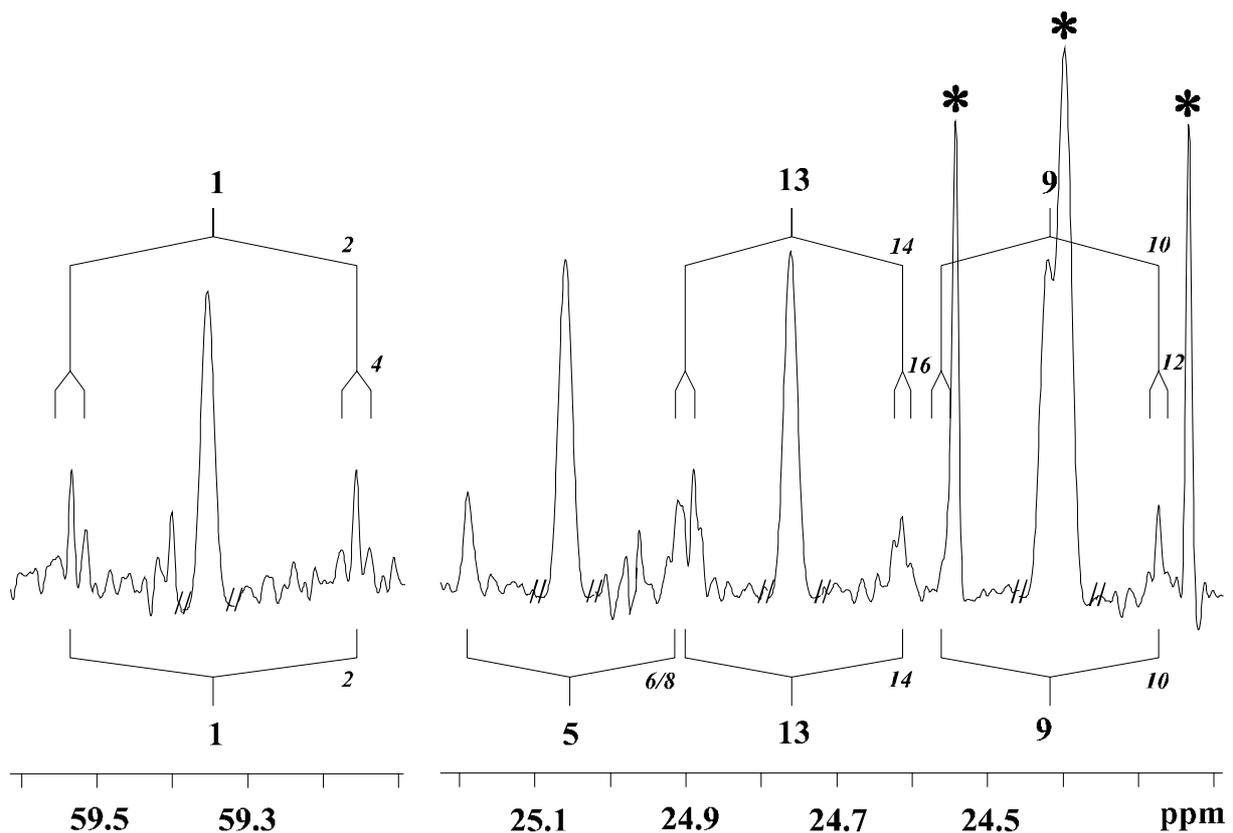


Abbildung 70. NMR Signale der Positionen C-1 (3. IPP), C-9 (1. IPP) und C-13 (DMAPP) von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die Sterne markieren die Signale der Position C-17 im *cis*-Abienol.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 45. Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe, sowie ihre Verhältnisse, aus den IPP/DMAPP Molekülen von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose und aus den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs (1-DOXP, Tabelle 41).

	Isotopologe		Verhältnis
	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]	
DMAPP	0,12	0,10	1,2 : 1,0
1. IPP	0,14	0,09	1,6 : 1,0
3. IPP	0,11	0,10	1,1 : 1,0
1-DOXP	0,24	0,41	1,0 : 1,7

Tabelle 46. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ³¹	Häufigkeit	Kopplungen
	Verschiebung δ [ppm]			
1	59,4	47,4 (2)	2,3	5,0
		2,3 (2/4)		4,5
2	122,9	47,7 (1, 1/4)	2,1	9,3
3	140,3	41,6 (20)	n.d.	11,3
4	39,8		2,1	
5	25,1	n.d. (6)	n.d.	n.d.
6	36,6	34,9 (5)	2,3	9,8
7	32,6	35,3 (19)	2,3	10,1
8	37,3		2,0	
9	24,4	33,9 (10)	1,9	6,7
		1,5 (10/12)		4,0
10	37,4	33,6 (9)	2,1	11,6
11	32,7	35,3 (18)	2,3	11,1
12	37,2		1,8	
13	24,8	34,6 (14)	2,1	6,2
		1,4 (14/16)		4,6
14	39,3	34,8 (13)	2,0	10,0
15	27,9	35,1 (17)	1,8	11,8
16	22,6		1,8	
17	22,7	35,2 (15)	2,0	8,5
18	19,7	35,3 (11)	2,2	9,9
19	19,7	35,3 (7)	2,0	9,6
20	16,1	41,8 (3)	1,9	10,1

³¹ Kopplungspartner in Klammern

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Retrobiosynthese

Phytol setzt sich, wie in Abbildung 71 (A) dargestellt aus einem DMAPP (rot) und drei IPP (grün) Molekülen zusammen. Da sich die Verhältnisse der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe in dem 1. und 3. IPP Molekül deutlich unterscheiden, werden die Daten der IPP Moleküle getrennt ausgewertet. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Phytol sind in Tabelle 47 und Abbildung 66 (E) zusammengefasst.

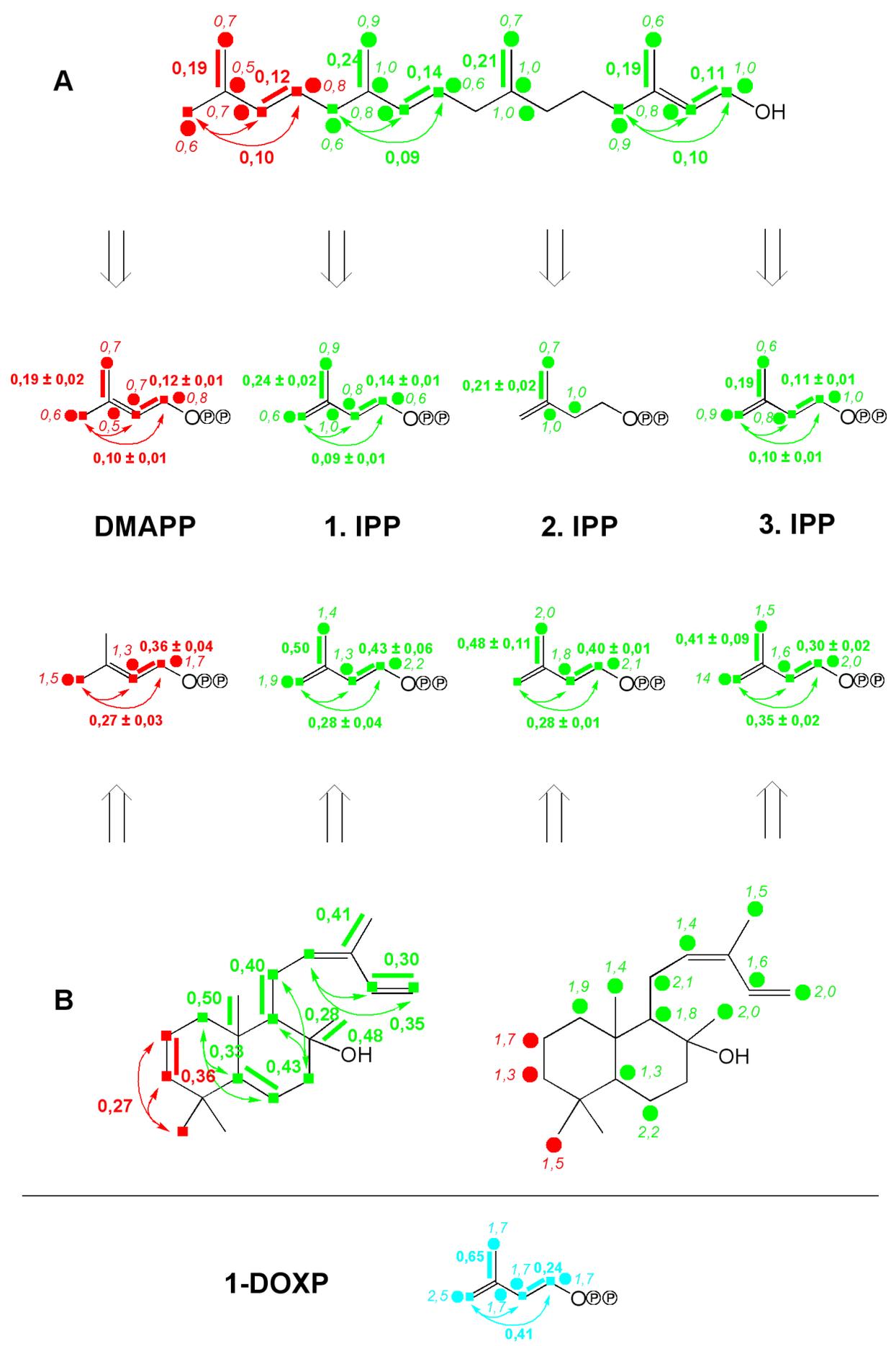
Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Phytol weist [1,2-¹³C₂], [1,2,4-¹³C₃] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, sowie [¹³C₁]Isotopologe mit höheren Konzentrationen auf (Abbildung 66, E; Abbildung 71, A). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Konzentration des [1,2,4-¹³C₃]Isotopologs liegt bei 0,1 mol%, und entspricht damit nur einem Viertel der Markierungshöhe der hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Moleküle über den Deoxyxylulosephosphatweg (0,4 mol%, Tabelle 41 und Abbildung 66, D). Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe ist im Phytol mit 1 % ca. halb so hoch, wie in den hypothetisch bestimmten Daten mit 1,7 % bzw. 2,4 %.

Die höhere Konzentration der [¹³C₁]Isotopologe im Phytol wird durch den Einbau von [¹³C₁]Markierungen verursacht. Je stärker die Verstoffwechslung der [U-¹³C₆]D-Glucose voranschreitet, desto mehr [¹³C₁]Bruchstücke entstehen. Wenn es bei den Biosynthesen der Aminosäure und des Phytols einen zeitlichen Unterschied gibt, erklärt sich die erhöhte Konzentration an [¹³C₁]Isotopologen durch die spätere Bildung des Phytols.

Eine weitere Quelle für [¹³C₁]Markierungen ist das ¹³CO₂. Bei den Biosynthesen, zum Beispiel zu Beginn des Pentosephosphatwegs, wird ¹³CO₂ abgespalten. Das ¹³CO₂ diffundiert durch die Zellwände und kann anschließend über die Photosynthese refixiert werden.

Abbildung 71. Das Markierungsmuster der IPP (grün) und DMAPP (rot) Moleküle von Phytol (A) und *cis*-Abienol (B) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, sowie die Vorhersage für das IPP/DMAPP Molekül (blau) aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten über den Deoxyxylulosephosphatweg (1-DOXP).

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C]₆D-Glucose)



Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 47. Aus Phytol retrobiosynthetisch abgeleitete Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Abgeleitet aus		Position	koppelt mit	Häufigkeit % ¹³ C _{abs}	Kopplung % ¹³ C ¹³ C
Phytol	1. IPP	1	(2)	1,9	6,7
			(2/4)		4,0
		2	(1)	2,1	11,6
		3	(5)	2,3	11,1
		4		1,8	
		5	(3)	2,0	9,9
	2. IPP	1	(2, 2/4)	n.d.	n.d.
		2	(1)	2,3	9,8
		3	(5)	2,3	10,1
		4		2,0	
		5	(3)	2,2	9,6
	3. IPP	1	(2)	2,3	5,0
			(2/4)		4,5
		2	(1)	2,1	9,3
		3	(5)	n.d.	11,3
		4		2,1	
		5	(3)	1,9	10,1
	DMAPP	1	(2)	2,1	6,2
			(2/4)		4,6
		2	(1)	2,0	10,0
3		(5)	1,8	11,8	
4			1,8		
	5	(3)	2,0	8,5	

Tabelle 48. Bestimmung der Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, die über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurden.

	Isotopologe	
	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]
		63 %
1-DOXP	0,23	0,41
DMAPP	0,06	0,10
1. IPP	0,05	0,09
3. IPP	0,06	0,10

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 49. Bestimmung der Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, die über den Mevalonatweg synthetisiert wurden, sowie der Anteil dieser Konzentrationen am Gesamtsignal.

	[1,2- ¹³ C ₂] Isotopologe		Differenz	Anteil am Gesamtsignal
	aus Phytol	aus 1-DOXP ³²		
DMAPP	0,12	0,06	0,06	27 %
1. IPP	0,14	0,05	0,09	39 %
3. IPP	0,11	0,06	0,05	24 %

Das Verhältnis der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe unterscheidet sich innerhalb der IPP/DMAPP Moleküle mit 1,2 : 1,0 (DMAPP), 1,2 : 1,0 (3. IPP) bzw. 1,6 : 1,0 (1. IPP, Tabelle 45). Im Vergleich zum Verhältnis von 1,0 : 1,7, aus den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs, ist der Anteil an [1,2-¹³C₂]Isotopolog im Phytol höher. Wenn im *Nicotiana tabacum*, bei der Biosynthese vom Phytol, neben den IPP/DMAPP Molekülen aus dem Deoxyxylulosephosphatweg, auch Vorstufen der Terpenbiosynthese aus dem Mevalonatweg beteiligt sind, lassen sich die experimentell bestimmten Verhältnisse der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe erklären. Der als Crosstalk bezeichnete Austausch von Vorstufen der Terpenbiosynthese zwischen den Kompartimenten der Zelle wurde bereits in anderen Organismen nachgewiesen (Tabelle 3 und Tabelle 4).

Da das [1,2,4-¹³C₃]Isotopolog ausschließlich über den Deoxyxylulosephosphatweg gebildet wird, kann über das bekannte Verhältnis der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe die Konzentration an [1,2-¹³C₂]Isotopolog, das über den Mevalonatweg gebildet wurde, bestimmt werden. Der Anteil der [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen liegt bei den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs bei 63 %. Die Konzentration (mol%) des [1,2-¹³C₂]Isotopologs, das über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurde, entspricht demnach 37 % des Gesamtsignals (Tabelle 48). Das heißt, dass nur 0,06 mol% (DMAPP), 0,05 mol% (1. IPP) und 0,06 mol% (3. IPP) des [1,2-¹³C₂]Isotopologs über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurden. Die Differenz von 0,06 mol% (DMAPP), 0,09 mol% (1. IPP), sowie 0,05 mol% (3. IPP) der im Phytol bestimmten Konzentration der [1,2-¹³C₂]Isotopologe stammt aus dem Mevalonatweg (Tabelle 49). Der Anteil, der über den Mevalonatweg synthetisierten IPP/DMAPP Moleküle, spiegelt die Höhe des Crosstalks zwischen den Kompartimenten (Plastiden und Cytosol) wieder.

³² siehe Tabelle 48

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Der Crosstalk liegt in den vorliegenden IPP/DMAPP Molekülen bei 27 % (DMAPP), 39 % (1. IPP) und 24 % (3. IPP) (Tabelle 49). Die IPP/DMAPP Moleküle aus Phytol haben einen unterschiedlich hohen Crosstalk. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede im Crosstalk liegt, wie in der Literatur beschrieben, bei den diskutierten Metaboliten die am Crosstalk zwischen den Kompartimenten beteiligt sind (Schwarz, 1994; Schwarz und Arigoni, 1999). Wenn ausschließlich IPP und Farnesyldiphosphat (FPP) am Crosstalk beteiligt sind, ergibt sich eine mögliche statistische Verteilung der Moleküle, die aus dem Cytosol für die Biosynthese von Phytol in die Plastiden importiert werden. Der im Phytol, aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, beobachtete Crosstalk kann durch den Import von FPP und IPP erklärt werden (Abbildung 72). Die importierten FPP Moleküle würden zu gleichen Teilen mit DMAPP oder IPP reagieren. Die importierten IPP Moleküle verteilen sich gleichmäßig über das ganze Molekül.

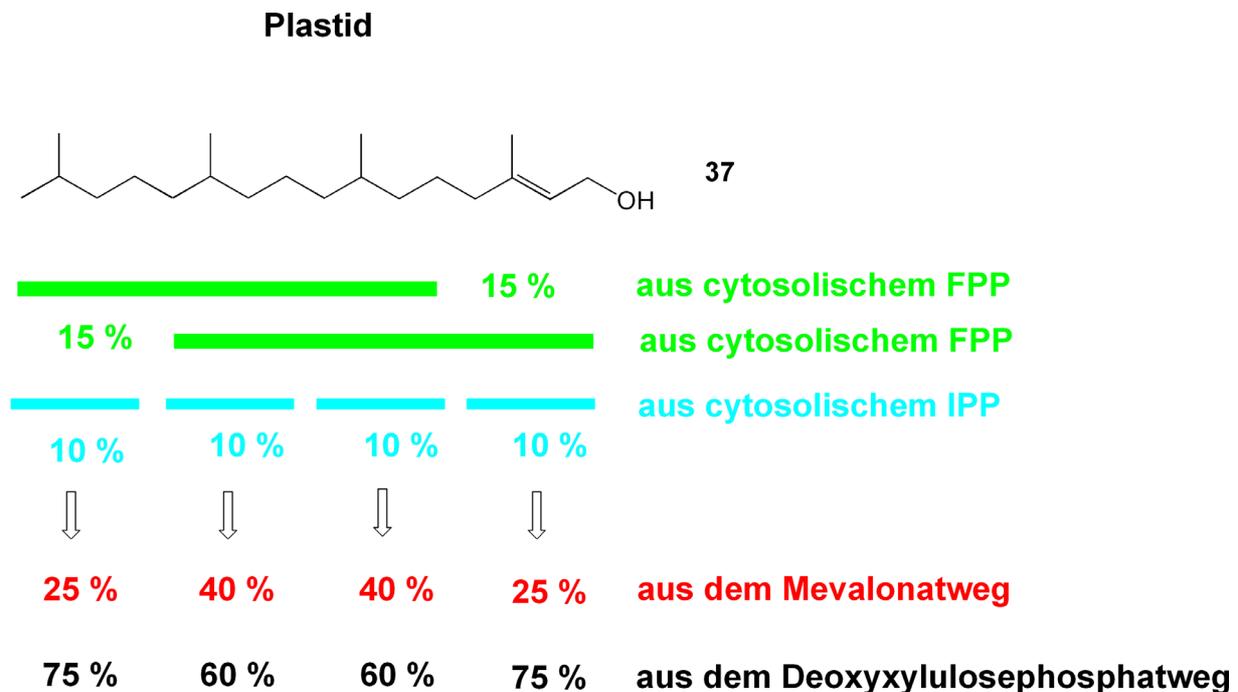


Abbildung 72. Hypothetischer Einbau der Terpenbiosynthesevorläufer IPP und Farnesyldiphosphat (FPP), die für die Phytolbiosynthese aus dem Cytosol in die Plastiden eingeführt wurden. Hypothese zur Bestätigung des beobachteten Crosstalks im Phytol (40) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Schwarz und Arigoni vertreten, anhand der Markierungsergebnisse bei *Ginkgo biloba*, die Meinung, dass FPP nach dem Import mit IPP aus dem Deoxyxylulosephosphatweg weiterreagiert (Schwarz und Arigoni, 1999). Die vorliegenden Daten weisen auf eine Reaktion von FPP mit DMAPP und IPP hin.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Das Markierungsmuster kann auch durch den ausschließlichen Import von IPP/DMAPP Molekülen erklärt werden. Das in den Plastiden vorhandene Gleichgewicht der Isomerisierung der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Cytosol läge zur Seite des IPP verschoben vor. Wobei mit diesem Gedankenmodell nicht geklärt werden kann, warum der Crosstalk im 1. und 2. IPP Molekül höher ist, als im 3. IPP Molekül.

3.4.4.1.4 Geranylgeraniol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 50 und Abbildung 73 (A) zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Geranylgeraniol sind keine Satelliten sichtbar (Abbildung 84). Die vorliegende Verbindung weist keine Kopplungsblöcke auf. Es wurden keine mehrfach ¹³C-markierten Vorstufen in Geranylgeraniol eingebaut. Auf der anderen Seite belegt die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe mit 0,6 % den Einbau von [¹³C₁]Fragmenten.

Tabelle 50. Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose oder mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	[1- ¹³ C ₁]D-Glucose	[U- ¹³ C ₆]D-Glucose
		% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C _{abs}
1	59,4	3,3	1,5
2	124,4	3,1	n.d.
3	139,9	3,3	1,1
4	39,7	3,1	1,7
5	26,8	n.d.	1,9
6	124,2	3,0	1,7
7	135,4	3,0	1,0
8	39,7	2,9	n.d.
9	26,7	3,0	1,6
10	123,7	3,3	1,9
11	135,0	2,9	1,2
12	39,6	2,8	1,8
13	26,3	2,9	1,6
14	123,3	n.d.	1,7
15	131,2	3,1	n.d.
16	17,7	n.d.	n.d.
17	17,7	n.d.	n.d.
18	16,3	3,7	1,1
19	16,0	3,6	1,0
20	16,0	3,6	1,0

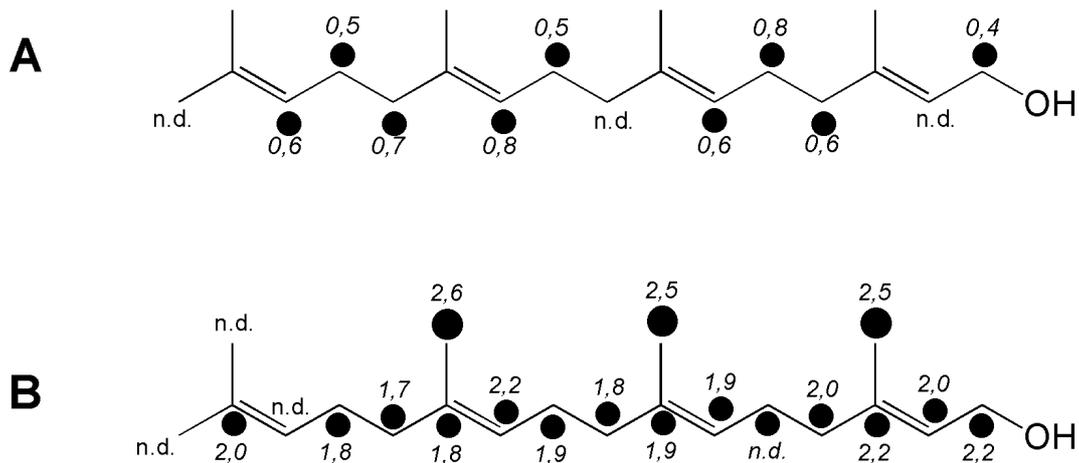


Abbildung 73. Kopplungsmuster von Geranylgeraniol aus den Einbauversuchen in *Nicotiana tabacum* mit (A) [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, und mit (B) [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich Geranylgeraniol aus einem DMAPP und drei IPP Molekülen zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Geranylgeraniol sind in Tabelle 51 und Abbildung 74 zusammengefasst.

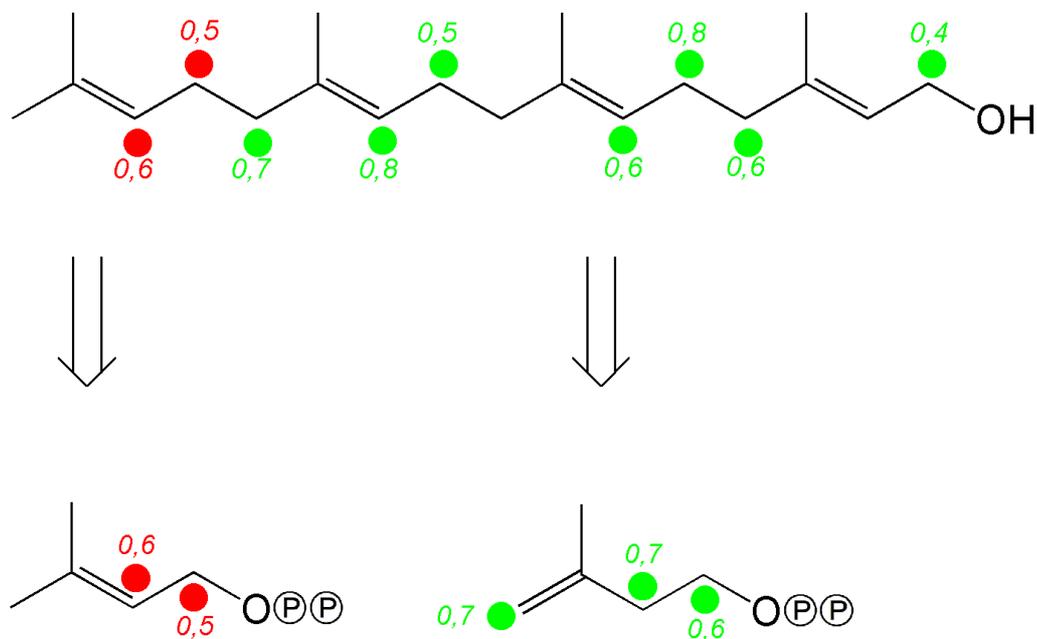


Abbildung 74. Das Markierungsmuster der IPP (grün) und DMAPP (rot) Moleküle von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

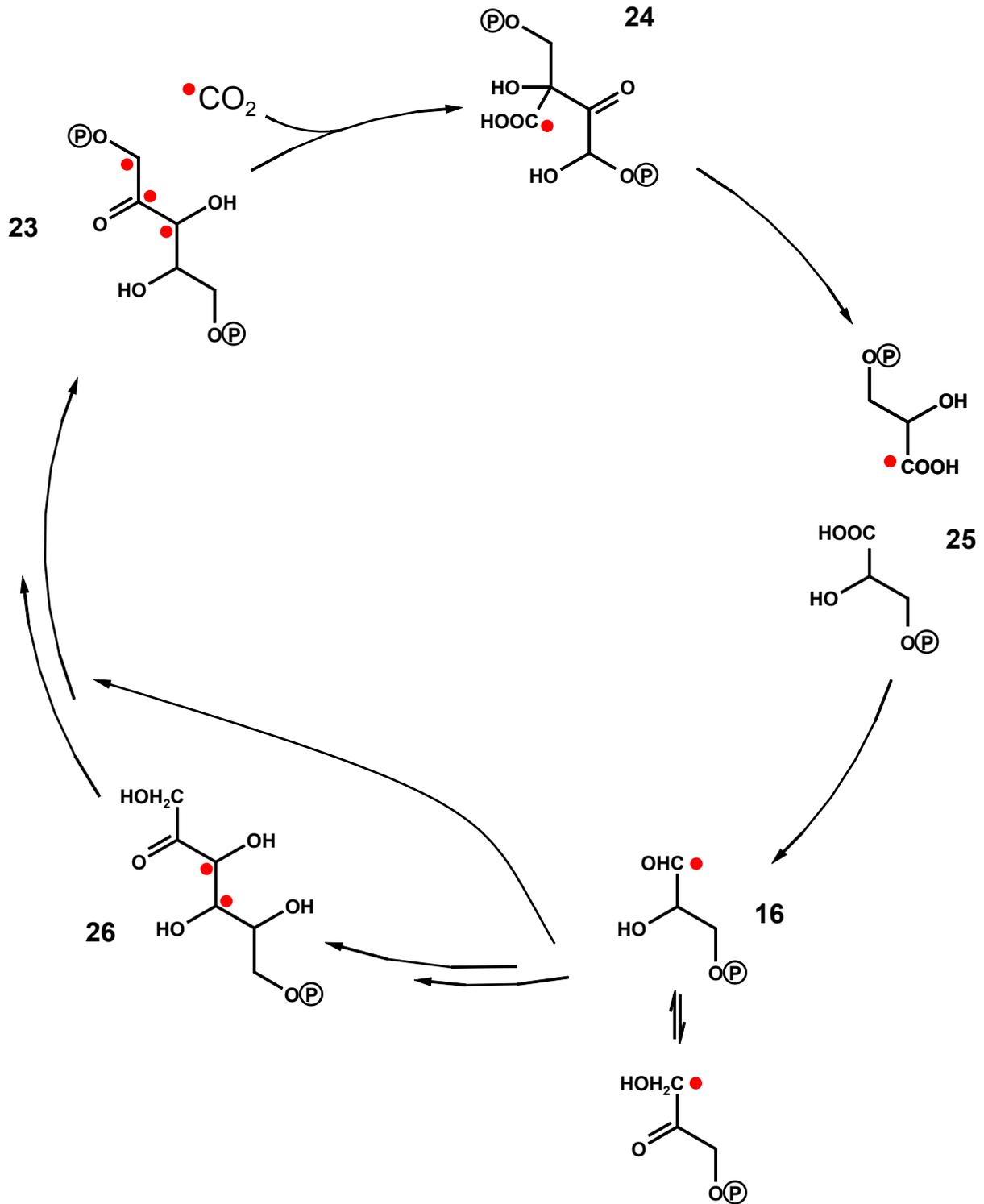


Abbildung 75. Metabolitenfluss im Calvin-Zyklus aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Hypothetischer Einbau von ¹³CO₂ über den Calvin-Zyklus.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus Geranylgeraniol weist keine Kopplungsblöcke auf, jedoch [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-1, C-2 und C-4 (Abbildung 74). Die Verteilung der Anreicherungen in den IPP/DMAPP

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Molekülen weist auf ein Glycerinaldehyd-3-phosphat mit [¹³C₁]Isotopologen in allen drei Positionen. Die fehlenden Kopplungsblöcke im Geranylgeraniol schließen einen Einbau von dem, aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch bestimmten, Glycerinaldehyd-3-phosphat aus. Es muss davon ausgegangen werden, dass bei der Biosynthese des Geranylgeraniol weitgehend Stoffwechselmetabolite aus der Photosynthese eingebaut wurden.

Der Ursprung der Markierung in der Verbindung ist voraussichtlich ¹³CO₂, das über die Photosynthese gebunden wird. Bei den Biosynthesen wird ¹³CO₂ frei und diffundiert über die Zellwände in die Spaltöffnungen. Bei der ersten Fixierung von ¹³CO₂ im Calvin-Zyklus bildet sich ein [1-¹³C₁]Glycerinaldehyd-3-phosphat (Abbildung 75, **16**). Wenn das [1-¹³C₁]Glycerinaldehyd-3-phosphat an der Regenerationsphase zur Rückgewinnung von Ribulose-1,5-bisphosphat (**23**) beteiligt ist, wird die Markierung in Position C-1, C-2 und C-3 von Ribulose-1,5-bisphosphat (**23**) eingeführt. Aus den Ribulose-1,5-bisphosphaten (**23**), mit [¹³C₁]Isotopologen an den Positionen C-1, C-2 und C-3, bilden sich im weiteren Verlauf des Calvin-Zyklus Glycerinaldehyd-3-phosphate (**16**) mit erhöhten Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe an allen drei Positionen (Abbildung 75).

Da Geranylgeraniol ein Bestandteil des Photosyntheseapparats ist, erscheint es wahrscheinlich, dass bei der Terpenbiosynthese innerhalb der Chloroplasten mit markiertem Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Calvin-Zyklus gearbeitet wird.

Tabelle 51. Aus Geranylgeraniol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Abgeleitet aus		Position	Häufigkeit	
			% ¹³ C _{abs}	Δs ³³
Geranylgeraniol	IPP	1	1,7	0,2 {3}
		2	1,8	0,1 {2}
		3	1,1	0,1 {3}
		4	1,8	0,1 {2}
		5	1,0	0,1 {3}
	DMAPP	1	1,6	{1}
		2	1,7	{1}
		3	n.d.	{1}
		4	n.d.	{1}
		5	n.d.	{1}

³³ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

3.4.4.1.5 *Cis*-Abienol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von *cis*-Abienol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 52 und Abbildung 76 (A) zusammengefasst.

Tabelle 52. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von *cis*-Abienol aus den Einbauversuchen in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose oder mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ³⁴	Isotopen- shift ³⁵	[1- ¹³ C ₁]D-Glucose	[U- ¹³ C ₆]D-Glucose		
	Verschiebung δ [ppm]			J _{CC} [Hz]	[ppb]	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C _{abs}
1	40,0				4,8	3,3	
2	18,5	33,3 (3) 1,7 (3/18)	8,3		6,7	3,5	11,0 8,7
3	41,7	33,3 (2, 2/18)	6,6		3,4	3,1	18,0
4	33,2	n.d. (19)	11,0		3,1	n.d.	n.d.
5	56,0	34,5 (6)	9,7		3,9	3,1	19,8
6	20,2	34,6 (5) 1,2 (1/5)	7,0		n.d.	4,0	12,0 7,7
7	43,8				n.d.	n.d.	
8	74,3	38,9 (17)	10,5		5,2	2,2	16,6
9	62,0	36,2 (11)	13,6		4,5	3,6	18,4
10	38,9	n.d. (20)	11,9		4,6	1,9	n.d.
11	23,0	36,2 (9) 1,0 (7/9)	7,5		n.d.	3,9	10,5 7,1
12	133,8				4,7	2,9	
13	130,8	43,9 (16)	5,7		4,7	1,9	16,6
14	133,5	69,0 (15, 15/12)	24,7		3,5	3,4	17,8
15	113,8	68,9 (14) 3,6 (12/14)	28,6		7,7	3,8	8,2 9,6
16	19,9	43,9 (13)	6,6		6,8	3,0	16,4
17	24,4	38,9 (8)	8,7		n.d.	3,6	16,3
18	33,4				4,5	2,9	
19	21,5	35,2 (4)	8,0		8,3	n.d.	16,6
20	15,4	35,5 (10)	8,3		6,2	3,0	16,7

³⁴ Kopplungspartner in Klammern

³⁵ Die Isotopenshifts wurden aus dem ¹³C-NMR Spektrum des Einbauversuchs mit [U-¹³C₆]D-Glucose bestimmt.

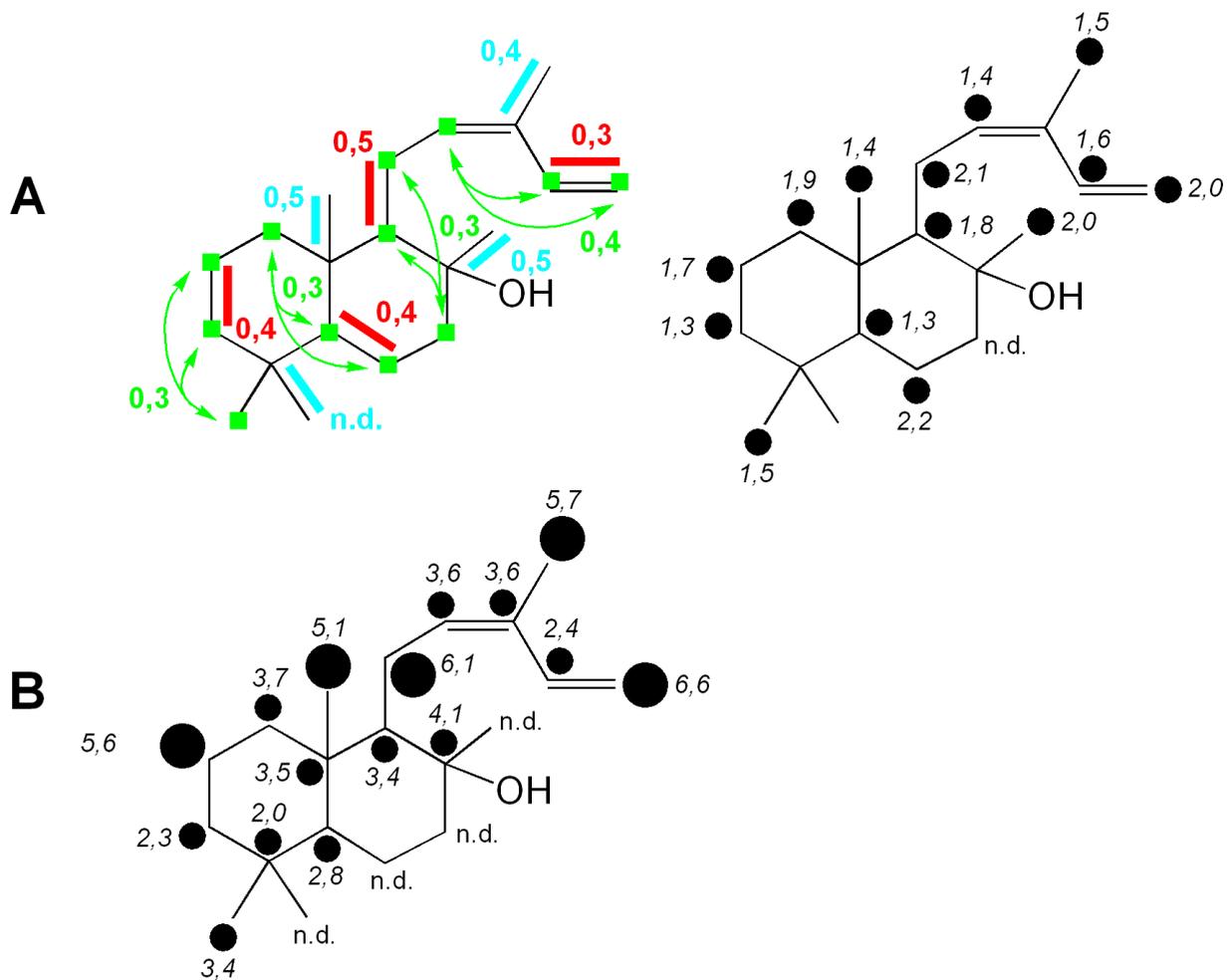


Abbildung 76. Kopplungsmuster von *cis*-Abienol aus den Einbauversuchen in *Nicotiana tabacum* mit (A) [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, und mit (B) [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die farbigen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Im NMR Spektrum von *cis*-Abienol sind neben [¹³C₂]Isotopologen Fernkopplungen an den Positionen C-2, C-6, C-11 und C-15 sichtbar (Abbildung 77).

Gemäß der Biosynthese baut sich *cis*-Abienol aus drei IPP und einem DMAPP Molekül zusammen. Im nachfolgenden Text werden die IPP Moleküle zum besseren Verständnis, entsprechend der Biosynthese von *cis*-Abienol, nach ihrer Reihenfolge, wie sie in *cis*-Abienol eingeführt werden, von 1 bis 3 durchnummeriert (d.h. Position C-15 liegt im 3. IPP, Abbildung 71, B).

Die IPP/DMAPP Moleküle im *cis*-Abienol weisen [3,5-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 0,5 mol% bzw. 0,4 mol%, sowie [1,2-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

von 0,4 mol% und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe mit einer Konzentration von 0,3 mol% auf. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe liegt bei 1,3 - 2,2 % (Abbildung 76, A).

Die Verhältnisse der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe in den DMAPP (1,3 : 1,0), 1. IPP (1,5 : 1,0) und 2. IPP (1,4 : 1,0) Molekülen sind vergleichbar (Tabelle 53). Das 3. IPP unterscheidet sich von ihnen mit einem Verhältnis von 1,0 : 1,2. Das 3. IPP hat einen geringeren Anteil an [1,2-¹³C₂]Isotopologen, als die anderen IPP/DMAPP Moleküle von *cis*-Abienol. Die unterschiedlichen Verhältnisse der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe sind im NMR Spektrum sichtbar (Abbildung 77). Vorallem beim DMAPP (C-2) fällt die deutlich größere Fläche der Satelliten für das [2,3-¹³C₂]Isotopolog auf. Im Gegensatz dazu sind die entsprechenden Satelliten des [14,15-¹³C₂]Isotopologs im 3. IPP (C-15) deutlich niedriger (Abbildung 77).

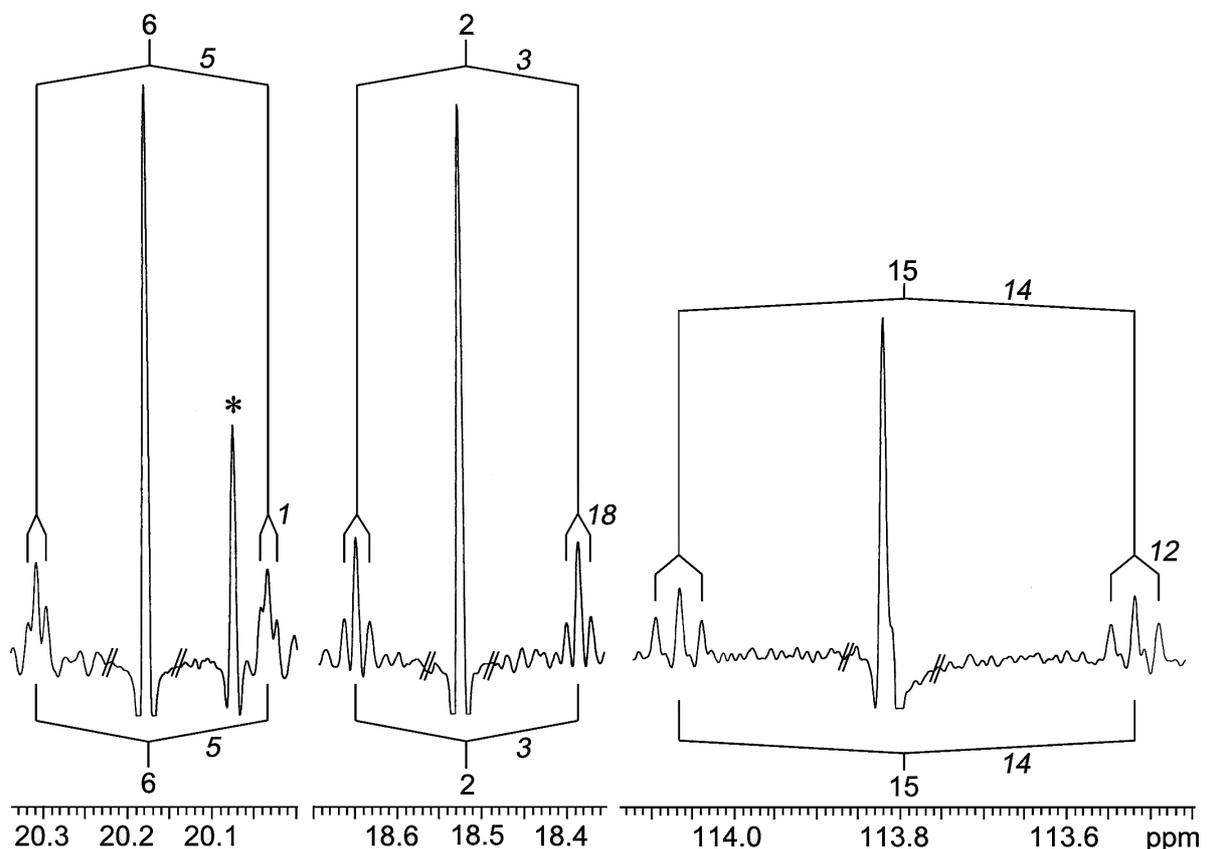


Abbildung 77. NMR Signale der Positionen C-2 (DMAPP), C-6 (1. IPP) und C-15 (3. IPP) von *cis*-Abienol aus den Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 53. Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe, sowie ihre Verhältnisse, aus den IPP/DMAPP Molekülen von *cis*-Abienol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose und aus den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs (1-DOXP, Tabelle 41).

	Isotopologe		Verhältnis
	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]	
DMAPP	0,36	0,27	1,3 : 1,0
1. IPP	0,43	0,28	1,5 : 1,0
2. IPP	0,40	0,28	1,4 : 1,0
3. IPP	0,30	0,35	1,0 : 1,2
1-DOXP	0,24	0,41	1,0 : 1,7

Retrobiosynthese

Cis-Abienol setzt sich, wie in Abbildung 71 (B) dargestellt aus einem DMAPP (rot) und drei IPP (grün) Molekülen zusammen. Da sich die Verhältnisse der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃] Isotopologe in den IPP Molekülen unterscheiden, werden die Daten von 1./2. IPP und 3. IPP getrennt ausgewertet. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von *cis*-Abienol sind in Tabelle 54 und Abbildung 66 (F) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus *cis*-Abienol weist [1,2-¹³C₂], [1,2,4-¹³C₃] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, sowie [¹³C₁]Isotopologe mit höheren Konzentrationen auf (Abbildung 66, F; Abbildung 71, B). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Konzentration der [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe unterscheiden sich 0,27 mol% im DMAPP, 0,29 mol% im 1./2. IPP und 0,35 mol% im 3. IPP. Im Vergleich zu den 0,41 mol%, die über den Deoxyxylulosephosphatweg aus den Aminosäuren bestimmt wurden (Tabelle 41 und Abbildung 66, D), liegen im *cis*-Abienol nur 66 %, 71 % bzw. 85 % der Konzentration der [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe vor. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe aus dem *cis*-Abienol (2 %) ist mit den hypothetischen Daten (1,7 % bzw. 2,4%) vergleichbar, obwohl sie der Intensität der Kopplungsblöcke angepasst, niedriger sein müsste.

Die höhere Konzentration der [¹³C₁]Isotopologe im *cis*-Abienol wird durch den Einbau von [¹³C₁]Markierungen verursacht. Je stärker die Verstoffwechslung der [U-¹³C₆]D-Glucose voranschreitet, desto mehr [¹³C₁]Bruchstücke entstehen. Wenn es bei den Biosynthesen der

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Aminosäure und des *cis*-Abienols einen zeitlichen Unterschied gibt, erklärt sich die erhöhte Konzentration an [¹³C₁]Isotopologen durch die spätere Bildung des *cis*-Abienols.

Eine weitere Quelle für [¹³C₁]Markierungen ist das ¹³CO₂. Bei den Biosynthesen, zum Beispiel zu Beginn des Pentosephosphatwegs, wird ¹³CO₂ abgespalten. Das ¹³CO₂ diffundiert durch die Zellwände und kann anschließend über die Photosynthese refixiert werden.

Tabelle 54. Aus *cis*-Abienol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit			Kopplung			
			% ¹³ C _{abs}	Δs ³⁶	{}	% ¹³ C ¹³ C	Δs	{}	
<i>cis</i>-Abienol	1./2. IPP	1	(2)	4,0	0,1	{2}	11,3	0,8	{2}
			(2/4)				7,4	0,3	{2}
		2	(1)	3,4	0,3	{2}	19,8		{1}
		3	(5)	2,1	0,2	{2}	16,6		{1}
		4		3,3		{1}			
	5	(3)	3,3	0,3	{2}	16,5	0,2	{2}	
	3. IPP	1	(2)	3,8		{1}	8,2		{1}
			(2/4)				9,6		
		2	(1)	3,4		{1}	17,8		{1}
		3	(5)	1,9		{1}	16,6		{1}
		4		2,9		{1}			
	5	(3)	3,0		{1}	16,4		{1}	
	DMAPP	1	(2)	3,5		{1}	11,0		{1}
			(2/4)				8,7		
		2	(1)	3,1		{1}	18,0		{1}
3		(5)	n.d.		{1}	n.d.		{1}	
4			2,9		{1}			{1}	
5	(3)	n.d.		{1}	16,6		{1}		

Das Verhältnis der, über den Deoxyxylulosephosphatweg hypothetisch bestimmten, [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe fällt mit 1,0 : 1,7 anders aus, als beim *cis*-Abienol mit 1,3 : 1,0 (DMAPP), 1,5 : 1,0 (1. IPP) 1,4 : 1,0 (2. IPP) bzw. 1,0 : 1,2 (3. IPP) (Tabelle 53). Der Anteil an [1,2-¹³C₂]Isotopologen ist in allen vier, aus dem *cis*-Abienol retrobiosynthetisch bestimmten, IPP/DMAPP Molekülen höher. Wenn bei der Biosynthese des *cis*-Abienols neben IPP/DMAPP Molekülen aus dem Deoxyxylulosephosphatweg, auch Vorstufen der Terpenbiosynthese aus dem Mevalonatweg beteiligt sind, lassen sich die experimentell bestimmten

³⁶ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Verhältnisse der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe erklären. Der als Crosstalk bezeichnete Austausch von Vorstufen der Terpenbiosynthese zwischen den Kompartimenten der Zelle wurde bereits in anderen Organismen nachgewiesen (Tabelle 3 und Tabelle 4).

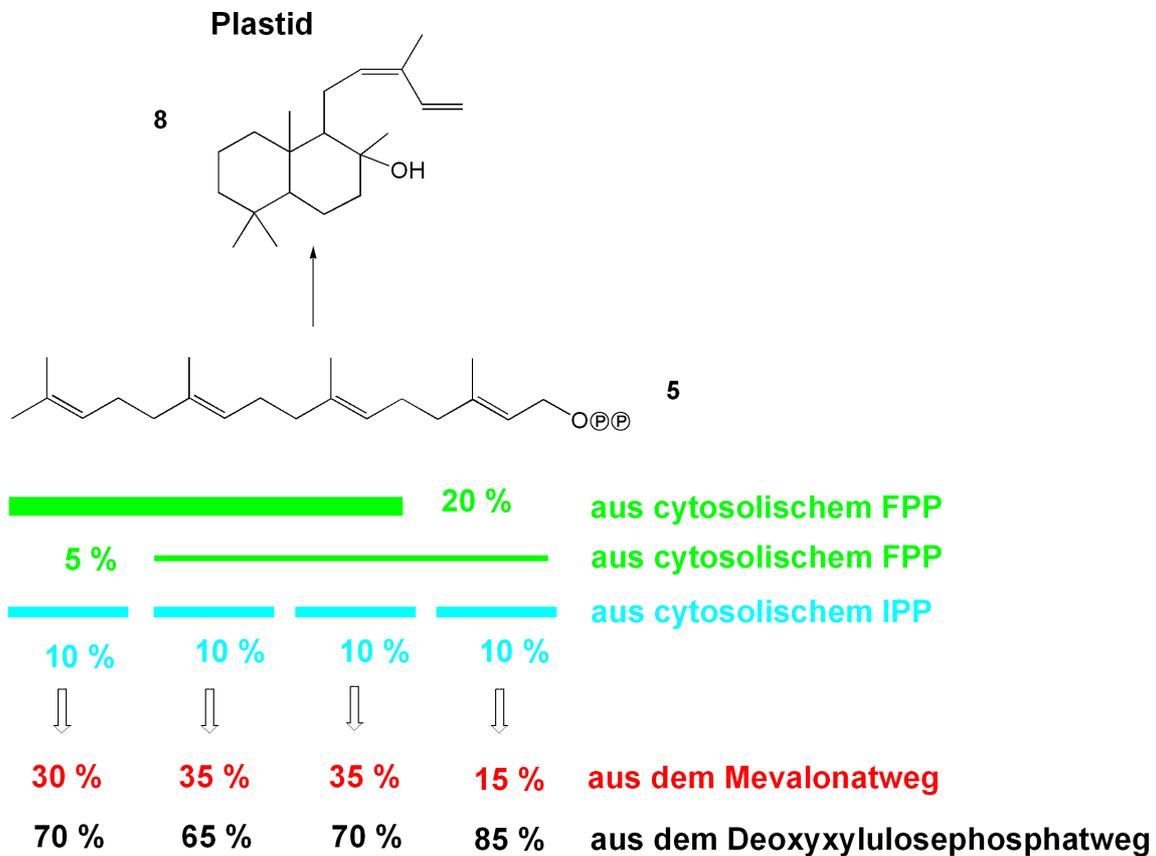


Abbildung 78. Hypothetischer Einbau der Terpenbiosynthesevorläufer IPP und Farnesyldiphosphat (FPP), die für die *cis*-Abienolbiosynthese aus dem Cytosol in die Plastiden importiert wurden. Hypothese zur Bestätigung des beobachteten Crosstalks im *cis*-Abienol (8) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Der Einbau ist mit der Vorstufe Geranylgeranyldiphosphat (5) dargestellt.

Da das [1,2,4-¹³C₃]Isotopolog ausschließlich über den Deoxyxylulosephosphatweg gebildet wird, kann über das bekannte Verhältnis der [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe die Konzentration an [1,2-¹³C₂]Isotopolog, das über den Mevalonatweg gebildet wurde, bestimmt werden. Der Anteil der [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen liegt bei den hypothetischen Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs bei 63 %. Die Konzentration (mol%) des [1,2-¹³C₂]Isotopologs, das über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurde, entspricht demnach 37 % des Gesamtsignals (Tabelle 55). Das heißt, dass nur 0,16 mol% (DMAPP, 1. IPP und 2. IPP), sowie 0,21 mol% (3. IPP) des [1,2-¹³C₂]Isotopologs über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurden. Die Differenz von 0,20 mol% (DMAPP),

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

0,27 mol% (1. IPP), 0,24 mol% (2. IPP), sowie 0,09 mol% (3. IPP), der im *cis*-Abienol bestimmten Konzentrationen der [1,2-¹³C₂]Isotopologe stammen aus dem Mevalonatweg (Tabelle 56). Der Anteil, der über den Mevalonatweg synthetisierten IPP/DMAPP Moleküle, spiegelt die Höhe des Crosstalks zwischen den Kompartimenten (Plastiden und Cytosol) wieder.

Der Crosstalk liegt in den vorliegenden IPP/DMAPP Molekülen bei 32 % (DMAPP), 38 % (1. IPP), 35 % (2. IPP) und 14 % (3. IPP) (Tabelle 56). Die IPP/DMAPP Moleküle aus *cis*-Abienol haben einen unterschiedlich hohen Crosstalk. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede im Crosstalk liegt, wie in der Literatur beschrieben, bei den diskutierten Metaboliten die am Crosstalk zwischen den Kompartimenten beteiligt sind (Schwarz, 1994; Schwarz und Arigoni, 1999). Wenn ausschließlich IPP und Farnesyldiphosphat (FPP) am Crosstalk beteiligt sind, ergibt sich eine mögliche statistische Verteilung der Moleküle, die aus dem Cytosol für die Biosynthese von *cis*-Abienol in die Plastiden importiert werden. Der im *cis*-Abienol, aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, beobachtete Crosstalk kann durch den Import von FPP und IPP erklärt werden (Abbildung 78). Die importierten FPP Moleküle würden sowohl mit DMAPP, wie mit IPP reagieren. Die Reaktion des FPP mit IPP wäre jedoch bevorzugt. Die importierten IPP Moleküle verteilen sich gleichmäßig über das ganze Molekül.

Das Markierungsmuster kann auch durch den ausschließlichen Import von IPP/DMAPP Molekülen erklärt werden. Das in den Plastiden vorhandene Gleichgewicht der Isomerisierung der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Cytosol läge zur Seite des IPP verschoben vor. Wobei mit diesem Gedankenmodell nicht geklärt werden kann, warum der Crosstalk im 1. und 2. IPP Molekül höher ist, als im 3. IPP Molekül.

Tabelle 55. Bestimmung der Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von *cis*-Abienol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, die über den Deoxyxylulosephosphatweg synthetisiert wurden.

	Isotopologe	
	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]
		63 %
1-DOXP	0,24	0,41
DMAPP	0,16	0,27
1. IPP	0,16	0,28
2. IPP	0,16	0,28
3. IPP	0,21	0,35

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 56. Bestimmung der Konzentrationen (mol%) der [1,2-¹³C₂]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von *cis*-Abienol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, die über den Mevalonatweg synthetisiert wurden, sowie der Anteil dieser Konzentrationen am Gesamtsignal.

	[1,2- ¹³ C ₂] Isotopologe		Differenz	Anteil am Gesamtsignal
	aus <i>cis</i> -Abienol	aus 1-DOXP ³⁷		
DMAPP	0,36	0,16	0,20	32 %
1. IPP	0,43	0,16	0,27	38 %
2. IPP	0,40	0,16	0,24	35 %
3. IPP	0,30	0,21	0,09	14 %

3.4.4.1.6 Nicotin

Das Markierungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 57 und Abbildung 79 zusammengefasst.

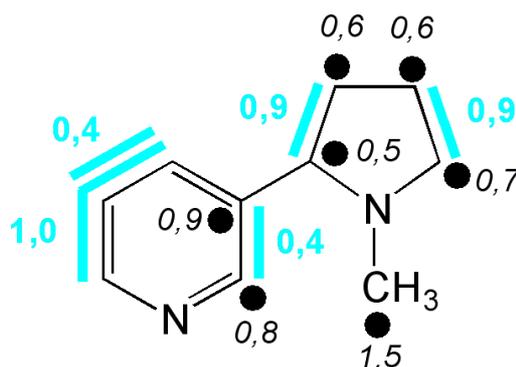


Abbildung 79. Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Pyrrolidin-Einheit

Im NMR Spektrum von Nicotin sind [6,7-¹³C₂] und [8,9-¹³C₂]Isotopologe in der Pyrrolidin-Einheit sichtbar (Abbildung 79, Abbildung 81 und Abbildung 80). Im Spektrum sind bei den Signalen der Positionen C-6 bis C-9 keine Fernkopplungen sichtbar (Abbildung 80).

Gemäß der Literatur erfolgt die Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bzw. aus Arginin (Abbildung 53; Tiburcio und Galston, 1986; Wagner, 1987). Die Intensitäten der

³⁷ siehe Tabelle 55

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Kopplungsblöcke im Nicotin sollten sich, durch das symmetrische Putrescin, aus der Summe der [2,3-¹³C₂] und [4,5-¹³C₂]Isotopologe des Glutamats bzw. des Arginins zusammensetzen. Bei einer Retrobiosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Arginin bilden sich [6,7-¹³C₂] und [8,9-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 0,7 mol% (Abbildung 83, **B**). Experimentell wurden 0,9 mol% bestimmt (Abbildung 83, **A**). Im Nicotin liegt neben höheren [¹³C₂]Isotopologen eine niedrigere Anreicherung von 0,6 %, im Verhältnis zum Arginin, vor. Die Anreicherungen aus dem Arginin liegen bei 1,7 %.

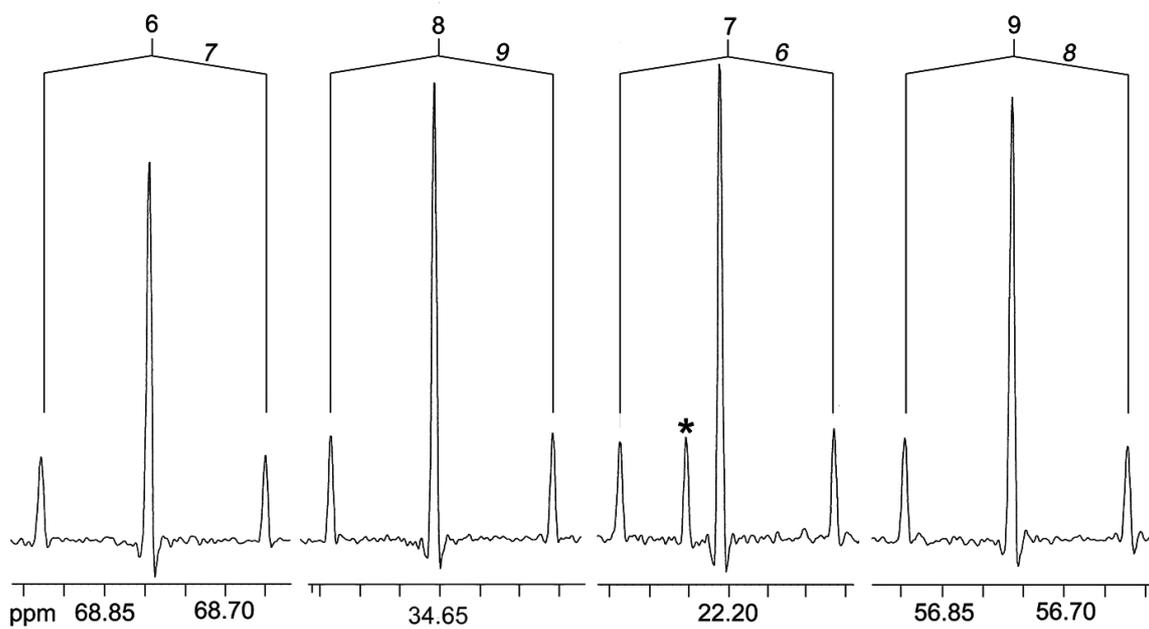
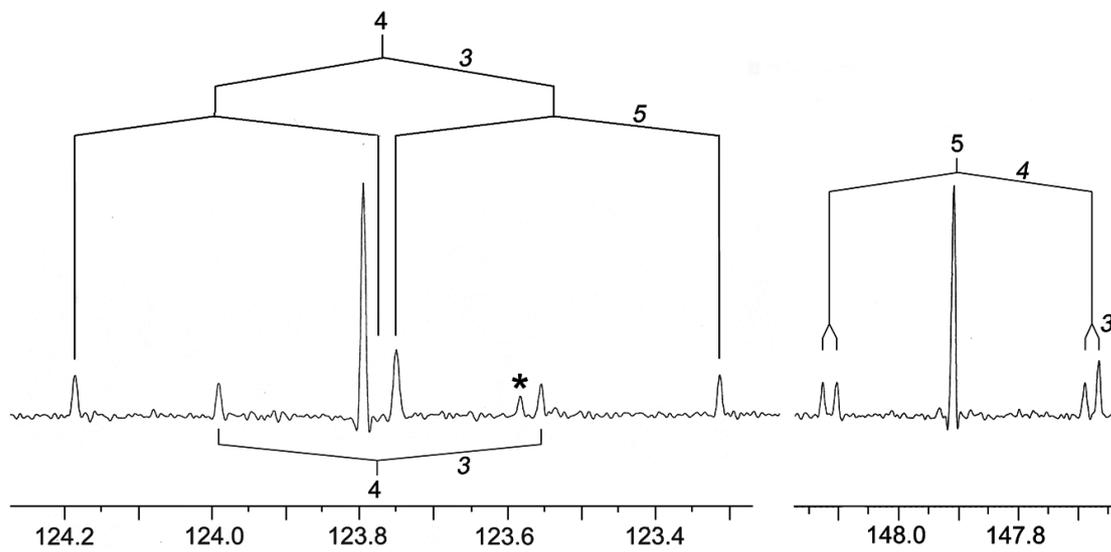
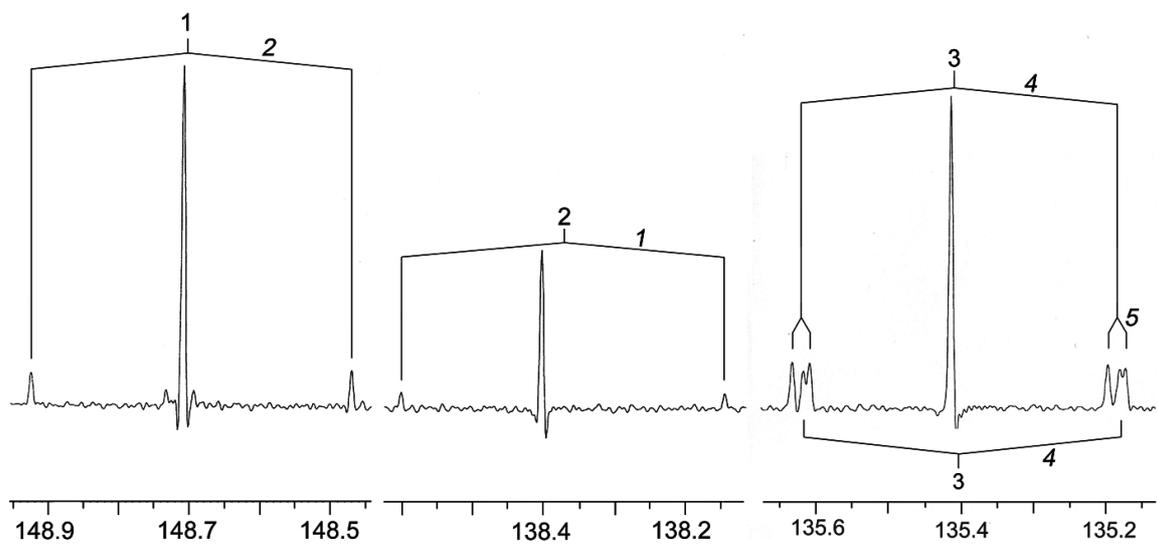
Der hohe Anteil an [¹³C₁]Isotopologen in der Aminosäure bedeutet eine stärkere Verstoffwechslung der D-Glucose. Es muss davon ausgegangen werden, dass die [U-¹³C₆]D-Glucose sehr früh und nur mit geringer Umsetzung im Stoffwechsel in das Nicotin eingebaut wird. Das erklärt auch die, im Verhältnis zum Arginin, höheren [¹³C₂]Isotopologe neben den niedrigeren [¹³C₁]Isotopologen im Nicotin.

Tabelle 57. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante ³⁸ J _{CC} [Hz]	Häufigkeit % ¹³ C _{abs}	Kopplung % ¹³ C ¹³ C
1	148,7	57,3 (2)	2,3	16,5
2	138,4	57,4 (1)	2,4	20,1
3	135,4	54,7 / 2,4 (4, 4/5)	2,7	51,8
4	123,8	54,7 (3) 55,0 (3/5)	2,5	15,6 37,2
5	147,9	55,2 / 2,9 (3/4)	2,2	39,3
6	68,8	35,1 (7)	2,5	33,7
7	22,2	34,4 (6)	2,6	35,5
8	34,7	35,1 (9)	2,6	34,2
9	56,8	34,3 (8)	2,7	33,1
10	40,1		2,6	

³⁸ Kopplungspartner in Klammern

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)



Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Abbildung 80. NMR Spektrum von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die Sterne markieren Verunreinigungen im Spektrum.

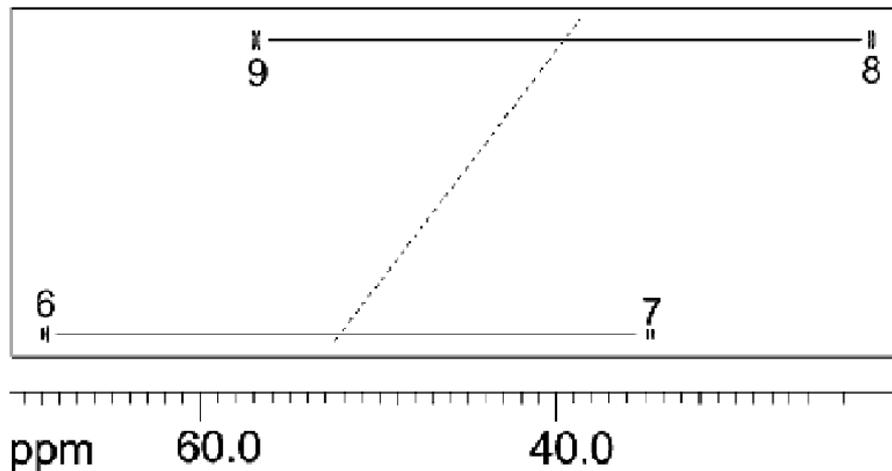


Abbildung 81. Zweidimensionales NMR Spektrum der Pyrrolidin- Einheit im Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Pyridin-Einheit

Im NMR Spektrum sind [1,2-¹³C₂], [3,4-¹³C₂] und [3,4,5-¹³C₃]Isotopologe in der Pyridin-Einheit des Nicotins sichtbar (Abbildung 79, Abbildung 82 und Abbildung 80). In der Literatur werden drei verschiedene Biosynthesewege für den Vorläufer der Pyridin-Einheit, der Nicotinsäure, beschrieben (S. 155).

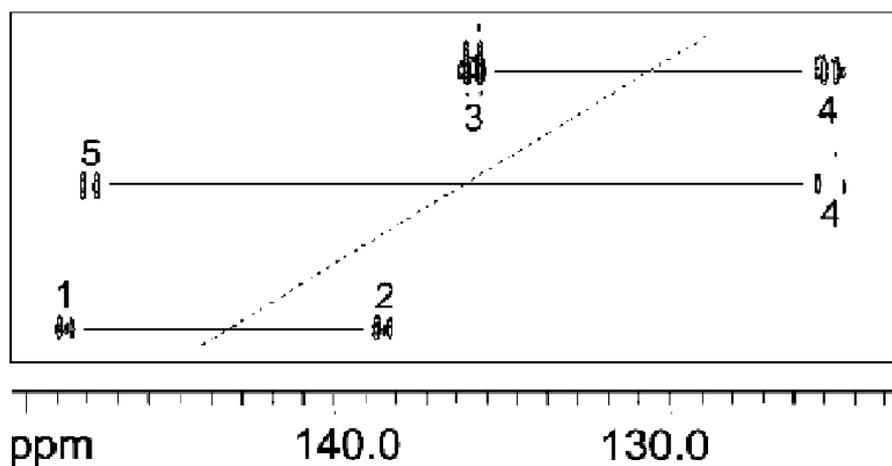
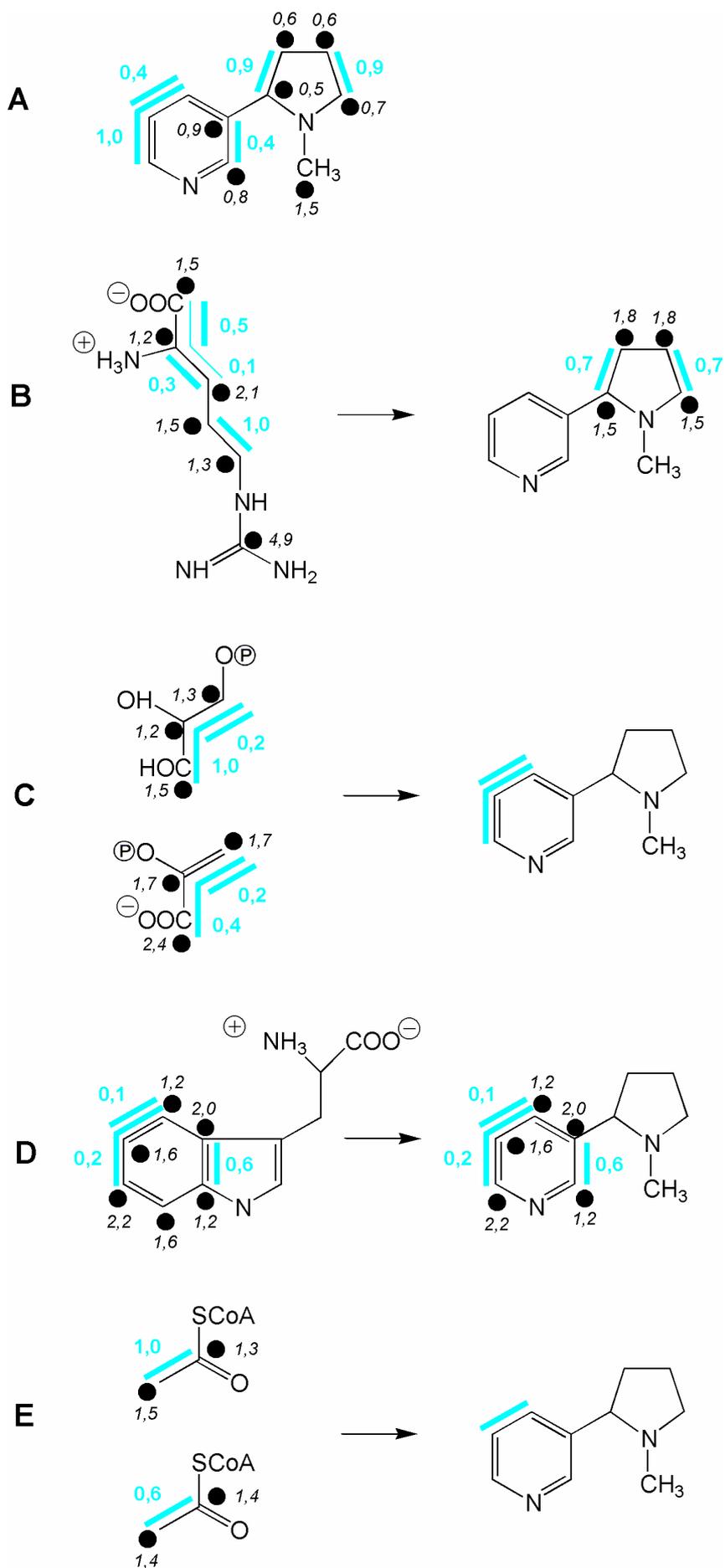


Abbildung 82. Zweidimensionales NMR Spektrum der Pyridin-Einheit im Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C]₆D-Glucose)



Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Abbildung 83. Vergleich der (A) experimentellen Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, mit den (B) bis (E) hypothetischen Kopplungsmustern, rekonstruiert aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten (Tabelle 20 und Abbildung 36). Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit über (B) Arginin. Biosynthese der Pyridin-Einheit aus Aspartat und (C) Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. 3-Phosphoenolpyruvat, sowie aus (D) Tryptophan (rekonstruiert aus Tyrosin, Tabelle 20), und aus Aspartat, Formiat und (E) Acetyl-CoA (rekonstruiert aus Arginin (oben) und Leucin (unten), Tabelle 20).

Die Biosynthese der Nicotinsäure in höheren Pflanzen geht, gemäß der Literatur, von Aspartat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus (Abbildung 55, oben; Wagner, 1987; Luckner, 1990; Review: Forster und Moat, 1980).

Die [3,4-¹³C₂] und [3,4,5-¹³C₂]Isotopologe im Nicotin stammen aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat. Das aus Histidin retrobiosynthetisch bestimmte Glycerinaldehyd-3-phosphat hat mit 1,0 : 5,0 ein anderes Verhältnis (Tabelle 20 und Abbildung 83, C), als die Isotopologe im Nicotin mit 1,0 : 2,5 (Abbildung 83, A). Bei der Bestimmung der zentralen Stoffwechselmetabolite aus den Aminosäuren wurden unterschiedlich beeinflusste Pools festgestellt (Tabelle 20 und Abbildung 36). Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin, Tabelle 20) und 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Tyrosin, Phenylalanin, Leucin und Isoleucin, Tabelle 20) sind über den Stoffwechsel miteinander verknüpft. Das Verhältnis der [¹³C₂] und [¹³C₃]Isotopologe im 3-Phosphoenolpyruvat unterscheidet sich mit 1,0 : 2,0, von dem Verhältnis in Glycerinaldehyd-3-phosphat mit 1,0 : 5,0 (Abbildung 83, C). Hier liegen zwei voneinander getrennte Pools vor, aus denen jeweils 3-Phosphoenolpyruvat und/oder Glycerinaldehyd-3-phosphat im Stoffwechsel weiterreagieren kann. Das Verhältnis der Isotopologe aus dem 3-Phosphoenolpyruvat ist besser mit dem Ergebnis aus dem Nicotin vergleichbar. Auch wenn die Verhältnisse der beiden Isotopologe in 3-Phosphoenolpyruvat und Nicotin gut übereinstimmen, ist die Konzentration der [3,4-¹³C₂] und [3,4,5-¹³C₂] Isotopologe im Nicotin mit 0,4 mol% und 1,0 mol% doppelt so groß, wie im 3-Phosphoenolpyruvat mit 0,2 mol% und 0,4 mol% (Abbildung 83, A und C).

Bei der Biosynthese von Nicotinsäure in höheren Pflanzen bildet sich ein [1,2-¹³C₂]Isotopolog im Nicotin, aus den Positionen C-2 und C-3 von Aspartat. In der vorliegenden Isolierung konnte Aspartat nicht NMR spektroskopisch vermessen werden. Das aus den Aminosäuren rekonstruierte Oxalacetat ist, bei den hier benötigten Positionen, nicht aussagekräftig (Tabelle 19). Bei der Bildung von Oxalacetat kann davon ausgegangen werden, dass ein Kopplungsblock zwischen den Positionen C-2 und C-3, aus den [1,2,3-¹³C₃] und [2,3,4-¹³C₃]

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Isotopologen, über die anaplerotische Reaktion gebildet wird. Das [2,3,4-¹³C₃]Isotopolog des Oxalacetats ist im α -Ketoglutarat sichtbar (Tabelle 20 und Abbildung 36). Eine Rekonstruktion des möglichen [1,2-¹³C₂]Isotopologs im Nicotin, aus dem α -Ketoglutarat, ergibt eine Konzentration des [1,2-¹³C₂]Isotopologs in Höhe von 0,2 mol%. Das [1,2-¹³C₂]Isotopolog im Nicotin ist mit 0,4 mol% doppelt so hoch.

Das Ergebnis für das [1,2-¹³C₂]Isotopolog entspricht dem Ergebnis für die [3,4-¹³C₂] und [3,4,5-¹³C₂]Isotopologe der Pyridin-Einheit im Nicotin.

Bei der Biosynthese der Nicotinsäure in Säugetieren wird, gemäß der Literatur (Cleaves und Miller, 2001; Wagner, 1987; Review: Forster und Moat, 198), Tryptophan als Ausgangs-Verbindung diskutiert (Abbildung 55, unten).

In dem vorliegenden Einbauversuch wurde die Markierung des aromatischen Rings von Tyrosin für die Darstellung herangezogen (Tabelle 19). Das [4,5-¹³C₂]Isotopolog des Tyrosins kommt im Nicotin auf den Positionen C-1 und C-2 zu liegen. Das gebildete [1,2-¹³C₂]Isotopolog im Nicotin ist mit einer Konzentration von 0,6 mol% deutlich höher als die [3,4-¹³C₂] und [3,4,5-¹³C₃] Isotopologe mit einer Konzentration von 0,1 mol% bzw. 0,2 mol% (Abbildung 83, **D**). Da die drei Isotopologe aus einer Verbindung, dem Tryptophan, stammen, kommt es während der Biosynthese zu keiner Verschiebung der Verhältnisse. Das über den aromatischen Ring der Aminosäure eingeführte Verhältnis der Isotopologe stimmt nicht mit den experimentellen Daten aus Nicotin überein.

Somit erscheint die Synthese der Pyridin-Einheit von Nicotin im vorliegenden Einbauversuch über die aromatische Aminosäure Tryptophan unwahrscheinlich.

Die Biosynthese von Nicotinsäure in anaeroben Bakterien geht, gemäß der Literatur (Gaertner und Shetty, 1977; Wagner, 1987; Review: Forster und Moat, 1980), von Aspartat, Formiat und Acetyl-CoA aus (Abbildung 55, links).

Die Biosynthese der Nicotinsäure über Aspartat, Formiat und Acetyl-CoA liefert [1,2-¹³C₂] und [3,4-¹³C₂]Isotopologe. Bei der hier untersuchten Biosynthese könnte ein [3,4,5-¹³C₃]Isotopolog nur über statistische Kopplungen zwischen Acetyl-CoA und Formiat, das in Position C-5 der Pyridin-Einheit eingeführt wird, entstehen. Das [3,4,5-¹³C₃]Isotopolog, in den experimentellen Daten von Nicotin, ist doppelt so hoch wie das [3,4-¹³C₂]Isotopolog. Das aus dem Acetyl-CoA gebildete [3,4-¹³C₂]Isotopolog liegt in einer Konzentration von 1,0 mol% (Acetyl-CoA rekonstruiert aus Arginin) bzw. 0,6 mol% (Acetyl-CoA rekonstruiert aus Leucin) vor. Unter den vorliegenden Bedingungen existiert keine statistische Kopplung,

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

die ein Intensitätsverhältnis, wie zwischen den [3,4-¹³C₂] und [3,4,5-¹³C₃]Isotopologen im Nicotin, ermöglichen könnten.

Somit erscheint die Synthese der Pyridin- Einheit von Nicotin in dem vorliegenden Einbauversuch über Aspartat, Formiat und Acetyl-CoA unwahrscheinlich.

3.4.4.1.7 Diskussion

Es gibt innerhalb der untersuchten Verbindungen ein Gefälle bei den Isotopologkonzentrationen. Nicotin hat doppelt so hohe Kopplungsblöcke, wie die Aminosäuren bzw. die zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 58). Die Intensität der Kopplungsblöcke im Phytol entsprechen nur 30 %, in den Sterolen nur 60 % und im *cis*-Abienol nur 70 % der Isotopologkonzentrationen in den zentralen Stoffwechselmetaboliten (Tabelle 59). Geranylgeraniol weist keine Kopplungsblöcke auf. Die Unterschiede in den Konzentrationen der Isotopologe werden schon mit der Satellitenhöhe im NMR Spektrum deutlich (Abbildung 84).

Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe laufen entgegengesetzt. Die Terpene haben eine höhere Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe, als die zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 59). Die zentralen Stoffwechselmetabolite haben eine höhere Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe, wie das Nicotin (Tabelle 58).

Tabelle 58. Vergleich der Kopplungsblöcke (mol%) und Häufigkeiten (%) in Nicotin, Rekonstruktion aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten und experimentelle Daten.

	[¹³ C ₁]	Isotopologe				Anteil an den rekonstruierten Isotopologen
		[1,2- ¹³ C ₂]	[3,4- ¹³ C ₂]	[3,4,5- ¹³ C ₃]	[6,7- ¹³ C ₂] [8,9- ¹³ C ₂]	
Nicotin (rekon.)	1,5	0,2	0,2	1,0	0,7	
Nicotin	2,5	0,4	0,4	1,0	0,9	130 – 200 %

Im vorliegenden Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* wurden ganze Pflanzen aus Blattzellen herangezogen. Beim Wachstum der Pflanze wurden, neben dem Spross, zu Beginn vor allem die Wurzeln ausgebildet. Die Nicotinbiosynthese erfolgt in den Wurzeln. Das gebildete Nicotin wird anschließend in alle Bereiche der Pflanze verteilt. Die Ergebnisse der getrennten Aufarbeitung von Wurzel, Spross und Blatt einer Probe bestätigten das (Tabelle 60). Es treten keine nennenswerte Unterschiede im Markierungsmuster oder Höhe in den verschiedenen Bereichen der Pflanzen auf.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Die frühe Ausbildung der Wurzeln und die wichtige Stellung des Nicotins als Fraßschutz legen die Vermutung nahe, dass zu Beginn der Vegetationsperiode vor allem die Nicotinbiosynthese durchgeführt wird. Eine andere Erklärung für den hohen Einbau ins Nicotin könnte auch der Syntheseort sein. Der Stoffwechsel in der Wurzel, Aufnahmeorgan der [U-¹³C₆]D-Glucose, setzt vielleicht bevorzugt markierte Verbindungen um. Die niedrigen Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe im Nicotin könnten mit einer frühen Umsetzung der [U-¹³C₆]D-Glucose zusammenhängen.

In den Aminosäuren und Terpenen wurden, neben niedrigeren Kopplungsblöcken, höhere Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe festgestellt. Die hohen Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe lassen sich auf eine starke Verstoffwechslung der [U-¹³C₆]D-Glucose zurückführen. Eine weitere Quelle an [¹³C₁]Markierungen ist der photosynthetische Einbau von ¹³CO₂ über die Photosynthese.

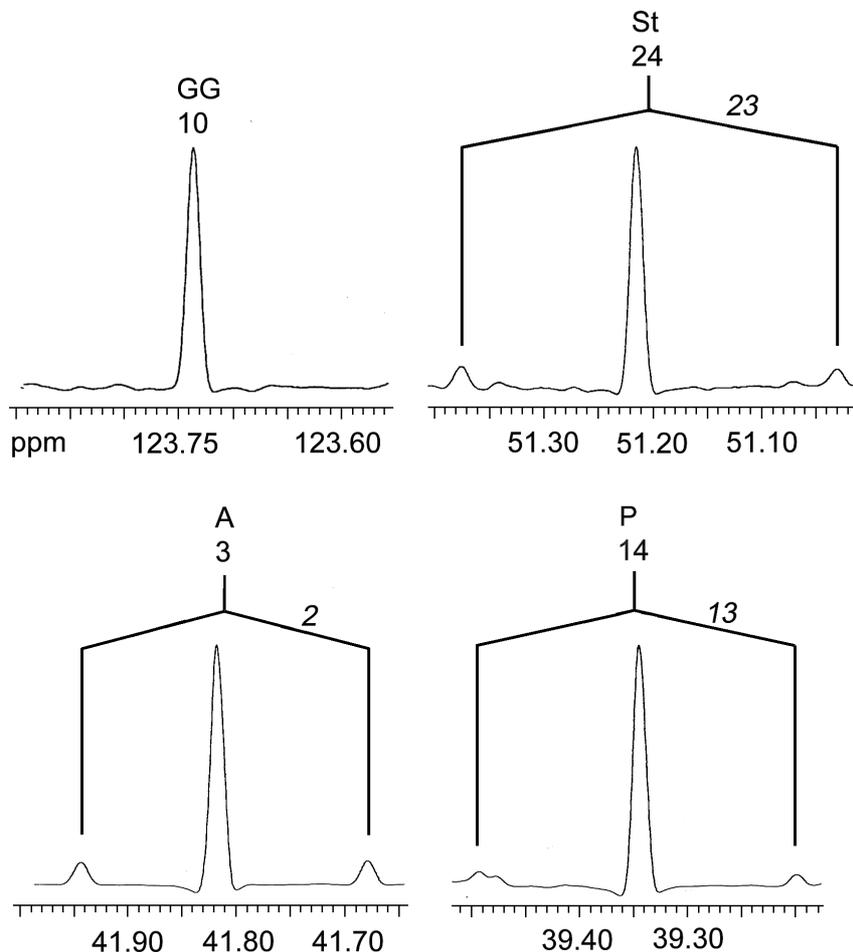


Abbildung 84. NMR Signale eines gemeinsamen Spektrums von Geranylgeraniol (GG), Stigmasterol (St), *cis*-Abienol (A) und Phytol (P) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Tabelle 59. Vergleich der Kopplungsblöcke (mol%) und Häufigkeiten (%) in den IPP/DMAPP Molekülen aus den hypothetisch bestimmten Biosynthesewegen und aus den experimentellen Daten der Terpene im Einbauversuch von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

		[¹³ C ₁]	Isotopologe			Anteil an den rekonstruierten Isotopologen
			[3,5- ¹³ C ₂]	[1,2- ¹³ C ₂]	[1,2,4- ¹³ C ₃]	
Mevalonatweg		3,5	0,96	0,96		
	1-DOXP	3,5	0,65	0,24	0,41	
Stigmasterol	DMAPP	4,1	0,56	0,56		60 %
	IPP	4,0	0,54	0,53		
Phytol	DMAPP	2,0	0,19	0,12	0,10	25 %
	1. IPP	2,0	0,24	0,14	0,09	
	3. IPP	2,1	0,19	0,11	0,10	
cis-Abienol	DMAPP	3,0	n.d.	0,36	0,27	70 %
	1./2. IPP	3,3	0,45	0,43	0,29	
	3. IPP	3,1	0,41	0,30	0,35	85 %

Tabelle 60. Vergleich der Markierungsmuster von Nicotin aus verschiedenen Teilen (Blatt, Stiel und Wurzel) der Pflanze isoliert.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungs- konstante ³⁹ J _{CC} [Hz]	Blatt		Stiel		Wurzel	
			% ¹³ C _{rel}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{rel}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{rel}	% ¹³ C ¹³ C
1	148,7	57,6 (2)	1,2	16,9	1,4	15,1	1,5	12,5
2	138,4	57,1 (1)	1,0	22,2	1,3	15,6	n.d.	n.d.
3	135,4	54,6/1,9 (5, 4/5)	1,3	52,7	n.d.	n.d.	1,7	49,6
4	123,8	54,5 (3)	1,4	18,5	1,6	17,2	2,1	19,1
		55,3 (3/5)		38,7		39,7		33,5
5	147,9	55,4/2,8 (3, 3/4)	1,3	42,3	1,3	42,7	2,0	49,4
6	68,8	35,1 (7)	1,2	34,1	1,3	27,3	1,7	24,1
7	22,2	34,4 (6)	1,3	34,0	1,4	32,0	1,9	24,9
8	34,7	34,9 (9)	1,3	33,3	1,4	32,8	1,8	27,7
9	56,8	34,5 (8)	1,3	33,4	1,4	27,3	2,1	30,0
10	40,1		1,2		1,3		2,1	

Der Zufluss von Verbindungen über die CO₂-Fixierung könnte die fehlenden [¹³C₂] und [¹³C₃]Isotopologe im Geranylgeraniol erklären. Die [¹³C₁]Isotopologe im Geranylgeraniol stammen dann aus fixierten ¹³CO₂, das während der Biosynthese frei wurde.

³⁹ Kopplungspartner in Klammern

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

Geranylgeranyldiphosphat ist gemäß der Literatur (Herbert, 1981; Mann, 1980) Vorstufe für alle Diterpene. Die isolierten Diterpene, Phytol und *cis*-Abienol, enthalten [¹³C₂] und [¹³C₃]Isotopologe aus der [U-¹³C₆]D-Glucose. Wenn das Geranylgeranyldiphosphat mit [¹³C₂] und [¹³C₃]Isotopologen hauptsächlich zu Phytol, *cis*-Abienol und anderen Diterpenen weiterreagiert, wäre es möglich, dass zum Zeitpunkt der Analyse kein markiertes Geranylgeranyldiphosphat vorhanden ist. Daneben müsste ein Geranylgeranyldiphosphat Pool existieren, der mit der Photosynthese verbunden ist, aus dem das isolierte Geranylgeraniol stammt. Dieses unmarkierte Geranylgeranyldiphosphat fließt zum Teil in die Phytolbiosynthese, jedoch kaum in die *cis*-Abienolbiosynthese. Die vorhandene Markierung im Phytol wird durch den Nachfluss dieses Geranylgeranyldiphosphats verdünnt. D.h. die Biosynthese von Phytol und *cis*-Abienol ist räumlich voneinander getrennt und greift auf unterschiedliche Geranylgeranyldiphosphat Pools zu. Möglicherweise wird bei der Synthese von markiertem Phytol und *cis*-Abienol kein Geranylgeraniol freigesetzt, sondern das Diphosphat wird komplett umgesetzt.

Der beobachtete Crosstalk in Phytol und *cis*-Abienol unterscheidet sich stark zwischen den IPP/DMAPP Molekülen. Im Phytol ist der Crosstalk des 1. IPP Moleküls mit 39 % erhöht gegenüber dem 3. IPP (24 %) und dem DMAPP Molekül (27 %). Beim *cis*-Abienol hat das 3. IPP Molekül (14 %) einen deutlich niedrigeren Crosstalk als die restlichen IPP/DMAPP Moleküle (1. IPP: 38 %, 2. IPP: 35 % und DMAPP: 32 %).

Auffallend ist, dass trotz der unterschiedlich hohen Anreicherung im Phytol und *cis*-Abienol, beide Verbindungen, mit Ausnahme der jeweils 3. IPP Moleküle, einen vergleichbaren Crosstalk von 35 % aufweisen. Bei der unter den Terpenen ausgeführten Annahme, dass Farnesyldiphosphat und IPP aus dem Cytosol importiert werden, fällt auf, dass in beiden Verbindungen (Phytol und *cis*-Abienol) die gleichen Mengen an IPP Molekülen (40 %) am Crosstalk beteiligt sind. Die Menge an eingeführtem Farnesyldiphosphat variiert (30 % und 25 %). In *cis*-Abienol wird 5 % weniger Farnesyldiphosphat aus dem Cytosol eingebaut.

Bis jetzt ging man davon aus, dass der Crosstalk in ganzen Pflanzen unter physiologischen Bedingungen sehr gering ist (< 1 %; Review: Eisenreich *et al.*, 2001). Die bis jetzt beobachteten Crosstalks in Pflanzenzellkulturen wurden über die nicht physiologischen Bedingungen erklärt (Arigoni *et al.*, 1997; Eisenreich *et al.*, 2001). In einer ganzen Pflanze können physiologische Bedingungen vorausgesetzt werden. Im vorliegenden Einbauversuch wurde eindeutig ein höherer Crosstalk, als in der Literatur postuliert, beobachtet. Im Rückblick ist es nicht verwunderlich, dass die Entdeckung des alternativen Terpenbiosynthesewegs (Deoxy-

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [U-¹³C₆]D-Glucose)

xylulosephosphatweg) so lange gedauert hat. Schließlich war immer ein gewisser Einbau von Mevalonat und Acetat in den pflanzlichen Terpenen vorhanden.

Die ganze Pflanze als abgeschlossenes System ist komplexer als eine Pflanzenzellkultur. In der ganzen Pflanze liegen verschiedene spezialisierte Zelltypen nebeneinander. Die Bandbreite der möglichen Interaktionen ist sehr hoch. Es konnte nicht geklärt werden, wie viele der gefundenen Besonderheiten im Einbauversuch von der eingesetzten Pflanze *Nicotiana tabacum* abhängig sind bzw. wie viele auf den Einsatz einer ganzen Pflanze als Versuchsobjekt zurückzuführen sind.

Die hier vorliegenden Daten stammen aus Spross und Blatt der ganzen Pflanze. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Pflanzenteile wurden bei der Aufarbeitung nicht beachtet. Im stark spezialisierten System der ganzen Pflanze werden einzelne Verbindungen nicht in allen Zelltypen gebildet. Wie im Fall des Nicotins können solche, an speziellen Orten (Wurzel) synthetisierte Verbindungen, in die ganze Pflanze verteilt werden (Tabelle 60). Oder es besteht die Möglichkeit, dass Verbindungen in allen Teilen der Pflanze, räumlich voneinander getrennt, gebildet werden. Dann wären unterschiedliche Markierungsmuster möglich. Im vorliegenden Einbauversuch ist nicht geklärt worden, ob sich Unterschiede in den Markierungsmustern der Metabolite in Wurzeln, Spross oder Blättern nachweisen lassen.

Einige der aufgeworfenen Fragen könnten mit weiteren Einbauversuchen geklärt werden.

Eine kontinuierliche Fütterung von [U-¹³C₆]D-Glucose über die ganze Wachstumsperiode könnte klären, wie hoch der Druck der Stoffwechselintermediate aus der CO₂-Fixierung in Anwesenheit von externen Glucosegaben ist. Hierbei empfiehlt sich ein System, in dem innerhalb der Wachstumsperiode regelmäßige Probenahmen möglich sind. Einbauversuche über die Zeit könnte Einblicke in die Syntheseaktivitäten der Pflanze geben.

Im Einbauversuch mit ¹³CO₂ wäre es möglich den Verlauf der über die CO₂-Fixierung markierten Stoffwechselprodukte zu beobachten. Der Nachweis der Biosynthese von Geranylgeraniol über Metabolite der Photosynthese wären möglich. Das Markierungsexperiment mit ¹³CO₂ würde ein realistisches Bild der Prozesse in der Pflanze liefern.

Zur Überprüfung, ob die Nicotinbiosynthese, gegenüber den anderen betrachteten Synthesen bevorzugt wird, würde sich der Vergleich eines Einbauexperiments bei *Nicotiana tabacum* mit fertig ausgebildetem Spross und Blättern anbieten.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

3.4.4.2 Einbauexperiment mit [1-¹³C₁]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* (Wildtyp)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Markierungsmuster der Terpene und des Alkaloids Nicotin in *Nicotiana tabacum*, aus dem Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, untersucht.

Aus dem methanolischen Extrakt der frischen Pflanzenproben (ohne Wurzeln; 70 g) wurde Nicotin isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Aus dem, mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Extrakt wurden die Terpene Sitosterol, Stigmasterol, Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol isoliert, gereinigt und NMR spektroskopisch gemessen.

3.4.4.2.1 Retrobiosynthese der Terpene

Mit den NMR spektroskopischen Daten der Aminosäuren (S. 119), aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, wurden die Markierungsmuster der zentralen Stoffwechselmetabolite bestimmt (Acetyl-CoA, α -Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Phosphoenolpyruvat, u.a.; Tabelle 21 und Abbildung 39). Unter Verwendung der Zentralmetabolite ist es möglich die hypothetischen Markierungsmuster von IPP und DMAPP, den Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese, über die beiden bekannten Biosynthesewege zu rekonstruieren (Abbildung 3 und Abbildung 4).

Da im vorliegenden Organismus verschiedene Markierungshöhen in den von Cytosol und Plastiden beeinflussten Pools der zentralen Stoffwechselmetabolite existieren, wird bei der Retrobiosynthese von IPP und DMAPP der jeweilig typische Ort der Terpenbiosynthesen beachtet, d.h. Mevalonatweg im Cytosol und Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden. Die Retrobiosynthese erfolgt beim Mevalonatweg mit den Daten von Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Arginin, Tabelle 21) und beim Deoxyxylulosephosphatweg mit den Daten von 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus den aromatischen Aminosäuren, sowie Isoleucin, Leucin, Valin und Alanin, Tabelle 21). Die hypothetischen Daten von IPP und DMAPP aus den beiden Biosynthesen, Mevalonatweg (**B**) und Deoxyxylulosephosphatweg (**C**), sind in Tabelle 61 und Abbildung 85 zusammengefasst.

Der Mevalonatweg synthetisiert aus drei Acetyl-CoA Molekülen (Pool II, rekonstruiert aus Arginin, Tabelle 21) die Vorstufen IPP und DMAPP (Abbildung 85, **B**). Bei der hypothetischen Rekonstruktion von IPP und DMAPP mit dem retrobiosynthetisch abgeleiteten Acetyl-CoA entstehen [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-2, C-4 und C-5 mit einer Anreicherung

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

von 6,1 %. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-1 und C-3 ist mit 1,7 % deutlich niedriger.

Tabelle 61. Hypothetische Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP, rekonstruiert über den Mevalonat- und Deoxyxylulosephosphatweg, mit den Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 21) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Vorhersagen		Position	Häufigkeit % ¹³ C _{abs}
Mevalonat	IPP/DMAPP	1	2,8
		2	7,2
		3	2,8
		4	7,2
		5	7,2
1-DOXP	IPP/DMAPP	1	3,8
		2	2,1
		3	2,1
		4	2,8
		5	3,8

Beim Deoxyxylulosephosphatweg reagiert der „aktivierte Acetaldehyd“ Hydroxyethylthiamin-diphosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu IPP und DMAPP (Abbildung 85, C). Die Markierungsmuster von Hydroxyethylthiamin-diphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat wurden aus den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren, sowie aus Isoleucin, Leucin, Valin und Alanin rekonstruiert (Tabelle 21). Es bilden sich [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung von 2,7 % an den Positionen C-1 und C-5, von 1,7 % an Position C-4 und von 1,0 % an den Positionen C-2 und C-3.

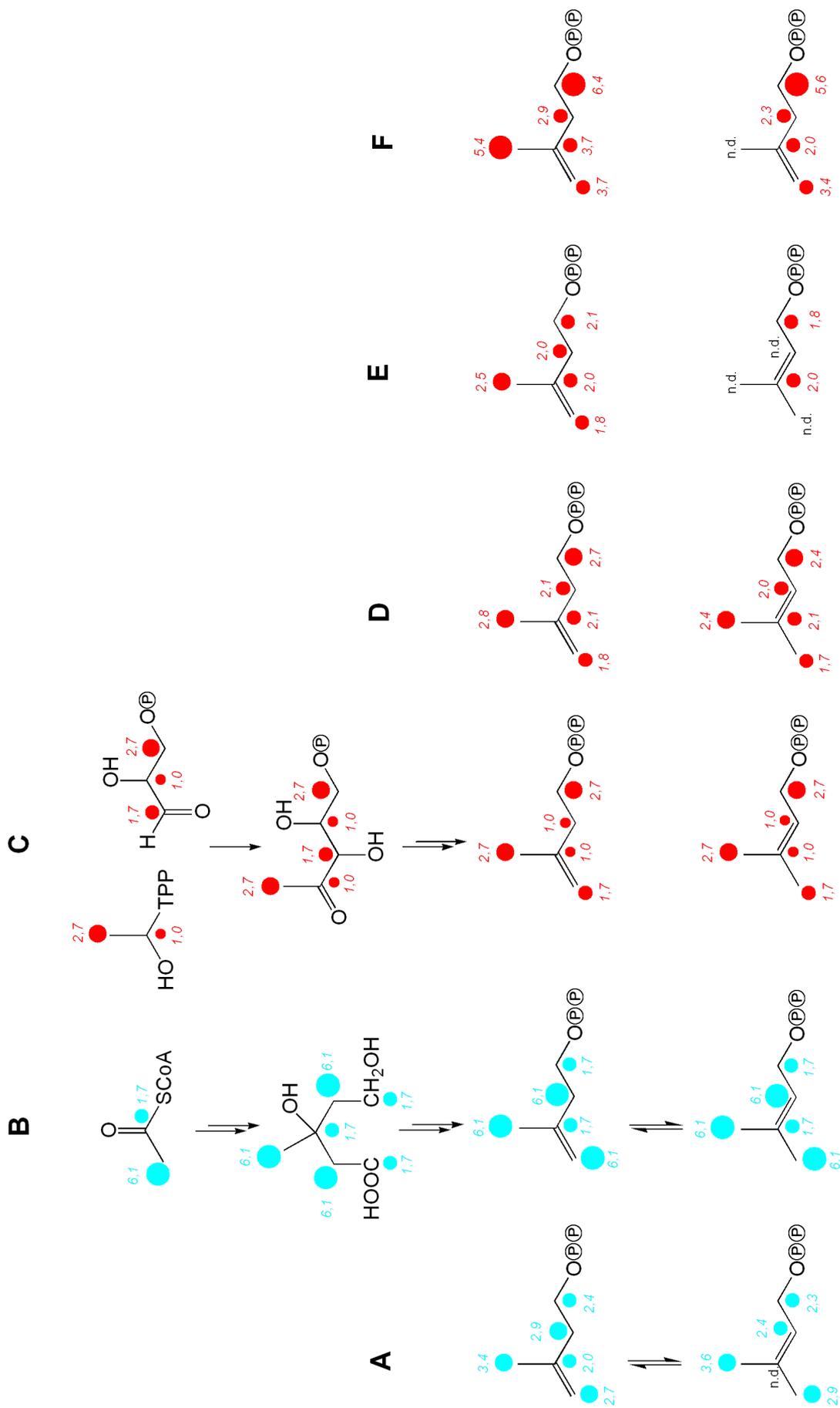


Abbildung 85. Vergleich der Kopplungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die hypothetisch bestimmten Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle über den Mevalonatweg (B) und den Deoxyxylulosephosphatweg (C). Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sterol (A), Phytol (D), Geranylgeraniol (E) und *cis*-Abienol (F).

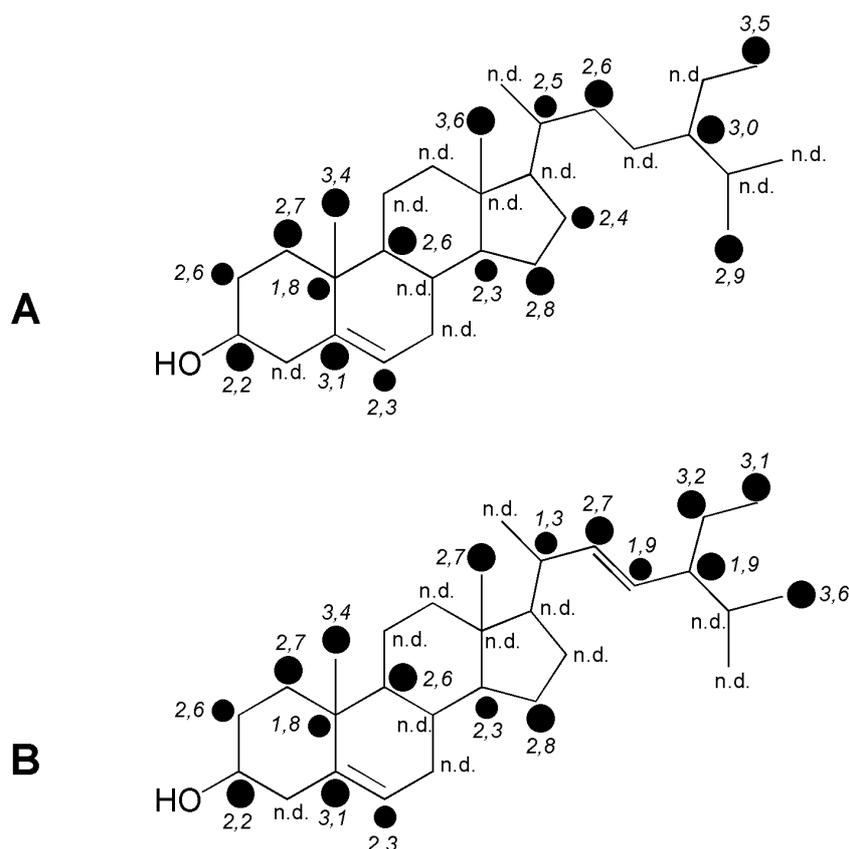


Abbildung 86. Kopplungsmuster von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die kursiven Zahlen geben die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

3.4.4.2.2 Sitosterol und Stigmasterol

Messergebnisse

Die Sterolfraction setzt sich aus zwei Sterolen zusammen. Im NMR Spektrum überlagern sich die Signale der Ringsysteme. Über die charakteristischen Verschiebungen der Seitenkettenatome (C-22 und C-23) konnten Sitosterol und Stigmasterol identifiziert werden.

Das Markierungsmuster von Sitosterol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, ist in Tabelle 42 und

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Abbildung 86 (A) zusammengefasst. Das Markierungsmuster von Stigmasterol ist in Tabelle 43 und Abbildung 86 (B) zusammengefasst.

Im NMR Spektrum der Sterole sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit sind im Spektrum keine Kopplungen > 1 % zu beobachten.

Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe liegt in beiden Sterolen zwischen 2 % und 4 %. Die im NMR Spektrum nicht überlagerten Positionen C-28 und C-29 liegen in Sitosterol und Stigmasterol mit einer Anreicherung von je 3 % vor. Gemäß der nicht überlagerten Positionen C-28 und C-29 kann davon ausgegangen werden, dass in den überlagerten Signalen des Ring-systems beider Sterole eine vergleichbare Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe vorliegt.

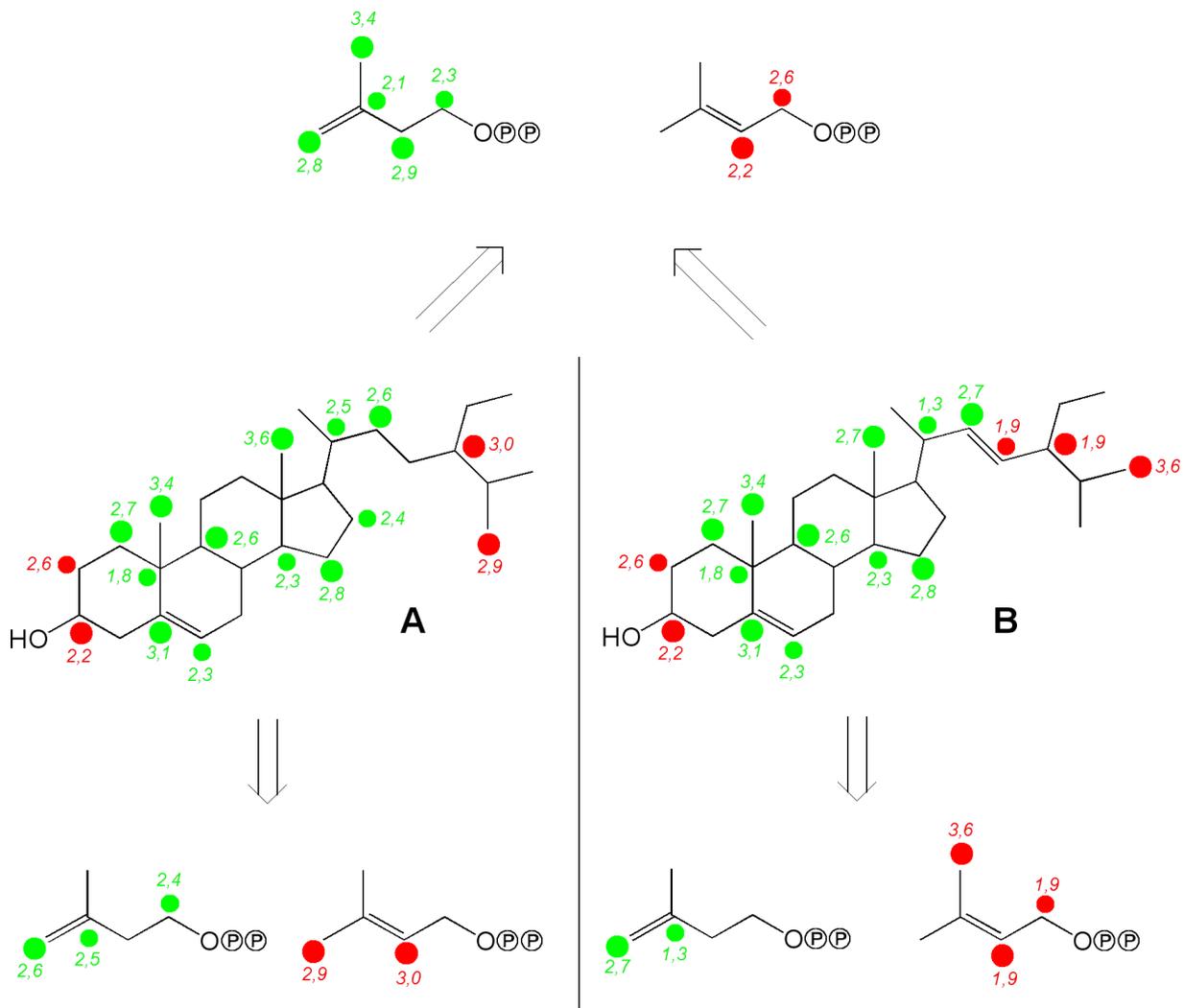


Abbildung 87. Das Markierungsmuster der IPP (grün) und DMAPP (rot) Moleküle von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, getrennt nach überlagerten Signalen aus dem Ringsystem (oben) und Signalen aus der Seitenkette (unten).

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese bauen sich Sterole aus vier IPP und zwei DMAPP Molekülen zusammen (Abbildung 51). Die nicht überlagerten Daten der Sterole sind für eine Auswertung zu lückenhaft (Abbildung 87, **A** und **B**, unten). Die überlagerten Signale der Ringsysteme liefern ein Gemisch der Anreicherungen beider Sterole (Abbildung 87, oben). Da, wie bereits ausgeführt, davon ausgegangen werden kann, dass die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe beider Sterole eine vergleichbare Höhe aufweisen, werden für die Auswertung die überlagerten Signale der Ringsysteme mit herangezogen.

Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten der beiden Sterole, Sitosterol und Stigmasterol, sind in Tabelle 62 und Abbildung 85 (**A**) zusammengefasst.

Tabelle 62. Aus den beiden Sterolen, Sitosterol und Stigmasterol, retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Abgeleitet aus	Position	Häufigkeit			
		% ¹³ C _{abs}	Δs ⁴⁰		
Sterole	IPP	1	3,5	0,1	{2}
		2	4,0	0,3	{2}
		3	3,1	0,5	{4}
		4	3,8	0,1	{4}
		5	4,5		{1}
	DMAPP	1	3,4	0,4	{2}
		2	3,5	0,5	{3}
		3	n.d.		
		4	4,0		{1}
		5	4,7		{1}

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus beiden Sterolen weist eine Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-2, C-4 und C-5 von 3 % auf (IPP, Abbildung 85, **A** und Abbildung 87, oben). Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe an den Positionen C-1 und C-3 liegen bei 2 %. Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Mevalonatweg. Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe unterscheiden sich nur geringfügig zwischen den einzelnen Positionen (3 % bzw. 2 %). Es gibt nicht, wie in den hypothetisch bestimmten Daten über den Mevalonatweg

⁴⁰ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

(6 % bzw. 2 %), einen deutlichen Unterschied zwischen markierten und unmarkierten Positionen.

Die [¹³C₁]Isotopologe in den Sterolen haben an den Positionen C-2, C-4 und C-5 nur die Hälfte der Anreicherung, im Vergleich zu den hypothetischen IPP/DMAPP Daten über den Mevalonatweg (Tabelle 61 und Abbildung 85, **B**). Die Positionen C-1 und C-3 sind im Verhältnis dazu deutlich höher markiert.

Die erhöhte Konzentration des [¹³C₁]Isotopologs an Position C-3 lässt sich nicht über den Crosstalk erklären. Die Anreicherung der Position C-1 könnte auf Crosstalk aus dem Deoxyxylulosephosphatweg zurück geführt werden, hierzu passt auch die leicht erhöhte Konzentration an Position C-5. Im Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose wurde in den Sterolen kein Crosstalk festgestellt. Es muss davon ausgegangen werden, dass die ungewöhnlich hohen Konzentrationen in den Positionen C-1 und C-3 unabhängig von Crosstalk entstehen.

Im Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose wurden 60 % der Markierung aus dem rekonstruierten Mevalonatweg in den Sterolen gefunden. Die restlichen Markierungen stammten aus [¹³C₁]Markierungen, die über die starke Verstoffwechslung gebildet wurden bzw. über die Refixierung von ¹³CO₂. Da in der vorliegenden Anzucht mit [1-¹³C₁]D-Glucose die gleichen Mechanismen zugrunde gelegt werden können, ist die Herkunft der hohen Anreicherung an den Positionen C-1 und C-3, im Verhältnis zu den Anreicherungen der Positionen C-2, C-4 und C-5, auf [¹³C₁]Markierungen zurück zu führen, die nicht direkt aus der [1-¹³C₁]D-Glucose stammen.

3.4.4.2.3 Phytol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, ist in Tabelle 63 und Abbildung 88 zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Phytol sind [¹³C₂]Isotopologe sichtbar. Gemäß Verteilung und Höhe (0,1 mol% bis 0,2 mol%) handelt es sich um statistische Kopplungen (Abbildung 88, oben).

Das Phytol weist in allen Positionen [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung zwischen 1,6 % und 3,0 % auf. Gemäß der Biosynthese baut sich Phytol aus drei IPP und einem DMAPP Molekül zusammen. Die [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung zwischen 2,2 %

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

und 3,0 % verteilen sich auf die Positionen C-1 und C-5 der IPP/DMAPP Moleküle. Die Anreicherung der restlichen Positionen liegt zwischen 1,6 % und 2,0 %.

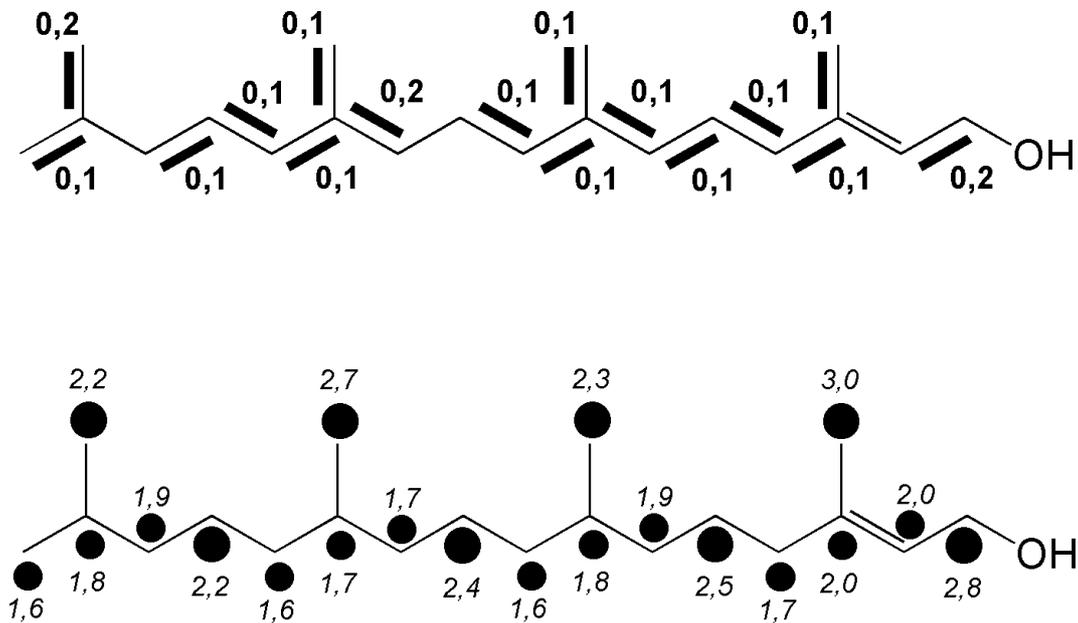


Abbildung 88. Kopplungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die Balken kennzeichnen die über statistische Kopplung gebildeten Blöcke im Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Retrobiosynthese

Phytol wird biosynthetisch aus drei IPP Molekülen und einem DMAPP Molekül synthetisiert. Die beobachteten [¹³C₂]Isotopologe werden bei der Auswertung der IPP/DMAPP Moleküle vernachlässigt, da es sich um statistische Kopplungen handelt. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Phytol sind in Tabelle 64 und Abbildung 85 (D) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Phytol weist in allen Positionen Anreicherungen auf. Auffällig ist die erhöhte Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe an den Positionen C-1 und C-5 mit 2,7 % (IPP) und 2,4 % (DMAPP; Abbildung 85, D). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-1 und C-5 liegen in vergleichbaren Konzentrationen, wie die hypothetischen Daten über den Deoxyxylulosephosphatweg, vor. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

C-2 und C-3 liegt bei 2,1 % und ist damit höher als die hypothetisch bestimmten Anreicherungen in den IPP/DMAPP Molekülen über den Deoxyxylulosephosphatweg.

Tabelle 63. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Phytol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁴¹	Häufigkeit	Kopplungen
	Verschiebung δ [ppm]			
1	59,4	47,6 (2)	4,1	4,3
2	122,9	47,6 (1)	3,3	4,9
3	140,4	41,8 (4, 20)	3,3	7,1
4	39,3	34,7 (3, 5)	3,0	6,0
5	25,1	34,7 (4, 6)	3,8	5,6
6	36,6	34,9 (5, 7)	3,2	6,9
7	32,6	34,7 (6, 8, 19)	3,2	8,3
8	37,3	34,8 (7, 9)	2,9	7,3
9	24,4	34,9 (8, 10)	3,6	5,0
10	37,4	34,8 (9, 11)	3,0	6,9
11	32,7	34,7 (10, 12, 18)	3,2	7,7
12	37,2	34,9 (11, 13)	2,9	5,9
13	24,8	34,9 (12, 14)	3,5	4,9
14	39,8	33,8 (13, 15)	3,1	2,9
15	27,9	35,1 (14, 16, 17)	3,2	9,0
16	22,6	35,3 (15)	2,8	3,7
17	22,7	35,2 (15)	3,5	4,6
18	19,7	37,0 (11)	3,9	2,4
19	19,7	35,1 (7)	3,5	2,9
20	16,2	41,6 (3)	4,2	3,4

Die erhöhten Konzentrationen der [¹³C₁]Isotopologe an den Positionen C-2 und C-3 lassen sich nicht über den Crosstalk erklären. Durch den Crosstalk müsste es zu einer Erhöhung der Konzentrationen an den [¹³C₁]Isotopologen der Positionen C-2, C-4 und C-5 kommen. Aus den vorliegenden Daten muss geschlossen werden, dass ein Teil der Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe über die Verstoffwechslung der [1-¹³C₁]D-Glucose entstanden sind. Die Markierung von [1-¹³C₁]D-Glucose wird z.B. im oxidativen Pentosephosphat-Zyklus abgespalten. Das gebildete ¹³CO₂ diffundiert in die Spaltöffnungen, wo eine Fixierung über die Photosynthese möglich ist.

Der Anteil an [¹³C₁]Isotopologen aus dem fixierten ¹³CO₂ ist im Phytol auf Grund des üblichen Biosyntheseorts (Blatt) stark erhöht, im Verhältnis zu den Aminosäuren. Da im

⁴¹ Kopplungspartner in Klammern

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

vorliegenden Datensatz keine von ¹³CO₂ unabhängigen Markierungen existieren, kann der Crosstalk im vorliegenden Einbauversuch nicht bestimmt werden.

Tabelle 64. Aus Phytol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Abgeleitet aus	Position	Häufigkeit			
		% ¹³ C _{abs}	Δs ⁴²		
Phytol	IPP	1	3,8	0,2	{3}
		2	3,2	0,1	{3}
		3	3,2	0,1	{3}
		4	2,9	0,1	{3}
		5	3,9	0,3	{3}
	DMAPP	1	3,5		{1}
		2	3,1		{1}
		3	3,2		{1}
		4	2,8		{1}
		5	3,5		{1}

3.4.4.2.4 Geranylgeraniol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, ist in Tabelle 50 und Abbildung 73 (B) zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Geranylgeraniol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit sind im Spektrum keine Kopplungen > 1 % zu beobachten.

Das Geranylgeraniol weist in allen Positionen [¹³C₁]Isotopologe mit Anreicherungen von 2,0 % und 2,5 % auf. Die höheren Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe beschränken sich auf einen Teil der Methylgruppen.

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich Geranylgeraniol aus einem DMAPP und drei IPP Molekülen auf. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP

⁴² Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

aus den experimentellen Daten von Geranylgeraniol sind in Tabelle 65 und Abbildung 85 (E) zusammengefasst.

Tabelle 65. Aus Geranylgeraniol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Abgeleitet aus		Position	Häufigkeit		
			% ¹³ C _{abs}	Δs ⁴³	
Geranylgeraniol	IPP	1	3,2	0,2	{2}
		2	3,1	0,1	{3}
		3	3,1	0,2	{3}
		4	2,9	0,1	{3}
		5	3,6	0,1	{3}
	DMAPP	1	2,9		{1}
		2	n.d.		{1}
		3	3,1		{1}
		4	n.d.		{1}
		5	n.d.		{1}

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Geranylgeraniol weist in allen Positionen Anreicherungen auf. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe in der Position C-5 ist mit 2,5 % höher, als die restlichen Positionen mit 2,0 %. Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen von Geranylgeraniol weisen auf keinen der beiden Terpenbiosynthesewege. Eine, auf den Deoxyxylulosephosphatweg deutende, höhere Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe an den Positionen C-2 und C-5 ist nicht zu beobachten. Auch in den Positionen C-2, C-4 und C-5 sind keine höheren Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe, die auf den Mevalonatweg deuten würden, zu beobachten.

Im Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose wurde die Biosynthese des Geranylgeraniol, ausgehend von Verbindungen der Photosynthese diskutiert. Die [¹³C₁]Isotopologe im Geranylgeraniol stammen voraussichtlich aus refixiertem ¹³CO₂, dass bei der biosynthetischen Umsetzung von [1-¹³C₁]D-Glucose (z.B. im oxidativen Pentosephosphat-Zyklus) gebildet wird.

Die gleichmäßige Anreicherung der Positionen im Geranylgeraniol, erklärt auch die hohe [¹³C₁]Isotopologkonzentration in Position C-3 der IPP/DMAPP Moleküle von Phytol. Wie im

⁴³ Δs: Standartabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose festgestellt wurde, wird ein Teil des Phytols aus Geranylgeraniol gebildet, das keinen direkten Kontakt zur markierten D-Glucose besitzt. Der Anteil an, dem hier beobachteten, Geranylgeraniol im Phytol sorgt für die hohen Anreicherungen, neben der typischen Verteilung der [¹³C₁]Isotopologe, wie sie in dem rekonstruierten Deoxyxylulosephosphat- und Mevalonatweg auftreten.

3.4.4.2.5 *Cis*-Abienol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von *cis*-Abienol aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, ist in Tabelle 52 und Abbildung 76 (B) zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von *cis*-Abienol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit sind im Spektrum keine Kopplungen > 1 % zu beobachten.

Cis-Abienol weist in allen Positionen [¹³C₁]Isotopologe auf. In den Positionen C-2, C-11, C-15, C-16, C-19 und C-20 liegt die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe zwischen 5 % und 7 %. Die restlichen Positionen weisen eine Anreicherung zwischen 2 % und 4 % auf.

Retrobiosynthese

Cis-Abienol wird biosynthetisch aus drei IPP Molekülen und einem DMAPP Molekül synthetisiert. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von *cis*-Abienol sind in Tabelle 66 und Abbildung 85 (F) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus *cis*-Abienol weist in allen Positionen Anreicherungen auf. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-1 und C-5 sind mit 5 % und 6 % deutlich höher als in den restlichen Positionen (Abbildung 85, F). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-1 und C-5 sind doppelt so hoch konzentriert, wie die hypothetischen Daten über den Deoxyxylulosephosphatweg. Diese erhöhten Konzentrationen sind auch in den restlichen Positionen zu beobachten, wobei im IPP mit 3 % bzw. 4 % die Position C-2 und C-3 etwas höher markiert sind.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Im Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose wurden 70 % (DMAPP, 1./2. IPP) bzw. 85 % (3. IPP) der Markierung des rekonstruierten Deoxyxylulosephosphatwegs im *cis*-Abienol gefunden. Die restlichen Markierungen stammten aus dem Mevalonatweg (Crosstalk: 30 % DMAPP, 35 % 1./2. IPP und 15 % 3. IPP) und nur zu einem geringen Anteil aus [¹³C₁]Markierungen, die über die starke Verstoffwechslung bzw. über die Refixierung von ¹³CO₂ entstanden sind. Dieser Unterschied in der Zusammensetzung wird in den Anreicherungen der Positionen C-2 und C-3 in den IPP/DMAPP Molekülen von *cis*-Abienol deutlich. Wenn die Zusammensetzung der Markierung im *cis*-Abienol, mit Hilfe der Daten aus dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose, analysiert wird, tritt immer wieder das Problem auf, dass die Anreicherungen, die aus dem refixiertem ¹³CO₂ stammen, die Berechnungen stören. Im vorliegenden Datensatz existieren keine Markierungen, die vom Einbau des ¹³CO₂, unabhängig sind. Ungeklärt bleibt auch, warum der im Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose beobachtete Crosstalk, sich in den IPP/DMAPP Molekülen von *cis*-Abienol, aus dem vorliegenden Einbauversuch, nicht widerspiegelt. Eine genaue Auswertung des Markierungsmusters der IPP/DMAPP Moleküle von *cis*-Abienol, aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, ist schwierig.

Tabelle 66. Aus *cis*-Abienol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Abgeleitet aus		Position	Häufigkeit	
			% ¹³ C _{abs}	Δs ⁴⁴
<i>cis</i>-Abienol	IPP	1	7,5	0,3 {2}
		2	4,0	0,4 {3}
		3	4,8	0,3 {3}
		4	4,8	0,1 {2}
		5	6,5	0,3 {2}
	DMAPP	1	6,7	{1}
		2	3,4	{1}
		3	3,1	{1}
		4	4,5	{1}
		5	n.d.	

⁴⁴ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

3.4.4.2.6 Nicotin

Das Markierungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, ist in Tabelle 67 und Abbildung 89 zusammengefasst.

Tabelle 67. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Kopplungskonstante ⁴⁵	Häufigkeit	Kopplung
		J _{CC} [Hz]	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
1	149,5	57,0 (2)	9,0	11,2
2	138,6	51,3 / 53,5 / 63,7 (1, 3, 6)	9,3	30,4
3	134,9	56,1 (2)	11,9	9,2
		53,5 (4)		2,4
4	123,6	54,5 (3)	1,8	18,8
5	148,6		2,6	
6	68,9	49,8 (2)	6,0	9,8
		35,1 (7)		8,3
7	22,5	33,3 / 31,8 (6, 8)	10,0	16,3
8	35,1	32,0 / 33,7 (7, 9)	9,6	16,3
9	57,0	34,5 (8)	6,2	9,5
10	40,4		12,5	

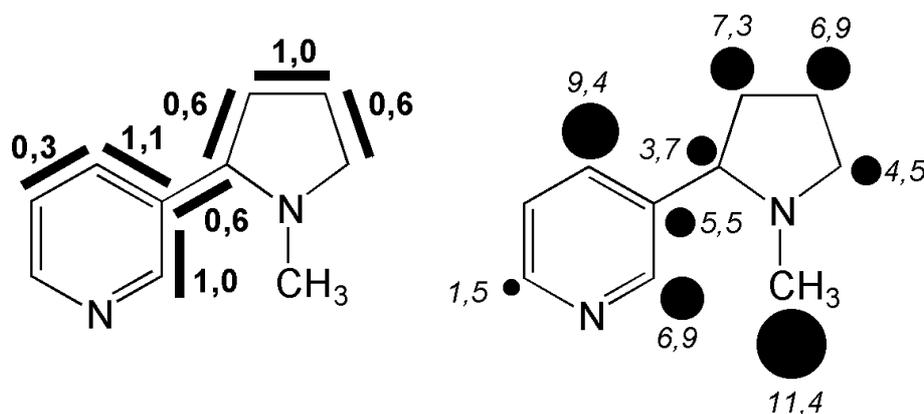


Abbildung 89. Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose. Die Balken kennzeichnen statistische Kopplungen. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

⁴⁵ Kopplungspartner in Klammern

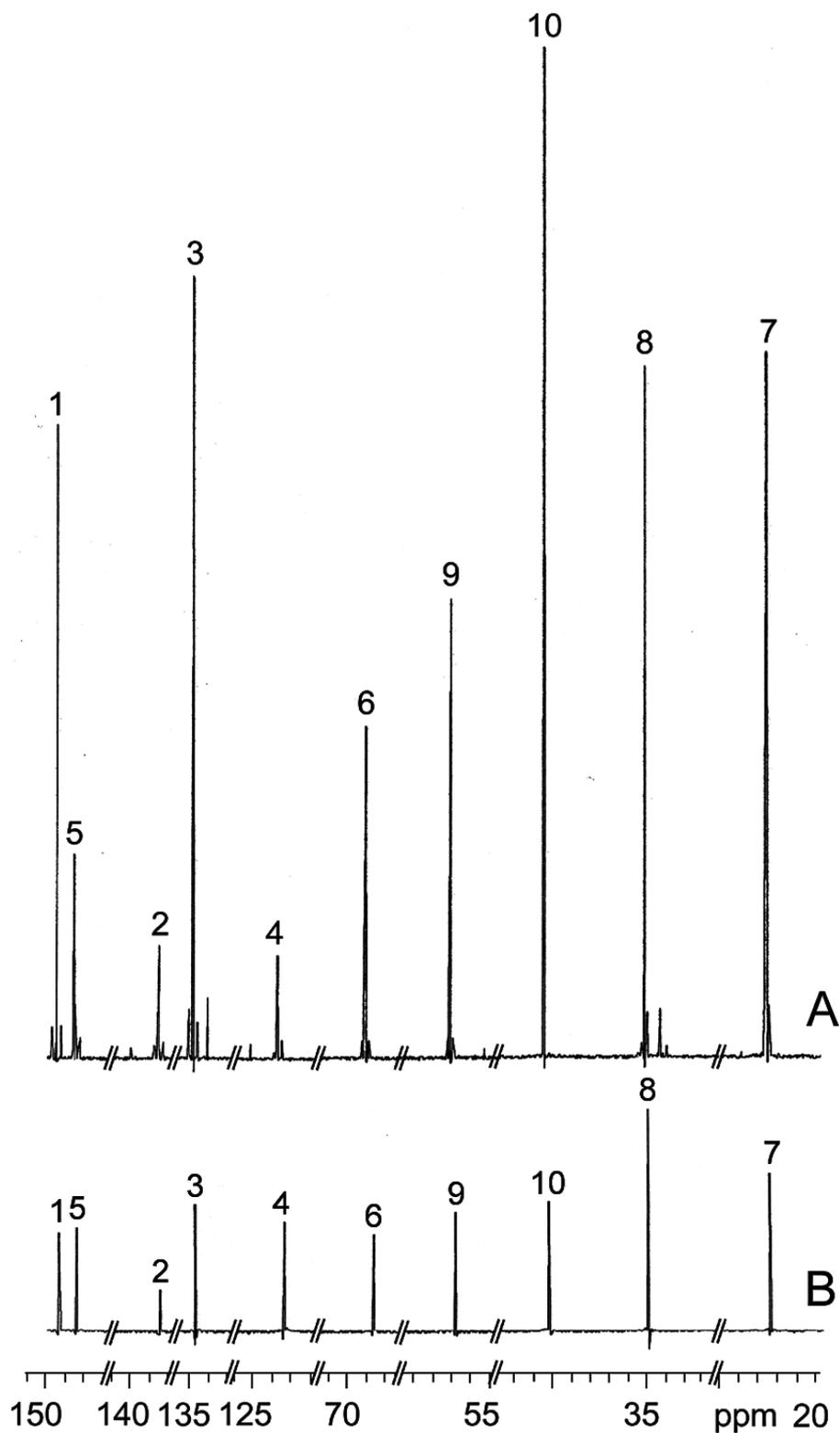


Abbildung 90. Vergleich der eindimensionalen NMR Spektren von Nicotin (A) aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, und aus (B) unmarkiertem *Nicotiana tabacum*.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Im NMR Spektrum von Nicotin sind [¹³C₂]Isotopologe sichtbar. Der Vergleich von unmarkierten (**B**) und markierten (**A**) Nicotin zeigt hohe Anreicherungen in einzelnen Positionen (Abbildung 90). Besonders hoch sind die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe in Position C-10 mit 11 %, in Position C-3 mit 9 %, sowie in den Positionen C-1, C-7 und C-8 mit je 7 %. Die [¹³C₁]Isotopologe der Positionen C-6 und C-8 haben eine Anreicherung von 4 % und die Position C-5 eine Anreicherung von 5 %. Die Position C-4 weist keine [¹³C₁]Isotopologe auf (Abbildung 89).

Die [¹³C₂]Isotopologe im Nicotin zeigen die typische Verteilung von statistischen Kopplungen. Die Höhe von statistischen Kopplungen ist von der Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe abhängig. Die hohen [¹³C₂]Isotopologe von 1 mol% liegen alle zwischen C-Atomen mit Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe von 7 % bzw. 9 %. An den Positionen mit einer Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe mit 4 % bzw. 5 % sind die [¹³C₂]Isotopologe nur in Konzentrationen von 0,6 mol% enthalten (Abbildung 89). Die hohen Anreicherungen im Nicotin sind für die hohen statistischen Kopplungsblöcke verantwortlich.

Die beobachteten [¹³C₂]Isotopologe werden bei der Auswertung der Biosynthese von Nicotin vernachlässigt, da es sich um statistische Kopplungen handelt.

Pyrrolidin-Einheit

Gemäß der Literatur erfolgt die Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bzw. aus Arginin (Abbildung 53; Tiburcio und Galston, 1986; Wagner, 1987). Die Konzentration der [¹³C₁]Isotopologe im Nicotin setzen sich, durch das symmetrische Putrescin, aus der Summe der Positionen C-2/C-5, sowie C-3/C-4 des Glutamats bzw. des Arginins zusammen.

Bei einer Retrobiosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bilden sich [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung von 6 % in den Positionen C-6 und C-9 und von 3 % in den Positionen C-7 und C-8 (Abbildung 91, **B**). In der Pyrrolidin-Einheit vom Nicotin liegen die experimentell bestimmten Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe bei 9 % für die Positionen C-6 und C-9 und bei 5 % für die Positionen C-7 und C-8. Das Verhältnis der Anreicherungen liegt im Nicotin bei 1,9 : 1,0 und in der Rekonstruktion aus den Aminosäuren bei 2,3 : 1,0. Trotz einem vergleichbaren Markierungsverhältnis liegt die Anreicherung im Nicotin 1 ½ mal höher als in den Aminosäuren.

Pyridin-Einheit

In der Literatur werden drei verschiedene Biosynthesewege für den Vorläufer der Pyridin-Einheit, der Nicotinsäure, beschrieben (S. 155).

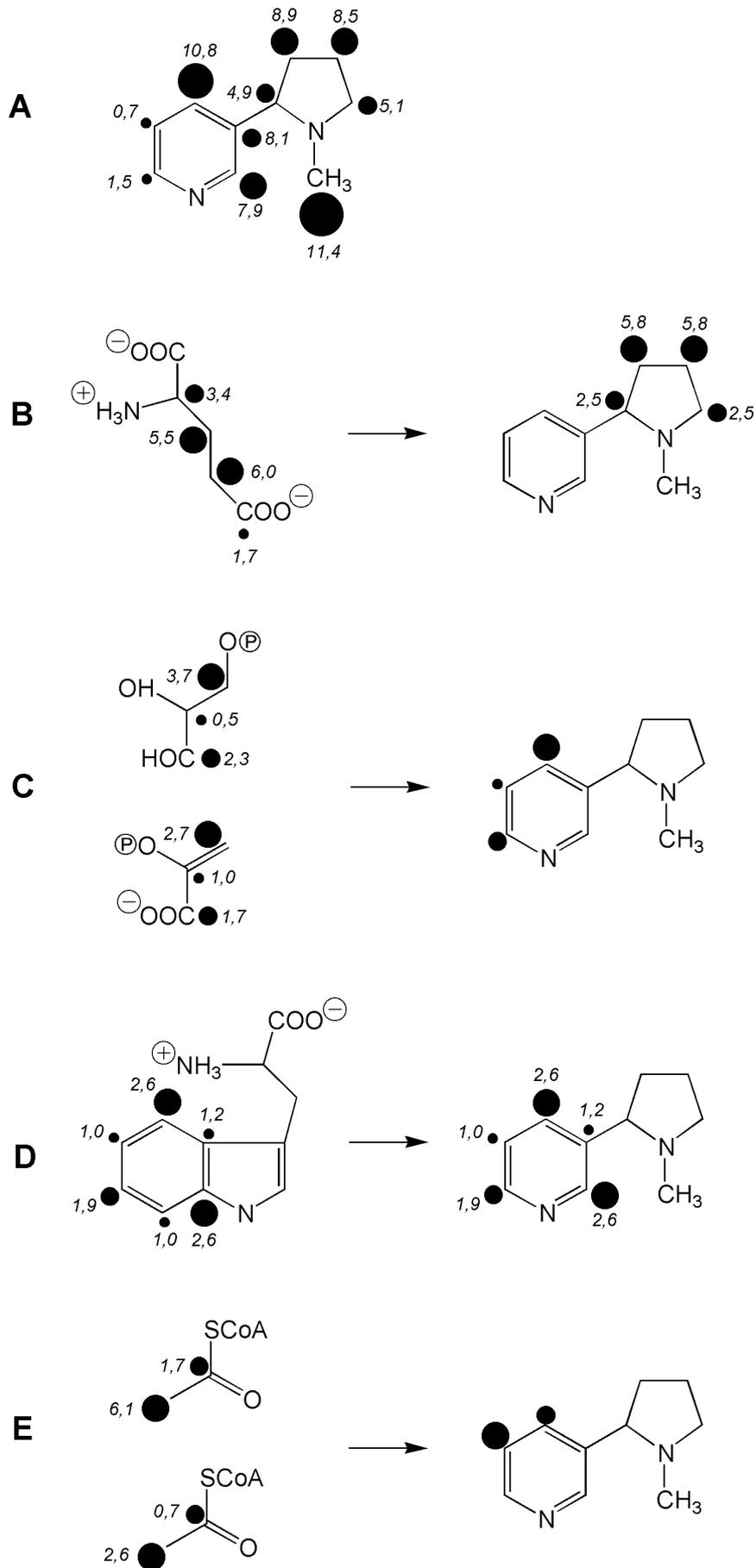
Die Biosynthese der Nicotinsäure in höheren Pflanzen geht, gemäß der Literatur (Wagner, 1987; Luckner, 1990; Review: Forster und Moat, 1980), von Aspartat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus (Abbildung 55, oben).

Die Positionen C-3, C-4 und C-5 in der Pyridin-Einheit stammen aus Glycerinaldehyd-3-phosphat. Im Nicotin haben die Positionen Anreicherungen von 10,8 % (C-3), 0,7 % (C-4) und 1,5 % (C-5). Die aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat rekonstruierte Markierung im Nicotin weist Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe von 3,7 % (C-3), 0,5 % (C-4) und 2,3 % (C-5) auf (Abbildung 91, C). Im Gegensatz zum Nicotin hat das Glycerinaldehyd-3-phosphat keine so extreme Anreicherung einer Position.

Bei der Bestimmung der zentralen Stoffwechselmetabolite aus den Aminosäuren wurden unterschiedlich beeinflusste Pools festgestellt (Tabelle 21 und Abbildung 39). Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin, Tabelle 21) und 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Tyrosin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Alanin und Valin, Tabelle 21) sind über den Stoffwechsel miteinander verknüpft. Bei der Anzucht mit [U-¹³C₆]D-Glucose wurde das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat als Vorstufe für die Pyridin-Einheit gewählt. Die Verhältnisse der Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe im 3-Phosphoenolpyruvat aus dem vorliegenden Einbauversuch sind nicht mit den experimentellen Daten aus dem Nicotin vergleichbar. Das 3-Phosphoenolpyruvat weist, genauso wie das Glycerinaldehyd-3-phosphat, keine mit dem Nicotin vergleichbare extreme Anreicherung einer Position auf. Anhand der vorliegenden Daten kann die Herkunft der Markierung am C-3 von Nicotin nicht geklärt werden.

Abbildung 91. Vergleich der (A) experimentellen Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, mit den (B) bis (E) hypothetischen Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe, aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten (Tabelle 21 und Abbildung 39). Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit über (B) Glutamat. Biosynthese der Pyridin-Einheit aus Aspartat und (C) Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. 3-Phosphoenolpyruvat, sowie aus (D) Tryptophan (rekonstruiert aus Tyrosin, Tabelle 21), und aus Aspartat, Formiat und (E) Acetyl-CoA (rekonstruiert aus Arginin, Glutamat, Prolin (oben) und Leucin (unten), Tabelle 21).

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C]₁]D-Glucose)



Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Die Positionen C-1 und C-2 in der Pyridin-Einheit stammen aus Aspartat. Die Anreicherung der entsprechenden Positionen liegt im Aspartat bei 4 % und 3 %. Im Nicotin liegt die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe mit 7 % und 6 % doppelt so hoch.

Bei der Biosynthese der Nicotinsäure in Säugetieren wird, gemäß der Literatur (Cleaves und Miller, 2001; Wagner, 1987; Review: Forster und Moat, 198), Tryptophan als Ausgangsverbindung diskutiert (Abbildung 55, unten).

In dem vorliegenden Einbauversuch wurde die Markierung des aromatischen Rings von Tyrosin für die Darstellung herangezogen (Tabelle 19). Bei der Biosynthese des Nicotins über das Tryptophan werden die [¹³C₁]Isotopologe mit einer Anreicherung von 2,6 % auf die Positionen C-1 und C-3, von 1,9 % auf die Position C-5 und von 1,1 % auf die Positionen C-2 und C-3 übertragen (Abbildung 91, **D**). Die dabei gebildeten Verhältnisse der Anreicherungen in der Pyridin-Einheit entsprechen nicht den experimentellen Ergebnissen im Nicotin. Der Anteil der Anreicherung des [¹³C₁]Isotopologs an Position C-5 ist zu hoch. Die Anreicherungen der Positionen C-1 und C-2 sind nicht, wie im Nicotin, gleich hoch.

Die Biosynthese der Pyridin-Einheit von Nicotin in dem vorliegenden Einbauversuch über die aromatische Aminosäure Tryptophan ist unwahrscheinlich.

Die Biosynthese von Nicotinsäure in anaeroben Bakterien geht, gemäß der Literatur (Gaertner und Shetty, 1977; Wagner, 1987; Review: Forster und Moat, 1980), von Aspartat, Formiat und Acetyl-CoA aus (Abbildung 55, links).

Das Acetyl-CoA wird bei dieser Biosynthese mit Position C-1 und C-2 in die Pyridin-Einheit auf Position C-3 und C-4 eingebaut. Beide Acetyl-CoA Pools haben an Position C-2 eine höhere Anreicherung als in Position C-1 (Abbildung 91, **E**). Dies steht im Widerspruch zu der Anreicherung von 11 % in Position C-3 vom Nicotin, im Verhältnis zu 0,4 % in Position C-4. Somit erscheint die Synthese der Pyridin-Einheit von Nicotin in dem vorliegenden Einbauversuch über Aspartat, Formiat und Acetyl-CoA unwahrscheinlich.

3.4.4.2.7 Diskussion

In der vorliegenden Anzucht in *Nicotiana tabacum* wurde [1-¹³C₁]D-Glucose und unmarkierte D-Glucose im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Wegen der hohen Konzentration an markierten Ausgangsmetaboliten wurden hohe Anreicherungen der einzelnen Positionen erwartet. Dies trifft beim Nicotin zu. Auffällig ist Position C-3, die mit 10,8 % eine der höchsten Anreicherungen im Nicotin trägt. Der Ursprung der Markierung ist 3-Phosphoenolpyruvat (Position C-3). Aus dem gleichen zentralen Stoffwechselmetabolit stammen auch die Anreicherungen der

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

[¹³C₁]Isotopologe in Position C-4 von Nicotin mit 0,7 % und C-5 mit 1,5 %. Bei der Umsetzung von [1-¹³C₁]D-Glucose bilden sich durch die Glykolyse [3-¹³C₁]Glycerinaldehyd-3-phosphat und [3-¹³C₁]3-Phosphoenolpyruvat. Die hohe Anreicherung des [¹³C₁]Isotopologs in Position C-3 von Nicotin, neben den deutlich niedrigeren Anreicherungen der Positionen C-4 und C-5, deuten auf einen frühen Einbau der Markierung.

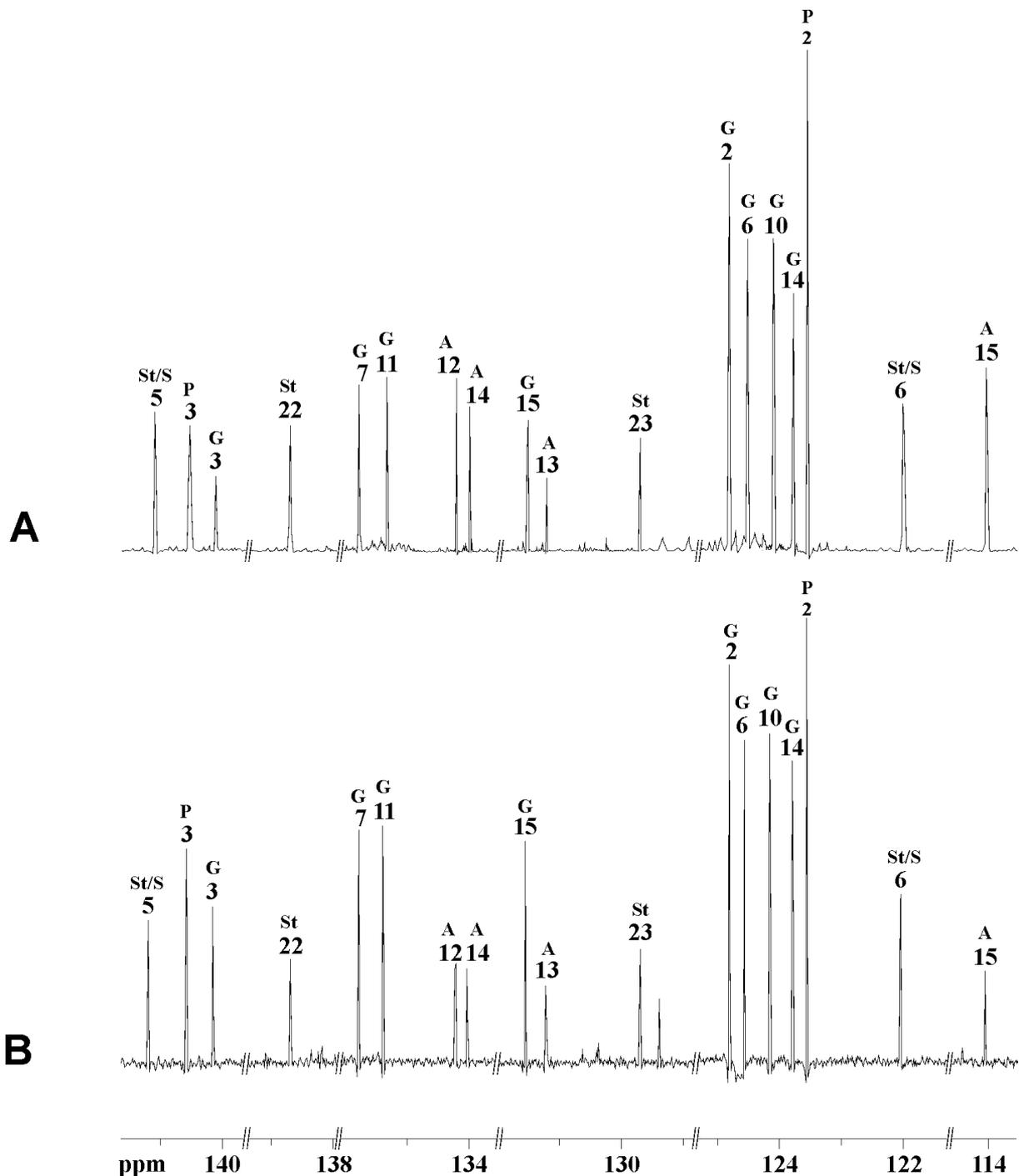


Abbildung 92. NMR Spektren der, mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Fraktion von *Nicotiana tabacum*: (A) Aus dem Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose, im Verhältnis 1:1 mit unmarkierter D-Glucose, und (B) aus einer unmarkierten Anzucht.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

Die Aminosäuren weisen deutliche Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten Positionen auf (Abbildung 38). Die Unterschiede liegen zwischen 3 % und 2 % (Tyrosin) bzw. zwischen 6 % und 2 % (Glutamat, Arginin und Prolin). Bei den Terpenen ist kein großer Unterschied zwischen den Positionen sichtbar. Einzige Ausnahme ist *cis*-Abienol, dessen Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe bei 6 % und 2 % bzw. 3 % liegt. Im *cis*-Abienol ist damit die Anreicherung der markierten Positionen C-1 und C-5 in den IPP/DMAPP Molekülen doppelt so hoch wie bei den unmarkierten Positionen. Im Vergleich der NMR Spektren der markierten (**A**) und unmarkierten (**B**), mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Fraktion werden die Unterschiede zwischen den markierten und unmarkierten Positionen sichtbar (Abbildung 92). Die Positionen C-12, C-13, C-14 und C-15 des unmarkierten *cis*-Abienol, im vorliegenden Ausschnitt des Spektrums, haben weitgehend gleich hohe Signale. Im Spektrum des Einbauversuchs mit [1-¹³C₁]D-Glucose ist Position C-15, mit einer Anreicherung von 7,7 %, deutlich höher als die anderen Signale der Verbindung (Abbildung 92, **A**). Die Positionen C-12 und C-14 haben eine Anreicherung von 4,7 %. Die Signale dieser Positionen sind höher, als das von Position C-13, mit einer Anreicherung von 3,5 %.

Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe im Phytol liegen bei 3 % und 2 %, im Geranylgeraniol über das ganze Molekül gleichmäßig verteilt 2 %. Die Größenverhältnisse der Signale von Phytol und Geranylgeraniol entsprechen weitgehend dem unmarkierten Spektrum (Abbildung 92). Die hier gezeigten Signale von Phytol spiegeln die Positionen C-2 und C-3 der IPP/DMAPP Moleküle wieder. Diese Positionen sind, gemäß der retrobiosynthetischen Bestimmung des Deoxyxylulosephosphatwegs unmarkiert. Ihre Anreicherung liegt bei 2 %.

Die Signalhöhen bei den, in Abbildung 92 (**A**) dargestellten, Positionen aus den Sterolen unterscheiden sich nicht so deutlich wie beim *cis*-Abienol. Die markierten Positionen C-5 und C-22, mit einer Anreicherung von 3 %, unterscheiden sich kaum von den unmarkierten Positionen C-6 und C-23, mit einer Anreicherung von 2 %.

Bereits in der Anzucht mit [U-¹³C₆]D-Glucose konnten unterschiedliche Mengen an inkorporiertem markiertem Material in Nicotin, Aminosäuren und Terpenen nachgewiesen werden. Auch hier hat Nicotin die höchste Anreicherung. Es kann eine Abnahme der Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe von den Aminosäuren zu den Terpenen beobachtet werden. Der Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose liefert vergleichbare Ergebnisse.

Trotz der geringeren Einbauraten in den Terpenen sind die potenziell unmarkierten C-Atome höher markiert als in den Aminosäuren und im Nicotin. Bei der Umsetzung von [1-¹³C₁]D-Glucose im Stoffwechsel kommt es bei einigen Stoffwechselreaktionen (Glykolyse

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

und oxidativer Pentosephosphatweg) zum Verlust des markierten C-Atoms durch Abspaltung als ¹³CO₂. Das in der Pflanze über Stoffwechselwege freigesetzte CO₂ diffundiert in die Spaltöffnung, um dort über den Calvin-Zyklus wieder in den Stoffwechsel zurückgeführt zu werden. Diese Prozesse konnten bereits in Einbauversuchen in Tabak BY-2 Zellkultur (var. Bright Yellow) mit [1-¹³C₁]D-Glucose nachgewiesen werden (Disch *et al.*, 1998b). Der gleiche Mechanismus wurde auch in Arbeiten an *E. coli*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *S. obliquus* und in Chloroplasten höherer Pflanzen beobachtet (Rohmer *et al.*, 1993b; Schwender *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997b; Disch *et al.*, 1998b).

Bei dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit 50 % [1-¹³C₁]D-Glucose durchgeführt wurde, ist ein hoher Anteil an refixierter Markierung über die Photosynthese wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu wurde bei dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose nur mit 2 % markierter D-Glucose gearbeitet.

Der erneute Einbau von abgespaltetem ¹³CO₂ kann die gleichmäßige Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe im Geranylgeraniol von 2 % erklären, ohne im Widerspruch zu den Daten der Anzucht mit [U-¹³C₆]D-Glucose zu liegen. Das in der Anzucht mit [U-¹³C₆]D-Glucose isolierte Geranylgeraniol weist nur Anreicherungen in den Positionen C-1, C-2 und C-3 der IPP/DMAPP Moleküle auf. Die Positionen stammen aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat. Fließt, wie im vorliegenden Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose, verstärkt ¹³CO₂ über die Photosynthese in das System, ist es wahrscheinlich, dass sich die Markierungen weiter im Stoffwechsel verbreiten.

In der Anzucht mit [U-¹³C₆]D-Glucose ist *cis*-Abienol deutlich höher markiert als Phytol oder Geranylgeraniol. Eine vergleichbare Verteilung ist auch bei der Anzucht mit [1-¹³C₁]D-Glucose zu beobachten.

Die Anreicherungen der markierten Positionen sind im *cis*-Abienol doppelt so hoch, wie im Phytol. Sowohl Phytol, wie auch Geranylgeraniol weisen eine Nivellierung ihrer Markierungen über die fünf Positionen des IPP/DMAPP Moleküls auf. Im Phytol weichen die markierten Positionen nur geringfügig nach oben ab. Geranylgeraniol hat nur in den Positionen C-5 der IPP/DMAPP Moleküle eine leicht höhere Anreicherung. Die gleichmäßige Verteilung der Anreicherungen wird auf den Einbau von ¹³CO₂ zurückgeführt.

Geranylgeraniol ist, gemäß der Literatur, Vorstufe aller Diterpene, d.h. Vorstufe von Phytol und *cis*-Abienol. Der Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose legt die Vermutung nahe, dass *cis*-Abienol und Phytol nicht aus dem gleichen Geranylgeraniol Pool

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, [1-¹³C₁]D-Glucose)

gebildet werden und das isolierte Geranylgeraniol nicht alle Pools aus *Nicotiana tabacum* widerspiegelt.

Der Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [1-¹³C₁]D-Glucose bestätigt die Hypothese aus dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose, dass verschiedene räumlich und zeitlich getrennte Geranylgeraniol Pools in der Pflanze vorliegen, bzw. die Geranylgeraniol Pools die an der Bildung von Phytol und *cis*-Abienol beteiligt sind nicht freigesetzt werden.

Eine weitere Besonderheit der Anzucht mit [1-¹³C₁]D-Glucose, ist die vergleichbar hohe Anreicherung in den Positionen C-28 und C-29 der beiden identifizierten Sterole. Wobei, wie in der Anzucht mit [U-¹³C₆]D-Glucose, die Anreicherungen der [¹³C₁]Isotopologe der Positionen C-28 und C-29 von Stigmasterol doppelt so hoch sind, wie im Sitosterol. Die hohe Anreicherung lässt sich über einen verstärkten Einbau von markiertem CO₂ erklären.

Unter den vorliegenden Bedingungen kann bei den Terpenen kein Crosstalk bestimmt werden. Die Anreicherungen der einzelnen Positionen liegen so nahe beieinander, dass es schon schwierig ist die Biosynthesen eindeutig zuzuordnen. Der auslösende Grund hierfür kann die Rückführung von ¹³CO₂ über die Photosynthese sein.

Die Untersuchungen zum Biosyntheseweg der Pyridin-Einheit von Nicotin im Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose bestätigen die Ergebnisse des Einbauversuchs mit [U-¹³C₆]D-Glucose. Die Biosynthesen über Tryptophan, bzw. Aspartat, Formiat und Acetyl-CoA erscheinen unwahrscheinlich. Die Markierungen lassen sich mit der Biosynthese über Aspartat und Glycerinaldehyd-3-phosphat in Einklang bringen.

Es bieten sich weitere Markierungsversuche mit einfach markierter D-Glucose an. Wobei der Einsatz von [2-¹³C₁]D-Glucose gegenüber [1-¹³C₁]D-Glucose den Vorzug zu geben ist. Die Rückführung von ¹³CO₂ kann beim Einsatz von [2-¹³C₁]D-Glucose stark reduziert werden.

Einbauversuche mit markiertem ¹³CO₂ können Aufschluss hinsichtlich, der hier aufgestellten Vermutung der Verknüpfung zwischen den Terpenen Geranylgeraniol, Phytol und *cis*-Abienol, geben. Wenn, die Theorie aus den beiden Anzuchten mit [U-¹³C₆]D-Glucose und [1-¹³C₁]D-Glucose stimmen, müsste vor allem Geranylgeraniol markiert werden. Ein Einbauversuch mit ¹³CO₂ kann auch getrennte Geranylgeraniol Pools bei der Biosynthese von Phytol und *cis*-Abienol bestätigen.

3.4.4.3 Einbauexperiment mit $^{13}\text{CO}_2$ in *Nicotiana tabacum* (Wildtyp)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Markierungsmuster des Alkaloids Nicotin in *Nicotiana tabacum*, aus dem Einbauversuch mit 80 ml $^{13}\text{CO}_2$ untersucht.

Aus dem methanolischen Extrakt der frischen Pflanzenproben (ohne Wurzeln, 85 g) wurde Nicotin isoliert und NMR spektroskopisch vermessen.

3.4.4.3.1 Nicotin

Das Markierungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit $^{13}\text{CO}_2$ ist in Tabelle 68 und Abbildung 93 zusammengefasst.

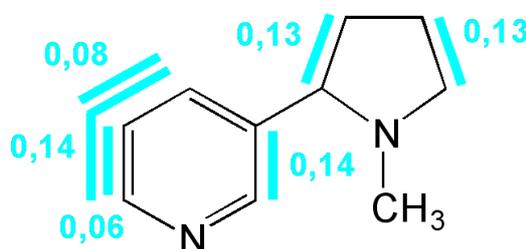


Abbildung 93. Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit $^{13}\text{CO}_2$. Die Balken kennzeichnen die Kopplungsblöcke. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50).

Pyrrolidin-Einheit

Im NMR Spektrum von Nicotin sind $[6,7-^{13}\text{C}_2]$ und $[8,9-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe in der Pyrrolidin-Einheit sichtbar (Abbildung 94). Im Spektrum sind bei den Signalen der Positionen C-6 bis C-9 keine Fernkopplungen sichtbar.

Gemäß der Literatur und der Ergebnisse in den Einbauversuchen mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ und $[1-^{13}\text{C}_1]\text{D-Glucose}$ erfolgt die Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bzw. aus Arginin (Abbildung 53; Tiburcio und Galston, 1986; Wagner, 1987).

Pyridin-Einheit

Im NMR Spektrum sind $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ Isotopologe in der Pyridin-Einheit des Nicotins sichtbar (Abbildung 94).

Gemäß der Literatur und der Ergebnisse in den Einbauversuchen mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ und $[1-^{13}\text{C}_1]\text{D-Glucose}$ erfolgt die Biosynthese der Pyridin-Einheit aus Aspartat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (Abbildung 55, oben; Wagner, 1987; Luckner, 1990; Review: Forster und Moat, 1980).

Tabelle 68. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit $^{13}\text{CO}_2$.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁴⁶	Häufigkeit	Kopplung
	Verschiebung δ [ppm]			
1	149,5	56,8 (2)	1,2	10,0
2	138,8	56,8 (1)	1,2	13,8
3	135,0	54,6 / 2,4 (4, 4/5)	1,3	16,8
4	123,7	54,7 (3)	1,3	10,5
		54,8 (3/5)		10,8
5	148,6	54,8 / 2,4 (3/4)	1,5	14,7
6	69,0	35,1 (7)	1,2	9,8
7	22,7	34,3 (6)	1,2	12,4
8	35,2	34,3 (9)	1,2	10,8
9	57,1	34,4 (8)	1,3	10,7
10	40,4		1,3	

Diskussion

Im Einbauversuch von *Nicotiana tabacum* mit $^{13}\text{CO}_2$ entstehen mehrfach ^{13}C -markierte Vorstufen in den einzelnen Biosynthesebausteinen. Es wurden keine mehrfachmarkierten Isotopologe gefunden, die gleichzeitig Atome aus verschiedenen Bausteinen umfassen. Die Pyrrolidin-Einheit entsteht aus den gemischten Signalen von Acetyl-CoA (**10**, blau) und Oxalacetat (**38**, rot). Die Markierungen in der Pyridin-Einheit bilden sich aus Glycerinaldehyd-3-phosphat (**16**, grün) und Aspartat (Abbildung 95, **53**, rot). Dies belegt, dass bei der Biosynthese von Nicotin maximal ein markierter Biosynthesebaustein pro Molekül eingebaut wurde. Die Isotopologverteilung zeigt daher die Schnitte für die retrobiosynthetische Zerlegung des Moleküls.

Aus dem $^{13}\text{CO}_2$ wurden universell ^{13}C -markierte Zucker gebildet. Durch das Recycling im Zuckerstoffwechsel entstehen aus den universell ^{13}C -markierten und unmarkierten Metaboliten spezifische Isotopologmuster. Das Modellexperiment in *Nicotiana tabacum* mit $^{13}\text{CO}_2$ zeigt, dass das System für die Aufklärung von Biosynthesewegen und Stoffflüssen im Primärstoffwechsel geeignet ist. Durch die Kombination mehrerer Intermediate sollte es möglich sein einen einzigartigen Einblick in das Stoffwechselnetzwerk einer Pflanze unter physiologischen Bedingungen zu erfassen und zu beschreiben.

⁴⁶ Kopplungspartner in Klammern

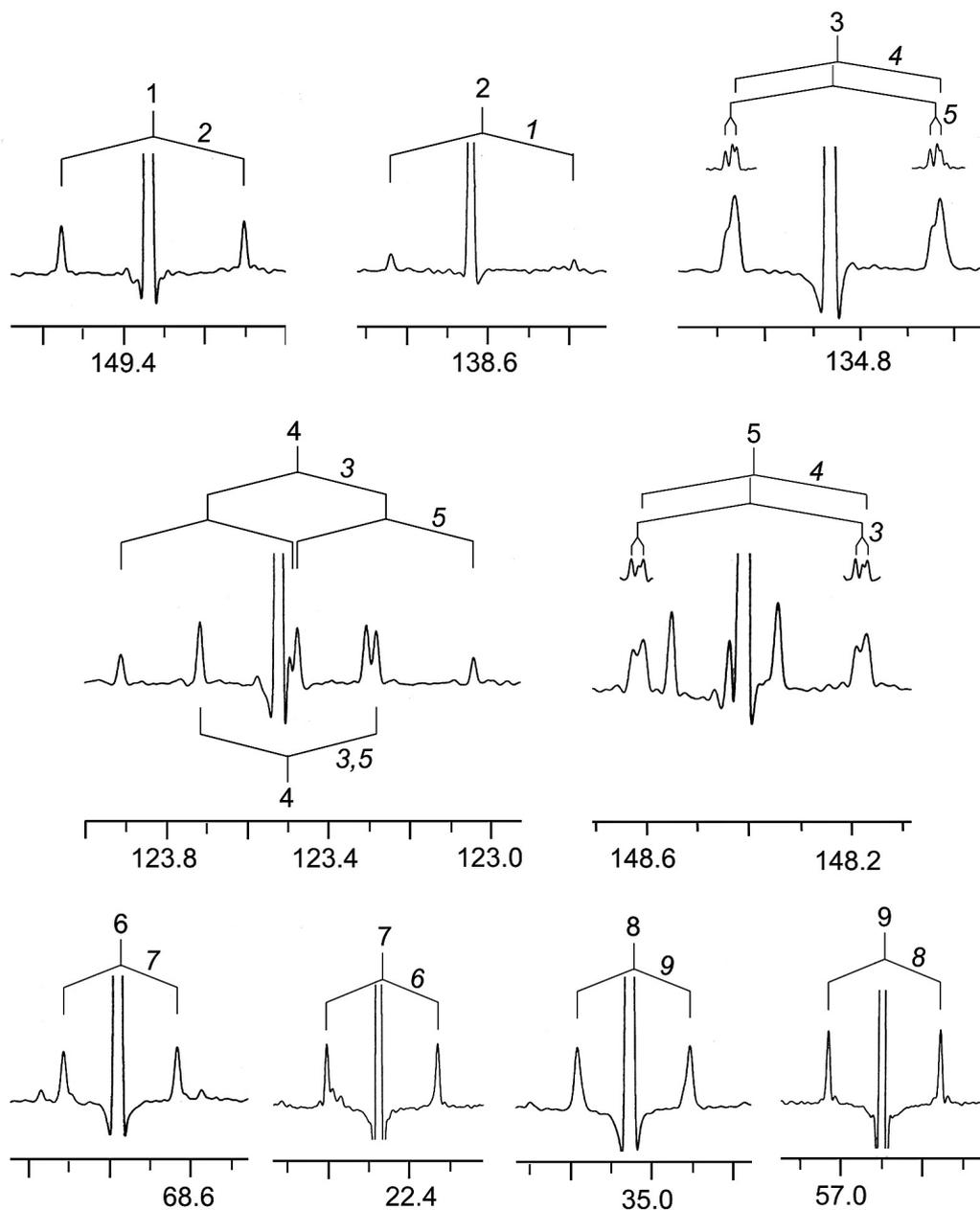


Abbildung 94. NMR Spektrum von Nicotin aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die Sterne markieren Verunreinigungen im Spektrum.

3.4.4.4 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* RPO

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Markierungsmuster der Terpene und des Alkaloids Nicotin in der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum*, aus dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, untersucht.

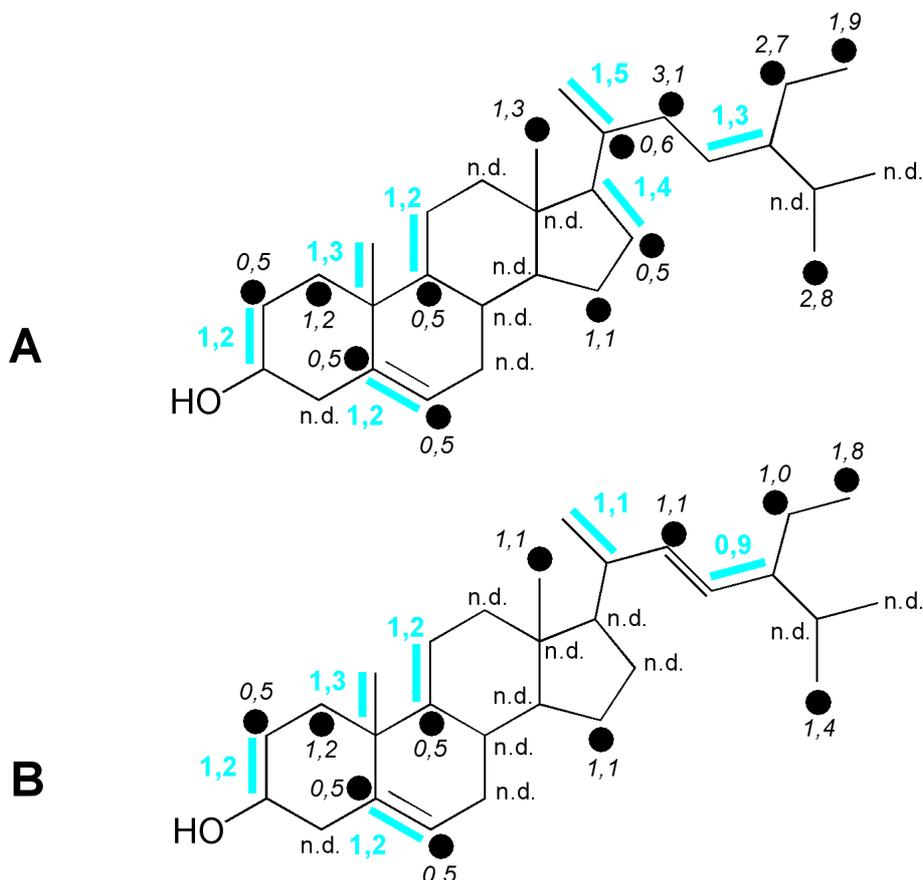


Abbildung 96. Kopplungsmuster von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Messergebnisse

Im Lipid-Extrakt der frischen Pflanzenproben (83 g) konnten Sterole isoliert und NMR spektroskopisch vermessen werden. Über die charakteristischen Verschiebungen der Seitenkettenatome (C-22 und C-23) konnten Sitosterol und Stigmasterol identifiziert werden. Die beiden Sterole liegen in einem Verhältnis von 1 : 2 (Sitosterol : Stigmasterol) in der Probe vor.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* RPO

Die Anwesenheit weiterer Terpene, wie sie bereits im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* bestimmt wurden (S. 186; β -Carotin, Lutein, Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol), konnten in der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* über HPLC (Detektion: Dioden-Array) nicht festgestellt werden. Auch Nicotin konnte nicht in ausreichenden Mengen für eine NMR spektroskopische Untersuchung gewonnen werden.

Tabelle 69. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Sitosterol aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁴⁷	Häufigkeit	
	Verschiebung		J _{CC} [Hz]	% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
	δ [ppm]			
1	37,2			2,3
2	31,6	36,6 (3)		2,8
3	71,7	36,5 (2)		2,6
4	42,2			n.d.
5	140,7	71,5 (6)		2,8
6	121,7	71,8 (5)		2,4
7	31,9			n.d.
8	31,9			n.d.
9	50,1	35,2 (11)		2,8
10	36,5	35,1 (19)		2,5
11	21,0	n.d. (9)		n.d.
12	39,7	35,5 (13)		n.d.
13	42,2	n.d. (12)		n.d.
14	56,8			n.d.
15	24,3			2,2
16	28,2	33,8 (17)		3,0
17	56,0	n.d. (16)		n.d.
18	11,8			2,4
19	19,4	35,2 (10)		2,8
20	36,1	34,6 (21)		3,2
21	18,9	37,7 (20)		2,9
22	33,9			4,2
23	26,0	35,1 (24)		2,6
24	45,8	34,9 (23)		2,8
25	29,1	n.d. (27)		n.d.
26 (pro-S)	19,8			3,9
27 (pro-R)	20,5	n.d. (25)		n.d.
28	23,0			3,8
29	11,9			3,0

⁴⁷ Kopplungspartner in Klammern

Tabelle 70. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Stigmasterol aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁴⁸	Häufigkeit	
	Verschiebung δ [ppm]		J_{CC} [Hz]	% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	37,2			2,3
2	31,6	36,6 (3)		2,8
3	71,7	36,5 (2)		2,6
4	42,2			n.d.
5	140,7	71,5 (6)		2,8
6	121,7	71,8 (5)		2,4
7	31,9			n.d.
8	31,9			n.d.
9	50,1	35,2 (11)		2,8
10	36,5	35,1 (19)		2,5
11	21,0	n.d. (9)		n.d.
12	39,7	35,5 (13)		n.d.
13	42,2	n.d. (12)		n.d.
14	56,8			n.d.
15	24,3			2,2
16	28,9	33,6 (17)		2,9
17	56,0	n.d. (16)		n.d.
18	12,0			2,2
19	19,4	35,2 (10)		2,8
20	40,5	34,2 (21)		2,5
21	20,2	n.d. (20)		n.d.
22	138,3			2,1
23	129,2	43,7 (24)		2,3
24	51,2	43,6 (23)		2,0
25	31,9	34,5 (27)		n.d.
26 (pro-S)	18,7			2,5
27 (pro-R)	21,2	35,6 (25)		n.d.
28	25,4			2,1
29	12,2			2,9

Das Markierungsmuster von Sitosterol aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 69 und Abbildung 96 (A) zusammengefasst. Das Markierungsmuster von Stigmasterol ist in Tabelle 70 und Abbildung 96 (B) zusammengefasst.

⁴⁸ Kopplungspartner in Klammern

Im NMR Spektrum der Sterole sind ausschließlich [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe sichtbar. Im Spektrum sind, in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, keine Fernkopplungen $> 0,1\%$ zu beobachten. Die Konzentration der [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe aus den überlagerten Signalen des Ringsystems der beiden Sterole liegt bei $1,2\text{ mol}\%$ (Abbildung 97, oben). In den Seitenketten liegt die Konzentration der [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe im Sitosterol bei $1,5\text{ mol}\%$ im IPP, sowie bei $1,3\text{ mol}\%$ im DMAPP (Tabelle 69 und Abbildung 97, **A**, unten) und im Stigmasterol bei $1,1\text{ mol}\%$ (Tabelle 70 und Abbildung 97, **B**, unten). Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe aus dem Ringsystem liegt bei $1,2\%$, aus dem Sitosterol bei $3,0\%$ und aus dem Stigmasterol bei $1,3\%$. Die deutlich höheren Anreicherungen der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in Sitosterol spiegeln sich auch in der Position C-28 wieder (Tabelle 72 und Abbildung 97).

Die Anreicherung der Position C-28 liegt im Sitosterol bei $2,7\%$ und im Stigmasterol bei $1,0\%$. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass Sitosterol eine Anreicherung von 3% und Stigmasterol von 1% hat (Abbildung 96, **A** und **B**). Die überlagerten Signale des Ringsystems liefern ein Gemisch der beiden Anreicherungen, in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses der beiden Sterole (Sitosterol : Stigmasterol 1 : 2).

Retrobiosynthese

Mit den NMR spektroskopischen Daten der Aminosäuren (S. 125) aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, wurden die Markierungsmuster der zentralen Stoffwechselmetabolite bestimmt (Acetyl-CoA, α -Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Phosphoenolpyruvat, u.a.; Tabelle 23 und Abbildung 42). Unter Verwendung der Zentralmetabolite ist es möglich die hypothetischen Markierungsmuster von IPP und DMAPP, den Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese, über die beiden bekannten Biosynthesewege zu rekonstruieren (Abbildung 3 und Abbildung 4).

Da im vorliegenden Organismus verschiedene Markierungshöhen in den von Cytosol und Plastiden beeinflussten Pools der zentralen Stoffwechselverbindungen existieren, wird bei der Retrobiosynthese von IPP und DMAPP der jeweilig typische Ort der Terpenbiosynthesen beachtet, d.h. Mevalonatweg im Cytosol und Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden. Die Retrobiosynthese erfolgt beim Deoxyxylulosephosphatweg mit den Daten von 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus den aromatischen Aminosäuren, sowie Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin, Tabelle 23). Die hypothetischen Daten von IPP und DMAPP aus den beiden Biosynthesen, Mevalonatweg (**C**) und Deoxyxylulosephosphatweg (**D**), sind in Tabelle 71 und Abbildung 98 zusammengefasst.

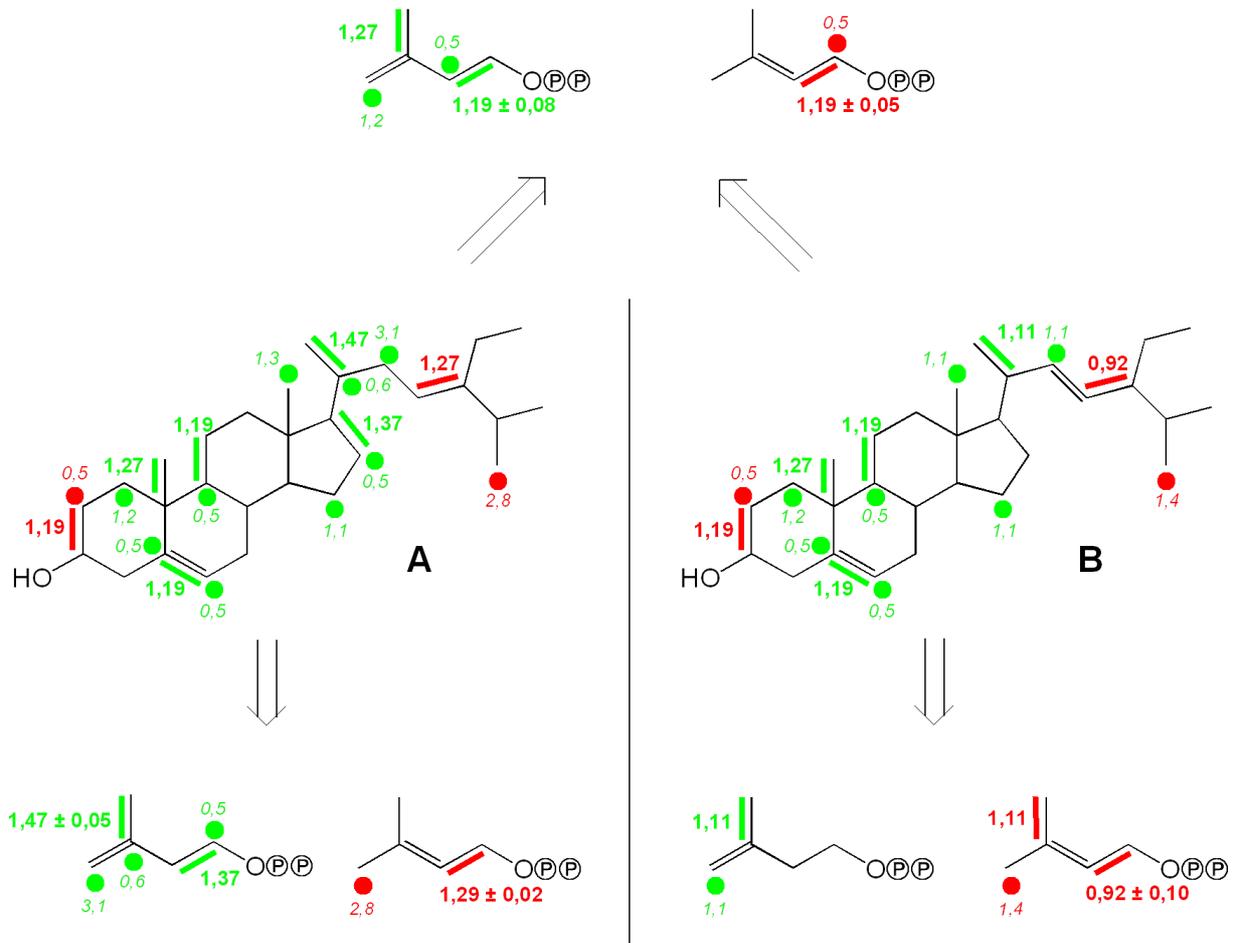


Abbildung 97. Das Markierungsmuster der IPP (grün) und DMAPP (rot) Moleküle von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, getrennt nach überlagerten Signalen aus dem Ringsystem (oben) und Signalen aus der Seitenkette (unten).

Der Mevalonatweg synthetisiert aus drei Acetyl-CoA Molekülen (rekonstruiert aus Glutamat, Arginin, Prolin und Leucin, Tabelle 23) die Vorstufen IPP und DMAPP (Abbildung 98, C). Bei der hypothetischen Rekonstruktion von IPP und DMAPP mit dem retrobiosynthetisch bestimmt Acetyl-CoA entstehen [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 1,7 mol%, sowie [¹³C₁]Isotopologe in Position C-4 mit einer Anreicherung von 2,3 % und in den restlichen Positionen mit einer Anreicherung von 0,5 %.

Beim Deoxyxylulosephosphatweg reagiert der „aktivierte Acetaldehyd“ Hydroxyethylthiamin-diphosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu IPP und DMAPP (Abbildung 98, D). Die Markierungsmuster von Hydroxyethylthiamin-diphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat wurden aus den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren, sowie aus Alanin,

Valin, Leucin und Isoleucin rekonstruiert (Tabelle 23). Es bilden sich, in Analogie zum Mevalonatweg, [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe, wobei die Konzentration des [1,2-¹³C₂] Isotopologs (rot) mit 0,5 mol% niedriger ist als das [3,5-¹³C₂]Isotopolog (blau) mit 1,7 mol%. Daneben entsteht über das [1,2,3-¹³C₃]Isotopolog aus dem Glycerinaldehyd-3-phosphat ein [1,2,4-¹³C₃]Isotopolog (grün) in den IPP/DMAPP Molekülen mit einer Konzentration von 1,3 mol%. Die [1,2-¹³C₂] und [1,2,4-¹³C₃]Isotopologe liegen in einem charakteristischen Verhältnis von 1,0 : 2,8 vor. Die Position C-4 weist ein [¹³C₁]Isotopolog mit einer Anreicherung von 1,9 % auf.

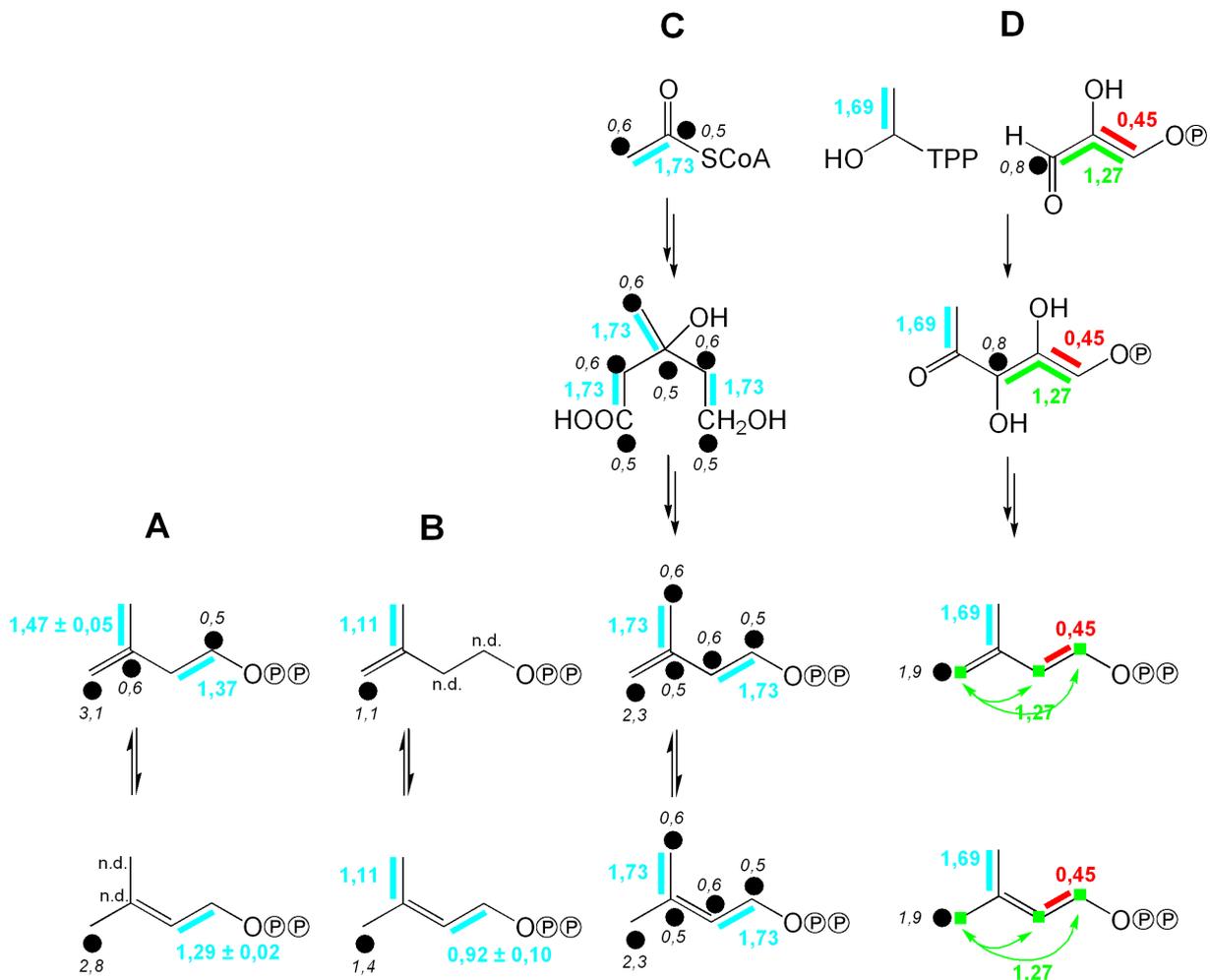


Abbildung 98. Vergleich der Kopplungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose. Die hypothetisch bestimmten Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle über den Mevalonatweg (C) und den Deoxyxylulosephosphatweg (D). Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sitosterol (A) und Stigmasterol (B).

Tabelle 71. Hypothetische Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP, rekonstruiert über den Mevalonat- und Deoxyxylulosephosphatweg, mit den Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 23) aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Vorhersagen		Position	koppelt mit	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Mevalonat	IPP/DMAPP	1	(2)	3,3	53,5
		2	(1)	3,4	51,3
		3	(5)	3,3	53,5
		4		3,4	
		5	(3)	3,3	51,3
1-DOXP	IPP/DMAPP	1	(2)	3,2	43,9
		2	(1)	3,1	13,3
			(1/4)		38,6
		3	(5)	3,1	51,9
		4		3,0	
		5	(3)	3,0	58,6

Gemäß der Biosynthese bauen sich Sterole aus vier IPP und zwei DMAPP Molekülen zusammen (Abbildung 51). Wie bereits ausgeführt, können nur die Daten der Seitenkette für die Bestimmung der Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle von Sitosterol bzw. Stigmasterol herangezogen werden (Abbildung 97). Die sich überlagernden Signale der beiden Sterole werden für die weiteren Auswertungen nicht herangezogen.

Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Sitosterol (**A**) und Stigmasterol (**B**) sind in Tabelle 72 und Abbildung 98 zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sitosterol (**A**) und Stigmasterol (**B**) weist ausschließlich $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe, sowie $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe in höheren Konzentrationen in der Position C-4 auf (Tabelle 72 und Abbildung 98). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Mevalonatweg. Die Konzentrationen der $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe liegen im Stigmasterol bei 1,0 mol%, sowie im IPP von Sitosterol bei 1,4 mol% und im DMAPP bei 1,3 mol%.

Im Vergleich dazu liegen die Konzentration der $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe, aus den hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Molekülen über den Mevalonatweg, mit 1,7 mol% nur geringfügig höher (Tabelle 71 und Abbildung 98, C). Im Gegensatz dazu ist die Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe in Position C-4 mit 3 % in Sitosterol höher und mit 1 % in Stigmasterol niedriger, als die 2 % aus den hypothetisch bestimmten Daten über den Mevalonatweg.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* RPO

Tabelle 72. Aus Sitosterol und Stigmasterol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit		Kopplung		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	ΔS^{49}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	
Sitosterol (Seitenkette)	IPP	1	(2)	3,0	{1}	45,6	{1}
		2	(1)	n.d.	{1}	n.d.	{1}
		3	(5)	3,2	{1}	47,5	{1}
		4		4,2	{2}		
		5	(3)	2,9	{1}	48,9	{1}
	DMAPP	1	(2)	2,6	{1}	48,9	{1}
		2	(1)	2,8	{1}	46,4	{1}
		3	(5)	n.d.		n.d.	
		4		3,9	{1}		
		5	(3)	n.d.		n.d.	
Stigmasterol (Seitenkette)	IPP	1	(2)	2,9	{1}	n.d.	
		2	(1)	n.d.		n.d.	
		3	(5)	2,5	{1}	44,3	{1}
		4		2,1	{1}		
		5	(3)	n.d.		n.d.	
	DMAPP	1	(2)	2,3	{1}	44,4	{1}
		2	(1)	2,0	{1}	41,0	{1}
		3	(5)	n.d.		n.d.	
		4		2,5	{1}		
		5	(3)	n.d.		n.d.	
Ringsystem	IPP	1	(2)	2,4	{1}	44,1	1,6 {2}
		2	(1)	2,8	0,0 {2}	44,3	1,8 {2}
		3	(5)	2,5	{1}	n.d.	
		4		2,3	0,1 {2}		
		5	(3)	2,8	{1}	45,5	{1}
	DMAPP	1	(2)	2,8	{1}	43,8	{1}
		2	(1)	2,6	{1}	44,0	{1}
		3	(5)	n.d.			
		4		n.d.		n.d.	
		5	(3)	n.d.		n.d.	

⁴⁹ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Die höhere Konzentration der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in den Sterolen wird durch den Einbau von [$^{13}\text{C}_1$]Markierungen verursacht. Je stärker die Verstoffwechslung der [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose voranschreitet, desto mehr [$^{13}\text{C}_1$]Bruchstücke entstehen. Wenn es bei den Biosynthesen der Aminosäure und der Sterole einen zeitlichen Unterschied gibt, erklärt sich die erhöhte Konzentration an [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologen durch die spätere Bildung der Sterole.

Die weitere Quelle für [$^{13}\text{C}_1$]Markierungen, die bei dem Einbauversuch im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* diskutiert wurde, ist das $^{13}\text{CO}_2$. In der vorliegende Mutante ist der Photosyntheseapparat nicht aktiv, wie bereits die weißen Blätter andeuten. Somit muss die Photosynthese als Quelle für [$^{13}\text{C}_1$]Markierungen ausgeschlossen werden.

Diskussion

Aus der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* wurden nur Sitosterol und Stigmasterol in ausreichender Menge für die NMR spektroskopische Untersuchung isoliert (Abbildung 99, A). Die im Wildtyp gefundenen Terpene β -Carotin, Lutein, Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol konnten nicht nachgewiesen werden. Das NMR Spektrum des Lipid-Extrakts der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* weist keine Signale von Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol auf (Abbildung 99, A).

Die vorliegende Mutante hat ein Defizit an *rpoB*. Die eliminierte RNA Polymerase führt zu einer reduzierten Transkription der Polypeptide für den Photosyntheseapparat. Wobei die rRNAs und mRNAs, ohne funktionellen Bezug zur Photosynthese, in vergleichbaren Mengen wie im Wildtyp enthalten sind (Santis-Maciassek *et al.*, 1999).

Bei den Untersuchungen der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Koop wurden wichtige Inhaltsstoffe, wie Lipide, Protochlorophyllide und Carotinoide, nur zu 1 – 2 %, im Verhältnis zum Wildtyp gefunden (Santis-Maciassek *et al.*, 1999). Die Biosynthese der Terpene, die mit dem Photosynthese-Apparat verknüpft sind, ist in der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* stark eingeschränkt. Eine gestörte Photosynthese kann auch eine gestörte Chloroplastenentwicklung bedeuten. Die RPO Mutante ist weiß. Da der Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden stattfindet besteht hier eine Verknüpfung. Es muss davon ausgegangen werden, dass die geringen Konzentrationen von β -Carotin, Lutein, Phytol und Geranylgeraniol auf fehlende bzw. gestörte Chloroplasten zurückzuführen ist.

Es handelt sich hierbei ausschließlich um Terpene, die über den Deoxyxylulosephosphatweg gebildet werden. Im Einbauversuch konnten aromatische Aminosäuren mit Markierung nachgewiesen werden. Gemäß der Literatur erfolgt die Biosynthese der aromatischen Amino-

säuren in den Chloroplasten. Möglicherweise werden nicht alle Enzyme des Deoxyxylulosephosphatwegs in der Mutante gebildet, oder sind in ausreichenden Mengen vorhanden.

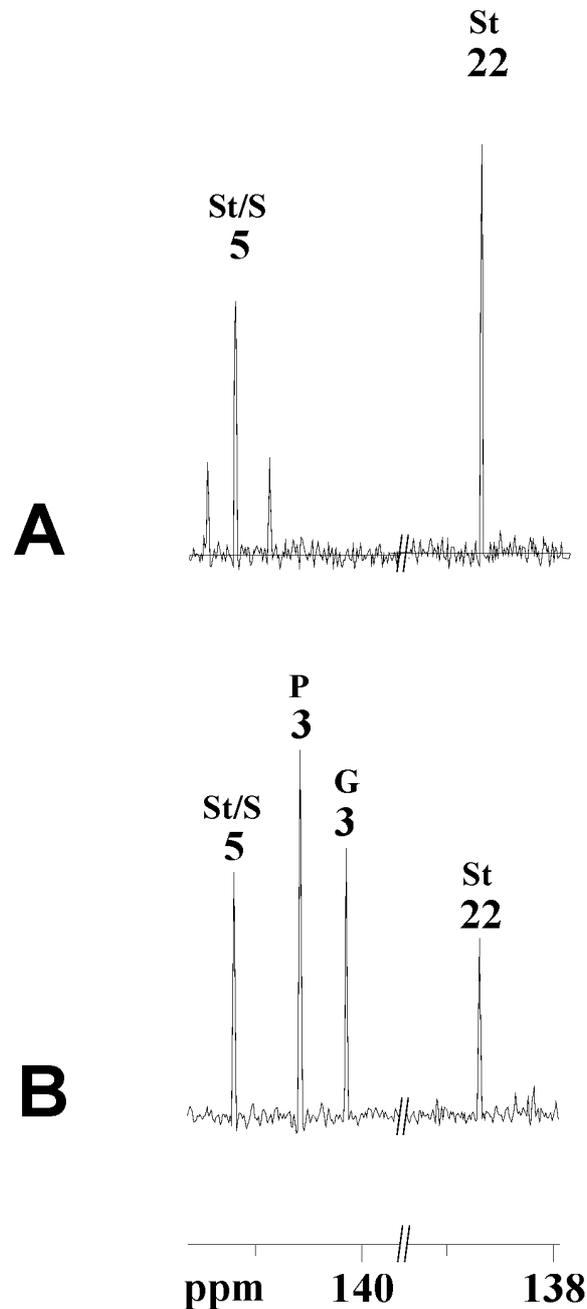


Abbildung 99. NMR Spektren der, mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Fraktion aus den Einbauversuchen mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose, (A) in der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* und (B) im Wildtyp von *Nicotiana tabacum*.

Die $^{13}\text{C}_2$ Isotopologe von Sitosterol und Stigmasterol haben nur 80 %, bzw. 60 % der Höhe, im Vergleich zu den rekonstruierten IPP/DMAPP Molekülen über den Mevalonatweg (Abbildung 98). Die Anreicherung der sekundären Metabolite ist im Verhältnis zu den primären Metaboliten, bei der RPO Mutante von *Nicotiana tabacum* höher als im Wildtyp beo-

bachtet (50 % bei den Sterolen). Da neben den Sterolen keine weiteren Terpene in nennenswerten Mengen gebildet wurden, war ein höherer Einbau in den Sterolen zu erwarten, da die [U-¹³C₆]D-Glucose verstärkt in diese Metabolite fließt.

Die RPO Mutante bildet im verwendeten Nährmedium keine Wurzeln aus. Die eingesetzten Pflanzen bestehen hauptsächlich aus einem Kallus und wenigen Blättern. Versuche, die RPO Mutante, wie den Wildtyp, auf B5 Medium anzuziehen, scheiterten (Klaus *et al.*, 2003).

Die Nicotinbiosynthese findet in den Wurzeln statt. In der RPO Mutante konnte kein Nicotin in ausreichender Menge für eine NMR spektroskopische Untersuchung isoliert werden. Eine Überprüfung der Nicotinbiosynthese in der RPO Mutante war nicht möglich.

Es sind 1 – 2 % der im Wildtyp vorhandenen Carotinoide in der RPO Mutante nachgewiesen worden (Santis-Maciassek *et al.*, 1999). Wenn größere Probenmengen aufgearbeitet werden, ist es vielleicht möglich NMR spektroskopisch auswertbare Mengen an Terpenen des Deoxyxylulosephosphatwegs zu erhalten. Vorallem *cis*-Abienol würde sich anbieten, da bereits im Wildtyp wenig β -Carotin und Lutein vorhanden ist. Phytol und Geranylgeraniol wird über die Beeinträchtigung des Photosyntheseapparats, wie die farblosen Blätter schon andeuten, wahrscheinlich in noch schlechterer Ausbeute vorhanden sein. Es ist jedoch möglich, dass für die ausreichende Synthese von *cis*-Abienol eine gute Blattausbildung bzw. eine damit verbundene Bildung von Trichomen notwendig ist. Das hieße auch hier, wie bei der Überprüfung der Nicotinbiosynthese, müsste in erster Linie die Nährmediumzusammensetzung hinsichtlich der Spross- bzw. Wurzelentwicklung geändert werden.

Einbauversuche mit Mevalonat und Deoxyxylulose, sowie mit Intermediaten des Deoxyxylulosephosphatwegs könnten Aufschluss über das Ausmaß der Beeinträchtigung des Deoxyxylulosephosphatwegs geben, evtl. in Kombination mit einem 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase Inhibitor um den Mevalonatweg vollständig auszuschalten.

3.4.4.5 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* NDH 53-25

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Markierungsmuster der Terpene und des Alkaloids Nicotin in der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum*, aus dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, untersucht.

Aus dem methanolischen Extrakt der frischen Pflanzenproben (ohne Wurzel, 67g) wurde Nicotin isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Aus dem, mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Extrakt wurden die Terpene Sitosterol, Stigmasterol, Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol isoliert, gereinigt und NMR spektroskopisch vermessen.

3.4.4.5.1 Retrobiosynthese der Terpene

Mit den NMR spektroskopischen Daten der Aminosäuren (S.135), aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, wurden die Markierungsmuster der zentralen Stoffwechselmetabolite bestimmt (Acetyl-CoA, α -Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Phosphoenolpyruvat, u.a.; Tabelle 25 und Abbildung 46). Unter Verwendung der Zentralmetabolite ist es möglich die hypothetischen Markierungsmuster von IPP und DMAPP, den Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese, über die beiden bekannten Biosynthesewege zu rekonstruieren (Abbildung 3 und Abbildung 4).

Abbildung 100. Vergleich der Kopplungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die hypothetisch bestimmten Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle über den Mevalonatweg (B) und den Deoxyxylulosephosphatweg (C). Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Sterol (A), Phytol (D), Geranylgeraniol (E) und *cis*-Abienol (F).

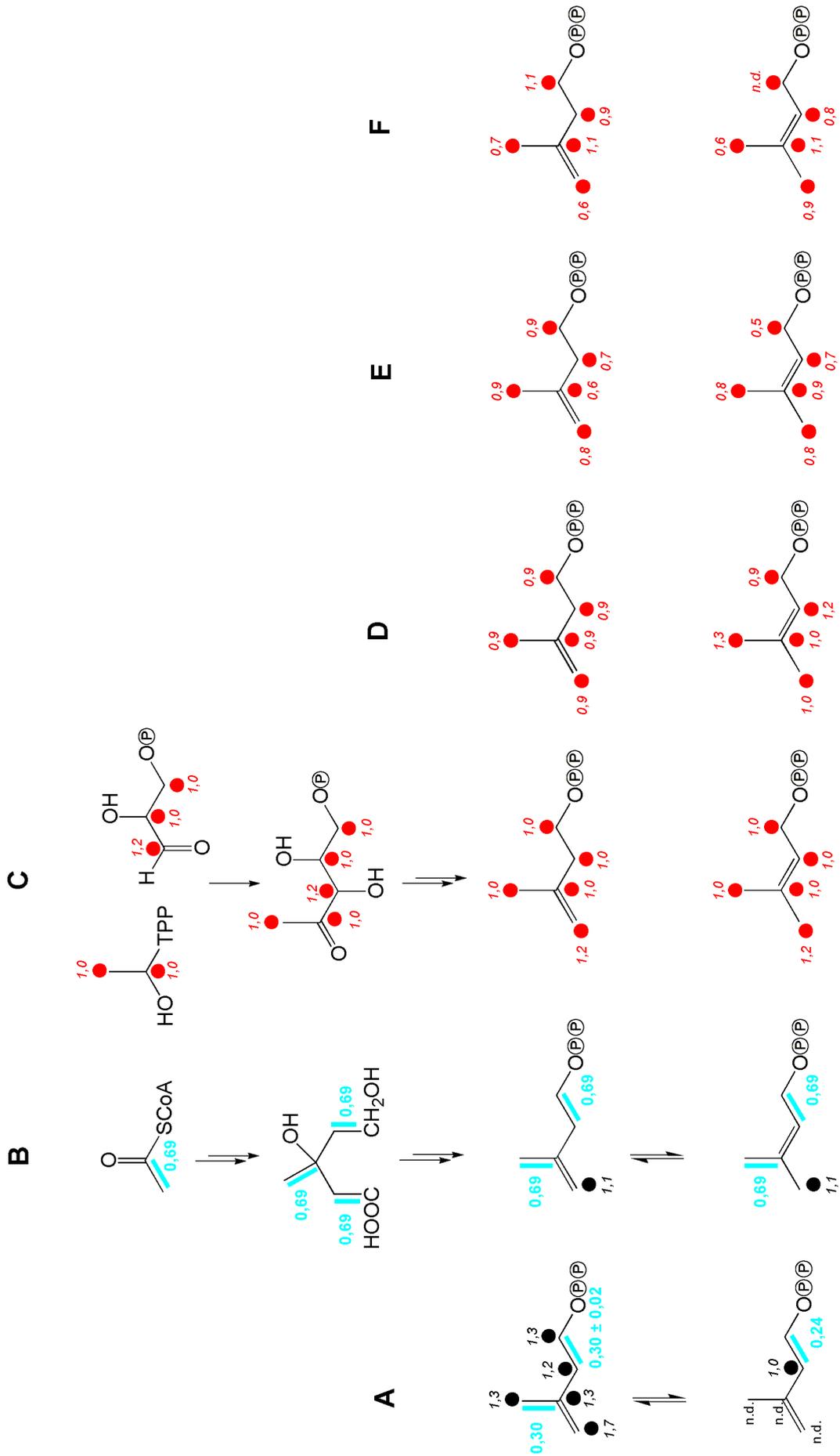


Tabelle 73. Hypothetische Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP, rekonstruiert über den Mevalonat- und Deoxyxylulosephosphatweg, mit den Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 25) aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Vorhersagen		Position	koppelt mit	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Mevalonat	IPP/DMAPP	1	(2)	2,2	31,4
		2	(1)	2,2	31,3
		3	(5)	2,2	31,4
		4		2,2	
		5	(3)	2,2	31,4
1-DOXP	IPP/DMAPP	1		2,1	
		2		2,1	
		3		2,1	
		4		2,3	
		5		2,1	

Da im vorliegenden Organismus verschiedene Markierungshöhen in den von Cytosol und Plastiden beeinflussten Pools der zentralen Stoffwechselverbindungen existieren, wird bei der Retrobiosynthese von IPP und DMAPP der jeweilig typische Ort der Terpenbiosynthesen beachtet, d.h. Mevalonatweg im Cytosol und Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden. Die Retrobiosynthese erfolgt beim Mevalonatweg mit den Daten von Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Glutamat) und beim Deoxyxylulosephosphatweg mit den Daten von 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus den aromatischen Aminosäuren, sowie Alanin, Leucin und Lysin, Tabelle 25). Die hypothetischen Daten von IPP und DMAPP aus den beiden Biosynthesen, Mevalonatweg (**B**) und Deoxyxylulosephosphatweg (**C**), sind in Tabelle 73 und Abbildung 100 zusammengefasst.

Der Mevalonatweg synthetisiert aus drei Acetyl-CoA Molekülen (Pool II, rekonstruiert aus Glutamat, Tabelle 25) die Vorstufen IPP und DMAPP (Abbildung 100, **B**). Bei der hypothetischen Rekonstruktion von IPP und DMAPP mit dem retrobiosynthetisch abgeleiteten Acetyl-CoA entstehen $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ und $[3,5\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe mit einer Konzentration von 0,7 mol%, sowie ein $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopolog an der Position C-4 mit einer Anreicherung von 1,1 %.

Beim Deoxyxylulosephosphatweg reagiert der „aktivierte Acetaldehyd“ Hydroxyethylthiamin-diphosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu IPP und DMAPP (Abbildung 100, **B**). Die Markierungsmuster von Hydroxyethylthiamin-diphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat wurden aus den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren, sowie aus Alanin,

Leucin und Lysin rekonstruiert (Tabelle 25). Die Ausgangsverbindungen der Biosynthese weisen keine Kopplungen auf. Die über den Deoxyxylulosephosphatweg gebildeten IPP/DMAPP Moleküle weisen eine gleichmäßige Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in allen Positionen von 1,0 % auf.

3.4.4.5.2 Sitosterol und Stigmasterol

Messergebnisse

Die isolierte Sterol-Fraktion aus der NDH 35-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* enthält, vergleichbar mit dem Wildtyp, ein Gemisch aus Sitosterol und Stigmasterol. Im NMR Spektrum überlagern sich die Signale der Ringsysteme. Über die charakteristischen Verschiebungen der Seitenkettenatome (C-22 und C-23) konnten Sitosterol und Stigmasterol nebeneinander identifiziert werden.

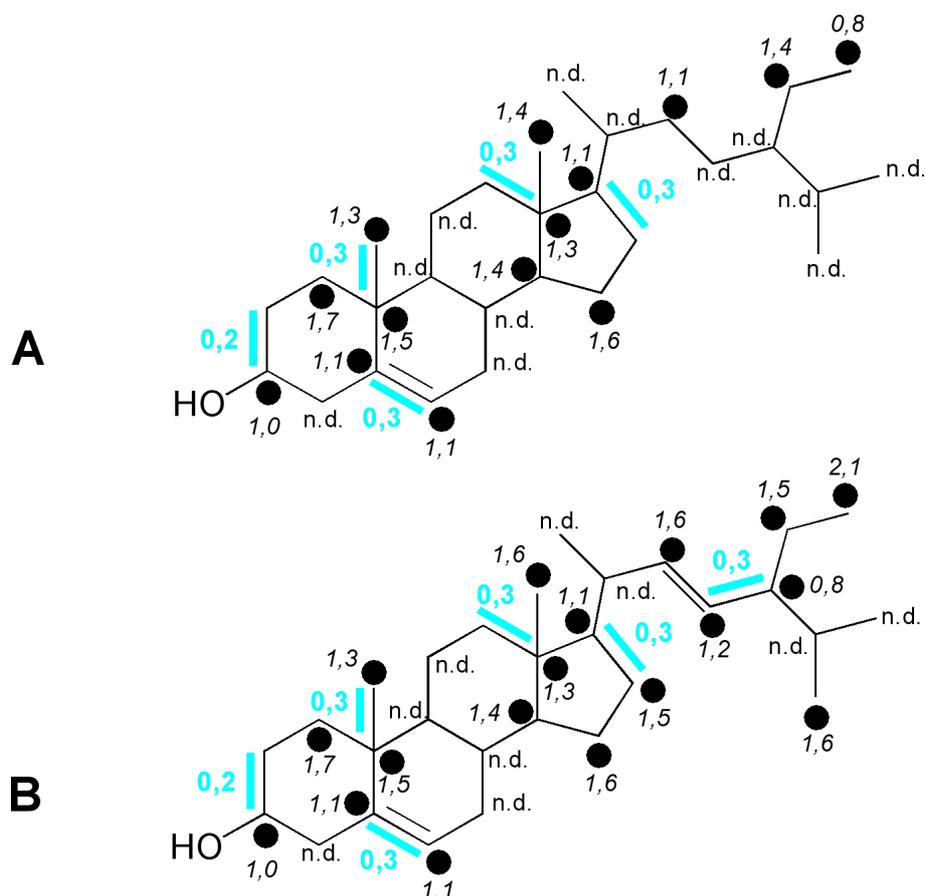


Abbildung 101. Kopplungsmuster von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* NDH 53-25

Das Markierungsmuster von Sitosterol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 74 und Abbildung 101 (A) zusammengefasst. Das Markierungsmuster von Stigmasterol ist in Tabelle 75 und Abbildung 101 (B) zusammengefasst.

Tabelle 74. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Sitosterol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁵⁰	Häufigkeit	
	Verschiebung δ [ppm]		J _{CC} [Hz]	% ¹³ C _{abs}
1	37,2			2,8
2	31,6	36,6 (3)		n.d.
3	71,8	36,5 (2)		2,3
4	42,3			n.d.
5	140,7	71,5 (6)		2,5
6	121,7	71,8 (5)		2,5
7	31,9			n.d.
8	31,9			n.d.
9	50,0	35,2 (11)		2,5
10	36,5	35,1 (19)		2,9
11	21,1	n.d. (9)		2,8
12	39,6	35,5 (13)		n.d.
13	42,1	n.d. (12)		2,7
14	56,8			2,5
15	24,3			2,7
16	28,2	33,6 (17)		n.d.
17	55,8	n.d. (16)		2,5
18	11,8			2,5
19	19,4	35,2 (10)		2,7
20	36,1	n.d. (21)		2,0
21	18,9	n.d. (20)		n.d.
22	33,8			2,2
23	26,0	n.d. (24)		n.d.
24	45,7	43,6 (23)		1,7
25	29,2	n.d. (27)		1,6
26 (pro-S)	19,8			n.d.
27 (pro-R)	n.d.	n.d. (25)		n.d.
28	23,1			2,5
29	11,9			1,9

⁵⁰ Kopplungspartner in Klammern

Tabelle 75. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Stigmasterol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁵¹	Häufigkeit	
	Verschiebung		$^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	$^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
	δ [ppm]	J_{CC} [Hz]		
1	37,2		2,8	
2	31,6	36,3	n.d.	11,3
3	71,8	36,4	2,3	10,4
4	42,3		n.d.	
5	140,7	63,5	2,5	n.d.
6	121,7	78,5	2,5	11,6
7	31,9		n.d.	
8	31,9		n.d.	
9	50,0	34,9	2,5	n.d.
10	36,5	n.d.	2,9	n.d.
11	21,1	n.d.	2,8	n.d.
12	39,6	n.d.	n.d.	n.d.
13	42,1	34,2	2,7	10,8
14	56,8		2,5	
15	24,3		2,7	
16	28,9	n.d.	2,9	n.d.
17	55,8	34,4	2,5	10,6
18	12,0		2,7	
19	19,4	34,6	2,7	11,2
20	40,5	34,4	2,1	n.d.
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	138,3		2,7	
23	129,2	44,0	2,6	12,7
24	51,2	43,6	2,2	n.d.
25	31,8	34,8	n.d.	n.d.
26 (pro-S)	18,7		2,7	
27 (pro-R)	21,2	n.d.	2,5	n.d.
28	25,4		2,6	
29	12,3		3,2	

Im NMR Spektrum der Sterole sind ausschließlich $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Kopplungen sichtbar.

Die Konzentration der $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe aus den überlagerten Signalen des Ringsystems der beiden Sterole liegt im IPP bei 0,3 mol% und im DMAPP bei 0,2 mol% (Abbildung 102, oben). In den Seitenketten liegt die Konzentration der $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe im DMAPP von Stigmasterol bei 0,3 mol% (Tabelle 75 und Abbildung 102, **B**, unten). Die Konzentration der $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe von Sitosterol konnte, aus dem vorliegenden NMR Spektrum, nicht

bestimmt werden (Tabelle 74). Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe im Ringsystem der beiden Sterole liegt in Position C-4, der retrobiosynthetisch bestimmten IPP/DMAPP Moleküle, bei 2 % und in den restlichen Positionen bei 1 % (Abbildung 102, oben). Die im NMR Spektrum nicht überlagerte Position C-29 hat im Sitosterol eine Anreicherung von 0,8 % und im Stigmasterol von 2,1 %. Die höhere Anreicherung in den [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologen der Position C-29 im Stigmasterol spiegelt sich auch in den nicht überlagerten Signalen der Seitenkette in Position C-22 wieder. Die Anreicherung des [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologs in Position C-22 liegt im Sitosterol bei 1,1 % und im Stigmasterol bei 1,6 % (Abbildung 101). Die Position C-22 in den Sterolen entspricht der Position C-4 in den retrobiosynthetisch bestimmten IPP/DMAPP Molekülen. Die Anreicherung der Position C-4 in den IPP/DMAPP Molekülen, aus dem Ringsystem der Sterole, liegt bei 1,7 %. Es kann davon ausgegangen werden, dass Sitosterol eine Anreicherung von 1 % und Stigmasterol von 2 % hat. Die überlagerten Signale liefern ein Gemisch der beiden Anreicherungen, in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses der beiden Sterole.

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese bauen sich Sterole aus vier IPP und zwei DMAPP Molekülen zusammen (Abbildung 51). Wie bereits ausgeführt, können nur die Daten der Seitenkette für eine getrennte Bestimmung der Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle von Sitosterol bzw. Stigmasterol herangezogen werden (Abbildung 102). Die sich überlagernden Signale der beiden Sterole stellen ein Gemisch der Daten, in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses von Sitosterol und Stigmasterol, dar. Die Daten aus den Seitenketten sind lückenhaft. Für die Bestimmung des Terpenbiosynthesewegs ist es notwendig die überlagerten Signale des Ringsystems beider Sterole zu nutzen.

Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Sitosterol und Stigmasterol sind in Tabelle 76 und Abbildung 100 (A) zusammengefasst.

!

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus der Summe der beiden Sterole weist ausschließlich [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,5\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopologe, sowie [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in höheren Konzentrationen auf (Abbildung 100, A). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Mevalonatweg. Die Konzentration der [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,5\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopologe liegt im IPP bei 0,3 mol% und im DMAPP bei 0,2 mol%.

⁵¹ Kopplungspartner in Klammern

Damit ist nur ein Drittel der Isotopologenkonzentration in den Sterolen enthalten, im Vergleich zu den hypothetisch bestimmten Daten über den Mevalonatweg (Tabelle 76 und Abbildung 100, **B**). Die Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe in Position C-4 der IPP/DMAPP Moleküle liegt bei 1,7 % bzw. 1,3 % in den restlichen Positionen der Sterole. Sie ist höher als die 1,1 % in Position C-4 der hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Moleküle aus dem Mevalonatweg. Die Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen liegt zwischen 1,1 % und 1,6 %.

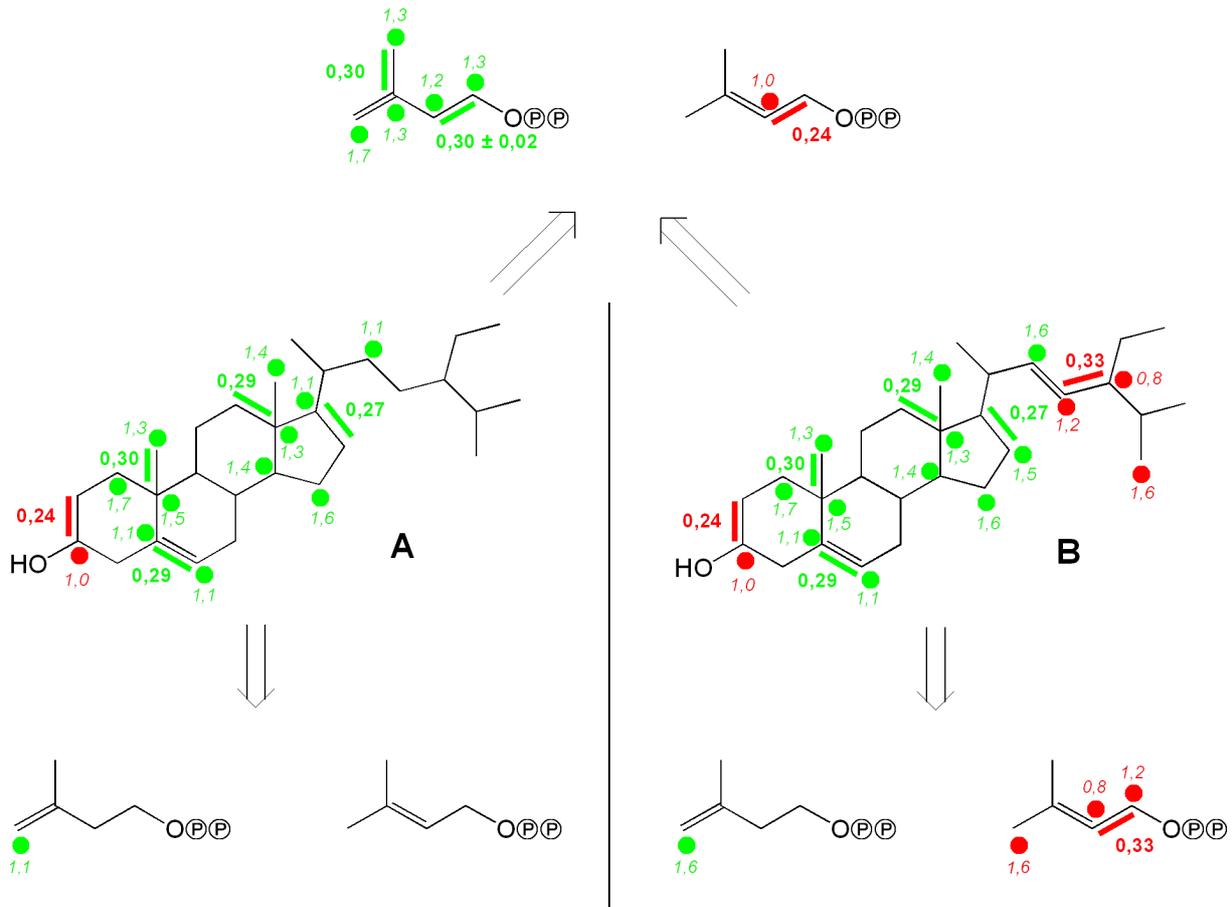


Abbildung 102. Das Markierungsmuster der IPP (grün) und DMAPP (rot) Moleküle von Sitosterol (**A**) und Stigmasterol (**B**) aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[U-^{13}\text{C}_6]$ D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, getrennt nach überlagerten Signalen aus dem Ringsystem (oben) und Signalen aus der Seitenkette (unten).

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* NDH 53-25

Tabelle 76. Aus Sitosterol und Stigmasterol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit		Kopplung			
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{52}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs		
Sitosterol (Seitenkette)	IPP	1	(2)	n.d.		n.d.		
		2	(1)	n.d.		n.d.		
		3	(5)	2,0	{1}	n.d.		
		4		2,2	{1}			
		5	(3)	n.d.		n.d.		
	DMAPP	1	(2)	n.d.		n.d.		
		2	(1)	1,7	{1}	n.d.		
		3	(5)	1,6	{1}	n.d.		
		4		n.d.				
		5	(3)	n.d.		n.d.		
Stigmasterol	IPP	1	(2)	2,5	{1}	n.d.		
		2	(1)	n.d.		n.d.		
		3	(5)	2,1	{1}	n.d.		
		4		2,7	{1}			
		5	(3)	n.d.		n.d.		
	DMAPP	1	(2)	2,6	{1}	12,7		{1}
		2	(1)	2,2	{1}	n.d.		
		3	(5)	n.d.		n.d.		
		4		2,7	{1}			
		5	(3)	2,5	{1}	n.d.		
Ringsystem	IPP	1	(2)	2,7	0,2 {2}	11,6		{1}
		2	(1)	2,6	0,1 {4}	10,7	0,1	{2}
		3	(5)	2,7	0,2 {2}	n.d.		
		4		2,8	0,1 {2}			
		5	(3)	2,7	{1}	11,2		{1}
	DMAPP	1	(2)	n.d.	{1}	11,3		{1}
		2	(1)	2,3	{1}	10,4		{1}
		3	(5)	n.d.		n.d.		
		4		n.d.				
		5	(3)	n.d.		n.d.		

⁵² Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Die höhere Konzentration der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in den Sterolen wird durch den Einbau von [$^{13}\text{C}_1$]Markierungen verursacht. Je stärker die Verstoffwechslung der [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose voranschreitet, desto mehr [$^{13}\text{C}_1$]Bruchstücke entstehen. Wenn es bei den Biosynthesen der Aminosäuren und der Sterole einen zeitlichen Unterschied gibt, erklärt sich die erhöhte Konzentration an [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologen durch die spätere Bildung der Sterole. Eine weitere Quelle für [$^{13}\text{C}_1$]Markierungen ist das $^{13}\text{CO}_2$. Bei den Biosynthesen, zum Beispiel zu Beginn des Pentosephosphatwegs, wird $^{13}\text{CO}_2$ abgespalten. Das $^{13}\text{CO}_2$ diffundiert durch die Zellwände und kann anschließend über die Photosynthese refixiert werden.

3.4.4.5.3 Phytol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 77 und Abbildung 103 zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Phytol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Kopplungen $> 0,1\%$ zu beobachten. Es wurden keine mehrfach ^{13}C -markierten Vorstufen in Phytol eingebaut. Auf der anderen Seite belegt die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe mit $1,0\%$ den Einbau von [$^{13}\text{C}_1$]Fragmenten. Die verschiedenen Positionen im Phytol weisen nur geringfügige Unterschiede bei der Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe auf.

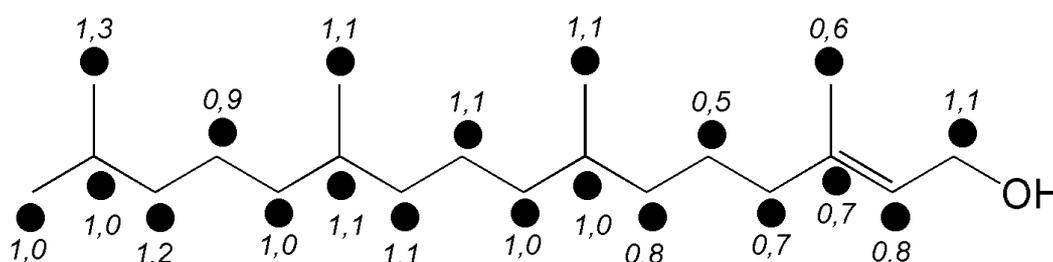


Abbildung 103. Kopplungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die kursiven Zahlen geben die absolute ^{13}C -Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Tabelle 77. Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Phytol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	59,4	2,2
2	123,0	1,9
3	140,4	1,8
4	39,9	1,8
5	25,1	1,6
6	36,6	1,9
7	32,7	2,0
8	37,3	2,0
9	24,5	2,2
10	37,4	2,2
11	32,8	2,2
12	37,3	2,1
13	24,8	2,0
14	39,3	2,3
15	28,0	2,1
16	22,6	2,1
17	22,7	2,4
18	19,7	2,2
19	19,7	2,2
20	16,2	1,7

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich Phytol aus drei IPP und einem DMAPP Molekül zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Phytol sind in Tabelle 78 und Abbildung 100 (**D**) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus Phytol weist keine Kopplungsblöcke auf, jedoch $[\text{}^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe mit einer Anreicherung von 1,0 % in allen Positionen (Tabelle 78 und Abbildung 100, **D**). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Synthese über den Mevalonatweg kann ausgeschlossen werden, da im Spektrum keine $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe sichtbar sind.

Die gleichmäßige Anreicherung der $[\text{}^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe von 1,0 % in allen Positionen der IPP/DMAPP Moleküle, sowie die Höhe der Anreicherung ist mit den rekonstruierten Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs vergleichbar (Tabelle 73 und Abbildung 100, **C**).

Tabelle 78. Aus Phytol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Abgeleitet aus	Position	Häufigkeit		
		% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{53}	
Phytol	IPP	1	2,0	0,3 {3}
		2	2,0	0,1 {3}
		3	2,0	0,2 {3}
		4	2,0	0,1 {3}
		5	2,0	0,2 {3}
	DMAPP	1	2,0	{1}
		2	2,3	{1}
		3	2,1	{1}
		4	2,1	{1}
		5	2,4	{1}

3.4.4.5.4 Geranylgeraniol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 79 und Abbildung 104 zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Geranylgeraniol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Kopplungen $> 0,1\%$ zu beobachten. Es wurden keine mehrfach ^{13}C -markierten Vorstufen in Phytol eingebaut. Auf der anderen Seite belegt die Anreicherung der $[\text{C}_1]$ Isotopologe mit 0,6 bis 1,0 % den Einbau von $[\text{C}_1]$ Fragmenten.

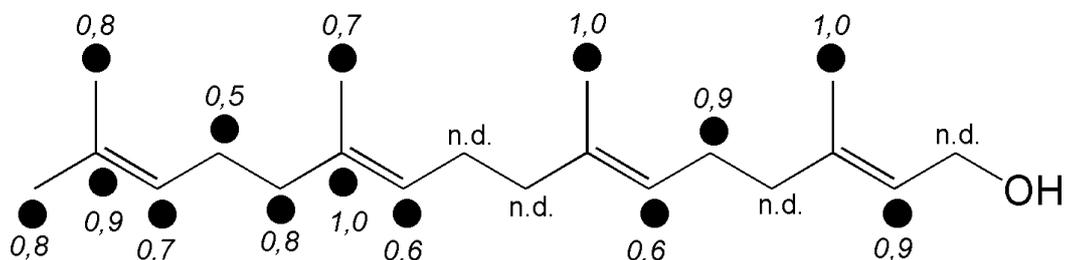


Abbildung 104. Kopplungsmuster von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der $[\text{C}_1]$ Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

⁵³ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Tabelle 79. Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	59,4	n.d.
2	124,3	2,0
3	139,9	1,3
4	39,7	n.d.
5	26,7	2,0
6	124,1	1,7
7	135,4	1,3
8	39,7	n.d.
9	26,6	n.d.
10	123,4	1,7
11	135,0	2,1
12	39,5	1,9
13	26,3	1,6
14	123,2	1,8
15	131,3	2,0
16	17,7	1,9
17	17,7	1,9
18	16,3	1,8
19	16,0	2,1
20	16,0	2,1

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich Geranylgeraniol aus einem DMAPP und drei IPP Molekülen zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Geranylgeraniol sind in Tabelle 80 und Abbildung 100 (E) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus Geranylgeraniol weist keine Kopplungsblöcke auf, jedoch $^{13}\text{C}_1$ Isotopologe in allen Positionen (Tabelle 80 und Abbildung 100, E). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Synthese über den Mevalonatweg kann ausgeschlossen werden, da im Spektrum keine $^{13}\text{C}_2$ Isotopologe sichtbar sind (Abbildung 100, B).

Die Anreicherung der $^{13}\text{C}_1$ Isotopologe in den IPP/DMAPP Molekülen ist nicht gleichmäßig verteilt. Vorallem die Positionen C-1 und C-2 im DMAPP, sowie die Positionen C-2 und C-3 im IPP fallen niedriger aus. Mit den vorliegenden Daten kann der Grund für diese

Abweichungen nicht bestimmt werden. Wenn, eine mit dem Wildtyp vergleichbare Fixierung von $^{13}\text{CO}_2$ in der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* angenommen wird, dann müssten die Positionen C-1, C-2 und C-4 höhere bzw. abweichende Konzentrationen aufweisen. Dies widerspricht den experimentellen Daten des vorliegenden Einbauversuchs.

Tabelle 80. Aus Geranylgeraniol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Abgeleitet aus		Position	Häufigkeit		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{54}	
Geranylgeraniol	IPP	1	2,0		{1}
		2	1,8	0,1	{3}
		3	1,7	0,4	{3}
		4	1,9		{1}
		5	2,0	0,1	{3}
	DMAPP	1	1,6		{1}
		2	1,8		{1}
		3	2,0		{1}
		4	1,9		{1}
		5	1,9		{1}

3.4.4.5.5 *Cis*-Abienol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von *cis*-Abienol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 81 und Abbildung 105 zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von *cis*-Abienol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Kopplungen $> 0,1\%$ zu beobachten. Es wurden keine mehrfach ^{13}C -markierten Vorstufen in *cis*-Abienol eingebaut. Auf der anderen Seite belegt die Anreicherung der $[\text{C}_1]$ Isotopologe mit 0,6 bis 1,4% den Einbau von $[\text{C}_1]$ Fragmenten.

⁵⁴ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Tabelle 81. Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von cis-Abienol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	40,0	2,4
2	18,6	2,0
3	41,8	1,8
4	33,3	1,5
5	55,9	1,3
6	20,2	n.d.
7	43,9	2,5
8	74,3	n.d.
9	62,1	1,9
10	38,8	n.d.
11	23,1	2,3
12	133,8	1,8
13	130,9	n.d.
14	133,5	1,9
15	113,8	2,2
16	19,9	2,0
17	24,4	1,7
18	33,5	1,9
19	21,5	2,3
20	15,4	1,7

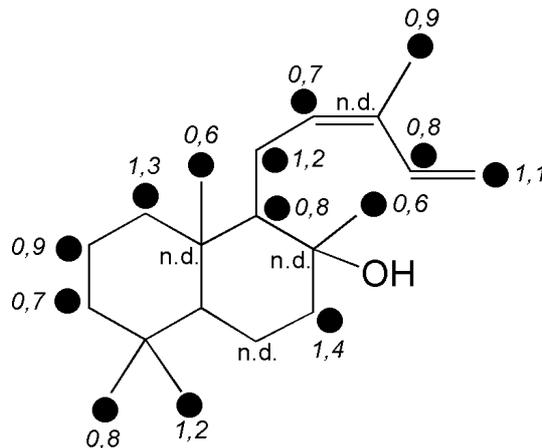


Abbildung 105. Kopplungsmuster von cis-Abienol aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der $[\text{C}_1]$ Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich *cis*-Abienol aus einem DMAPP und drei IPP Molekülen zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von *cis*-Abienol sind in Tabelle 73 und Abbildung 100 (F) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus *cis*-Abienol weist keine Kopplungsblöcke auf, jedoch [¹³C₁]Isotopologe in allen Positionen (Tabelle 73 und Abbildung 100, F). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Synthese über den Mevalonatweg kann ausgeschlossen werden, da im Spektrum keine [¹³C₂]Isotopologe sichtbar sind.

Die Anreicherung der Positionen in den IPP/DMAPP Molekülen ist nicht gleichmäßig verteilt, vor allem Position C-5 fällt niedriger aus als die restlichen Positionen. Mit den vorliegenden Daten kann der Grund für diese Abweichungen nicht bestimmt werden. Keines der vorliegenden Modelle für die Markierung von *cis*-Abienol, die aus dem Einbauversuch im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* gewonnen wurden, ist auf die vorliegende Markierung anwendbar.

Tabelle 82. Aus *cis*-Abienol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Abgeleitet aus		Position	Häufigkeit		
			% ¹³ C _{abs}	Δs ⁵⁵	
<i>cis</i>-Abienol	IPP	1	2,2	0,3	{2}
		2	2,0		{1}
		3	2,2	0,3	{3}
		4	1,7	0,2	{2}
		5	1,8	0,1	{2}
	DMAPP	1	n.d.		{1}
		2	1,9		{1}
		3	2,2		{1}
		4	2,0		{1}
		5	1,7		{1}

⁵⁵ Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

3.4.4.5.6 Nicotin

Das Markierungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 83 und Abbildung 106 zusammengefasst.

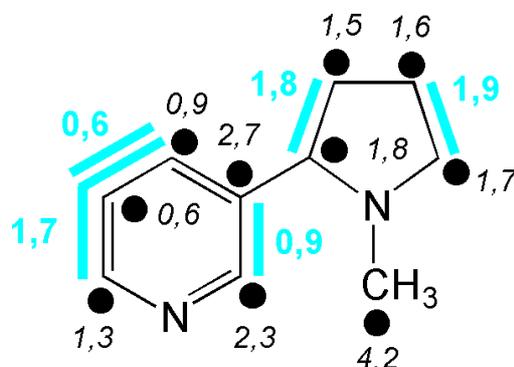


Abbildung 106. Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Tabelle 83. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁵⁶	Häufigkeit	
	Verschiebung		Kopplung	
	δ [ppm]	J _{CC} [Hz]	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
1	148,7	57,2 (2)	4,3	20,3
2	138,1	57,2 (1)	4,7	21,4
3	135,6	54,6 / 2,4 (5, 4/5)	4,3	55,3
4	124,0	54,3 (3)	4,0	14,6
		55,0 (3/5)		41,4
5	148,0	55,0 / 2,8 (3, 3/4)	4,1	43,5
6	68,9	34,7 (7)	4,7	40,3
7	22,1	34,3 (6)	4,4	40,4
8	34,4	35,3 (9)	4,5	41,2
9	56,8	34,2 (8)	4,6	40,1
10	40,1		4,2	

⁵⁶ Kopplungspartner in Klammern

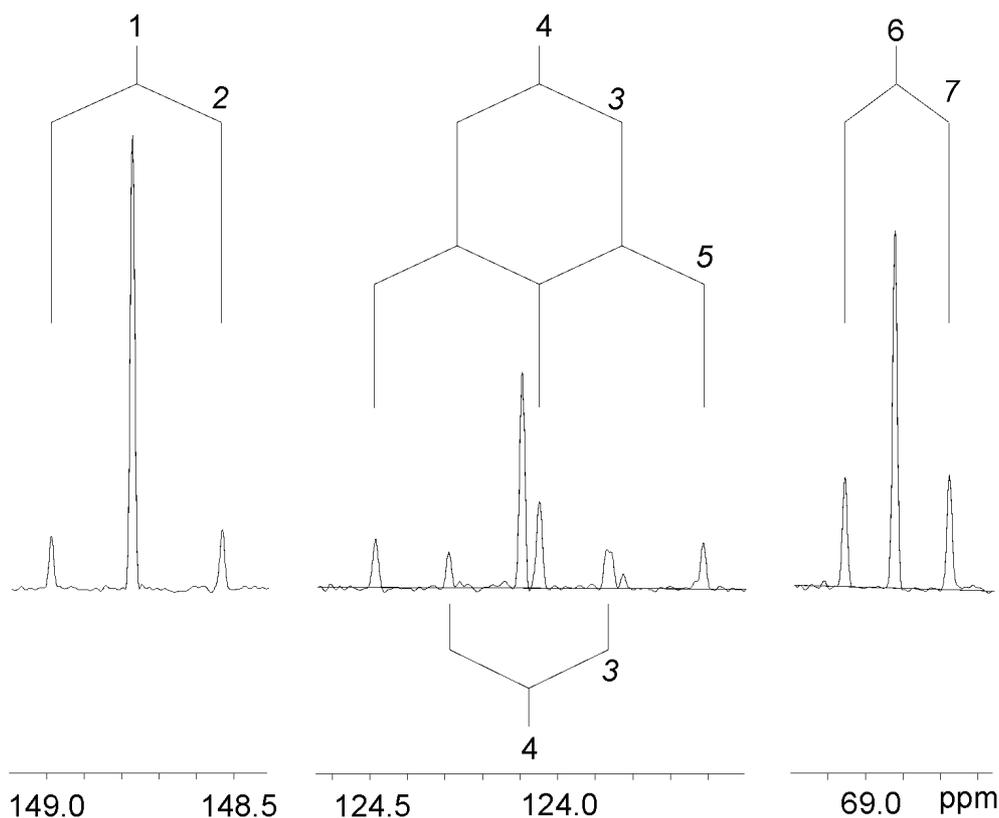


Abbildung 107. Eindimensionales NMR Spektrum der Positionen C-1, C-4 und C-6 von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose.

Pyrrolidin-Einheit

Im NMR Spektrum von Nicotin sind [6,7-¹³C₂] und [8,9-¹³C₂]Isotopologe in der Pyrrolidin-Einheit sichtbar (Abbildung 107, **B**). Es sind im Spektrum bei den Signalen der Positionen C-6 bis C-9 keine Fernkopplungen sichtbar.

Gemäß der Literatur erfolgt die Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bzw. aus Arginin (Abbildung 53; Tiburcio und Galston, 1986; Wagner, 1987). Die Intensität der Kopplungsblöcke im Nicotin sollte sich, durch das symmetrische Putrescin, aus der Summe der [2,3-¹³C₂] und [4,5-¹³C₂]Isotopologe des Glutamats bzw. des Arginins zusammensetzen. Die Ergebnisse des Einbauversuchs im Wildtyp bestätigten die Vorgaben der Literatur für *Nicotiana tabacum*.

Bei einer Retrobiosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bilden sich [6,7-¹³C₂] und [8,9-¹³C₂]Isotopologe mit einer Konzentration von 0,4 mol% (Abbildung 108, **B**). Bei den experimentellen Daten im Nicotin liegt die Konzentration der [¹³C₂]Isotopologe bei 1,8 mol% (Abbildung 108, **A**). Damit ist die Konzentration der gefundenen [¹³C₂]Isotopologe im Nicotin um das fünffache höher, als die aus der Aminosäure Glutamat rekonstruierten. Im

Nicotin liegt, im Vergleich zu einer fünffach höheren Konzentrationen der [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe, nur die doppelte Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe mit 1,7 % vor. Die Anreicherungen aus dem Glutamat liegen bei 0,7 %.

Der hohe Anteil an [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologen in der Aminosäure bedeutet eine stärkere Verstoffwechslung der D-Glucose. Es muss davon ausgegangen werden, dass die [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose sehr früh und nur mit geringer Umsetzung im Stoffwechsel in das Nicotin eingebaut wird. Dies erklärt auch die fünffach höheren Konzentration an [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologen, neben den zweifach höheren Anreicherungen der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe im Nicotin.

Pyridin-Einheit

Im NMR Spektrum sind [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$], [$3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3$]Isotopologe in der Pyridin-Einheit des Nicotins sichtbar (Abbildung 107, **B**). In der Literatur werden drei verschiedene Biosynthesewege für den Vorläufer der Pyridin-Einheit, der Nicotinsäure, beschrieben (S. 155). Die Biosynthese der Nicotinsäure in höheren Pflanzen geht, gemäß der Literatur (Wagner, 1987; Luckner, 1990; Review: Forster und Moat, 1980), von Aspartat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus (Abbildung 55, oben). Die Ergebnisse des Einbauversuchs im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* bestätigten die Vorgaben der Literatur für die eingesetzte Pflanze.

In der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* ergibt sich bei der retrobiosynthetischen Bestimmung der Markierungsmuster der Pyridin-Einheit über Glycerinaldehyd-3-phosphat und Aspartat, mit den vorliegenden Aminosäuredaten, nur ein [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopolog mit 0,2 mol%. Das Glycerinaldehyd-3-phosphat, als Ausgangsverbindung der Positionen C-3, C-4 und C-5 in der Pyridin-Einheit des Nicotins, weist keine Kopplungsblöcke auf (Tabelle 25, Abbildung 46 und Abbildung 108, **C**).

Bei der Bestimmung der zentralen Stoffwechselmetabolite aus den Aminosäuren wurden unterschiedlich beeinflusste Pools festgestellt. Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin, Tabelle 25) und 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Tyrosin, Phenylalanin, Leucin Lysin und Alanin, Tabelle 25) sind über den Stoffwechsel miteinander verknüpft. Auch das 3-Phosphoenolpyruvat besitzt keine Kopplungsblöcke.

Die Biosynthese des Nicotins über Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. 3-Phosphoenolpyruvat ist im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* in den Einbauversuchen mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose und mit [$1\text{-}^{13}\text{C}_1$]D-Glucose bewiesen worden. Im Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose erschienen [$^{13}\text{C}_2$] und [$^{13}\text{C}_3$]Isotopologe im Nicotin, obwohl die retrobiosynthetisch bestimmten Ausgangsverbindungen, Glycerin-

aldehyd-3-phosphat und 3-Phosphoenolpyruvat, keine Kopplungsblöcke aufweisen. Unter diesen Bedingungen muss von getrennten Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. 3-Phosphoenolpyruvat Pools ausgegangen werden. Die Rekonstruktion der zentralen Stoffwechselmetabolite erfolgte über die Aminosäure. Die Pools von Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. 3-Phosphoenolpyruvat müssten dementsprechend entweder zeitlich oder räumlich voneinander getrennt in der Pflanze vorliegen.

3.4.4.5.7 Diskussion

Die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* hat einen Defekt im NDH-Komplex. Die Funktion des NDH-Komplexes im Plastidenmetabolismus ist weitgehend unbekannt. Die sekundären Auswirkungen der Mutation können festgestellt werden.

Die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* hat weniger Chlorophyll als der Wildtyp, besitzt jedoch beide Photosysteme. Der Abbau der Stärke ist gehemmt.

Der Einfluss der Mutation auf die Terpen- und Nicotinbiosynthese wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es konnten, wie im Wildtyp von *Nicotiana tabacum*, Sitosterol, Stigmasterol, Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol isoliert und NMR spektroskopisch vermessen werden. Im verseiften Lipid-Extrakt ist deutlich mehr Phytol als im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* enthalten (Abbildung 109). Die Konzentration an Geranylgeraniol ist geringer. Sterole und *cis*-Abienol liegen im Verhältnis zu den anderen Verbindungen in vergleichbaren Konzentrationsverhältnissen, wie im Wildtyp vor.

In den Sterolen der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* bilden sich [¹³C₂]Isotopologe. Die Biosynthese erfolgt über den Mevalonatweg. Wie im Wildtyp ist in den Sterolen nur die Hälfte der [¹³C₂]Isotopologkonzentration, im Vergleich zu den hypothetischen IPP/DMAPP Molekülen aus dem Mevalonatweg, enthalten.

Im Phytol der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* konnten keine Kopplungen nachgewiesen werden. Dasselbe trifft auch auf Geranylgeraniol und *cis*-Abienol zu. Alle Positionen der Terpene weisen eine gleichmäßige Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe von 1 % auf. Die retrobiosynthetische Bildung der IPP/DMAPP Moleküle über den Deoxyxylulosephosphatweg, aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten, bestätigt, dass keine Kopplungsblöcke eingebaut werden. Die aromatischen Aminosäuren, aus denen die zentralen Stoffwechselmetabolite für die Rekonstruktion des Deoxyxylulosephosphatwegs retrobiosynthetisch bestimmt werden, weisen keine Kopplungsblöcke auf.

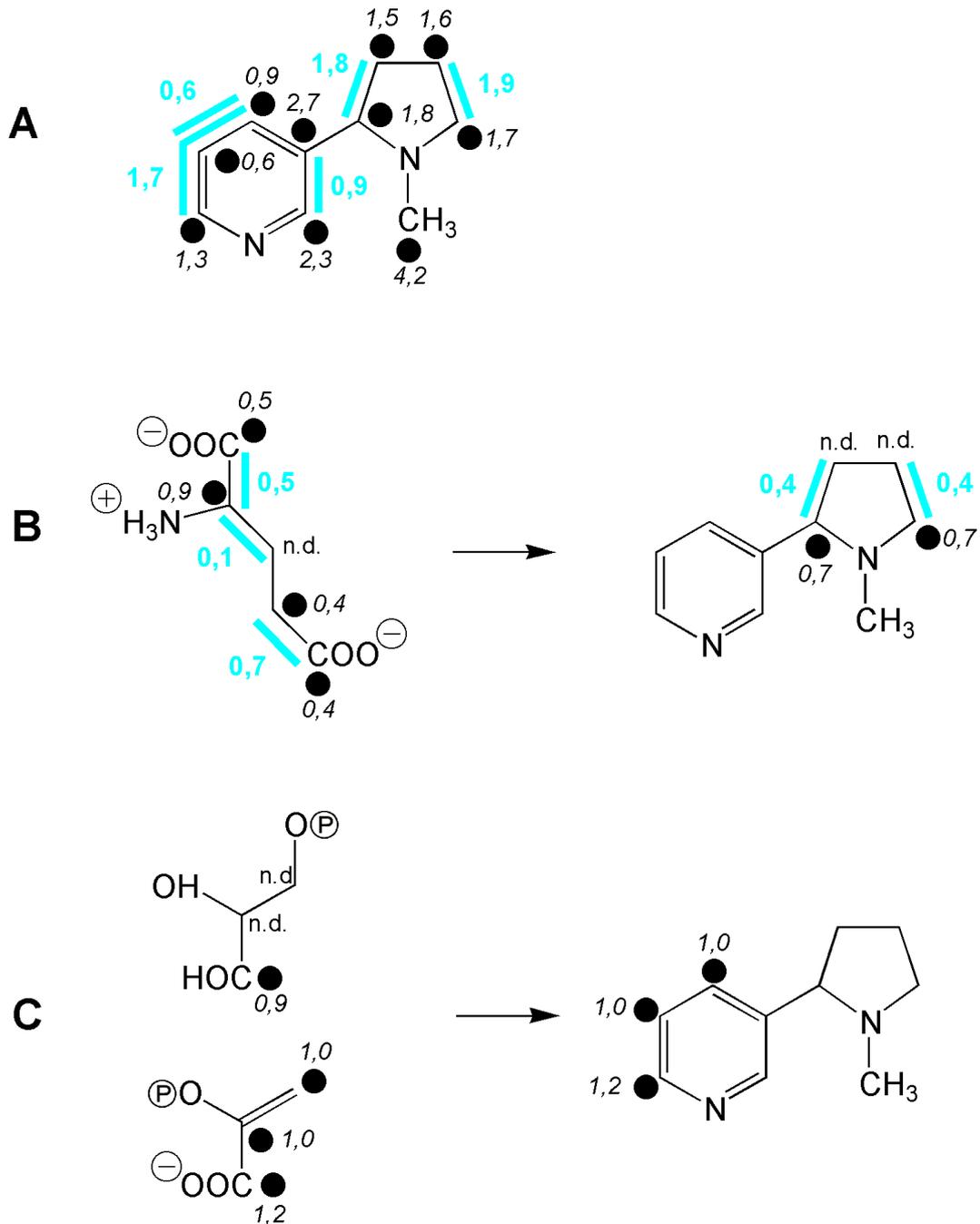


Abbildung 108. Vergleich der (A) experimentellen Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, mit den (B) und (C) hypothetischen Kopplungsmustern, rekonstruiert aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten (Tabelle 25 und Abbildung 46). Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit über (B) Glutamat. Biosynthese der Nicotinsäure aus Aspartat und (C) Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. 3-Phosphoenolpyruvat.

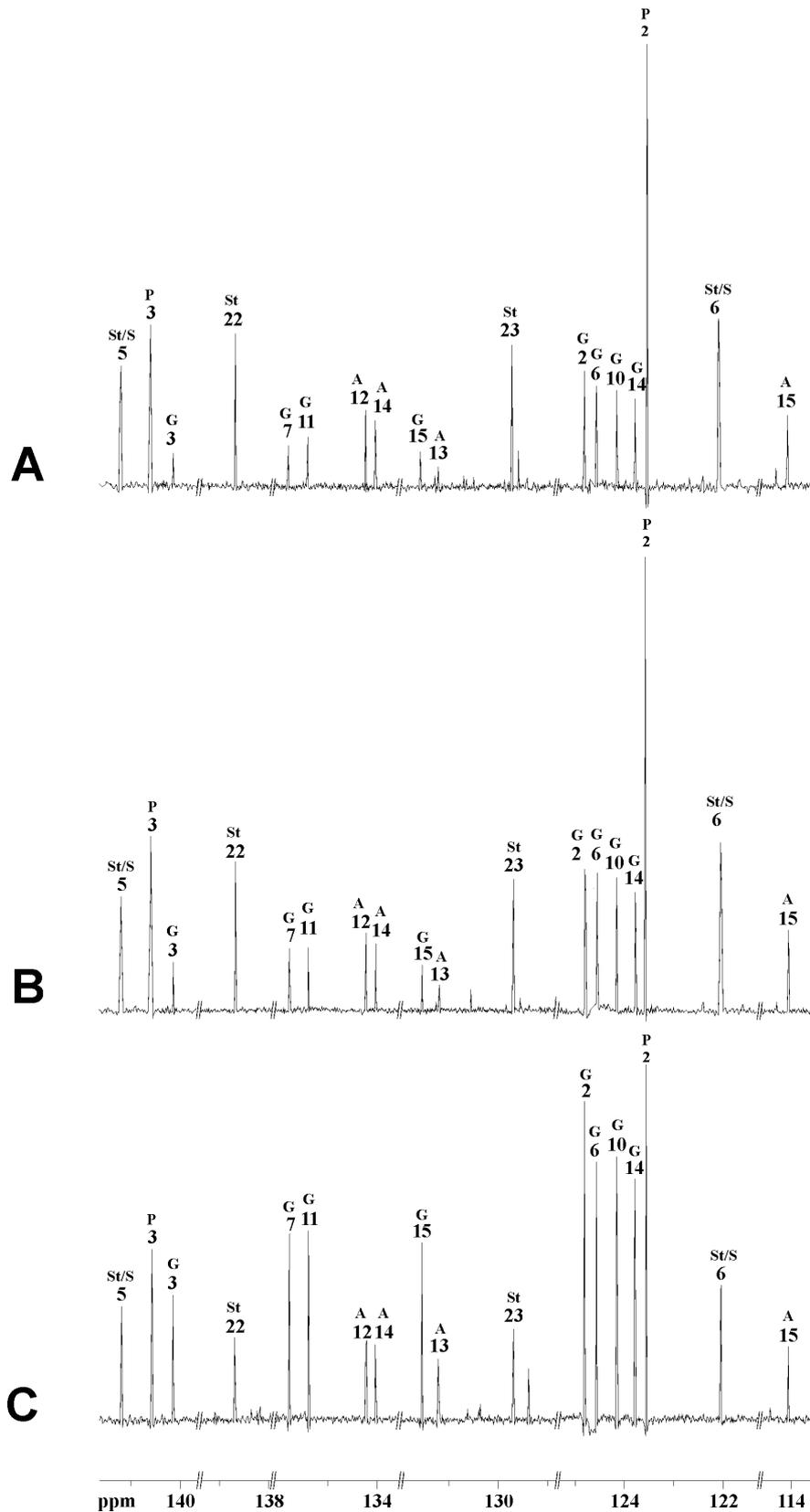


Abbildung 109. NMR Spektren der verseiften Lipid-Extrakte aus (A) dem unmarkierten Wildtyp, (B) der NDH 54-3IV Mutante und (C) der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* aus den Einbauversuchen mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose.

In der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* können keine näheren Erkenntnisse hinsichtlich unterschiedlicher Pools für Geranylgeraniol, Phytol und *cis*-Abienol gewonnen werden. Der Vergleich mit dem Wildtyp macht deutlich, dass es durch die Mutation zu Veränderungen bei den Biosynthesen kommt, die mit den aromatischen Aminosäuren und dem Deoxyxylulosephosphatweg verknüpft sind. Beide Synthesen finden in den Chloroplasten bzw. Plastiden statt. Der fehlende Einbau von Kopplungsblöcken aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, der so im Wildtyp nicht zu beobachten ist, deutet auf eine Bildung der aromatischen Aminosäuren, Geranylgeraniol, Phytol und *cis*-Abienol über die CO₂ Fixierung. Es ist unklar, warum es nicht zu einer verstärkten Fixierung von ¹³CO₂ kommt, wie es im Wildtyp beobachtet wurde. Der Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* erfolgte mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Es ist im Einbauversuch der Mutante somit mehr markierte D-Glucose vorhanden, wie im Vergleich dazu im Einbauversuch des Wildtyps (1:49). Das würde bedeuten, dass die Biosynthesen, die an der Freisetzung von ¹³CO₂ beteiligt sind, nicht oder nur in geringem Maß durchgeführt werden. Der Beweis für diese Annahme könnte in einem Einbauversuch mit [1-¹³C₁]D-Glucose geführt werden.

Da keine Kopplungen in Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol festgestellt wurden, muss von einem geringen (> 5 %) bzw. nicht vorhandenen Crosstalk in der vorliegenden Mutante ausgegangen werden.

Im Verhältnis zu den hypothetisch bestimmten IPP/DMAPP Molekülen über den Mevalonatweg, haben die IPP/DMAPP Moleküle aus dem Sterol nur die Hälfte der [¹³C₁]Isotopologenkonzentration. Die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe an Position C-4 mit 2 % und den restlichen Positionen bei 1 % könnten ein Gemisch der beiden Terpenbiosynthesen widerspiegeln. Es kann sich jedoch auch um einen Verdünnungseffekt handeln.

Die NDH 53-25 Mutante zeigt im Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose ein, mit dem Wildtyp von *Nicotiana tabacum*, vergleichbares Markierungsmuster im Nicotin. Dem gegenüber stehen deutlich niedrigere Einbauraten in den Aminosäuren und aromatische Aminosäuren ohne Kopplungsblöcke.

Auffallend sind die hohen Einbauraten und Markierungsmuster im Nicotin der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum*, obwohl die aromatischen Aminosäuren keine Kopplungsblöcke aufweisen. Die Positionen C-3, C-4 und C-5 in der Pyridin-Einheit stammen aus Glycerinaldehyd-3-phosphat. Der Biosyntheseweg entspricht den Literaturdaten bzw. den

Ergebnissen aus den Einbauversuchen im Wildtyp von *Nicotiana tabacum*. Das Markierungsmuster von Glycerinaldehyd-3-phosphat wird aus den Markierungsmustern der aromatischen Aminosäuren rekonstruiert. Eine mögliche Erklärung für ein markiertes Nicotin, im Gegensatz zu unmarkierten aromatischen Aminosäuren, liegt in der Kompartimentierung. Die Biosynthese von Nicotin findet in den Wurzeln statt, die der aromatischen Aminosäure in den Chloroplasten.

Weitere Einbauversuche mit $^{13}\text{CO}_2$ könnten beweisen, dass der Deoxyxylulosephosphatweg in der Mutante durchgeführt wird und eng mit der Photosynthese verknüpft ist. Einbauversuche mit $[1-^{13}\text{C}_1]\text{D-Glucose}$ könnten Einblick in die Hypothese geben, dass wenig $^{13}\text{CO}_2$ während der Biosynthesen frei wird.

3.4.4.6 Einbauexperiment mit [U-¹³C₆]D-Glucose in *Nicotiana tabacum* NDH 54-3IV

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Markierungsmuster der Terpene und des Alkaloids Nicotin in der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum*, aus dem Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, untersucht.

Aus dem methanolischen Extrakt der frischen Pflanzenproben (ohne Wurzel, 55 g) wurde Nicotin isoliert und NMR spektroskopisch vermessen. Aus dem, mit methanolischer KOH verseiften, Lipid-Extrakt wurden die Terpene Sitosterol, Stigmasterol, Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol isoliert, gereinigt und NMR spektroskopisch vermessen.

3.4.4.6.1 Retrobiosynthese der Terpene

Die NMR spektroskopischen Daten der Aminosäuren (S.143), aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, wurden die Markierungsmuster der zentralen Stoffwechselmetabolite bestimmt (Acetyl-CoA, α -Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Phosphoenolpyruvat, u.a.; Tabelle 26 und Abbildung 48). Unter Verwendung der Zentralmetabolite ist es möglich die hypothetischen Markierungsmuster von IPP und DMAPP, den Zwischenprodukten der Terpenbiosynthese, über die beiden bekannten Biosynthesewege zu rekonstruieren (Abbildung 3 und Abbildung 4).

Da im vorliegenden Organismus verschiedene Markierungshöhen in den von Cytosol und Plastiden beeinflussten Pools der zentralen Stoffwechselverbindungen existieren, wird bei der Retrobiosynthese von IPP und DMAPP der jeweilig typische Ort der Terpenbiosynthesen beachtet, d.h. Mevalonatweg im Cytosol und Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden. Die Retrobiosynthese erfolgt beim Mevalonatweg mit den Daten von Acetyl-CoA (Pool II, rekonstruiert aus Glutamat) und beim Deoxyxylulosephosphatweg mit den Daten von 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus den aromatischen Aminosäuren, sowie Alanin, Valin, Leucin und Lysin, Tabelle 26). Die hypothetischen Daten von IPP und DMAPP aus den beiden Biosynthesen, Mevalonatweg (**B**) und Deoxyxylulosephosphatweg (**C**) sind in Tabelle 84 und Abbildung 110 zusammengefasst.

Der Mevalonatweg bildet aus drei Acetyl-CoA Molekülen (Pool II, rekonstruiert aus Glutamat, Tabelle 26) die Vorstufen IPP und DMAPP (Abbildung 110, **B**). Bei der hypothetischen Rekonstruktion von IPP und DMAPP mit dem retrobiosynthetisch abgeleiteten Acetyl-CoA entstehen [1,2-¹³C₂] und [3,5-¹³C₂]Isotopologe mit einer

Konzentration von 0,7 mol%, sowie ein [$^{13}\text{C}_1$]Isotopolog an der Position C-4 mit einer Anreicherung von 1,0 %.

Beim Deoxyxylulosephosphatweg reagiert der „aktivierte Acetaldehyd“ Hydroxyethylthiamin-diphosphat mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu IPP und DMAPP (Abbildung 110, C). Die Markierungsmuster von Hydroxyethylthiamin-diphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat wurden aus den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren, sowie aus Alanin, Valin, Leucin und Lysin rekonstruiert (Tabelle 26). Die Ausgangsverbindungen der Biosynthese weisen keine Kopplungen auf. Die über den Deoxyxylulosephosphatweg gebildeten IPP/DMAPP Moleküle weisen eine gleichmäßige Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in allen Positionen von 0,8 % auf.

Tabelle 84. Hypothetische Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP, rekonstruiert über den Mevalonat- und Deoxyxylulosephosphatweg, mit den Daten der zentralen Stoffwechselmetabolite (Tabelle 26) aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

Vorhersagen		Position	koppelt mit	Häufigkeit % $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Kopplung % $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$
Mevalonat	IPP/DMAPP	1	(2)	2,1	31,2
		2	(1)	2,1	31,2
		3	(5)	2,1	31,2
		4		2,1	
		5	(3)	2,1	31,2
1-DOXP	IPP/DMAPP	1		1,8	
		2		1,9	
		3		1,9	
		4		1,8	
		5		1,8	

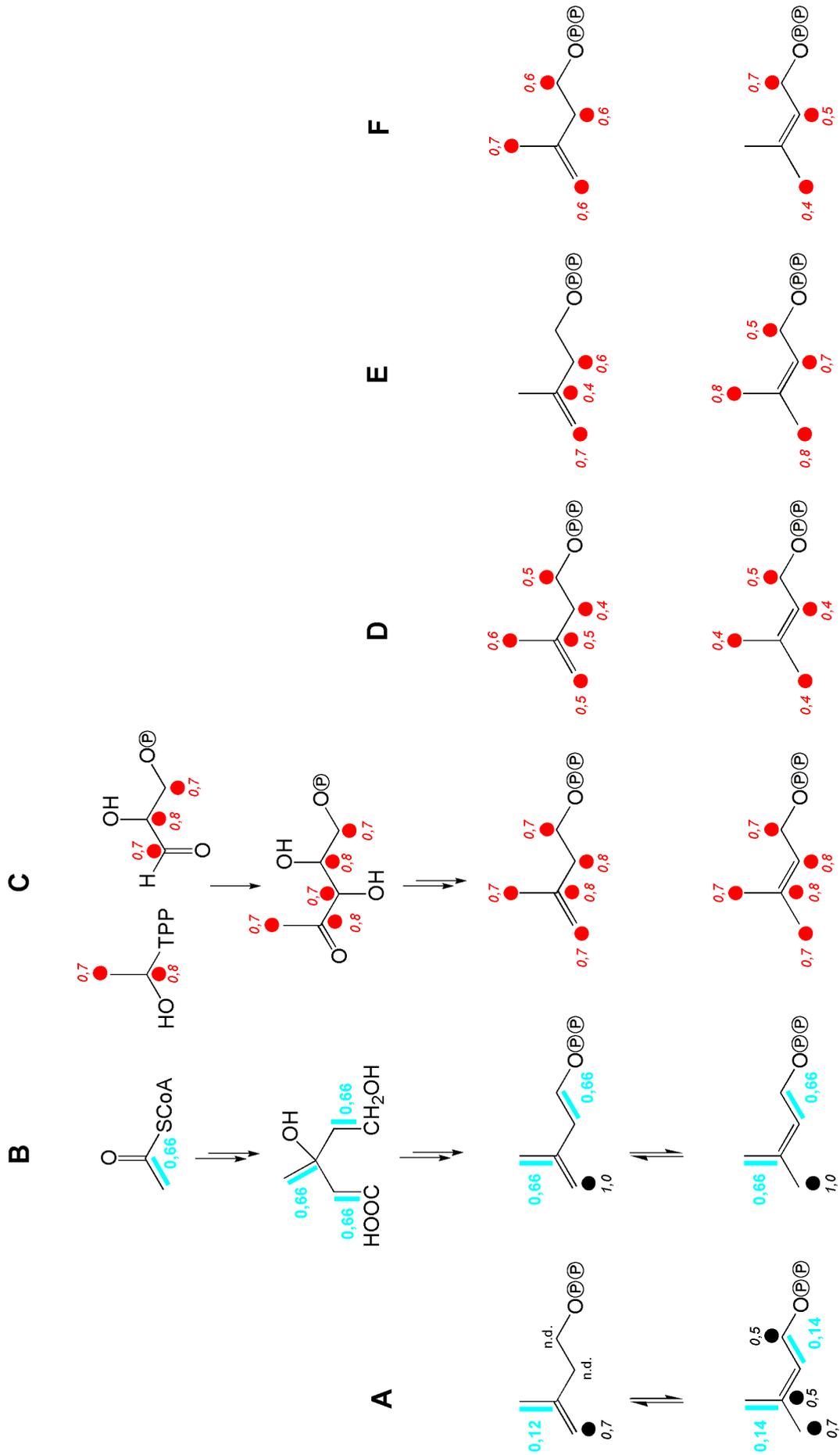


Abbildung 110. Vergleich der Kopplungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die hypothetisch bestimmten Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle über den Mevalonatweg (B) und den Deoxyxylulosephosphatweg (C). Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Stigmasterol (A), Phytol (D), Geranylgeraniol (E) und *cis*-Abienol (F).

3.4.4.6.2 Sitosterol und Stigmasterol

Messergebnisse

Die isolierte Sterol-Fraktion aus der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* enthält, vergleichbar mit dem Wildtyp, ein Gemisch aus Sitosterol und Stigmasterol. Im NMR Spektrum überlagern sich die Signale der Ringsysteme. Über die charakteristischen Verschiebungen der Seitenkettenatome (C-22 und C-23) konnten Sitosterol und Stigmasterol nebeneinander identifiziert werden.

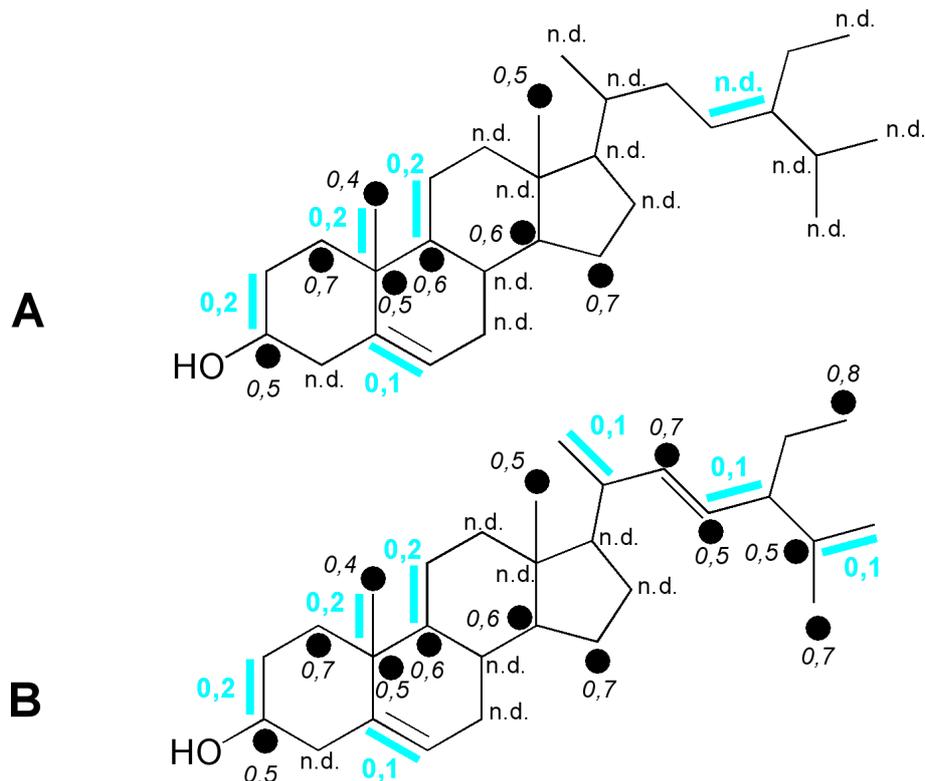


Abbildung 111. Kopplungsmuster von Sitosterol (A) und Stigmasterol (B) aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* NDH 54-3IV

Das Markierungsmuster von Sitosterol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 85 und Abbildung 111 (A) zusammengefasst. Das Markierungsmuster von Stigmasterol ist in Tabelle 86 und Abbildung 111 (B) zusammengefasst.

Tabelle 85. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Sitosterol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁵⁷	Häufigkeit	Kopplung
	Verschiebung δ [ppm]			
1	37,2		1,8	
2	31,6	36,6 (3)	n.d.	n.d.
3	71,8	36,5 (2)	1,8	9,7
4	42,3		n.d.	
5	140,7	71,5 (6)	1,6	9,7
6	121,7	71,8 (5)	1,5	7,7
7	31,9		n.d.	
8	31,9		n.d.	
9	50,0	35,2 (11)	1,9	9,3
10	36,5	35,1 (19)	1,8	n.d.
11	21,1	n.d. (9)	n.d.	n.d.
12	39,6	35,5 (13)	n.d.	n.d.
13	42,1	n.d. (12)	n.d.	n.d.
14	56,8		1,7	
15	24,3		1,8	
16	28,2	33,6 (17)	1,5	n.d.
17	55,8	n.d. (16)	n.d.	n.d.
18	11,8		1,6	
19	19,4	35,2 (10)	1,7	9,1
20	36,1	n.d. (21)	n.d.	n.d.
21	18,9	n.d. (20)	n.d.	n.d.
22	33,8		1,3	
23	26,0	n.d. (24)	n.d.	n.d.
24	45,7	43,6 (23)	n.d.	8,2
25	29,2	n.d. (27)	n.d.	n.d.
26 (pro-S)	19,8		n.d.	
27 (pro-R)	n.d.	n.d. (25)	n.d.	n.d.
28	23,1		1,2	
29	11,9		n.d.	

⁵⁷ Kopplungspartner in Klammern

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* NDH 54-3IV

Tabelle 86. Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Stigmasterol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁵⁸	Häufigkeit Kopplung	
	Verschiebung δ [ppm]		J_{CC} [Hz]	% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	37,2		1,8	
2	31,6	36,3	n.d.	n.d.
3	71,8	36,4	1,8	9,7
4	42,3		n.d.	
5	140,7	63,5	1,6	9,7
6	121,7	78,5	1,5	7,7
7	31,9		n.d.	
8	31,9		n.d.	
9	50,0	34,9	1,9	9,3
10	36,5	n.d.	1,8	n.d.
11	21,1	n.d.	n.d.	n.d.
12	39,6	n.d.	n.d.	n.d.
13	42,1	34,2	n.d.	n.d.
14	56,8		1,7	
15	24,3		1,8	
16	28,9	n.d.	1,8	n.d.
17	55,8	34,4	n.d.	n.d.
18	12,0		1,7	
19	19,4	34,6	1,7	9,1
20	40,5	34,4	1,5	8,1
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	138,3		1,8	
23	129,2	44,0	1,8	7,9
24	51,2	43,6	n.d.	7,0
25	31,8	34,8	1,8	7,8
26 (pro-S)	18,7		1,4	
27 (pro-R)	21,2	n.d.	n.d.	n.d.
28	25,4		1,4	
29	12,3		1,9	

Im NMR Spektrum der Sterole sind ausschließlich $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe sichtbar.

Die Konzentration der $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe aus den überlagerten Signalen des Ringsystems der beiden Sterole liegt im IPP bei 0,15 mol% und im DMAPP bei 0,17 mol% (Abbildung 112, oben). In den Seitenketten von Stigmasterol liegt die Konzentration der $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe im IPP bei 0,12 mol% und im DMAPP bei 0,14 mol% (Tabelle 86 und Abbildung 112, **B**, unten). Die Konzentration der $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe von Sitosterol konnte aus dem vorliegenden NMR

⁵⁸ Kopplungspartner in Klammern

Spektrum nicht bestimmt werden (Tabelle 85). Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe im Ringsystem der beiden Sterole liegt in der Position C-4 bei 0,7 %, der retrobiosynthetisch bestimmten IPP/DMAPP Moleküle, und in den Positionen C-2, C-3 und C-5 bei 0,6 % (IPP, Abbildung 112, oben). Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in den nicht überlagerten Signalen des Stigmasterols liegt in den retrobiosynthetisch bestimmten IPP/DMAPP Molekülen der Position C-4 bei 0,7 % und in den Positionen C-1 und C-3 bei 0,6 % (Abbildung 112, **B**, unten).

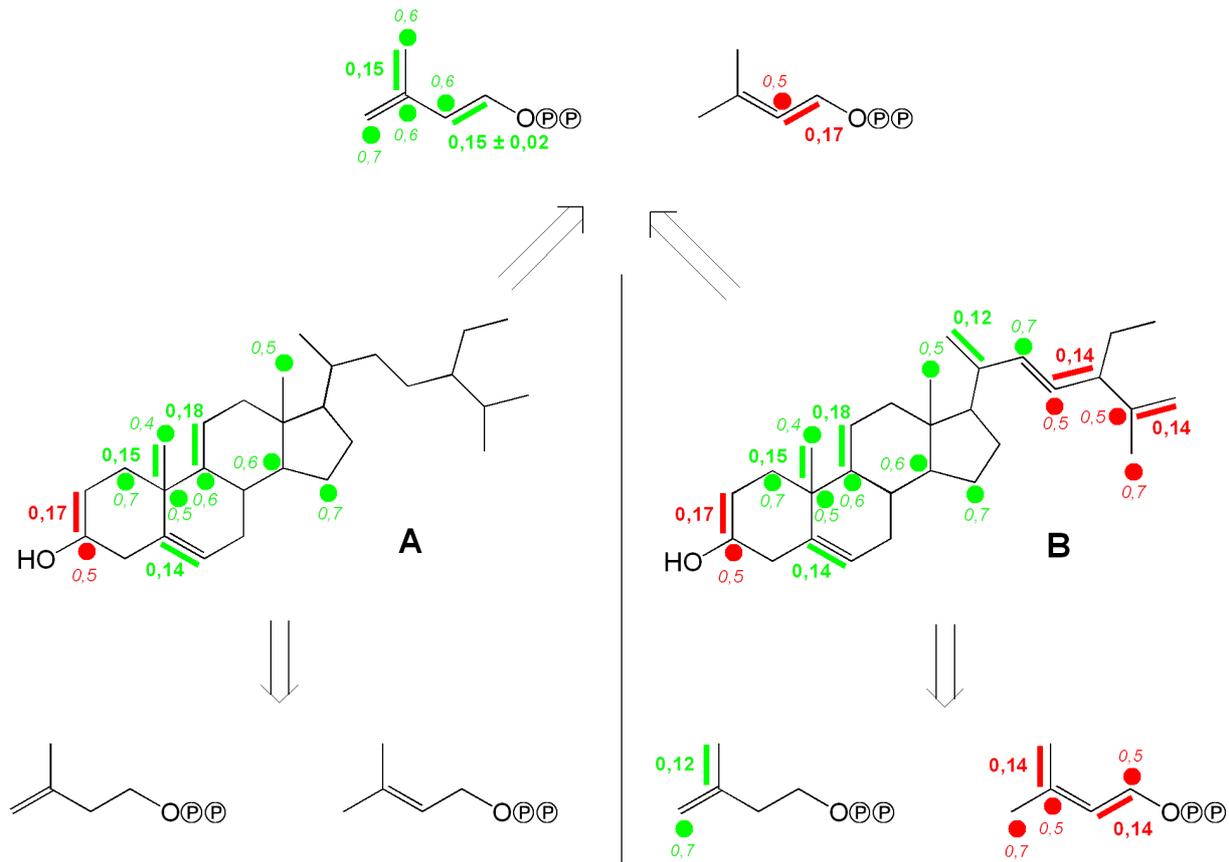


Abbildung 112. Das Markierungsmuster der IPP (grün) und DMAPP (rot) Moleküle von Sitosterol (**A**) und Stigmasterol (**B**) aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, getrennt nach überlagerten Signalen aus dem Ringsystem (oben) und Signalen aus der Seitenkette (unten).

Der Datensatz für die Anreicherungen und Konzentrationen in den Positionen der Seitenkette von Sitosterol fehlt vollständig. Die überlagerten Signale liefern ein Gemisch der Anreicherungen, in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses der beiden Sterole. Die beim Stigmasterol bestimmten Konzentrationen und Anreicherungen der C-Atome in der Seitenkette unterscheiden sich von den Daten aus den überlagerten Signalen. Die Konzentration der [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe ist niedriger. Das Sitosterol scheint eine höhere

Konzentration in den [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe aufzuweisen als Stigmasterol. Das Ergebnis entspricht damit nicht den Daten aus dem Einbauversuch im Wildtyp von *Nicotiana tabacum*. Im Wildtyp hat Stigmasterol höhere Anreicherungen und Konzentrationen als Sitosterol. Anscheinend handelt es sich hierbei um eine Besonderheit der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum*.

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese bauen sich Sterole aus vier IPP und zwei DMAPP Molekülen zusammen (Abbildung 51). Wie bereits ausgeführt, können nur die Daten der Seitenkette für eine getrennte Bestimmung der Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle von Sitosterol bzw. Stigmasterol herangezogen werden. Die sich überlagernden Signale der beiden Sterole stellen ein Gemisch der Daten, in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses von Sitosterol und Stigmasterol, dar. Es sind keine Daten aus der Seitenkette des Sitosterols vorhanden und die Daten von Stigmasterol sind lückenhaft (Abbildung 112). Für die Bestimmung des Terpenbiosynthesewegs empfiehlt es sich nur die Daten von Stigmasterol zu nutzen.

Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Stigmasterol sind in Tabelle 87 und Abbildung 110 (A) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus Stigmasterol weist ausschließlich [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,5\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopologe, sowie [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in höheren Konzentrationen auf (Abbildung 110, A). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Mevalonatweg. Die Konzentration der [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] und [$3,5\text{-}^{13}\text{C}_2$]Isotopologe liegt bei 0,12 mol% im IPP und bei 0,14 mol% im DMAPP.

Damit ist im Stigmasterol nur ein Fünftel der Isotopologenkonzentration enthalten, im Vergleich zu den hypothetisch bestimmten Daten über den Mevalonatweg (Tabelle 84 und Abbildung 110, B). Im Gegensatz dazu ist die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in Position C-4 der IPP/DMAPP Moleküle aus Stigmasterol mit 0,7 % nur halb so hoch wie die Isotopologenkonzentration aus den hypothetisch bestimmten Daten des Mevalonatwegs.

Sekundärstoffwechsel – *Nicotiana tabacum* NDH 54-3IV

Tabelle 87. Aus Sitosterol und Stigmasterol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Kopplungen (% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$) und Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

Abgeleitet aus	Position	koppelt mit	Häufigkeit		Kopplung		
			% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{59}	% $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	Δs	
Sitosterol (Seitenkette)	IPP	1	(2)	1,5	{1}	n.d.	
		2	(1)	n.d.		n.d.	
		3	(5)	n.d.			
		4		1,3	{1}	n.d.	
		5	(3)	n.d.		n.d.	
	DMAPP	1	(2)	n.d.		n.d.	
		2	(1)	n.d.		8,2	{1}
		3	(5)	n.d.		n.d.	
		4		n.d.			
		5	(3)	n.d.		n.d.	
Stigmasterol (Seitenkette)	IPP	1	(2)	1,8	{1}	n.d.	
		2	(1)	n.d.		n.d.	
		3	(5)	1,5	{1}	8,1	{1}
		4		1,8	{1}		
		5	(3)	n.d.		n.d.	
	DMAPP	1	(2)	1,8	{1}	7,9	{1}
		2	(1)	n.d.		7,0	{1}
		3	(5)	1,8	{1}	7,8	{1}
		4		1,4	{1}		
		5	(3)	n.d.		n.d.	
Ringsystem	IPP	1	(2)	1,5	{1}	9,7	{1}
		2	(1)	1,8	0,2 {2}	8,5	0,8 {2}
		3	(5)	1,8	0,1 {2}	n.d.	
		4		1,8	{1}		
		5	(3)	1,8	0,1 {2}	9,1	{1}
	DMAPP	1	(2)	n.d.		n.d.	
		2	(1)	1,8	{1}	9,7	{1}
		3	(5)	n.d.		n.d.	
		4		n.d.			
		5	(3)	n.d.		n.d.	

⁵⁹ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Die höhere Konzentration der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in den Sterolen wird durch den Einbau von [$^{13}\text{C}_1$]Markierungen verursacht. Je stärker die Verstoffwechslung der [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose voranschreitet, desto mehr [$^{13}\text{C}_1$]Bruchstücke entstehen. Wenn es bei den Biosynthesen der Aminosäure und der Sterole einen zeitlichen Unterschied gibt, erklärt sich die erhöhte Konzentration an [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologen durch die spätere Bildung der Sterole. Eine weitere Quelle für [$^{13}\text{C}_1$]Markierungen ist das $^{13}\text{CO}_2$. Bei den Biosynthesen, zum Beispiel zu Beginn des Pentosephosphatwegs, wird $^{13}\text{CO}_2$ abgespalten. Das $^{13}\text{CO}_2$ diffundiert durch die Zellwände und kann anschließend über die Photosynthese refixiert werden.

3.4.4.6.3 Phytol

Messergebnisse

Das Markierungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Abbildung 90 und Abbildung 113 zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Phytol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Kopplungen $> 0,1\%$ zu beobachten. Es wurden keine mehrfach ^{13}C -markierte Vorstufen in Phytol eingebaut. Auf der anderen Seite belegt die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe mit $0,5\%$ den Einbau von [$^{13}\text{C}_1$]Fragmenten. Die verschiedenen Positionen im Phytol weisen nur geringfügige Unterschiede bei der Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe auf.

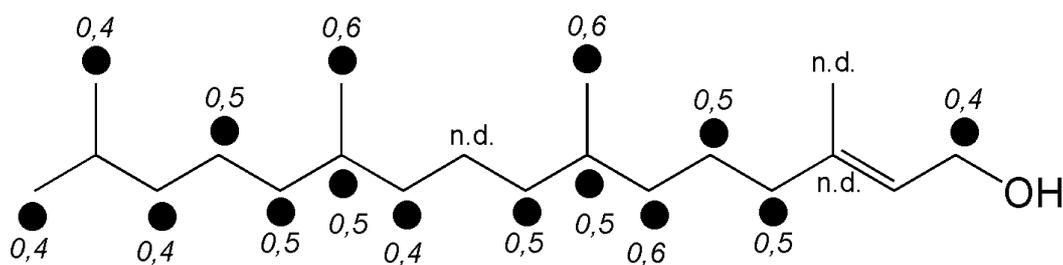


Abbildung 113. Kopplungsmuster von Phytol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die kursiven Zahlen geben die absolute ^{13}C -Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Tabelle 88. Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Phytol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Häufigkeit $\% \text{ }^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	59,4	1,5
2	123,0	1,4
3	140,4	n.d.
4	39,9	1,6
5	25,1	1,6
6	36,6	1,7
7	32,7	1,6
8	37,3	1,6
9	24,5	n.d.
10	37,4	1,5
11	32,8	1,6
12	37,3	1,6
13	24,8	1,6
14	39,3	1,5
15	28,0	1,3
16	22,6	1,5
17	22,7	1,5
18	19,7	1,7
19	19,7	1,7
20	16,2	n.d.

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich Phytol aus drei IPP und einem DMAPP Molekül zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Phytol sind in Tabelle 89 und Abbildung 110 (**D**) zusammengefasst.

Das retrobiosynthetisch bestimmte Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle aus Phytol weist keine Kopplungsblöcke auf, jedoch [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe mit einer Anreicherung von 0,5 % in allen Positionen (Tabelle 89 und Abbildung 110, **D**). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Synthese über den Mevalonatweg kann ausgeschlossen werden, da im Spektrum keine [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe sichtbar sind.

Die gleichmäßige Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe von 0,5 % in allen Positionen der IPP/DMAPP Moleküle ist mit den rekonstruierten Daten des Deoxyxylulosephosphatwegs vergleichbar (Tabelle 84 und Abbildung 110, **C**).

Tabelle 89. Aus Phytol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$.

Abgeleitet aus	Position	Häufigkeit			
		% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	Δs^{60}		
Phytol	IPP	1	1,6	0,1	{2}
		2	1,5	0,1	{3}
		3	1,6	0,0	{2}
		4	1,6	0,0	{3}
		5	1,7	0,0	{2}
	DMAPP	1	1,6		{1}
		2	1,5		{1}
		3	1,3		{1}
		4	1,5		{1}
		5	1,5		{1}

3.4.4.6.4 Geranylgeraniol

Die Markierungsmuster von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ sind in Tabelle 90 und Abbildung 114 zusammengefasst.

Im NMR Spektrum von Geranylgeraniol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Kopplungen $> 0,1\%$ zu beobachten. Es wurden keine mehrfach ^{13}C -markierten Vorstufen in Phytol eingebaut. Auf der anderen Seite belegt die Anreicherung der $[\text{C}_1]$ Isotopologe mit 0,4 bis 0,9 % den Einbau von $[\text{C}_1]$ Fragmenten.

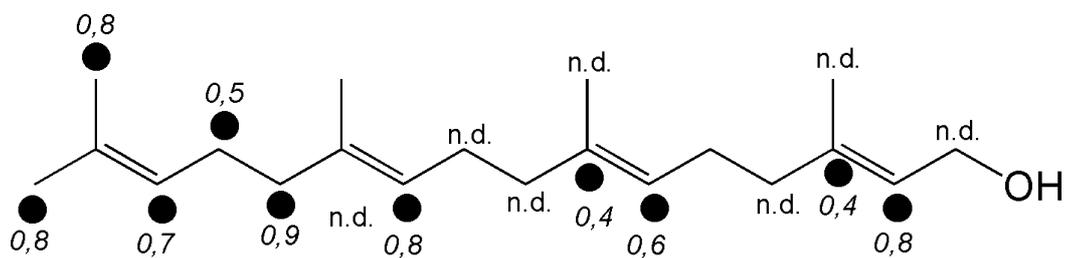


Abbildung 114. Kopplungsmuster von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der $[\text{C}_1]$ Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

⁶⁰ Δs : Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

Tabelle 90. Häufigkeiten (% $^{13}\text{C}_{\text{abs}}$) von Geranylgeraniol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U- $^{13}\text{C}_6$]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Häufigkeit $\% \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	59,4	n.d.
2	124,3	1,9
3	139,9	1,5
4	39,7	n.d.
5	26,7	1,4
6	124,1	1,7
7	135,4	1,5
8	39,7	n.d.
9	26,6	n.d.
10	123,4	1,6
11	135,0	n.d.
12	39,5	1,8
13	26,3	1,6
14	123,2	1,8
15	131,3	1,4
16	17,7	1,9
17	17,7	1,9
18	16,3	1,3
19	16,0	n.d.
20	16,0	n.d.

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich Geranylgeraniol aus einem DMAPP und drei IPP Molekülen zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von Geranylgeraniol sind in Tabelle 91 und Abbildung 110 (E) zusammengefasst.

Die retrobiosynthetisch bestimmten Muster der IPP/DMAPP Moleküle aus Geranylgeraniol weisen keine Kopplungsblöcke auf, jedoch [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe in allen Positionen (Tabelle 91 und Abbildung 110, E). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Die Synthese über den Mevalonatweg kann ausgeschlossen werden, da im Spektrum keine [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe sichtbar sind (Abbildung 110, B).

Die Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe der Positionen in den IPP/DMAPP Molekülen ist nicht gleichmäßig verteilt. Vorallem die Positionen C-1 und C-3 sind niedriger. Mit den vorliegenden Daten kann der Grund für diese Abweichungen nicht bestimmt werden. Wenn eine, mit dem Wildtyp vergleichbare Fixierung von $^{13}\text{CO}_2$ in der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* angenommen wird, dann müssten die Positionen C-1, C-2 und C-4 höhere

Im NMR Spektrum von *cis*-Abienol sind keine Satelliten sichtbar. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit, sind im Spektrum keine Kopplungen > 0,1 % zu beobachten. Es wurden keine mehrfach ¹³C-markierten Vorstufen in *cis*-Abienol eingebaut. Auf der anderen Seite belegt die Anreicherung der [¹³C₁]Isotopologe mit 0,7 % den Einbau von [¹³C₁]Fragmenten.

Tabelle 92. Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von *cis*-Abienol aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem. Verschiebung δ [ppm]	Häufigkeit % ¹³ C _{abs}
1	40,0	1,7
2	18,6	1,7
3	41,8	1,4
4	33,3	n.d.
5	55,9	1,9
6	20,2	n.d.
7	43,9	1,5
8	74,3	n.d.
9	62,1	1,7
10	38,8	n.d.
11	23,1	1,7
12	133,8	1,5
13	130,9	1,4
14	133,5	1,6
15	113,8	1,8
16	19,9	1,4
17	24,4	n.d.
18	33,5	1,8
19	21,5	1,8
20	15,4	1,7

Retrobiosynthese

Gemäß der Biosynthese baut sich *cis*-Abienol aus einem DMAPP und drei IPP Molekülen zusammen. Die retrobiosynthetisch bestimmten Markierungsmuster von IPP und DMAPP aus den experimentellen Daten von *cis*-Abienol sind in Tabelle 93 und Abbildung 110 (F) zusammengefasst.

Die retrobiosynthetisch bestimmte Markierung der IPP/DMAPP Moleküle aus *cis*-Abienol weist keine Kopplungsblöcke auf, jedoch [¹³C₁]Isotopologe in den Positionen C-1, C-2, C-4 und C-5 (Tabelle 93 und Abbildung 110, F). Das Markierungsmuster der IPP/DMAPP Moleküle weist auf den Deoxyxylulosephosphatweg. Auffällig ist, dass die retrobiosynthetisch über dem Deoxyxylulosephosphatweg bestimmte Anreicherung der [¹³C₁]Iso-

topologe mit 1,0 % doppelt so hoch ist, wie im *cis*-Abienol. Die Synthese über den Mevalonatweg kann ausgeschlossen werden, da im Spektrum keine [¹³C₂]Isotopologe sichtbar sind (Abbildung 110, **B**).

Die Anreicherung der Positionen in den IPP/DMAPP Molekülen ist nicht gleichmäßig verteilt, vorallem Position C-3 fällt niedriger aus als die restlichen Positionen. Mit den vorliegenden Daten kann der Grund für diese Abweichungen nicht bestimmt werden. Keine der vorliegenden Modelle für die Markierung von *cis*-Abienol, die aus dem Einbauversuch im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* gewonnen wurden, sind auf die vorliegende Markierung anwendbar.

Tabelle 93. Aus *cis*-Abienol retrobiosynthetisch abgeleitete und statistisch gemittelte Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von IPP und DMAPP aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Abgeleitet aus		Position	Häufigkeit	
			% ¹³ C _{abs}	Δs ⁶²
<i>cis</i>-Abienol	IPP	1	1,7	0,0 {2}
		2	1,7	0,2 {3}
		3	1,4	{1}
		4	1,7	0,2 {2}
		5	1,8	0,1 {2}
	DMAPP	1	1,8	{1}
		2	1,6	{1}
		3	1,4	{1}
		4	1,5	{1}
		5	1,4	{1}

⁶² Δs: Standardabweichung; die Zahlen in den geschweiften Klammern geben die Anzahl der eingegangenen Werte in die statistische Bestimmung an.

3.4.4.6.6 Nicotin

Das Markierungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, ist in Tabelle 94 und Abbildung 116 zusammengefasst.

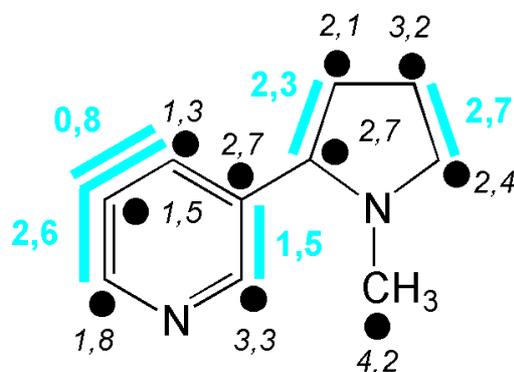


Abbildung 116. Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose. Die blauen Balken kennzeichnen Fragmente aus der [U-¹³C₆]D-Glucose, die unter Erhalt der Konnektivität inkorporiert wurden. Die Zahlen geben die jeweilige Konzentration (mol%) nach Gleichung E an (S. 50). Die kursiven Zahlen geben die absolute Anreicherung der [¹³C₁] Isotopologe nach Gleichung C an (S. 47).

Tabelle 94. Kopplungen (% ¹³C¹³C) und Häufigkeiten (% ¹³C_{abs}) von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose.

Position	chem.	Kopplungskonstante ⁶³	Häufigkeit	
	Verschiebung		Kopplung	
	δ [ppm]	J _{CC} [Hz]	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C
1	148,7	57,2 (2)	5,9	27,6
2	138,1	57,2 (1)	5,3	27,2
3	135,6	54,6 / 2,4 (5, 4/5)	5,8	57,8
4	124,0	54,3 (3)	6,0	14,6
		55,0 (3/5)		44,6
5	148,0	55,0 / 2,8 (3, 3/4)	5,5	44,5
6	68,9	34,7 (7)	6,0	39,7
7	22,1	34,3 (6)	5,5	38,5
8	34,4	35,3 (9)	7,0	42,0
9	56,8	34,2 (8)	6,2	39,8
10	40,1		5,3	

⁶³ Kopplungspartner in Klammern

Pyrrolidin-Einheit

Im NMR Spektrum von Nicotin sind $[6,7-^{13}\text{C}_2]$ und $[8,9-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe in der Pyrrolidin-Einheit sichtbar (Abbildung 107, C). Es sind im Spektrum bei den Signalen der Positionen C-6 bis C-9 keine Fernkopplungen sichtbar.

Gemäß der Literatur erfolgt die Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bzw. aus Arginin (Abbildung 53; Tiburcio und Galston, 1986; Wagner, 1987). Die Intensität der Kopplungsblöcke im Nicotin sollte sich, durch das symmetrische Putrescin, aus der Summe der $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ und $[4,5-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe des Glutamats bzw. des Arginins zusammensetzen. Die Ergebnisse des Einbauversuchs im Wildtyp bestätigten die Vorgaben der Literatur für *Nicotiana tabacum*.

Bei einer Retrobiosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus Glutamat bilden sich $[6,7-^{13}\text{C}_2]$ und $[8,9-^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe mit einer Konzentration von 0,5 mol% (Abbildung 117, B). Bei den experimentellen Daten im Nicotin liegt die Konzentration der $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe bei 2,5 mol% (Abbildung 117, A). Damit ist die Konzentration der gefundenen $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe im Nicotin um das fünffache höher, als die aus der Aminosäure Glutamat rekonstruierten. Im Nicotin liegt, im Vergleich zu einer fünffach höheren Konzentrationen der $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopologe, nur die dreifache Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe mit 2,6 % in den Positionen C-6 und C-9 vor. Die Anreicherungen aus dem Glutamat liegen bei 0,8 %.

Der hohe Anteil an $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologen in der Aminosäure bedeutet eine stärkere Verstoffwechslung der D-Glucose. Es muss davon ausgegangen werden, dass die $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ D-Glucose sehr früh und nur mit geringer Umsetzung im Stoffwechsel in das Nicotin eingebaut wird. Dies erklärt auch die fünffach höheren Konzentration an $[^{13}\text{C}_2]$ Isotopologen, neben der dreifach höheren Anreicherung der $[^{13}\text{C}_1]$ Isotopologe im Nicotin.

Pyridin-Einheit

Im NMR Spektrum sind $[1,2-^{13}\text{C}_2]$, $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ und $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ Isotopologe in der Pyridin-Einheit des Nicotins sichtbar (Abbildung 107, C). In der Literatur werden drei verschiedene Biosynthesewege für den Vorläufer der Pyridin-Einheit, der Nicotinsäure, beschrieben (S. 155). Die Biosynthese der Nicotinsäure in höheren Pflanzen geht, gemäß der Literatur (Wagner, 1987; Luckner, 1990; Review: Forster und Moat, 1980), von Aspartat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus (Abbildung 55, oben). Die Ergebnisse des Einbauversuchs im Wildtyp bestätigten die Vorgaben der Literatur für *Nicotiana tabacum*.

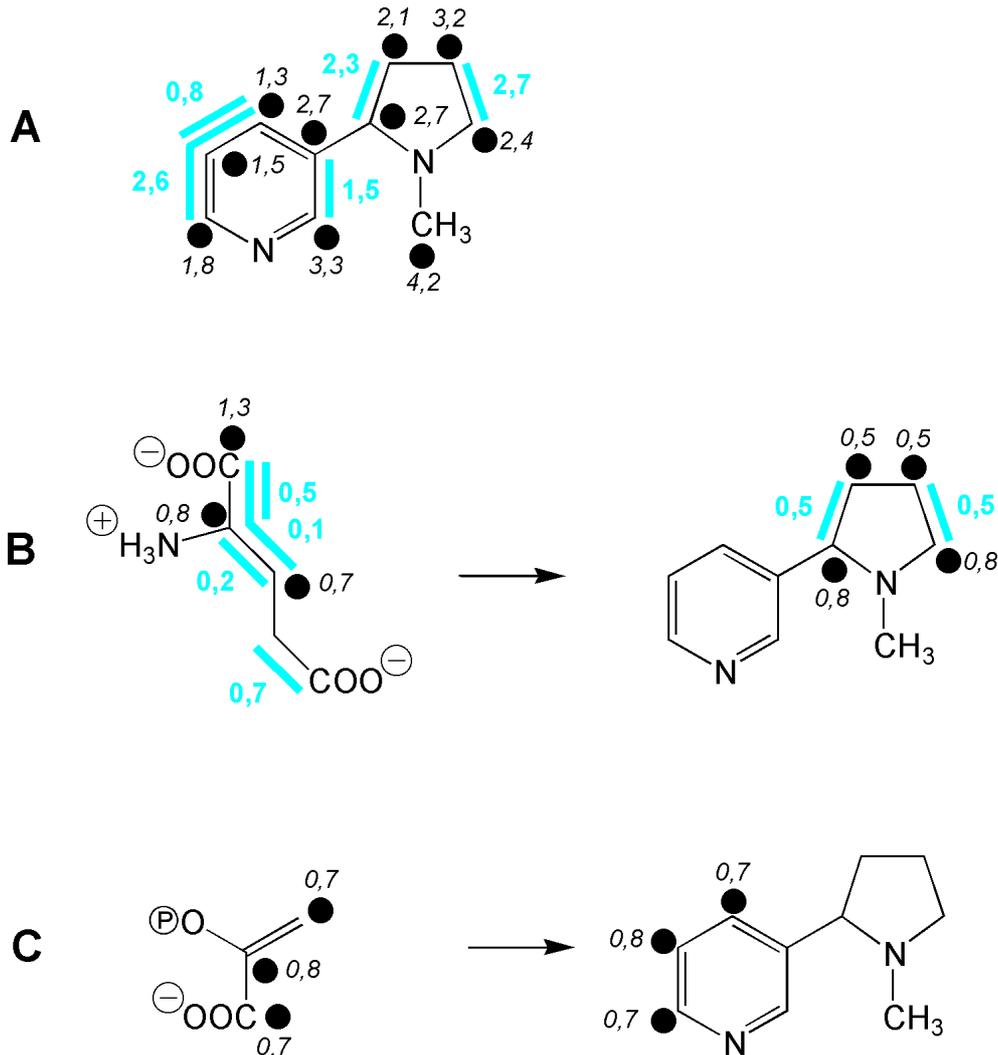


Abbildung 117. Vergleich der (A) experimentellen Kopplungsmuster von Nicotin aus dem Einbauversuch in die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:4 mit unmarkierter Saccharose, mit den (B) und (C) hypothetischen Kopplungsmustern, rekonstruiert aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten (Tabelle 26 und Abbildung 48). Biosynthese der Pyrrolidin-Einheit aus (B) Glutamat. Biosynthese der Nicotinsäure aus Aspartat und (C) 3-Phosphoenolpyruvat.

Glycerinaldehyd-3-phosphat und 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Tyrosin, Phenylalanin, Leucin Lysin, Alanin und Valin, Tabelle 26) sind über den Stoffwechsel miteinander verknüpft. In der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* ergeben sich bei der retrobiosynthetischen Bestimmung der Markierungsmuster der Pyridin-Einheit über 3-Phosphoenolpyruvat und Aspartat, mit den vorliegenden Aminosäuredaten, keine [3,4-¹³C₂] und [3,4,5-¹³C₃]Isotopologe. Das 3-Phosphoenolpyruvat, stellvertretend für Glycerinaldehyd-3-phosphat, das Ausgangsverbindung der Positionen C-3, C-4 und C-5 in der Pyridin-Einheit des Nicotins ist, weist keine Kopplungsblöcke auf (Abbildung 117, C).

Die Biosynthese des Nicotins über Glycerinaldehyd-3-phosphat bzw. 3-Phosphoenolpyruvat ist im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* im Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose und mit [1-¹³C₁]D-Glucose bewiesen worden. Im Einbauversuch in die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose erschienen [¹³C₂] und [¹³C₃]Isotopologe im Nicotin, obwohl die retrobiosynthetisch bestimmte Ausgangsverbindung, 3-Phosphoenolpyruvat, keine Kopplungsblöcke aufweist. Unter diesen Bedingungen muss von getrennten 3-Phosphoenolpyruvat Pools ausgegangen werden. Die Rekonstruktion der zentralen Stoffwechselmetabolite erfolgte über die Aminosäure. Die Pools von 3-Phosphoenolpyruvat müssten dementsprechend entweder zeitlich oder räumlich von einander getrennt in der Pflanze vorliegen.

3.4.4.6.7 Diskussion

Die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* hat einen Defekt im NDH-Komplex. Die Funktion des NDH-Komplexes im Plastidenmetabolismus ist weitgehend unbekannt. Ein Teil der sekundären Auswirkungen der Mutation können festgestellt werden.

Die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* ähnelt dem Wildtyp stärker, als die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum*. Die Pflanze wirkt gesünder und wächst besser. Es wird angenommen, dass die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* das Defizit am NDH-Komplex über verstärkte Gen-Kopien aus den Chloroplasten kompensieren kann (Kofer *et al.*, 1998). Der Stärkeabbau ist nicht gehemmt.

Der Einfluss der Mutation auf die Terpen- und Nicotinbiosynthese wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es konnten, wie im Wildtyp von *Nicotiana tabacum*, Sitosterol, Stigmasterol, Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol isoliert und NMR spektroskopisch vermessen werden. Die Zusammensetzung der Terpene im verseiften Lipid-Extrakt entspricht in den Konzentrationen der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum*. Es scheint deutlich mehr Phytol als im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* enthalten zu sein (Abbildung 109). Die Konzentration an Geranylgeraniol ist geringer. Sterole und *cis*-Abienol liegen im Verhältnis zu den anderen Verbindungen in vergleichbaren Konzentrationsverhältnissen, wie im Wildtyp vor.

In den Sterolen der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* bilden sich [¹³C₂]Isotopologe. Die Biosynthese erfolgt über den Mevalonatweg. Es liegt eine vergleichbare Anreicherung in beiden Sterolen vor. Eine Unterscheidung der Anreicherungen in den Positionen, wie in der NDH 53-25 Mutante und im Wildtyp von *Nicotiana tabacum*, kann

nicht getroffen werden. Wobei bei der Lage der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden kann, dass dies durch die lückenhaften Daten der Seitenkette des Sitosterols vorgetäuscht wird. Die Konzentration der [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologe beträgt nur ein Viertel der Konzentration der hypothetisch bestimmten Daten der IPP/DMAPP Moleküle aus dem Mevalonatweg. Die Konzentration ist damit auch deutlich niedriger, wie im Vergleich dazu im Wildtyp, wo die Sterole die Hälfte der retrobiosynthetisch bestimmten Daten aus dem Mevalonatweg aufweisen.

Wie in der NDH 53-25 Mutante konnten auch in der 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* keine Kopplungen in den Terpenen Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol nachgewiesen werden. Alle Positionen der Terpene weisen eine gleichmäßige Anreicherung der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe von 0,5 % auf. Die retrobiosynthetische Bildung der IPP/DMAPP Moleküle über den Deoxyxylulosephosphatweg, aus den zentralen Stoffwechselmetaboliten, bestätigt, dass keine Kopplungsblöcke eingebaut werden. Die aromatischen Aminosäuren, aus denen die zentralen Stoffwechselmetabolite für die Rekonstruktion des Deoxyxylulosephosphatwegs retrobiosynthetisch bestimmt werden, weisen keine Kopplungsblöcke auf.

Da keine Kopplungen in Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol festgestellt wurden, muss von einem geringen (> 5 %) bzw. nicht vorhanden Crosstalk in der vorliegenden Mutante ausgegangen werden.

Die NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* zeigt im Einbauversuch mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]D-Glucose ein mit dem Wildtyp vergleichbares Markierungsmuster im Nicotin. Dem gegenüber stehen deutlich niedrigere Einbauraten in den Aminosäuren und aromatische Aminosäuren ohne Kopplungsblöcke.

Auffallend sind die hohen Einbauraten und Markierungsmuster im Nicotin der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum*, obwohl die aromatischen Aminosäuren keine Kopplungsblöcke aufweisen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Einbauversuch im Wildtyp, stammten die Positionen C-3, C-4 und C-5 in der Pyridin-Einheit aus Glycerinaldehyd-3-phosphat. Das Markierungsmuster von Glycerinaldehyd-3-phosphat wird aus den Markierungsmustern der aromatischen Aminosäuren rekonstruiert. Eine mögliche Erklärung für ein markiertes Nicotin, im Gegensatz zu unmarkierten aromatischen Aminosäuren, liegt in der Kompartimentierung. Die Biosynthese von Nicotin findet in den Wurzeln statt, die der aromatischen Aminosäuren in den Chloroplasten.

Das Ergebnis der NDH 54-3IV Mutante entspricht dem Ergebnis der NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum*. Beide Mutanten synthetisieren Nicotin mit [$^{13}\text{C}_2$] und [$^{13}\text{C}_3$]Isotopologen in hohen Konzentrationen. Die auslösenden Mechanismen scheinen in beiden Mutanten die gleichen zu sein. Weitere Einbauversuche könnten helfen diese Mechanismen zu verstehen. Interessant wäre die Frage, ob sich der Schwerpunkt der Markierung bei einer Hemmung der Nicotinbiosynthese verschieben würde.

In den beiden untersuchten NDH Mutanten von *Nicotiana tabacum* sind die Anreicherungen und Markierungsmuster der Aminosäuren weitgehend vergleichbar. Die Sterole der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* weisen nur ein Viertel der [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologanreicherungen auf, im Verhältnis zu den hypothetischen Daten aus dem Mevalonatweg. Die NDH 53-25 Mutante von *Nicotiana tabacum* weist die Hälfte der [$^{13}\text{C}_2$]Isotopologkonzentration in den Sterolen auf. Die Anreicherungen der [$^{13}\text{C}_1$]Isotopologe und Konzentration der [$^{13}\text{C}_2$] und [$^{13}\text{C}_3$]Isotopologe im Nicotin der NDH 54-3IV Mutante von *Nicotiana tabacum* sind höher, als in der NDH 53-25 Mutante.

Die Unterschiede zwischen den NDH Mutanten von *Nicotiana tabacum* sind minimal. Wenn es einen deutlichen Unterschied in der Genetik der beiden Pflanzen gibt, so macht er sich auf der Ebene der hier beobachteten primären und sekundären Metabolite nicht bemerkbar.

3.4.5 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einbauversuche mit einfach und mehrfach markierten Tracern geben einen Einblick in die komplexen Systeme der Biosynthesenwege in Mikroorganismen, Pflanzenzellkulturen und ganzen Pflanzen. Die Unterschiede in den drei Systemen werden gut in den retrobiosynthetisch bestimmten 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat Molekülen deutlich. 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat eignen sich für eine Darstellung, da sie im Stoffwechsel über Glykolyse und Glukoneogenese direkt ineinander überführbar sind.

Im *Chloroflexus aurantiacus* haben die retrobiosynthetisch gewonnen 3-Phosphoenolpyruvat (**A**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**B**) Moleküle aus den Aminosäuren die gleichen Anreicherungen der [$^{13}\text{C}_1$], [$^{13}\text{C}_2$] und [$^{13}\text{C}_3$]Isotopologe (Abbildung 118). Es kommt nicht zur Bildung verschiedener Pools. Das Eubakterium besitzt nur einen „Syntheseraum“, in dem alles zusammenfließt.

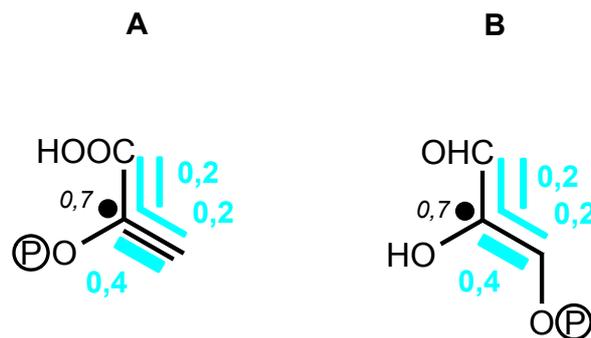


Abbildung 118. Die Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in *Chloroflexus aurantiacus* mit 2,0 g [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycin: (**A**) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Tyrosin, Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin) und (**B**) Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin, Cytidin, Guanosin und Uridin).

Im *Catharanthus roseus* haben die, aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch bestimmten, 3-Phosphoenolpyruvat (**A**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**B**) Moleküle unterschiedliche Anreicherungen der [$^{13}\text{C}_1$], [$^{13}\text{C}_2$] und [$^{13}\text{C}_3$]Isotopologe (Abbildung 119). Die Konzentration der [$^{13}\text{C}_2$] und [$^{13}\text{C}_3$]Isotopologe im 3-Phosphoenolpyruvat ist niedriger als im Glycerinaldehyd-3-phosphat. Die Verhältnisse der [2,3- $^{13}\text{C}_2$] und [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]Isotopologe sind jedoch in beiden Molekülen gleich hoch. Das aus Phytol (ohne Crosstalk) rekonstruierte 3-Phosphoenolpyruvat weist noch geringere Konzentrationen auf (Abbildung 119, C). Es treten verschiedene Pools auf, die sich unterschiedlich stark vermischt, in den primären und

sekundären Verbindungen präsentieren. In der Pflanzenzellkultur von *Catharanthus roseus* liegt nur eine Zellart vor. Dadurch wird die mögliche Zahl der Pools eingeschränkt, wie der Einbauversuch in den ganzen Pflanzen zeigt.

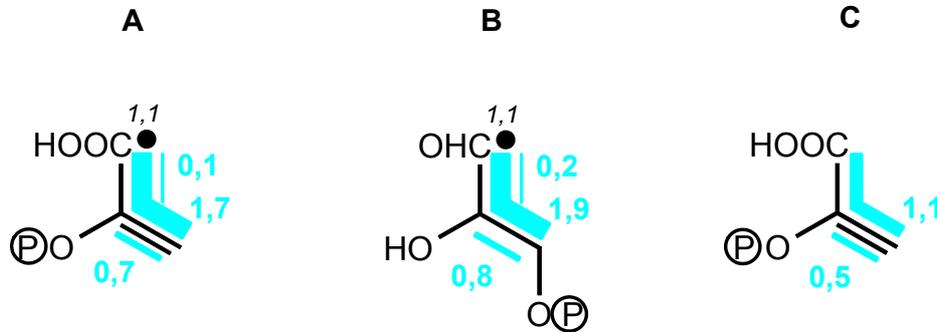


Abbildung 119. Die Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in *Catharanthus roseus* mit $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose, im Verhältnis 1:24 mit unmarkierter D-Glucose: (A) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Phenylalanin, Tyrosin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin und Lysin), (B) Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin) und (C) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Phytol, ohne Crosstalk).

In dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit $[U-^{13}C_6]D$ -Glucose können verschiedene 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat Pools unterschieden werden. Die retrobiosynthetisch bestimmten 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat Moleküle aus den Aminosäuren, Phytol, Geranylgeraniol, *cis*-Abienol und Nicotin zeigen deutliche Unterschiede in den Markierungsmustern und Isotopologkonzentrationen (Abbildung 120). Gründe für diese verschiedenen Pools sind die Kompartimentierung (zeitlich und räumlich) und die unterschiedlichen C-Quellen ($[U-^{13}C_6]D$ -Glucose, D-Glucose, $^{13}CO_2$ und CO_2) auf die die Pflanze während des Wachstums zurückgreift.

Die Kompartimentierung in *Nicotiana tabacum* beschränkt sich nicht nur auf Cytosol und Plastiden. Auch verschiedene Zelltypen in der Pflanze bilden ihre eigenen Kompartimente. So bilden nur die Wurzelzellen das Nicotin. *Cis*-Abienol wird ausschließlich in den Trichomen, Haarzellen der Blattoberfläche, gebildet. Um nur zwei Beispiele zu nennen. Die verschiedenen Biosyntheseorte und -zeiten spiegeln sich in den Markierungsmustern und den Konzentration der Isotopologe wider.

Das aus Nicotin biosynthetisch bestimmte Glycerinaldehyd-3-phosphat weist die höchsten $[^{13}C_2]$ und $[^{13}C_3]$ Isotopologanreicherungen auf (Abbildung 120, A). Der Syntheseort (Wurzel) befindet sich räumlich am nächsten zu dem mehrfach markierten Tracer. Bei der Synthesezeit kann von einer frühen Bildung ausgegangen werden, um den wachsenden Spross zu schützen.

Sekundärstoffwechsel – Diskussion

Die, aus den Aminosäuren retrobiosynthetisch bestimmten 3-Phosphoenolpyruvat (**B**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**C**) Moleküle haben niedrigere Isotopologkonzentrationen (Abbildung 120). Die Aminosäurebiosynthese findet zeitlich über die ganze Wachstumsperiode und räumlich über die ganze Pflanze verteilt statt.

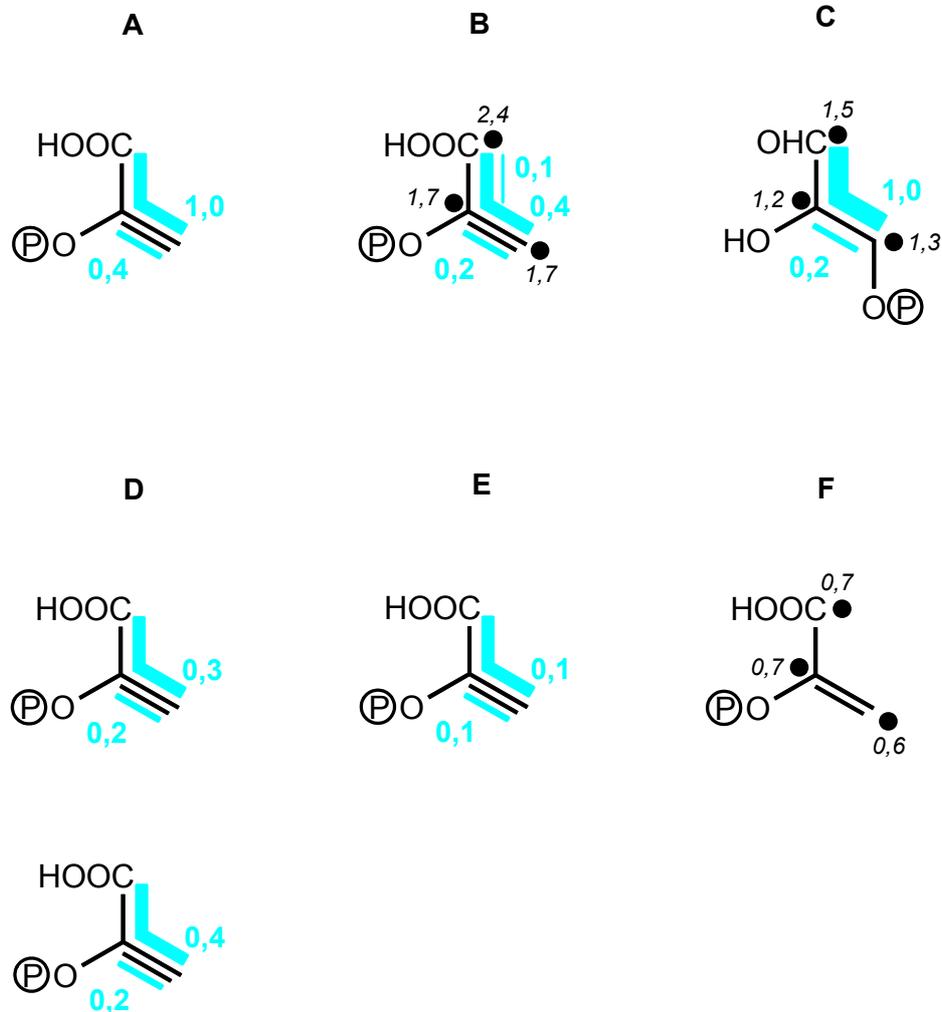


Abbildung 120. Die Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus dem Einbauversuch in *Nicotiana tabacum* mit [U-¹³C₆]D-Glucose, im Verhältnis 1:49 mit unmarkierter Saccharose: (**A**) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Nicotin), (**B**) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Phenylalanin, Tyrosin, Isoleucin und Leucin), (**C**) Glycerinaldehyd-3-phosphat (rekonstruiert aus Histidin), (**D**) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus *cis*-Abienol, ohne Crosstalk; oben: 1./2. IPP und DMAPP; unten: 3. IPP), (**E**) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Phytol, ohne Crosstalk) und (**F**) 3-Phosphoenolpyruvat (rekonstruiert aus Geranylgeraniol, ohne Crosstalk).

Die retrobiosynthetisch bestimmten 3-Phosphoenolpyruvat Moleküle aus den Terpenen des Deoxyxylulosephosphatwegs unterschieden sich deutlich untereinander, obwohl sie alle auf Geranylgeranyldiphosphat als Ausgangsverbindung der Biosynthese zurück zuführen sind.

Das aus Geranylgeraniol rekonstruierte 3-Phosphoenolpyruvat weist keine Kopplungen auf (Abbildung 120, **F**). Es wird von einer Biosynthese aus Metaboliten der Photosynthese ausgegangen. Das aus Phytol rekonstruierte 3-Phosphoenolpyruvat hat deutlich niedrigere Konzentrationen an [$^{13}\text{C}_2$] und [$^{13}\text{C}_3$]Isotopologen als *cis*-Abienol (Abbildung 120, **E**). Es wird von einer Synthese des Phytols aus Vorstufen mit und ohne Kopplungsblöcken ausgegangen. Die 3-Phosphoenolpyruvat Moleküle aus *cis*-Abienol weisen die höchsten Anreicherungen von den Terpenen des Deoxyxylulosephosphatwegs auf (Abbildung 120, **D**). 3-Phosphoenolpyruvat aus dem 3. IPP Molekül zeigt vergleichbare Anreicherungen wie das rekonstruierte 3-Phosphoenolpyruvat aus den Aminosäuren.

Streng genommen darf man die retrobiosynthetisch bestimmten 3-Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat Moleküle nicht als Pools bezeichnen. Jedes rekonstruierte Molekül für sich spiegelt ein Gemisch der Pools wider. Die Informationen geben einen ganz neuen Einblick auf die Biosynthesewege innerhalb von *Nicotiana tabacum*. Die hier gewonnenen Ergebnisse sind nicht direkt auf andere Pflanzen übertragbar. Die Komplexität der Natur ist unglaublich groß. Es gibt keinen Grund warum es ausgerechnet hierbei nach dem gleichen Schema ablaufen sollte.

Die Methode der markierten Tracer ist eine gute Methode für die Aufklärung von Biosynthesewegen und -flüssen in Mikroorganismen, Pflanzenzellkulturen und ganzen Pflanzen. Je komplexer die Systeme werden, desto mehr Informationen kommen zusammen und es sind mehrere Einbauversuche notwendig um alle Informationen aufeinander abzustimmen. Vorallem Einbauversuche mit $^{13}\text{CO}_2$ ermöglicht die Beobachtung von Biosynthesen unter physiologischen Bedingungen. Hier eröffnen sich ungeahnte Möglichkeiten. In Zukunft wird es nicht mehr notwendig sein, Zellkulturen oder sterile Anzuchten von ganzen Pflanzen zu erstellen, um einen ersten Eindruck der Biosynthesewege und -flüsse zu bekommen.

3.5 Stereochemie von Reduktasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, mit Hilfe von selektiv deuteriertem NADPH am C-4 des Pyridin-Rings, die Stereochemie von NADPH abhängigen Reduktasen bestimmt.

3.5.1 Stereospezifische Deuterierung von NADPH

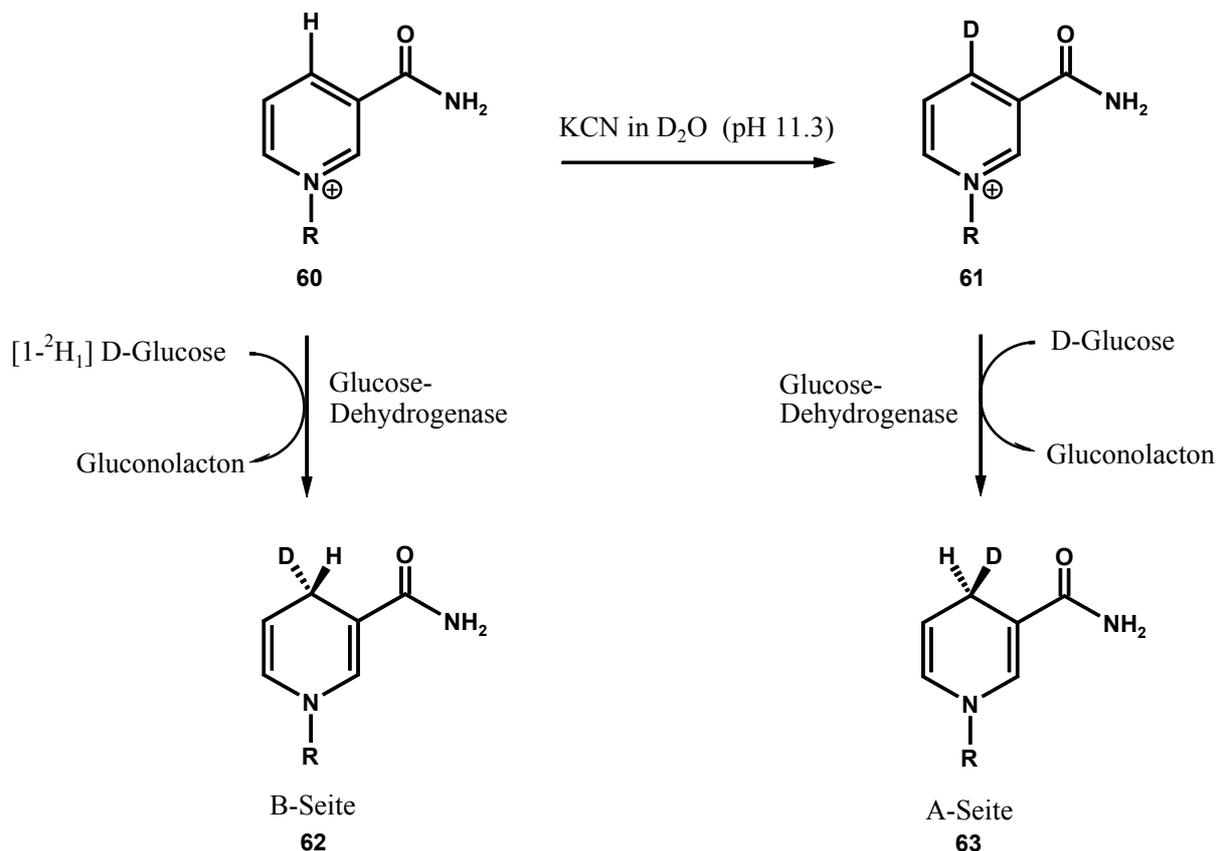


Abbildung 121. Syntheseweg von stereospezifisch markiertem NADPH: (4S) [4-²H₁] NADPH (**62**) oder (4R) [4-²H₁]NADPH (**63**). Schematische Darstellung nach Podschun (Podschun, 1992).

Die Deuterierung von NADPH erfolgte nach einer variierten Vorschrift von Podschun (Podschun, 1992). Versuche zur Stabilität, zum Reinheitsgrad und zur Ausbeute führten zu einer Optimierung der Synthesevorschrift.

Hierfür wurde NADP (**60**) mit Glucosedehydrogenase umgesetzt. Die D-Glucosedehydrogenase gehört zu den Klasse B Dehydrogenasen (Purich, 1982). Sie führt den Wasserstoff von Position C-1 der D-Glucose definiert an Position C-4 auf der B-Seite des Pyridin-Rings von NADP. Je nachdem, ob deuteriertes [4-²H₁]NADP (**61**) oder deuterierte [1-²H₁]D-Glucose

Stereochemie von Reduktasen

eingesetzt wurde entstehen die Stereoisomere (4S) bzw. (4R) $[4\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$ (Abbildung 121, **62** bzw. **63**).

Der erreichte Deuterierungsgrad von (4S) und (4R) $[4\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$ wurde NMR spektroskopisch bestimmt. Er lag für das S-Isomer bei $< 92\%$ und für das R-Isomer bei $> 95\%$. Durch die Deuterierung entfällt die Kopplung des benachbarten Wasserstoffatoms. Die Aufspaltung der Signale entfällt und ein Singulett entsteht (Abbildung 122, **A** und **B**).

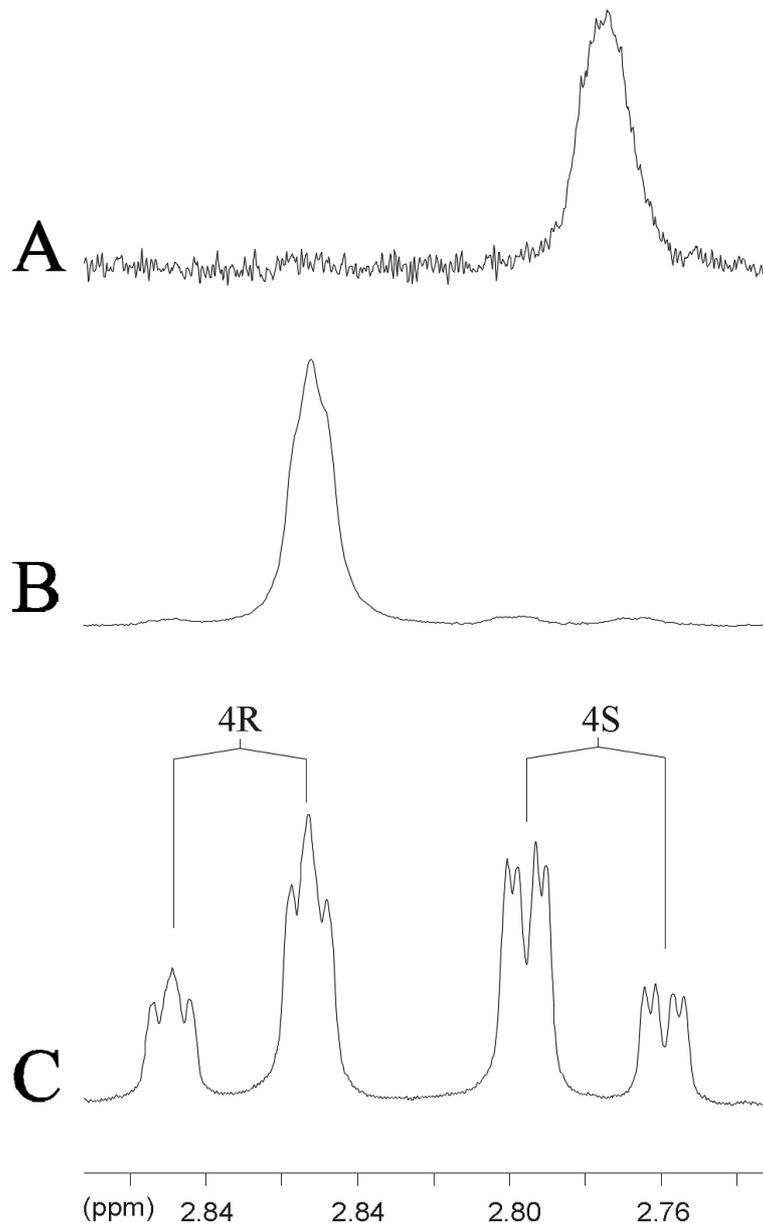


Abbildung 122. NMR Spektrum von (A) (4R) und (B) (4S) $[4\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$ und (C) unmarkiertem NADPH.

Stereochemie von Reduktasen

Die deuterierten Vorstufen, $[1-^2\text{H}_1]\text{D-Glucose}$ bzw. $[4-^2\text{H}_1]\text{NADP}^+$, wurden für die Synthese kommerziell erworben oder hergestellt. Für die Deuterierung von NADP^+ (**60**) wurde auf ein nasschemisches Verfahren zurückgegriffen (You, 1984). Bei pH 11 wurde das Proton am C-4 durch ein Cyanid-Anion verdrängt. Anschließend nahm ein Deuterium, bei Änderung des pH-Wertes, die Stelle des Cyanids ein (Abbildung 123). Die Ausbeute an $[4-^2\text{H}_1]\text{NADP}$ (**61**) wurde durch den extremen pH zu Beginn der Reaktion stark reduziert.

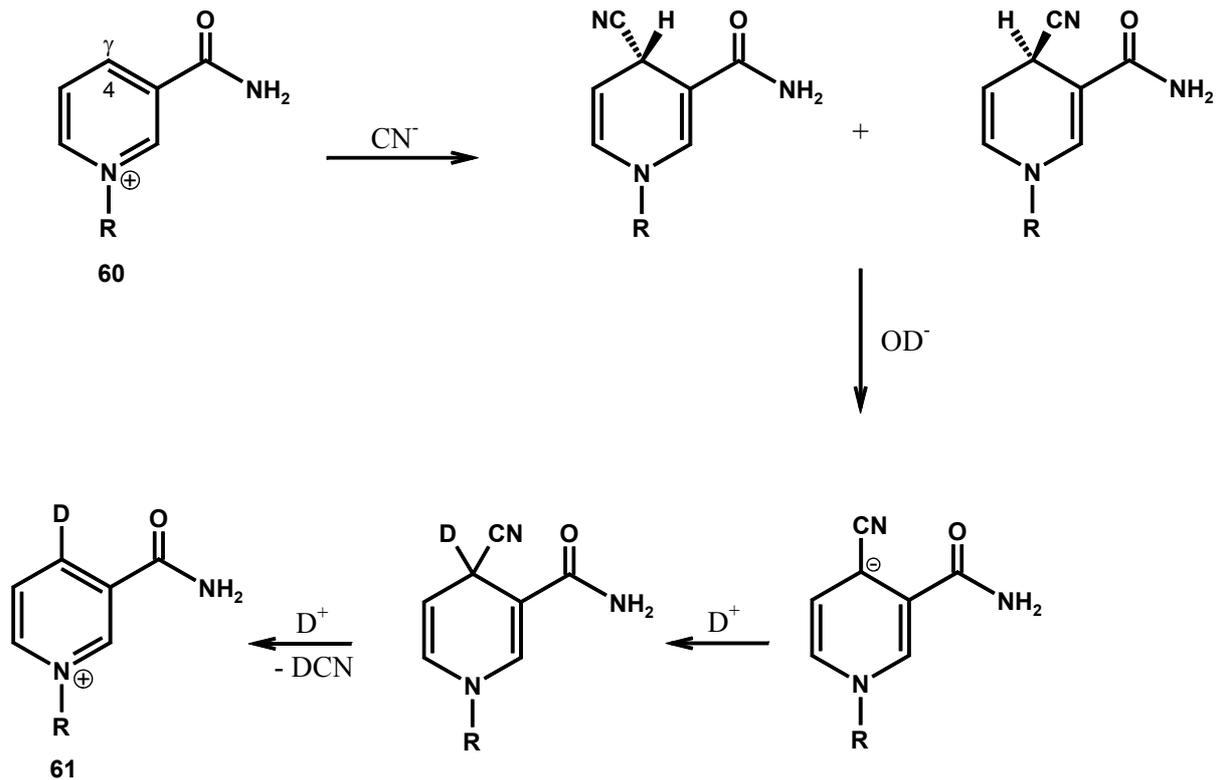


Abbildung 123. Synthese von $[4-^2\text{H}_1]\text{NADP}^+$ (**60**, Cyanid-Reaktion), schematische Darstellung nach You (You, 1984).

Stereochemie von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase

3.5.2 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stereochemie der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (DXR, später IspC-Protein) aus *E. coli*, mit Hilfe selektiv deuteriertem NADPH, bestimmt.

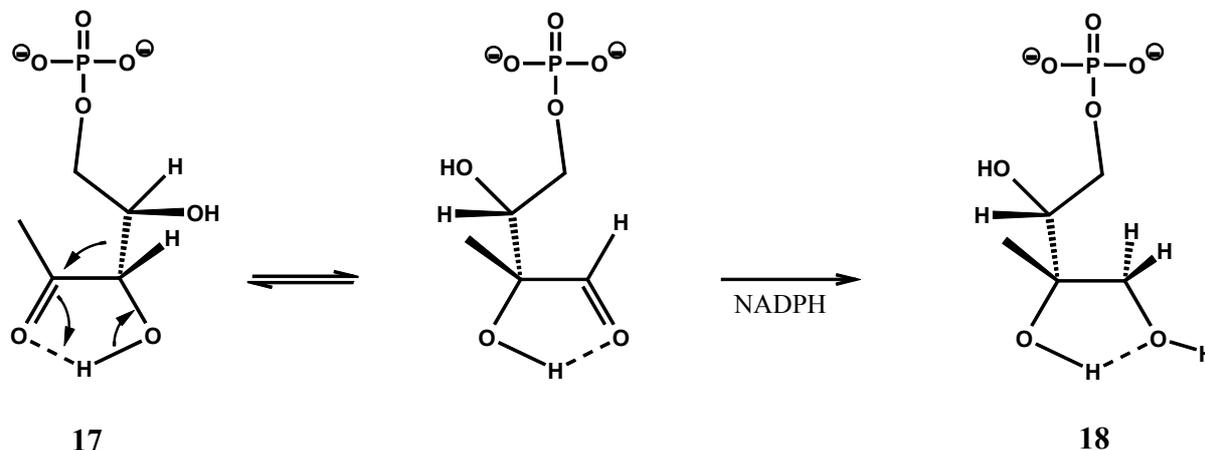


Abbildung 124. Umsetzung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (17) mit der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase von *E. coli*.

Die DXR ist ein Enzym des alternativen Terpenbiosynthesewegs, dem Deoxyxylulosephosphatweg (Abbildung 4). Die DXR wurde 1998 in der Arbeitsgruppe von Seto aus *E. coli* isoliert und gereinigt (Takahashi *et al.*, 1998; Kuzuyama *et al.*, 1998b; Schwender *et al.*, 1999; Lange und Croteau, 1999; Jomaa *et al.*, 1999). Sie katalysiert die Konvertierung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP, 17) zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP, 18; Abbildung 124). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat wird von der hier vorliegenden DXR als Substrat akzeptiert.

Für die Enzymreaktion benötigt die DXR zweiwertige Kationen, wobei Mn^{2+} und Mg^{2+} maximale Aktivität zeigen. Als Protonendonator akzeptiert sie ausschließlich NADPH, mit einem K_M von 25 μM . Die Proteinkristallstruktur deutet darauf hin, dass NADPH mit seinem Phosphat-Rest in der katalytischen Tasche bindet (Yajima *et al.*, 2002; Reuter *et al.*, 2002). Die Bindung des Phosphat Restes ist eine Grundvoraussetzung für die Umsetzung von DXP (Yajima *et al.*, 2002). Das pH Optimum liegt zwischen pH 7,8 und 8,5. K_M und v_{max} liegen bei 171 μM und 18 $\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ (Wungsintaweekul, 2001).

Das Interesse für die DXR ist groß. Da in Säugetieren und somit auch im Menschen, bei der Terpenbiosynthese nur der Mevalonatweg beschriftet wird, sind die Enzyme des Deoxyxylulosephosphatwegs ein gutes Ziel für Herbizide, Antibiotika und Antiparasitika (Lichten-

Stereochemie von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase

des Protonentransfers, nicht nur in Hinsicht des Substrates zu untersuchen, sondern auch in Hinsicht auf das Hydrierungsreagenz.

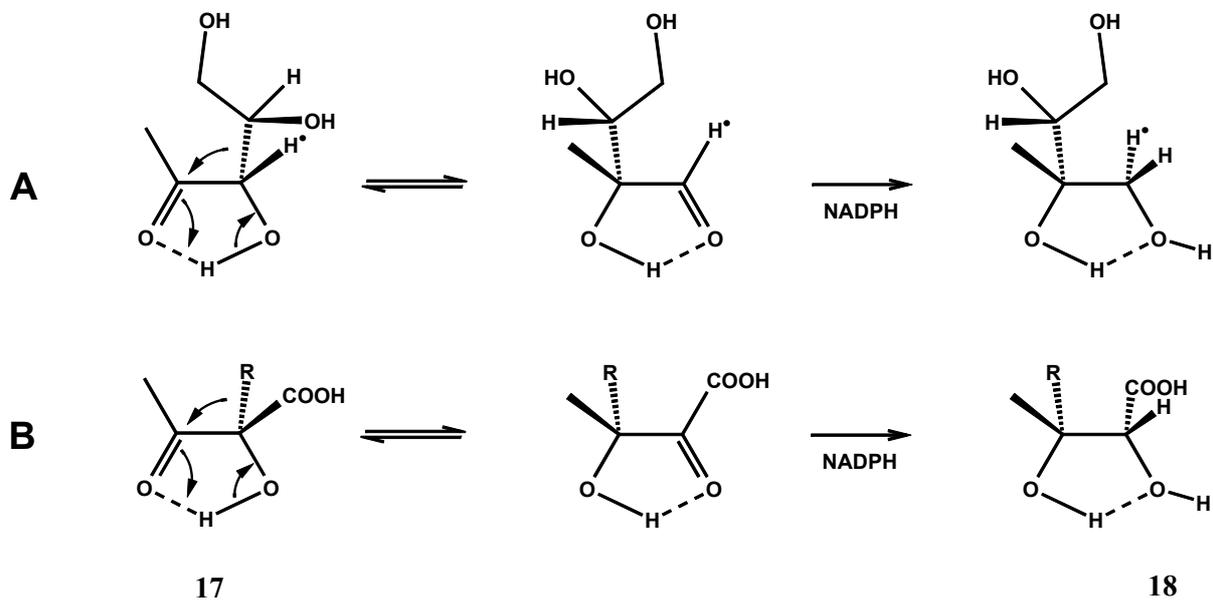


Abbildung 126. Darstellung der postulierten Stereochemie bei der Konvertierung von $[3\text{-}^2\text{H}_1]$ 1-Deoxy-D-xylulose zu 2-C-Methylerythritol (A; Arigoni *et al.*, 1999). Stereochemie bei der Reduktasereaktion in den Biosynthesen von Valin (R = Methyl-) und Isoleucin (R = Ethyl-) (B).

1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat wurde in Anwesenheit der DXR mit (4S) und (4R) $[4\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$ umgesetzt. Das gebildete MEP wurde mit ^1H - und ^2H -NMR Spektroskopie analysiert.

Es kommt zu keinem Deuteriumeinbau bei der Umsetzung mit (4R) $[4\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$ (Abbildung 127, C). Die beiden Protonen an Position C-1 von MEP ergeben im NMR Spektrum die gleichen Signale wie bei dem unmarkierten Vergleich (Abbildung 127, A).

Die Spektren dokumentieren den Einbau von Deuterium in MEP bei der Umsetzung mit (4S) $[4\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$. Im NMR Spektrum wird der Deuterium Einbau, durch den Wegfall der Kopplungen zwischen den Protonen, sichtbar (Abbildung 127, B).

Die DXR verhält sich wie eine B-Reduktase. Das pro-S Proton aus NADPH wird bei der Enzymreaktion von DXR in das Substrat eingeführt (Abbildung 128).

Das *in vitro* Experiment bestätigt die Ergebnisse der Kristallstrukturanalyse der DXR mit NADPH (Kuzuyama *et al.*, 2000). Auch die Ergebnisse des Einbauversuchs mit $[3\text{-}^2\text{H}_1]$ 1-Deoxy-D-xylulose in *Liriodendrum tulpifera* wurden bestätigt (Arigoni *et al.*, 1999).

Stereochemie von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase

Bei Arbeiten an der homologen DXR aus *Synechocystis* wurde die gleiche Stereochemie festgestellt (Proteau *et al.*, 1999).

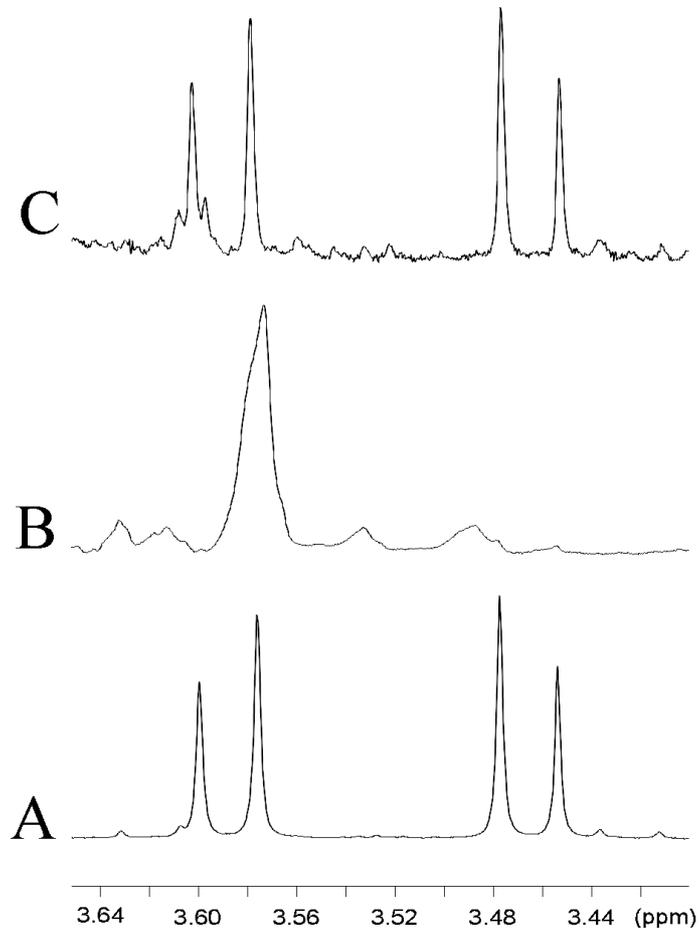


Abbildung 127. ¹H-NMR Spektren (D₂O) der Protonen an Position C-1 von MEP: (A) die unmarkierte Referenz, (B) aus dem Experiment mit (4S) [4-²H₁]NADPH und (C) aus dem Experiment mit (4R) [4-²H₁]NADPH.

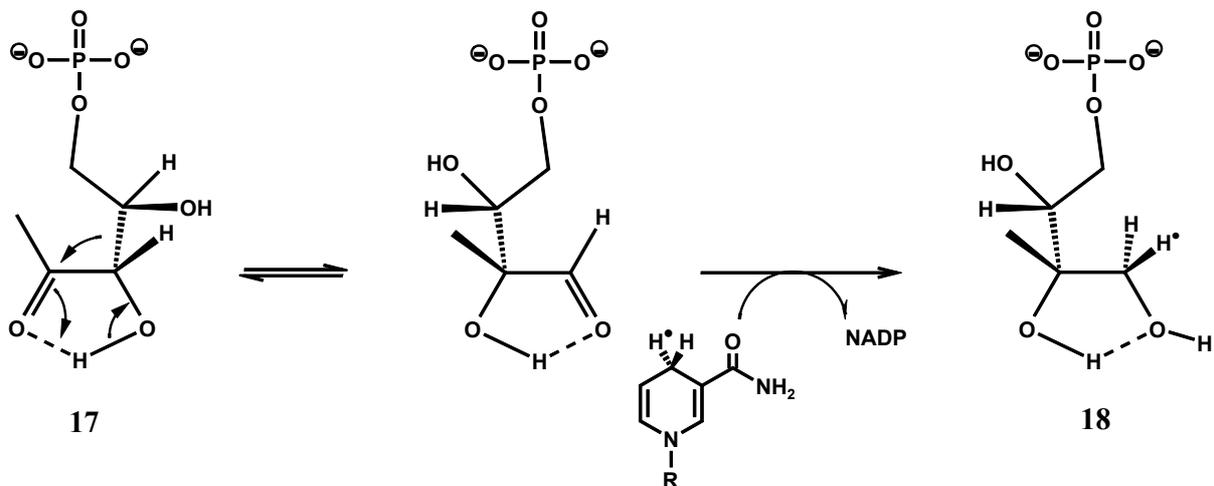


Abbildung 128. Umsetzung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (17) mit (4S) [4-²H₁]NADPH.

3.5.3 Sepiapterinreduktase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stereochemie der murinen Sepiapterinreduktase (SR, aus *E. coli* exprimiert) mit Hilfe selektiv deuteriertem NADPH bestimmt.

Die SR ist ein Enzym der Tetrahydrobiopterin Biosynthese (Abbildung 129). Tetrahydrobiopterin (**66**) ist ein unkonjugiertes Pterin und dient in verschiedenen Stoffwechselwegen als Cofaktor bei Hydroxylierungen. Tetrahydrobiopterin ist an der Bildung verschiedener Neurotransmitter (Dopamin, Norepinephrin, Ephinephrin), sowie der Serotonin- und Melatoninbildung beteiligt (Kaufman, 1959; Nagatsu *et al.*, 1964; Friedman *et al.*, 1972). Defekte bei der von Eukaryonten durchgeführten Biosynthese führen zu mehreren Krankheitsbildern. DOPA-behandelbare Dystonie (Niederwieser *et al.*, 1984) und atypische Phenylketonurie sind neurologische Erkrankungen, die durch den Mangel von Tetrahydrobiopterin und der damit verbundenen Störung der Neurotransmitterbiosynthese ausgelöst werden (Nichol *et al.*, 1985; Blau *et al.*, 1996).

Die SR katalysiert im Rahmen der Tetrahydrobiopterin Biosynthese die Reduktion der beiden Keto-Gruppen von 6-Pyruvoyl-Tetrahydrobiopterin (Abbildung 129; Smith, 1987). SR wurde 1982 das erstmalig vollständig aus Rattenerythrozyten isoliert, gereinigt und charakterisiert (Sueoka und Katoh, 1982). Die erste beschriebene Reaktion des Enzyms, die ihm auch den Namen gab, war die Reduktion von Sepiapterin (**67**) zu Dihydrobiopterin (**68**) (Abbildung 130; Nagai, 1968). Die Reaktion ist für den Nachweis der Aktivität der SR von Bedeutung. Im Enzymtest erfolgt anschließend die Oxidation des Dihydrobiopterins (**68**) zu Biopterin (**69**), das mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden kann (Ferré und Naylor, 1987).

Die murine SR akzeptiert, im Gegensatz zu SR aus anderen Spezies, ausschließlich NADPH als Protonendonator (Herrmann, 1999). In den Kristallstrukturen der murinen SR bindet die Ribose von NADPH an Lys 175. Die Lage von NADPH zum Substrat in der katalytischen Tasche deutet auf einen Protoneneinbau von der B-Seite des Coenzym (Herrmann, 1999). Das pH Optimum des Enzyms liegt bei pH 4,5.

Stereochemie von Reduktasen - Sepiapterinreduktase

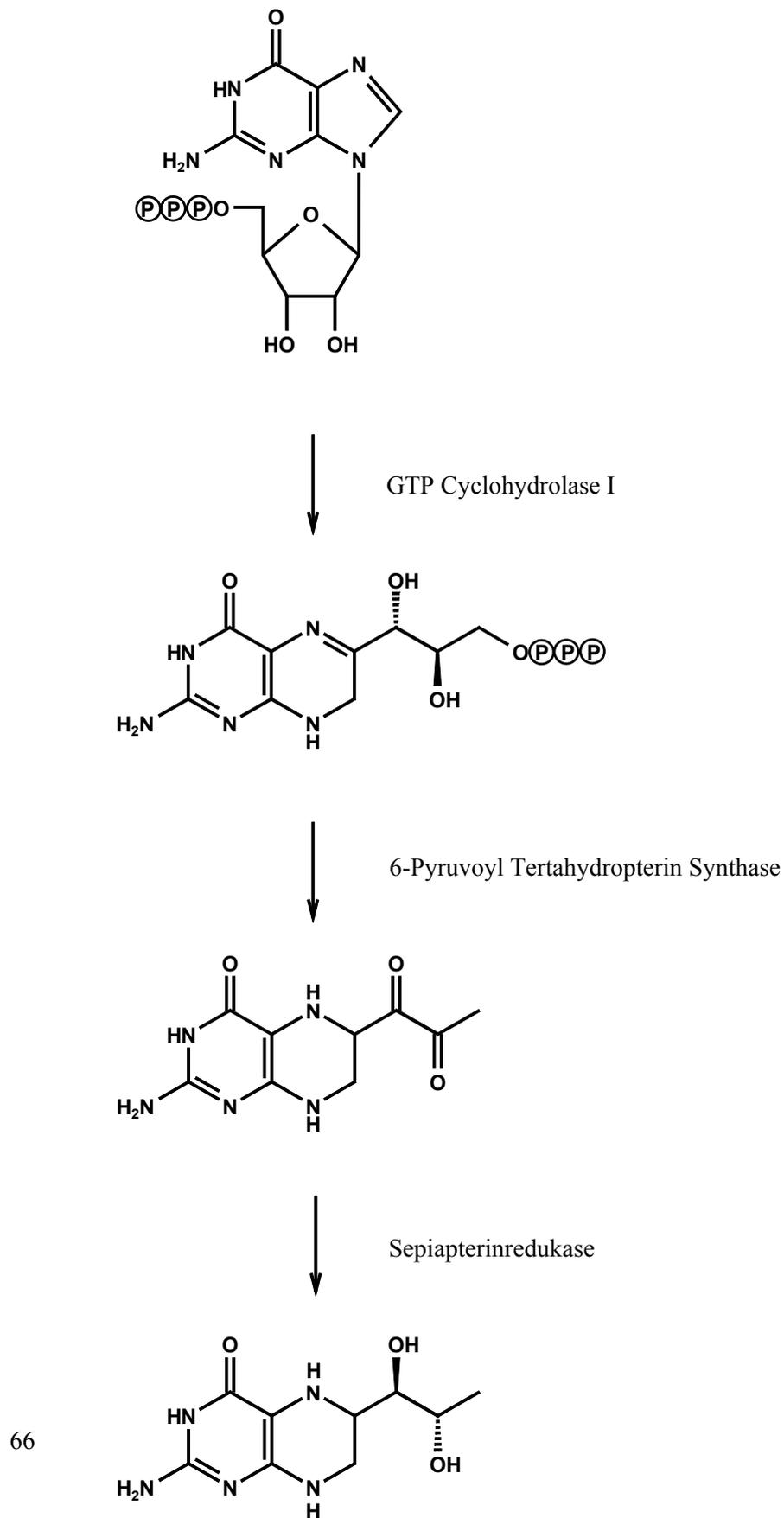


Abbildung 129. Biosynthese von Tetrahydrobiopterin (66).

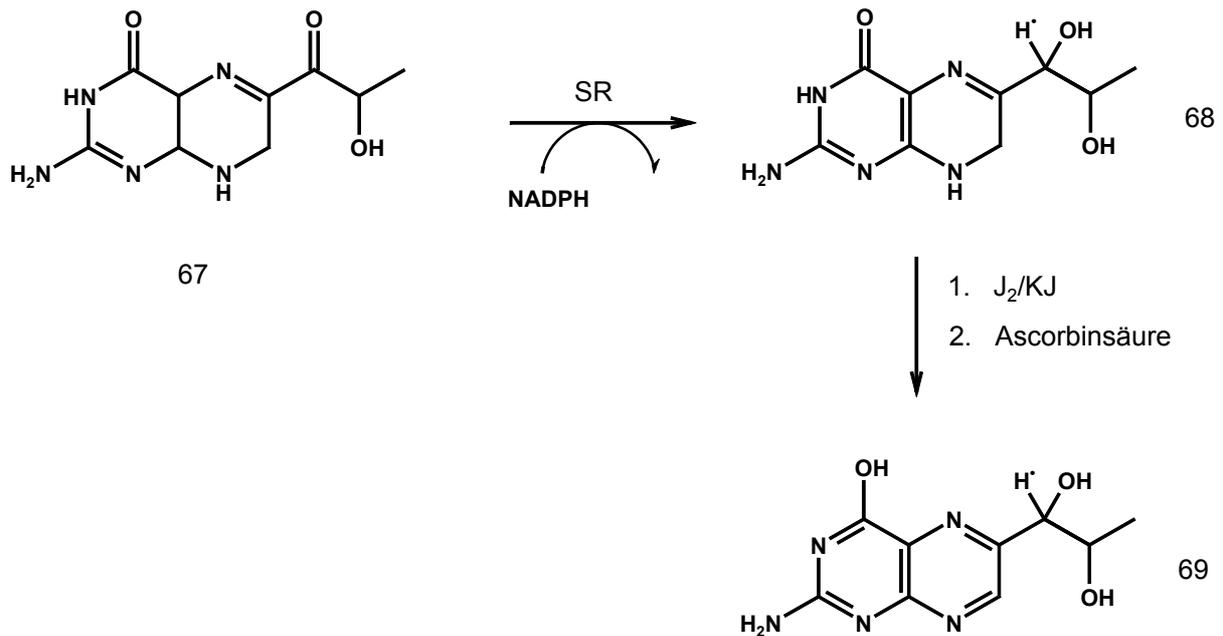


Abbildung 130. Enzymatische Umsetzung von L-Sepiapterin (66) mit NADPH zu Dihydrobiopterin (68) und anschließender Oxidation zu Biopterin (69).

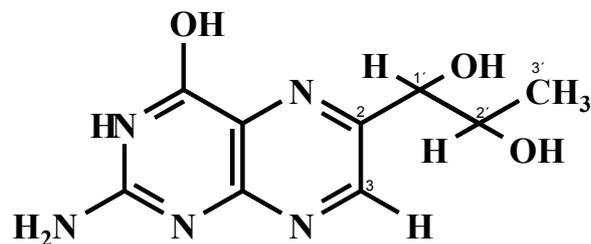


Abbildung 131. Biopterin (69)

Messergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stereochemie der murinen SR (exprimiert aus *E. coli*) auf enzymatischer Ebene in vitro untersucht.

Sepiapterin wurde in Anwesenheit von muriner SR mit (4S) und (4R) [4-²H₁]NADPH umgesetzt. Das gebildete Dihydrobiopterin wurde mit KJ/J₂ zu Biopterin oxidiert. Das gereinigte Biopterin (69) wurde mit ¹H NMR Spektroskopie analysiert (Abbildung 131).

Es kommt zu keinem Deuteriumeinbau bei der Umsetzung mit (4R) [4-²H₁]NADPH. Die Protonen an den Positionen C-1', C-2' und C-3' von Biopterin (69) nach der Umsetzung ergeben die gleiche Signalaufspaltung und Integralhöhe, wie bei dem unmarkierten Vergleich (Tabelle 95 und Abbildung 132, C).

Stereochemie von Reduktasen - Sepiapterinreduktase

Bei der Umsetzung mit (4S) [4-²H₁]NADPH kommt es zum Deuteriumeinbau (Abbildung 132, **B**). Im NMR Spektrum wird der Deuteriumeinbau, durch die Veränderung der Signalintensitäten an den Positionen C-1' und C-2' sichtbar, sowie an den unterschiedlich hohen Signalen in den Dubletts von Position C-1' und C-3' (Tabelle 96 und Abbildung 132, **B**).

Gemäß der NMR Signale liegen in der Probe drei verschiedene Verbindungen vor. Das Biopterin in der NMR Probe liegt unmarkiert (**a**), an Position C-2' (**b**) oder an Position C-1' (**c**) markiert vor (Abbildung 134, **A**). Das NMR Signal an Position C-1' setzt sich aus einem Dublett über die Verbindung (**a**) und einem Singulett über die Verbindung (**b**) zusammen (Abbildung 134, **B**). Die Nachbarschaft mit dem Deuterium bewirkt einen Shift des Singulett. Das Singulett liegt im NMR Signal über dem rechten Teil des Dubletts (Abbildung 134, **C**). Das Signal von Position C-3' enthält ein Dublett über die Verbindungen (**a**) und (**c**). Daneben ergibt sich aus der Verbindung (**b**) ein Singulett mit Shift (Abbildung 134, **C**).

Gemäß den Integralen der Signale von C-1' und C-2' liegen beide Positionen teilweise deuteriert vor (Tabelle 95). Durch die Keto-Enol-Tautomerie im Sepiapterin (**67**) kann das Deuterium sowohl in Position C-1', wie in Position C-2' eingebaut werden (Abbildung 133). Das Integral der Position C-1' ist, durch die Wasserunterdrückung, keine realistische Wiedergabe der Deuteriumsmenge im Gesamtmolekül. Die Positionen C-2' liegt zu 48 % deuteriert vor. Eine exakte Berechnung der drei Verbindungen (**a**), (**b**) und (**c**) ist mit den vorliegenden Daten nicht möglich.

Die SR verhält sich wie eine B-Reduktase. Das pro-S Proton aus NADPH wird bei der Enzymreaktion von SR in das Substrat eingeführt (Abbildung 133). Das Experiment bestätigt die Ergebnisse der Kristallstrukturanalyse der SR mit NADPH (Herrmann, 1999).

Tabelle 95. Integrale der ¹H-NMR Spektren (D₂O) der Protonen an den Positionen C-1', C-2' und C-3' von Biopterin. (**A**) die unmarkierte Referenz, (**B**) aus dem Experiment mit (4S) [4-²H₁]NADPH und (**C**) aus dem Experiment mit (4R) [4-²H₁]NADPH.

Position	chem.	Kopplungs- konstante	Integrale		
	Verschiebung δ [ppm]		J _{CC} [Hz]	A	B
1'	4,9	5,0 (d)	1,0133	0,4342	1,0000
2'	4,2	5,1/6,5 (m)	0,9922	0,5096	1,0205
3'	1,2	6,5 (d)	2,9787	3,0000	2,9689

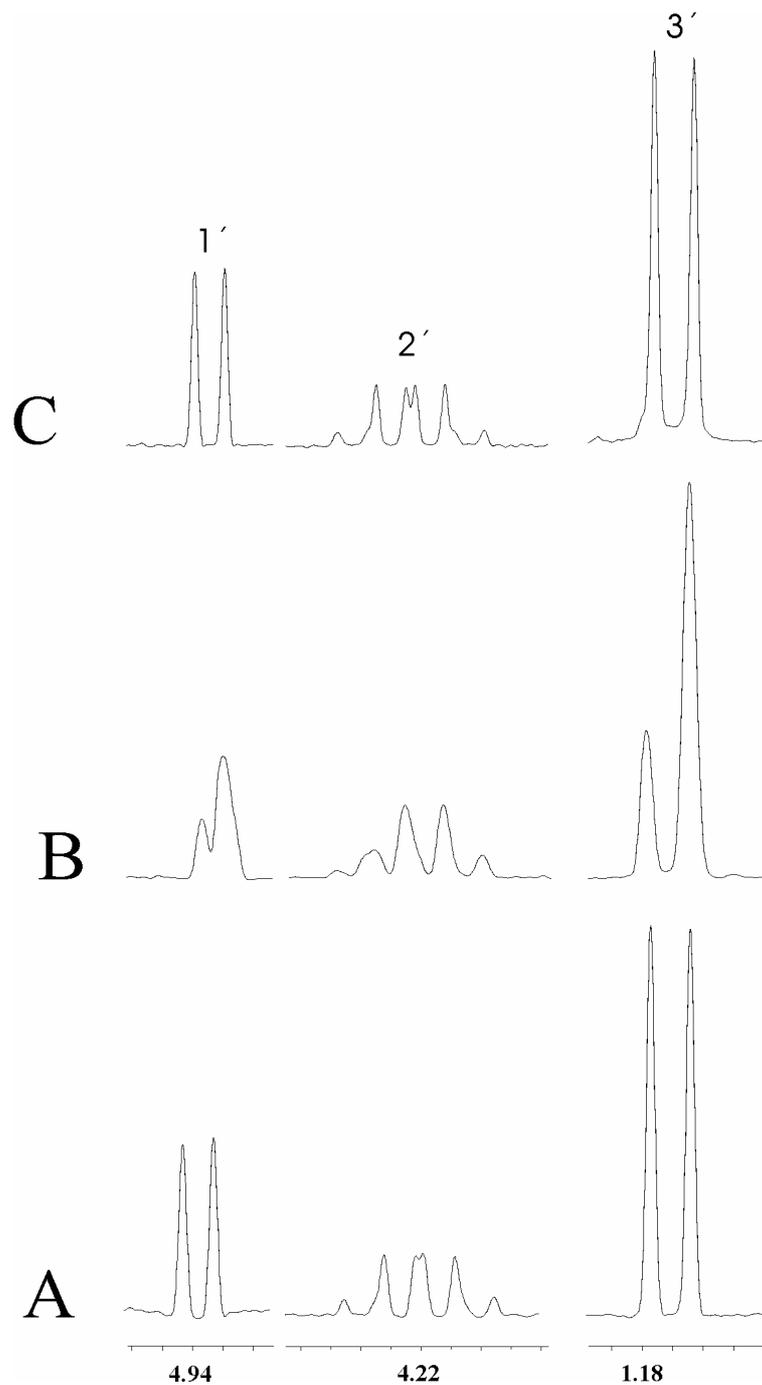


Abbildung 132. ¹H-NMR Spektren (D₂O) der Protonen an den Positionen C-1', C-2' und C-3' von Biopterin. (A) Die unmarkierte Referenz, (B) aus dem Experiment mit (4S) [4-²H₁]NADPH und (C) aus dem Experiment mit (4R) [4-²H₁]NADPH.

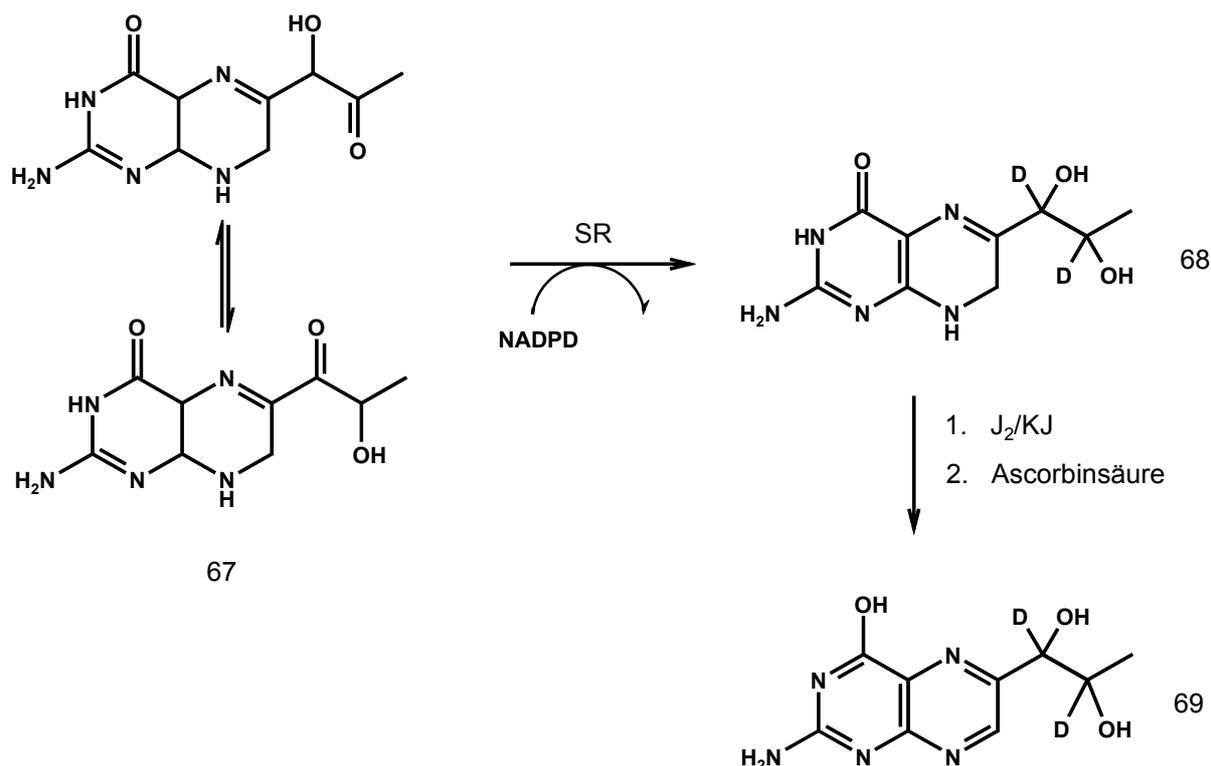


Abbildung 133. Enzymatische Umsetzung von Sepiapterin (**67**) zu Biopterin (**69**) mit (4S) [4-²H₁]]NADPH.

Tabelle 96. Integrale der ¹H-NMR Spektren (D₂O) der Protonen an den Positionen C-1' und C-3' von Biopterin. (A) die unmarkierte Referenz und (B) aus dem Experiment mit (4S) [4-²H₁]]NADPH.

Position	A		B	
	rechts	links	rechts	links
1'	0,4952	0,5181	0,1070	0,3281
3'	1,4882	1,4905	0,8065	2,1938

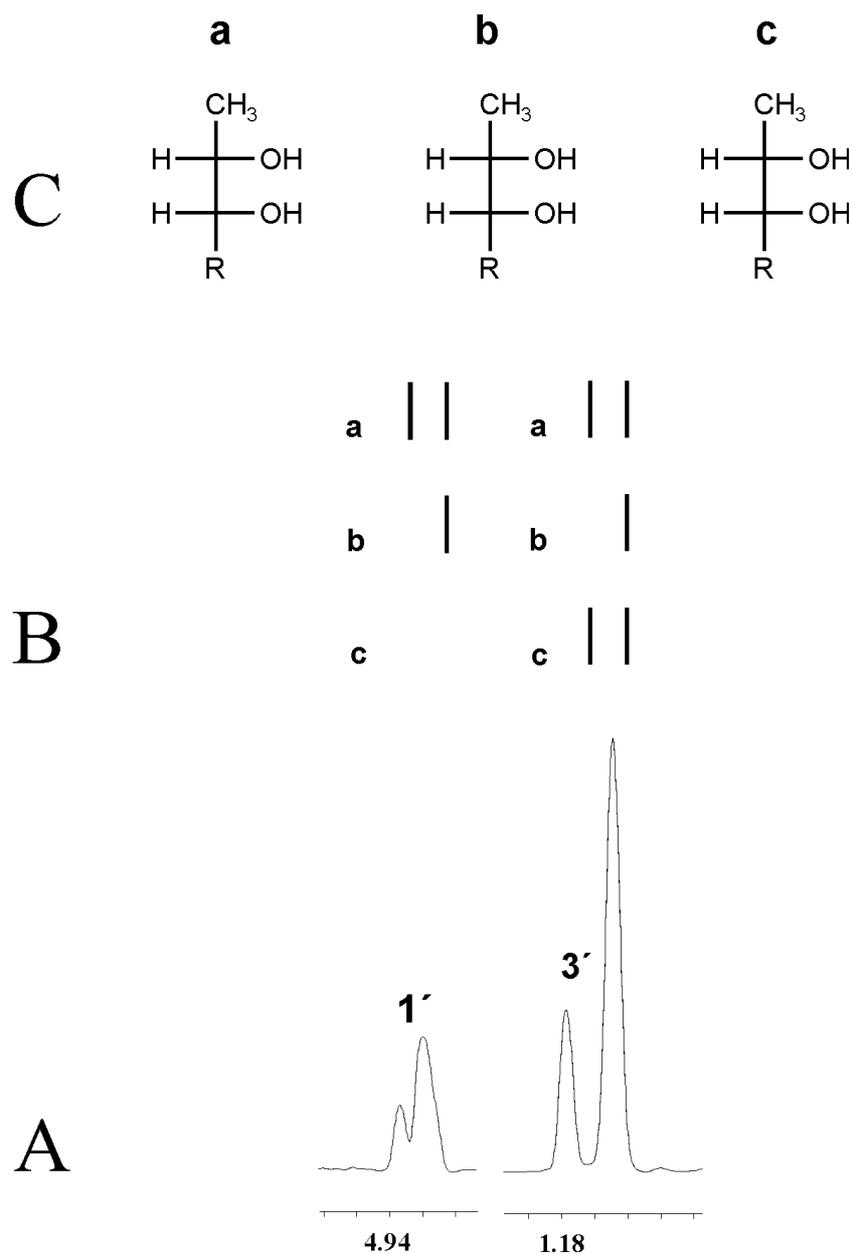


Abbildung 134. Mögliche Markierungsmuster des Biopterins nach dem Einbau von (4S) [4-²H₁]NADPH: (a) unmarkiert, (b) Position C-2' deuteriert und (c) Position C-3' deuteriert. Schematische Darstellung der Signalzusammensetzung im NMR Spektrum für die Positionen C-1' und C-3'.

3.5.4 Diskussion

Die selektive Deuterierung von NADH bzw. NADPH in Kombination mit NMR spektroskopischen Methoden ist eine gute und zuverlässige Methode zur Bestimmung der Stereochemie von NADH bzw. NADPH abhängigen Reduktasen.

4 Zusammenfassung

Die Biosynthesewege der isoprenoiden Verbindungen Phytol, Geranylgeraniol, *cis*-Abienol, Sitosterol und Stigmasterol, sowie des Alkaloids Nicotin wurden in *in vivo* Markierungsexperimenten in *Chloroflexus aurantiacus*, *Catharanthus roseus* und *Nicotiana tabacum* (Wildtyp, RPO Mutante, NDH 53-25 Mutante und NDH 54-3IV Mutante) mit ^{13}C -markierten Vorstufen $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Glycin}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{D-Glucose}$ und $^{13}\text{CO}_2$ untersucht. Dabei wurden Häufigkeiten von einfach und mehrfach ^{13}C -markierten Isotopologen durch NMR Spektroskopie bestimmt. Die Markierungsmuster von zentralen Stoffwechselintermediaten (z.B. Acetyl-CoA, Triosphosphat und Ribosephosphat) wurden aus den Daten von Aminosäuren und Ribonukleoside retrobiosynthetisch bestimmt. Die Muster dienen zur Vorhersage von hypothetischen Isotopologzusammensetzungen in den Isoprenoiden und im Nicotin. Durch Vergleich mit den spektroskopisch bestimmten Mustern wurden Biosynthesewege quantitativ rekonstruiert.

Geranylgeraniol und Phytol werden im Eubakterium *Chloroflexus aurantiacus* ausschließlich über den Mevalonatweg synthetisiert. Sitosterol wird in *Catharanthus roseus* über den Mevalonatweg gebildet. Phytol wird zu 60 % über den Deoxyxylulosephosphatweg und zu 40 % über den Mevalonatweg gebildet. Dies bestätigt, dass Pflanzen gleichzeitig beide Terpenbiosynthesewege benutzen (Mevalonatweg im Cytosol und Deoxyxylulosephosphatweg in den Plastiden) und mindestens ein Produkt aus dem Mevalonatweg (vermutlich Farnesyldiphosphat und/oder IPP) über die Kompartimentgrenzen transportieren („Crosstalk“).

In ganzen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* wurden die primären und sekundären Metabolite in zwei Einbauversuchen mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ und $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{D-Glucose}$ über das Wurzelsystem markiert. Das Alkaloid Nicotin ist deutlich höher markiert als die anderen isolierten primären und sekundären Metabolite. Eine Erklärung hierfür ist die Nicotinbiosynthese im Aufnahmeorgan (Wurzel) und/oder die bevorzugte Biosynthese von Nicotin zu Beginn der Wachstumsperiode. Die Markierungsmuster von Nicotin entsprechen den in der Literatur beschriebenen Biosynthesewegen der Pyrollidin-Einheit über Arginin, bzw. Glutamat und der Pyrrol-Einheit über Aspartat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Das Nicotin aus den NDH Mutanten weist mit dem Wildtyp vergleichbare Markierungsmuster auf.

Zusammenfassung

Sitosterol und Stigmasterol in *Nicotiana tabacum* (Wildtyp und Mutanten) werden hauptsächlich über den Mevalonatweg gebildet. Die Biosynthese von Phytol und *cis*-Abienol im Wildtyp erfolgt zu 70 % über den Deoxyxylulosephosphatweg. Beide Terpene weisen einen vergleichbar hohen Crosstalk wie Phytol in *Catharanthus roseus* auf. In Geranylgeraniol wurden im Einbauversuch mit [U-¹³C₆]D-Glucose keine mehrfach markierten Isotopologe beobachtet. Phytol, Geranylgeraniol und *cis*-Abienol der NDH Mutanten weisen ebenfalls keine mehrfach markierten Isotopologe auf. Es bestehen keine engen metabolischen Beziehungen zu den mehrfach markierten Vorstufen. Es wird von einer Biosynthese über Metabolite aus der Photosynthese ausgegangen.

Das Markierungsmuster von Lysin in *Catharanthus roseus* und *Nicotiana tabacum* konnte keinem der bekannten Biosynthesewege zugeordnet werden. Die aromatischen Aminosäuren der NDH Mutanten weisen keine mehrfach markierten Isotopologe auf.

Im Einbauversuch mit ¹³CO₂ in *Nicotiana tabacum* wurden im Nicotin nicht-stochastische Isotopologmuster gefunden, die Kopplungsblöcke ausschließlich in den Biosynthesevorstufen zeigten. Einbauversuche mit ¹³CO₂ scheinen damit ein geeignetes System für die Aufklärung von Biosynthesewegen in Pflanzen unter physiologischen Bedingungen zu sein.

Die Stereochemie der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase und der Sepia-pterinreduktase wurde mit Hilfe von stereospezifisch deuteriertem NADPH bestimmt. Beide Enzyme verhalten sich wie B-Reduktasen.

5 Literatur

A

ADAM, K.-P. und ZAPP, J. (1998) Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry* **48**, 953 - 959

ADAM, P.; HECHT, S.; EISENREICH, W.; KAISER, J.; GRÄWERT, T.; ARIGONI, D.; BACHER, A. und ROHDICH, F. (2002) Biosynthesis of terpenes. Studies in 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12108 - 12113

ALLISION, L.A.; SIMON, L.D.; MALIGA, P. (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO Journal* **15**, 2802 - 2809

ANDERSON, J.M. (1992) Cytochrome *b6/f* complex: dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynth. Res.* **34**, 341 - 357

ARIGONI, D.; GINER, J.-L.; SANGER, S.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; ZENK, M.H.; KIS, K.; BACHER, A. und EISENREICH, W. (1999) Stereochemical course of the reduction step in the formation of 2-C-methylerythritol from the terpene precursor 1-deoxyxylulose in higher plants. *Chem. Commun.*, 1127 - 1128

ARIGONI, D.; SAGNER, S.; LATZEL, C.; EISENREICH, W.; BACHER, A. und ZENK, M.H. (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10600 - 10605

ALTINCICEK, B.; HINTZ, M.; SANDERBRAND, S.; WIESNER, J.; BECK, E. und JOMAA, H. (2000) Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**, 329 - 333

ALTINCICEK, B.; DUIN, E.C.; REICHENBERG, A.; HEDDERICH, R.; KOLLAS, A.-K.; HINTZ, M.; WAGNER, S.; WIESNER, J.; BECK, E. und JOMAA, H. (2002) LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **532**, 437 - 440

B

BACH, T.J. (1995) Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants - a review. *Lipids* **30** (3), 191 - 202

BACHER, A.; RIEDER, C.; EICHINGER, D.; ARIGONI, D.; FUCHS, G. und EISENREICH, W. (1999) Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. *FEMS Microbiology* **R22**, 567 - 598

BAGGE, P. und LARSSON, C. (1986) Biosynthesis of aromatic amino acids by highly purified spinach chloroplasts-compartmentation and regulation of the reactions. *Physiol. Plantarum* **68**, 641 - 647

BANTHORPE, D.V.; CHARLWOOD, B.V. und FRANCIS, M.J.O. (1972) The biosynthesis of monoterpenes. *Chem Rev.* **72**, 115 - 155

BARRET, G.C. (1985) Chemistry and biochemistry of the amino acids. Chapman and Hall, London • New York

BARTLEY, G.E. und SCOLNIK, P.A. (1995) Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **7**, 1027 - 1038

BATTERSBY, A.R.; SHELDRAKE, P.W. und MILNER, J.A. (1974) Biosynthesis of colchicine. Incorporation of a carbon-13 labeled precursor in a higher plant. *Tetrahedron Letters* **37**, 3315 - 3318

BENNOUN, P. (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4342 - 4356

BERGER, S.; ELLERSIEK, U.; WESTHOFF, P. und STEINMÜLLER, K. (1993) Studies on the expression of *ndhH*, a subunit of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase of higherplant chloroplasts. *Planta* **190**, 25 - 31

BILCK, I.R.C.; BRENNER, J.B.; GILLARD, J.W. und WINZENBERG, K.N. (1974) Alkaloids of *Anthacris tasmanica* (*Solanaceae*). *Anst. J. Chem.* **27**, 2515 - 2518

BLAU, N.; BARNES, I. und DHONDT, J.L. (1996) International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *J. Inherit. Metab. Dis.* **19**, 8 - 14

BLOCH, K. (1992) Sterol molecule: Structure, biosynthesis and function. *Steroids* **57** (8), 378 - 383

BOCHAR, D.A.; FRIESEN, J.A.; STAUFFACHER, C.V. und RODWELL, V.W. (1999) Comprehensive natural products chemistry - Volume 2 (Hrsg.: Cane, D.E.) Elsevier Science B.V., Amsterdam • Neth, 15 - 44

BOLAND, M.J.; HANKS, J.F.; REYNOLDS, P.H.S.; BLEVNIS, D.G.; TOLBERT, N.E. und SCHUBERT, K.R. (1982) Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. *Planta* **155**, 45 - 51

BOLAND, M.J. und SCHUBERT, K.R. (1983) Biosynthesis of purines by a proplastid fraction from soybean nodules. *Arch Biochem Biophys* **220**, 179 - 187

BORRMANN, S.; ADEGNIKA, A.A.; MATSIEGUI, P.-B.; ISSIFOU, S.; SCHINDLER, A.; MAWILI-MBOUMBA, D.P.; BARANEK, T.; WIESNER, J.; JOMAA, H.; KREMSNER, P.G (2004) Fosmidomycin-clindamycin for Plasmodium falciparum infections in African children. *Journal of Infectious Diseases* **189**(5), 901 - 908

BRACHER, A.; EISENREICH, W.; SCHRAMEK, N.; RITZ, H.; GÖTZE, E.; HERRMANN, A.; GÜTLICH, M. und BACHER, A. (1998) Biosynthesis of Pteridines - NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. *The Journal of Biological Chemistry* **273** (43), 28132 - 28141

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive methode for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 - 254

BRINTNALL, S.B. und CONNER-OGORZALY, M. (1986) Economic Botany: Plants in our world. McGraw-Hill Publishing Co., New York

BRITTON, G.; GOODWIN, T. W.; LOCKLEY, W. J. S.; MUNDY, A. P.; PATEL, N. J. und ENGLERT, G. (1979) Stereochemistry of cyclization in carotenoid biosynthesis: Use of

Literatur

¹³C-labelling to elucidate the stereochemical behaviour of the C-1 methyl substituents during zeaxanthin biosynthesis in a *flavobacterium*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 27 - 28

BROERS, S.T.J. (1994) Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz

BRUNE, D.C.; NOZAWA, T. und BLANKENSHIP, R.E. (1987) Antenna organization in green photosynthetic bacteria. 1. Oligomeric bacteriochlorophyll c as a model for the 740 nm absorbing bacteriochlorophyll c in *Chloroflexus aurantiacus* chlorosomes. *Biochemistry* **26**, 8644 - 8652

BRYAN, J.K. (1990) Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. In: *The Biochemistry of Plants*. (Hrsg.: Stumpf, P.K.; Conn, E.E.), Vol. 16 Academic Press, Inc. San Diego, 161 - 195

BRYAN, J.K. (1980) Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In: *The Biochemistry of Plants* (Hrsg.: Stumpf, P.K.; Conn, E.E.), Vol. 5 Academic Press, Inc., San Diego, 403 - 453

BRYCE, J.H. und REES, T. (1985) Rapid decarboxylation of the products of dark fixation of CO₂ in roots of *pisum* and *plantago*. *Phytochemistry* **24**, 1635 - 1638

BUCHHOLZ, B.; REUPKE, B.; BICKEL, H. und SCHULTZ, G. (1979) Reconstitution of amino acid synthesis by combining spinach chloroplasts with other leaf organelles. *Phytochemistry* **18**, 1109 - 1111

BYNG, G.; WHITAKER, R.; FLICK, C. und JENSEN, R.A. (1981) Enzymology of L-tyrosine biosynthesis in corn (*Zea mays*). *Phytochemistry* **20**, 1289 - 1292

C

CANE, D. E.; ROSSI, T.; TILLMAN, A. M. und PACHLATKO, J. P. (1981) Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis. Biosynthesis of pentalenolactone from [U-¹³C₆]glucose and [6-²H₂]glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1838 - 1843

CARMAN, R.M. und DUFFIELD, A.R. (1993) The biosynthesis of labdanoids. The optical purity of naturally occurring manool and abienol. *Aust. J. chem.* **46**(7), 1105 - 1114

CARTAYRADE, A.; SCHWARZ, M.; JAUN, B. und ARIGONI, D. (1994) Second symposium of the european network on plant terpenoids. Straßburg/Bischenberg, 23. - 27. Januar, Abstract P1

CHAMPIGNY, M.-L. und FOYER, C. (1992) Nitrate activation of cytosolic protein kinase diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. *Plant physiol.* **100**, 7 - 12

CHEEKE, P.R. und SHULL, L.R. (1985) Natural toxicants in feeds and poisonous plants. AVI Publishing Company, Inc., Westport

CLEAVES, H.J. und MILLER, S.L. (2001) The Nicotinamide biosynthetic pathway is a by-product of the RNA world. *Journal of Molecular Evolution* **52**, 73 - 77

COGGINS, J.R.; BOOCOCK, M.R.; CAMPBELL, M.S.; CHAUDHURI, S.; LAMBERT, J.M.; LEWENDON, A.; MOUSDALE, D.M. und SMITH, D.D.S. (1985) Functional domains involved in aromatic amino acid biosynthesis. *Biochemical society transactions*, 610th meeting, Vol. 13, Stirling

CONNELLY, J.A. und CONN, E.E. (1986) Tyrosin biosynthesis in *Sorghum bicolor*: Isolation and regulatory properties of arogenate dehydrogenase. *Z. Naturforsch.* **41C**, 69 - 78

CORUZZI, G.M. (1991) Molecular approaches to the study of amino acid biosynthesis in plants. *Plant Science* **74**, 145 - 155

CVEJIC, J.H. und ROHMER, M. (2000) CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. *Phytochemistry* **53**, 21 - 28

D

DAWSON, R.F. (1962) Science in progress (Hrsg.: Brode, W.R.) Yale University Press, New Haven, **117**

DAWSON, R.F. und OSDENE, T.S. (1972) Speculative view of tobacco alkaloid biosynthesis. *Recent Advan. Phytochem.* **5**, 317 - 338

DEWEY, L.J.; BYERRUM, R.U. und BALL, C.D. (1955) Biosynthesis of the pyrrolidine ring of nicotine. *Biochim Biophys Acta* **18**, 141 - 142

DISCH, A.; SCHWENDER, J.; MÜLLER, C.; LICHTENBERG, H.K. und ROHMER, M. (1998a) Mevalonate versus glyceraldehyde phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synchocystis*. *Biochem. J.* **333**, 381 - 388

DISCH, A.; HEMMERLIN, A.; BACH, T. J. und ROHMER, M. (1998b) Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem. J.* **331**, 615 - 621

DISCH, A. und ROHMER, M. (1998) On the absence of the glyceraldehyd-3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 201 - 208

DOBELIS, I.N. (1989) Magic and medicine of plants. Reader's Digest Books, Pleasantville

DOSE, K. (1991) Biochemie. Springer Verlag, Berlin • Hamburg, 2. Auflage

DUFFEY, S.S. (1986) Plant glandular trichomes: their partial role in defence against insects. In: Insects and the plants surface. (Hrsg.: Juniper, B.E. und Southwood, T.R.E.) Edward Arnold, London, 151 - 172

DUVOLD, T.; BRAVO, J. M.; PALE-GROSDÉMANGE, C. und ROHMER, M. (1997) Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol, a putative C₅ intermediate in the mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **38**, 4769 - 4772

E

EICHINGER, D. (1997) Retroanalytische NMR Untersuchungen zur Biosynthese der Indolalkaloidvorstufen Loganin und von Anthrachinoglykosiden in höheren Pflanzen. Dissertation, Technische Universität München

EICHINGER, D. (1993) Isolierung des Monoterpens Loganin aus *R. serpentina*. Diplomarbeit, TU München.

EICHINGER, D.; EISENREICH, W.; ZENK, M.H. und BACHER, A. (1999) Analysis of metabolic pathways via quantitative prediction of isotope labeling patterns: a retrobiosynthetic ¹³C-NMR study on the monoterpene loganin. *Phytochemistry* **51**(2), 223 - 236

Literatur

- EISENREICH, W.; ETTENHUBER, C.; LAUPITZ, R.; THEUS C. und BACHER A. (2004) Isotopolog perturbation techniques for metabolic networks: metabolic recycling of nutritional glucose in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(17), 6764 - 6769
- EISENREICH, W.; ROHDRICH, F. und BACHER, A. (2001) The deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* **6**, 78 - 84
- EISENREICH, W. UND BACHER, A. (1999) Elucidation of biosynthetic pathways by retrodictiv/predictiv comparison of isomer patterns determined by NMR spectroscopy. In: Genetic engineering, principles and methods. (Hrsg.: Setlow, J.K.) Kluwer academic/Plenum Publisher Vol. **22**, 121 - 151
- EISENREICH, W.; SCHWARZ, M.; CARTAYRADE, A.; ARIGONI, D.; ZENK, M.H. und BACHER, A. (1998) The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology* **5** (9), R221 - R233
- EISENREICH, W.; SAGNER, S.; ZENK, M. H. und BACHER, A. (1997) Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Letters* **38**, 3889 - 3892
- EISENREICH, W.; MENHARD, B.; HYLANDS, P. J.; ZENK, M. H. und BACHER, A. (1996) Studies on the biosynthesis of taxol: The taxan carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6431-6436.
- EISENREICH, W.; STRAUß, G.; WERZ, U.; FUCHS, G. und BACHER, A. (1993) Retrobiosynthetic analysis of carbon fixation in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Eur. J. Biochem.* **215**, 619 - 632
- EISENREICH, W.; SCHWARZKOPF, B. und BACHER, A. (1991) Biosynthesis of nucleotides, flavins, and deazaflavins in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 9622 - 9631
- EKIEL, I.; SPOTT, G. D. und SMITH, I. C. P. (1986) Mevalonic acid is partially synthesized from amino acids in *Halobacterium cutirubrum*. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J. Bacteriol.* **166**, 559 - 564
- ENDREß, R. (1994) *Platn cell biotechnologie*. Springer-Verlag, Berlin • Heidelberg,
- F**
- FALBE, J. und REGITZ, M. (Hrsg.) (1998) *Römpf Lexikon Chemie* Thieme Verlag, Stuttgart • New York (10. Auflage)
- FERRÉ, J. und NAYLOR, E.W. (1987) Sepiapterin reductase in cultures human cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **148**, 1475 - 1481
- FLESCH, G. und ROHMER, M. (1988) Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. *Eur. J. Biochem.* **175**, 405 - 411
- FORSTER, J.W. und MOAT, A.G. (1980) Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiological Reviews* **44**, 83 - 105
- FREUDIG, D. und SAUERMAST, P. (HRSG.) (2001) *Lexikon der Biologie* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

FRIEDMAN, P.A.; KAPPELMAN, A.H. und KAUFMAN, S. (1972) Partial purification and characterization of tryptophane hydroxylase from rabbit hindbrain. *J. Biol.Chem.* **247**, 4165 - 4173

FRIEDRICH, T.; STEINMÜLLER, K. und WEISS, H. (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue of chloroplasts. *FEBS Letters* **367**, 107 - 111

FUCHS, G. (1989) Alternative pathway of autotrophic CO₂ fixation. In: Autotrophic bacteria (Schlegel, H.G. und Brown, B.; Hrsg.) Science Tech Publisher, Madison, 365 - 382

FUNAYAMA, S.; ISHIBASHI, M.; KOMIYAMA, K. und OMURA, S. (1990) Biosynthesis of furanocoumarins A and B. *J. Org. Chem.* **55**, 1132 - 1133

G

GAERTNER, F.H. und SHETTY, A.S. (1977) Kynureninase-type enzymes and the evolution of the aerobic tryptophan-to-nicotinamide adenine dinucleotide pathway. *Biochim Biophys Acta* **482**, 453 - 460

GAINES, C.G.; BYNG, G.S.; WHITAKER, R.J. und JENSEN, R.A. (1982) L-Tyrosine regulation and biosynthesis via arogenate dehydrogenase in suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca* Speng. et Comes. *Planta* **156**, 233 - 240

GIBSON, J.; LUDWIG, W.; STACKEBRANDT, E. und WOESE, C.R. (1985) The phylogeny of the green photosynthetic bacteria: Absence of a close relationship between *Chlorobium* and *Chloroflexus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 152 - 156

GINGER, M.L.; CHANCE, M.L.; SADLER, I.H. und GOAD, L.J. (2001) The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(15), 11674 - 11682

GILCHRIST, D.G. und KOSUGE, T. (1980) Aromatic amino acid biosynthesis and its regulation. In: The Biochemistry of Plants (Hrsg.: Stumpf, P.K. und Conn, E.E.), Vol. 5 Academic Press, Inc., San Diego, 507 - 532

GIOVANELLI, J.; MUDD, S.H. und DATKO, A.H. (1989) Regulatory structure of the biosynthetic pathway for the aspartate family of amino acids in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6747, with special reference to the role of aspartokinase. *Plant Physiol* **90**, 1584 - 1599

GOLDS, T.J.; MALIGA, P. und KOOP, H.U. (1993) Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology* **11**, 95 - 97

GOTTLIEB, L.D. (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* **216**, 373 - 308

GROLLE, S.; BRINGER-MEYER, S. und SAHM, H. (2000) Isolation of the *dxr* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *FEBS* **448**, 115 - 119

GUEDENY, G.; CORNEILLE, S.; CUINÉ, S. und PELTIER, G. (1996) Evidence for an association of *ndhB*, *ndhJ* gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Letters* **378**, 277 - 280

GUO, Z.; SEVERSON, R.F. und WAGNER, G.J. (1994) Biosynthesis of the diterpene cis-Abienol in Cell-Free Extracts of tobacco trichomes. *Archivs of biochemistry and biophysics* **308**, 103 - 108

H

HALFEN, L.H. (1972) Carotinoids of gliding organism containing bacteriochlorophylls. *Arch. Mikrobiol.* **82**, 240 - 246

HATCH, D. (1987) C₄ photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 81 - 106

HECHT, S.; KIS, K.; EISENREICH, W.; AMSLINGER, S.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; HERZ, S.; ROHDICH, F. und BACHER A. (2001a) Enzyme-assisted preparation of isotope-labeled 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *J. Org. Chem.* **66**, 3948 - 3952

HECHT, S.; EISENREICH, W.; ADAM, P.; AMSLINGER, P.; KIS, K.; BACHER, A.; ARIGONI, D. und ROHDICH, F. (2001b) Studies on the non-mevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14837 - 14842

HEDTKE, B.; BÖRNER, T. und WEIHE, A. (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerase in *Arabidopsis*. *Science* **277**, 809 - 811

HEINTZE, A.; GÖRLACH, J.; LEUSCHNER, C.; HOPPE, P.; HAGELSTEIN, P.; SCHULZ-SIEBERT, D. und SCHULTZ, G. (1990) Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. *Plant Physiol.* **93**, 1121 - 1127

HEMMERLIN, A.; HOEFFLER, J.-F.; MEYER, O.; TRITSCH, D.; KAGAN, I.A.; GROSDEMANGE-BILLIARD, C.; ROHMER, M. und BACH, T.J. (2003) Cross-talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**(29), 26666 - 26676.

HERBERT, R. B. (1981) The biosynthesis of secondary metabolites. Chapman & Hall, London, 70 - 73

HERRMANN, A. (1999) Doktorarbeit: Rekombinate Expression, in vitro Mutagenese und Reaktionsmechanismus von Enzymen der Tetrahydrobiopterin-Biosynthese aus Säugetieren. Technische Universität München, Lehrstuhl für organischen Chemie und Biochemie

HERRMANN, R.G. (1997) Eukaryotism, towards a new interpretation. In: Eukaryotism and Symbiosis. (Hrsg.: Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G.; Jeon, K.W.; Müller, N.E. und Schwemmler, W.) Springer Verlag, Berlin, 73 - 121

HERTER, S.; FUCHS, G.; BACHER, A. und EISENREICH, W. (2002) A bicyclic autotrophic CO₂ fixation pathway in *Chloroflexus aurantiacus*. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(23), 20277 - 20283

HERTER, S.; FARFSING, J.; GADÓN, N.; RIEDER, C.; EISENREICH, W.; BACHER, A. und FUCHS, G. (2001) Autotrophic CO₂ fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: Study of glyoxylate formation and assimilation via the 3-hydroxypropionate cycle. *J. Bacteriol.* **183**, 4305 - 4316

HERZ, S. (2000) Expression von Gene der Riboflavin- und Terpenbiosynthese und Charakterisierung der entsprechenden Proteine. Dissertation, Technische Universität München

HEß, D. (1992) Biotechnologie der Pflanzen UTB, Stuttgart

Literatur

HESSE, M.; MEIER, H. und ZEEH, B. (1987) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage

HEYWOOD, V.H. (1993) Flowering plants of the world. Oxford University Press, New York

HILL, R.K.; SAWADA, S.M. und ARFIN, S.M. (1979) Stereochemistry of valine and isoleucine biosynthesis. IV. Synthesis, configuration, and enzymatic specificity of α -acetolactate and α -aceto- α -hydroxybutyrate. *Bioorg.Chem* **8**, 175 - 189

HINTZ, M.; REICHENBERG, A.; ALTINCICEK, B.; BAHR, U.; GSCHWIND, R.M.; KOLLAS; A.-K.; BECK, E.; WIESNER, J.; EBERL, M. und JOMAA, H. (2001) Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in Escherichia coli. *FEBS Letters* **509**(2), 317 - 322

HOLO, H. (1989) *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate. *Arch. Microbiol.* **151**, 252 - 256

HOLO, H. AND GRACE, D. (1987) Polyglucose synthesis in *Chloroflexus aurantiacus* studied by ¹³C-NMR. *Arch Microbiol.* **148**, 292 - 297

HOLO, H. und SIREVÅG, R. (1986) Autotrophic growth and CO₂ fixation of *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.* **145**, 173 - 180

HUTCHINSON, C.R.; HECKENDORF, A.H.; DADDONA, P.E.; HAGAMAN, E. und WENKERT, E. (1974) Biosynthesis of camptothecin. I. Definition of the overall pathway assisted by carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis. *J. Amer. Chem. Soc.* **96**, 5609-5611

I/J

IGLOI, G.L. und KÖSSEL, H. (1992) The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**, 525 - 558

ITOH, D.; KARUNAGODA, R.P.; FUSHIE, T.; KATOH, K. und NABETA, K. (2000) Non-equivalent labeling of the phytyl side chain of chlorophyll A in callus of the hornwort *Anthoceros punctatus*. *J. Nat. Prod.* **63**; 1090 - 1093

JENSEN, R.A. (1985) The shikimate/arogenate pathway: Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol. Plant.* **66**, 164 - 168

JOMAA, H.; WIESNER, J.; SADERBRAND, S.; ALTINICICEK, B.; WIEDENMEYER, C.; HINTZ, M.; TÜRBAČHOVA, I.; EBERL, M.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H.K.; SOLDATI, D. und BECK, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**, 1573 - 1576

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W. und WIMMER, H. (1998) Dünnschicht Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim • Basel • Cambridge • New York

K

KAUFMAN, S. (1959) Studies on the mechanism of the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.* **234**, 2677 - 2682

KINDL, H. (1994) Biochemie der Pflanzen. Springer Verlag, 4. Auflage

KISAKI T.; MIZUSAKI, S. und TAMAKI, E. (1966) γ -Methylaminobutyraldehyde, a new intermediate in nicotine biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **117**, 677 - 678

KLAUS, S.M.; HUANG, F.-C.; EIBL, C.; KOOP, H.-U. und GOLDS, T.J. (2003) Rapid and proven production of transplastic tobacco plants by restoration of pigmentation and photosynthesis. *The Plant Journal* **35**, 811 - 821

KOFER, W.; KOOP, H.-U.; WANNER, G.; STEINMÜLLER, K. (1998) Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethalene glycol-mediated plastome transformation. *Mol Gen Genet* **258**, 166 - 173

KOLLAS, A.-K.; DUIN, E.C.; EBERL, M.; ALTINCICEK, B.; HINTZ, M.; REICHENBERG, A.; HENSCHKER, D.; HENNE, A.; STEINBRECHER, I.; OSTROVSKY, D.N.; HEDDERICH, R.; BECK, E.; JOMAA, H. und WIESNER, J. (2002) Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoids. *FEBS Lett.* **532**, 432 - 436

KUZUYAMA, T.; TAKAGI, M.; KANEDA, K.; DARI, T. und SETO, H. (2000) Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **41**, 703 - 706

KUZUYAMA, T.; SHIZIMU, T.; TAKAHASHI, S. und SETO, H. (1998a) Fosfidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5 phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **39**(43), 7913 - 7916

KUZUYAMA, T.; TAKAHASHI, S.; WATANABE, H. AND SETO, H. (1998b) 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 nonmevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Letters* **39**(25), 4509 - 4512

L

LANGE, B.M. und CROTEAU, R. (1999) Isoprenoid Biosynthesis via a Mevalonate-Independent Pathway in Plants: Cloning and Heterologous Expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from Peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 170 - 174

LEA, P.L. und LEEGOOD, R.C. (1993) Plant biochemistry and molecular biology. John Wiley & Sons Ltd.

LEE, M.S. (1996) NMR Spektroskopie Retroanalyse von Aminosäuren in Zellkulturen *Taxus chinensis*. Dissertation, Technische Universität München

LEETE, E. (1977) The incorporation of [5,6-¹³C₂]Nicotinic Acid into the tobacco alkaloids examined by the use of ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. *Bioorganic chemistry* **6**, 273 - 286

LEETE, E. (1967) Biosynthesis of the Nicotiana alkaloids. XI. Investigation of tautomerism in N-methyl- Δ 1-pyrrolinium chloride and its incorporation into nicotine. *J Am Chem Soc* **89**, 7081 - 7084

LEETE, E. (1958) Biogenesis of nicotine. V. New precursors of the pyrrolidine ring. *J Am Chem Soc* **80**, 2162 - 2164

LEETE, E. (1955) Biogenesis of nicotine. *Chem Ind (London)*, 537

Literatur

LEETE, E. und BODEM, G.B. (1976) Biosynthesis of shihunine in *Dendrobium pierardii*. *J. Amer. Chem. Soc.* **98**, 6321 - 6325

LEETE, E. und MCDONELL, J.A. (1981) The incorporation of [1-¹³C, ¹⁴C, methylamino-¹⁵N]-N-methylputrescine into nicotine and scopolamine established by means of carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J Am Chem Soc* **103**, 658 - 662

LEETE, E. und SLATTERA, S.A. (1976) Incorporation of [2-¹⁴C]- und [6-¹⁴C]Nicotinic acid into the tobacco alkaloids. Biosynthesis of Anatabine and α,β -Dipyridyl. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 6326 - 6330

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. und COX, M.M. (1998) Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg • Berlin • Oxford

LI, S.-M.; HENNIG, S. und HEIDE, L. (1998) Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of novobiocin via a non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Letters* **39**, 2717 - 2720

LICHTENTHALER, H.K. (1999) The 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate pathway of isoprenoids biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio* **50**, 47 - 55

LICHTENTHALER, H. K. (1998) Der 1-Desoxy-D-xylulose-Biosyntheseweg pflanzlicher Isoprenoide. *Biospektrum* **4**, 49 - 52

LICHTENTHALER, H.K.; ROHMER, M. und SCHWENDER, J. (1997a) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* **101**, 643 - 652

LICHTENTHALER, H. K.; SCHWENDER, J.; DISCH, A. und ROHMER, M. (1997b) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* **400**, 271 - 274

LICHTENTHALER, H.K.; ROHMER, M. und SCHWENDER, J. (1997c) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol.* **101**(3), 643 - 652

LINSMAIER E.M. und SKOOG F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **18**, 100 - 127

LIST, P. und HÖRHAMMER, L. (HRSG.) (1977) Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer Verlag, Berlin • Heidelberg • New York (4. Auflage), 1997 - 109

LOIS, L.M.; CAMPOS, N.; PUTRA, S.R.; DANIELSEN, K.; ROHMER, M. und BORONAT, A. (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyses the synthesis of D-1-deoxyxylulose-5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxal biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12857 - 12862

LUCKNER, M. (1990) Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals. Springer Verlag, 3. Auflage, Berlin • Heidelberg • New York • London • Paris • Tokyo • Hong Kong, 295 - 299

M

MANN (1980) Secondary metabolites. Clarendon Press, Oxford, 112 - 116, 140f

MICHAL, G. (HRSG.) (1999) Biochemical Pathways. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg • Berlin

MIZUSAKI, S.; TANABE, Y.; NOGUCHI, M. und TAMAKI, E. (1971) Phytochemical studies on tobacco alkaloids. XIV. Occurrence and properties of putrescine N-methyltransferase in tobacco roots. *Plant Cell Physiol* **12**, 633 - 640

MIZUSAKI, S.; TANABE, Y.; NOGUCHI, M. und TAMAKI, E. (1972) Phytochemical studies on the tobacco alkaloids. XV. N-methylputrescine oxidase from tobacco roots. *Phytochemistry* **11**, 2757 - 2762

MOLDOVEANU, M. und KATES, M. (1988) Biosynthetic studies of the polar lipids of *Halobacterium cutirubrum*. Formation of isoprenyl ether intermediates. *Biochim. Biophys. Acta* **960**, 164 - 182

N

NABETA, K.; KAWAE, T.; SAITOH, T. und KIKUCHI, T. (1997) Synthesis of chlorophyll a and β -carotene from ^2H and ^{13}C -labelled mevalonates and ^{13}C -labelled glycine in cultured cells of liverworts, *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 261 - 267

NABETA, K.; SAITOH, T. ; ADACHI, K. und KOMURA, K. (1998) Biosynthesis of phytyl side-chain of chlorophyll a: apparent reutilization of carbon dioxide evolved during acetate assimilation in biosynthesis of chloroplastidic isoprenoid. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 671 - 672

NABETA, K.; ISHIKAWA, T. und OKUYAMA, H. (1995a) Sesqui- and di-terpene biosynthesis from ^{13}C labelled acetate and mevalonate in cultured cells of *Heteroscyphus planus*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 3111 - 3115

NABETA, K.; ISHIKAWA, T.; KAWAE, T. und OKUYAMA, H. (1995b) Biosynthesis of heteroscyphic acid A in cell culture of *Heteroscyphus planus*: non-equivalent labelling of C-5 units in diterpene biosynthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 681 - 682

NABETA, K.; KAWAE, T.; KIKUCHI, T.; SAITOH, T. und OKUYAMA, H. (1995c) Biosynthesis of chlorophyll a from ^{13}C -labeled mevalonates and glycine in liverwort. Nonequivalent labeling of phytyl side chain. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **24**, 2529 - 2530

NAGAI, M. (1968) Studies on sepiapterin reductase: Further characterization of the reaction product. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 426 - 435

NAGATSU, T.; LEVITT, M. und UBENFRIED, S. (1964) Tyrosine hydroxylase: The initial step in structure of 6-pyruvoylpterin synthase, an enzyme involved in tetrahydrobiopterin biosynthesis. *J. Biol. Chem* **239**, 2910 - 2917

NICHOL, C.A.; SMITH, G.K. und DUCH, D.S. (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annal. Rev. Biochem.* **54**, 729 - 764

NIEDERWIESER, A.; BLAU, N.; WANG, M.; JOLLER, P.; ATARÉS, und M. CARDESAGARCIA, J. (1984) GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *Eur. J. Pediatr.* **141**, 208 - 214

NIXON, P.J.; GOUNARIS, K.; COOMBER, S.A.; HUNTER, C.N., DYER, T.A. und BARBER, J. (1989) *psbG* is not a photosystem II gene but may be an *ndh* gene. *J. Biol. Chem.* **264**, 14129 - 14135

O

OHAYAMA, K.; KOHCHI, T.; SANO, Y. und YAMADA, Y. (1988) Newly identified groups of genes in chloroplasts. *Trends Biochem Sci* **13**, 19 - 22

OYAIZU, W.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B.; MANDELCO, L.; STUDIER, J.A. und WOESE, C.R. (1987) The green non sulfur bacteria: a deep branching in the eubacterial line of descent. *System. Appl. Microbiol.* **9**, 47 - 53

P

PIEL, J.; DONATH, J.; BANDEMER, K. und BOLAND, W. (1998) Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: induced and constitutive emission of volatiles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 2478 - 2481

PODSCHUN, B. (1992) Stereochemistry of NADPH oxidation by dihydropyrimidine dehydrogenase from pig liver. *Biochemical and biophysical research communications* **182**(2), 609 - 616

PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J. und SIMON, W. (1990) Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden. Springer, Berlin, 3. Auflage

PROTEAU, P.J.; WOO, Y.-H.; WILLIAMSON, R.T. und PHAOSIRI, C. (1999) Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate isomeroreductase. *Organic Letters* **1** (6), 921 - 923

PURICH, D.L. (Hrsg.) (1982) *Methods of Enzymology*. Vol. 87: Enzym kinetics and mechanism. Part C - Intermediates, stereochemistry and rate studies. Academic Press, New York • London • Paris • San Diego • San Francisco • Sao Paulo • Sydney • Tokyo • Toronto, 106 ff

PUTRA, S. R.; LOIS, L. M.; CAMPOS, N.; BORONAT, A. und ROHMER, M. (1998a) Incorporation of [2,3-¹³C₂]- and [2,4-¹³C₂]-D-1-deoxyxylulose into ubiquinone of *Escherichia coli* via the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **39**, 23 - 26

PUTRA, S.R.; DISCH, A.; BRAVO, J.M. und ROHMER, M. (1998b) Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some Gramnegative bacteria and mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **164**, 169 - 175

Q

QURESHI, N. und 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. (Hrsg.) John Wiley, New York, 47 - 94

R

RADYKEWICZ, T.; ROHDICH, F.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; HERZ, S.; KIS, K.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; ZENK, M.H. und ARIGONI, D (2000) Biosynthese of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS Letters* **465**, 157 - 160

RAUSCHENBACH, P.; SCHMIDT, H.L.; SIMON, H.(HRSG.); TYKVA, R. und WENZEL, M. (1974) *Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen*. Springer Verlag, Berlin

Literatur

RICHTER, G. (1998) Stoffwechselfysiologie der Pflanzen - Physiologie und Biochemie des Primären- und Sekundärenstoffwechsels. Thieme Verlag, Stuttgart, 6.Auflage

RIEDER, C. (1999) Retrobiosynthetic studies of carbon flux by NMR detected stable isotope incorporation. Biosynthesis of molybdopterin and of Verrucosan diterpenes. Dissertation, Technische Universität München

RIEDER, C.; STRAUß, G.; FUCHS, G.; ARIGONI, D.; BACHER, A. UND EISENREICH, W. (1998) Biosynthesis of the diterpene verrucosan-2 β -ol in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. A retrobiosynthetic NMR study. *J. Biol. Chem.* **273**(29), 18099 - 18108

RISCH, N.; BROCKMANN JR., H. und GLOE, A. (1979) Strukturaufklärung von neuartigen Bakteriochlorophyllen aus *Chloroflexus aurantiacus*. *Liebigs. Ann. Chem.*, 408 - 418

REUTER, K.; SANDERBRAND, S.; JOMAA, H.; WIESNER, J.; STEINBRECHER, I.; BECK, E.; HINTZ, M.; KLEBE, G. und STUBBS, M.T. (2002) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(7), 5378 - 5384

ROHDICH, F.; ZEPECK, F.; ADAM, P.; HECHT, S.; KAISER, J.; LAUPITZ, R.; GRÄWERT, T.; AMSLINGER, S.; EISENREICH, W., BACHER, A. und ARIGONI, D. (2003) The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(4), 1586 - 1591

ROHDICH, F.; HECHT, S.; GÄRTNER, K.; ADAM, P.; KRIEGER, C.; AMSLINGER, S.; ARIGONI, D.; BACHER, A. und EISENREICH, W. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1158 - 1163

ROHDICH, F.; KIS, K.; BACHER, A. und EISENREICH, W. (2001a) The non-mevalonate pathway of isoprenoids: Genes, enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 535 - 540

ROHDICH, F.; EISENREICH, W.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; HECHT, S.; SCHUHR, C.A. und BACHER, A. (2001b) Biosynthesis of terpenoids: 2C-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3190 - 3197

ROHDICH, F.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; FELLERMEIER, M.; SANGER, S.; HERZ, S.; KIS, K.; EISENREICH, W.; BACHER, A. und ZENK, M.H. (1999) Cytidine 5-triphosphate-dependant biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11758 - 11763

ROHMER, M. (1999a) The discovery of a mevalonate - independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565 - 574

ROHMER, M. (1999b) A mevalonate - independent route to isopentenyl diphosphate. In: *Comprehensive natural products chemistry - Volume 2* (Hrsg. : Cane, D.E.) Elsevier Science B.V., Amsterdam • Neth, 45 - 67

ROHMER, M. (1998) Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate - independent route, a novel target for antibacterial drugs? *Progress In Drug Research* **50**, 135 - 154

ROHMER, M.; SEEMANN, M.; HORBACH, S.; BRINGER-MEYER, S. und SAHM, H. (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2564 - 5266

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B. und SAHM, H. (1993a) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphat. *Biochem. J.* **295**, 517 - 524

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B. und SAHM, H. (1993b) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.* **295**, 517 - 524

ROHMER, M.; SUTTER, B. und SAHM, H. (1989) Bacterial sterol surrogates. Biosynthesis of the side-chain of bacteriohopanetetrol and of a carboxylic pseudopentose from ¹³C-labelled glucose in *Zymomonas mobilis*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1471 - 1472

RONTANI, J.-F. und VOLKMAN, J.K. (2003) Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Organic Geochemistry* **34**, 1 - 35

RUBIN, J.L. und JENSEN, R.A. (1979) Enzymology of L-tyrosine biosynthesis in Mung Bean (*Vigna radiata* [L.] Witzcek). *Plant Physiol.* **64**, 727 - 734

S

SACCHETTINI, J.C. und POULTER, C.D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* **277**, 1788 - 1789

SAGNER, S.; EISENREICH, W.; FELLERMEIER, M.; LATZEL, C.; BACHER, A. und ZENK, M. H. (1998a) Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol in plants by rearrangement of the terpenoid precursor, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *Tetrahedron Letters* **39**, 2091 - 2094

SAGNER, S.; LATZEL, C.; EISENREICH, W.; BACHER, A. und ZENK, M. H. (1998b) Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into monoterpenes and carotenoids in higher plants. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 221 - 222

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. und MANIATIS, M. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2. Auflage)

SANTIS-MACIASSEK, G.; KOFER, W.; BOCK, A.; SCHOCH, S.; MAIER, R.; WANNER, G.; RÜDIGER, W.; KOOP, H.-U. und HERRMANN, R. (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes rpo A, B and C1: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *The Plant Journal* **18**(5), 477 - 487

SAUER, K.; SMITH, J.R.L. und SCHULTZ, A.J. (1966) The dimerization of chlorophyll a, chlorophyll b and bacteriochlorophyll in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2681 - 2688

SCHMIDT, C.L.; DANNEEL, H.J.; SCHULTZ, G. und BUCHANAN, B.B. (1990) Shikimate kinase from spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **93**, 758 - 766

SMITH, G.K. (1987) On the role of sepiapterin reductase in the biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 254 - 266

- SCHÖNHEIMER, R. und RITTENBERG, D. (1935) Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. *Science* **82**, 156 - 157
- SCHUHR, C.A.; RADYKEWICZ, T.; SAGNER, S.; LATZEL, C.; ZENK, M.H.; ARIGONI, D.; BACHER, A.; ROHDICH, F. und EISENREICH, W. (2003) Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **R 2**, 3 - 16
- SCHUHR, C.; HECHT, S.; KIS, K.; EISENREICH, W.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; BACHER, A. und ROHDICH, F. (2001) Studies on the non-mevalonate pathway - Preparation and Properties of isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate *Eur. J. Org. Chem.*, 3221 - 3226
- SCHUHR, C.A.; EISENREICH, W.; GOESE, M.; STOHLER, P.; WEBER, W.; KUPFER, E. und BACHER, A. (2002), Biosynthetic precursors of the lipase inhibitor lipstatin. *Journal of Organic Chemistry*, **67**(7), 2257 - 2262
- SCHULZE-SIEBERT, D.; HEINEKE, D.; SCHARF, H. und SCHULTZ G. (1984) Pyruvate-derived amino acids in spinach chloroplasts. Synthesis and regulation during photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiol* **76**, 465 - 471
- SCHULZE-SIEBERT, D. und SCHULTZ G. (1987) Full autonomy in isoprenoid synthesis in spinach chloroplasts. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 145 - 153
- SCHWARZ, M.K. (1994) Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
- SCHWARZ, M. und ARIGONI, D. (1999) Ginkgolide Biosynthesis. In: Comprehensive Natural Product Chemistry, Vol. 2 (Hrsg. Cane, D.), Pergamon, Oxford, UK, 367 - 400
- SCHWENDER, J.; GEMUNDEN, C. und LICHTENTHALER, H.K. (2001) Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* **212**, 416 - 423
- SCHWENDER, J.; MÜLLER, C.; ZEIDLER, C. und LICHTENTHALER; H.K. (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **455**, 140 - 144
- SCHWENDER, J.; ZEIDLER, J.; GRÖNER, R.; MÜLLER, C.; FOCKE, M.; BRAUN, S.; LICHTENTHALER, F.W. und LICHTENTHALER, H.K. (1997) Incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Letters* **414**, 129 - 134
- SCHWENDER, J.; SEEMANN, M.; LICHTENTHALER, H. K. und ROHMER, M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde-3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* **316**, 73 - 80
- SETO, H. und KUZUYAMA, T. (2001) 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, a novel enzyme in the nonmevalonate pathway from *Escherichia coli*. *PCT Int. Appl.* (WO 2001057223)
- SETO, H.; ORIHARA, N. und FURIHATA, K. (1998) Studies on the biosynthesis of terpenoids produced by actinomycetes. Part 4. Formation of BE-40644 by the mevalonate and nonmevalonate pathways. *Tetrahedron Lett.* **39**, 9497 - 9500

Literatur

SETO, H.; WATANABE, H. und FURIHATA, K. (1996) Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aeriovifer*. *Tetrahedron Letters* **37**, 7979 - 7982

SEVERSON, R.F.; JOHNSON, A.W. und JACKSON, D.M. (1985) Cuticular constituents of tobacco: factors affecting their production and their role in insect and disease resistance and smoke quality. *Recent Adv. Tob. Sci.* **11**, 105 - 174

SHAH, S.P.J. und COSSINS, E.A. (1970) Biosynthesis of glycine and serine by isolated chloroplasts. *Phytochemistry* **9**, 1545 - 1551

SHIGI, Y. (1989) Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**, 131 - 145

SHIN-YA, K.; FURIHATA, K.; HAYAKAWA, Y. und SETO, H. (1990) Biosynthetic studies of naphterpin, a terpenoid metabolite of *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett.* **31**, 6025 - 6026

SIMON, H. (Hrsg.) und FLOSS, H.G. (1967) Anwendung von Isotopen in der organischen Chemie und Biochemie, Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen Springer Verlag, Berlin, 1. Auflage

SPRENGER, G.A.; SCHORKE, U.; WIEGERT, T.; GROLLE, S.; DE GRAAF, A.; TAYLOR, S.V.; BEGLEY, T.P.; BRINGER-MEYER, S. und SAHM, H. (1997) Identification of a thiamindependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12857 - 12862

STEINBACHER, S.; KAISER, J.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; HECHT, S.; EISENREICH, W.; GERHARDT, S.; BACHER, A. und ROHDICH, F. (2002) Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate independent biosynthesis of isoprenoids. *J. Mol. Biol.* **316**(1), 79 - 88

STEWART, G.R.; MANN, A.F. und FENTEM, R.A. (1980) Enzymes of Glutamate Formation: Glutamate Dehydrogenase, Glutamine Synthase, and Glutamate Synthase. In: *The Biochemistry of Plants* (Hrsg.: Stumpf, P.K. und Conn, E.E.), Vol. 5 Academic Press, Inc., San Diego, 271 - 327

STITT, M. und REES, T. AP (1979) Capacities of pea chloroplast to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. *Phytochemistry*, 1905 - 2287

STRAUB, G. und FUCHS, G. (1993) Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Catharanthus roseus*, the 3-hydroxypropionate cycle. *Eur. J. Biochem.* **215**, 633 - 643

STRAUB, G.; EISENREICH, W.; BACHER, A. und FUCHS, G. (1992) ¹³C-NMR study of autotrophic CO₂ fixation pathways in the sulfur-reducing archaeobacterium *Thermoproteus neutrophilus* and in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Eur. J. Biochem.* **205**, 853 - 866

STRYER, L. (1995) Biochemie. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 5. Auflage

SUEOKA, T. und KATOH, S. (1982) Purification and characterization of sepiapterin reductase from rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **717**, 265 - 271

SUGIURA, M. (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* **19**, 149 - 168

Literatur

SVAB, Z. und MALIGA, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 913 - 917

SVAB, Z.; HAJDUKIEWICZ, P. und MALAGIA, P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 8526 - 8530

T

TAKAGI, M.; KUZUYAMA, T.; KANEDA, K.; WATANABE, H.; DAIRI, T. und SETO, H. (2000) Studies in the nonmevalonate pathway: formation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidyl 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol. *Tetrahedron Lett.* **41**, 3395 - 3398

TAKAHASHI, S.; KUZUYAMA, T.; WATANABE, H. und SETO, H. (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 9879 - 9884

THIEL, R.; ADAM, K. P.; ZAPP, J. und BECKER, H. (1997) Isopentenyl diphosphate biosynthesis in liverworts. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **7**, 103 - 105

TIBURCIO, A.F. und GALSTON, A.W. (1986) Arginine decarboxylase as the source of putrescine for tobacco alkaloids. *Phytochemistry* **25**(1), 107 - 110

U/V/W

VOET, D. und VOET, J.G. (1995) Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim, 2. Auflage

VOET, D. und VOET, J.G. (1994) Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim, 1. Auflage

WAGNER, G.J. (1991) Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology* **96**, 675 - 679

WAGNER, R. (1987) Regulation der Nicotinbiosynthese in Tabak. *Pharmazie in unserer Zeit* **2**, 53 - 59

WALTERS, D.S. und STEFFENS, J.C. (1990) Branches chain acid metabolism in the biosynthesis of *Lycopersicon pennellii* glucose esters. *Plant Physiol.* **93**, 1544 - 1551

WANG, E. und WAGNER, G.J. (2003) Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. *Planta* **216**, 686 - 691

WASHITANI, I. und SATO, S. (1977) Studies on the function of proplastids in the metabolism of in vitro-cultured tobacco cells. IV. Gluconeogenic pathway. *Plant Cell Physiol* **18**, 117 - 125

WERNER, I. (1996) Biosynthese von Gallussäure und Aminsäuren in Pflanzen, *In vivo* Biosyntheseuntersuchungen mittels ¹³C-NMR Spektroskopie und Retroanalyse. Dissertation, Technische Universität München

WERNER, I.; BACHER, A. und EISENREICH, W. (1997) Retrobiosynthetic NMR studies with ¹³C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and fungi. *J. Biol. Chem.* **272**, 25474 - 25482

WIGLE, I.D.; MESTICHELLI, L.J.J. und SPENSER, I.D. (1982) ²H-NMR spectroscopy as a probe of the stereochemistry of biosynthetic reaction. The biosynthesis of nicotine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 662 - 664

WOESE, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 227 - 271

WOLFF, M.; SEEMANN, M.; GROSDÉMANGE-BILLIARD, C.; TRITSCH, D.; CAMPOS, N.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; BORONAT, A. und ROHMER, M. (2002) Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*. *Tetrahedron Letters* **43**(14), 2555 - 2559

WUNGSINTAWEEKUL, J. (2001) Enzymes of the alternativ terpenoid pathway in *Escherichia coli*. Dissertation, Technische Universität München

X/Y/Z

YAJIMA, S.; NONAKA, T.; KUZUYAMA, T.; SETO, H. und OHSAWA, K. (2002) Crytal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactore: Implications of a flexible loop movement upon substrate binding. *J. Biochem.* **131**, 313 - 317

YANG, J.-W. und ORIHARA, Y. (2002) Biosynthesis of abietane diterpenoids in cultured cells of *Torreya nucifera* var. *radicans*: Biosynthetic inequality of the FPP part and the terminal IPP. *Tetrahedron* **58**, 1265 - 1270

XIONG, J.; FISCHER, W.M.; INOUE, K.; NAKAHARA, M. und BAUER, C.E. (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* **289**, 1724 - 1730

YOU, K.-S. (1984) Stereospecificity for nicotinamide nucleotides in enzymatic and chemical hydride transfer reaction *Critical Reviews in Biochemistry* **17**, 313 - 451

ZEIDLER, J.; SCHWENDER, J.; MÜLLER, C.; WIESNER, J.; WEIDEMEYER, C.; BECK, E.; JOMAA, H. und LICHTENTHALER, H.K. (1998) Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Zeitung Naturforschung* **53C**, 980 - 986

ZEIDLER, J. G.; LICHTENTHALER, H. K.; MAY, H. U. und LICHTENTHALER, F. W. (1997) Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z. Naturforsch.* **C52**, 15 - 23

Zhou, D. und White, H. (1991) Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **273**, 627 - 634