

FRÜHE STUFEN DES TERPENSTOFFWECHSELS

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Andreas Jux
geboren am 15 Juni 1971 in Bensberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Boland
2. Prof. Dr. E. Anders

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. Juli 2001

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ALLGEMEINES	1
1.2	CHEMIE UND BIOCHEMIE DER TERPENE	4
1.3	DER MEVALONAT-WEG.....	6
1.4	DIE ENTDECKUNG DES METHYLERYTHRITOLPHOSPHAT-WEGES	7
1.5	DIE INDUZIERT ABWEHR BEI PFLANZEN	10
1.6	KOMPARTMENTIERUNG DER TERPENBIOSYNTHESE IN PFLANZEN.....	14
2	AUFGABENSTELLUNG.....	16
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	18
3.1	EINBAUVERSUCHE MIT DEUTERIUMMARKIERTEN INTERMEDIATEN DES MEP- UND DES MVA-WEGES	18
3.1.1	<i>Synthese markierter Vorstufen.....</i>	<i>18</i>
3.1.2	<i>Versuche zum Einbau von d₂-DOX und d₅-MVA in induzierte Terpene der Limabohne</i>	<i>21</i>
3.2	INHIBITORSTUDIEN ZUR TERPENBIOSYNTHESE IN DER LIMABOHNE.....	35
3.2.1	<i>Inhibitoren der MEP-Route</i>	<i>35</i>
3.2.2	<i>Selektive Blockade des MEP- und des MVA-Weges.....</i>	<i>38</i>
3.2.3	<i>Untersuchung der Inhibitoreigenschaften von Herbiciden des "Bleaching Agent" Typs</i>	<i>40</i>
3.2.4	<i>Versuche zur Darstellung von Strukturanaloga der 1-Deoxy-D-xylulose.....</i>	<i>43</i>
3.3	ZUORDNUNG DER TERPEN-HERKUNFT AUFGRUND NATÜRLICHER ISOTOPENVERHÄLTNISSE.....	46
3.3.1	<i>Bestimmung anhand des ¹²C / ¹³C-Isotopenverhältnisses.....</i>	<i>46</i>
3.3.2	<i>Bestimmung anhand des ¹H / ²H-Isotopenverhältnisses.....</i>	<i>52</i>
3.4	VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER BEIDEN UNBEKANNTEN TERPENE C ₁₀ H ₁₄ UND C ₁₀ H ₁₆ O IM DUFTBOUQUET DER LIMABOHNE.....	54
3.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR BETEILIGUNG DES MEP-WEGES AN DER BIOSYNTHESE VON GEOSMIN UND DEHYDROGEOSMIN.....	61
3.5.1	<i>Untersuchungen zur Biosynthese von Dehydrogeosmin.....</i>	<i>62</i>
3.5.2	<i>Untersuchungen zur Biosynthese von Geosmin</i>	<i>65</i>
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON ISOPREN MIT HILFE DER PHOTOAKUSTIKSPEKTROSKOPIE	68
3.7	DIE BETEILIGUNG MIKROBIELLER ELICITOREN AN DER INDUZIERTEN DUFTEMISSION	74
3.7.1	<i>Die Duftinduktion durch Peptaibole des Alamethicin-Typs</i>	<i>74</i>

3.7.2	<i>Versuche zur Aufreinigung der aktiven Komponente des Cellulasengemisches Cellulysin</i>	77
3.7.3	<i>Einfluß pflanzlicher Duftstoffe auf den Infektionsvorgang der Bohne <i>Vicia faba</i> durch den Bohnenrost <i>Uromyces fabae</i></i>	81
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	85
5	EXPERIMENTELLER TEIL	89
5.1	SYNTHESEN	89
5.1.1	<i>Geräte und Chemikalien</i>	89
5.1.2	<i>[5,5-²H₂]-Deoxy-D-xylulose</i>	89
5.1.3	<i>[4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton</i>	93
5.1.4	<i>Fosmidomycin</i>	95
5.1.5	<i>[6,6-²H₂]-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose</i>	99
5.2	INKUBATIONSEXPERIMENTE	101
5.3	STABILISOTOPEN-VERHÄLTNISSPEKTROSKOPIE	105
5.4	VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER BEIDEN UNBEKANNTEN TERPENE AUS DEM DUFTBOUQUET DER LIMABOHNE	106
5.5	AUFTRENNUNG VON CELLULYSIN	107
5.6	INOKULATION VON <i>V. FABAE</i> MIT <i>U. FABAE</i>	110
6	LITERATURVERZICHNIS	111
7	ANHANG	119
7.1	SPEKTREN	119
7.1.1	<i>¹H-NMR-Spektren</i>	119
7.1.2	<i>¹³C-NMR-Spektren</i>	126
7.1.3	<i>Massenspektren</i>	127
7.1.4	<i>IR-Spektren</i>	132
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	133
7.3	PUBLIKATIONEN	134
7.4	LEBENS LAUF	135
7.5	DANKSAGUNG	136
7.6	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	137

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Mit mehr als 22.000 beschriebenen Verbindungen bilden Terpene und Terpenoide eine der größten und variationsreichsten Familien natürlich vorkommender Verbindungen.^[1] Sie lassen sich in allen Organismen nachweisen und übernehmen zum Teil lebenswichtige Funktionen. Die mit Abstand meisten Terpene finden sich im Reich der Pflanzen.

Der Mensch besitzt seit dem Altertum das Wissen, Terpene als ätherisches Öl oder als fettlöslichen Extrakt aus zahllosen Pflanzen zu gewinnen.^[2] So beschreiben bereits Quellen aus Ägypten und Mesopotamien die Zubereitung und Verwendung ätherischer Öle. Genutzt wurden sie vom Menschen zur Verbreitung angenehmer Gerüche, zur Zubereitung von Speisen, aber auch zur Bekämpfung von Krankheiten. In Mitteleuropa verbreitete sich die Kenntnis über ätherische Öle etwa seit dem 11. Jahrhundert. Vermutlich wurde sie von der maurischen Kultur übernommen, die um 1000 n. Chr. die Destillation entwickelt und damit die moderne Gewinnung ätherischer Öle eingeleitet hatte.

Mit dem Aufkommen der modernen Chemie im 19. Jahrhundert standen dann nicht mehr ätherische Öle und pflanzliche Extrakte, sondern die in ihnen enthaltenen Wirkstoffe im Mittelpunkt des Interesses. Im Laufe der Zeit kristallisierten sich dabei nicht nur verschiedenste substanzspezifische Anwendungen von Terpenen heraus, sondern auch die enorme Bandbreite an biologischen Funktionen und Eigenschaften, die sie in der Natur wahrnehmen und zeigen.

Ihre größte wirtschaftliche Bedeutung besitzen Terpene auch heute noch im Bereich der Aroma- und Duftindustrie.^[3] Hierbei ist die Gewinnung von Duftkomponenten aus natürlichen Quellen in vielen Bereichen durch die Verwendung synthetischer oder halbsynthetischer, aber naturidentischer Terpene ersetzt worden. Ionone, zum Beispiel, Substanzen mit veilchenartigem Geruch und Bestandteil vieler ätherischer Blütenöle, werden zur Parfümierung vieler als Massenartikel hergestellter Seifen und Parfüms benutzt. Um diesen Bedarf zu decken, werden Ionone daher nicht mehr nur aus Blüten gewonnen, sondern im weit größeren Maßstab synthetisch aus Citral und Aceton hergestellt.^[4]

Gewisse wirtschaftliche Bedeutung haben einige Terpene auch durch ihre Anwendung als Pflanzenschutzmittel erlangt. So leiten sich die Pyrethroide, häufig verwendete Insektizide, die als Kontakt- und Fraßgift wirken, von dem aus Chrysanthemen gewonnenen Pyrethrum ab.^[5]

Anwendung finden auch Terpene mit pharmakologischen Wirkungen. Bekannte Beispiele hierfür sind Taxol **3**, ein aus der amerikanischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliertes Cancerostatikum^[6] und Artemisinin **4**, ein Terpenperoxid, das aus der chinesischen Heilpflanze *Artemisia annua* gewonnen wird und erfolgreich in der HIV- und Malariatherapie^{[7], [8]} angewendet wird. In der chinesischen Volksmedizin wird es unter der Bezeichnung Qinghaosu seit zweitausend Jahren zur Fiebersenkung eingesetzt. Für viele Terpene konnte auch eine allgemeine antimikrobielle Wirkung gezeigt werden.^[9]

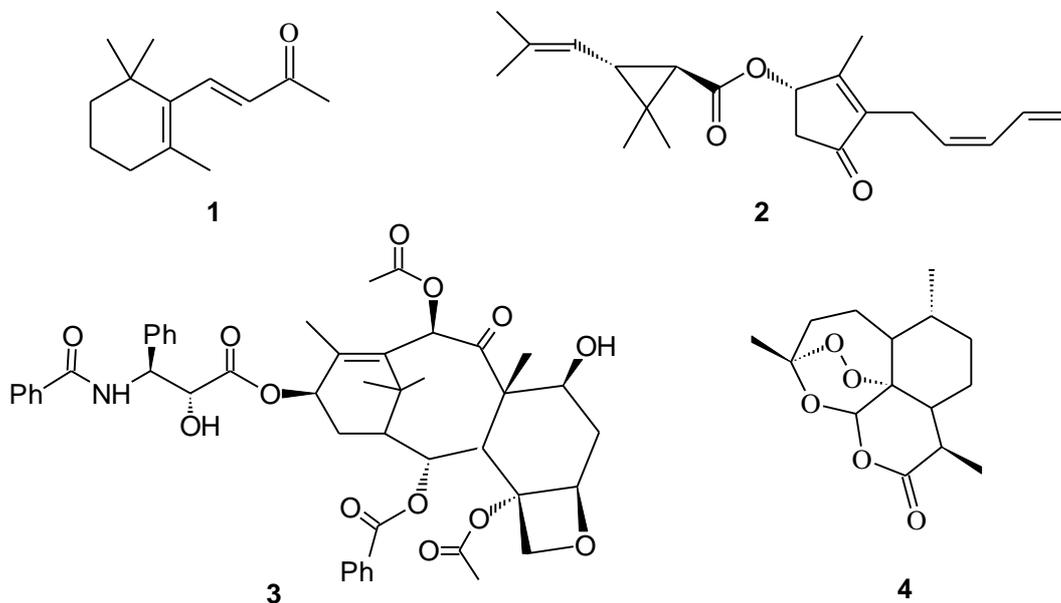


Abb. 1: einige Terpene mit wirtschaftlicher Bedeutung: β -Ionon **1**, Pyrethrin I **2**, Taxol[®] **3**, Artemisinin **4**.

Wie die zuletzt genannten Beispiele zeigen, dienen Terpene aus der Sicht des produzierenden Organismus häufig der Auseinandersetzung mit seiner Umwelt. Sie schützen vor Fraßfeinden oder vor mikrobiellem Befall. Besonders eindrucksvoll sind in diesem Zusammenhang Keimungshemmstoffe wie Campher **5** oder Cineol **6**, die von Salbei- (*Salvia leucophylla*) und Beifußarten (*Artemisia californica*) in trockenen Regionen Kaliforniens in großen Mengen in den Boden abgegeben werden (Chaparral-Vegetation). Dort verhindern sie das Auskeimen konkurrierender Pflanzen und verschaffen der produzierenden Pflanze somit den entscheidenden Standortvorteil.^{[10], [11]}

Die Auseinandersetzung zwischen Produzent und seiner Umwelt muß aber nicht nur zum Nachteil der Umwelt sein. Das Anlocken von Bestäubern durch Blütenduftstoffe ist ein klassisches Beispiel, wie beide Seiten von der Wirkung terpenoider Substanzen profitieren können. Farnesen **7** ist wiederum ein Beispiel dafür, daß Terpene auch innerhalb einer Art zur Kommunikation beitragen können: Blattläuse geben diese Substanz bei Gefahr als Alarmstoff für ihre Artgenossen ab.^{[12], [13]}

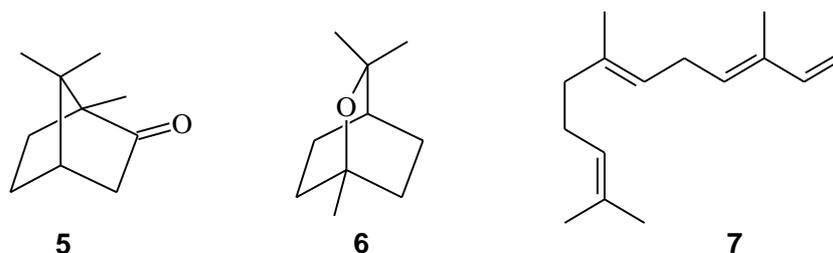


Abb. 2: ausgewählte Terpene mit ökologischer Bedeutung: Campher **5**, Cineol **6**, β-Farnesen **7**.

Neben dieser Wechselwirkung mit der Umwelt übernehmen Terpene aber auch Aufgaben im Stoffwechsel von Zellen, die für deren Funktion unerlässlich sind. So sorgen Ubichinone **8** in den Mitochondrien fast aller Lebewesen für den Elektronentransport im Ablauf der Atmungskette und unterstützen somit die Energieversorgung der Zelle. Bei der Photosynthese erhöhen Carotenoide die Effizienz der Lichtabsorption und schützen den Photosyntheseapparat, indem sie das einfallende Licht filtern und die aufgenommene Energie auf das Chlorophyll übertragen. Steroide, wie etwa das Cholesterin, regulieren zusammen mit ungesättigten Fettsäuren die Fluidität der Zellmembranen und ermöglichen es der Zelle so, auf Umwelteinflüsse, wie etwa Temperaturschwankungen zu reagieren. Gleichzeitig sind Steroide ein Beispiel dafür, daß Terpene in Organismen auch die Funktion von Hormonen übernehmen können, wie etwa die blutdruckregulierende Wirkung von Cholesterin. Wichtige Beispiele für hormonelle Funktionen von Terpenen im Pflanzenreich sind Abscisinsäure **10** und Gibberilinsäure **11**, die unter anderem antagonistisch das Längenwachstum in höheren Pflanzen regulieren.

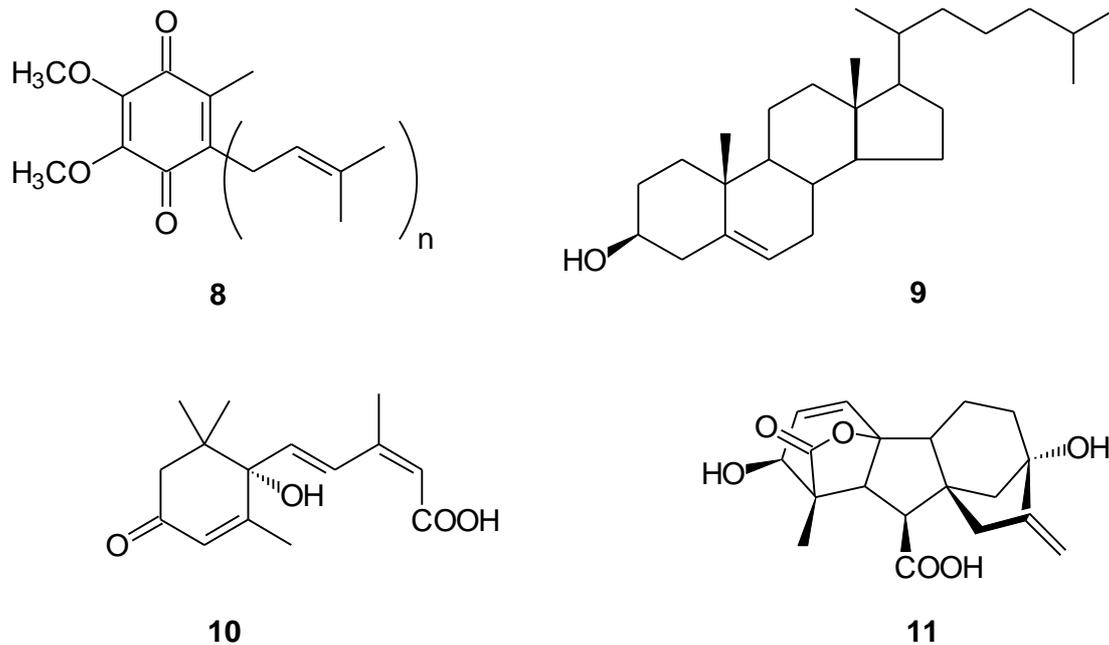


Abb. 3: Terpene mit physiologischer Bedeutung: Ubichinon **8**, Cholesterol **9**, Abscisinsäure **10**, Gibberilinsäure **11**.

1.2 Chemie und Biochemie der Terpene

In chemischer Hinsicht erfolgte eine erste systematische Charakterisierung der Terpene am Anfang des 20. Jahrhunderts durch O. Wallach, indem er die empirische Isoprenregel formulierte.^[14] Sie beschreibt den Aufbau von Terpenen durch Wiederholungen des C₅-Grundkörpers Isopren. Gleichzeitig lassen sich die Terpene damit je nach Anzahl der enthaltenen Isoprenbausteine in Hemi- (1 Isopreneinheit), Mono- (2), Sesqui- (3), Di- (4), Tri- (6) und Tetraterpene (8) unterteilen. 1953 erweiterte L. Ruzicka diese Regel aufgrund theoretischer Überlegungen zu einer biogenetischen Isoprenregel, in der er für die Biosynthese der Terpene einen universellen isoprenoiden Baustein postulierte.^[15] Aus diesem sollten alle Terpene durch Kettenverlängerung und anschließender ionischer oder radikalischer Cyclisierung bzw. Umlagerung entstehen können. Schon bald darauf wurde durch Arbeiten von Bloch^[16] und Lynen^[17] Isopentenylpyrophosphat (IPP) **12** als dieser Baustein identifiziert. Auch der weitere Verlauf der Terpenbiosynthese konnte dann zügig aufgeklärt werden. Als erster Schritt wird Isopentenylpyrophosphat durch das Enzym IPP-Isomerase in Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) **13** überführt. Anschließend kondensieren dann Prenyltransferasen IPP und DMAPP zu den, für die Synthese größerer Terpene benötigten Zwischenstufen, indem sie IPP an die wachsende Kette anheften (Abb. 4). Alle Prenyltransferasen arbeiten

dabei nach demselben, als Kopf-Schwanz-Verknüpfung bezeichneten, Mechanismus, in dessen Verlauf die Pyrophosphatgruppe (Kopf) des DMAPP, bzw. der längeren Homologen, als Anion abgespalten wird. Das so entstandene Dimethylallylkation, welches zusammen mit der Pyrophosphatgruppe als enzymgebundenes Ionenpaar vorliegt, kann nun durch die Doppelbindung eines IPP-Moleküls (Schwanz) nucleophil angegriffen werden. Im Unterschied hierzu werden die Ausgangssubstanzen für Tri- und Tetraterpene durch eine sogenannte Kopf-Kopf-Verknüpfung gebildet. Hierbei werden nicht weitere IPP-Einheiten ankondensiert, sondern zwei Moleküle Farnesylpyrophosphat (FPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) werden unter Selbstkondensation und Abspaltung beider Pyrophosphatgruppen zu den entsprechenden C₃₀ bzw. C₄₀-Grundkörpern verknüpft.

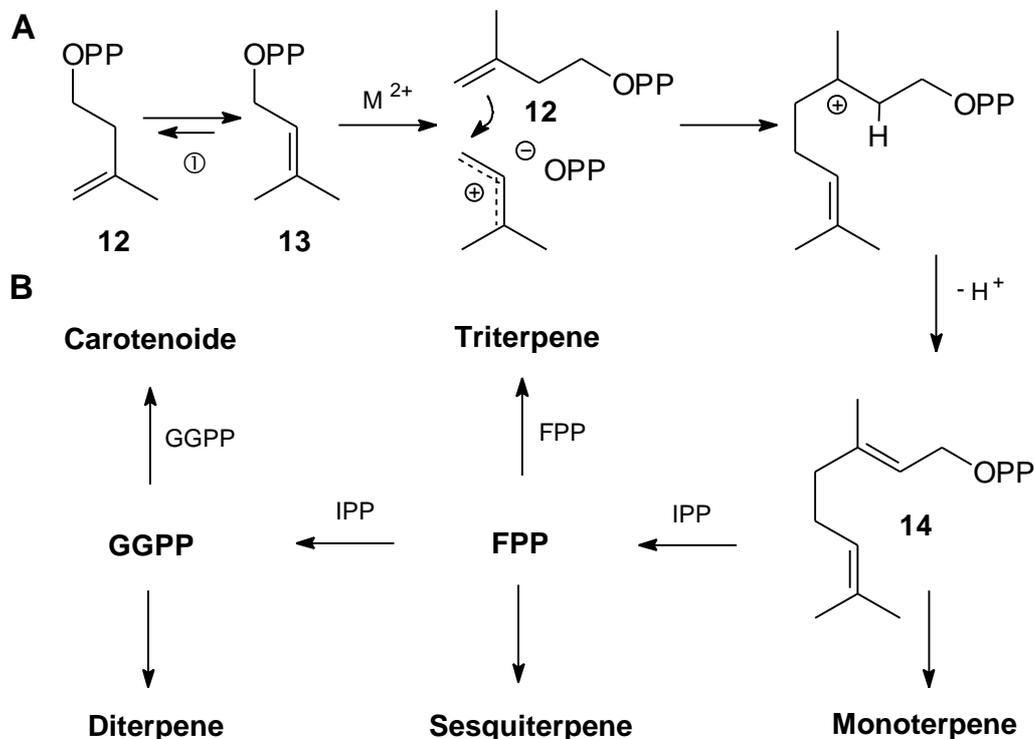


Abb. 4: A: Isomerisierung von IPP 12 zu DMAPP 13 und die Verknüpfung beider Substanzen zu Geranylpyrophosphat (GPP) 14. Beteiligte Enzyme: ① IPP-DMAPP-Isomerase, GPP-Synthase
 B: Biosynthese der Terpengrundbausteine. Abkürzungen: FPP: Farnesylpyrophosphat, GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat.

Die abschließende Synthese der Terpene aus den oben genannten Zwischenstufen erfolgt dann durch Terpensynthasen und -cyclasen.^[18] Auch diese Enzyme leiten ihre Reaktion durch die Bildung eines Allylkations ein. Meist erfolgen danach Isomerisierungen, Cyclisierungen, Hydrid- und Methyl-Verschiebungen. Durch Abspaltung eines Protons oder Anlagerung eines Nucleophils - in den meisten Fällen Wasser - stabilisiert

sich schließlich das gebildete Terpengrundgerüst. Anschließend kann es noch durch weitere Enzyme oxidiert, reduziert oder substituiert werden. Letztendlich läßt sich die enorme strukturelle Vielfalt der Terpene aber auf die hohe Reaktivität der gebildeten Carbokationen und der daraus resultierenden Tendenz zu Umlagerungen aller Art zurückführen.

1.3 Der Mevalonat-Weg

Noch bevor IPP als universeller isoprenoider Baustein zum Aufbau der Terpene identifiziert worden war, kannte man bereits einige Vorläufersubstanzen dieses Bausteins. Von Bloch,^[19] Cornforth und Popjak^[20] durchgeführte Einbauversuche zur Biosynthese von Cholesterin in Rattenleber und Ergosterol in Hefen hatten gezeigt, daß für den Aufbau dieser isoprenoiden Einheit drei Moleküle Acetat benötigt werden. Spekulationen über mögliche Zwischenstufen auf dem Weg vom Acetat zu einem potentiellen isoprenoiden Baustein wurden schließlich durch die Entdeckung der Mevalonsäure (MVA) **17** in Destillaten aus Brauereihefen beendet.^[21] Synthetische, markierte Mevalonsäure wurde in zellfreien Leberextrakten rasch in Cholesterin eingebaut.^[22] Hierdurch entstand zugleich die Vermutung, daß 3-Hydroxy-3-methylglutarat (HMG), eine Substanz, die seit einiger Zeit aus Pflanzen bekannt war,^[23] eine oxidierte Vorstufe der Mevalonsäure sein könnte. Die Reduktion von HMG, bzw der durch Coenzym A aktivierten Form (HMG-CoA) **16**, in Mevalonsäure wurde dann schnell in zellfreien Extrakten gezeigt.^[24] Damit waren die Schlüsselschritte dieses Stoffwechselweges aufgeklärt. Die übrigen Schritte sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Bildung des HMG-CoA aus Acetyl-CoA **15** erfolgt durch Claisen-Kondensation und anschließende Aldoladdition. Nach Reduktion des HMG-CoA zur Mevalonsäure wird diese durch zwei Kinasen in ein Diphosphat überführt und anschließend nach Aktivierung der noch freien Hydroxygruppe als Phosphatester durch Eliminierung zum IPP decarboxyliert.^[25]

Nach seiner Entdeckung in tierischem Gewebe und in Hefen, konnte der Mevalonat-Weg auch bei der Biosynthese von Steroiden in Bakterien und in höheren Pflanzen nachgewiesen werden. Er wurde daher als universeller Stoffwechselweg für die Biosynthese von Terpenen in allen existierenden Organismen angesehen.^[26]

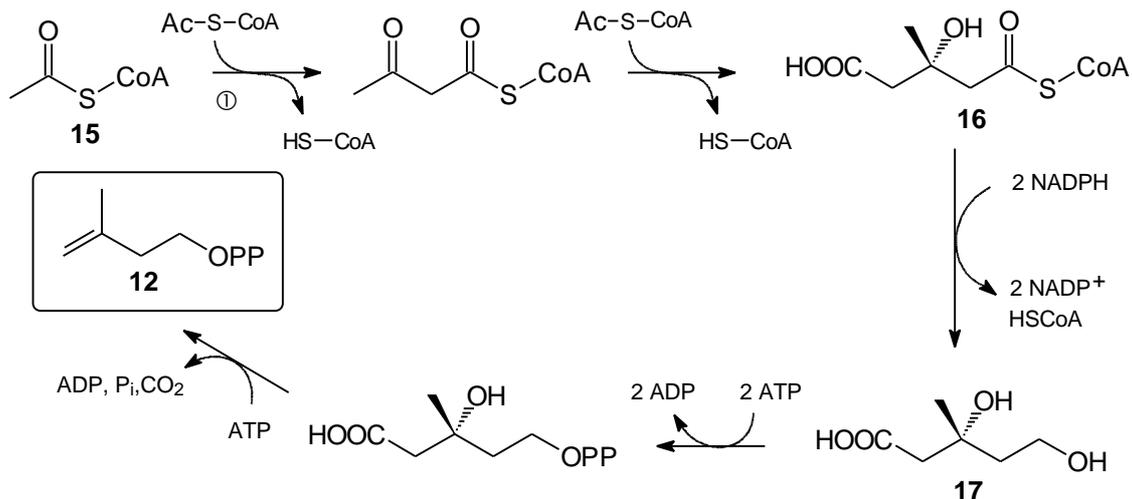


Abb. 5: Biosynthese von Isopentenylpyrophosphat **12** aus Acetyl-CoA **15** über den Mevalonat-Weg. Beteiligte Enzyme: Acetoacetyl-CoA-Thiolase ①, 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Synthase, HMG-CoA-Reduktase, Mevalonat-5-phosphotransferase, Phosphomevalonatkinase, Pyrophosphatmevalonatdecarboxylase.

1.4 Die Entdeckung des Methylethritolphosphat-Weges

Mit der Klärung der Rolle des Mevalonatweges innerhalb der Terpenbiosynthese ergaben sich aber auch Befunde, die einer universellen Verbreitung dieses Weges widersprachen. So führten Einbauversuche mit markiertem Acetat oder MVA bei Pflanzen immer zu sehr geringem oder gar keinem Einbau dieser Vorstufen in Mono- und Diterpene.^{[27], [28]} Des Weiteren konnte in Pflanzen durch die Anwendung von Mevinolin, einem sehr effektiven Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, zwar die Biosynthese von Sterolen unterbunden werden, die Biosynthese von terpenoiden Pigmenten, wie den Carotenoiden oder der Phytolseitenkette des Chlorophylls, wurde aber nicht beeinträchtigt.^[29] Zunächst versuchte man solche Resultate noch damit zu erklären, daß die genannten Substanzen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle synthetisiert wurden und die gewählten Vorstufen bzw. Inhibitoren schlechte Membrangängigkeit besaßen.

Seit Ende der 80er Jahre führten dann aber Arbeiten der Gruppen um Rohmer, Sahn und Arigoni zu dem Vorschlag, einen alternativen Weg für die Bildung von IPP in Pflanzen und Bakterien zu berücksichtigen. Einbauversuche mit ¹³C-markiertem Acetat in bakterielle Hopanoide hatten Markierungsmuster ergeben, die nicht mehr mit dem klassischen MVA-Weg zu erklären waren.^[30] Das gleiche Problem ergab sich auch beim Einbau von ¹³C-markierter Glucose in die Seitenkette des Ubichinons in *Escherichia Coli*^[31] und in Diterpene des Ginkolidtyps in Setzlingen des Ginkobaumes *Ginkgo*

biloba.^[32] Variationen der markierten Positionen ließen dann den Schluß zu, daß diese alternative IPP-Quelle aus der Kondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Pyruvat entsteht.^{[33], [34]} Um die erhaltenen Einbaumuster zu erklären, mußte die Biosynthese zum IPP dabei über eine Umlagerung des Kohlenstoffgrundgerüsts verlaufen. Diese beiden Rahmenbedingungen ließen sich durch die Pentulose 1-Deoxy-D-xylulose (DOX) erfüllen. Die Bildung dieses Kohlenhydrates aus Pyruvat und GAP war bereits aus zellfreien Bakterien- und Hefeaufschlüssen beschrieben,^[35] und DOX, bzw. ihr 5-Phosphat (DXP) **18**, kann formal analog einer Pinakol-Umlagerung in 2-C-Methyl-D-erythritose-4-phosphat **19** überführt werden, womit das benötigte Grundgerüst aufgebaut wäre (Abb. 6). Der entscheidende Beweis für diese Hypothese wurde dann durch den außergewöhnlich hohen Einbau markierter Deoxy-D-xylulose in die Seitenkette des Ubichinons und in Gingkolide erbracht.^{[31], [32], [36]}

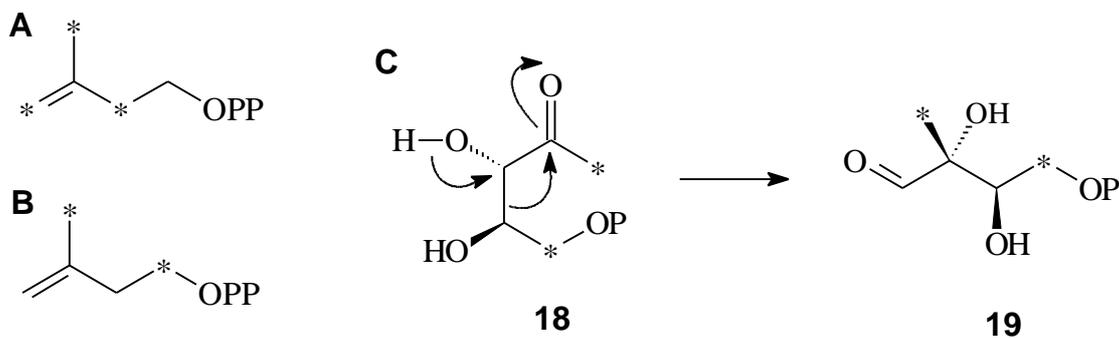


Abb. 6: **A:** erwartetes ¹³C-Markierungsmuster von IPP bei Einbau von 1-¹³C-Glucose über den Acetat-Mevalonat-Weg. **B:** gefundenes Markierungsmuster. **C:** Markierungsmuster von DOX **18** bei Aufbau aus 1-¹³C-Glucose über Pyruvat/GAP und die Umlagerung zu 2-C-Methyl-D-erythritose-4-phosphat **19**, mit der sich das Muster in **B** erklären läßt.

Die Beteiligung der Deoxy-D-xylulose an der Terpenbiosynthese wurde in den letzten Jahren in Eubakterien, in Grün- und Rotalgen und in den Chloroplasten vieler höherer Pflanzen bestätigt.^{[37], [38]} Ebenso konnten die für die beschriebenen Schritte notwendigen Enzyme und die sie kodierenden Gene in mehreren Systemen isoliert und charakterisiert werden. Die Bildung von DXP wird dabei von einer Thiamindiphosphat-abhängigen Transketolase katalysiert.^{[39], [40]} Die nachfolgende Umlagerung geht einher mit einer Reduktion der nur intermediär gebildeten Methylerythritose zu 2-C-Methyl-D-erythritolphosphat (MEP) **22** und wird von einer Reduktoisomerase durchgeführt.^[41] Über die nachfolgenden Schritte zum IPP ist bisher nur bekannt, daß aus MEP ein cyclisches Diphosphat (CDP-ME2P) **24** gebildet wird, indem eine Cytidyltransferase

die Hydroxygruppe in Position 4 von **22** unter Bildung von 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) **23** aktiviert.^{[42], [43]} Anschließend phosphoryliert eine Kinase **23** in Position 2.^{[44], [45]} Die Cyclisierung erfolgt dann durch eine Synthese unter Abspaltung von Cytidylmonophosphat (CMP).^{[46], [47]} Alle weiteren Schritte zum IPP sind noch unbekannt und werden intensiv untersucht.

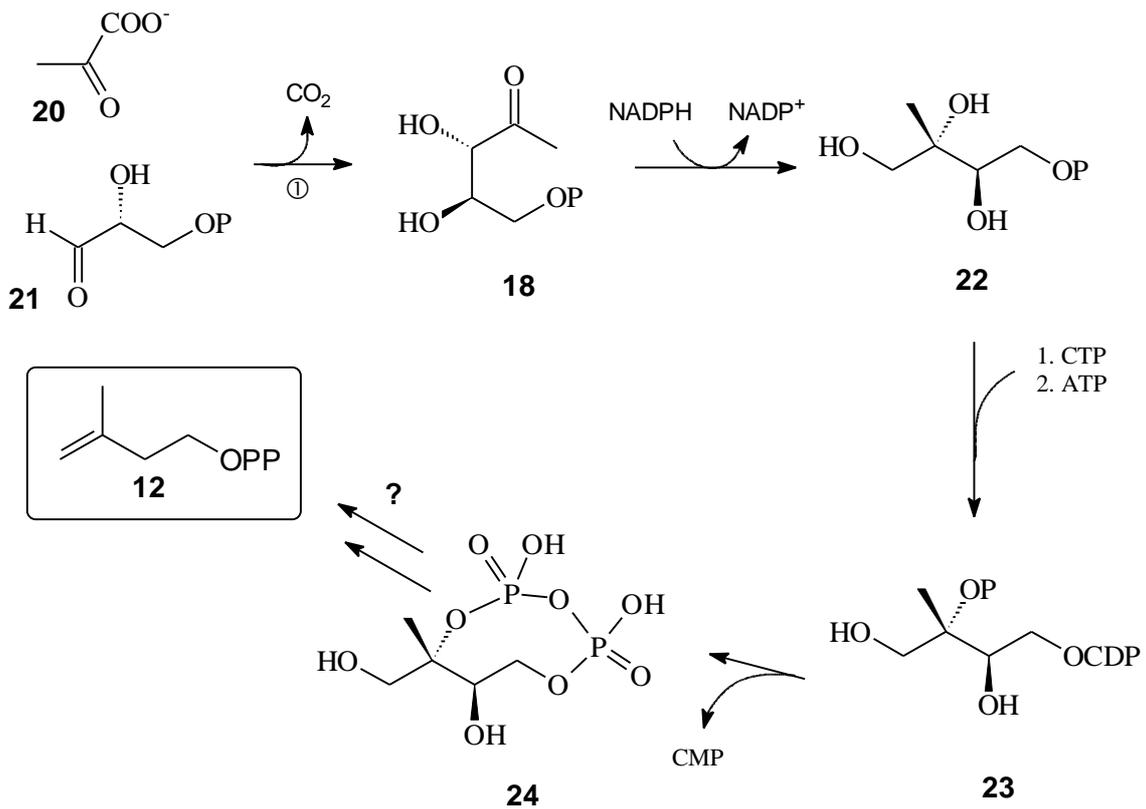


Abb. 7: Biosynthese von Isopentenylpyrophosphat **12** aus Pyruvat **20** und Glycerinaldehyd-3-phosphat **21** über den 2-C-Methylerythritol-4-phosphat-Weg. Beteiligte Enzyme: DXP-Synthase ①, DXP-Reduktisomerase ②, MEP-Cytidyltransferase ③, CDP-ME-Kinase ④, MECDP-Synthase ⑤.

Dieser neu entdeckte Biosyntheseweg wurde nach den beteiligten Verbindungen häufig als Deoxy-D-xylulose-Weg oder auch als GAP/Pyruvat-Weg bezeichnet. Da Deoxy-D-xylulose neben der Terpenbiosynthese aber auch an der Biosynthese der Coenzyme Thiamindiphosphat und Pyridoxalphosphat beteiligt ist,^[48] hat sich die Bezeichnung 2-C-Methyl-D-erythritolphosphat-Weg (MEP-Weg) durchgesetzt, da es sich hierbei um die erste Verbindung dieses Weges handelt, die nur in den Terpenstoffwechsel fließt.

1.5 Die induzierte Abwehr bei Pflanzen

Wie anfangs erwähnt dienen Terpene bei höheren Pflanzen häufig der Abwehr von Mikroben und herbivoren Insekten. Ihre Biosynthese ist aber im Vergleich zu Metaboliten des Primärstoffwechsels mit hohen Produktionskosten verbunden. Gleichzeitig steht ihre Synthese mit Wachstum und Vermehrung der Pflanzen in Konkurrenz um vorhandene Ressourcen. So benötigen Pflanzen für den Aufbau eines Gramms einer Aminosäure im Durchschnitt 2,09 g Glucose, während sie für den Aufbau von Terpenen im Durchschnitt bereits 3,18 g Glucose verbrauchen.^{[49], [50]} Um diese Kosten zu minimieren, haben viele Pflanzen Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, Substanzen, die für die Verteidigung benötigt werden, erst zu synthetisieren, wenn auch ein Angriff erfolgt. Die Verteidigung wird also erst durch den Angriff induziert.

Ein besonders eindrucksvolles Beispiel hierfür ist die Freisetzung von Duftstoffen, mit deren Hilfe Fraßfeinde der angreifenden Insekten angelockt werden. So beginnt die Lima- oder Mondbohne (*Phaseolus lunatus*) wenige Stunden nach Befall durch die Gemeine Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*), ein Bouquet verschiedener Mono- und Sesquiterpene sowie Produkte des Shikimatweges und Abbauprodukte von Fettsäuren freizusetzen (Abb. 8).

Teile dieser Mischung, insbesondere Ocimen, Linalool, Methylsalicylat und der Sesquiterpenabkömmling 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatrien werden von der Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis* wahrgenommen und als Orientierungshilfe zum Auffinden ihrer Beute, den Spinnmilben, benutzt.^{[51], [52]}

Ein weiteres Beispiel für ein solches tritrophisches System ist die Interaktion zwischen Maissämlingen (*Zea Mays*), Raupen des Zuckerrübenfalters (*Spodoptera exigua*) und der parasitischen Wespe *Cotesia marginiventris*, die ihre Eier in die auf dem Mais fressenden Raupen legt.^[53]

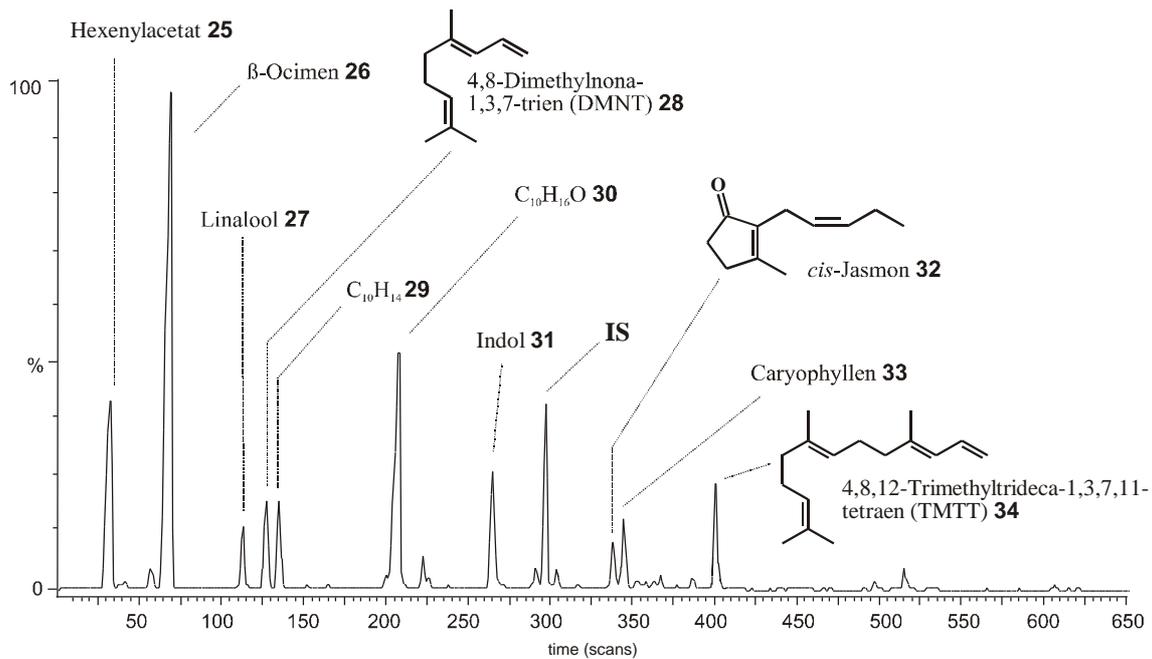


Abb. 8: Gaschromatographisches Profil des Duftbouquets von *P. lunatus* nach Befall mit *T. urticae*, IS: interner Standard (n-Bromdecan).

Die möglichen Antworten von Pflanzen auf einen Angriff sind aber noch weit vielfältiger. So produziert Tabak (*Nicotiana sylvestris*) bei Beweidung durch Raupen im Vergleich zum unbefallenen Zustand bis zu 400% mehr Nikotin.^[54] Eine Erhöhung des Gehaltes toxischer Verbindungen ist weitverbreitet^[10] und umfaßt neben Alkaloiden zum Beispiel auch die Synthese von Furanocoumarinen,^[55] Glucosinolaten,^[56] cyanogenen Glykosiden^[57] oder auch Tanninen.

Eine weitere Strategie der Pflanzen besteht darin, ihren Nährwert herabzusetzen. Hierzu produzieren Pflanzen nach Fraßschädigung Proteinaseinhibitoren, die Proteinase des tierischen Verdauungssystems so effektiv hemmen, daß die Pflanze für den Herbivoren als Nahrungsquelle praktisch wertlos wird.^[58]

Muß eine Pflanze den Kampf gegen Mikroorganismen aufnehmen, so besteht eine erste Antwort darin, dem Angreifer den Nährboden zu entziehen, indem es im Bereich des Infektionsherdes zu einem schnellen, aber lokal begrenzten Absterben der umgebenden Zellen kommt (hypersensitive response, HR).^[59] Im weiteren Verlauf der Abwehrreaktion erfolgt die Neusynthese von Phytoalexinen. Hierbei handelt es sich um eine chemisch sehr heterogene Gruppe von niedermolekularen Verbindungen mit antimikrobiellen Eigenschaften.^[60] Abwehrmaßnahmen sind aber nicht nur auf den lokalen Bereich der Infektion begrenzt. Nach einiger Zeit stellt sich auch in weiter entfernten Bereichen der Pflanze eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen ein (systemic

acquired resistance, SAR).^{[61], [62]} In diesem Zusammenhang hat man die Bildung einer Gruppe meist hydrolytischer (Glucanasen, Chitinasen) oder fungitoxischer Proteine nachgewiesen, die man unter dem Begriff "pathogen-related proteins" (PR-Proteine) zusammenfaßt.^[63]

Die Mechanismen, die zu diesen Antworten der Pflanze führen, sind noch Gegenstand intensiver Forschung. Klar ist aber, daß neben der Verwundung, Substanzen eine Rolle spielen müssen, die im Verwundungs- bzw. Infektionsbereich zwischen Pflanze und Angreifer freigesetzt und von der Pflanze wahrgenommen werden.

So führt die reine Verwundung der Limabohne nicht zur Freisetzung des genannten Duftbouquets. Andererseits können viele Komponenten des Bouquets durch die Applikation dieser als Elicitoren bezeichneten Verbindungen über die Leitbündelgefäße der Pflanze ausgelöst werden.^[64] Als Elicitoren sind dabei sowohl abiotische Substanzen, wie zum Beispiel Schwermetallsalze,^{[65], [66]} als auch biotische Substanzen beschrieben worden. Bei letzteren handelt es sich meist um Oligosaccharide,^[67] Polypeptide^[68] oder Glykoproteine, die häufig erst während des Angriffs aus der Zellwand der Pflanze oder des Angreifers durch Hydrolyseprozesse freigesetzt werden. Es finden sich aber auch niedermolekulare Substanzen, wie zum Beispiel Coronatin, das von dem phytopathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* produziert wird.^[69]

Durch die Verwundung und Identifizierung eines Elicitors kommt es in der Pflanze zu einer Reihe von Signalprozessen, die sich nach Art des Angreifers unterscheiden können.

Im Zusammenhang mit einem Pathogenangriff erfolgt meist zunächst die Freisetzung kurzlebiger, reaktiver Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 oder des Hydroxylradikals $OH \cdot$.^[70] Neben ihrer toxischen Wirkung auf das Pathogen und eigene Pflanzenzellen (hypersensitive response), stimulieren diese Moleküle die Biosynthese des Phytohormones Salicylsäure (SA) **35**. Von dieser Substanz ist bekannt, daß sie zur Expression von PR-Genen führt und an der SAR beteiligt ist.^[71]

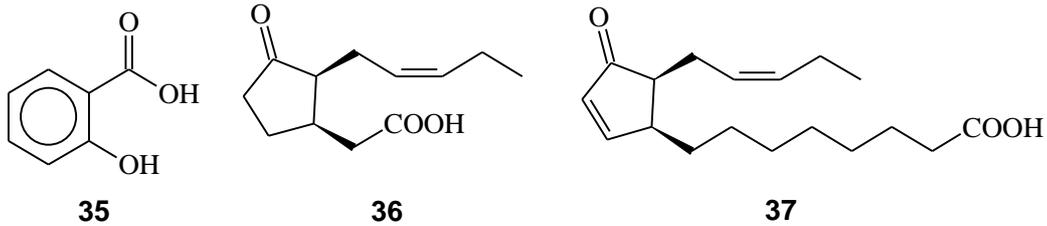


Abb. 9: Salicylsäure (SA) **35**, Jasmonsäure (JA) **36** und 12-Oxo-phytodienoicäure **37**, drei Phytohormone, die an den Signalwegen der induzierten Pflanzenabwehr beteiligt sind.

Beim Befall einer Pflanze mit Insekten, die durch Fraß starken Schaden verursachen, treten dagegen Signalwege des Lipidstoffwechsel in den Vordergrund. Bestuntersuchtes Beispiel hierfür ist die Jasmonsäure (JA) **36**, die über den Octadecanoid-Weg aus Linsensäure gebildet wird. Sie aktiviert die Expression einer Gruppe von Genen, die charakteristisch für eine Verwundung sind. Diese Gene werden daher auch als "wound response genes" bezeichnet.^{[72], [62]} Hierzu zählen Gene von Proteinase-Inhibitoren, der Biosynthese von Ethylen und viele Gene des Sekundärstoffwechsels.^[73] Auch bei der Induktion der Duftemission der Limabohne durch Insektenfraß konnte ein Anstieg der endogenen JA-Konzentration nachgewiesen werden.^[74] Die Expression dieser Gene läßt sich in den meisten Fällen auch durch exogene JA-Gabe stimulieren. Viele Autoren beschreiben auch die Aktivierung von wound response Genen durch 12-Oxo-phytodienoicäure (12-OPDA) **37**,^{[75], [76]} die ebenfalls im Verlauf des Octadecanoid-Weges entsteht und eine Vorstufe der Jasmonsäure darstellt.

Neben den hier skizzierten Signalwegen deutet sich auch die Existenz weiterer Signalwege ab, bei denen Oxylipine eine wichtige Rolle spielen, über deren Verlauf aber bisher wenig Aussagen gemacht werden können.^[77] Auch die Beteiligung von Membrandepolarisationen, Ca^{2+} -Ionenflüssen,^{[78], [79]} G-Proteinen^{[80], [81]} und die Aktivität von Kinasen^{[82], [83]} und Phosphatasen^[84] an der Signaltransduktion bei der pflanzlichen Abwehr sind beschrieben worden, aber noch nicht zu einem Gesamtbild zusammengefaßt.

Interessanterweise kann Salicylsäure an verschiedene Stellen des Octadecanoidweges regulativ eingreifen. Dies könnte, zusammen mit den noch weitgehend unbekanntem Signalwegen, auf ein Signalnetzwerk hinweisen, das eine fein abgestufte, pflanzliche Abwehr ermöglicht und erklärt.^{[85], [72]}

1.6 Kompartimentierung der Terpenbiosynthese in Pflanzen

In Pflanzen ist die Biosynthese unterschiedlicher Terpenklassen ausgehend von Isopentenylpyrophosphat durch die subzelluläre Kompartimentierung räumlich voneinander getrennt. Während Mono- und Diterpene in den Plastiden synthetisiert werden, ist die Biosynthese von Sesquiterpenen und Sterolen überwiegend im Cytosol angesiedelt.^[86] Auch MEP- und MVA-Weg laufen vermutlich getrennt voneinander ab. Die bisher aus Pflanzen charakterisierten Gene des MEP-Weges besitzen plastidäre protein-targeting-Sequenzen,^{[87], [88]} wohingegen Enzyme des MVA-Weges überwiegend aus dem Cytosol isoliert worden sind. Diese Zuordnung wurde prinzipiell auch bei der induzierten Biosynthese von Terpenen nach Fraßschädigung oder Induktion mit Elicitoren gefunden. Einbauversuche mit deuteriummarkierter Mevalonsäure an der Limabohne führten bei dem Sesquiterpenabkömmling 4,8-Dimethylnona-1,3,7-trien (DMNT) zu hohen Markierungsgraden, während die im Duftbouquet enthaltenen Monoterpene kaum Einbau zeigten.^[89] Nach der Entdeckung des MEP-Weges konnte durch Fütterungsexperimente mit deuteriummarkierter Deoxy-D-xylulose ebenfalls gezeigt werden, daß die im Duftbouquet enthaltenen Monoterpene fast ausschließlich über diesen Weg gebildet werden.^[90]

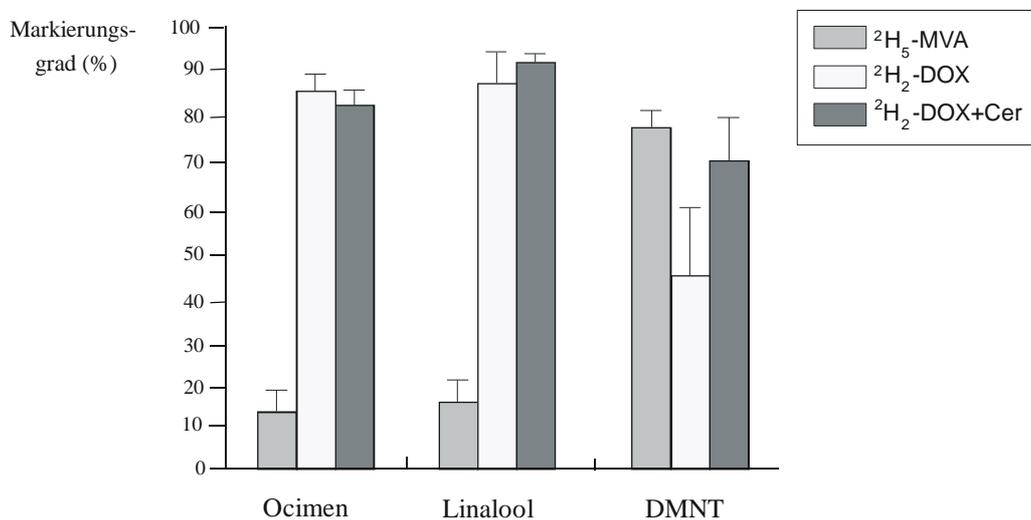


Abb. 10: Markierungsgrad der Monoterpene Ocimen und Linalool und des Sesquiterpenabkömmlings DMNT nach Inkubation mit deuteriummarkierten Vorstufen des MVA- und des MEP-Weges und nach gleichzeitiger Anwendung von Cerivastatin (Cer) und Deoxy-D-xylulose (Konzentration der Vorstufen: 3 mg/ml).^[90]

Entgegen den Erwartungen zeigte aber auch das DMNT einen deutlichen Einbau von Deoxy-D-xylulose. Dieser konnte bei gleichzeitiger Blockade des MVA-Weges mit

Cerivastatin (Cer) auch noch weiter gesteigert werden (Abb. 10). Mit diesen Ergebnissen deutete sich nicht nur eine Beteiligung der MEP-Route an der Biosynthese von Sesquiterpenen an.^[90] Sie waren zugleich auch ein erster Hinweis darauf, daß die Pflanze bei physiologischen Engpässen beide Wege dynamisch nutzen kann. Ähnliche Ausnahmen der üblichen Zuordnung der Terpenklassen zu MEP- und MVA-Weg ergaben sich auch bei der Verfütterung von ¹³C-markierter Glucose an Kamillenblüten. Hier wurden bei Sesquiterpenen Einbaumuster beobachtet, die nur durch die Beteiligung beider Wege zu erklären sind.^[91] Ferner wurde in Zellkulturen von *Catharanthus roseus* bei der Biosynthese des Sitosterols, das als Steroid durch Kondensation der Sesquiterpenvorstufe Farnesyldiphosphat entsteht, ein ca. 6%iger mevalonat-unabhängiger Anteil entdeckt.^[36]

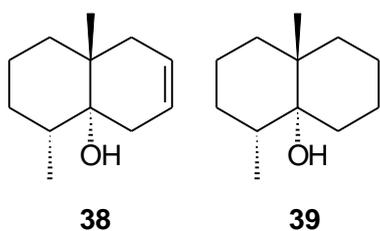
2 Aufgabenstellung

Die im letzten Teil der Einleitung beschriebenen Versuche zur Zuordnung von MEP- und MVA-Weg zur Terpenbiosynthese durch Verfütterung markierter Vorstufen sind nicht frei von Kritik. Durch die Verfütterung werden die natürlichen physiologischen Konzentrationen der Metaboliten in den betrachteten Versuchssystemen verschoben. Da zusätzlich in den genannten Versuchen jeweils nur einer der beiden Wege mit Vorstufen angereichert wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß zumindest die Beteiligung des MEP-Weges an der Sesquiterpenbiosynthese auf eine artifizielle Überbetonung des MEP-Weges zurückzuführen war.

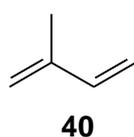
Aufgabe war es daher, die Beteiligung des MEP-Weges an der Biosynthese von Sesquiterpenen genauer zu untersuchen. Hierzu sollte im System der Limabohne die Abhängigkeit des Einbaus von der Konzentration der Vorstufen ermittelt werden und dies mit den Einbauraten verglichen werden, die bei paralleler Inkubation der Vorstufen beider Wege erreicht werden. Für diese Aufgabe war es notwendig, für beide Wege deuteriummarkierte Vorläufersubstanzen in größeren Mengen zu synthetisieren. Da die in der Literatur beschriebenen Vorschriften jedoch nur geringe Ausbeuten lieferten, sollten diese zunächst optimiert werden.

Darüber hinaus sollte nach einer Methode gesucht werden, die Beteiligung beider Wege ohne größere Beeinflussung der physiologischen Verhältnisse in der Pflanze zu erkunden. In vielen Systemen ist dies durch Verfütterung ^{13}C -markierter Glucose möglich, die bezogen auf MEP- und MVA-Weg eine neutrale Vorstufe darstellt. Die Herkunft der Terpene läßt sich dann über unterschiedliche Einbaumuster im ^{13}C -NMR ermitteln. Im System der Limabohne ist dies aber aus praktischen Gründen nicht möglich, da die von der Pflanze emittierten Substanzmengen bei weitem nicht für die Analyse durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie ausreichen. Es sollte daher getestet werden, ob sich eine Kopplung aus Gaschromatographie und Stabilisotopen-Verhältnismassenspektroskopie eignet, Aussagen über die physiologische Herkunft der Terpene zu machen. Diese Methode wurde in den letzten Jahren entwickelt und ermöglicht es, Differenzen im natürlichen Isotopenverhältnis auch komplexer Substanzgemische zu ermitteln, die in diesem Fall auf unterschiedliche kinetische Isotopeneffekte der enzymkatalysierten Reaktionen beider Wege zurückzuführen wären.

Wichtige Werkzeuge für die Bestimmung dieser Isotopenverhältnisse, aber auch für die Untersuchung der Verteilung und der eventuellen dynamischen Nutzung beider Stoffwechselwege sind Inhibitoren, mit denen sich beide Wege selektiv unterbinden lassen. Da zu Beginn dieser Arbeit keine Inhibitoren des MEP-Weges bekannt waren, bestand eine essentielle Aufgabe darin, Inhibitoren dieses Weges ausfindig zu machen oder zu entwickeln.



Neben der Beteiligung des MEP-Weges an der Sesquiterpenbiosynthese im Rahmen der induzierten pflanzlichen Abwehr, sollte weiterhin untersucht werden, ob eine solche Beteiligung auch im Zusammenhang mit der Emission und der Biosynthese von Blüteninhaltsstoffen eine Rolle spielt. Im Mittelpunkt des Interesses sollte hierbei Dehydrogeosmin **38** stehen, das von Blüten mittel- und südamerikanischer Kakteenarten emittiert wird. Es ist wie DMNT ein irreguläres Terpen, das ebenfalls durch Abbau von sesquiterpenoiden Vorstufen entsteht. Darüber hinaus wird ein Strukturanalogon, das Geosmin **39**, von Bakterien, Pilzen und Moosen synthetisiert. Somit könnte die mögliche Beteiligung des MEP-Weges an der Biosynthese eines irregulären Terpens an mehreren, grundverschiedenen Modellsystemen untersucht werden.



Ein weiteres Forschungsprojekt sollte die natürliche Emission des formalen terpenoiden Grundbausteins Isopren **40** durch verschiedene Pflanzen sein. Obwohl die Freisetzung größerer Mengen von **40** ein entscheidender Faktor in der Chemie der unteren Atmosphäre darstellt, ist die physiologische Funktion für die Pflanze bisher völlig ungeklärt. Gesichert ist lediglich, daß auch die Isoprenbiosynthese im Chloroplasten abläuft und durch den MEP-Weg gespeist wird. In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Kühnemann, Institut für Angewandte Physik der Universität Bonn, sollte daher die Entwicklung eines photoakustischen Spektrometers unterstützt werden, mit dem die Isoprenemission kontinuierlich beobachtet werden kann. Hierbei sollte es möglich sein, gleichzeitig deuteriummarkiertes Isopren, das durch die Verfütterung deuteriummarkierter Deoxy-D-xylulose entstanden ist, parallel zu unmarkiertem Isopren zu messen und so genauere Einblicke in die Physiologie der Isoprenemission zu erhalten.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Einbauversuche mit deuteriummarkierten Intermediaten des MEP- und des MVA-Weges

3.1.1 Synthese markierter Vorstufen

Voraussetzung für die geplanten Einbauversuche war es, ermitteln zu können, ob das zum Aufbau der Terpene benutzte Isopentenylpyrophosphat bei gleichzeitiger Fütterung von Vorstufen beider Wege aus dem MEP- oder dem MVA-Weg stammt. Da diese Untersuchungen durch GC-MS erfolgen sollten, mußte die Anzahl der im resultierenden IPP enthaltenen Deuteriumatome verschieden sein, um die jeweiligen terpenoiden Produkte durch ihr unterschiedliches Molekulargewicht identifizieren zu können. Ferner sollten die Markierungen auch zu unterschiedlichen Positionen im IPP führen, da so durch Fragmentierungsreaktionen im Massenspektrometer Aussagen über die Positionen der IPP-Bausteine innerhalb der Terpenkette getroffen werden können. Beide Kriterien werden durch die in Abbildung 11 dargestellten Verbindungen **41** und **42** erfüllt; für beide lagen auch Synthesekonzepte bzw. Vorschriften vor.

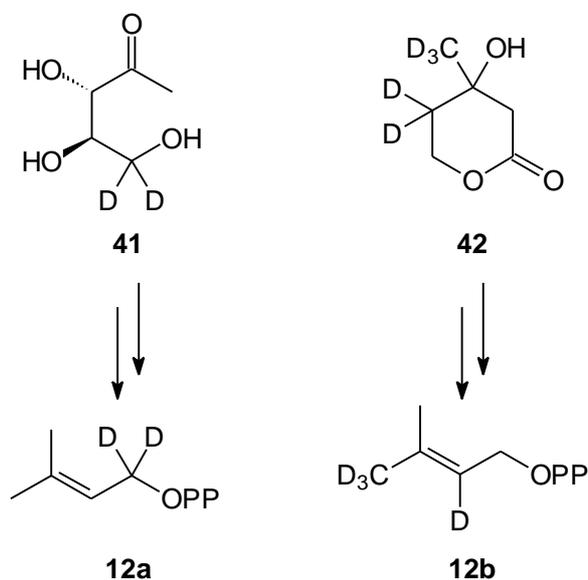


Abb. 11: [5,5-²H₂]-1-Deoxy-D-xylulose (d₂-DOX) **41** und [4,4,6,6,6-²H₅]-3-Hydroxy-3-methyl-δ-valerolacton ([4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton, d₅-MVA) **42** und die daraus resultierenden deuteriummarkierten Isopentenylpyrophosphate **12a** bzw. **12b**.

Darstellung von [5,5-²H₂]-1-Deoxy-D-xylulose

Das wachsende Wissen über die Bedeutung des MEP-Weges bei der Terpenbiosynthese hat zu einer Vielzahl verschiedener chemischer und enzymatischer Synthesen von 1-Deoxy-D-xylulose^{[92], [93]} und ihrem Phosphat^[94-96] geführt, die aber alle geringe Aubeuten liefern oder zahlreiche Reaktionschritte umfassen. Für die Synthese größerer Substanzmengen der markierter [5,5-²H₂]-1-Deoxy-D-xylulose schien eine von Jörn Piel entwickelte Syntheseroute am aussichtsreichsten.^[97] Hierbei geht man von isopropylidengeschütztem D-Weinsäuredimethylester **43** aus, der enzymatisch mit Schweineleberesterase stereoselektiv zum Monoester **44** hydrolysiert wird. Die verbleibende Esterfunktion wird anschließend mit Lithiumtriethylbordeuterid (Super-Deuterid[®]) zum Alkohol **45** reduziert, womit gleichzeitig auch die Deuteriummarkierungen eingeführt werden. Nachfolgend wird das erhaltene Lithiumsalz mit Methylithium in einer Gilman-van-Ess-Reaktion in das Methylketon **46** überführt. Die Deprotektion zum gewünschten Produkt **41** erfolgt abschließend mit einer Mischung aus Acetonitril, Wasser und Salzsäure.

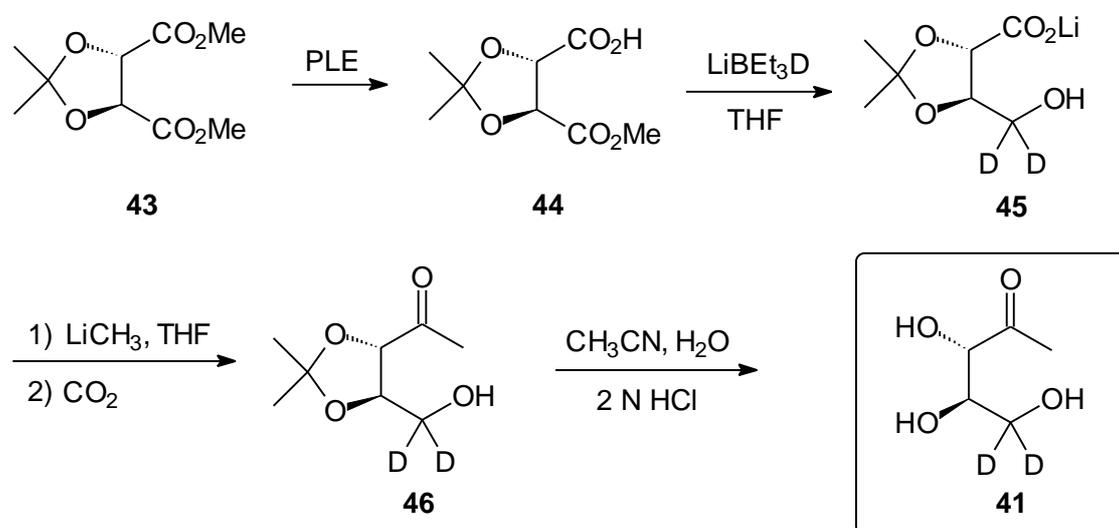


Abb. 12: Synthese von [5,5-²H₂]-1-Deoxy-D-xylulose (d₂-DOX) **41** nach Piel.^[97]

Ein Nachteil dieser Syntheseroute liegt in der reduktiven Methylierung der Carboxylatgruppe von **45** zu **46**. Dieser Schritt benötigt einen 12 fachen Überschuß an Methylithium. Zusätzlich kann als weiteres Produkt der Reaktion der tertiäre Alkohol **48** entstehen (Abb. 13). Im Verlauf der Reaktion bildet sich nach Anlagerung des ersten Äquivalents Methylithium das lithiierte Acetal **47**. Dieses Acetal verhindert, daß über-

schüssiges Methyllithium angreifen kann und unterbindet somit die Bildung des tertiären Alkohols **48**. Bei wässriger Aufarbeitung der Reaktion hydrolysiert es aber deutlich schneller zum Keton **46**, als Methyllithium mit Wasser abreagiert. Mit **46** kann überschüssiges Methyllithium dann trotzdem zum Alkohol **48** reagieren.

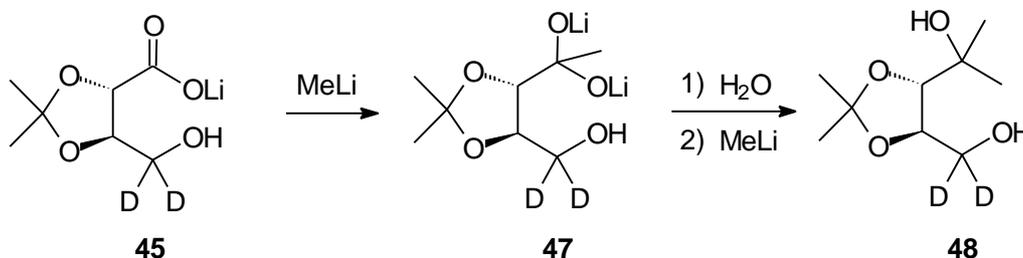


Abb. 13: Bildung des lithiierten Acetals **47** und Reaktion zum tertiären Alkohol **48** bei wässriger Aufarbeitung der Reaktionsmischung.

Die von Piel entwickelte Synthese verhindert die Bildung des tertiären Alkohols **48**, indem nach Ablauf der Methylierung überschüssiges Methyllithium durch Einleiten von Kohlendioxid entfernt wird. Trotzdem muß vor der Reaktion darauf geachtet werden, daß alle beteiligten Substanzen gründlich getrocknet werden. Dies ist für das Edukt **45** jedoch schwierig, da es sich um eine höchst hygroskopische Zwischenstufe handelt. Größere Ansätze führten daher immer zu unbefriedigenden Ausbeuten. Auf der Suche nach Möglichkeiten, dieses Problem zu umgehen, stellte sich heraus, daß sich die Reduktion der Esterfunktion und die Methylierung der Carboxylatgruppe zu einer Eintopfreaktion zusammenfassen lassen und somit auf den Trocknungsschritt verzichtet werden kann. Der Verlauf der Reaktion zeigte dabei eine starke Abhängigkeit von Art und Menge der verwendeten Lösungsmittel. Die besten Ergebnisse ergaben sich in THF, wobei es sich als essentiell herausstellte, die Reaktionsmischung nach der Reduktion und vor Zugabe des Methyllithiums mit THF auf das 10-fache Volumen zu verdünnen. Durch diese Reaktionsführung konnte die Reaktion dann auch in größerem Maßstab durchgeführt werden und die durchschnittliche Ausbeute verdoppelte sich von 20% auf 40%. Darüber hinaus verringerte sich der benötigte Überschuß an Methyllithium auf das 4-fache. Versuche, die Ausbeute der Reaktion durch Zugabe von Tetramethylethylendiamin (TMEDA) zu erhöhen, führten zwar zu kürzeren Reaktionszeiten bei der Methylierung, änderten aber nicht die Ausbeute.

Darstellung von [4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton

Die Darstellung des [4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolactons erfolgte nach Synthesekonzepten von J. Donath^[89] bzw. M. K. Schwarz.^[32] Ausgangspunkt der Synthese ist 3-Oxo-butyr-aldehyd-dimethylacetal **49**, bei dem zunächst durch basenkatalysierten Austausch der aciden Protonen in Deuteriomethanol die Deuteriummarkierungen eingeführt werden. Da die Ketogruppe von **49a** durch die anschließende Aldoladdition in eine tertiäre Alkoholfunktion überführt wird, sind die Markierungen im weiteren Verlauf der Synthese vor Rücktausch geschützt. Diese Aldoladdition zum Valerylsäureethylesterdimethylacetal **50** verläuft dabei mit fast 100 prozentiger Ausbeute, indem mit Lithiumdiisopropylamid metalliertes Ethylacetat eingesetzt wird. Nach basischer Hydrolyse von **50** zum Bariumsalz **51** wird die Dimethoxyacetalgruppierung von **51** im Säuren in einen entsprechenden Aldehyd überführt und *in situ* mit Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert. Nach erneutem Ansäuern erfolgt die Cyclisierung zum Lacton **42** dann beim Ausschütteln des Produktes aus dem wässrigen Reaktionsmedium.

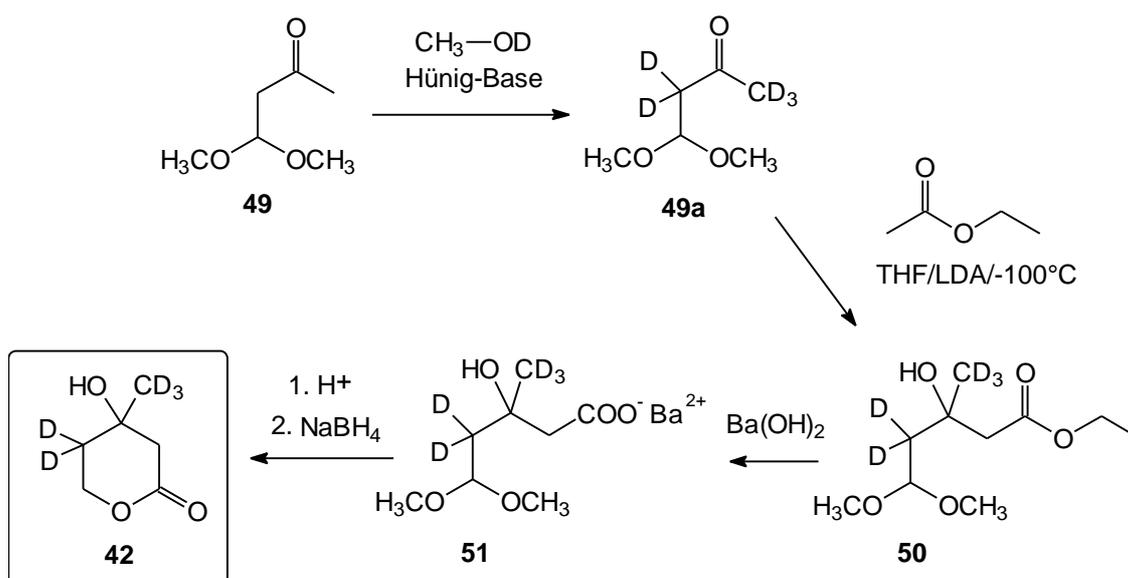


Abb. 14: Synthese von [4,4,6,6,6-²H₅]-3-Hydroxy-3-methyl- δ -valerolacton ([4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton **42**, d₅-MVA)

3.1.2 Versuche zum Einbau von d₂-DOX und d₅-MVA in induzierte Terpene der Limabohne

Ziel der Einbaustudien war es, zu untersuchen, ob die bereits festgestellte Beteiligung des MEP-Weges an der Biosynthese der Sesquiterpene artifiziell auf das zusätzliche Angebot an Vorstufen des MEP-Weges im Verlauf der Fütterungsexperimente zurück-

zuführen ist. Diesem möglichen Effekt sollte entgegengetreten werden, indem gleichzeitig Vorstufen des MVA-Weges angeboten werden. Dabei sollte die Abhängigkeit des Einbaus von der Konzentration der Vorstufen untersucht werden und mit den Werten verglichen werden, die bei Gabe nur einer Vorstufe erhalten werden. Zur Durchführung wurden 12 bis 14 Tage alte Setzlinge der Limabohne kurz oberhalb der Pflanze abgeschnitten und für 24 Stunden in wässrige Lösungen der Vorstufen gestellt. Um die Aufnahme der Lösungen zu verbessern, wurde der Transpirationssog der Versuchspflanzen erhöht, indem die Pflanzen im Verlauf der Vorinkubationen einer verringerten Luftfeuchtigkeit von ca. 25% ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Pflanzen in Lösungen überführt, die neben den markierten Vorstufen Jasmonsäure zur Auslösung der Duftproduktion enthielten. Die daraufhin emittierten Verbindungen wurden über einen Aktivkohlefilter geleitet, mit Methylenchlorid von diesem Filter desorbiert und per GC-MS untersucht. Bei allen Versuchen wurde MVA in der jeweils doppelten Konzentration der DOX appliziert, da das durch die Synthese erhaltene Mevalolacton als Racemat vorlag, die Enzyme des MVA-Weges aber nur das *R*-Enantiomer umsetzen. Im Falle eines Einbaus sollte sich das Molekulargewicht der Terpene pro Isopreneinheit um 2 bzw. 4 Masseneinheiten verschieben, je nachdem, ob die eingebaute Isopreneinheit aus DOX oder MVA gebildet worden ist. Für die im Bohnenduft enthaltenen Monoterpene Ocimen und Linalool kann sich das Molekulargewicht damit bei einem Einbau von DOX um 2 bzw. 4 und bei einem Einbau von MVA um 4 bzw. 8 erhöhen. Die Höhe der Einbauraten lassen sich leicht bestimmen, indem nicht der Totalionenstrom der Massenspektren als Chromatogramm dargestellt wird, sondern nur die Masse des zu bestimmenden Isotopomeren. Integriert man die Peaks in diesen ionenspezifischen Chromatogrammen (Ionenspuren), so kann der Markierungsgrad ermittelt werden, indem die Peakflächen der markierten Isotopomere, gewichtet nach der Anzahl der enthaltenen markierten Isopreneinheiten, summiert werden und anschließend mit der Summe der Peakflächen aller Isotopomere ins Verhältnis gesetzt werden. So stellt der Markierungsgrad den Quotienten aus den enthaltenen markierten Isopreneinheiten und der Summe aus markierten und nicht markierten Einheiten des betrachteten Terpens dar.

In den Abbildungen 15 und 16 sind die so erhaltenen Markierungsraten für Ocimen und Linalool bei getrennter Applikation der Vorstufen dargestellt.

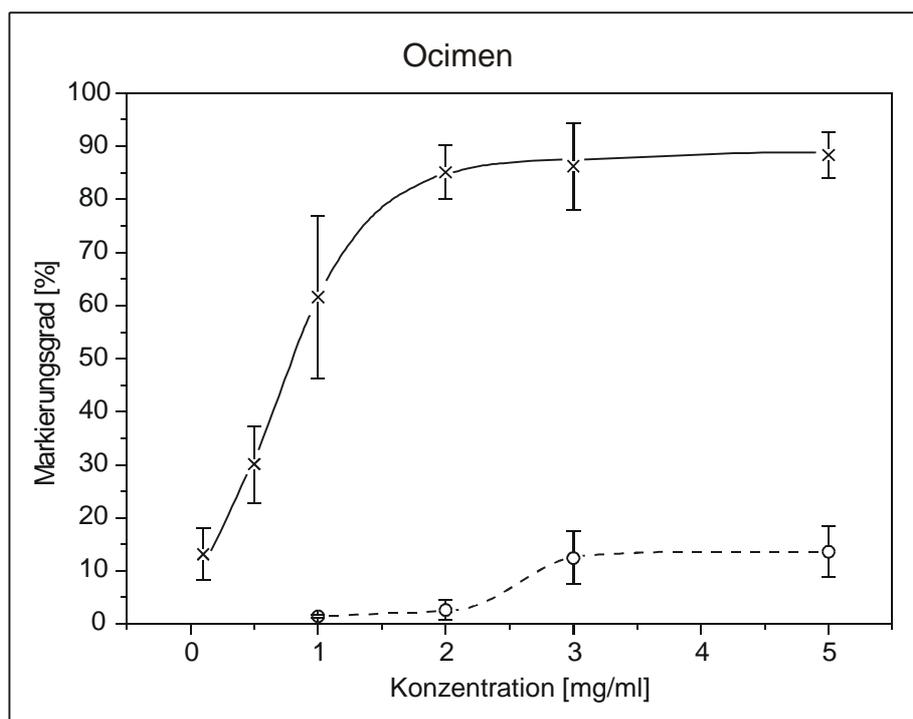


Abb. 15: Konzentrationsabhängigkeit des Markierungsgrades von Ocimen bei getrennter Applikation der Vorstufen (x = d₂-DOX **41**, o = d₅-MVA **42**, die Konzentrationsangaben für **42** beziehen sich auf das R-Enantiomer, die eingesetzte Konzentration des Racemates besaß die doppelte Größe). Für jede Konzentration sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Einbauversuchen dargestellt.

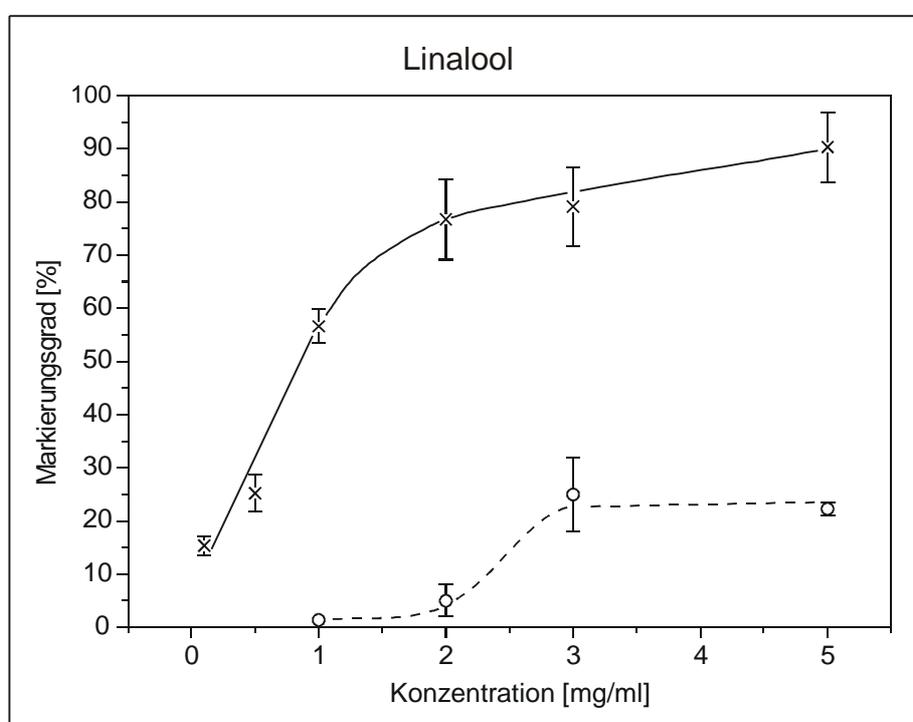


Abb. 16: Konzentrationsabhängigkeit des Markierungsgrades von Linalool bei getrennter Applikation der Vorstufen (x = d₂-DOX, o = R-d₅-MVA, siehe Erläuterungen Abbildung 15).

Wie zu erwarten, führt bei beiden Monoterpenen der Einbau von d_2 -DOX zu einem maximalen Markierungsgrad zwischen 80 % und 90 %, der damit in dem Bereich liegt, der auch von Piel beschrieben wurde.^[90] In Abhängigkeit von der Konzentration steigt die Markierungsrate dabei zügig an und erreicht ihren maximalen Wert bereits bei einer DOX-Konzentration 2 mg/ml. Im Gegensatz hierzu wird MVA erst ab dieser Konzentration sichtbar eingebaut. Bei einer Konzentration von 3 mg/ml MVA zeigt dieser Markierungsgrad dann bereits seine maximale Höhe von 15% bzw. 20%, die auch durch höhere MVA-Konzentrationen nicht gesteigert werden kann. Dieser Verlauf entspricht damit der erwarteten untergeordneten Rolle des MVA-Weges bei der Biosynthese der Monoterpene.

Für die beiden im Bohnenduft enthaltenen Sesquiterpene DMNT und Caryophyllen ergibt sich ein völlig anderes Bild. Zunächst soll aber erläutert werden, welche Einbaumuster die gewählten Vorstufen bei diesen beiden Terpenen erzeugen.

Das Homoterpen DMNT **28** geht im Verlauf seiner Biosynthese aus dem Sesquiterpenalkohol Nerolidol **52** durch oxidative Spaltung hervor. Bei dieser Reaktion entsteht ein konjugiertes Dien, dessen Bildung die Eliminierung des H_{Si} -Wasserstoffs an Position 5 erfordert (Abb. 17).^[98] Der Einbau von d_2 -DOX erhöht das Molekulargewicht daher nur maximal um 3 Masseneinheiten. Wird nur eine IPP-Einheit eingebaut, kann zusätzlich unterschieden werden, ob diese Einheit als erste (Verschiebung um 2 Masseneinheiten) oder als zweite Einheit (Verschiebung um 1 Masseneinheit) in die wachsende Terpenkette eingebaut worden ist. Die durch einen Einbau von MVA verursachten Markierungen sind von dieser Eliminierung nicht betroffen.

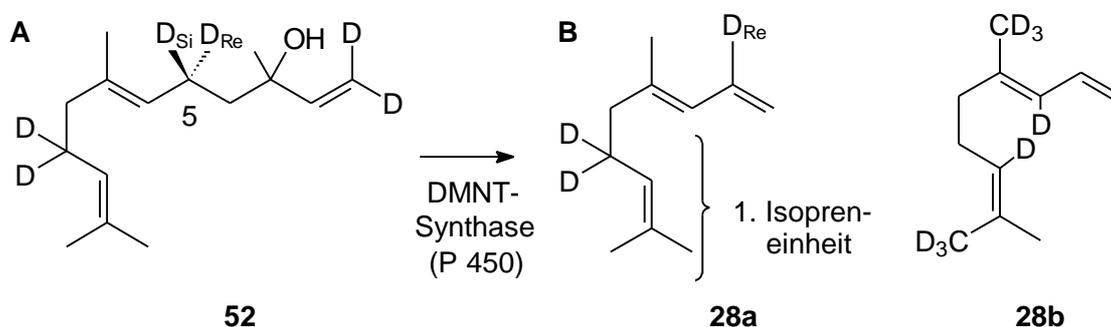


Abb. 17: **A:** Bildung von DMNT **28** aus Nerolidol **52**. **B:** Positionen der Deuteriumatome in **28** bei Einbau von d_2 -DOX (links **28a**) und bei Einbau von d_3 -MVA (rechts **28b**).

Bei der Cyclisierung von Farnesylpyrophosphat **53** zu β -Caryophyllen **33** kommt es ebenfalls zur Ausbildung einer Doppelbindung. In diesem Fall ist aber die Methylgruppe der dritten Isopreneinheit der Farnesylkette betroffen und entsprechend führt die Eliminierung zum Verlust eines Deuteriumatoms, wenn an dieser Position d_5 -MVA eingebaut worden ist. Maximal kann das Molekulargewicht von Caryophyllen daher nur um 11 Masseneinheiten verschoben werden und bei unvollständigem Einbau von MVA müssen neben den Verschiebungen um 4 und 8 Masseneinheiten auch Verschiebungen um 3 und 7 Einheiten berücksichtigt werden.

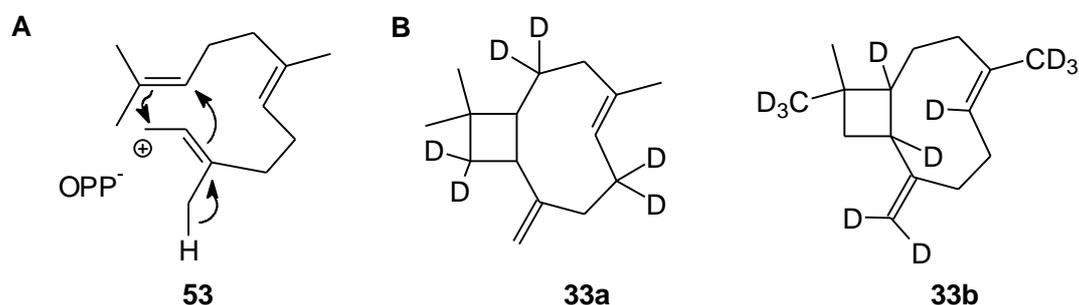


Abb. 18: **A:** postulierte Cyclisierung von Farnesylpyrophosphat **53** zu β -Caryophyllen **33** nach Abspaltung des Pyrophosphatanions. **B:** Positionen der Deuteriummarkierungen in β -Caryophyllen nach Einbau von jeweils drei Molekülen d_2 -DOX **41** (links **33a**) und d_5 -MVA **42** (rechts **33b**).

Beide Sesquiterpene zeigen die erwartete stärkere Betonung der MVA-Route (Abb. 19 und 20). Allerdings erhöht sich die Markierungsrate durch Einbau von MVA langsamer als dies beim Einbau der DOX in die Monoterpene der Fall war. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß diese Vorstufe im Vergleich zu MVA besser über die Membranen in die Zelle und weiter in den Chloroplasten transportiert wird. So gibt es Hinweise darauf, daß das Phosphat der DOX von ATP-abhängigen Pentose-Transporten über die Chloroplastenmembran transportiert werden kann. Die hierfür notwendige Phosphorylierung der eingesetzten Deoxy-D-xylulose muß für deren Verwendung im Verlauf des MEP-Weges ohnehin stattfinden und kann durch Kinasen mit hoher Substratoleranz erfolgen.

Im Unterschied zum Einbau von MVA in die Monoterpene Ocimen und Linalool, kann der Einbau von DOX in die Sesquiterpene aber kontinuierlich durch Erhöhung der DOX-Konzentration gesteigert werden.

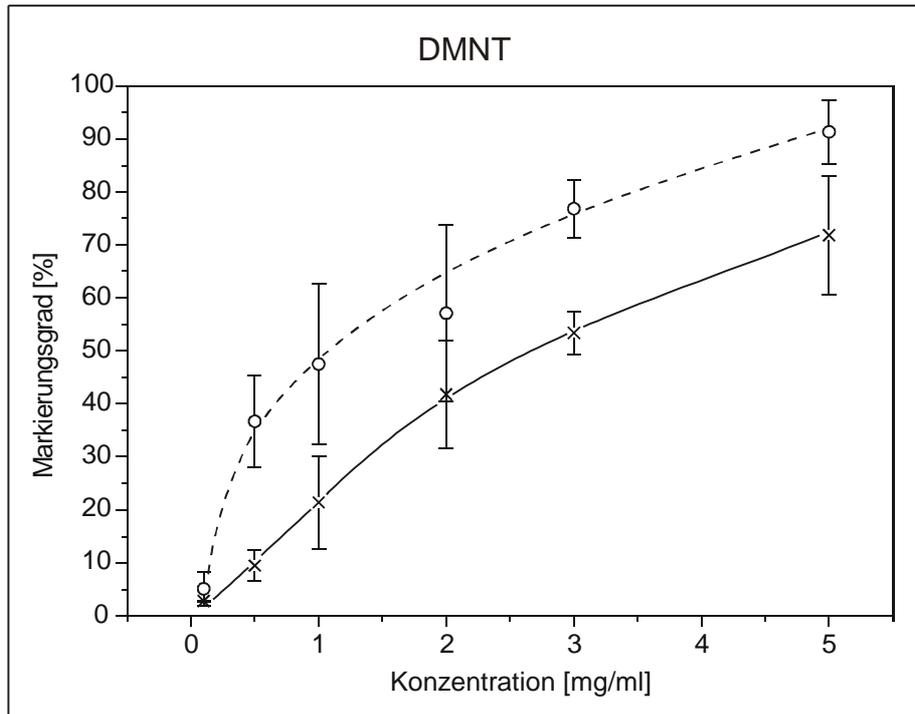


Abb. 19: Konzentrationsabhängigkeit des Markierungsgrades von DMNT **28** bei getrennter Applikation der Vorstufen (x = d₂-DOX, o = R-d₅-MVA, siehe Erläuterungen Abbildung 15).

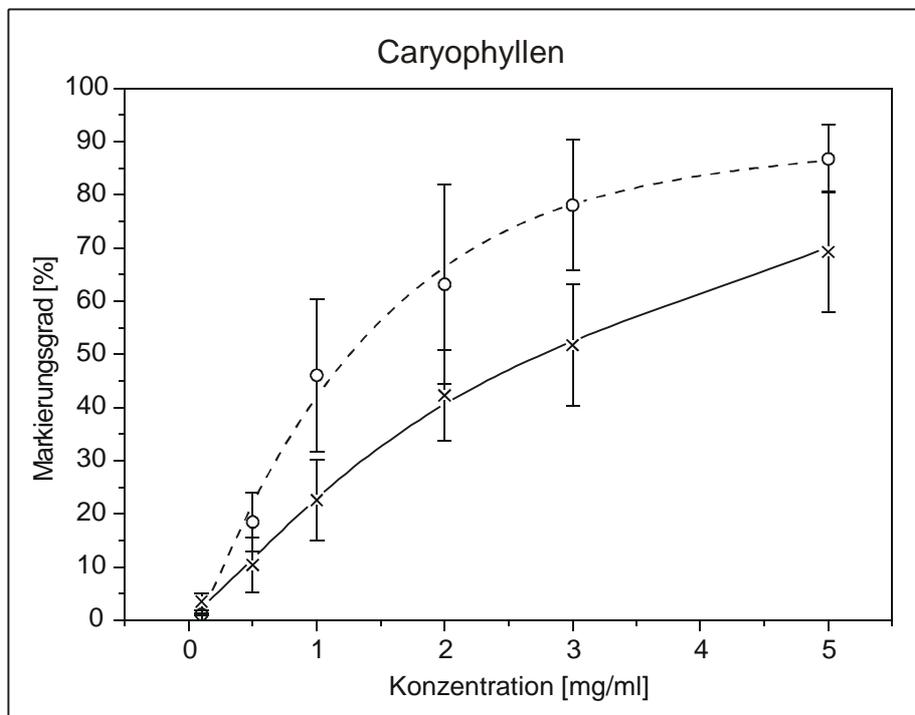


Abb. 20: Konzentrationsabhängigkeit des Markierungsgrades von β -Caryophyllen **33** bei getrennter Applikation der Vorstufen (x = d₂-DOX, o = R-d₅-MVA, siehe Erläuterungen Abbildung 15).

Da die Enzyme des MEP-Weges im Chloroplasten angesiedelt sind, die Biosynthese der Sesquiterpene aber im Cytosol stattfindet, muß die von der Zelle aufgenommene, markierte Deoxy-D-xylulose in den Chloroplasten transportiert werden und dort in IPP oder nachfolgende Vorstufen der Terpenbiosynthese überführt werden. Erst diese können im Cytosol weiterverarbeitet werden. Für die Beteiligung des MEP-Weges an der Sesquiterpenbiosynthese müssen also diese späteren Vorstufen aus dem Chloroplasten ins Cytosol exportiert werden. Da die Einbaurrate bei Erhöhung der DOX-Konzentration kontinuierlich steigt, muß dieser Export proportional zur DOX-Konzentration erfolgen. Dies unterstreicht damit nicht nur allgemein die Beteiligung des MEP-Weges an der Biosynthese von Sesquiterpenen, es unterstützt auch die Hinweise auf eine dynamische Nutzung der MEP-Route im Verlauf deren Biosynthese. Diese hatte sich ja schon in den Arbeiten von Piel durch den erhöhten Einbau von Deoxy-D-xylulose in DMNT bei gleichzeitiger Blockade des MVA-Weges mit Inhibitoren angedeutet.^[90]

Die simultane Gabe von Vorstufen beider Wege sollte nun noch Hinweise darauf geben, wie stark dieser Befund durch die einseitig erhöhte Konzentration der Intermediate des MEP-Weges beeinflusst wird.

Die Analyse der anfallenden Chromatogramme wurde dabei durch den Umstand erleichtert, daß Isotopomere mit höherem Deuteriumgehalt, aufgrund ihres geringeren Siedepunktes und ihrer herabgesetzten Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial, schneller von der GC-Säule eluieren. Im Idealfall können dabei die einzelnen Massenspektren der Isotopomere in unterschiedlichen Scans isoliert betrachtet werden. In Abbildung 21 ist diese chromatographische Antrennung für DMNT dargestellt. Bemerkenswert war hierbei das in Abb. 21 C abgebildete Massenspektrum, dessen Molekülion eine Masse von 156 besitzt. Diese Masse ist nur durch den gleichzeitigen Einbau von DOX und MVA zu erklären. Die Wechselwirkung zwischen DOX und MVA-Weg muß damit also auf einem Export von Isopentenylpyrophosphat ins Cytosol beruhen.

Der zusätzliche Export höherer Homologer, etwa Geranylpyrophosphat oder Farnesylpyrophosphat, kann dabei natürlich nicht ausgeschlossen werden. Hierfür sprechen zum Beispiel Versuche von Adam zur Biosynthese von Sesquiterpenen in der Kamillenblüte.^[91] Durch den Einbau von ¹³C-markierter Glucose ließen sich die beiden ersten Isopreneinheiten dem MEP-Weg zuordnen, während die dritte Einheit einen gemischten Ursprung besaß.

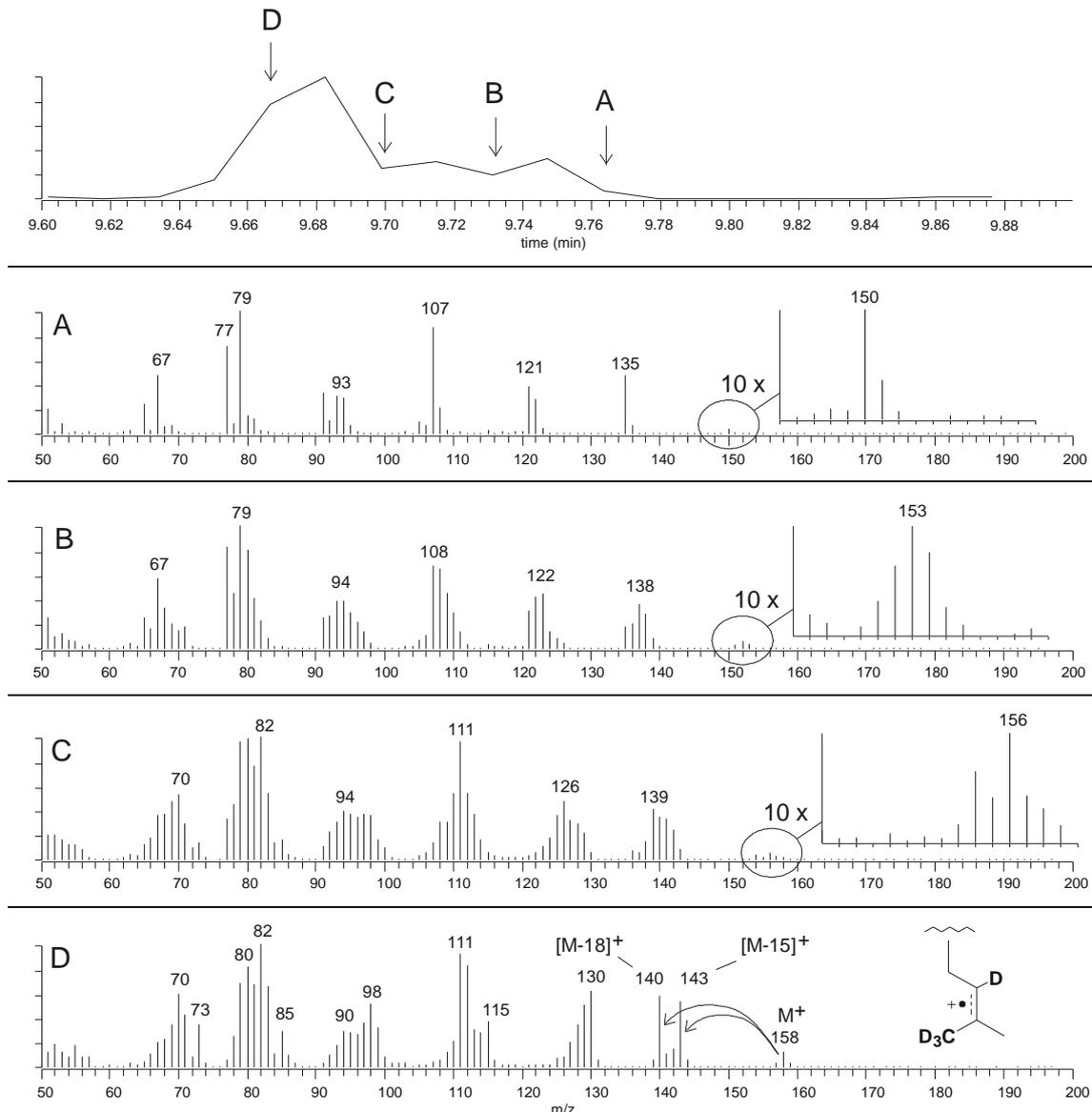
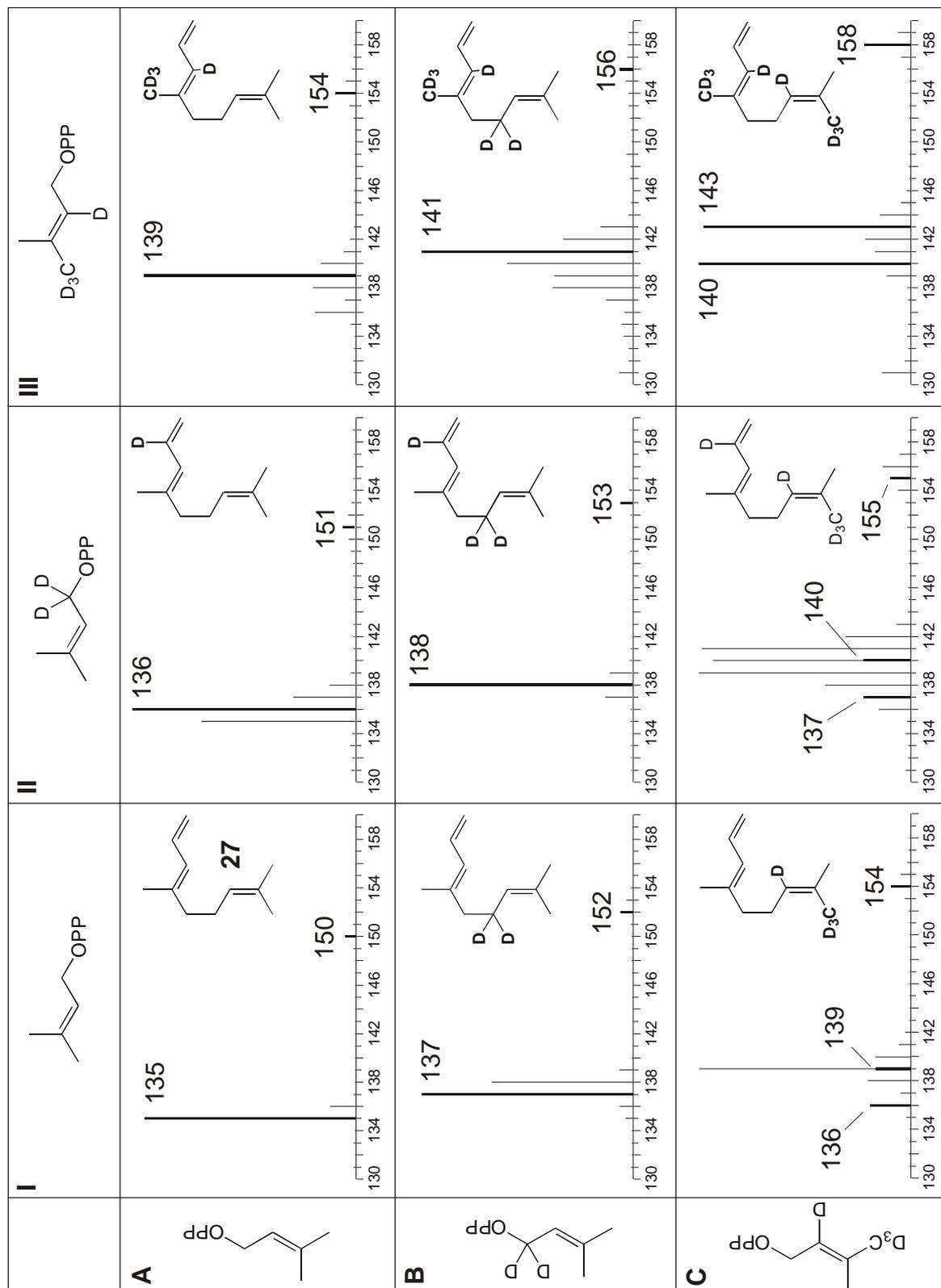


Abb. 21: Chromatographische Auftrennung einzelner Isotopomere von DMNT. **A:** kein Einbau von markierten Vorstufen, **B:** vollständiger Einbau von d_2 -DOX, **C:** gleichzeitiger Einbau von d_2 -DOX und d_5 -MVA, **D:** vollständiger Einbau von d_5 -MVA. **A-C:** der Bereich des Moleküliions ist um den Faktor 10 vergrößert dargestellt, **D:** Fragmentierung des Moleküliions durch Abspaltung der allylischen Methylgruppen.

Der Export plastidären IPP erfordert aber auch, daß im Verlauf der durchgeführten Einbauversuche alle Kombinationen aus nichtmarkiertem IPP und beiden markierten Vorstufen entstehen müssen. Diese lassen sich im Falle des DMNT auch alle massenspektroskopisch nachweisen. Die Position einer Isopentenyleinheit des DOX-Weges kann hierbei aufgrund der unterschiedlichen Zahl der verbleibenden Deuteriumatome (1 bzw. 2) bestimmt werden und über die Position einer Isopreneinheit des MVA-Weges kann der massenspektrometrische Zerfall Auskunft geben.



Tab. 1: mögliche Kombinationen des Einbaus von d_2 -DOX und d_5 -MVA in DMNT **28** und der Bereich der Molionen aus den Massenspektren der daraus resultierenden Isotopomeren. In den Zellen CI und CII wird die Masse 139 von der Fragmentierung des in Zelle AIII dargestellten Isotopomers überlagert.

So bewirkt die Ionsisierung der Doppelbindung innerhalb der Dimethylallylgruppe im DMNT die Abspaltung einer der beiden Methylgruppen. Beim Einbau von MVA an dieser Position muß eine dieser Methylgruppen aber perdeutert sein, ausgehend von einem Molekulargewicht von 158 müssen daher statt nur einem Peak bei 143 ([M-15]), je ein Peak bei 143 ([M-15]) und ein Peak bei 140 ([M-18]) entstehen (Abb. 21 D).

Die Abspaltung der beiden Methylgruppen erfolgt dabei nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit. Die Integration der Ionenspuren der Massen 140 und 143 zeigte, daß beide Spaltprodukte aufgrund eines sekundären Isotopeneffektes im Verhältnis 52 zu 48 entstehen.

Erfolgt der Einbau nur einer MVA-Einheit, kann mit diesem Zerfall unterschieden werden, ob diese als erste oder als zweite Einheit in die Terpenkette eingebaut worden ist. In beiden Fällen beträgt das Molekulargewicht zwar 154, im ersten Fall muß aber wieder eine Aufspaltung zu zwei Peaks beobachtet werden (136 und 139), während im zweiten Fall nur der Peak bei 139 entsteht. Da sich die Zahl der Deuteriumatome in beiden Isotopomeren nicht unterscheidet, überlagern sich die Massenspektren dieser beiden Spezies.

In Tab. 1 sind die für die Charakterisierung ausreichenden Bereiche des Molekülions und der Dimethylallylspaltung aller Isotopomere dargestellt.

Auffällig war dabei, daß die beiden durch den gemischten Einbau möglichen Isotopomere scheinbar nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit entstanden sind. Während das bereits erwähnte Isotopomer der Masse 156 (Tab. 1, Zelle BIII), bei dem die erste IPP-Einheit aus dem MEP-Weg stammt, in fast allen Chromatogrammen zu finden ist, konnte das Isotopomer mit umgekehrtem Aufbau (Tab. 1, Zelle CII, Masse 155) nur in Spuren gefunden werden.

Dies macht sich auch bei einer Aufstellung der prozentualen Verhältnisse der verschiedenen Isotopomere bemerkbar, die in Abbildung 22 dargestellt ist. Das Isotopomer BIII erreicht dabei einen Anteil von bis zu 14%, der damit doppelt so hoch ist, wie der Anteil des Isotopomers CII. Über die Ursache dieses Ungleichgewichtes kann mit den vorliegenden Daten aber keine Aussage getroffen werden.

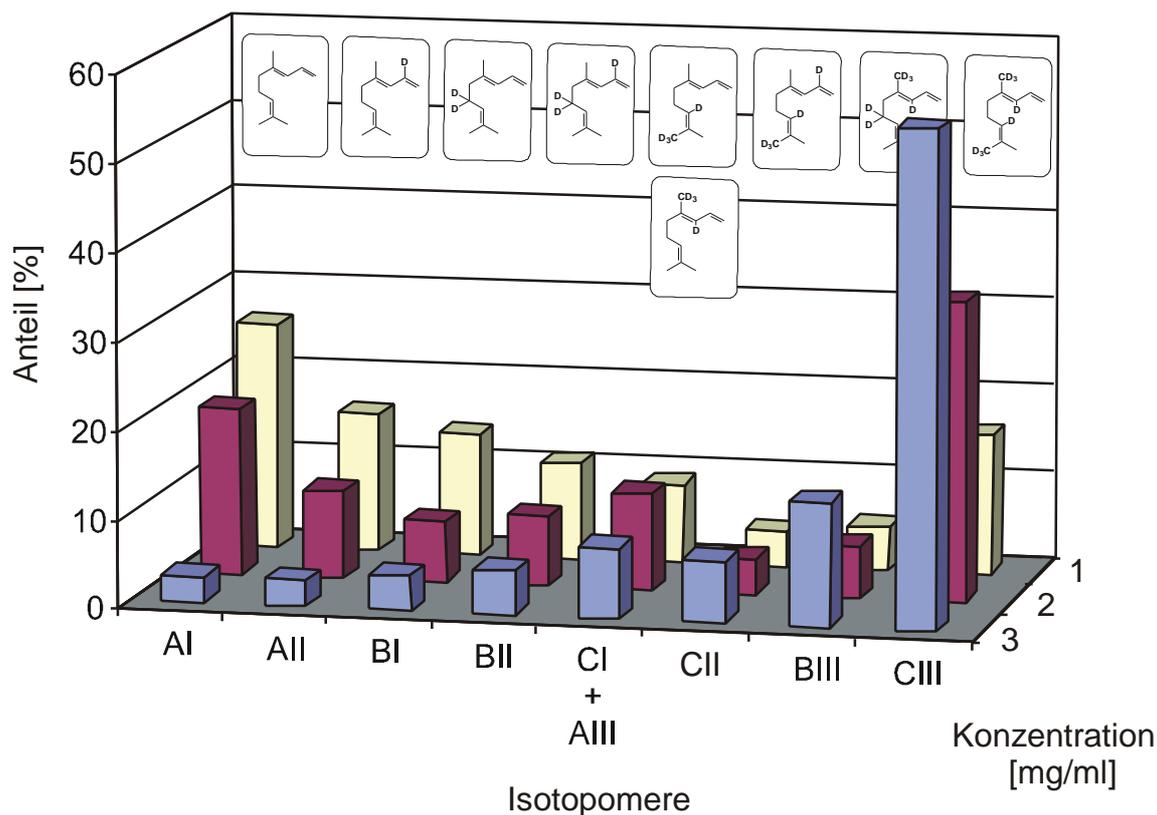


Abb. 22: Prozentuale Verteilung der Isotopomere von DMNT bei unterschiedlichen Konzentrationen der markierten Vorstufen (d_2 -DOX, R - d_3 -MVA, siehe Erläuterungen Abbildung 15). Für jedes Isotopomer ist der Mittelwert aus drei Einbauversuchen dargestellt.

In dieser Abbildung deutet sich auch bereits an, dass der Einbau von DOX bei gleichzeitiger Applikation von MVA, verglichen mit der alleinigen Gabe von DOX, deutlich geringer ausfällt. Deutlich wird dies, wenn man die Anteile der Isotopomere, gewichtet nach der Zahl der eingebauten Vorstufen zum Markierungsgrad zusammenfaßt (Abb. 23).

Bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml steigt der, auf den Einbau von d_2 -DOX zurückzuführende, Markierungsgrad auf einen Wert von 20% an, um danach zu stagnieren und wieder leicht auf 17% abzufallen. Durch das gleichzeitige Angebot von DOX und MVA wird bei höheren Konzentrationen der meßbare Einbau von IPP des MEP-Weges in Sesquiterpene also deutlich zurückgedrängt. Als mögliche Ursache muß zunächst ein einfacher statistischer Effekt berücksichtigt werden. So wird durch die gleichzeitige Gabe beider Vorstufen die jeweilige Einbauwahrscheinlichkeit halbiert.

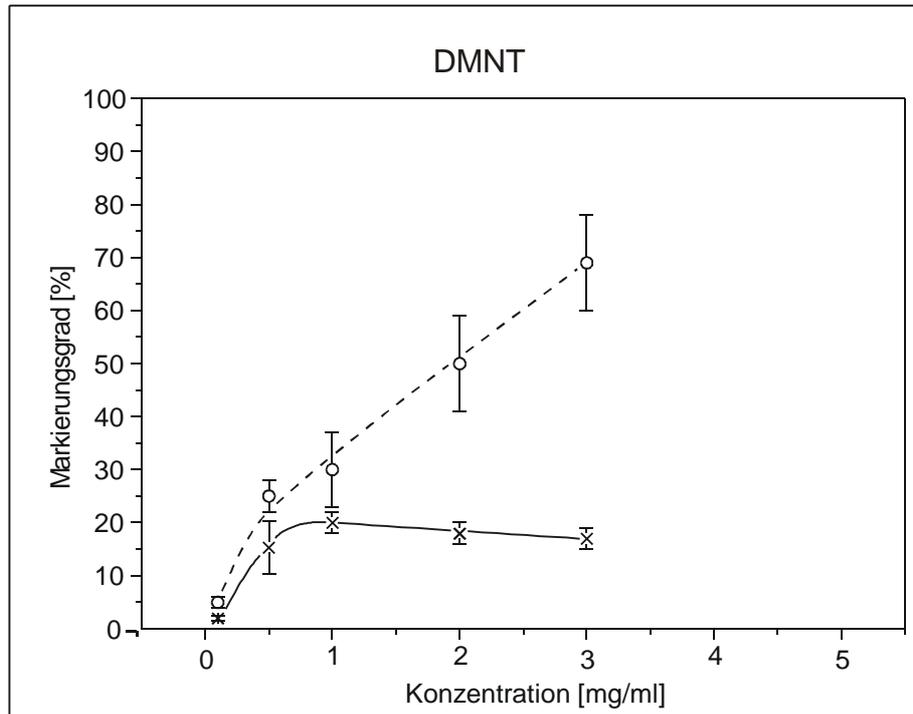


Abb. 23: Konzentrationsabhängigkeit des Markierungsgrades von DMNT bei gleichzeitiger Applikation der Vorstufen (x = d₂-DOX, o = R-d₅-MVA, siehe Erläuterungen Abbildung 15). Für die Konzentration von 1 bis 3 mg/ml sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus fünf Einbauversuchen dargestellt, bei geringeren Konzentrationen die Ergebnisse aus drei Einbauversuchen. Pflanzen, die einer Konzentration von 5 mg/ml beider Vorstufen ausgesetzt wurden, ließen sich nicht mehr zur Duftproduktion anregen und zeigten starke Nekrosen entlang der Blattadern, die vermutlich auf den hohen osmotischen Druck zurückzuführen sind, der durch die Inkubationslösung ausgeübt wurde.

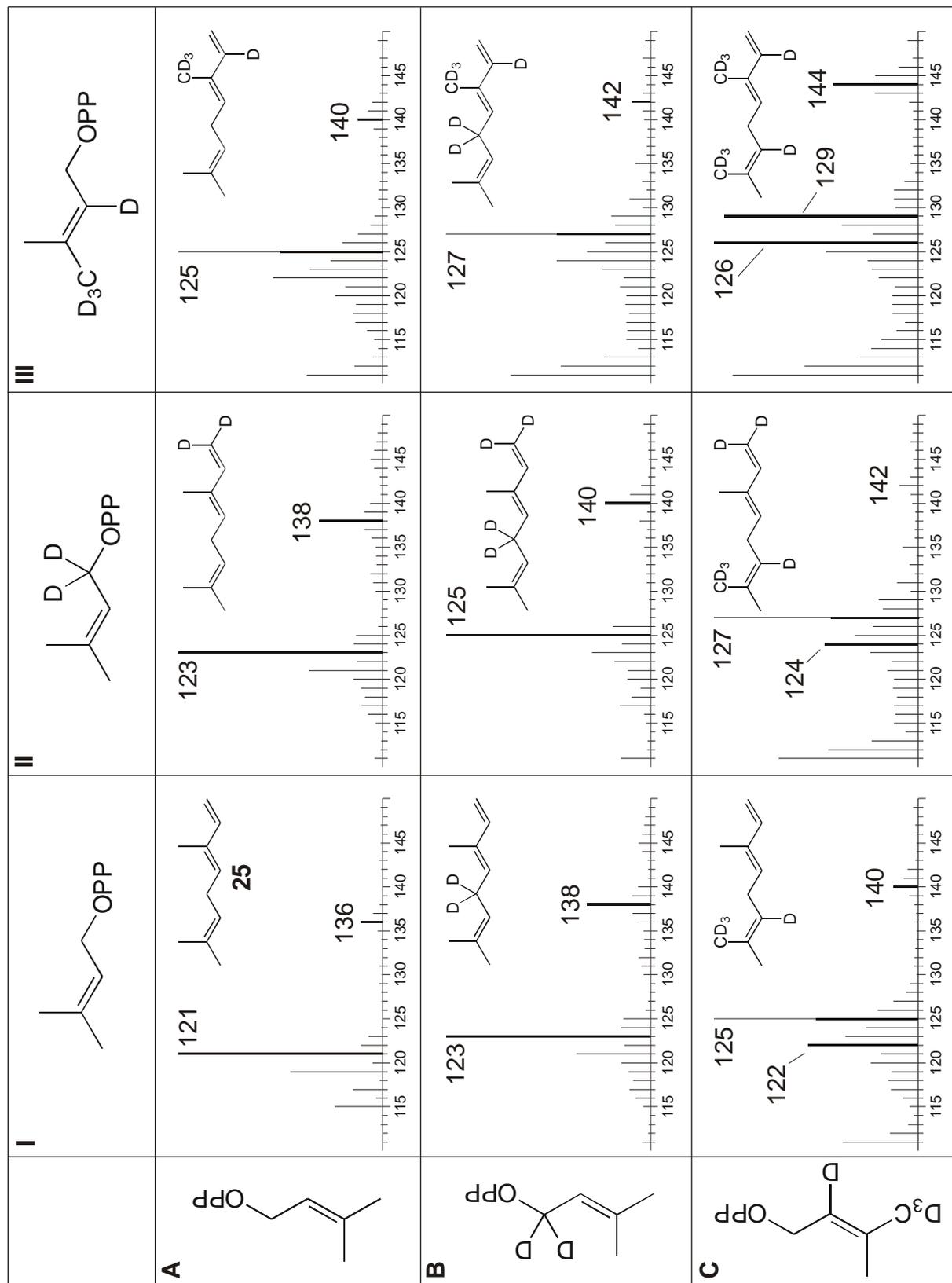
Eine Halbierung der Markierungsraten wird aber nicht beobachtet. Während der, auf den Einbau von d₅-MVA zurückzuführende, Markierungsgrad im Vergleich zu den Einzelapplikationen zwischen 10 und 15 Prozent abnimmt, fällt der Rückgang des, auf den Einbau von d₂-DOX zurückzuführende, Markierungsgrad weitaus stärker aus. Neben dem genannten statistischen Effekt, kann als weitere Ursache dieser Abnahme der Rückgang des Exportes von plastidärem IPP ins Cytosol in Frage kommen. Da IPP ein mehrfach geladenes Ion ist, kann der Export über die Membranen des Plastiden nicht in signifikanter Größe durch Diffusion stattfinden, sondern muß aktiv über Transporterproteine erfolgen. Dieser Transporter könnte den Export von IPP aus den Plastiden in Abhängigkeit vom Konzentrationsunterschied des IPP zwischen Plastiden und Cytosol ermöglichen. Erhöht sich einseitig die plastidäre IPP-Konzentration, wird mehr IPP ins Cytosol abgegeben. Erhöhen sich dagegen plastidäre und cytosolische IPP-Konzentration parallel, bräuchte nur ein gleichbleibender Prozentsatz ins Cytosol abgegeben werden. Diese Überlegung deckt sich auch mit dem beobachteten sprunghaften

Auftreten des Einbaus von cytosolischem MVA in plastidäre Monoterpene. Die Konzentrationserhöhung des cytosolischen IPP muß zunächst ein Potential aufbauen, daß groß genug ist, um die entgegengesetzte Arbeit des Transporters auszugleichen. Erst bei höheren Konzentrationen wäre dann ein Übertritt in den Plastiden möglich.

Der Einbau von Deoxy-D-xylulose bei gleichzeitiger Gabe von Mevalonsäure wird auch bei dem Sesquiterpen β -Caryophyllen beobachtet. Ähnlich wie beim DMNT finden sich auch hier Isotopomere, deren Massenspektren nur durch den gleichzeitigen Einbau von DOX und MVA zu erklären sind. Für eine genaue, quantitative Auswertung ist die Menge des emittierten Caryophyllenes aber zu gering.

Die Wechselwirkung zwischen MEP-Weg und Sesquiterpenbiosynthese auf der Ebene des IPP, kann umgekehrt auch beim Einbau von cytosolischem MVA in die plastidären Monoterpene beobachtet. Ähnlich wie bei DMNT, kommt es ebenfalls zur Bildung von Isotopomeren, die nur durch den gleichzeitigen Einbau von DOX und MVA zu erklären sind. Allerdings ist ihr Anteil auch hier zu gering, um sicher quantifiziert zu werden. In Tabelle 2 sind dennoch für Ocimen **26** die Regionen der Molionen aus den Massenspektren aller Isotopomere dargestellt. Da auch Ocimen eine Dimethylallylgruppierung besitzt, läßt sich die Zuordnung der Massenspektren zu den Isotopomeren aufgrund der gleichen Fragmentierungsreaktionen durchführen, die auch bei DMNT zur Zuordnung verwendet wurden. Gemischte Isotopomere finden sich auch bei beiden unbekanntem Terpenen $C_{10}H_{14}$ und $C_{10}H_{16}O$. In allen Fällen kann der Einbau von cytosolischem IPP aber erst bei MVA-Konzentrationen von 2 mg/ml oder höher beobachtet werden und entspricht damit den Ergebnissen, die bei der alleinigen Applikationen von MVA beobachtet werden.

In der Summe zeigen die Ergebnisse der Einbauversuche, daß der Anteil des MEP-Weges an der Sesquiterpenbiosynthese durch die Gabe von Deoxy-D-xylulose zwar überbewertet worden ist, daß eine grundsätzliche, wenn auch geringere, Beteiligung aber nicht ausgeschlossen werden darf. Diese Beteiligung scheint dynamisch durch die Konzentrationsverhältnisse des IPP im Chloroplasten und im Cytosol gesteuert zu sein.



Tab. 2: mögliche Kombinationen des Einbaus von d_5 -DOX und d_5 -MVA in Ocimen **26** und der Bereich der Molionen aus den Massenspektren der daraus resultierenden Isotopomeren. In den Zellen CI und AII bzw. CII und BIII überlagern sich die Massenspektren der beiden Isotopomere.

3.2 Inhibitorstudien zur Terpenbiosynthese in der Limabohne

3.2.1 Inhibitoren der MEP-Route

Für die gezielte Suche nach Inhibitoren eines Stoffwechselweges sollten die Mechanismen der an dem Weg beteiligten Enzyme bekannt sein. Das Design eines potentiellen Inhibitors kann so auf der Basis einer systematischen Struktur-Wirkungs-Beziehung erfolgen. Obwohl das entsprechende Enzym zu Beginn dieser Arbeit noch nicht isoliert worden war, vermutete man bereits, daß der erste Schritt des MEP-Weges, die Bildung von Deoxy-D-xylulose aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, durch eine Thiamin-abhängige Transketolase katalysiert wird. Enzyme dieses Typs sind in der Natur weit verbreitet^{[99], [100]} und entsprechend gibt es für andere Enzyme dieses Typs Inhibitoren, die als Leitstruktur dienen könnten.^[101] Die weite Verbreitung dieses Enzymtyps bringt aber gleichzeitig die Gefahr mit sich, daß neben der DXP-Synthase auch andere Enzyme inhibiert und so die Ergebnisse der durchzuführenden *in vivo*-Versuche beeinflusst werden.

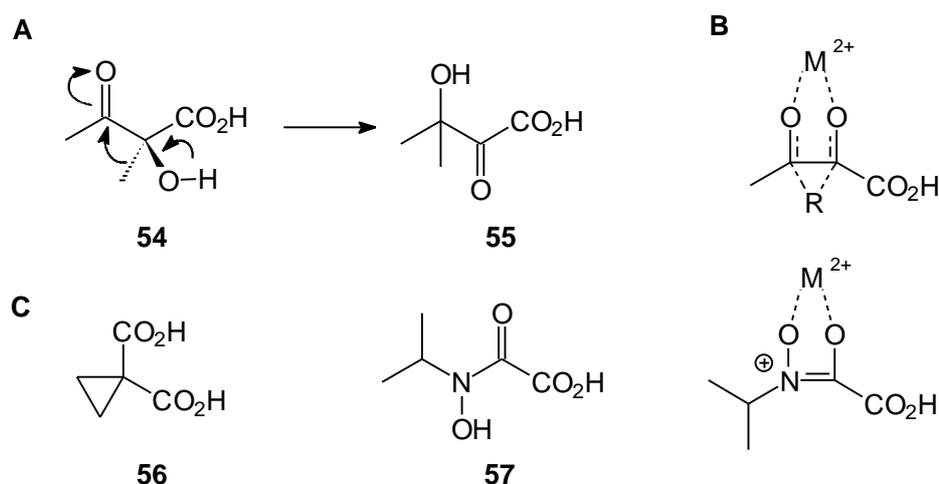


Abb. 24: Umlagerung von 2-Acetolactat **54** zu 3-Hydroxy-3-methyl-2-oxo-butyrat **55**. **B:** Übergangszustand der Reaktion. **C:** 1,1-Cyclopropanedicarbonsäure **56** und N-Hydroxy-N-isopropylloxamat **57**, bzw. dessen im Enzym-Inhibitor-Komplex vermutlich vorliegende Iminolform.

Im Unterschied hierzu stellt der nächste Schritt im Verlauf des MEP-Weges, die Umlagerung zur Erythritose, eine nahezu einzigartige Reaktion dar. Lediglich im Verlauf der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin ist eine ähnliche Reaktion bekannt. Das Enzym Ketolsäure-Reduktoisomerase katalysiert hier in Gegenwart von Magnesium- oder Manganionen die Umlagerung von 2-Acetolactat **54** zu

3-Hydroxy-3-methyl-2-oxo-butyrat **55** und die anschließende Reduktion zu 2,3-Dihydroxyisovalerat (Abb. 24 A).^{[102], [103]}

Als Inhibitoren dieser Reaktion sind unter anderem 1,1-Cyclopropandicarbonsäure **56** und N-Hydroxy-N-isopropylloxamat (IpOHA) **57** beschrieben worden, die als kompetitive Inhibitoren die strukturellen bzw. elektronischen Verhältnisse des Übergangszustandes der Reaktion nachahmen (Abb. 24 B).^{[104], [105]}

Da nicht nur der Mechanismus dieser Reaktion Ähnlichkeiten mit der postulierten Reaktion der DXP-Reduktoisomerase aufweist, sondern auch die Substrate strukturell nicht zu weit von den Substraten des MEP-Weges entfernt sind, wurde überprüft, ob die genannten Inhibitoren der Ketolsäure-Reduktoisomerase auch in den Terpenstoffwechsel eingreifen. Als Testsystem wurde das induzierte Duftbouquet der Limabohne gewählt, da die hier emittierten Verbindungen *de novo* synthetisiert werden. Wenn Enzyme der Terpenbiosynthese inhibiert werden, sollten die im Bouquet enthaltenen Terpene im Verhältnis zu den ebenfalls enthaltenen Produkten des Shikimat- und des Acetogenat-Stoffwechsels deutlich reduziert sein. Setzlinge der Limabohne, die mit den potentiellen Inhibitoren 24h vorinkubiert und anschließend mit Jasmonsäure elicitiert wurden, zeigten aber keine Veränderung in der Zusammensetzung des emittierten Duftes.

Der MEP-Weg stellt in Pflanzen und Bakterien einen zentralen Stoffwechselweg dar. Es ist daher naheliegend, daß im Verlauf der Evolution Wirkstoffe entstanden sind, die hier eingreifen. Bekannte Antibiotika, deren Struktur Ähnlichkeiten mit den genannten Inhibitoren der Ketolsäure-Reduktoisomerase aufweisen, sind Phosphomycin **58** und Fosmidomycin **59**.

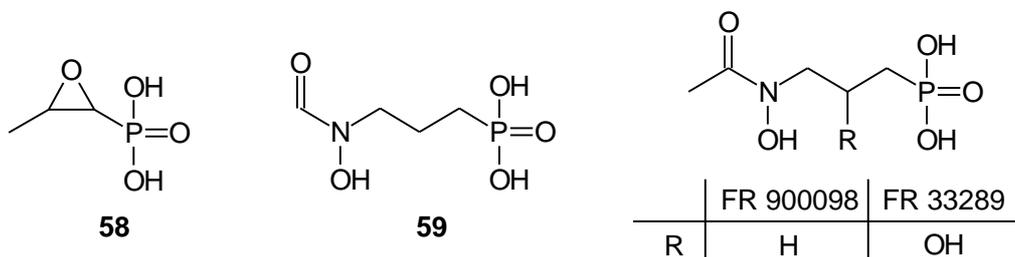


Abb. 25: Antibiotika mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Inhibitoren der Ketolsäure-Reduktoisomerase: Phosphomycin **58**, Fosmidomycin (FR 31564) **59** und strukturverwandte Antibiotika von **59**.

Phosphomycin **58** greift allerdings in die bakterielle Zellwandsynthese ein, indem es dort die Pyruvat-uridindiphospho-N-acetylglucosamin-Transferase inhibiert.^[106] Die

Substanz führte daher erwartungsgemäß im Duftassay an der Limabohne auch nicht zu einer Veränderung in der Terpenbiosynthese.

Im Gegensatz hierzu war für Fosmidomycin **59** eine Wechselwirkung mit der Terpenbiosynthese in Bakterien beschrieben worden, auch wenn zum damaligen Zeitpunkt keine Aussage über den genauen Wirkmechanismus getroffen werden konnte.^[107] Die Substanz wurde 1980 im Rahmen eines Streptomyces-Screening Programms durch den Pharmakonzern Fujisawa aus dem Bakterienstamm *Streptomyces lavendulae* isoliert und gehört zu einer kleinen Gruppe strukturverwandter Antibiotika, die im gleichen Screening entdeckt worden waren.^[108] Seine Wirkung als Inhibitor der DXP-Reduktisomerase wurde dann im Zeitraum der vorliegenden Arbeit durch zwei Arbeitsgruppen an *E. Coli* und am Malariaerreger *P. falciparum*^[109] gezeigt. Damit war Fosmidomycin ein aussichtsreicher Kandidat für die Blockade des MEP-Weges auch in Pflanzen wie etwa der Limabohne. Da die Verbindung kommerziell nicht erhältlich ist, wurde es in Anlehnung an ein Patent des Fujisawa-Konzerns synthetisiert.^[110]

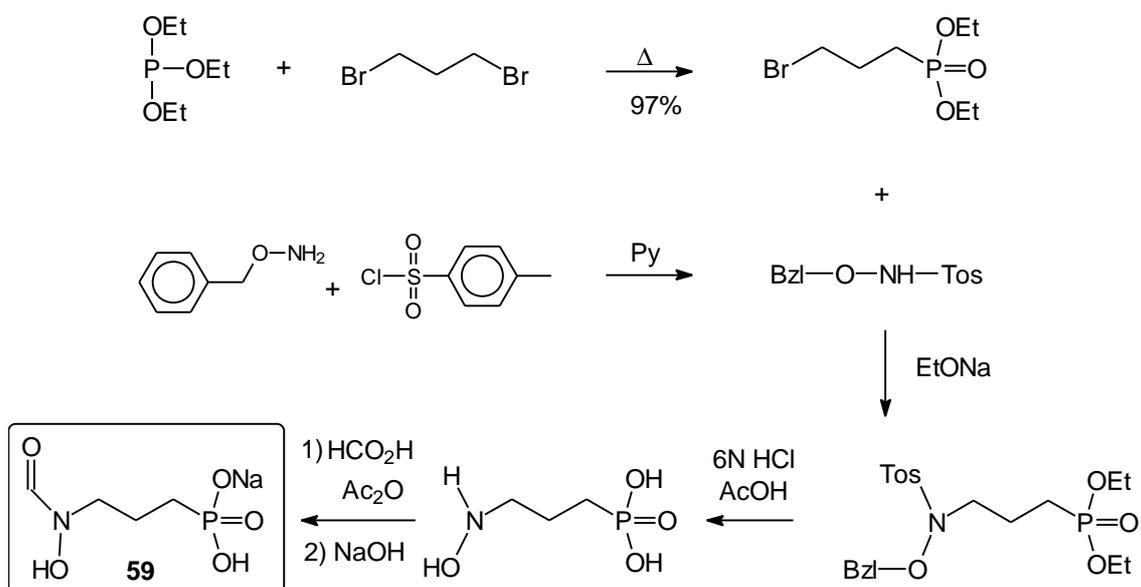


Abb. 26: Synthese-Schema zur Darstellung von Fosmidomycin.

Die Einführung der Phosphonatgruppe erfolgt hierbei durch eine Michaelis-Arbusov-Reaktion zwischen 1,3-Dibrompropan und Triethylphosphit. Das verbleibende Bromid wird anschließend durch eine geschützte Hydroxylamingruppe substituiert, die leicht aus *O*-Benzoylhydroxylamin und *p*-Toluensulfonsäurechlorid zugänglich ist. Nach Ent-

schützung im stark Sauren wird abschließend die Hydroxylamingruppe durch ein *in situ* hergestelltes gemischtes Anhydrid aus Essigsäure und Ameisensäure formyliert.

3.2.2 Selektive Blockade des MEP- und des MVA-Weges

Die Wirkung von Fosmidomycin **59** auf die Terpenbiosynthese in der Limabohne zeigte sich in Inkubationsexperimenten mit Setzlingen der Bohne. Nach 24 h Vorinkubation und anschließender Elicitierung mit Jasmonsäure ist die Biosynthese der Monoterpene Ocimen **26** und Linalool **27** vollständig unterdrückt (Abb. 27 B). Auch die Emission der beiden nicht charakterisierten Terpene $C_{10}H_{14}$ **29** und $C_{10}H_{16}O$ **30** ist drastisch reduziert. Substanzen, die nicht aus dem Terpenstoffwechsel stammen, wie etwa das Hexenylacetat **25** sind dagegen unbeeinflusst. Die zu erwartende dominante Rolle des MEP-Weges bei der Biosynthese von Monoterpenen wird damit bestätigt.

Von besonderem Interesse war im Verlauf dieser Versuche die Menge des emittierten DMNT **28**. Da es durch oxidativen Abbau des Sesquiterpens Nerolidol entsteht, sollte es überwiegend aus dem cytosolischen MVA-Weg stammen. Andererseits hatten die Einbauversuche mit deuterierten Vorstufen einen merklichen Anteil des MEP-Weges angezeigt. Bei einer Blockade des MVA-Weges sollte daher die DMNT-Biosynthese nicht vollständig unterdrückt werden. Hierzu wurden Bohnen mit Cerivastatin[®] vorbehandelt, einem von der Bayer AG entwickelten Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, der daher unter anderem zur Senkung des Cholesteringehaltes bei Erkrankungen der Herzkranzgefäße eingesetzt wird.^[111] Tatsächlich ist die DMNT-Biosynthese bei Anwendung von Cerivastatin deutlich auf bis zu 30% reduziert, sie läßt sich aber nicht vollständig unterdrücken (Abb. 27 C). Dies könnte als weiteres Indiz für eine Beteiligung des MEP-Weges an der Biosynthese des DMNT interpretiert werden. In diesem Fall sollte das verbleibende DMNT aber bei einer parallelen Inkubation von Cerivastatin und Fosmidomycin nicht mehr beobachtbar sein. Auszuschließen ist aber auch nicht, daß die restliche DMNT-Emission auf eine unvollständige Unterdrückung der HMG-CoA-Aktivität zurückzuführen ist, allerdings sollte diese dann durch eine parallele Inkubation nicht beeinflußt werden. Wie man Abb. 28 entnehmen kann, werden von der Limabohne nach Inkubation mit beiden Inhibitoren aber keine Terpene mehr freigesetzt.

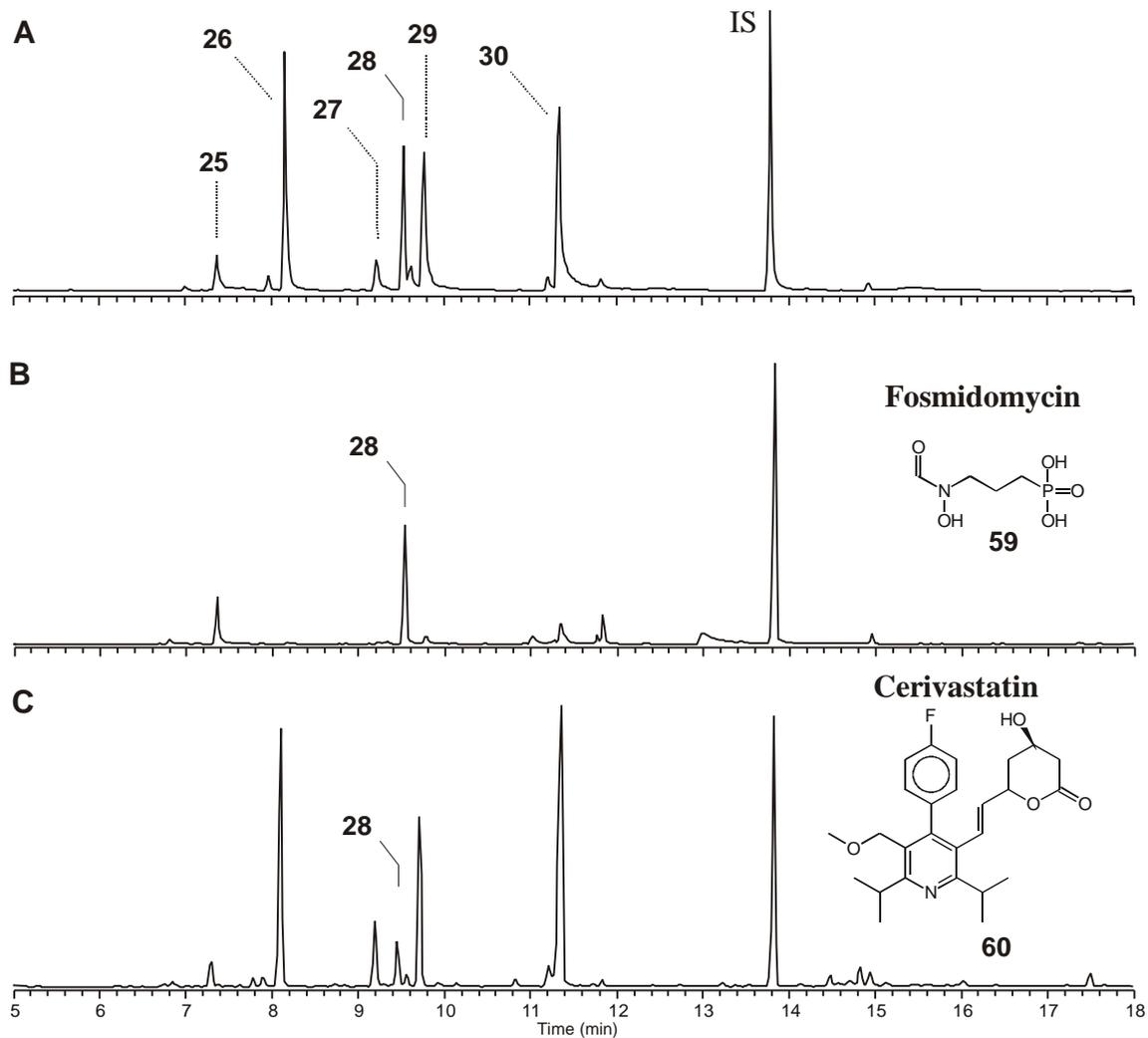


Abb. 27: Gaschromatographische Profile des Duftbouquets von *P. lunatus*, **A:** ohne Einwirkung von Inhibitoren, **B:** nach Blockade mit Fosmidomycin **59**, **C:** nach Blockade mit Cerivastatin® **60**. Beide Inhibitoren wurden mit einer Konzentration von $3 \times 10^{-5} \text{M}$ eingesetzt.

Hiermit zeigt sich eindeutig, daß die Biosynthese des DMNT in der Limabohne sowohl über den MVA-, als auch über den MEP-Weg erfolgen kann. Der Export plastidären IPP kann also nicht nur, wie im Falle der Einbauexperimente, durch eine Erhöhung der plastidären IPP-Konzentration erreicht werden, sondern auch durch das Unterdrücken der cytosolischen IPP-Produktion. Der Export von plastidärem IPP scheint hier also die fehlende cytosolische IPP-Synthese zu überbrücken.

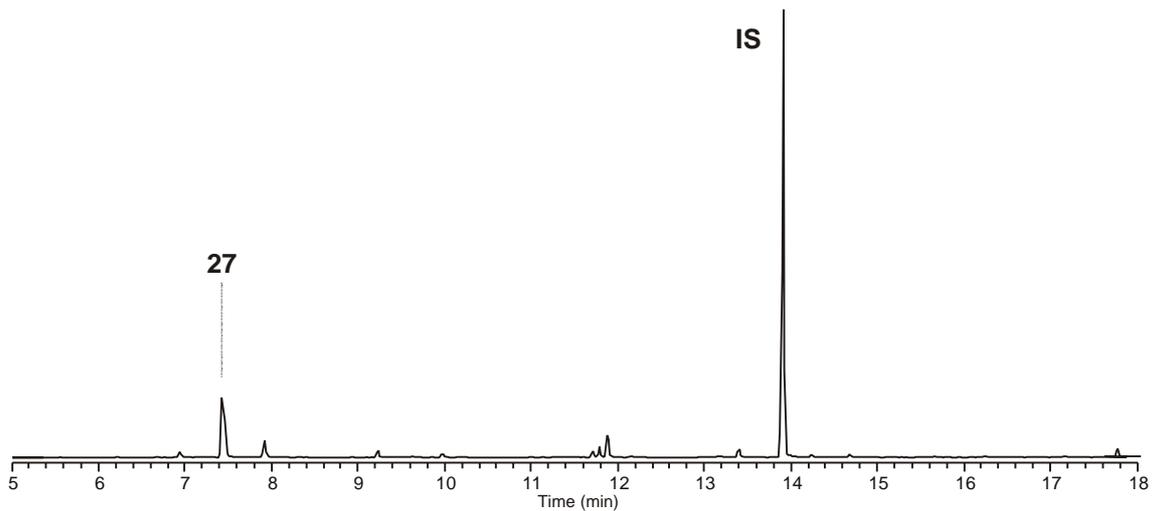


Abb. 28: Duftprofil von *P. lunatus* nach gleichzeitiger Vorbehandlung mit Cerivastatin[®] und Fosmidomycin.

Festzuhalten bleibt weiterhin, daß der Export von IPP nicht ohne weiteres zu einem Import von cytosolischem IPP in den Plastiden umgekehrt werden kann. Anderenfalls dürfte die Blockade des MEP-Weges durch Fosmidomycin nicht zum vollständigen Ausfall der Monoterpenemission führen. Auch die gleichzeitige Applikation von Mevalonsäure in niedriger Konzentration (1 bzw. 2 mg/ml) kann die Blockade des MEP-Weges durch Fosmidomycin nicht aufheben. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, daß die alleinige Gabe von Mevalonsäure erst ab einer Konzentration von 3 mg/ml zu einem deutlichen Einbau in Ocimen oder Linalool führte und unterstreicht nochmals, daß der Transport von IPP über die Plastidenmembran nicht über Diffusion erfolgen kann.

3.2.3 Untersuchung der Inhibitoreigenschaften von Herbiziden des "Bleaching Agent" Typs

Eine weitere Konsequenz der Blockade des MEP-Weges durch Fosmidomycin bei Pflanzen besteht im Ausbleichen junger, sich entwickelnder Blätter. Da sowohl die Phytolseitenkette des Chlorophylls als auch die Carotenoide der Photozentren I und II in den Chloroplasten synthetisiert werden, stammt das für ihren Aufbau benötigte IPP aus dem MEP-Weg.^[112] Nach Einwirken von Fosmidomycin muß die Bildung von Blattpigmenten daher stark beeinträchtigt sein.

Diese Chlorosen junger Blätter treten auch bei einer chemisch heterogenen Gruppe von Herbiziden auf, die als "Bleaching Agents" bezeichnet werden.^[113] Die Wirkungsweise der Substanzen reicht von einer Beeinträchtigung des Terpen- und Porphyrinstoff-

wechsels, über Eingriffe in die Regulation des Pigmenthaushaltes, bis hin zur Störung der Zellproliferation, wie etwa der Ausbildung von Chloroplasten aus Proplastiden. Bei vielen "Bleaching Agents" ist der genaue Wirkmechanismus aber nicht bekannt. Es erschien daher aussichtsreich, diese auf eine Beeinflussung des Methylerythritol-phosphat-Weges hin zu untersuchen. Wenn eine Inhibierung stattfindet, sollten neben dem Ausbleichen der Sekundärblätter auch ähnliche Veränderungen im Duftbouquet zu beobachten sein, wie sie bei Anwendung von Fosmidomycin auftreten.

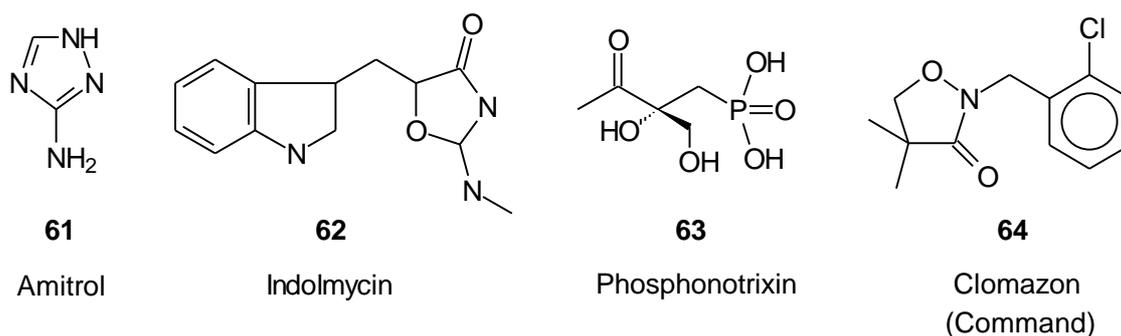


Abb. 29: Strukturen und Handelsnamen einiger Herbizide, die zu Chlorosen junger Blätter führen ("Bleaching Agents").

Die vier in Abbildung 29 dargestellten Verbindungen führten alle zu Chlorosen der Sekundärblätter. Bei Amitrol **61** und Phosphonotrixin **62** konnte jedoch keine Veränderung im Duftbouquet festgestellt werden.

Indolmycin **63** hingegen führte zu einer deutlich reduzierten Emission der Monoterpene Ocimen und Linalool. Die beiden nicht charakterisierten Monoterpene $C_{10}H_{14}$ und $C_{10}H_{16}O$ waren hiervon allerdings nicht betroffen. Auffallend war darüber hinaus, daß auch die Emission der aromatischen Verbindungen Indol und Methylantranilat stark verringert war. In einigen Literaturstellen wird Indolmycin als Inhibitor der prokaryotischen Tryptophanyl-t-RNA-Synthetase aufgeführt.^{[114], [115]} Da die *de novo* Synthese von Enzymen des Terpenstoffwechsels und des Shikimat-Weges als Antwort auf die Elicitierung von Pflanzen in der Literatur beschrieben sind, könnte die Wirkung von Indolmycin in einer Inhibierung der Translation dieser Enzyme bestehen. Versuche, diese Überlegung durch die Anwendung anderer t-RNA-Synthetase-Inhibitoren zu unterstützen, führten aber zu keinen schlüssigen Ergebnissen. So zeigte der Tyrosinyl-t-RNA-Synthetase-Inhibitor Puromycin^[116] keinen Einfluß auf das Duftmuster der Lima-bohne. Entgegengesetzt wurde nach Wirkung von Cyclohexinimid^[117] und anschließender Elicitierung kein Duft mehr emittiert. Ob Indolmycin auch in Pflanzen die

Translation unterbinden kann, bleibt damit offen. Eine Inhibierung des MEP-Weges als Wirkmechanismus von Indolmycin kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber ebenfalls unwahrscheinlich.

Als einzige getestete Verbindung zeigte Clomazon **64** die hierfür indikativen Veränderungen in der Duftzusammensetzung. Sie entsprachen völlig den Veränderungen bei Anwendung von Fosmidomycin (Abb. 30).

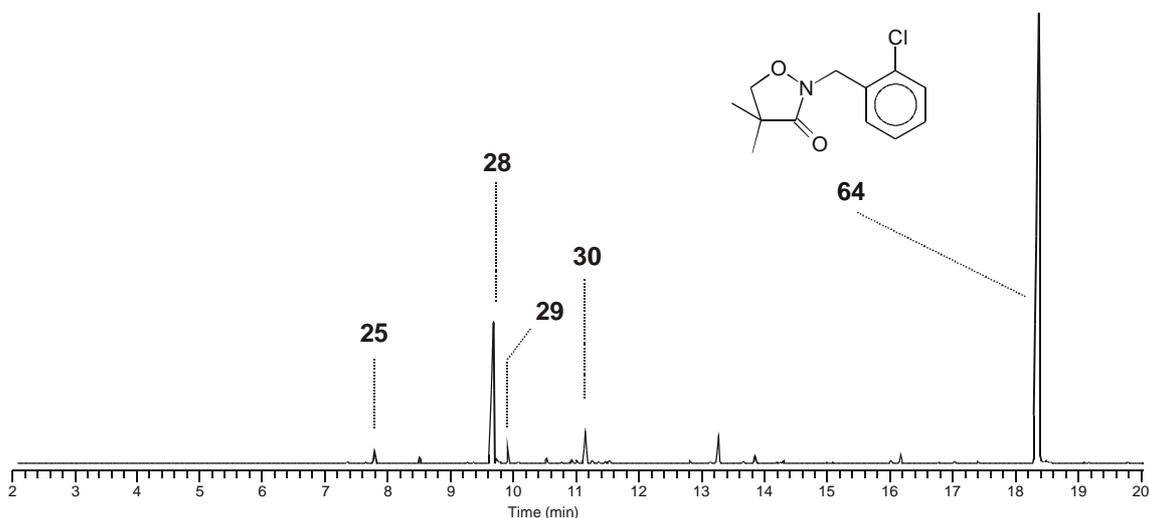


Abb. 30: Duftprofil von *P. lunatus* nach Vorinkubation mit Clomazon **64**. Die Monoterpene Ocimen **26** und Linalool **27** sind völlig unterdrückt, $C_{10}H_{14}$ **29** und $C_{10}H_{16}O$ **30** stark vermindert. Der Sequiterpenabkömmling DMNT **28** und das Fettsäurederivat Hexenylacetat **25** werden weiterhin emittiert.

Überraschend war der hohe Dampfdruck von Clomazon (Abb. 30). In ersten Versuchen hatte dies zu Komplikationen geführt, da bereits der Dampfdruck der wässrigen Lösung ausreichte, um im Verlauf der Vorinkubationen Kontrollen, die sich in der Nähe der Versuchspflanzen befanden, über die Gasphase zu beeinträchtigen. Da Clomazon in den Chromatogrammen der Versuchsansätze deutlich zu erkennen ist, ließ sich diese Fehlerquelle aber schnell abstellen.

Die Struktur von Clomazon läßt zunächst keine Elemente erkennen, die Ähnlichkeiten zu Deoxy-D-xylulose oder Methylerythritolphosphat zeigen und als Inhibitor wirken könnten. Eine detaillierte Betrachtung der durch die Inhibierung erhaltenen Chromatogramme, förderte allerdings Hinweise auf eine Metabolisierung von Clomazon durch die Bohne zu Tage. Zwei kleinere Peaks konnten über ihre Massenspektren als *o*-Chlorobenzaldehyd **65** und *o*-Chlorobenzylalkohol **66** identifiziert werden (Abb. 31).

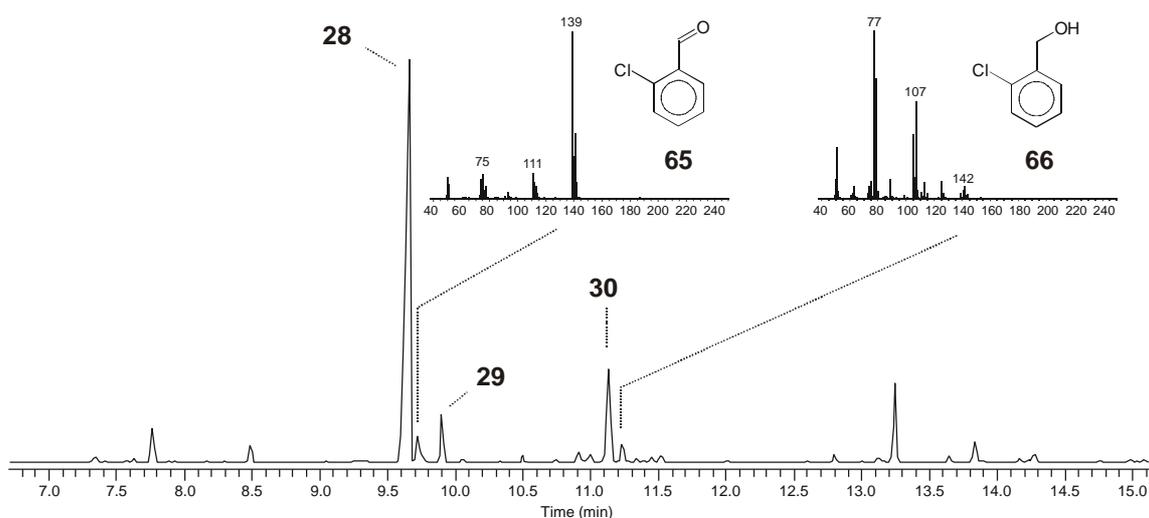


Abb. 31: Ausschnittsvergrößerung eines nach Inhibierung mit Clomazon erhaltenen Chromatogramms des Bohnenduftes und die Massenspektren der vorgefundenen Metaboliten von Clomazon.

Diese Beobachtung deckt sich mit Berichten von Weimer et. al., die in der Sojabohne eine oxidative Spaltung von Clomazon und anschließende Glykolisierung des entstandenen Benzylalkohols beschreiben.^[118] Da durch eine solche oxidative Spaltung auch der Isoxazolidonring geöffnet wird, könnte die aktive Komponente von Clomazon Hydroxypivalinsäure oder ihr Amid **67** sein.

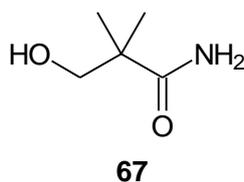


Abb. 32: Hydroxypivalinsäureamid

3.2.4 Versuche zur Darstellung von Strukturanaloga der 1-Deoxy-D-xylulose

Parallel zur Suche nach bereits existierenden Inhibitoren des MEP-Weges sollten auch neue Inhibitorstrukturen durch Synthesen erschlossen werden. Der Mechanismus der DXP-Reduktoisomerase legt es dabei nahe, das Substrat der Umsetzung, Deoxy-D-xylulose, an den zur Carbonylgruppe α -ständigen Kohlenstoffatomen zu variieren. Ausgehend von der verwendeten Darstellung der Deoxy-D-xylulose bietet sich hierbei besonders die α -ständige Methylgruppe an, da diese im Verlauf der Synthese frei zugänglich bleibt.

Eine einfach zugängliche Variation der DOX-Struktur besteht in der Substitution dieser Methylgruppe durch eine Ethylgruppe. Hierdurch könnten einerseits die sterischen Anforderungen an das Reaktionszentrum untersucht werden und andererseits Einblicke in den induktiven Effekt der Methylgruppe auf die Umlagerung gewonnen werden. Für die Darstellung mußte lediglich das bei der reduktiven Methylierung der Carboxylatgruppe des Lithiumsalzes **45** verwendete Methyllithium durch Ethyllithium ersetzt werden (Abb. 33). Erste Versuche, Ethyllithium durch Umsetzung von Ethyljodid mit elementarem Lithium *in situ* zu erzeugen, führten aber zu keinem Erfolg. Durch die Verwendung von Ethylchlorid und die zusätzliche Unterstützung der Reaktion durch Ultraschall, konnte das isopropyliden-geschützte Ethyl-Analogon der Deoxy-D-xylulose dann in zufriedenstellenden Ausbeuten gewonnen werden. Die Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe erfolgte anschließend wie bei der Darstellung der Deoxy-D-xylulose.

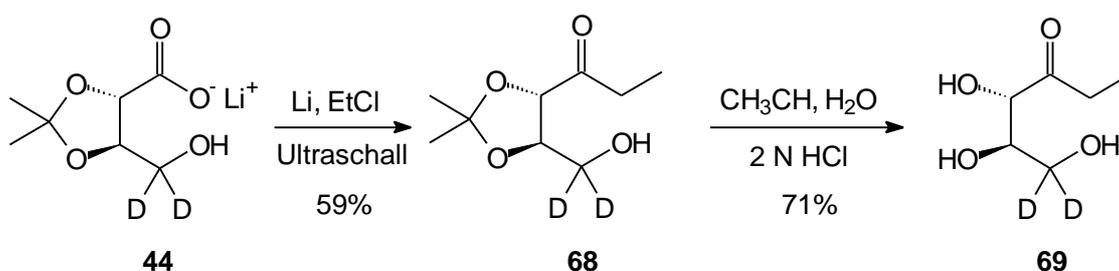


Abb. 33: Synthese von [6,6-²D₂]-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **69**, einem Ethyl-Analogon von 1-Deoxy-D-xylulose.

Die Verbindung zeigte bei Inkubationsexperimenten in der Limabohne bis zu einer Konzentration von 200 mg/ml aber keine Wirkung. Dies wurde auch durch Enzymassays bestätigt, die von S. Grolle im Arbeitskreis Bringer-Mayer am Forschungszentrum Jülich durchgeführt wurden. 1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose wurde weder von der DXP-Reduktoisomerase umgesetzt, noch zeigt es inhibitorische Eigenschaften. Dies könnte damit zu erklären sein, daß Substrate des Enzyms eine entständige Phosphatgruppe aufweisen müssen.

Bei einer weiteren Veränderung der DOX-Struktur sollte die Methylgruppe durch eine Trifluoromethylgruppe ersetzt werden. Die Fluorierung von Substituenten in α -Position einer Ketogruppe führen häufig zur Hydratisierung der Ketofunktion, α -fluorierte Ketone werden daher bereits als Inhibitoren für Esterasen und Acylasen eingesetzt.^[119]

Für die Einführung einer Trifluoromethylgruppe existieren verschiedene Methoden. Bei den vorhandenen Zwischenstufen der DOX-Synthese bietet sich die Verwendung von

Trifluoromethyltrimethylsilan an, das auch als Rupperts-Reagenz bezeichnet wird. Es überführt elektrophile Substrate, wie Aldehyde und Ketone unter katalytischer Einwirkung von Fluorid-Donoren in Trifluoromethyltrimethylsilylether, die leicht durch saure, wässrige Hydrolyse in die entsprechenden Alkohole überführt werden können.^{[120], [121]}

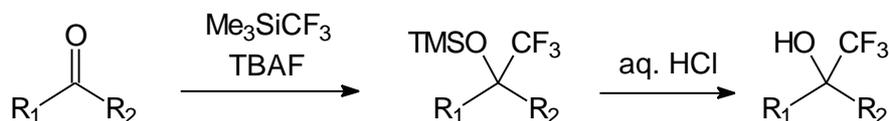


Abb. 34: Überführung von Carbonylverbindungen in Trifluoromethylcarbinole mittels Trifluorotrimethylsilan (Rupperts-Reagenz).

Ester werden in einer analogen Reaktion in Trifluoromethylketone überführt.^[122] Für die Darstellung eines 1,1,1-Trifluoromethylanalogons der 1-Deoxy-D-xylulose mußte daher zunächst das im Verlauf der DOX-Synthese anfallende Lithiumsalz des Carboxylates **45** verestert werden.

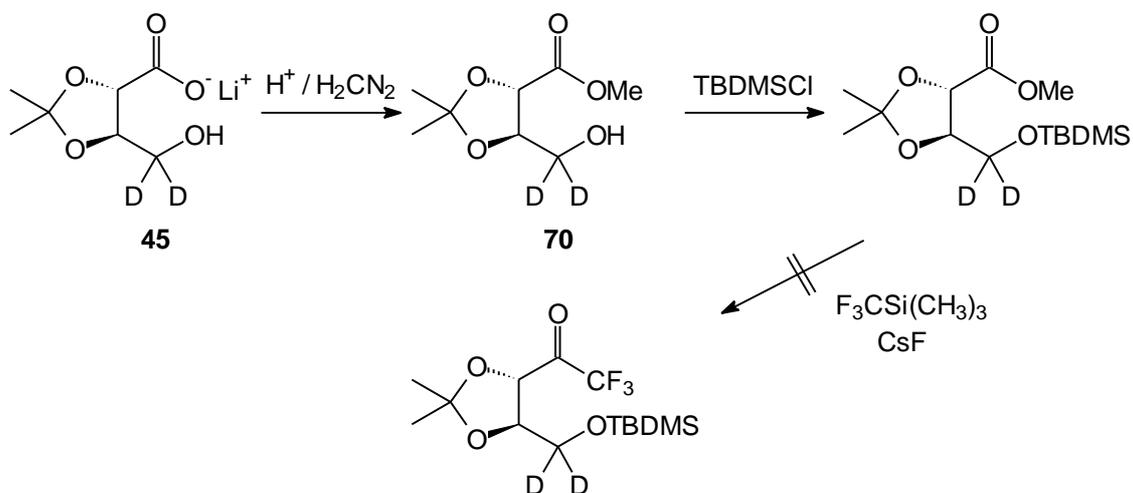


Abb. 35: Einführung einer Trifluoromethylgruppe in das Grundgerüst der 1-Deoxy-D-xylulose.

Versuche, den mittels Diazomethan erhaltenen Ester **70** des Carboxylates **45** in ein Trifluoromethylketon zu überführen, führten aber nicht zum Erfolg. Da zur gleichen Zeit von Bouvet et. al. die Synthese eines 1-Monofluoro- und eines 1,1-Difluoroanalogons beschrieben wurde und beide Verbindungen in mikrobiellen Assays keine Wirkung zeigten,^[123] wurden die Versuche zur Synthese des Trifluoranalogs nicht weiter verfolgt.

3.3 Zuordnung der Terpen-Herkunft aufgrund natürlicher Isotopenverhältnisse

3.3.1 Bestimmung anhand des $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses

Die natürlichen Verhältnisse der Stabilisotopen der Bioelemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel stellen keine absolute Konstanten dar, sondern unterliegen geringen räumlichen und zeitlichen Abweichungen vom globalen Mittelwert. Verursacht werden diese Unterschiede durch kinetische und thermodynamische Isotopeneffekte im Verlauf von chemischen Reaktionen und physikalischen Prozessen.

Die Unterschiede in der Isotopenzusammensetzung sind äußerst gering. Um sie dennoch mit der notwendigen Genauigkeit ermitteln zu können, werden die Analyten in einfache Gase überführt. So werden zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff die zu untersuchenden Analyten verbrannt und die Isotopenzusammensetzung des entstandenen Kohlendioxids anhand der Massen 44, 45 und 46 registriert. Zusätzlich bestimmt man das Isotopenverhältnis immer in Relation zu einem Isotopenstandard. Für Kohlenstoff bezieht man sich dabei auf fossile Überreste von Kopffüßern der Kreidezeit, die aus CaCO_3 bestehen und als gebundener Kohlenstoff des Ozeans angesehen werden können (V-PDB, Vienna-Pee Dee Belemnite). Die Verrechnung von Standard und Probe wird dann in der δ -Notation dargestellt.^[124]

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [\text{R}_{\text{Probe}} / \text{R}_{\text{Standard}} - 1] \times 10^3 \quad \text{mit } \text{R} = {}^{12}\text{C}_x / {}^{13}\text{C}_x$$

In den letzten Jahren hat die Isotopenverhältnismassenspektroskopie (IRMS) einen entscheidenden Durchbruch in vielen Anwendungsgebieten durch die Entwicklung von on-line-Pyrolyse-Einheiten erfahren, die die direkte Kopplung von Isotopenverhältnismassenspektrometern mit Gaschromatographen ermöglicht (GC-C-IRMS).^{[125], [126]} Sie erlaubt die direkte Bestimmung von substanzspezifischen Isotopenverhältnissen auch in komplexen Gemischen. Die Eluenten des Gaschromatographen werden dabei auf herstellerepezifischen Katalysatoren pyrolysiert, das entstandene Kohlendioxid on-line mit hygroskopischen Teflonmembranen (Nafion[®]) getrocknet und anschließend durch Elektronenbeschuss (EI) ionisiert. Der Ionenstrom wird dann auf einem Sektorfeldgerät, das fest auf die erforderlichen Massen justiert ist, analysiert. Der Isotopenstandard kann durch Schaltventile während des Laufes zu jedem Zeitpunkt als Referenz- CO_2 direkt in die Ionenquelle injiziert werden.

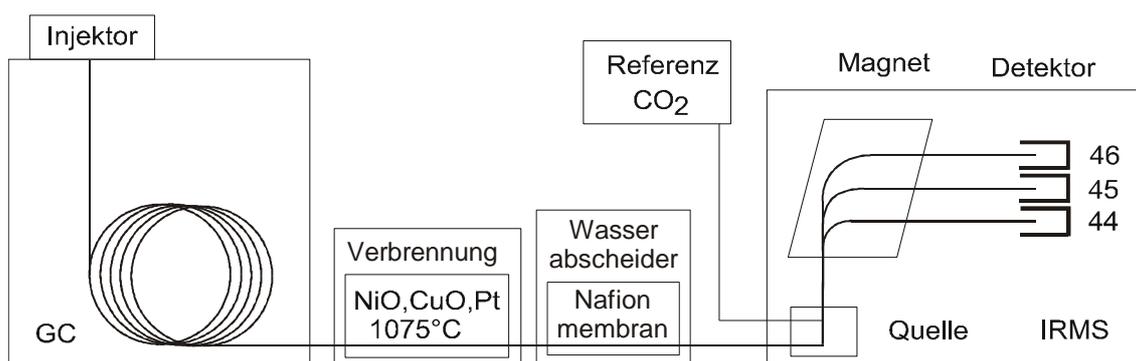


Abb. 36: schematische Darstellung der Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Isotopenverhältnismassenspektrometer über eine on-line-Verbrennungseinheit. Der hier angegebene Katalysator wird in den Geräten der Firma Thermoquest (ehemals Finnigan MAT) eingesetzt.

Benutzt werden Unterschiede in der Isotopenzusammensetzung bereits seit längerem zur Authentizitätskontrolle in der Lebensmittel- und Aromaindustrie.^[127] In der Pharmakologie werden sie im Rahmen von Doping-Kontrollen zur Differenzierung zwischen endogenen und exogenen Steroidhormonen herangezogen.^[128] Treibende Kraft für die Entwicklung der GC-C-IRMS war jedoch die Geochemie, die mit Hilfe dieser Methode die Isotopenzusammensetzung der in fossilen Sedimenten enthaltenen organischen Verbindungen bestimmen kann. Hierdurch konnte zum Beispiel das plötzliche, vermehrte Auftreten multizellulärer Organismen am Ende des Kambiums (Kambium-Explosion) auf den Wechsel des Umwelthaushaltes von einer anaeroben, von sulfatreduzierenden Bakterien dominierten Welt, zu einer aeroben, von phototrophen Organismen dominierten Welt, zurückgeführt werden.^[129] Wachsende Bedeutung erfährt die Isotopenverhältnismassenspektroskopie auch bei der Untersuchung globaler Stoffkreisläufe und der Rekonstruktion des globalen Klimas im Verlauf der letzten 300.000 Jahre durch Untersuchungen von Bohrkernen der arktischen Eiskappen.^{[130], [131]}

In der Biosphäre werden Abweichungen in der Isotopenzusammensetzung durch Isotopeneffekte der an den physiologischen Prozessen beteiligten, enzymkatalysierten Reaktionen verursacht. Die bekanntesten Beispiele betreffen die unterschiedliche Fixierung von Kohlendioxid in C₃- und C₄-Pflanzen, die auch zu den prägnantesten Isotopendiskriminierungen führen.^[132] Die meisten Bäume, Sträucher und Kräuter fixieren Kohlendioxid unter Katalyse der Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Rubisco) als Phosphoglycerat (C₃-Körper). Bei einigen Pflanzen, zu denen zum Beispiel Zuckerrohr

und Mais gehören, wird Kohlendioxid vor dieser eigentlichen Assimilation durch das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEP-Carboxylase) als Malat oder Aspartat fixiert (C_4 -Körper). Der Reaktionsmechanismus der Rubisco zeigt dabei bei Kohlenstoff einen größeren kinetischen Isotopeneffekt, als der Mechanismus der PEP-Carboxylase. Entsprechend nehmen C_3 -Pflanzen weniger ^{13}C -Kohlendioxid bei der Primärfixierung auf, als C_4 -Pflanzen. Der Kohlenstoff in C_3 -Pflanzen ist also "leichter" als der in C_4 -Pflanzen.

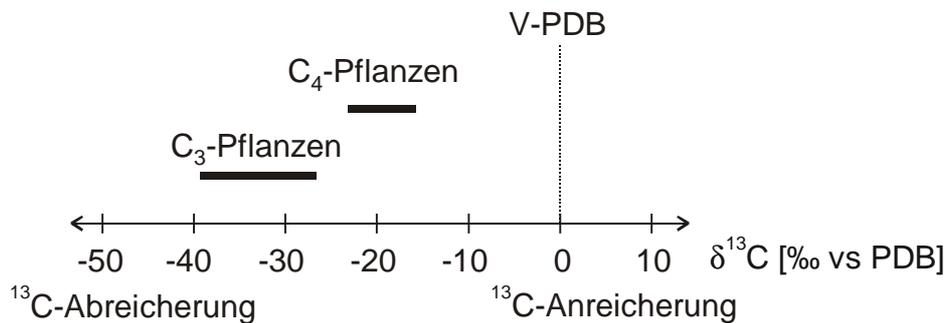


Abb. 37: Darstellung der unterschiedlichen Isotopenzusammensetzung von C_4 - und C_3 -Pflanzen in der δ -Notation.

Nach der Assimilation stellen Pflanzen, bezogen auf Kohlenstoff, ein abgeschlossenes System dar. Veränderungen an der Isotopenzusammensetzung einzelner Verbindungen können daher immer nur dann stattfinden, wenn Metaboliten in mehr als eine Reaktion einfließen. In diesem Fall würde im Verlauf der Reaktion mit größerem Isotopeneffekt weniger ^{13}C -Kohlenstoff umgesetzt und die Reaktionsprodukte wären ^{13}C -verarmt. Aus Gründen der Massenerhaltung müssen die schweren Metaboliten dann in die anderen Reaktionen fließen. Beispiele hierfür sind die unvollständige Umsetzung von Metaboliten unter gleichzeitiger Speicherung oder aber die Verzweigung von Stoffwechselwegen.

Bezogen auf die Bildung von IPP über den MVA- bzw. den MEP-Weg verzweigt sich der Stoffwechsel nach der Bildung von Pyruvat am Ende der Glykolyse (Abb. 38). In den MVA-Weg fließt Pyruvat durch die Umsetzung zu Acetyl-CoA durch die Pyruvat-Dehydrogenase. Gleichzeitig kann es auch durch die DXP-Synthase in den MEP-Weg gelangen. Für die Reaktion der Pyruvat-Dehydrogenase wurde aber schon gezeigt, daß die thiamindiphosphat-katalysierte Decarboxylierung des Pyruvates leichte Isotope bevorzugt; das entstehende Acetyl-CoA sollte also ^{13}C -abgereichert sein.^[133] Zwar führt

auch die DXP-Synthase eine thiamindiphosphat-katalysierte Decarboxylierung durch,^[39] doch ist diese Reaktion zum Aufbau von IPP nur einmal erforderlich. Über die MVA-Route fließen aber drei Moleküle Pyruvat, bzw. Acetyl-CoA in den Aufbau von IPP. Eine Diskriminierung zugunsten der leichteren Isotopomere sollte sich daher beim Aufbau von Sesquiterpenen über die MVA-Route besonders bemerkbar machen. Hinzu kommt, daß die Carbonylkohlenstoffe von Glycerinaldehyd und Pyruvat ¹³C-angereicht sind, da Glucose, als direkter Vorläufer beider Substanzen, in den Position C-3 und C-4 einen erhöhten ¹³C-Gehalt besitzt.^[124] Der Einbau von intaktem Glycerinaldehyd über die MEP-Route sollte daher zusätzlich zur Differenzierung beider Wege beitragen.

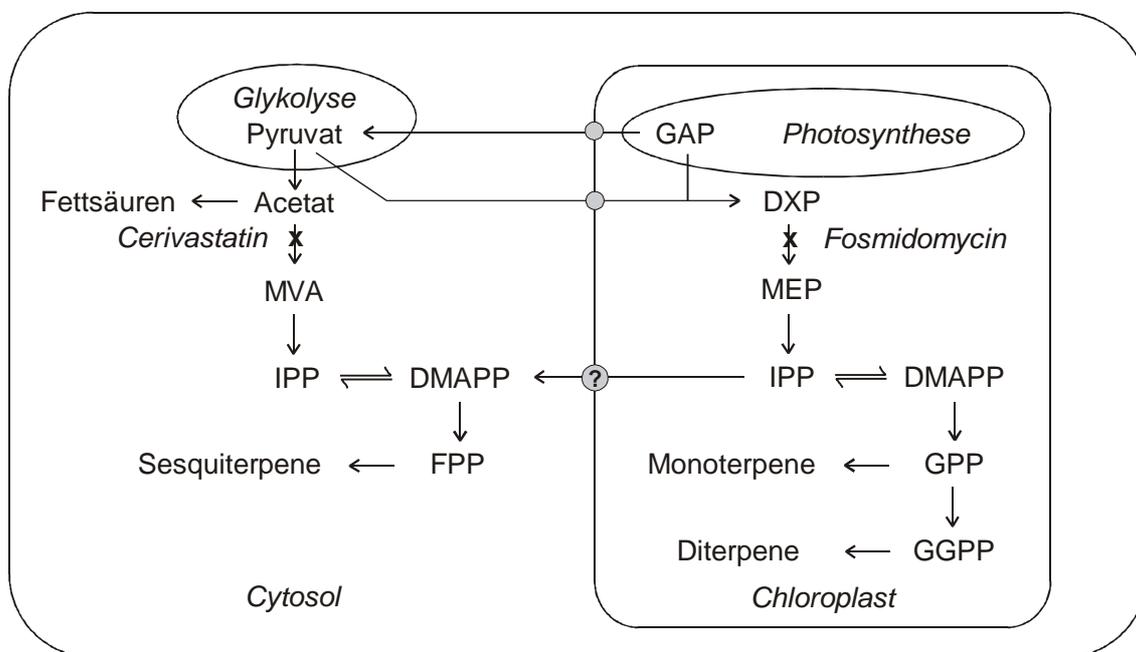


Abb. 38: Kohlenstofffluss beim Aufbau von IPP und Terpenen über die MEP- und die MVA-Route.

Die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der von der Limabohne nach Induktion mit Jasmonsäure emittierten Terpene kann diese Erwartung bestätigen. Das Sesquiterpen DMNT zeigt mit einem Wert von $-37,4\text{‰}$ eine deutliche ¹³C-Abreicherung gegenüber dem Monoterpen Ocimen ($-29,0\text{‰}$). Dieser Wert deckt sich mit Werten von Monoterpenen, die im Rahmen von Authentizitätsbestimmungen schon häufiger bestimmt worden sind und sich in einem Bereich von -26‰ bis -30‰ bewegen.^[127] Des Weiteren liegt der Wert des DMNT nahe am Wert des Hexenylacetats ($-40,2\text{‰}$), das sich als Fettsäureabbauprodukt ebenfalls aus Acetat-Einheiten ableitet und folglich eine starke ¹³C-Abrei-

cherung aufweisen muss. Eine vergleichbare Isotopendiskriminierung zwischen Fettsäuren und Produkten der MEP-Route fanden auch Schouten et. al. in Lipiden von Süß- und Meerwasseralgen.^[134] Der ^{13}C -Gehalt von Palmitinsäure war hier gegenüber Phytol (MEP-Route) um 2-5‰ abgereichert. Insgesamt scheint die Bestimmung des natürlichen $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses also Aussagen darüber zu ermöglichen, ob Terpene aus der MEP- oder der MVA-Route stammen.

Bei der Bewertung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DMNT muss aber auch die dynamische Beteiligung der MEP-Route an der DMNT-Biosynthese berücksichtigt werden, die sich schon im Verlauf der Inhibitor- und Einbaustudien angedeutet hatte. Als Konsequenz muss sich der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert für DMNT verschieben, wenn einer der beiden Wege blockiert wird. Tatsächlich besitzt das DMNT, das nach Blockade der MVA-Route mit Cerivastatin noch emittiert wird, mit einem Wert von -30,8‰ eine deutlich geringere ^{13}C -Abreicherung als ohne Blockade. Der Wert nähert sich deutlich dem des Ocimens an (-29,0‰). Umgekehrt bewegt sich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DMNT bei Blockade der MEP-Route mit Fosmidomycin (-38,4‰) in Richtung der Werte des Hexenylacetats (-38,6‰). Ocimen erfährt durch Inhibierung der MVA-Route in Übereinstimmung mit den Einbauversuchen keine nennenswerte Veränderung des Isotopenverhältnisses.

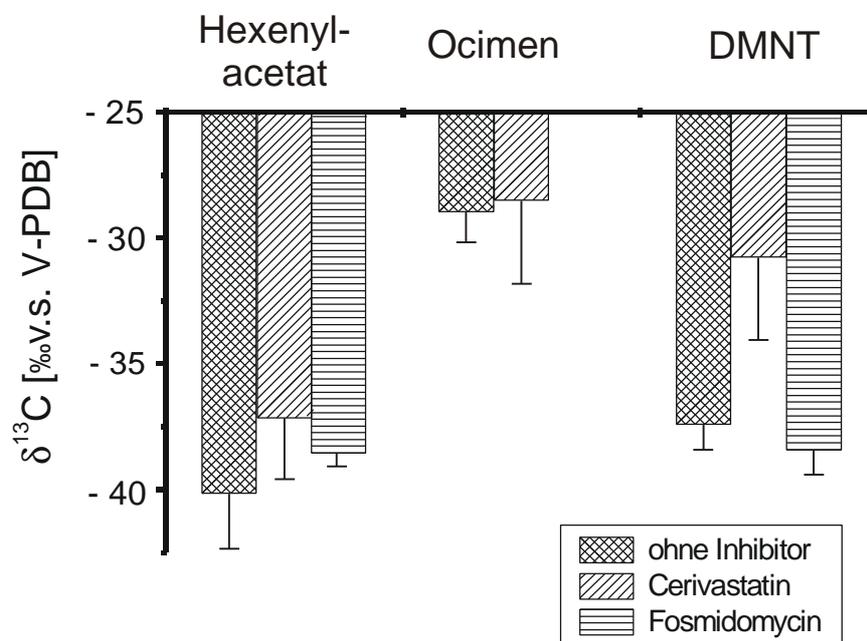


Abb. 39: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ausgewählter Duftstoffe nach Induktion mit Jasmonsäure. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei Proben.

Der Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bekräftigt damit nicht nur die Zuordnung der Isotopenverhältnisse zu den beiden Stoffwechselwegen, es beweist darüber hinaus noch einmal die flexible Ressourcennutzung bei der induzierten Biosynthese von Sesquiterpenen. Weiterhin deutet die etwas verringerte ^{13}C -Anreicherung, die die Blindwerte gegenüber den durch Fosmidomycin inhibierten Proben zeigen, daß auch unter normalen physiologischen Bedingungen eine geringe Beteiligung des MEP-Weges an der DMNT-Biosynthese beobachtet werden kann. Dies würde sich dann auch mit den Ergebnissen der Parallelkubationen decken. Allerdings muß hierbei darauf hingewiesen werden, daß die Verschiebung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen den genannten Proben im Rahmen der Fehlergrenzen nicht signifikant ist.

Die bisher beschriebenen Verschiebungen der Isotopenverhältnisse ergeben sich auch dann, wenn die Duftemission der Limabohne nicht durch Jasmonsäure, sondern durch Herbivorenfraß ausgelöst wird.

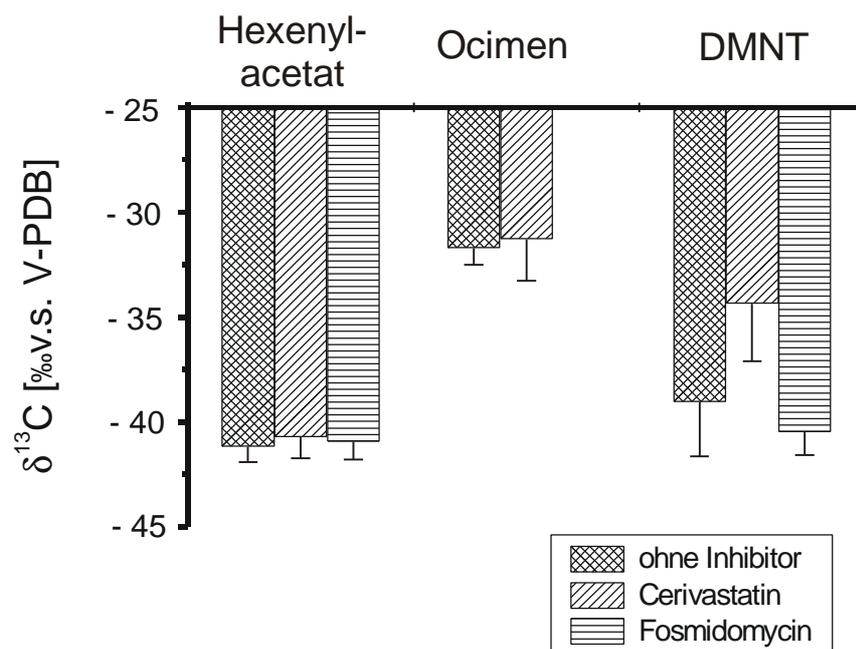


Abb. 40: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ausgewählter Duftstoffe nach Induktion durch Herbivorenfraß (*Spodoptera frugiperda*). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei Proben.

So führte die Fraßschädigung von Limabohnen durch Raupen des Eulenfalters *Spodoptera frugiperda* zu $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des DMNT (-39,0‰), die auch bei dieser Duftinduktion für eine Biosynthese über die MVA-Route sprechen. Wird diese durch Cerivastatin

blockiert, kann die MEP-Route den Ausfall zu gewissen Teilen kompensieren, was aus dem Anstieg des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes für DMNT auf $-34,4\text{‰}$ ersichtlich wird. Dieser Befund macht deutlich, daß auch bei natürlichen Induktionsprozessen eine dynamische Nutzung beider Wege erfolgen kann. Die Pflanze ist damit potentiell in der Lage, sich auch gegen Angreifer zu Wehr zu setzen, die die Emission des als Kairomon wirkenden DMNT durch Inhibitoren unterbinden wollen. Die physiologische Flexibilität könnte der Pflanze somit einen ökologischen Vorteil verschaffen.

3.3.2 Bestimmung anhand des $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Isotopenverhältnisses

Wasserstoff zeigt von allen Elementen den stärksten Isotopeneffekt und entsprechend ergeben sich die größten Abweichungen vom durchschnittlichen Verhältnis der Stablisotopen bei diesem Element.

Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse erfolgt nach Pyrolyse der Analyten anhand der H_2 / HD -Verhältnisse, also den Massen 2 und 3. Die Unterschiede werden dann, wie beim Kohlenstoff, bezogen auf einen internationalen Standard (V-SMOW, Vienna Standard Mean Ocean Water) dargestellt und bewegen sich bei natürlichen Proben in einem Bereich von -400‰ bis -30‰ .^[127]

Bei einer on-line-Kopplung von Gaschromatograph und Massenspektrometer entsteht das Problem, daß das Trägergas Helium eine Auswertung des H/D-Signal unmöglich macht. Der Deuteriumgehalt natürlicher Proben ist so gering, daß er nach der Ionisierung vom niederenergetischen Anteil des He^+ -Ionenstroms vollständig überlagert wird. Erst 1999 stellten die Firmen Micromass und Finnigan gleichzeitig kommerzielle Geräte vor, die dieses Hindernis durch verbesserte Ionenoptik und Gerätegeometrie aus dem Weg räumten.^[135] Entsprechend existieren erst wenige Publikationen, die die Bestimmung von H/D-Verhältnissen durch GC-IRMS-Kopplung beschreiben.^[136] Hayes et. al. beschrieben allerdings schon 1999 die Bestimmung von Wasserstoffisotopenverhältnissen von Lipiden aus unterschiedlichen Organismen und verschiedener biochemischer Herkunft unter Benutzung eines selbstentwickelten Pyrolyse-Interfaces und entsprechend optimiertem Massenspektrometer.^[137] Als typische Verbindung des MEP-Weges zeigte Phytol im Rahmen dieser Studien eine Deuteriumanreicherung zwischen -288‰ und -376‰ . Sterole und Triterpenoide, als Vertreter des MVA-Weges waren in allen Fällen mit Werten zwischen -142‰ und -283‰ deutlich geringer angereichert. Grundsätzlich folgen die Werte der Limabohne auch dieser Tendenz (Tabelle 3).

	Hexenylacetat	Ocimen	DMNT
JA	-163	-300	-270
JA	-180	-270	-208
JA + Cerivastatin	¹⁾	-250	-224
JA + Cerivastatin	-144	-203	-245

¹⁾ Peak aufgrund von Verunreinigungen nicht auswertbar

Tab. 3: δD -Werte (‰) ausgewählter Duftstoffe der Limabohne nach Induktion mit Jasmonsäure (JA) und nach Induktion und gleichzeitiger Blockade des MVA-Weges durch Cerivastatin. Angegeben sind die Mittelwerte einzelner biologischer Proben, die zur instrumentellen Absicherung jeweils dreimal vermessen wurden.

Nach Induktion mit Jasmonsäure zeigt das aus dem MEP-Weg stammende Ocimen eine deutlich stärkere Deuteriumanreicherung als der Fettsäureabkömmling Hexenylacetat. Für DMNT treten aber Schwankungen auf, die keine Zuordnung zu MEP- oder MVA-Weg erlauben. Zusätzlich fällt bei gleichzeitiger Anwendung von Cerivastatin die Anreicherungsrate von Ocimen teilweise unter die Werte von DMNT. Es erscheint daher fraglich, ob die Bestimmung der Wasserstoffisotopenverhältnisse unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen geeignet ist, eine sichere Zuordnung von Terpenen zu MEP- oder MVA-Weg zu gewährleisten. Da die Standardabweichung der Replika einer Probe unter 10‰ lagen, können messtechnische Ursachen für diese Schwankungen ausgeschlossen werden. Vermutlich werden die Isotopeneffekte der enzymatischen Reaktion von weiteren Isotopeneffekten überlagert. So wird die größte Isotopendiskriminierung innerhalb des Wasserhaushaltes einer Pflanze durch die thermodynamischen Isotopeneffekte beim Verdampfen und Kondensieren des Wassers erzeugt.^[138] Die Transpirationsrate einer Pflanze hat also entscheidenden Einfluss auf die Isotopenverhältnisse. Weiterhin kann das NADPH, das für Reduktionen innerhalb der Zelle benötigt wird, aus der Photosynthese oder aus dem Pentosephosphat-Weg stammen. Damit wird insbesondere das Isotopenverhältnis der Terpene abhängig von Photosynthese- bzw. Respirationsrate der Pflanze. Wasserstoffisotopenverhältnisse können daher vermutlich nur zur physiologischen Herkunftsbestimmung von Terpenen herangezogen werden, wenn die Physiologie der Pflanzen über den gesamten Wachstumszeitraum möglichst exakt kontrolliert werden kann.

3.4 Versuche zur Identifizierung der beiden unbekannt Terpene $C_{10}H_{14}$ **29** und $C_{10}H_{16}O$ im Duftbouquet der Limabohne

Das Duftbouquet der Limabohne enthält als Hauptkomponenten zwei Verbindungen, die bisher noch nicht identifiziert und nur durch ihre Massenspektren charakterisiert sind. Es handelt es sich um einen Alkohol mit der Summenformel $C_{10}H_{16}O$ **30** und um einen Kohlenwasserstoff der Summenformel $C_{10}H_{14}$ **29**. Die Zahl der Kohlenstoffe und die Gestalt der Massenspektren deutet daraufhin, daß es sich bei beiden Substanzen um Monoterpene handelt. Da sich im Massenspektrum des Alkohols alle Fragmente des Kohlenwasserstoffs in ähnlichen Intensitätsverhältnissen wiederfinden, könnte letzterer ein Eliminierungsprodukt des Alkohols darstellen. Mit drei Doppelbindungsäquivalenten besitzt der Alkohol gegenüber einfachen Monoterpenalkoholen ein zusätzliches Doppelbindungsäquivalent. Gleiches gilt auch für den Kohlenwasserstoff (4 Äquivalente).

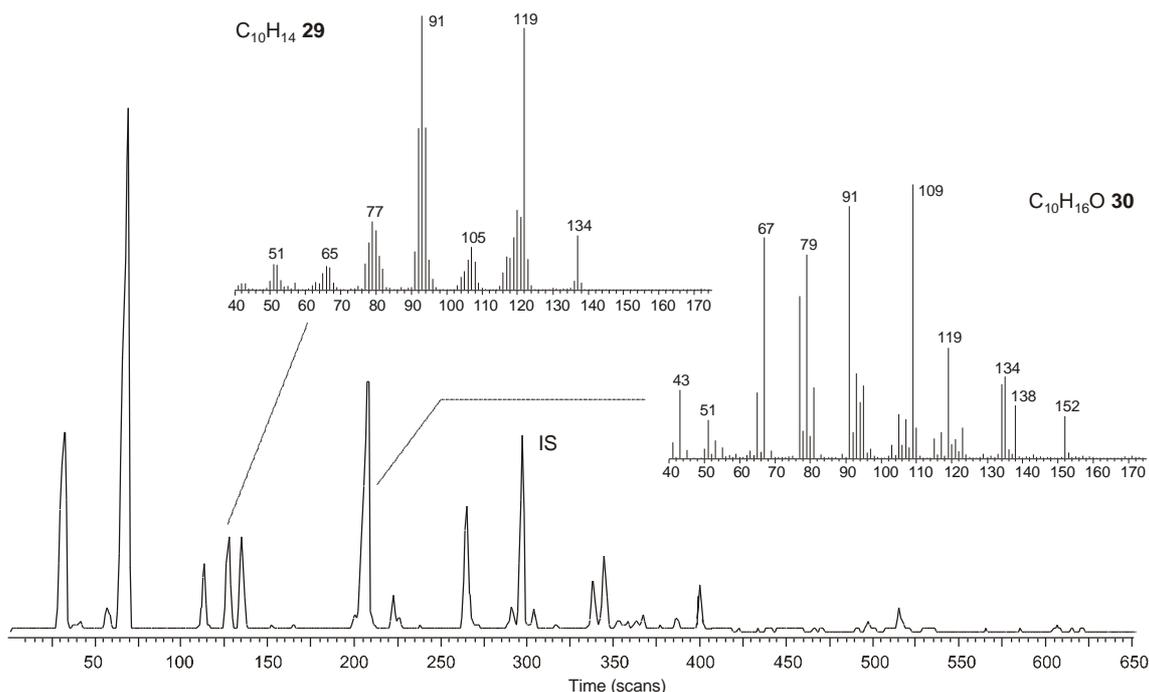


Abb. 41: Chromatographische Auftrennung des Bohnenduftes und Massenspektren der beiden nicht identifizierten Verbindungen **29** und **30**.

Versuche, die Struktur beider Verbindungen durch NMR-Spektroskopie zu ermitteln, stießen schon bei der Gewinnung ausreichenden Probenmaterials auf Probleme. Die von der Limabohne emittierten Verbindungen werden direkt nach ihrer Biosynthese in die Umgebungsluft abgegeben. Sie können daher nicht durch Extraktion aus einer

entsprechend großen Menge induzierten Pflanzenmaterials gewonnen werden. Als Quelle bliebe damit nur das Sammeln des induzierten Duftes auf Aktivkohlefiltern. Da der mutmaßliche Terpenalkohol in deutlich größeren Mengen als der Kohlenwasserstoff im Duftbouquet enthalten ist und darüber hinaus einen höheren Siedepunkt besitzt, konzentrierten sich die Bemühungen zur Isolierung zunächst auf den Alkohol. Mit den zur Verfügung stehenden stripping-Apparaturen hätten nach Schätzungen, die auf einer Quantifizierung durch GC-MS basierten, pro Versuch zwischen 500 ng und 4 µg des Alkohols gewonnen werden können. Die Anzahl der durchzuführenden Duftsammlungen lag damit in einem Bereich, der klein genug war, um genügend Substanzmenge für eine Isolierung und Charakterisierung zu erhalten.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde zunächst nach einem Weg gesucht, den Alkohol aus dem Gemisch der adsorbierten Substanzen zu isolieren. Hierzu wurden stripping-Proben an einer mit Kieselgel gefüllten 200 µl-HPLC-Spritze aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden dann anschließend per GC-MS untersucht. Von den auf diese Weise durchgetesteten Elutionsmitteln lieferte ein Pentan / Diethylether-Stufengradient die besten Trennungsergebnisse. Der Alkohol eluierte hier bei einem Diethylether-Anteil von 40% und wurde nur noch von *cis*-Jasmon als weitere Komponente begleitet. Leider konnte im Anschluß dieses Lösungsmittelgemisch nicht mehr entfernt werden, ohne gleichzeitig auch den Alkohol zu verdampfen. Dieses Problem trat zwar nicht bei Verwendung halogenierter Lösungsmittel als Laufmittel auf, allerdings konnte hier keine befriedigende Trennung erreicht werden.

Mehr Hinweise auf die Struktur bot eine genaue Analyse der durchgeführten Einbauexperimente an. Sowohl die Applikation von d₂-DOX, als auch von d₅-MVA hatte bei beiden Substanzen zu einer Markierung geführt. Hierdurch wird aber nicht nur die vermutete Einordnung der Substanzen zu den Terpenen bestätigt, Unterschiede im Einbau ermöglichten darüber hinaus auch Aussagen über strukturelle Eigenschaften beider Verbindungen. So verschiebt der Einbau von d₅-MVA das Molekulargewicht beider Verbindungen, wie zu erwarten, um maximal 8 Masseneinheiten. Der Einbau von d₂-DOX erhöht das Molekulargewicht aber nur um 3 Einheiten. Ein Deuteriumatom muß also im Verlauf der Biosynthese verloren gehen (Abb. 42).

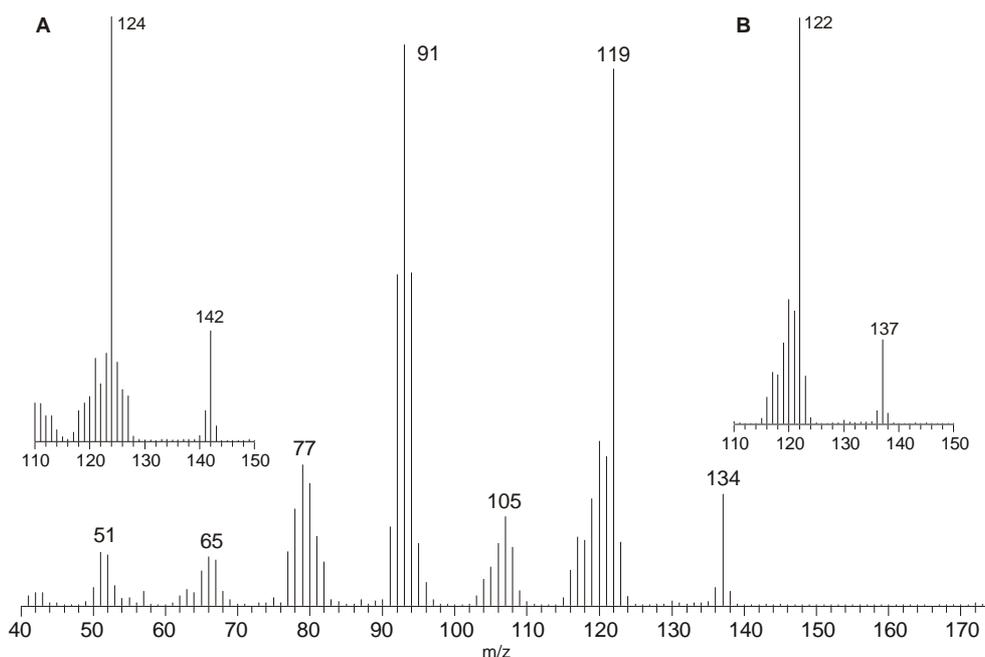


Abb. 42: Massenspektrum des Monoterpens C₁₀H₁₄ **29** und nach Einbau von d₅-MVA (**A**) und d₂-DOX (**B**).

Betrachtet man die Positionen der Deuteriumatome in der universellen Monoterpenvorstufe Geranylpyrophosphat und berücksichtigt zunächst keine Hydrid- bzw. Deuteridverschiebungen, so muß bei der Bildung beider Substanzen das zusätzliche Doppelbindungsäquivalent in Positionen 4 oder 8 eingeführt werden (Abb. 43).

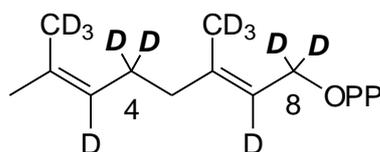


Abb. 43: Positionen der Deuteriumatome in Geranylpyrophosphat nach Einbau von d₂-DOX (kursiv) und d₅-MVA. Aufgrund des Verlustes eines Deuteriumatoms bei Einbau von d₂-DOX muß in den Positionen 4 oder 8 ein Doppelbindungsäquivalent entstehen.

Aus den Massenspektren kann weiterhin geschlossen werden, daß zumindest der Kohlenwasserstoff keine Dimethylallylgruppe besitzen kann. Anderenfalls müßte das durch die Abspaltung einer Methylgruppe entstandene Fragment der Masse 119 bzw. 124 bei Einbau von MVA zu zwei Fragmenten aufspalten ([M-CH₃] und [M-CD₃]). Ein Vergleich des Massenspektrums mit Bibliotheksspektren deutete auf Ähnlichkeiten zu Terpenen des Menthatrientyps. Diese Terpene kommen in einigen essentiellen Ölen vor, so zum Beispiel *p*-Mentha-1,3,8-trien **71** im Petersilienöl. Die Untersuchung von

Petersilienöl durch GC-MS zeigte jedoch, daß **71** zwar ein identisches Massenspektrum, aber eine andere Retentionszeit als der unbekannte Kohlenwasserstoff **29** besitzt. Die Struktur von *p*-Mentha-1,3,8-trien **71** widerspricht allerdings auch den postulierten Positionen der Deuteriumatome nach Einbau der Vorstufen. Cyclisiert man Geranylpyrophosphat zum Menthatriengrundgerüst, so deckt sich das Einbaumuster nur mit dem in Abbildung 44 dargestellten *p*-Mentha-1,5,8-trien **72**.

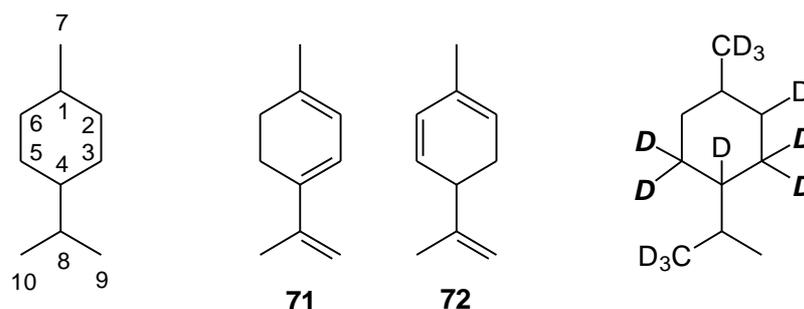


Abb. 44: *p*-Mentha-1,3,8-trien **71** und *p*-Mentha-1,5,8-trien **72**, als Strukturvorschlag von **29** und die Positionen der Deuteriummarkierungen in diesem Gerüst (kursiv: *d*₂-DOX).

Zur Überprüfung konnte **72** einfach aus Carveol **73** durch kupferkatalysierte Eliminierung hergestellt werden. Neben **72** entstanden auch zwei weitere Isomere. Alle Reaktionsprodukte zeigten zwar ähnliche oder identische Massenspektren, besaßen aber nicht die Retentionszeiten des Kohlenwasserstoffs.

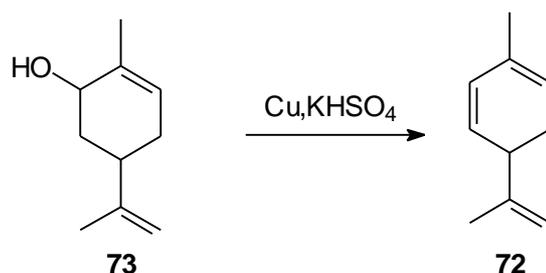


Abb. 45: Darstellung von *p*-Mentha-1,5,8-trien **70** aus Carveol **72**.

Neben cyclischen Terpenen kann das notwendige Einbaumuster aber auch noch durch offenkettigen Kohlenwasserstoffe erklärt werden. Da auf der Grundlage des Einbaumusters keine Dreifachbindungen in der Kette existieren können, muß ein offenkettiger Kohlenwasserstoff 4 konjugierte Doppelbindungen besitzen, um die Zahl der Doppelbindungsäquivalente des Kohlenwasserstoffs zu erreichen.

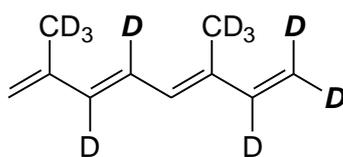


Abb. 46: mögliche lineare Struktur von **28** (kursiv: *d*₂-DOX).

Die Zahl der Doppelbindungen sollte daher durch Hydrierung von stripping-Proben ermittelt werden. Um die Zahl der zu erwartenden Hydrierungsprodukte in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wurden die Proben vor der Hydrierung mit der bereits etablierten Auftrennung in Fraktionen unterschiedlicher Polarität aufgeteilt. Der Kohlenwasserstoff eluiert hierbei allerdings zusammen mit allen im Duft enthaltenen nichtoxidierten Terpenen. Im Gegensatz dazu beinhalten die Fraktionen, in denen sich der Terpenalkohol **30** befindet, nur noch *cis*-Jasmon als weitere Komponente. Da die Hydrierungsprodukte des Alkohols und von *cis*-Jasmon deutlich voneinander unterscheidbar sein sollten und darüber hinaus der Verdacht bestand, daß **29** und **30** strukturverwand waren, wurden zunächst Fraktionen hydriert, die den Alkohol **30** enthielten.

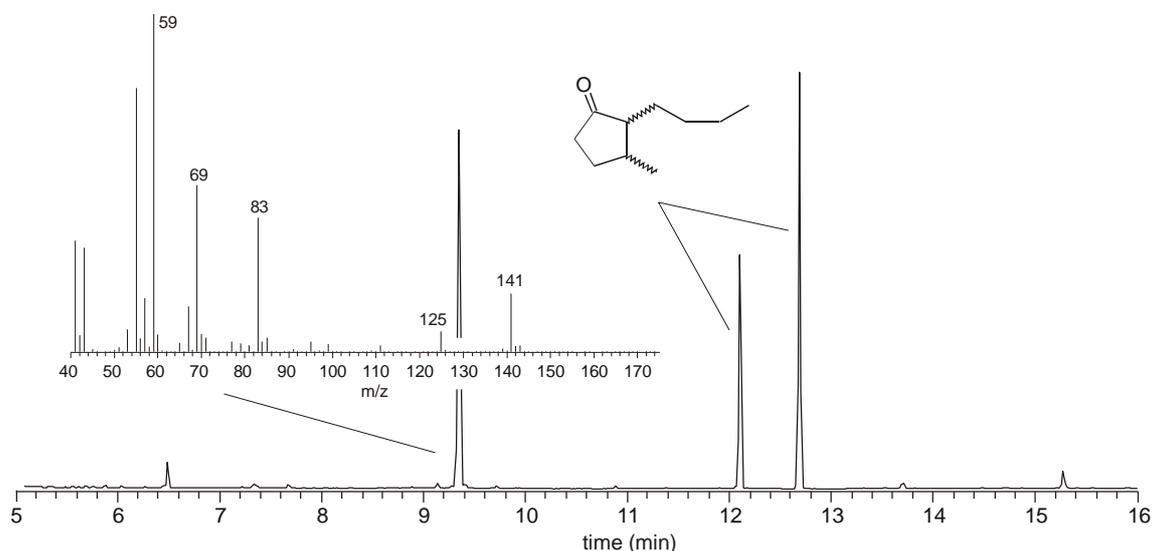


Abb. 47: Chromatographische Auftrennung der Hydrierungsprodukte von *cis*-Jasmon und des Alkohols **30**, sowie das Massenspektrum des Hydrierungsproduktes von **30**.

Das größte Fragment im Massenspektrum des Hydrierungsproduktes besaß eine Masse von 141. Da es sich bei der Verbindung um einen Alkohol handelt, und das Massenspektrum auf einem Ion-Trap-Massenspektrometer gemessen wurde - der Wasserverlust von Alkoholen macht sich hier häufig durch ein [M-17]-Fragment bemerkbar - ergibt

sich ein Molekulargewicht von 158. Damit besitzt der Alkohol 3 Doppelbindungen und muß also eine offenkettige Verbindung sein.

Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, daß der gesuchte Alkohol ein Oxidationsprodukt von Ocimen sein könnte. Ocimen gehört ebenfalls zu den Hauptkomponenten des Bohnenduftes und ist ein offenkettiges Terpen, das ebenfalls drei Doppelbindungen besitzt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde Ocimen mit Chromtrioxid behandelt. Eine Koinjektion des Reaktionsgemisches und einer stripping-Probe zeigte dann, daß der gesuchte Alkohol tatsächlich durch Oxidation von Ocimen erzeugt werden kann. Damit stand der Weg offen, durch Oxidation von Ocimen im präperativen Maßstab genügend Material für eine Isolierung und Charakterisierung des Oxidationsproduktes herzustellen.

Zur gleichen Zeit wurden im Arbeitskreis von Prof. Schulz (Braunschweig) Versuche durchgeführt, im Duftbouquet von induzierten Ulmenblättern einen Alkohol und einen Kohlenwasserstoff zu identifizieren, die ebenfalls die Summenformel $C_{10}H_{16}O$ bzw. $C_{10}H_{14}$ und ähnliche Massenspektren wie die Verbindungen aus dem Bohnenduft besitzen. Hier konnten die Substanzen durch Synthese entsprechender Referenzen aber bereits identifiziert werden. Es handelte sich um *all-trans*-2,6-Dimethyloctatetraen und um *all-trans*-2,6-Dimethylocta-3,5,7-trien-2-ol. Da Herr Prof. Schulz seine Substanzen zur Verfügung stellte, konnte durch Koinjektionen der Referenzen mit stripping-Proben schnell gezeigt werden, daß es sich auch im Bohnenduft um diese Substanzen handelt.

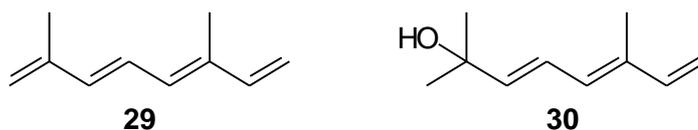


Abb. 48: Strukturen der beiden zu identifizierenden Substanzen.

Beide Substanzen sind bereits als Naturstoffe bekannt. **29** wurde aus einigen Korbblütlern (Compositae), wie etwa dem Schmuckkörnchen *Cosmos bipinnatus*^[139] und dem Jakobskraut *Senecio jacobae*,^[140] isoliert und **30** ist Bestandteil des aus *Narcissus geranium*^[141] gewonnenen Narzissenöls.

Bemerkenswert ist, daß beide Substanzen bei Applikation von d_2 -DOX eine für Monoterpene ungewöhnlich niedrige Einbaurate von unter 50% zeigen (Abb. 49).

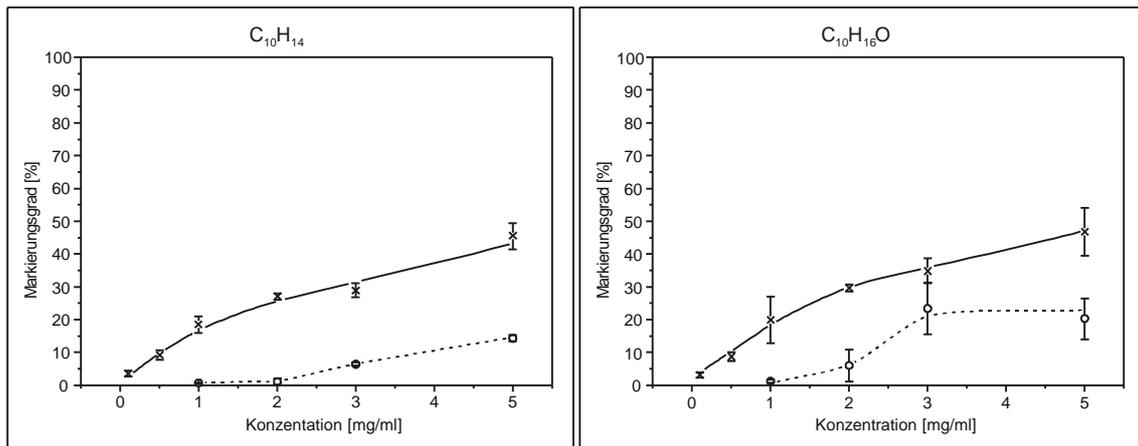


Abb. 49: Konzentrationsabhängigkeit des Markierungsgrades von C₁₀H₁₄ (links) und C₁₀H₁₆O (rechts) bei getrennter Applikation von d₂-DOX (x) und 3R-d₅-MVA (o) (Erläuterung siehe Abbildung 15).

Dies könnte darauf hindeuten, daß der Alkohol nach Induktion nicht vollständig *de novo* synthetisiert wird, sondern zumindest zu einem gewissen Anteil aus einem Glykosid freigesetzt werden kann. Die Glykolisierung oxidierter Terpenspezies ist in Pflanzen ein häufig beobachtetes Phänomen. Außerdem deckt sich diese Vermutung mit der Beobachtung, daß bei Anwendung von Fomimidomycin die Emission der beiden Verbindungen, im Gegensatz zu den Monoterpenen Ocimen und Linalool, nicht vollständig unterdrückt wurde.

3.5 Untersuchungen zur Beteiligung des MEP-Weges an der Biosynthese von Geosmin und Dehydrogeosmin

Dehydrogeosmin **38** und Geosmin **39** sind zwei strukturverwandte irreguläre Terpene, die beide aus einem *trans*-Decalingerüst mit identischem Substitutionsmuster und relativen Konfigurationen aufgebaut sind und sich durch eine zusätzliche Doppelbindung in Position 7 des Ringsystems unterscheiden. Beide lassen sich strukturell auf das Sesquiterpengrundgerüst des Eudesmantyps zurückführen, allerdings geht im Verlauf ihrer Biosynthese die für diese Einordnung notwendige Isopropylgruppe verloren.^[142]

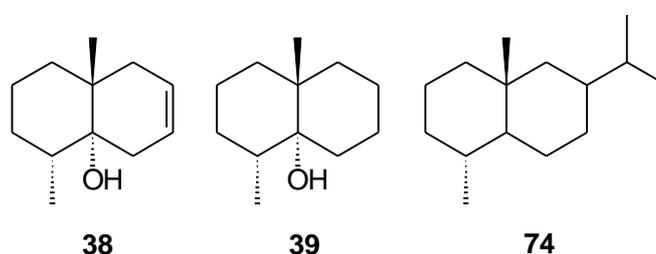


Abb. 50: Dehydrogeosmin **38**, Geosmin **39** und Eudesman **74**, die Sesquiterpenstruktur, die beiden Substanzen zugrunde liegt.

Beide Substanzen riechen intensiv nach modriger Erde. Geosmin wird von Mikroben synthetisiert, die in feuchtem Boden oder in abgestandenen Gewässern siedeln, und ist dort verantwortlich für den typischen Geruch, der mit diesen Habitaten verbunden ist. Zu den Produzenten von Geosmin zählen Cyanobakterien, Streptomyceten, Pilze, aber auch Moose. Seine Freisetzung stellt ein bedeutendes Problem bei der Trinkwassergewinnung dar und Verunreinigungen durch Geosmin können die Qualität vieler Lebensmittel beeinflussen.^[143] Andererseits trägt es zum charakteristischen Aroma von Roter Beete und Whisky bei.^[144] Dehydrogeosmin wurde dagegen bisher fast ausschließlich als Blütenduftstoff einiger Kakteen nachgewiesen. Allerdings ist es dort olfaktorisch die dominanteste Verbindung.^[145] Dies legt die Vermutung nahe, daß Dehydrogeosmin durch seinen an Feuchtigkeit erinnernden Geruch in ariden Gebieten potentielle Bestäuber anlocken könnte.

Die Frage, ob der MEP-Weg auch an der Biosynthese von Geosmin und Dehydrogeosmin beteiligt ist, sollte durch Einbauversuche mit d_2 -DOX und d_5 -MVA an Kakteenblüten, an einem Lebermoos und an einer *Streptomyces*-Art beantwortet werden.

3.5.1 Untersuchungen zur Biosynthese von Dehydrogeosmin

Die Bildung von Dehydrogeosmin aus der Sesquiterpenvorstufe Farnesylpyrophosphat wurde bereits von Feng et al. untersucht, indem deuteriummarkiertes Farnesol an Blüten von Kakteen verabreicht wurde.^[146] Nach Ausbildung des bicyclischen Ringsystems, über deren exakten Ablauf allerdings keine Aussage gemacht werden konnte, erfolgt eine superfaciale [1,2]-Hydrid-Verschiebung, die den Angriff eines Wassermoleküls auf das nun am Brückenkopf des Ringsystems lokalisierte Carbeniumion ermöglicht (Abb. 51). Die Abspaltung des C₃-Restes zum Dehydrogeosmin erfolgt anschließend vermutlich durch eine oxidative Bindungsspaltung, wie sie auch bei der Bildung von DMNT aus Nerolidol beobachtet wird.

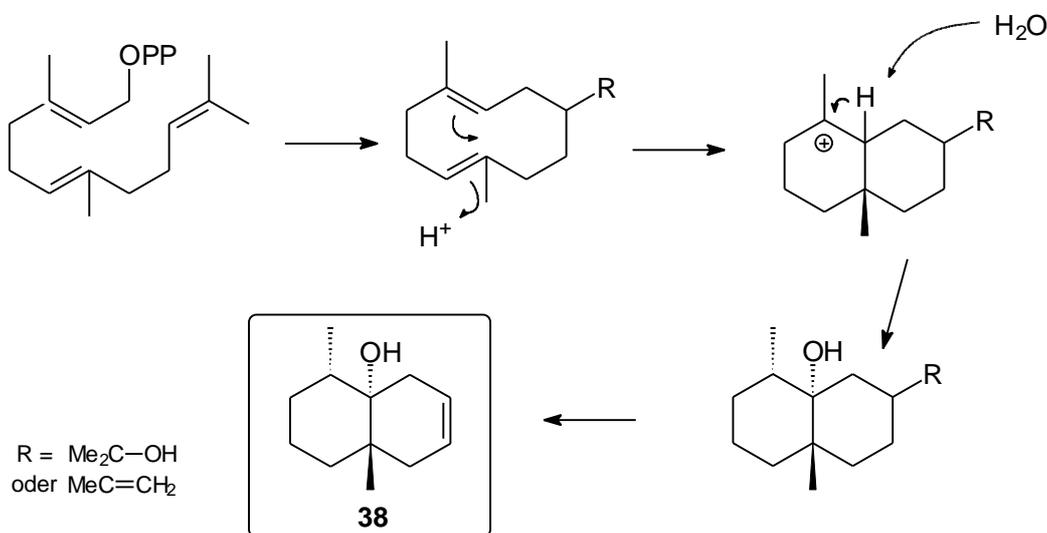


Abb. 51: Mutmaßliche Bildung von Dehydrogeosmin aus Farnesylpyrophosphat.^[146]

Um die Frage nach der Herkunft des Isopentenylpyrophosphat im Dehydrogeosmin zu beantworten, wurden Knospen von Kakteen verschiedener Arten, in deren Blütenduft die Substanz nachgewiesen worden war, von den Kakteen entfernt und in Lösungen der Vorstufen (2 mg/ml DOX und 4 mg/ml MVA) gestellt. Die Abnahme erfolgte dabei einen Tag bevor sich die Knospe zur Blüte öffnete. Zusätzlich wurden die Vorstufen auch an Blüten appliziert, die nicht von der Pflanze abgetrennt worden waren, indem in regelmäßigem Abstand (12 h) je 250 µl sterilisierter Lösungen der Vorstufen mit einer Subkutannadel in die Blütenbasis injiziert wurden. Sofort danach wurden die abgegebenen Blütenduftstoffe durch closed loop stripping analysiert.

Wie man Abb. 52 entnehmen kann, bleiben bei durchgehendem Einbau von d₂-DOX in Dehydrogeosmin von den ursprünglich 6 vorhandenen Deuteriumatomen 5 nach Ab-

spaltung des C₃-Restes erhalten. Der Einbau von d₅-MVA führt zum Verbleib von 9 Deuteriumatomen.

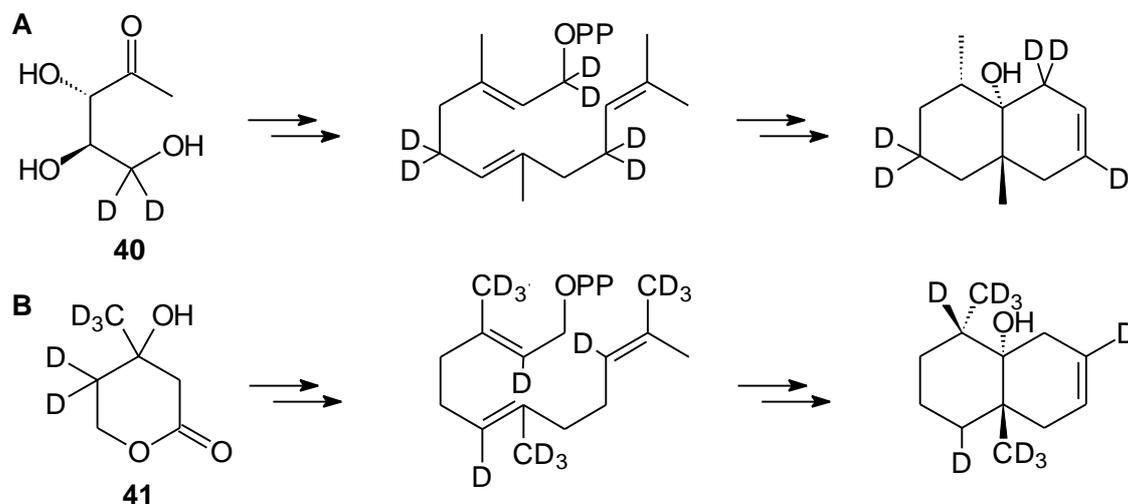
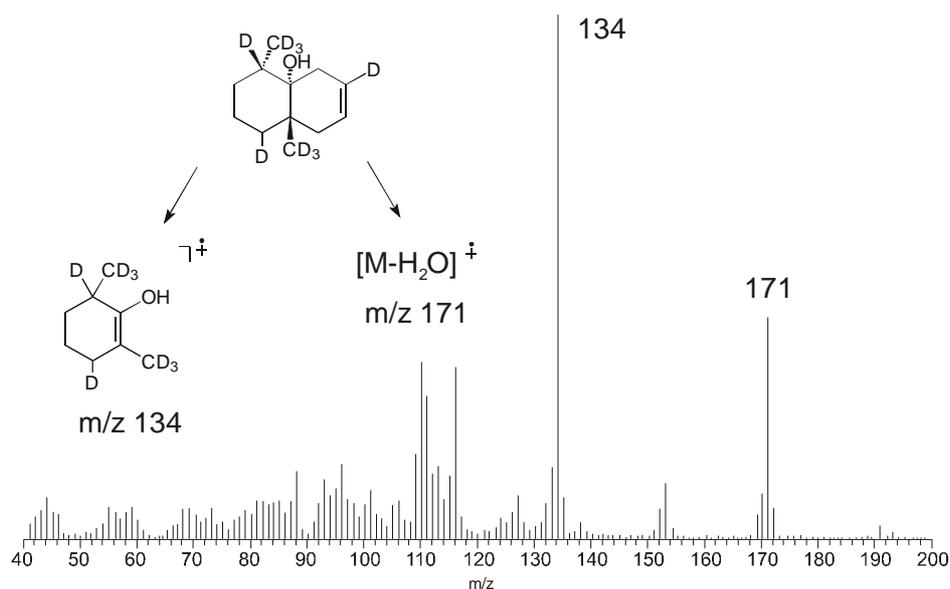


Abb. 52: mögliche Positionen der Deuteriumatomen in Dehydrogeosmin **38** bei Einbau von d₂-DOX (**A**) und d₅-MVA (**B**).

In den Massenspektren von Dehydrogeosmin können zwar, wie für einen Alkohol zu erwarten, keine Molekülonen beobachtet werden, es zeigt sich aber deutlich der Verlust von Wasser. Das daraus resultierende Fragment gibt dann die notwendige Antwort zur Anzahl der eingebauten Deuteriumatome. Charakteristisch für den massenspektroskopischen Zerfall von Dehydrogeosmin ist darüber hinaus eine retro-Diels-Alder-Reaktion, die zum Verlust des Ringes B führt und die Fragmentierung mit der höchsten Intensität darstellt (Abb. 53 und 54).



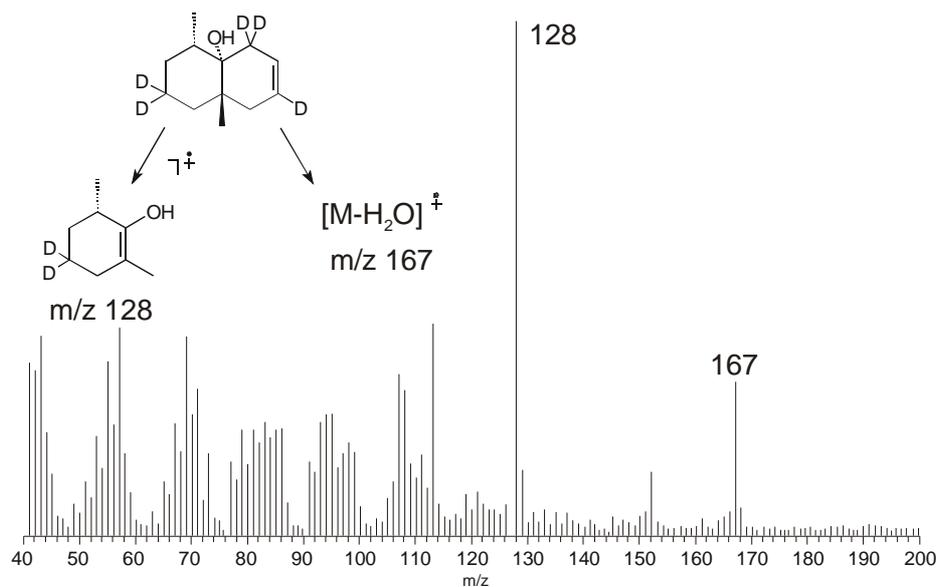


Abb. 54: Massenspektrum von Dehydrogeosmin **38** nach Einbau von d_2 -DOX.

Die Übereinstimmung der gemessenen Verschiebung dieses Fragmentes mit der Zahl der Deuteriumatome, die sich in dem Fragment aufgrund der beschriebenen Biosynthese befinden sollten, bekräftigt noch einmal den Ablauf der Biosynthese. Insbesondere das Fragment der Masse 134, das sich durch den Einbau von MVA ergibt, bestätigt, daß die Hydroxylgruppe im Verlauf der [1,2]-Hydrid-Verschiebung eingeführt wird und nicht nachträglich durch Hydroxylierung. In diesem Fall wäre das am Brückenkopf befindliche Deuteriumatom substituiert worden und im Massenspektrum müßte dann ein Fragment der Masse 133 beobachtet werden.

Die Applikation der Vorstufen erfolgte an 5 verschiedenen Kakteenarten und führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die in Tabelle 3 aufgelistet sind:

	d_2 -DOX	d_5 -MVA	DOX / MVA
<i>Aylostera espinosa</i>	8%	1)	2)
<i>Dolichothele baumii</i>	32%	+	DOX 3% / MVA -
<i>Turbinicarpus krainzianus v. min.</i>	-	-	-
<i>Gymnocalycium andreae</i>	+	15%	2)
<i>Rebutia fabrisii v. aureiflora</i>	+	31%	DOX 7% / MVA 6%

- + Einbau nachweisbar, aber nicht quantifizierbar
- kein Einbau nachzuweisen
- 1) Versuch nicht durchgeführt (nicht genügend Blüten)
- 2) kein Dehydrogeosmin im Duft enthalten

Tab. 4: Auflistung der Markierungsraten von Dehydrogeosmin verschiedener Kakteenarten nach getrennter und paralleler Applikation von d_2 -DOX und d_5 -MVA.

Während *Turbinicarpus krainzianus* weder Einbau von Deoxy-D-xylulose noch von Mevalolacton zeigte, besitzt *Dolichothele baumii* scheinbar eine merkliche Präferenz für den DOX-Weg. Umgekehrt führt in *Rebutia fabrisii* var. *aureiflora* die Applikation von MVA zu den höchsten Markierungsraten. Diese unterschiedlichen Einbauten könnten für eine artspezifische Nutzung beider Routen sprechen. Allerdings war der Erfolg einer Applikation auch stark vom Zeitpunkt abhängig, zu dem die Blüten von den Kakteen entfernt und in die Lösungen der Vorstufen gestellt wurden. Wenn sich die Blüten bereits länger als einen Tag geöffnet hatten, konnten in keinem Fall höhere Markierungsraten erhalten werden. Erfolgte die Abnahme der Knospe zu früh, so entwickelte sich die Knospe nicht mehr zur Blüte. Auch die subkutane Applikation in die Blütenbasis führte nicht immer zum Erfolg, da vermutlich nicht immer die in die Blüten führenden Leitgefäße getroffen wurden. In der Summe unterstreichen die Ergebnisse aber, daß Kakteen in der Lage sind, beide Routen für die Biosynthese des Sesquiterpenabkömmlings Dehydrogeosmin zu verwenden. Bemerkenswert ist ebenfalls, daß Dehydrogeosmin in allen Fällen im Vergleich zu weiteren im Kakteenduft vorhandenen Terpen, den mit Abstand höchsten Markierungsgrad aufwies. So besaßen zwei im Duft von *Dolichothele baumii* enthaltene Sesquiterpene nach Applikation von d_2 -DOX Markierungsraten von 20% bzw. 25% und selbst ein Monoterpen zeigte hier mit einer Markierungsrate von 14% einen geringeren Einbau als Dehydrogeosmin (32%). Auch bei den anderen untersuchten Kakteenarten zeigten die weiteren Terpene nur Spuren eines Einbaus. Diese Unterschiede deuten an, daß Dehydrogeosmin im Verlauf der Duftstoffemission im Verhältnis zu den übrigen Terpenen über eine stärkere oder dynamischere *de-novo* Synthese gebildet wird.

3.5.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Geosmin

Trotz der Bedeutung von Geosmin ist seine Biosynthese bisher nur unvollständig untersucht. Die terpenoide Herkunft von Geosmin konnte von Bentley et. al. durch Einbauversuche mit ^{14}C -markiertem Acetat an *Streptomyces antibioticus* nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Studien wurde ebenfalls L -[^{14}C -Methyl]-methionin als metabolischer Methyl-donor appliziert. Im Unterschied zu 2-Methyl-isoborneol, einem irregulären Monoterpen, das häufig zusammen mit Geosmin auftritt, wurde aber kein Einbau in Geosmin beobachtet.^[147] Dies deutet darauf hin, das Geosmin analog zu Dehydrogeosmin durch Abbau einer sesquiterpenoiden Vorstufe entstehen muß, und

nicht durch den Aufbau aus einer monoterpenoiden Vorstufe und anschließender Methylierung. Über die Cyclisierung oder den Abbau des C3-Restes liegen aber keine Kenntnisse vor.

Die Frage nach einer Beteiligung des MEP-Weges an der Geosminbiosynthese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Suspensionskulturen des Bakterienstammes *Streptomyces maritimus* und an Kalluskulturen des Lebermooses *Fossombrussia pusilla* untersucht werden.

Für die Einbauversuche an *S. maritimus* wurde den Nährlösungen getrennt d₂-DOX (2 mg/ml) und d₅-MVA (4 mg/ml) zugegeben und 2 bzw. 3 Tage nach Beimpfung der Kulturgefäße die Gasphase durch Festphasenmikroextraktion (SPME) auf flüchtige Sekundärmetaboliten überprüft. Neben Geosmin produziert der Stamm noch ein Dutzend weiterer Sesquiterpene, von denen 2 bis 3 zu den Hauptkomponenten der emittierten Verbindungen zählen. Alle Terpene waren in Gegenwart von Deoxy-D-xylulose nahezu vollständig markiert. Bei zwei Sesquiterpenen konnten sogar keine unmarkierten Ionen mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu führte die Applikation von Mevalonsäure zu keinerlei Einbau. Auch durch Aufschluß der Bakterien wurden keine Terpene freigesetzt, die eine MVA-typische Markierung trugen. *Streptomyces maritimus* benutzt also für die Biosynthese aller Sesquiterpene, einschließlich des Geosmins, exklusiv den MEP-Weg. Die fast vollständige Abwesenheit unmarkierter Terpene zeigt darüber hinaus, daß dieser Bakterienstamm Deoxy-D-xylulose als externe Quelle so gut nutzen kann, daß die endogene DOX-Produktion keine Rolle mehr im Stoffwechsel spielt.

Die hier eindeutig nachgewiesene Nutzung des MEP-Weges kann aber nicht generalisiert werden. Die bereits erwähnten Studien mit markiertem Acetat und weitere Publikationen zur Terpenbiosynthese in Streptomyceten sprechen auch für eine Beteiligung des MVA-Weges. Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Einbaustudien von Seto et. al. an *Streptomyces aeriouifer*. Dieser Stamm nutzt während seiner Wachstumsphase zur Bildung der Primärmetaboliten den MEP-Weg, der später beim Übergang zur stationären Phase für die Bildung von Sekundärmetaboliten durch den MVA-Weg ersetzt wird.^[148] Eine ähnliche regulative Veränderung der Terpenbiosynthese beobachteten Diogini bereits 1994, ohne sie aber zum damaligen Zeitpunkt richtig deuten zu können. Durch die Anwendung von Clomazon konnte in *Streptomyces tendae* die Geosmin-Produktion konzentrationsabhängig reduziert werden.^[149] Dieser Effekt trat jedoch nur in Actinomyceten-Medien auf. In Hickey-Tresner-Medium führte

die Gabe von Clomazon zu einer erhöhten Produktion von Geosmin. Berücksichtigt man in diesem Zusammenhang die Ergebnisse aus den Inhibierungsversuchen der Terpenbiosynthese an *P. lunatus*, die für Clomazon eine Wirkung als Inhibitor von Enzymen des MEP-Weges andeuten, so scheint die Nutzung des MEP- oder des MVA-Weges vor allen Dingen durch Einflüsse des Mediums reguliert zu werden. Nur bei aktiviertem MEP-Weg kann Clomazon die Geosmin-Synthese unterbinden. Welcher der beiden Wege allerdings aktiv ist, hängt von den äußeren Bedingungen ab. Auch der Wechsel von MEP- auf MVA-Weg beim Übergang der Wachstumsphase auf die stationäre Phase kann so durch Änderungen der äußeren Bedingungen erklärt werden. Die Aktivierung beider Wege könnte im Rahmen dieser Überlegung auf einfachen genetischen Regulationen, wie dem Operon-Modell basieren. Vor diesem Hintergrund muß offen bleiben, ob die hier beobachtete, ausschließliche Nutzung des MEP-Weges durch *S. maritimus* den einzigen physiologischen Zustand darstellt oder nur von der Wahl der Kulturbedingungen abhängt.

Die entgegengesetzte Ressourcennutzung zeigte *F. pusilla*. Die Benetzung von Kalluskulturen des Lebermooses mit Lösungen der deuterierten Vorstufen, führte im Falle der Mevalonsäure zu einer 5%igen Markierung des Geosmins. Weitere, in der Gasphase enthaltene Sesquiterpene zeigten Markierung von bis zu 10%. Ein ebenfalls enthaltenes Monoterpen wies keinen Einbau von Mevalonsäure auf. Die geringen Einbauraten decken sich mit Beobachtungen von U. Warmers, die die Biosynthese von Sesquiterpenen des Gymnomitran-Typs in den Lebermoosen *Bazzonia trilobata* und *Reboulia hemispherica* untersucht hat.^[150] Hier führte der Einbau von deuteriertem Mevalolacton auch nur zu Einbauraten von 5% bzw. 15%. Jedoch scheinen die niedrigen Einbauraten nicht auf Mevalonsäure begrenzt zu sein. So zeigt das von *F. pusilla* produzierte Monoterpen auch nach Applikation von Deoxy-D-xylulose nur eine Markierung von 6%. Die geringen Einbauraten deuten also eher auf einen sehr langsamen Umsatz beim Sekundärmetabolismus hin. Interessanterweise lassen sich auch nach Applikation von d₂-DOX sowohl bei Geosmin, als auch bei einem weiteren Sesquiterpen Spuren eines Einbaus nachweisen. Ob dies auch als Beteiligung des MEP-Weges an der Geosminbiosynthese gewertet werden kann, bleibt angesichts der insgesamt geringen Einbauraten aber fraglich. Einer solchen Beteiligung spricht auch entgegen, daß die bereits erwähnten Sesquiterpene des Gymnomitran-Typs bei Applikation von ¹³C-markierter Glucose nur Einbaumuster des MVA-Weges zeigten.^[150] Dies deckt sich weiterhin mit

einer Beobachtung von Thiel et. al., die ebenfalls beim Einbau von markierter Glucose in den Lebermoosen *Ricciocarpos natans* und *Conocephalum conicum* zwischen Sesqui- und Monoterpenen die klassische Aufteilung der beiden Stoffwechselwege vorgefunden haben.^{[151], [152]}

3.6 Untersuchungen zur Biosynthese von Isopren mit Hilfe der Photoakustikspektroskopie

Isopren stellt das kleinste denkbare Terpen dar. Es wird von verschiedene Pflanzenarten emittiert und gehört neben Methan zu den wichtigsten leichtflüchtigen organischen Verbindungen biologischen Ursprungs, die in der Atmosphäre als Spurengase auftreten. Genaue Emissionsraten sind bisher nicht bekannt, aber Schätzungen belaufen sich auf eine jährlich Menge von bis zu 50×10^6 Tonnen Isopren, die in die Atmosphäre abgegeben werden.^[153] Durch seine Fähigkeit sehr schnell mit Hydroxylradikalen zu reagieren, spielt es eine entscheidende Rolle in der Chemie der Troposphäre und wird als wichtige Komponente bei der Bildung von Sommersmog diskutiert.^{[154], [155]} Zu den größten Isoprenproduzenten zählen Eichen und Pappeln, aber auch Fichten, Moose und Farne emittieren signifikante Mengen. Die Verbindung wird durch das Enzym Isoprensynthase direkt aus Dimethylallylpyrophosphat durch Eliminierung des Diphosphatrestes gebildet.^[156] Seine Biosynthese verläuft nur bei Temperaturen oberhalb von 20°C und besitzt dann eine starke Temperaturabhängigkeit.^[157] Zusätzlich ist die Isoprenbiosynthese proportional zur Menge des einfallenden Lichtes, eine physiologische Verbindung zwischen Isoprenbiosynthese und Photosyntheserate ist daher naheliegend. Die biologische Bedeutung der Isoprenemission für Pflanzen ist bisher aber unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung. Diskutiert wird neben dem intrazellulären Schutz vor reaktiven Molekülspezies (Radikale u.ä.) auch eine Funktion als Wärmeregulator in den Blättern zur Erhöhung der Thermotoleranz des Photosyntheseapparates.^[158] Als lipophile Verbindung wäre Isopren in der Lage die Membraneigenschaften der Thylakoidmembranen des Photosyntheseapparates innerhalb der Chloroplasten zu beeinflussen und den Photosyntheseapparat somit vor Denaturierung zu schützen. Ein Einfluß von Isopren auf die Stabilität von Membran-Protein-Komplexen konnte bei *in vitro* Versuchen aber nicht gezeigt werden.

Wie alle Terpene wurde auch Isopren lange Zeit als Produkt des Mevalonat-Weges angesehen. Der Umstand, daß die bisher beschriebenen Isoprensynthesen aus Chloroplastenmembranen isoliert wurden,^[159] führte zur naheliegenden Idee, daß auch Isopren ein Produkt des MEP-Weges darstellt. Die Rolle des MEP-Weges in der Isoprenbiosynthese wurde dann auch von Zeidler et. al in Weiden, Pappeln und Schöllkraut durch den Einbau deuteriummarkierter $[1-^2\text{H}]$ -Deoxy-D-xylulose nachgewiesen.^[160]

Das fehlende Verständnis für die physiologische Bedeutung der Isoprenemission und ihr Gewicht in der Atmosphärenchemie haben zur Entwicklung verschiedener analytischer Techniken für den Nachweis von Isopren in der Gasphase geführt. Für die Untersuchung der biologischen Bedeutung kann dabei der Nachweis isotopenmarkiertem Isoprens besondere Dienste leisten. Hier nimmt der Nachweis durch GC-MS eine führende Rolle ein. Allerdings besitzt er den Nachteil, das er diskontinuierlich erfolgen muß, zur Untersuchung schneller physiologischer Antworten ist die Methode daher ungeeignet. Darüber hinaus, kann der Nachweis durch GC-MS mit unhandlichen und damit schlecht zu reproduzierenden Probenpräparationen verbunden sein.

Um diese Nachteile zu umgehen, sollte daher die Entwicklung eines photoakustischen Spektrometers zum Nachweis von Isopren durch der Arbeitsgruppe Kühnemann am Institut für Angewandte Physik der Universität Bonn unterstützt werden.

Die Photoakustische Spektroskopie (PAS) beruht auf der Umwandlung elektromagnetischer Transversalwellen in akustische Longitudinalwellen. Hierzu werden Schwingungsübergänge des zu untersuchenden Spurengases spezifisch mit einem Laser angeregt. Die angeregten Moleküle geben ihre Energie schnell durch Dissipation ab. Da die Meßküvetten des Systems ein konstantes Volumen besitzen, macht sich dieser Wärmeanstieg durch einen gleichzeitigen Druckanstieg bemerkbar, der mit einem druckempfindlichen Sensor, etwa einem Piezomikrofon, verfolgt werden kann. Um die Meßgenauigkeit zu erhöhen, wird der einstrahlende Laser mit einem Chopper unterbrochen und die Verstärkung des Meßsignals mit dieser Einstrahlfrequenz synchronisiert (lock-in-Verstärkung). Die Unterbrechung ermöglicht darüber hinaus auch die thermische Relaxation des Systems. Die Frequenz des Choppers wird dabei auf die akustische Resonanzfrequenz der Meßküvette abgestimmt, die so erzeugte stehende Welle garantiert eine optimale Amplitudenausnutzung.^{[161], [162]}

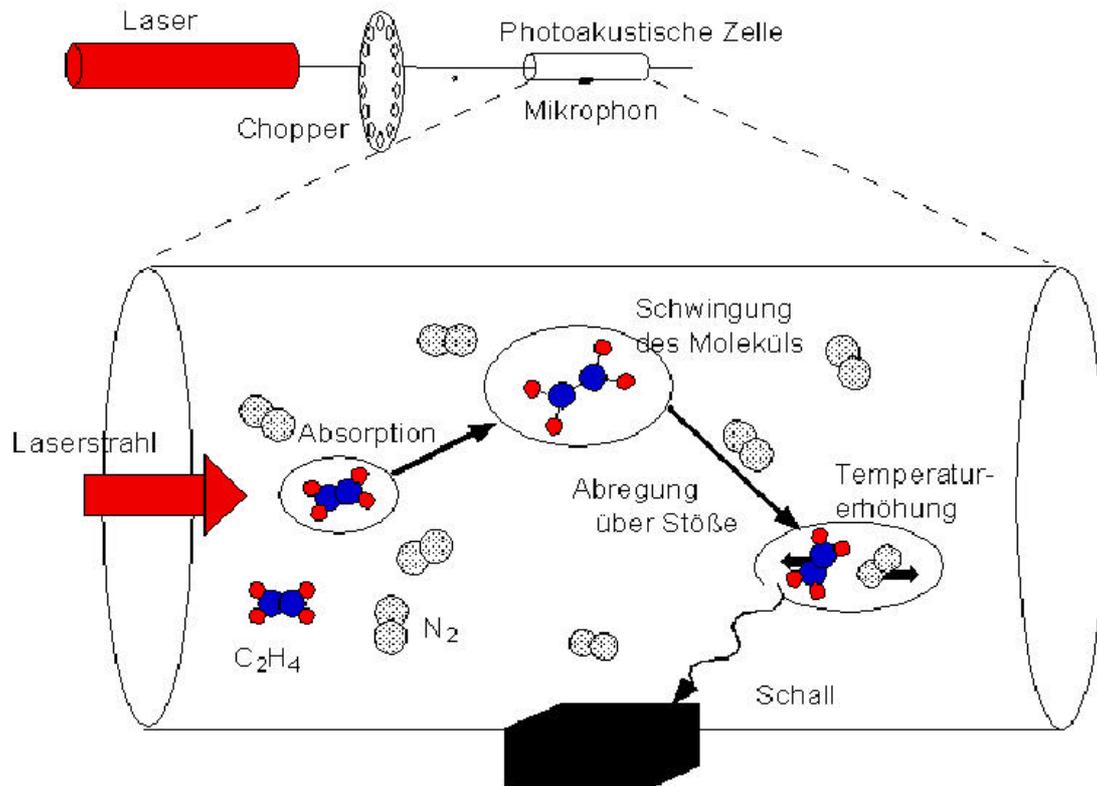


Abb. 55: Prinzip der Photoakustischen Spektroskopie (mit freundlicher Genehmigung von F. Kühnemann).

Spült man die photoakustische Meßzelle mit einem kontinuierlichen Strom des zu überwachenden Gasgemisches, so kann der Gehalt des zu detektierenden Gases durch Abstimmung der einstrahlenden Laserfrequenz selektiv, kontinuierlich und mit hoher Empfindlichkeit bestimmt werden. Die möglichen Anwendungen der PAS sind dabei vielfältig, besonders aber hat ihre Anwendung in der Pflanzenphysiologie zur Überwachung des Phytohormones Ethylen Aufmerksamkeit erreicht.

Mit der Entwicklung eines Isopren-sensitiven Photoakustik-Spektrometers sollte es auch möglich sein, die Isoprenemission von Pflanzen kontinuierlich zu messen. Durch abwechselnde Anregung typischer Schwingungen von deuteriertem und nichtdeuteriertem Isopren, könnte damit der Einbau deuterierter Deoxy-D-xylulose parallel zur Gesamtemission des Isoprens nahezu kontinuierlich beobachtet werden und damit vielfältige physiologische Versuche ermöglichen. Der Einbau der verwendeten $[5,5-^2H_2]$ -Deoxy-D-xylulose sollte dabei zu $[4,4-^2H_2]$ -Isopren führen.

Zunächst sollte eine Methode entwickelt werden, den Einbau der markierten Deoxy-D-xylulose in Isopren durch herkömmliche GC-MS-Analyse zu erfassen, um so unabhängig von dem neu zu entwickelnden spektroskopischen Verfahren die Funktionsfähigkeit

gig von dem neu zu entwickelnden spektroskopischen Verfahren die Funktionsfähigkeit des biologischen Systems überwachen zu können. Als Versuchspflanze wurde *Eucalyptus globulus* gewählt, da er zu den stärkeren Isoprenemittenten gehört und sowohl in Jena als auch in Bonn von den Botanischen Gärten zur Verfügung gestellt werden konnte. Die bisher für die Analyse des Headspaces von pflanzlichen Proben verwendete Methode des closed-loop-strippings ist für den Nachweis von Isopren ungeeignet, da Isopren aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit zusammen mit dem Lösungsmittel von der GC-Säule eluieren würde. Daher wurde auf die lösungsmittelfreie Festphasenmikroextraktion (SPME) zurückgegriffen. Als Absorptionsmaterial wurde eine Carboxen/PDMS-Mischfaser gewählt, die speziell für den Nachweis niedermolekularer, leichtflüchtiger Substanzen optimiert ist. Die chromatographische Auftrennung erfolgte auf einer AT 624-Säule (Alltech), die ebenfalls für die Auftrennung niedermolekularer Verbindungen entwickelt wurde. Für die Einbauexperimente wurde jeweils ein Blatt von *E. globulus* über Nacht mit Lösungen der deuterierten Deoxy-D-xylulose (1 mg/ml) vorinkubiert und anschließend in der Lösung in einen geschlossenen Exsikkator überführt. Die Isopren-Emission wurde dann durch starke Lichteinstrahlung angeregt und nach 1,5 Stunden mittels SPME überprüft. Hierzu wurde die SPME-Faser für 30 min dem Gasraum des Exsikkators ausgesetzt und anschließend in den Injektor des GC-MS überführt. Das von *E. globulus* emittierte Isopren ließ sich mit dieser Methode sicher nachweisen und auch die Nutzung der markierten Deoxy-D-xylulose für die Isopren-Synthese war eindeutig zu erkennen (Abb. 56). Sie betrug nahezu 100%.

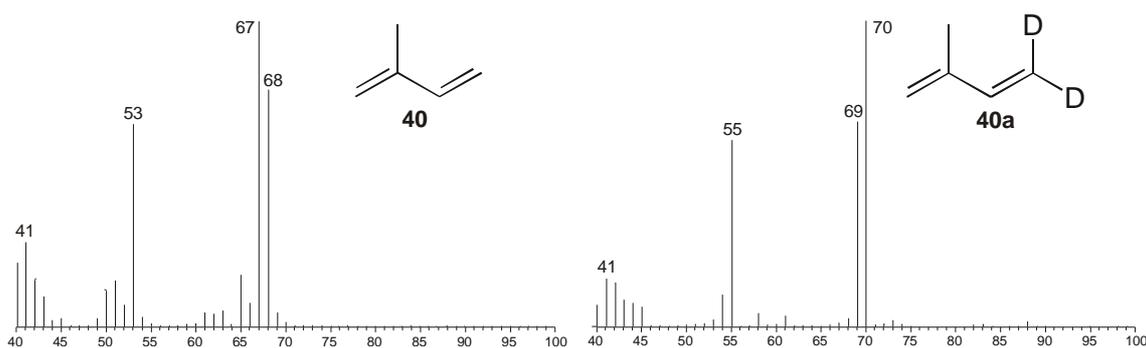


Abb. 56: Massenspektren des undeuterten Isoprens (links, **40**) und des [4,4-²H₂]-Isoprens (rechts, **40a**).

Als weitere wichtige Voraussetzung für die Entwicklung eines isotopen-sensitiven PA-Spektrometers mußten die IR-spektroskopischen Daten des entstandenen Deuteroiso-

prens bekannt sein. Zu diesem Zweck wurde von Göde Schüler das benötigte $[4,4\text{-}^2\text{H}_2]$ -Isopren synthetisiert. Mit den so erhaltenen Daten konnte dann von der Arbeitsgruppe Kühnemann der Laser des Spektrometers auf die Absorptionsbanden des Deuterioisoprens abgestimmt werden.^[163]

Zwei Beispiele für die gleichzeitige Beobachtung der Emission deuterierten und nicht-deuterierten Isoprens nach der Gabe von deuteriummarkierter Deoxy-D-xylulose sind in Abbildung 57 dargestellt.

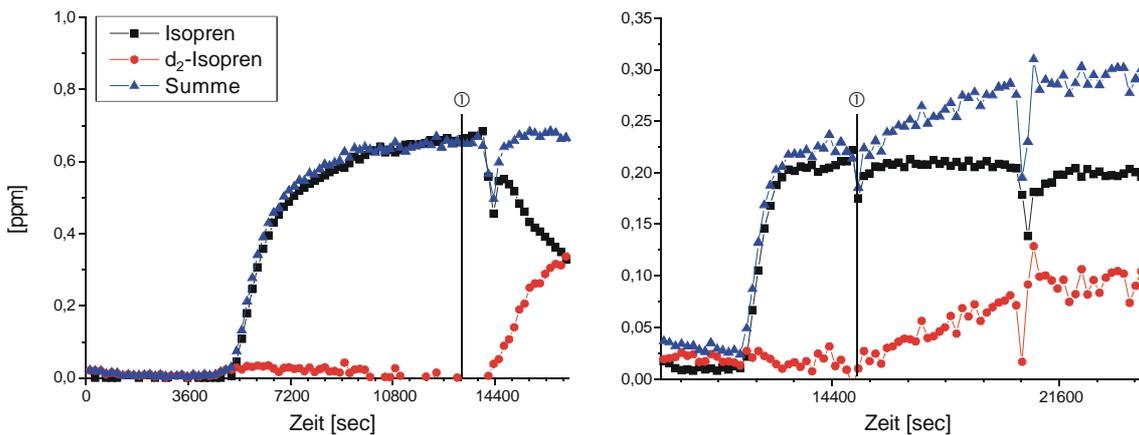


Abb. 57: on-line monitoring der Isopren und $[4,4\text{-}^2\text{H}_2]$ -Isoprenemission zweier Eucalyptusblätter nach Gabe von deuteriummarkierter Deoxy-D-xylulose, ① d_2 -DOX-Zugabe.

In beiden Fällen beginnt wenige Minuten nach Gabe der Vorstufe die Emission des deuterierten Isoprens. Im links dargestellten Fall nimmt aber parallel zur Zunahme der Emission des markierten Isoprens die Emission des nichtmarkierten Isoprens ab. Die Summe des emittierten Isoprens bleibt dabei gleich. Die Isoprenbiosynthese muß also an eine enzymlimitierte Grenze gestoßen sein, bei der endogene Biosynthese und exogene Gabe von DOX in Konkurrenz stehen. Im Gegensatz hierzu bleibt im rechts dargestellten Fall die Emission des nichtdeuterierten Isoprens konstant. Das zusätzliche Angebot deuterierter Deoxy-D-xylulose führt zur zusätzlichen Biosynthese von Isopren. Dies zeigt, daß die enzymatische Aktivität einzelner Blätter durchaus unterschiedlich sein kann und deutet damit bereits den Wert der Methode für die Untersuchung physiologischer Fragestellungen in Bezug auf die Isoprenbiosynthese an. Besonders eindrucksvoll zeigt sich dies auch an dem in Abbildung 58 dargestellten Experiment. Im ersten Teil deutet sich wieder eine enzymlimitierte Isoprenbiosynthese an, allerdings ist diesmal die Abnahme des nichtmarkierten Isoprens weniger ausgeprägt als der Anstieg des markierten, die Reaktion gerät also erst durch das zusätzliche Angebot an Vorstufen

in die Enzymlimitation. Interessanter ist aber der zweite Teil des Experimentes in dessen Verlauf die Temperatur erhöht wurde.

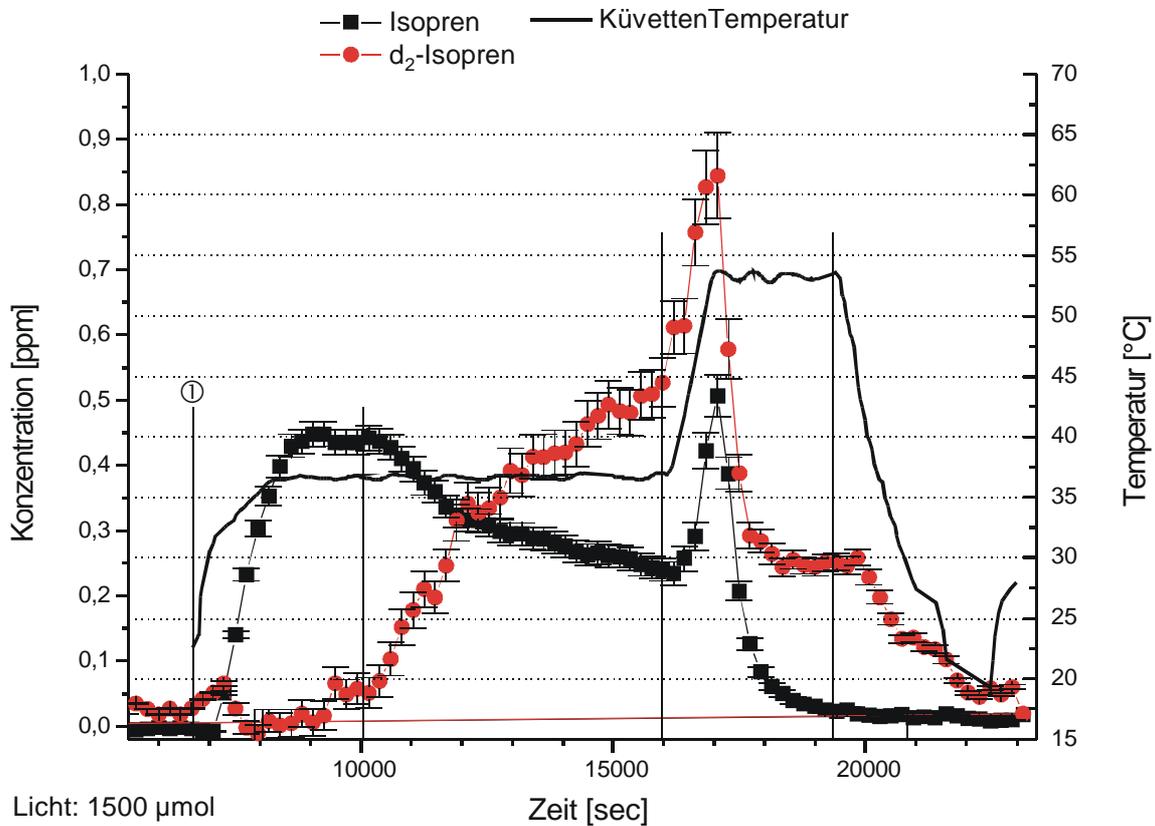


Abb. 58: on-line monitoring der Isopren- und $[4,4\text{-}^2\text{H}_2]$ -Isoprenemission bei Veränderung der Versuchstemperatur, ① Einschalten der Beleuchtung, d_2 -DOX-Zugabe, Temperaturerhöhung, Temperaturabsenkung.

Entsprechend der Temperaturabhängigkeit der Isoprenproduktion steigt die Emission des Isoprens nach Erhöhung der Temperatur sprunghaft an. Bei Temperaturen oberhalb von 45°C kommt es allerdings zu einer irreversiblen Schädigung des Photosyntheseapparates.^[158] Da im Verlauf des vorliegenden Experimentes die Temperatur auf 53°C erhöht wurde, kann also keine Photosynthese mehr stattfinden, entsprechend bricht nach sehr kurzer Zeit die Isoprenemission zusammen. Allerdings ist hiervon nur die Emission des nichtmarkierten Isoprens vollständig betroffen. Die Emission des markierten Isoprens bleibt auf einem verringerten Niveau erhalten. Die Pflanze ist also in der Lage, alle Umsetzungen, die zur Überführung der Deoxy-D-xylulose in Isopren notwendig sind, weiterhin durchzuführen. Dies spricht dafür, daß nach einmal erfolgter Aktivierung der Isoprenbiosynthese diese primär durch die Bereitstellung der ersten Vorstufen

des MEP-Weges (Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat) durch die Photosynthese limitiert wird und nicht etwa durch den Bedarf an Reduktionsäquivalenten (NADPH) oder Phosphorylierungspotential (ATP bzw. CTP), die für die Überführung der DOX in IPP notwendig sind. Auch die Isopren-Synthase selbst muß bei diesen Temperaturen noch aktiv sein.

Mit den aufgeführten Ergebnissen hat sich nicht nur gezeigt, daß das von der Arbeitsgruppe Kühnemann entwickelte und betriebene Photoakustische Spektrometer in der Lage ist, die Emission von deuteriummarkiertem und nichtmarkiertem Isopren parallel und kontinuierlich zu messen, es ergaben sich auch bereits wichtige Einblicke in die physiologischen Abläufe der Isoprensynthese.

3.7 Die Beteiligung mikrobieller Elicitoren an der induzierten Duftemission

Der größte Teil höherer Pflanzen ist gegen die meisten potentiellen, mikrobiellen Pathogene resistent. Viele Pathogene werden bereits durch strukturelle Eigenschaften der Pflanzenoberfläche von der Besiedelung einer Pflanze abgehalten. So bewirkt zum Beispiel der Wachsüberzug von Blättern das Abperlen von Tau- und Regentropfen, die somit Erreger oder deren Sporen von der Blattoberfläche abspülen können. Kommt es aber zu einer Infektion der Pflanze, so hängt deren Verlauf davon ab, mit welcher Schlagkraft und Geschwindigkeit der Parasit die Wirtspflanze angreift und wie schnell diese ihre Abwehrmaßnahmen aktivieren kann. Für diese Aktivierung muß die Pflanze als ersten Schritt die im Infektionsbereich freigesetzten Elicitoren erkennen. Elicitoren stellen damit eine wichtige Schnittstelle für die Erforschung der pflanzlichen Wirt-Parasit-Interaktion dar. In diesem Zusammenhang hat der phytopathogene Pilz *Trichoderma viride* in letzter Zeit die Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da aus ihm zwei Elicitoren isoliert worden sind, die zu unterscheidbaren pflanzlichen Antworten führen und diese durch grundverschiedene Mechanismen anregen.

3.7.1 Die Duftinduktion durch Peptaibole des Alamethicin-Typs

Mit dem Namen Alamethicin bezeichnet man eine Gruppe homologer Peptide, die bereits vor geraumer Zeit aus *T. viride* isoliert worden sind und die die Eigenschaft besitzen, sich in Lipidmembranen einzulagern und dort spannungsabhängige Kanäle zu

bilden.^[164] Strukturell gehört Alamthicin zu den Peptaibolen, kurzkettigen, peptidartigen Antibiotika, deren gemeinsames Kennzeichen ein acetylierter N-Terminus und die Anwesenheit von α -Aminobuttersäure ist.^[165] Zusätzlich befindet sich am C-Terminus ein α -Aminoalkohol. Ihre Wirkung als Elicitor der pflanzlichen Abwehr wurde erst vor kurzem durch Arbeiten von Dr. Jürgen Engelberth aufgedeckt.^[166] Die Applikation von Alamethicin an Setzlinge der Limabohne führte im Rahmen dieser Arbeit zu einer völlig anderen Zusammensetzung der emittierten Düfte, als sie von der Applikation zuvor eingesetzter Elicitoren oder von Jasmonsäure bekannt war. Das durch Alamthicin ausgelöste Duftbouquet setzt sich nur aus drei Komponenten zusammen: den beiden Homoterpenen DMNT und TMTT sowie Methylsalicylat. Das grundlegende Prinzip, das zur Auslösung der Duftproduktion führt, beruht vermutlich auf der Depolarisation des Ruhepotentials der Pflanzenzellen. So läßt sich die beobachtete Duftemission auch durch andere Peptiabile elicitorieren. Eine besondere Rolle kommt hierbei wohl der Aufhebung des Protonengradienten zu, der an der Zellmembran von Pflanzenzellen existiert. So führte die Applikation von Kalium-spezifischen Porenbildnern, wie etwa Valinomycin, nicht zur Auslösung der Duftemission. Andererseits kann das Duftbouquet auch ausgelöst werden, indem die Protonenpumpen, die unter Verbrauch von ATP den Protonengradienten an der Zellmembran aufrecht erhalten, mit spezifischen Inhibitoren ausgeschaltet werden (Abb. 59).

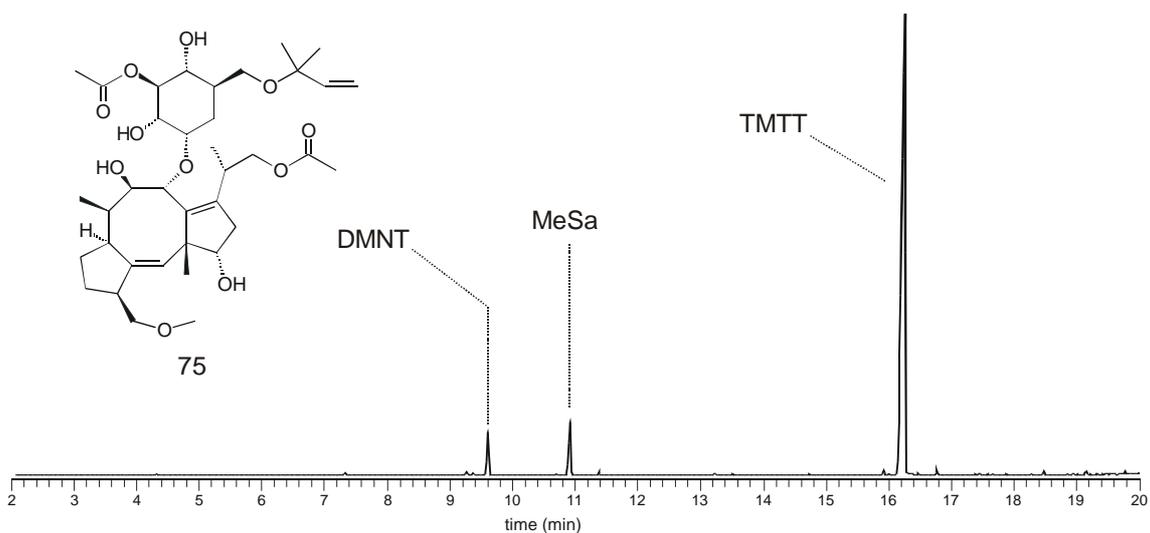


Abb. 59: Emission eines Alamethicin-analogen Duftbouquets durch *P. lunatus* nach Blockade der membranständigen ATPasen mittels Fusicoccin **75**.

Die Mechanismen und Signalwege, die nach der Depolarisation zur Signalverarbeitung beitragen sind bisher nicht bekannt. Durch Arbeiten von Koch und Schüler konnte aber gezeigt werden, daß es zu einer Interaktion zwischen dem durch Pathogene ausgelösten Salicylat-Weg und dem durch Herbivoren ausgelösten Jasmonat-Weg kommt.^[167] Nach Applikation des Alamethicins steigt zunächst, wie im Falle der Schädigung durch Insekten, der endogene Jasmonatgehalt der Pflanzen an. Durch die gleichzeitig einsetzende, massive Produktion von freier Salicylsäure wird die Synthese der Jasmonsäure über den Octadecanoid-Weg aber durch einen bisher nicht bekannten Mechanismus nach Bildung von 12-Oxophytodiensäure unterbunden. Das Ausbleiben des Jasmonsäuresignals wirft für die Biosynthese der emittierten Homoterpene aber die Frage auf, ob das für die Synthese benötigte IPP aus dem MVA- oder dem MEP-Weg stammt. DMNT wird im Falle einer herbivoren Schädigung überwiegend aus cytosolischem IPP des MVA-Weges synthetisiert. Das Gen des Schlüsselenzyms des MVA-Weges, der HMG-CoA-Reduktase gehört aber zu den JA-induzierbaren Genen. Das fehlende JA-Signal bei der Induktion durch Alamethicin könnte damit zur Folge haben, daß es eben nicht zu einer verstärkten Aktivität des MVA-Weges kommt. Es entstände eine ähnliche Situation, wie sie auch bei der Blockade des MVA-Weges durch Cerivastatin besteht. Wie dort könnte die Biosynthese des DMNT überwiegend durch den Export von IPP des plastidären MEP-Weges ermöglicht werden. Herbivor- und pathogen-bezogene Elicitoren würden damit nicht nur zu unterschiedlichen Duftmustern führen, die emittierten Terpene hätten auch unterschiedliche biochemische Herkünfte.

Für diese Überlegung sprechen erste Bestimmungen des natürlichen $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Verhältnisses des DMNT nach Induktion mit Alamethicin. Mit einem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-30,6 \pm 1,5$ (n=3) liegt es in einem Bereich, der für Terpene charakteristisch ist, die über den MEP-Weg gebildet werden. Allerdings läßt sich die DMNT-Emission durch eine Blockade des MEP-Weges mittels Fosmidomycin nicht vollständig unterdrücken. Dies wird erst durch die gleichzeitige Applikation von Fosmidomycin und Cerivastatin erreicht. Dieser Befund muß jedoch noch nicht grundsätzlich mit den eben beschriebenen Überlegungen im Widerspruch stehen. Da der MVA-Weg auch für die Bildung von physiologisch essentiellen Substanzen, wie etwa den Steroiden verantwortlich ist, muß eine Grundaktivität immer vorhanden sein. Die Induktion durch Alamethicin würde die DMNT-Biosynthese durch einen erhöhten Export plastidären IPPs zusätzlich unterstützen. Leider liegen für die verbleibende DMNT-Emission nach Blockade nur

eines Weges noch keine $\delta^{13}\text{C}$ -Wert vor, um eine abschließende Aussage über die Gültigkeit dieser These zu treffen.

3.7.2 Versuche zur Aufreinigung der aktiven Komponente des Cellulasengemisches Cellulysin

Neben Alamethicin entstammt auch der Elicitor Cellulysin dem Pilz *T. viride*. Es handelt sich dabei um eine grob gereinigte Mischung verschiedener Cellulasen und Xylanasen, deren elicitierende Wirkung von Dr. Jörn Piel am System des induzierten Duftes der Limabohne entdeckt wurde.^[64] Die aktive Komponente von Cellulysin konnte bisher aber nicht isoliert werden. Bei Auftrennung des Gemisches durch Größenausschluß- (SE, Supedex 200), Anionenaustausch- (AEX, Resource Q) und hydrophober Interaktions-Chromatographie (HIC, Resource ISO) konnten zwar aktive Fraktionen erhalten werden, diese enthielten aber noch mehrere Proteine. Kombinationen der genannten Methoden führten entweder nicht zur gewünschten Trennung der enthaltenen Proteine oder aber zum Verlust der Aktivität.^[168] Darüberhinaus schwankte die elicitierende Eigenschaft des Ausgangsmaterials stark in Abhängigkeit von der verwendeten Cellulysincharge und den verwendeten Bohnen. Zum einen könnte dieses Problem auf einen schwankenden Gehalt des elicitierenden Proteins zurückzuführen sein, zum anderen könnte es sein, daß sich Begleitproteine störend auf den elicitierenden Prozeß auswirken. Beide möglichen Ursachen könnten durch Aufreinigung des Cellulysins behoben werden.

Ein Problem in den von Jörn Piel durchgeführten Versuchen zur Kombination unterschiedlicher chromatographischer Schritte bestand darin, die Proteine der erhaltenen aktiven Fraktion ohne Aktivitätsverlust in den Injektionspuffer des nächsten chromatographischen Schrittes zu überführen. Eine schnelle und bequeme Methoden für solche Pufferwechsel bietet die Ultrafiltration. Hier trat allerdings das Problem auf, daß die Membranen der verwendeten Filter aus modifizierten Polysacchariden bestanden, die schnell von den im Cellulysin enthaltenen hydrolytischen Enzymen zerstört wurden. In einem ersten Schritt sollte daher nach einer besseren Methode zum Wechsel des Chromatographiepuffers gesucht werden. Gelöst werden konnte das Problem durch Verwendung von Membranen auf Polyethersulfon-Basis (Vivascience, Vivaspin), die von den im Cellulysin enthaltenen Enzymen nicht angegriffen wurden und die Aktivität vollständig zurückhielten. Da der Proteingehalt des Ausgangsmaterials nur 10-12% betrug,

bot sich gleichzeitig an, durch Verwendung dieser Ultrafilter vor der ersten chromatographischen Trennung niedermolekulare Bestandteile des Cellulysins abzutrennen und somit den Proteingehalt zu erhöhen. Durch Testen verschiedener Ausschlußgrößen (5, 30, 100 kDa) und Kontrolle der Trennung über SDS-PAGE ergab sich, daß bei Verwendung des 30 kDa-Filter nicht nur niedermolekulare Komponenten, sondern auch bereits kleinere Begleitproteine (zwischen 10 und 20 kDa) abgetrennt werden konnten. Hierbei blieb die Aktivität vollständig erhalten.

Als nächstes sollten die bereits erprobten chromatographischen Reinigungsschritte, in deren Verlauf die Aktivität nicht verloren gegangen war, miteinander kombiniert werden. Da die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) von den ausgewählten Methoden das größte Trennungsvermögen zeigte, wurde diese Methode als erster Reinigungsschritt ausgewählt.

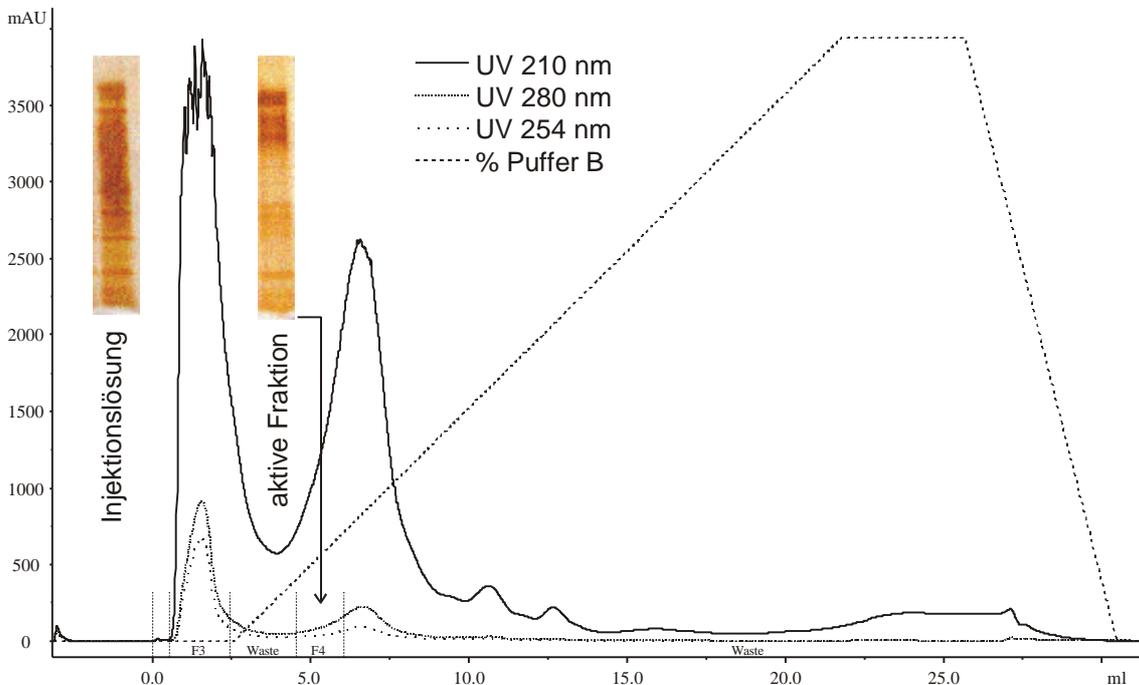


Abb. 60: HIC-Lauf nach Filtration von Cellulysin mit 30 kDa cut-off-Filter, sowie die SDS-Page-Banden der Injektionslösung und der aktiven Fraktion. Bedingungen: Resource ISO; 50 mM Tris; pH 7,3; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow$ 50 mM Tris; pH 7,3; 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Im Verlauf einer HIC-Trennung binden Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkung an das hydrophobe Säulenmaterial, indem sie zu Beginn der Trennung durch eine hohe Salzkonzentration des Laufpuffer ausgesalzt werden. Durch kontinuierliche Abnahme des Salzgehaltes können die Proteine dann nacheinander von der Säule gelöst werden. Das aktive Protein eluierte bei einem Salzgehalt von über 90% der Ausgangskonzentration (F4 in Abb. 60). Für die weitere Aufarbeitung mußte daher zunächst der

Puffer entsalzt werden. Dies geschah wieder mittels Ultrafilter (Vivaspin 5 kDa). Da die Aktivität der Fraktion trotz des hohen Salzgehaltes des Puffers auch über längere Zeit erhalten blieb, konnte dieser Schritt zusätzlich genutzt werden, um die Fraktionen mehrerer Läufe zu vereinen und aufzukonzentrieren.

Überraschend war, daß der Durchlauf der ungebundenen Verbindungen eine Komponente enthielt, die ein schwaches Alamethicin-analoges Duftmuster erzeugte. Da Cellulysin wie Alamethicin aus *T. viride* gewonnen wird und nur eine grob gereinigte Komponente darstellt, lag natürlich der Verdacht nahe, daß das beobachtete Alamethicin-Signal durch Verunreinigungen des Peptaibols verursacht wird. Mit einem Molekulargewicht von ca 2 kDa sollte Alamethicin aber beim ersten Schritt der Reinigung, der Filtration über die 30 kDa-Ultrafilter zumindest teilweise in den Durchlauf übergehen. In diesem konnte aber keine Aktivität gefunden werden. Eine Elicitierung der Bohnen durch den hohen Salzgehalt des HIC-Durchlaufes konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da durch den Hochsalzpuffer selbst keine Duftproduktion ausgelöst wurde. Somit scheint in *T. viride* neben der aufzureinigenden Komponente und Alamethicin ein weiterer elicitierender Bestandteil zu existieren, der zwar ähnlich wie Alamethicin wirken, aber höher molekularen Charakter besitzen muß.

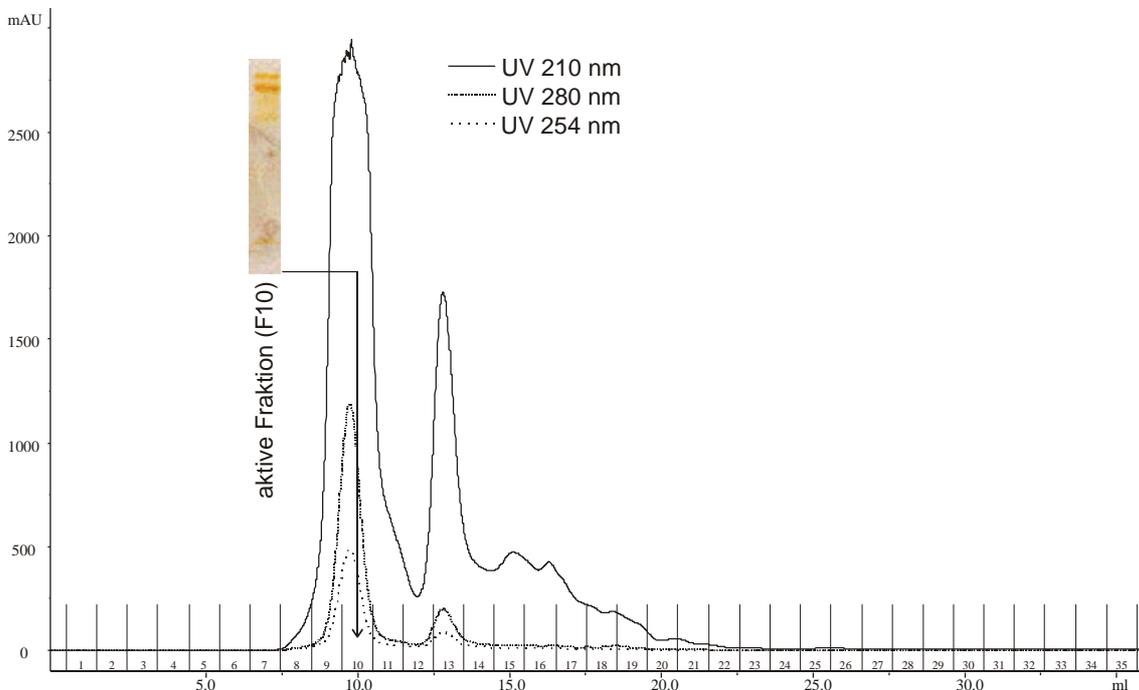


Abb. 61: Größenausschlußchromatographie der aktiven Fraktion des HIC-Laufes. Bedingungen: Superdex 75; 20 mM Tris; pH 0,8; 50 mM NaCl.

Zur weiteren Aufreinigung der JA-responsiven Komponente wurde der aktive Bereich der HIC-Trennung einer Größenausschlußchromatographie unterzogen. Hierbei konnte sowohl die Aktivität beibehalten werden, als auch weitere Begleitproteine abgetrennt werden. Die aktive Fraktion machte dabei den größten Anteil der aufgetragenen Proteinmenge aus und bestand laut SDS-PAGE noch aus ca 10 Proteinen.

Diese sollten durch Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt. Hierbei konnte zwar eine Fraktion erhalten werden, die nahezu ausschließlich das vermutete aktive Protein enthielt. Als problematisch erwies sich aber, die Aktivität der Fraktion zu reproduzieren. Dieses Problem trat auch auf, wenn Cellulysin ohne vorherige Reinigungsschritte über Anionenaustausch aufgetrennt wurde. Da durch Ionentauscher metallische Cofaktoren aus Enzymen gewaschen werden können, wurden dem Elutionspuffer divalente Ionen (CaCl_2 , MgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, je 1 mM) beigelegt. Aber auch diese Maßnahme führte zu keiner reproduzierbaren Aktivität. Unter den hier gewählten Bedingungen scheint die Anionenaustauscher-Chromatographie daher kein geeignetes Mittel, um den gesuchten Elicitor gereinigt und aktiv aus Cellulysin zu isolieren.

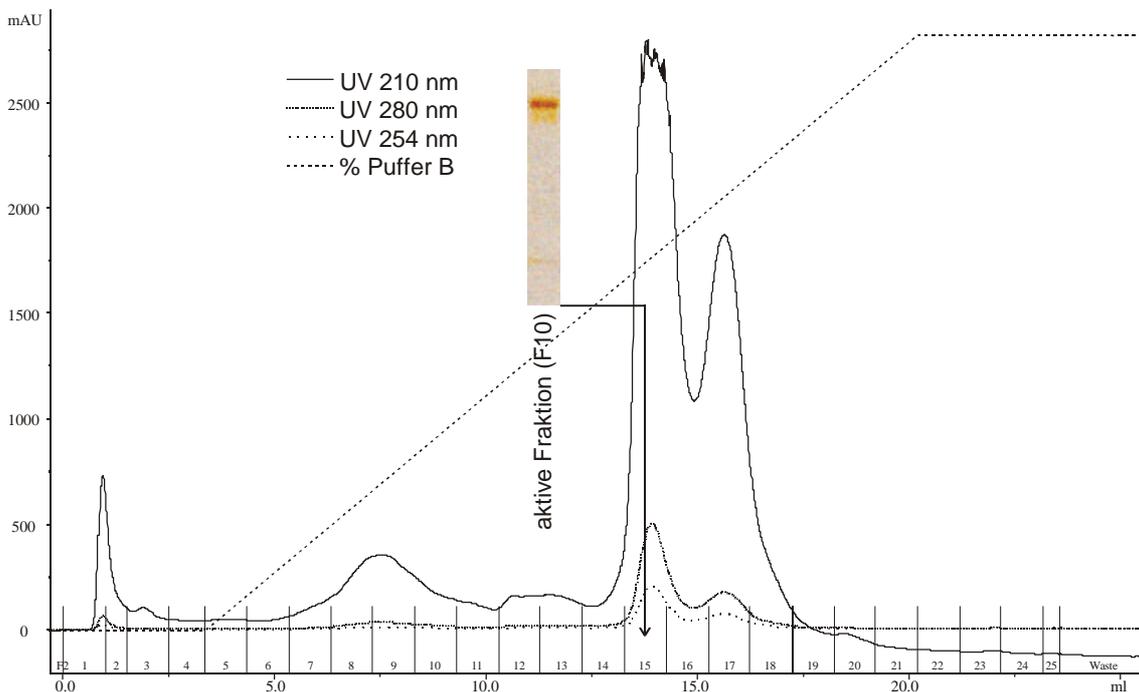


Abb. 62: Anionenaustauscher-Lauf der aktiven Fraktion der Größenausschlußchromatographie. Bedingungen: Resource Q; 20 mM Tris; pH 8,0; 50 mM NaCl \rightarrow 20 mM Tris; pH8,0; 0,5 M NaCl.

Aus zeitlichen Gründen wurde davon abgesehen, weitere Reinigungsschritte zu untersuchen. Da aber die Aufreinigung bis einschließlich der Größenausschlußchromatographie Material lieferte, das sehr reproduzierbar Duft erzeugte, wurden diese Reinigungs-

schritte zu einem Protokoll erweitert, mit dem auf semipräparativem Weg größere Mengen des angereinigten Elicitors erhalten werden können. Des Weiteren wurden die teilaktiven Fraktionen der Austauschläufe benutzt, um das Molekulargewicht des mutmaßlichen, elicitierenden Proteins zu bestimmen. Hierbei ergab sich eine Masse von 57060 Da.

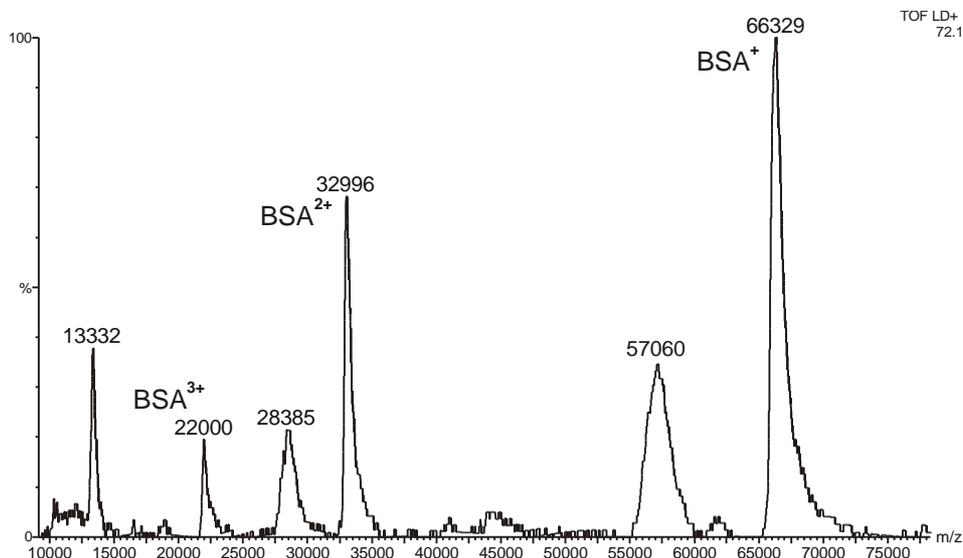


Abb. 63: MALDI-TOF-Spektrum der teilaktiven Fraktion des Anionenaustauscherlaufes. Zur Massenkalibrierung ist der Fraktion BSA zugemischt.

3.7.3 Einfluß pflanzlicher Duftstoffe auf den Infektionsvorgang der Bohne *Vicia faba* durch den Bohnenrost *Uromyces fabae*

Die Vorgänge bei der Infektion einer Pflanze durch ein Phytopathogen sind sehr komplex und vielfältig. Während Viren und Bakterien für die Besiedlung einer Pflanze auf natürliche Öffnungen (Stomata) oder Verwundungen angewiesen sind und intakte Pflanzenoberflächen nicht überwinden können, sind Pilze in der Lage, diese durch hydrolytische oder mechanische Vorgänge zu durchdringen. Des Weiteren können sie auch aktiv durch vorhandene Öffnungen in die Pflanze hineinwachsen. So entwickelt der Bohnenrost *Uromyces fabae* beim Eindringen in seine Wirtspflanze, der Ackerbohne *Vicia faba*, komplexe Infektionsstrukturen aus (Abb. 64).^{[169], [170]}

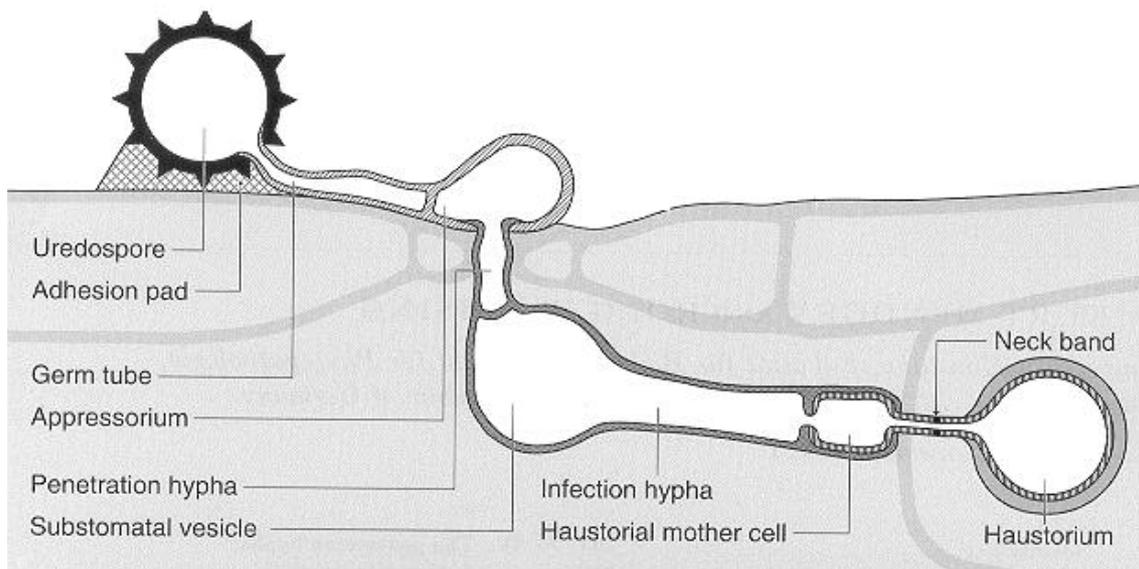


Abb. 64: Eindringen von *Uromyces fabae* in ein Blatt der Ackerbohne (aus ^{[169], [170]}).

Zunächst bilden die auf der Blattoberfläche anhaftenden Sporen einen Keimschlauch, der in der Lage ist, topographische Signale der Blattoberfläche wahrzunehmen. Ist dieser Keimschlauch über die Kante einer Spaltöffnung gewachsen, so kommt es zur Ausbildung eines Appressoriums, aus dem eine Penetrationshyphe hervorgeht, die die Spaltöffnung von außen nach innen durchwächst. Im Interzellularraum entsteht dann ein substomatäres Vesikel, welches in eine Infektionshyphe übergeht. Bei Kontakt mit einer Mesophyllzelle der Wirtspflanze bildet diese Hyphe eine Haustorienmutterzelle aus, die in der Lage ist, Mesophyllzellen zu durchdringen und im Inneren ein Haustorium auszubilden. Neben mechanischen Voraussetzungen, wie dem Vorfinden einer Spaltöffnung, spielen für den Ablauf dieses Infektionsvorgangs auch chemische Signale eine Rolle. So beobachtet man parallel zur Ausbildung der Haustorienmutterzelle einen Anstieg des Enzyms Polygalacturonatlyase, die die Mutterzelle zur Auflösung des Pektinanteils der Zellwand der pflanzlichen Wirtszelle benötigt. Dieser Anstieg ist aber substratinduziert und erfolgt nur in Gegenwart hochpolymeren Pektins. Des Weiteren scheinen auch leichtflüchtige Verbindungen der Ackerbohne eine Rolle zu spielen. Versucht man, artifiziell, die Infektionsstrukturen des Pilzes auf Polyethylenmembranen zu erzeugen, so kann der Infektionsvorgang bis zur Entwicklung der Haustorienmutterzelle simuliert werden. Die anschließende Ausbildung zum Haustorium erfolgt aber nur, wenn in den Gasraum der Versuchsanordnung Bohnenduft geleitet wird. In Zusammenarbeit mit Prof. K. Mendgen, Universität Konstanz, sollten Substanzen, die

für die Ausbildung der Haustorien verantwortlich sind, identifiziert werden. Hierzu wurde der Headspace von Bohnen, die mit *U. fabae* inokuliert worden waren und nicht inokulierte Bohnen per closed loop stripping und GC-MS untersucht.

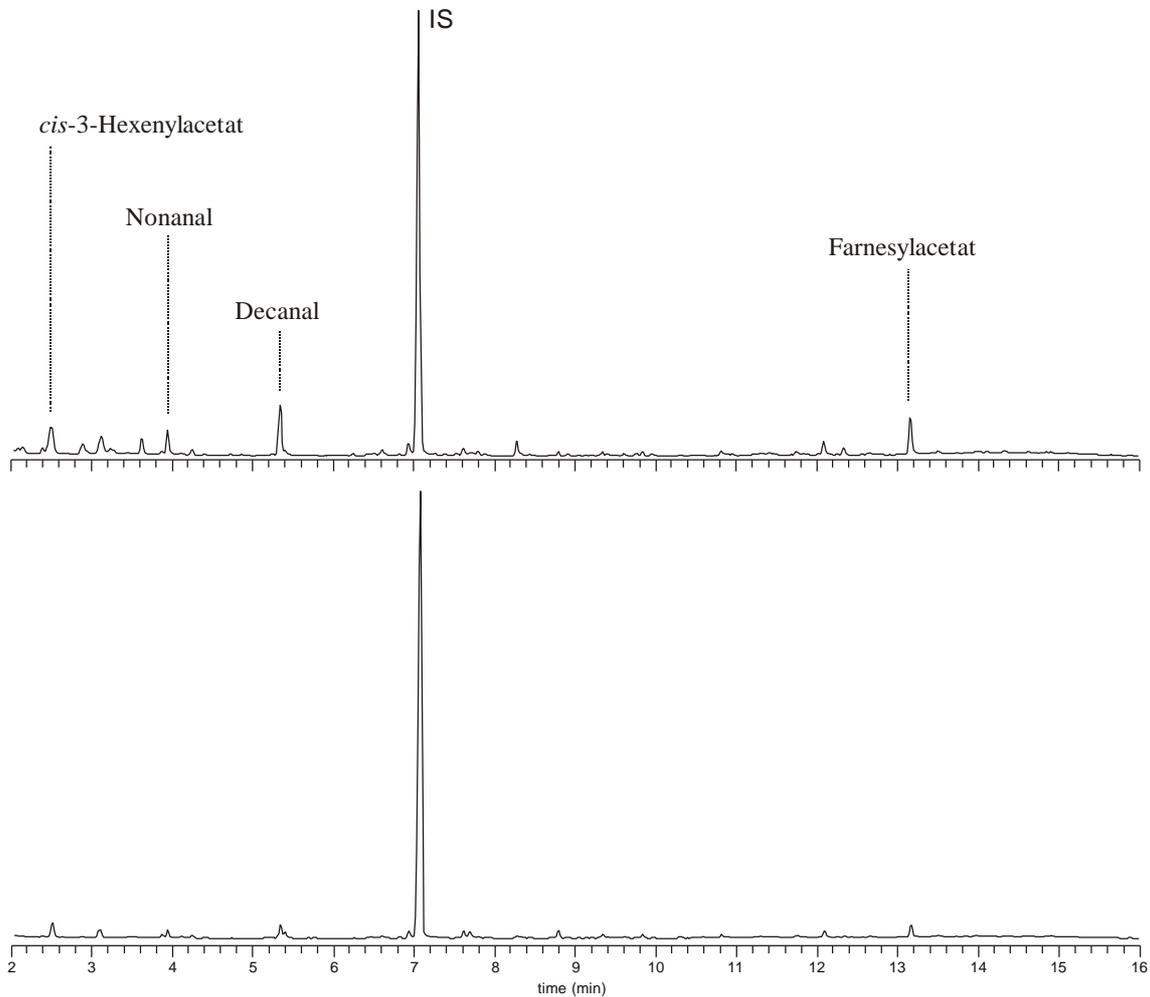


Abb. 65: Duftbouquet von *V. faba* nach Inokulation mit *U. fabae* (oben) und ohne Inokulation (unten).

Durch die Pilzinfektion wird hauptsächlich die Emission von Fettsäureabbauprodukten (*cis*-3-Hexenylacetat, Nonanal, Decanal) erhöht, mit Farnesylacetat findet sich aber auch eine Verbindung terpenoiden Ursprungs. Die drei Fettsäureabbauprodukte werden ebenfalls im verstärkten Maße emittiert, wenn die Bohne mechanisch verletzt wird.

Im Arbeitskreis Mendgen wurde nun der Einfluß dieser Substanzen auf die Ausbildung der Haustoriumszelle untersucht, indem die Substanzen auf Filterpapier aufgebracht wurden und dieses in den Gasraum über den Kunststoffmembranen gehängt wurden.

Verbindung	Haustorienausbildung (%)
Negativ-Kontrolle	<0,1
Positiv-Kontrolle (Bohnenduft)	1,0
Decanal	0,9
Nonanal	0,5
<i>cis</i> -3-Hexenylacetat	0,9
Farnesylacetat	0,1
Farnesylmethylether	0,2

Tab. 4: Einfluß der im Duft der Ackerbohne *V. faba* enthaltenen leichtflüchtigen Verbindungen auf die Ausbildung von Haustorien des Bohnenrostes *U. fabae*. Die aufgelisteten Verbindungen besaßen in der Gasphase, unter Voraussetzung vollständigen Verdampfens, eine Konzentration von 22 ppb.

Die Ausbildung der Haustorien wurde vor allen Dingen durch die Fettsäureabbauprodukte unterstützt. Farnesylacetat und der zum Vergleich ebenfalls getestete Farnesylmethylether zeigten nur einen geringen Effekt. In einer Mischung mit Decanal (Verhältnis 1:1) besaß Farnesylacetat sogar eine antagonistische Wirkung. Hier ging die Haustorienbildung wieder auf 0,1% zurück. Die Verbindung könnte also für die Pflanze eine schützende Wirkung besitzen. Einleuchtend ist auch die, für den Rost, unterstützende Wirkung der Fettsäureabbauprodukte. Die Synthese dieser Verbindungen ist eine weitverbreitete Antwort auf Verletzungen pflanzlicher Zellen, und im Verlauf des Infektionsvorgangs wäre es eine der ersten Antworten der benachbarten Zellen direkt am Ort der Infektion. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Entwicklung einer Ackerbohnen-Mutante bei der Gene für Lipoxigenasen ausgeschaltet sind. Diese Mutanten wären dann nicht mehr in der Lage, Hexenylacetat oder Aldehyde zu produzieren. Wenn *U. fabae* Fettsäureabbauprodukte zum Erkennen seiner Wirtspflanze benötigt, sollten diese Mutanten vor einer Besiedelung durch den Rost geschützt sein.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die unterschiedliche Beteiligung des Mevalonat-Weges und des vor vor einigen Jahren entdeckten Methyl-D-erythrophosphat-Weges an der Biosynthese von Mono- und Sesquiterpenen genauer zu untersuchen.

Einen Schwerpunkt bildeten dabei die im induzierten Duftbouquet der Limabohne *P. lunatus* enthaltenen Terpene. Hier konnte die bereits beobachtete, aber strittige Beteiligung des MEP-Weges an der Sesquiterpenbiosynthese auf drei voneinander unabhängigen Wegen bestätigt werden.

Durch Einbauexperimente mit deuteriummarkierten Vorstufen beider Wege wurde gezeigt, daß durch das alleinige Angebot von Deoxy-D-xylulose zwar eine Überbetonung der Beteiligung des MEP-Weges an der Sesquiterpenbiosynthese zu beobachten ist, daß grundsätzlich eine Beteiligung aber nicht ausgeschlossen werden kann. Während sich bei Einzelapplikationen von d₂-DOX der Markierungsgrad des Sesquiterpenabkömmlings DMNT bei Erhöhung der DOX-Konzentration kontinuierlich auf bis zu 70% steigerte, stagnierte dieser Wert bei gleichzeitigem Angebot von d₅-MVA ab einer Konzentration von 1 mg/ml bei ca 20%.

Für die Monoterpene Ocimen und Linalool zeigte sich umgekehrt keine signifikante Beteiligung des MVA-Wegs an deren Biosynthese.

Die im Rahmen dieser Versuche beobachteten Isotopomere, die auf den gleichzeitigen Einbau von d₂-DOX und d₅-MVA zurückzuführen sind, enthüllen, daß die Wechselwirkung zwischen MEP-Weg und Sesquiterpenbiosynthese auf dem Export von plastidärem IPP ins Cytosol beruhen muß.

Vorraussetzung für die Durchführung der Einbauexperimente war die Synthese ausreichender Menge der deuterierten Vorstufen. Hierzu wurde die Darstellung der Deoxy-D-xylulose nach einer Vorschrift von Piel optimiert, indem zwei Syntheschritte zu einer Eintopfreaktion zusammengefaßt wurden.

Die Beteiligung des MEP-Weges an der Sesquiterpenbiosynthese wurde zusätzlich durch Inhibitorexperimente untermauert. Die Synthese des Antibiotikums Fosmidomycin, das im Zeitraum dieser Arbeit als Inhibitor des MEP-Weges in der Literatur be-

schrieben wurde, eröffnete die Möglichkeit den MEP-Weg spezifisch zu blockieren. Durch Applikation dieser Substanz wurde die Biosynthese und die Emission der Monoterpene nahezu vollständig unterdrückt, während die Emission von DMNT nur zu einem geringen Teil beeinträchtigt wurde. Durch die spezifische Blockade des MVA-Weges mit Cerivastatin konnte die DMNT-Emission allerdings auch nicht vollständig unterdrückt werden. Es verblieb eine Restemission von 30%. Erst die Blockade beider Wege durch die gleichzeitige Anwendung von Fosmidomycin und Cerivastatin führte zum Ausbleiben der DMNT-Biosynthese. Dies unterstreicht, daß die, nach Blockade des MVA-Weges, verbliebene Restemission des DMNT auf einen Export von plastidären IPP des MEP-Weges ins Cytosol zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Inhibitorversuche stehen damit im vollem Einklang mit den Ergebnissen der Einbauversuche.

Bei der Suche nach Inhibitoren des MEP-Weges wurden darüberhinaus Herbizide des "Bleaching Agent"-Typs auf ihre inhibierenden Eigenschaften für Enzyme dieser Biosyntheseroute getestet. Von den geprüften Verbindung zeigte Clomazon Veränderungen in der Zusammensetzung des Duftbouquets, wie sie auch bei Anwendung von Fosmidomycin beobachtet wurden. Die aktive Komponente wird dabei vermutlich erst in der Pflanze durch Metabolisierung freigesetzt. Die zukünftige Suche und Charakterisierung dieser Komponente könnte neue Leitstrukturen für Inhibitoren des MEP-Weges offenlegen.

Abschließend konnten die im Duftbouquet enthaltenen Terpene den beiden Stoffwechselwegen aufgrund von Unterschieden im natürlichen $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnis zugeordnet werden. Das Sesquiterpen DMNT besaß hier in Übereinstimmung mit theoretischen Erwartungen eine deutliche stärkere ^{13}C -Anreicherung als das Monoterpene Ocimen. Diese Zuordnung wurde durch selektive Blockade beider Wege weiter unterstützt. So führte die Applikation von Cerivastatin zu keiner Veränderung des Isotopenverhältnisses von Ocimen, während sich das Isotopenverhältnis von DMNT dem Wert von Ocimen annäherte. Im Gegensatz hierzu wies DMNT nach Anwendung von Fosmidomycin eine geringfügig erhöhte ^{13}C -Anreicherung auf. Diese Veränderungen stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Einbau- und Inhibitorexperimente und sie bekräftigen nochmals die dynamische Nutzung des MEP-Weges im Verlauf der Biosynthese von Sesquiterpenen in der Limabohne. Sie zeigen weiterhin, daß, unter natürlichen physiologischen Bedingungen, DMNT überwiegend über den

Mevalonat-Weg gebildet wird, aber auch ein geringer Anteil des MEP-Weges erkennbar ist.

Hier liegt die eigentliche Stärke der Bestimmung von natürlichen Isotopenverhältnissen mit Hilfe der Stabilisotopen-Verhältnismassenspektroskopie. Sie erlaubt die Zuordnung von Substanzen zu ihrer biochemischen Herkunft, ohne das biologische System physiologisch zu beeinflussen. Die Methode könnte zu einem neuartigen, wertvollem Werkzeug zur Beantwortung physiologischer Fragen werden. Die hier erstmalig durchgeführte Zuordnung sollte aber an weiteren biologischen Systemen überprüft werden, so zum Beispiel am induzierten Duft des Mais. Das Duftbouquet dieser Pflanze beinhaltet Sesquiterpene, für die man analog zum System der Limabohne ebenfalls eine Beteiligung des MEP-Weges erwarten könnte. Da Mais zu den C₄-Pflanzen zählt, sollten sich die erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwar deutlich von den Werten der Limabohne (C₃-Pflanze) unterscheiden, die Unterschiede zwischen Mono- und Sesquiterpenen und die Verschiebungen bei Anwendung von Inhibitoren sollten aber ähnlich sein.

Initiiert durch die Analyse des Markierungsmusters nach Einbau von d₂-DOX und d₅-MVA, konnten die, im Duftbouquet der Limabohne bisher nur durch ihre Summenformel charakterisierten, Terpene C₁₀H₁₄ und C₁₀H₁₆O als *all-trans*-2,6-Dimethyloctatetraen und als 2,6-Dimethylocta-3,5,7-trien-2-ol identifiziert werden. Die geringe Einbaurate der Deoxy-D-Xylulose in beide Verbindungen und die unvollständige Inhibierung durch Fosmidomycin könnten Indizien dafür sein, daß beide Verbindungen teilweise aus glykosidischen Speicherformen freigesetzt werden. Die Suche nach einem Glykosid erscheint daher vielversprechend. Interessant dürfte weiterhin sein, ob beide Substanzen eine ökologische Bedeutung im Rahmen der tritrophischen Interaktion zwischen Limabohne, Fraßfeinden der Limabohne und parasitären Insekten besitzen.

Neben der Terpenbiosynthese im Rahmen der induzierten Duftproduktion wurde auch die Beteiligung von MVA- und MEP-Weg an der Biosynthese der Sesquiterpenabkömmlinge Geosmin und Dehydrogeosmin untersucht. Das Lebermoos *Fossombrossia pusilla* nutzte hierbei die angebotenen markierten Vorstufen entsprechend der klassisch zu erwartenden Aufteilung. So wurde d₅-MVA in Geosmin und weitere Sesquiterpene eingebaut, während ein ebenfalls emittiertes Monoterpen Einbau von Deoxy-Dylulose

zeigte. Die beobachteten Einbauraten waren in allen Fällen klein und betrug maximal 10%.

Durch das Bakterium *Streptomyces maritimus* wurde dagegen ausschließlich Deoxy-D-xylose verwertet. Alle Terpene wiesen dabei Einbauraten von nahezu 100% auf. Untersuchungen anderer Autoren deuten aber daraufhin, daß diese Ressourcennutzung abhängig ist vom Entwicklungsstadium der Bakterienkultur und den äußeren Bedingungen. Hier könnten Untersuchungen der Regulation beider Wege auf genetischer Ebene weitere Einblicke in die mögliche Nutzung der Wege in Streptomyceten ergeben.

Bei der Biosynthese des Dehydrogeosmins in Blüten verschiedener Kakteenarten wurde sowohl die Nutzung beider Wege, als auch eine Bevorzugung sowohl des MVA-Weges, als auch des MEP-Weges beobachtet. Auch wenn die Applikation von Vorstufen zu einer Beeinflussung der Physiologie führt, zeigt dieser Befund, vor dem Hintergrund der umfangreichen Untersuchungen an der Limabohne, daß in höheren Pflanzen die Nutzung beider Wege ein Phänomen ist, daß nicht nur auf die induzierte Terpenbiosynthese beschränkt ist, sondern auch bei der Produktion von Blüteninhaltsstoffen auftreten kann.

Einblicke in die Physiologie der Isopren-Emission einiger Pflanzen ermöglichte die Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Kühnemann am Institut für Angewandte Physik der Universität Bonn. Hier wurde die Entwicklung eines photoakustischen Spektrometers für den quantitativen, isotopenspezifischen Nachweis von Isopren und d_2 -Isopren unterstützt, der es ermöglicht, kontinuierlich den Einbau von d_2 -DOX in ermitteltes Isopren zu überwachen. In ersten Einbauexperimenten mit Blättern von *E. globulus* konnte auf diese Weise gezeigt werden, daß die plötzliche Abnahme der Isopren-Emission bei höheren Temperaturen auf ein Zusammenbruch der Photosynthese und der daraus resultierenden fehlenden Bereitstellung der Vorstufen des MEP-Weges zurückzuführen ist.

5 Experimenteller Teil

5.1 Synthesen

5.1.1 Geräte und Chemikalien

NMR-Spektrometer	Bruker Avance DRX 500
Massenspektrometer	Micromass MassSpec 2
GC-MS	Finnigan MAT, Magnum
LC-MS	Finnigan MAT, LCQ
IR-Spektrometer	Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer
Polarimeter	Jasco P 1030
Schmelzpunkte	Büchi B540
Analytische DC	Merck Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄
Säulenchromatographie	ICN Silica 32 –60, 60 Å

Lösungsmittel und Laufmittel für die Chromatographie wurden vor dem Gebrauch destilliert. Wurden absolute Lösungsmittel verwendet, so ist das Trocknungsverfahren in den Versuchsvorschriften aufgeführt. Die Herkunft der im Handel bezogenen Reagentien wird ebenfalls dort angegeben. Alle Reaktionen wurden unter Argon durchgeführt.

5.1.2 [5,5-²H₂]-Deoxy-D-xylulose

2,3-O-Isopropyliden-D-weinsäuremonomethylester 43

Zu einer Mischung von 10 g 2,3-O-Isopropylidenweinsäuredimethylester **42** (45,6 mmol, Fluka) in 100 ml 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer¹⁾ werden 1,5 ml suspendierte Schweineleberesterase (suspendiert in 3,2 M (NH₄)₂SO₄, 130 U / mg Protein, Fluka) gegeben. Unter Rühren bei Raumtemperatur wird der pH-Wert durch Zutropfen 0,2 molarer Natronlauge bei pH 8 gehalten, bis eine äquimolare Menge Natronlauge verbraucht ist (228 ml). Anschließend wird zweimal mit je 60 ml Diethylether nicht umgesetztes Edukt ausgeschüttelt. Nachdem man den pH-Wert der wässrigen Phase mit 2 N Salzsäure auf 3,5 eingestellt hat, wird diese mit

Natriumchlorid gesättigt und mit Essigester extrahiert (8×40 ml), wobei nach jeder Extraktion der pH-Wert erneut auf 3,5 eingestellt werden muß. Nachdem man die vereinigten Essigesterphasen über Na_2SO_4 getrocknet hat und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt hat, erhält man das Produkt als fahles, zähes Öl. Falls eine Aufreinigung notwendig ist, kann dies über Kiesegel erfolgen (Petrolether / Essigester / Ameisensäure, 30:70:1). Zum Entfernen der Essigsäure wird das Eluat mit wenig ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und die organische Phase am Rotationsverdampfer vom Laufmittel befreit.

Ausbeute: 7,5 g (80 %)

¹Phosphatpuffer: 3,7 ml einer Lösung von 1,38 g NaH_2PO_4 in 100 ml Aqua Dest. und 96,3 ml einer Lösung von 1,78 g Na_2HPO_4 in 100 ml Aqua Dest. werden vermischt und mit Phosphorsäure oder Natronlauge auf pH 8 eingestellt.

¹H-NMR (CDCl_3) δ : 1,50 (s, 3H, Me), 1,52 (s, 3H, Me), 3,84 (s, 3H, OMe), 4,82 (d, 1H, C3), 4,88 (d, 1H, C2)

¹³C-NMR (CDCl_3) δ : 26,30 (C-Me), 26,33 (C-Me), 53,02 (C-3), 56,53 (C-2), 114,33 (C-Acetal), 169,97 (C-1), 174,04 (C-4)

MS 189 (M^+ -15, 100), 161 (2), 141(4), 129 (21), 119 (46), 83 (9), 73(9), 59(15), 43(30)

IR: 2983, 2885, 2211, 2106, 1745, 1721, 1461, 1455, 1385, 1191, 1092, 970 cm^{-1}

Lithium [4,4²H₂]-2,3-O-Isopropyliden-D-threonat 44

Zu einer eisgekühlten Lösung von 2,04 g (10 mmol) 2,3-O-Isopropyliden-D-weinsäuremonomethylester **43** in 75 ml THF (über LiAlH_4 getrocknet) werden über einen Zeitraum von 20 min. 35 ml einer 1 molaren Lösung von Lithiumtriethylbordeuterid in THF (Superdeutrid[®], Aldrich) getropft. Man rührt eine weitere Stunde bei 0°C und tropft anschließend Wasser zu, bis die Wasserstoffentwicklung aufhört. Nach Zugabe

von weiteren 100 ml Wasser entfernt man das THF am Rotationsverdampfer und säuert das verbleibende Wasser langsam mit 2N Salzsäure auf pH 3,5 an (Vorsicht, bei zu schneller Zugabe erfolgt Selbstzündung des entweichenden BEt_3). Die Mischung wird 30 min gerührt und dann mit 0,2 N LiOH neutralisiert. Nachdem man das Wasser am Rotaionsverdampfer entfernt hat, nimmt man den öligen Rückstand mit 20 ml Methanol wieder auf und engt die Lösung erneut ein. Den farblosen, hochviskosen Rückstand trocknet man mehrere Stunden bei 60°C im Hochvakuum, bis man einen weißen Feststoff erhalten hat. Dieses stark hygroskopische Rohprodukt wird ohne weitere Aufarbeitung für die nächsten Syntheseschritte verwendet.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 1,28 (s, 3H, Me), 1,30 (s, 3H, Me), 4,01(d, 1H, C3), 4,06 (d, 1H, C2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ : 25,9 (C-Me), 26,2 (C-Me), 30,4 (C-4), 63,4 (C-3), 66,7 (C-2), 112,2 (C-Acetal), 178,0 (C-1)

[5,5- $^2\text{H}_2$]-2,3-*O*-Isopropyliden-1-deoxy-*D*-xylulose **45**

Zu einer eisgekühlten, gut gerührten Lösung von 1,02 g (5 mmol) 2,3-*O*-Isopropyliden-*D*-weinsäuremonomethylester **43** in 30 ml THF (über LiAlH_4 getrocknet) werden über einen Zeitraum von 20 min. 16 ml einer 1 molaren Lösung von Lithiumtriethylbordeuterid in THF (Superdeutrid[®], Aldrich) getropft. Man rührt eine weitere Stunde bei 0°C und verdünnt dann die Lösung mit 150 ml eisgekühltem, trockenem THF. Nach 5 Minuten fügt man 15 ml (24 mmol) einer 5% igen Lösung von Methyllithium in Diethylether (Merck) zu und rührt weitere 2 Stunden bei 0°C. Anschließend zerstört man überschüssiges Methyllithium, indem man 20 min. kräftig Kohlendioxid durch die Mischung leitet. Zu der entstandenen dicken, gelblich weißen Suspension tropft man vorsichtig Wasser, bis die Gasentwicklung aufhört. Diese Mischung gibt man dann in 500 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung und entfernt am Rotationsverdampfer das THF. Nun säuert man vorsichtig mit 2N Salzsäure auf pH 3,5 (Vorsicht, bei zu schneller Zugabe erfolgt Selbstzündung des entweichenden BEt_3) und läßt die Lösung 30 min bei Raumtemperatur rühren. Danach neutralisiert man mit 2 N Natronlauge, sättigt mit Natriumchlorid und extrahiert das Produkt mit Essigester (3 × 200 ml). Nach Trocknen

über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt auf Kieselgel gereinigt (Pentan / Essigester 1 : 1). Man erhält ein farbloses Öl.

Ausbeute: 596 mg, 68 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,37 (s, 3H, Me), 1,39 (s, 3H, Me), 3,59 (s, 3H, C1), 4,10 (d, 1H, C4), 4,15 (d, 1H, C3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 26,3 (C-Me), 26,9 (C-Me), 30,5 (C-4), 78,1 (C-3), 81,6 (C-2), 110,6 (C-Acetal), 211,5 (C-1)

MS (70 eV) 161(M^+ -15, 10), 143(3), 133(48), 119(3), 115(41), 101(14), 99(27), 97(6), 85(33) 83(26), 59(100), 43(73)

IR (KBr) ν : 3435, 2981, 2882, 2210, 2104, 1713, 1459, 1382, 1089, 970 cm^{-1}

[5,5- $^2\text{H}_2$]-1-Deoxy-D-xylulose **41**

500 mg (2,8 mmol) [5,5- $^2\text{H}_2$]-2,3-*O*-Isopropyliden-1-xeoxy-D-xylulose **46** werden in einer Mischung aus 90 ml Acetonitril, 6 ml Aqua Dest. und 3 ml 2 N Salzsäure gelöst und bei Raumtemperatur 24 Stunden gerührt. Anschließend neutralisiert man die Lösung mit 0,2 N Natronlauge und engt am Rotationsverdampfer (Badtemperatur < 40°C) das Lösungsmittels auf 1/4 des Ausgangsvolumens ein. Nun stellt man den pH-Wert nochmals auf 7 ein und entfernt das Lösungsmittel vollständig. Nach Aufreinigung über Kieselgel (Essigester / Methanol 95:5) kristallisiert das zunächst erhaltene farblose Öl nach einiger Zeit in Form weißer Nadeln aus.

Ausbeute: 252 mg (66 %), Schmelzpunkt: 61°C

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 1,37, 1,41(Anomere), 2,23 (offenkettige Form) (s, Summe 3H, C1), 3,75 - 4,35 (m, Summe 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ : 28,2 (C-5), 64,7 (C-1), 74,0 (C-4) 79,7 (C-3), 216,7 (C-2)

MS (70eV)	118(1), 103(2), 93(16), 85(36), 75(21) 73(27), 63(23), 61(27), 57(100), 45(22)
IR (KBr)	v: 3415, 2979, 2858, 2224, 2114, 1718, 1458, 1405, 1112, 976 cm ⁻¹

5.1.3 [4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton

[2,2,4,4,4-²H₅]-3-Oxobutyraldehyd-dimethylacetal **49a**

5 ml (4,97g 37 mmol, Merck) 3-Oxobutyraldehyd-dimethylacetal **49** werden unter Argon in 30 ml d-Methylalkohol (Deuterierungsgrad >99.5%) gelöst und mit 0,5 ml Ethyldiisopropylamin versetzt. Man rührt über Nacht bei 50°C, entfernt dann am Rotationsverdampfer Lösungsmittel und Amin und wiederholt die Reaktion.

Nachdem man diese Reaktion das dritte Mal durchgeführt hat, wird das Produkt gesäult (Kieselgel; Petrolether, Essigester 70:30). Der Austausch mit anschließender Aufreinigung wird nun so oft wiederholt (meist 2 mal), bis im NMR der farblosen Flüssigkeit keine Signale der auszutauschenden Protonen mehr zu erkennen sind (> 97 % Deuterierungsgrad).

Ausbeute: 4,5 g (90 %)

¹H-NMR (D₂O) δ: 3,34 (s, 6H, OCH₃), 4,82 (s, 1H, C1)

MS (70 eV) 136(M⁺, 4), 122(5), 119(12), 106(87), 75(100), 62(5)

[3,3,3,4,4-²H₅]-3-Hydroxy-3-methyl-5,5-dimethoxyvalerylsäureethylester **50**

Eine Mischung aus 15 ml trockenem THF und 2,13 ml (0,017 mol) über Phosphor-pentoxid getrocknetem Essigester werden mit einer Stickstoff/Ethanol-Kältemischung auf -100°C abgekühlt. Die Temperatur wird dabei mit einem Innenthermometer überwacht. Danach werden über einen Zeitraum von 15 min 8,5 ml (0,017 mol) einer 2 M Lösung von Lithium-diisopropylamin (Fluka) in einer Mischung aus THF, Heptan

und Ethylbenzol zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 30 min. nachgerührt und dann auf -80°C erwärmt. Anschließend werden 1,75 ml (0,0138 mol) $[2,2,4,4,4\text{-}^2\text{H}_5]$ -3-Oxobutyraldehyd-dimethylacetal **49a** zugegeben. Nach 30 min Rühren gibt man bei gleicher Temperatur zunächst tropfenweise ges. Ammoniumchloridlösung zu und vervollständigt die Zugabe auf insgesamt 30 ml. Anschließend läßt man die teilweise erstarrte Mischung auf Raumtemperatur erwärmen. Hierbei bilden sich zwei klare Phasen aus. Die wässrige trennt man ab, sättigt mit NaCl und schüttelt dreimal mit je 50 ml Diethylether aus. Die Etherphasen werden mit der organischen Phase der Reaktionsmischung vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 2,8 g (100%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4,10 (q $J=7,12$, 3H, C1-Et), 4,56 (s, 1H, C1), 3,27 (s, 6H, OCH_3), 2,48 (m, 2H, C4), 1,21(t, $J=7,09$, 3H, C2-Et)

MS (70 eV) 175(M^+ , 33), 161(7), 134(25), 120(17), 106(17), 88(16), 86(18), 75(100), 59(67)

Barium $[3,3,3,4,4\text{-}^2\text{H}_5]$ -3-Hydroxy-3-methyl-5,5-dimethoxyvalerylat **51**

2,25 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ werden in einem 100 ml Kolben, der mit Septum und Druckausgleichsballon (Argon) versehen ist, in 35 ml entgastem Wasser bei 50°C gelöst. Nun fügt man 2 g (8,9 mmol) des Esteracetals **50** hinzu und rührt bei 50°C für 3 h. Danach entfernt man das Septum, gibt eine Spatelspitze Aktivkohle hinzu und läßt über eine Kanüle CO_2 durch die Mischung strömen, bis nach Filtration des Niederschlags keine weitere Trübung zu erkennen ist. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, der resultierende gelbliche Feststoff über Nacht in einem Exsikkator über P_2O_5 von Restwasser befreit und aus Ethanol zu einem weißen Feststoff umkristallisiert.

Ausbeute: 2,69 g (58%), Schmelzpunkt.: 227°C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 2,38 (m, 2H, C4), 3,39 (d $J=5,16$, 6H, OCH_3), 4,70 (s, 1H, C1)

[4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton 42

1,004 g (2 mmol) Barium [3,3,3,4,4-²H₅]-3-Hydroxy-3-methyl-5,5-dimethoxy-valerylat **51** werden in 3 ml Wasser gelöst und mit 2 N HCl auf pH 1,5 gebracht. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur wird die leicht gelbliche Lösung unter Eiskühlung mit 2 N NaOH neutralisiert und zu einer eisgekühlten Lösung von 100 mg Natriumborhydrid in 2 ml Wasser getropft. Man rührt 1 h bei Raumtemperatur. Hat sich die Lösung bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig entfärbt und geklärt, gibt man nochmals 50 mg Natriumborhydrid zu und rührt weitere 30 Minuten. Anschließend tropft man vorsichtig unter Eiskühlung 2 N HCl zu, bis die Gasentwicklung aufhört. Man säuert weiter auf pH 2 an und rührt 30 min bei 50°C. Nun schüttelt man einmal mit 10 ml Essigester aus, läßt die wässrige Phase weitere 5 min rühren und schüttelt nochmal mit Essigester aus. Diesen Vorgang wiederholt man noch ein weiteres mal. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, Diethylether, Ethylacetat 3:7).

Ausbeute: 490 mg (90 %)

¹H-NMR (D₂O) δ: 2,72 (m, 2H, C5), 4,55 (m, 2H, C2)

MS (70 eV) 136 (100), 118 (27), 106 (8), 89 (21), 87 (16), 75 (83), 61 (48)

5.1.4 Fosmidomycin**Diethyl-3-Brompropylphosphonat**

Eine Mischung aus 51 ml (0,5 Mol, Aldrich) Dibrompropan und 16 ml (95 mMol, Aldrich) Triethylphosphonat werden für 30 min bei 150 °C zum Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das überschüssige Dibrompropan am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige, klare Rückstand an Kieselgel mit reinem Essigester aufgereinigt (farblose Flüssigkeit).

Ausbeute: 24,0 g (97%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)	δ : 1,26 (s, 6H, C2-Et), 1,84 (m, 2H, C2), 2,09 (m, 2H, C-P), 3,41 (dt, 2H, C-Br), 4,03 (m, 4H, C1-Et)
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)	δ : 15,44 (d, $J=5,6$), 23,42 (d $^1J_{\text{C, P}}=142,1$), 24,97 (d, 3,5 Hz), 32,61 (d, $J=17,8$), 60,74 (d, $J=4,9$)
MS (70 eV)	259(44), 261(47), 179(100), 151(39), 123(83), 97(31), 81(30), 65(30)
IR (KBr)	ν : 2981, 2937, 2907, 2871, 1436, 1392, 1233, 1163, 1029, 962, 785 cm^{-1}

***N*-Benzyloxy-*p*-toluolsulfonamid**

Zu einer eisgekühlten Lösung von 8,3 g (50 mmol, Aldrich) *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid in 200 ml über Molsieb getrocknetem Pyridin wird über einen Zeitraum von einer Stunde eine Lösung von 9,5 g (50 mmol, Aldrich) *p*-Toluensulfonsäurechlorid in 20 ml Pyridin getropft.

Man rührt noch 2 h bei Raumtemperatur, filtriert das entstandene Pyridiniumhydrochlorid ab und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Der gelbliche, ölige Rückstand wird mit 200 ml Eiswasser überschichtet und über Nacht gerührt. Den so erhaltenen weiß-gelblichen Feststoff filtriert man ab und kristallisiert ihn mit Isooctan um, indem man die kurz unter den Siedepunkt abgekühlte klare Lösung vom nicht gelösten Öl abdekantiert und wieder erwärmt bis sich die Lösung wieder geklärt hat. Bei langsamen Abkühlen erhält man das Produkt in Form kleiner farbloser Nadeln.

Ausbeute : 12,3 g (92 %), Schmelzpunkt : 89 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD)	δ : 2,43 (s, 3H, Me_{Ar}), 4,92 (s, 2H, O- CH_2), 7,33 (m, 5H, $\text{H}_{\text{Ar}(\text{Bz})}$), 7,38 (d, $J=8,24$, 2H, $\text{H}_{\text{Ar}(\text{Tos})}$), 7,80 (d, $J=7,93$, 2H, $\text{H}_{\text{Ar}(\text{Tos})}$)
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)	δ : 22,1, 82,9, 129,0, 129,6, 129,7, 130,6, 133,1, 134,1 146,1

MS (70 eV)	277(12), 171(13), 167(10), 155(21), 139(12), 105(7), 91(100), 77(66), 65(69)
IR (KBr)	v: 3224, 3071, 3035, 2982, 2950, 2865, 2784, 2721, 1594, 1455, 1397, 1329, 1163, 1091, 1015, 880, 818, 723, 696, 557 cm ⁻¹

Diethyl-3-[*N*-Benzyloxy-*N*-tosylamino]-propylphosphonat

760 mg Natrium werden unter Kühlung in 80 ml Ethanol gelöst. Nun gibt man 9,15 g (33 mmol) *N*-Benzyloxy-*p*-toluolsulfonamid zu, rührt für 1 h bei 70°C und tropft anschließend 8,55 g (33 mmol) Diethyl-3-brompropylphosphonat zu. Diese Mischung erhitzt man für 6 Stunden zum Rückfluß.

Nach Abkühlen filtriert man den entstandenen Niederschlag ab, entfernt das Lösungsmittel des Filtrats am Rotationsverdampfer und nimmt den Rückstand mit 100 ml Essigester und 50 ml Wasser auf. Die organische Phase wäscht man noch zweimal mit je 50 ml Wasser und trocknet anschließend über Magnesiumsulfat. Nach entfernen des Lösungsmittels erhält man das Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Essigester/Ethanol 98:2) zunächst als farbloses Öl, das später zu farblosen Kristallen erstarrt.

Ausbeute: 10,3g (68%), Schmelzpunkt: 88°C

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 1,24 (t, 6H, C2-Et), 1,74 (m, 4H, C1,C2), 2,37 (s, 3H, Me_{Ar}), 3,25 (t, 2H, C3), 4,01 (m, 4H, C1-Et), 5,01 (s, 2H, O-CH₂), 7,32 (d, ²J_{C,P}=7,56, 2H, C_{Ar(Tos)}), 7,85 (m, 5H, C_{Ar(Bz)}), 7,69 (d, J=8,50, 2H, C_{Ar(Tos)})

¹³C-NMR (CD₃OD) 12,76 (d, ³J_{C,P}=5,5), 17,27 (d, J=4,3), 17,61 (s), 19,2 (d ¹J_{C,P}=142,7), 50,7 (d, ²J_{C,P}=17,7), 59,3 (d, ²J_{C,P}=6,1), 76,9 (s), 125,6 (s), 125,9 (s), 126,69 (s), 126,75 (s), 126,8 (s), 127,4 (s), 132,6 (s), 142,7 (s)

MS (70 eV)	455(14), 348(36), 300(96), 282(14), 270(17), 210(16), 194(61), 179(52), 166(32), 155(34), 1139(47), 123(44), 109(41), 91(100), 77(48), 65(58)
IR (KBr)	ν : 3089, 3066, 3033, 2981, 2939, 2907, 1736, 1597, 1454, 1352, 1244, 1168, 1029, 815, 755, 699, 652, 578, 550 cm^{-1}

3-[*N*-Hydroxyamino]-propylphosphonsäure

13,65 g (0,03 mol) Diethyl-3-[*N*-Benzyloxy-*N*-tosylamino]-propylphosphonat werden in einer Mischung aus 150 ml konzentrierter Salzsäure und 150 ml Essigsäure für 2 Tage zum Rückfluß erhitzt.

Danach engt man die Mischung am Rotationsverdampfer ein, nimmt den braunen, öligen Rückstand mit 300 ml Wasser auf, wäscht zweimal mit Diethylether, gibt eine Spatelspitze Aktivkohle zu und rührt für 5 Minuten. Nach Abfiltrieren engt man das Filtrat ein und gibt wieder soviel Wasser zu, bis sich der Rückstand gerade gelöst hat. Nach Zugabe von 2,4 ml Pyridin tropft man langsam unter starkem Rühren 5 ml Ethanol zu und läßt über Nacht bei 4°C stehen. Der entstandene weiße Niederschlag wird abfiltriert, in wenig Wasser gelöst und wieder mit Ethanol auskristallisiert. Das saubere Produkt erhält man in Form farbloser, blättriger Kristalle.

Ausbeute: 2,13 g (51%) Schmelzpunkt: 162°C

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O)	δ : 1,54 (m, 2H, C2), 1,82 (m, 2H, C1), 3,21 (t, 2H, C3)
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O)	δ : 18,1 (d, $^3\text{J}_{\text{C,P}}=3,8$), 25,3 (d, $^1\text{J}_{\text{C,P}}=134$), 51,8 (d, $^2\text{J}_{\text{C,P}}=16,3$)
MS (LC-MS)	156(7), 152(9), 138(52), 123(100), 84(18), 56(70)
IR (KBr)	3400-2000, 1629, 1533, 1235, 1122, 1004, 926, 902, 769 cm^{-1}

Mono-Natrium-3-(*N*-formyl-*N*-hydroxyamino)-propylphosphonat 59

Über einen Zeitraum von 10 min tropft man 4 ml Ameisensäure zu 8 ml eisgekühltem Essigsäureanhydrid, rührt 10 min bei dieser Temperatur, erwärmt für 15 min auf 50 °C und läßt wieder auf 0 °C abkühlen.

Hierzu tropft man im Verlauf von 10 min eine eisgekühlte Lösung von 1,64 g (10 mM) 3-(*N*-hydroxyamino)-propylphosphonsäure in 6 ml Ameisensäure. Man läßt eine Stunde bei Raumtemperatur rühren und entfernt anschließend am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel. Den öligen Rückstand nimmt man in 30 ml Wasser auf und wäscht dreimal mit je 25 ml Diethylether. Nachdem man den pH-Wert der wässrigen Phase mit 1 N Natronlauge auf 4,8 eingestellt hat, entfernt man das Wasser am Rotationsverdampfer und löst den erhaltenen Rückstand in 25 ml Methanol. Man gibt 10 ml Ethanol zu, dekantiert von dem entstandenen gelben Öl ab und fügt weitere 60 ml Ethanol zu. Das Produkt kristallisiert über Nacht als farbloser Feststoff aus.

Ausbeute: 1,15 g (57 %), Schmelzpunkt: 191°C

¹H-NMR (D₂O) δ: 1,44 (m, 2H,C2), 1,84 (m, 2H, C1), 3,54 ,3,55(t, Summe 2H, C3), 7,89, 8,24 (s, Summe 1H, CHO)

¹³C-NMR (D₂O) δ: 19,26 (d, ³J_{C, P}=3,8), 22,8 (d, ¹J_{C, P}=134), 49,5 (²J_{C, P}=18), 158

MS (LC-MS) 184(23), 156(7), 152(9), 138(52), 123(100), 84(18), 56(29)

IR 3600-2200, 1671, 1510, 1270, 1230, 1165, 1053, 884 cm⁻¹

5.1.5 [6,6-²H₂]-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose**[6,6-²H₂]-3,4-*O*-Isopropyliden-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose 68**

Frisch getrocknetes Lithium 2,3-*O*-isopropyliden-[4,4-²H₂]-D-threonat **45** (gewonnen aus 1 g 2,3-*O*-Isopropyliden-D-weinsäuremonomethylester **44**, 4,8 mmol) werden in einer Mischung aus 20 ml über LiAlH₄ getrocknetem THF und 2,5 ml Cyclohexan suspendiert. Nach Zugabe von 350 mg blanken Lithiumdrahts (50 mmol, Natriumgehalt 2%, Aldrich) wird die Mischung auf 0°C gekühlt. Nun tropft man eine Lösung von 1,28

ml Chlorethan (20 mmol, Aldrich) in 20 ml eisgekühltem THF zu und beschallt die Mischung 60 min mit Ultraschall, wobei das Bad des Ultraschallgerätes mit Eis gekühlt wird. Anschließend leitet man für 20 min. einen kräftigen Strahl Kohlendioxid durch die Mischung und entfernt dann die überschüssigen Lithiumstücke. Die entstandene dicke, gelblich weiße Suspension gibt man in 250 ml ges. Ammoniumchloridlösung und stellt gegebenenfalls den pH-Wert der Lösung mit 2 N Salzsäure auf pH 7 ein. Anschließend sättigt man mit Natriumchlorid und extrahiert mit 3×100 ml Essigester. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Reinigung über Kieselgel (Petrolether / Essigester 1:1) erhält man ein farbloses Öl.

Ausbeute: 518 mg (59%, bezogen auf **43**)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,00 (t, $J=7,15$, 3H, C1), 1,35 (s, 3H, Me), 1,40 (s, 3H, Me), 2,63 (m, 2H, C2), 3,99 (d, $J=7,84$ 1H, C3), 4,20 (d, $J=8,95$, 1H, C4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6,8 (C-1), 26,1 (C-Me) , 26,7 (C-Me), 32,2 (C-6), 78,0 (C-5) , 81,4 (C-4), 110, 6 (C-Acetal), 211,5 (C-3)

MS (70 eV) 175(M^+-15 , (6)), 157(2), 133(100), 115(28), 113(15), 89(18), 85(11), 59(86), 57(38)

IR (KBr) ν : 3432, 2987, 2940, 2882, 2212, 2105, 1715, 1458, 1380, 1091, 974 cm^{-1}

HR-MS berechnet ($\text{C}_8\text{H}_{11}^2\text{H}_2\text{O}_4$, M^+-15): 175,09353 gemessen.: 175,0935

[6,6- $^2\text{H}_2$]-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **69**

300 mg (1,5 mmol) **68** werden in einer Mischung aus 45 ml Acetonitril, 3 ml dest. Wasser und 1,5 ml 2 N Salzsäure gelöst und bei Raumtemperatur 24 Stunden gerührt. Anschließend neutralisiert man die Lösung mit 0,2 N Natronlauge und engt am

Rotationsverdampfer (Badtemperatur < 40°C) das Lösungsmittels auf 1/4 des Ausgangsvolumens ein. Nun stellt man den pH-Wert nochmals auf 7 ein und entfernt das Lösungsmittel vollständig. Nach Aufreinigung über Kieselgel (Essigester / Methanol 95:5) kristallisiert das zunächst erhaltene farblose Öl nach einiger Zeit in Form farbloser Nadeln aus.

Ausbeute: 160 mg (71%), Schmelzpunkt: 36,5 °C, $[\alpha]_D^{24}$: 33°

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 0,74, 0,82 (Anomere), 0,91(offenkettige Form) (t, Summe 3H, C1), 1,51, 1,63 (Anomere) 2,53 (offenkettige Form) (m, Summe 2H, C2), 3,49 - 4,29 (m, Summe 2H, C4, C5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,1 (C-1), 32,2 (C-2), 71,9 (C-5), 77,0 (C-4), 216,0 (C-3)

MS 132(1), 117(2), 93(14), 88(48), 76(31), 75(25), 73(22), 63(27), 61(35), 57(100),45(20)

IR (KBr) ν : 3413, 2984, 2944, 2923, 2858, 2222, 2112, 1716, 1459, 1404, 1110, 976 cm^{-1}

5.2 Inkubationsexperimente

Headspace-Analysen mittels closed loop stripping (CLS)

Das verwendete System zum closed loop stripping besteht aus einer 12-V-Miniaturdrehchieberpumpe (Fürgut, 88139 Aitrach) die mit einer Spannung von 9-10 V betrieben wird und die zu analysierende Luft kontinuierlich aus dem Analysengefäß heraus durch einen Aktivkohlefilter (Bettgröße: 1 mg, CLSA-Filter, Le Ruisseau de Montbrun, F 09350) ansaugt und wieder in das Analysengefäß zurückführt. Nach Ablauf der Adsorptionszeit werden die Analyten 3 mal mit je 10 μl Methylenchlorid von dem Aktivkohlefilter eluiert. Als internen Standard enthält das Methylenchlorid 1-Bromdecan (200 $\mu\text{g/ml}$) .

Die Proben werden anschließend per GC-MS untersucht:

Gerät:	Finnigan GCQ
Säule	Alltech DB5 MS ITD (0,25 μm \times 30 m, Filmdicke 0,25 mm)
Trägergas	Helium, 40 cm min^{-1}
Temperatur	40°C 2 min isotherm, dann mit 10° min^{-1} auf 200°C, mit 35° min^{-1} auf 280°C und 280°C für 3 min isotherm, Injektortemperatur: 260°C
MS	Transferline 265°C, Messbereich 35-450 Da

Phaseolus lunatus

Material

Eingesetzt wurde die Sorte "Jackson Wonder Bush", die von der BASF AG, Deutschland und der Firma Kellogs Seed Inc., USA bezogen wurde.

Die Anzucht erfolgte in Blumenerde der Firma Capriflor, in Kunststofftöpfen (\varnothing 5,5 cm) bei einer Temperatur zwischen 22 und 26 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 %. Die Blumenerde wurde vor der Aussaat 3 min bei 900 W in der Mikrowelle sterilisiert. Die Pflanzen wurden täglich für 14 Stunden mit Leuchtstoffröhren belichtet ($270 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$). Pro Topf wurden jeweils zwei Bohnen ausgesät.

Durchführung

Die Setzlinge wurden im Alter von 10-14 Tagen verwendet und besaßen zwei voll entwickelte Blätter. Sie wurden ca 2 cm unterhalb der Keimblätter mit einer Rasierklinge abgeschnitten und sofort in die Inkubationslösung gestellt, die sich je nach Volumen in 2 ml Eppendorf-Gefäßen oder in 5 ml Schnappdeckelgläschen befand. Anschließend wurde das Gefäß mit der Bohne in einen geschlossenen 3 l-Exsikkator gestellt und die emittierten Duftstoffe für 48 Stunden im closed loop-Verfahren gesammelt. Wenn vor der Elicitierung eine Vorinkubation durchgeführt werden sollte, wurde im Verlauf der Vorinkubation der Exsikkator mehrfach für ca 30 min geöffnet, um den Transpirationssog der Pflanze zu erhöhen. Die Inkubationslösungen (2 ml) wurden von der Pflanze im Verlauf von ca 24 Stunden nahezu vollständig aufgenommen. Während der Inkubationen wurden die Pflanzen täglich für 14 Stunden mit Leuchtstoffröhren belichtet ($270 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$).

Eucalyptus globulus**Material**

Die Eucalyptusblätter stammten aus dem Botanischen Garten der Friedrich-Schiller-Universität Jena, bzw der Rheinischen Friedrich Wilhelm Universität Bonn. Für eine Versuchsreihe wurde von den Bäumen ein Zweig mit einer Gartenschere abgetrennt und im Labor in Leitungswasser für 3-4 Tage aufbewahrt. Für die Versuche wurden dann einzelne Blätter mit einer Rasierklinge von diesem Zweig abgetrennt.

Durchführung

Die Blätter wurden in 20 ml Bechergläser gestellt, die mit 5 ml Wasser oder 5 ml der d_2 -DOX-Inkubationslösung (1ml/mg) gefüllt waren und in 750 ml Exsikkatoren plaziert wurden. Die Öffnung des Exsikkatordeckels wurde mit Aluminiumfolie verschlossen und dann die Isopren-Emission durch Bestrahlung mit drei 150 W PAR 38 Scheinwerfern (12° spot), die im Abstand von ca 1,20 m über dem Exsikkatoren angebracht waren, angeregt. Nach 90 min wurde eine SPME-Faser durch den Aluminiumdeckel gestochen, für 30 min im Exsikkator belassen und dann per GC-MS vermessen.

Gerät:	Thermoquest Trace MS
Säule	Alltech AT624 (0,32 mm × 30 m, Filmdicke 3 µm)
Trägergas	Helium, 3 ml / min
Temperatur	30°C 2 min isotherm, dann mit $10^\circ \text{ min}^{-1}$ auf 200°C, mit $35^\circ \text{ min}^{-1}$ auf 280°C und 280°C für 3 min isotherm
SPME-Desorption	2 min, splitless, Injektortemperatur: 260 °C
MS	Transferline 265°C, Messbereich 35-450 Da

Fossombrossia pusilla**Material**

Das Lebermoos *F. pusilla* stammte von Herrn Prof. Hans Becker, Institut für Pharmakognosie und Analytische Phytochemie, Universität Saarbücken. Es wurde als Kalluskultur bei 21 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit auf B5 Agar-Medien gehalten und täglich für 14 Stunden mit Leuchtstoffröhren ($400 \mu\text{E m}^2 \text{ s}^{-1}$) belichtet. Die Anzucht

erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben, die mit Zellstoff-Einmalstopfen verschlossen und mit 50 ml Medium gefüllt waren.

Zum Ansetzen des B5-Mediums wurden 3,1 g einer käuflichen B5-Salzmischung (Sigma) mit 1 ml einer im Verhältnis 1:100 verdünnten B5-Vitaminlösung (Sigma) in 1 l MilliQ Grade 2 Wasser gelöst, mit 8 g Agar und 20 g Saccharose versetzt und autoklaviert.

Durchführung

Pro Kulturkolben wurde jeweils 1 ml wässriger Lösung der markierten Vorstufe (5 mg/ml) mit einer Spritze über die Kalli verteilt. Zur Sterilisation wurden die Lösungen dabei durch einen sterilen Spritzenfilter gedrückt.

Anschließend wurden die Kulturkolben wieder mit Aluminiumfolie verschlossen und die emittierten Duftstoffe mehrmals im Abstand von je 3 Tagen durch SPME (Fasermaterial: 100 µm PDMS, Äquilibrierungszeit: 20 min, Desorption: splittless für 2 min, sonstige GC- und MS-Bedingungen wie bei CLS) oder durch CLS (Dauer 1 Tag) analysiert.

Streptomyces maritimus

Material

Der Bakterienstamm war von Dr. Jörn Piel aus maritimen Sedimenten isoliert worden, die sich vor der Küste von Wailupe Beach Park, Hawaii, befanden. Aliquots der Stammkulturen wurden bei - 18°C aufbewahrt.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte mit A1-Flüssigmedium in 100 ml Erlenmeyerkolben, die mit zwei Spiralfedern bestückt waren, bei Raumtemperatur und auf einem Kreisschüttler (100 upm).

Zum Ansetzen des Mediums wurden 10 g Kartoffelstärke, 4 g Hefeextrakt, 2 g Pepton und 28 g Seewasserpulver (Aquarium Systems, Instand Ocean) in 1 l Aqua dest. gelöst. Nach Zugaben von 10 ml Tris/HCl-Puffer (1 M, pH 8,0) rührte man 17 g Agar unter und autoklavierte.

Durchführung

Die deuterierten Vorstufen wurden den bereits autoklavierten Medien als Stammlösung (d_2 -DOX: 10 mg/ml, d_5 -MVA: 20 mg/ml, Verdünnung 1:10) zugegeben, die über Sterilspritzenfilter sterilisiert wurden. Anschließend wurden die Kulturen mit je 100 µl

aufgetauten Stammkulturen beimpft. Nach 2 bis 3 Tagen wurde der Headspace der Kulturkolben durch SPME-Messungen (Fasermaterial: 100 µm PDMS, Äquilibrierungszeit: 20 min, Desorption: splittless für 2 min, sonstige GC- und MS-Bedingungen wie bei CLS) untersucht. Die einsetzende Produktion leichtflüchtiger Verbindungen korrelierte dabei mit einer orangen Verfärbung des Kulturmediums.

5.3 Stabilisotopen-Verhältnismassenspektroskopie

Zur Duftinduktion werden frisch geschnittene Triebe der Limabohne in eine wässrige Lösung von Jasmonsäure eingestellt. Nach 12 Std. werden die induzierten Pflanzen in ein geschlossenes System (Exsikkator, 3 l) verbracht, und der emittierte Duft wird über weitere 48 Std. im Kreislauf an Aktivkohlefiltern absorbiert. Zur selektiven Inhibierung der MVA- oder MEP-Route wurden die Triebe vor der eigentlichen Induktion mit JA (1 mM), Alamethicin (10 µM) oder Raupenfraß (4 Larven von *Spodoptera frugiperda*) über 24 Std. in wässrige Lösungen der Inhibitoren Cerivastatin[®] bzw. Fosmidomycin (3×10^{-5} M) eingestellt.

Die Analyse und Trennung der Duftkomponenten erfolgte auf einer Kapillarsäule (DB-5-MS ITD, Alltech, Länge: 30 m, ID: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm) unter temperaturprogrammierten Bedingungen. 50°C (2 min isotherm), dann mit 5°C min⁻¹ auf 220°C. Eluierende Substanzen wurden on-line an einem CuO/NiO/PtO Katalysator bei 940°C verbrannt und einem Delta^{Plus} XL-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometer (Thermoquest, D-63329 Egelsbach, Germany) zugeführt. Ein Kapillarsplit vor der Verbrennung erlaubte den Abzweig von 10% des Probenmaterial in ein konventionelles Massenspektrometer (GCQ, Thermoquest) zur Identifikation der eluierenden Substanzen. Alle Isotopenverhältnisse sind als δ¹³C-Werte (‰) angeführt:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(\text{R}_{\text{Probe}} / \text{R}_{\text{Standard}}) - 1] \times 10^3,$$

wobei R das ¹³C/¹²C-Verhältnis der Probe bzw. des Standards (Vienna Pee Dee Belemnite) angibt.

5.4 Versuche zur Identifizierung der beiden unbekanntem Terpene aus dem Duftbouquet der Limabohne

Material

Um größere Substanzmengen zu erhalten, wurden 6 - 10 Bohnen in einem 50 l Exsikkator mit Jasmonsäure elicitiert. Die emittierten Verbindungen wurden auf Aktivkohlefiltern (CLSA-Filter) mit einem 5 mg-Bett adsorbiert und mit $2 \times 20 \mu\text{l}$ Methylenchlorid eluiert.

Säulenchromatographische Auftrennung von Duftproben

Die Duftproben wurden mit einem schwachen Argonstahl (Argonballon mit Subkutannadel) auf ein Volumen von ca $10 \mu\text{l}$ eingeengt. Als Säule diente eine $200 \mu\text{l}$ HPLC-Spritze, die bis zur Hälfte mit MPLC - Kieselgel (Merck Lichroprep Si 60, Korngröße 25 - $40 \mu\text{m}$) gefüllt war. Die Elution erfolgte mit einem Pentan / Diethylether - Stufengradienten, wobei man zunächst mit 2 ml 100% Pentan die unpolaren Bestandteile des Duftbouquetts abtrennt und dann den Diethyletheranteil nach je 1 ml um 20% erhöht. Die Fraktionen (ca $150 \mu\text{l}$) wurden in GC-Vials mit $200 \mu\text{l}$ -Einsätzen gesammelt und per GC-MS vermessen.

Hydrierung von fraktionierten Duftproben

Die zu hydrierende Fraktion wird in einem GC-Vial mit wenigen Mikrogramm Palladium auf Aktivkohle (Fluka, 10% Pd) versetzt. Anschließend durchsticht man den Deckel des Vials mit einer Subkutannadel und läßt langsam aus einem Ballon Wasserstoff durch die Lösung perlen. Die Flußgeschwindigkeit regelt man dabei, indem man den Deckel des Vials vorsichtig öffnet. Nach 30 min bricht man die Hydrierung ab, überführt den Vial-Einsatz ($100 \mu\text{l}$) in ein $1,5 \text{ ml}$ Eppendorfgesäß, zentrifugiert den Katalysator für 5 min bei 2000 upm ab und vermisst per GC-MS.

Oxidation von Ocimen

Zu 10 ml t-Butanol gibt man in kleinen Portionen $3,5 \text{ g}$ Chromtrioxid und nach vollständiger Zugabe $3,5 \text{ ml}$ Essigsäureanhydrid. Diese Lösung tropft man langsam zu einer eisgekühlten Lösung von $320 \mu\text{l}$ (3 mmol) Ocimen in 10 ml t-Butanol. Nach 15 min entnimmt man eine Probe, zu der man Wasser und etwas Methanol und Oxalsäure gibt. Diese Mischung extrahiert man mit Chloroform, wäscht die Chloroformphase

mehrfach mit 10% iger Natriumcarbonatlösung, entfernt das Chlroform am Rotationsverdampfer, und wäscht den Rückstand mit einigen ml Diethylether/Pentan (1:1) aus. Die in der organischen Phase enthaltenen Oxidationsprodukte können nun per GC-MS vermessen werden.

5.5 Auftrennung von Cellulysin

Allgemeine Arbeitstechniken

SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli^[171] auf Fertiggelen der Firma Novex.

Gele	Novex/Invitrogen, 12% Tris-Glycin, 1,0 mm × 12 Wells
Laufpuffer	33 g Tris und 144 g Glycin in 1 l Wasser (MilliQ) lösen (pH 8,8),
Elektrophoresekammer	Hoefer Mighty Small SE 260 (Pharmacia Biotech)
Power Supply	Electrophoresis Power Supply EPS 200 (Pharmacia Biotech)

Färbung

Die Gele wurden durch Silberfärbung nach Blum^[172] mit einem automatisierten Gelfärbesystem (Hoefer Automated Gel Stainer, Pharmacia Biotech) angefärbt.

Proteinmengenbestimmung

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte nach Bradford^[173] und auf Mikrotiterplatten. Die Absorbtionen der Proben wurden mit einem Mikroplattenspektrophotometer bestimmt (Spectra Max 250, Molecular Devices).

Aktivitätstest

Die Fähigkeit der zu untersuchenden Fraktionen bzw. Lösungen zur Elicitierung der Duftproduktion an der Limabohne wurde mittels CLS oder SPME überprüft. Hierzu wurden die Fraktionen auf einen Proteingehalt in der Größenordnung von 25 µg/ml verdünnt und mit 2 ml der Lösung Limabohnen inkubiert. CLS-Bestimmungen wurden nach 12 h gestartet und dauerten 48 h (Bedingungen siehe Inkubationsversuche),

SPME-Messungen wurden nach 2 Tagen durchgeführt (Fasermaterial: 100 μm PDMS, Äquilibrationszeit: 20 min, Desorption: splitless für 2 min, sonstige GC- und MS-Bedingungen wie bei CLS). Für Aktivitätstests des Ausgangsmaterials wurden Lösungen des Celluysins (Calbiochem) mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

semipräoperatives Reinigungsprotokoll

Puffer

HIC A	(1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris, pH 7,3) 132,14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,42 g Tris in 900 ml MilliQ lösen, mit 2 N HCl auf pH 7,3 bringen, auf 1 l auffüllen
HIC B	20 mM Tris, pH 7,3 wie A, ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Size Exclusion	20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8 2,42 g Tris, 2,92 g NaCl in 900 ml MilliQ lösen, mit 2 N NaCl auf pH 8 bringen, auf 1 l auffüllen

FPLC

Gerät	Åtka Explorer 10, ausgestattet mit Fraktionssammler F-950, automatisierte Auftragungspumpe P-950 (alle Amershan Pharmacia Biotech), Datenverarbeitungssystem: UNICORN V3.21 (Amershan Pharmacia Biotech)
HIC-Lauf	Säule: Resource ISO 1 ml, Detektion: UV (280, 254, 218 nm), Säulenäquilibration: 2 CV, Injektionsvolumen: 1 ml, Flußrate: 1 ml min^{-1} , Auswaschen ungebundener Probe: 2 CV, Gradient: 100 % A \rightarrow 100 % B in 20 min, Spülen der Säule: 4 CV.
size exclusion-Lauf	Säule: Superdex 75 10/30, Detektion: UV (280, 254, 218 nm), Säulenäquilibration: 1 CV, Injektionsvolumen: 0,2 ml, Flußrate: 0,7 ml min^{-1} , Gradient: 100 % A isokratisch, Elutionslänge 1,5 CV.

5.6 Inokulation von *V. faba* mit *U. fabae*

Material

Verwendet wurde die Sorte Con amore der Firma Nickerson - Zwaan, von der je 4 Bohnen in einem Plastiktopf (\varnothing 14 cm) angezogen wurden. Nach 10 Tagen wurden die Bohnen an eine Kletterhilfe (Holzstab) gebunden. Die weiteren Bedingungen entsprachen den Anzuchtbedingungen von *P. lunatus*.

Die Sporen von *Uromyces fabae* stammten von Herrn Prof. Kurt Mendgen, Institut für Phytopathologie, Universität Konstanz und wurden bei -18° in Eppendorf-Gefäßen aufbewahrt.

Durchführung

Vor dem Inokulieren wurden die Bohnen oberhalb des 4. Blattpaares abgeschnitten. Dann wurden 100 mg Sporen von *U. fabae* mit 20 mg BSA in 40 ml dest. Wasser durch kräftiges Schütteln suspendiert und mit einem Reagenzien-Sprüher auf die Ober- und Unterseite der Bohnenblätter versprüht. Anschließend wurden die Bohnen für 24 Stunden bei 18°C in einen luftdicht verschlossenen Kunststoffbehälter (Curver-Mülltonne) gestellt, in dem sich zur Befeuchtung der Luft eine Schale mit Wasser befand. Nach ca. 5 Tagen waren auf den Blättern deutliche, 1-2 mm große, braune Erhebungen zu erkennen.

Zur Untersuchung der emittierten Duftstoffe wurden die 4 Bohnen eines Topfes in ein Planschliffrohr (\varnothing 12 cm, Länge 50 cm) eingeführt. Das Rohr saß dabei auf dem Topf auf und die Erde des Topfes war vorher mit Aluminiumfolie abgedeckt worden. Nachdem man das Planschliffrohr mit einem Exsikkatordeckel verschlossen hatte, wurden die abgegebenen Duftstoffe 2×48 h durch CLS gesammelt. Um eine bessere Luftzirkulation innerhalb des Rohres zu gewährleisten, war die Ausgangskapillare der Drehschieberpumpe auf 40 cm verlängert worden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Connolly, R. A. Hill, *Dictionary of Terpenoids*, Chapman and Hall, London, **1992**.
- [2] L. Roth, K. Kormann, *Duftpflanzen, Pflanzendüfte : Ätherische Öle und Riechstoffe*, Landsberg, **1996**.
- [3] P. Kraft, J. A. Bajgrowicz, C. Denis, G. Frater, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2000**, 39, 2981.
- [4] C. Fuganti, S. Serra, A. Zenoni, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 2761.
- [5] Y. Katsuda, *Pestic. Sci.* **1999**, 55, 775.
- [6] D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 726.
- [7] M. Jung, S. Lee, H. Kim, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 649.
- [8] V. Dhingra, K. V. Rao, M. L. Narasu, *Life Sci.* **2000**, 66, 279.
- [9] M. M. Cowan, *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 564.
- [10] J. B. Harborne, *Ökologische Biochemie: eine Einführung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**.
- [11] M. Vila, J. Sardans, *J. Veg. Sci.* **1999**, 10, 281.
- [12] L. J. Edwards, J. B. Siddall, L. L. Dunham, P. Uden, C. J. Kislw, *Nature* **1973**, 241, 126.
- [13] J. A. Pickett, L. J. Wadhams, C. M. Woodcock, J. Hardie, *Annu. Rev. Entomol.* **1992**, 37, 67.
- [14] O. Wallach, *Terpene und Campher*, 2 ed., Vit & Co, Leipzig, **1914**.
- [15] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, 9, 357.
- [16] K. E. Bloch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, 44, 998.
- [17] F. Lynen, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1958**, 70, 738.
- [18] E. M. Davis, R. Croteau, *Top. Curr. Chem.* **2000**, 209, 53.
- [19] K. Bloch, *Harvey Lectures* **1954**, 48, 68.
- [20] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, A. Pelter, M. G. Horning, G. Popjak, *Tetrahedron* **1959**, 5, 311.
- [21] L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, G. D. E. MacRae, C. H. Hoffmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 5273.
- [22] P. A. Tavormina, M. H. Gibbs, J. W. Huff, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 4498.
- [23] H. J. Klosterman, F. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1229.

-
- [24] J. Knappe, E. Ringelmann, F. Lynen, *Biochem. Z.* **1959**, 332, 195.
- [25] S. L. Spurgeon, J. W. Porter, *Biosynthesis of Isoprenoids Compounds, Vol. 1*, John Wiley and Sons, New York, **1981**.
- [26] T. J. Bach, A. Boronat, N. Campos, A. Ferrer, K. U. Vollack, *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1999**, 34, 107.
- [27] J. Chappel, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plan Mol. Biol.* **1995**, 46, 521.
- [28] T. J. Bach, *Lipids* **1995**, 30, 191.
- [29] T. J. Bach, H. K. Lichtenthaler, *Physiol. Plant.* **1983**, 59, 50.
- [30] G. Flesch, M. Rohmer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 175, 405.
- [31] S. T. J. Broers, Dissertation (#10978), ETH Zürich (Zürich), **1994**.
- [32] M. K. Schwarz, Dissertation (#10951), ETH Zürich (Zürich), **1994**.
- [33] M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahn, *Biochem. J.* **1993**, 295, 517.
- [34] M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringermeier, H. Sahn, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2564.
- [35] A. Yokota, K. Sasajima, *Agr. Biol. Chem.* **1986**, 50, 2517.
- [36] D. Arigoni, S. Sagner, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 10600.
- [37] W. Eisenreich, M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M. H. Zenk, A. Bacher, *Chem. Biol.* **1998**, 5, R 221.
- [38] M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 565.
- [39] G. A. Sprenger, U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. Degraaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringermeier, H. Sahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 12857.
- [40] L. M. Lois, N. Campos, S. R. Putra, K. Danielsen, M. Rohmer, A. Boronat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 2105.
- [41] S. Takahashi, T. Kuzuyama, H. Watanabe, H. Seto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 9879.
- [42] F. Rohdich, J. Wungsintaweekul, M. Fellermeier, S. Sagner, S. Herz, K. Kis, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 11758.
- [43] T. Kuzuyama, M. Takagi, K. Kaneda, T. Dairi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 703.

-
- [44] F. Rohdich, J. Wungsintaweekul, H. Luttgen, M. Fischer, W. Eisenreich, C. A. Schuhr, M. Fellermeier, N. Schramek, M. H. Zenk, A. Bacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 8251.
- [45] T. Kuzuyama, M. Takagi, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Dairi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2925.
- [46] F. Rohdich, J. Wungsintaweekul, W. Eisenreich, G. Richter, C. A. Schuhr, S. Hecht, M. H. Zenk, A. Bacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 6451.
- [47] M. Takagi, T. Kuzuyama, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Dairi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3395.
- [48] K. Himmeldirk, I. A. Kennedy, R. E. Hill, B. G. Sayer, I. D. Spenser, *Chem. Commun.* **1996**, 1187.
- [49] J. Gershenzon, *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 1281.
- [50] A. R. Zangerl, A. M. Arntz, M. R. Berenbaum, *Oecologia* **1997**, *109*, 433.
- [51] M. Dicke, M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Briun, M. A. Posthumus, *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 3091.
- [52] M. Dicke, R. Gols, D. Ludeking, M. A. Posthumus, *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 1907.
- [53] P. W. Páre, J. H. Tumlinson, *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 325.
- [54] I. T. Baldwin, Z. P. Zhang, N. Diab, T. E. Ohnmeiss, E. S. McCloud, G. Y. Lynds, E. A. Schmelz, *Planta* **1997**, *201*, 397.
- [55] M. Miksch, W. Boland, *Experientia* **1996**, *52*, 739.
- [56] B. A. Halkier, L. C. Du, *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 425.
- [57] J. Vetter, *Toxicon* **2000**, *38*, 11.
- [58] H. Koiwa, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 379.
- [59] A. Danon, V. Delorme, N. Mailhac, P. Gallois, *Plant Physiol. Biochem.* **2000**, *38*, 647.
- [60] R. Hammerschmidt, *Annu. Rev. Phytopathol.* **1999**, *37*, 285.
- [61] M. D. Hunt, J. A. Ryals, *Crit. Rev. Plant Sci.* **1996**, *15*, 583.
- [62] C. A. Ryan, *Biochem. Biophys. Acta - Prot. Struct. Mol. Enz.* **2000**, *1477*, 112.
- [63] S. Kitajima, F. Sato, *J. Biochem.* **1999**, *125*, 1.
- [64] J. Piel, R. Atzorn, R. Gäbler, F. Kühnemann, W. Boland, *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 143.
- [65] H. Clijsters, A. Cuypers, J. Vangronsveld, *Z.Naturforsch.(C)* **1999**, *54*, 730.
- [66] A. Stroinski, *Acta Physiol. Plant.* **1999**, *21*, 175.

-
- [67] J. Ebel, *Bioessays* **1998**, 20, 569.
- [68] S. W. Hutcheson, *Annu. Rev. Phytopathol.* **1998**, 36, 59.
- [69] C. L. Bender, *Eur. J. Plant Path.* **1999**, 105, 1.
- [70] P. Wojtaszek, *Biochem. J.* **1997**, 322, 681.
- [71] D. A. Dempsey, J. Shah, D. F. Klessig, *Crit. Rev. Plant Sci.* **1999**, 18, 547.
- [72] L. L. Walling, *J. Plant Growth Reg.* **2000**, 19, 195.
- [73] C. Wasternack, B. Parthier, *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 302.
- [74] T. Koch, T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth, W. Boland, *Plant Physiol.* **1999**, 121, 153.
- [75] S. Parchmann, H. Gundlach, M. J. Mueller, *Plant Physiol.* **1997**, 115, 1057.
- [76] M. H. Beale, J. L. Ward, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, 15, 533.
- [77] M. van der Stelt, M. A. Noordermeer, T. Kiss, G. van Zadelhoff, B. Merghart, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 2000.
- [78] P. J. White, *Biochem. Biophys. Acta - Biomembranes* **2000**, 1465, 171.
- [79] B. Blume, T. Nurnberger, N. Nass, D. Scheel, *Plant Cell* **2000**, 12, 1425.
- [80] W. Roos, B. Dordschbal, J. Steighardt, M. Hieke, D. Weiss, G. Saalbach, *Biochem. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1999**, 1448, 390.
- [81] L. G. Josefsson, L. Rask, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 249, 415.
- [82] F. Cardinale, C. Jonak, W. Ligterink, K. Niehaus, T. Boller, H. Hirt, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 36734.
- [83] K. U. Torii, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, 3, 361.
- [84] P. Van Gestelen, P. Ledeganck, I. Wynant, R. J. Caubergs, H. Asard, *Protoplasma* **1998**, 205, 83.
- [85] C. M. J. Pieterse, L. C. van Loon, *Trends Plant Sci.* **1999**, 4, 52.
- [86] D. J. Mc Garvey, R. Croteau, *Plant Cell* **1995**, 7, 1015.
- [87] B. M. Lange, M. R. Wildung, D. McCaskill, R. Croteau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 2100.
- [88] B. M. Lange, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 365, 170.
- [89] J. Donath, Dissertation, Universität Karlsruhe (Karlsruhe), **1994**.
- [90] J. Piel, J. Donath, K. Bandemer, W. Boland, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1998**, 37, 2478.
- [91] K. P. Adam, J. Zapp, *Phytochemistry* **1998**, 48, 953.
- [92] I. A. Kennedy, T. Hemscheidt, J. F. Britten, I. D. Spenser, *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 1329.

- [93] J. L. Giner, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2479.
- [94] S. V. Taylor, L. D. Vu, T. P. Begley, U. Schorcken, S. Grolle, G. A. Sprenger, S. Bringermeier, H. Sahm, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2375.
- [95] B. S. J. Blagg, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1508.
- [96] R. Thiel, K. P. Adam, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5307.
- [97] J. Piel, W. Boland, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6387.
- [98] J. Donath, W. Boland, *Phytochemistry* **1995**, 39, 785.
- [99] G. Schenk, R. G. Duggleby, P. F. Nixon, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, 30, 1297.
- [100] G. Hubner, K. Tittmann, M. Killenbergjabs, J. Schaffner, M. Spinka, H. Neef, D. Kern, G. Kern, G. Schneider, C. Wikner, S. Ghisla, *Biochem. Biophys. Acta - Prot. Struct. Mol. Enz.* **1998**, 1385, 221.
- [101] O. N. Solovjeva, G. A. Kochetov, *FEBS Lett.* **1999**, 462, 246.
- [102] A. N. Radhakrishnan, R. P. Wagner, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 2322.
- [103] Satyanar.T, Radhakri.An, *Biochem. Biophys. Acta* **1965**, 110, 380.
- [104] A. Aulabaugh, J. V. Schloss, *Biochemistry* **1990**, 29, 2824.
- [105] B. C. Gerwick, L. C. Mireles, R. J. Eilers, *Weed Technol.* **1993**, 7, 519.
- [106] T. D. H. Bugg, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 9, 199.
- [107] Y. Shigi, *J. Antimicrob. Chemother.* **1989**, 24, 131.
- [108] M. Okuhara, Y. Kuroda, T. Goto, M. Okamoto, H. Terano, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka, *J. Antibiotics* **1980**, 33, 24.
- [109] H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Turbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, E. Beck, *Science* **1999**, 285, 1573.
- [110] T. Kamiya, M. Hashimoto, K. Hemmi, H. Takeno, Fujisawa Pharmaceutical Company, Limited, Japan, **1980**.
- [111] J. Kuhlmann, W. Muck, H. Bischoff, E. von Keutz, M. Llewellyn, *Cardiovasc. Drug Rev.* **1998**, 16, 236.
- [112] H. K. Lichtenthaler, J. Schwender, A. Disch, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **1997**, 400, 271.
- [113] B. Hock, C. Fedke, R. Schmidt, *Herbizide*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- [114] A. Hirota, Y. Higashinaka, H. Sakai, *Agr. Biol. Chem.* **1978**, 42, 147.

- [115] R. G. Werner, L. F. Thorpe, W. Reuter, K. H. Nierhaus, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 68, 1.
- [116] M. A. Darken, *Pharmacol. Rev.* **1964**, 16, 223.
- [117] J. Kraftcreech, I. Pietsch, E. R. Lochmann, *Z.Naturforsch.(C)* **1978**, 33, 299.
- [118] M. R. Weimer, N. E. Balke, D. D. Buhler, *Pest. Biochem. Physiol.* **1992**, 42, 43.
- [119] M. H. Gelb, J. P. Svaren, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1985**, 24, 1813.
- [120] I. Ruppert, K. Schlich, W. Volbach, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2195.
- [121] C. Lamberth, *J. Prakt. Chem.-Chem. Ztg.* **1996**, 338, 586.
- [122] R. P. Singh, G. F. Cao, R. L. Kirchmeier, J. M. Shreeve, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2873.
- [123] D. Bouvet, D. O'Hagan, *Tetrahedron* **1999**, 55, 10481.
- [124] H. L. Schmidt, G. Gleixner, in *Stable Isotopes: The Integration of Biological, Ecological & Geological Processes* (Eds.: H. Griffiths, D. Robinson, P. Van Gardingen), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, **1998**.
- [125] W. A. Brand, *J. Mass Spec.* **1996**, 31, 225.
- [126] Meier-Augenstein, *J. Chromatogr. A* **1999**, 842, 351.
- [127] A. L. Schmidt, A. Roßmann, R. A. Werner, in *Flavourings* (Eds.: E. Ziegler, H. Ziegler), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [128] R. Aguilera, D. H. Catlin, M. Becchi, A. Phillips, C. Wang, R. S. Swerdloff, H. G. Pope, C. K. Hatton, *J. Chromatogr. B* **1999**, 727, 95.
- [129] G. A. Logan, J. M. Hayes, G. B. Hieshima, R. E. Summons, *Nature* **1995**, 376, 53.
- [130] B. Stauffer, *Space Sci. Rev.* **2000**, 94, 321.
- [131] D. A. Merritt, J. M. Hayes, D. J. D. Marias, *J. Geophys. Res.-Atmos.* **1995**, 100, 1317.
- [132] M. O'Leary, *Phytochemistry* **1981**, 20, 553.
- [133] E. Melzer, H. L. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 8159.
- [134] S. Schouten, W. Breteler, P. Blokker, N. Schogt, W. I. C. Rijpstra, K. Grice, M. Baas, J. S. S. Damste, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1998**, 62, 1397.
- [135] A. W. Hilker, C. B. Douthitt, H. J. Schluter, W. A. Brand, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 1226.
- [136] K. A. Hobson, L. I. Wassenaar, O. R. Taylor, *Oecologia* **1999**, 120, 397.
- [137] A. L. Sessions, T. W. Burgoyne, A. Schimmelmann, J. M. Hayes, *Org. Geochem.* **1999**, 30, 1193.

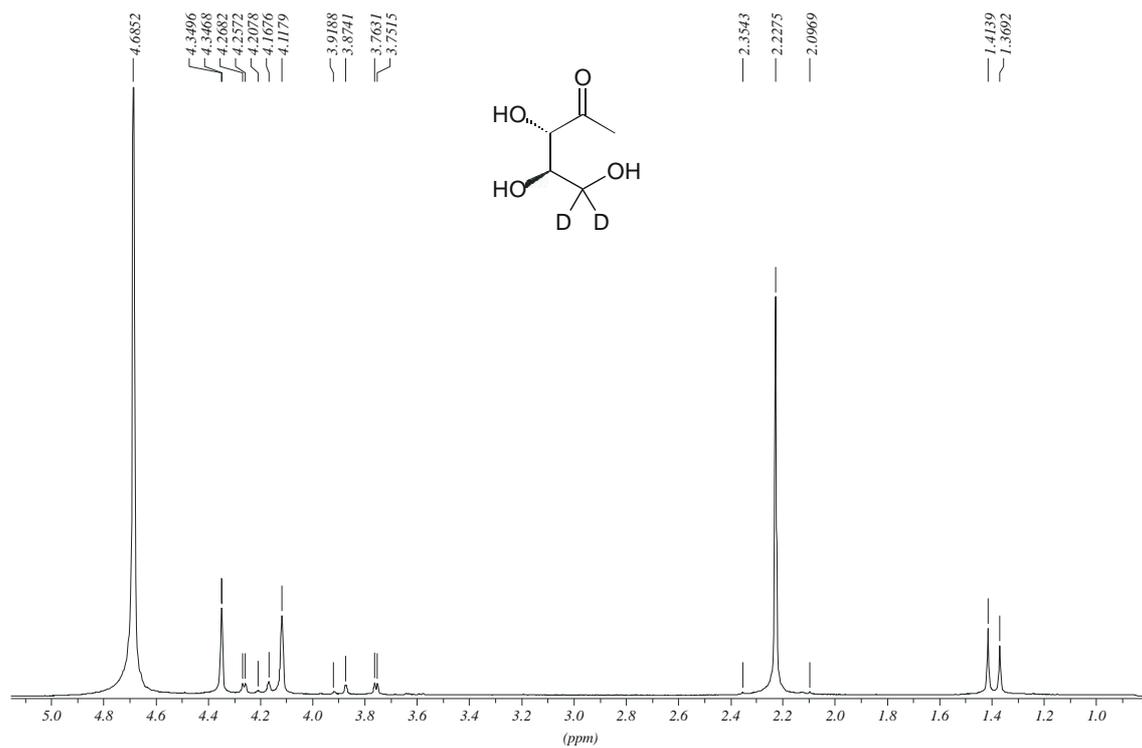
- [138] B. N. Smith, H. Ziegler, *Bot. Acta* **1990**, *103*, 335.
- [139] J. S. Sorensen, N. A. Sorensen, *Acta Chem. Scand.* **1954**, *8*, 284.
- [140] J. Lam, D. Drake, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 149.
- [141] H. M. Vandort, P. P. Jagers, R. Terheide, A. J. A. Vanderweerd, *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2063.
- [142] U. Huber, W. Boland, W. A. König, B. Gehrcke, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1949.
- [143] G. Izaguirre, C. J. Hwang, S. W. Krasner, M. J. McGuire, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 708.
- [144] K. E. Murray, P. A. Bannister, R. G. Buttery, *Chem. Ind.* **1975**, 973.
- [145] R. Kaiser, C. Nussbaumer, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 133.
- [146] Z. F. Feng, U. Huber, W. Boland, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2547.
- [147] R. Bentley, R. Meganathan, *FEBS Lett.* **1981**, *125*, 220.
- [148] H. Seto, H. Watanabe, K. Furihata, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7979.
- [149] C. P. Dionigi, *Weed Sci.* **1994**, *42*, 148.
- [150] U. Warmers, W. A. König, *Phytochemistry* **2000**, *53*, 645.
- [151] R. Thiel, K. P. Adam, H. Becker, *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1997**, *7*, 103.
- [152] K. P. Adam, R. Thiel, J. Zapp, H. Becker, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *354*, 181.
- [153] A. Guenther, C. N. Hewitt, D. Erickson, R. Fall, C. Geron, T. Graedel, P. Harley, L. Klinger, M. Lerdau, W. A. McKay, T. Pierce, B. Scholes, R. Steinbrecher, R. Tallamraju, J. Taylor, P. Zimmerman, *J. Geophys. Res.-Atmos.* **1995**, *100*, 8873.
- [154] S. E. Paulson, R. C. Flagan, J. H. Seinfeld, *Int. J. Chem. Kinet.* **1992**, *24*, 103.
- [155] W. L. Chameides, R. W. Lindsay, J. Richardson, C. S. Kiang, *Science* **1988**, *241*, 1473.
- [156] J. P. Schnitzler, R. Arenz, R. Steinbrecher, A. Lehning, *Bot. Acta* **1996**, *109*, 216.
- [157] T. D. Sharkey, F. Loreto, *Oecologia* **1993**, *95*, 328.
- [158] E. L. Singsaas, M. Lerdau, K. Winter, T. D. Sharkey, *Plant Physiol.* **1997**, *115*, 1413.
- [159] M. C. Wildermuth, R. Fall, *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 1111.
- [160] J. G. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, H. U. May, F. W. Lichtenthaler, *Z.Naturforsch.(C)* **1997**, *52*, 15.

-
- [161] P. R. Crippa, A. Vecchi, C. Viappiani, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **1994**, *24*, 3.
- [162] W. Urban, *Infrared Phys. Technol.* **1995**, *36*, 465.
- [163] H. Dahnke, J. Kahl, G. Schüler, W. Boland, W. Urban, F. Kühnemann, *Appl. Phys. B-Lasers and Opt.* **2000**, *70*, 275.
- [164] D. S. Cafiso, *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* **1994**, *23*, 141.
- [165] M. S. P. Sansom, *Q. Rev. Biophys.* **1993**, *26*, 365.
- [166] J. Engelberth, T. Koch, F. Kühnemann, W. Boland, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* **2000**, *39*, 1860.
- [167] J. Engelberth, T. Koch, G. Schüler, N. Bachmann, J. Rechtenbach, W. Boland, *Plant Physiol.* **2001**, *in Druck*.
- [168] J. Piel, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Bonn), **1997**.
- [169] F. Elstner, W. Oßwald, I. Schneider, *Phytopathologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [170] K. Mendgen, H. Deising, *New Phyt.* **1993**, *124*, 193.
- [171] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680.
- [172] H. Blum, H. Beier, H. J. Gross, *Electrophoresis* **1987**, *8*, 93.
- [173] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.

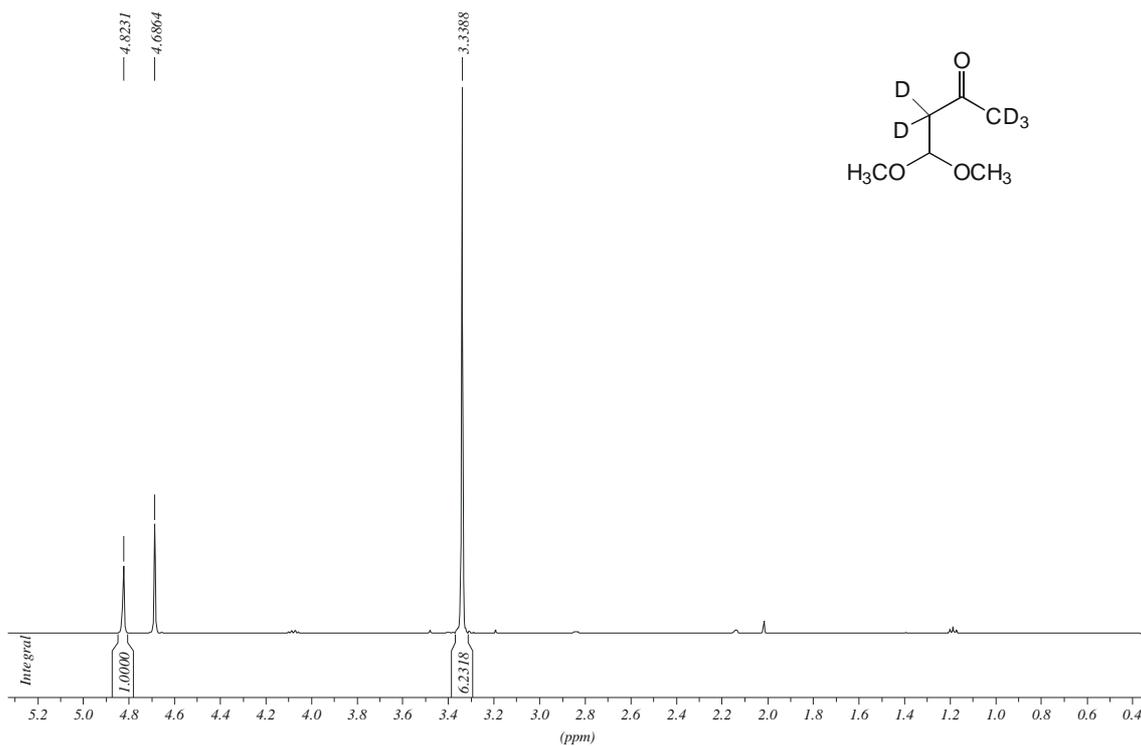
7 Anhang

7.1 Spektren

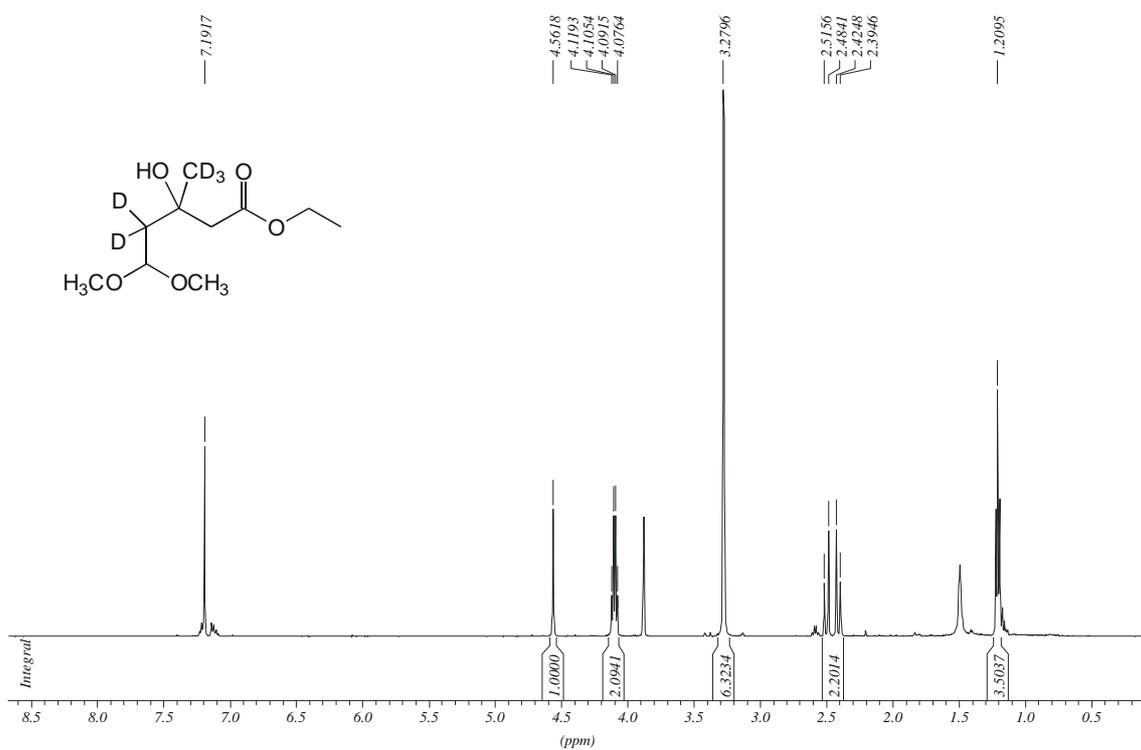
7.1.1 ^1H -NMR-Spektren



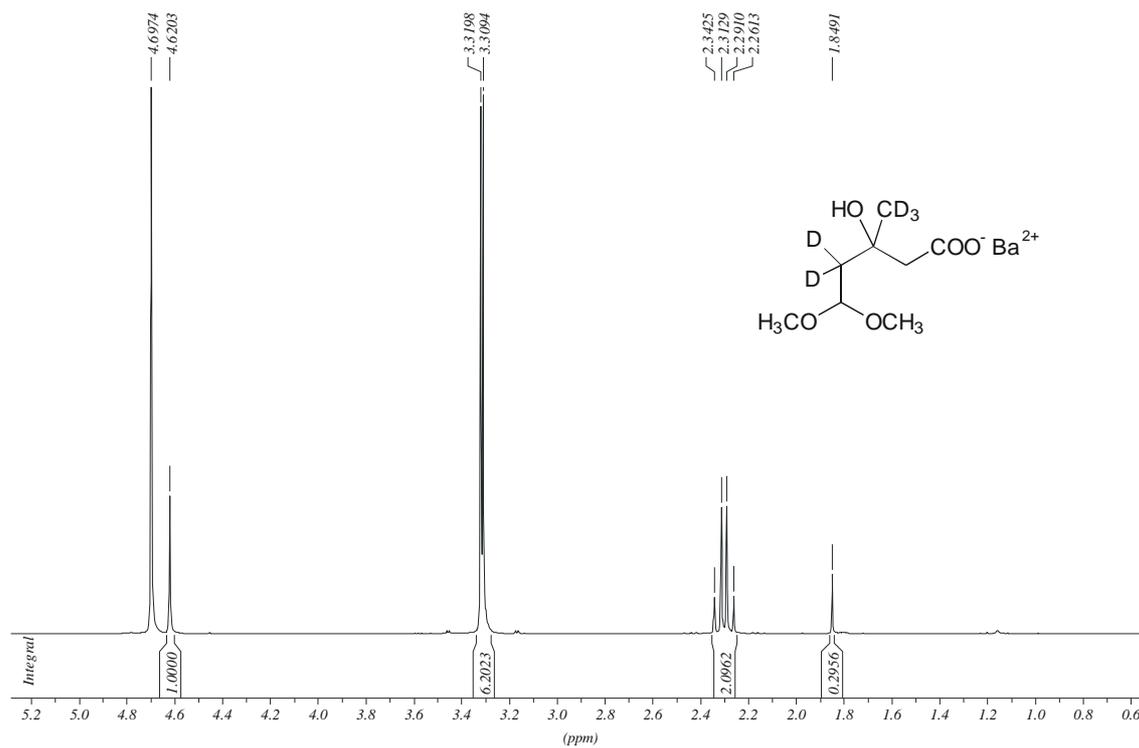
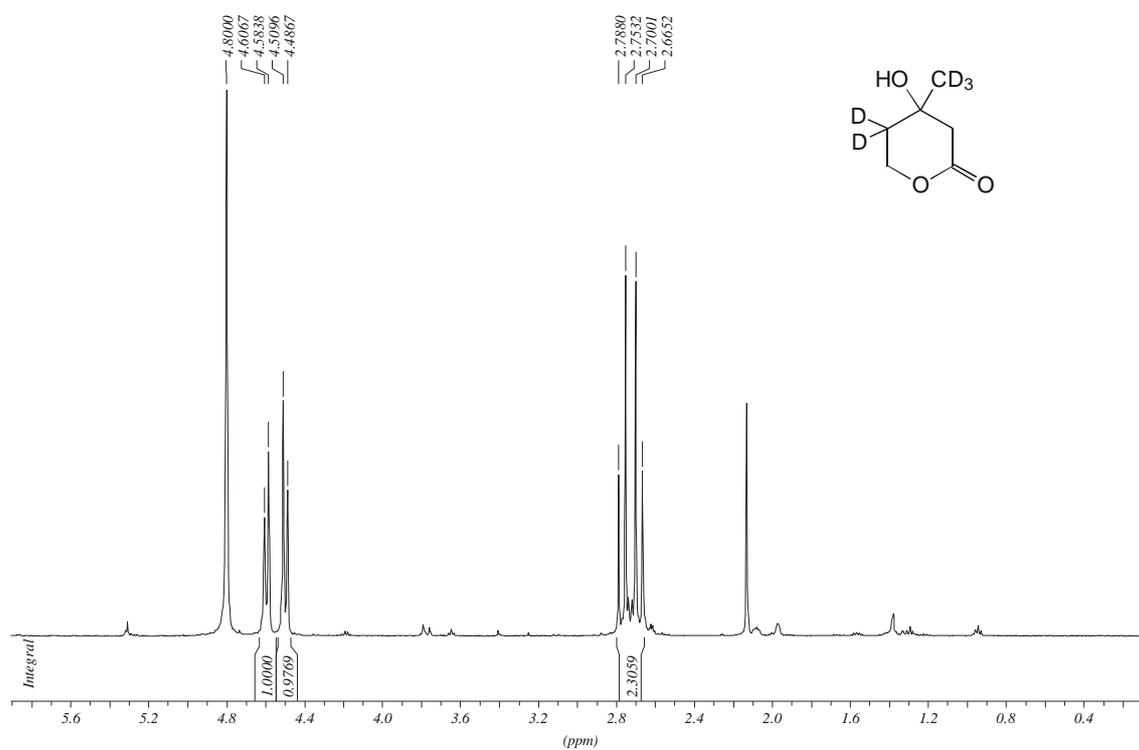
[5,5- $^2\text{H}_2$]-1-Deoxy-D-Xylulose **41**

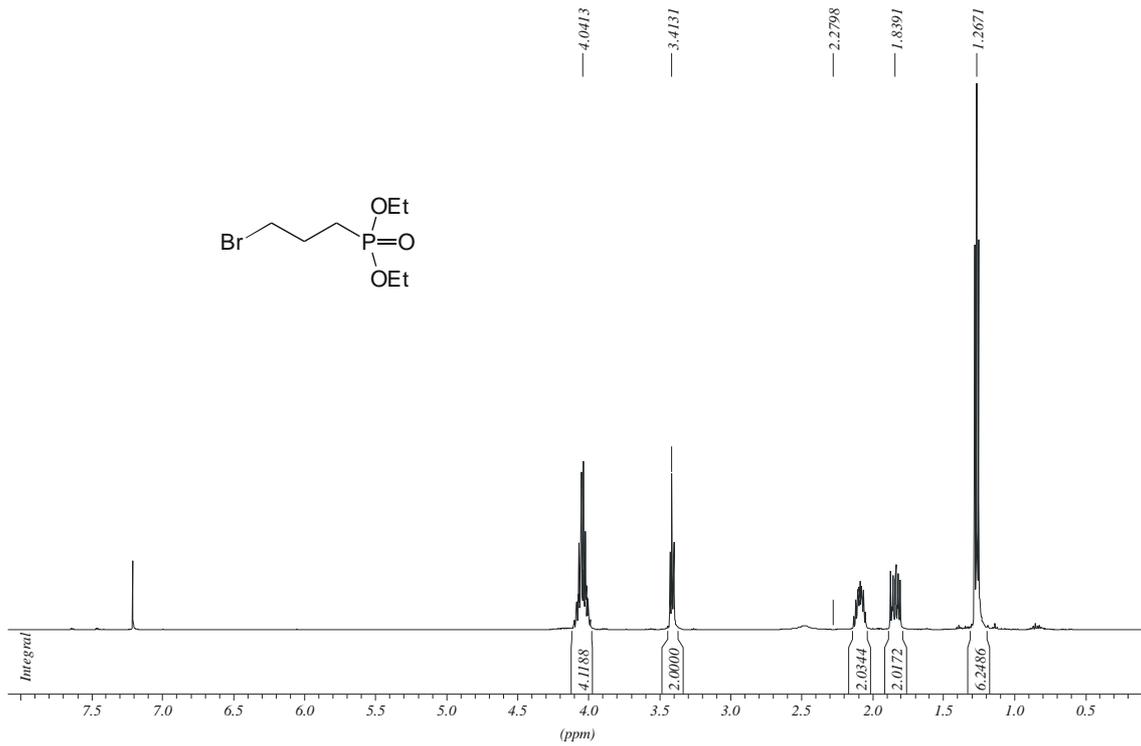


[2,2,4,4,4- $^2\text{H}_5$]-3-Oxobutyaldehyd-dimethylacetal **49a**

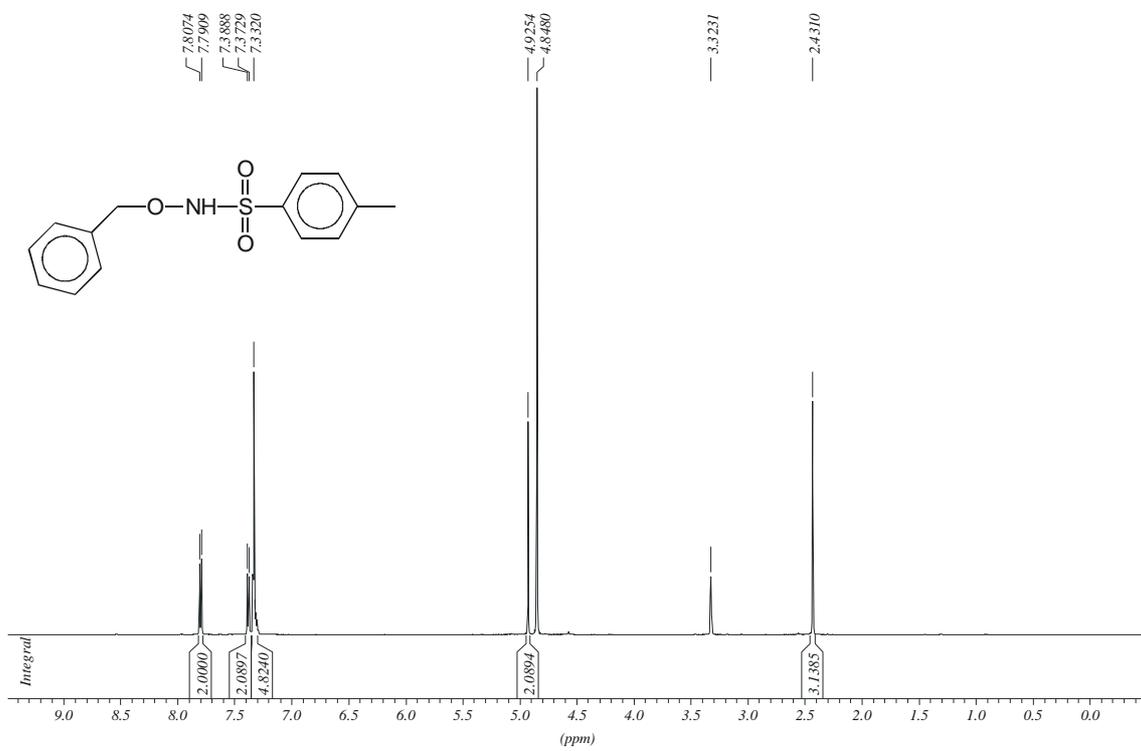


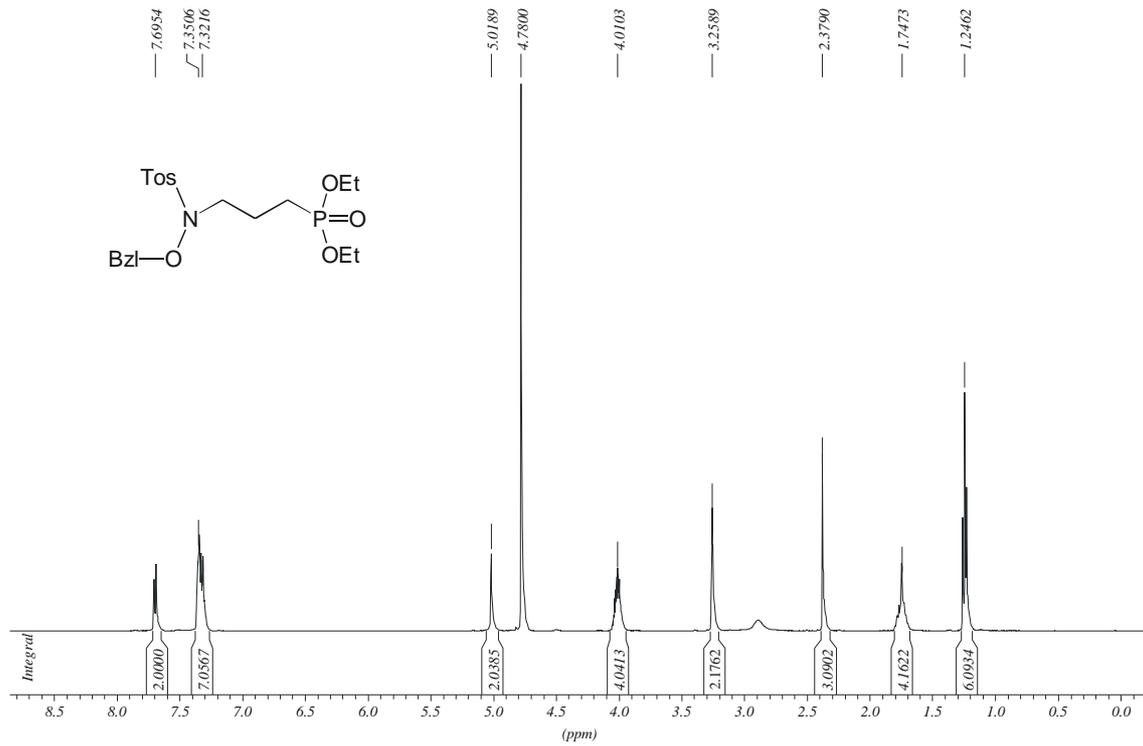
[3,3,3,4,4- $^2\text{H}_5$]-3-Hydroxy-3-methyl-5,5-dimethoxyvalerylsäureethylester **50**

Barium-[3,3,3,4,4-²H₅]-3-Hydroxy-3-methyl-5,5-dimethoxyvalerylát **51**[4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton **42**

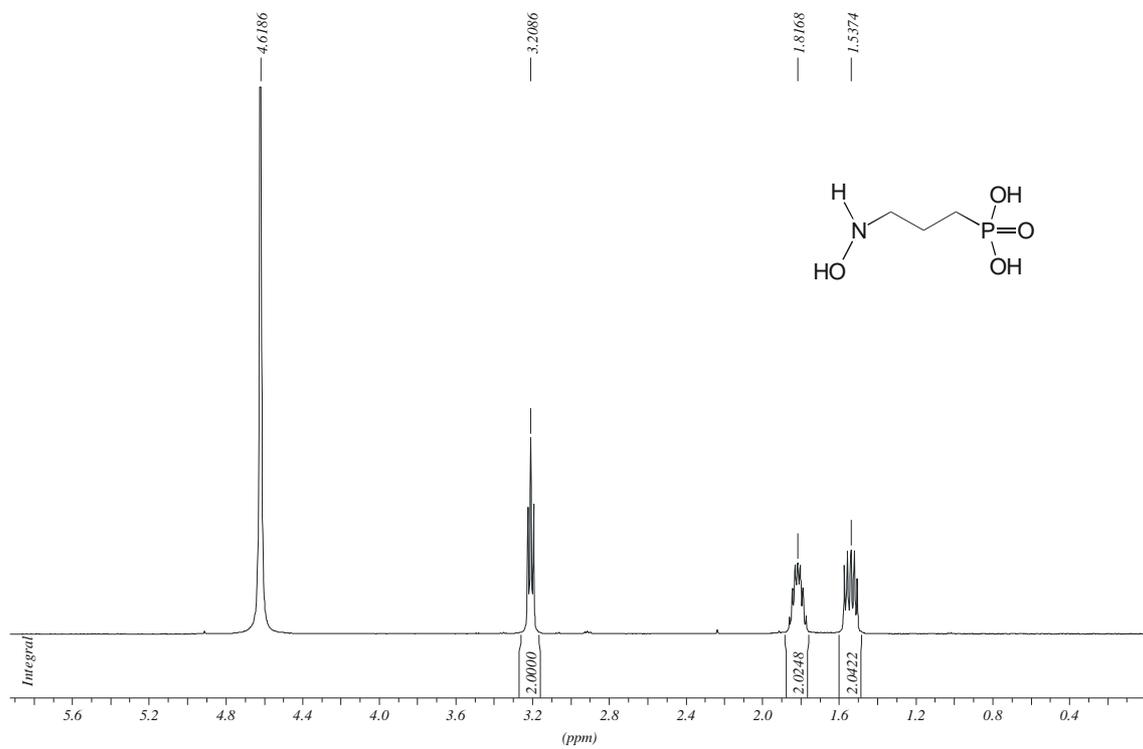


Diethyl-3-Bromopropylphosphonat

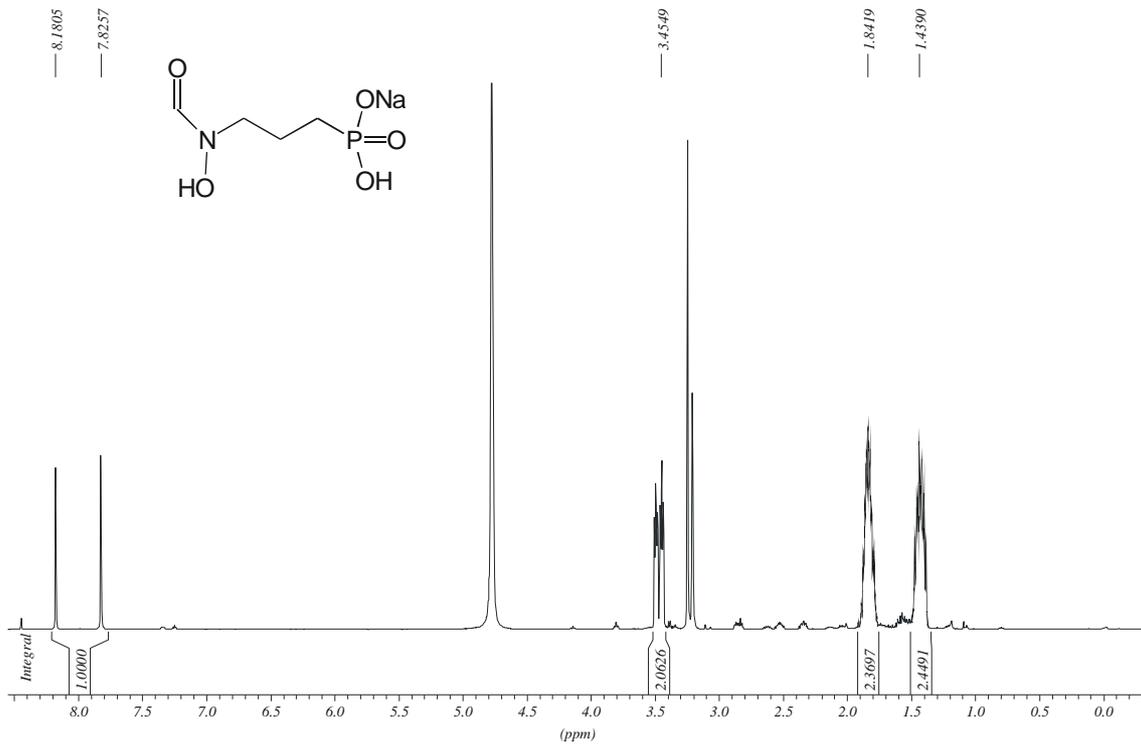
*N*-Benzyloxy-*p*-toluolsulfonamid



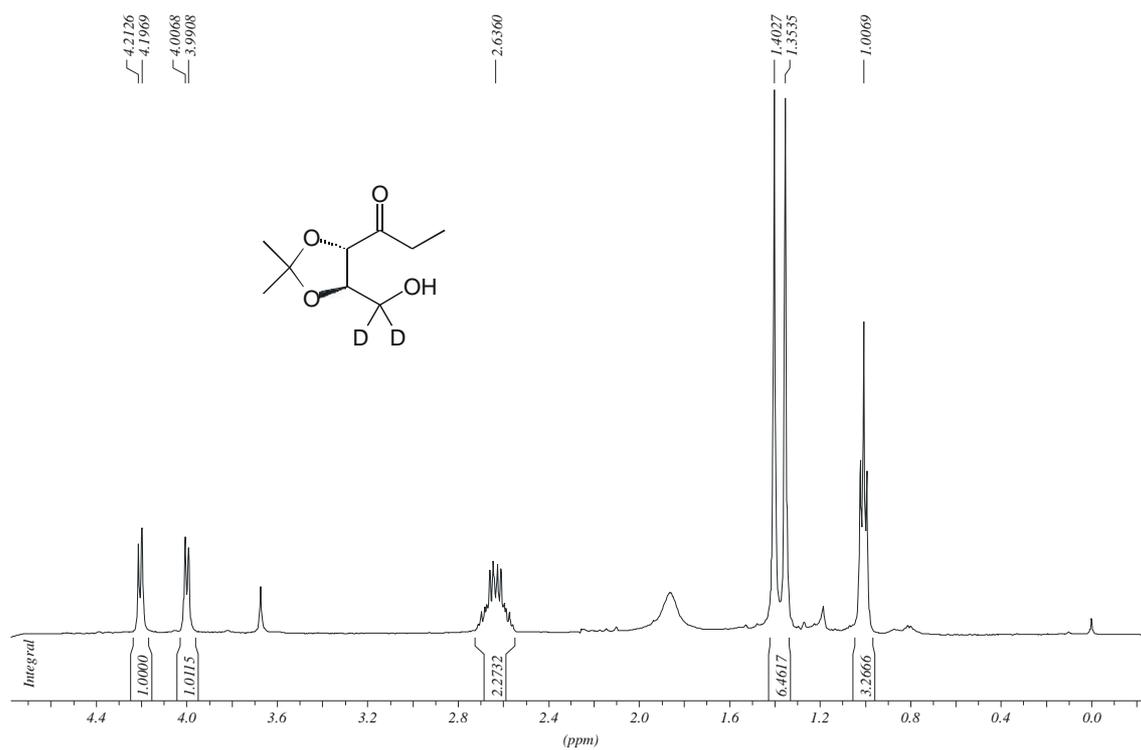
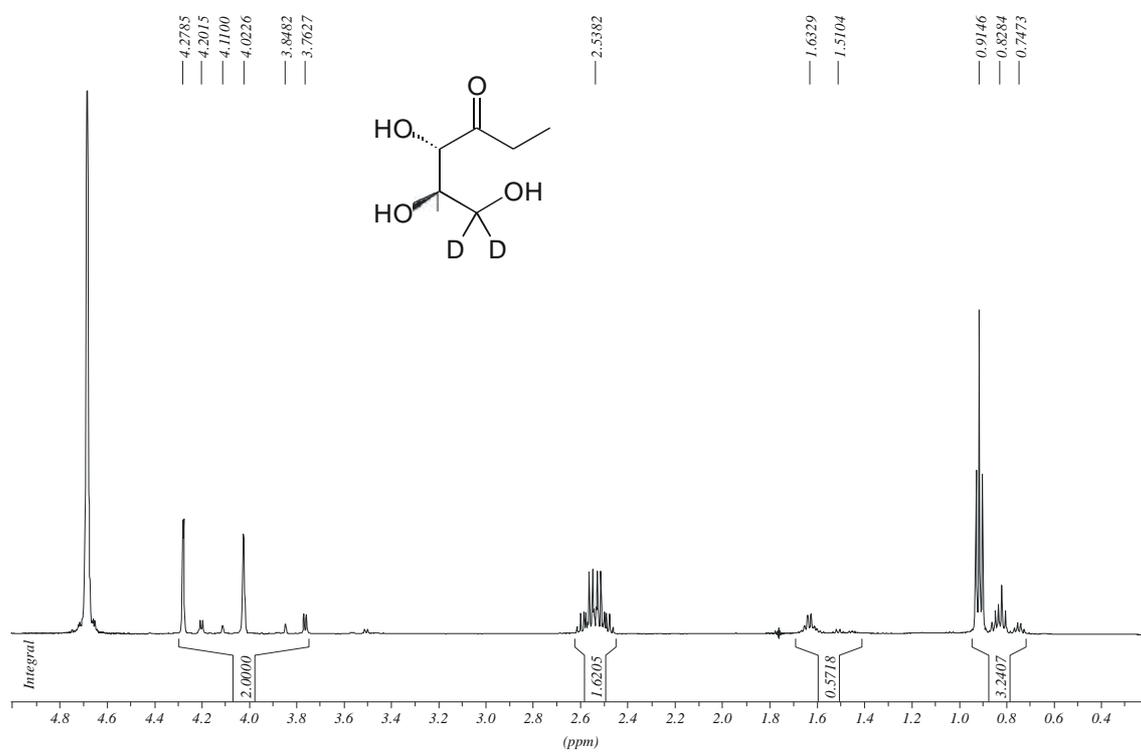
Diethyl-3-[N-Benzyloxy-N-tosylamino]-propylphosphonat

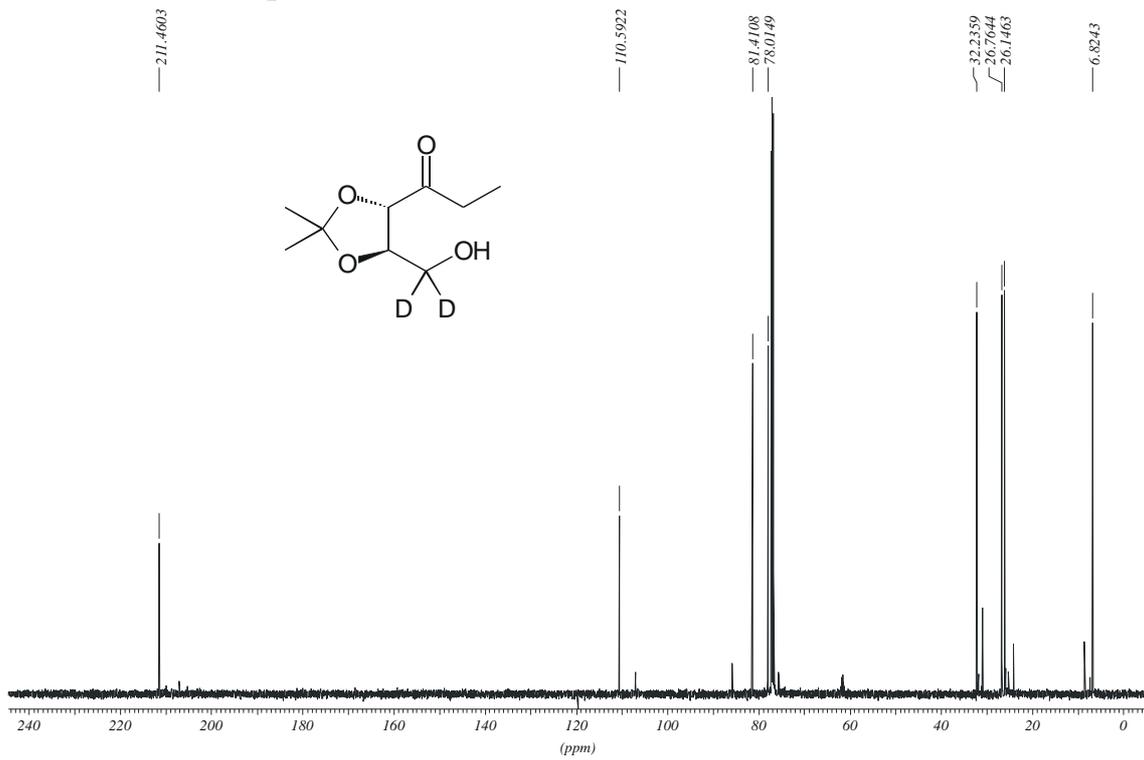
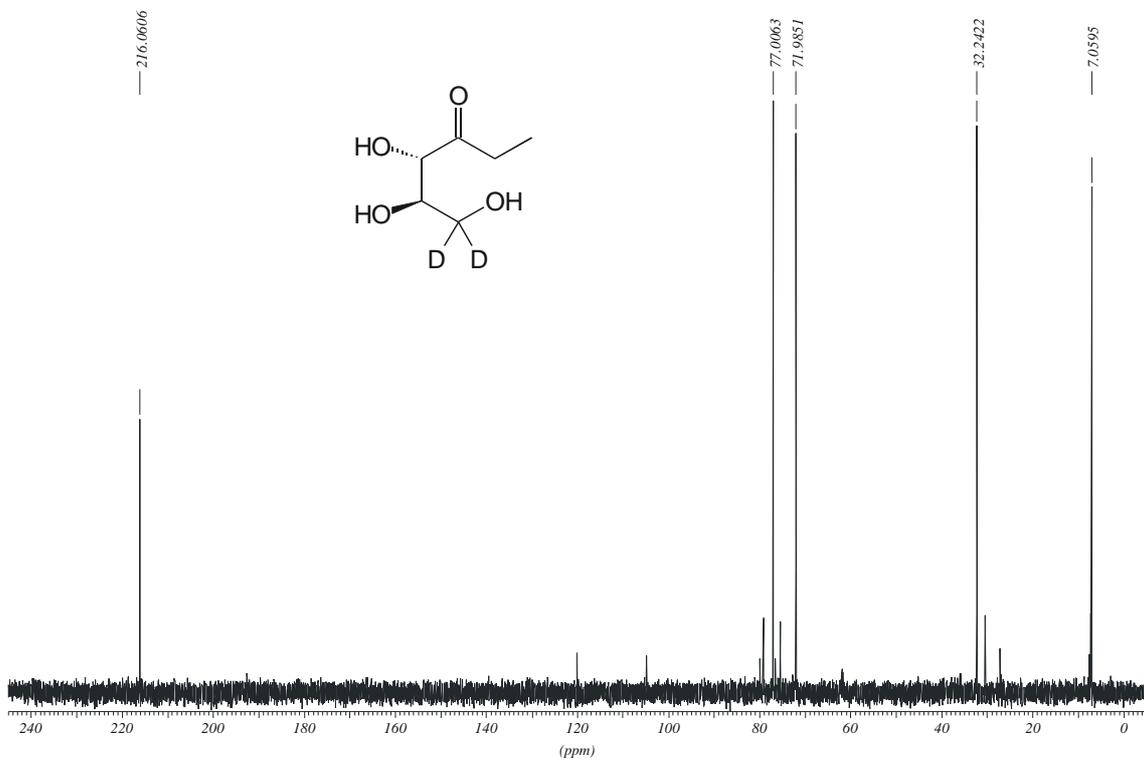


3-[N-Hydroxyamino]-propylphosphonsäure

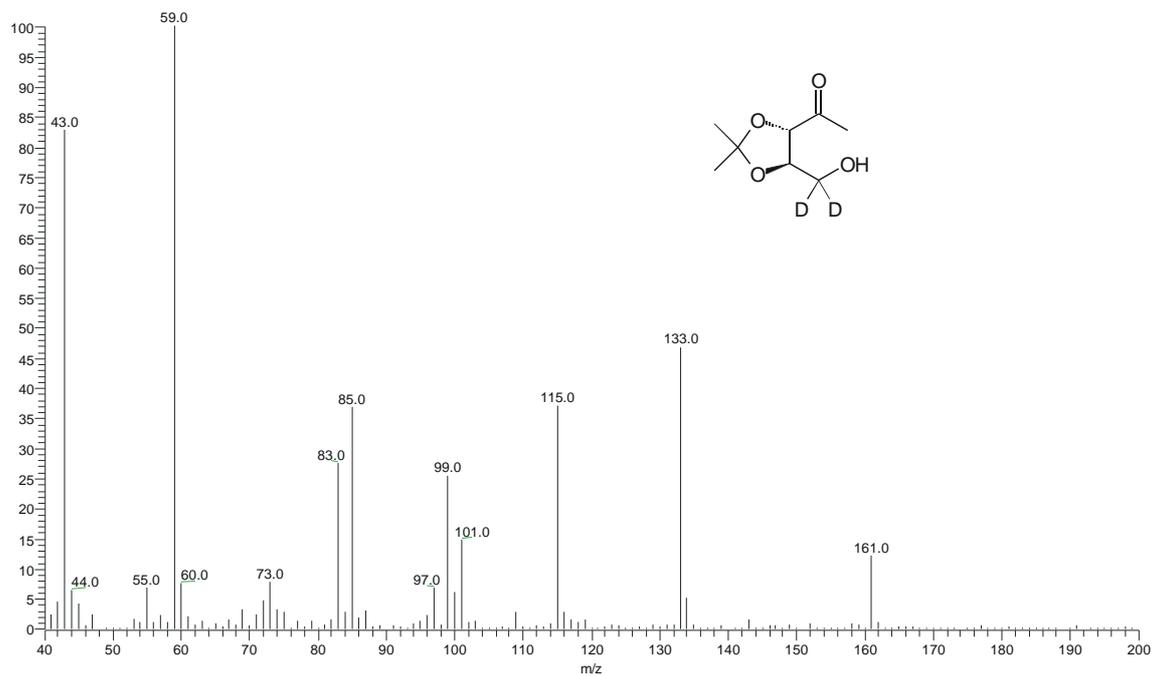
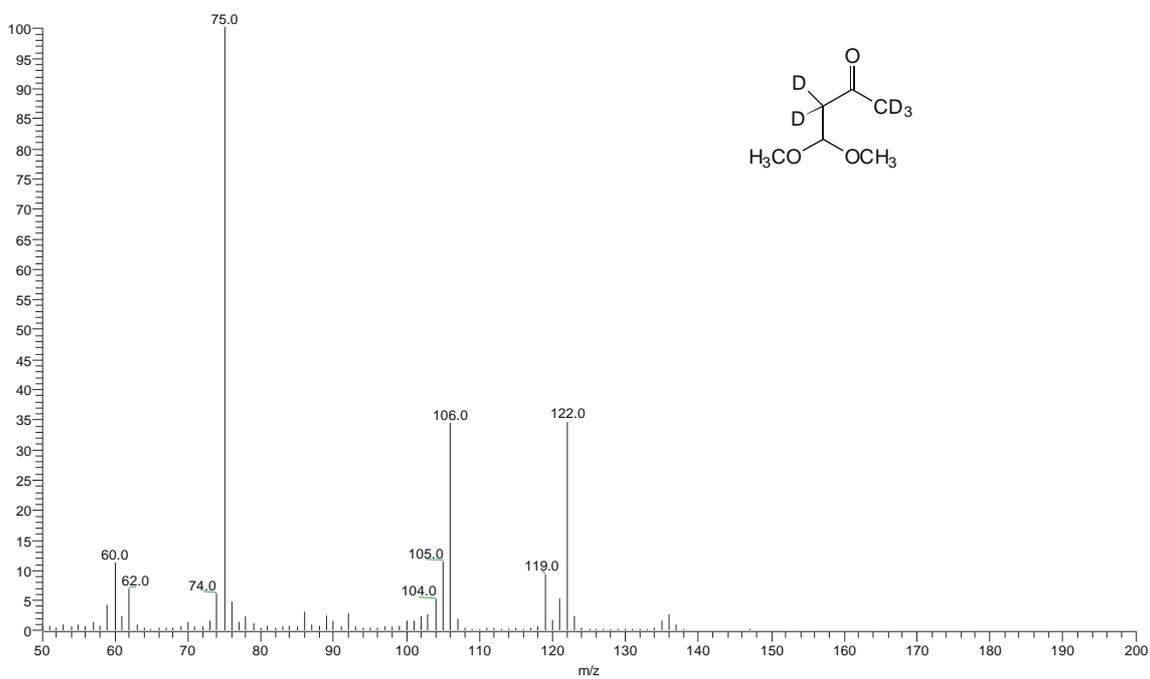


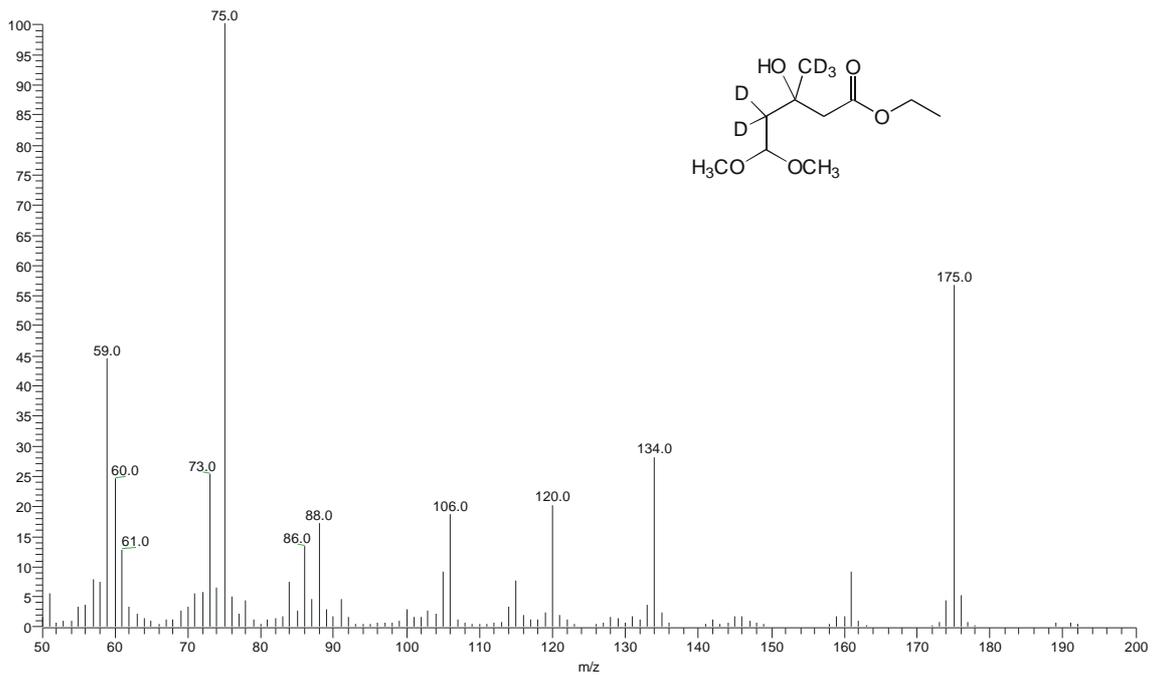
Mono-Natrium-3-[N-formyl-N-Hydroxyamino]-propylphosphonsäure **59**

[6,6-²D₂]-3,4-*O*-Isopropyliden-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **68**1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **69**

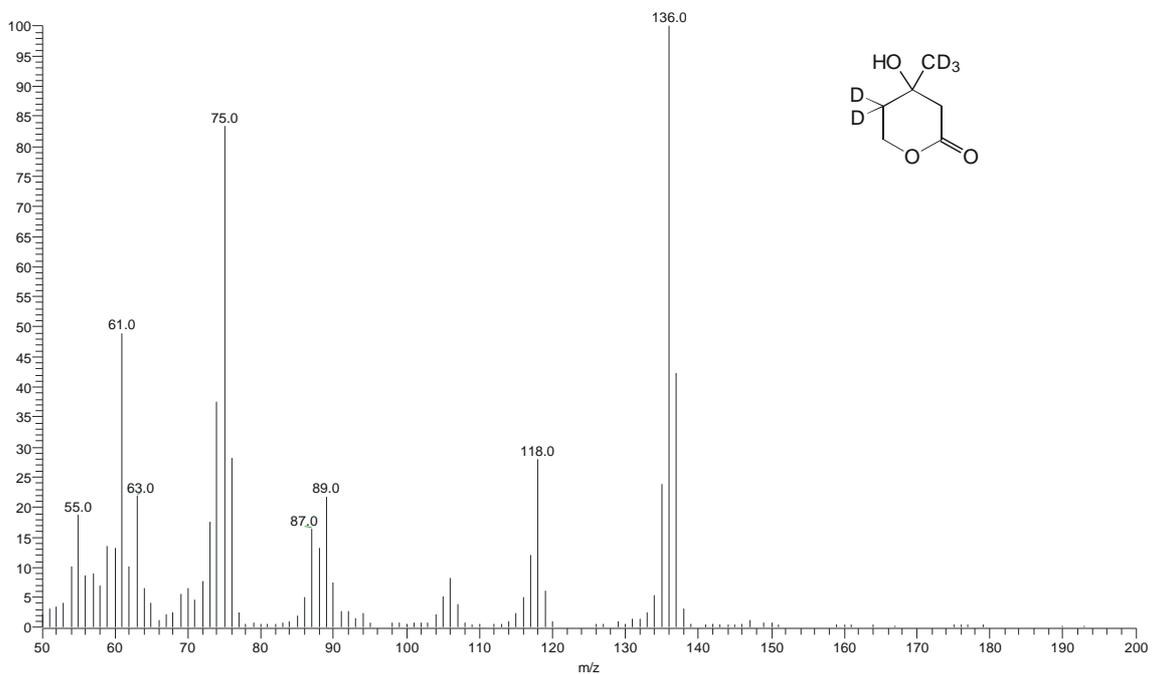
7.1.2 ^{13}C -NMR-Spektren[6,6- $^2\text{D}_2$]-3,4-*O*-Isopropyliden-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **68**1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **69**

7.1.3 Massenspektren

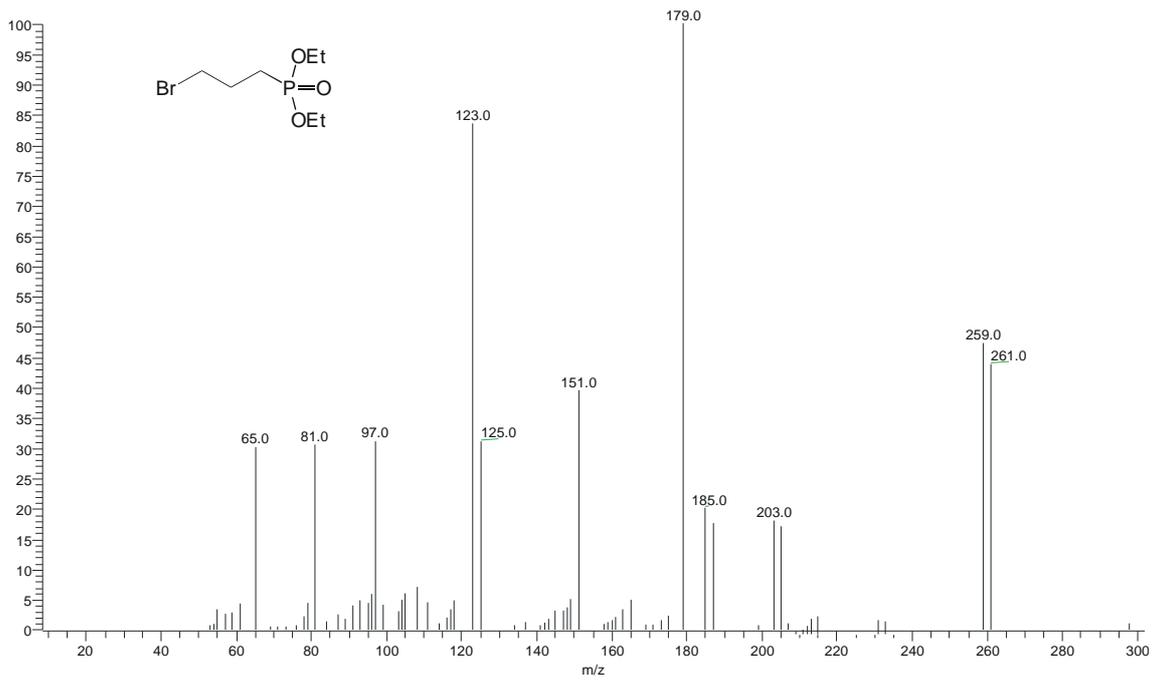
[5,5-²H₂]-1-Deoxy-D-Xylulose **41**[2,2,4,4,4-²H₅]-3-Oxobutyaldehyd-dimethylacetal **49a**



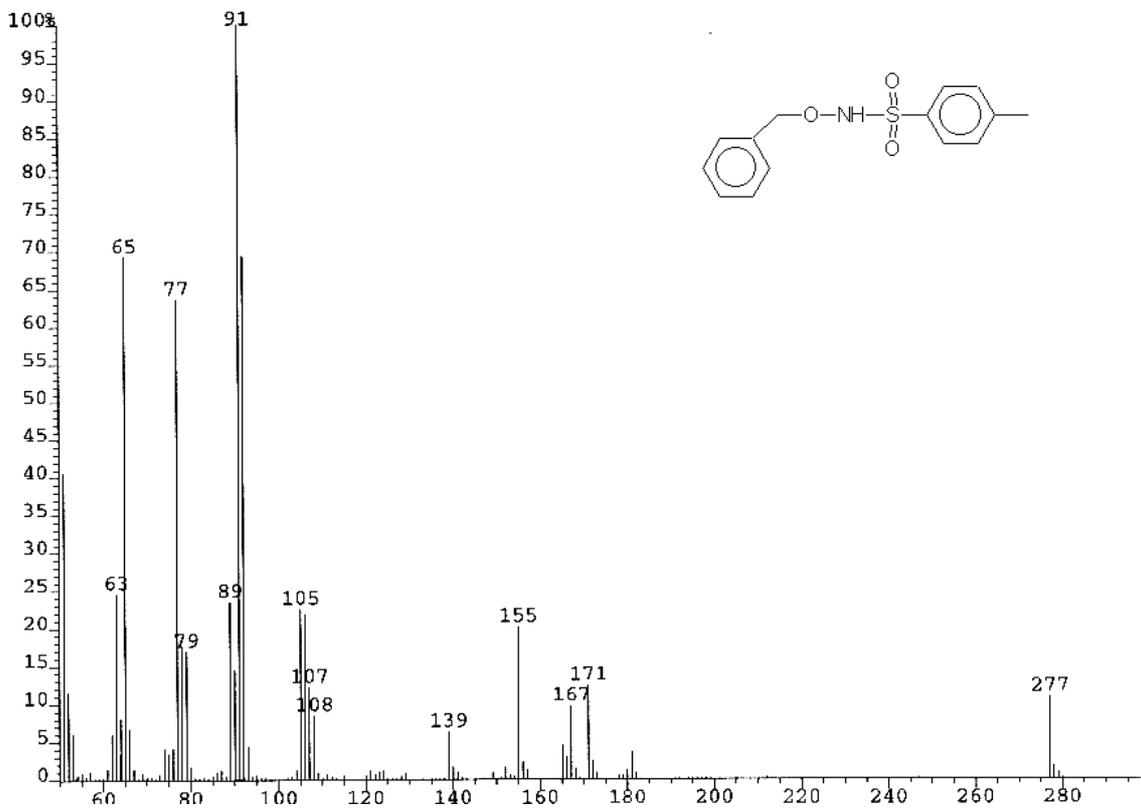
[3,3,3,4,4-²H₅]-3-Hydroxy-3-methyl-5,5-dimethoxyvalerylsäureethylester **50**



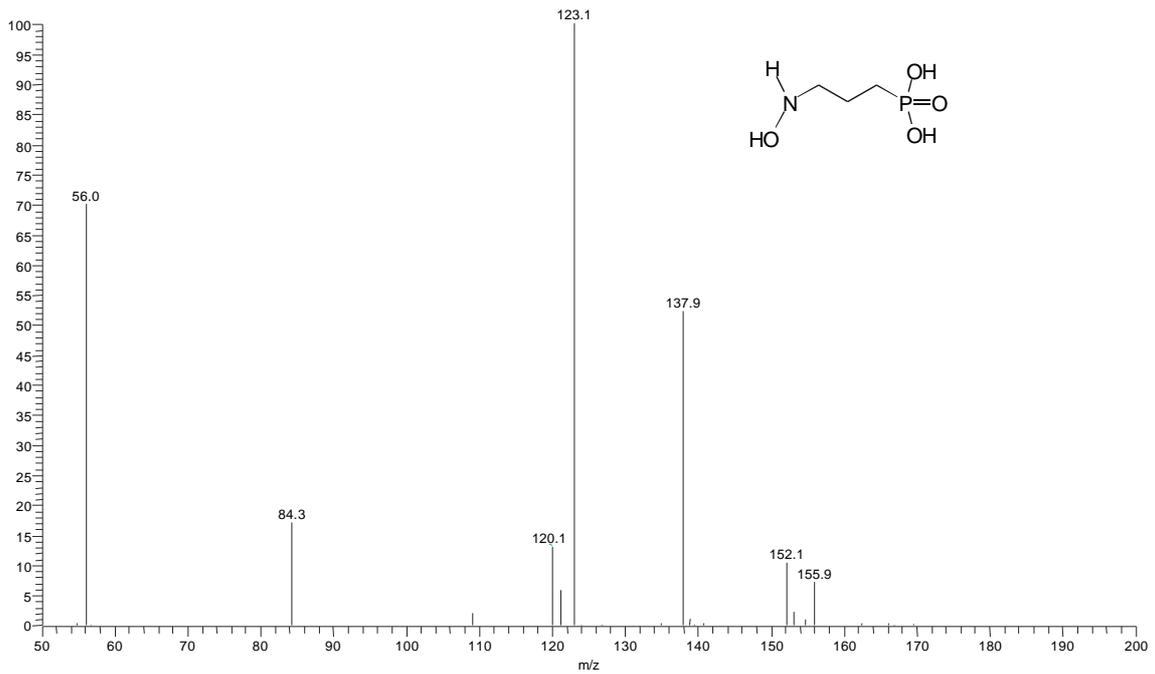
[4,4,6,6,6-²H₅]-Mevalolacton **42**



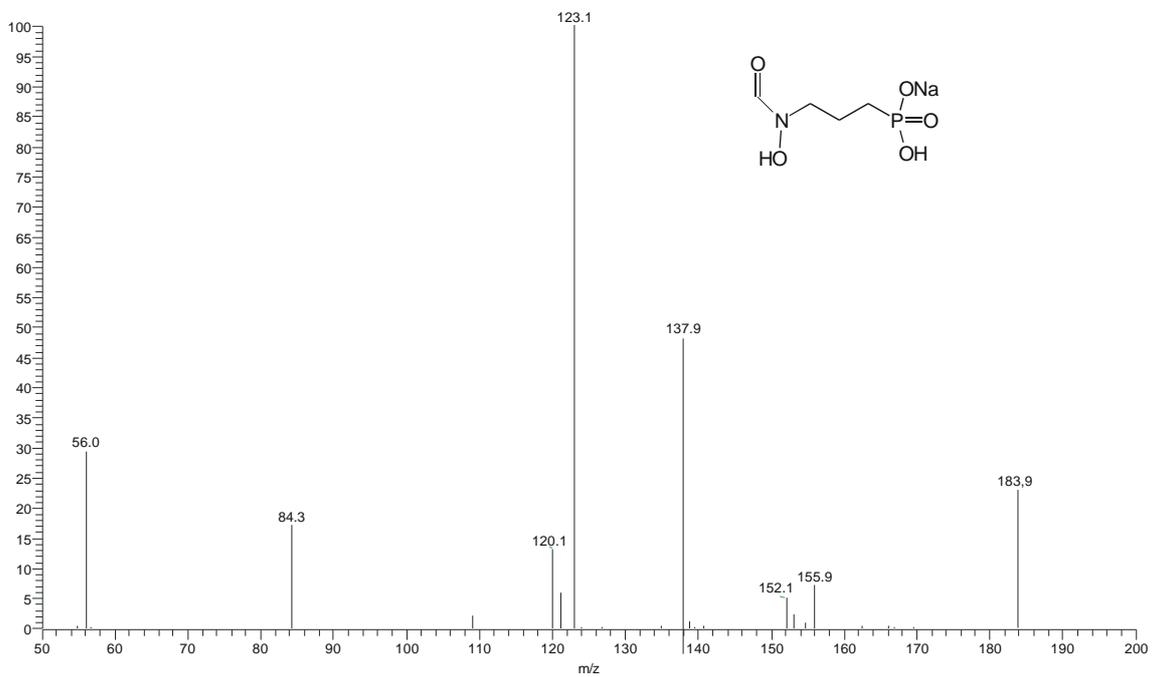
Diethyl-3-Bromopropylphosphonat

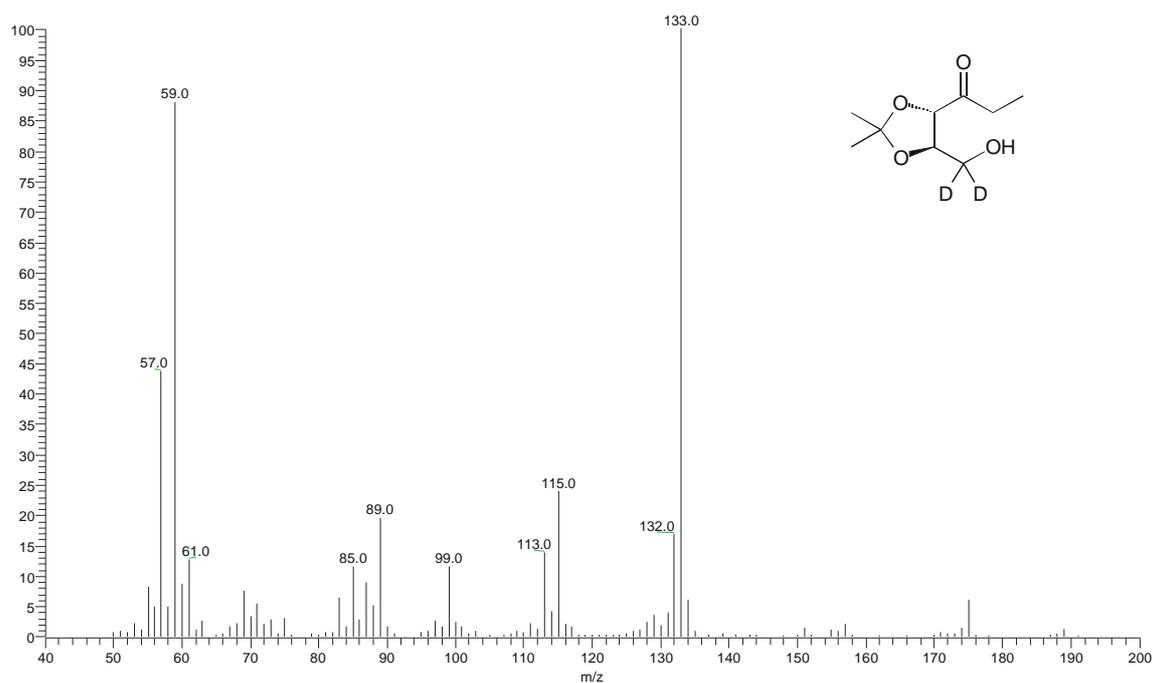


N-Benzyloxy-p-toluolsulfonamid

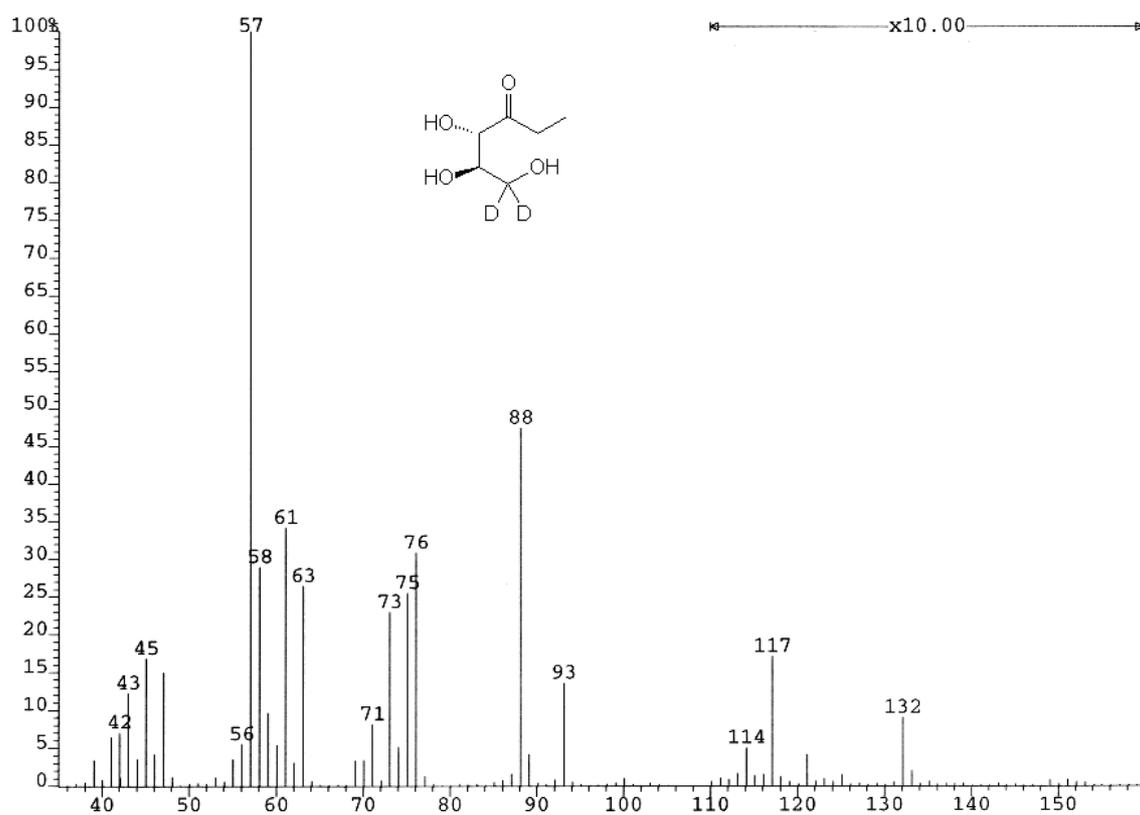


3-[N-Hydroxyamino]-propylphosphonsäure

Mono-Natrium-3-[N-formyl-N-Hydroxyamino]-propylphosphonsäure **59**

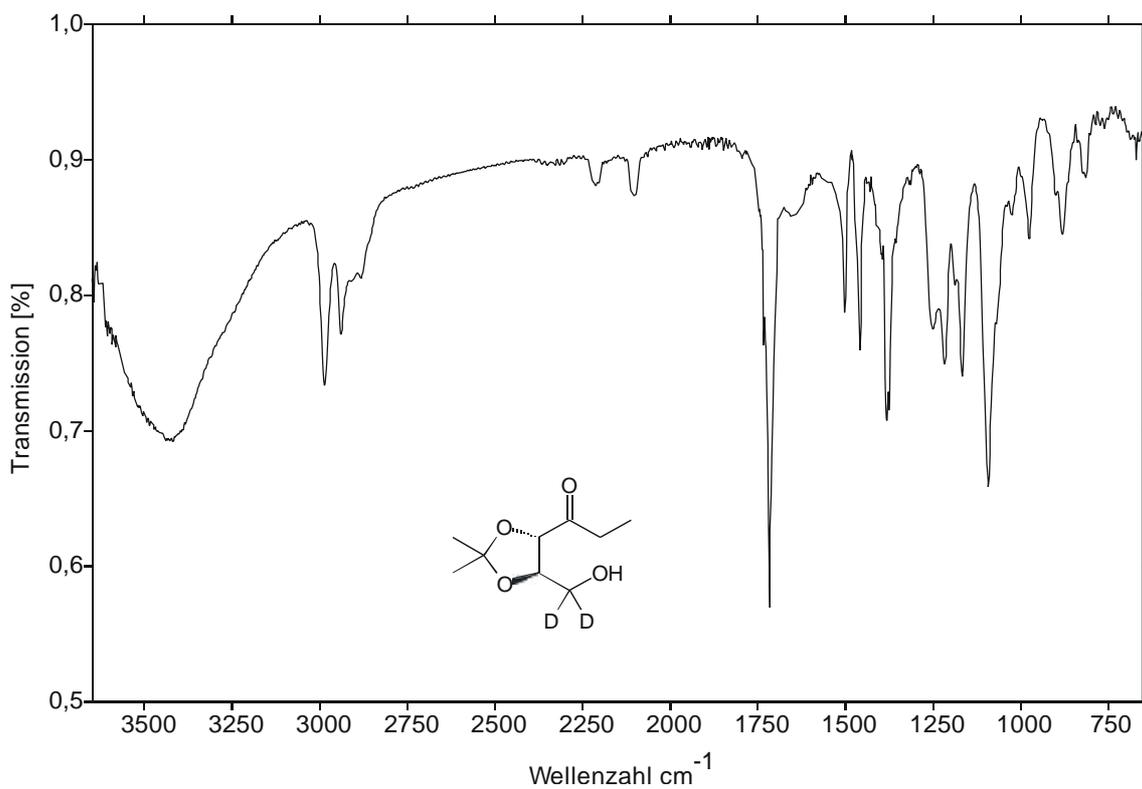


[6,6-²D₂]-3,4-*O*-Isopropyliden-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **68**

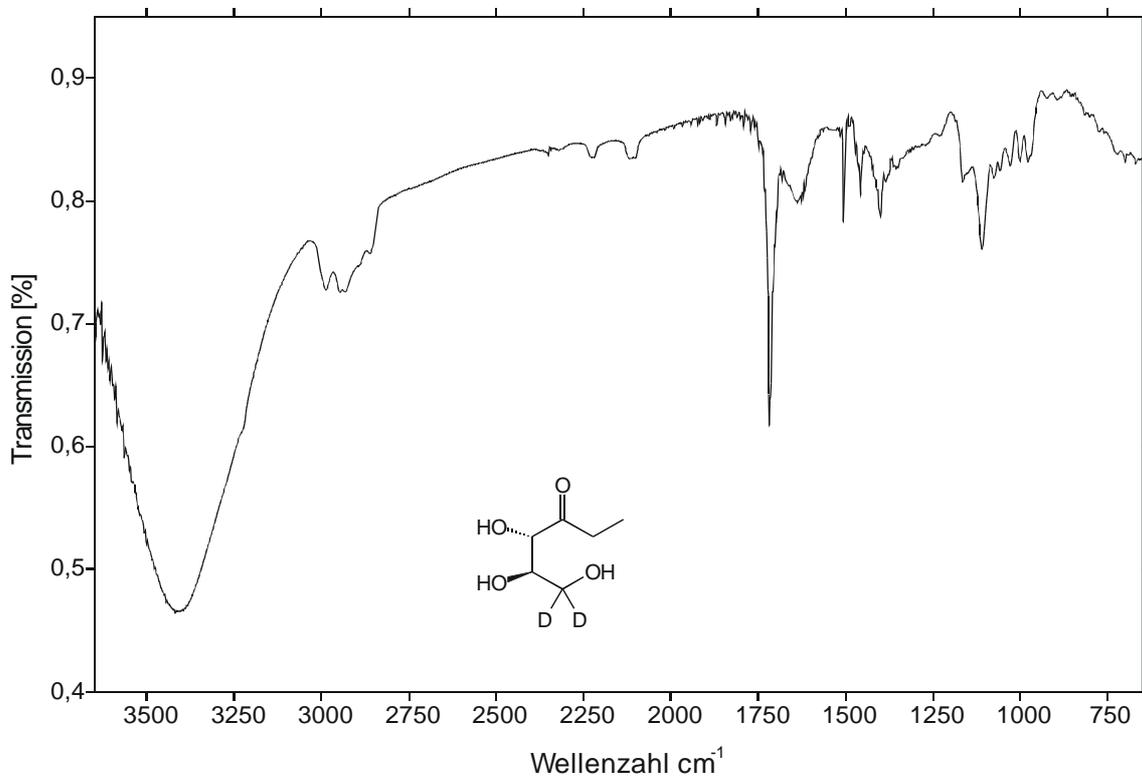


1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **69**

7.1.4 IR-Spektren



[6,6-²D₂]-3,4-*O*-Isopropyliden-1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **68**



1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose **69**

7.2 Abkürzungsverzeichnis

ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
AMP	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
Bzl	<u>B</u> enzoyl
CDP	<u>C</u> ytidin <u>d</u> iphosphat
CDP-ME	4-(<u>C</u> ytidin-5'- <u>d</u> iphospho)-2- <u>C</u> - <u>M</u> ethyl-D- <u>e</u> rythritol
CDP-ME2P	2- <u>P</u> hospho-4-(<u>C</u> ytidin-5'- <u>d</u> iphospho)-2- <u>C</u> - <u>M</u> ethyl-D- <u>e</u> rythritol
CMP	<u>C</u> ytidin <u>m</u> onophosphat
CoA	<u>C</u> oenzym <u>A</u>
CTP	<u>C</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
DMAPP	<u>D</u> imethylallylpyrophosphat
DOX	1- <u>D</u> eoxy-D- <u>x</u> ylulose
DXP	1- <u>D</u> eoxy-D- <u>x</u> ylulose-5-phosphat
FPP	Farnesylpyrophosphat
GAP	<u>G</u> lycerinaldehyd-3-phosphat
GC-C-IRMS	gas <u>c</u> hromatograph <u>c</u> ombustion <u>i</u> sotope <u>r</u> atio <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry
GGPP	<u>G</u> eranylgeranylpyrophosphat
GPP	<u>G</u> eranylpyrophosphat
HMG	<u>H</u> ydroxymethylglutarat
HR	<u>h</u> ypersensitive <u>r</u> esponse
IRMS	<u>i</u> sotope <u>r</u> atio <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry
IPP	<u>I</u> sopentenylpyrophosphat
MVA	<u>M</u> evalonsäure (acid)
PLE	Schweinelebersterase (pig liver <u>e</u> sterase)
Rubisco	<u>R</u> ibulose <u>b</u> isphosphat- <u>C</u> arboxylase
SAR	<u>s</u> ystemic <u>a</u> quired <u>r</u> esistance
SDS-Page	sodium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate - poly <u>a</u> crylamide gel <u>e</u> lectrophoresis
TBAF	<u>T</u> etra <u>b</u> utylammonium <u>f</u> luorid
Tos	<u>T</u> osylat
vs	<u>v</u> ersus (gegen)
V-PDB	<u>V</u> ienna <u>P</u> ee <u>D</u> ee <u>B</u> elemnite
V-SMOW	<u>V</u> ienna <u>s</u> tandard <u>m</u> ean <u>o</u> cean <u>w</u> ater

7.3 Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

- A.Jux, W.Boland, *Improved Protocol towards Isotopically Labelled 1-Deoxy-D-Xylulose*, Tetrahedron Letters, 40, **1999**, 6913-6914.
- Boland W. Engelberth J. Piel J. Jung V. Jux A. Koch T. Krumm T. Schuler G. *Induced biosynthesis of terpenoid insect semiochemicals in plants*. Chemicke Listy. 93(Suppl.), S1-S69, **1999**.
- A.Jux, G.Gleixner, W.Boland, *Natürliche $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse erlauben die Zuordnung von Terpenen zur Methylerythrolphosphat oder der Mevalonat-Route: Dynamische Ressourcenverwaltung in induzierten Pflanzen*, Angewandte Chemie, **2001**, in Druck.

Posterpräsentationen:

- 15th annual conference of the International Society of Chemical Ecology, August 1998, Ithaca (NY), USA. *Cellulysin is a high molecular elicitor of plant volatile biosynthesis"*
- 4th Dutch German Workshop on Plant Secondary Metabolism, Bad Herrenalb, Germany, Oktober 1998, *Volatile Biosynthesis in Plants; Mevalonate-Dependent and Independent Pathways for Terpenoid Biosynthesis*
- Botaniker Tagung 2000, Jena, August 2000, *Dehydrogeosmin: Ecology and Biosynthesis of an unique Volatile from Cactus Flowers*

Vorträge:

- Fränkisch Mitteldeutsches Naturstofftreffen, Würzburg, Mai 1999, *Terpenbiosynthese in gestreßten Pflanzen*
- Pflanzliche Lipide, Göttingen, Juni 1999, *Optimierte Darstellung isotopenmarkierter 1-Deoxy-D-Xylulose und ihr Einbau in pflanzliche Terpenoide*
- Fränkisch Mitteldeutsches Naturstofftreffen, Jena, November 2000, *Zur Biosynthese fraßinduzierten terpenoider Duftstoffe der Limabohne*
- TerpNet, Bonn, März 2001, *Differential Induction of Terpenoid Biosynthesis in Lima Beans by Microbial and Insect Elicitors*

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Andreas Jux

geb. 15 Juni 1971 in Bensberg

Schulbildung

1978 - 1982

Grundschule in Bergisch Gladbach

1982 - 1991

Dietrich Bonhoeffer Gymnasium in Bergisch Gladbach

Hochschulausbildung

1991 - 1997

Studium der Chemie an der Universität zu Köln

05/1994

Diplomvorprüfung

10/1996

Diplomhauptprüfung

11/1996 - 08/1997

Diplomarbeit mit dem Thema "Evaluierung der Festphasenmikroextraktion für den hpl-chromatographischen Nachweis von Lipiden" Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Marner, Universität Köln

Promotion

seit 11/1997

Mit dem Thema "Frühe Stufen des Terpenstoffwechsels", im Arbeitstreis von Prof. Dr. W. Boland, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena

Berufliche Tätigkeit

07/1994, 09/1994

Werksstudent bei der Bayer AG Leverkusen im Bereich WV Umweltschutz

01/1997 - 06/1997

Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie der Universität zu Köln

01/1998 - 12/1999

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

seit 01/1999

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena

7.5 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland für die hochinteressante und spannende Aufgabenstellung, sowie für die anregenden Diskussionen und die ausgezeichnete Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Ernst Anders danke ich für die unkomplizierte Betreuung von Seiten der Friedrich-Schiller Universität Jena.

Für die sehr gute Zusammenarbeit beim Messen der Isotopenverhältnisse danke ich Herrn Dr. Gerd Gleixner und Steffen Rühlow, Herrn Dipl. Biol. Boris Schlumpberger für die gemeinsame Untersuchung der Kakteendüfte und die stete Versorgung mit Blüten und Proben, Herrn PD. Dr. Frank Kühnemann für die photoakustischen Messungen der Isoprenemission und Herrn Prof. Dr. Kurt Mendgen für die Beteiligung an den Rostinfektionsstudien.

Meinen Arbeitskollegen Dr. Stefan Bartram, Christoph Beckmann, Angelika Berg, Anja Biedermann, Dr. Rita Büchler, Dr. Jürgen Engelberth, Dr. Birte Feld, Oliver Fietz, Dr. Gereon Glombitza, Dr. Christian Hertweck, Dr. Marc Hombeck, Dr. Michal Hoskovic, Dr. Andrew Jarvis, Verena Jung, Thomas Koch, Dr. Thomas Krumm, Jürgen Kuhn, Dr. Maritta Kunert, Ryan Lauchli, Andrea Lehr, Dr. Patrice Marchand, Dr. Gerog Pohnert, Dr. Jörn Piel, Dr. Iris Schnitzler, Jana Schubert, Dr. Göde Schüler, Heike Send, Dr. Christoph Steinbeck, Dieter Spittler, Sabine Thiessen, Oliver Thum, Dr. Elke Übler und Grit Winnefeld für das angenehme Klima und ihre Unterstützung.

Meinen HiWis Katrin Giggel und Hannes Notni für die tatkräftige Unterstützung

Andrea Lehr für die gute Zusammenarbeit beim Aufreinigen des Cellulysins

Angelika Berg für die kontinuierliche Versorgung mit Bohnen, sowie Jana Schubert und Anja Biedermann für die Pflege der Lebermooskulturen.

Dr. Renate Ellinger und PD. Dr. Bernd Schneider für die Aufnahme der NMR-Spektren

Janine Rattke und Dr. Neil Oldham für die Aufnahme der MS-Spektren.

Ulrike Krause und Linda Müller für die prompte Versorgung mit Literatur

Ein besonders großer Dank geht an Dr. Georg Pohnert und Dr. Iris Schnitzler für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

7.6 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Literatur angefertigt habe.

Jena,

(A. Jux)