

an Imidazolen (Tabelle 1). Der zu 100 % fehlende Anteil entspricht jeweils dem Anteil an Azirindimeren 9.

Im Vergleich zu klassischen Methoden der Direktsynthese N-substituierter Imidazole<sup>[8]</sup> sind die Ausbeuten relativ

Tabelle 1. Übersicht der hergestellten Imidazole.

Verb.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Ausbeute
8a	Phenyl	Phenyl	Phenyl	n-Propyl	87 % [a]
8b	Phenyl	H	Phenyl	n-Propyl	12 % [b]
8c	n-Butyl	H	Phenyl	n-Propyl	3 % [c]
8d	Phenyl	Phenyl	n-Propyl	n-Propyl	25 % [d]
8e	Phenyl	H	n-Propyl	n-Propyl	35 % [e]
8f	n-Butyl	H	n-Propyl	n-Propyl	40 % [f]

[a] 9a: 12%; [b] 9b: 85%; [c] 9c: 95%; [d] 9a: 74%; [e] 9b: 60%; [f] 9c: 57%.

hoch. Durch die darüber hinaus einfache Zugänglichkeit der Edukte ergeben sich neue, vielseitige Synthesemöglichkeiten.

### Arbeitsvorschrift

Die Azirine 1 werden nach [9], die Imine 7 nach [10] hergestellt. Für die Synthese von DCN siehe [11].

In ein Bestrahlungsrohr aus Pyrex-Glas wird eine Lösung von 0.3 mmol Azirin und 1.0 mmol Imin in 10 mL Acetonitril gegeben. 0.1 mmol Naphthalindicarbonitril (18 mg) werden hinzugefügt, das Rohr mit Argon entlüftet und verschlossen. In einem Rayonet-Photoreaktor wird mit 350 nm-Strahlungsröhren 6–10 Stunden bestrahlt. Das Lösungsmittel wird entfernt, der Rückstand mit Diethylether an Aluminiumoxid (Merck Neutral Akt. 1) chromatographiert. Alle neuen Verbindungen lieferten korrekte <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR- und massenspektrometrische und elementaranalytische Daten, die mit den vorgeschlagenen Strukturen und den Daten vergleichbarer Substanzen in Einklang stehen [12].

Eingegangen am 15. März 1991 [Z 4501]

- [1] J. Mattay, *Synthesis* 1989, 233; H. Tomioka, D. Kobayashi, A. Hashimoto, S. Murata, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 4685; P. Clawson, P. M. Lunn, D. A. Whiting, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1990, 153; *ibid.* 1990, 159; E. Palomino, A. P. Schaap, M. J. Heeg, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 6861; K. Gollnick, M. Weber, *ibid.* 31 (1990) 4585; N. Ichimose, K. Mizuno, T. Tamai, Y. Otsuji, *J. Org. Chem.* 55 (1990) 4079; M. Kamata, H. Furukawa, T. Miyashi, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 681.
- [2] R. Huisgen in A. Padwa (Hrsg.): *1,3-Dipolar Chemistry, Vol. 1*, Wiley, New York 1984, S. 1; A. Padwa in W. Horspool (Hrsg.): *Synthetic Organic Photochemistry*, Plenum, New York 1984, S. 313; H. Heimgartner, *Angew. Chem.* 103 (1991) 271; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) 238.
- [3] Als ersten Schritt nehmen wir die Oxidation des Azirins zum Azirin-Radikalkation an, da die nach der Weller-Gleichung (D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* 8 (1970) 259) abgeschätzte Energie für den Elektronentransfer negativ ist, der Prozeß also thermodynamisch erlaubt ist.
- [4] A. Padwa, J. Smolanoff, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 548; A. Padwa, M. Dharan, J. Smolanoff, S. I. Wetmore, Jr., *ibid.* 95 (1973) 1945; *ibid.* 95 (1973) 1954; A. Padwa, J. Smolanoff, A. Tremper, *ibid.* 97 (1975) 4682.
- [5] Abfangreaktion durch Zugabe von 1 mL 2,2,2-Trifluorethanol zur üblichen Reaktionsmischung (siehe Arbeitsvorschrift). 5 und 6 wurden mit 8 bzw. 7 % Anteil isoliert. Bei Direkteinstrahlung wird nur 5 gebildet. Bei Zugabe von nucleophileren Alkoholen läßt sich keine zu 6 analoge Verbindung isolieren.
- [6] H. Giezendanner, M. Märky, B. Jackson, H.-J. Hansen, H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 745; H. Giezendanner, H. Heimgartner, B. Jackson, T. Winkler, H. Schmid, *ibid.* 56 (1973) 2611; U. Gerber, H. Heimgartner, H. Schmid, H.-J. Hansen, *Heterocycles* 6 (1977) 143.
- [7] R. Huisgen, H. Gotthardt, B. O. Bayer, *Chem. Ber.* 103 (1970) 2370; K. Bünge, R. Huisgen, R. Raab, H. J. Sturm, *ibid.* 105 (1972) 1307.
- [8] V. Stoeck, W. Schunack, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* 307 (1974) 922; *ibid.* 309 (1976) 421.
- [9] G. Smolinsky, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 3557; F. W. Fowler, A. Hassner, L. A. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 2077.
- [10] L. F. Tietze, T. Eicher: *Reaktionen und Synthesen*, Thieme, Stuttgart 1981, S. 69.
- [11] A. Albini, D. R. Arnold, *Can. J. Chem.* 56 (1978) 2985.
- [12] H. J. Sattler, V. Stoeck, W. Schunack, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* 308 (1975) 795; *ibid.* 311 (1978) 736.

## Herbizidresistenz in transgenen Pflanzen durch Abbau des Phytotoxins zu Harnstoff\*\*

Von Ursula H. Maier-Greiner, Christian B. A. Klaus, Lydia M. Estermaier und Guido R. Hartmann\*

Herbizidresistenz in transgenen Pflanzen wurde bisher auf drei Wegen erreicht<sup>[1]</sup>: 1. Überproduktion des betroffenen Proteins; 2. Expression eines Mutantenproteins, das gegen die herbizide Wirkung resistent ist; 3. Expression eines Enzyms, welches das Herbizid durch Modifikation inaktiviert. In jedem Fall verbleiben Reste des Phytotoxins oder seiner Modifikationen in einer Pflanze mit möglichen Rückwirkungen auf ihre Nutzbarkeit als Nahrungsmittel. Wir beschreiben hier eine neue Methode, die Resistenz durch Umwandlung des Herbizids in eine unschädliche, physiologische Verbindung zu bewirken. Das Herbizid ist Cyanamid, das zu Harnstoff in transgenen Tabakpflanzen umgewandelt wird.

Im Bodenpilz *Myrothecium verrucaria* wurde ein induzierbares Enzym entdeckt, welches das Herbizid Cyanamid (Handelsbezeichnung Alzodef\*) quantitativ in Harnstoff umwandelt<sup>[2,3]</sup>. Diese Cyanamid-Hydratase (EC 4.2.1.69) wird vom 732 Basenpaare langen *cah*-Gen codiert, das sich auf einem 900 Basenpaare langen *EcoRI*-Fragment befindet, das aus einer cDNA-Bank von *Myrothecium verrucaria* isoliert wurde<sup>[3]</sup>.

Zur Erpression in Pflanzen wurde eine Genkassette konstruiert, in der dieses *EcoRI*-Fragment zwischen den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus und das PolyA-Signal des Nopalin-Synthetasegens gesetzt wurde. Hierfür kann man den Plasmidvektor pRT101<sup>[4]</sup> verwenden. Zwei Genkonstrukte wurden erhalten. Eines enthielt das Gen in der korrekten Orientierung bezüglich des Promotors (bezeichnet als *cah*<sup>+</sup>), das andere mit dem Gen in der entgegengesetzten Orientierung (*cah*<sup>-</sup>). Die Übertragung in die Pflanzen wurde unter Verwendung der üblichen binären Vektorsysteme erreicht, z. B. mit dem Plasmid pBin19<sup>[5]</sup>, welches die *cah*<sup>+</sup>- oder *cah*<sup>-</sup>-Genkassette enthält, und mit *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA 4404<sup>[6]</sup> (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). Triparentale Kreuzung, Transformation und Regeneration der Pflanzen wurden wie beschrieben<sup>[7,8]</sup> durchgeführt. Die sich entwickelnden Sprosse wurden auf 100 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin selektioniert.

Fünfzehn Kanamycin-resistente Pflanzen wurden auf Cyanamid-Hydratase-Aktivität getestet. In allen Pflanzen wurde Enzymaktivität gefunden, wobei der Spiegel der Expression von 0.03 bis 0.79 Enzymeinheiten pro mg Protein im Zell-extrakt reichte. Der höchste Wert entspricht etwa einem Fünftel der spezifischen Aktivität, die in Extrakten aus induziertem *Myrothecium verrucaria* gefunden wird. Obgleich die spezifische Aktivität in den Wurzeln am höchsten war, war die Gesamtaktivität des Enzyms pro Gramm Frischgewicht in den Blättern deutlich höher als in den anderen Teilen der Pflanzen (Tabelle 1). Keine Aktivität wurde in Pflanzen gefunden, die für *cah*<sup>-</sup> transgen waren.

Die Wurzelbildung von Wildtyp oder *cah*<sup>-</sup>-transgenen Tabakspalten wird durch 1.2 mM Cyanamid im Medium vollkommen verhindert. Im Gegensatz hierzu wurde Wurzelbildung bei *cah*<sup>+</sup>-transgenen axillaren Sprossen selbst in Gegenwart von 12 mM Cyanamid im Wachstumsmedium beobachtet. Die Toleranz für Cyanamid, bezogen auf die Wurzel-

[\*] Prof. Dr. G. R. Hartmann, Dr. U. H. Maier-Greiner, Dipl.-Chem. C. B. A. Klaus, Dipl.-Chem. L. M. Estermaier, Institut für Biochemie der Universität, Karlstraße 23, W-8000 München 2

[\*\*] Wir danken Dr. Reinhard Töpfer, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, für den Plasmidvektor pRT101. Diese Arbeit wurde von der SKW Trostberg und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Table 1. Aktivität der Cyanamid-Hydratase in Extrakten von verschiedenen Organen von *cah*<sup>+</sup>-transgenen Tabakpflanzen. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert und dann mit 5 mM Phosphatpuffer pH 8.0 (1 mL g<sup>-1</sup> Frischgewicht) extrahiert (spezifische enzymatische Aktivität im Extrakt der gesamten Pflanze 0.276 Enzymeinheiten pro mg Protein). Keine über der Kontrolle liegende Aktivität wurde in *cah*<sup>-</sup>-transgenen Pflanzen gemessen.

Pflanzenorgane	Gesamtaktivität [Enzymeinheiten pro g Frischgewicht]	Spezifische Aktivität [Enzymeinheiten pro mg Protein]
<i>cah</i> <sup>+</sup> -Wurzeln	0.073	0.660
<i>cah</i> <sup>+</sup> -Stengel	0.437	0.469
<i>cah</i> <sup>+</sup> -Blätter	0.643	0.202

bildung, ist also mindestens um den Faktor 10 erhöht. Bewurzelte *cah*<sup>+</sup>-transgene Pflanzen wachsen selbst in Gegenwart von 2.4 mM Cyanamid gut, also auf einer Konzentration, welche nicht transformierte oder *cah*<sup>-</sup>-transgene Pflanzen innerhalb von sechs Wochen zum Absterben bringt. Pflanzen, die nicht transformiert sind, oder nur für den Plasmidvektor pBin 19 transgen sind, werden innerhalb von 15 Tagen nach dem einmaligen Besprühen mit einer 0.5 proz. Cyanamidlösung völlig gebleicht. Im Gegensatz hierzu tolerieren *cah*<sup>+</sup>-transgene Pflanzen deutlich höhere Konzentrationen, welche mit dem Spiegel der *cah*<sup>+</sup>-Genexpression korrelieren. Beispielsweise zeigte eine Pflanze mit einer spezifischen Enzymaktivität von 0.58 Enzymeinheiten pro mg Protein im Zellextrakt keine Nekrose nach dem einmaligen Besprühen mit einer 5proz. Cyanamidlösung. Dies ist die Herbizidkonzentration, die für die Anwendung in der Landwirtschaft empfohlen wird (Abb. 1). Ein zusätzlicher Hin-



Abb. 1. Cyanamid-Toleranz in transgenem Tabak. *Nicotiana-tabacum*-SR 1-Pflanzen, transgen für *cah*<sup>+</sup> oder pBin 19 mit sechs bis acht Blättern wurden einmal mit 5 proz. Cyanamidlösung besprüht. Die Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Kulturkammer gehalten (16 h Photoperiode, 25/18 °C). Die Photographien wurden nach 15 Tagen aufgenommen. Links: Pflanze transgen für pBin 19; rechts: Pflanze transgen für *cah*<sup>+</sup>.

weis darauf, daß die exprimierte Cyanamid-Hydratase-Aktivität die Ursache der beobachteten Toleranz ist, ist die Bildung von Harnstoff in der Pflanze. Extrakte von Blättern von *cah*<sup>+</sup>-transgenen Pflanzen, die für mehrere Wochen in Gegenwart von 2.4 mM Cyanamid gewachsen waren, enthalten 10–32 µmol Harnstoff pro Gramm Blätter (Frischgewicht). Dieser fehlt in Kontrollen, die in Abwesenheit von Cyanamid gewachsen waren.

Diese Resultate zeigen klar, daß die Expression der Cyanamid-Hydratase Toleranz gegenüber Cyanamid in transgenem Tabak bewirkt, wobei dieses zu Harnstoff abgebaut wird. In Gegenwart des Harnstoff-abbauenden Enzyms

Urease, das in vielen Pflanzen gefunden wird<sup>[9–12]</sup>, kann das entstehende Hydrolyseprodukt NH<sub>4</sub><sup>+</sup> als Stickstoffquelle für die Pflanze dienen.

Eingegangen am 5. Juli 1991 [Z 4778]

CAS-Registry-Nummern:

Cyanamid-Hydratase, 50812-20-9; Cyanamid, 156-62-7; Harnstoff, 57-13-6.

- [1] J. Botterman, J. Leemans, *Trends Genet.* 4 (1988) 219–222.
- [2] H. Stransky, A. Amberger, *Z. Pflanzenphysiol.* 70 (1973) 74–87.
- [3] U. H. Maier-Greiner, B. M. M. Obermaier-Skrobranek, L. M. Estermaier, W. Kammerloher, C. Freund, C. Wülfing, U. I. Burkert, D. H. Matern, M. Breuer, M. Eulitz, Ö. I. Küfrevioglu, G. R. Hartmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 4260–4264.
- [4] R. Töpfer, V. Matzeit, B. Gronenborn, J. Schell, H.-H. Steinbiss, *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 5890.
- [5] M. Bevan, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 8711–8721.
- [6] A. Hoekema, P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, R. A. Schilperoort, *Nature* 303 (1983) 179–180.
- [7] R. B. Horsch, J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers, R. T. Fraley, *Science* 227 (1985) 1229–1231.
- [8] J. Draper, R. Scott, (Hrsg.): *Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual*, Blackwell, Oxford 1988.
- [9] M. Damodaran, P. M. Sivaramakrishnan, *Biochem. J.* 31 (1932) 1041–1052.
- [10] T. A. Skokut, P. Filner, *Plant Physiol.* 65 (1980) 995–1003.
- [11] H. M. Davis, L. M. Shih, *Phytochemistry* 23(1984) 2741–2745.
- [12] Y. Chen, T. M. Ching, *Plant Physiol.* 86 (1988) 941–945.

## Zum Rätsel des Chlorophyllabbaus: Die Konstitution eines secoporphinoiden Kataboliten\*\*

Von Bernhard Kräutler\*, Bernhard Jaun, Karlheinz Bortlik, Maja Schellenberg und Philippe Matile

Professor Vladimir Prelog zum 85. Geburtstag gewidmet

Der Abbau des grünen Pflanzenpigments Chlorophyll, der dem eindrucklichen Naturphänomen des herbstlichen Verfärbens von Bäumen und Sträuchern zugrundeliegt, ist noch ungeklärt<sup>[1, 2]</sup>. Diese Wissenslücke<sup>[3]</sup> ist darauf zurückzuführen, daß der Chlorophyllabbau „scheinbar ohne Hinterlassung von Spuren verläuft“<sup>[1a]</sup>, obwohl jährlich auf der Erde über 10<sup>9</sup> t Chlorophyll katabolisiert werden dürften<sup>[3]</sup>. Erst in jüngster Zeit eröffnete die Entdeckung von nahezu farblosen pflanzlichen Metaboliten, deren wichtigste anhand von Isotopenmarkierungen als Tetrapyrrolabkömmlinge erkannt wurden<sup>[1, 4–6]</sup>, die Aussicht, bald erste Erkenntnisse über den Chlorophyllkatabolismus gewinnen zu können. Aufgrund der Abfolge des Auftretens dieser Metabolite in den Chloroplasten und Vakuolen der vergilbenden Gerstenprimärblätter schlug man vor, daß die als „fluorescent compounds“ (FCs) bezeichneten Metabolite Vorläufer der „rusty pigments“ (RPs) sein dürften<sup>[4]</sup>. Letztere verdanken ihren Namen (und ihre Entdeckung) der Beobachtung, daß aus ihnen bei der Isolierung an Luft und unter Säureeinwirkung gut sichtbare, rostfarbene Sekundärprodukte gebildet werden<sup>[1, 4, 5]</sup>. Wir berichten hier über die (durch „botanisch-chemische“ Zusammenarbeit zustandegekommene) Konstitutionsaufklärung von „RP-14“<sup>[5]</sup>, dem Hauptvertreter der RPs aus seneszenten Gerstenprimärblättern. Der Kon-

[\*] Priv.-Doz. Dr. B. Kräutler, Dr. B. Jaun  
Laboratorium für Organische Chemie der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule  
Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)  
Prof. Dr. P. Matile, Dr. K. Bortlik, M. Schellenberg  
Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Zürich

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds und der ETH-Zürich gefördert. Wir danken Herrn Prof. A. Eschenmoser für anregende Gespräche und den Herren Dr. W. Amrein und R. Häflicher für die Aufnahme der Massenspektren.