

**Chemie und Immunbiologie
von Intermediaten der Isoprenoidbiosynthese**

Sabine Amslinger



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

2003

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Chemie und Immunbiologie
von Intermediaten der Isoprenoidbiosynthese**

Sabine Amslinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
3. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 12.05.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.07.2003 angenommen.

Meiner Familie

Jetzt sind die guten alten Zeiten, nach denen wir uns in zehn Jahren zurücksehnen werden.

Peter Ustinov

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von April 2000 bis Februar 2003 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie sowie am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. A. Bacher danke ich für das stete Interesse an meiner Arbeit und die vielfältigen Diskussionen.

Herrn Dr. F. Rohdich danke ich für die Unterstützung bei biochemischen Fragestellungen.

Herrn Dr. K. Kis danke ich für die große Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung des Syntheseteils.

Herrn Dr. W. Eisenreich danke ich für die Hilfe bei der NMR-Spektroskopie und sein immer offenes Ohr.

Herrn Dr. S. Bauer danke ich für die Bereitstellung des Know-how der Immunologie und die stete Diskussionsbereitschaft.

Dem Fonds der Chemischen Industrie, insbesondere Frau Dr. S. Kiefer, danke ich für die großzügige Unterstützung im Rahmen des Kekulé-Stipendiums.

Herrn F. Wendling danke ich, der in allen Fragen der HPLC- und Computerprobleme unermüdlich zu helfen wußte.

Allen Kollegen des Arbeitskreises danke ich für das gute Betriebsklima - insbesondere den Bewohnern des Hauptlabors (P. Adam, K. Gärtner, T. Gräwert, J. Kaiser, A. König, R. Laupitz, C. Liebl, T. Radykewicz und C. Schwarz), den alten und neuen Mitgliedern des Terpenprojekts (S. Hecht, C. Schuhr, J. Wungsintaweekul und F. Zepeck) sowie C. Graßberger und I. Obersteiner für deren Hilfe.

Den Kollegen am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene danke ich, welche mir den Einstieg in eine neue Welt ermöglicht haben, insbesondere auch den Vampiren aus der Hämatologie und deren Opfern (S. Bauer, T. Gräwert, S. Hamm, H. Hochrein, C. Huber, C. Wagner und F. Zepeck).

S. Bauer, W. Eisenreich, C. Huber und F. Rohdich danke ich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Und last but not least danke ich meinem Mann Holger für seine Unterstützung und Liebe, die so manches ermöglicht hat.

Publikationsliste

Amslinger, S.; Hecht, S.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Adam, P.; Bauer, S.; Bacher, A. Stimulation of V γ 9/V δ 2 T lymphocyte proliferation by the isoprenoid precursor, (E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-diphosphate. (eingereicht)

Rohdich, F.; Zepeck, F.; Adam, P.; Hecht, S.; Kaiser, J.; Laupitz, R.; Gräwert, T.; Amslinger, S.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D. (2003) The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1586-1591.

Hecht, S.; Amslinger, S.; Jauch, J.; Kis, K.; Trentinaglia, V.; Adam, P.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Rohdich, F. (2002) Studies on the non-mevalonate isoprenoid biosynthetic pathway. Simple methods for preparation of isotope-labeled (E)-1-hydroxy-2-methylbut-2-enyl 4-diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **43**, 8929-8933.

Rohdich, F.; Hecht, S.; Gärtner, K.; Adam, P.; Krieger, C.; Amslinger, S.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1158-1163.

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Isoprenoidbiosynthese	1
1.1.1	Der Mevalonat-Biosyntheseweg	2
1.1.2	Der Desoxyxylulosephosphat-Biosyntheseweg	3
1.2	Das Immunsystem	5
1.2.1	Das angeborene Immunsystem	5
1.2.2	Das erworbene Immunsystem	7
1.2.3	$\gamma\delta$ -T-Zellen	8
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Materialien	11
2.1.1	Chromatographie-Materialien	11
2.1.2	Färbereagenzien	12
2.1.3	Phosphorylierungsreagenzien	12
2.1.4	Szintillatorflüssigkeit	13
2.1.5	Puffer	13
2.1.6	Kulturmedien	13
2.1.7	Verwendete Wachstumsfaktoren	13
2.1.8	Antikörper	14
2.1.9	ELISA	14
2.2	Geräte	15
2.3	Methoden	18
2.3.1	Synthese von (<i>E</i>)-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat (E-23)	18
2.3.1.1	Acetonyl-tetrahydropyranyloxy (17)	18
2.3.1.2	(<i>E</i>)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (E-19)	18
2.3.1.3	(<i>E</i>)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en-4-ol (E-20)	19
2.3.1.4	(<i>E</i>)-4-Chlor-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en (E-21)	20
2.3.1.5	(<i>E</i>)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enyl-4-diphosphat (E-22)	20
2.3.1.6	(<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23)	21
2.3.2	Synthese von (<i>E/Z</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E/Z-23)	22
2.3.2.1	(<i>Z</i>)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (Z-19)	22

2.3.2.2	(Z)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en-4-ol (Z-20)	22
2.3.2.3	(Z)-4-Chlor-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en (Z-21)	22
2.3.2.4	(Z)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enyl-4-diphosphat (Z-22)	23
2.3.2.5	(Z)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (Z-23)	23
2.3.3	NMR-Titrationsexperimente zur Aufklärung der Konfiguration der Doppelbindung in [U- ¹³ C ₅]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (23)	23
2.3.3.1	<i>In vivo</i> Darstellung von [U- ¹³ C ₅]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat und [2- ¹⁴ C]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat	23
2.3.3.2	¹ H-NMR-Charakterisierung	23
2.3.3.3	¹³ C-NMR-Charakterisierung	24
2.3.4	Synthese von Strukturanalogen von (<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23)	25
2.3.4.1	(<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (24)	25
2.3.4.2	(<i>E</i>)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (25)	25
2.3.5	Synthese von IPP und DMAPP	25
2.3.6	Bestimmung der Konzentrationen von Syntheseprodukten in wäßrigen Lösungen	26
2.3.7	Immunologische Methoden	26
2.3.7.1	Isolierung von PBMC	26
2.3.7.2	Bestimmung der Zellzahl	27
2.3.7.3	Stimulierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen	27
2.3.7.4	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	28
2.3.7.5	Durchflußzytometrie	29
2.3.7.6	Bestimmung von EC ₅₀ -Werten	30
2.3.7.7	Stabilitätstests von E-23 in Zellkultur	30
2.3.7.8	ELISA-Analyse	32
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Synthese von (<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23)	35
3.1.1	Reaktion von Hydroxyaceton mit 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran	36
3.1.2	Synthese von (<i>E</i>)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (E-19)	36
3.1.2.1	Wittigreaktion zur Bildung von (<i>E/Z</i>)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (E/Z-19)	36
3.1.2.2	HPLC-Reinigung des (<i>E/Z</i>)-Gemisches von Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (E/Z-19)	38
3.1.3	DIBALH-Reduktion des Ethylesters (E-19) zum Alkohol (E-20)	38

3.1.4	Erzeugung des Allylchlorids E-21	39
3.1.5	Bildung der geschützten Diphosphatverbindung E-22	39
3.1.6	Entschützung des THP-Diphosphats E-22 zur Bildung von (<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23)	40
3.2	Strukturbestimmung von synthetischem (<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat E-23 mittels NOESY-Spektroskopie einer Mischung von (<i>E</i>)- und (<i>Z</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E/Z-23)	41
3.2.1	Erzeugung einer Mischung von (<i>E</i>)- und (<i>Z</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E/Z-23)	41
3.2.2	NOESY-Spektroskopie der Mischung von (<i>E</i>)- und (<i>Z</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E/Z-23)	42
3.3	Strukturzuordnung des biosynthetisch hergestellten [$U-^{13}C_5$]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphats (23)	46
3.4	Synthese von Strukturanalogen von (<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23)	50
3.4.1	(<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (24)	50
3.4.2	(<i>E</i>)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (25)	51
3.4.3	(<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylen-diphosphonat) (26) und (<i>E</i>)-3-Formyl-but-2-enyl-1-diphosphat (27)	51
3.5	Stimulierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen	52
3.5.1	Nachweis der Stimulation von $V\gamma 9/V\delta 2$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen durch E-23	52
3.5.2	IL-2-Titration	52
3.5.3	Zellmengentitration	55
3.5.4	Terpenbiosynthese-Intermediate	56
3.5.5	Charakterisierung der Rezeptorverhältnisse von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen	57
3.5.6	Vergleich der Populationen bei verschiedenen Spendern	60
3.5.7	Vergleich der Populationen bei verschiedenen IL-2-Konzentrationen	61
3.5.8	Spendertitration zur Bestimmung der EC_{50} -Werte von E-23	62
3.5.9	Spendertitration zur Bestimmung der EC_{50} -Werte von Strukturanalogen von E-23 sowie von IPP und DMAPP	65
3.5.10	Stabilität von E-23	70
3.5.10.1	Stabilität von E-23 bei geringer Zelldichte (Standardassaybedingungen)	70
3.5.10.2	Stabilität von E-23 bei hoher Zelldichte	70
3.5.11	ELISA-Analyse der Zytokinsezernierung bei Stimulation von PBMC mit E-23	72

4 DISKUSSION	75
4.1 Der alternative Terpenbiosyntheseweg	75
4.1.1 Synthese von E-23 und Strukturanalogen	76
4.1.2 Strukturaufklärung des Naturproduktes 1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (23)	77
4.1.3 Die Reaktion des IspG (GcpE)-Proteins	78
4.1.4 Die Reaktion des IspH (LytB)-Proteins	79
4.2 (<i>E</i>)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23) als Stimulator von $\gamma\delta$ -T-Zellen	82
4.2.1 Stimulation der Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen durch E-23	82
4.2.2 Entscheidende Strukturparameter von E-23 , welche für die biologische Aktivität verantwortlich sind	84
4.2.3 Reaktivität verschiedener Spender und Rezeptorverhältnisse	85
4.2.4 Zytokinsezernierung durch stimulierte $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen	87
4.2.5 Biologische Relevanz der Ergebnisse	87
5 ZUSAMMENFASSUNG	91
6 LITERATURVERZEICHNIS	93

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Ci	Curie
CI	Chemische Ionisation
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CpG-DNA	Cytidin-Phosphat-Guanosin-DNA
CTP	Cytidintriphosphat
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dubliziertes Dublett
DHP	3,4-Dihydro-2H-pyran
DIBALH	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's <i>Phosphate Bufferd Saline</i>
ds	doppelsträngig
<i>dxs</i>	1-Desoxyxylulose-5-phosphat Synthase-Gen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Et	Ethyl
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FC	Flashchromatographie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GPI	Glykanphosphoinositol
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>

HMQC	<i>Heteronuclear Multible Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquid Chromatographie</i>
HSCoA	Coenzym A
Hz	Hertz
<i>idi</i>	Isopentenyldiphosphat Isomerase-Gen
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
Inv ^t	invariant
IPP	Isopentenyldiphosphat
<i>ispC</i>	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase-Gen
<i>ispD</i>	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase-Gen
<i>ispE</i>	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase-Gen
<i>ispF</i>	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase-Gen
<i>ispG</i>	(E)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat Synthase-Gen
<i>ispH</i>	(E)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat Reduktase-Gen
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
m	Multipllett
MeCN	Acetonitril
MS	Massenspektroskopie
<i>mvaA</i>	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase-Gen
<i>mvaD</i>	Mevalonatdiphosphat Decarboxylase-Gen
<i>mvaK1</i>	Mevalonat Kinase-Gen
<i>mvaK2</i>	Phosphomevalonat Kinase-Gen
<i>mvaS</i>	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase-Gen
n.b.	nicht bestimmt
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form
NaOAc	Natriumacetat
NEt ₃	Triethylamin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>

NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
ODS	Octadecylsilan
OPD	<i>o</i> -Phenylendiamin
PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Bufferd Saline</i>
PE	R-Phycoerythrin
P _i	anorganisches Phosphat
POX	Peroxidase
PP _i	anorganisches Diphosphat
PPTS	Pyridinium-toluol-4-sulfonat
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
<i>p</i> -TsCl	<i>p</i> -Tosylchlorid
q	Quartet
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed Phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Singulett
t	Triplett
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor
THP	Tetrahydropyranyl
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
tq	Tripliziertes Quartet
U	Unit, = IU (International Unit)
<i>xyIB</i>	D-Xylulokinase-Gen

1 EINLEITUNG

1.1 Isoprenoidbiosynthese

Mehr als 30 000 Repräsentanten machen die Terpene zu einer der größten Naturstoffgruppen (Sacchettini und Poulter, 1997). Trotz einer immensen strukturellen Vielfalt (Abbildung 1) werden alle Terpene aus den universellen Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) gebildet.

Die Biosynthese von IPP und DMAPP über Mevalonat wurde innerhalb des letzten halben Jahrhunderts umfassend untersucht (Reviews siehe Qureshi und Porter, 1981; Bloch, 1992; Bach, 1995; Bochar et al., 1999). In den letzten Jahren wurde die Existenz eines zweiten Weges zu IPP und DMAPP in der Pflanze *Ginkgo biloba* (Schwarz, 1994) und bestimmten Bakterien (Rohmer et al., 1993; Broers, 1994) entdeckt. Inzwischen ist bekannt, daß dieser Mevalonat-unabhängige Biosyntheseweg weit verbreitet ist. So werden die Terpenbausteine in den Plastiden von Pflanzen, in zahlreichen Eubakterien sowie im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* nicht über Mevalonat gebildet (Reviews siehe Rohmer, 1999; Arigoni und Schwarz, 1999; Eisenreich et al., 2001; Rohdich et al., 2001; Rohdich et al., 2003a).

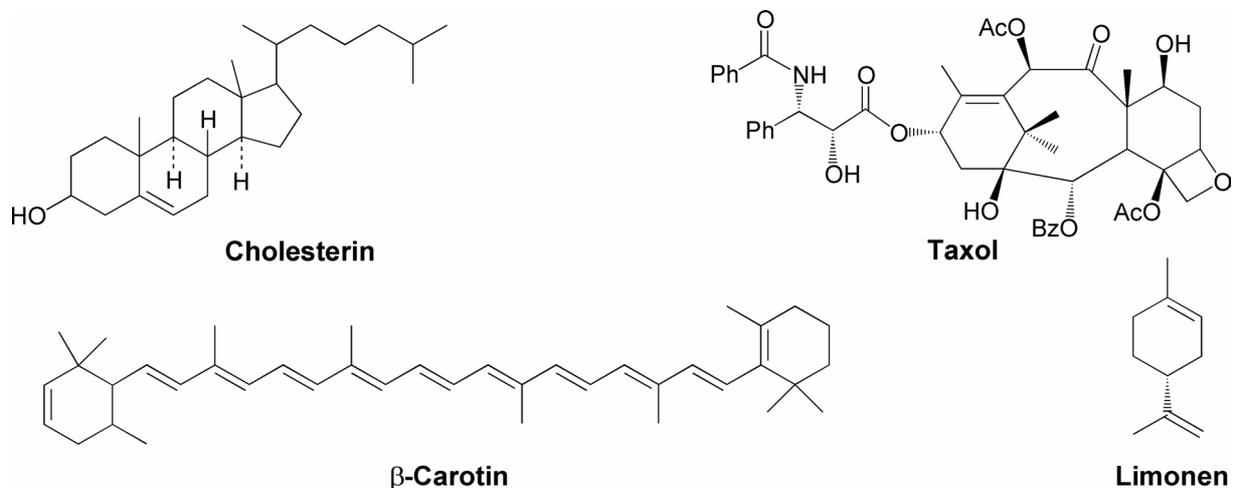
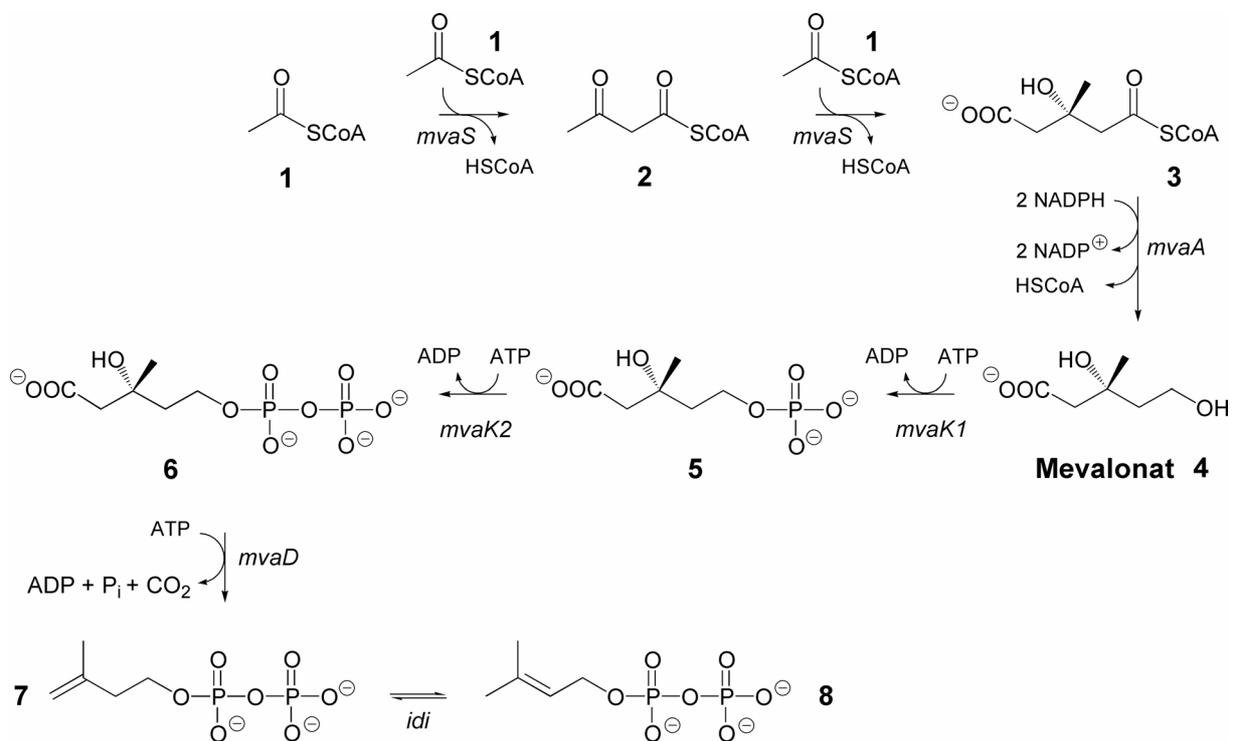


Abbildung 1: Beispiele bekannter Terpene

1.1.1 Der Mevalonat-Biosyntheseweg

Folkers (Wright et al., 1956) und *Tavormina* (Tavormina et al., 1956) fanden Indizien dafür, daß Isoprenoidmonomere in *Lactobacillus acidophilus* von Mevalonat abgeleitet sind. Spätere Arbeiten (Popjak, 1959; Lynen, 1961; Cornforth, 1968) konnten schließlich den Bildungsmechanismus von IPP (**7**) und DMAPP (**8**) über Mevalonat (**4**) in tierischen Zellen und Hefen detailliert aufklären (Schema 1).

Schema 1



Zunächst wird Acetoacetyl-CoA (**2**) durch Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA (**1**) gebildet. Anschließend entsteht 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (**3**) durch eine weitere Verknüpfung mit Acetyl-CoA (**1**). Durch Reduktion unter Verwendung von NADPH und Abspaltung von HSCoA erhält man Mevalonolacton (**5**). Das Diphosphat (**6**) wird durch aufeinanderfolgende Phosphorylierungsreaktionen gebildet. Im letzten Schritt entsteht IPP (**7**) durch Eliminierung von CO₂, woraus durch Isomerisierung DMAPP (**8**) gebildet wird.

1.1.2 Der Desoxyxylulosephosphat-Biosyntheseweg

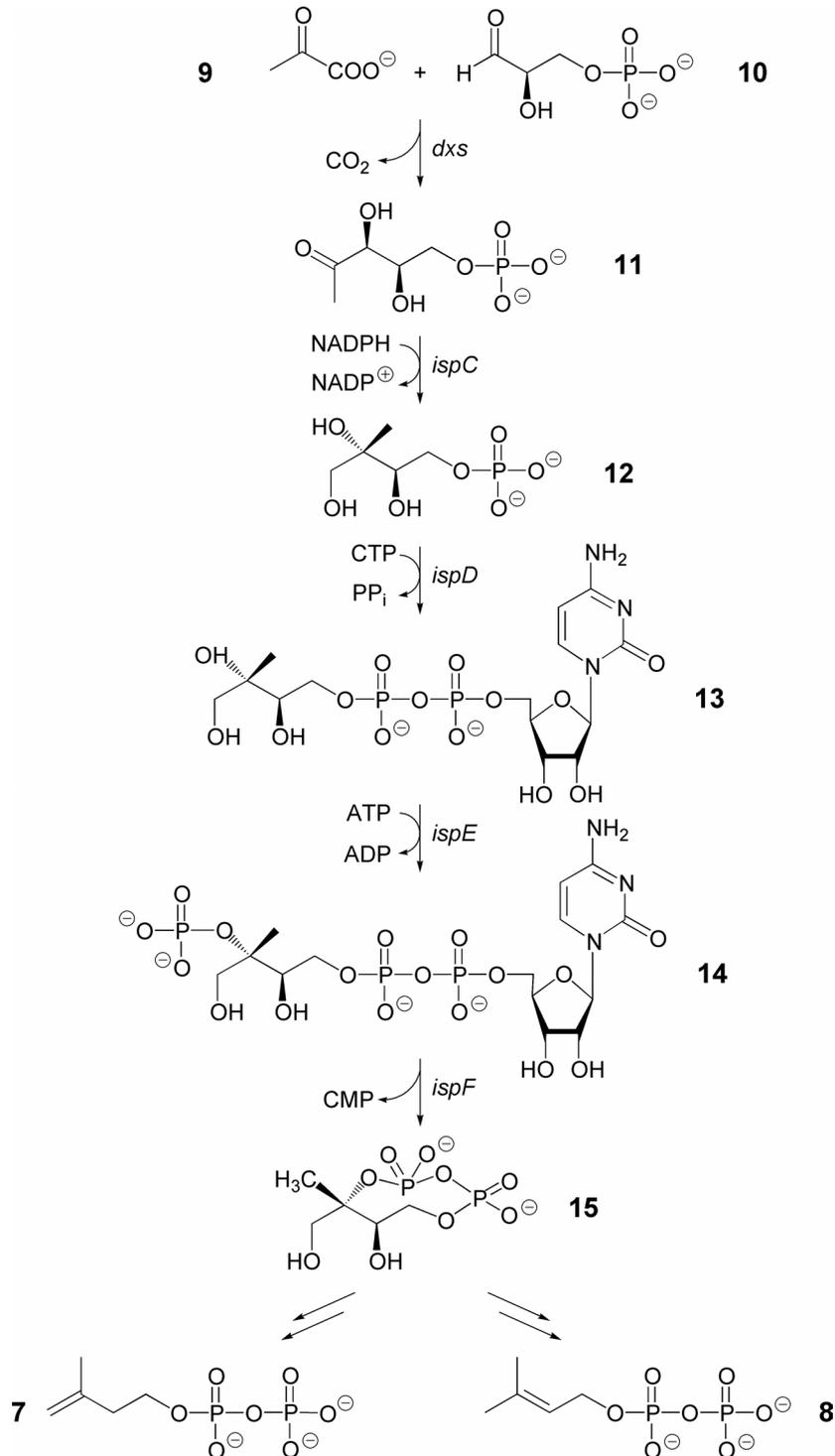
Der Desoxyxylulosephosphat- oder alternative Terpenbiosyntheseweg (Schema 2) beginnt mit einer Thiamindiphosphat-abhängigen Kondensation von Pyruvat (**9**) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**10**), wodurch 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (**11**) entsteht (Sprenger et al., 1997; Lois et al., 1998). Dieses Produkt wird durch Isomerisierung und Reduktion der resultierenden verzweigten Aldose in das verzweigte Polyolderivat, 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**), umgewandelt. Beide Reaktionsschritte werden von dem NADPH-abhängigen Enzym 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase (IspC) (Takahashi et al., 1998) katalysiert. Das Polyalkoholphosphat **12** wird durch die sequentielle Reaktion von drei Enzymen, die durch die *ispDEF*-Gene spezifiziert werden, in das zyklische Diphosphat **15** überführt. Dabei wird durch Übertragung einer Cytidylgruppe auf die 5-Phosphatgruppe von **12** 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**13**) gebildet (Rohdich et al., 1999; Kuzuyama et al., 2000a). Im nächsten Schritt erfolgt eine Phosphorylierung zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) (Lüttgen et al., 2000; Kuzuyama et al., 2000b). Die Zyklisierung zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) erfolgt unter Abspaltung von CMP (Herz et al., 2000; Takagi et al., 2000).

Der Nachweis, daß IPP und DMAPP die Endprodukte des alternativen Terpenbiosyntheseweges darstellen, wurde durch *in vitro*-Einbauexperimente geführt. Dabei konnte durch Einbau von ^{13}C -markiertem Pyruvat in Zellen aus Blättern von *Mentha piperita* (McCaskill und Croteau, 1999) gezeigt werden, daß sich IPP nach Zusatz eines Isopentenylidiphosphat Isomerase-Inhibitors anstauen ließ, aber nicht DMAPP. Daneben wurde durch Einbau $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -markierter 1-Desoxy-D-xylulose in Kulturen von *Catharanthus roseus* (Arigoni et al., 1999) gefunden, daß die Bildung von Geranylgeranoldiphosphat unter Beibehaltung des stereochemischen Musters erfolgt, welches jeweils von IPP und DMAPP stammt. Damit wurde gezeigt, daß DMAPP keine Vorstufe von IPP ist.

Mittels eines Computer-unterstützten Komplet-Genomvergleichs vollständig sequenzierter Organismen wurde festgestellt, daß das Vorkommen der orthologen Gensätze von *ispG* (*gcpE*) und *ispH* (*lytB*) dem der bis dahin bekannten Desoxyxylulosephosphat-Biosyntheseweg-Gene *dxs*, *ispC*, *ispD* und *ispF* (innerhalb dieser Genome) entspricht (Adam et al., 2000; Eisenreich et al., 2001; Rohdich et al., 2001). Dies legte die Vermutung nahe, daß diese beiden Gene eine Rolle bei den weiteren Reaktionsschritten ausgehend von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) zu IPP und DMAPP spie-

len. Die Beteiligung dieser beiden Gene an der Isoprenoidbiosynthese konnte durch Untersuchungen mit *E. coli*-Mutanten (Cunningham et al., 2000; Campos et al., 2001) bestätigt werden, ohne daß dabei deren genaue Funktion aufgeklärt werden konnte.

Schema 2



Bekannte Schritte des Desoxyxylulosephosphatweges

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem bildet bei den Wirbeltieren einen wirksamen Schutz gegen den Angriff von pathogenen Mikroorganismen. Dabei wird zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität unterschieden.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Bei der angeborenen Immunität handelt es sich um Abwehrmechanismen, die den angegriffenen Organismus schützen, indem sie eindringende Mikroorganismen abtöten und freie Viruspartikel neutralisieren. Diese unspezifische Art der Immunität wird hauptsächlich von den Neutrophilen und Makrophagen bzw. Monozyten getragen. Diese Phagozyten erkennen Bausteine der bakteriellen Oberflächen und sind in der Lage, Mikroorganismen direkt aufzunehmen und abzutöten. Natürliche Killerzellen greifen eigene bereits infizierte Zellen an und lysieren diese.

Die an der angeborenen Immunität beteiligten Rezeptoren werden durch Gene der Keimbahn codiert, d.h. es existiert eine limitierte Anzahl an Rezeptoren, deren Spezifität genetisch vorbestimmt ist. Das begrenzte Rezeptorrepertoire ist auf wenige hoch konservierte Strukturen fokussiert, die in großen Gruppen von Mikroorganismen vorkommen. Diese Strukturmotive werden PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*) genannt. Die invarianten Rezeptoren, die diese Muster erkennen, werden als PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) bezeichnet. Sie werden auf antigen-präsentierenden Zellen (APCs) oder Lymphozyten exprimiert (Reviews siehe Lindahl et al., 1995; Akira et al., 2001; Bendelac und Medzhitov, 2002).

Beispiele für PAMPs sind Lipopolysaccharid (LPS), welches sich auf den Zelloberflächen von Gram-negativen Bakterien befindet, Lipoteichonsäure auf der Zelloberfläche bei Gram-positiven Bakterien, Lipoarabinomannan (LAM) bzw. Mannane bei Mycobakterien und Hefen, unmethylierte CpG-DNA und Glykane von Bakterien, virale doppelsträngige RNA sowie N-formylierte Peptide prokaryotischer Herkunft (Abbildung 2).

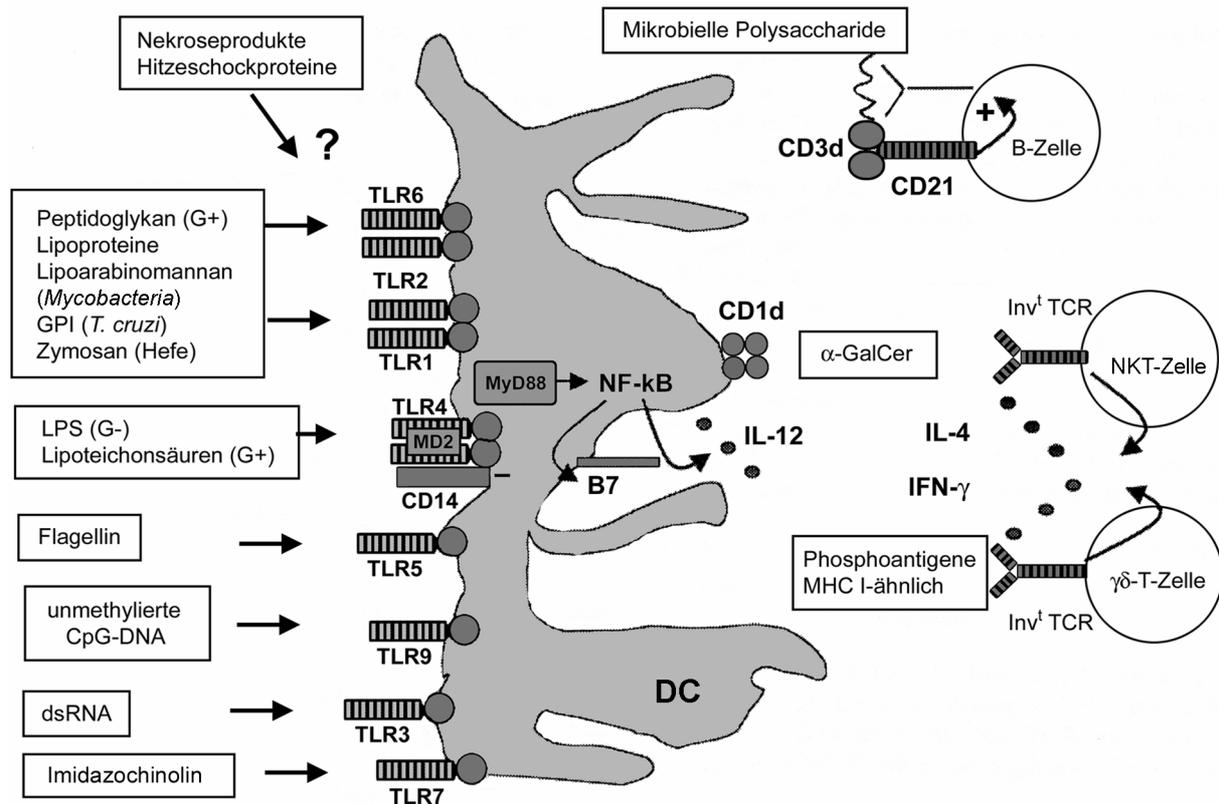


Abbildung 2: Adjuvans-Erkennungswege. Verschiedene Klassen mikrobieller oder nichtmikrobieller Adjuvantien werden spezifisch durch invariante Rezeptoren erkannt. Dabei handelt es sich beispielsweise um *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), die auf dendritischen Zellen (DCs) exprimiert werden, lösliche Komplementfaktoren (CD3d) oder sogar invariante T-Zell-Rezeptoren (Inv^t TCRs), welche auf spezialisierten Untergruppen CD1d-beschränkter natürlicher Killer- $\alpha\beta$ -T-Zellen (NKT-Zellen) und $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert werden. Die sich ergebenden Adjuvans-Kaskaden erniedrigen im allgemeinen die Antigenkonzentration, welche benötigt wird, um die adaptiven B- und T-Zell-Antworten auszulösen und/oder stellen Zytokine bereit, die eine Th1- oder Th2-Differenzierung herbeiführen (Bendelac und Medzhitov, 2002).

Die PRRs induzieren eine sofortige Immunantwort durch die Aktivierung der Phagozyten, natürlichen Killerzellen und des Komplementsystems sowie der Sezernierung von antimikrobiellen Proteinen und entzündungsfördernder Signalstoffe ohne vorherige Proliferation von Immunzellen. So kommt es zu einer frühzeitigen Erkennung (Medzhitov und Janeway, 1997) und damit schnellen Bekämpfung der Pathogene.

1.2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene oder adaptive Immunsystem wird durch die Erkennung von Antigenen in Gang gesetzt. Dazu gehören Moleküle von Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen und parasitischen Würmern, aber auch Oberflächenstrukturen von Pollen, Insektengiften und Gewebetransplantaten. Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems erfolgt durch das angeborene Immunsystem. Dabei werden Signale erzeugt, welche Informationen über den Ursprung des Antigens sowie die Art der notwendigen Reaktion enthalten.

Die Rezeptoren des erworbenen Immunsystems werden durch somatische Mechanismen während der Entwicklung des Individuums gebildet. Durch die somatische Rekombination entsteht eine große Vielzahl an Antigenrezeptoren mit einer hohen Diversivität und Spezifität. Es gibt 10^{14} bis 10^{18} somatisch erzeugte Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptoren, die auf B- und T-Zellen exprimiert sind, welche durch klonale Selektion entstehen. Jeder Klon besitzt einen einzigartigen Antigenrezeptor.

Die primär von Zellen abhängige Immunität wird als zellvermittelte Immunität bezeichnet. Daneben existiert die sog. humorale Immunität. Sie wird durch von Plasmazellen sezernierte Antikörper vermittelt, das sind lösliche Proteine, welche im Blutplasma bzw. in der Lympflüssigkeit zirkulieren.

Eine spezifische Immunantwort kommt durch die erneute Erkennung eines Antigens zustande und ist daher viel ausgeprägter und somit rascher und stärker. Man spricht in diesem Fall vom immunologischen Gedächtnis.

Eine Immunantwort ist nur sinnvoll, wenn das Antigen von einem pathogenen Organismus stammt. Die Aktivierung von Lymphozyten durch körpereigene Antigene oder unschädliche Substanzen aus der Umwelt kann zu Autoimmunkrankheiten sowie Überempfindlichkeitsreaktionen führen.

Die zellvermittelte adaptive Immunität wird zum einen durch B-Zellen und zum anderen durch T-Zellen getragen. Eine Unterscheidung der T-Zellen erfolgt aufgrund ihres T-Zell-Rezeptors. Es gibt zwei Typen: $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Der komplette T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein CD3/ $\alpha\beta$ -TCR-Komplex bzw. CD3/ $\gamma\delta$ -TCR-Komplex.

Die durch $\alpha\beta$ -T-Zellen vermittelte Immunität kennt zwei Phasen. Zunächst werden die $\alpha\beta$ -T-Zellen in der Induktionsphase zur Teilung und Differenzierung angeregt, dann folgt die Effektorphase, in welcher sie ihre Funktionen ausführen. Es werden

zwei Typen von Effektorzellen unterschieden: zytotoxische $\alpha\beta$ -T-Zellen ($CD8^+$), die infizierte Zellen abtöten und $\alpha\beta$ -T-Helfer-Zellen ($CD4^+$), welche Makrophagen und B-Zellen aktivieren. Man unterscheidet zwischen Th1-Zellen, die Interferon- γ (INF- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sezernieren sowie Makrophagen aktivieren und Th2-Zellen, die B-Zellen aktivieren, indem sie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren.

Bei $\alpha\beta$ -T-Zellen, den weitaus häufigsten T-Zellen im peripheren Blut, erfolgt die Erkennung eines spezifischen Antigens durch den Kontakt mit dem Antigen, welches auf der Oberfläche einer antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert wird. Das erfolgt durch Fragmentierung des peptidischen Antigens in der APC und Präsentation mittels des MHC I- oder MHC II-Komplexes an der Zelloberfläche.

Für die Aktivierung von T-Zellen ist aber noch ein zweites Signal notwendig, das durch kostimulatorische Moleküle erzeugt wird. Dabei handelt es sich um Zytokine, insbesondere IL-2, welches zunächst als T-Zell-Wachstumsfaktor beschrieben wurde (Review siehe Smith, 1988).

1.2.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Neben den $\alpha\beta$ -T-Zellen, welche 80-90% der PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) im Blut des Menschen darstellen, beträgt der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen nur 0.5-10%. Der Rest besteht aus Monozyten, Granulozyten und B-Zellen.

Bis zu 90% dieser $\gamma\delta$ -T-Zellen gehören zur Untergruppe der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen und $V\delta 1$ -T-Zellen (Parker et al., 1990), wobei die $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen mit 70-80% die Hauptpopulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes sind. Diese Zellen sind zu meist doppelt negativ ($CD4^-CD8^-$) (Deusch et al., 1991).

Die Struktur des $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zell-Rezeptors ist im Gegensatz zu derjenigen des $\alpha\beta$ -TCR immunglobulinähnlich (Allison et al., 2001), und seine Antigenerkennung gleicht derjenigen der Antikörper (Hayday, 2000). Das bedeutet, es werden keine APCs und damit keine MHC-Moleküle benötigt, um Antigene zu erkennen. Die strukturellen Unterschiede zwischen dem $\gamma\delta$ -TCR und dem $\alpha\beta$ -TCR sowohl in der gesamten Form als auch in den C-Domänen legen eine spezifische Rolle der $\gamma\delta$ -TCRs im Immunsystem nahe. Die in der Keimbahn kodierte Phosphoantigen-Bindungsstelle des $\gamma\delta$ -TCR

(Allison et al., 2001) könnte die breite Antigenreaktivität polyklonaler $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes erklären.

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem dar (Mak und Ferrick, 1998; Bendelac und Medzhitov, 2002) (Abbildung 3).

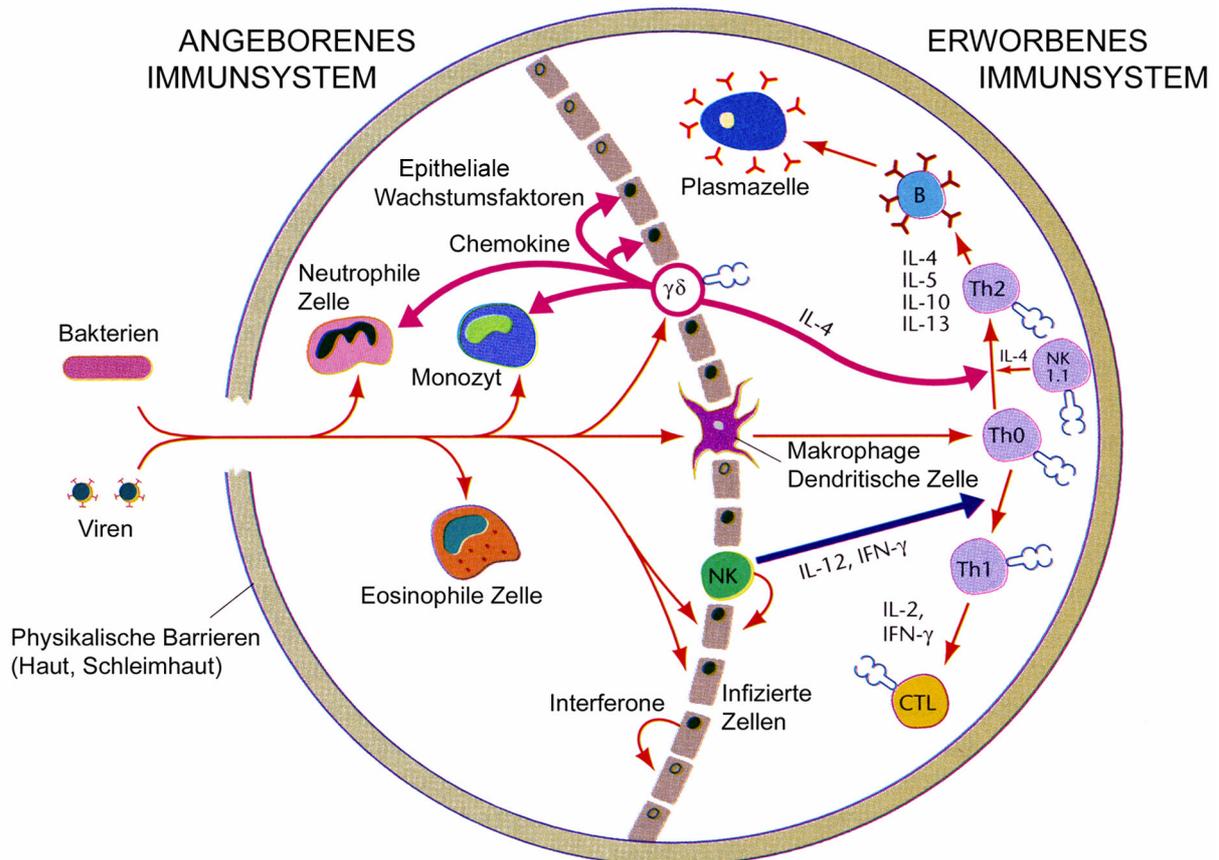


Abbildung 3: Wenn Pathogene über physikalische Grenzen wie die Haut bzw. die Schleimhäute in den Organismus eindringen, werden sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem aktiviert. Die Reaktion des angeborenen Immunsystems wird durch Monozyten bzw. Makrophagen, Granulozyten und Zytokine vermittelt und sorgt für eine Begrenzung der Infektion. Wohingegen die Reaktion des erworbenen Immunsystems mit seinen humoralen und zellvermittelten Zweigen Pathogene erkennt und abtötet sowie Gedächtniszellen generiert. Neue Erkenntnisse legen nahe, daß $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen das Zusammenspiel von erworbenem und angeborenem Immunsystem koordinieren. (IL, Interleukin; Th, T-Helfer-Zelle; IFN, Interferon; B, B-Zelle; CTL, zytotoxischer T-Lymphozyt; NK, natürliche Killerzelle (NK 1.1, NK mit NK 1.1-Marker); $\gamma\delta$, $\gamma\delta$ -T-Zelle.) (Mak und Ferrick, 1998).

Die Proliferation von $\alpha\beta$ -T-Zellen wird durch Proteinantigene stimuliert und von APCs vermittelt. Dahingegen erfolgt die Stimulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen in MHC-unabhängigen Prozessen (Morita et al., 1995) durch proteaseresistente phosphataselelabile niedermolekulare Verbindungen (Pfeffer et al., 1990; Pfeffer et al., 1992). Dabei handelt es sich um verschiedene Phosphat- und Diphosphatester, welche in bakteriellen Extrakten enthalten sind. Diese niedermolekularen Verbindungen werden in ihrer Gesamtheit als Phosphoantigene bezeichnet. Sie stimulieren die Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, die $V\gamma 9/V\delta 2$ -Rezeptoren exprimieren (Constant et al., 1994; Tanaka et al., 1994; Morita et al., 1995). Die Beteiligung des $V\gamma 9/V\delta 2$ -Rezeptors, früher auch als $V\gamma 2/V\delta 2$ -Rezeptor bezeichnet, konnte nachgewiesen werden (Bukowski et al., 1995). Innerhalb der Gruppe der Phosphoantigene stellen die universellen Terpenbiosynthesevorstufen IPP und DMAPP relativ potente Stimulatoren dar (Tanaka et al., 1995). Es gibt darüber hinaus noch weitere Verbindungen, die $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen aktivieren. Dies sind beispielsweise synthetische Mono- und Diphosphate, Alkylamine und Aminobisphosphonate (Review siehe Espinosa et al., 2001).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Materialien wurden von ACROS (Geel, Belgien), BD (Becton Dickinson, Heidelberg), Beckman Coulter-Immuntotech (Unterschleißheim), Biochrom (Berlin), Fluka Feinchemikalien (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Ismaning), PAN Biotech (Aidenbach), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und SIGMA-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Sämtliche Lösungsmittel wurden vor der Verwendung destilliert bzw. absolutiert.

Gepooltes humanes AB-Serum wurde vom Hämatologischen Forschungslabor des Klinikums Rechts der Isar (München) zur Verfügung gestellt. 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**13**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) und 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) wurden von S. Hecht bereitgestellt.

2.1.1 Chromatographie-Materialien

Säulenchromatographie wurde auf Silicagel 60 (230-400 mesh, Fluka), DOWEX 50 WX8 (200-400 mesh, Serva) und Cellulose (Avicel, Cellulose mikrokristallin, Merck) durchgeführt. DC-Platten (Silicagel bzw. Cellulose, Merck) wurden zur Detektion entweder mit F_{254} Fluoreszenzindikator verwendet oder mit Färbereagenzien angefärbt.

2.1.2 Färbereagenzien

Anisaldehydreagenz

Anisaldehyd/konzentrierte Schwefelsäure/Eisessig, 1:2:100 v/v.

Dinitrophenylhydrazinreagenz

2,4-Dinitrophenylhydrazin 0.4% w/v in 2 N Salzsäure.

Eosinlösung

2.0 g Eosin, 250 mg Natriumazid und 50 ml FBS (Sera Plus, PAN Biotech) wurden in 450 ml 0.9% Natriumchlorid-Lösung gelöst, durch einen Papierfilter filtriert, portioniert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.3 Phosphorylierungsreagenzien

Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogendiphosphat

Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogendiphosphat wurde nach einer Vorschrift von Poulter (Davisson et al., 1986) hergestellt. Die Reinigung erfolgte durch Lösen des lyophilisierten Feststoffes in der Kälte in MeCN. Der unlösliche Rückstand wurde durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Anschließend wurde der ölige Rückstand in H₂O gelöst und schließlich lyophilisiert.

Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogenphosphat

Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogenphosphat wurde analog obiger Vorschrift aus 85%iger Phosphorsäure hergestellt und direkt nach der Neutralisation mit Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydroxid lyophilisiert.

2.1.4 Szintillatorflüssigkeit

5.5 g Permablend[®] I (Packard Instrument International, Zürich, Schweiz) wurden in 180 ml 2-Phenylethylamin und 250 ml Methanol gelöst und anschließend mit Toluol auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.1.5 Puffer

PBS (*Phosphate Buffered Saline*) Phosphat-gepufferte Saline

Phosphat-gepufferte Saline enthält 4 mM NaH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl sowie 20 mM KCl (pH 7.6) (Seromed Instantmix, Biochrom). Zum Waschen von Zellen wurden 10%ige Lösungen von FBS (*Fetal Bovine Serum*) in PBS verwendet. Für ELISA-Analysen wurde DPBS von PAN Biotech verwendet.

2.1.6 Kulturmedien

RPMI 1640-Medium Komplett

RPMI 1640-Medium (PAN Biotech), 10% humanes AB-Serum, 2 mM L-Glutamin, 10 µM β-Mercaptoethanol.

2.1.7 Verwendete Wachstumsfaktoren

Humanes IL-2 wurde von EuroCetus (Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen von IL-2 in Kultur wurden in Units/ml (U/ml) angegeben, dabei handelt es sich um Internationale Units (IU).

1 IU = 0.38 Cetus Units = 0.17 BRMP (*Biological Response Modifier Program Unit*).

1 Cetus Unit ist als die Menge an IL-2/ml definiert, die eine halb-maximale Inkorporation von ³H-Thymidin nach einer 24-stündigen Inkubation durch IL-2-abhängige Maus T-Zell-Linien induziert.

2.1.8 Antikörper

Für die FACS-Analyse von humanen PBMC wurden fluoreszenzmarkierte monoklonale Maus-anti-human Antikörper verwendet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten fluoreszenzmarkierten monoklonalen Maus-anti-human Antikörper.

Antikörper	Isotyp	Farbstoff ^a	Verdünnung	Bezugsquelle ^b
Anti-CD3 (UCHT1)	mIgG1	PE	1:200	CI
Anti-TCR- $\alpha\beta$	mIgG1	FITC	1:50	BD
Anti-TCR- $\gamma\delta$	mIgG1	FITC	1:50	BD
Anti-V δ 2 TCR	mIgG1	FITC	1:1000	BD
Anti-V γ 9 TCR	mIgG1	PE	1:50	BD

^a PE, R-Phycoerythrin; FITC, Fluoresceinisothiocyanat

^b CI, Coulter-Immunotech; BD, Becton Dickinson

2.1.9 ELISA

Es wurden die folgenden humanen Zytokinsets von BD PharMingen (Heidelberg) verwendet: IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15, TNF- α und IFN- γ . Dabei handelte es sich jeweils um monoklonale Maus- bzw. Ratte-anti-human Zytokin Antikörper (Coating), Zytokine (Standards) sowie monoklonale biotinylierte Maus- bzw. Ratte-anti-human Zytokin Antikörper (Detektion). Für die Farbreaktion wurde ExtrAvidin[®]-Peroxidase (Peroxidase-Konjugat, E 2886, SIGMA) mit OPD-Peroxidase-substrat (0.4 mg/ml o-Phenylendiamin Dihydrochlorid, 0.4 mg/ml Wasserstoffperoxid-Harnstoffaddukt in 0.05 M Phosphat-Citrat-Puffer; SIGMA FAST[™] o-PHENYLENE-DIAMINE DIHYDROCHLORIDE TABLET SETS, SIGMA) verwendet. Das OPD-Peroxidasesubstrat wurde durch Lösen einer Puffer- und Substrattablette je 20 ml Ultrapurwasser erzeugt.

2.2 Geräte

NMR-Spektroskopie

^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren wurden mit AMX 400, DRX 500, und AC 250 Spektrometern von Bruker (Karlsruhe) gemessen. Hauptsächlich wurde das DRX 500 verwendet, welches bei 11.75 Tesla ^1H -Resonanzfrequenzen von 500.13 MHz und ^{13}C -Resonanzfrequenzen von 125.77 MHz lieferte. Für ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurde ein $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Dualprobenkopf verwendet. Die zweidimensionalen Experimente HMBC, HMQC und NOESY wurden mittels eines inversen $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Tripelresonanzprobenkopfes gemessen. Eindimensionale Spektren wurden am rotierenden (20 s^{-1}), mehrdimensionale Spektren hingegen am ruhenden Röhrchen gemessen. Die Messungen erfolgten in der Regel bei $27\text{ }^\circ\text{C}$ in deuterierten Lösungsmitteln wie CDCl_3 , MeOD-d_3 , MeCN-d_3 und D_2O bzw. H_2O mit 10% D_2O in 5 mm NMR-Röhrchen.

Die Messung der Spektren sowie Auswertung erfolgte mit XWINNMR 3.0 bzw. 1D/2D-WINNMR 5.0 von Bruker. Die eindimensionalen Spektren wurden mittels einer Gauß-Lorentz-Funktion (gb: 0.01 bis 0.2, lb: -1 bis -2) Fourier-transformiert.

Massenspektroskopie

Die GC-MS-Analysen wurden von H. Krause mit dem MAT 8200 von Finnigan (Bremen) durchgeführt. Dabei wurde die Massenspektroskopie im CI-Modus mit Isobutan als Trägergas durchgeführt.

Elementaranalyse

Alle Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium des Anorganisch-chemischen Instituts der Technischen Universität München unter der Leitung von M. Barth durchgeführt. Die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffwerte wurden nach der Verbrennungsmethode bestimmt.

HPLC-Anlagen

System 1: nicht-radioaktive Substanzen, analytisch

Für die Analyse nicht-radioaktiver Substanzen wurde ein HPLC-System bestehend aus einer Knauer (Berlin) HPLC Pumpe 64, einem Knauer UV/VIS Filter Photometer sowie einem Schreiber PM 8222 dual-pen recorder von Philips (Hamburg) benutzt.

System 2: nicht-radioaktive Substanzen, präparativ

Für präparative Trennungen wurde ein computergesteuertes HPLC-System von Knauer (Berlin) bestehend aus einer präparativen Pumpe K-1800 Well Chrom und einem UV-Detektor K-2501 eingesetzt. Die Steuerung der Anlage erfolgte mit der EuroChrom 2000 Basic Edition-Software von Knauer.

System 3: Radioaktive Substanzen, analytisch

Es wurde ein computergesteuertes HPLC-System von Knauer (Berlin) bestehend aus einer K-1001 Pumpe und einem UV-Detektor K-2600 sowie einem Solvent Organizer K-1500 inklusive Degasser verwendet. Die Proben wurden mittels eines Autosamplers AS-100 (Bio-Rad, München) injiziert und mit Hilfe eines Radioaktivitätsdetektors β -RAM (β -RAM Flow-Through System Model 2, Biostep GmbH, Jahnsdorf) analysiert. Bei ^{14}C -markierten Proben wurde eine YtSi-Feststoffzelle (200 μl Zellvolumen), bei ^3H -markierten Proben eine Flüssigzumischzelle (400 μl Zellvolumen, Mischungsverhältnis Probe/Szintillatorflüssigkeit Ultima Gold M (Packard BioSciences, Groningen, Niederlande) 1:5) verwendet.

Alle Proben wurden vor der Injektion durch Ultrazentrifugation (100 kD Nanosep, Pall Gelman, Dreieich) filtriert.

Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität gelöster und flüssiger Verbindungen wurden mit dem Flüssigszintillationszähler bF (betascint BF 5000, München) bestimmt. Dazu wurde die Probe mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, ausgezählt und die Radioaktivität bestimmt ($2.2 \cdot 10^6$ dpm entsprechen 1 μCi).

Ultraschallgerät

Der Aufschluß von Bakterien erfolgte mit Hilfe eines BRANSON SONIFIER 250 Ultraschallgerätes (BRANSON ULTRASONICS, Danbury, USA). Die Leistung wurde bei einer Kontrollstellung von 4 auf 70% eingestellt.

Gefriertrocknung

Gefriertrockner Alpha 1-4 von Christ (Osterode am Harz) mit angeschlossener Chemie-Hybrid-Pumpe RC5 von Vacuubrand (Wertheim).

FACScan

Die FACScan-Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellen wurde mittels eines FACScan-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Zur Analyse standen drei Fluoreszenzkanäle zur Verfügung. Die Anregungswellenlänge des Lasers betrug 488 nm. Die Detektionswellenlängen lagen für die beiden Kanäle FL1 (Fluoresceinisothiocyanat, FITC) bei 530 nm und für FL2 (R-Phycoerythrin, PE) bei 585 nm. Die Messungen wurden mit Hilfe der CellQuest Pro-Software von Becton Dickinson durchgeführt und ausgewertet.

Sterilbank

Alle Arbeiten mit humanen Zellen wurden unter Laminar flow Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt (Heraeus, Hanau).

Brutschrank

Humane Zellen wurden in einem Inkubator (CO₂-Inkubator, Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 6% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.3 Methoden

2.3.1 Synthese von (*E*)-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat (*E*-23)

2.3.1.1 Acetonyl-tetrahydropyranylether (**17**)

Eine Mischung von 339 mg (1.35 mmol) Pyridinium-toluol-4-sulfonat, 9.35 ml (10.0 g, 0.135 mol) Hydroxyaceton und 24.7 ml (22.7 g, 0.270 mol) 3,4-Dihydro-2*H*-pyran wurde bei Raumtemperatur 2.5 h lang gerührt. Überschüssiges 3,4-Dihydro-2*H*-pyran wurde unter reduziertem Druck entfernt. Die Rohmischung wurde mittels Flashchromatographie über eine Silicagelsäule (6 × 20 cm; Hexan/Aceton, 4:1) gereinigt. Man erhält 18.7 g (0.118 mol, 88%) von **17** einer farblosen Flüssigkeit.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 4.62 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.22 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 3.83-3.79 (m, 1H), 3.51-3.47 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.87-1.49 (m, 6H), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 206.7, 98.7, 72.3, 62.3, 30.2, 26.5, 25.2, 19.2; MS (CI, Isobutan) m/z 159 [$\text{M} + 1$] $^+$; $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$ 158.20 **Ber.:** C 60.74, H 8.92 **Gef.:** C 60.39, H 8.65.

2.3.1.2 (*E*)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (*E*-19)

Acetonyl-tetrahydropyranylether (**17**, 3.88 g, 24.5 mmol) wurde in 50 ml absolutem Toluol unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gelöst. Eine Suspension von (Ethoxycarbonylmethylen)triphenylphosphoran (**18**, 12.8 g, 36.8 mmol) in 150 ml absolutem Toluol wurde hinzugefügt, und die Mischung 23 h lang unter Rückfluß gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Man erhält ein oranges Öl. Triphenylphosphinoxid wurde durch die Zugabe von 100 ml einer Mischung aus Hexan/Aceton 9:1 ausgefällt. Die Mischung wurde filtriert, und das Filtrat auf ein Volumen von etwa 1 ml eingeeengt. Weitere 100 ml einer Mischung aus Hexan/Aceton 9:1 wurden hinzugefügt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Man erhält 9 g eines orange-farbenen Öls, welches durch Flashchromatographie auf Silicagel vorgereinigt wurde (6.5 × 28 cm, Hexan/Aceton 9:1). Man erhält 7.03 g (30.8 mmol, 89%) eines Gemisches von (*E*)/(*Z*)-Stereoisomeren von **19** in einem Verhältnis von 86:14. Die

beiden Isomere wurden durch präparative *Reversed Phase*-HPLC getrennt, wobei eine ODS-Säule (YMC-Pack, ODS-AQ, 120 Å, S-11 µm, YMC Europe GmbH, Schermbeck/Weselerwald; 250 × 40.0 mm; Eluent, Methanol/Isopropanol/Wasser 33:22:45 (v/v); Flußrate, 76 ml·min⁻¹) verwendet wurde. Als analytisches System wurde eine analytische Säule gleichen Materials (YMC-Pack, ODS-AQ, 120 Å, S-5 µm, 250 × 4.6 mm) verwendet, die mit einer Flußrate von 1.0 ml·min⁻¹ betrieben wurde. Die durch die Vorreinigung erhaltenen 7 g **E/Z-19** wurden in 138 ml Eluent sowie 12 ml MeOH gelöst und in Portionen von 3 ml pro Lauf getrennt. Die Retentionszeit von **E-19** betrug dabei 13 min. Fraktionen mit **E-19** wurden gesammelt und vereinigt, schließlich das Volumen durch Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck auf etwa die Hälfte verringert. Die Lösung (3.8 l) wurde mit 3 × 1 l CH₂Cl₂ extrahiert und die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet, dann filtriert und schließlich unter reduziertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Man erhält 5.64 g (24.7 mmol, 71%) **E-19** in isomerenreiner Form als farbloses Öl.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.93 (q, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.59 (t, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.17 (dd, *J* = 15.6 Hz, 1.4 Hz, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.90 (dd, *J* = 15.5, 1.4 Hz, 1H), 3.81-3.76 (m, 1H), 3.49-3.45 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.87-1.78 (m, 2H), 1.72-1.50 (m, 4H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 166.8, 154.7, 114.5, 98.0, 70.6, 62.0, 59.7, 30.3, 25.3, 19.1, 15.9, 14.3; MS (CI, Isobutan) *m/z* 229 [M + 1]⁺; C₁₂H₂₀O₄ 228.29 **Ber.:** C 63.14, H 8.83 **Gef.:** C 63.13, H 8.44.

2.3.1.3 (*E*)-2-Methyl-1-tetrahydropyranloxy-but-2-en-4-ol (**E-20**)

Eine Lösung von **E-19** (3.00 g, 13.1 mmol) in 30 ml absolutem CH₂Cl₂ wurde auf -78 °C abgekühlt. Eine 1.0 M Lösung von DIBALH (31.5 ml, 31.5 mmol) in Hexan wurde innerhalb von 2 h unter Stickstoffatmosphäre zugetropft. Die Lösung wurde 30 min bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0.5 ml 1 M NaOH abgebrochen. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt, und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Dann wurden 200 ml Methanol hinzugefügt und die Mischung auf eine Säule von Na₂SO₄/Silicagel (3.5 × 5; 21 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 600 ml Methanol entwickelt. Das Eluat wurde unter reduziertem Druck konzentriert. Das erhaltene Öl wurde in 5 ml CH₂Cl₂ gelöst. Die Lösung wurde auf eine Silicagelsäule geladen (3.5 × 12 cm) und

mit 450 ml Methanol entwickelt. Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck ergab 2.39 g (12.8 mmol, 98%) einer farblosen Flüssigkeit von **E-20**.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.66 (tq, $J = 6.8, 1.3$ Hz, 1H), 4.59 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.17 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 4.10 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 3.86-3.81 (m, 1H), 3.84 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 3.50-3.46 (m, 1H), 1.86-1.66 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.61-1.48 (m, 4H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 135.5, 125.6, 97.8, 71.9, 62.1, 59.0, 30.5, 25.4, 19.3, 14.1; MS (Cl, Isobutan) m/z 169 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + 1]^+$.

2.3.1.4 (E)-4-Chlor-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en (E-21)

Zu einer Lösung von **E-20** (1.10 g, 5.91 mmol) in 12 ml absolutem CH_2Cl_2 , wurden Lösungen von 1.01 g (8.27 mmol) DMAP in 12 ml absolutem CH_2Cl_2 und 1.35 g (7.09 mmol) *p*-TsCl in 12 ml absolutem CH_2Cl_2 zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde 3 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der Rückstand mittels FC auf Silicagel (3.5×12.5 cm, CH_2Cl_2 100%) gereinigt. Man erhält 1.13 g (5.52 mmol, 93%) von **E-21** als farblose Flüssigkeit.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.72 (tq, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 4.59 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.92 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 3.90-3.86 (m, 1H), 3.59-3.52 (m, 1H), 1.92-1.52 (m, 6H), 1.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 138.7, 121.8, 97.9, 71.3, 62.1, 40.2, 30.5, 25.4, 19.4, 13.8; MS (Cl, Isobutan) m/z 205 $[\text{M} + 1]^+$; $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{ClO}_2$ 204.70 **Ber.:** C 58.68, H 8.37, Cl 17.32 **Gef.:** C 58.56, H 8.54, Cl 16.96.

2.3.1.5 (E)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enyl-4-diphosphat (E-22)

Zu einer Lösung von **E-21** (475 mg, 2.32 mmol) in 2.5 ml absolutem MeCN, wurde eine Lösung von 2.51 g (2.78 mmol) Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogenpyrophosphat in 5.5 ml absolutem MeCN langsam bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 3 h wurde die orange-farbene Lösung unter reduziertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene orange Öl wurde in 2.5 ml Wasser gelöst und auf eine Kationenaustauschersäule (DOWEX 50 WX8, 2.5×11 cm, NH_4^+ -Form) geladen, die zuvor mit 100 ml 25 mM NH_4HCO_3 equilibriert wurde. Die Säule wurde mit 250 ml 25 mM

NH₄HCO₃ eluiert. Die vereinigten Fraktionen wurden lyophilisiert. Der weiße Rückstand wurde in 5 ml eines Gemisches von Isopropanol/100 mM NH₄HCO₃ (1:1, v/v) gelöst. Die Lösung wurde auf eine Cellulosesäule (2 × 18 cm) geladen, die mittels derselben Mischung von Isopropanol/100 mM NH₄HCO₃ eluiert wurde. Das Isopropanol wurde unter reduziertem Druck entfernt, und die erhaltene wässrige Lösung lyophilisiert. Man erhält 444 mg (1.12 mmol, 88%) **E-22** als weißes Pulver.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 5.52 (tq, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.98 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.84 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.42-3.38 (m, 1H), 1.61-1.57 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.40-1.32 (m, 4H); ¹³C NMR (D₂O, 126 MHz) δ 136.4, 123.9 (dd, *J* = 8.0, 2.3 Hz), 98.5, 72.5, 63.2, 62.2 (d, *J* = 5.3 Hz), 29.9, 24.5, 19.0, 13.4; ³¹P NMR (D₂O, 101 MHz) δ -5.62 (d, *J* = 20.9 Hz), -7.57 (d, *J* = 20.8 Hz).

2.3.1.6 (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**)

Für den folgenden Reaktionsschritt konnte **E-22** ohne die oben beschriebene chromatographische Reinigung eingesetzt werden. Eine orange-farbene Lösung von **E-22** (2.32 mmol) in 8 ml MeCN wurde durch Zugabe von 8 ml Wasser verdünnt. Der pH wurde durch Zugabe von 400 µl 37%iger HCl auf pH 1.3 eingestellt. Die Reaktion wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt und durch Zugabe von 350 µl 40%iger NaOH gestoppt. Dabei wurde die Lösung in mehreren Schritten insgesamt 20 min auf pH 1.3 gehalten. Die Lösung wurde auf eine Kationenaustauschersäule (DOWEX 50 WX8, 2.5 × 6 cm; NH₄⁺-Form) geladen, welche mit 90 ml 25 mM NH₄HCO₃ entwickelt wurde. Die vereinigten Fraktionen wurden lyophilisiert. Der weiße Rückstand wurde in 3 ml eines Gemisches von Isopropanol/100 mM NH₄HCO₃ (1:1, v/v) gelöst. Die Lösung wurde auf eine Cellulosesäule (2.5 × 19 cm) geladen, die mittels derselben Mischung von Isopropanol/100 mM NH₄HCO₃ eluiert wurde. Das Isopropanol wurde unter reduziertem Druck entfernt. Die erhaltene wässrige Lösung wurde lyophilisiert. Man erhält 516 mg (1.65 mmol, 66% basierend auf **E-21**) **E-23** als weißes Pulver.

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 5.52 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 1.57 (s, 3H); ¹³C NMR (D₂O, 126 MHz) δ 141.6, 122.7 (d, *J* = 8.0 Hz), 68.6, 64.3 (d, *J* = 5.1 Hz), 15.1; ³¹P NMR (D₂O, 101 MHz) δ -3.49 (d, *J* = 22.3 Hz), -7.17 (d, *J* = 22.0 Hz).

2.3.2 Synthese von (*E/Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E/Z*-23)

Eine *E/Z*-Mischung von **23** wurde mittels derselben Reaktionssequenz wie oben beschrieben hergestellt, indem man die (*E/Z*)-Mischung von **19** als Edukt verwendet. Da die NMR-Daten der (*E*)-Verbindungen bekannt waren (siehe oben), konnten die Signale der (*Z*)-Verbindungen in den Spektren der Mischungen zugeordnet werden.

2.3.2.1 (*Z*)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (*Z*-19)

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.71 (q, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.60 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.20 (dd, $J = 15.5$ Hz, 1.3 Hz, 1H), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.93 (dd, $J = 15.6$, 1.3 Hz, 1H), 3.84-3.79 (m, 1H), 3.52-3.48 (m, 1H), 1.97 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H), 1.88-1.50 (m, 6H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 165.9, 156.8, 116.9, 98.7, 66.5, 62.3, 59.8, 30.6, 25.3, 21.9, 19.5, 14.3; MS (CI, Isobutan) m/z 229 [$\text{M} + 1$] $^+$; $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4$ 228.29 **Ber.:** C 63.14, H 8.83 **Gef.:** C 63.13, H 8.44.

2.3.2.2 (*Z*)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en-4-ol (*Z*-20)

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.64 (tq, $J = 6.6$, 1.3 Hz, 1H), 4.63 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.15 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 3.87-3.82 (m, 1H), 3.83 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 3.52-3.48 (m, 1H), 1.86-1.48 (m, 6H), 1.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 136.2, 128.6, 96.6, 65.1, 61.8, 58.1, 30.3, 25.3, 21.9, 19.0; MS (CI, Isobutan) m/z 169 [$\text{M} - \text{H}_2\text{O} + 1$] $^+$.

2.3.2.3 (*Z*)-4-Chlor-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en (*Z*-21)

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.65 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.61 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.92 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 3.90-3.86 (m, 1H), 3.59-3.52 (m, 1H), 1.92-1.52 (m, 6H), 1.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz) δ 138.3, 124.6, 97.5, 64.7, 62.2, 40.1, 30.5, 25.4, 21.8, 19.4; MS (CI, Isobutan) m/z 205 [$\text{M} + 1$] $^+$; $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{ClO}_2$ 204.70 **Ber.:** C 58.68, H 8.37, Cl 17.32 **Gef.:** C 58.56, H 8.54, Cl 16.96.

2.3.2.4 (Z)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enyl-4-diphosphat (Z-22)

^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 5.52 (t, $J = 6.8$, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.98 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 3.84 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.42-3.38 (m, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.61-1.57 (m, 2H), 1.40-1.32 (m, 4H); ^{13}C NMR (D_2O , 126 MHz) δ 136.3, 125.8 (d, $J = 8.6$ Hz), 98.6, 72.5, 63.2, 61.8 (d, $J = 5.1$ Hz), 29.9, 24.5, 20.8, 19.0; ^{31}P NMR (D_2O , 101 MHz) δ -5.69 (d, $J = 20.8$ Hz), -7.68 (d, $J = 20.8$ Hz).

2.3.2.5 (Z)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (Z-23)

^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 5.49 (tm, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.03 (s, 2H), 1.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (D_2O , 126 MHz) δ 141.8, 125.6 (d, $J = 7.7$ Hz), 63.8 (d, $J = 5.1$ Hz), 62.0, 22.7; ^{31}P NMR (D_2O , 101 MHz) δ -4.48 (d, $J = 20.8$ Hz), -7.06 (d, $J = 20.8$ Hz).

2.3.3 NMR-Titrationsexperimente zur Aufklärung der Konfiguration der Doppelbindung in [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (23)

2.3.3.1 *In vivo* Darstellung von [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat und [$2\text{-}^{14}\text{C}$]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat

Biosynthetisch hergestelltes von [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat ([$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]23) bzw. [$2\text{-}^{14}\text{C}$]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat ([$2\text{-}^{14}\text{C}$]23) wurde erhalten, indem man den *E. coli*-Stamm XL1-pBSxispC-G, welcher die *xyIB*- und *ispCDEFG*-Gene überexprimiert, mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]1-Desoxy-D-xylulose bzw. [$1\text{-}^{14}\text{C}$]1-Desoxy-D-xylulose in Minimalmedium anzieht (Hecht et al., 2001).

2.3.3.2 ^1H -NMR-Charakterisierung

Für das ^1H -Experiment wurde eine mittels HPLC gereinigte Probe verwendet. Dazu wurden zu den [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]23 enthaltenden Zellen radioaktives [$2\text{-}^{14}\text{C}$]23 enthaltende Zellen (5 μCi) hinzugefügt. Damit ließ sich die Reinigung unter Verwendung eines Radiodetektors durchführen. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (3×10 s, 0°C)

aufgeschlossen, die Suspension zentrifugiert (14000, 4 °C, 15 min) und von Proteinen befreit (Säurefällung mittels 30%iger Trichloressigsäure (TCA) sowie Ultrafiltration 3 kD). Anschließend wurde Anionenaustauscher-HPLC mittels einer Nucleosil 10 SB-Säule (250 × 4.6 mm, Partikelgröße 10 µm, Macherey-Nagel, Düren; Eluent A: Wasser bidest.; Eluent B: 1 M Ammoniumformiat, Flußrate, 2.0 ml·min⁻¹) durchgeführt. Als Programm wurde ein linearer Gradient (0 bis 35 min: 10 bis 25% Eluent B) benutzt. Die Retentionszeit von [2-¹⁴C]**23** betrug dabei 22.5 min, das ebenfalls enthaltene 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) hatte eine Retentionszeit von 12.5 min. Fraktionen mit [2-¹⁴C]**23** und damit [U-¹³C₅]**23** wurden gesammelt, vereinigt, und die erhaltene wäßrige Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 600 µl D₂O (pH 6) gelöst und mittels ¹³C-entkoppelter-¹H-Spektroskopie vermessen. Anschließend wurden 40 µl einer Lösung von synthetisch hergestelltem (*E/Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat **E/Z-23** (*E/Z* = 7:1) (D₂O, pH 7) hinzugefügt und die Mischung nochmals vermessen. Weitere Messungen erfolgten nach nochmaliger Zugabe von jeweils 40 µl derselben Lösung von (*E/Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat.

2.3.3.3 ¹³C-NMR-Charakterisierung

Etwa 300 µl [U-¹³C₅]-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat ([U-¹³C₅]**23**) enthaltende Zellen wurden in 440 µl 20 mM NaF in D₂O und 210 µl MeOD-d₃ suspendiert. Nach einem Ultraschallaufschluß (3 × 10 s, 0 °C) wurde die Suspension zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand, welcher etwa 0.1 mM [U-¹³C₅]**23** enthielt, wurde direkt für die NMR-Charakterisierung verwendet. Zunächst wurde ein ¹³C-Spektrum aufgenommen und 1 h gepulst, bevor festes synthetisch hergestelltes (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**) hinzugefügt und eine weitere einstündige Messung vorgenommen wurde.

2.3.4 Synthese von Strukturanalogen von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**)

2.3.4.1 (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (**24**)

Eine Mischung aus 4.0 mg (0.020 mmol) (*E*)-4-Chlor-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en (**21**) und 6.2 mg (0.029 mmol) Di(tetra-*n*-butylammonium)hydrogenphosphat in 500 μ l MeCN wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von 10 μ l 37%iger wässriger HCl auf 1 erniedrigt. Nach 7 min wurden 10 μ l 40% wässrige NaOH zugesetzt und die Mischung damit neutralisiert. Die Mischung wurde auf eine Kationenaustauschersäule DOWEX 50 WX8 (4.5 ml, NH_4^+ -Form) geladen, die mit 10 ml 25 mM NH_4HCO_3 equilibriert wurde. Die Säule wurde mit 15 ml 25 mM NH_4HCO_3 entwickelt. Das Eluat wurde lyophilisiert. Man erhält 2.9 mg (0.013 mmol, 68%) von **24** eines weißen Feststoffes.

^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 5.45 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 1.54 (s, 3H); ^{13}C NMR (D_2O , 126 MHz) δ 140.7, 124.7, 68.7, 59.6, 14.8; ^{31}P NMR (D_2O , 101 MHz) δ 5.25.

2.3.4.2 (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**)

Eine Lösung von 16.5 mg (0.0886 mmol) (*E*)-2-Methyl 1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en-4-ol (**20**) in 500 μ l H_2O wurden mit 10 μ l 37%iger wässriger HCl versetzt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurden 10 μ l 40%ige wässrige NaOH zugefügt. Die Mischung wurde mit Chloroform extrahiert (3×600 μ l). Die wässrige Phase enthält 65 μ mol (74%) (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**).

^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 5.45 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 1.54 (s, 3H); ^{13}C NMR (D_2O , 126 MHz) δ 140.7, 124.7, 68.7, 59.6, 14.8.

2.3.5 Synthese von IPP und DMAPP

IPP und DMAPP wurden nach einer Methode von Davisson et al. (Davisson et al., 1986) synthetisiert.

2.3.6 Bestimmung der Konzentrationen von Syntheseprodukten in wäßrigen Lösungen

Um die genauen Konzentrationen von Syntheseprodukten in wäßriger Lösung bestimmen zu können, wurde ein interner Standard hinzugefügt und die Konzentration mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Dazu wurden 50 μl einer wäßrigen 120 mM NaOAc-Lösung zu 500 μl der jeweiligen wäßrigen Lösungen der Syntheseprodukte sowie 50 μl D_2O hinzugefügt. Anschließend wurden die Integrale der Methylgruppe der 10 mM NaOAc enthaltenden Lösung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit denen der Syntheseprodukte verglichen und damit deren Konzentration bestimmt.

2.3.7 Immunologische Methoden

2.3.7.1 Isolierung von PBMC

Zur Isolierung von PBMC (mononukleare Zellen des peripheren Blutes) (Boyum, 1968) wurde entweder heparinisiertes humanes Vollblut von gesunden Spendern (1 ml Heparin (Liquemin N 25000, Roche, Grenzach-Wylen) pro 50 ml frisch gespendetem Vollblut) oder Erythrozytenfilter (Spenden des Blutspendedienstes der Landeshauptstadt München) verwendet. Die Aufarbeitung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das heparinisierte Vollblut wurde 1:1 mit RPMI 1640-Medium verdünnt. Die Erythrozytenfilter wurden zunächst mit 30 ml Luft entgegen der Filtrationsrichtung teilweise entleert. Anschließend wurde der Filter noch zweimal in gleicher Richtung mit jeweils 20 ml 20%igem Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories, Linz, Österreich) in DPBS gespült. Zum Abschluß wurde nochmals mit 30 ml Luft der Filter entleert. Der gepoolte Filterinhalt wurde mit RPMI 1640-Medium 1:1 verdünnt. Jeweils 16 ml Lymphozytenseparationsmedium wurden in 50 ml *blue cap*-Röhrchen vorgelegt und mit 30 bis 34 ml der verdünnten Blutproben (aus Vollblut bzw. Erythrozytenfiltern) überschichtet. Nach der Zentrifugation (2200 rpm, 22 °C, 5 min, ohne Bremse) erhält man eine Interphase, welche die PBMC enthält. Die Granulozyten und Erythrozyten wurden größtenteils abgetrennt. Die Isolierung beruht auf einer Dichtentrennung. Das Lymphozytenseparationsmedium hat eine Dichte von 1.09 g/ml, während die Dichte der Granulozyten und Erythrozyten bei 1.09-1.1 g/ml liegt, sodaß diese zu Boden sinken, während die PBMC mit einer Dichte von 1.06-1.08 g/ml eine

weiße Schicht an der Grenze zum Separationsmedium bilden. Diese Phase wurde mit einer 10 ml Pipette vorsichtig entnommen. Die Interphasen eines Patienten wurden gepoolt, auf 50 ml mit RPMI 1640-Medium aufgefüllt (Verdünnung mit RPMI 1640 ungefähr 1:1), zentrifugiert (1700 rpm, 4 °C, 7 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde noch einmal mit 50 ml RPMI 1640 gewaschen, zentrifugiert (1700 rpm, 4 °C, 7 min), in 5 bis 10 ml RPMI 1640-Medium Komplet (siehe 2.1.6) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden auf Eis gelagert und anschließend direkt verwendet.

2.3.7.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden entweder frisch bereitete Zellsuspensionen verwendet (siehe 2.3.7.1) oder bei Bestimmung der Zellzahl von Kulturen, die Zellen zunächst gewaschen und in einem definierten Volumen resuspendiert. Um die toten Zellen sichtbar zu machen, wurden sie mit einem definierten Volumen Eosin verdünnt. Eosin diffundiert in tote Zellen und färbt sie rosa, während lebende Zellen gelblich bleiben. Gezählt wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer. Auf der Kammer sind 8 Großquadrate mit einer Seitenlänge von jeweils 1 mm aufgebracht. Davon enthalten vier Großquadrate jeweils 16 Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von 0.25 mm. Der Abstand zum Deckgläschen beträgt 0.1 mm. Das Volumen über einem Großquadrat ergibt sich damit zu 0.1 mm^3 bzw. $0.1 \text{ } \mu\text{l}$. Die Zellzahl pro Milliliter lässt sich damit berechnen aus:

$$N [\text{Zellen/ml}] = \text{Zellen im Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei zehnfach- bzw. vierzigfacher Vergrößerung.

2.3.7.3 Stimulierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Frisch isolierte PBMC wurden in RPMI 1640-Medium Komplet suspendiert, welches 2 mM L-Glutamin, 10 μM β -Mercaptoethanol, humanes rekombinantes IL-2 und 10% gepooltes humanes AB-Serum enthält. Terpenbiosynthese-Intermediate oder ihre

Analoga wurden in Kulturen von 1 ml in 24-Well-Platten (NUNCLON™ Surface, Nunc, Wiesbaden) 7 Tage lang bei 37 °C in einer 6%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Alle Experimente wurden als Doppelbestimmung durchgeführt, d.h. es wurden jeweils zwei identische Proben pro Datenpunkt angesetzt.

2.3.7.3.1 Zelldichtetitration

Die Zelldichtetitration wurde bei konstanten **E-23**-Konzentrationen von 800 pM, 4.0 nM sowie ohne **E-23** (Mediumkontrolle) durchgeführt. Die verwendete IL-2-Konzentration betrug 10 U/ml. Als Zelldichten wurden 125 000, 250 000, 500 000, 750 000, $1.0 \cdot 10^6$, $1.5 \cdot 10^6$, $2.0 \cdot 10^6$, $3.0 \cdot 10^6$, $4.0 \cdot 10^6$ und $5.0 \cdot 10^6$ PBMC/ml eingesetzt.

2.3.7.3.2 IL-2-Titration

Die IL-2-Titration wurde bei konstanten **E-23**-Konzentrationen von 800 pM, 4.0 nM sowie ohne **E-23** (Mediumkontrolle) bei einer Zelldichte von 500 000 PBMC/ml durchgeführt. Die verwendeten IL-2-Konzentrationen betragen 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 und 150 U/ml.

2.3.7.3.3 Antigentitration (Standardassay)

Die Antigentitrationen wurden bei einer Zelldichte von 500 000 PBMC/ml durchgeführt. Die verwendete IL-2-Konzentration betrug 10 U/ml. Die Konzentrationen der Phosphoantigene wurden wie folgt variiert: IPP (**7**), 3.13 mM-0.2 µM; DMAPP (**8**), 125 µM-1.6 nM; **E-23**, 4.0 nM-0.256 pM; **24**, 12.5 µM-800 pM; **25**, 3.13 mM-0.20 µM; **26**, 625 µM-40 nM; **27**, 12.5 µM-800 pM.

2.3.7.4 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Nach sieben Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 90% Luftfeuchte und 6% CO₂ wurden die Zellen resuspendiert und aus den 24-Well-Platten in 1.5 ml *Eppendorf caps* überführt. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 22 °C, 5 min) wurden die Überstände abgesaugt, jeweils 100 µl 10% FBS in PBS hinzugefügt und die resuspendier-

ten Zellen auf eine 96-Well-Platte (V-Shape, NUNCLON™ Surface, Nunc, Wiesbaden) überführt. Nach nochmaligem Zentrifugieren (1400 rpm, 4 °C, 5 min) und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Dazu wurde jede Probe mit 50 µl Antikörperlösung 30 min auf Eis unter Lichtausschluß inkubiert. Die Antikörperlösung wurde aus 10% FBS in PBS mit monoklonalen PE- oder FITC-konjugierten Antikörpern mit den in Tabelle 1 (siehe 2.1.8) angegebenen Verdünnungen hergestellt. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Zellen zweimal mit jeweils 150 µl 10% FBS in PBS gewaschen, zentrifugiert (1400 rpm, 4 °C, 5 min) und schließlich in 250 µl 10% FBS in PBS resuspendiert.

2.3.7.5 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der FACS(*Fluorescence Activated Cell Sorter*)-Analyse kann man einzelne Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzsignale unterscheiden. Dazu werden die Zellen mittels monoklonaler Antikörper mit einem Farbstoff markiert. Der Farbstoff ist mit dem gegen ein bestimmtes Zelloberflächenantigen gerichteten Antikörper konjugiert, wodurch selektiv Oberflächenmotive wie z. B. Rezeptoren an der Zelloberfläche detektiert werden können. Die Stärke der Lichtemission nach Anregung ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörpermoleküle. Zur Anregung von Fluorochromen wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet.

Die markierten Zellen werden im Durchflußzytometer angesaugt und in einer Kapillare durch einen Flüssigkeitsstrom vereinzelt. In einer Kammer werden die einzelnen Zellen mittels eines Laserstrahls angeregt, und das emittierte bzw. gestreute Licht wird mit Hilfe verschiedener Filter detektiert und analysiert. Dabei wird jeder Zelle für folgende Parameter ein bestimmter Wert zugeordnet: *Forward Scatter* (Streulicht in Richtung des Laserstrahls) als Maß für die Größe, *Side Scatter* (Streulicht zur Seite) als Maß für die Granularität und zwei weitere Kanäle, FL1 und FL2 (Stärke des Emissionssignals) als Maß für die Menge an gebundenem Antikörper. Auf dem FL1-Kanal wird grünes Licht, FITC (Fluoresceinisothiocyanat), auf dem FL2-Kanal rotes Licht, PE (R-Phycoerythrin) bei Wellenlängen von 530 nm bzw. 585 nm gemessen. Aliquots von 50 000 PE- und/oder FITC-gefärbten Zellen wurden jeweils analysiert.

2.3.7.6 Bestimmung von EC_{50} -Werten

Die Bestimmung der EC_{50} -Werte der Spendertitrationsreihen wurde durch Kurvenfitting mit Hilfe des Programms Origin 6.0G Professional von Microcal (Northampton, USA) unter Verwendung einer Boltzmann-Funktion vorgenommen. Dazu wurde der prozentuale Anteil von $CD3^+V\delta 2^+-\gamma\delta$ -T-Zellen von allen $CD3^+$ -Zellen gegen den Logarithmus der Antigenkonzentration aufgetragen. Diese sigmoidalen Kurven wurden mittels einer Boltzmann-Funktion analysiert und gleichzeitig die halbmaximale Stimulation bestimmt, diese entspricht dem EC_{50} -Wert (Abbildung 4).

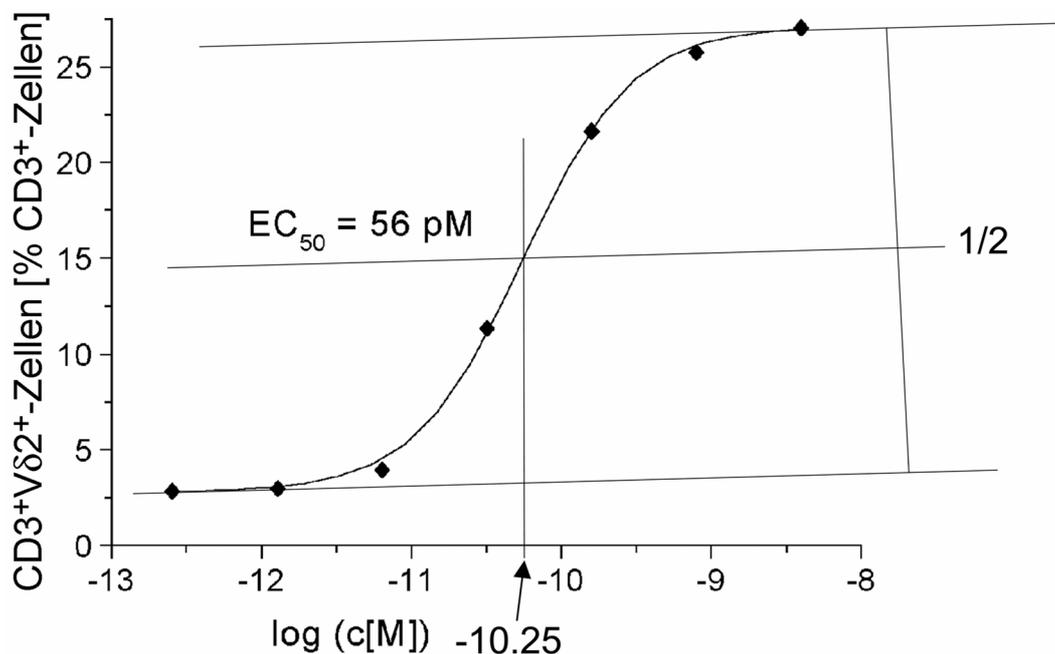


Abbildung 4: Bestimmung der EC_{50} -Werte der Antigen-Titrationskurven mittels Kurvenfitting. 1/2 zeigt die halbmaximale Steigerung der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zell-Proliferation an.

2.3.7.7 Stabilitätstests von E-23 in Zellkultur

Für die durchgeführten Stabilitätstests wurde radioaktivmarkiertes $[1-^3H]1$ -Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat ($[1-^3H]23$) verwendet, welches in Zusammenarbeit mit S. Hecht hergestellt wurde (Hecht et al., 2002).

2.3.7.7.1 Stabilität von E-23 bei geringer Zelldichte (Standardassay-Bedingungen)

Jeweils 150 µl einer 28 µM (4.2 nmol, 0.35 µCi, 84 µCi/µmol) Lösung von [^3H]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat ([^3H]23) und 10 U/ml IL-2 in RPMI 1640-Medium Komplette wurden entweder ohne Zugabe von Zellen oder unter Zusatz von 75 000 PBMC (500 000/ml) (Spender SA) bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubation (0, 0.5, 2 und 5 h) wurden die Proben abzentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand abgenommen. Zu dieser Lösung wurden auf Eis 10 µl 30%ige TCA zugegeben. Nach 30 s wurden auf Eis 20 µl 30%ige NaOH hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 25 min). Der erhaltene Überstand wurde dann über einen Nanosep Membranfilter 100 kD filtriert (14000 rpm, 50 min, 4 °C).

Die Analyse des Reaktionsansatzes wurde mittels analytischer *Reversed Phase*-Ionenpaar-HPLC mit radioaktiver Detektion durchgeführt. Dazu wurde eine Multospher 120 RP 18 AQ-5 Säule (250 × 3.0 mm, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) mit Eluent A: 10 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat pH 6.0; Eluent B: 10 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat pH 6.0 in 70% MeOH, Flußrate, 0.55 ml·min⁻¹ verwendet. Als Programm wurde ein linearer Gradient (0 bis 20 min: 15 bis 35% Eluent B, 20 bis 35 min: 35 bis 75% Eluent B, 35 bis 40 min: 75% Eluent B, 40 bis 45 min: 75 bis 15% Eluent B, 45 bis 55 min: 15% Eluent B) benutzt. Die Retentionszeit von [^3H]23 betrug dabei 26.5 min, die als interner Standard verwendete ^3H -haltige Verunreinigung eluierte zwischen 8 und 18 min.

2.3.7.7.2 Stabilität von E-23 bei hoher Zelldichte

150 µl einer Suspension von 50 · 10⁶ PBMC (330 · 10⁶/ml) (Spender SA) in RPMI 1640-Medium Komplette, welche 28 µM (4.2 nmol, 0.35 µCi, 84 µCi/µmol) [^3H]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat ([^3H]23) und 10 U/ml IL-2 enthielt, wurde bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubation (1 h bzw. 5 h) wurden jeweils 75 µl abzentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 5 min), der Überstand abgenommen, das Pellet mit 20 µl bidest. H₂O resuspendiert, die Suspension nochmals zentrifugiert und beide Überstände vereinigt. Zu dieser Lösung wurden auf Eis 5 µl 30%ige TCA zugegeben. Nach 30 s wurden auf Eis 11 µl 30%ige NaOH hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 10 min). Der erhaltene Überstand wur-

de dann über einen Nanosep Membranfilter 100 kD filtriert (14000 rpm, 4 °C, 30 min).

Die Analyse des Reaktionsansatzes wurde mittels analytischer *Reversed Phase*-Ionenpaar-HPLC mit radioaktiver Detektion durchgeführt (siehe 2.3.7.7.1).

2.3.7.8 ELISA-Analyse

ELISA steht für *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Dabei handelt es sich um eine Methode mit deren Hilfe aus komplexen Proteinmischungen wie beispielsweise Überständen von Zellkulturen einzelne Proteine quantitativ nachgewiesen werden können. Dazu werden Antikörper gegen einzelne Proteine auf 96-Loch-Mikrotiterplatten, welche spezielle Polysorb-Plastikoberflächen besitzen, aufgebracht. Dabei entsteht eine sehr feste, nicht-kovalente Bindung auf der Kunststoffoberfläche. Freie Bindungsstellen werden durch Inkubation mit FBS in PBS blockiert. Im nächsten Schritt wird die Antigen-Lösung, sprich die Protein-Lösung, aufgegeben. Dadurch kommt es zu einer Bindung mit dem zuvor an die Oberfläche gebundenen Antikörper gegen ein bestimmtes Protein. Nach einem Waschschrift wird erneut mit einem Antikörper, welcher mit Biotin kovalent verbunden ist, inkubiert. Dabei handelt es sich um einen Antikörper gegen dasselbe Protein mit dem die Platte zuvor beschichtet wurde, der zusätzlich biotinyliert ist. Im Folgeschritt wird Avidin-gekoppelte Peroxidase hinzugefügt, wobei es zur Ausbildung von Biotin-Avidin-Komplexen kommt, sofern sich in der Proteinlösung Moleküle des Zielproteins befunden haben. Abschließend wird eine Farbreaktion durch Zugabe von OPD herbeigeführt. Die Messung der Farbtiefe des Chromogens erfolgt mit Hilfe eines speziellen Photometers, eines Mikro-ELISA-Readers. Die ermittelten Absorptionswerte werden durch Vergleich mit Standards mit Hilfe einer Software ausgewertet.

2.3.7.8.1 Erzeugung der ELISA-Proben

Jeweils 5 ml einer Zellsuspension von $2.5 \cdot 10^6$ PBMC (Spender SA) (500 000/ml) in RPMI 1640-Medium Komplett mit 10 U/ml IL-2 wurden in 6-Well-Platten (NUNC-LON™ Surface, Nunc, Wiesbaden) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dabei wurden

vier verschiedene Konzentrationen an Stimulanz präpariert: ohne Stimulanz, 4.0 nM **E-23**, 32 pM **E-23**, 10 ng/ml LPS.

Die Probennahme erfolgte nach 12 h, 24 h, 48 h und 6.5 d durch Abnehmen der Überstände und anschließende Zentrifugation (1700 rpm, 4 °C, 5 min). Die Proben wurden bis zur Analyse bei –20 °C aufbewahrt.

2.3.7.8.2 ELISA-Analyse der durch **E-23**-Stimulation erzeugten Überstände

Für die Analyse wurden folgende humane Zytokinsets verwendet: IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15, TNF- α und IFN- γ (siehe 2.1.9).

Die ELISA-Analyse wurde in 96-Well-ELISA-Platten im einzelnen folgendermaßen durchgeführt:

1. *Coating*. Es wurde für jedes Zytokin jeweils eine komplette 96-Well-Platte (Nunc-Immuno™ Plate, MaxiSorb™ Surface, Nunc, Wiesbaden) mit 50 μ l/Well präpariert. Für das *Coating* wurden Maus- bzw. Ratte-anti-human Zytokin Antikörper als Lösungen in DPBS mit folgenden Endkonzentrationen verwendet, für IL-1 α , 2.0 μ g/ml; IL-4, 2.0 μ g/ml; IL-6, 1.0 μ g/ml; IL-10, 2.0 μ g/ml; IL-12p40, 4.0 μ g/ml; IL-12p70, 2.0 μ g/ml; IL-15, 2.0 μ g/ml; TNF- α , 1.0 μ g/ml und IFN- γ , 2.0 μ g/ml. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C in einer feuchten Kammer über Nacht. Anschließend wurde jede Platte dreimal mit PBS/Tween 0.02% gewaschen und vor der nächsten Verwendung sorgfältig trocken geklopft.
2. *Blocking*. Jede 96-Well-Platte wurde mit jeweils 200 μ l/Well 10% FBS/DPBS befüllt und 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde jede Platte dreimal mit PBS/Tween gewaschen und vor der nächsten Verwendung sorgfältig trocken geklopft.
3. *Proben/Standards*. Die Proben wurden nach dem Auftauen über einen 0.2 μ m Spritzenfilter filtriert, um ausgefallenes Protein abzufiltrieren. Dann wurden die Proben (je 3.5 ml) über 5 kD Membranfilter (Ultrafree-4 Centrifugal Filter Unit, Millipore, Eschborn) auf 300 μ l aufkonzentriert. Die Membranen wurden mit 200 μ l 10% FBS/DPBS gewaschen, mit der Proteinlösung vereinigt und schließlich vor dem Auftrag mit 600 μ l DPBS auf 1.1 ml verdünnt. Jede Probe wurde jeweils zweimal pro Platte aufgetragen, zusätzlich wurden für die LPS-Proben 1:5-Verdünnungen hergestellt und auf der IFN- γ -Platte wurden alle Proben noch

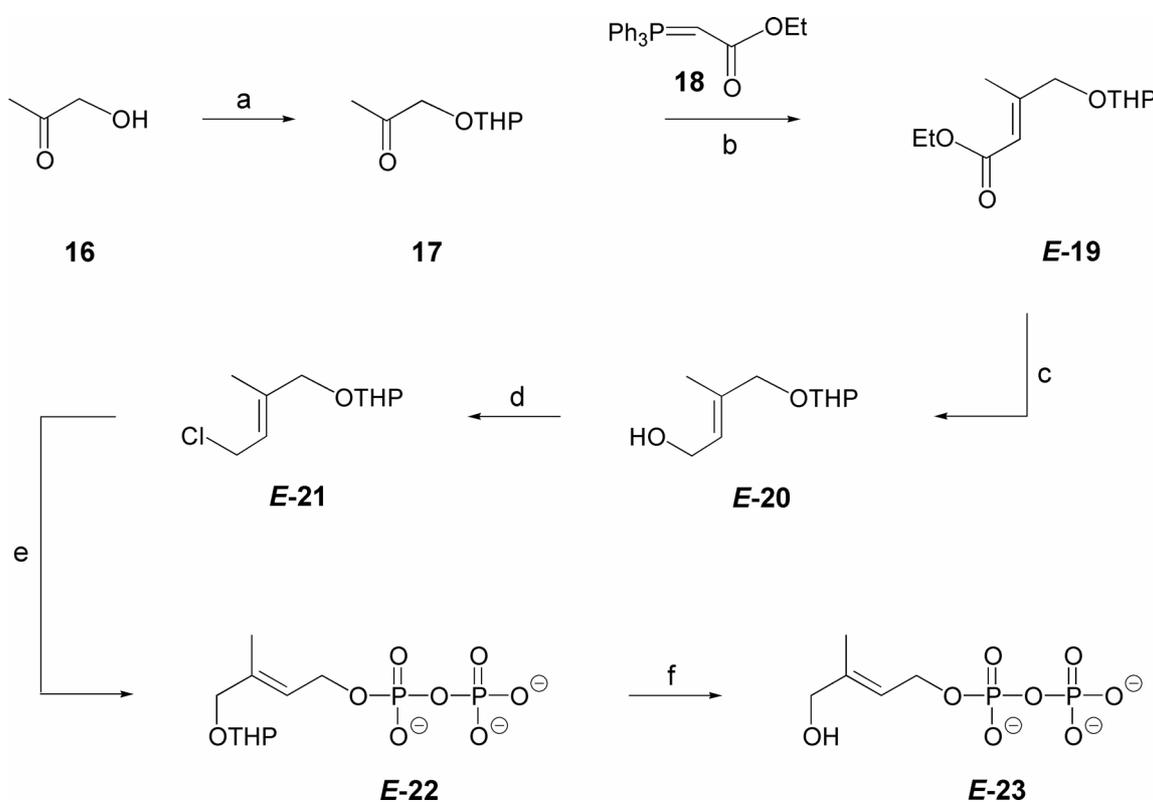
- 1:10 verdünnt. Die Standards wurden in Verdünnungsreihen von 10 ng/ml ausgehend (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) aufgetragen. Proben und Standards wurden gleichermaßen mit je 50 µl/Well aufgetragen und 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde jede Platte dreimal mit PBS/Tween gewaschen und vor der nächsten Verwendung sorgfältig trocken geklopft.
4. *Detektion*. Es wurden biotinylierte Maus- bzw. Ratte-anti-human Zytokin Antikörper in Konzentrationen von jeweils 1.0 µg/ml in 10% FBS/DPBS verwendet und je 50 µl/Well für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde jede Platte dreimal mit PBS/Tween gewaschen und vor der nächsten Verwendung sorgfältig trocken geklopft.
 5. *POX*. Für die Detektion wurden 50 µl/Well ExtrAvidin Peroxidase-Konjugat in einer 1:1000-Verdünnung in 10% FBS/DPBS 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde jede Platte sechs Mal mit PBS/Tween gewaschen und vor der nächsten Verwendung sorgfältig trocken geklopft.
 6. *OPD-Farbreaktion*. Fünf goldene Tabletten (Puffer) wurden in 100 ml Ultrapurwasser gelöst, anschließend wurden fünf silberne OPD-Tabletten hinzugefügt und sofort nach dem vollständigen Lösen 100 µl/Well pipettiert und im Dunkeln 5-30 min inkubiert. Abschließend wurde die Farbreaktion mit 30 µl/Well verdünnter Schwefelsäure (0.2 M) beendet und mittels eines ELISA-Readers (Emax precision microplate reader; Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) die Extinktion bei 490 nm abzüglich der Extinktion bei 650 nm ausgelesen und mit der SOFTmax[®] PRO-Software von Molecular Devices analysiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Synthese von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E*-23)

(*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E*-23) wurde in einer sechsstufigen Synthese aus Hydroxyaceton (**16**) und (Ethoxycarbonylmethenyl)-triphenylphosphoran (**18**) mit einer Gesamtausbeute von 38% hergestellt (Schema 3). Diese Verbindung ist identisch mit dem Produkt des IspG-Proteins, welches ein Intermediat des alternativen Terpenbiosyntheseweges ist.

Schema 3



Reagenzien und Bedingungen: (a) DHP, PPTS, 25 °C (2.5 h); (b) Toluol, Rückfluß (23 h); (c) (1) DIBALH, CH₂Cl₂, -78 °C (2.5 h), (2) 1 M NaOH/H₂O; (d) *p*-TsCl, DMAP, CH₂Cl₂, 25 °C (3 h); (e) Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogendiphosphat, MeCN, 25 °C (3 h); (f) HCl/H₂O pH 1.3, 25 °C (20 min).

3.1.1 Reaktion von Hydroxyaceton mit 3,4-Dihydro-2H-pyran

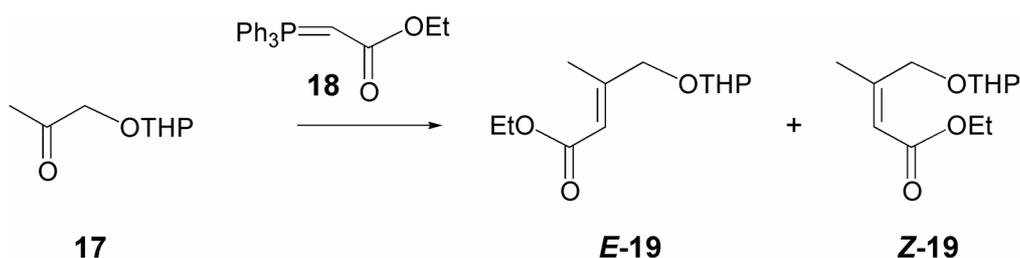
Eine Behandlung von Hydroxyaceton (**16**) mit einem Überschuß 3,4-Dihydro-2H-pyran unter Katalyse von Pyridinium-toluol-4-sulfonat (PPTS) (Hagiwara und Uda, 1984) lieferte das bekannte Tetrahydropyranyl(THP)-Derivat **17** (Schema 3). Wurde die Reaktion mit 1.2 Equivalenten Dihydropyran in CH₂Cl₂ durchgeführt, ist nach 20 h noch kein vollständiger Umsatz zu erzielen. Verwendet man stattdessen Dihydropyran im Überschuß ohne zusätzliches Lösungsmittel, verläuft die Reaktion glatt unter Umsatz des gesamten Hydroxyacetons. Bei Verwendung von 5.0 Equivalenten trat vollständiger Umsatz auf. Führt man nach teilweiser Entfernung des überschüssigen Dihydropyrans am Rotationsverdampfer eine Destillation durch, wird die Schutzgruppe teilweise abgespalten. Das läßt sich zum einen durch eine gewisse Temperaturlabilität der Schutzgruppe zum anderen durch einen niedrigen pH-Wert aufgrund des vorhandenen PPTS erklären. Die Reinigung mittels Flashchromatographie über Silicagel mit Hexan/Aceton 4:1 ließ sich problemlos ohne Verlust der Schutzgruppe beim abschließenden Entfernen des Lösungsmittels mit einer Ausbeute von 82% durchführen.

3.1.2 Synthese von (*E*)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (*E*-19)

3.1.2.1 Wittigreaktion zur Bildung von (*E/Z*)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (*E/Z*-19)

Eine Wittigreaktion von **17** mit (Ethoxycarbonylmethylen)triphenylphosphoran (**18**) (Miyaoaka et al., 1998) in Toluol unter Rückfluß lieferte eine 6:1 Mischung aus (*E*)- und (*Z*)-Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-enoat (***E/Z*-19**) (Schema 4).

Schema 4



Aus dieser Mischung wurde das reine (*E*)-Isomer mittels präparativer HPLC isoliert (die stereochemische Charakterisierung der beiden Isomere ist unten gezeigt).

Die Steuerung der Wittigreaktion in Richtung der Bildung des *E*-Produktes gelang durch den Einsatz eines stabilisierten Ylids, welches kommerziell als weißes kristallines Pulver erhältlich ist. Die Umsetzung des THP-geschützten Hydroxyacetons **17** bei niedrigen Temperaturen durch *in situ* erzeugte Ylide erbrachte keine gesteuerte Produktbildung, zumal meist überhaupt keine Produktbildung erfolgte. Das läßt sich durch die Tatsache erklären, daß die Verwendung von Ketonen im allgemeinen höhere Temperaturen erfordert. Im vorliegenden Fall wurden die Reaktionen in zum Rückfluß erhitztem Toluol, d.h. bei 112 °C, durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde das thermodynamisch stabilere *E*-Produkt im Überschuß gebildet. Fortgesetztes Rühren unter Rückfluß ergab keine signifikante Änderung des Isomerenverhältnisses bei Verdopplung, Verdreifachung bzw. Verfünffachung der Reaktionszeit von 14 h (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über Reaktionszeiten, Ausbeuten sowie *E/Z*-Isomerenverhältnisse der Wittigreaktionen.

Versuch Nr.	Reaktionszeit	Gesamtausbeute	Isomerenverhältnis <i>E/Z</i>
1	14 h	80%	85:15
2	23 h	89%	86:14
3	39 h	89%	87:13
4	65 h	78%	88:12

Lediglich die Gesamtausbeute konnte bei einer Verdopplung und Verdreifachung der Reaktionszeit (23 und 39 h) aufgrund erhöhter Umsetzung der Carbonylkomponente noch erhöht werden; dieser Effekt war bei einer weiter fortgesetzten Reaktion (65 h) nicht mehr zu beobachten. Im Gegenteil, aufgrund der Bildung von Nebenprodukten, vermutlich polymerer Spezies, konnte ein Rückgang der Gesamtausbeute festgestellt werden. Eine Reaktionsdauer von 23 h (Versuch 2) stellte eine ideale Kombination an guter Gesamtausbeute und Dauer der Reaktion dar. Die geringfügige Verschiebung der Isomerenverhältnisse hin zu einem höheren *E/Z*-Verhältnis bei längeren

Reaktionszeiten stellt im Hinblick auf die Gesamtausbeuterniedrigung keine Alternative zur 23-stündigen Reaktion dar.

3.1.2.2 HPLC-Reinigung des (E/Z)-Gemisches von Ethyl-2-methyl-1-tetrahydropyranloxy-but-2-enoat (E/Z-19)

Versuche, eine Reinigung mittels silberderivatisiertem Silicagel durchzuführen, schlugen fehl. Diese Methode findet Anwendung bei der Analyse von mehrfachungesättigten Fettsäuren (Dobson et al., 1995). Entscheidend bei diesem Verfahren ist, daß hierbei die Z-Isomere eine stärkere Bindung an das mit Ag⁺-Ionen beladene Säulenmaterial zeigen. Dieses Verhalten steht dem beobachteten Effekt des reinen Silicagels genau entgegen, daher konnte auf dieser Basis keine Trennung der Isomeren erzielt werden. Die Detektierbarkeit der Ethylestergruppe bei 254 nm im UV-Licht ermöglichte es jedoch, eine Reinigung über präparative HPLC durchzuführen. Die Wahl des Eluentengemisches startete mit Wasser/Methanol-Mischungen. Zugabe von Isopropanol führte zu einer Erhöhung der Trennung bei gleichzeitiger Verbreiterung des eluierten Peaks und größerer Retentionszeit. Ein Mischungsverhältnis von Methanol/Isopropanol/Wasser 33:22:45 (v/v) bei einer Flußrate von 76 ml·min⁻¹ lieferte schließlich eine isomerenreine Trennung von 200 mg Rohmaterial pro Trennungsschritt.

3.1.3 DIBALH-Reduktion des Ethylesters (E-19) zum Alkohol (E-20)

Reduktion von **E-19** mit DIBALH (Watanabe et al., 1996) in CH₂Cl₂ lieferte (E)-2-Methyl-1-tetrahydropyranloxy-but-2-en-4-ol (**E-20**). Um Nebenprodukte zu vermeiden, war es wichtig, die Temperatur bis zur Zugabe der wäßrigen Natronlauge auf -78 °C zu halten. Während der Aufarbeitung war es essentiell, Aluminiumsalze mittels Extraktion mit größeren Mengen Methanol zu entfernen; andernfalls konnte das ölige Produkt mittels Chromatographie auf Silicagel nicht in befriedigenden Ausbeuten isoliert werden.

3.1.4 Erzeugung des Allylchlorids **E-21**

Der Allylalkohol **E-20** wurde mit DMAP und *p*-TsCl in CH₂Cl₂ in das Chlorid **E-21** überführt. Das Chlorid **E-21** ist bei Raumtemperatur und 4 °C sehr instabil und muß bei –20 °C gelagert werden. Die Synthese von Chlorallyl **21** wurde analog einer Methode, welche zur Synthese von Tosylaten aus den entsprechenden Alkoholen dient, durchgeführt (Davisson et al., 1986). Da es sich bei dem vorliegenden Alkohol um einen Allylalkohol handelt, konnte nur die entsprechende Chlorspezies isoliert werden. Eine tosylierte Verbindung wurde nicht gefunden. In einer von Nicolaou (Hwang et al., 1984) entwickelten Synthese zur Umsetzung von verschiedensten Alkoholen, unter anderem auch Allylalkoholen, wird ebenfalls *p*-TsCl/DMAP verwendet. Der Unterschied zur Synthese von Poulter (Davisson et al., 1986) besteht darin, daß zusätzlich NEt₃ als Base eingesetzt und DMAP im Unterschuß von nur 0.6 Äquivalenten benötigt wird. Im Vergleich zur Verwendung von 1.4 Äquivalenten DMAP ohne NEt₃ konnte keine Ausbeuteverbesserung erzielt werden. Eine Steigerung der Ausbeute durch Zusatz von DMAP im größeren Überschuß (2.0 Äquivalente) ergab Probleme mit der Isolierung des Materials durch Entstehung großer Mengen an Dimethylaminopyridiniumsalz, aus welchem sich das Produkt nicht quantitativ entfernen ließ. Als weitere Option zur Ausbeuteverbesserung durch Reduktion der Nebenproduktbildung wurde die Reaktion bei tieferen Temperaturen durchgeführt. Weder bei –78 °C noch bei –10 °C war eine Reaktion zu beobachten. Daher wurde die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ausbeuten bei Äquivalentverhältnissen von Alkohol **20**:*p*-TsCl:DMAP von 1.0:1.2:1.4 variierten von 63 bis 78% bei der Verwendung des Isomerengemisches. Die isomerenreine Verbindung ließ sich in 93% Ausbeute umsetzen.

3.1.5 Bildung der geschützten Diphosphatverbindung **E-22**

Die Diphosphatgruppe wurde durch eine Reaktion von **E-21** mit 1.2 Äquivalenten Tris(tetra-*n*-butylammonium)hydrogendiphosphat in MeCN (Davisson et al., 1986) eingeführt. Das entstandene Diphosphat **E-22** konnte mittels zweier chromatographischer Schritte gereinigt werden - Ionenaustauscherchromatographie auf DOWEX 50 WX8 (NH₄⁺-Form) und Säulenchromatographie über Cellulose. Alternativ dazu wurde

die Reaktionsmischung direkt ohne vorherige Reinigung im folgenden Reaktions-schritt verwendet.

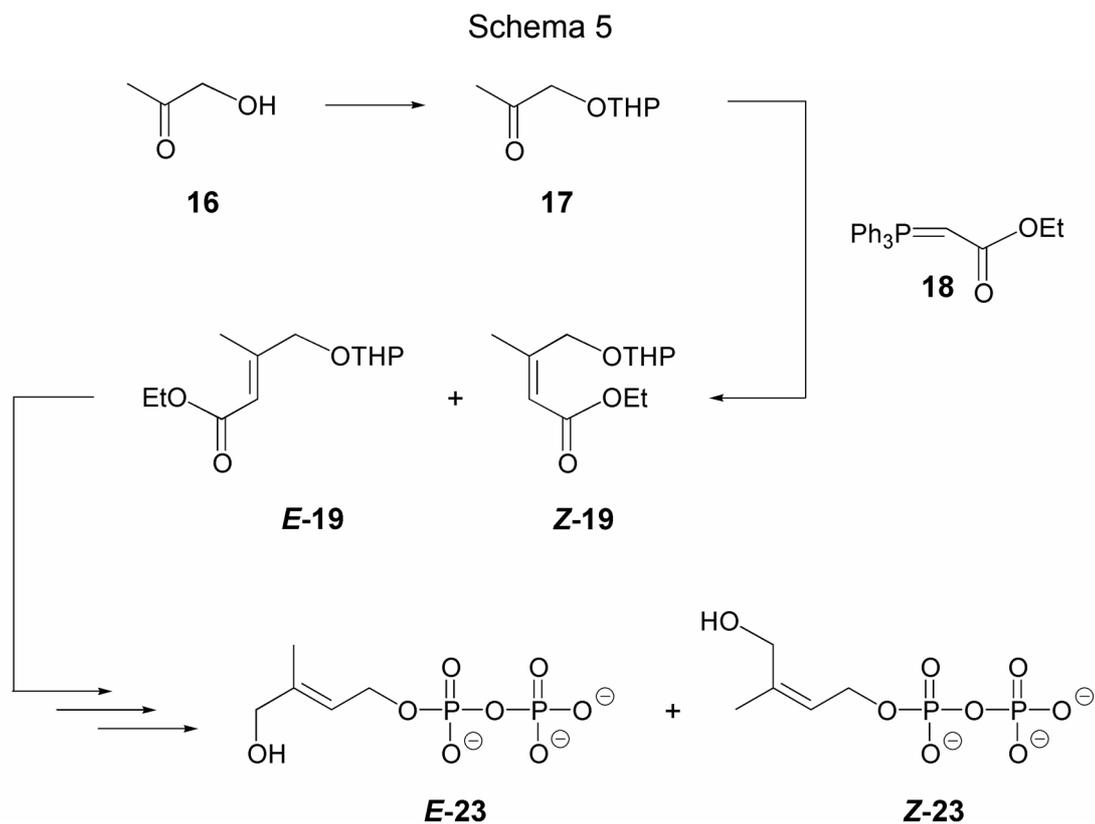
3.1.6 Entschützung des THP-Diphosphats *E-22* zur Bildung von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E-23*)

Die THP-Gruppe von ***E-22*** wurde durch saure Hydrolyse (pH 1.3) bei Raumtemperatur entfernt. Dabei war es entscheidend, den pH-Wert nicht zu lange bei 1.3 zu belassen, da ansonsten die Diphosphatgruppe abgespalten wird, und es zur Bildung einer vinylichen Spezies kommt. Aus diesem Grund wurde die Reaktion mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt. Um keine weitere Hydrolyse während der Messung zu erhalten, wurde die Mischung vor jeder Kontrollmessung mit Natronlauge neutralisiert. (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (***E-23***) wurde mittels Ionenaustauscherchromatographie auf DOWEX 50 WX8 (NH₄⁺-Form) und Chromatographie über Cellulose gereinigt. Die sterisch anspruchsvollen (Tetra-*n*-Butyl)ammonium-Kationen des Phosphorylierungsreagenzes mußten über den Kationenaustauscher vollständig abgetrennt werden, da sich sonst die Cellulosereinigung nicht erfolgreich durchführen läßt. Die Ausbeute über beide Schritte betrug 66%.

3.2 Strukturbestimmung von synthetischem (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat *E*-23 mittels NOESY-Spektroskopie einer Mischung von (*E*)- und (*Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E/Z*-23)

3.2.1 Erzeugung einer Mischung von (*E*)- und (*Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E/Z*-23)

Eine 7:1-Mischung von (*E*)- und (*Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E/Z*-23) wurde über dieselbe Reaktionssequenz wie *E*-23 aus der Isomerenmischung der Wittigreaktion von *E/Z*-19 erzeugt und für die spektroskopische Charakterisierung beider Isomere verwendet (Schema 5).



3.2.2 NOESY-Spektroskopie der Mischung von (*E*)- und (*Z*)-1-Hydroxy-2-methylbut-2-enyl-4-diphosphat (*E/Z*-23)

Die *E/Z*-Zuordnungen basieren auf NOESY-Experimenten. Dabei konnten die starken NOE-Wechselwirkungen zwischen H-3/H-1 und H-4/H-2-methyl, welche zu ***E*-23** gehören beziehungsweise die NOE-Wechselwirkungen zwischen H-3/H-2-methyl und H-4/H-1, welche zu ***Z*-23** gehören, zugeordnet werden (Abbildung 5).

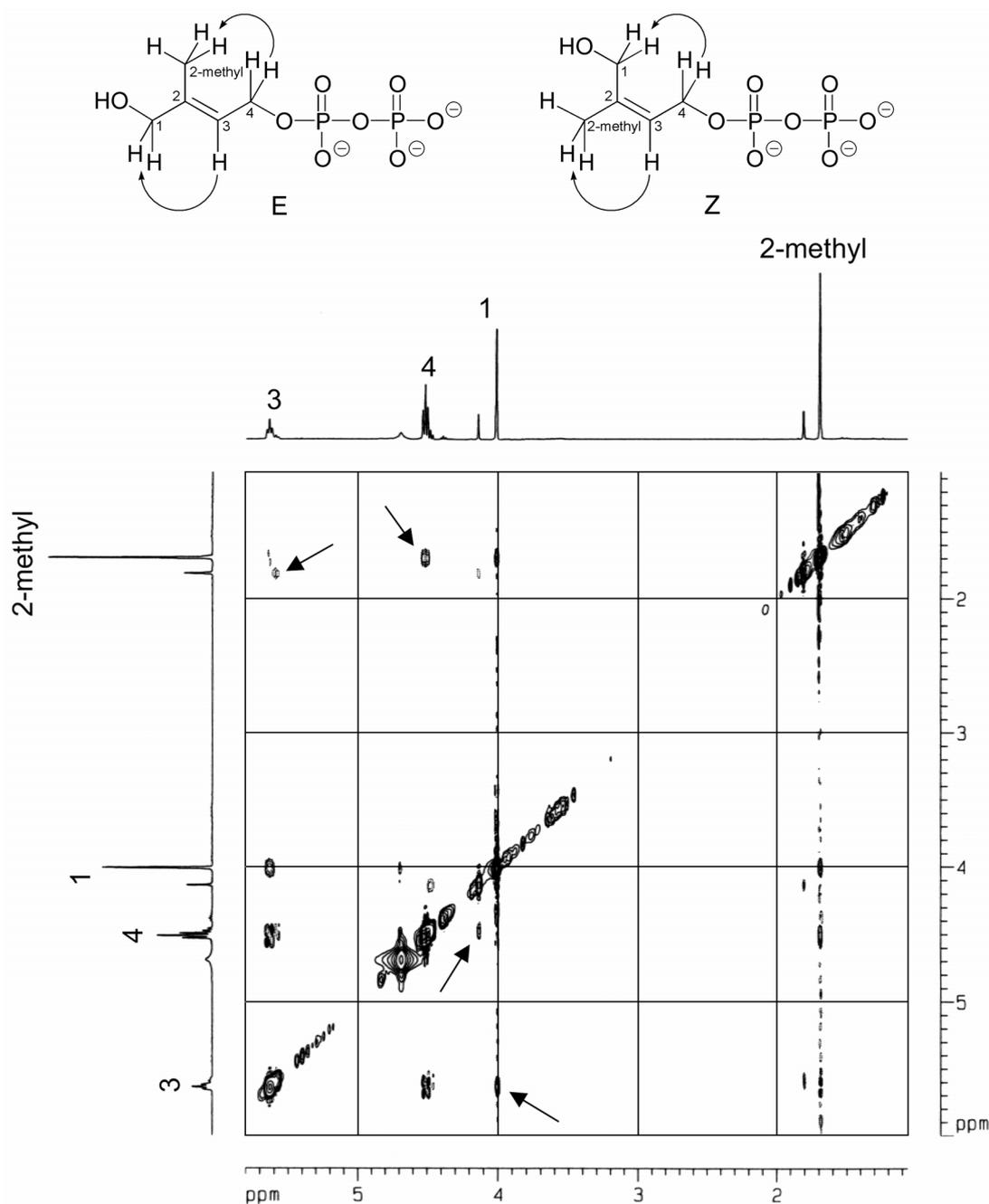


Abbildung 5: NOESY-Spektrum von ***E/Z*-23**. Die gezeigten Kreuzsignale sind in Anti-phase zur Diagonalen.

Die Geometrie der Doppelbindung der Hauptkomponente der *E/Z*-Mischung ergibt sich somit zu *E*, d.h. die im Überschuß vorhandene Verbindung ist **E-23**. Die Quantifizierung der NOE-Effekte sowie die Ergebnisse von HMBC-Experimenten sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: 2D-NMR-Daten von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**) und (*Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**Z-23**) in D₂O bei pH 7.

Position	NMR-Korrelationsmuster	
	NOESY (rel. NOE) ^a	HMBC
<i>(E)</i> -1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23)		
1	2-methyl (53)	2, 2-methyl, 3
2	-	-
2-methyl	-	1, 2, 3
3	1 (100)	-
4	2-methyl (79)	2, 3
<i>(Z)</i> -1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (Z-23)		
1	2-methyl (34)	2, 2-methyl, 3
2	-	-
2-methyl	-	1, 2, 3
3	2-methyl (88)	-
4	1 (100)	2, 3

^a die Intensitäten der Kreuzsignale sind in relativen Einheiten angegeben

Die Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale von **Z-23** konnte durch Vergleich des Gemisches aus **E-23** und **Z-23** mit dem Spektrum von isomerenreinem **E-23** vorgenommen werden (Abbildung 6).

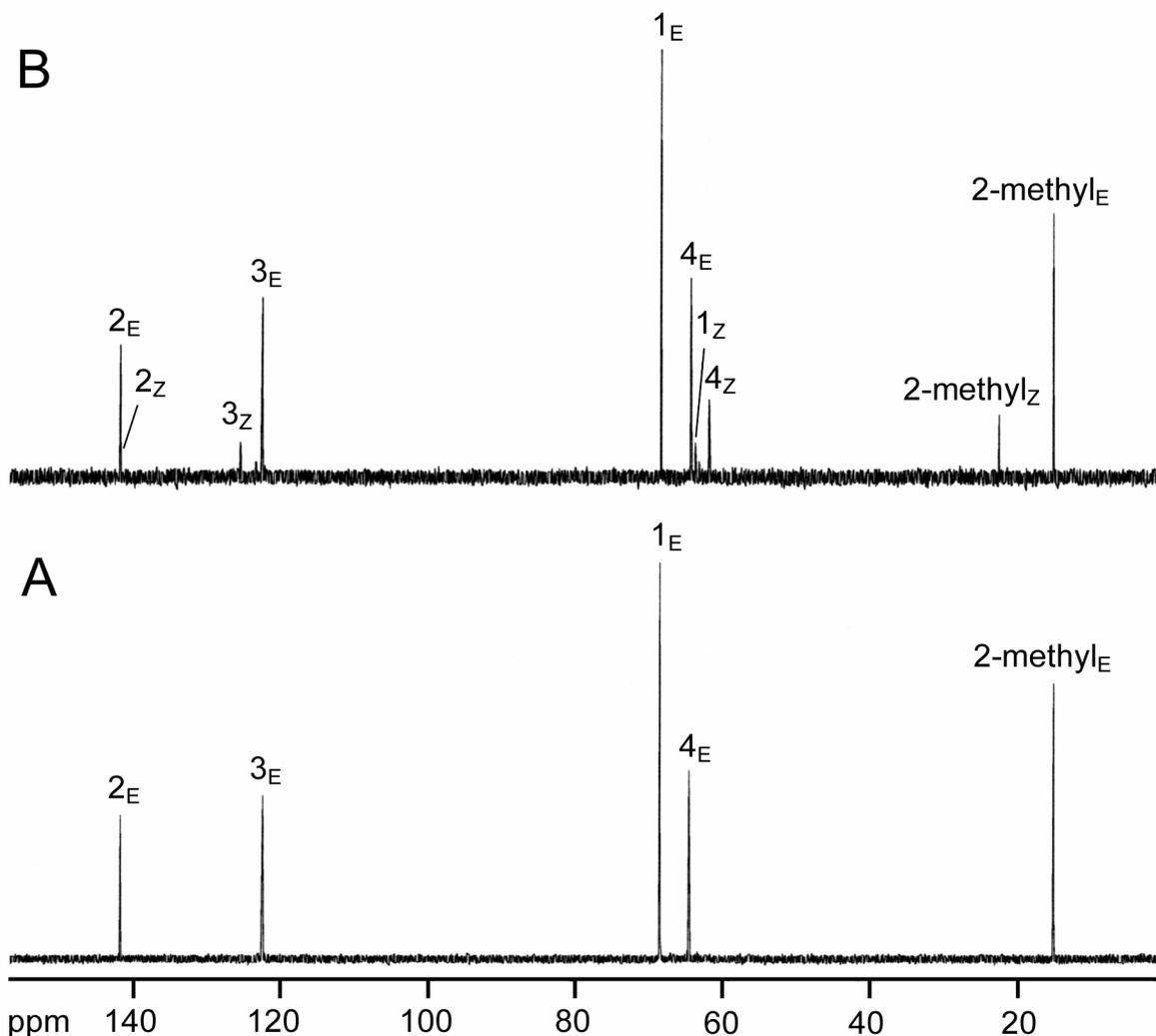


Abbildung 6: ^{13}C -NMR-Spektren von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**) und (*Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**Z-23**) in D_2O bei pH 7. A, **E-23** und B, **E/Z-23**. Die Indizes E bzw. Z stehen für Signale von **E-23** bzw. **Z-23**.

Auf diesem Weg konnten beide Verbindungen eindeutig charakterisiert werden. So ließen sich die Doppelbindungen sowohl der Hauptkomponente als auch der Nebenverbindung des Gemisches als **E-23** bzw. **Z-23** bestimmen. Die NMR-Daten beider Verbindungen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: NMR-Daten von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**) und (*Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**Z-23**) in D₂O (pH 7).

Position	Chemische Verschiebungen [ppm]			Kopplungskonstanten [Hz]			¹³ C-Isotopenshifts ^a [ppb]
	¹ H ^b	¹³ C ^b	³¹ P ^c	J _{HH}	J _{PC}	J _{PP}	
<i>(E)</i> -1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (E-23)							
1	3.88	68.6					8
2		141.6					67
2-methyl	1.57	15.1					15
3	5.52	122.7		6.9 1.2	8.0		100
4	4.39	64.3		7.2	5.1		30
P _β			-4.48 ^d				20.8 ^d
P _α			-7.06 ^d				20.8 ^d
<i>(Z)</i> -1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (Z-23)							
1	4.03	62.0					
2		141.8					
2-methyl	1.70	22.7					
3	5.49	125.6		6.8	7.7		
4	4.41	63.8		7.3	5.1		
P _β			-4.48 ^d				20.8 ^d
P _α			-7.06 ^d				20.8 ^d

^a zusammen mit [U-¹³C₅]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat gemessen

^b mit Trimethylsilylpropansulfonat als externem Standard

^c mit 85% Orthophosphorsäure als externem Standard

^d als **E/Z-23**-Mischung gemessen

3.3 Strukturzuordnung des biosynthetisch hergestellten [U-¹³C₅]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphats (**23**)

Durch die Synthese einer *E/Z*-Mischung von 1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat konnte die Konfiguration des Naturprodukts **23** zugeordnet werden (Abbildung 7).

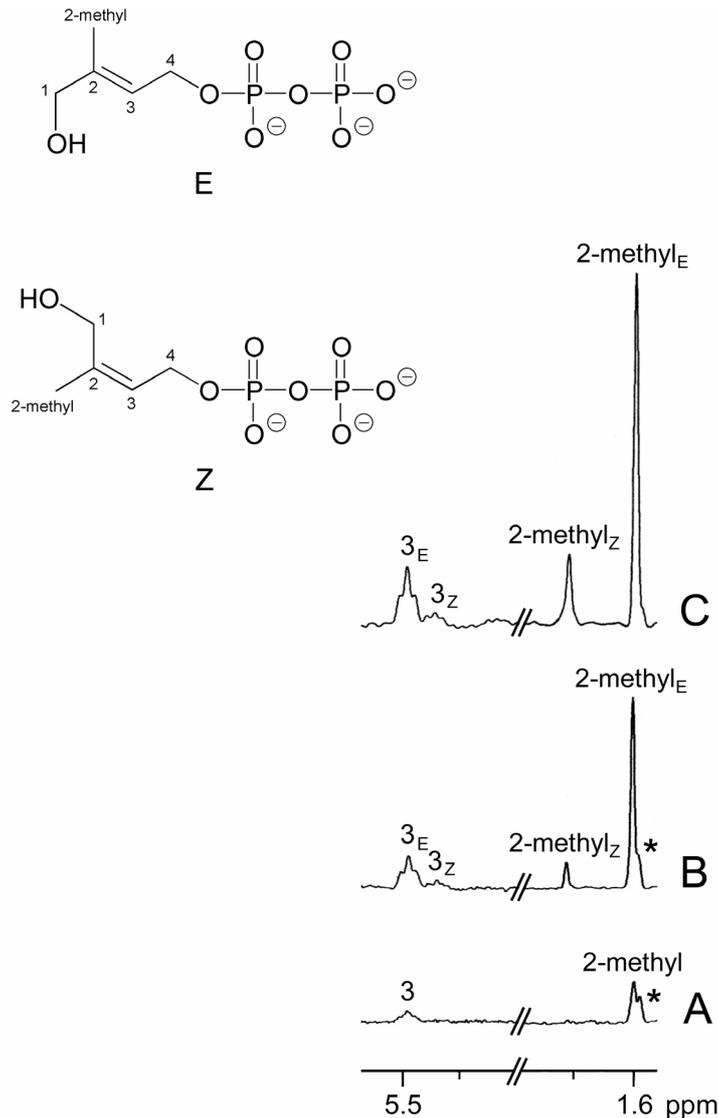


Abbildung 7: ¹³C-entkoppelte ¹H-NMR-Signale von 1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**23**). A, aus einem gereinigten *E. coli*-Zellextrakt, welcher von einem *E. coli*-Stamm erhalten wurde, der das *xylB*-Gen und die *ispCDEFG*-Gene überexprimiert; B, Probe aus A nach Zugabe einer 7:1-Mischung von synthetischem (*E/Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E/Z*-**23**); C, Probe aus B nach Zugabe eines zweiten Equivalents von *E/Z*-**23**. * markiert Signale von [2-¹⁴C]**23**.

Dazu wurde eine Probe verwendet, die durch Fütterung von *Escherichia coli*-Zellen mit [U-¹³C₅]1-Desoxy-D-xylulose erzeugt wurde. Der hierfür benutzte Stamm exprimiert die Gene *xylB*, *ispC*, *ispD*, *ispE*, *ispF* und *ispG* (*gcpE*) über. Nach der HPLC-Reinigung und Lyophilisierung wurde der **23** enthaltende Rückstand in D₂O (pH 6) gelöst und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert (Abbildung 7A).

Nach Zugabe einer Lösung synthetisch hergestellten (*E/Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphats (*E/Z* = 7:1) (D₂O, pH 7) wurde die Probe nochmals mittels ¹H-NMR-Spektroskopie vermessen (Abbildung 7B). In Abbildung 7B wird gezeigt, daß ausschließlich die Signale, welche zum *E*-Isomeren (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (***E*-23**) gehören, an Intensität zunehmen. Das ist der schlüssige Beweis dafür, daß die biochemisch erzeugte Verbindung **23** identisch mit der synthetisch erzeugten Verbindung ist, d.h. dem Isomeren ***E*-23**. Im Gegensatz dazu entstehen neue Signale für das im Unterschluß vorliegende (*Z*)-Isomer ***Z*-23**, welche keinerlei Korrelation mit dem biologischen Produkt zeigen. In Abbildung 7C sind dieselben Effekte nach Zugabe eines weiteren Aliquots der Lösung des synthetisch hergestellten (*E/Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphats erkennbar.

Für eine weitergehende Charakterisierung des neuen Intermediates wurde ein Vergleich mit der isomerenreinen synthetischen Verbindung ***E*-23** vorgenommen. Dazu wurde eine Probe biosynthetisch hergestellten Materials verwendet, die durch Fütterung desselben *E. coli*-Stammes wie oben mit [U-¹³C₅]1-Desoxy-D-xylulose präpariert wurde. Der einzige Unterschied bestand darin, daß keine HPLC-Reinigung des Zellextraktes vorgenommen wurde. Die ¹³C-NMR-Signale von biosynthetisch erzeugtem (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**23**) sind in Abbildung 8A gezeigt; in Übereinstimmung mit der Literatur (Hecht et al., 2001) ergeben sich komplexe Multipletts aufgrund von ¹³C-¹³C-Kopplungen.

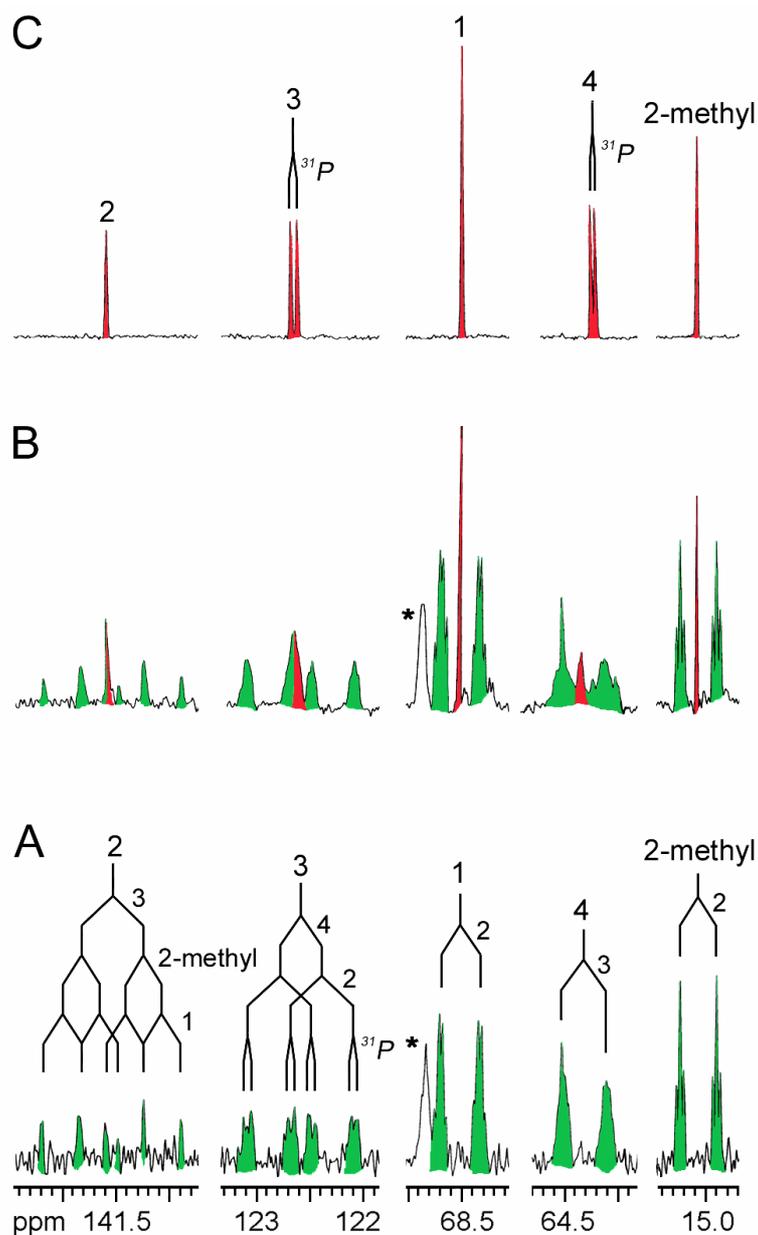


Abbildung 8: ^{13}C -NMR-Signale von 1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**23**). A, aus einem ungereinigten *E. coli*-Zellextrakt, welcher von einem *E. coli*-Stamm erhalten wurde, der das *xyIB*-Gen und die *ispCDEFG*-Gene überexprimiert; B, aus der Probe in A nach Zugabe synthetischen (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphats (**E-23**); C, des synthetischen (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphats (**E-23**). * markiert Signale von $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$ (**15**), aus dem ungereinigten *E. coli*-Extrakt. Kopplungen mit Kopplungskonstanten unter 5 Hz wurden nicht angegeben.

Abbildung 8C zeigt die ^{13}C -NMR-Signale von synthetischem (*E*)-1-Hydroxy-2-methylbut-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**). Abbildung 8B zeigt die Signale der Probe von Abbildung 8A nach Zugabe der synthetischen Verbindung. Die Singulets, welche die synthetische Verbindung repräsentieren, sind bezüglich der Signalmitten der Multipletts der vollständig ^{13}C -markierten biosynthetischen Verbindung geringfügig tiefelfverschoben. Diese Verschiebung kommt durch Schwerisotopeneffekte zustande, die durch die vollständige ^{13}C -Markierung hervorgerufen werden (siehe Tabelle 4). Die Linienbreiten des ^{13}C -markierten biosynthetischen Materials übersteigen diejenigen des unmarkierten synthetischen Materials, was sich durch ^{13}C - ^{13}C -Fernkopplungen erklären läßt, die zu klein sind, um vollständig aufgelöst zu werden, sich jedoch aus den Linienverbreiterungen folgern lassen.

3.4 Synthese von Strukturanalogen von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**)

Um eine Aussage über die Strukturparameter treffen zu können, welche für die Aktivität von **E-23** bezüglich der Stimulierung von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen entscheidend sind, wurden Strukturanaloga von **E-23** synthetisiert (Abbildung 9), um diese in Proliferationstests auf deren Aktivität zu untersuchen.

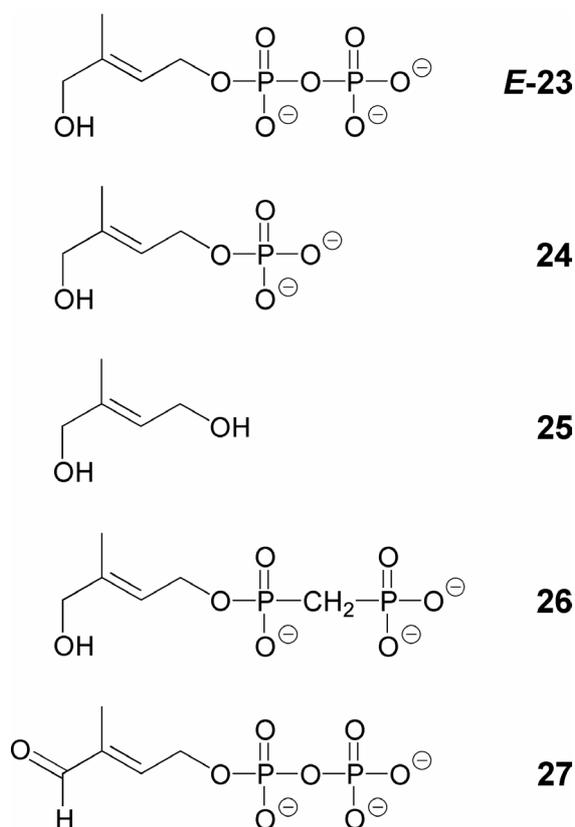


Abbildung 9: (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**) und seine Strukturanaloga **24-27**.

3.4.1 (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (**24**)

(*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (**24**) wurde durch Phosphorylierung von (*E*)-4-Chlor-2-methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en (**21**) mit Di(tetra-*n*-butylammonium)hydrogenphosphat in MeCN und anschließender Entfernung der THP-Schutzgruppe im Säuren (pH 1) hergestellt. **24** konnte mittels Anionenaustauscher-

Chromatographie auf DOWEX 50 WX8 (NH₄⁺-Form) gereinigt und in das Ammoniumsalz überführt werden. Die Ausbeute betrug insgesamt 68%.

3.4.2 (E)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (25)

(E)-2-Methyl-1-tetrahydropyranyloxy-but-2-en-4-ol (**20**) wurde in wäßriger Lösung durch Zugabe von konzentrierter HCl bei Raumtemperatur entschützt. Die neutrale Lösung wurde anschließend mit Chloroform extrahiert, um das Hydrolyseprodukt der Schutzgruppe zu entfernen. (E)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**) verblieb als Produkt in der wäßrigen Phase. Die Extraktion wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie kontrolliert, um sicherzustellen, daß die Reste der Schutzgruppe vollständig entfernt wurden, die Extraktion aber nicht unnötig oft wiederholt wurde. Bei fortgesetzter Extraktion wurde zusätzlich auch **25** mit entfernt. Nach drei Extraktionsschritten konnte **24** mit 74% Ausbeute als wäßrige Lösung erhalten werden, deren Konzentration durch Verwendung von NaOAc als Standard bestimmt wurde (siehe 2.3.6).

3.4.3 (E)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylen-diphosphonat) (26) und (E)-3-Formyl-but-2-enyl-1-diphosphat (27)

(E)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylen-diphosphonat) (**26**) und (E)-3-Formyl-but-2-enyl-1-diphosphat (**27**) wurden von S. Hecht bereitgestellt (Hecht et al., 2002; Amslinger et al., eingereicht).

3.5 Stimulierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen

3.5.1 Nachweis der Stimulation von V γ 9/V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen durch **E-23**

Wie aus der Literatur bekannt (Constant et al., 1994; Tanaka et al., 1994; Morita et al., 1995), werden humane V γ 9/V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels Phosphoantigenen zur Proliferation angeregt. Das zuletzt aufgeklärte Intermediat des alternativen Terpenbiosyntheseweges (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**) zeigte ebenfalls die Stimulierung dieser Hauptpopulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen des peripheren Blutes beim Menschen (Abbildung 10).

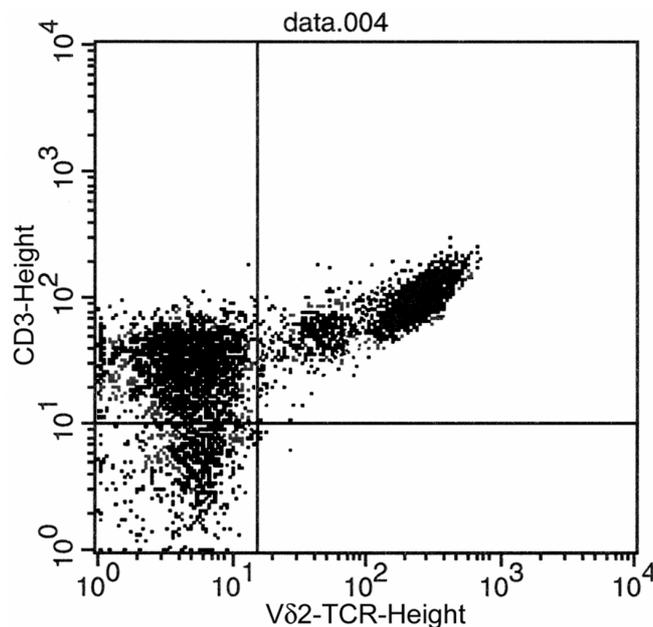


Abbildung 10: FACS-Bild einer Kultur humaner PBMC (500 000/ml) (Spender SA), welche bei Stimulation mit 800 pM **E-23** und 10 U/ml IL-2 sieben Tage lang inkubiert wurden.

3.5.2 IL-2-Titration

In früheren Untersuchungen wurde die Notwendigkeit von IL-2 als Kostimulator für eine T-Zell-Stimulation durch Phosphoantigene gezeigt (Pfeffer et al., 1990). Um zweckmäßige Konzentrationsbereiche für IL-2 zu bestimmen, wurden Voruntersuchungen mit Zellsuspensionen von humanen peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) eines *high responders* (Spender SA) (Abbildung 11A, B) und eines *low responders* (Spender

CH) (Abbildung 11C, D) durchgeführt. Als *high responder* wird ein Spender mit einem hohen prozentualen Endwert an $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen bezeichnet, wohingegen ein Spender mit einem niedrigen Endwert dieser Zellpopulation als *low responder* bezeichnet wird.

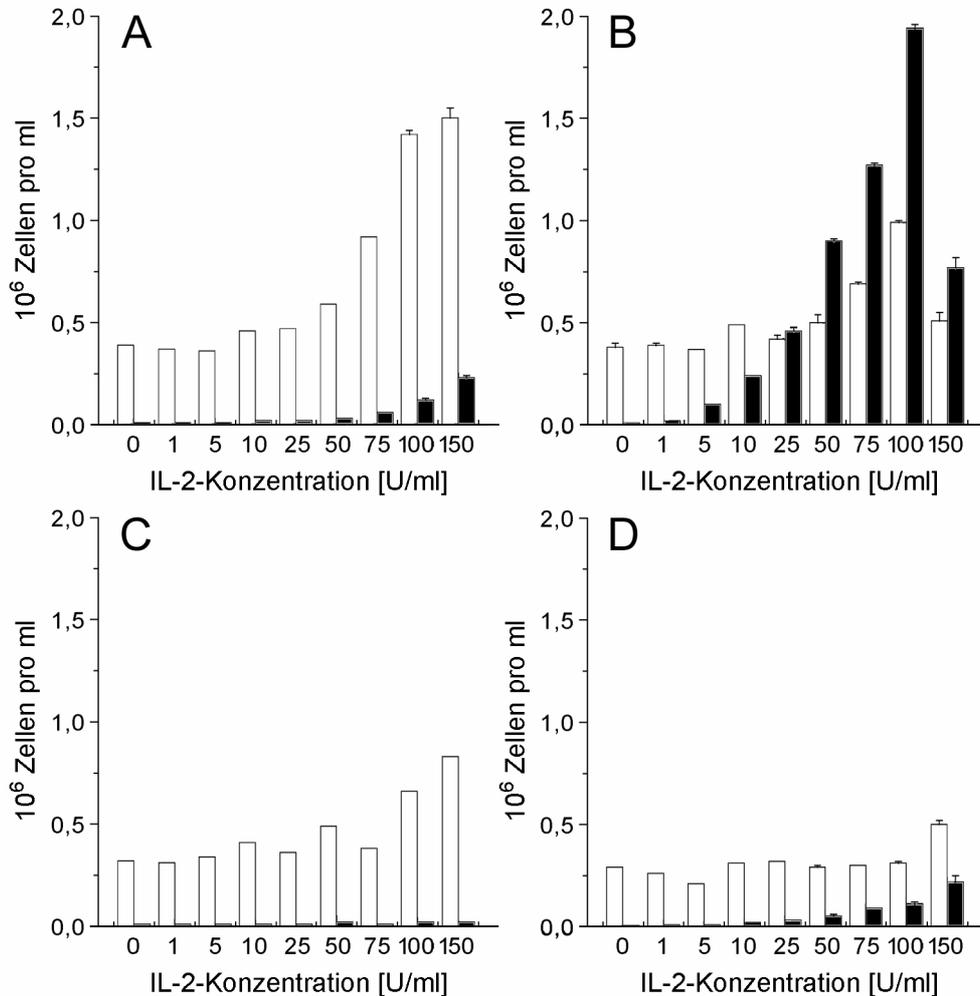


Abbildung 11: Induzierte Proliferation von T-Zellen. PBMC wurden sieben Tage in Medium mit verschiedenen Mengen IL-2 inkubiert. Weiße Säulen, $\alpha\beta$ -T-Zellen; schwarze Säulen, $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen. A und C, Medium ohne **E-23**; B und D, Medium mit 800 pM **E-23**. Die Anzahl der $\alpha\beta$ - und $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen wurde durch FACS-Analyse unter Verwendung von CD3- und $V\delta 2$ -TCR-Antikörpern und Zellzählung der Kulturen vor der FACS-Analyse bestimmt. A und B, PBMC eines *high responders* (Spender SA); C und D, PBMC eines *low responders* (Spender CH).

In diesen anfänglichen Experimenten wurde der Anteil an $CD3^+V\delta 2^+$ -Zellen, welche $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen entsprechen, unter den peripheren mononuklearen Blutzellen von ge-

sunden Spendern mittels zwei-dimensionaler FACS-Analyse ermittelt. Anschließend wurden die Zellen sieben Tage in Medium kultiviert, welches verschiedene Mengen IL-2 und Phosphoantigen **E-23** enthielt. Dann wurden die Zellen nochmals mittels zwei-dimensionaler FACS-Analyse untersucht. Darüberhinaus wurden die Zelldichten zu Beginn und zum Ende der Inkubationszeit gemessen. Auf diesen Daten basierend wurde die Proliferation der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen quantifiziert. Da ebenfalls gezeigt wurde, daß die meisten der Zellen, bei denen es sich nicht um $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen handelte, $\alpha\beta$ -T-Zellen waren, konnte deren Proliferation ebenfalls mit einer guten Genauigkeit bestimmt werden.

Zunächst wurde ausschließlich IL-2 als Stimulator in verschiedenen Konzentrationen ohne Zusatz von **E-23** verwendet (Abbildung 11A, C). Im Konzentrationsbereich von 50-150 U/ml wurde die Anzahl der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten durch IL-2 um einen Faktor von 2 bis 4 und die Anzahl der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Lymphozyten innerhalb von sieben Tagen Kultivierung um einen Faktor von 6 bis 20 erhöht (Abbildung 11A, C). Bei IL-2-Konzentrationen von 10 U/ml oder darunter wurde keine signifikante Proliferation von sowohl $\alpha\beta$ - als auch $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Lymphozyten festgestellt.

Anschließend wurden die PBMC mit den gleichen IL-2-Konzentrationen unter Zugabe von 800 pM **E-23** inkubiert. Bei einer IL-2-Konzentration von 0 U/ml, d.h. in Abwesenheit von IL-2, hatte die Zugabe von 800 pM **E-23** keinen wahrnehmbaren Effekt auf die Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen (Abbildung 11B, D). Bei IL-2-Konzentrationen im Bereich von ungefähr 5-10 U/ml wurde durch die Zugabe von 800 pM **E-23** eine starke Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen, aber nur eine moderate Proliferation von $\alpha\beta$ -T-Zellen erzeugt. Bei höheren IL-2-Konzentrationen wurde die Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen weiter gesteigert. Man findet beim *high responder* in Anwesenheit von **E-23** eine maximale Steigerung bei 100 U/ml IL-2 von 10 000 auf 1.9 Millionen $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen (Abbildung 11B). Gleichzeitig kam es bei dieser IL-2-Konzentration zu einer Verdopplung der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten. Beim *low responder* ist unter Zusatz von **E-23** der gleiche Trend zu beobachten, insbesondere bei 150 U/ml IL-2, wenn auch weniger deutlich ausgeprägt (Abbildung 11D). Beim *high responder* ist bei 150 U/ml und 800 pM **E-23** eine geringere Stimulation als bei 100 U/ml und **E-23** zu beobachten.

Um eine Stimulierung der Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen in Abhängigkeit von **E-23**, seinen Strukturanalogen und anderen Phosphoantigenen zu untersuchen, wurde

für IL-2 eine Konzentration gewählt, welche ohne Antigenzusatz keine signifikante Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Lymphozyten induziert. Daher wurden die Folgeexperimente mit 10 U/ml IL-2 durchgeführt.

3.5.3 Zellmengentitration

Abbildung 12 zeigt den Einfluß der Aussaatzelldichte auf die $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zell-Proliferation in PBMC-Suspensionen.

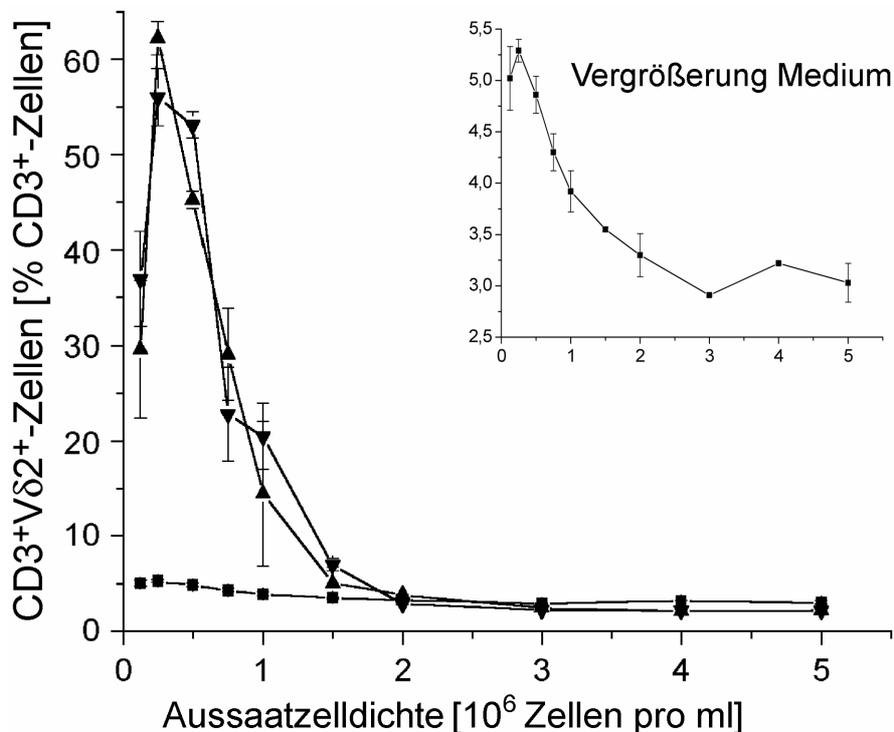


Abbildung 12: Induzierte Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen bei verschiedenen Aussaatzelldichten humaner PBMC (Spender SA), die sieben Tage lang in Medium mit 10 U/ml IL-2 inkubiert wurden. Der Anteil der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen wurde durch FACS-Analyse unter Verwendung von CD3- und $V\delta 2$ -TCR-Antikörpern bestimmt. ■, ohne **E-23**; ▼, 800 pM **E-23**; ▲, 4.0 nM **E-23**.

Bei Aussaatzelldichten von 10^5 bis 10^6 PBMC/ml und einer IL-2-Konzentration von 10 U/ml zusammen mit **E-23** (800 pM oder 4.0 nM) erhöhte sich der Anteil der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen (Spender SA) innerhalb von sieben Tagen von 5% auf Werte von 20-60%. Bei Aussaatzelldichten oberhalb von $1.5 \cdot 10^6$ Zellen/ml war keine signifikante

Proliferation weder von $\alpha\beta$ - noch von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen zu beobachten. Aus diesem Grund wurden die Folgeexperimente bei Aussatzelldichten von 500 000 Zellen/ml durchgeführt, welche Proliferationswerte nahe dem Maximalwert lieferten. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt auch ohne den Zusatz von **E-23** nur in Anwesenheit von IL-2 (Abbildung 12, Vergrößerung Medium).

3.5.4 Terpenbiosynthese-Intermediate

Zunächst wurden die bis zum zyklischen Diphosphat **15** bekannten Desoxyxylulosephosphatweg-Intermediate sowie IPP (**7**) und **E-23** im Standardassay (Antigentitration) getestet.

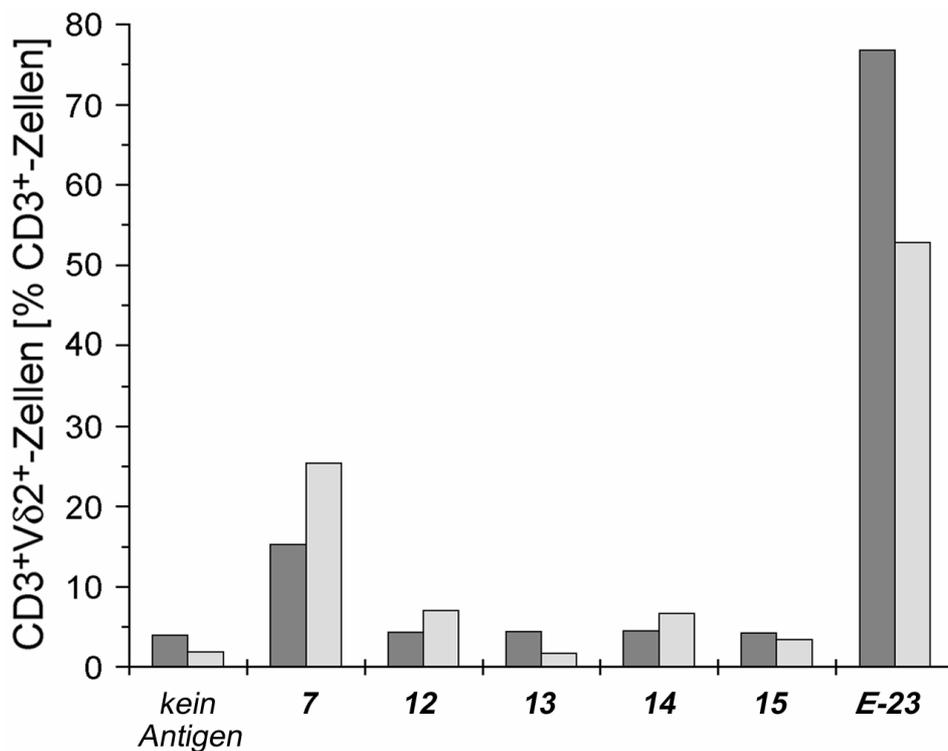


Abbildung 13: Proliferationstests von Desoxyxylulosephosphatweg-Intermediaten. Humane PBMC wurden sieben Tage lang in Medium mit 10 U/ml IL-2 und den Intermediaten **7** sowie **12-15** in Konzentrationen von 25 μ M bzw. **E-23** mit einer Konzentration von 800 pM inkubiert. **7**, IPP; **12**, 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat; **13**, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol; **14**, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat; **15**, 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat. Dunkle Säulen, Spender SA; helle Säulen, Spender SH' (nicht identisch mit Spender SH im Folgenden).

Dabei wurden IPP und die Intermediate **12-15** in einer Konzentration von 25 μM sowie **E-23** mit einer Konzentration von 800 pM eingesetzt. Zur Abschätzung der Aktivität der getesteten Verbindungen wurde die Proliferation der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen durch eine CD3/ $V\delta 2$ -TCR-Doppelfärbung bestimmt.

IPP, welches aus der Literatur als potentes Phosphoantigen bekannt ist (Tanaka et al., 1995) lieferte eine Stimulation von 4 bzw. 2% auf 15 bzw. 25% $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu zeigten die Intermediate **12-15** bei gleicher verwendeter Konzentration keine signifikante Erhöhung des Anteils an $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen verglichen mit der Mediumkontrolle ohne Zusatz von Antigen. Das Intermediat **E-23** hingegen zeigte bereits bei der viel geringeren Konzentration von 800 pM eine deutlich stärkere Aktivität bezüglich $\gamma\delta$ -T-Zellen, welche zu einem Anteil von 75 bzw. 55% $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen führte.

3.5.5 Charakterisierung der Rezeptorverhältnisse von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen

Eine Charakterisierung der Rezeptorverhältnisse von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen wurde durch Untersuchung der Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen, welche mittels **E-23** stimuliert wurden, durchgeführt. Dazu wurden Antigentitrationen mit **E-23** vorgenommen und jeder Konzentrationswert mit unterschiedlichen Antikörperkombinationen angefärbt. Abbildung 14 zeigt Doppelfärbungen mit PBMC von Spender SA nach einer sieben-tägigen Kultivierung mit 10 U/ml IL-2 und 4.0 nM **E-23** bzw. ohne Zusatz von **E-23**. Die Proben bei einer Konzentration von 4.0 nM **E-23** sind exemplarisch für die übrigen Konzentrationen bei einer Stimulation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen abgebildet und zeigen die maximale Stimulation (Abbildung 14, rechte Spalte). Diejenigen ohne Zusatz von **E-23** sind als Kontrollexperimente gezeigt (Abbildung 14, linke Spalte).

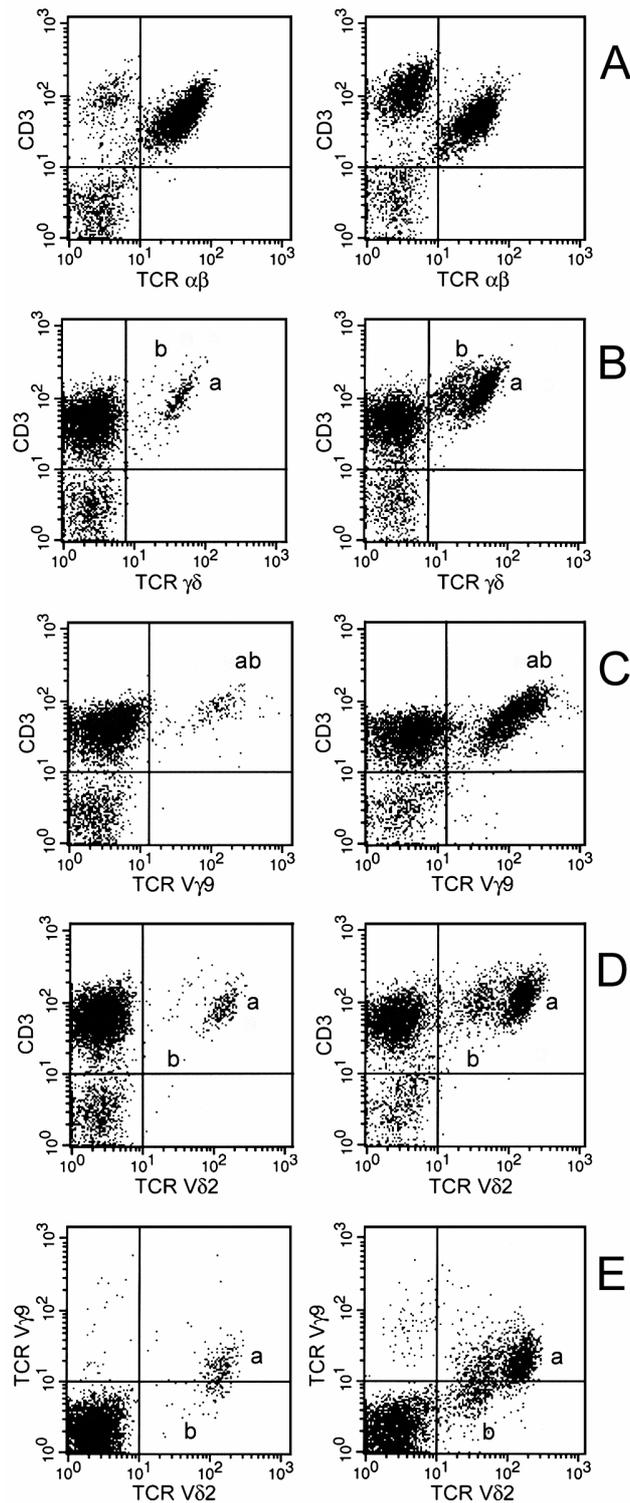


Abbildung 14: Zweidimensionale FACS-Analyse von PBMC (Spender SA) mit verschiedenen Antikörperkombinationen nach einer siebentägigen Inkubation. Linke Seite, Kultivierung mit 10 U/ml IL-2 ohne **E-23**; rechte Seite, Kultivierung mit 10 U/ml IL-2 und 4.0 nM **E-23**. A, CD3/TCR- $\alpha\beta$; B, CD3/TCR- $\gamma\delta$; C, CD3/TCR-V γ 9; D, CD3/TCR-V δ 2; E, TCR-V γ 9/TCR-V δ 2. a und b markieren unterschiedliche Populationen von V γ 9/V δ 2-T-Zellen.

Die zweidimensionale FACS-Analyse mit Anti-CD3- und Anti-TCR- $\alpha\beta$ -monoklonalen Antikörpern zeigt, daß sich die Anzahl der CD3⁺TCR- $\alpha\beta$ ⁻-Zellen durch Zusatz von **E-23** beträchtlich vergrößert hat (Abbildung 14A, rechte Spalte). Diese Erhöhung kann klar mit dem relativen Anstieg der CD3⁺V γ 9⁺V δ 2⁺-T-Zellen erklärt werden, welcher durch Färbung mit Anti-CD3-, Anti-TCR- $\gamma\delta$ -, Anti-V γ 9- und Anti-V δ 2-Antikörpern (Abbildung 14B, C, D) nachgewiesen wurde. Interessanterweise zeigen diese Daten zwei Zellpopulationen mit einem relativ hohen Überschuß der V δ 2-Kette auf den CD3⁺V γ 9⁺V δ 2⁺-T-Zellen (Abbildung 14B, D, E). Im Gegensatz zu der bimodalen Verteilung der V δ 2-Kette, zeigt die V γ 9-Kette keine bimodale Verteilung (Abbildung 14C, E). Wie in Abbildung 15 gezeigt, sind die EC₅₀-Werte sowohl der Klasse-a- als auch der Klasse-b-Zellen im Rahmen der Meßgenauigkeit im gleichen Bereich.

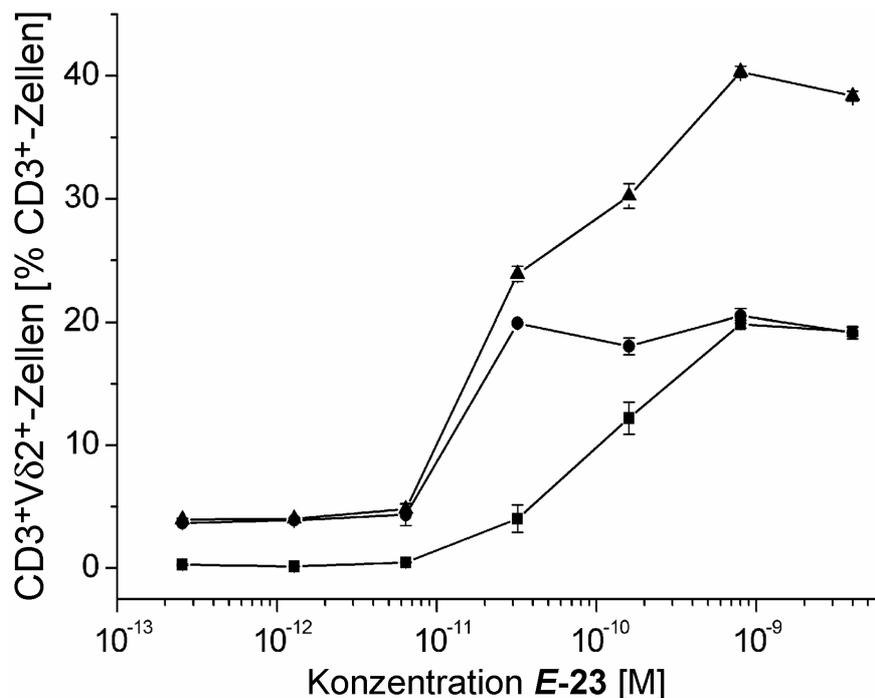


Abbildung 15: FACS-Analyse von PMBC (Spender SA), welche mit 10 U/ml IL-2 und **E-23** wie angegeben sieben Tage lang kultiviert wurden. ●, CD3⁺V δ 2⁺-Zellen mit einem hohen V δ 2-Anteil (Klasse a); ■, CD3⁺V δ 2⁺-Zellen mit einem niedrigen V δ 2-Anteil (Klasse b); ▲, alle CD3⁺V δ 2⁺-Zellen.

In Abbildung 15 sind die Titrationskurven von Spender SA für beide V γ 9/V δ 2-T-Zell-Populationen a und b getrennt bzw. als Summe von a und b aufgetragen. Dabei ist zu bemerken, daß Population a von einem höheren Wert startet und insgesamt einen

geringeren Anstieg als Population b zeigt, welche von einem niedrigeren Ausgangswert beginnt. Das relative Verhältnis von Population a und b variierte nach der sieben-tägigen Inkubation zum Teil deutlich. Mitunter wurde ein gleicher Anteil an Klasse a und Klasse b-Zellen erreicht (Abbildung 15). In der Regel blieb der Anteil der Population b-Zellen unter derjenigen von Population a (vgl. Abbildung 14B, D, E).

3.5.6 Vergleich der Populationen bei verschiedenen Spendern

Die bimodale Verteilung der V δ 2-Kette wurde bei allen acht Spendern und allen getesteten Verbindungen (IPP, DMAPP, **E-23** und **24-27**) gefunden.

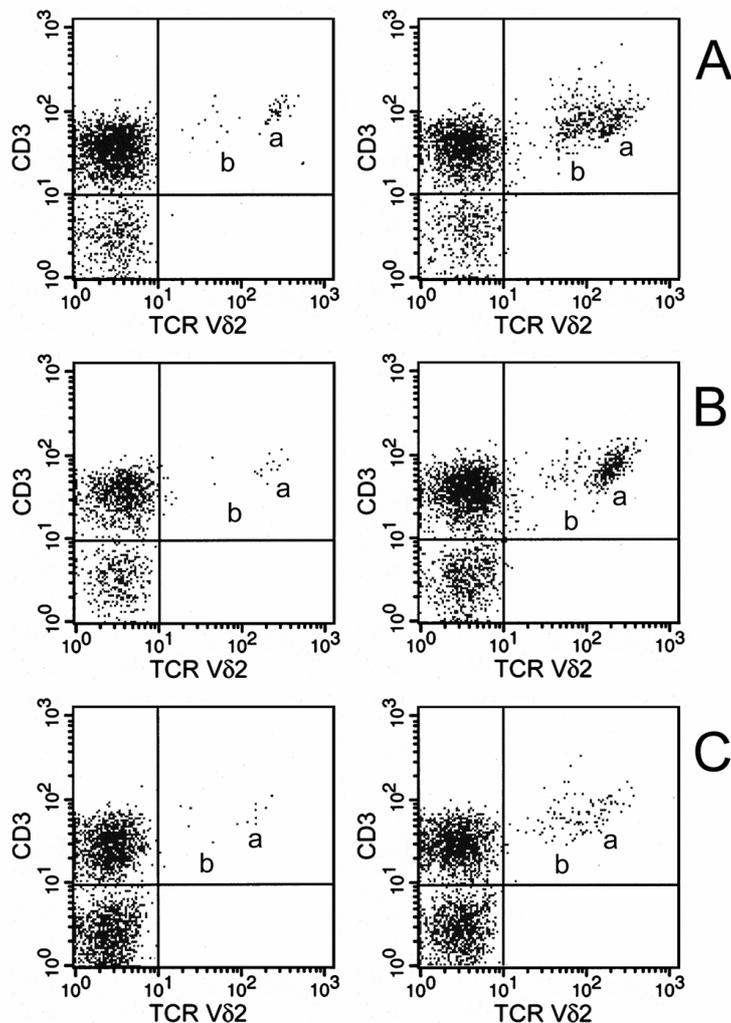


Abbildung 16: V γ 9/V δ 2-T-Zellen nach sieben Tagen Kultivierung mit 10 U/ml IL-2. Linke Spalte, ohne **E-23**; rechte Spalte, mit 4.0 nM **E-23**. A, *high responder* (SB); B, *medium responder* (CW); C, *low responder* (SH).

Exemplarisch für diesen Befund sind drei Spender gezeigt: ein *high responder* (Spender SB), ein *medium responder* (Spender CW) und ein *low responder* (Spender SH) (Abbildung 16A, B, C).

3.5.7 Vergleich der Populationen bei verschiedenen IL-2-Konzentrationen

Nachdem die Anwesenheit beider Populationen a und b in Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen von **E-23** und bei verschiedenen Spendern untersucht wurde, sollte geklärt werden, ob die IL-2-Menge einen Einfluß auf das Auftreten bzw. die Verteilung beider Populationen hat. Das wurde anhand der Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen nach einer siebentägigen Kultivierung von PBMC des Spenders SA gezeigt. Das verwendete Medium enthielt unterschiedliche Mengen IL-2 ohne Zusatz von **E-23** oder mit 800 pM **E-23**. Die verwendeten IL-2-Mengen waren 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 sowie 150 U/ml. In Abbildung 17 sind exemplarisch die drei Konzentrationen 0, 10 und 100 U/ml gezeigt.

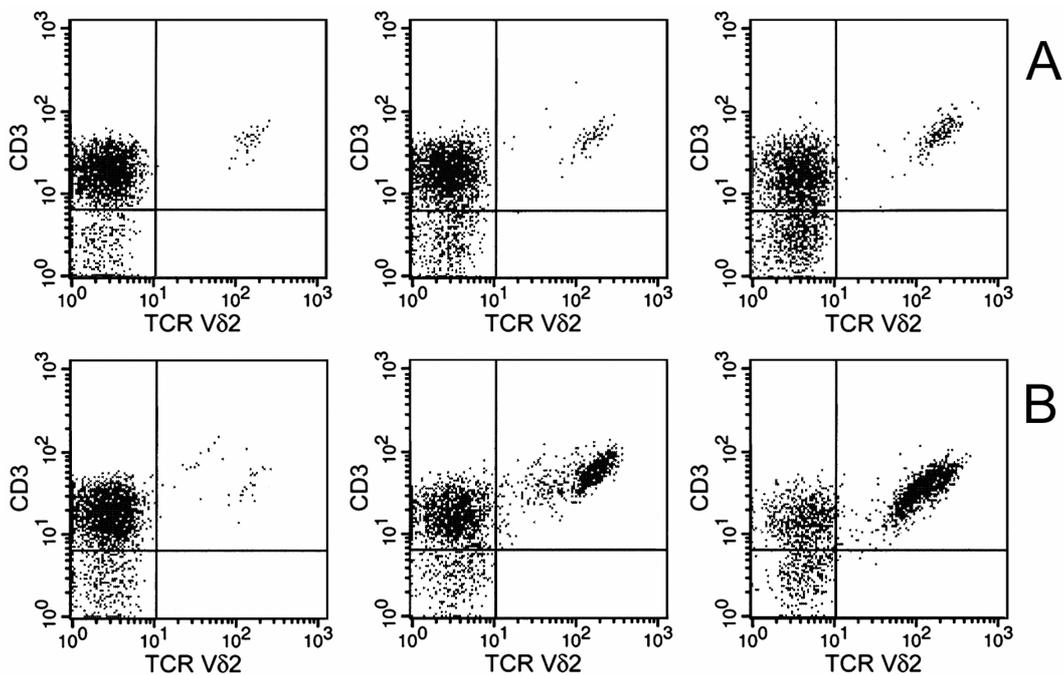


Abbildung 17: Induzierte Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen. PBMC von Spender SA wurden sieben Tage lang in Medium mit verschiedenen Mengen IL-2 inkubiert. Linke Spalte, kein IL-2; mittlere Spalte, mit 10 U/ml IL-2; rechte Spalte, mit 100 U/ml IL-2. A, ohne **E-23**; B, mit 800 pM **E-23**.

Bei Inkubation der PBMC ohne Zusatz von IL-2 und **E-23** (Abbildung 17A, links) konnte nur die Anwesenheit der Population mit einem hohen V δ 2-Anteil nachgewiesen werden. Unter Zugabe von 5 bis 50 U/ml IL-2 (vgl. Abbildung 17A, Mitte) wurde eine mäßige Proliferation von V γ 9/V δ 2-T-Zellen gefunden, aber kein eindeutiger Nachweis für eine bimodale Verteilung der V δ 2-Kette. Bei einer weiteren Erhöhung der IL-2-Konzentration wurde zwar eine deutliche Proliferation der V γ 9/V δ 2-T-Lymphozyten beobachtet, aber dennoch kein eindeutiger Hinweis auf das Auftreten der zweiten Population (vgl. Abbildung 17A, rechts). Bei Stimulation mit **E-23** ohne Zusatz von IL-2 (Abbildung 17B, links) traten eindeutig beide Populationen auf. Mit zunehmender IL-2-Menge nahm sowohl die Proliferation der V γ 9/V δ 2-T-Zellen als auch der Bruchteil der Zellen mit niedrigerem V δ 2-Anteil zu (Abbildung 17, Mitte). Dieser Trend erreichte bei 10 U/ml sein Maximum. Bei IL-2-Werten von 25 bis 75 U/ml konnte Population b noch nachgewiesen werden, bei 100 bis 150 U/ml ist diese Population nahezu wieder verschwunden. Es scheint jedoch eine neue Population mit einem noch höheren V δ 2-Anteil aufzutauchen (Abbildung 17B, rechts).

3.5.8 Spendertitration zur Bestimmung der EC₅₀-Werte von **E-23**

Für den systematischen Vergleich der Proliferation der V γ 9/V δ 2-T-Zellen von verschiedenen Spendern und verschiedenen Analoga von **E-23**, wurde der Anteil an CD3⁺V δ 2⁺-Zellen in stimulierten im Vergleich zu unstimulierten PBMC gemessen.

Abbildung 18 zeigt Daten mit PBMC von acht gesunden Spendern, die sieben Tage lang mit 10 U/ml IL-2 und verschiedenen Konzentrationen von **E-23** kultiviert wurden. Der Median EC₅₀-Wert von **E-23** ist 70 pM. Der Mittelwert beträgt 90 ± 50 pM. Der Anteil der V γ 9/V δ 2-T-Zellen variierte bei der Konzentration, welche maximale Stimulation durch **E-23** erzeugt, zwischen 6 und 47% (Abbildung 18).

Eine *high response* wurde reproduzierbar mit Zellen von den Spendern SA, SB, TG sowie FZ gefunden und eine *low response* reproduzierbar mit Zellen von den Spendern CH, HH und SH. Dieses Verhalten wurde mit den jeweiligen Spendern innerhalb eines Zeitraumes von einigen Monaten beobachtet. Zellen von Spender CW ergaben eine *intermediate response*. Es konnte kein einfacher Zusammenhang zwischen dem

Ausmaß der Aktivierung der Proliferation durch **E-23** und dem Anteil der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen, die ohne **E-23** inkubiert wurden, ermittelt werden.

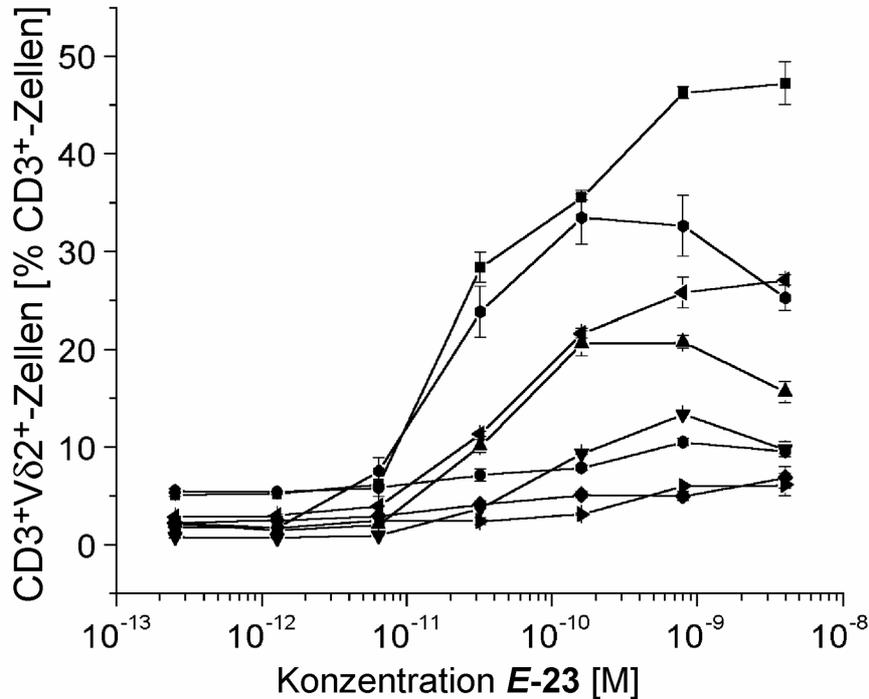


Abbildung 18: FACS-Analyse von PMBC (Spender SA), welche mit 10 U/ml IL-2 und **E-23** wie angegeben sieben Tage lang kultiviert wurden. ■, Spender SA; ●, Spender CH; ▲, Spender CW; ▼, Spender FZ; ◆, Spender HH; ◄, Spender SB; ►, Spender SH; ◐, Spender TG.

D.h. bei einigen Spendern war der Anteil der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen nach einer Stimulation ohne Antigen 0.6%, bei einem anderen 6.7%. Dennoch war der Wert für den Anteil der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen nach der siebentägigen Inkubation mit **E-23** kein gleiches Vielfaches des ursprünglichen Wertes. Dieses Verhalten wurde ebenfalls für IPP, DMAPP und die Verbindungen **24-27** gefunden. Die einzelnen Daten, exemplarisch für **E-23** gezeigt, sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über den Anteil der V γ 9/V δ 2-T-Zellen nach einer siebentägigen Inkubation von PBMC mit 10 U/ml IL-2 ohne **E-23**, mit **E-23** bei maximaler Stimulation, die **E-23**-Konzentration bei maximaler Stimulation, die x-fache Stimulation sowie die EC₅₀-Werte der einzelnen Spender mit **E-23**.

Spender	V γ 9/V δ 2-T-Zellen (kein E-23) [% CD3 ⁺]	V γ 9/V δ 2-T-Zellen (max. Stimulation) [% CD3 ⁺]	x-fache ^a Stimulation	E-23 -Konzentration (max. Stimulation) [nM]	EC ₅₀ [pM]
SA	4.8	47	10	4.0	39
SH	1.4	6.1	4	4.0	250
CH	6.7	10.5	2	0.80	100
CW	1.4	21	15	0.80	35
SB	2.8	27	10	4.0	56
TG	1.8	33.5	18	0.16	18
HH	2.4	6.9	3	4.0	110
FZ	0.6	13	21	0.80	83

^a x-fache Stimulation: [% V γ 9/V δ 2-T-Zellen]_{max. Stimulation} : [% V γ 9/V δ 2-T-Zellen]_{kein **E-23**}

Mit Zellen von Spender SA, war der Anteil der V γ 9/V δ 2-T-Zellen nach einer siebentägigen Kultivierung 4.8% ohne Zusatz von **E-23** und 47% mit 4.0 nM **E-23**. Im Gegensatz dazu wurde mit PBMC des Spenders HH ein Anteil von von 2.4% ohne Stimulation mit **E-23** und ein Wert von 6.9% mit 4.0 nM **E-23** V γ 9/V δ 2-T-Zellen erreicht. Die beträchtlichen Unterschiede zwischen *high* und *low responders* zeigen sich ebenfalls bei den Proliferationsdaten in Abbildung 11. Bei Zellen von Spender SA wurde eine massive Proliferation von V γ 9/V δ 2-T-Zellen beobachtet, die mit IL-2 und **E-23** stimuliert wurden. Hohe Konzentrationen von IL-2 induzierten ebenfalls eine signifikante Proliferation von $\alpha\beta$ -T-Zellen (Abbildung 11A, B). Mit Zellen von Spender CH war das Ausmaß der V γ 9/V δ 2-T-Zell-Stimulierung insgesamt viel weniger ausgeprägt (Abbildung 11C, D). Die Proliferation von $\alpha\beta$ -T-Zellen war ebenfalls geringer verglichen mit Spender SA. Mit PBMC von Spender CH war der Anteil der V γ 9/V δ 2-T-Zellen ohne Zusatz von **E-23** 6.7% und 10.5% bei Inkubation mit 800 pM **E-23** (Tabelle 5).

3.5.9 Spendentitration zur Bestimmung der EC_{50} -Werte von Strukturanalogen von **E-23** sowie von IPP und DMAPP

Sowohl verschiedene Isoprenoidbiosynthese-Intermediate als auch Strukturanaloge von **E-23** wurden in einer vergleichenden Analyse verwendet, wobei PMBC von acht gesunden Spendern benutzt wurden. Abbildung 19 zeigt Daten eines *high responder* (Spender SB).

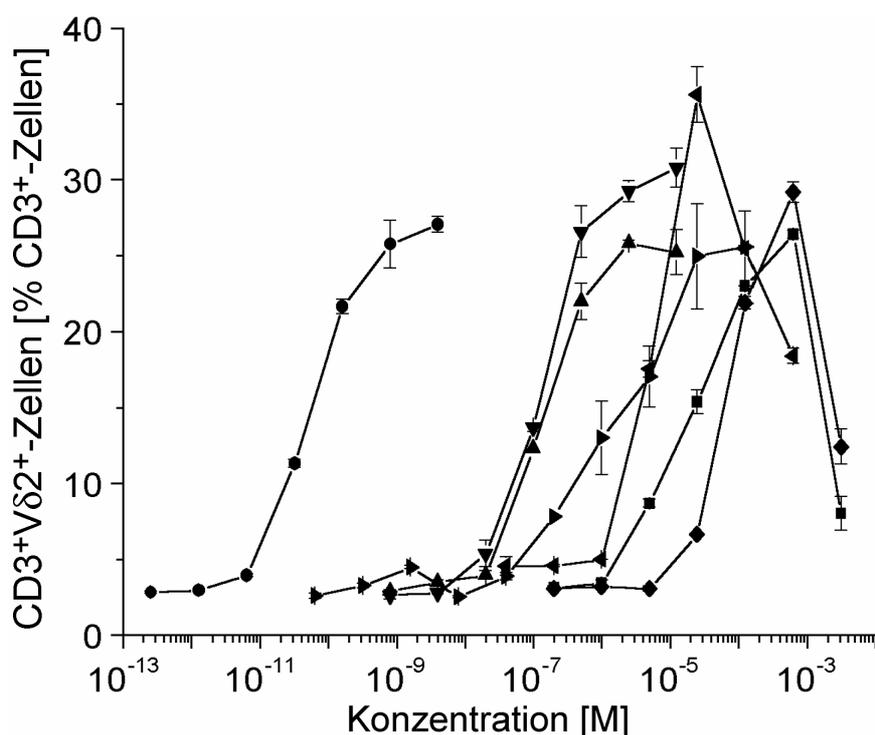


Abbildung 19: FACS-Analyse von PMBC (Spender SB), die sieben Tage lang mit 10 U/ml IL-2 und verschiedenen Phosphoantigenen wie angegeben kultiviert wurden. ■, Isopentenylidiphosphat (IPP, **7**); ►, Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **8**); ●, (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**); ▲, (*E*)-1-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (**24**); ◆, (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**); ◄, (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylene-diphosphonat) (**26**); ▼, (*E*)-3-Formyl-but-2-enyl-1-diphosphat (**27**).

Es ist unschwer zu erkennen, daß **E-23** die weitaus aktivste Verbindung unter den getesteten Stimulanzen von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen ist. **E-23** ist mindestens 1000-fach aktiver als die übrigen Verbindungen. Auch tritt reproduzierbar bei allen Substanzen und allen Spendern ein weiterer Effekt auf. Es kommt zu einer Überstimulation, d.h.

bei sehr hohen Antigenkonzentrationen, welche höher als die Sättigungs- bzw. Maximalkonzentration liegen, kommt es zu einem rapiden Abfall des Anteils der V γ 9/V δ 2-T-Zellen. Im dargestellten Versuch traf dies für IPP sowie für die Verbindungen **25** und **26** zu.

Eine Übersicht der für alle Spender und alle Verbindungen ermittelten EC₅₀-Werte sowie deren Mediane ist in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Übersicht über alle für Verbindungen IPP, DMAPP, **E-23** und **24-27** ermittelten EC₅₀-Werte sowie deren Mediane.

Spender ^a	EC ₅₀						
	Stimulus ^b						
	IPP [μ M]	DMAPP [nM]	E-23 [pM]	24 [nM]	25 [μ M]	26 [μ M]	27 [nM]
SA (w)	15	160	39	45	9.8	2.2	170
SH (w)	160	2900	250	64	n.b. ^c	77	98
CH (w)	57	n.b.	100	200	130	n.b.	260
CW (w)	22	39	35	710	31	18	18
SB (m)	19	1500	56	130	72	5.5	140
TG (m)	4.6	n.b.	18	25	180	n.b.	41
HH (m)	240	230	110	400	9.6	3.7	90
FZ (m)	17	n.b.	83	120	60	n.b.	160
Median	21	230	70	120	66	5.5	150

^a Geschlecht der Spender. (w), weiblich; (m), männlich

^b IPP, Isopentenylidiphosphat (**7**); DMAPP, Dimethylallyldiphosphat (**8**); (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**); (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (**24**); (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**); (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylen-diphosphonat) (**26**), (*E*)-3-Formyl-but-2-enyl-1-diphosphat (**27**)

^c n.b., nicht bestimmt

Es fällt auf, daß es einen gewissen Trend einzelner Spender bezüglich der einzelnen EC₅₀-Werte gibt. So zeigt beispielsweise Spender TG bei allen getesteten Verbin-

dungen bis auf Verbindung **25** sehr niedrige EC_{50} -Werte, d.h. deutlich unterhalb des jeweiligen Medians. Wohingegen der Spender SH meist höhere EC_{50} -Werte als die Mediane zeigte. Es gibt allerdings keinen allgemeinen Trend bei allen Spendern. Spender SB repräsentiert am besten die ermittelten Mediane der EC_{50} -Werte, lediglich der EC_{50} -Wert von DMAPP weicht deutlich ab. Die oben gezeigten EC_{50} -Werte, die mit Zellen aller Spender erhalten wurden, sind in Abbildung 20 dargestellt. So konnte für die Spender teilweise eine große Bandbreite der EC_{50} -Werte bestimmt werden. Für einen jeweiligen Spender konnte jedoch eine gute Reproduzierbarkeit der EC_{50} -Werte gezeigt werden.

Wie oben dargestellt, wurde die bimodale Verteilung der $V\delta 2^+$ -Klasse a und Klasse b $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen bei allen Spendern festgestellt (vgl. Abbildung 15, Abbildung 16).

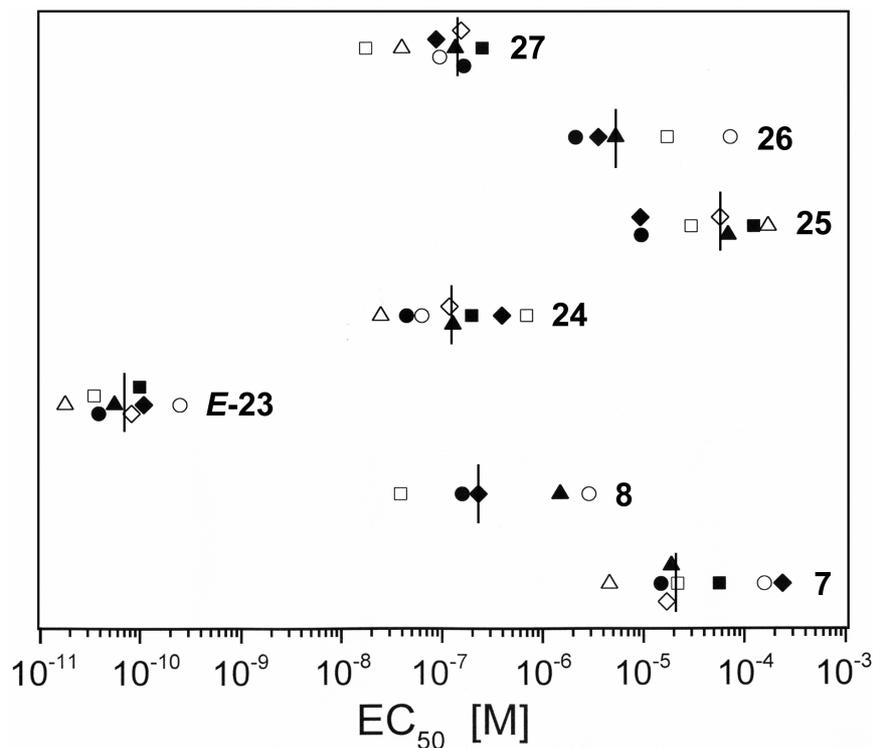
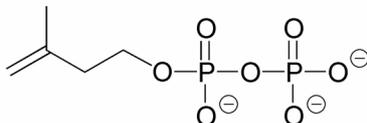
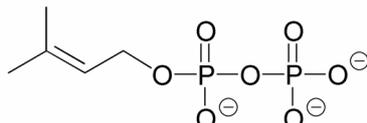
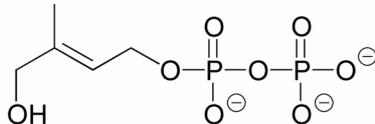
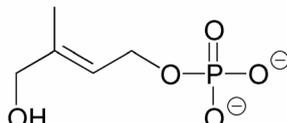
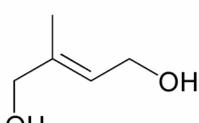
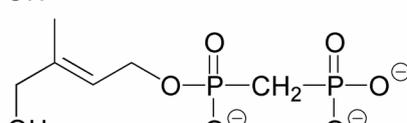
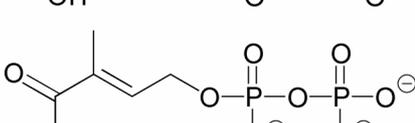


Abbildung 20: EC_{50} -Werte von Phosphoantigenen. PMBC verschiedener Spender wurden mit 10 U/ml IL-2 und den angegebenen Phosphoantigenen kultiviert. ●, Spender SA; ○, Spender SH; ■, Spender CH; □, Spender CW; ▲, Spender SB; △, Spender TG; ◆, Spender HH; ◇, Spender FZ.

Für jede einzelne Verbindung streuten die gefundenen EC_{50} -Werte der Zellen von verschiedenen Spendern über ungefähr eine Größenordnung. Verbindung **E-23**, d.h.

die direkte Vorstufe von DMAPP und IPP über den alternativen Terpenbiosyntheseweg, war bei weitem der effektivste Stimulator von V γ 9V δ 2-T-Zellen, wenn nach dem EC₅₀-Wert geurteilt wird. Genauer gesagt, die EC₅₀-Werte aller anderen Verbindungen, die hier getestet wurden, lagen um mindestens drei Größenordnungen höher als der EC₅₀-Wert von Verbindung **E-23** (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht über die Median EC₅₀-Werte von acht gesunden Spendern und deren relative Effizienz bezüglich **E-23**.

Verbindung	EC ₅₀	Relative Effizienz ^a
 7	21 μ M	0.000003
 8	230 nM	0.0003
 E-23	70 pM	1
 24	120 nM	0.0006
 25	66 μ M	0.000001
 26	5.5 μ M	0.00001
 27	150 nM	0.0005

^a die relative Effizienz ist auf einen willkürlichen Wert von 1 für **E-23** gesetzt

Einige der Spender zeigten *high responses* gegenüber allen getesteten Verbindungen, wenn diese bei einem zehnfachen Wert ihres jeweiligen EC₅₀-Wertes verwendet wurden. Für andere Spender wurden *low responses* oder *intermediate responses* (Abbildung 21)

ermittelt. Die gefundenen EC_{50} -Werte für IPP, DMAPP und Verbindungen **E-23** und **24-27** streuten bei allen Spendern über sechs Größenordnungen (vgl. Tabelle 6).

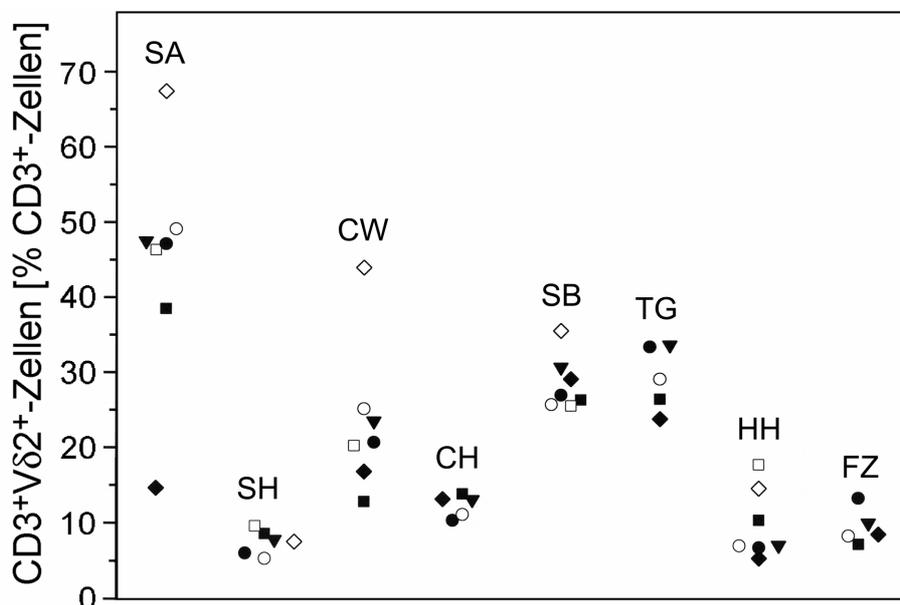


Abbildung 21: Maximale Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen bei den jeweiligen Konzentrationen verschiedener Phosphoantigene, welche eine maximale Antwort liefern. PBMC der angegebenen Spender wurden mit 10 U/ml IL-2 und verschiedenen Phosphoantigenkonzentrationen sieben Tage lang inkubiert. ■, Isopentenylidiphosphat (IPP, **7**); □, Dimethylallyldiphosphat (DMAPP, **8**); ●, (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**); ○, (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (**24**); ◆, (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**); ◇, (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylendiphosphonat) (**26**); ▼, (*E*)-3-Formyl-but-2-enyl-1-diphosphat (**27**).

Die maximale Stimulation bezogen auf $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen, die mit verschiedenen Spendern gefunden wurde, ist in Abbildung 21 gezeigt. Dabei fällt auf, daß sich die maximale *response* einzelner Spender durchaus deutlich bei verschiedenen Substanzen unterscheidet. Bei Spender SA fällt dies besonders deutlich auf. (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**) zeigt bereits bei sehr geringen Konzentrationen einen Abfall der Aktivierung der Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen. (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylendiphosphonat) (**26**) wurde an einem Tag getestet, an welchem die Amplituden der Proliferation für die getesteten Substanzen höher lagen als bei den übrigen dargestellten Verbindungen. Diese Variation in der maximalen Amplitude des Anteils

der V γ 9/V δ 2-T-Zellen konnte wiederholt beobachtet werden auch bei anderen Spendern. Dies hatte jedoch keinen prinzipiellen Einfluß auf das *high* und *low responder*-Verhalten der Spender und die EC₅₀-Werte im Rahmen der üblichen Streuung.

3.5.10 Stabilität von **E-23**

Die Diphosphatmotive von bestimmten Phosphoantigenen reagieren empfindlich bezüglich enzymkatalysierter oder nicht-enzymatischer Hydrolyse. Daneben könnte **E-23** auch durch andere Zersetzungswegen wie eine Eliminierung der Diphosphatgruppe abgebaut werden.

3.5.10.1 Stabilität von **E-23** bei geringer Zelldichte (Standardassaybedingungen)

Um die Stabilität von **E-23** unter den verwendeten Kulturbedingungen (Standardassay: 10 U/ml IL-2, 500 000 PBMC/ml) zu testen, wurden 28 μ M [1-³H]**E-23** Lymphozytensuspensionen (Spender SA) in RPMI 1640-Medium Komplett bei 37 °C inkubiert und die Konzentrationen von [1-³H]**E-23** nach verschiedenen Zeitintervallen mittels HPLC aufgezeichnet. Dies wurde unter Verwendung von *liquid scintillation counting* erreicht. Zusätzlich wurden 28 μ M [1-³H]**E-23**-Lösungen mit 10 U/ml IL-2 ohne Zusatz von PBMC in identischer Weise inkubiert. Dabei wurde bei keiner der beiden Meßreihen eine signifikante Zersetzung der radioaktiven Verbindung [1-³H]**E-23** innerhalb von 0.5 bis 5 h beobachtet.

3.5.10.2 Stabilität von **E-23** bei hoher Zelldichte

Nachdem sich **E-23** als unerwartet stabil unter Standardassaybedingungen gezeigt hatte, wurde das gleiche Experiment unter Verwendung einer stark erhöhten Zelldichte vorgenommen. Als Ansatzpunkt wurde das Verhältnis von **E-23** zu einzelnen PBMC verwendet. Bei einer Konzentration von 4.0 nM **E-23** liegt das Verhältnis von **E-23**-Molekülen zu PBMC bei den üblicherweise verwendeten Kulturbedingungen von 500 000 PBMC/ml bei $5 \cdot 10^6$ **E-23**/PBMC. Beim Stabilitätsversuch unter Standardassaybedingungen (siehe 3.5.10.1) lag dieses Verhältnis jedoch bei $5 \cdot 10^{10}$ **E-23**/PBMC. Eine Durchführung des Versuches bei Konzentrationen von

4.0 nM **E-23** und Zelldichten von 500 000 PBMC/ml ließ sich aufgrund der zu geringen spezifischen Aktivität von $[1\text{-}^3\text{H}]\text{E-23}$ (84 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) nicht bewerkstelligen. Daher wurde der Versuch unter Hochzellbedingungen mit $330 \cdot 10^6$ PBMC/ml durchgeführt. In diesem Fall liegt ein Verhältnis von $50 \cdot 10^6$ **E-23**/PBMC vor. Das entspricht immerhin noch dem zehnfachen Wert des üblicherweise verwendeten Verhältnisses.

In Abbildung 22 wird gezeigt, daß unter diesen extremen Bedingungen die Menge an $[1\text{-}^3\text{H}]\text{E-23}$ abnimmt. Nach einer Stunde (Abbildung 22B) wird für $[1\text{-}^3\text{H}]\text{E-23}$ noch ein Anteil von 55% des Anfangswertes (Abbildung 22A) gefunden. Nach weiteren vier Stunden Inkubation bei 37 °C sind nur noch 12% von $[1\text{-}^3\text{H}]\text{E-23}$ in der Mischung enthalten (Abbildung 22C).

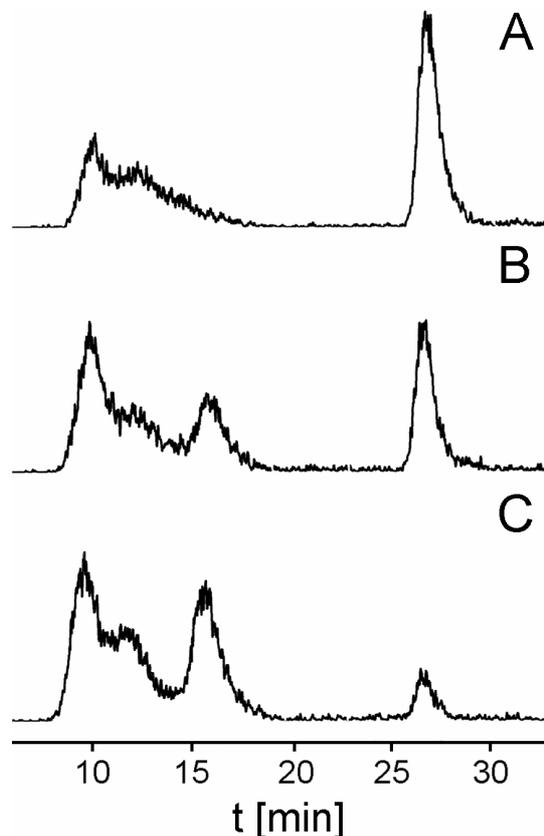


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramme von $[1\text{-}^3\text{H}]\text{E-23}$, welches mit PBMC ($330 \cdot 10^6/\text{ml}$) (Spender SA) und 10 U/ml IL-2 in RPMI 1640-Medium Komplett bei 37 °C inkubiert wurde. Die Konzentration von $[1\text{-}^3\text{H}]\text{E-23}$ betrug zu Beginn der Kultivierung 28 μM . A, zu Beginn der Kultivierung; B, nach 1 h; C, nach 5 h. Die Retentionszeit von $[1\text{-}^3\text{H}]\text{E-23}$ ist 26.5 min. Das Signal von 8 bis 18 min stammt von einer oder mehreren ^3H -haltigen Verbindungen unbekannter Struktur. Dieses Signal wurde als interner Standard verwendet.

3.5.11 ELISA-Analyse der Zytokinseznernierung bei Stimulation von PBMC mit *E-23*

Die Analyse der Zytokinseznernierung wurde anhand von ELISA-Messungen vorgenommen. Dabei wurden die Überstände von PBMC analysiert, welche durch Kultivierung in RPMI 1640-Medium Komplett mit 10 U/ml IL-2 und *E-23* bzw. LPS als Positivkontrolle erhalten wurden. Als Antigenkonzentrationen wurden kein Antigen (Mediumkontrolle), 4.0 nM *E-23*, 32 pM *E-23* und 10 ng/ml LPS verwendet. Die Probenahme erfolgte nach 12 h, 24 h, 48 h und 6.5 Tagen Inkubation. Die Analyse wurde für folgende Zytokine vorgenommen IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15, TNF- α und IFN- γ . Tabelle 8 gibt einen Überblick über die mittels ELISA bestimmten Zytokine.

Tabelle 8: Übersicht über die Zytokinseznernierung vom PBMC, welche mit 10 U/ml IL-2 und zwei verschiedenen Konzentrationen *E-23* kultiviert wurden. LPS mit 10 U/ml IL-2 wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Zytokinseznernierung wurde mittels ELISA-Analyse quantifiziert.

Zytokin	Stimulus			
	kein	4.0 nM <i>E-23</i>	32 pM <i>E-23</i>	10 ng/ml LPS
IL-1 α	-	-	-	-
IL-4	-	-	-	-
IL-6	-	+	-	+++
IL-10	+	-	-	+++
IL-12p40	-	-	-	-
IL-12p70	-	-	-	-
IL-15	-	-	-	-
TNF- α	+	++	+	+++
IFN- γ	+	++++	+	++

-, keine meßbare Zytokinproduktion zur Zeit der Probennahmen (12 h, 24 h, 48 h, 6.5 d)

+, meßbare Zytokinproduktion zur Zeit der Probennahmen

Für die Zytokine IL-1 α , IL-4, IL-12p40, IL-12p70 und IL-15 konnte kein Nachweis einer Sezernierung unter den gegebenen Bedingungen erbracht werden. Für IL-6 konnten bei Kultivierung mit 4.0 nM **E-23** nur kleine Mengen nachgewiesen werden, unter Zusatz von LPS jedoch deutliche Mengen. IL-10 wurde in der unstimulierten Probe in geringer Konzentration, sowie in höheren Konzentrationen bei Zugabe von LPS gefunden. TNF- α und IFN- γ schließlich wurden ohne Zugabe von Antigen und bei Zusatz von 32 pM **E-23** in niedriger Konzentration und bei 4.0 nM **E-23** sowie LPS in größeren Mengen produziert.

In Abbildung 23 ist der zeitliche Verlauf der Zytokinproduktion nach einer Stimulation mit 4.0 nM **E-23**, 32 pM **E-23** sowie 10 ng/ml LPS als Positivkontrolle für TNF- α , IFN- γ , IL-6 und IL-10 gezeigt.

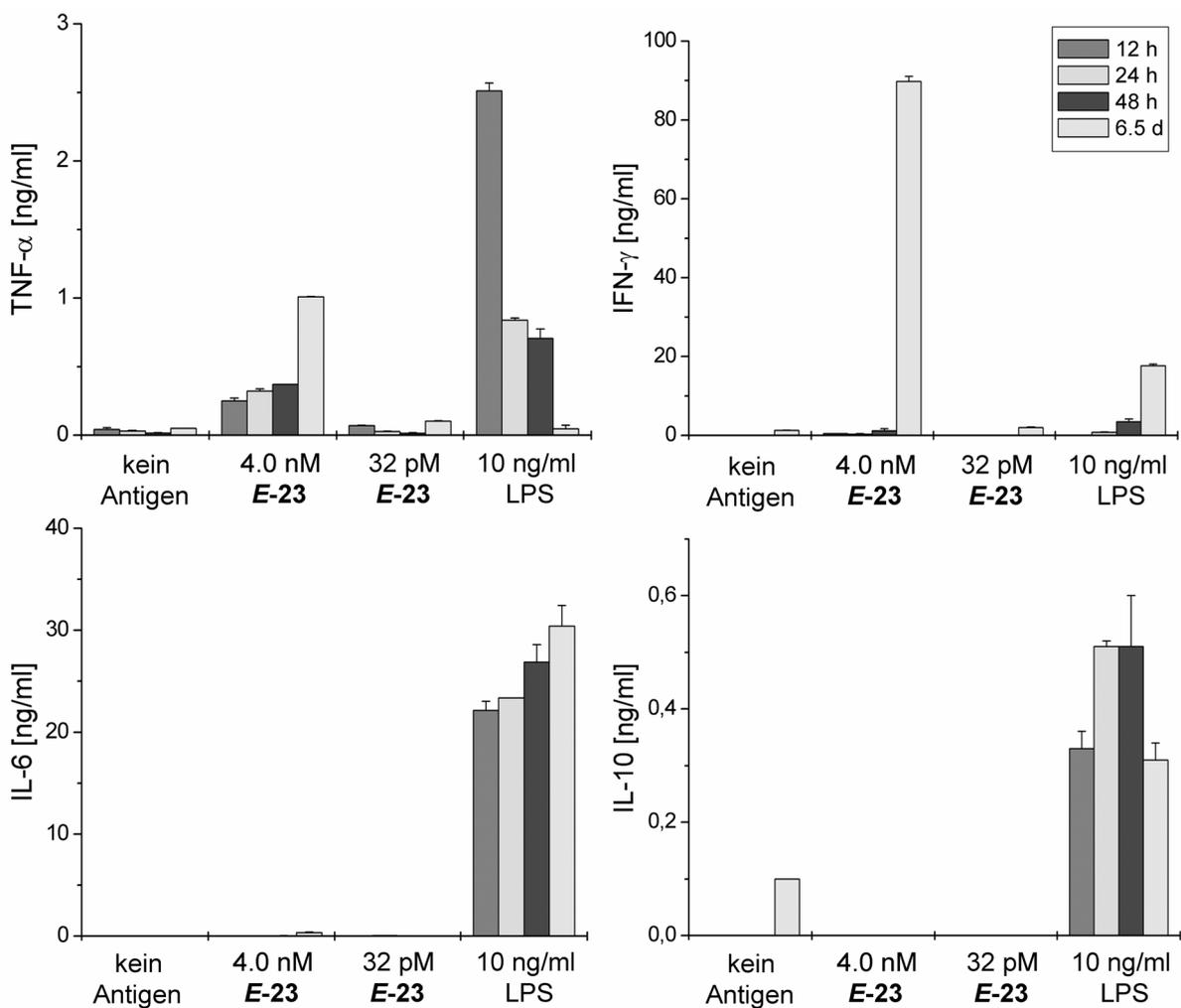


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Zytokinsekrektion der Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-6 und IL-10.

Dabei wird sichtbar, daß die TNF- α -Produktion sehr rasch erfolgt. Es werden innerhalb der ersten 12, 24 bzw. 48 h bei einer Konzentration von 4.0 nM **E-23** deutliche Mengen von 0.25, 0.32 bzw. 0.37 ng/ml sezerniert, auch wenn die Mengen klar unter denen der als Positivkontrolle verwendeten LPS-Probe von 2.5, 0.84 bzw. 0.71 ng/ml liegen. Nach 6.5 d ergibt sich ein anderer Befund. So ist die Menge an TNF- α in der mit 4.0 nM **E-23** stimulierten Probe deutlich auf 1.0 ng/ml gestiegen. In der mit LPS stimulierten Probe unterscheidet sich der TNF- α -Spiegel nicht mehr von der Mediumkontrolle mit 0.05 ng/ml. Es ist ebenfalls bemerkenswert, daß bei einer Konzentration, welche eine halbmaximale Proliferation erzeugt, keine deutlich größere TNF- α -Sezernierung im Vergleich zur Probe ohne Antigen auftritt, d.h. zur nur mit IL-2 stimulierten Probe. Lediglich nach 12 h bzw. 6.5 d findet man mit jeweils 0.069 bzw. 0.10 ng/ml einen etwa doppelt so hohen Wert als in der Mediumkontrolle. Es fällt auf, daß die Sezernierungsprofile von **E-23** und LPS grundlegend voneinander abweichen, zumal TNF- α im Kulturmedium nicht stabil ist und wieder abgebaut wird. Bei den mit **E-23** stimulierten PBMC wird also mit zunehmender Kulturzeit vermehrt TNF- α produziert, wohingegen die sehr große anfängliche Sezernierung in den mit LPS stimulierten Proben rasch abnimmt und nach 6.5 d keine signifikante TNF- α -Produktion mehr vorliegt.

Bei IFN- γ ist ein gegenteiliger Trend zu beobachten. Eine geringe anfängliche Sezernierung von 0.39 ng/ml bzw. 0.30 ng/ml bei Verwendung von 4.0 nM **E-23** nach 12 bzw. 24 h wird durch einen deutlichen Anstieg nach 48 h auf 1.2 ng/ml und schließlich einen extremen Anstieg auf 90 ng/ml IFN- γ nach 6.5 d gefolgt. Bei Zusatz von 32 pM **E-23** wird nur nach 6.5 d eine merkliche Konzentration an IFN- γ erreicht. Die LPS-Kulturen zeigen einen kontinuierlichen Anstieg bis auf 18 ng/ml nach 6.5 d. IFN- γ wird im Gegensatz zu TNF- α in Kultur nicht schnell wieder abgebaut.

Bei den beiden Zytokinen IL-6 und IL-10 konnten nur bei den mit LPS stimulierten Proben deutliche Mengen nachgewiesen werden. Für IL-6 wurden 22 bis 30 ng/ml mit leicht ansteigender Tendenz erhalten. IL-10 im Gegensatz dazu wurde in Konzentrationen von 0.33 bis 0.51 ng/ml gefunden, wobei die Werte bei 24 und 48 h eine maximale Sezernierung von IL-10 zeigten. Daneben konnte IL-6 nur bei einer Stimulation mit 4.0 nM **E-23** und IL-10 nach 6.5 d in Medium ohne Antigen nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

4.1 Der alternative Terpenbiosyntheseweg

Mittels Komplet-Genomvergleich vollständig sequenzierter Organismen (Adam et al., 2000; Eisenreich et al., 2001; Rohdich et al., 2001) wurde ermittelt, daß die Gene *ispG* (ehemals *gcpE*) und *ispH* (ehemals *lytB*) eine Rolle bei der Bildung von IPP und DMAPP aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) spielen. Dabei wurde das Vorkommen von Genen bei Spezies verglichen, die entweder den alternativen Terpenbiosyntheseweg oder den Mevalonat-Terpenbiosyntheseweg verwenden. Durch Experimente mit *E. coli*-Deletionsmutanten wurde die essentielle Rolle dieser Gene (Campos et al., 2001; Altincicek, et al. 2001a; Cunningham et al., 2000; Altincicek et al., 2001b; McAteer et al., 2001) bestätigt.

In neueren Arbeiten mit *E. coli*-Stämmen, welche Plasmide mit synthetischen Operons bestehend aus dem Gen *xyiB* und Genen des Desoxyxylulosephosphat-Weges enthalten, wurde *in vivo* die Bildung der einzelnen Intermediate des Desoxyxylulosephosphat-Terpenbiosyntheseweges gezeigt (Hecht et al., 2001). Dazu wurde ¹³C-markierte 1-Desoxy-D-xylulose an diese Stämme verfüttert, welche *in vivo* durch das Genprodukt des *xyiB*-Gens, die D-Xylulokinase, phosphoryliert und anschließend durch die weiteren in der Zelle vorhandenen Genprodukte der Gene *ispC*, *ispD*, *ispE* und *ispF* in die entsprechenden Intermediate des alternativen Terpenbiosyntheseweges umgesetzt wird. Dieses Vorgehen ermöglichte es, die in die Zelle aufgenommene 1-Desoxy-D-xylulose sukzessive in 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (**11**), 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**13**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) und 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) umzuwandeln. **23** wurde schließlich durch Fütterung von 1-Desoxy-D-xylulose mit einem *E. coli*-Stamm erhalten, welcher das *xyiB*-Gen und die *ispCDEFG*-Gene überexprimiert (Hecht et al., 2001). Die erhaltenen ¹³C-markierten Produkte konnten direkt in den Zell-extrakten mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.

4.1.1 Synthese von **E-23** und Strukturanalogen

Die erfolgreiche Synthese des synthetisch hergestellten **E-23** war die Voraussetzung für die Zuordnung der Konfiguration des *in vivo* produzierten [U-¹³C₅]**23**. Anfängliche Versuche ausgehend von Mesaconsäure (Methylfumarsäure) durch verschiedene Reduktionsreaktionen mit Lithiumaluminiumhydrid, Natriumborhydrid oder Diborane-therat in unterschiedlichen Reaktionsmischungen direkt zur ungesättigten Verbindung zu gelangen, führten nicht zum Ziel. Mit Lithiumaluminiumhydrid kam es zur Bildung von Gemischen sowohl gesättigter als auch ungesättigter Verbindungen, welche sich nicht in befriedigender Weise trennen ließen (vgl. Duvold et al., 1997).

Daher wurde die Doppelbindung mittels einer klassischen Wittig-Reaktion ausgehend von Hydroxyaceton und dem Ylid von Essigsäureethylester eingeführt. Um Probleme durch die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden, wurde eine THP-Schutzgruppe zur Deaktivierung der Hydroxygruppe von Hydroxyaceton verwendet. Diese Schutzgruppe läßt sich leicht im Säuren abspalten und ist basenstabil. Der Schlüsselschritt der Synthese war die Wittigreaktion mit anschließender chromatographischer Isomerentrennung. Versuche der Umesterung des Wittigproduktes zur Änderung des Laufverhaltens und eine Verwendung von auf Silberionen-Komplexierung basierender Trennmethode mit Silicagel waren nicht erfolgreich. Es war jedoch möglich, die *E/Z*-Isomere durch präparative HPLC quantitativ voneinander abzutrennen. Die Folgeschritte einer Reduktion mit DIBALH und die Bildung des Allylchlorids konnten mit sehr guten bis guten Ausbeuten durchgeführt werden. *E/Z*-Isomerisierungen wurden zu keiner Zeit der Synthese beobachtet. Es wurde lediglich die Bildung weiterer ungesättigter Verbindungen im Zuge der DIBALH-Reduktion beobachtet, sofern die Temperatur beim Abstoppen der Reaktion zu hoch war. Die Phosphorylierungsreaktion und die Abspaltung der THP-Schutzgruppe konnten als Eintopfreaktion durchgeführt werden. Für eine erfolgreiche Reinigung war die quantitative Entfernung der Tetra-*n*-butylammoniumgruppen des Phosphorylierungsreagenzes essentiell (Davisson et al., 1986). Eine Durchführung der Entschützung unter NMR-Kontrolle verhinderte eine Abspaltung bzw. Hydrolyse der Diphosphatgruppe durch unnötig langes Einwirken eines niedrigen pH-Wertes auf **E-23**. Durch Lyophilisierung konnte die Verbindung **E-23** in Reinform gewonnen werden. Es wurde keine Zersetzung von **E-23** beobachtet.

Das *E/Z*-Verhältnis im Isomerengemisch ***E/Z*-23** unterschied sich von demjenigen der Wittigreaktion, da die *E*-Form durch Reinigung der einzelnen Zwischenstufen angereichert wurde. Allerdings konnte das *E/Z*-Verhältnis nur von 6:1 auf 7:1 erhöht werden.

Die Synthese der Strukturanaloga (*E*)-1-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-4-phosphat (**24**) und (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol (**25**) konnte durch Abwandlung der beschriebenen Synthesestrategie für ***E*-23** durchgeführt werden. Bei der Isolierung des Alkohols **25** wurde aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit eine Reinigung durch Extraktion der abgespaltenen Schutzgruppe in die organische Phase verwirklicht.

In unserem Arbeitskreis wurde in Zusammenarbeit mit S. Hecht darüberhinaus noch eine Synthese von ³H-markiertem **23** entwickelt (Hecht et al., 2002). Diese Synthese basiert auf einer Epoxidöffnung von 2-Methyl-2-vinylloxiran mittels Kupfer(II)-chlorid zu (*E*)-4-Chlor-2-methyl-but-2-en-1-al. Dieser Aldehyd wird in vier weiteren Reaktionsschritten bei Verwendung von NaBH₄ in ***E*-23** bzw. bei einer Reduktion des Aldehyds mit NaBH₃T in [³H]***E*-23** überführt.

Im Zuge der Entdeckung des neuen Intermediates **23** wurden weitere chemische Synthesen publiziert (Ward und Beale, 2002; Wolff et al., 2002; Fox und Poulter, 2002; Gao et al., 2002; Giner et al., 2002).

4.1.2 Strukturaufklärung des Naturproduktes 1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**23**)

Die Strukturaufklärung von [U-¹³C₅]1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat ([U-¹³C₅]**23**) wurde mittels eines Vergleichs mit dem synthetisch hergestellten ***E*-23** durchgeführt. Dabei wurde die Struktur, d.h. insbesondere die Konfiguration der Doppelbindung, von synthetischem ***E*-23** bzw. sämtlicher ungesättigter Synthesestufen, mit Hilfe von HMBC- und NOESY-NMR-Experimenten eindeutig zugeordnet (für ***E*-23** vgl. Tabelle 3 und Tabelle 4). Die Struktur von *in vivo* produziertem [U-¹³C₅]**23** konnte zum einen durch Vergleich der chemischen Verschiebungen der ¹³C-NMR-Signale *per se* und zum anderen durch Zutitrieren von synthetischem ***E*-23** zu einem Zellextrakt von [U-¹³C₅]**23** nachgewiesen werden. Bei diesem Experiment erschienen die ¹³C-NMR-Signale der synthetischen Spezies ***E*-23** als Zentralsignale im ¹³C-¹³C-

gekoppelten Spektrum der *in vivo* produzierten Verbindung **23**. Weiterhin wurde eine gereinigte Probe von [U-¹³C₅]**23** mit einer *E/Z*-Mischung von synthetischem *E/Z-23* versetzt. Die anschließende Analyse der ¹³C-entkoppelten ¹H-NMR-Signale zeigte einerseits eine Übereinstimmung der Signale von [U-¹³C₅]**23** und *E-23* sowie andererseits keinerlei Korrelation der Signale von [U-¹³C₅]**23** und *Z-23*.

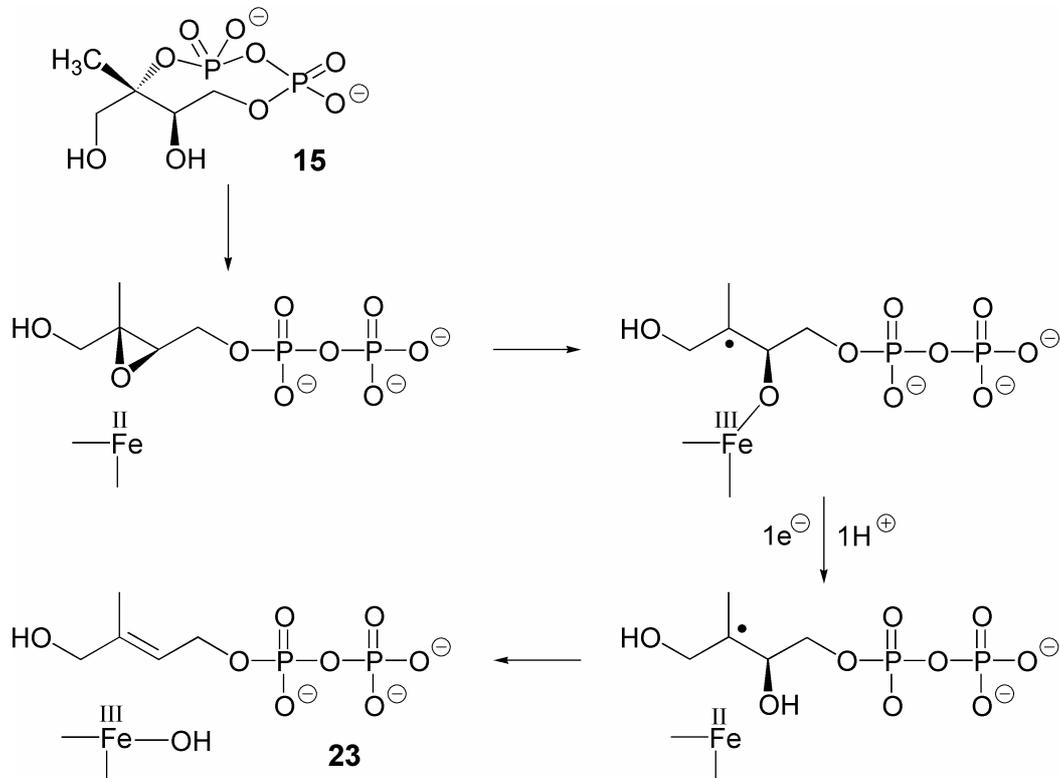
Diese Experimente beweisen direkt, daß die biologisch hergestellte Verbindung **23** identisch mit (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (*E-23*) ist. Die NMR-Daten des Naturstoffes stimmen mit den Daten des synthetisch hergestellten Materials überein. Damit wurde die Richtigkeit der Struktur gezeigt, welche dem neuen Intermediat des alternativen Terpenbiosyntheseweges zugeordnet wurde.

4.1.3 Die Reaktion des IspG (GcpE)-Proteins

Die Bildung von **23** aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) konnte *in vitro* durch Zellextrakte aus einem *E. coli*-Stamm, welcher das *ispG*-Gen überexprimiert, mittels radiochemischer Untersuchungen gezeigt werden (Wolff et al., 2002; Rohdich et al., 2003b). Das IspG-Protein trägt drei konservierte Cysteine, welche auf das Vorhandensein eines Eisen-Schwefel-Clusters hinweisen (Hecht et al., 2002). Dieser konnte durch spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden (Seemann et al., 2002; Kollas et al., 2002; Rohdich et al., 2003b). Rekombinantes IspG-Protein allein, welches als Fusionskonstrukt mit Maltosebindeprotein über Amylose gereinigt wurde, konnte das zyklische Diphosphat **15** nicht in die offenkettige Verbindung **23** umwandeln. Bei Zugabe eines Zellextraktes einer *ispG*-Deletionsmutante konnte jedoch katalytische Aktivität für die Bildung von **23** aus **15** detektiert werden (Rohdich et al., 2003b). Bei einer Aktivierung durch photoreduziertes 10-Methyl-5-deaza-isoalloxazin wurde für die Umwandlung von **15** in **23** eine Reaktionsgeschwindigkeit von 1 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ gefunden (Rohdich et al., 2003b). In Untersuchungen mit gereinigtem IspG-Protein aus *Thermus thermophilus* (Kollas et al., 2002) wurde eine maximale spezifische Aktivität von 0.6 µmol·min⁻¹·mg⁻¹ bei pH 7.5 und 55 °C sowie ein *k_{cat}*-Wert von 0.4 s⁻¹ und ein *K_m*-Wert für **15** von 0.42 mM gefunden.

In Schema 6 ist ein möglicher Reaktionsmechanismus für die Bildung von **23** aus **15** gezeigt (Rohdich et al., 2003b).

Schema 6



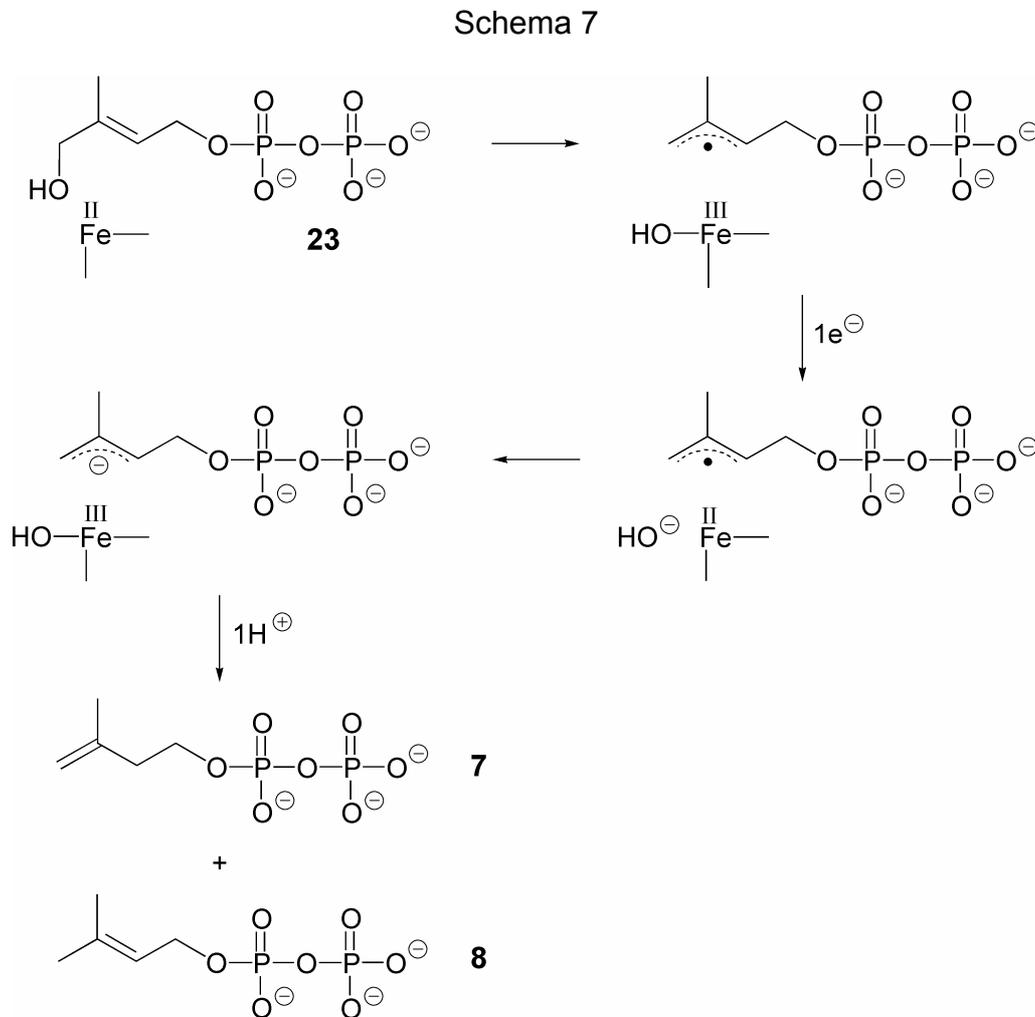
Postulierter Reaktionsmechanismus der Bildung von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**23**) aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) (Rohdich et al., 2003b).

4.1.4 Die Reaktion des IspH (LytB)-Proteins

Eine zusätzliche Expression des *ispH*-Gens erbrachte *in vivo* die Bildung von sowohl IPP als auch DMAPP in einem Verhältnis von 6:1 (Rohdich et al., 2002; Adam et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurde in unabhängigen Untersuchungen von Zellextrakten einer *ispH*-Deletionsmutante aus *E. coli* die Anreicherung einer Verbindung gezeigt, die spektroskopisch als **23** beschrieben wurde (Hintz et al., 2001). Die Bildung von IPP und DMAPP aus **23** konnte zum einen analog der von IspG katalysierten Reaktion mit einem Maltosebindeprotein/IspH-Fusionskonstrukt mit 10-Methyl-5-deaza-isoalloxazin mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ nachgewiesen werden zum anderen in Gegenwart von Flavo-

doxin, Flavodoxin Reduktase und NADPH mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von $3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Rohdich et al., 2003b).

In Schema 7 ist ein möglicher Reaktionsmechanismus für die Bildung von IPP (**7**) und DMAPP (**8**) aus **23** gezeigt (Rohdich et al., 2003b).

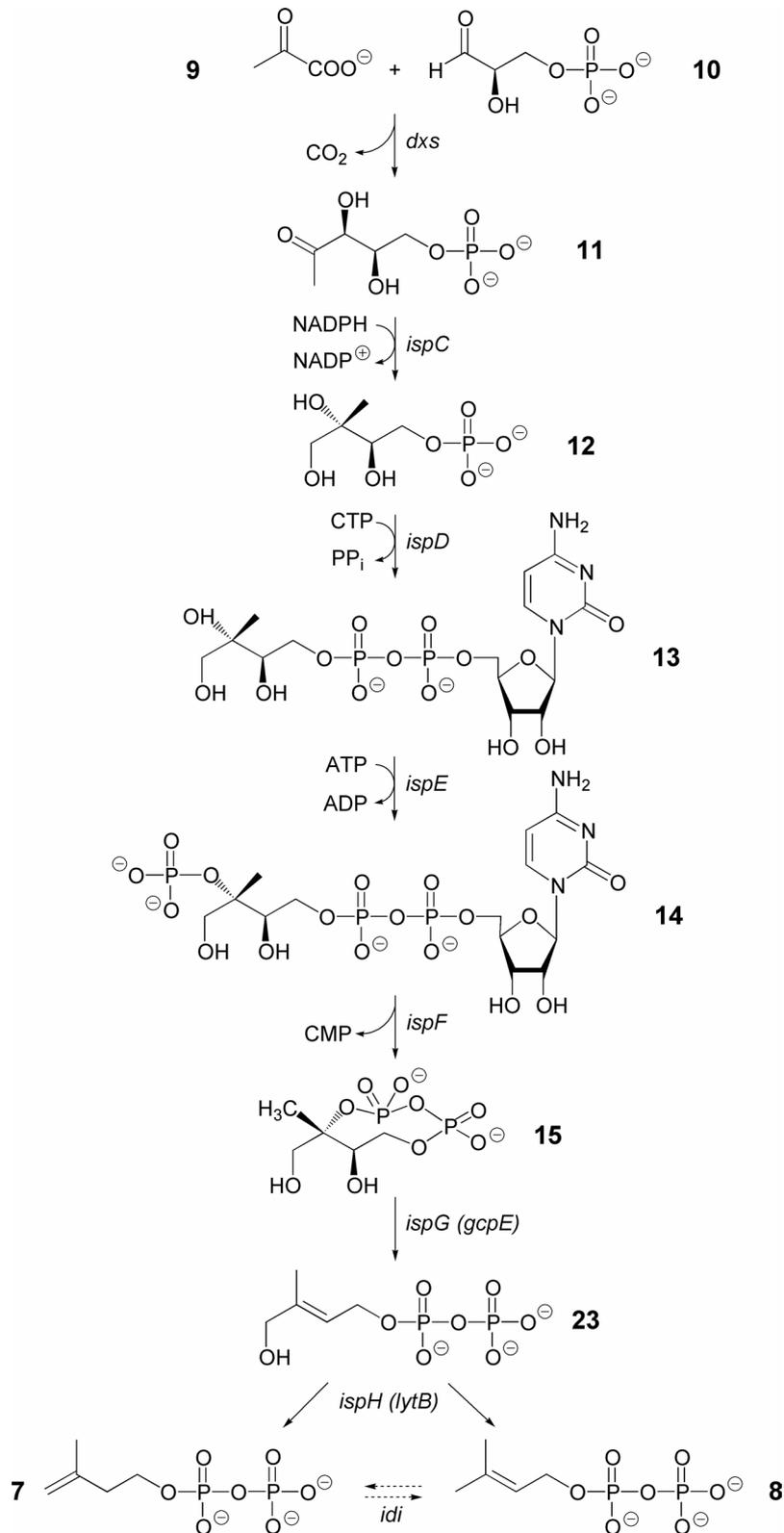


Postulierter Reaktionsmechanismus der Bildung von IPP (**7**) und DMAPP (**8**) aus (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**23**) (Rohdich et al., 2003b).

In unabhängigen Untersuchungen in der Gruppe von *Jomaa* (Altincicek et al., 2002) wurde für gereinigtes IspH-Protein aus *Aquifex aeolicus* eine maximale spezifische Aktivität von $6.6 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ bei pH 7.5 und $60 \text{ } ^\circ\text{C}$ sowie ein k_{cat} -Wert von $3.7 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ und ein K_m -Wert für **23** von $590 \pm 60 \text{ } \mu\text{M}$ gefunden.

Damit konnte gezeigt werden, daß es sich bei **23** um das letzte Intermediat des Desoxyxylulosephosphat-Terpenbiosyntheseweges handelt (Schema 8).

Schema 8



Biosynthese von IPP (7) und DMAPP (8) über 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (11). Die gestrichelten Pfeile über *idi* deuten an, daß ein Isomerisierungsschritt nicht essentiell ist (Hahn et al., 1999).

4.2 (E)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat (**E-23**) als Stimulator von $\gamma\delta$ -T-Zellen

4.2.1 Stimulation der Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen durch **E-23**

Der weitaus größte Teil der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut von gesunden Erwachsenen exprimiert beim Menschen $V\gamma 9/V\delta 2$ -Rezeptoren (Borst et al., 1989; Kabelitz, 1992). Eine Vielzahl an Beweisen zeigt, daß sich eine Proliferation dieser Zellen durch verschiedenste Phosphat- oder Diphosphatester einfacher Alkohole im Zusammenspiel mit IL-2 stimulieren läßt (Belmant et al., 2000; Review siehe Espinosa et al., 2001).

In Tabelle 9 ist eine Übersicht einer großen Anzahl unterschiedlicher natürlicher und synthetischer Phosphoantigene und deren EC_{50} -Werte gezeigt. Dabei fällt auf, daß sich unter den starken Agonisten ausschließlich Di- bzw. Triphosphate befinden, die aus fünf Kohlenstoffatomen aufgebaut sind.

Die in früheren Arbeiten aufgeklärten Intermediate des alternativen Terpenbiosyntheseweges 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**13**), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) und 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) zeigen in Konzentrationsbereichen, in welchen IPP bereits eine deutliche Proliferation humaner $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen induziert, keine signifikante Stimulation dieser Lymphozyten (Abbildung 13). Sie stellen damit keine Stimulatoren von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen dar, was in anderen Untersuchungen bestätigt wurde (Feurle et al., 2002).

Das kürzlich entdeckte Naturprodukt **23**, welches als Intermediat in der Isoprenoidbiosynthese in vielen Bakterienarten und in Pflanzen vorkommt, ist das effektivste Phosphoantigen, welches bisher bekannt ist. So konnte für **E-23** ein Median EC_{50} -Wert von 70 pM ermittelt werden (Tabelle 6 und Tabelle 7). *Jomaa* zeigte für **23**, welches aus Zellextrakten einer *ispH*-Deletionsmutante von *E. coli* isoliert wurde, ebenfalls EC_{50} -Werte im picomolaren Bereich (Hintz et al., 2001; Eberl et al., 2002a).

Eine ähnliche Aktivität wurde zuvor nur für Iodhydrin-diphosphat mit 3-0.5 nM beschrieben (Delibero, 1997; vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9: EC₅₀-Werte nicht-nucleotidischer Phosphoantigene (Espinosa et al., 2001).

Verbindung	Bereich des EC₅₀-Wertes [µM]
<i>Schwache Agonisten</i>	
Ribose-1-phosphat	1 000-10 000
sec-Butyl-phosphat*	1 000-5 000
Phospholactat*	500-5 000
2,3-Diphosphoglycerat	500-5 000
Xylose-1-phosphat	500-5 000
Glycerin-1-phosphat	500-5 000
Methyl-phosphat*	500-1 000
Propyl-phosphat*	500-1 000
Isopropyl-phosphat*	500-1 000
Phosphoglycolsäure	500-1 000
<i>Mittlere Agonisten</i>	
β-Hydroxyethyl-phosphat*	100-500
Isopentenyl-phosphat	50-500
γ-Butyrolacton-α-diphosphoester	50-500
Allyl-phosphat	50-500
Crotyl-phosphat	50-500
Dimethylallyl-phosphat	50-500
2-Butanon-1-yl-diphosphat	20-100
α,γ-Dibromhydrin-triphosphodiester	10-20
α,γ-Diodhydrin-triphosphodiester	5-15
2-Methyl-iodhydrin-diphosphat	5-10
3-Methyl-3,4-butandiol-1-yl-diphosphat	1-10
Allyl-diphosphat	1-10
Crotyl-diphosphat	1-10
Dimethylallyl-diphosphat	1-10
Ethyl-diphosphat	1-10
Isopentenyl-diphosphat	1-10
Pamidronat	4-8
Alendronat	0.9
Ibandronat	1
<i>Starke Agonisten</i>	
Bromhydrin-triphosphat	0.080-0.150
Iodhydrin-triphosphat	0.050-0.100
3,4-Epoxy-3-methyl-1-butyl-diphosphat	0.020-0.080
3-Formyl-1-butyl-diphosphat	0.005-0.010
Chlorhydrin-diphosphat	0.050-0.100
Bromhydrin-diphosphat	0.005-0.020
Iodhydrin-diphosphat	0.0005-0.003

* die Aktivitäten wurden mit ungereinigten Produkten aus chemischen Synthesen abgeschätzt

Alkylamine wie *iso*-Butylamin, *iso*-Amylamin und *n*-Butylamin, die von verschiedenen Humanpathogenen wie *Morganella morganii*, *Salmonella typhimurium* und *Listeria monocytogenes* sezerniert werden, aber auch in Pflanzenextrakten vorkommen, wurden mit EC₅₀-Werten im millimolaren Bereich mit sehr geringen Bioaktivitäten eingestuft (Bukowski et al., 1999). Synthetische Aminobisphosphonate wie Pamidronat, Ibandronat und Alendronat mit EC₅₀-Werten im mikromolaren Bereich haben eine starke *in vivo*-Expansion von V γ 9/V δ 2-T-Zellen gezeigt (Kunzmann et al., 1999).

4.2.2 Entscheidende Strukturparameter von **E-23**, welche für die biologische Aktivität verantwortlich sind

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Ausmaß der Proliferation von V γ 9/V δ 2-T-Zellen in Folge einer Phosphoantigenstimulierung einen hohen Grad an Strukturspezifität besitzt. So ist beispielsweise das Monophosphat **24** 1700 mal weniger effizient als Stimulator als das Diphosphat **E-23**. Der Austausch des verbrückenden Sauerstoffatoms des Phosphorsäureanhydridmotivs von **E-23** durch eine Methylengruppe in Verbindung **26** führt zu einer 79 000-fach niedrigeren Aktivität. Besonders interessant ist die Tatsache, daß der EC₅₀-Wert von **E-23** um einen Faktor von 3300 höher liegt als derjenige von DMAPP, obwohl sich die beiden Verbindungen lediglich durch eine Hydroxygruppe unterscheiden. Vergleicht man die beiden isomeren Verbindungen IPP und DMAPP, die ebenfalls strukturell sehr ähnlich sind, zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied. DMAPP ist 100-fach aktiver als IPP (Tabelle 7). Das steht im Gegensatz zu den von Tanaka et al. gezeigten EC₅₀-Werten von DMAPP und IPP, welche sehr ähnliche Aktivitäten für diese beiden Verbindungen beschrieben haben (Tanaka et al., 1995), d.h. für IPP einen EC₅₀-Wert von 3 μ M und für DMAPP einen EC₅₀-Wert von 10 μ M. Beim Vergleich der Monophosphate von IPP und DMAPP geben die Autoren dagegen für Dimethylallylphosphat einen 20-fach höheren EC₅₀-Wert als für Isopentenylphosphat an.

Phosphoantigene mit chemisch reaktiven Gruppen wie beispielsweise Aldehyde wurden als sehr potente Stimulatoren der $\gamma\delta$ -T-Zell-Proliferation beschrieben (Belmant et al., 1999). Insbesondere 3-Formyl-1-butyl-diphosphat mit einem beschriebenen EC₅₀-Wert von 5-10 nM wurde als ein besonders effizienter Stimulator dargestellt, da die Aldehydgruppe die Bildung einer kovalenten Bindung (Schiffbase) zu

Proteinen ermöglichen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden für den strukturverwandten Aldehyd **27** EC_{50} -Werte im Bereich von 41-450 nM mit einem Median EC_{50} -Wert von 150 nM gefunden. Das entspricht einer 2100-fach geringeren Aktivität als für **E-23**. Erwähnenswert ist, daß die Effizienz beider Aldehyde, **27** und 3-Formyl-1-butyl-diphosphat, weitaus geringer ist als diejenige von **E-23**, obwohl **E-23** keine Schiffbase bilden kann. Entfernt man ausgehend vom Monophosphat **24** nochmals eine Phosphatgruppe, findet man für die Aktivität der erhaltenen Spezies **25** eine weitere Erniedrigung des EC_{50} -Wertes um drei Größenordnungen. Der Alkohol **25** zeigt EC_{50} -Werte im Bereich von 9.6-180 μ M mit einem Median von 66 μ M. Er ist damit 1 000 000 mal weniger aktiv als **E-23**, hat also immer noch einen EC_{50} -Wert in der Größenordnung von IPP.

In Abbildung 24 ist eine Zusammenfassung der Strukturanalyse von **E-23** gezeigt.

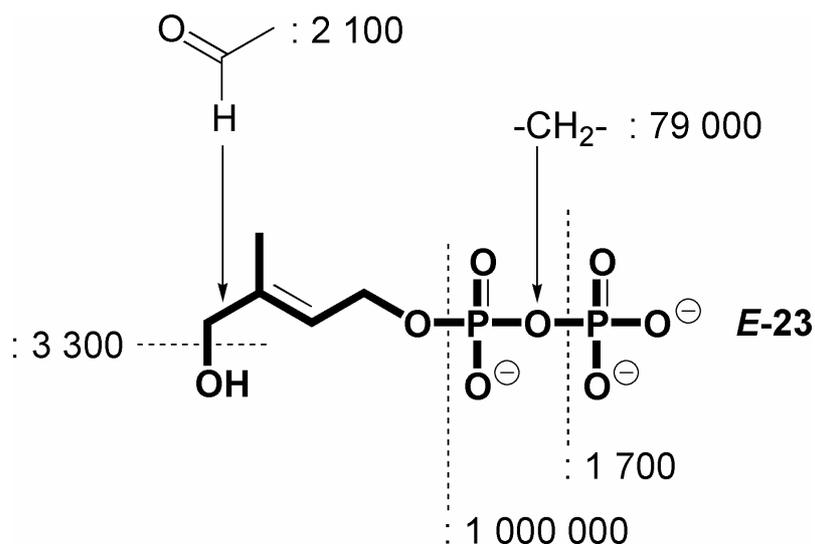


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Einflüsse von Strukturänderungen auf die Aktivität von Strukturanalogenen von **E-23**.

4.2.3 Reaktivität verschiedener Spender und Rezeptorverhältnisse

Die Amplitude der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zell-Proliferation zeigte eine große Bandbreite bei PBMC von verschiedenen Spendern. Bei den Spendern SA, CW, SB und TG erhöhte sich die Fraktion der $V\delta 2^+$ -Zellen unter den $CD3^+$ -Zellen von 1-5% auf Werte von 20-70%. In Experimenten mit PBMC der Spender SH, CH, HH und FZ war die Reak-

tion viel weniger ausgeprägt (Abbildung 18 und Abbildung 21). Ein bestimmter Spender zeigte gleichbleibend denselben Reaktionstyp mit PBMC, die über Wochen hinweg aus Vollblut isoliert wurden. Die *high* und *low responder* Phenotypen könnten genetisch bestimmt sein. Es gab keine offensichtliche Beziehung zwischen der Amplitude der Proliferationsreaktion, dem EC_{50} -Wert und der Anzahl der $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen vor der Stimulation (Tabelle 5).

Bei der Stimulation mit **E-23** und den anderen getesteten Phosphoantigenen wurden zwei Populationen $CD3^+V\delta 2^+$ -T-Zellen beobachtet, welche als a und b bezeichnet wurden. Diese beiden Populationen wurden mit PBMC aller acht Spender gefunden. Klasse a-Zellen mit einem relativ hohen $V\delta 2$ -Antigenlevel sind in den unstimulierten Zellen aller Spender vorhanden, wohingegen die Population-b- $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen mit einer niedrigen $V\delta 2$ -Dichte in unstimulierten Zellkulturen selten vorkommen. Beide Populationen nahmen bei der Stimulation mit **E-23** zu, wobei die relative Zunahme bei Zellen der Klasse b ausgeprägter war (Abbildung 15 und Abbildung 16). Interessant ist die Tatsache, daß das Auftreten beider Populationen zum einen an den Zusatz von Phosphoantigen und zum anderen an die Menge an zugesetztem IL-2 gekoppelt ist (vgl. 3.5.7, Abbildung 17). So wurde bei Versuchen unter den üblichen Versuchsbedingungen von 10 U/ml der beschriebene Sachverhalt reproduzierbar beobachtet. Bei höheren IL-2-Mengen verschwindet die Population mit dem niedrigeren Anteil an $V\delta 2$ -Ketten und es zeigt sich eine Population mit einem noch höheren $V\delta 2$ -Anteil als Population a.

Sireci et al. (Sireci et al., 2001) interpretierten die bimodale Verteilung der $V\delta 2$ Expression in stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen als Herunterregulierung des $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptors, welche durch Stimulation mit Phosphoantigen herbeigeführt wurde. Es sollte jedoch angemerkt werden, daß nur die $V\delta 2$ -Ketten die bimodale Verteilung zeigen, wohingegen die $V\gamma 9$ -Ketten diesen Effekt nicht zeigen. Die Stöchiometrie der $CD3$ -(ϵ -Kette) und $V\delta 2$ -Kette unterscheidet sich um einen Faktor von 3 zwischen Klasse a und b. Wenn $CD3$ und $V\delta 2$ direkt auf der Zelloberfläche assoziiert sind, kann im besten Fall nur eine der beiden Klassen eine 1:1-Stöchiometrie von $V\delta 2$ und $V\gamma 9$ aufweisen.

4.2.4 Zytokinsezernierung durch stimulierte V γ 9/V δ 2-T-Zellen

Untersuchungen zeigen, daß $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Immunantwort gegen mikrobielle Pathogene beteiligt sind, indem sie nach einer Phosphoantigenstimulation Lymphokine wie Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α produzieren (Garcia et al., 1997; Tsukaguchi et al., 1999). Diese Sezernierung ist hochgradig von der Anwesenheit kostimulierender T-Zell-Wachstumsfaktoren abhängig. Dabei ist die Produktion von IFN- γ und TNF- α insbesondere bei einer Stimulation mit IL-2 zu beobachten (Sireci et al., 1997; Wesch et al., 1997).

Die Sezernierung TNF- α nach Stimulierung mit hohen Konzentrationen an **E-23** erfolgte rasch und über einen ungewöhnlich langen Zeitraum von einer Woche. IFN- γ wurde ebenfalls produziert und offenbar innerhalb einer Woche akkumuliert.

In der Gruppe von Jomaa wurden Untersuchungen mit Zellextrakten von *ispH*-Deletionsmutanten, welche **23** enthielten, durchgeführt. Dabei wurde sowohl die Hochregulierung der Aktivierungsmarker CD25 (IL-2R α -Kette), CD69 und HLA-DR sowie des C-Typ Lektins CD94 auf der Oberfläche von V γ 9/V δ 2-T-Zellen als auch die Sezernierung von IFN- γ und TNF- α durch PBMC gefunden (Eberl et al., 2002a). Diese Experimente wurden standardmäßig unter Verwendung von IL-2 vorgenommen. Später wurden humane PBMC mit gereinigtem **23** unter Kostimulation verschiedener Zytokine kultiviert. Dabei wurden IL-15 und IL-21 als Kostimulatoren einer V γ 9/V δ 2-T-Zell-Proliferation mit **23** beschrieben, in ähnlicher Art und Weise ebenfalls IL-2 und IL-7 (Eberl et al., 2002b).

4.2.5 Biologische Relevanz der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß die Proliferation von V γ 9/V δ 2-T-Zellen durch Zellextrakte einer Vielzahl von Bakterien sowohl Gram-positiven als auch Gram-negativen stimuliert wird (Jomaa et al., 1999a). Dabei war nicht die Zusammensetzung der Zellwand und auch nicht die IPP-Konzentration in den Zellen für eine Stimulation der V γ 9/V δ 2-T-Zellen verantwortlich, vielmehr war das Vorhandensein des alternativen Terpenbiosyntheseweges ausschlaggebend für eine Aktivierung der Proliferation dieser Lymphozyten. In Abbildung 25 sind Untersuchungen mit Zellextrakten ver-

schiedener Bakterien gezeigt, welche entweder den Desoxyxylulosephosphatweg (Desoxyxyluloseweg) oder den Mevalonatweg beschreiten (Jomaa et al., 1999a).

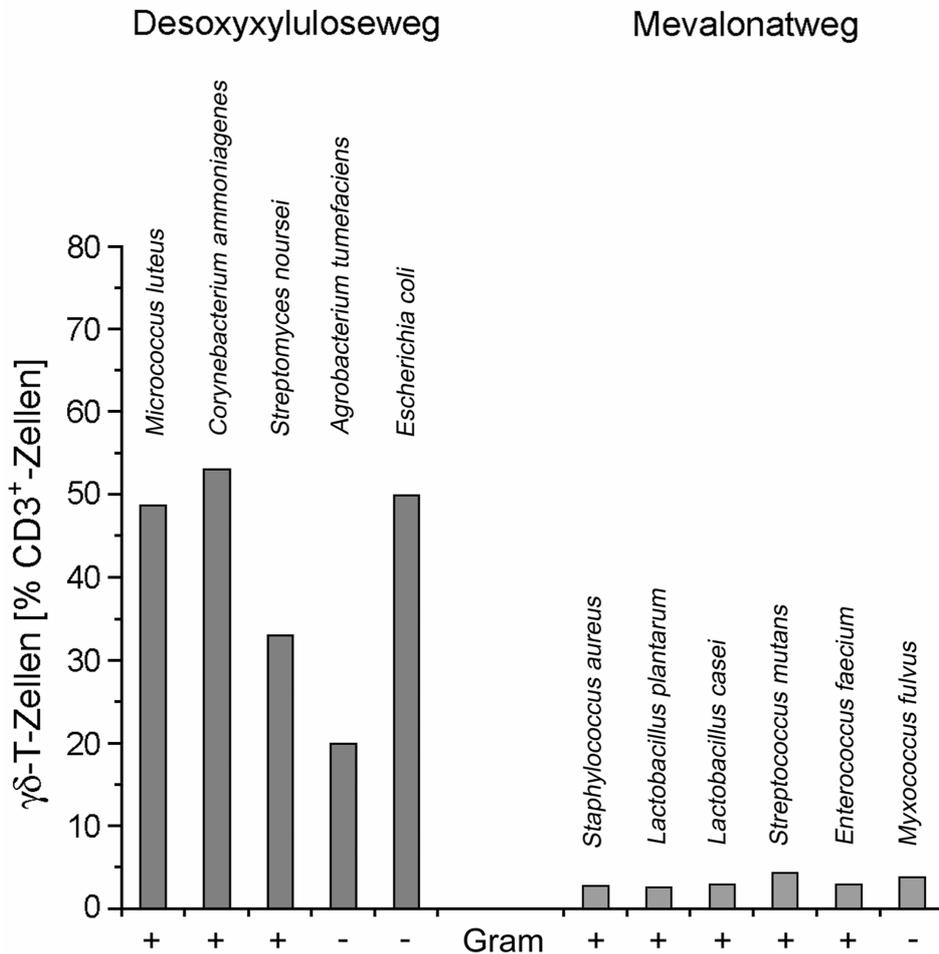


Abbildung 25: Selektives Wachstum von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach einer Inkubation von PBMC mit Zellextrakten von Bakterien, die den Desoxyxylulosephosphat-Terpenbiosyntheseweg oder den Mevalonat-Biosyntheseweg verwenden. Die Ergebnisse zeigen die Anteile in Prozent aller CD3⁺-Zellen, welche einen $\gamma\delta$ -TCR exprimieren (Jomaa et al., 1999a).

Dabei ist klar zu erkennen, daß die Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen ausschließlich mit Zellextrakten von Bakterien stimuliert wird, die den alternativen Terpenbiosyntheseweg verwenden. Darüberhinaus wurde gefunden, daß die Menge an IPP in diesen Zellextrakten keine entscheidenden Unterschiede in Abhängigkeit des Isoprenoidbiosyntheseweges zeigt und die gefundenen IPP-Werte jeweils unterhalb einer Konzentration lagen, die signifikante V γ 9/V δ 2-T-Zell-Proliferation induzieren könnten.

Seit 1995 sind die vollständigen Genome von etwa 60 humaner bakterieller Pathogene sequenziert worden. Ein genomischer Vergleich zeigt, daß Gram-negative Pathogene den Desoxyxylulosephosphat-Terpenbiosyntheseweg beschreiten mit der Ausnahme von *Borrelia burgdorferi*. In der Gram-positiven Pathogengruppe benutzen *Staphylococce*n und *Streptococce*n den Mevalonat-Biosyntheseweg (Wilding et al., 2000, vgl. Abbildung 25). Die Genome von *Rickettsia prowazekii*, *Mycoplasma* und *Ureaplasma* (Andersson et al., 1998; Fraser et al., 1995; Glass et al., 2000) scheinen keine Isoprenoidbiosynthesegene zu besitzen. Der Desoxyxylulosephosphat-Terpenbiosyntheseweg wurde als einziger Isoprenoidbiosyntheseweg in *Plasmodium* spp. (Jomaa et al., 1999b; Gardner et al., 2002) nachgewiesen, wohingegen bestimmte andere pathogene Protozoen, wie beispielsweise *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania* sp. den Mevalonat-Biosyntheseweg verwenden (Concepcion et al., 1998; Ginger et al., 1999). Pilze und Tiere benutzen ausschließlich den Mevalonatweg zur Isoprenoidbiosynthese.

Da Tiere ausschließlich den Mevalonatweg für die Terpenbiosynthese verwenden, könnte die Gegenwart von Desoxyxylulosephosphatweg-Intermediaten in den Körperflüssigkeiten als molekularer Marker für die Anwesenheit von bestimmten pathogenen Mikroorganismen sowohl im Gewebe als auch den Körperflüssigkeiten dienen. Auf der anderen Seite sollte angemerkt werden, daß DMAPP und IPP ausnahmslos in allen Säugetierzellen erzeugt werden. Der EC₅₀-Wert von **E-23** und DMAPP unterscheidet sich um einen Faktor von etwa 3300, derjenige von IPP sogar um einen Faktor von einer Million. Allerdings muß man bedenken, daß die Menge bakterieller Biomasse bei Infektionen im Vergleich zur Masse des infizierten Gewebes typischerweise gering ist. Damit ist ein extrem niedriger EC₅₀-Wert Voraussetzung für eine effiziente Erkennung pathogener Organismen.

Bis jetzt ist weder etwas über den Efflux von **23** aus intakten Bakterienzellen noch über denjenigen von DMAPP aus intakten humanen Zellen bekannt. Selbst wenn der Efflux aus humanen Zellen gering ist, könnte DMAPP in der extrazellulären Flüssigkeit im Zuge einer Gewebsnekrose aufgrund einer Gewebeschädigung auftreten. Kürzlich wurde auch berichtet, daß bestimmte Tumorzellen durch T-Zellen *via* endogener Mevalonat-Biosynthese-Metaboliten erkannt werden (Gober et al., 2003), dabei wird IPP als entscheidende Substanz vorgeschlagen. Wenn die $\gamma\delta$ -T-Zell-Antwort entweder durch **23** aus infektiösen Bakterien oder durch IPP aus geschädigten oder

bösartigen Säugetierzellen stimuliert werden kann, wäre es möglich, daß Phosphoantigene als Signal für eine Infektion und/oder Zellschädigung dienen. In ähnlicher Weise können N-Formylpeptide, welche durch Immunrezeptoren erkannt werden, sowohl aus Bakterien als auch aus den Mitochondrien geschädigter Zellen stammen (Carp, 1982).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bis in die 1990er Jahre wurde die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat über den Mevalonat-Biosyntheseweg erklärt. Erst seit kurzem ist bekannt, daß Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat auch über 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gebildet werden können. Kürzlich konnte (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat als ein spätes Intermediat des alternativen Terpenbiosyntheseweges identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sechsstufige Synthese von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat entwickelt. Die Gesamtausbeute bei Herstellung der isomerenreinen Verbindung betrug 38%. Zusätzlich wurden analoge Verbindungen, d.h. (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat und (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol, durch Abwandlung des zuvor erzeugten Synthesekonzepts synthetisch hergestellt. Daneben wurde eine *E/Z*-Mischung von 1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat hergestellt, indem die Synthesesequenz ohne Isomerentrennung des durch eine Wittigreaktion erhaltenen *E/Z*-Gemisches durchgeführt wurde.

Die *E*-Konfiguration des durch die enzymatische Funktion des IspG-Proteins erhaltenen Naturproduktes wurde durch NMR-Experimente bewiesen. Dazu wurden Zellextrakte eines *Escherichia coli*-Stammes, der die *xyIB*- und *ispCDEFG*-Gene überexprimiert, verwendet. Dieser Stamm wurde mit [U-¹³C₅]1-Desoxy-D-xylulose gefüttert. Zellen dieses Stammes wurden entweder direkt mittels NMR-Spektroskopie analysiert oder zuvor über Ionenaustauscherchromatographie mittels HPLC gereinigt. Bei der ¹³C-NMR-Analyse wurde ungereinigtes Material mit synthetischem (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat versetzt; bei der ¹H-NMR-Analyse wurde eine gereinigte Probe mit dem Isomerengemisch (*E/Z*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat versetzt. Auf diese Weise konnte eindeutig die Struktur des neuen Intermediates des Desoxyxylulosephosphat-Terpenbiosyntheseweges nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die biologische Aktivität von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat und analoger Substanzen mit immunologischen Methoden untersucht. Dabei stellte sich (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat als der bisher potenteste Aktivator der Proliferation von $V\gamma 9/V\delta 2$ -T-Zellen heraus. Die früher aufgeklärten Intermediate 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat und 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat stellen keine Stimulatoren von $V\gamma 9/V\delta 2$ -Zellen dar.

In Kulturen von PBMC von acht gesunden zufälligen Spendern wurde die Proliferation von $CD3^+V\delta 2^+$ -T-Lymphozyten durch (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat mit einem Median EC_{50} -Wert von 70 pM stimuliert, wenn IL-2 (10 U/ml) als Kostimulator zugesetzt wurde. Isopentenylidiphosphat (IPP), Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) und einige Strukturanaloga von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat stimulierten ebenfalls die $\gamma\delta$ -T-Zell-Proliferation, jedoch bei viel höheren Konzentrationen. Die Amplitude der Proliferation variierte um einen Faktor von ungefähr 10 zwischen den Spendern. Alle getesteten Phosphoantigene riefen die Proliferation von zwei T-Lymphozytenpopulationen mit ausgesprochen verschiedenen Verhältnissen zwischen den Expressionslevels der $V\delta 2$ - und $V\gamma 9$ -Ketten hervor.

Die Aktivierung der Proliferation durch Phosphoantigene besitzt eine hohe Strukturspezifität. Das konnte durch Vergleich der EC_{50} -Werte von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat mit synthetischen Strukturanaloga von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat, nämlich Isopentenylidiphosphat, Dimethylallyldiphosphat, (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-phosphat, (*E*)-2-Methyl-but-2-en-1,4-diol, (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-(methylen-diphosphonat) und (*E*)-3-Formyl-but-2-enyl-1-diphosphat, gezeigt werden. So wurde ermittelt, daß das Diphosphatmotiv insgesamt und die 1-Hydroxygruppe als solche essentiell für die hohe Aktivität von (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat sind.

Es konnte außerdem gezeigt werden, daß TNF- α und INF- γ in Zellkulturen sezerniert wurden, die mit (*E*)-1-Hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphat und IL-2 (10 U/ml) als Kostimulator inkubiert wurden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adam, P.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Fellermeier, M.; Hecht, S.; Rohdich, F.; Schuhr, C. A.; Wungsintaweekul, J.; Zenk, M. H. (2000) The non-mevalonate isoprenoid pathway. Dt. Patentanm. PCT/EP01/06255.

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

Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* **2**, 675-680.

Allison, T. J.; Winter, C. C.; Fournie, J.-J.; Bonneville, M.; Garboczi, D. N. (2001) Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* **411**, 820-824.

Altincicek, B.; Duin, E. C.; Reichenberg, A.; Hedderich, R.; Kollas, A. K.; Hintz, M.; Wagner, S.; Wiesner, J.; Beck, E.; Jomaa, H. (2002) LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **532**, 437-440.

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

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

Amslinger, S.; Hecht, S.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Adam, P.; Bauer, S.; Bacher, A. Stimulation of V γ 9/V δ 2 T lymphocyte proliferation by the isoprenoid precursor, (E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-diphosphate. (eingereicht)

Andersson, S. G.; Zomorodipour, A.; Andersson, J. O.; Sicheritz-Ponten, T.; Alsmark, U. C.; Podowski, R. M.; Naslund, A. K.; Eriksson, A. S.; Winkler, H. H.; Kurland, C. G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133-140.

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

Arigoni, D.; Schwarz, M. K. (1999) Ginkgolide biosynthesis. In *Comprehensive natural product chemistry*; Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Cane, D., Eds.; Pergamon: Oxford; Vol. 2, S. 367-399.

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

Belmant, C.; Espinosa, E.; Halary, F.; Tang, Y.; Peyrat, M. A.; Sicard, H.; Koziowski, A.; Buelow, R.; Poupot, R.; Bonneville, M.; Fournie, J.-J. (2000) A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human δ T cells. *FASEB J.* **14**, 1669-1670.

Belmant, C.; Espinosa, E.; Poupot, R.; Peyrat, M. A.; Guiraud, M.; Poquet, Y.; Bonneville, M.; Fournie, J.-J. (1999) 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A Novel Mycobacterial Metabolite-activating Human $\gamma\delta$ T cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 32079-32084.

Bendelac, A.; Medzhitov, R. (2002) Adjuvants of Immunity: Harnessing Innate Immunity to Promote Adaptive Immunity. *J. Exp. Med.* **195**, F19-F23.

Bloch, K. (1992) Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. *Steroids* **57**, 378-382.

Bochar, D. A.; Friesen, J. A.; Stauffacher, C. V.; Rodwell, V. W. (1999) Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. In *Comprehensive natural product chemistry*; Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Cane, D., Eds.; Pergamon: Oxford; Vol. 2, S. 15-44.

Borst, J.; Wicherink, A.; Van Dongen, J. J.; De Vries, E.; Comans-Bitter, W. M.; Wassenaar, F.; Van Den Elsen, P. (1989) Non-random expression of T cell receptor γ and δ variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1559-1568.

Boyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **97**, 77-89.

Broers, S. T. J. (1994) Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. Dissertation Nr. 10978, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz.

Bukowski, J. F.; Morita, C. T.; Brenner, M. B. (1999) Human $\gamma\delta$ T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants and tea: implication for innate immunity. *Immunity* **11**, 57-65.

Bukowski, J. F.; Morita, C. T.; Tanaka, Y.; Bloom, B. R.; Brenner, M. B.; Band, H. (1995) $V\gamma 2V\delta 2$ TCR-dependent Recognition of Non-Peptide Antigens and Daudi Cells Analyzed by TCR Gene Transfer *J. Immunol.* **154**, 998-1006.

Campos, N.; Rodriguez-Concepcion, M.; Seemann, M.; Rohmer, M.; Boronat, A. (2001) Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **488**, 170-173.

Carp, H. (1982) Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* **255**, 264-275.

Concepcion, J. L.; Gonzalez-Pacanowska, D.; Urbina, J. A. (1998) 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **352**, 114-120.

Constant, P.; Davodeau, F.; Peyrat, M.-A.; Poquet, Y.; Puzo, G.; Bonneville, M.; Fournie, J.-J. (1994) Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* **264**, 267-270.

Cornforth, J. W. (1968) Olefin-Alkylierung in der Biosynthese. *Angew. Chem.* **80**, 977-985.

Cunningham, F. X. Jr.; Lafond, T. P.; Gantt, E. (2000) Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 5841-5848.

Davisson, V. J.; Woodside, A. B.; Neal, T. R.; Stremmer, K. E.; Muehlbacher, M.; Poulter, C. D. (1986) Phosphorylation of Isoprenoid Alcohols. *J. Org. Chem.* **51**, 4768-4779.

Delibero, G. (1997) Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol. Today* **18**, 22-26.

Deusch, K.; Lüling, F.; Reich, K.; Classen, M.; Wagner, H.; Pfeffer, K. (1991) A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the $\gamma\delta$ T cell receptor, CD8 accessory molecule and preferentially uses the V δ 1 gene segment. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1053-1059.

Dobson, G.; Christie, W. W.; Nikolova-Damyanova, B. (1995) Silver ion chromatography of lipids and fatty acids. *J. Chromatogr. B* **671**, 197-222.

Duvold, T.; Cali, P.; Bravo, J.-M.; Rohmer, M. (1997) Incorporation of 2-C-Methyl-D-erythritol, a Putative Isoprenoid Precursor in the Mevalonate-Independent Pathway, into Ubiquinone and Menaquinone of *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* **38**, 6181-6184.

Eberl, M.; Altincicek, B.; Kollas, A.-K.; Sanderbrand, S.; Bahr, U.; Reichenberg, A.; Beck, E.; Foster, D.; Wiesner, J.; Hintz, M.; Jomaa, H. (2002a) Accumulation of a potent $\gamma\delta$ T-cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*. *Immunology* **106**, 200-211.

Eberl, M.; Engel, R.; Beck, E.; Jomaa, H. (2002b) Differentiation of human $\gamma\delta$ T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol.* **218**, 1-6.

Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Bacher, A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**, 78-84.

Espinosa, E.; Belmant, C.; Sicard, H.; Poupot, R.; Bonneville, M.; Fournie, J. J. (2001) Y2K+1 state-of-the-art on non-peptide phosphoantigens, a novel category of immunostimulatory molecules. *Microbes Infect.* **3**, 645-654.

Feurle, J.; Espinosa, E.; Eckstein, S.; Pont, F.; Kunzmann, V.; Fournie, J.-J.; Herderich, M.; Wilhelm, M. (2002) *Escherichia coli* Produces Phosphoantigens Activating Human $\gamma\delta$ T Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 148-154.

Fox, D. T.; Poulter, C. D. (2002) Synthesis of (*E*)-4-Hydroxydimethylallyl Diphosphate. An Intermediate in the Methyl Erythritol Phosphate Branch of the Isoprenoid Pathway. *J. Org. Chem.* **67**, 5009-5010.

Fraser, C. M.; Gocayne, J. D.; White, O.; Adams, M. D.; Clayton, R. A.; Fleischmann, R. D.; Bult, C. J.; Kerlavage, A. R.; Sutton, G. G.; Kelley, J. M.; Fritchman, J. L.; Weidman, J. F.; Small, K. V.; Sandusky, M.; Fuhrmann, J. L.; Nguyen, D. T.; Utterback, T.; Saudek, D. M.; Phillips, C. A.; Merrick, J. M.; Tomb, J.; Dougherty, B. A.; Bott, K. F.; Hu, P. C.; Lucier, T. S.; Peterson, S. N.; Smith, H. O.; Venter, J. C. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403.

Gao, W.; Loeser, R.; Raschke, M.; Dessoy, M. A.; Fulhorst, M.; Alpermann, H.; Wessjohann, L. A.; Zenk, M. H. (2002) (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: an intermediate in the formation of terpenoids in plant chromoplasts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2604-2607.

Garcia, V. E.; Sieling, P. A.; Gong, J.; Barnes, P. F.; Uyemura, K.; Tanaka, Y.; Bloom, B. R.; Morita, C. T.; Modlin, R. L. (1997) Single-cell cytokine analysis of $\gamma\delta$ T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J. Immunol.* **159**, 1328-1335.

Gardner, M. J.; Hall, N.; Fung, E.; White, O.; Berriman, M.; Hyman, R. W.; Carlton, J. M.; Pain, A.; Nelson, K. E.; Bowman, S.; Paulsen, I. T.; James, K.; Eisen, J. A.; Rutherford, K.; Salzberg, S. L.; Craig, A.; Kyes, S.; Chan, M. S.; Nene, V.; Shallom, S. J.; Suh, B.; Peterson, J.; Angiuoli, S.; Pertea, M.; Allen, J.; Selengut, J.; Haft, D.; Mather, M. W.; Vaidya, A. B.; Martin, D. M.; Fairlamb, A. H.; Fraunholz, M. J.; Roos, D. S.; Ralph, S. A.; McFadden, G. I.; Cummings, L. M.; Subramanian, G. M.; Mungall, C.; Venter, J. C.; Carucci, D. J.; Hoffman, S. L.; Newbold, C.; Davis, R. W.; Fraser, C. M.; Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498-511.

Giner, J.-L. (2002) A convenient synthesis of (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl pyrophosphate and its [4-¹³C]-labeled form. *Tetrahedron Lett.* **43**, 5457-5459.

Ginger, M. L.; Chance, M. L.; Goad, L. J. (1999) Elucidation of carbon sources used for the biosynthesis of fatty acids and sterols in the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *Biochem. J.* **342**, 397-405.

Glass, J. I.; Lefkowitz, E. J.; Glass, J. S.; Heiner, C. R.; Chen, E. Y.; Cassell, G. H. (2000) The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* **407**, 757-762.

Gober, H. J.; Kistowska, M.; Angman, L.; Jenö, P.; Mori, L.; De Libero, G. (2003) Human T Cell Receptor $\gamma\delta$ Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *J. Exp. Med.* **197**, 163-168.

Hagiwara, H.; Uda, H. (1984) New Route for Synthesis of Furan Derivatives from Protected α -Ketols and Ketones. A Total Synthesis of Furoventalene. *J. Chem. Soc. Trans. 1*, 91-94.

Hahn, F. M.; Hurlburt, A. P.; Poulter, C. D. (1999) *Escherichia coli* Open Reading frame 696 is *idi*, a Nonessential Gene Encoding Isopentenyl Diphosphate Isomerase. *J. Bacteriol.* **181**, 4499-4504.

Hayday, A. C. (2000) $\gamma\delta$ CELLS: A right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 975-1026.

Hecht, S.; Amslinger, S.; Jauch, J.; Kis, K.; Trentinaglia, V.; Adam, P.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Rohdich, F. (2002) Studies on the non-mevalonate isoprenoid biosynthetic pathway. Simple methods for preparation of isotope-labeled (*E*)-1-hydroxy-2-methylbut-2-enyl 4-diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **43**, 8929-8933.

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

Herz, S.; Wungsintaweekul, J.; Schuhr, C. A.; Hecht, S.; Lüttgen, H.; Sagner, S.; Fellermeier, M.; Eisenreich, W.; Zenk, M. H.; Bacher, A.; Rohdich, F. (2000) Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2486-2490.

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

Hwang, C. K.; Li, W. S.; Nicolaou, K. C. (1984) Reactions of Hydroxyl Groups with Tosylchloride-Dimethylaminopyridine System. Direct Synthesis of Chlorides from Hydroxycompounds. *Tetrahedron Lett.* **25**, 2295-2296.

Jomaa, H.; Feurle, J.; Lühs, K.; Kunzmann, V.; Tony, H.-P.; Herderich, M.; Wilhelm, M. (1999a) $V\gamma 9/V\delta 2$ T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **25**, 371-378.

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

Kabelitz, D. (1992) Function and specificity of human γ/δ -positive T cells. *Crit. Rev. Immunol.* **11**, 281-303.

Kollas, A. K.; Duin, E. C.; Eberl, M.; Altincicek, B.; Hintz, M.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Henne, A.; Steinbrecher, I.; Ostrovsky, D. N.; Hedderich, R.; Beck, E.; Jomaa, H.; Wiesner, J. (2002) Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **532**, 432-436.

Kunzmann, V.; Bauer, E.; Wilhelm, M. (1999) γ/δ T-cell stimulation by pamidronate. *N. Engl. J. Med.* **340**, 737-738.

Kuzuyama, T.; Takagi, M.; Kaneda, K.; Dairi, T.; Seto, H. (2000a) Formation of 4-(cytidine 5'-phospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **41**, 703-706.

Kuzuyama, T.; Takagi, M.; Kaneda, K.; Watanabe, H.; Dairi, T.; Seto, H. (2000b) Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol to its 2-phospho derivative by 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase. *Tetrahedron Lett.* **41**, 2925-2928.

Lindahl, K. F.; Dabhi, V. M.; Hovik, R.; Smith, G. P.; Wang, C. R. (1995) Presentation of N-formylated peptides by H2-M3. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 669-674.

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

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

- Lynen, F.** (1961) Biosynthesis of saturated fatty acids. *Fed. Proc.* **20**, 941-951.
- Mak, T. W.; Ferrick, D. A.** (1998) The $\gamma\delta$ T-cell bridge: Linking innate and acquired immunity. *Nat. Med.* **4**, 764-765.
- McAteer, S.; Coulson, A.; McLennan, N.; Masters, M.** (2001) The *lytB* gene of *Escherichia coli* is essential and specifies a product needed for isoprenoid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**, 7403-7407.
- McCaskill, D.; Croteau, R.** (1999) Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Tetrahedron Lett.* **40**, 653-656.
- Medzhitov, R.; Janeway, C. A.** (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298.
- Missinou, M. A.; Borrmann, S.; Schindler, A.; Issifou, S.; Adegnika, A. A.; Matsiegui, P.-B.; Binder, R.; Lell, B.; Wiesner, J.; Baranek, T.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G.** (2002) Fosmidomycin for malaria. *Lancet* **360**, 1941-1942.
- Miyaoka, H.; Isaji, Y.; Kajiwara, Y.; Kunimune, I.; Yamada, Y.** (1998) Total synthesis of dolabellane diterpenoid claenone. *Tetrahedron Lett.* **39**, 6503-6506.
- Morita, C. T.; Beckman, E. M.; Bukowski, J. F.; Tanaka, Y.; Band, H.; Bloom, B. R.; Golan, D. E.; Brenner, M. B.** (1995) Direct Presentation of Nonpeptide Prenyl Pyrophosphate Antigens to Human $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity* **3**, 495-507.
- Parker, C. M.; Groh, V.; Band, H.; Porcelli, S. A.; Morita, C.; Fabbi, M.** (1990) Evidence for Extratymic changes in the T cell receptor $\gamma\delta$ repertoire. *J. Exp. Med.* **171**, 1597-1612.
- Pfeffer, K.; Schoel, B.; Gulle, H.; Kaufmann, S. H. E.; Wagner, H.** (1990) Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of $\gamma\delta$ T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1175-1179.

Pfeffer, K.; Schoel, B.; Plesnila, N.; Lipford, G. B.; Kromer, S.; Deusch, K.; Wagner, H. (1992) A LECTIN-BINDING, PROTEASE-RESISTANT MYCOBACTERIAL LIGAND SPECIFICALLY ACTIVATES V γ 9⁺ HUMAN γ δ T CELLS. *J. Immunol.* **148**, 575-583.

Popják, G. (1959) BIOSYNTHESIS OF SQUALENE AND OF CHOLESTEROL FROM MEVALONIC ACID. In *Ciba Foundation Symposium, "Biosynthesis of Terpenes and Sterols"*, Wolstenholme, G. E. W.; O'Conner, M., Eds.; Churchill: London; S. 148-172.

Qureshi, N.; Porter, J. W. (1981) Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentyl pyrophosphate. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds*; Porter, J. W.; Spurgeon, S. L., Eds.; Vol. 1; John Wiley: New York; S. 47-94.

Rohdich F.; Hecht S.; Gärtner K.; Adam P.; Krieger C.; Amslinger S.; Arigoni D.; Bacher A.; Eisenreich W. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1158-1163.

Rohdich, F.; Hecht, S.; Bacher, A.; Eisenreich, W. (2003a) Deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of *ispDEFGH* genes and their cognate enzymes. *Pure Appl. Chem.* **75**, 393-405.

Rohdich, F.; Kis, K.; Bacher, A.; Eisenreich, W. (2001) The non-mevalonate pathway to isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 535-540.

Rohdich, F.; Wungsintaweekul, J.; Fellermeier, M.; Sagner, S.; Herz, S.; Kis, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H. (1999) Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11758-11763.

Rohdich, F.; Zepeck, F.; Adam, P.; Hecht, S.; Kaiser, J.; Laupitz, R.; Gräwert, T.; Amslinger, S.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D. (2003b) The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1586-1591.

Rohmer, M. (1999) A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate In *Comprehensive natural product chemistry*; Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Cane, D., Eds.; Pergamon: Oxford; Vol. 2, S. 45-68.

Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524.

Sacchettini, J. C.; Poulter, C. D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science*, **277**, 1788-1789.

Schwarz, M. K. (1994) Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. Dissertation Nr. 10951, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz.

Seemann, M.; Bui, B. T.; Wolff, M.; Tritsch, D.; Campos, N.; Boronat, A.; Marquet, A.; Rohmer, M. (2002) Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: the (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4337-4339.

Sireci, G.; Champagne, E.; Fournie, J.-J.; Dieli, F.; Salerno, A. (1997) Patterns of phosphoantigen stimulation of human V γ 9/V δ 2 T cell clones include Th0 cytokines. *Hum. Immunol.* **58**, 70-82.

Sireci, G.; Espinosa, E.; Di Sano, C.; Dieli, F.; Fournie, J.-J.; Salerno, A. (2001) Differential activation of human $\gamma\delta$ cells by nonpeptide phosphoantigens. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1628-1635.

Smith, K. A. (1988) Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science* **240**, 1169-1176.

Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Wiegert, T.; Grolle, S.; deGraaf, A. A.; Taylor, S. V.; Begley, T. P.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (1997) Identification of a thiamindependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12857-12862.

Takagi, M.; Kuzuyama, T.; Kaneda, K.; Watanabe, H.; Dairi, T.; Seto, H. (2000) Studies on the nonmevalonate pathway: formation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidine 5'diphospho)-2-methyl-D-erythritol. *Tetrahedron Lett.* **41**, 3395-3398.

Takahashi, S.; Kuzujama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9879-9884.

Tanaka Y.; Morita, C. T.; Tanaka Y.; Nieves, E.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R. (1995) Natural and synthetic non-peptide antigens by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* **375**, 155-158.

Tanaka Y.; Sano, S.; Nieves, E.; De Libero, G.; Rosa, D.; Modlin, R. L.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R.; Morita, C. T. (1994) Nonpeptide ligands for human $\gamma\delta$ T cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 8175-8179.

Tavormina, P. A.; Gibbs, M. H.; Huff, J. W. (1956) The Utilization of β -Hydroxyl- β -methyl- δ -valerolactone in Cholesterol Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4498-4499.

Tsukaguchi, K.; de Lange, B.; Boom, W. H. (1999) Differential regulation of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 production by CD4⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺ T cells and V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T cells in response to monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*-H37Ra *Cell. Immunol.* **194**, 12-20.

Ward, J. L.; Beale, M. H. (2002) Synthesis of (2*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate, a key intermediate in the biosynthesis of isoprenoids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 710-712.

Watanabe, H.; Hatakeyama, S.; Tazumi, K.; Takano, S.; Masuda, S.; Okano, T.; Kobayashi, T.; Kubodera, N. (1996) Synthetic Studies of Vitamin D Analogs. XXII. Synthesis and Antiproliferation Activity of Putative Metabolites of 1 α ,25-Dihydroxy-22-oxavitamin D₃. *Chem. Pharm. Bull.* **44**, 2280-2286.

Wesch, D.; Marx, S.; Kabelitz, D. (1997) Comparative analysis of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell activation by *Mycobacterium tuberculosis* and isopentenyl pyrophosphate. *Eur. J. Immunol.* **27**, 952-956.

Wilding, E. I.; Brown, J. R.; Bryant, A. P.; Chalker, A. F.; Holmes, D. J.; Ingraham, K. A.; Iordanescu, S.; So, C. Y.; Rosenberg, M.; Gwynn, M. N. (2000) Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J. Bacteriol.* **182**, 4319-4327.

Wolff, M.; Seemann, M.; Grosdemange-Billiard, C.; Tritsch, D.; Campos, N.; Rodriguez-Concepcion, M.; Boronat, A.; Rohmer, M. (2002) Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclo-diphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* **43**, 2555-2559.

Wright, L. D.; Cresson, E. L.; Skeggs, H. R.; MacRae, G. D. E.; Hoffman, C. H.; Wolf, D. E.; Folkers, K. (1956) Isolation of a New Acetate-replacing Factor. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5273-5275.