

**Untersuchungen zum Alternativen Terpenbiosyntheseweg
in *Escherichia coli* und *Nicotiana benthamiana***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Maria Henriette Alpermann
geb. am 19.04.1974 in Templin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. *h.c.* M.H. Zenk
2. Prof. Dr. B. Dräger
3. Prof. Dr. P. Welzel

Halle (Saale), 27.01.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010447

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010447>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorkommen, Bedeutung und Anwendung der Terpene	2
1.2	Die Biosynthese der Terpene	5
1.2.1	Der klassische Acetat-Mevalonat-Weg	6
1.2.2	Der Alternative Terpenbiosyntheseweg	7
1.2.2.1	Das erste Intermediat – 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat	8
1.2.2.2	Das zweite Intermediat – 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat	9
1.2.2.3	Die nächsten drei Reaktionsschritte	10
1.2.2.4	Die zwei letzten Reaktionen auf dem Weg zu IDP und DMADP	11
1.2.3	Die IDP-Isomerase in der Terpenbiosynthese	13
1.3	Der Stoffaustausch zwischen den Terpenbiosynthesewegen	14
1.4	Die Verbreitung der Terpenbiosynthesewege	16
1.5	Der Alternative Terpenbiosyntheseweg als Zielstruktur	18
1.6	Zielstellung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Bakterienstämme	21
2.1.2	Plasmide	21
2.1.3	Oligonukleotide	22
2.1.4	Pflanzliches Material	22
2.1.5	Chemikalien und Enzyme	23
2.1.6	Geräte	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Bakterien	25
2.2.2	Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion	25
2.2.3	Trennung von DNA über Agarosegele	26
2.2.4	Klonierung	26
2.2.4.1	Klonierung mit dem TOPO [®] -Vektor-System	26
2.2.4.2	Klonierung in den pHIS 8-3-Vektor	27
2.2.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	27
2.2.6	Sequenzierung von DNA	27
2.3	Methoden der Proteinchemie	28
2.3.1	Überexpression in <i>E. coli</i>	28
2.3.2	Reinigung über Affinitätschromatographie	29
2.3.3	Trennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	31

2.4 Bestimmung der Enzymaktivität	31
2.4.1 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase – DXS.....	31
2.4.2 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat-Reduktoisomerase – DXR.....	32
2.4.3 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase – IspD.....	32
2.4.4 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase – IspE.....	32
2.4.5 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase – IspF.....	32
2.4.6 Xylulokinase – XylB	33
2.4.7 GcpE und LytB.....	33
2.4.8 IDP-Isomerase	33
2.5 Synthese von Intermediaten	34
2.5.1 Gewinnung von Pyruvat.....	34
2.5.2 Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat	34
2.5.3 Synthese von Isopentenylidiphosphat	35
2.6 Untersuchungen an <i>Nicotiana benthamiana</i>	36
2.6.1 Infiltration von <i>N. benthamiana</i>	36
2.6.2 Mikroskopische Untersuchungen	37
2.6.3 Carotinoid- und Chlorophyllbestimmung	37
2.6.4 Applikation markierter Vorstufen an <i>N. benthamiana</i>	37
2.6.5 Präparation von Chloroplasten von <i>N. benthamiana</i>	38
2.7 Chromatographische Methoden	38
2.7.1 Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie	38
2.7.1.1 Papierchromatographie.....	38
2.7.1.2 Dünnschichtchromatographie.....	38
2.7.1.3 Laufmittelsysteme und Detektion	39
2.7.2 HPLC.....	40
2.7.3 Chromatographische Methoden zur Proteintrennung	41
2.7.3.1 Ionenaustauschchromatographie	41
2.7.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	42
2.7.3.3 Chromatofokussierung	42
2.8 Weitere Analysemethoden	43
2.8.1 Kernresonanz-Spektroskopie	43
2.8.2 Erfassung der radioaktiven Markierung.....	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Klonierung und Expression von Enzymen des Alternativen Terpenbiosyntheseweges	44
3.1.1 Klonierung der Enzyme des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	44
3.1.2 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase – DXS.....	45
3.1.3 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase – DXR	47
3.1.4 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase – IspD.....	49
3.1.5 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase – IspE.....	50
3.1.6 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase – IspF.....	51

3.1.7 D-Xylulokinase – XylB.....	52
3.1.8 GcpE und LytB.....	54
3.2 Synthese von Intermediaten des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	56
3.2.1 Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat.....	56
3.2.2 Gewinnung von isotoopenmarkiertem Pyruvat mit dem <i>E. coli</i> -Stamm YYC202 ...	57
3.2.2.1 Gewinnung von [U- ¹⁴ C ₃]Pyruvat.....	57
3.2.2.2 Gewinnung von [U- ¹³ C ₃]Pyruvat.....	59
3.2.3 Synthese von isotoopenmarkiertem DXP.....	60
3.2.3.1 Synthese von [1,2- ¹⁴ C ₂]DXP und [1,2- ¹³ C ₂]DXP.....	60
3.2.3.2 Synthese von [3,4,5- ¹⁴ C ₃]DXP.....	62
3.2.4 Gewinnung von [1,2- ¹⁴ C ₂]MEP.....	63
3.2.5 Gewinnung von [1,2- ¹⁴ C ₂]cMEDP.....	64
3.2.6 Synthese von Isopentenylidiphosphat.....	65
3.3 Enzymatische Charakterisierung der IDP-Isomerase aus <i>E. coli</i> und einer neuen IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i>	68
3.3.1 Klonierung und heterologe Expression der IDP-Isomerasen.....	68
3.3.1.1 IDP-Isomerase aus <i>E. coli</i>	68
3.3.1.2 IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i>	69
3.3.2 Analytischer Nachweis der Enzymaktivität von IDP-Isomerasen.....	72
3.3.2.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	72
3.3.2.2 Kultivierung des Bakterienstammes und Ammoniumsulfat-Fällung.....	72
3.3.2.3 Ionenaustauschchromatographie.....	73
3.3.2.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	74
3.3.2.5 Chromatofokussierung.....	75
3.3.2.6 Natives Proteingel und anschließendes SDS-Polyacrylamid-Gel.....	76
3.3.2.7 Übersicht über die Anreicherung.....	77
3.3.2.8 Analyse der Proteinsequenz und Identifikation des Intermediats.....	78
3.3.2.9 Neuordnung der HPLC-analytischen Signale.....	79
3.3.3 Katalytische Aktivität und enzymatische Charakterisierung.....	81
3.3.3.1 IDP-Isomerase aus <i>E. coli</i>	81
3.3.3.2 IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i>	82
3.3.3.3 Umsetzungen mit IDP-Isomerasen.....	82
3.3.3.4 K _M -Werte der IDP-Isomerasen.....	84
3.3.3.5 Gleichgewichtseinstellungen.....	86
3.4 Untersuchungen zur Funktion der IDP-Isomerase an <i>Nicotiana benthamiana</i>	88
3.4.1 Makroskopische Untersuchungen.....	88
3.4.2 Mikroskopische Untersuchungen.....	90
3.4.3 Untersuchung der Pigmentzusammensetzung.....	91
3.4.4 <i>In vivo</i> Applikation von 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und Mevalonsäurelacton.....	92

3.4.5 <i>In vitro</i> Applikation von 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und Isopentenylidiphosphat.....	96
3.4.5.1 Chloroplastentrennungen am Saccharosestufengradienten.....	96
3.4.5.2 Applikation von [3,4,5- ¹⁴ C ₃]DXP und [1- ¹⁴ C]IDP an isolierte Chloroplasten	97
4 Diskussion.....	100
4.1 Klonierung und Expression von Enzymen des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	100
4.2 Synthese von Intermediaten des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	106
4.3 IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i> und aus <i>E. coli</i>	111
4.4 Funktion der IDP-Isomerase in <i>Nicotiana benthamiana</i>	119
5 Zusammenfassung.....	124
6 Literaturverzeichnis.....	127

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Cytidindiphosphat
CDP-ME	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol
CDP-MEP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphat
Ci	Curie
cMEDP	2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DMADP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid 5'-triphosphat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
DX	1-Deoxy-D-xylulose
DXP	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat
DXR	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase
DXS	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadeninukleotid (oxidierte Form)
FDP	Farnesyldiphosphat
FMN	Flavinmononukleotid (oxidierte Form)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Beschleunigung durch Schwerkraft
GAP	Glyceraldehyd 3-phosphat
GcpE	2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Reduktase
GDP	Geranyldiphosphat
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin

HMBDP	1-Hydroxy-2-methyl-2-(<i>E</i>)-butenyl 4-diphosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IDI	IDP/DMADP-Isomerase
IDP	Isopentenyl-diphosphat
IMP	Isopentenylmonophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LM	Laufmittel
LytB	1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase
ME	2C-Methyl-D-erythritol
MEP	2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Papierchromatographie, Papierchromatogramm
PCR	Polymerasekettenreaktion
R _f	relative Laufstrecke zur Front
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBAS	tetra- <i>n</i> -Butylammoniumhydrogensulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymmenge, die ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt)
VT	Volumenteile
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XylB	D-Xylulokinase

1 Einleitung

Malaria ist die häufigste tropische Infektionserkrankung. Der Name leitet sich vom italienischen *mala aria* – schlechte Luft – ab. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation liegt die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr zwischen 300 - 500 Millionen klinischen Fällen. 1,5 - 2,7 Millionen Menschen, insbesondere Kleinkinder in Afrika, sterben jährlich an den Folgen der Malaria (Stock, 2004). Die Malaria tritt endemisch in über 100 Ländern tropischer und subtropischer Regionen auf, insbesondere in Afrika südlich der Sahara sowie in Teilen Südasiens und Südamerikas. Risikoländer sind in Abbildung 1 dargestellt. Neben dem humanitären Aspekt sei auf die wirtschaftlichen Auswirkungen in den betroffenen Ländern hingewiesen – allein für Afrika wird der durch die Krankheit verursachte jährliche volkswirtschaftliche Schaden auf umgerechnet rund 9,54 Milliarden Euro geschätzt.



Abb. 1

Globale Verbreitung der Malaria 2003 (http://lexikon.freenet.de/Bild:Malaria_risk_2003_deutsch.jpeg)

Das Krankheitsbild der Malaria, welche auch als Sumpf- oder Wechselfieber bezeichnet wird, umfasst neben Kopf- und Gliederschmerzen, gastrointestinalen Beschwerden und Krämpfen typischerweise das mit Schüttelfrost auftretende hohe, wiederkehrende bis periodische Fieber. Hervorgerufen wird die Krankheit durch parasitär lebende Protozoen der Gattung *Plasmodium*. Diese tierischen Einzeller, die keine Zellwand, jedoch als Eukaryonten im Gegensatz zu Bakterien einen Zellkern besitzen, gehören zum Stamm der *Apicomplexa*. Humanpathogene Plasmodium-Arten sind *Plasmodium falciparum* (Erreger der Malaria tropica), *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* (beide sind Erreger der Malaria tertiana) und *Plasmodium malariae* (Erreger der Malaria quartana). *Plasmodium falciparum* stellt den klinisch bedeutendsten und gefährlichsten Erreger dar. Die Erreger werden in Form so genannter Sporozoiten durch den Stich weiblicher Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen. Der Entwicklungszyklus von Plasmodium-Arten ist durch einen Generationswechsel gekennzeichnet, bei dem sich eine geschlechtliche Fortpflanzung (Gamogonie) und eine ungeschlechtliche Vermehrung (Sporogonie) im Moskito mit einer ungeschlechtlichen Vervielfachung zunächst in der Leber und dann im Blut des Menschen (Schizogonie) abwechseln.

Zu den Apicomplexa (Sporozoen) gehören neben den Plasmodien die Toxoplasmen mit *Toxoplasma gondii* als Erreger der Toxoplasmose und die Gattung der *Eimeria*, die Haustiere, insbesondere Hühner befallen. Als zellbiologische Besonderheit besitzen die Apicomplexa ein den Plastiden ähnliches Organell (Köhler *et al.*, 1997). Dieser Apicoplast wurde im Verlauf der Evolution als Produkt eines sekundären endosymbiotischen Prozesses einer einzelligen Alge erworben. Die photosynthetische Aktivität des Chloroplasten ging verloren, jedoch scheint der Apicoplast für bestimmte anabole Reaktionen im Stoffwechsel dieser Einzeller, wie der Synthese von Fettsäuren und Isoprenoiden, essenziell zu sein (Roos *et al.*, 2002; Wiesner *et al.*, 2003).

Chinin und Chloroquin sind terpenoide Verbindungen, die in der klassischen Malariatherapie zum Einsatz kommen (Stock, 2004). Aufgrund der ansteigenden Resistenzsituation zahlreicher *P. falciparum*-Stämme werden zunehmend Artemisinin, der Inhaltsstoff einer alten chinesischen Arzneidroge, und dessen semisynthetische Abwandlungsprodukte als Reservemittel zur Malariatherapie eingesetzt.

Darüber hinaus sind aufgrund der globalen Verbreitung der Malaria und der Schwere der Erkrankungen neben der Prophylaxe und der derzeitigen Pharmakotherapie dringend weitere Strategien erforderlich. Die Entdeckung des Apicoplasten bietet hier eine viel versprechende Zielstruktur, denn Stoffwechselwege dieses Organells, wie beispielsweise die Terpenbiosynthese über den Deoxyxylulosephosphat-Weg, bieten Angriffsziele für neue Wirkstoffe (Abschnitt 1.5). Zunächst soll die große Stoffklasse der Terpene und deren Biosynthese vorgestellt werden.

1.1 Vorkommen, Bedeutung und Anwendung der Terpene

Terpene stellen hinsichtlich ihrer Chemie und Struktur eine äußerst vielfältige Stoffklasse dar (Sachettini und Poulter, 1997). Gegenwärtig sind über 35000 unterschiedliche Terpene identifiziert (Rohdich *et al.*, 2004), welche sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten vorkommen. Strukturell leiten sich Terpene von C_5 -Isopren-Grundeinheiten ab, weshalb man diese Gruppe von Naturstoffen auch als Isoprene oder Isoprenoide bezeichnet. Isopren ist 2-Methyl-1,3-butadien. In Abhängigkeit von der Anzahl der Grundbausteine werden sie in Hemiterpene (C_5), Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Triterpene (C_{30}), Tetraterpene (C_{40}) und Polyterpene (C_5)_n eingeteilt. Azyklische Strukturen, zyklische und aromatische Ringsysteme tragen zur großen Anzahl an Vertretern bei.

Terpene haben mit ihren unterschiedlichsten biologischen Funktionen eine immense Bedeutung für das Leben auf der Erde. Im Primärstoffwechsel von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren übernehmen Terpene lebensnotwendige Aufgaben, zum Beispiel als Carotinoide, Phytol-Seitenkette im Chlorophyll, Sterole, Dolichole, Plasto-, Mena- und Ubichinone. Die Mehrheit der pflanzlichen Terpene zählt zu den Sekundärstoffen, deren Funktionen im Stoffwechsel teils noch unbekannt sind. Einzelne Pflanzenarten synthetisieren oft charakteristische

individuelle Terpene. Dabei steht die große strukturelle Vielfalt der isoprenoiden Verbindungen im markanten Gegensatz zu ihrer Biosynthese aus nur zwei Vorstufen. Die funktionale Bedeutung einzelner Verbindungen in biologischen Systemen soll im Folgenden beschrieben werden.

Die aus Isopreneinheiten gebildete Phytol-Seitenkette im Chlorophyll sowie die Carotinoide als so genannte akzessorische Pigmente sind essenziell für die Lichtreaktion der Photosynthese in höheren Pflanzen. Ubichinone und Plastochinone, die sich in der Länge der Isoprenoid-Seitenkette unterscheiden, sind als Redoxsysteme für Elektronentransportketten in der Atmungskette bzw. der Photosynthese notwendig. Brassinolide, Giberelline und Abscisinsäure bewirken als Phytohormone maßgeblich Wachstums- und Entwicklungsvorgänge in Pflanzen. Bestimmte Monoterpene fungieren als Insektenpheromone und sind in Abwehrsekreten (Iridodial in Ameisen-Arten) zu finden. Als Bestandteil ätherischer Öle kommen mit Wasserdampf flüchtige, lipophile, niedermolekulare Terpene – überwiegend Mono- und Sesquiterpene – vor.

Die für den Menschen lebensnotwendigen fettlöslichen Vitamine A, D, E und K leiten sich von der isoprenoiden Grundstruktur ab. Das Provitamin β -Carotin beispielsweise ist ein Diterpenalkohol, aus dem durch Spaltung zwei Moleküle Vitamin A entstehen können. Dieses hat neben anderen physiologischen Funktionen eine wichtige Bedeutung beim Sehvorgang. Tocopherole oder E-Vitamine tragen eine Phytol-Seitenkette und sind an Redox-Vorgängen des Intermediärstoffwechsels beteiligt. Darüber hinaus schützen Carotinoide und Tocopherole durch ihre Radikalfängereigenschaften und antioxidative Wirkung Membranen vor oxidativer Zerstörung (Eisenreich *et al.*, 1998; Eisenreich *et al.*, 2004). Ebenso wird eine antikanzerogene Wirkung diskutiert.

Die strukturell vielfältige Gruppe der Sterole leitet sich vom C_{30} -Molekül Squalen ab. In höheren Pflanzen wird – über Zyκλοartenol als Zwischenverbindung – Stigmasterol und in Pilzen – über Lanosterol als erster zyklischer Verbindung – das Ergosterol gebildet. Diese Verbindungen sind strukturell eng verwandt mit dem für tierische Zellen charakteristischen Cholesterol, das als Plasmalipid fungiert und zur Stabilität von biologischen Membranen beiträgt. Darüber hinaus dient Cholesterol als Vorstufe zahlreicher physiologisch aktiver Verbindungen wie den Steroidhormonen, den Gallensäuren und den D-Vitaminen.

Zahlreiche weitere Terpenoide kommen im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel vor, wie Bitterstoffe (z. B. aus Gentianaceen-Arten), Saponine (z. B. Aescin aus *Aesculus hippocastanum*), Harzbestandteile sowie Kautschuk, der zu den Polyterpenen gehört.

Durch posttranslationale Modifizierungen können isoprenoide Strukturen an Proteine gekoppelt werden. Die kovalente Bindung von Farnesyl- und Geranylgeranyleinheiten führt zur Verankerung der Proteine in Zellmembranen, was die Lokalisierung und Protein-Protein-

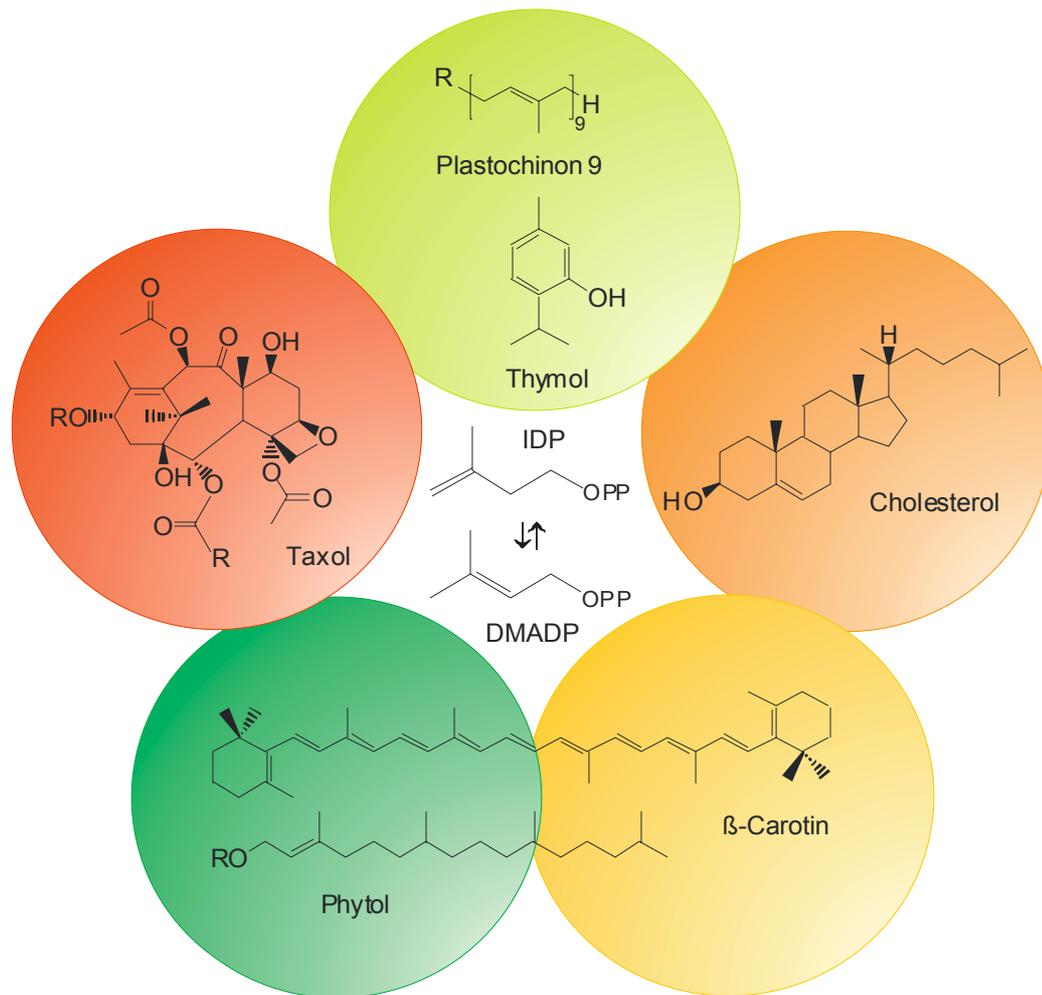
Interaktionen beeinflusst (Zhang und Casey, 1996). Zur Gruppe der Polyprenoide gehören unter anderem Dolichole, die als Überträger und Transportmoleküle von Oligosacchariden eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Glycoproteinen und Glycolipiden spielen, und Undecaprenol, das beim Aufbau der Zellmembran von Bakterien beteiligt ist.

Zahlreiche pharmazeutisch eingesetzte Verbindungen mit breiten Anwendungsmöglichkeiten in der medizinischen Therapie gehören der Gruppe der Isoprenoide an. Große Bedeutung haben die bei verschiedensten Indikationen anwendbaren Ätherisch-Öl-Drogen (z. B. Kamille, Pfefferminze, Salbei und Thymian) und die bei Herzinsuffizienz angezeigten, von Cardenoliden abgeleiteten, herzwirksamen Glycoside (Digoxin und Digitoxin). Monoterpenoide Indolalkaloide wie Vincristin, Vinblastin und Camptothecin sowie das diterpene Alkaloid Taxol aus der pazifischen Eibe zeigen Wirksamkeit bei der Behandlung verschiedenartiger Krebserkrankungen. Die in der Malariatherapie angewandten Arzneistoffe Chinin und Artemisinin wurden bereits vorgestellt. Mutterkornalkaloide wie Ergotamin und Methylergometrin leiten sich von der zu den Indolalkaloiden zählenden Lysergsäure ab und sind bei unterschiedlichen Erkrankungen von pharmakologischem Interesse. Fusidinsäure, eine tetrazyklische Triterpensäure, wird bei Staphylokokkeninfektionen als Reserveantibiotikum eingesetzt.

Die Struktur zahlreicher weiterer pharmakologisch interessanter Verbindungen leitet sich von den Terpenen ab. Ein aus *Ginkgo biloba* gewonnener Extrakt wird zur symptomatischen Behandlung von hirnganisch bedingten Leistungsstörungen eingesetzt. Die Wirksamkeit wird hierbei den zu den Terpen-Laktonen gehörenden Ginkgoliden und Bilobaliden zugeschrieben (Ahlemeyer und Krieglstein, 2003). Cannabinoide, aktive Substanzen aus *Cannabis sativa*, und Derivate können unterstützend in der Therapie von Krebspatienten eingesetzt werden, da sie analgetisch wirken und die Nebenwirkungen von Zytostatika mildern. Zusätzlich zeigten diese Verbindungen in Tiermodellen einen wachstumshemmenden Einfluss auf Tumorzellen (Guzman, 2003). Die Anwendung von Cannabinoiden bei neurologischen Erkrankungen wird derzeit in klinischen Tests untersucht (Schwenkreis und Tegenthoff, 2003).

Terpene sind nicht nur von therapeutischem Interesse, sondern finden in zahlreichen anderen Bereichen ihre Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise als Parfüme, Duft- und Aromastoffe und in Lebens- und Arzneimitteln als Farbstoffe (β -Carotin). Terpentin ist ein wichtiger Rohstoff in der chemischen Industrie. Als Kontaktinsektizide sind natürlich vorkommende Pyrethrine und ihre synthetischen Analoga (Pyrethroide) in der Landwirtschaft von Bedeutung.

Einige physiologisch wichtige terpenoide Verbindungen wie β -Carotin, Cholesterol, Phytol und Plastochinon 9 sowie die pharmazeutisch eingesetzten Vertreter Taxol und Thymol sind in Abbildung 2 dargestellt. Diese Verbindungen leiten sich strukturell von den zwei Grundbausteinen Isopentenylidiphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP) ab, deren Biosynthese im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

**Abb. 2:**

Strukturen physiologisch wichtiger Verbindungen der vielfältigen Klasse der Terpene, welche sich von den Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IDP) und Dimethylallylidiphosphat (DMADP) ableiten.

1.2 Die Biosynthese der Terpene

Aufgrund der großen Bedeutung dieser Stoffklasse ist es wichtig zu wissen, wie terpenoide Strukturen gebildet werden. Diese Kenntnisse ermöglichen es beispielsweise auf die Ausbeute der Substanzen aktiv Einfluss zu nehmen, z. B. durch „Molecular Engineering“ dieser Stoffwechselwege (Enfissi *et al.*, 2005). Alle isoprenoiden Verbindungen leiten sich biosynthetisch von Isopentenylidiphosphat und seiner isomeren Struktur Dimethylallylidiphosphat ab. Durch eine so genannte Kopf-Schwanz-Reaktion von IDP mit DMADP entsteht unter Abspaltung einer Phosphatgruppe Geranylidiphosphat (GDP), aus dem sich die Monoterpene ableiten. Ein nächster Kondensationsschritt einer aktivierten Isopreneinheit führt zu Farnesyldiphosphat (FDP), der Leitstruktur der Sesquiterpene. Durch Kopf-Kopf-Kondensation zweier Moleküle FDP wird die Cholesterin-Vorstufe Squalen gebildet (Bochar *et al.*, 1999). Diterpene leiten sich vom Geranylgeranylidiphosphat (GGDP) ab, das durch Kondensation eines weiteren Moleküls IDP an FDP synthetisiert wird. Aus zwei Diterpen-Molekülen gehen durch Kondensation Tetraterpene hervor.

1.2.1 Der klassische Acetat-Mevalonat-Weg

Erste Untersuchungen von Bloch, Lynen, Cornforth und Mitarbeitern zur Bildung von Cholesterol führten zur Entdeckung des Acetat-Mevalonat-Stoffwechselweges (MVA-Weg) (Qureshi und Porter, 1981; Bochar *et al.*, 1999). Dabei geht die Synthese von Cholesterol in Lebergewebe und Ergosterol in Hefen von Acetat bzw. der aktivierten Form Acetyl-CoA aus. Der MVA-Weg wird im Folgenden kurz beschrieben und ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

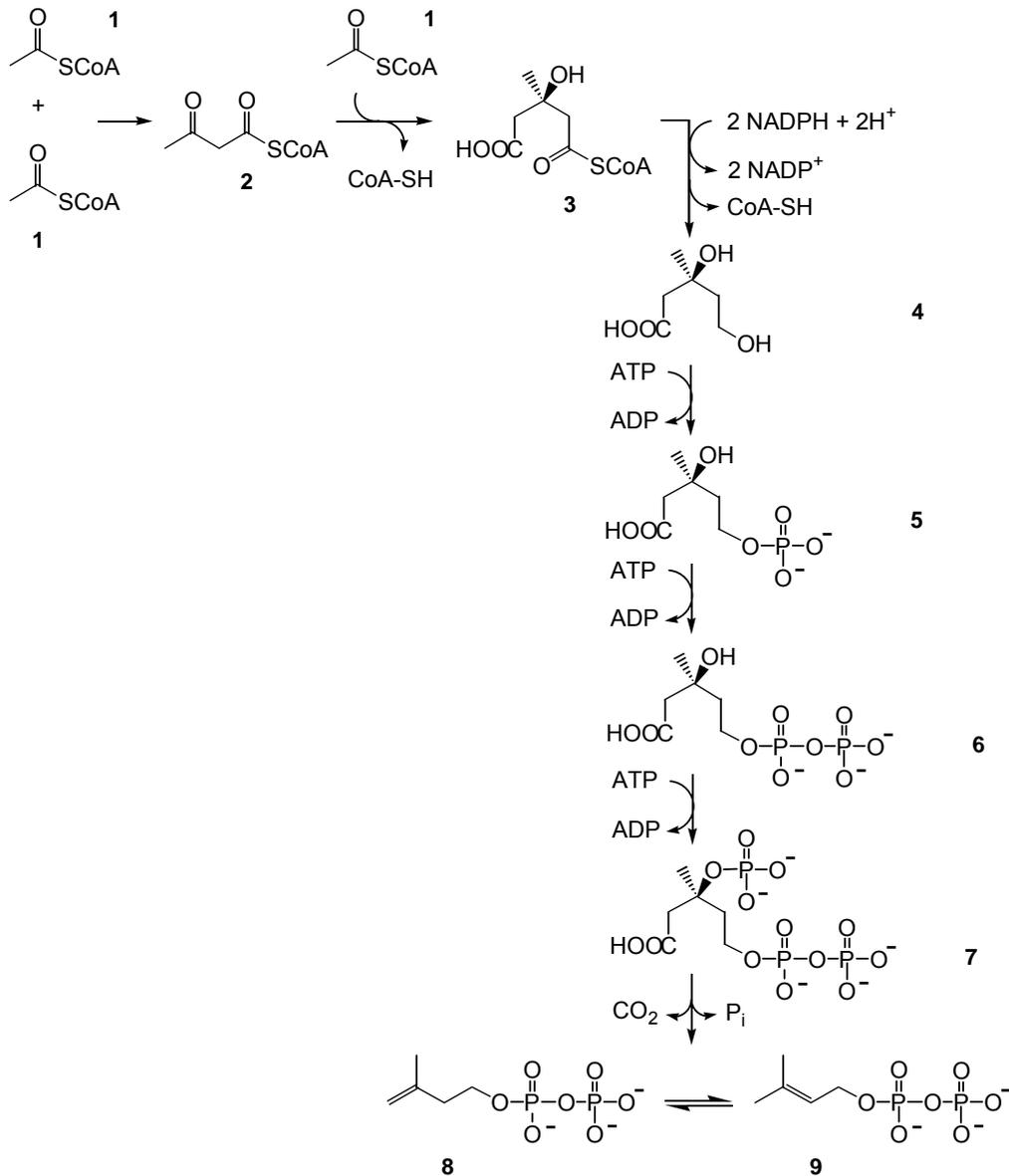


Abb. 3:
Der Acetat-Mevalonat-Weg

- | | | | |
|---|--|---|---------------------------------|
| 1 | Acetyl-CoA | 5 | 5-Phosphomevalonsäure |
| 2 | Acetoacetyl-CoA | 6 | 5-Pyrophosphomevalonsäure |
| 3 | 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) | 7 | 3-Phospho-5-phosphomevalonsäure |
| 4 | Mevalonsäure | 8 | Isopentenylidiphosphat (IDP) |
| | | 9 | Dimethylallyldiphosphat (DMADP) |

In einer Claisen-Kondensation reagieren zwei Moleküle Acetyl-CoA, katalysiert durch Thiolase, zum Zwischenprodukt Acetoacetyl-CoA. HMG-CoA-Synthase katalysiert eine weitere Kondensation mit einem dritten Molekül Acetyl-CoA, was zur Bildung der C₆-Verbindung 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) führt.

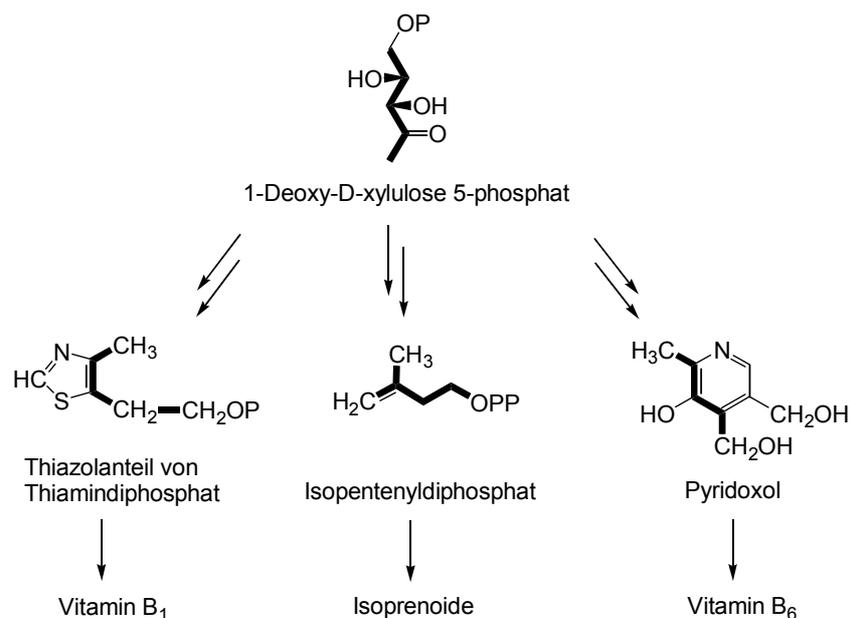
Dem nächstfolgenden Schritt, der Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonsäure, kommt große Bedeutung zu. Die dafür verantwortliche NADPH-abhängige HMG-CoA-Reduktase ist das Schlüsselenzym im Reaktionsweg zum Cholesterin, da es den limitierenden Faktor darstellt. Die Blockade der HMG-CoA-Reduktase wird auch medizinisch genutzt: Simvastatin, Atorvastatin, Lovastatin und andere Analogpräparate sind Inhibitoren dieses Enzyms und werden zur Senkung eines erhöhten Cholesterin-Blutspiegels als Standardmedikation eingesetzt.

In der weiteren Reaktionsfolge zur Isopreneinheit werden aus ATP-Molekülen stammende Phosphatgruppen auf Mevalonat übertragen. Durch Eliminierung einer Phosphatgruppe und gleichzeitige Decarboxylierung des Zwischenprodukts 3-Phospho-5-diphosphomevalonsäure entsteht unter Ausbildung einer Doppelbindung Isopentenylidiphosphat. Dessen Isomerisierung führt zu Dimethylallyldiphosphat, sodass beide aktivierten Isopreneinheiten vorliegen (Bochar *et al.*, 1999).

1.2.2 Der Alternative Terpenbiosyntheseweg

Seit der Entdeckung des Acetat-Mevalonat-Weges ging man davon aus, dass alle Organismen IDP und DMADP nur über diesen Biosyntheseweg gewinnen und Mevalonsäure als Vorstufe aller Terpene fungiert. Jedoch ergaben sich aus einer Reihe experimenteller Daten zunehmend widersprüchliche Ergebnisse. Isotopenmarkierte Mevalonsäure und Acetat wurden in pflanzlichen Systemen gar nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil in Carotinoide, Mono- und Diterpene eingebaut, ohne weiteres dagegen in cytosolische Sterole und Triterpene (Banthorpe *et al.*, 1972; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999a). Durch den HMG-CoA-Reduktasehemmer Lovastatin (Mevinolin) konnte die Biosynthese von Sterolen in Pflanzen deutlich gesenkt werden, nicht aber die Bildung von plastidären Isoprenoiden wie Carotinoiden und die Synthese der Phytol-Seitenkette des Chlorophylls (Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999a). Die Beobachtungen wurden dahingehend gedeutet, dass die Chloroplastenmembran nicht ausreichend permeabel für die applizierten Verbindungen sei.

Erst Ende der 1980er Jahre führten voneinander unabhängige Ergebnisse der Forschungsgruppen von Rohmer und Arigoni zur Entdeckung des Alternativen Terpenbiosyntheseweges. Die Applikation von ¹³C-markiertem Acetat an bestimmte Bakterienstämme führte bei den bakteriellen Hopanoiden, die den pflanzlichen Sterolen analog sind, zu einem unerwarteten Markierungsmuster (Flesch und Rohmer, 1988). Auch Einbauexperimente mit ¹³C-markierter Glucose zeigten ein nicht übereinstimmendes Bild mit der über den MVA-Weg verlaufenden Biosynthese des IDP (Rohmer *et al.*, 1993).

**Abb. 5:**

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat als gemeinsame Vorstufe von Thiamin, Isopentenylidiphosphat und Pyridoxol (modifiziert nach Sprenger *et al.*, 1997)

Die ersten beiden C₃-Vorstufen des DXP-Weges – Glyceraldehyd 3-phosphat und Pyruvat – werden als Derivate der Glucose direkt aus der in den Chloroplasten ablaufenden Photosynthese erhalten, was durch Markierungsexperimente herausgefunden wurde (Rohmer, 1999a). In einer Transketolase-ähnlichen Reaktion wird eine aus Pyruvat und Thiamin unter CO₂-Abspaltung erhaltene C₂-Einheit auf D-Glyceraldehyd 3-phosphat übertragen, wobei 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat gebildet wird (Übersicht in Abb. 6). Diese Umsetzung wird katalysiert durch das Enzym 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase (DXS), deren Klonierung und Charakterisierung aus *E. coli* in den Arbeitsgruppen von Sahn (Sprenger *et al.*, 1997) und Boronat (Lois *et al.*, 1998) gelang.

Aus anderen Organismen konnte das Gen der DXP-Synthase (*dxs* oder *ispA*) ebenso kloniert und die Enzyme charakterisiert werden, beispielsweise aus einem *Streptomyces*-Stamm (Kuzuyama *et al.*, 2000a), aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Lichtenthaler, 1999) sowie aus den höheren Pflanzen *Mentha x piperita* (Lange *et al.*, 1998), *Capsicum annum* (Bouvier *et al.*, 1998) und *Arabidopsis thaliana* (Araki *et al.*, 2000).

DXS stellt ein Schlüsselenzym im Stoffwechsel dar, weil durch dessen Katalyse gebildetes DXP sowohl als Intermediat zur Synthese von IDP und DMADP fungiert als auch an den Biosynthesen von Thiamin und Pyridoxol beteiligt ist (Abb. 5)

1.2.2.2 Das zweite Intermediat – 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat

Das nächste Enzym des DXP-Weges katalysiert die erste für den Alternativen Terpenbiosyntheseweg spezifische Umsetzung. In der Arbeitsgruppe von Rohmer konnte nachgewiesen werden, dass an *E. coli*-Zellen appliziertes 2C-Methylerythritol (ME) als Vorstufe der Ubichinon-Seitenkette dient (Duvold *et al.*, 1997a und Duvold *et al.*, 1997b). An *E. coli*-Mutanten, deren Stoffwechsel zwischen DXP und dem nächstfolgenden Intermediat unter-

brochen war, durchgeführte Applikationsversuche zeigten, dass DXP durch intramolekulare Umlagerung und eine Reduktion zu 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat (MEP) umgesetzt wird (Kuzuyama *et al.*, 1998a; Takahashi *et al.*, 1998).

Das für diesen Reaktionsschritt verantwortliche *dxr*-Gen (*yaeM* oder *ispC*) wurde erstmals aus *E. coli* kloniert und überexprimiert. In Gegenwart von NADPH katalysiert die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (DXR) gleichzeitig die Umlagerung von DXP zu 2C-Methyl-D-erythrose 4-phosphat und die Reduktion dieser Aldose zu MEP (Abb. 6). Ein vergleichbarer Reaktionsmechanismus findet sich bei der Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin (Arfin und Umbarger, 1969). Wenig später wurde DXR in den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (Schwender *et al.*, 1999) und *Mentha x piperita* (Lange und Croteau, 1999a) sowie im Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* beschrieben (Jomaa *et al.*, 1999).

1.2.2.3 Die nächsten drei Reaktionsschritte

Die durch DXR katalysierte Reaktion legt den C₅-Körper auf den DXP-Weg fest. Die sich daran anschließenden Reaktionsschritte zum 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (cMEDP) laufen linear ab und werden im Folgenden gemeinsam beschrieben.

Die Inkubation von radioaktiv markiertem 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat in Gegenwart von CTP mit einem Zellextrakt von *E. coli* resultierte in der Bildung des neuen Metaboliten 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) (Rohdich *et al.*, 1999). Durch Datenbanksuche nach Enzymen, die phosphorylierte Polyole wie MEP und Nukleotidtriphosphate als Substrate benötigen, kam es zur Entdeckung des bislang funktionell nicht beschriebenen *ygbP*-Gens (heutige Bezeichnung: *ispD*). Nach Überexpression in *E. coli* katalysierte das gereinigte rekombinante Protein die Bildung von CDP-ME (Abb. 6) (Rohdich *et al.*, 1999). Auch aus *Arabidopsis thaliana* konnte die 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase kloniert werden (Rohdich *et al.*, 2000a).

Vergleichende Datenbankanalysen publizierter Genomsequenzen von Organismen, die den DXP-Biosyntheseweg verwenden, ermöglichten die Identifizierung weiterer Gene. Im Anschluss an die bisher charakterisierten Enzyme DXS, DXR und IspD folgen die durch *ychB* (heutige Bezeichnung: *ispE*) und *ygbB* (heutige Bezeichnung: *ispF*) codierten Enzyme IspE und IspF (Lüttgen *et al.*, 2000; Herz *et al.*, 2000).

Das Enzym IspE aus *E. coli* katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung (Abb. 6) von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME) zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphat (CDP-MEP) (Lüttgen *et al.*, 2000). Ein Protein aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*), das mit der Fruchtreife in Verbindung gebracht wurde (Lawrence *et al.*, 1997), konnte als orthologes Enzym IspE identifiziert werden (Rohdich *et al.*, 2000b).

Aus *Mentha x piperita* wurde eine weitere IspE beschrieben (Lange und Croteau, 1999b), die später eindeutig als CDP-ME-Kinase identifiziert werden konnte (Rohdich *et al.*, 2000b).

Das *E. coli*-Enzym IspF setzt das so entstandene Substrat 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphat (CDP-MEP) unter Abspaltung von CMP zum zyklischen 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (cMEDP) um (Abb. 6) (Herz *et al.*, 2000). Das Enzym 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase (IspF) wurde auch in *Plasmodium falciparum* nachgewiesen (Rohdich *et al.*, 2001a).

Die drei Gene *ygbP* (*ispD*), *ychB* (*ispE*) und *ygbB* (*ispF*) wurden später in der Arbeitsgruppe von Seto identifiziert (Kuzuyama *et al.*, 2000b; Kuzuyama *et al.*, 2000c; Takagi *et al.*, 2000).

1.2.2.4 Die zwei letzten Reaktionen auf dem Weg zu IDP und DMADP

Ebenso wie *ispE* und *ispF* wurden *gcpE* und *lytB* als weitere Gene des DXP-Biosyntheseweges durch genomische Analyse identifiziert (Adam, P. *et al.*, 2000). Durch Markierungsexperimente mit [1-²H]Glucose am Bakterium *Zymomonas mobilis* konnte auf einen NADP- oder NADPH-abhängigen Reduktionsschritt geschlossen werden, der zur Bildung von IDP aus cMEDP führt (Charon *et al.*, 1999).

Die Notwendigkeit des Gens *lytB* für die Synthese isoprenoider Verbindungen über den Alternativen Terpenbiosyntheseweg wurde bei dem Cyanobakterium *Synechocystis* erkannt – Mutanten mit Veränderungen in der für *lytB* codierenden Region waren nicht überlebensfähig (Cunningham *et al.*, 2000). Bei *E. coli*-Mutanten mit einem *lytB*-Mangel war eine Substitution der alkoholischen Analoga von IDP bzw. DMADP (3-Methyl-3-buten-1-ol bzw. 3-Methyl-2-buten-1-ol) zur Unterstützung des Zellwachstums erforderlich (McAteer *et al.*, 2001). Die Eliminierung der Gene *gcpE* und *lytB* in *E. coli* zeigte letale Auswirkungen; jedoch konnte durch Einführung dreier Gene des Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweges und Zuführen von Mevalonsäure ein Überleben der Mutanten erzielt werden (Campos *et al.*, 2001; Altincicek *et al.*, 2001a; Altincicek *et al.*, 2001b). Diese Resultate erlaubten die Identifizierung von *gcpE* und *lytB* als neuartige Gene des Alternativen Terpenbiosyntheseweges. Die Gene wurden wenig später in *ispG* und *ispH* umbenannt.

Die Verteilungsmuster orthologer *gcpE*- und *lytB*-Gruppen waren identisch mit denen anderer orthologer Gruppen von Genen des DXP-Weges. Beim Vorkommen von *dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE* und *ispF* waren auch immer die beiden neuartigen Gene *ispG* und *ispH* anzutreffen (Cunningham *et al.*, 2000). Die Funktionen, die den Enzymen IspG und IspH in diesem Stoffwechselweg zukommen, waren zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt.

Die in den Abschnitten 1.2.2.1 bis 1.2.2.4 dargestellten Schritte des Alternativen Terpenbiosyntheseweges sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

Die unterschiedlichen Bezeichnungen der beteiligten Gene und Enzyme des Deoxyxylulosephosphat-Weges sind in Tabelle 1 angegeben.

Tab. 1:

Unterschiedliche Bezeichnungen beteiligter Gene und Enzyme des DXP-Weges (nach Rodriguez-Concepcion und Boronat, 2002)

Gen		Enzym			
<i>dxs</i>		DXS	CLA1		DXP-Synthase
<i>ispC</i>	<i>yaeM</i>	DXR			DXR-Reduktoisomerase
<i>ispD</i>	<i>ygbP</i>	IspD		CMS	CDP-ME-Synthase
<i>ispE</i>	<i>yhbB</i>	IspE		CMK	CDP-ME-Kinase
<i>ispF</i>	<i>ygbB</i>	IspF		MCS	cMEDP-Synthase
<i>ispG</i>	<i>gcpE</i>	IspG	GcpE	HDS	cMEDP-Reduktase HMBDP-Synthase
<i>ispH</i>	<i>lytB</i>	IspH	LytB	IDDS HDR	IDP/DMADP-Synthase HMBDP-Reduktase
<i>idi</i>		IDP-Isomerase		IDI	IDP/DMADP-Isomerase

1.2.3 Die IDP-Isomerase in der Terpenbiosynthese

Bereits vor der Entdeckung der Enzyme GcpE und LytB wurde in höheren Pflanzen eine Verzweigung des Stoffwechselweges beschrieben (Arigoni *et al.*, 1999; McCaskill und Croteau, 1999). Unklar war jedoch, ob IDP und DMADP gleichzeitig gebildet werden und ob weitere Gene und Enzyme am DXP-Weg beteiligt sind. Während die IDP-Isomerase im klassischen MVA-Weg als aktivierendes Enzym für das Überleben von Organismen zwingend erforderlich ist, konnte bisher ihre Bedeutung im DXP-Weg nicht geklärt werden.

Die IDP/DMADP-Isomerase (IDI) wandelt das relativ unreaktive IDP in seine reaktive Isoform DMADP um. Das Enzym katalysiert damit den für die Terpenbiosynthese über den MVA-Weg entscheidenden Aktivierungsschritt. Die Isomerisierung ist reversibel, das Gleichgewicht liegt aber in Richtung DMADP (Ramos-Valdivia *et al.*, 1997a). Die erste Charakterisierung und Partialreinigung der IDP-Isomerase aus Hefe gelang schon im Zusammenhang mit der Entdeckung des Acetat-Mevalonat-Weges durch Lynen und Mitarbeiter (Agranoff *et al.*, 1960) wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben.

Das für die IDP-Isomerase codierende *idi*-Gen konnte aus unterschiedlichen Organismen kloniert und exprimiert werden wie zum Beispiel aus *Saccharomyces cerevisiae* (Anderson *et al.*, 1989), aus der Leber von *Sus scrofa* (Banthorpe *et al.*, 1977), aus Chromoplasten von *Capsicum annuum* (Dogbo und Camara, 1987), aus *Rhodobacter capsulatus* (Hahn *et al.*, 1996a) und *E. coli* (Hahn *et al.*, 1999). Auch eine menschliche IDP-Isomerase konnte durch Überexpression in *E. coli* gewonnen, gereinigt und charakterisiert werden (Hahn *et al.*, 1996b). Aus *Arabidopsis thaliana* konnten zwei cDNAs isoliert werden, die beide für IDP-Isomerasen mit N-terminalen Erweiterungen codieren (Campbell *et al.*, 1997). Diese dienen

vermutlich als Transportpeptide zur Lokalisierung dieser Enzyme in Chloroplasten. Die cytosolischen Varianten dieser Enzyme entstehen mutmaßlich durch alternative Translationsinitiation (Cunningham und Gantt, 2000).

Das Vorkommen eines neuen Typs von IDP-Isomerasen, deren Aminosäuresequenzen keine Ähnlichkeit zu denen der bekannten IDP-Isomerasen haben, wurde im *Streptomyces*-Stamm CL190 entdeckt (Kaneda *et al.*, 2001). Diese zweite IDP-Isomerase-Familie wird seither als Typ II bezeichnet (Rohdich *et al.*, 2004).

Im Vergleich zum MVA-Weg kommt es beim DXP-Weg durch eine Verzweigung zu einer getrennten Bildung von IDP und DMADP (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2000). Damit übereinstimmend ist das *idi*-Gen in *E. coli* nicht zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen notwendig (Hahn *et al.*, 1999). Gleichwohl wird das Enzym in zahlreichen pflanzlichen Organismen exprimiert (Cunningham und Gantt, 2000) und scheint für deren Lebensfähigkeit von Bedeutung zu sein (Page *et al.*, 2004). Somit ist die Funktion der IDP-Isomerase zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen in pflanzlichen Organismen noch unklar.

1.3 Der Stoffaustausch zwischen den Terpenbiosynthesewegen

In höheren Pflanzen werden Terpene sowohl über den Acetat-Mevalonat-Weg als auch den Deoxyxylulosephosphat-Weg gebildet. Diese Stoffwechselwege sind in unterschiedlichen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle anzutreffen und führen unabhängig voneinander zur Bildung von IDP. Zwischen beiden Routen findet ein gewisser Austausch auf der Ebene des IDPs statt, auch „Crosstalk“ genannt, der sowohl von der Spezies, von der Art der Zellen sowie vom Entwicklungsstadium abhängig ist (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2004). In Abbildung 7 sind MVA- und DXP-Weg sowie der Stoffaustausch zwischen diesen Wegen schematisch dargestellt.

Bei verschiedenen Pflanzen wurde eine aktive Aufnahme von IDP in isolierte Plastide beschrieben. Der gerichtete Transport von IDP mittels eines plastidären Protonen-Symporters vom Plastid ins Cytosol konnte kürzlich gezeigt werden (Laule *et al.*, 2003; Bick und Lange, 2003). Andere Prenyldiphosphate wie Farnesyl-, Geranyl- und Geranylgeranyldiphosphat können möglicherweise ebenfalls zwischen Cytosol und Plastiden ausgetauscht werden, unklar ist aber noch, wie dieser Austausch reguliert wird (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2000). Einbauexperimente mit *Catharanthus roseus*-Zellkulturen (Arigoni *et al.*, 1997), die Bildung von Ginkgoliden aus *Ginkgo biloba*-Embryonen (Schwarz, 1994) und die Synthese bestimmter Sesquiterpenen aus *Matricaria recutita* (Adam *et al.*, 1999) seien als Beispiel für den Transfer von Intermediaten genannt. Zur Quantifizierung des Stoffaustausches zwischen beiden Terpenbiosynthesewegen erfolgten mit den ¹³C-markierten Vorstufen Glucose und Mevalonsäurelacton Applikationsexperimente an *C. roseus*-Zellkulturen (Schuhr *et al.*, 2003). In *Arabidopsis thaliana* zeigten Untersuchungen mit einem Hemmstoff des MVA-Weges, dass

der plastidäre DXP-Weg geringere Syntheseaktivitäten des cytosolischen Weges zu kompensieren vermag (Laule *et al.*, 2003). Folglich erlangt der DXP-Weg als Reserve-Weg des MVA-Weges zusätzliche Bedeutung.

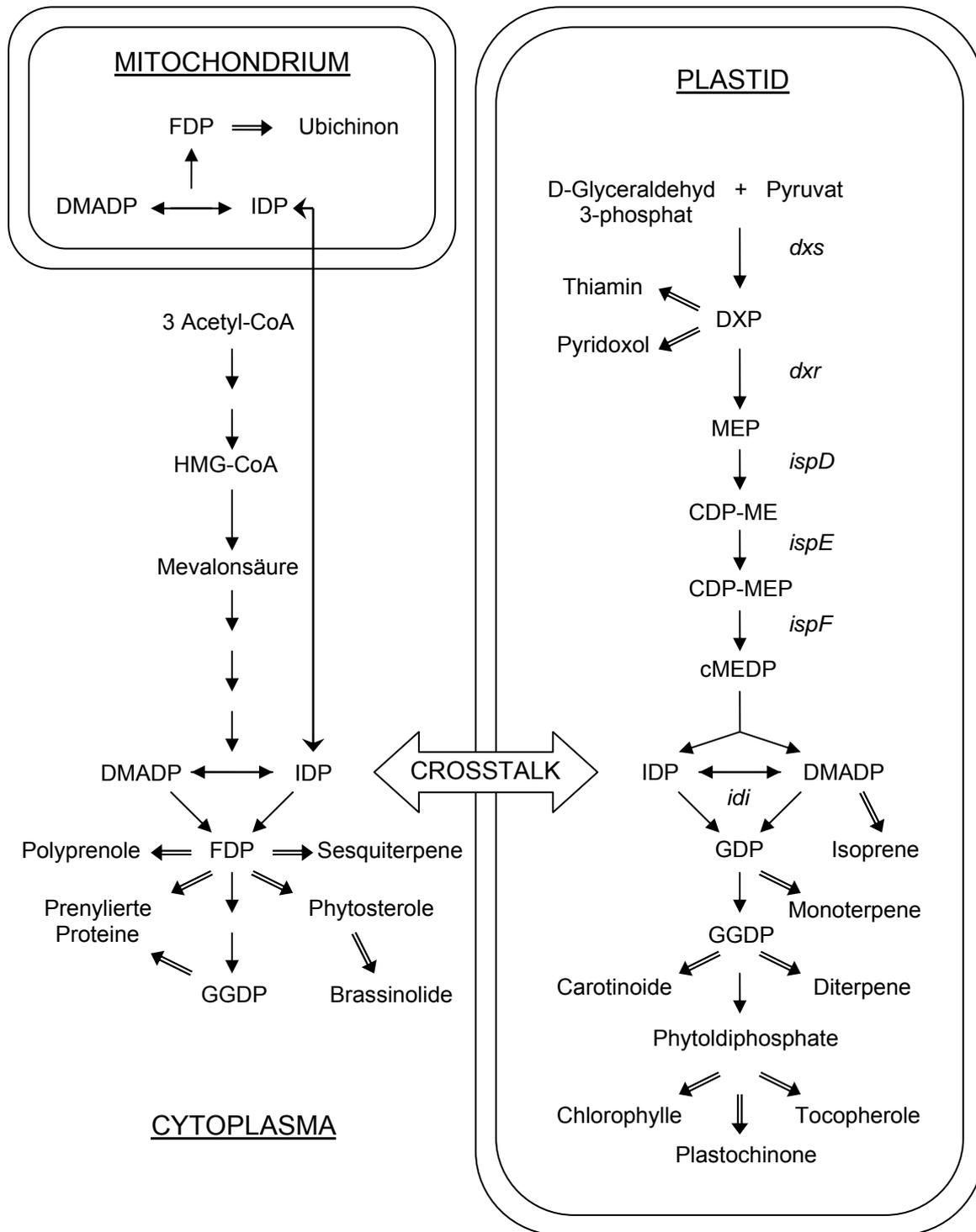


Abb. 7: Überblick über die Kompartimentierung der Terpenbiosynthese in Zellen höheren Pflanzen zwischen Cytoplasma (Acetat-Mevalonat-Weg), Plastid (Deoxyxylulosephosphat-Weg) und Mitochondrium (modifiziert nach Rodriguez-Concepcion und Boronat, 2002).

1.4 Die Verbreitung der Terpenbiosynthesewege

Die Verteilung der Isoprenoidbiosynthesewege via Acetat-Mevalonat und Deoxyxylulosephosphat in unterschiedlichsten Spezies wurde in zahlreichen Untersuchungen betrachtet (Rohmer, 1999b; Lichtenthaler, 1999; Eisenreich *et al.*, 2004). In Abbildung 8 ist die Verbreitung der beiden Wege wiedergegeben.

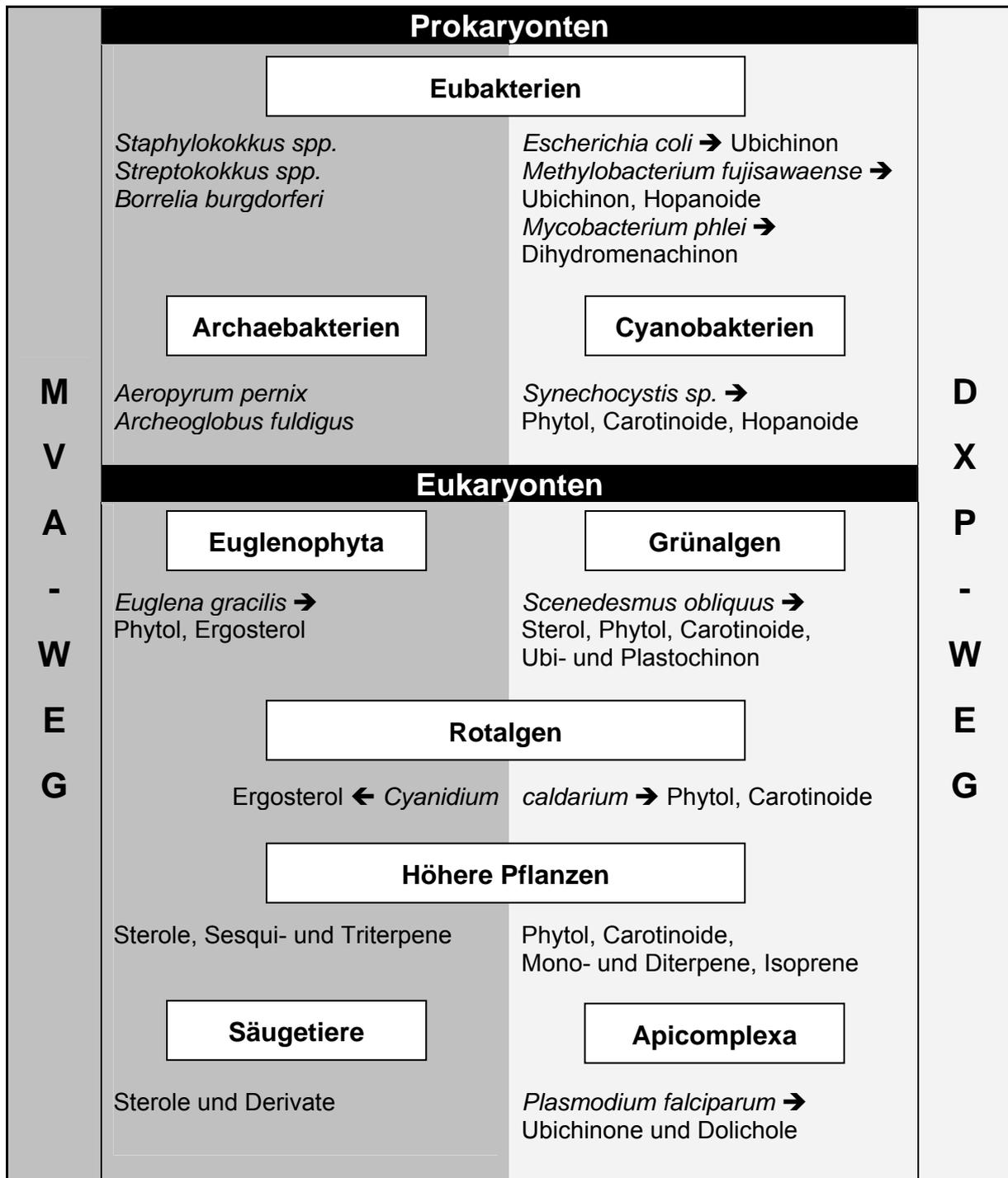


Abb. 8: Verbreitung des Acetat-Mevalonat-Weges (dunkelgrau unterlegt) und des Deoxyxylulosephosphat-Weges (hellgrau unterlegt) (nach Lichtenthaler, 1999; Eisenreich *et al.*, 2004)

Sowohl in Hefen, Pilzen, Säugetieren als auch im Menschen dient ausschließlich der klassische Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweg der Gewinnung isoprenoide Verbindungen (Disch und Rohmer, 1998).

Archaeobakterien und ein Teil der Eubakterien wie zum Beispiel *Staphylokokken*-Stämme gewinnen terpenoide Verbindungen über den Acetat-Mevalonat-Weg. Der Alternative Terpenbiosyntheseweg ist sowohl in zahlreichen Eubakterien wie beispielsweise *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Streptomyces*-Stämmen als auch in Cyanobakterien verbreitet (Rohmer, 1999b). Eine Besonderheit stellt das vom Entwicklungszustand abhängige Vorkommen beider Wege in *Streptomyces aeriowifer* dar (Seto *et al.*, 1996). In der exponentiellen Wachstumsphase werden essenzielle Metabolite wie die Prenylseitenkette der Menachinone über den DXP-Weg gebildet, während der MVA-Weg nur in der stationären Phase zur Synthese von Monoterpenderivaten induziert wird.

In niederen Pflanzen findet sich ein differenziertes Bild. Entweder kommt der Acetat-Mevalonat-Weg wie beispielsweise in *Euglena gracilis* oder der Alternative Terpenbiosyntheseweg vor, zum Beispiel in Grünalgen wie *Scenedesmus obliquus* und *Chlamydomonas reinhardtii*. In Rotalgen wie z. B. *Cyanidium caldarium* erfolgt die Synthese von Sterolen via MVA-Weg, die von Phytol aber über den DXP-Weg (Lichtenthaler, 1999).

In höheren Pflanzen sind für die Biosynthese von IDP beide Stoffwechselwege nebeneinander vorhanden (Abb. 7). Die im Cytoplasma lokalisierte IDP-Synthese über den MVA-Weg führt zur Bildung von Sterolen, Sesqui- und Triterpenen. Auch die Prenylseitenkette des in Mitochondrien anzutreffenden Ubichinons stammt aus dem cytosolischen MVA-Weg (Disch *et al.*, 1998). Der Alternative Terpenbiosyntheseweg dagegen ist in den Plastiden lokalisiert. Dort dient er zur Synthese von Phytol, Carotinoiden, Tocopherolen, Mono- und Diterpenen sowie der Prenylseitenkette vom Plastochinon. Darüber hinaus wird die isoprenoide Struktur von an Regulationsprozessen beteiligten Phytohormonen wie Gibberellinen oder Abscisinsäure über den DXP-Weg gebildet. Das Auftreten des bakteriellen mevalonsäureunabhängigen Weges in Chloroplasten steht in Übereinstimmung mit der Endosymbiontentheorie, der Theorie über den prokaryontischen Ursprung dieser Zellorganellen.

Alle Enzyme des Alternativen Terpenbiosyntheseweges tragen 60 - 100 Aminosäuren umfassende N-terminale Sequenzen, die als Signale für den Transport in Chloroplasten fungieren (Eisenreich *et al.*, 2004). Solche Transportpeptide konnten in den pflanzlichen Enzymen IspD aus *Arabidopsis thaliana* (Rohdich *et al.*, 2000a), IspE aus *Lycopersicon esculentum* (Rohdich *et al.*, 2000b) und *Mentha x piperita* (Lange und Croteau, 1999b) sowie IspF aus *Arabidopsis thaliana* und *Catharanthus roseus* (Rohdich *et al.*, 2001b) identifiziert werden.

Der DXP-Weg stellt demnach eine lebensnotwendige Stoffwechselroute dar, die nur in Bakterien, Pflanzen und Apicomplexa, nicht aber in Säugetieren vorkommt. Folglich erlangte dieser Terpenbiosyntheseweg große Bedeutung als Angriffspunkt für Herbizide, Antiinfektiva und Antimalaria-Mittel.

1.5 Der Alternative Terpenbiosyntheseweg als Zielstruktur

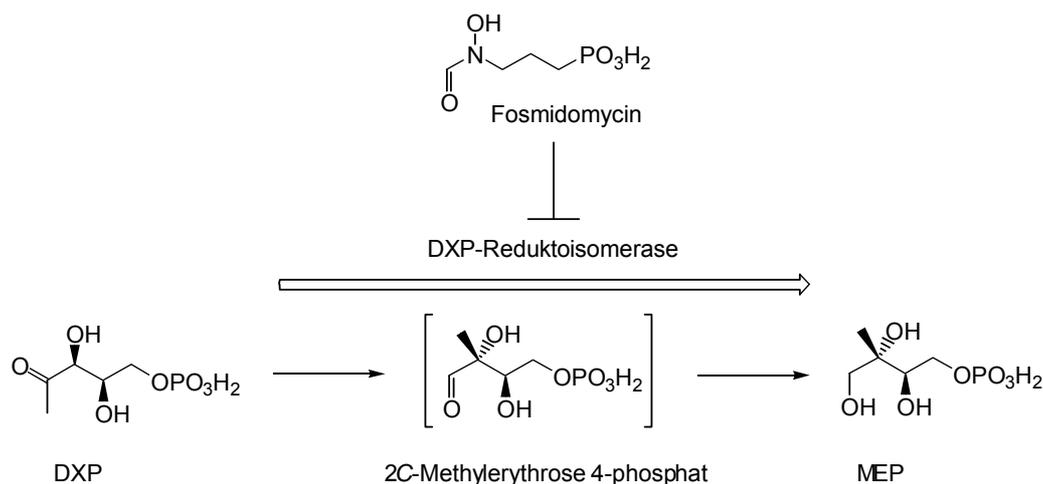
Die über den Alternativen Biosyntheseweg erworbenen Kenntnisse haben große Bedeutung für Medizin und Landwirtschaft. Ermöglicht wird eine neue Zielstruktur für Herbizide, deren Toxizität für den menschlichen Organismus und den anderer Säugetiere sehr niedrig sein dürfte, weil der Deoxyxylulosephosphat-Weg in diesen nicht vorkommt.

Infektionskrankheiten stellen nach kardiovaskulären Erkrankungen weltweit die zweithäufigste Todesursache dar. Zudem verbreiten sich unter gesundheitsgefährdenden Keimen zunehmend Resistenzen gegenüber antibiotischen Substanzen. Somit ist neben einem kritischen Umgang mit den Wirkstoffen die Entwicklung anderer Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen dringend notwendig (Hohmann, 2004).

Pathogene Bakterien mit Ausnahme grampositiver Kokken wie den *Strepto-* und *Staphylokokken*-Stämmen nutzen den DXP-Weg zur Gewinnung ihrer isoprenen Strukturen. Dieser Stoffwechselweg ist für das Wachstum und Überleben der Pathogene essenziell und bietet damit neue Ziele für die Entwicklung antiinfektiv wirkender Strukturen. Das Auftreten möglicher Nebenwirkungen dürfte gering sein, da der Alternative Terpenbiosyntheseweg in Menschen und Säugetieren nicht vorkommt. Die prekäre Situation der Resistenzentwicklung vor allem bei Problemkeimen wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* und *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Antibiotika kann somit abgemildert und die Therapiemöglichkeiten für Infektionskrankheiten erweitert werden.

Der Malaria-Erreger Plasmodium trägt ein spezielles Zellorganell, den Apicoplasten, in dem verschiedene Stoffwechselprozesse ablaufen. Für die Enzyme des DXP-Weges codierende Gene konnten in dem vollständig sequenzierten Genom von *P. falciparum* identifiziert werden. Alle Enzyme des DXP-Weges von *P. falciparum* tragen eine Apicoplast-Zielstruktur. Dies legt eine Lokalisierung des Alternativen Terpenbiosyntheseweges im Apicoplasten nahe (Ralph *et al.*, 2004). Zudem konnten aus Blutschizonten vom Erreger der Malaria tropica typische Intermediate des DXP-Weges (DXP, MEP, CDP-ME, CDP-MEP und cMEDP) isoliert werden (Cassera *et al.*, 2004).

Fosmidomycin ist eine von *Streptomyces lavendulae* produzierte Substanz (Okuhara *et al.*, 1980). Die Beeinflussung der Isoprenoidbiosynthese einiger Bakterien (Shigi, 1989) durch Fosmidomycin und dessen herbizide Wirkung (Patterson, 1987) wurden schon früh beschrieben, die Wirkungsweise dagegen war noch ungeklärt. Erst Jahre später konnte die Wirkung von Fosmidomycin durch die Inhibierung der DXP-Reduktoisomerase (DXR) des Alternativen Biosyntheseweges erklärt werden (Kuzuyama *et al.*, 1998b; Zeidler *et al.*, 1998). Die DXP-Reduktoisomerase katalysiert gleichzeitig die intramolekulare Umlagerung und die Reduktion von DXP über das hypothetische Intermediat 2C-Methylerythrose 4-phosphat zu MEP. Fosmidomycin kann aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Intermediat als spezifischer Inhibitor das Enzym hemmen und somit zur Blockade der Terpenbiosynthese führen (Abb. 9).

**Abb. 9:**

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat (DXP) wird durch die DXP-Reduktoisomerase zu 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat (MEP) umgesetzt. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit dem hypothetischen Intermediat 2C-Methylerythrose 4-phosphat vermag Fosmidomycin das Enzym zu inhibieren. (modifiziert nach Kuzuyama, 2003)

Die Wirksamkeit von Fosmidomycin und seinem Derivat FR-900098 gegenüber rekombinanten DXP-Reduktoisomerasen verschiedener Spezies inklusive *P. falciparum* führt zu einer eingeschränkten Terpenbiosynthese über den Alternativen Terpenbiosyntheseweg (Jomaa *et al.*, 1999). Das Wachstum mehrfachresistenter *P. falciparum*-Stämme konnte unterdrückt und mit *P. vinckei* – dem Malariaerreger von Nagetieren – infizierte Mäuse geheilt werden (Jomaa *et al.*, 1999). Die starke antiplasmodiale Wirksamkeit des Fosmidomycins wurde in klinischen Studien mit 20 an Malaria tropica erkrankten Patienten bestätigt (Lell *et al.*, 2003). Synergistische Effekte der Arzneistoffkombination von Fosmidomycin und dem Antibiotikum Clindamycin werden in laufenden klinischen Studien untersucht (Wiesner *et al.*, 2003).

Eine weitere Rolle spielen IDP und DMADP als Immunstimulatoren für die Reaktion des Immunsystems auf Phosphoantigene durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten (Eisenreich *et al.*, 2004). Wesentlich wirksamer als diese Verbindungen stellte sich das Intermediat HMBDP (1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat) des DXP-Weges dar. Diese nur in Pathogenen vorkommende Substanz wirkte als Immunmodulator bzw. T-Zellaktivator bereits im picomol-Bereich (Hintz *et al.*, 2001; Eberl *et al.*, 2003). Sie signalisiert mutmaßlich dem Immunsystem die Anwesenheit von prokaryontischen oder protozoischen Krankheitserregern.

Zusammenfassend stellt der Alternativen Terpenbiosyntheseweg ein viel versprechendes Forschungsgebiet mit denkbaren Anwendungen in den Bereichen Antiinfektiva, Herbizide, Antimalaria-Mittel und möglicherweise sogar als Immunmodulatoren dar.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Neben dem klassischen Acetat-Mevalonat-Weg wurde ein Mevalonat-unabhängiger Stoffwechselweg zur Terpenbiosynthese entdeckt. Die Bedeutung dieses Deoxyxylulosephosphat-Weges (DXP-Weg), der in Pflanzen, vielen Eubakterien und Apicomplexa essenziell ist, in Säugetieren aber nicht vorkommt, wird zunehmend erkannt. Aufgrund der unterschiedlichen Verbreitung dieser beiden Stoffwechselwege eignet sich der DXP-Weg als Zielstruktur für innovative Arzneistoffe.

Die Darstellung kommerziell nicht verfügbarer Intermediate des Alternativen Terpenbiosyntheseweges ist zur Aufklärung einzelner Biosyntheseschritte des Stoffwechselweges erforderlich. Zunächst war es Ziel dieser Arbeit, die im Deoxyxylulosephosphat-Weg vorkommenden Proteine für enzymatische Synthesen bereitzustellen. Hierfür mussten die *E. coli*-Enzyme des DXP-Weges kloniert, überexprimiert, gereinigt und auf ihre Aktivität hin überprüft werden.

Unter Verwendung der dargestellten rekombinanten Enzyme des DXP-Weges sollten sowohl unmarkierte als auch ^{13}C - und ^{14}C -markierte Intermediate dieses Stoffwechselweges synthetisiert werden. Darüber hinaus war es die Aufgabe, einen pyruvatbildenden *E. coli*-Stamm zu kultivieren und die Synthese zur Darstellung von radioaktiv- und schwerisotopenmarkiertem Pyruvat im Kulturmedium zu entwickeln.

Isopentenylidiphosphat-Isomerasen sollten durch Klonierung und Expression als katalytisch aktive Proteine dargestellt werden. Hierfür wurde es erforderlich, die nach der Enzymreaktion zur Detektion eingesetzte HPLC-Methode zu verifizieren. Anschließend wurde die enzymatische Charakterisierung der IDP-Isomerasen aus *E. coli* und *Cannabis sativa* angestrebt.

Die Funktion der IDP/DMADP-Isomerase in höheren Pflanzen ist noch ungeklärt. Untersuchungen an *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit ausgeschaltetem *idi*-Gen hatten zum Ziel, funktionale Aussagen zur IDP-Isomerase in diesen Pflanzen zu treffen. Die *N. benthamiana*-Mutanten sollten makro- und mikroskopisch sowie auf Ebene ihrer Pigmentzusammensetzung auf ihren Phänotyp hin analysiert werden. Zudem wurde angestrebt, durch Fütterungsexperimente an Blättern und isolierten Chloroplasten diese Pflanzen funktional auf die Bildung von plastidären und cytosolischen Isoprenoiden zu testen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Nachfolgend sind die *Escherichia coli* Stämme, die zum Einsatz kamen, mit ihren jeweiligen genetischen Charakteristika aufgeführt:

E. coli DH5 α , Invitrogen F⁻, Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR endA1*
recA1 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

E. coli BL21(DE3), Invitrogen F⁻ *ompT hsdS_B* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3)

Der pyruvatbildende Stamm *Escherichia coli* YYC202 wurde von Herrn Prof. Dr. H. Sahn und Herrn Prof. Dr. M. Bott, Forschungszentrum Jülich, zur Verfügung gestellt, wofür ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken möchte (Gerharz *et al.*, 2001).

Aus dem Stamm *E. coli* ID16 wurde im Rahmen der Proteinreinigung das Enzym Anorganische Pyrophosphatase isoliert. Herrn Prof. Dr. A. Böck, LMU München, der diesen Stamm zur Verfügung stellte, möchte ich dafür sehr herzlich danken.

Vom *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pSa_RepA (Hellens *et al.*, 2000) wurden Stämme mit dem Plasmid pBINTRA6 und den pTV-Plasmiden pTV $\emptyset\emptyset$ als Leervektor, pTV Nb PDS als Positivkontrolle und pTV Nb IDI zum Ausschalten der IDP-Isomerase eingesetzt (Page *et al.*, 2004).

2.1.2 Plasmide

pCR[®]T7/NT TOPO[®], Invitrogen, ist ein 2,87 kb großer linearisierter Expressionsvektor und Bestandteil des TOPO TA Cloning[®] Kits. Der 3'-terminale Thymidinüberhang ermöglicht es mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente zu klonieren. Die Zyklisierung des Plasmids erfolgt durch die am Vektor kovalent gebundene Topoisomerase. Der Vektor besitzt einen T7 Promotor, eine N-terminale Polyhistidin-Region (6xHis) sowie als Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase).

pHIS 8-3 (Jez *et al.*, 2000) ist ein 5,5 kB großer Expressionsvektor, eine Modifikation des pET 28a Vektors. Nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *EcoR* I erfolgte die Ligation mit der T4 DNA-Ligase. Das Plasmid besitzt einen T7 Promotor, einen N-terminalen Histidin-Tag (8xHis) und zu Selektionszwecken ein Kanamycin-Resistenzgen.

2.1.3 Oligonukleotide

Die als Primer für Polymerasekettenreaktionen eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die Sequenzen der genspezifischen PCR-Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2:
Auflistung genspezifischer PCR-Primer

Primer	Nukleotidsequenz	Orientierung
dxs-5'	5'-ATGAGTTTTGATATTGCCAAATACC-3'	sence
dxs-3'	5'-TTATGCCAGCCAGGCCTT-3'	antisence
ispD-5'	5'-ATGGCAACCACTCATTTGGA-3'	sence
ispD-3'	5'-TTATGTATTCTCCTGATGGATGG-3'	antisence
ispE-5'	5'-ATGCGGACACAGTGGCCC-3'	sence
ispE-3'	5'-TTAAAGCATGGCTCTGTGCAATG-3'	antisence
ispF-5'	5'-ATGCGAATTGGACACGGTTT-3'	sence
ispF-3'	5'-TCATTTTGTTCCTTAATGAGTAG-3'	antisence
xylB-5'	5'-ATGTATATCGGGATAGATCTT-3'	sence
xylB-3'	5'-TTACGCCATTAATGGCAGAA-3'	antisence
gcpE-5'	5'-ATGCATAACCAGGCTCCAAT-3'	sence
gcpE-3'	5'-TTATTTTTCAACCTGCTGAAC-3'	antisence
lytB-5'	5'-ATGCAGATCCTGTTGGCCA-3'	sence
lytB-3'	5'-TTAATCGACTTCACGAATATC-3'	antisence
Ec idi-5'	5'-ATGCAAACGGAACACGTCATTTTAT-3'	sence
Ec idi-3'	5'-TTATTTAAGCTGGGTAAATGCAG-3'	antisence
Cs idi-5'	5'-TCCACCATGGGAGACTCT-3'	sence
Cs idi-3'	5'-TCATATCAGCAACTTCCTTAA-3'	antisence
Cs idi-5' BamH1	5'-CGGGATCCTCCACCATGGGAGACTCT-3'	sence
Cs idi-3' EcoR1	5'-GGAATTCTCATATCAGCAACTTCCTTAA-3'	antisence
Cs idi-N68	5'-TTCTAGTGGATGAGAATGAC-3'	sence
T7 TOPO	5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'	sence
pHIS8-3 T7	5'-TAATACGACTCACTATA-3'	sence
pHIS8-3 T7rev	5'-CAAAAACCCCTCAAGACCC-3'	antisence

2.1.4 Pflanzliches Material

Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* Domin (Solanaceae) wurden in einer Phytokammer des Institutes für Pflanzenbiochemie Halle durch Aussaat der Samen gezogen. Die Pflanzen wurden während der Anzucht und des Wachstums bei einer Temperatur von 22 °C 16 h beleuchtet und standen bei 20 °C für 8 h in Dunkelheit. Zum Keimen wurden die Samen in Petrischalen gelegt, die mit weichem wassergetränktem Papier ausgelegt waren. Nach 7 Tagen wurden die Keimlinge auf Erde in Töpfe mit 3 cm Durchmesser umgesetzt. Das Umpflanzen in ca. 9 x 9 cm große Töpfe erfolgte nach 3 Wochen. Die verwendete Erde bestand aus einer Mischung von 2 Teilen Sand und 3 Teilen ED73 Einheitserde.

2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien in der erforderlichen Reinheit wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Fluka (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Bestandteile für Kulturmedien wurden von der Firma Otto Nordwald (BD, Hamburg) eingesetzt. Die Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim) und NewEngland BioLabs (Frankfurt/Main) bezogen, sofern nicht anders angegeben. Alle wässrigen Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser der Millipore-Anlage Seralpur DELTA_{UF} USF Seral hergestellt.

Enzyme:

Hexokinase – H-5625	Sigma (Taufkirchen)
Glucose 6-phosphat-Isomerase – P-5381	Sigma (Taufkirchen)
Fructose 6-phosphat-Kinase – F-0137	Sigma (Taufkirchen)
Aldolase – A-8811	Sigma (Taufkirchen)
Triosephosphat-Isomerase – T-2507	Sigma (Taufkirchen)
Alkalische Phosphatase – P-5521	Sigma (Taufkirchen)
Anorganische Pyrophosphatase – 83206	Fluka (Taufkirchen)
Lysozym – L-6876	Sigma (Taufkirchen)

Antibiotika:

Ampicillin – A-9518	Sigma (Taufkirchen)
Kanamycin – K-4000	Sigma (Taufkirchen)
Tetracyclin-Hydrochlorid – 58346	Calbiochem (Darmstadt)
Rifampicin – 34514	Serva (Heidelberg)

DNA Längenstandards und Nukleotide:

1 kB DNA Marker – 15615	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA Marker – 15628	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTPs – 18427	Invitrogen (Karlsruhe)

Proteinmolekulargewichtsmarker – #SM0431	Fermentas (St. Leon-Rot)
--	--------------------------

Spezielle Chemikalien:

ATP – 50200	Biomol (Hamburg)	NADP – A1394	AppliChem (Darmstadt)
IPTG – 2316	Roth (Karlsruhe)	NADPH – A1395	AppliChem (Darmstadt)

Substrate für enzymatische Umsetzungen:

Sofern benötigte Substrate des DXP-Weges nicht im Rahmen dieser Arbeit beschrieben worden sind, wurden sie in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Gao synthetisiert.

Radiochemikalien:

[U- ¹⁴ C ₆]D-Glucose – CFB 96-1mCi	Amersham Biosciences (Freiburg)
(Spezifische Aktivität 311 µCi/µmol, Gesamtaktivität 1 mCi = 37 MBq / 5 ml)	
[1- ¹⁴ C]Isopentenylpyrophosphat Ammoniumsalm – CFA 476-50µCi	Amersham Biosciences
(Spezifische Aktivität 58 mCi/mmol, Gesamtaktivität 50 µCi = 1,85 MBq / 1 ml)	
[¹⁴ C ₅]Mevalonsäurelacton – CMM 228	CEA France Service Molecules Marqees
(Spezifische Aktivität 11,8 µCi/µmol, Gesamtaktivität 0,1 µCi / 2 ml)	
[U- ¹³ C ₆]D-Glucose (99 %) – CLM-1396	Cambridge Isotope Laboratories

2.1.6 Geräte

Folgende Geräte wurden eingesetzt, sofern sie nicht weiter im Methodenteil beschrieben sind:

Analytische HPLC:

Merck-Hitachi LaChrom[®] HPLC-System
L-7100 Pump, L-7200 Autosampler, L-7450 Diode Array Detektor, D-7000 Interface

Radio-HPLC:

Merck-Hitachi LaChrom[®] HPLC-System
Radio-Detektor Ramona 2000 mit Software Winnie 32, Version 2.12 Raytest (Straubenhardt)

FPLC:

ÄKTApurifier Chromatographiesystem Amersham Biosciences (Freiburg)
Pump P-900, Monitor pH/Cond-900, Monitor UV-900, Fraction collector Frac-900

Radioaktivitätsmessung:

Radio-Dünnschicht-Scanner Tracemaster 20	Berthold (Wildbach)
Phosphorimager Fujifilm BAS-1500	Raytest (Straubenhardt)
Flüssigszintillationszähler LS-6000TA	Beckman (Krefeld)

Zentrifugen:

Tischzentrifuge 5415D, Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge SORVALL [®] RC-5B	} GSA-Rotor und SS 34-Rotor
Kühlzentrifuge SORVALL [®] RC-26 Plus	
Ultrazentrifuge SORVALL [®] ULTRA Pro 80	DUPONT (Bad Homburg)
	DUPONT (Bad Homburg)

Schüttler:

Rotationsschüttler innova 4000	New Brunswick Scientific
Überkopfschüttler, Schrägschüttler, Minischüttler (Vortexer)	(Nürtingen)

Spektrometer:

Spektralphotometer Ultraspec 3000	Amersham Biosciences (Freiburg)
Specord 200	Carl Zeiss (Jena)

Sonstige Geräte:

Autoklav: Varioklav Typ 500 Dampfsterilisator	H + P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Lyophilisation: Gefriertrocknungsanlage Gamma 1-20	Christ (Osterode)
Vakuum-Konzentrator (SpeedVac)	Bachofer (Reutlingen)
Rotationsverdampfer Rotavapor Laborota 4000	Heidolph (Schwabach)
Ultraturrax T25	JKA [®] -Labortechnik (Staufen)
pH-Meter inoLab	WTW (Weilheim)
Mikroskop: Axioskop 20	Carl Zeiss (Jena)
Ultraschall: Somnifer 250, Ultraschallbad 2510	Branson (Danbury, USA)
Sterilbank HERA Safe HS 12	Heraeus Instruments (Hanau)
Wasserbäder, Magnetrührer, Waagen	

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Die Isolierung der genomischen DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll „Miniprep of bacterial genomic DNA“ aus „Short Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1999).

2.2.2 Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Segmente entwickelt (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Fallona, 1987). In Gegenwart von thermostabilen DNA-Polymerasen und Desoxynukleotiden wird die Matrize mit spezifischen, komplementären Oligonukleotidprimern zu vollständig doppelsträngiger DNA amplifiziert. Die Methode umfasst drei sich zyklisch wiederholende Einzelschritte: Hitzedenaturierung bei 94 °C, Anlagerung der Primer bei 40 - 60 °C und Synthese neuer DNA-Abschnitte bei 72 °C. Als Matrizen-DNA für die Polymerasekettenreaktion diente die aus *E. coli* isolierte genomische DNA (2.2.1). Für Negativkontrollen wurde steriles Wasser anstelle der DNA verwendet. Genspezifische Oligonukleotide (Tab. 2) und die gebräuchlichen DNA-Polymerasen *Pfu* aus *Pyrococcus furiosus* bei den Genen *dxs* und *gcpE* und *Taq* aus *Thermus aquaticus* bei allen anderen Genen kamen mit den vom Hersteller mitgelieferten Pufferlösungen zum Einsatz. Einleitend zu jeder Polymerasekettenreaktion erfolgte eine Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 °C. Es schloss sich ein 30 Zyklen umfassender Reaktionsablauf von Denaturierung für 30 s bei 94 °C, Annealing für 30 s bei 50 °C und Kettenverlängerung an.

Die Zeiten für die Kettenverlängerungen betragen bei einer Temperatur von 72 °C bei *dxs* 3 min, bei *ispD*, *ispE*, *ispF* und *idi* aus *C. sativa* 45 s und bei *xylB*, *gcpE* und *lytB* 1 min, 45 s. Die benötigte Zeit ist abhängig von der Anzahl an Basenpaaren der zu amplifizierenden Matrizen-DNA (ca. 1000 Basenpaare/min). Das PCR-Programm wurde abgeschlossen mit einer DNA-Polymerisation für 7 min bei 72 °C und der anschließenden Abkühlung auf 4 °C.

Für *idi* aus *E. coli* kam ein abgewandeltes PCR-Programm (Touch Down) zum Einsatz:

- Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 °C
- 3 Zyklen: Denaturierung – 30 s, 94 °C, Annealing – 30 s, 55 °C und Kettenverlängerung – 50 s, 72 °C
- 30 Zyklen: Denaturierung – 30 s, 94 °C, Annealing – 30 s, 50 °C und Kettenverlängerung – 50 s, 72 °C
- DNA-Polymerisation für 5 min bei 72 °C und Abkühlung auf 4 °C.

Das Gene Amp[®] PCR System 9700 der Firma PE Applied Biosystems (Darmstadt) wurde für die PCR-Reaktionen eingesetzt. Den mit *Pfu*-DNA-Polymerase gewonnenen DNA-Fragmenten wurde vor der TOPO[®] Cloning Reaktion ein 3'-A-Überhang angefügt. Die Überprüfung der DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung im Agarosegel (2.2.3). Die daraus isolierten DNA-Abschnitte standen für Klonierung (2.2.4), Transformation (2.2.5) und Sequenzierung (2.2.6) zur Verfügung.

2.2.3 Trennung von DNA über Agarosegele

DNA-Fragmente wurden in 1 - 1,5%igen Agarosegelen (Agarose in 1 x TAE-Puffer) aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 2001). Für eine spätere Visualisierung der DNA wurde dem Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. DNA-Proben wurden mit 0,2 VT DNA-Gelladepuffer, Sigma (Taufkirchen), versetzt. Als Längenstandard diente 1 kB DNA Marker oder 100 bp DNA Marker. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer mit 1 x TAE-Puffer (50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA) befüllten horizontalen Elektrophoreseeinheit, Biometra (Göttingen), in 1 - 3 h bei einer Spannung von 80 - 110 V. Mit dem Gel Doc 1000-System, BioRad (München), konnten die gefärbten Gele dokumentiert werden.

Nach elektrophoretischer Trennung der DNA wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen (Hilden) wurden die DNA-Fragmente isoliert.

2.2.4 Klonierung

2.2.4.1 Klonierung mit dem TOPO[®]-Vektor-System

Die Klonierung des PCR-Produkts in den pCR[®]T7/NT TOPO[®]-Vektor erfolgte mit dem mitgelieferten Puffer laut Angabe des Herstellers Invitrogen für 15 min bei RT. Das TOPO[®] Cloning System stellt eine effektive Methode zur Klonierung dar. DNA-Fragmente mit einem einfachen Desoxyadenosin am 3'-Ende werden durch Katalyse der Topoisomerase I leicht in den offenen TOPO[®]-Vektor mit einfachem 3'-Desoxythymidin-Überhang kloniert. Dieser Vektor enthält einen Sequenzbereich, der für sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren Histidin codiert, was eine Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins mit der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie erlaubt.

2.2.4.2 Klonierung in den pHIS 8-3-Vektor

Vor der Ligation wurde der Vektor an den Schnittstellen für *BamH* I und *EcoR* I mit den Restriktionsenzymen in einer Reaktion bei 37 °C über Nacht geöffnet und anschließend mit dem MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen (Hilden), gereinigt. Das unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits, Qiagen, gereinigte PCR-Produkt wurde bei gleichen Inkubationsbedingungen mit denselben Restriktionsenzymen behandelt. Die Ligation erfolgte durch 3 Units T4 DNA-Ligase, Promega, in dem dazugehörigen Puffer für 90 min bei RT.

2.2.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

Die Herstellung kompetenter Zellen der *E. coli*-Stämme DH5 α und BL21(DE3) beruht auf der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970). Sie wurde nach den Protokollen von Hanahan (1983) und Hanahan *et al.* (1991) durchgeführt. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation des *E. coli*-Stammes DH5 α wurden 2 μ l des Klonierungsprodukts zu 200 μ l kompetenten Zellen gegeben. Vom Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) wurden 200 μ l kompetente Zellen mit 2 μ l einer Plasmid-Lösung (10 ng/ μ l) versetzt. Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte durch Hitzeschock für genau 30 s bei 42 °C und sofortiger Kühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium erfolgte die Inkubation für 1 h bei 37 °C. Die transformierte Bakterienkultur wurde auf LB-Agar-Medium (1,5 % Agar in LB-Medium (2.3.1) Sambrook *et al.*, 2001) ausgestrichen, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt (2.3.1). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose (Sambrook *et al.*, 2001).

Die nach der Transformation in den *E. coli*-Stamm DH5 α erhaltenen Bakterienkolonien wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Plasmids geprüft. Als Oligonukleotide kamen T7 TOPO – Sense-Primer – und der dem jeweiligen Gen zugehörige Antisense-Primer zum Einsatz. Die PCR erfolgte mit der *Taq*-DNA-Polymerase unter Verwendung des gleichen PCR-Programms. Aus positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und im Anschluss sequenziert (2.2.6).

2.2.6 Sequenzierung von DNA

Nach der Selektion positiver Klone wurden QIAprep-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) zur Gewinnung der Plasmid-DNA eingesetzt. Die Isolation aus Bakterien-Übernachtskulturen erfolgte mit den im QIAprep[®] Spin Miniprep Kit vorhandenen Puffern anhand des Herstellerprotokolls. Die erhaltene Plasmid-DNA stand zur Sequenzierung zur Verfügung. Die DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems (Darmstadt), basiert auf der Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide (Sanger *et al.*, 1977). *Taq*-DNA-Polymerase, dNTPs, je nach Base mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide und ein Primer wurden zur Amp-

lifikation der DNA eingesetzt. Der ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, wurde zum Sequenzieren verwandt. Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte kapillarelektrophoretisch. Die vier unterschiedlichen Farben wurden mit Hilfe eines Lasers detektiert. Auf Basis der Längenauftrennung ergab sich die Nukleotidsequenz. Zur Überprüfung der durch DNA-Sequenzierungen erhaltenen Sequenzen kam die Lasergene Software (DNA STAR) zum Einsatz. Anschließend erfolgte die Transformation korrekter Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) (2.2.5).

2.3. Methoden der Proteinchemie

2.3.1 Überexpression in *E. coli*

Die durch Polymerasekettenreaktion (2.2.2) gewonnenen DNA-Abschnitte von *dxs*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *xylB*, *gcpE*, *lytB* und *idi* von *E. coli* standen nach Klonierung in den pCR[®]T7/NT TOPO[®]-Vektor (2.2.4.1), Plasmidisolierung und Sequenzierung (2.2.6) für die Transformation (2.2.5) in *E. coli* BL21(DE3) zur Verfügung. Auf vergleichbarem Weg konnte der Stamm für die IDP-Isomerase aus *Cannabis sativa* gewonnen werden, jedoch erfolgte die Klonierung in den pHIS 8-3-Vektor (2.2.4.2). Der Stamm M15-pQEDXRECO für die DXP-Reduktoisomerase aus *E. coli* (mit Histidin-Fusion) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. F. Rohdich vom Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München bereitgestellt, wofür ich mich hiermit vielmals bedanke. Die Anzucht der Expressionsstämme bei 37 °C erfolgte auf Agarplatten (1,5 % Agar) bzw. als Suspensionskultur (bei 175 Umdrehungen pro Minute geschüttelt) in Luria-Bertani-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl pH 7,0; Sambrook *et al.*, 2001). Zur selektiven Kultivierung wurde die durch Plasmide vermittelte Antibiotika-Resistenz genutzt. Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium sterilfiltrierte Antibiotikallösungen zugesetzt (Rotilabo[®]-Spritzenfilter, Polyvinylidenfluorid-Filter, 0,45µm, Roth).

Für die Startkultur der Proteinexpression wurde eine Bakterienkolonie in 50 ml LB-Medium gegeben, das mit 1 % Glucose und dem Antibiotikum versetzt war, und etwa 6 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 50 µg/ml Ampicillin wurde als Antibiotikum für die Expressionsstämme von DXS, IspD, IspE, IspF, XylB, GcpE, LytB und der IDP-Isomerase aus *E. coli* eingesetzt. Für den DXR-Expressionsstamm kamen 180 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin zum Einsatz. Dem Expressionsstamm für die IDP-Isomerase aus *C. sativa* wurde 50 µg/ml Kanamycin als Antibiotikum zugegeben. Die Startkultur wurde zu 950 ml vorgewärmtem antibiotikahaltigen LB-Medium gegeben und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 (Wellenlänge 600 nm) bei gleichen Bedingungen inkubiert. Durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Proteinsynthese induziert. Die Bakterienkulturen wurden 4 h bei 28 °C und 200 rpm geschüttelt. Zur Abtrennung des Mediums nach der Expression wurde für 10 min bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurden die Bakterien in Talon-Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol), der zusätzlich 750 μ g/ml Lysozym und 1 % (v/v) Tween 20 enthielt, resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch 2 x 30 s lange Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellfragmente durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g abgetrennt.

2.3.2 Reinigung über Affinitätschromatographie

Für die Reinigung der rekombinanten Proteine wurde Talon-Harz, BD Biosciences Clontech (Heidelberg), eingesetzt. Dieses ist ein kobalthaltiges Harz für die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Es ermöglicht die Reinigung rekombinanter Proteine mit Polyhistidin-Tag am N- oder C-Terminus. Das Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie basiert auf einer reversiblen Interaktion zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten, vor allem von Histidin und Cystein, und immobilisierten Metallionen (Porath *et al.*, 1975). Die Komplexbindungen können durch Zusatz von Imidazol gelöst und die gereinigten Proteine eluiert werden. 2 ml Talon-Harz wurden zweimal mit je 10 ml Talon-Waschpuffer versetzt und zentrifugiert (2 min, 4 °C, 700 x g). Der nach dem Aufschluss der Zellen durch Zentrifugation erhaltene Überstand wurde zum equilibrierten Talon-Harz gegeben. Zum Binden des Harzes an den His-Tag wurde für 60 min bei 4 °C und 30 rpm geschüttelt. Der durch nachfolgende Zentrifugation (5 min, 4 °C, 700 x g) gewonnene Überstand enthielt die nicht gebundenen Proteine und wurde verworfen. Das Talon-Harz wurde zweimal mit dem Waschpuffer behandelt und anschließend in 2 ml des Puffers aufgenommen. Die Suspension wurde in eine Gravitations-Einwegsäule, BD Clontech, gegeben und nach Absetzen mit 5 ml Puffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit je fünf mal einem ml Elutionspuffer – dieser ist identisch mit dem Talon-Waschpuffer, enthält aber mit 250 mM eine deutlich höhere Imidazol-Konzentration – in fünf Fraktionen gewonnen. Die das rekombinante Protein enthaltenden Fraktionen 1, 2 und 0,5 ml der Fraktion 3 wurden zu 2,5 ml vereinigt und über eine mit Lagerungspuffer äquilibrierte PD 10-Säule, Amersham Biosciences (Freiburg), von Imidazol und NaCl befreit. 3 ml umgepuffertes Protein wurde gewonnen, dessen Konzentration ermittelt (2.3.4) und mittels SDS-PAGE die Proteinreinheit bestimmt (2.3.3).

Lagerungspuffer

<u>DXS</u>	<u>DXR, IspD, IspE,</u>	<u>IDP-Isomerasen aus</u>
200 mM Natriumcitrat pH 6,0	<u>IspF, XylB, GcpE, LytB</u>	<u><i>E. coli</i> und <i>C. sativa</i></u>
1 mM Dithiothreitol	100 mM Tris-HCl pH 7,5	20 mM Tris-HCl pH 7,0
0,4 mM EDTA	1 mM Dithiothreitol	1 mM Dithiothreitol
20 % (v/v) Glycerol	10 % (v/v) Glycerol	1 mM Magnesiumchlorid
		10 % (v/v) Glycerol

2.3.3 Trennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Aussage über die Reinheit einzelner Proteinfraktionen und zur Bestimmung der Molekulargewichte fand die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) Verwendung. Die Methode basiert auf einer Vereinheitlichung der Nettoladung der zu trennenden Proteine. Durch Zugabe des Detergenz SDS vor der Auftrennung der Enzyme kommt es zur Denaturierung. Vorhandene Disulfidbrücken werden mit Hilfe von β -Mercaptoethanol gespalten. Durch gleichzeitiges Auftragen von Größenstandards (Proteinmolekulargewichtsmarker, Fermentas) konnte das Gel kalibriert werden.

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese stand eine vertikale Elektrophoreseeinheit mit dazugehörigen Glasplatten, Klammern, Spacern und Kämmen der Firma Biometra (Göttingen) zur Verfügung. Zur Herstellung der Gele wurde Rotiphorese[®] Gel 30 der Firma Roth (Karlsruhe) eingesetzt, eine gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1. Nach Zusammensetzung der Komponenten des Trenngels wurde die Lösung vorsichtig zwischen 2 Glasplatten gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren und Verwerfen des Isopropanols wurde der verbleibende Zwischenraum mit Sammelgel aufgefüllt. Um die zum Beladen des Gels erforderlichen Probetaschen zu erhalten, wurde sofort der Kamm in das Sammelgel eingebracht. Nach Polymerisation des Sammelgels und Entfernen des Kammes war das Gel gebrauchsfertig.

Das Gel wurde in die mit 1 x Elektrodenspuffer befüllte Elektrophoreseeinheit eingespannt. Ein 20 μ g Protein entsprechendes Volumen wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Gelladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels gegeben. Falls die zu untersuchende Proteinlösung zu verdünnt war, erfolgte durch Acetonfällung eine Aufkonzentrierung. Dazu wurde ein 20 μ g Protein entsprechendes Volumen mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt, zentrifugiert und der Rückstand in Wasser gelöst. Somit stand das Protein zur SDS-PAGE zur Verfügung. Die Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde bei einer Spannung von 100 V erreicht.

Zur Färbung und Detektion von aufgetrennten Proteinen wurde das Gel in Coomassie Brilliant Blue G 250-Färbelösung inkubiert (etwa 1 h bei 30 rpm). Durch Schwenken des Gels in Entfärbelösung (etwa 2 - 3 h bei 30 rpm) wurde überschüssiger, nicht gebundener Farbstoff entfernt und die Proteinbanden sichtbar.

Zusammensetzung	Trenngel, 12 %	Sammelgel, 6 %
1,5 M Tris-HCl pH 8,0	2,5 ml	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8		1250 μ l
20 % (m/v) SDS-Lösung	50 μ l	25 μ l
Wasser	3,4 ml	3075 μ l
Acrylamid/Bisacrylamid	4,0 ml	670 μ l
10 % (m/v) Ammoniumpersulfat-Lösung	50 μ l	25 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

5 x Elektrodenpuffer	Gelladepuffer	
1,5 % (w/v) Tris	Tris	36,3 mg
7,2 % (w/v) Glycin	SDS	600 mg
0,5 % (w/v) SDS	EDTA	9,0 mg
1 x Elektrodenpuffer	Bromphenolblau	3,0 mg
1 VT 5 x Elektrodenpuffer	Glycerol	3,0 ml
verdünnt mit 4 VT Wasser	β-Mercaptoethanol	1,5 ml
	Wasser	zu 10,0 ml
Färbelösung	Entfärbelösung	
0,1 % Coomassie Brilliant	30 % (v/v) Methanol	
Blue G 250 in Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure	

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration an Protein erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Sie beruht auf der Bindung der Proteine an den in Säure gelösten Farbstoff Coomassie Blue Brilliant G 250. Der Gehalt der Probe konnte durch Detektieren der Absorption bei 595 nm gegen eine Eichgerade, die mit Rinderserumalbumin als Standardprotein erstellt wurde, ermittelt werden.

2.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Eine Unit (Einheit) entspricht der Enzymmenge, die ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt.

2.4.1 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase – DXS

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 6 mM D-GAP und 4 mM Pyruvat mit 1,5 mM Thiamindiphosphat, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT und 0,4 mM EDTA in 200 mM Natriumcitrat-Puffer pH 6,0 in einem Gesamtvolumen von 50 µl umgesetzt. Nach Zugabe von DXS erfolgte für eine Stunde die Inkubation bei 37 °C. Die Papierchromatographie in LM1 oder LM5 fand für die Überprüfung der Reaktion Verwendung (2.7.1). Von der zu untersuchenden Lösung wurde jeweils ein Aliquot aufgetragen. Detektiert wurde mit den für DXP und Pyruvat beschriebenen Sprühreagenzien (2.7.1.3).

Alternativ konnte dem Ansatz zum Aktivitätstest 100.000 cpm (0,321 nmol) [U-¹⁴C₃]Pyruvat (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) zugesetzt werden, um die Reaktion anhand der radioaktiven Markierung zu verfolgen. In LM1 oder LM5 wurden die Substanzen (je ein Aliquot) auf Papier getrennt (2.7.1) und nach Trocknen der Chromatogramme mit dem Radio-DC-Scanner oder dem Phosphorimager detektiert (2.8.2).

2.4.2 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat-Reduktoisomerase – DXR

Die enzymatische Aktivität wurde durch Umsetzung von 0,3 mM DXP und 100.000 cpm [3,4,5-¹⁴C₃]DXP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) mit 300 nM NADPH und 5 mM MgCl₂ überprüft. Als Puffer kam 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zum Einsatz. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Nach Proteinzugabe wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Überprüfung erfolgte durch Einspritzen der 50 µl Reaktionsansatz in die HPLC (2.7.2).

Alternativ erfolgte nach Reaktionsabbruch durch zweiminütige Inkubation bei 95 °C und anschließender Kühlung des Reaktionsansatzes im Eisbad der Zusatz von 0,5 U Alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1) zur Dephosphorylierung. Die Inkubation fand für eine weitere Stunde bei 37 °C statt. Der Nachweis der dephosphorylierten Verbindungen erfolgte dünn-schichtchromatographisch auf DC1 in LM3 (Auftragen von Aliquoten), wobei zweimal entwickelt wurde (2.7.1). Detektiert wurden 1-Deoxy-D-xylulose und 2C-Methyl-D-erythritol mit dem Phosphorimager (2.8.2).

2.4.3 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase – IspD

Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte durch Umsetzung von 0,2 mM MEP, 100.000 cpm [¹⁴C]MEP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) und 5 mM CTP in einem Volumen von 50 µl. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 100 mM Tris-HCl pH 8,0 als Puffer. Für eine Stunde wurde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss konnte das Gesamtvolumen mittels HPLC (2.7.2) analysiert werden.

2.4.4 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase – IspE

Zur Überprüfung der Aktivität des Enzyms erfolgte ein Reaktionsansatz mit 0,2 mM CDP-ME, 100.000 cpm [¹⁴C]CDP-ME (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) und 5 mM ATP. Als Puffer diente 100 mM Tris-HCl pH 8,0. Das Endvolumen betrug 50 µl. Außerdem waren 5 mM MgCl₂ und 5 mM DTT zugesetzt. Nach Zugabe von IspE erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C, bevor das Gesamtvolumen in die HPLC (2.7.2) injiziert wurde.

2.4.5 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase – IspF

100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂ und 5 mM DTT wurden mit 0,2 mM CDP-MEP, 100.000 cpm [¹⁴C]CDP-MEP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) und dem Protein für die Bestimmung der Aktivität der IspF zur Umsetzung gebracht. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Ein Aliquot der Untersuchungslösung wurde dünn-schichtchromatographisch (DC2) in LM4 getrennt (2.7.1) und mittels Phosphorimager detektiert (2.8.2).

2.4.6 Xylulokinase – XylB

Für den Aktivitätstest wurden 0,2 mM 1-Deoxy-D-xylulose (DX) und 100.000 cpm [¹⁴C]DX (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) zusammen mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂ und 5 mM ATP in einem Endvolumen von 50 µl umgesetzt. Nach Enzymzusatz erfolgte für eine Stunde die Inkubation bei 37 °C. Zur Überprüfung der Umsetzung wurde ein Aliquot auf ein Papierchromatogramm aufgetragen und in LM5 entwickelt (2.7.1). Mit dem Phosphorimager konnte das Chromatogramm ausgewertet werden (2.8.2).

2.4.7 GcpE und LytB

Die enzymatische Aktivität wurde durch Umsetzung von 0,5 mM cMEDP und 100.000 cpm [¹⁴C]cMEDP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) in 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 3,5 mM NaF und 2 mM DTT überprüft. Das Enzym GcpE bzw. beide Enzyme wurden zugesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C, bevor das Gesamtvolumen in die HPLC (2.7.2) injiziert wurde.

2.4.8 IDP-Isomerase

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurde 25 mM Hepes-KOH-Puffer pH 7,6 mit 10 mM MgCl₂, 3,5 mM NaF und 2 mM DTT versetzt, das Substrat, 50.000 cpm [1-¹⁴C]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol), zugegeben und mit der IDP-Isomerase aus *E. coli* bzw. *C. sativa* in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 30 min, 1 h oder 2 h und bei 30 °C oder 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Radio-HPLC (2.7.2).

Alternativ wurde der auf der Säurelabilität des Dimethylallyldiphosphat (DMADP) beruhende Nachweis der Umsetzung von IDP zu DMADP angewandt (Jones und Porter, 1985; Ramos-Valdivia *et al.*, 1997b). [1-¹⁴C]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) diente als Substrat für die enzymatische Charakterisierung der IDP-Isomerasen. Bei dieser Methode erfolgte der Reaktionsabbruch der enzymatischen Umsetzung durch Zusatz von 200 µl 12 M HCl in Methanol (20 % (v/v)). Nachdem 100 µl Wasser zum Gesamtansatz gegeben wurden, erfolgte die Inkubation für 20 min bei 37 °C. Zur Erfassung des Anteils an Gesamtradioaktivität wurde ein Aliquot in Szintillatorlösung vermessen. Nach der Hydrolyse erfolgte unter Zusatz von 400 µl Chloroform und kräftigem Mischen für 10 min auf einem Vortexer die Extraktion der alkoholischen Verbindungen. Zum Trennen der organischen und der wässrigen Phase wurde bei 2 min und 13.600 rpm zentrifugiert bevor Aliquote der Phasen zur Bestimmung des radioaktiven Anteils vermessen wurden. Aus der Aktivität der organischen Phase ließ sich auf den Anteil an DMADP schließen, welcher aus der Umsetzung von IDP mit der IDP-Isomerase hervorgegangen war. In den graphischen Darstellungen der Umsetzungen mit IDP-Isomerasen wurde die Bildung des aus der Hydrolyse des DMADP hervorgegangenen 3-Methyl-2-buten-1-ol aufgetragen.

2.5 Synthese von Intermediaten

2.5.1 Gewinnung von Pyruvat

Die Anzucht des zur Pyruvatproduktion befähigten *E. coli*-Stammes YYC202 (Gerharz *et al.*, 2001) erfolgte in LB-Medium (2.3.1) bei 37 °C und 175 rpm. Zur selektiven Kultivierung wurden dem Medium 10 µg/ml Tetracyclin zugesetzt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde 1 ml dieser Kultur in 20 ml M9-Minimalmedium gegeben, welches 10 µg/ml Tetracyclin enthielt und mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat versetzt war. Die Inkubation erfolgte unter gleichen Bedingungen für 24 h.

M9-Minimalmedium setzt sich zusammen aus 33,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H₂O (6,0 g/l), 20,0 mM Kaliumdihydrogenphosphat (3,0 g/l), 8,6 mM Natriumchlorid (0,5 g/l) und 7,6 mM Ammoniumchlorid (1,0 g/l). Nach dem Autoklavieren mussten 1,0 mM Magnesiumsulfat x 7 H₂O (247 mg/l) und 0,1 mM Calciumchlorid x 2 H₂O (14,7 mg/l) als sterile Lösungen zugesetzt werden. Dem M9-Medium wurden außerdem sterile Lösungen von 10 mM Glucose x H₂O (1,98 g/l) und 2 mM Natriumacetat (164 mg/l) zugegeben.

Zum Animpfen von 300 ml tetracyclinhaltigem M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat wurden 10 ml der 20 ml-Kultur verwendet und unter gleichen Bedingungen für 24 h inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Resuspendierung des Bakterienrückstandes erfolgte in 2 - 4 ml 50 mM MOPS-Puffer (10,47 g/l; Sigma M-1254), dessen pH-Wert mit Kaliumhydroxid-Plätzchen auf 7,0 eingestellt war. Zum Waschen wurden 150 ml dieses Puffers eingesetzt. Abzentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm, Resuspendieren in 2 - 4 ml 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 und Waschen mit 150 ml dieses Puffers wurden dreimal wiederholt, bevor das Bakterienpellet in 2 ml 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 aufgenommen wurde. Die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm erfolgte nach Verdünnung von 100 µl Zellsuspension mit 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 zu 1 ml.

2.5.2 Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat

Sowohl die im Folgenden aufgeführte Synthese als auch die Synthese von Isopentenylidiphosphat (2.5.3) wurden von Herrn Dr. Gao und mir durchgeführt. An dieser Stelle danke ich ihm sehr herzlich dafür. Eine Beschreibung der jeweiligen Synthese soll einen Einblick geben.

Bei Raumtemperatur wurde Dinatrium D-Fructose 6-phosphat (1,0 g, 3,3 mmol) mit 1,6 ml Wasser befeuchtet und unter Rühren (Magnetrührer) in 132 ml Eisessig gelöst. Nach Auflösen des Salzes und Zugabe von 0,36 ml konzentrierter Schwefelsäure (18 M) wurde Bleitetraacetat (5,9 g) in zehn Anteilen über 15 min verteilt zugesetzt. Nach 2 Stunden wurde 1,6 g Oxalsäuredihydrat zugegeben und das Rühren weitere 30 min fortgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Suspension für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm. Der erhaltene Überstand wurde mit einem Rotationsverdampfer bei 30 °C und Niederdruck (20 - 25 mbar)

zu etwa 5 ml aufkonzentriert. Nach Waschen des festen Rückstandes mit dreimal 20 ml Wasser und Vereinigen von Konzentrat und Waschlösungen erfolgte unter Rühren bei 4 °C für 15 min ein Zusatz von 3,3 g Bariumacetat. Die weiße Suspension wurde zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4000 rpm) und der feste Rückstand mit zweimal 5 ml Wasser gewaschen. Nach Vereinigen der Waschlösungen mit dem durch die Zentrifugation erhaltenen Überstand erfolgte zum Aufreinigen eine Behandlung mit 60 ml Dowex 50w x 8 (Fluka, protonierte Form des Harzes). Die durch Filtrieren der Suspension erhaltene saure Lösung wurde zu etwa 3 ml aufkonzentriert und zur Bildung von D-Glyceraldehyd 3-phosphat für 18 Stunden bei 25 °C aufbewahrt. Die Einstellung des pH-Wertes der resultierenden Lösung auf 5,5 erfolgte mit 2 M Natriumhydroxid-Lösung. Bei 4 °C wurde diese Lösung auf eine Säule (1,0 x 18 cm) mit DEAE-Sephadex A-25 (Acetat-Form) gegeben, mit wenig Wasser gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0,05 M bis 0,6 M Natriumacetat pH 5,5 eluiert. Die D-GAP enthaltenen Fraktionen – mittels Papierchromatographie überprüft – wurden vereinigt und bei 30 °C und Niedrigdruck (20 - 25 mbar) eingengt. 0,43 g bzw. 2,5 mmol der leicht gelb gefärbten, öligen Substanz konnten gewonnen werden, was einer Ausbeute von 77 % entsprach.

2.5.3 Synthese von Isopentenylidiphosphat

Die Synthese von Isopentenylidiphosphat aus dem korrespondierenden Alkohol erfolgte über zwei Reaktionsschritte (Abb. 10). Der erste Schritt beinhaltet die Aktivierung des Carbinyl-Kohlenstoffatoms. Anschließend kommt es durch das diphosphorylierende Reagenz zu einer Verdrängung an der aktivierten Position.

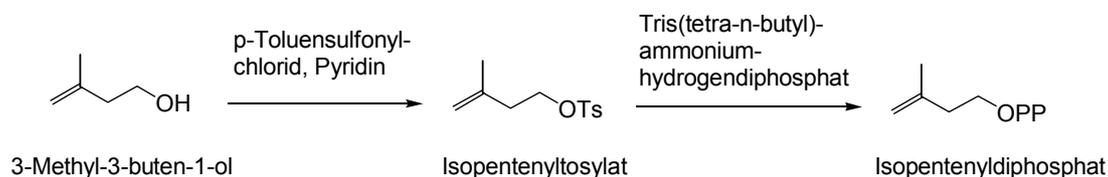


Abb. 10:
Synthese von Isopentenylidiphosphat

Unter Zuhilfenahme der in der Arbeitsgruppe von Poulter entwickelten Synthesevorschriften (Davisson *et al.*, 1985; Davisson *et al.*, 1986) konnte IDP hergestellt werden.

3-Methyl-3-buten-1-ol (43 mg, 0,5 mmol) wurden mit p-Toluensulfonylchlorid (105 mg, 0,55 mmol) und 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (73 mg, 0,6 mmol) in 2,5 ml Methylenchlorid versetzt. Das durch Extraktions- und Waschschriffe erhaltene ölige Isopentenyltosylat einer Ausbeute von 86 % konnte direkt für die Phosphorylierung verwendet werden.

Als diphosphorylierende Substanz wurde Tris(tetra-n-butylammonium)hydrogendiphosphat eingesetzt. Es stellt das entscheidende Reagenz bei der Synthese des organischen Diphosphat-esters dar. 3,25 g (3,6 mmol) dieser Substanz wurden in 3,5 ml Acetonitril gelöst, zu 3-Methyl-3-buten-1-yltosylat (288 mg, 1,2 mmol) gegeben und die erhaltene Lösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Einrotieren gewonnene, undurchsichtige Rückstand wurde in 3 ml Ionenaustauschpuffer (1:49 (v/v) Isopropanol:25 mM Ammoniumcarbonat)

gelöst. Die klare, farblose Lösung konnte nach Auftragen auf eine Kationenaustauschersäule (63,5 ml Säulenvolumen) in die Ammoniumform überführt werden. Als Matrix diente Dowex 50w x 8, (Fluka, Ammoniumform des Harzes). Nach dem Equilibrieren der Säule mit 2 Säulenvolumen Ionenaustauschpuffer erfolgte mit dem gleichen Volumen die Elution der Lösung. Durch Lyophilisation des Eluenten bis zur Trockne konnte 200 mg des weißen Isopentenylidiphosphat gewonnen werden, was einer Ausbeute von 67 % entsprach.

2.6 Untersuchungen an *Nicotiana benthamiana*

2.6.1 Infiltration von *N. benthamiana*

Durch Anwendung des VIGS-Systems („virus-induced gene-silencing“) (Baulcombe, 1999) kommt es zu einem TRV-vermittelten („tobacco rattle virus“) Ausschalten eines Gens, wodurch die Ausprägung phänotypischer Merkmale des betreffenden Gens beeinflusst wird. Verwendet wurde dieses Virus in Form der zwei Plasmide pTVØØ und pBINTRA6. Der Leervektor pTVØØ basiert auf der cDNA der RNA 2 des Tobacco Rattle Virus. In pTVØØ wurde eine cDNA-Sequenz des *idi*-Gens kloniert, um das Plasmid pTV Nb IDI zu erhalten (Page *et al.*, 2004). Bei pBINTRA6 handelt es sich um den Volllänge-klon der RNA 1 des Tobacco Rattle Virus. Durch Infiltration von *N. benthamiana* Pflanzen mit pTV Nb IDI und pBINTRA6 kommt es zum Ausschalten der IDP-Isomerase. Durch das als Positivkontrolle eingesetzte Plasmid pTV Nb PDS wird die Phytoen-Desaturase (*pds*), ein essenzielles Gen der Carotinoid-Biosynthese, TRV-vermittelt ausgeschaltet (Ratcliff *et al.*, 2001). Daraufhin kommt es bei infizierten Pflanzen zum Ausbleichen der für die Photosynthese verantwortlichen Regionen und somit zur Ausbildung weißer Blätter.

A. tumefaciens (2.1.1) mit einem pTV-Konstrukt oder dem Plasmid pBINTRA6 wurden in LB-Medium (2.3.1) mit Selektion durch 50 µg/ml Kanamycin, 20 µg/ml Rifampicin und 5 µg/ml Tetracyclin bei 28 °C über Nacht inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 4 °C, 4000 rpm) wurden die Bakterien in Resuspensionspuffer (1 mM MES pH 5,0, 10 mM MgCl₂, 100 mM 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon) zu einer OD₆₀₀ = 1 aufgenommen. Die Agrobakterien standen für 2 - 4 h bei Raumtemperatur, bevor die Suspensionen, die das pBINTRA6- und das jeweilige pTV-Konstrukt enthielten, im Verhältnis von 1:1 (v/v) gemischt wurden. Mit einer sterilen 2 ml Einwegspritze der Firma Braun (Melsungen) wurde die Unterseite von zwei höheren Blättern der fünf Wochen alten Pflanzen infiltriert. Die Infiltration der *N. benthamiana* Pflanzen erfolgte mit den Plasmiden pBINTRA6 und pTV Nb IDI, pTVØØ oder pTV Nb PDS als Positivkontrolle. Die mit pBINTRA6 und pTVØØ infizierten Pflanzen dienten als Kontrolle, da das pTVØØ-Konstrukt keinen zusätzlichen pflanzlichen cDNA-Abschnitt enthält. Für makro- und mikroskopische Untersuchungen, Bestimmungen des Carotinoid- und Chlorophyllgehaltes und Applikationsexperimente wurden etwa zehn Wochen alte Blätter verwendet, die charakteristische Merkmale des Virussilencing zeigten.

2.6.2 Mikroskopische Untersuchungen

Die zu untersuchenden *N. benthamiana* Blätter der mit pTV Nb IDI infizierten und Leervektorpflanzen wurden per Hand geschnitten. Zum Mikroskopieren wurden die Schnitte in auf einem Objektträger befindliches Wasser gegeben. Die Anfertigung von lichtmikroskopischen Aufnahmen (Vergrößerung 1:40) erfolgte mit dem Axioskop 20 mit eingebauter Kamera. Vergleichend wurde die Fluoreszenz der Objekte bei folgenden Wellenlängen betrachtet: Bandpass 546 nm, Farbteiler 580 nm, Langpass 590 nm. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Hochdrucklampe. Für die Hilfestellung von Herrn Dr. G. Hause möchte ich mich herzlich bedanken.

2.6.3 Carotinoid- und Chlorophyllbestimmung

Vier bis fünf Wochen nach der Infiltration der *N. benthamiana* Pflanzen wurden die Carotinoide und Chlorophylle aus den Blättern, basierend auf einer nach Fraser *et al.* (2000) modifizierten Methode (Page *et al.*, 2004), extrahiert. Als Ausgangsmaterial wurden Blätter der mit pTV Nb IDI infizierten Pflanzen und der pTVØØ-Leervektorpflanzen eingesetzt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser pulverisiert. Zur Extraktion wurden 100 - 150 mg pulverisiertes Blattmaterial mit 300 µl Methanol versetzt und für 5 min bei 4 °C mit 60 rpm auf einem Rotationsschüttler bewegt. Es wurde nach Zugabe von 300 µl Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl) für 5 min und von 800 µl Chloroform für 10 min bei gleichen Bedingungen weiter geschüttelt. Durch Zentrifugieren (5 min, 4 °C, 3000 rpm) erfolgte die Trennung der wässrigen und organischen Phasen. Die organische Phase wurde mit einem Vakuum-Konzentrator bis zur Trockne eingengt und die Pigmentrückstände für die spektralphotometrische Analyse in 500 µl Aceton aufgenommen. Ein Aliquot der resultierenden Lösung wurde mit dem Spektralphotometer bei den Wellenlängen 470 nm, 645 nm und 662 nm direkt oder nach Verdünnung vermessen. Der Gehalt an Carotinoiden und Chlorophyllen wurde, wie von Lichtenthaler (1987) beschrieben, für 100 % Aceton kalkuliert.

Der Chlorophyllgehalt von Chloroplasten wurde nach der Methode von Joyard *et al.* (1987) bestimmt. Dazu wurden 10 ml 80 % (v/v) Aceton mit 10 µl Chloroplastensuspension versetzt und zentrifugiert (10 min, 4500 x g). Die Bestimmung der Absorption des Überstandes gegen 80 % (v/v) Aceton erfolgte bei 652 nm. Die Chlorophyllkonzentration der untersuchten Chloroplastensuspension wurde mit der Formel Chlorophyll [mg/ml] = $OD_{652} \times 26$ ermittelt.

2.6.4 Applikation markierter Vorstufen an *N. benthamiana*

Für Applikationsexperimente wurden die am Blattstiel abgelösten Blätter in den unteren abgetrennten Teil eines 500 µl Eppendorf-Gefäßes gestellt, das eine wässrige Lösung der markierten Vorstufe enthielt. Nach Aufnahme der Substratlösung wurde über einen Zeitraum von 8 h je 100 µl und nachfolgend über Nacht ein ausreichendes Volumen an Wasser zugegeben. Das darüber hinausgehende weitere Vorgehen ist im Ergebnisteil beschrieben.

2.6.5 Präparation von Chloroplasten von *N. benthamiana*

Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise zur Präparation von Chromoplasten (Fellermeier, 2000). Es wurden 3,0 g Blattgewebe (ca. 20 cm² Blattmaterial) mit 60 ml eisgekühltem Aufschlusspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, 0,4 M Saccharose) versetzt und mit einem Ultraturrax für 20 s homogenisiert. Nach Filtration des Homogenates durch Nylongaze (4 Lagen, 50 µm Maschenweite, Verseidag Techfab GmbH) wurde das Filtrat für 10 min bei 4 °C und 3076 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet zum Waschen vorsichtig in 20 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 300 µl Resuspensionspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,0, 1 mM DTE, 70 % (w/v) Saccharose). Die erhaltene Chloroplastensuspension wurde in ein Ultra-Clear-Zentrifugengefäß (11 x 60 mm, Beckman) überführt und mit je 7 ml Saccharoselösungen folgender Konzentrationen überschichtet: 62,5; 55; 47,5; 40; 35 und 30 % (w/v) Saccharose in Gradientenpuffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,0 und 1 mM DTE). Durch Zentrifugation mit der Ultrazentrifuge Pro 80 für 1h bei 4 °C und 15.000 rpm kam es zu einer Anreicherung der Chloroplasten entsprechend ihrer Dichte an den Grenzschichten zwischen den einzelnen Saccharosekonzentrationen. Im Anschluß wurden die chloroplastenhaltigen Zwischenschichten mit einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen, mit dem fünffachen Volumen an Gradientenpuffer gewaschen und abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 3076 x g). Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren erfolgte nach Verwerfen des Überstandes die Resuspendierung des Rückstandes in maximal 100 µl Gradientenpuffer. Jede Fraktion wurde hinsichtlich des Chlorophyllgehaltes analysiert (Methode von Joyard *et al.* (1987) 2.6.3).

2.7 Chromatographische Methoden

2.7.1 Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie

Die Analyse von Enzymreaktionen als auch von Carotinoiden und Sterolen erfolgte mittels Dünnschicht- (DC) oder Papierchromatographie (PC).

2.7.1.1 Papierchromatographie

Chromatographie-Papier: 2043B, 0,22 mm dick, 580 x 600 mm, Schleicher & Schüll (Dassel)

2.7.1.2 Dünnschichtchromatographie

- DC1 Fertigfolie: POLYGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄, 0,2 mm Kieselgel mit Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄, 20 x 20 cm Macherey-Nagel (Düren)
- DC2 Fertigfolie: POLYGRAM[®] SIL N-HR/UV₂₅₄, 0,2 mm Kieselgel N-HR/UV₂₅₄, 20 x 20 cm Macherey-Nagel (Düren)
- DC3 DC-Alufolie 20 x 20 cm, Cellulose, Merck (Darmstadt)

2.7.1.3 Laufmittelsysteme und Detektion

Die Analytik enzymatischer Reaktionen erfolgte mit nachfolgend aufgeführten Laufmitteln:

Laufmittelsystem		VT	Chromatogramm
LM1	1 M Ammoniumacetat-Lösung pH 5,0	30,0	PC
(Schreyer und Böck, 1973)	95 % Ethanol, vergällt	70,0	
	0,1 M EDTA-Dinatriumsalz	1,0	
LM2	tert-Butanol	150,6	PC
	Ameisensäure	39,0	
	Wasser	60,0	
LM3	Chloroform	7,0	DC1
	Methanol	2,0	
	Wasser	0,2	
LM4	Isopropanol	6,0	DC2
	Ethylacetat	1,0	
	Wasser	3,0	
LM5	Ethylacetat	3,0	PC
	Essigsäure	3,0	
	Wasser	1,0	

Sterole wurden mit Dichlormethan als Laufmittel (LM6) dünnschichtchromatographisch (DC1) analysiert. Für die DC-Trennung von Carotinoiden (DC1) standen Systeme aus Hexan und Diethylether im Verhältnis 6:4 (LM7) sowie aus Hexan und Toluol im Verhältnis 9:1 (LM8) zur Verfügung (Fellermeier, 2000). Carotinoide (β -Carotin, Phytoen), Chlorophylle und Xantophylle konnten in Hexan:Isopropanol:Wasser im Verhältnis 100:12:0,25 (LM9) dünnschichtchromatographisch (DC1) aufgetrennt werden.

Die Detektion der Banden erfolgte durch UV-Löschung bei 254 nm bzw. Fluoreszenz bei 366 nm und wenn möglich mit Sprühreagenzien. Wenn eine Referenzsubstanz aufgetragen worden war, wurde mit dieser verglichen. Die Auswertung radioaktiv markierter Substanzen auf Chromatogrammen erfolgte mittels Radio-DC-Scanner bzw. Phosphorimager (2.8.2).

Detektion Sprühreagenzien

DXP	Ethylendiaminsulfat (10%ige wässrige Lösung, 10 min Erhitzen bei 100 °C)
Pyruvat	2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,5 g in 50 ml 2 N HCl)
Sterole	Anisaldehyd-Schwefelsäure (Stahl und Kaltenbach, 1961) (0,5 ml Anisaldehyd in 50 ml Essigsäure unter Zusatz von 1 ml Schwefelsäure lösen; nach dem Besprühen bei 100 - 105 °C bis zur maximalen Farbintensität der Spots erwärmen) Molybdato-Phosphorsäure (10%ige gesättigte Lösung in Ethanol, nach dem Besprühen bei 100 - 120 °C erwärmen)

2.7.2 HPLC

Die Ionenpaar-reversed-Phase HPLC-Methode nach McCaskill und Croteau (1993) in Abwandlung von Fellermeier (2000) erwies sich für die chromatographische Analyse von phosphorylierten Verbindungen als zweckdienliches Trennsystem. Zum Einsatz kam eine Luna C8 (2), 250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße (00G-4249-E0) als Trennsäule mit der Luna C8 (2), 4 x 3 mm, 5 µm Partikelgröße (AJ0-4290) als Vorsäule. Luna C8 (2) ist ein Material der Firma Phenomenex (Aschaffenburg), das aus sphärischem Kieselgel mit C8-Ketten an der Oberfläche besteht. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 50 µl oder 100 µl. Das Laufmittelsystem bestand aus zwei Eluenten – A: 10 mM TBAS in Wasser und B: 10 mM TBAS in 70 % (v/v) Methanol. Eine 200 mM Stocklösung von tetra-n-Butylammoniumhydrogensulfat (TBAS) pH 6,0 (eingestellt mit festem Na₂HPO₄) wurde zur Herstellung der Eluenten A und B eingesetzt. Bei einer Flussrate von 0,75 ml/min wurde die Säule mit folgendem Gradientenprogramm entwickelt:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
20	100	0
80	40	60
85	100	0
100	100	0

Zur Detektion stand der Radio-Detektor Ramona 2000, Raytest, bzw. der Diode Array Detektor L-7450 zur Verfügung. Eine zum Teil auftretende Verschiebung der Retentionszeiten von bis zu 2 min ist auf die Auslastung dieses Trennsystems zurückzuführen.

Alternativ zu diesem Radio-HPLC-Verfahren wurde ein neues Gradientensystem zur Trennung von Mono-, Di- und Triphosphat-Verbindungen entwickelt. Dadurch sollte eine Verkürzung der mit 100 min relativ langen Laufzeit erreicht werden. Für die HPLC-Anwendung wurde das Ionenpaar-Reagenz Tetrabutylammoniumphosphat (TBAP), Alltech (Unterhaching), eingesetzt. Laufmittel A setzte sich aus 0,05 M TBAP und 0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat zusammen. Mit Phosphorsäure erfolgte die pH-Wert-Einstellung auf 5,0. Dieser Anteil des Laufmittels A wurde mit 5 % (v/v) Methanol versetzt. Als Laufmittel B diente reines Methanol. Als Säule wurde eine Spermimage -80 ODS 2 (4 mm ID, Länge 10 cm, 3 µm Säulenmaterial) eingesetzt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde die Säule mit folgendem Gradientenprogramm entwickelt:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	99	1
20	30	70
25	99	1

Zur Detektion stand der Radio-Detektor Ramona 2000, Raytest, zur Verfügung.

2.7.3 Chromatographische Methoden zur Proteintrennung

Zur Trennung von Proteinen kam der ÄKTApurifier, Amersham Biosciences (Freiburg), mit der Software UNICORN, Version 4.0 zum Einsatz. Dieses ist ein Chromatographiesystem für die FPLC, die Fast Protein Liquid Chromatography. Die Proteintrennungen wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Erfassung von pH-Wert, Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm diente zur Detektion der Proteine.

Sofern notwendig wurden die Proben vor der Trennung über eine PD10-Säule (Fast Desalting Column HR 10/10) gegeben. Diese Gelfiltration mit Sephadex G 25 erfolgte zur Umpufferung und Entsalzung. Vor der Applikation der in Startpuffer gelösten Proteinprobe auf die Säule war eine Filtration durch 0,45 µm (Rotilabo[®]-Spritzenfilter, Polyvinylidenfluorid-Filter, Roth) erforderlich. Zum Equilibrieren der eingesetzten Trennsäulen wurde vor jedem Lauf mit Elutionspuffer und anschließend mit Startpuffer gewaschen. Die Proteinproben wurden jeweils mit Hilfe einer Probenschleife auf die Säule geladen. Die zwischen den einzelnen Trennungsschritten notwendige Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen und chromatographischer Fraktionen erfolgte mittels Jumbosep[™] 10K, Pall (Dreieich), oder Centriprep YM-10, Millipore (Eschborn), wobei die Trenngrenze jeweils 10 kDa betrug.

2.7.3.1 Ionenaustauschchromatographie

Als Trennsäule fand die HiPrep[™] 16/10 DEAE FF, Amersham Biosciences, Verwendung (Ø 16 mm x 100 mm, 20 ml Säulenvolumen). Die Säulenmatrix ist eine mit Diethylaminoethyl-Gruppen verknüpfte Sepharose. Die Säule wurde mit einer konstanten Flussrate von 2,5 ml/min betrieben. Die nach Ammoniumsulfat-Fällung erhaltene Probe (10 - 15 ml) wurde auf die mit 100 ml Startpuffer IC (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol) equilibrierte Säule geladen. Nach Waschen mit 2 Säulenvolumina erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 0 - 500 mM KCl in Startpuffer IC (Elutionspuffer IC) über 30 Säulenvolumina. Abschließend wurden weitere 5 Volumina Elutionspuffer IC über die Säule gepumpt. Gesammelt wurden Fraktionen von 12 ml.

Zur Ionenaustauschchromatographie am starken Anionenaustauscher kam die mit SOURCE 30Q gepackte XK16/20-Säule (Ø 16 mm x 130 mm) mit einem Volumen von 26 ml zum Einsatz. SOURCE 30Q, Amersham Biosciences, ist ein aus Polystyrol und Divinylbenzol zusammengesetztes, mit quarternären Ammoniumgruppen verknüpftes Kunststoffpolymer, das eine einheitliche Partikelgröße von 30 µm aufweist. Die mit Startpuffer IC über 3 Volumina equilibrierte Säule wurde mit einer konstanten Flussrate von 5 ml/min betrieben. An die Injektion der Probe (7 - 11 ml) schloss sich ein Waschschritt mit 2 Säulenvolumina an. Mit dem nachfolgend aufgeführten Stufengradienten konnten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (Elutionspuffer IC) die gebundenen Proteine über 30 Säulenvolumina von der Säule gewaschen werden, welche mit 2 Volumina nachgewaschen wurde. Die Fraktionsvolumina betragen 12 ml.

Nummer	<u>Gradient</u>	<u>Konzentration des Elutionspuffers</u> (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol, 500 mM KCl)
	Länge in Säulenvolumen	
1	12,1	38,8 %
2	2	38,8 %
3	0,5	30 %
4	0,5	30 %
5	2	45 %
6	3	45 %
7	0,5	40 %
8	0,5	40 %
9	9	100 %
10	5	100 %

2.7.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Fast-Flow-Säule HiPrep™ 16/10 Phenyl FF, Amersham Biosciences, wurde mit einer konstanten Flussrate von 2,5 ml/min eingesetzt. Die Phenylsepharose-Säule hat ein Volumen von 20 ml, 16 mm Durchmesser und 100 mm Länge. 20 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2 mM β-Mercaptoethanol mit 1 M Ammoniumsulfat über 5 Säulenvolumina dienten dem Equilibrieren der Säule. Nach dem Auftragen der Proteinprobe (8 - 10 ml) wurde mit 2 Volumina nachgewaschen. Mit dem Puffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2 mM β-Mercaptoethanol konnten die Proteine über den nachfolgenden mehrstufigen Gradienten bei Abnahme der Salzkonzentration bis auf Null und Fraktionssammlung (3 ml) eluiert werden. Mit 2 Säulenvolumina wurde die Säule nachgewaschen.

Nummer	<u>Gradient</u>	<u>Konzentration des Elutionspuffers</u> (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol)
	Länge in Säulenvolumen	
1	2	100 %
2	0	19 %
3	1,5	19 %
4	0	3 %
5	1,5	3 %
6	0	0 %
7	2	0 %
8	5	0 %

2.7.3.3 Chromatofokussierung

Zur Chromatofokussierung wurde die Fertigsäule MONO P HR 5/5 (1 ml Säulenvolumen, Ø 5 mm x 50 mm) eingesetzt. Das MONO P-Säulenmaterial, Amersham Biosciences, besteht aus so genannten MonoBeads, hydrophilen Polymerkügelchen, die mit einem Gemisch quarternärer und tertiärer Amine substituiert sind. Als Startpuffer CF diente mit gesättigter

Iminodiessigsäure eingestellter 25 mM Bis-Tris-Puffer pH 7,1 mit 2 mM β -Mercaptoethanol. 10 % (v/v) Polypuffer 74, Amersham Biosciences, mit gesättigter Iminodiessigsäure auf pH 4,0 eingestellt, und 2 mM β -Mercaptoethanol fanden als Elutionspuffer CF Verwendung.

Das Equilibrieren der Säule erfolgte mit 5 Säulenvolumina Startpuffer CF bei einer Flussrate von 1 ml/min. Nachdem 1 ml 5 N NaOH-Lösung bei 0,4 ml/min über die Säule gegeben wurden, folgte bis zur pH-Wert-Konstanz (7,1) ein Ausspülen mit Startpuffer CF. Mit Elutionspuffer CF wurde bis zu einem konstanten pH-Wert von 4,0 gespült. Die Behandlung mit NaOH-Lösung und Startpuffer CF musste wiederholt werden, bevor nach weiterem Equilibrieren mit 5 Volumina Startpuffer CF die Injektion der Probe (1,5 - 2,5 ml) möglich war. Die bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min betriebene Säule wurde mit 2 Säulenvolumina nachgewaschen. Die an die Säule gebundenen Proteine konnten mittels Elutionspuffer CF durch den sich einstellenden pH-Gradienten (pH-Wert 7,1 bis pH 4,0) in der Reihenfolge ihrer isoelektrischen Punkte abgelöst werden. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug jeweils 0,5 ml. Zur Reinigung wurde mit Startpuffer CF und 1,5 N NaCl-Lösung gewaschen.

2.8 Weitere Analysemethoden

2.8.1 Kernresonanz-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer Varian Mercury 300 aufgenommen. Frau Dr. Porzel, IPB Halle, danke ich vielmals für die Vermessung der Proben und die Hilfestellung bei der Auswertung der Resultate.

2.8.2 Erfassung der radioaktiven Markierung

Die zu untersuchenden ^{14}C -markierten Proben wurden zu 5 ml der Rotiszint[®] eco plus - Szintillatorlösung, Roth (Karlsruhe), gegeben und im Flüssigszintillationszähler LS-6000TA vermessen.

Nach der Auftrennung radioaktiv markierter Verbindungen mittels PC oder DC kam zur qualitativen und quantitativen Auswertung der getrockneten Chromatogramme der Radio-Dünnschicht-Scanner Tracemaster 20 zum Einsatz. Alternativ erfolgte die Beurteilung durch Auflage der Chromatogramme auf einen Phosphorimagerfilm (Fujifilm BAS MS 2040 Imaging Plate) für 15 - 30 h. Mit dem Phosphorimager und der dazugehörigen Software BASReader, Version 2.11a, Raytest (Straubenhardt), und Tina, Version 2.10i, Raytest, konnte ausgewertet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression von Enzymen des Alternativen Terpenbiosyntheseweges

Zur Analyse des Alternativen Terpenbiosyntheseweges sind die entsprechenden Zwischenstufen von entscheidender Bedeutung. Da aber Intermediate dieses Biosyntheseweges nicht kommerziell verfügbar sind, sollten sie in verschiedenen Markierungsmustern bereitgestellt werden. Die Darstellung unterschiedlich isotopenmarkierter Intermediate durch chemische Synthese erfordert bestimmte Durchführungsstrategien und ist daher häufig schwer auszuführen (Eisenreich *et al.*, 2004). Alternativ dazu können isotopenmarkierte Intermediate durch *in vivo*-Applikation und Isolierung aus der Pflanze sowie durch Einsatz isolierter Plastiden dargestellt werden. Wegen des hohen experimentellen Aufwandes und der oft nur geringen Ausbeute bei diesen Methoden wurde in dieser Arbeit die enzymatische Synthese zur Intermediat-Darstellung gewählt. Die Enzyme des Alternativen Terpenbiosyntheseweges wurden in Abschnitt 1.2.2 der Einleitung beschrieben. Da auch die Enzyme des DXP-Weges ebenso wie die benötigten Intermediate nicht kommerziell erhältlich waren, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit kloniert, exprimiert und auf ihre Aktivität hin überprüft.

3.1.1 Klonierung der Enzyme des Alternativen Terpenbiosyntheseweges

Für die *E. coli*-Enzyme wurden die codierenden Nukleotidsequenzen in der Datenbank (NCBI – National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov) herausgesucht. In Tabelle 3 sind Gen- und Protein-Bank-Nummern mit angegeben.

Tab. 3:
Enzyme des Alternativen Terpenbiosyntheseweges aus *E. coli*

Enzym	EC-Nummer	Gen-Bank-Nummer	Nukleotide [Basenpaare]	Protein-Bank-Nummer	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]
DXS	2.2.1.7	AF035440	1863	P77488	619	67,5
DXR	1.1.1.267	AB013300	1197	P45568 (P77209)	398	43,4
IspD	2.7.7.60	AF230736	711	Q46893	235	25,6
IspE	2.7.1.148	AF216300	852	P62615 (P24209)	283	30,9
IspF	4.6.1.12	AF230738	480	P62617 (P36663)	159	16,9
XylB	2.7.1.17	X04691	1455	P09099	484	52,6
GcpE	1.17.4.3	AY033515	1119	P62620 (P27433)	372	40,7
LytB	1.17.1.2	AY062212	951	P62623 (P22565)	316	34,8
IDP-Isomerase	5.3.3.2	AF119715	549	Q46822	182	20,5

Mit genspezifischen Oligonukleotiden (Tab. 2) der aus *E. coli* isolierten genomischen DNA und der DNA-Polymerase erfolgte die Polymerasekettenreaktion (2.2.2). Zur Überprüfung der PCR kam die Gelelektrophorese für DNA-Fragmente auf Agarosegelen zum Einsatz (2.2.3). Nach der Isolierung aus Agarosegelen erfolgte die Klonierung (2.2.4.1) des PCR-Produkts in den pCR[®]T7/NT TOPO[®]-Vektor (2.1.2) und die Transformation (2.2.5) in *E. coli* DH5 α . Die durch Transformation erhaltenen Bakterienkolonien mussten überprüft werden, ob die betreffende genetische Information der jeweiligen Gene enthalten war. Aus positiven Klonen isolierte Plasmide wurden sequenziert (2.2.6). Nach Überprüfung dieser Sequenzen erfolgte die Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3). Die rekombinanten Bakterienstämme standen somit als Expressionssysteme für die Gewinnung der jeweiligen Enzyme zur Verfügung.

Die Gewinnung der Enzyme des DXP-Biosyntheseweges erfolgte im Anschluss an die Entwicklung der rekombinanten Expressionsstämme. Die Proteinbildung wurde durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) induziert. Expression, Aufschluss und Reinigung der Enzyme erfolgte gemäß Abschnitt 2.3. Für die Reinigung der Enzyme ist die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie verwendet worden, bei der es zur reversiblen Bindung eines Histidin-Tags an ein immobilisiertes Metallatom kommt. Die codierende Sequenz für die dafür notwendigen aufeinanderfolgenden Histidine enthält der verwendete pCR[®]T7/NT TOPO[®]-Vektor. Die nach der Talonreinigung erhaltenen und umgepufferten rekombinanten Enzyme wurden vor dem Aktivitätstest mit Hilfe der SDS-PAGE (2.3.3) auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurden als Proben jeweils der Proteinmarker (1), ein Bakterienzellextrakt vor der Enzyminduktion (2), ein nach erfolgter Proteinsynthese entnommener Zellextrakt (3), ein nach dem Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall gewonnener Rohextrakt (4) und das nach Talonreinigung und Umpufferung erhaltene Protein (5) aufgetragen.

3.1.2 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase – DXS

Die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase (DXS) katalysiert den ersten Schritt des Alternativen Terpenbiosyntheseweges, in dem durch Kondensation von Pyruvat und D-Glyceraldehyd 3-phosphat die Bildung von 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat erfolgt. An der Reaktion ist Thiamindiphosphat als Cofaktor beteiligt. Ebenso sind für die Enzymaktivität divalente Kationen wie Mg²⁺ oder Mn²⁺ erforderlich (Sprenger *et al.*, 1997). Durch Gelfiltrationschromatographie wurde herausgefunden, dass es sich bei der 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* um ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Homodimer handelt (Kuzuyama *et al.*, 2000a). Die Molekulare Masse des Enzyms beträgt 67,5 kDa (SDS-PAGE). Die durch Überexpression und Talonreinigung gewonnene rekombinante 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* zeichnet sich durch einen hohen Reinheitsgrad aus und konnte im SDS-Gel in Übereinstimmung mit dem erwarteten Molekulargewicht dargestellt werden (Abb. 11). Aus einem Liter Expressionskultur konnte durchschnittlich 19 mg gereinigtes Enzym mit einer Konzentration von 5,7 mg/ml gewonnen werden. Der Expressions-

stamm neigte nach mehreren Wochen der Kultivierung zum Plasmid-Verlust. Daher wurde das Plasmid erneut transformiert, wenn die Ausbeute an exprimiertem Protein zu gering war.

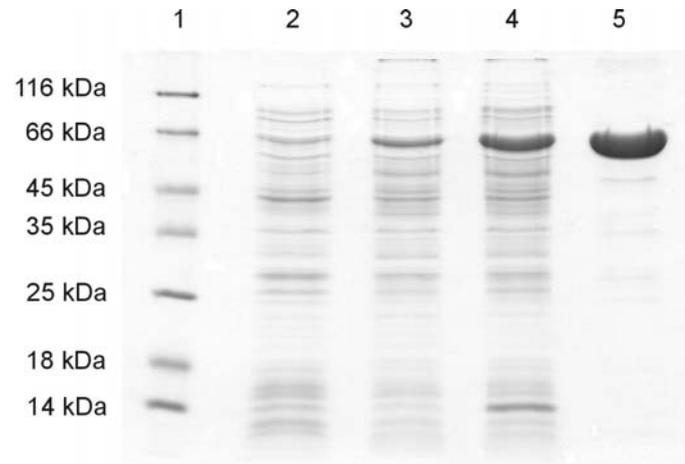


Abb. 11:

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) des rekombinanten Enzyms DXS: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 µg; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt (n = 10); Darstellung eines typischen Gels

Der Aktivitätstest (2.4.1) zeigte, dass durch die rekombinante 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase aus Pyruvat und D-Glyceraldehyd 3-phosphat 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat gebildet wurde. Abbildung 12 stellt die Aufnahme mit dem Phosphorimager und dem Radio-DC-Scanner nach Papierchromatographie in LM1 bzw. LM5 dar.

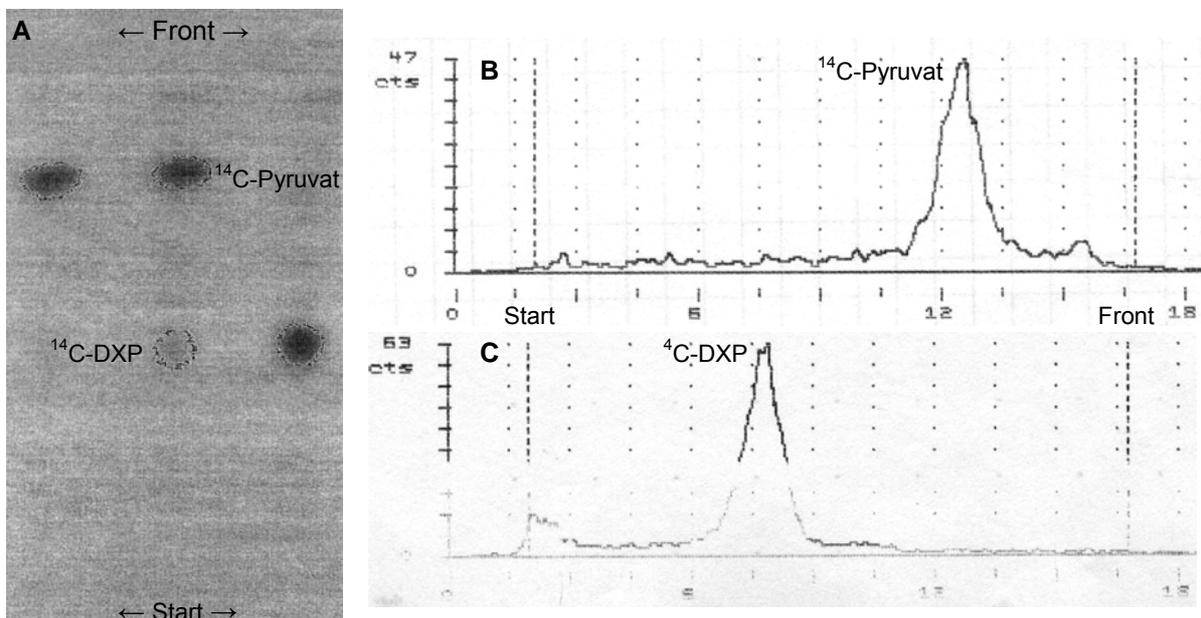


Abb. 12:

Umsetzung von 6 mM D-GAP mit 4 mM Pyruvat, 100.000 cpm (0,321 nmol) [U-¹⁴C₃]Pyruvat, 1,5 mM Thiamindiphosphat, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,4 mM EDTA und DXS in 200 mM Natriumcitrat-Puffer pH 6,0, Gesamtvolumen 50 µl, 1 h Inkubation bei 37 °C

A Phosphorimager-Darstellung, PC in LM1

B Radio-DC-Scanner-Darstellung von ¹⁴C-Pyruvat vor der Reaktion, PC in LM5

C Radio-DC-Scanner-Darstellung von ¹⁴C-DXP nach der Umsetzung, PC in LM5

In LM1 zeigte Pyruvat einen R_f -Wert von 0,75 und DXP von 0,45. Die R_f -Werte von Pyruvat und DXP in LM5 betragen 0,68 und 0,39. Damit konnte die Aktivität der DXS gezeigt werden. Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde mit 0,9 U/mg bestimmt. Die Ausbeute (2.4.1) mit 1 mU DXS betrug 79 %, wobei diese Angabe aufgrund der geringen Stoffmengen um bis zu 20 % abweichen kann. Somit stand gereinigte und aktive DXS für katalytische Umsetzungen von Pyruvat und D-GAP zu DXP variabler Markierungsmuster zur Verfügung.

3.1.3 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase – DXR

Den zweiten Reaktionsschritt im Alternativen Terpenbiosyntheseweg stellt die intramolekulare Umlagerung und nachfolgende Reduktion von DXP zum 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat (MEP) dar, welche durch die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase katalysiert wird. Für die Umsetzung sind NADPH und divalente Kationen wie Mn^{2+} oder auch Mg^{2+} oder Co^{2+} notwendig (Takahashi *et al.*, 1998). Das Enzym ist ein Homotetramer, dessen Molekulare Masse unter nativen Bedingungen mit 150 kDa bestimmt werden konnte. 42.000 Dalton konnten als Molekulargewicht einer Untereinheit des gereinigten, rekombinanten Enzyms (SDS-PAGE) ermittelt werden (Takahashi *et al.*, 1998).

Die durch Proteinexpression des *E. coli*-Stammes M15-pQEDXRECO (2.3.1) gewonnene 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase stand im Anschluss an die Reinigung mit Metall-Chelat-Affinitätschromatographie zur Verfügung. Eine Übereinstimmung mit dem theoretischen Molekulargewicht konnte nach SDS-Gelelektrophorese (Abb. 13) gezeigt werden. Die gewonnene DXR wies den im SDS-Polyacrylamid-Gel gezeigten Reinheitsgrad auf. Mit durchschnittlich 36 mg gereinigtem Enzym lag die aus einem Liter Expressionskultur gewonnene Proteinmenge sehr hoch. Die Konzentration des Enzyms betrug 10,2 mg/ml.

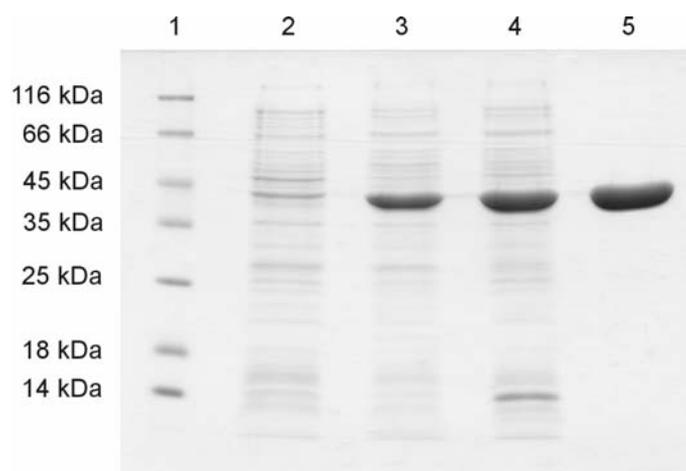


Abb. 13:

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) des rekombinanten Enzyms DXR: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 μ g; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt ($n = 5$); Darstellung eines typischen Gels

Die Aktivität der rekombinanten DXR konnte mit zwei Detektionsmethoden nachgewiesen werden (2.4.2). Der Verlauf der Umsetzung zu 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat, der in

Abbildung 14 dargestellt ist, wurde mittels Radio-HPLC (2.7.2) überprüft. Als Referenz dienten die bei Raschke *et al.* (2004) eingesetzten Verbindungen.

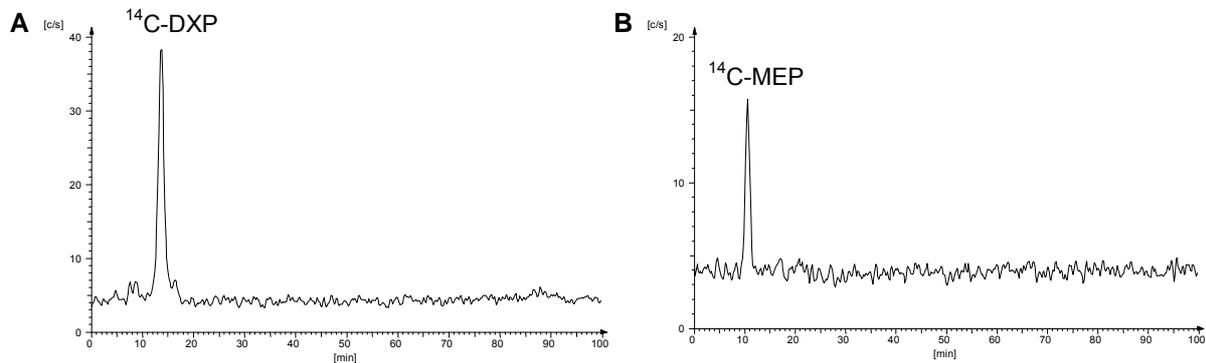


Abb. 14: HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von 0,3 mM DXP und 100.000 cpm [3,4,5-¹⁴C₃]DXP (A) mit 300 nM NADPH, 5 mM MgCl₂ und DXR in 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zu ¹⁴C-MEP (B), Gesamtvolumen 50 µl, 1 h Inkubation bei 37 °C

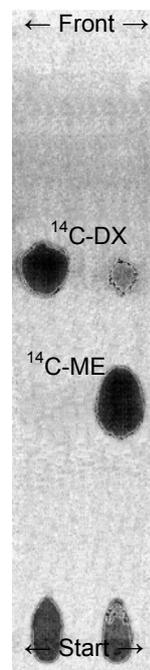


Abb. 15: Phosphorimager-Aufnahme der Umsetzung von 0,3 mM DXP und 100.000 cpm [3,4,5-¹⁴C₃]DXP mit 300 nM NADPH, 5 mM MgCl₂ und DXR in 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zu ¹⁴C-MEP, Gesamtvolumen 50 µl, 1 h Inkubation bei 37 °C; nach Reaktionsabbruch durch zweiminütige Inkubation bei 95 °C und Eiskühlung Dephosphorylierung mit 0,5 U Alkalischer Phosphatase, 1 h Inkubation bei 37 °C, DC1 (Kieselgel mit Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄) in LM3 (zweimalige Entwicklung)

Alternativ erfolgte im Anschluss an die Umsetzung eine Inkubation mit Alkalischer Phosphatase und der dünnschichtchromatographische Nachweis der dephosphorylierten Verbindungen (Abb. 15). Die R_F-Werte von 1-Deoxy-D-xylulose (DX) und 2C-Methyl-D-erythritol (ME) in LM3 betragen 0,6 und 0,39. Als spezifische Aktivität von DXR konnten 4,4 U/mg bestimmt werden. Die Reaktion mit 0,4 mU DXR verlief mit einer Ausbeute von 91 %, wobei die Angabe aufgrund der geringen Stoffmengen um bis zu 10 % schwanken kann. Nach Expression und Reinigung stand aktive DXR im Milligrammbereich zur Synthese von MEP bereit.

3.1.4 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase – IspD

Die Cytidintriphosphat-abhängige Bildung von CDP-ME aus MEP erfolgt durch Katalyse der 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase. Zudem sind Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Co^{2+} für die Umsetzung erforderlich. Andere divalente Kationen wie Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} oder Zn^{2+} können nicht als Cofaktoren eingesetzt werden (Rohdich *et al.*, 1999). Durch Vergleich mit der Elution von Standardproteinen bei der Gelfiltration konnte das native Molekulargewicht des Enzyms IspD mit 50 kDa bestimmt werden. Mit SDS-PAGE wurde für die Monomere eine Molekulare Masse von 26 kDa ermittelt. Das Enzym liegt nativ als Homodimer vor (Wungsintaweeikul, 2001a).

Das aus dem Expressionsstamm IspD pCR T7/NT TOPO *E. coli* BL21(DE3) gewonnene und am Talon-Harz gereinigte Enzym wurde mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei zeigte das rekombinante IspD ein apparentes Molekulargewicht von ca. 28 kDa (Abb. 16), welches im Rahmen der Genauigkeit der SDS-PAGE mit dem theoretischen Molekulargewicht eines Monomers übereinstimmt. Aus einem Liter Kulturvolumen konnte durchschnittlich 6,2 mg gereinigtes Enzym mit einer Konzentration von 2,3 mg/ml gewonnen werden.

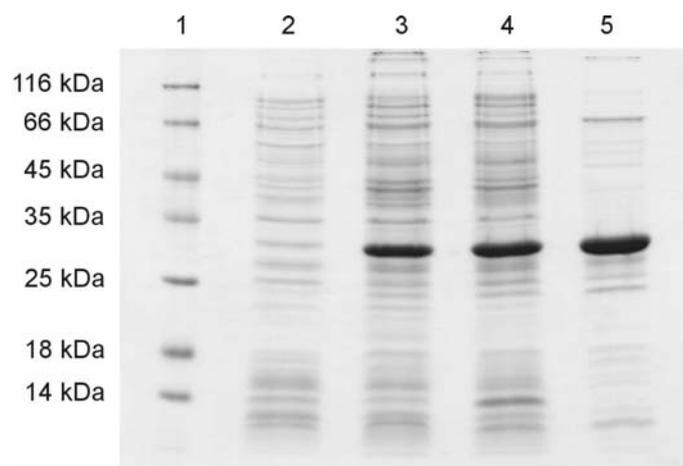


Abb. 16:

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) des rekombinanten Enzyms IspD: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 μ g; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt ($n = 5$); Darstellung eines typischen Gels

Das rekombinante IspD zeigte nach Umsetzung mit MEP (2.4.3) und Radio-HPLC-Analyse (2.7.2) enzymatische Aktivität (Abb. 17). Als Referenz dienen die bei Raschke *et al.* (2004) eingesetzten Verbindungen. Die spezifische Aktivität von IspD wurde mit 21,8 U/mg bestimmt. Mit 0,22 mU IspD konnten 64 % an Ausbeute gewonnen werden. Schwankungen der Angabe von bis zu 15 % sind aufgrund der geringen Stoffmengen möglich. Zur Gewinnung von CDP-ME stand gereinigtes aktives IspD zur Verfügung.

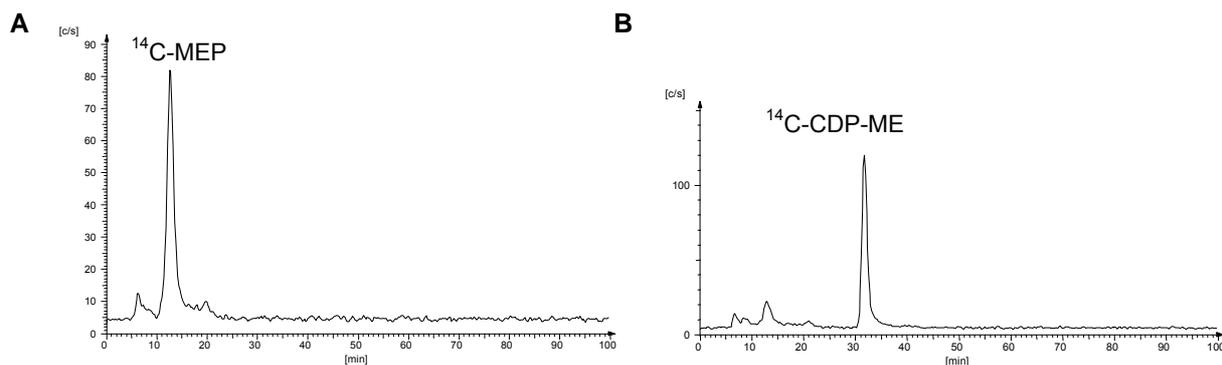


Abb. 17: HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von 1 mM MEP und 100.000 cpm [^{14}C]MEP (A) mit 5 mM CTP, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT und IspD in 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zu ^{14}C -CDP-ME (B), Gesamtvolumen 50 μl , 1 h Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$

3.1.5 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase – IspE

CDP-ME wird durch Katalyse der 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase in Position 2 phosphoryliert. Das dabei entstehende Reaktionsprodukt ist CDP-MEP. ATP ist für die Reaktion erforderlich. Es stellt die Phosphatgruppe zur Verfügung. Das Molekulargewicht einer Untereinheit von IspE beträgt 30,9 kDa. Das Enzym liegt nativ als Homodimer vor.

Durch Proteinexpression des rekombinanten *E. coli*-Stammes IspE pCR T7/NT TOPO BL21(DE3) konnte IspE gewonnen und durch Affinitätschromatographie mit dem Talon-Harz gereinigt werden. Der erzielte Reinheitsgrad des Enzyms kann dem SDS-Gel (Abb. 18) entnommen werden. In Übereinstimmung mit dem theoretischen Molekulargewicht wies das SDS-Gel eine Proteinbande bei 31 kDa auf. Bei einer durchschnittlichen Konzentration von 2,6 mg/ml wurde aus einem Liter Expressionskultur 6,6 mg gereinigtes Protein gewonnen.

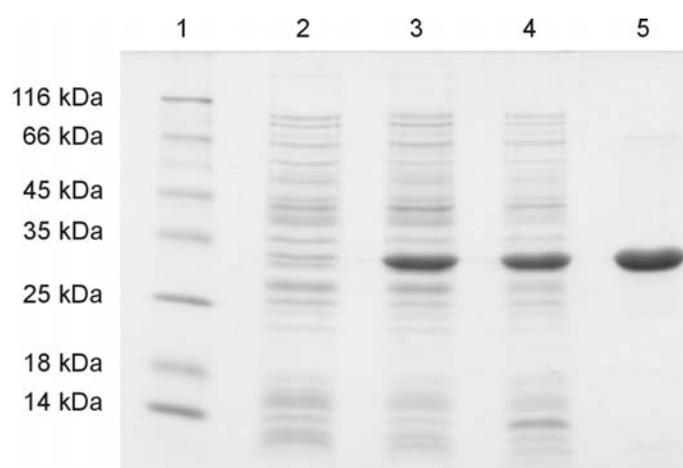


Abb. 18 SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) des rekombinanten Enzyms IspE: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 μg ; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt ($n = 5$); Darstellung eines typischen Gels

Die Bestimmung der Enzymaktivität (2.4.4) wurde mittels Radio-HPLC (2.7.2) überprüft. Wie im Chromatogramm in Abbildung 19 zu sehen, war das gewonnene Enzym IspE katalytisch aktiv. Als Referenz dienten die bei Raschke *et al.* (2004) eingesetzten Verbindungen.

Die spezifische Aktivität konnte mit 28,8 U/mg bestimmt werden. Die Ausbeute mit 3 mU IspE lag bei 70 %. Abweichungen von bis zu 15 % können aufgrund der geringen Stoffmengen vorkommen. IspE stand nach Expression und Proteinreinigung zur enzymatischen Synthese von CDP-MEP aktiv zur Verfügung.

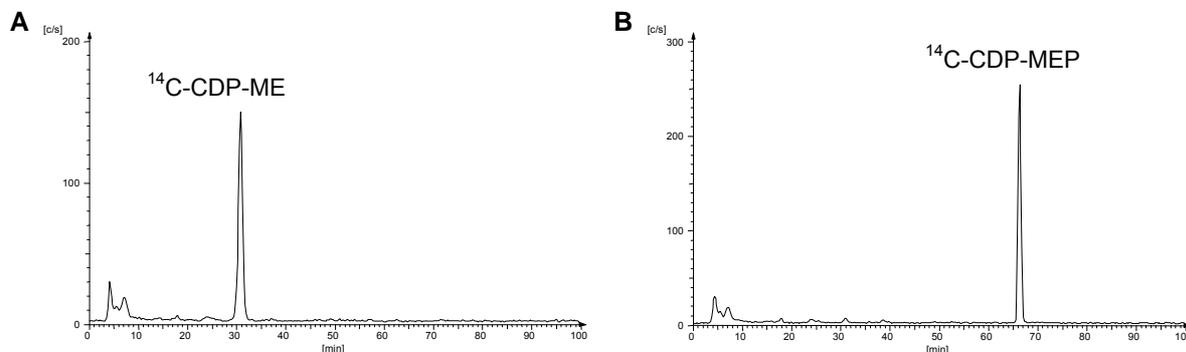


Abb. 19:

HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von 1 mM CDP-ME und 100.000 cpm [^{14}C]CDP-ME (**A**) mit 5 mM ATP und IspE in 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zu ^{14}C -CDP-MEP (**B**), Gesamtvolumen 50 μl , 1 h Inkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$

3.1.6 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase – IspF

Die 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase führt unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat aus CDP-MEP zu einer zyklischen Phosphatverbindung, dem 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (cMEDP). Diese Umsetzung erfordert Mn^{2+} oder Mg^{2+} , aber keine weiteren Cofaktoren (Herz *et al.*, 2000). Das Enzym liegt nativ als Homotrimer vor. Die Untereinheiten besitzen eine Molekulare Masse von 16,9 kDa.

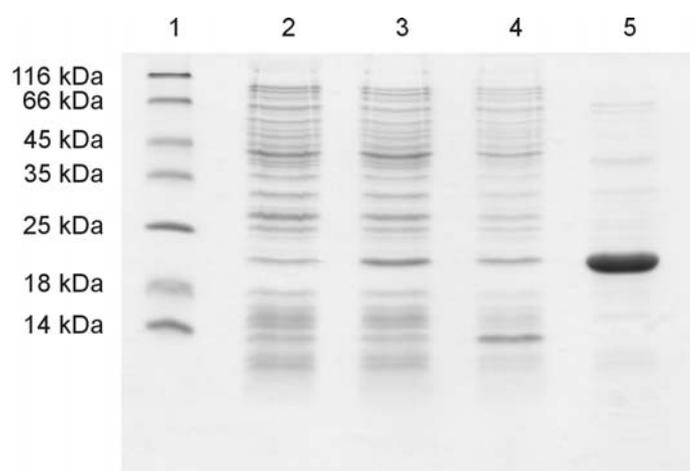


Abb. 20:

SDS-Polyacrylamid-Gel (15%ig) des rekombinanten Enzyms IspF: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 μg ; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt ($n = 5$); Darstellung eines typischen Gels

IspF, welches durch Proteinexpression erhalten wurde, konnte nach der Reinigung mit Metall-Chelat-Affinitätschromatographie und SDS-PAGE in dem in Abbildung 20 dargestellten hohen Reinheitsgrad gewonnen werden. Das apparente Molekulargewicht von 19 kDa ent-

sprach dem theoretischen Molekulargewicht im Rahmen der Genauigkeit der SDS-PAGE. Im Durchschnitt wurde aus einem Liter Kulturvolumen 5,1 mg gereinigtes IspF mit einer Konzentration von 2 mg/ml gewonnen.

Der Aktivitätstest (2.4.5) zeigte, dass das rekombinante Enzym IspF die Umsetzung von CDP-MEP zu cMEDP katalysiert. Die Detektion der Umsetzung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (Abb. 21). CDP-MEP wies im LM4 einen R_f -Wert von 0,45 auf, der von cMEDP betrug 0,68. Die ermittelte spezifische Aktivität des Enzyms IspF konnte mit 12,1 U/mg bestimmt werden. Mit 0,25 mU IspF wurde eine Ausbeute von 84 % erreicht. Die Angabe kann aufgrund der geringen Stoffmengen um bis zu 10 % abweichen. Das gewonnene IspF zeigte katalytische Aktivität und kann zur Darstellung von cMEDP eingesetzt werden.

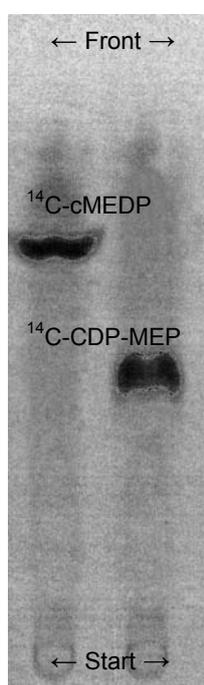


Abb. 21:

Phosphorimager-Aufnahme der Umsetzung von 1 mM CDP-MEP und 100.000 cpm [^{14}C]CDP-MEP mit 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT und IspF in 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zu ^{14}C -cMEDP, Gesamtvolumen 50 μl , 1 h Inkubation bei 37 °C, DC2 (Kieselgel N-HR/UV₂₅₄) in LM4

3.1.7 D-Xylulokinase – XylB

Das Enzym D-Xylulokinase katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung an der in C₅-Stellung befindlichen Hydroxylgruppe von 1-Deoxy-D-xylulose. Mg^{2+} ist für die Katalyse erforderlich (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001b). Die D-Xylulokinase hat ein Molekulargewicht von 52,6 kDa. XylB gehört nicht zu den Enzymen des DXP-Weges, steht mit diesem jedoch eng im Zusammenhang, da es die Phosphorylierung von 1-Deoxy-D-xylulose katalysiert (Abschnitt 1.2.2.1). Aus diesem Grund wurde es für enzymatische Synthesen von DXP, einem wichtigen Intermediat der Biosynthesen von Terpenen, Thiamin und Pyridoxol, in gereinigter aktiver Form zur Verfügung gestellt.

Die Reinigung des nach der Proteinexpression gewonnenen Enzyms XylB erfolgte mittels Talon-Harz. Zur Überprüfung wurden die Proteinfractionen im SDS-Gel getrennt, wobei das Enzym den in Abbildung 22 dargestellten Reinheitsgrad aufwies. Die XylB-Induktionsbande bei 50 kDa liegt in etwa in Höhe des theoretischen Molekulargewichts. Mit einer Konzentration von 4,6 mg/ml konnte aus einem Liter Expressionkultur durchschnittlich 14,6 mg gereinigte D-Xylulokinase gewonnen werden.

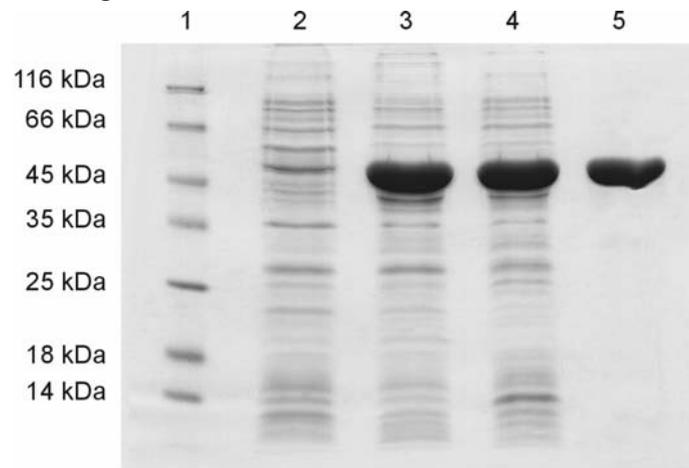


Abb. 22:

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) des rekombinanten Enzyms XylB: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 µg; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt (n = 5); Darstellung eines typischen Gels

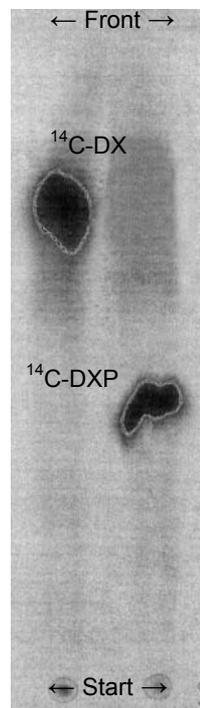


Abb. 23:

Phosphorimager-Aufnahme der Umsetzung von 1 mM DX und 100.000 cpm [^{14}C]DX mit 5 mM ATP, 5 mM MgCl_2 und XylB in 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zu ^{14}C -DXP, Gesamtvolumen 50 µl, 1 h Inkubation bei 37 °C, PC in LM5

Die mit papierchromatographischer Analyse aufgenommene Phosphorimager-Darstellung (Abb. 23) zeigt die enzymatische Aktivität der gewonnenen D-Xylulokinase (2.4.6). In LM5

zeigte ^{14}C -DXP einen R_f -Wert von 0,39 und ^{14}C -DX einen von 0,65. Als spezifische Aktivität für das rekombinante Enzym konnte 1,7 U/mg bestimmt werden. Mit 1,7 mU XylB konnten 80 % an Ausbeute gewonnen werden. Schwankungen der Angabe von bis zu 10 % sind aufgrund der geringen Stoffmengen möglich. Somit stand auch XylB für enzymatische Synthesen zur Verfügung.

3.1.8 GcpE und LytB

Bei genomischen Analysen wurden die Gene *gcpE* und *lytB* im Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Vorkommen der Gene *dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE* und *ispF* des Alternativen Terpenbiosyntheseweges beschrieben (Adam, P. *et al.*, 2000). Zur Aufklärung der Funktion der sich von diesen Genen ableitenden Enzyme kam ein *in vivo* System zum Einsatz (Hecht *et al.*, 2001c; Rohdich *et al.*, 2002). In davon unabhängigen Untersuchungen wurde sowohl in der Arbeitsgruppe von Rohmer (Campos *et al.*, 2001) als auch in der von Jomaa (Altincicek *et al.*, 2001a) GcpE im Alternativen Terpenbiosyntheseweg in *E. coli* charakterisiert. Das Vorkommen von LytB wurde von Cunningham *et al.* (2000) beschrieben.

GcpE und LytB, die letzten zwei Enzyme der Biosynthese des IDPs via DXP-Weg, konnten als weitere Enzyme durch Überexpression und Talonreinigung gewonnen werden. Die Molekulargewichte von GcpE und LytB betragen 40,7 bzw. 34,8 kDa (SDS-PAGE). In Übereinstimmung mit den erwarteten Molekulargewichten konnten die gewonnenen rekombinanten Enzyme aus *E. coli* im SDS-Gel (Abb. 24 und 25) dargestellt werden. Aus einem Liter Expressionskultur wurde durchschnittlich 5,3 mg gereinigte GcpE gewonnen, die Konzentration betrug 2 mg/ml. 4,0 mg gereinigtes Enzym LytB einer Konzentration von 1,4 mg/ml wurde im Durchschnitt aus einem Liter Expressionskultur erhalten.

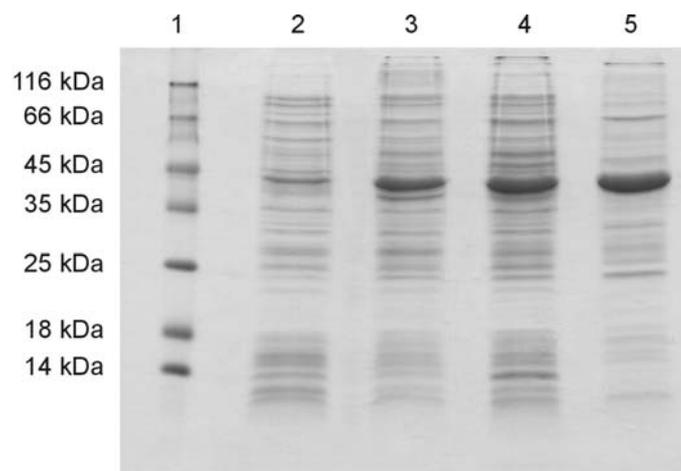
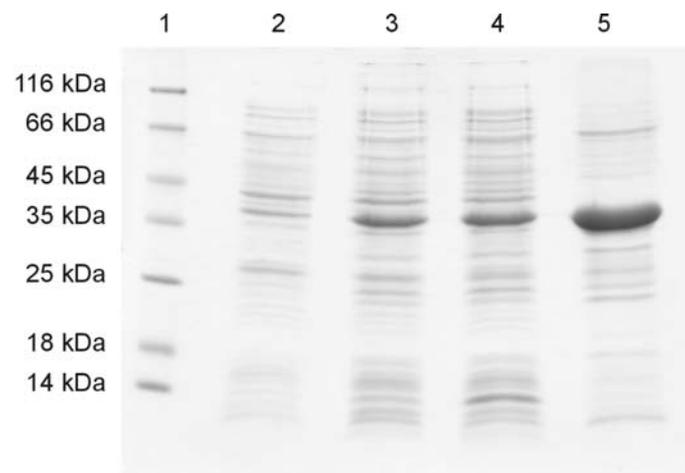


Abb. 24:

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) des rekombinanten Enzyms GcpE: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 μg ; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt ($n = 4$); Darstellung eines typischen Gels

**Abb. 25:**

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) des rekombinanten Enzyms LytB: Proteinmarker (1), Bakterienzell-extrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 µg; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt (n = 4); Darstellung eines typischen Gels

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurden die Enzyme mit cMEDP und [¹⁴C]cMEDP zur Reaktion gebracht (2.4.7). Anhand der radioaktiven Markierung konnte in der Radio-HPLC verfolgt werden, ob [¹⁴C]cMEDP einer Umsetzung durch die Reaktion mit GcpE bzw. beiden Enzymen unterlag. Ein Vergleich des Radio-HPLC-Signals der Referenzsubstanz [¹⁴C]cMEDP mit den Resultaten der HPLC-Analyse der Untersuchungslösungen aus den jeweiligen Umsetzungen mit den Enzymen zeigte keine Veränderungen in den Chromatogrammen. Mit dem eingesetzten Test konnten keine enzymatischen Aktivitäten von GcpE und LytB nachgewiesen werden. Die mutmaßliche Ursache für das Ausbleiben der enzymatischen Aktivität beider nach Reinigung am Talon-Harz gewonnenen Enzyme liegt an den für die Proteinreinigung und die enzymatischen Umsetzungen notwendigen Versuchsbedingungen. Der Reinigungsprozess wie auch die Umsetzungen mit GcpE und LytB erfordern anaerobe Bedingungen (Kollas *et al.*, 2002; Altincicek *et al.*, 2002).

3.2 Synthese von Intermediaten des Alternativen Terpenbiosyntheseweges

Nachdem die im DXP-Weg vorkommenden Enzyme durch Klonierung und Expression erfolgreich gewonnen werden konnten, standen DXS, DXR, IspD, IspE und IspF löslich und aktiv zur enzymatischen Synthese von Metaboliten dieses Stoffwechselweges zur Verfügung. Neben der chemischen Synthese der unmarkierten Verbindungen D-Glyceraldehyd 3-phosphat und Isopentenylidiphosphat gelang es durch Einsatz der Enzyme, ^{14}C -markierte Intermediate variabler Markierung zu gewinnen. Nach Synthese ^{14}C -markierter Intermediate, welche mit der Radio-HPLC schnell detektierbar waren, wurde der experimentelle Ablauf so abgewandelt, dass eine Darstellung schwerisotopenmarkierter Metabolite im Milligramm-Maßstab möglich war, die für nicht radioaktive Nachweismethoden mittels NMR und MS eingesetzt werden sollten.

3.2.1 Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat

In Abschnitt 2.5.2 wurde die von Herrn Dr. Gao und mir durchgeführte Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat und die sich daran anschließende Analytik beschrieben. Von der leicht gelb gefärbten, öligen Substanz konnten 0,43 g (2,5 mmol) erhalten werden, was einer Ausbeute von 77 % entsprach. Es wurde papierchromatographisch bestätigt, dass es sich bei der gewonnenen Substanz um D-GAP handelt. Als Referenzsubstanz für die PC in LM5 fand DL-GAP der Firma Sigma (Taufkirchen) Verwendung. Zur Detektion wurde 2,4-Dinitrophenylhydrazin eingesetzt, wobei GAP eine gelborange Färbung zeigt.

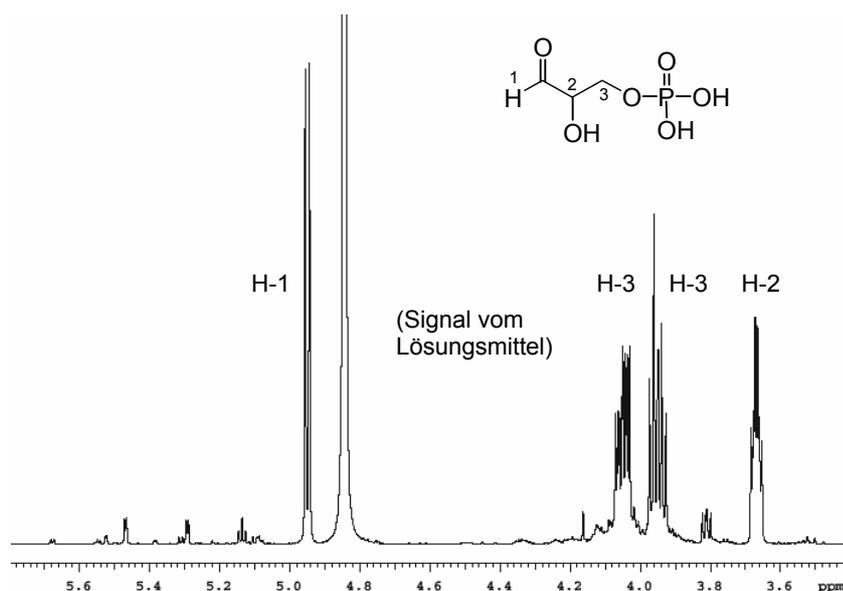


Abb. 26:

NMR-Analyse:

^1H -NMR-Spektrum von D-Glyceraldehyd 3-phosphat synthetisiert aus 1 g (3,3 mmol) Dinatrium D-Fructose 6-phosphat und Reinigung an Dowex und DEAE-Sephadex

^1H -NMR-Daten: (D_2O , 300 MHz) δ : 4.95 (d, $J = 5.6$ Hz, H-1), 4.05 (ddd, $J = 10,9 / 5,7 / 3,2$ Hz, H-3), 3.95 (ddd, $J = 10,9 / 6,2 / 6,2$ Hz, H-3), 3.67 (ddd, $J = 6,2 / 5,7 / 3,2$ Hz, H-2)

Das ^1H -NMR-Spektrum ist in Abbildung 26 dargestellt und zeigt, dass es sich bei der untersuchten Substanz um D-Glyceraldehyd 3-phosphat handelt. Zusammen mit $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ bzw. $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ stand D-Glyceraldehyd 3-phosphat für die Synthese von $[\text{1,2-}^{14}\text{C}_2]\text{DXP}$ bzw. $[\text{1,2-}^{13}\text{C}_2]\text{DXP}$ zur Verfügung. Neben der chemischen ist durch Einsatz der an der Glycolyse beteiligten Enzyme eine enzymatische Synthese von D-GAP möglich, welche bei der Darstellung von $[\text{3,4,5-}^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ (3.2.3.2) zugrunde gelegt wurde (Schuhr *et al.*, 2001).

3.2.2 Gewinnung von isopenmarkiertem Pyruvat mit dem *E. coli*-Stamm YYC202

Der *E. coli*-Stamm YYC202 (2.1.1) ist ein spezieller Bakterienstamm zur Gewinnung von Pyruvat (Gerharz *et al.*, 2001). Aufgrund von Defekten in den Genen für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex – Pyruvat:Chinon-Oxidoreduktase, Pyruvat-Formiat-Lyase und PEP-Synthetase – ist *E. coli* YYC202 nicht mehr in der Lage, Pyruvat zu Acetyl-CoA oder Acetat umzusetzen. Dadurch ist der Stamm bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle acetat-auxotroph und scheidet Pyruvat aus. Zur selektiven Kultivierung kann die Tetracyclin-Resistenz (10 $\mu\text{g/ml}$) oder die Streptomycin-Resistenz (50 $\mu\text{g/ml}$) des Stammes genutzt werden.

3.2.2.1 Gewinnung von $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$

Die Arbeit mit dem zur Verfügung gestellten *E. coli* YYC202-Stamm wurde im Rahmen dieser Studie in der Arbeitsgruppe eingeführt und ist daher detailliert beschrieben. 10 ml einer *E. coli* YYC202-Übernachtskultur wurden zu 300 ml tetracyclinhaltigem, mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat versetzten M9-Minimalmedium gegeben und für 24 h bei 37 °C und 175 rpm inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen, wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben, erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm.

100 μCi $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ (spezifische Aktivität 311 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, 321 nmol, 500 μl), gewaschene *E. coli* YYC202-Zellen der $\text{OD}_{600} = 2$ (etwa 100 μl Bakteriensuspension) und 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 zu einem Endvolumen von 800 μl wurden in den äußeren Bereich eines Warburg-Gefäßes gegeben. Der innere Bereich enthielt 0,2 ml 2 N Kaliumhydroxid-Lösung. Das Gasableitungsrohr war mit einem Wattestopfen verschlossen. Die Inkubation erfolgte für 5 h bei 37 °C und 175 rpm.

Die im äußeren Bereich befindliche Suspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 10000 rpm). Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß gegeben und der Bakterienrückstand zweimal mit jeweils 50 μl Wasser gewaschen und zentrifugiert. Nach Vereinigen von Überstand und Waschlösungen erfolgte mit 0,5 N Kaliumhydroxid-Lösung die Einstellung des pH-Wertes auf 7,5.

Zur Überprüfung der Umsetzung wurde eine Untersuchungslösung hergestellt, indem 1 μl der erhaltenen Lösung mit Wasser zu 10 μl verdünnt wurde. 1 μl Untersuchungslösung wurde zu Szintillatorlösung gegeben und im Flüssigszintillationszähler zur Erfassung des radioaktiven

Anteils vermessen (2.8.2). Auf ein Papierchromatogramm (2.7.1) wurden 2 μl Untersuchungslösung und als Referenzsubstanzen Aliquote von ^{14}C -markierter D-Glucose und unmarkiertem Natriumpyruvat aufgetragen, in LM5 entwickelt und mit dem Radio-DC-Scanner ausgewertet (Abb. 27) bzw. mit dem Sprühreagenz 2,4-Dinitrophenylhydrazin detektiert. Sowohl die Untersuchungslösung als auch die Referenz Pyruvat wiesen einen R_f -Wert von 0,68 auf. Somit handelt es sich bei der dargestellten Substanz um ^{14}C -Pyruvat.

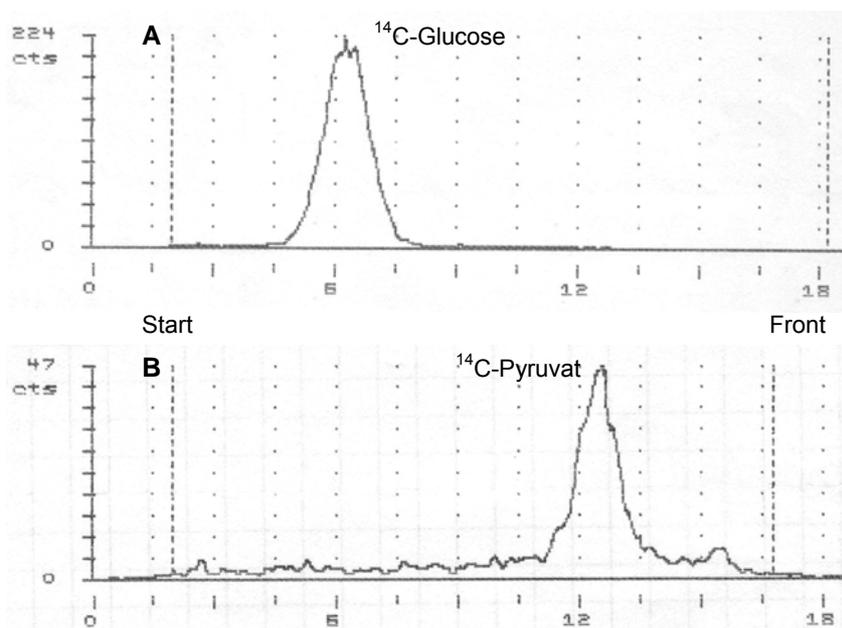


Abb. 27:

Umsetzung von 100 μCi (321 nmol) $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ mit *E. coli* YYC202-Zellen der $\text{OD}_{600} = 2$ (etwa 100 μl Bakteriensuspension) und 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 zu einem Endvolumen von 800 μl zur Synthese von $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$, 5 h Inkubation in einem Warburg-Gefäß bei 37 $^\circ\text{C}$ und 175 rpm, PC in LM5

A Radio-DC-Scanner-Darstellung von ^{14}C -Glucose vor der Umsetzung

B Radio-DC-Scanner-Darstellung von ^{14}C -Pyruvat nach der Umsetzung (1:10-Verdünnung der nach der Umsetzung gewonnenen Lösung des Reaktionsprodukts)

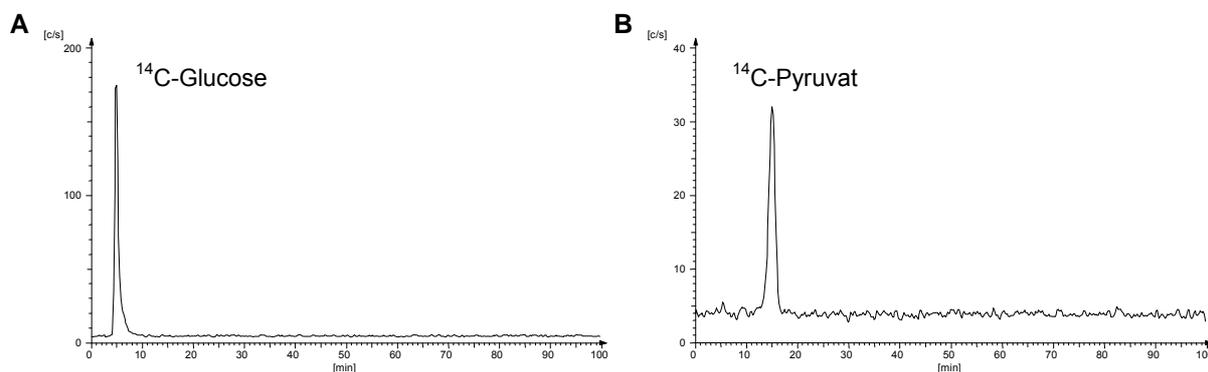


Abb. 28:

Umsetzung von 100 μCi (321 nmol) $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ mit *E. coli* YYC202-Zellen der $\text{OD}_{600} = 2$ (etwa 100 μl Bakteriensuspension) und 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 zu einem Endvolumen von 800 μl zur Synthese von $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$, 5 h Inkubation in einem Warburg-Gefäß bei 37 $^\circ\text{C}$ und 175 rpm, PC in LM5

A Radio-HPLC-Chromatogramm von ^{14}C -Glucose vor der Umsetzung

B Radio-HPLC-Chromatogramm von ^{14}C -Pyruvat nach der Umsetzung (1:10-Verdünnung der nach der Umsetzung gewonnenen Lösung des Reaktionsprodukts)

5 µl der Untersuchungslösung wurden für die HPLC-Analyse mit dem Ionenpaar-System (2.7.2) eingesetzt (Abb. 28). Durch Vergleich mit Standardsubstanzen konnte die Bildung von ^{14}C -Pyruvat aus ^{14}C -Glucose mittels Radio-HPLC nachgewiesen werden. Das gewonnene $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ wies keine radioaktiv markierten Verunreinigungen auf.

Das Reaktionsprodukt enthielt eine Gesamtradioaktivität von 89,5 µCi. Dies entsprach einer Ausbeute von 89,5 % $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol). Ohne weitere Reinigungsschritte wurde das gewonnene $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ zur Synthese von ^{14}C -DXP und ^{14}C -MEP eingesetzt.

3.2.2.2 Gewinnung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$

Drei 1-Liter-Erlenmeyerkolben, die 300 ml tetracyclinhaltiges, mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat versetztes M9-Minimalmedium enthielten, wurden jeweils mit 10 ml einer *E. coli* YYC202-Übernachtskultur angeimpft und für 24 h bei 37 °C und 175 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und das Bakterienpellet gewaschen (2.5.1). Nach Resuspendierung des Zellrückstandes in 2 ml 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 wurden 100 µl Bakteriensuspension mit diesem Puffer zu 1000 µl verdünnt und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

Die Umsetzung erfolgte in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben, indem zu 50 mg (0,25 mmol) $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, 5 µCi $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ (spezifische Aktivität 311 µCi/µmol, 25 µl), gewaschene *E. coli* YYC202-Zellen der $\text{OD}_{600} = 2$ (etwa 3 ml Bakteriensuspension) und 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 zu einem Endvolumen von 25 ml gegeben wurden, wobei die Bakteriensuspension zum Schluss zugesetzt wurde. Der Zusatz radioaktiv markierter Glucose diente zur Detektion der Umsetzung mittels Radio-HPLC-Analyse. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 20 h bei 37 °C und 175 rpm.

Anschließend wurde der durch Abzentrifugieren (20 min, 4 °C, 4000 rpm) erhaltene klare Überstand in eine mit 1,5 - 2,0 ml Dowex 1 x 8 (Serva, 200 - 400 mesh, Formiat-Form des Harzes) gefüllte Säule (0,5 x 10 cm) gegeben. Der Bakterienrückstand wurde mit zweimal 5 ml Wasser gewaschen und der nach Abzentrifugieren (20 min, 4 °C, 4000 rpm) erhaltene klare Überstand über die Dowex-Säule gegeben. Es schloss sich ein Waschen der Säule mit 10 ml Wasser an. Das Auswaschen des Reaktionsprodukts erfolgte mit 10 ml einer 1 M Ammoniumformiat-Lösung. Die erhaltene Lösung wurde über eine mit 18 ml Dowex 50w x 8 (Fluka, 100 - 200 mesh, protonierte Form des Harzes) gefüllte Säule (1,2 x 20 cm) gegeben. Das saure Eluat wurde sobald als möglich gesammelt und mittels Rotationsverdampfer bei 30 °C und Niederdruck (20 - 25 mbar) eingeeengt.

Ob es sich bei der mit einer Ausbeute von 93,3 % (45,63 mg, 0,5 mmol) gewonnenen öligen Substanz um $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Brenztraubensäure}$ handelt, wurde durch eine papierchromatographische Analyse (2.7.1) der Probe und der Referenzsubstanz in LM5 und Detektion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin überprüft (R_f -Wert 0,68). Die gewonnene Substanz wurde in 1 ml Wasser aufgenommen, der pH-Wert durch Zugabe von 2 N Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,5

eingestellt und eine NMR-Analyse durchgeführt (Abb. 29). Durch die ^{13}C -NMR-Analyse konnte ohne Zweifel der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei der synthetisierten Verbindung um $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Brenztraubensäure}$ handelt. Die durch Verwendung des *E. coli* YYC202-Stammes erfolgreich gewonnenen Substrate $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ und $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ konnten als Ausgangsstoffe für die im DXP-Weg nächstfolgende Reaktion eingesetzt werden. Das Protokoll zur Reinigung von Pyruvat wurde von Herrn Dr. Gao übernommen.

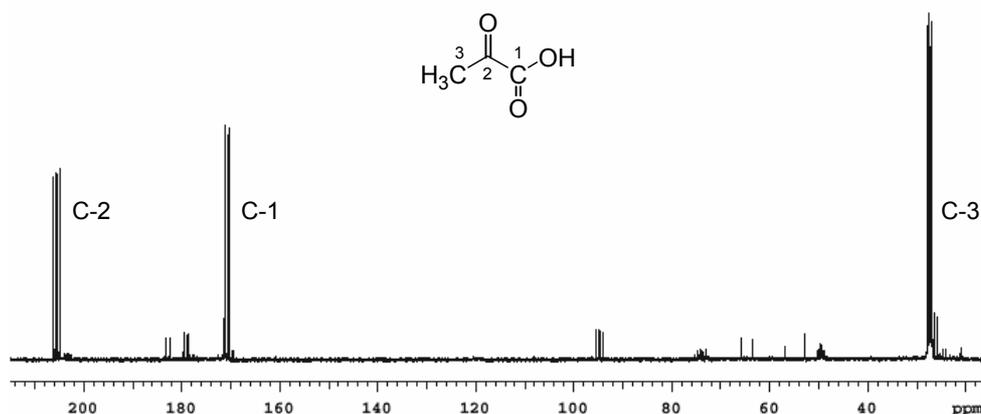


Abb. 29:

Umsetzung von 50 mg (0,25 mmol) $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ und 5 μCi $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ mit *E. coli* YYC202-Zellen der $\text{OD}_{600} = 2$ (etwa 3 ml Bakteriensuspension) und 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 zu einem Endvolumen von 25 ml zur Synthese von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$, 20 h Inkubation bei 37 °C und 175 rpm, Reinigung an Dowex-Harzen

NMR-Analyse:

Die Bestimmung der Position der markierten C-Atome erfolgte durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$, das in paralleler Umsetzung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ mit *E. coli* YYC202-Zellen unter gleichen Bedingungen synthetisiert wurde.

^{13}C -NMR-Spektrum von aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ synthetisiertem $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$

^{13}C -NMR-Daten: (D_2O , 75,5 MHz) δ : 207,47 (dd, $J = 62,2 / 39,7$ Hz, C-2), 170,75 (dd, $J = 62,2 / 13,2$ Hz, C-3), 27,32 (dd, $J = 39,7 / 13,2$ Hz, C-1)

3.2.3 Synthese von isotopenmarkiertem DXP

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat als Substrat für enzymatische Umsetzungen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit unterschiedlichen Markierungsmustern bereitgestellt. Ausgehend von ^{13}C - oder ^{14}C -markiertem Pyruvat, deren Darstellung in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde, erfolgte die Synthese von $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{DXP}$ und $[1,2\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{DXP}$. Hingegen wurde $[3,4,5\text{-}^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ aus $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ gewonnen.

3.2.3.1 Synthese von $[1,2\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{DXP}$ und $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{DXP}$

Zur Synthese von $[1,2\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{DXP}$ wurde zu dem aus der Umsetzung von 100 μCi $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ (321 nmol) und *E. coli* YYC202 erhaltenen $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ (0,58 μmol , 89,5 μCi) (3.2.2.1) 1,5 mM D-Glyceraldehyd 3-phosphat (3.2.1), 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 2 mM Thiamindiphosphat und 18 mU rekombinante DXS (3.1.1) gegeben. Das Endvolumen betrug nach Zugabe von Wasser 1 ml. Inkubiert wurde für 4 h bei 37 °C. Die Umsetzung konnte durch Einspritzen eines Aliquotes in die HPLC (2.7.2) kontrolliert werden. Durch Modifizierung dieses Protokolls konnte schwerisotopenmarkiertes

DXP gewonnen werden. Das aus der Reaktion von $[U-^{13}C_6]$ D-Glucose mit *E. coli* YYC202 gewonnene und gereinigte $[U-^{13}C_3]$ Pyruvat (3.2.2.2) wurde zur Synthese von $[1,2-^{13}C_2]$ DXP mit D-Glyceraldehyd 3-phosphat (3.2.1) umgesetzt. Dazu diente ein Reaktionsansatz mit 47 mM D-Glyceraldehyd 3-phosphat und 44 mM $[U-^{13}C_3]$ Pyruvat in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5. Als weitere Bestandteile waren 10 mM $MgCl_2$ und 2 mM Thiamindiphosphat zugesetzt. Mit Wasser wurde zu einem Gesamtvolumen von 300 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 45 mU der rekombinanten DXS (3.1.1) erfolgte für 14 h die Inkubation im Wasserbad bei 37 °C. Die Reaktion zu $[1,2-^{13}C_2]$ DXP wurde papierchromatographisch (2.7.1) in LM5 überprüft. Durch Verwendung der Sprühreagenzien Ethylendiaminsulfat und 2,4-Dinitrophenylhydrazin war die Detektion von DXP und Pyruvat möglich.

Zur Reinigung der gewonnenen Verbindungen $[1,2-^{14}C_2]$ DXP und $[1,2-^{13}C_2]$ DXP wurde die jeweilige Lösung auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1,0 x 18 cm, Formiat-Form des Harzes) gegeben und mit einem linearen Gradient von 0,06 M bis 0,56 M Ammoniumformiat pH 8,0 bei einer Flussrate von 1,1 ml/min eluiert. Die gesammelten Fraktionsvolumina betragen 8 ml. Durch Vermessen von 10 μ l jeder Fraktion im Flüssigszintillationszähler (2.8.2) konnte ein Retentionsvolumen von ungefähr 80 ml bestimmt werden, das ^{14}C -markiertes DXP enthält. Die DXP-Fractionen wurden vereinigt und über eine Säule (1,2 x 20 cm) gegeben, die mit 9 ml Dowex 50w x 8 (protonierte Form des Harzes) befüllt war. Die Einstellung des gesammelten sauren Eluates erfolgte mit 0,5 N Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 7,5. Nachdem zur Trockne eingeeengt wurde, konnte der Rückstand in 1ml Wasser aufgenommen werden. Das Protokoll zur Reinigung von DXP wurde von Herrn Dr. Gao übernommen.

Aus einem im Flüssigszintillationszähler vermessenen Aliquot von $[1,2-^{14}C_2]$ DXP (1:10-Verdünnung) konnte auf eine Gesamtradioaktivität von 48 μ Ci geschlossen werden, was einer Ausbeute von 78 % $[1,2-^{14}C_2]$ DXP entsprach. Die spezifische Aktivität betrug 103,7 μ Ci/ μ mol. Das Produkt wies in der Radio-HPLC keine radioaktiv markierten Verunreinigungen auf (Abb. 30) und stand für weitere Untersuchungen in erforderlicher Reinheit zur Verfügung.

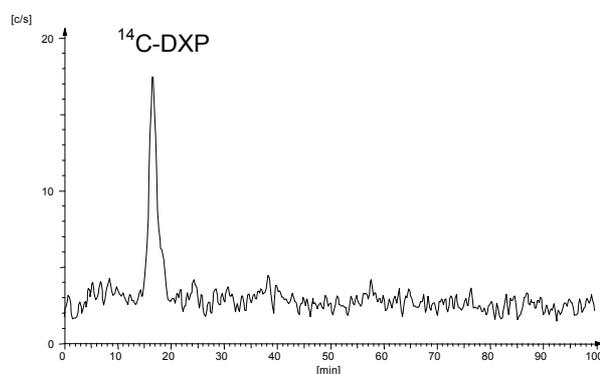


Abb. 30:

HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von $[U-^{14}C_3]$ Pyruvat (0,58 μ mol, 89,5 μ Ci) mit 1,5 mM D-Glyceraldehyd 3-phosphat, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM Thiamindiphosphat und 18 mU DXS zu $[1,2-^{14}C_2]$ DXP, Gesamtvolumen 1 ml, 4 h Inkubation bei 37 °C, Reinigung über DEAE-Sephadex und Dowex

Von dem nach der Reinigung über DEAE-Sephadex und Dowex 50w x 8 resultierenden $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{DXP}$ wurde ein NMR-Spektrum (Abb. 32 B) aufgenommen, durch das sich die Substanz eindeutig nachweisen ließ. $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{DXP}$ konnte mit einer Ausbeute von 66 % gewonnen werden.

3.2.3.2 Synthese von $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$

Für die Reaktion wurden 100 μCi $[\text{U}-^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ (321 nmol, spezifische Aktivität 311 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, 500 μl) und 2,7 mM Natriumpyruvat in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 gelöst und mit 6 mM MgCl_2 , 2 mM Thiamindiphosphat und 6 mM ATP pH 7,0 versetzt. 4,6 U Hexokinase, 4,2 U Glucose 6-phosphat-Isomerase, 1 U Fructose 6-phosphat-Kinase, 4 U Aldolase, 4 U Triosephosphat-Isomerase und 45 mU rekombinante DXS (3.1.1) wurden zugegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 700 μl ergänzt. Die Umsetzung erfolgte zur Optimierung der von Schuhr *et al.* (2001) durchgeführten Synthesen. Die Inkubation erfolgte für 6 h im Wasserbad bei 30 °C. Die Bildung des markierten DXP wurde HPLC-analytisch mit dem Ionenpaar-System (2.7.2) überprüft. $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ wurde säulenchromatographisch über DEAE-Sephadex und Dowex 50w x 8 gereinigt (3.2.3.1). 80 μCi $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ mit einer spezifischen Aktivität von 155,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ konnten gewonnen werden. Die Gesamtausbeute dieser enzymatischen Synthese über sechs Reaktionschritte betrug 80 %. Die Radio-HPLC zeigte keine radioaktive Verunreinigung des Produkts an (Abb. 31).

Die Bestimmung der Position der markierten C-Atome in $^{14}\text{C-DXP}$ erfolgte durch $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie von $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{DXP}$, welches durch Umsetzung von D- $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]\text{GAP}$ mit Pyruvat gewonnen wurde (Gao *et al.*, 2003). Aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ wurde durch Reaktion mit den Enzymen der Glycolyse D- $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]\text{GAP}$ synthetisiert. Die Resultate der NMR-Analyse sind in Abbildung 32 A dargestellt und belegen eindeutig die Synthese von 3,4,5-markiertem DXP.

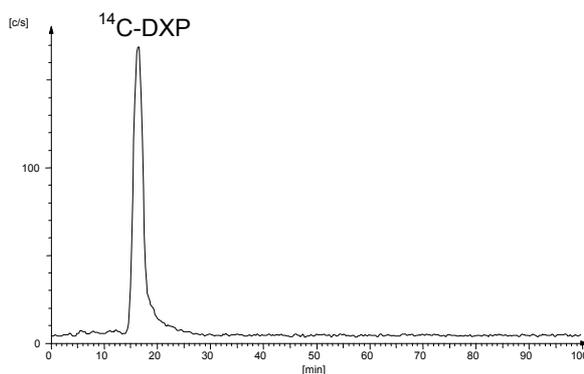
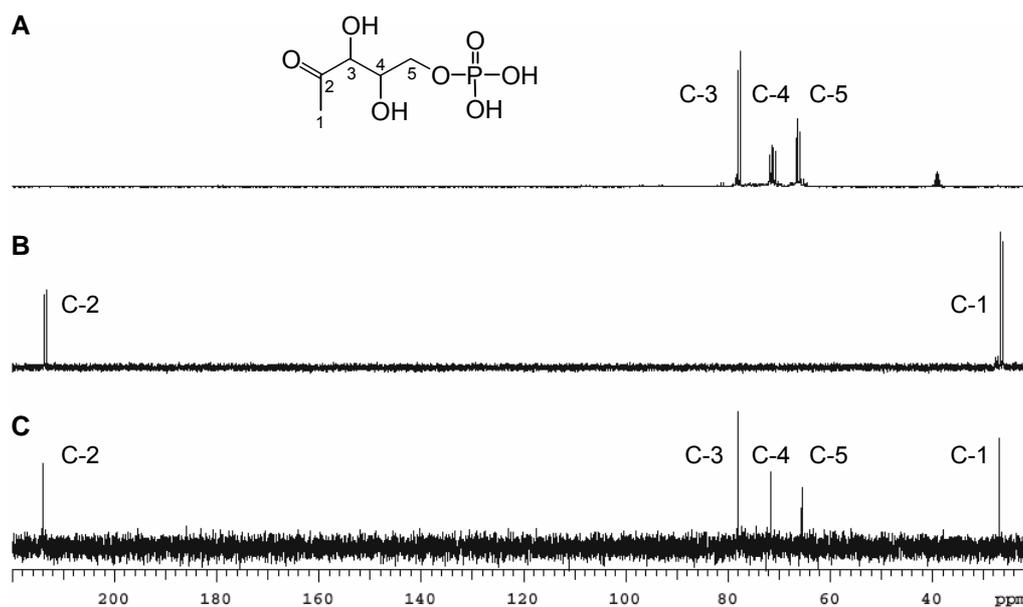


Abb. 31:

HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von $[\text{U}-^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ (321 nmol, 100 μCi) mit 2,7 mM Natriumpyruvat, 6 mM MgCl_2 , 2 mM Thiamindiphosphat, 6 mM ATP, 4,6 U Hexokinase, 4,2 U Glucose 6-phosphat-Isomerase, 1 U Fructose 6-phosphat-Kinase, 4 U Aldolase, 4 U Triosephosphat-Isomerase und 45 mU DXS in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 zu $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$, Gesamtvolumen 700 μl , 6 h Inkubation bei 30 °C, Reinigung an DEAE-Sephadex und Dowex

**Abb. 32:**¹³C-NMR-Spektren von DXP

- A** Umsetzung von [U-¹⁴C₆]D-Glucose (321 nmol, 100 μCi) mit 2,7 mM Natriumpyruvat, 6 mM MgCl₂, 2 mM Thiamindiphosphat, 6 mM ATP, 4,6 U Hexokinase, 4,2 U Glucose 6-phosphat-Isomerase, 1 U Fructose 6-phosphat-Kinase, 4 U Aldolase, 4 U Triosephosphat-Isomerase und 45 mU DXS in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 zu [3,4,5-¹⁴C₃]DXP, Gesamtvolumen 700 μl, 6 h Inkubation bei 30 °C, Reinigung an DEAE-Sephadex und Dowex

NMR-Analyse:

Die Bestimmung der Position der markierten C-Atome in ¹⁴C-DXP erfolgte durch ¹³C-NMR-Spektroskopie von [3,4,5-¹³C₃]DXP, das aus Pyruvat und D-[1,2,3-¹³C₃]GAP stammt und in paralleler Reaktion unter den gleichen Bedingungen synthetisiert wurde. D-[1,2,3-¹³C₃]GAP wurde durch Umsetzen von [U-¹³C₆]D-Glucose mit den glycolytischen Enzymen gewonnen.

¹³C-NMR-Spektrum von aus [U-¹³C₆]D-Glucose synthetisiertem [3,4,5-¹³C₃]DXP

¹³C-NMR-Daten: (D₂O, 75,5 MHz) δ: 77,8 (d, J = 39,7 Hz, C-3), 71,2 (ddd, J = 44,0 / 39,7 / 7,9 Hz, C-4), 66,1 (dd, J = 44,0 / 5,2 Hz, C-5)

- B** Umsetzung von 47 mM D-GAP und 44 mM [U-¹³C₃]Pyruvat mit 10 mM MgCl₂, 2 mM Thiamindiphosphat und 45 mM DXS in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 zu [1,2-¹³C₂]DXP, Gesamtvolumen 300 μl, 14 h Inkubation bei 37 °C, Reinigung an DEAE-Sephadex und Dowex

NMR-Analyse:

¹³C-NMR-Spektrum von aus D-GAP und [U-¹³C₃]Pyruvat synthetisiertem [1,2-¹³C₂]DXP

¹³C-NMR-Daten: (D₂O, 100,6 MHz) δ: 213,5 (d, J = 41,1 Hz C-2), 26,5 (d, J = 41,1 Hz, C-1)

- C** DXP – Gesamtspektrum der Einzelspektren der Syntheseprodukte [1,2-¹³C₂]DXP und [3,4,5-¹³C₃]DXP

3.2.4 Gewinnung von [1,2-¹⁴C₂]MEP

Da die Reaktion zu [1,2-¹⁴C₂]DXP (3.2.3.1) mit hoher Ausbeute möglich war, konnte ¹⁴C-Pyruvat (3.2.2.1) in einem gekoppelten Reaktionsschritt mit den Enzymen DXS und DXR zu ¹⁴C-MEP umgesetzt werden. Dazu wurde das durch Umsetzen von [U-¹⁴C₆]D-Glucose mit *E. coli* YYC202 erhaltene [U-¹⁴C₃]Pyruvat (0,58 μmol, 89,5 μCi) (3.2.2.1) mit 1,5 mM D-Glyceraldehyd 3-phosphat (3.2.1), 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 2 mM Thiamindiphosphat und 1 mM NADPH in einem Gesamtvolumen von 1 ml versetzt. Von den rekombinanten Enzymen DXS (3.1.1) und DXR (3.1.2) wurden 18 mU und 22 mU zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 10 h im Wasserbad bei 30 °C. Die Umsetzung wurde mit der

HPLC (2.7.2) überprüft (Abb. 33). $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{MEP}$ einer radiochemischen Reinheit von $> 90\%$ konnte mit einer Ausbeute von 95% gewonnen werden. Die spezifische Aktivität betrug $103,7\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

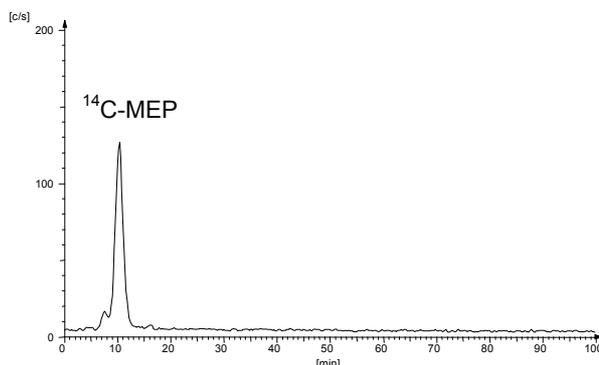


Abb. 33:

HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von $[\text{U}-^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ ($0,58\ \mu\text{mol}$, $89,5\ \mu\text{Ci}$) mit $1,5\ \text{mM}$ D-Glyceraldehyd 3-phosphat, $100\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7,5, $10\ \text{mM}$ MgCl_2 , $2\ \text{mM}$ Thiamindiphosphat, $1\ \text{mM}$ NADPH, $18\ \text{mU}$ DXS und $22\ \text{mU}$ DXR zu $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{MEP}$, Gesamtvolumen $1\ \text{ml}$, $10\ \text{h}$ Inkubation bei $30\ ^\circ\text{C}$

3.2.5 Gewinnung von $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{cMEDP}$

Über weitere drei Reaktionsschritte des DXP-Weges wurde das gewonnene $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{MEP}$ (3.2.4) enzymatisch zu $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{cMEDP}$ umgesetzt. Dazu wurde $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{MEP}$ mit $100\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7,5, $2\ \text{mM}$ MnCl_2 , $20\ \mu\text{M}$ FAD, $5\ \text{mM}$ NaF, $6\ \text{mM}$ ATP pH 7,0, $2\ \text{mM}$ CTP und $2\ \text{mg}$ aus *Narcissus pseudonarcissus* gewonnenem Stromaprotein, einer aus den Chromoplasten der Blüten isolierten Proteinfraction (Gao *et al.*, 2003), zur Reaktion gebracht. Das Endvolumen des Ansatzes betrug $1,3\ \text{ml}$. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Wasserbad bei $30\ ^\circ\text{C}$. $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{cMEDP}$ einer spezifischen Aktivität von $103,7\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ konnte in einer Ausbeute von 80% gewonnen werden. Das Produkt zeigte keine radioaktive Verunreinigung in der Radio-HPLC.

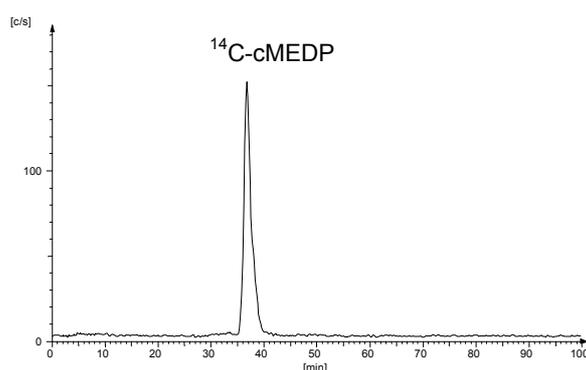


Abb. 34:

HPLC-Chromatogramm der Umsetzung des gewonnenen $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{MEP}$ (3.2.4) mit $100\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7,5, $2\ \text{mM}$ MnCl_2 , $20\ \mu\text{M}$ FAD, $5\ \text{mM}$ NaF, $6\ \text{mM}$ ATP pH 7,0 und $2\ \text{mM}$ CTP und $2\ \text{mg}$ aus *Narcissus pseudonarcissus* gewonnenem Stromaprotein zu $[1,2-^{14}\text{C}_2]\text{cMEDP}$, Gesamtvolumen $1,3\ \text{ml}$, Inkubation über Nacht bei $30\ ^\circ\text{C}$

In einigen Umsetzungen konnte nur eine unzureichende Synthese, ausgehend von $[^{14}\text{C}]\text{Pyruvat}$ und $1,5\ \text{mM}$ D-Glyceraldehyd 3-phosphat über $[^{14}\text{C}]\text{DXP}$ und $[^{14}\text{C}]\text{MEP}$ zu $[^{14}\text{C}]\text{cMEDP}$, erzielt werden. Die in diesen Fällen geringen Vorkommen an nichtzyklischen phosphory-

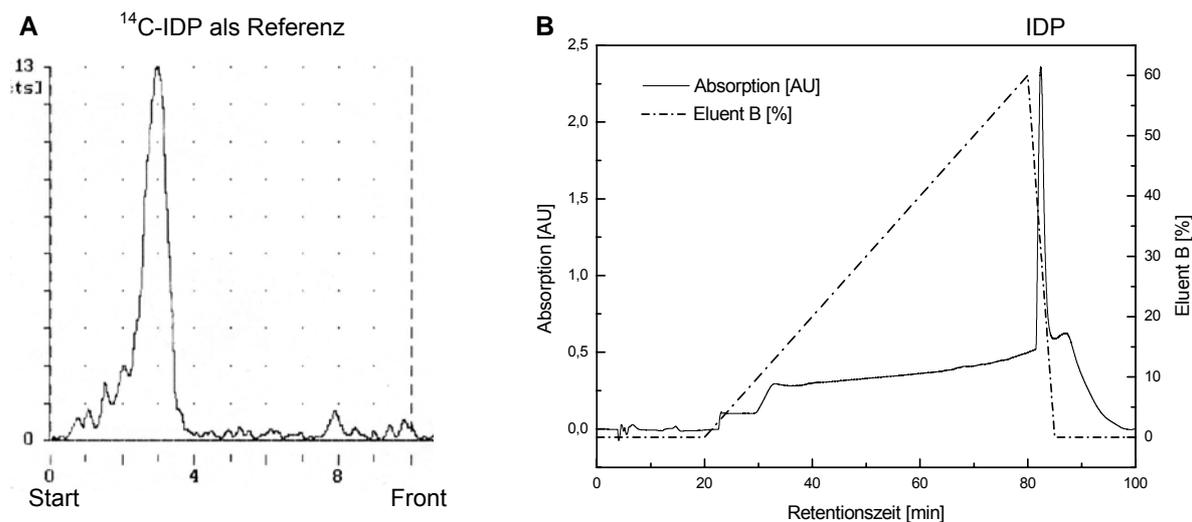
lierten Intermediaten konnten nach alkalischer Hydrolyse abgetrennt werden (Gao *et al.*, 2003). Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 100 mM Tris-HCl pH 7,5 und 1 U Alkalischer Phosphatase versetzt und für 3 h im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Zur Abtrennung der gebildeten unphosphorylierten Polyole vom zyklischen Diphosphat erfolgte der Einsatz der Ionenaustauschchromatographie.

Die Reaktion von [^{14}C]MEP zu [^{14}C]cMEDP war auch mit den rekombinanten Enzymen IspD (3.1.4), IspE (3.1.5) und IspF (3.1.6) möglich, die dabei erzielten Ausbeuten jedoch geringer als bei Verwendung der Stromaproteinfraktion.

3.2.6 Synthese von Isopentenylidiphosphat

Nachdem einzelne unterschiedlich isotopenmarkierte Intermediate des Alternativen Terpenbiosyntheseweges dargestellt werden konnten, wurde durch chemische Synthese Isopentenylidiphosphat gewonnen, das neben Dimethylallyldiphosphat als letzte Verbindung im Stoffwechselweg vorkommt. Die Isomere IDP und DMADP haben eine zentrale Bedeutung bei der Biosynthese der Terpene, da sie sowohl im Acetat-Mevalonat-Weg als auch im DXP-Weg vorkommen und auf ihrer Ebene ein Stoffaustausch zwischen beiden Biosynthesewegen stattfinden kann (Bick und Lange, 2003). Die Beschreibung der von Herrn Dr. Gao und mir durchgeführten Synthese und Analyse von IDP wurde in Abschnitt 2.5.3 dargestellt. Die Ausbeute des gewonnenen Zwischenprodukts Isopentenyltosylat betrug 86 %. Vom Reaktionsprodukt IDP konnten 200 mg synthetisiert werden, was einer Ausbeute von 67 % entsprach. Der Nachweis, dass es sich bei der gewonnenen Verbindung um IDP handelt, wurde dünnschichtchromatographisch, mittels HPLC sowie NMR-spektroskopisch geführt.

Die DC erfolgte auf Cellulose (DC3) in Isopropanol, Acetonitril und 0,1 M Ammoniumcarbonat im Verhältnis von 4,5:2,5:3 (v/v/v). Als Referenzsubstanz für das synthetisierte unmarkierte IDP wurde [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP eingesetzt, welches aufgrund der Markierung mit dem Radio-DC-Scanner detektiert werden konnte (Abb. 35 A). Die R_f -Werte von unmarkiertem IDP und ^{14}C -IDP betragen jeweils 0,3. Die HPLC mit der wie in Abschnitt 2.7.2 beschriebenen Methode mit UV-VIS-Detektion lieferte das in Abbildung 35 B dargestellte Ergebnis, das auftretende Signal stammt von IDP, was durch Referenzläufe mit unmarkiertem IDP (UV-VIS-Detektion) und [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP (Radio-HPLC) bestätigt werden konnte.

**Abb. 35:**

Synthese von IDP:

Teil 1: Umsetzung von 3-Methyl-3-buten-1-ol (43 mg, 0,5 mmol) mit p-Toluensulfonylchlorid (105 mg, 0,55 mmol) und 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (73 mg, 0,6 mmol) in 2,5 ml Methylenchlorid

Teil 2: Reaktion von Tris(tetra-n-butylammonium)hydrogendiphosphat (3,25 g, 3,6 mmol), 3,5 ml Acetonitril und 3-Methyl-3-buten-1-yltosylat (288 mg, 1,2 mmol), Inkubation 2 h bei RT, Reinigung an Dowex

A Radio-DC-Scanner-Darstellung von ^{14}C -IDP (als Referenz für unmarkiertes IDP)

B HPLC-Chromatogramm (UV-VIS-Detektion) von IDP

Durch Aufnahme von ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und ^{31}P -NMR-Spektren konnten die nachfolgenden Daten (Abb. 36) ermittelt werden. Die Resultate sind übereinstimmend mit denen in der Synthesevorschrift (Davisson *et al.*, 1985; Davisson *et al.*, 1986). Durch Erhalt dieser Spektren konnte die Reinheit des synthetisierten IDP nachgewiesen werden.

Das durch chemische Synthese gewonnen IDP wurde im weiteren Verlauf der Arbeit zur enzymatischen Charakterisierung der IDP-Isomerase eingesetzt (3.3.3). Zudem kann durch enzymatische Synthese IDP zu DMADP umgesetzt werden.

Die durch chemische und enzymatische Synthese gewonnenen Intermediate D-GAP, Pyruvat, DXP, MEP cMEDP und IDP des DXP-Weges konnten in unterschiedlichen Markierungsmustern für analytische (NMR, MS), kinetische (K_M -Wertbestimmungen), *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

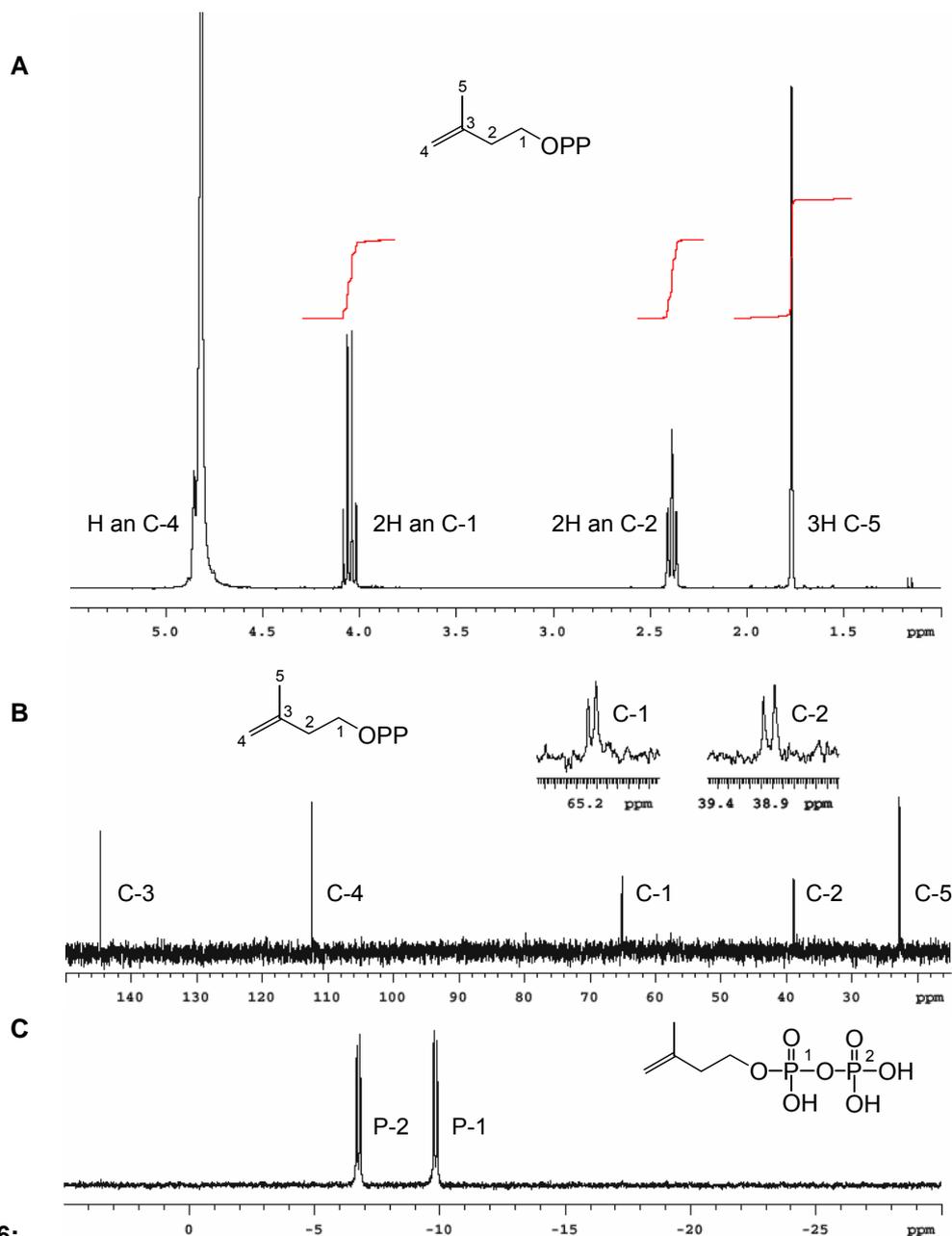


Abb. 36:
NMR-Spektren von IDP

Synthese von IDP:

Teil 1: Umsetzung von 3-Methyl-3-buten-1-ol (43 mg, 0,5 mmol) mit p-Toluensulfonylchlorid (105 mg, 0,55 mmol) und 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (73 mg, 0,6 mmol) in 2,5 ml Methylenchlorid
 Teil 2: Reaktion von Tris(tetra-n-butylammonium)hydrogendiphosphat (3,25 g, 3,6 mmol), 3,5 ml Acetonitril und 3-Methyl-3-buten-1-yltosylat (288 mg, 1,2 mmol), Inkubation 2 h bei RT, Reinigung an Dowex

A NMR-Analyse:

¹H-NMR-Spektrum von IDP

¹H-NMR-Daten: (D₂O, 300 MHz) δ: 4.85 (br s, H an C-4) [H-1 an C-4 ist vom Lösungsmittelsignal z.T. verdeckt, H-2 an C-4 ist vom Lösungsmittelsignal vollständig verdeckt], 4.05 (2H, dt, J = 6,6 / 6,6 Hz, H an C-1), 2.39 (2H, t, J = 6,6 Hz, H an C-2), 1.77 (3H, s, 3H an C-5)

B NMR-Analyse:

¹³C-NMR-Spektrum von IDP

¹³C-NMR-Daten: (D₂O, 75,5 MHz) δ: 144,71 (s, C-3), 112,42 (s, C-4), 65,16 (d, J = 5,2 Hz, C-1), 38,93 (d, J = 7,5 Hz, C-2), 22,77 (s, C-5)

C NMR-Analyse:

³¹P-NMR-Spektrum von IDP (ohne Kopplungen zu ¹H)

³¹P-NMR-Daten: (D₂O, 162 MHz) δ: -6,75 (d, J = 21,9 Hz, P-2), -9,83 (br d, J = 21,9 Hz, P-1)

3.3 Enzymatische Charakterisierung der IDP-Isomerase aus *E. coli* und einer neuen IDP-Isomerase aus *C. sativa*

Zur Darstellung von unterschiedlich markierten Derivaten des DXP-Weges konnten am Stoffwechselweg beteiligte Enzyme durch Klonierung, Überexpression und Proteinreinigung gewonnen werden. Bei der Biosynthese terpenoider Verbindungen spielt die Isopentenylidiphosphat DELTA-Isomerase (IDI, EC-Nummer 5.3.3.2) eine zentrale Rolle. Sie ist für die Isomerisierung von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat verantwortlich. Aktivierte Isopreneinheiten bilden den Ausgangspunkt für die Synthese von Prenyldiphosphaten, Squalen und weiteren isoprenoiden Verbindungen. So reguliert das Enzym IDP-Isomerase das Verhältnis der C₅-Vorstufen des plastidären DXP- und des cytosolischen MVA-Weges. Wie einleitend beschrieben (1.2.3), sind IDP/DMADP-Isomerasen aus unterschiedlichsten Organismen kloniert worden (Cunningham und Gantt, 2000). Für die Isomerisierung sind divalente Kationen wie Mg²⁺ oder Mn²⁺ notwendig.

3.3.1 Klonierung und heterologe Expression der IDP-Isomerasen

Nachdem vorangehende Enzyme und Substrate des Alternativen Terpenbiosyntheseweges erfolgreich gewonnen werden konnten, war es das nächstfolgende Ziel, die IDP-Isomerase als aktives Enzym zur Darstellung von Dimethylallyldiphosphat zu exprimieren. Damit sollten weiterführende Untersuchungen zur funktionalen Bedeutung der IDP-Isomerase ermöglicht werden. Bislang war bekannt, dass zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen von Bakterien dieses Enzym nicht zwingend notwendig ist (Hahn *et. al.*, 1999). Die Funktion des Enzyms in höheren Pflanzen wird gegenwärtig analysiert, beispielsweise in Experimenten mit pflanzlichen Mutanten, in denen das *idi*-Gen ausgeschaltet ist (Page *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die IDP-Isomerase aus einem bakteriellen und einem pflanzlichen Organismus kloniert und exprimiert.

3.3.1.1 IDP-Isomerase aus *E. coli*

Ebenso wie bei den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Enzymen wurde mit genspezifischen Primern die DNA-Sequenz der IDI aus *E. coli* (Tab. 3) amplifiziert, das PCR-Produkt in den pCR[®]T7/NT TOPO[®]-Vektor (2.1.2) kloniert, sequenziert und in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Durch Induktion mit IPTG konnte die IDI aus *E. coli* exprimiert werden und stand nach der Reinigung mit Metall-Chelat-Affinitätschromatographie zur Verfügung. Die IDP-Isomerase aus *E. coli*, welche nativ als Homodimer vorliegt, weist eine Molekulare Masse von 20,5 kDa auf. Das gewonnene rekombinante Enzym zeigte im SDS-Gel eine Bande von 25 kDa (Abb. 37). Abweichungen im apparenten Molekulargewicht der SDS-PAGE von dem theoretisch erwarteten Wert wurden schon eher beschrieben (Hahn *et. al.*, 1999). Die IDI aus *E. coli* konnte mit dem im SDS-Gel dargestellten Rein-

heitsgrad zur Verfügung gestellt werden. Aus einem Liter Kulturvolumen wurde durchschnittlich 4,8 mg gereinigtes Enzym mit einer Konzentration von 1,8 mg/ml gewonnen. Das Ergebnis der DNA-Sequenzierung des Plasmids und das apparente Molekulargewicht wiesen auf die erfolgreiche Expression der IDI aus *E. coli* hin. Zunächst war keine katalytische Aktivität der IDI aus *E. coli* nach Umsetzung mit ^{14}C -IDP und der HPLC-analytischen Detektion nachweisbar. Dessen ungeachtet sollte neben der bakteriellen IDP-Isomerase auch ein pflanzliches Enzym kloniert und exprimiert werden.

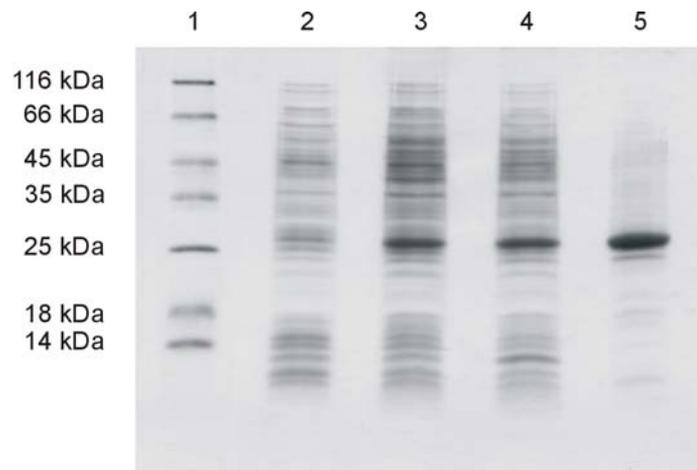


Abb. 37:

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) der rekombinanten IDP-Isomerase aus *E. coli*: Proteinmarker (1), Bakterienzellextrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach dem Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 µg; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt (n = 5); Darstellung eines typischen Gels

3.3.1.2 IDP-Isomerase aus *C. sativa*

Als pflanzlicher Organismus, aus dem die IDP-Isomerase kloniert und exprimiert werden sollte, wurde *Cannabis sativa* ausgewählt. Die Nukleotidsequenz der IDI aus *C. sativa* war bisher noch nicht beschrieben worden. In einer von Dr. J. Page, IPB Halle, zur Verfügung gestellten cDNA aus Trichomen von *C. sativa* wurde durch Sequenzvergleich die mutmaßliche Plastidtransportsequenz entdeckt. Anhand dieser charakteristischen Sequenz, deren Translationsprodukt für den Import der Proteine in Plastiden sorgt, war es möglich, Oligonukleotide für die IDI aus *C. sativa* zu entwickeln. Die Primer Cs idi-5' und Cs idi-3' dienten zur Amplifizierung der DNA-Sequenz vom Start- bis zum Stopcodon, jedoch ohne den für das Chloroplastentransportpeptid codierenden Bereich. Im Anschluss wurde das amplifizierte cDNA-Fragment in den Vektor kloniert, transformiert und sequenziert. Datenbankvergleiche im BLAST-Modus ergaben Ähnlichkeiten zu heterologen IDP-Isomerasen. Die vollständige Nukleotidsequenz der IDP-Isomerase aus *C. sativa* wurde aus den Sequenzierdaten ermittelt und ist in Abbildung 38 dargestellt. Der offene Leserahmen umfasst 810 Nukleotide und codiert für ein Protein mit 269 Aminosäuren.

atgggagactctgccgacgctggaatggacgctgtccagagacgccttatgtttgatgat	60
M G D S A D A G M D A V Q R R L M F D D	20
gaatgcattctagtggatgagaatgaccgagttggttggtcatgatacaaaatataactgt	120
E C I L V D E N D R V V G H D T K Y N C	40
cacttgatggaaaagattgaaaaggataatttgctacacagggctttcagtggttcttg	180
H L M E K I E K D N L L H R A F S V F L	60
ttcaactcaaaaatagagttgcttcttcagcaacgttctgcaacaaaggtaacattccct	240
F N S K Y E L L L Q Q R S A T K V T F P	80
cttggtgaggacaaacacctggttagccacccgctctaccgtgaatctgagcttatcgat	300
L V W T N T C C S H P L Y R E S E L I D	100
gaggagtcccttgagcaaggaatgcagcacagagaaagcttttagatgagctgggtatt	360
E E S L G A R N A A Q R K L L D E L G I	120
cctgctgaagatgtgccagttgatcaatcccccactaggcaggatgctgtacaaagct	420
P A E D V P V D Q F T P L G R M L Y K A	140
ccttctgatggcaaatggggcgagcatgaacttgattacctgctcttcacgtccgggat	480
P S D G K W G E H E L D Y L L F I V R D	160
gttagtgtcaatccaaaccagatgaagtagctgatatcaagtatgtaaaccgggacgag	540
V S V N P N P D E V A D I K Y V N R D E	180
ttgaaagagttggtgaggaaagcagatgctggggaaggaggcttgaagctatccccttg	600
L K E L L R K A D A G E G G L K L S P W	200
ttcagactggttggtgataatcttctgttcaagtgggtggaccatggtgagaaaggcaca	660
F R L V V D N F L F K W W D H V E K G T	220
cttaaggaagttgctgatatgagaattcgagctccgctcgacaagcttgcgggccgcactcg	720
L K E V A D M R I R A P S T S L R P H S	240
agcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaggaagctgagt	780
S T T T T T T E I R L L T K P E R K L S	260
tggtgctgccaccgctgagcaataactag	810
W L L P P L S N N *	269

Abb. 38:

Nukleotid- und Aminosäuresequenz der IDP-Isomerase aus *C. sativa* – vom Start- bis zum Stopcodon zählt die Sequenz 810 Nukleotide, die für ein Protein mit 269 Aminosäuren codieren. Das Stopcodon wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Nach erfolgreicher Transformation in den Expressionsstamm – es wurde mittels PCR kontrolliert, ob das Plasmid im Stamm enthalten ist – konnte durch HPLC-analytische Detektion keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Als Ursache dafür konnten verschiedene Gründe in Betracht kommen: die IDP-Isomerase lässt sich in diesem Vektor nicht exprimieren, der gewählte Expressionsstamm ist ungeeignet und der Aktivitätstest bzw. dessen Detektion sind fehlerhaft. Nachdem Abwandlungen des Systems wie beispielsweise die Expression in den *E. coli*-Expressionsstämmen BL21(DE3)pLysS, Novagen, BL21(DE3)RIL, IPB Halle, und BL21 Star™(DE3), Invitrogen, erfolglos waren, wurde als weiterführende Möglichkeit die Klonierung in einen anderen Vektor gewählt.

Für die Amplifizierung wurden neben der *Pfu*-DNA-Polymerase die mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme versehenen Oligonukleotide Cs idi-5' *BamH* I und Cs idi-3' *EcoR* I eingesetzt. Das Plasmid IDI pCR T7/NT TOPO diene als DNA-Matrize. Anschließend erfolgte die Klonierung (2.2.4.2) des gereinigten PCR-Produkts in den pHIS8-3-Vektor (2.1.2), einen Vektor, der die Sequenz für eine Polyhistidin-Fusion mit 8 Aminosäuren besitzt und somit die Reinigung des rekombinanten Proteins am Talon-Harz ermöglicht. Die nach der Transformation erhaltenen Bakterienkolonien wurden auf das Vorhandensein des Plasmids untersucht. Dazu diene die Polymerasekettenreaktion mit dem pHIS8-3 T7-Sense-Primer, dem Cs idi-3' *EcoR* I-Antisense-Primer und der *Taq*-DNA-Polymerase unter Verwendung des gleichen PCR-Programms. Aus positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und im Anschluss sequenziert. Nach der Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) konnte die IDI aus *C. sativa* durch Induktion mit IPTG exprimiert und durch Affinitätschromatographie am Talon-Harz gereinigt werden.

Das mittels SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht der IDP-Isomerase aus *C. sativa* beträgt etwa 34 kDa und stimmt im Rahmen der Genauigkeit der gelelektrophoretischen Proteintrennung mit dem vorhersagbaren Wert (30,9 kDa) überein. Aus diesem SDS-Gel (Abb. 39) ist ersichtlich, dass die IDI aus *C. sativa* im Vergleich zu den vorangehenden Enzymen in einem nicht so hohen Reinheitsgrad vorliegt, aber die eindeutig höchste Konzentration aufweist. Aus einem Liter Expressionskultur konnte mit durchschnittlich 15 mg IDP-Isomerase einer Konzentration von 5 mg/ml im Gegensatz zur IDI aus *E. coli* deutlich mehr Protein gewonnen werden.

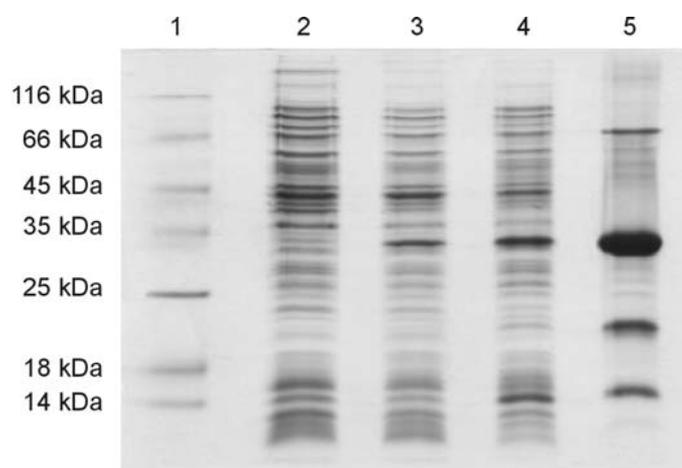


Abb. 39:

SDS-Polyacrylamid-Gel (12%ig) der rekombinanten IDP-Isomerase aus *C. sativa*: Proteinmarker (1), Bakterienzellextrakt vor (2) und nach (3) Induktion mit IPTG, Rohextrakt nach dem Aufschluss durch Lysozym und Ultraschall (4), Protein nach Talonreinigung und Umpufferung (5); Proteinmenge je Spur: 20 µg; Proteintrennung mit gleich bleibendem Ergebnis wiederholt (n = 7); Darstellung eines typischen Gels

Wie das *E. coli*-Enzym zeigte auch die heterolog exprimierte IDI aus *C. sativa* nach Umsetzung mit ^{14}C -IDP keine katalytische Aktivität. ^{14}C -DMADP konnte mit der eingesetzten HPLC-Methode (2.7.2) nicht detektiert werden. Die Nukleotidsequenzierung des IDI-Konstruktes und das Resultat der SDS-PAGE wiesen jedoch auf die IDP-Isomerase aus *C. sativa*

hin. Nach Bewertung aller Erkenntnisse stellte sich heraus, dass die an die Umsetzung mit IDP anschließende HPLC-Analytik möglicherweise fehlerhaft war.

3.3.2 Analytischer Nachweis der Enzymaktivität von IDP-Isomerasen

Bei der Prüfung der katalytischen Aktivität der rekombinanten IDP-Isomerasen kam die Ionenpaar-reversed-Phase HPLC-Methode nach McCaskill und Croteau (1993) zum Einsatz, mit der phosphorylierte Verbindungen quantitativ erfasst werden können. In Abwandlungen (2.7.2) wurde diese HPLC-Methode zur Auftrennung der phosphorylierten Intermediate des DXP-Weges verwendet (Fellermeier *et al.*, 2001). Lange Zeit bestand Grund zur Annahme, dass mit dieser Methode eine Trennung von IDP und seiner isomeren Struktur DMADP erzielt wird (McCaskill und Croteau, 1993; Gao *et al.*, 2002). Später kam es zu Unstimmigkeiten. Es gab Anzeichen dafür, dass das für DMADP erfasste Signal bei 63 min nicht von dieser Verbindung stammt (Rohdich *et al.*, 2003). Zur Überprüfung sollte das Enzym identifiziert werden, durch dessen Katalyse eine Verbindung entsteht, die in dieser HPLC-Methode eine Retentionszeit von 63 min aufweist. Für die Identifizierung des Intermediats kam der von Herrn Prof. A. Böck, LMU München, bereit gestellte *E. coli*-Stamm ID16 zum Einsatz. Das für die IDP-Isomerase codierende *idi*-Gen im *E. coli*-Stamm ID16 war deletiert. Der Stamm verliert dadurch seine Fähigkeit, DMADP aus IDP zu isomerisieren. Jedoch liefert die Inkubation des Rohextrakts dieses Stammes mit [¹⁴C]IDP in der Radio-HPLC-Analyse (2.7.2) ein Signal bei 63 min. Wenn es sich bei dem erhaltenen Signal nicht um DMADP handelt, welches Enzym führt dann zu diesem Signal und welches Intermediat stellt es dar? Zur Klärung dieser Fragen wurde das betreffende Protein aus dem Stamm *E. coli* ID16 isoliert (2.7.3).

3.3.2.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Zum Nachweis der Enzymaktivität einzelner *E. coli*-Lysatfraktionen der verschiedenen Anreicherungsschritte diente ein Reaktionsansatz mit 20.000 - 50.000 cpm [1-¹⁴C]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol), 100 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MnCl₂, 20 mM MgCl₂, 3,5 mM NaF und 5 mM DTT in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Inkubiert wurde für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch fünfminütige Inkubation bei 100 °C. Das Gesamtvolumen wurde mittels Radio-HPLC (2.7.2) analysiert.

3.3.2.2 Kultivierung des Bakterienstammes und Ammoniumsulfat-Fällung

Die Anzucht des Stammes *E. coli* ID16 erfolgte in LB-Medium (Sambrook *et al.*, 2001) ohne Zusatz eines Antibiotikums. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 wurde die Zellsuspension zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4000 rpm) und das Bakterienpellet bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Nach Resuspendierung von 12 g Bakterienpellet in 100 ml Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,6 und 5 mM β-Mercaptoethanol) kam zur partiellen Aufreinigung eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat zum Einsatz. Bei dieser Präzipitationsmethode erfolgt die

Proteinfällung durch Aussalzen bei hohen Salzkonzentrationen. Die Fällung erfolgte durch Ammoniumsulfat-Zugabe in den Bereichen 0 - 30 % und 30 - 60 % als Anfangs- bzw. Endkonzentrationen (Englard und Seifter, 1990). Das erste Proteinpellet wurde verworfen, da es nur minimale Enzymaktivität aufwies. Nach der Fällung im zweiten Sättigungsbereich erfolgte die Gewinnung des Proteinpräzipitats durch Zentrifugieren (20 min, 4 °C, 10000 x g). Das Pellet wurde in 5 ml Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,6 und 5 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert und die erhaltene Probe zur Entsalzung und Umpufferung in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2 mM β -Mercaptoethanol nach Anweisung des Herstellers über eine PD10-Säule, Amersham Biosciences, gegeben. Die Gesamtaktivität betrug 7695 nmol/min bei einem Gesamtproteingehalt von 363 mg.

3.3.2.3 Ionenaustauschchromatographie

Nach der ersten Abtrennung von nicht aktivem Protein durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat wurden DEAE-Sepharose und SOURCE 30Q – ein schwacher und ein starker Anionenaustauscher – für die Ionenaustauschchromatographie gemäß Abschnitt 2.7.3.1 verwendet. Das Trennprinzip beruht auf der Bindung negativ geladener Proteine an positiv geladene Gruppen der Ionenaustauschermatrix. Liegt der isoelektrische Punkt der gelösten Proteine im Verhältnis zum eingesetzten Puffer im sauren pH-Bereich, liegen diese als Anionen vor, was die Bindung an die positiv geladene Säulenmatrix ermöglicht.

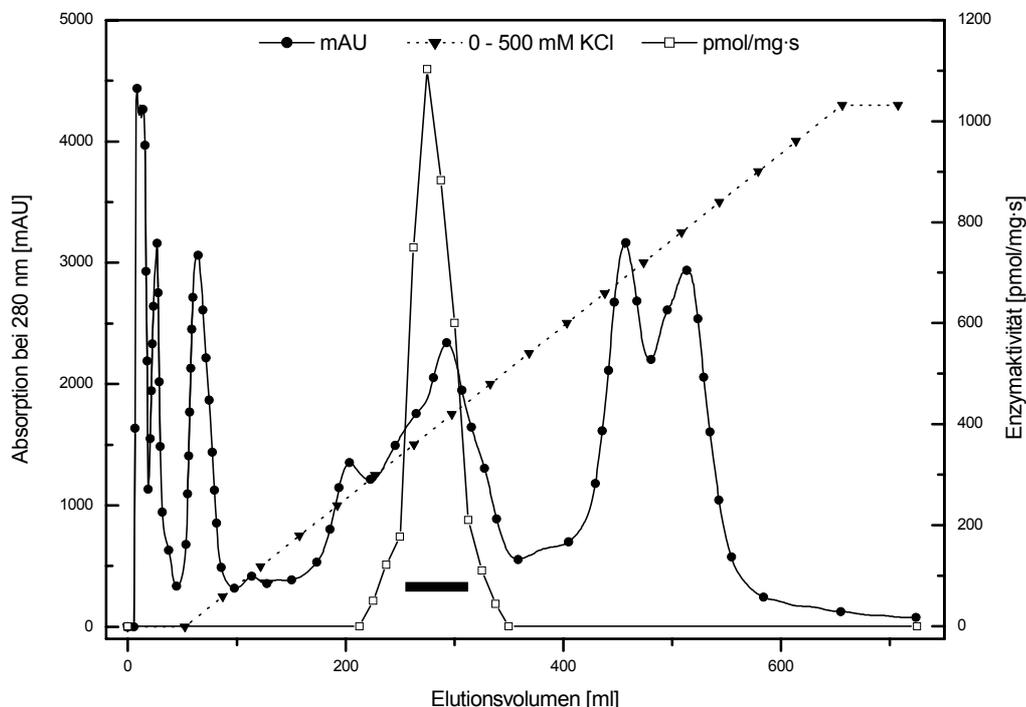


Abb. 40:

Elutionsprofil der HiPrep™ 16/10 DEAE FF-Säule nach Auftragen von 10 - 15 ml Rohextrakt (363 mg Protein) aus der Ammoniumsulfat-Fällung (30 - 60 %); Säulenabmessung: Ø 16 mm x 100 mm; Säulenvolumen: 20 ml; konstante Flussrate von 2,5 ml/min; Elution: linearer Gradient von 0 - 500 mM KCl in 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β -Mercaptoethanol (Elutionspuffer IC) über 30 Säulenvolumen; Fraktionsgröße 12 ml; Bestimmung der enzymatischen Aktivität (3.3.2.1) – Der mit einem Balken gekennzeichnete Elutionsbereich wurde zur weiteren Reinigung eingesetzt.

Ein typisches Elutionsprofil der DEAE-Säule ist in Abbildung 40 dargestellt. Die mit einem Balken gekennzeichneten Fraktionen wurden vereinigt. Die Gesamtaktivität des Enzyms nach Trennung über die DEAE-Säule betrug 5342 nmol/min, die Gesamtproteinmenge lag bei 107 mg. Gegenüber dem aus der Ammoniumsulfat-Fällung gewonnenen Rohextrakt konnte eine Anreicherung um den Faktor 2,5 erzielt werden, wobei 71 % Fremdproteine bei einem Aktivitätsverlust von 29 % abgetrennt wurden.

Zur weiteren Anreicherung erwies sich die Trennung über einen Stufengradienten an der SOURCE 30Q-Säule (2.7.3.1) als geeignet, deren typisches Elutionsprofil in Abbildung 41 dargestellt ist. Die vereinigten Fraktionen des Eluates, die für die weitere Reinigung eingesetzt wurden, sind mit einem Balken markiert. Bei einem Gesamtproteingehalt von 28 mg betrug die Gesamtaktivität 4479 nmol/min. Durch diesen Reinigungsschritt konnte durch Abtrennen von 74 % nicht aktivem Fremdprotein bei einem Verlust an Aktivität von 16 % das zu reinigende Enzym dreifach angereichert werden.

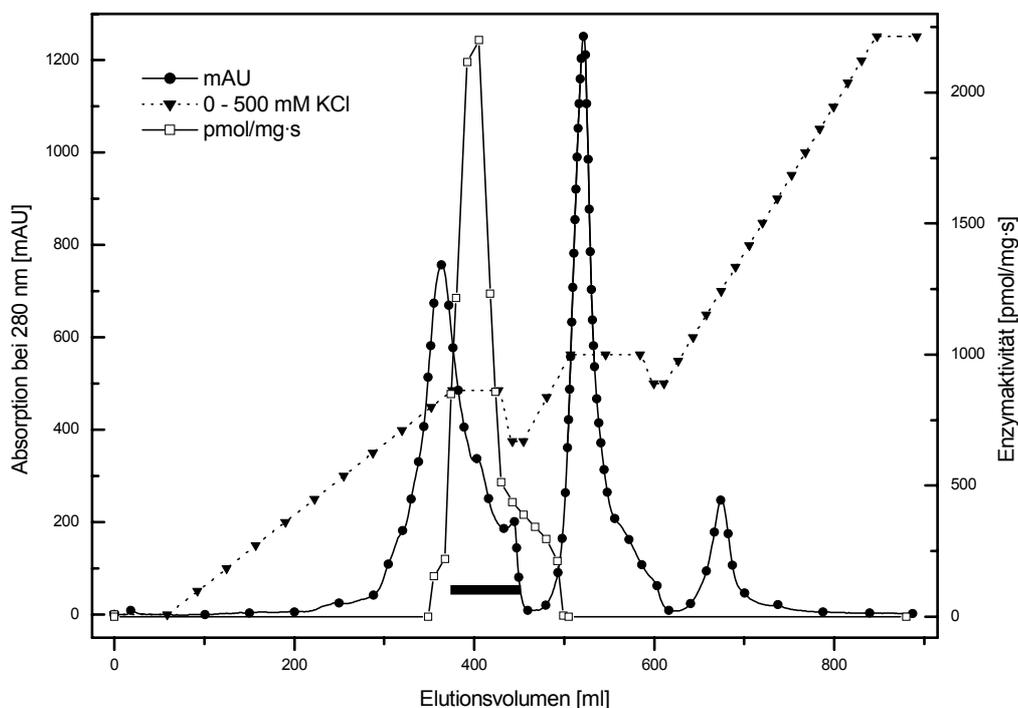


Abb. 41:

Elutionsprofil der SOURCE 30Q-Säule nach Auftragen von 7 - 11 ml DEAE-Eluat (107 mg Protein); Säulenabmessung: XK16/20-Säule, Ø 16 mm x 130 mm; Säulenvolumen: 26 ml; konstante Flussrate von 5 ml/min; Elution: Stufengradient (2.7.3.1) mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen von 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β -Mercaptoethanol, 500 mM KCl (Elutionspuffer IC) über 30 Säulenvolumen; Fraktionsgröße 12 ml; Bestimmung der enzymatischen Aktivität (3.3.2.1) – Der mit einem Balken gekennzeichnete Elutionsbereich wurde zur weiteren Reinigung eingesetzt.

3.3.2.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Bei dem sich anschließenden Reinigungsschritt wurde die Hydrophobe Interaktionschromatographie angewandt, bei der ausgenutzt wird, dass Proteine bei hoher Ionenstärke in der Lage sind, sich an hydrophobe Adsorbentien zu heften. Die gemäß Abschnitt 2.7.3.2 durchgeführte Auftrennung mit abnehmendem Salzgradienten ergab das in Abbildung 42 dargestellte

typische Elutionsprofil. Der mit einem Balken markierte Bereich zeigt die zur weiteren Anreicherung verwendeten Fraktionen des Eluates. Durch Trennung über die Phenylsepharose-Säule war es möglich, die gesamte Aktivität (4028 nmol/min, 13,3 mg Protein) gegenüber dem Durchlauf der SOURCE 30Q um den Faktor 1,8 anzureichern. Bei einem geringen Ausbeuteverlust von 10 % konnten 52 % Fremdproteine abgetrennt werden.

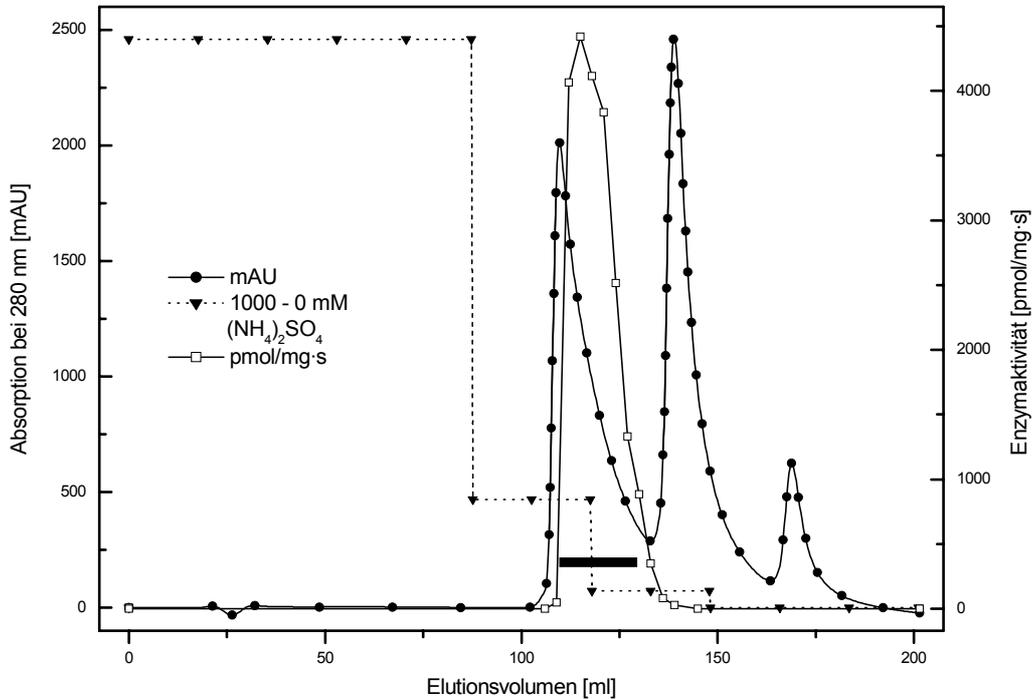
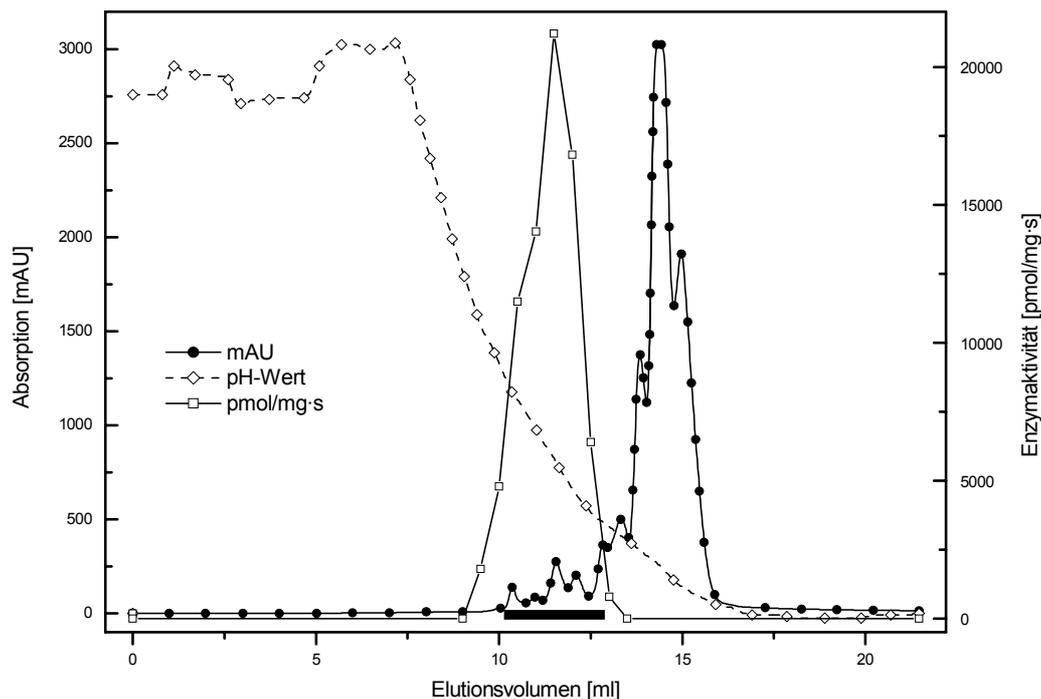


Abb. 42:

Elutionsprofil der HiPrep™ 16/10 Phenyl FF-Säule nach Auftragen von 8 - 10 ml SOURCE 30Q-Eluat (28 mg Protein); Säulenabmessung: Ø 16 mm x 100 mm; Säulenvolumen: 20 ml; konstante Flussrate von 2,5 ml/min; Elution: Stufengradient (2.7.3.2) mit Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β -Mercaptoethanol) bei Abnahme der Salzkonzentrationen über 7 Säulenvolumen; Fraktionsgröße 3 ml; Bestimmung der enzymatischen Aktivität (3.3.2.1) – Der mit einem Balken gekennzeichnete Elutionsbereich wurde zur weiteren Reinigung eingesetzt.

3.3.2.5 Chromatofokussierung

Die Chromatofokussierung an der MONO P-Säule (2.7.3.3) diente zur weiteren Abtrennung von inaktivem Protein. Bei dieser chromatographischen Methode werden Proteine auf Basis ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte getrennt. Ausgenutzt wird die Ausbildung eines absteigenden pH-Gradienten, der nach Equilibrieren der Säule mit einem Puffer hohen pH-Wertes durch Elution mit einem Puffer niedrigeren pH-Wertes entsteht. Die im Elutionsprofil (Abb. 43) mit einem Balken markierten Fraktionen wurden vereinigt. Die gesamte Aktivität, die nach der Trennung über die MONO P-Säule im Eluat lokalisiert werden konnte, betrug bei einem Gesamtproteingehalt von 320 μ g 2566 nmol/min. Mit der Chromatofokussierung konnte ein Anreicherungsfaktor von 27 gegenüber dem Eluat der Hydrophoben Interaktionschromatographie erzielt werden, wobei mit der sehr hohen Fremdproteinabtrennung von 97,6 % ein Aktivitätsverlust von 36 % zu verzeichnen war.

**Abb. 43:**

Elutionsprofil der MONO P HR 5/5-Säule nach Auftragen von 1,5 - 2,5 ml Phenylsepharose-Eluat (13,3 mg Protein); Säulenabmessung: Ø 5 mm x 50 mm; Säulenvolumen: 1 ml; konstante Flussrate von 0,5 ml/min; Elution: pH-Gradient (pH-Wert 7,1 bis pH 4,0) mit Elutionspuffer CF (10 % (v/v) Polypuffer 74, mit gesättigter Iminodiessigsäure auf pH 4,0 eingestellt, und 2 mM β -Mercaptoethanol), Fraktionsgröße 0,5 ml; Bestimmung der enzymatischen Aktivität (3.3.2.1) – Der mit einem Balken gekennzeichnete Elutionsbereich wurde zur weiteren Reinigung eingesetzt.

3.3.2.6 Natives Proteingel und anschließendes SDS-Polyacrylamid-Gel

Aufgrund des geringen Gesamtproteingehaltes von 320 μ g wurde nach der Bestimmung der Enzymaktivität als weiterer Reinigungsschritt die präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen herangezogen. Die Trennung erfolgt dabei nach Ladung und Größe. Für die Elektrophorese nativer Gele fanden Pufferlösungen ohne SDS und β -Mercaptoethanol Verwendung. Die Herstellungs- und Versuchsbedingungen entsprachen denen der SDS-PAGE (2.3.3). Das nach der Trennung über die MONO P-Säule gewonnene Eluat wurde über ein 12%iges natives Polyacrylamid-Gel getrennt, wobei die Probe in eine etwa 3 cm breite Tasche gegeben wurde. Sowohl die Konzentrierung der Probe im Sammelgel als auch die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte bei 4 °C mit einer Stromstärke von 12 mA in der mit 1 x Elektrodenpuffer ohne SDS (2.3.3) befüllten Elektrophoreseeinheit. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde an beiden Seiten der Tasche ein 4 mm aufgetrennte Probe umfassender Abschnitt senkrecht abgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue G 250 gefärbt, während das Mittelstück in Pufferlösung aufbewahrt wurde. Somit konnten die über das präparative Polyacrylamid-Gel getrennten Proteine sichtbar gemacht werden (Abb. 44 A). Das verbleibende native Gel wurde anhand des Ergebnisses der Färbung entlang der Banden in 3 bis 8 mm breite Abschnitte unterteilt. Aus diesen zehn Gelabschnitten konnten aufgetrennte Proteine mit 200 μ l Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2 mM β -Mercaptoethanol) bei 30 rpm in 4 oder 16 Stunden eluiert werden. Nach einem Zentrifugationsschritt

(10 min, 4 °C, 14500 rpm) erfolgte die Aufkonzentrierung der Proteinlösung auf etwa 50 µl mittels Nanosep 10 K blue, Trenngrenze 10 kDa, Pall. Die Enzymaktivität (3.3.2.1) konnte in den Gelabschnitten 4, 5 und 6 lokalisiert werden (in Abbildung 44 A mit einem Balken gekennzeichnet). Abschließend erfolgte eine Analyse der Eluate aus den betreffenden Gelabschnitten über ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel, welches in Abbildung 44 B dargestellt ist. Im Proteinbandenmuster des Gelabschnittes 5 waren zwei Banden von etwa 22 kDa und 66 kDa zu erkennen, die in den Gelabschnitten 4 und 6 nicht auftraten.

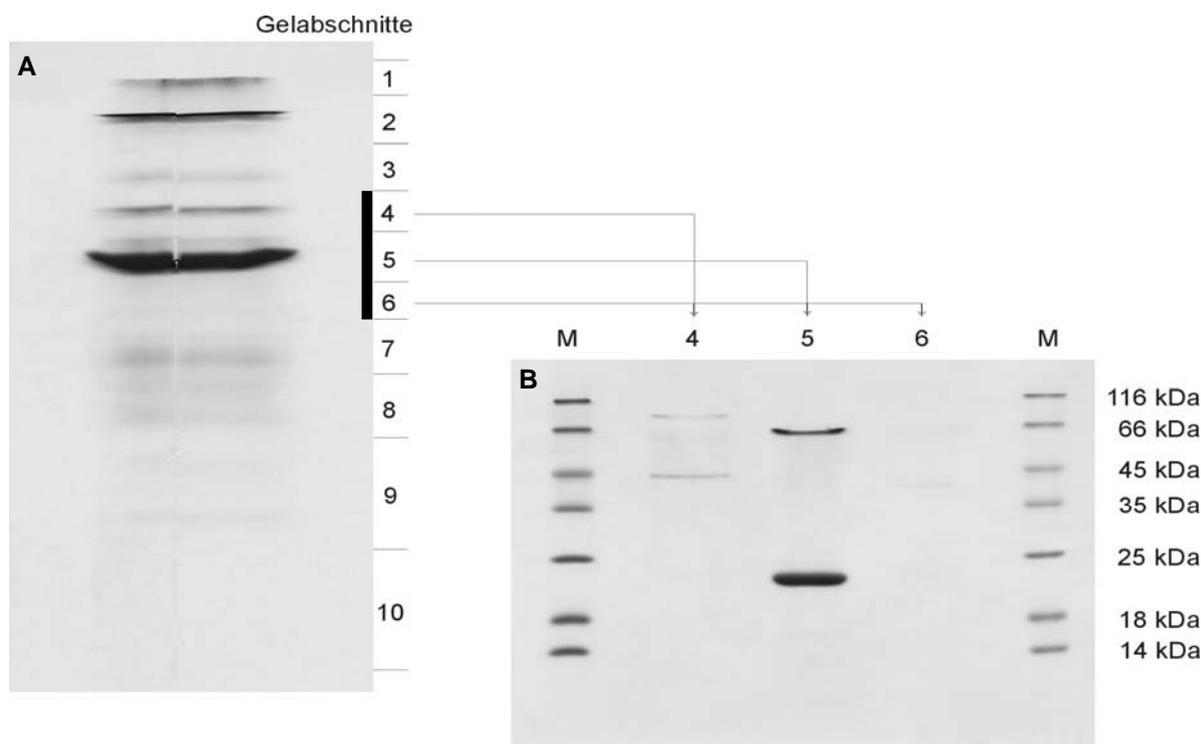


Abb. 44:

A Präparatives natives Polyacrylamid-Gel

Trennung des über die MONO P-Säule gewonnenen Eluates (320 µg Protein) über ein 12%iges natives Polyacrylamid-Gel: Aufgabe der Probe in eine etwa 3 cm breite Tasche, elektrophoretische Trennung bei 4 °C mit 12 mA, Färbung der an beiden Seiten der aufgetrennten Probe abgetrennten Abschnitte mit Coomassie Brilliant Blue G 250; Elution der Proteine aus den Gelabschnitten 1 - 10 und Bestimmung der enzymatischen Aktivität (3.3.2.1) – Die Eluate der Gelabschnitte 4, 5 und 6, die zur weiteren Auftrennung auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden, sind mit einem Balken gekennzeichnet.

B SDS-Polyacrylamid-Gel

Trennung der durch Elution gewonnenen Proteine aus den Gelabschnitten 4, 5 und 6 über ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel: elektrophoretische Trennung bei 80 V (Sammelgel) bzw. 100 V (Trenngel) und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250: Proteinmarker (M), Proteinbanden von Gelabschnitt 4, 5, 6 – Nach Aufkonzentrierung des Eluates wurde die gesamte Proteinmenge je Spur eingesetzt.

3.3.2.7 Übersicht über die Anreicherung

Durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (30 - 60 %), vier säulenchromatographische Schritte und eine präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen konnte das die Umsetzung von Isopentenylidiphosphat katalysierende Enzym aus dem *E. coli*-Lysat bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Gesamtaktivitätsausbeute betrug 33 % bei einem Anreicherungsfaktor von 377 im Vergleich zu dem nach der Ammoniumsulfat-Fällung

gewonnenen Rohextrakt und einer spezifischen Aktivität von 7917 nmol/min•mg. Mehr als 99,9 % Fremdproteine konnten durch die Reinigungsschritte abgetrennt werden. Während der Erarbeitung der Reinigungsprozedur führten alternativ eingesetzte Methoden wie die Gelfiltration und die Hydrophobe Interaktionschromatographie mit verschiedenen Matrices zu keiner weiteren Anreicherung des Proteins. In der folgenden Tabelle (4) ist ein Überblick über die gesamte Reinigung des Enzyms aus dem *E. coli*-Stamm ID16 dargestellt.

Tab. 4:
Übersicht zur Anreicherung der Anorganischen Pyrophosphatase aus *E. coli* ID16

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [nmol/min]	spezifische Aktivität [nmol/min•mg]	Ausbeute [%]	Reinigung (x-fach)
Rohextrakt nach 30 - 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	363	7695	21	100	1
Eluat nach DEAE	103	5342	52	70	2,6
Eluat nach SOURCE 30Q	28	4479	160	58	8
Eluat nach HIC	13,3	4028	303	52	14
Eluat nach MONO P	0,32	2566	7917	33	377

Für die umfangreiche Unterstützung sowohl bei der Kultivierung des Bakterienstammes als auch bei den einzelnen Reinigungsschritten und die konstruktive Zusammenarbeit am ÄKTApurifier möchte ich mich bei Herrn Christian Böttcher sehr herzlich bedanken.

3.3.2.8 Analyse der Proteinsequenz und Identifikation des Intermediats

Um die Aminosäuresequenz des gesuchten Proteins, welches Isopentenylidiphosphat in die in der Radio-HPLC-Analyse bei 63 min auftretende Verbindung umzusetzen vermag, zu erhalten, wurden die Banden des Gelabschnittes 5 (Abb. 44) der Sequenzierung unterzogen. Die Durchführung der Proteinsequenzierung erfolgte freundlicherweise von Herrn Dr. Piotrowski und Herrn Dr. Pollmann, Ruhr-Universität Bochum, bei denen ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken möchte.

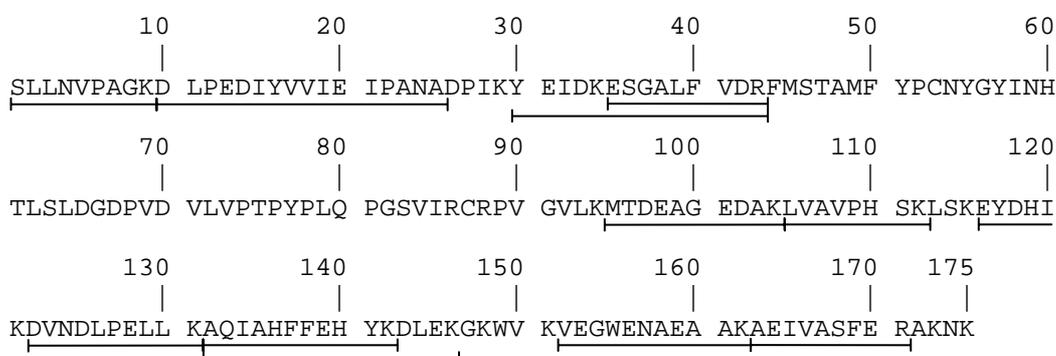


Abb. 45:
Sequenz der Anorganischen Pyrophosphatase aus *E. coli* ID16. Die über den MALDI-Fingerabdruck identifizierten Peptide sind unterstrichen.

Die Daten der Proteinsequenzierung wurden durch vergleichende Datenbankanalysen in der Peptidbank (www.matrixscience.com) ausgewertet. Bei beiden Banden in Bahn 5 des SDS-Polyacrylamid-Geles (Abb. 44) handelt es sich um eine Anorganische Pyrophosphatase, einem Protein, das zur Homooligomerisierung neigt und nativ als Homohexamer vorliegt. Das Ergebnis der Proteinsequenzierung ist in Abbildung 45 gezeigt.

IDP wurde mit der Anorganischen Pyrophosphatase aus dem *E. coli*-Stamm ID16 in ein Intermediat umgesetzt, das in der Radio-HPLC ein Signal bei 63 min ergab (Abb. 46). Bei dem Intermediat handelte es sich um Isopentenylmonophosphat (IMP), was durch MS-Analyse nachgewiesen werden konnte. Als Referenz für das aus der Reaktion von IDP mit der Anorganischen Pyrophosphatase aus dem *E. coli*-Stamm ID16 hervorgehende IMP wurde das Massenspektrum von IMP aus *N. benthamiana* in Abbildung 47 dargestellt. Das Massenspektrum wurde von Herrn Dr. J. Schmidt, IPB Halle, aufgenommen, wofür ich herzlich danke.

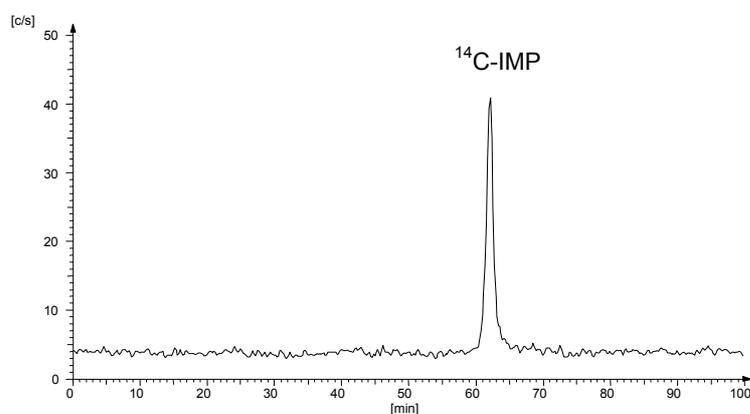


Abb. 46:

HPLC-Chromatogramm der Umsetzung (3.3.2.1) von 40.000 cpm [^{14}C]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) mit 10 mM MnCl_2 , 20 mM MgCl_2 , 3,5 mM NaF, 5 mM DTT und der Anorganischen Pyrophosphatase aus dem *E. coli*-Stamm ID16 in 100 mM Tris-HCl pH 7,6 zu ^{14}C -IMP, Gesamtvolumen 100 μl , 30 min Inkubation bei 37 °C, Reaktionsabbruch durch fünfminütige Inkubation bei 100 °C

3.3.2.9 Neuordnung der HPLC-analytischen Signale

Der *E. coli*-Stamm ID16, bei dem die Funktionsfähigkeit der IDP-Isomerase unterbunden ist, dephosphoryliert das applizierte IDP durch Katalyse der Anorganischen Pyrophosphatase zu Isopentenylmonophosphat, welches in der HPLC-Analyse das Signal bei 63 min hervorruft. Dieses Signal wurde unter Verwendung der beschriebenen HPLC-Methode (2.7.2) nicht wie lange angenommen von DMADP hervorgerufen. DMADP eluiert zusammen mit seiner isomeren Verbindung IDP bei 78 min. Die Reinigung der Anorganischen Pyrophosphatase ermöglichte, die HPLC-analytische Trennmethode neu zu bewerten und die richtigen Intermediate den Signalen zuzuordnen. Die zur Detektion der durch IDP-Isomerase katalysierten Umsetzung von IDP zu DMADP notwendige HPLC-Methode war fehlerhaft. Folglich wurden die aus *E. coli* und *C. sativa* klonierten und exprimierten IDP-Isomerasen erneut auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht.

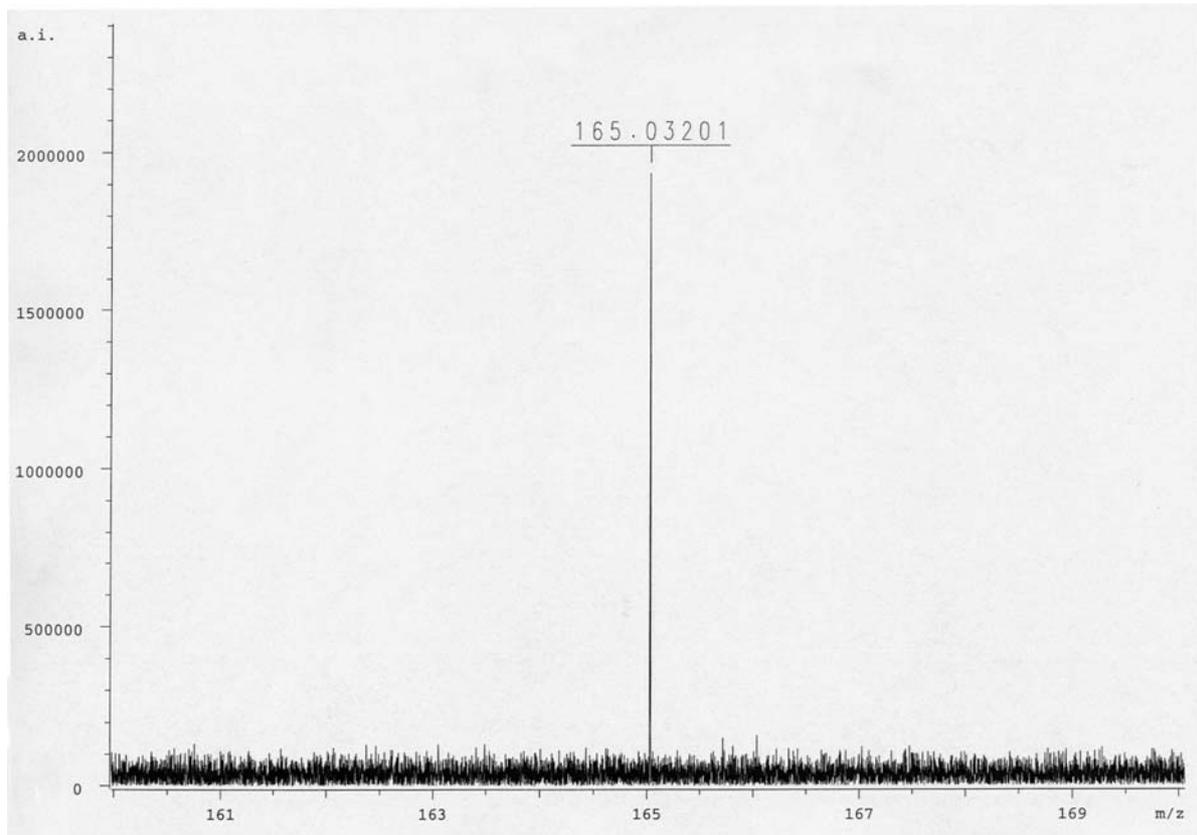


Abb. 47 – zu Abschnitt 3.3.2.8 gehörend:

Massenspektrum von Isopentenylmonophosphat aus *N. benthamiana* als Referenz für das IMP aus der Umsetzung von IDP mit der Anorganischen Pyrophosphatase aus dem *E. coli*-Stamm ID16 ESI-FT-ICRMS (negative ion mode) von IMP: M/z 165.03201 [M-H]⁻ (theoretisch ermittelter Wert: C₅H₁₀O₄P⁻ - 165.03222)

Zur Trennung von Mono-, Di-, und Triphosphatverbindungen wurde alternativ zur HPLC-Analyse mit einer Laufzeit von 100 min ein neues Verfahren mit einer nur 20-minütigen Laufzeit entwickelt (2.7.2). Die Trennung von Isopentenyldiphosphat und Isopentenylmonophosphat ist in Abbildung 48 dargestellt.

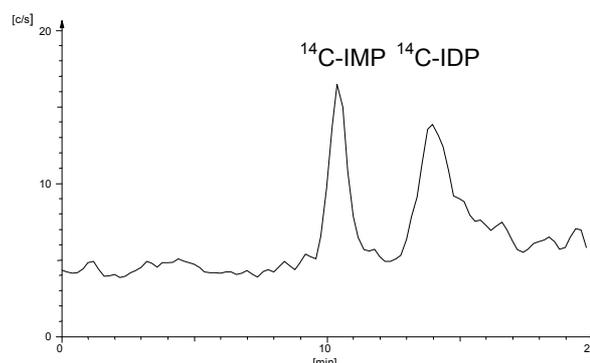


Abb. 48:

Radio-HPLC-Chromatogramm mit einer Laufzeit von 20 min: Umsetzung von 20.000 cpm [¹⁴C]IDP mit 100 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MnCl₂, 20 mM MgCl₂, 3,5 mM NaF und 5 mM DTT und Anorganischen Pyrophosphatase, Gesamtvolumen 100 µl, 30 min Inkubation bei 37 °C, Reaktionsabbruch durch fünfminütige Inkubation bei 100 °C

3.3.3 Katalytische Aktivität und enzymatische Charakterisierung

Nach Verifikation der HPLC-Methode und korrekter Zuordnung der Signale zu den betreffenden Intermediaten konnte die katalytische Aktivität der IDP-Isomerasen aus *E. coli* und *C. sativa* überprüft werden (2.4.8). Nach einer Inkubationszeit von 30 min, 1h oder 2 h bei 30 °C oder 37 °C wurde die Reaktion durch zweiminütige Inkubation bei 95 °C abgebrochen, auf Raumtemperatur gekühlt und mit 1 U Alkalischer Phosphatase versetzt. Die anschließende Inkubation für 30 min bei 37 °C führte zur Bildung der korrespondierenden nichtphosphorylierten Alkohole ¹⁴C-3-Methyl-3-buten-1-ol und ¹⁴C-3-Methyl-2-buten-1-ol. Mit der eingesetzten HPLC-Analyse konnten diese isomeren Strukturen getrennt werden.

3.3.3.1 IDP-Isomerase aus *E. coli*

Übereinstimmend mit den Daten der Sequenzanalyse des *idi*-Konstruktes und der SDS-PAGE der IDI aus *E. coli* konnte enzymatische Aktivität gezeigt werden. Nach der Umsetzung des rekombinanten Enzyms mit ¹⁴C-IDP (2.4.8, Inkubation 30 min und 30 °C) wurde mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die resultierenden Alkohole ¹⁴C-3-Methyl-3-buten-1-ol und ¹⁴C-3-Methyl-2-buten-1-ol konnten mit der Radio-HPLC nachgewiesen werden, was in Abbildung 49 B dargestellt ist. Zum Vergleich wurde ¹⁴C-IDP ohne vorherige enzymatische Umsetzung mit Alkalischer Phosphatase hydrolysiert (Abb. 49 A). Die spezifische Aktivität der rekombinanten IDP-Isomerase aus *E. coli* wurde mit 0,5 U/mg bestimmt.

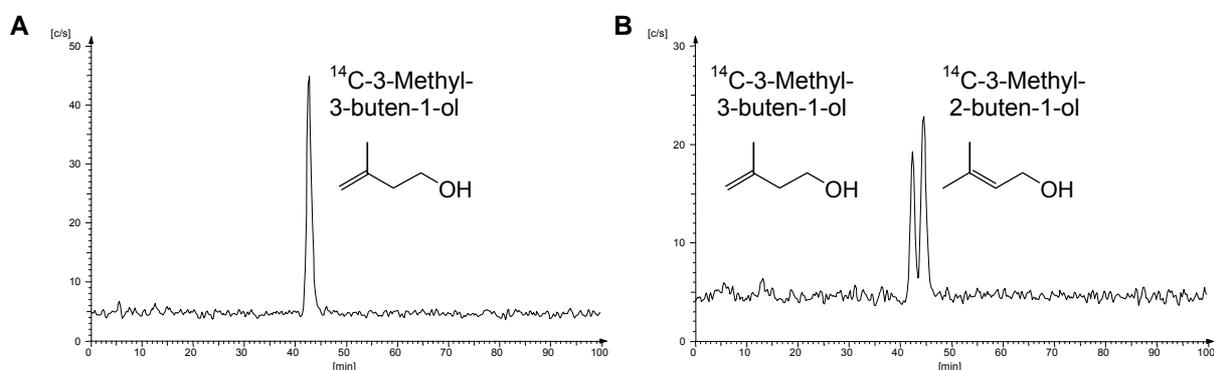


Abb. 49:

Umsetzung von 50.000 cpm [¹⁴C]IDP mit der rekombinanten IDP-Isomerase aus *E. coli* in 25 mM Hepes-KOH-Puffer pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 3,5 mM NaF und 2 mM DTT zu [¹⁴C]IDP und [¹⁴C]DMADP, Gesamtvolumen 100 µl, 30 min Inkubation bei 30 °C, nach Reaktionsabbruch durch zweiminütige Inkubation bei 95 °C und Eiskühlung Dephosphorylierung mit 1 U Alkalischer Phosphatase, 30 min Inkubation bei 37 °C

- A** HPLC-Chromatogramm von ¹⁴C-3-Methyl-3-buten-1-ol – Die Verbindung geht durch Hydrolyse aus [¹⁴C]IDP hervor (Dephosphorylierung mit 1 U Alkalischer Phosphatase, 30 min Inkubation bei 37 °C).
- B** HPLC-Chromatogramm von ¹⁴C-3-Methyl-3-buten-1-ol und ¹⁴C-3-Methyl-2-buten-1-ol – Die Verbindungen gehen durch Hydrolyse aus [¹⁴C]IDP und [¹⁴C]DMADP hervor (Dephosphorylierung mit 1 U Alkalischer Phosphatase, 30 min Inkubation bei 37 °C), welche aus der Umsetzung mit der IDP-Isomerase aus *E. coli* stammen.

3.3.3.2 IDP-Isomerase aus *C. sativa*

Datenbankvergleiche im BLAST-Modus ergaben Ähnlichkeiten zu heterologen IDP-Isomerasen und das Molekulargewicht entsprach dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Wert. Nach Korrektur der HPLC-Methode konnte die katalytische Aktivität der rekombinanten IDP-Isomerase aus *C. sativa* gezeigt werden. Die erfolgreiche heterologe Expression wurde durch Umsetzung des Enzyms mit ^{14}C -IDP (2.4.8, Inkubation 30 min und 30 °C) und anschließender Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase nachgewiesen. Die aus der Umsetzung hervorgehenden alkoholischen Verbindungen ^{14}C -3-Methyl-3-buten-1-ol und ^{14}C -3-Methyl-2-buten-1-ol wurden mit der Radio-HPLC analysiert (Abb. 50 B). Analog zum Aktivitätstest der IDI aus *E. coli* wurde ^{14}C -IDP ohne vorherige enzymatische Umsetzung mit Alkalischer Phosphatase hydrolysiert (Abb. 50 A). Die spezifische Aktivität der rekombinanten IDP-Isomerase aus *C. sativa* betrug 1,3 U/mg.

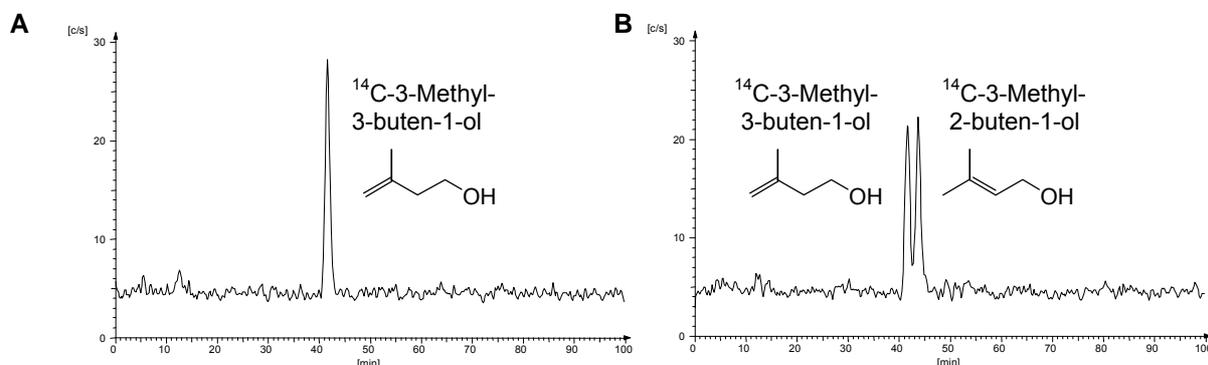


Abb. 50:

Umsetzung von 50.000 cpm [^{14}C]IDP mit der rekombinanten IDP-Isomerase aus *C. sativa* in 25 mM Hepes-KOH-Puffer pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 3,5 mM NaF und 2 mM DTT zu [^{14}C]IDP und [^{14}C]DMADP, Gesamtvolumen 100 μl , 30 min Inkubation bei 30 °C, nach Reaktionsabbruch durch zweiminütige Inkubation bei 95 °C und Eiskühlung Dephosphorylierung mit 1 U Alkalischer Phosphatase, 30 min Inkubation bei 37 °C

- A** HPLC-Chromatogramm von ^{14}C -3-Methyl-3-buten-1-ol – Die Verbindung geht durch Hydrolyse aus [^{14}C]IDP hervor (Dephosphorylierung mit 1 U Alkalischer Phosphatase, 30 min Inkubation bei 37 °C).
- B** HPLC-Chromatogramm von ^{14}C -3-Methyl-3-buten-1-ol und ^{14}C -3-Methyl-2-buten-1-ol – Die Verbindungen gehen durch Hydrolyse aus [^{14}C]IDP und [^{14}C]DMADP hervor (Dephosphorylierung mit 1 U Alkalischer Phosphatase, 30 min Inkubation bei 37 °C), welche aus der Umsetzung mit der IDP-Isomerase aus *C. sativa* stammen.

3.3.3.3 Umsetzungen mit IDP-Isomerasen

Zur Charakterisierung der IDP-Isomerasen aus *E. coli* bzw. *C. sativa* erfolgten Umsetzungen mit Isopentenylidiphosphat (IDP). Dabei wurde die Stoffmenge des Substrats, die Enzymmenge sowie die Inkubationszeit für den jeweiligen Nachweis optimiert. In einem Gesamtvolumen von 50 μl oder 150 μl wurde in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 1,5 mM MnCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF und 5 mM DTT [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) verdünnt mit unmarkiertem IDP und der IDP-Isomerase umgesetzt.

Im Unterschied zu den vorangehenden Untersuchungen wurde für die enzymatische Charakterisierung der IDP-Isomerasen ein alternatives Analyseverfahren eingesetzt. Der

Nachweis der Umsetzung beruht auf der Säurelabilität des Dimethylallyldiphosphat (Jones und Porter, 1985; Ramos-Valdivia *et al.*, 1997b) und ist in Abschnitt 2.4.8 beschrieben. IDP erweist sich gegenüber Säuren als stabil, wohingegen DMADP in Gegenwart von Säuren in die alkoholische Form 3-Methyl-2-buten-1-ol überführt wird. Nach Extraktion wurde der radioaktive Anteil des in der organischen Phase befindlichen 3-Methyl-2-buten-1-ol bestimmt. Daraus konnte auf die Isomerisierung von IDP zu DMADP geschlossen werden.

7,5 nmol IDP und 150.000 cpm [^{14}C]IDP (1,29 nmol, spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) wurden im oben beschriebenen Reaktionsansatz (150 μl Gesamtvolumen) mit 0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 μg der IDP-Isomerasen aus *E. coli* (51; 152; 507 μU ; 1,5; 5,1; 15,2 mU) bzw. *C. sativa* (133; 399 μU ; 1,3; 4; 13,3; 39,9 mU) sowie ohne Enzym für 1h bei 37 °C inkubiert. Nach Hydrolyse konnte die Bildung des 3-Methyl-2-buten-1-ol durch Extraktion mit Chloroform und Vermessen des radioaktiven Anteils mit dem Flüssigszintillationszähler erfasst werden. Aus der graphischen Darstellung (Abb. 51) wurde abgeleitet, dass für die Bestimmung der K_M -Werte 400 μU (0,8 μg) der IDP-Isomerase aus *E. coli* bzw. 200 μU (0,15 μg) der IDP-Isomerase aus *C. sativa* einzusetzen waren.

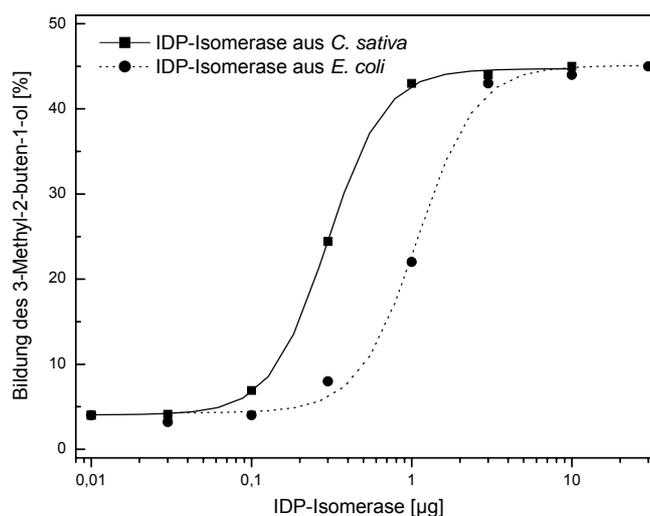


Abb. 51:

Umsetzung von ^{14}C -IDP mit verschiedenen Enzymmengen von IDP-Isomerasen aus *E. coli* bzw. aus *C. sativa* und Auftragung dieser Enzymmengen gegen die Bildung des 3-Methyl-2-buten-1-ol, hervorgegangen durch Hydrolyse aus DMADP, das aus der Umsetzung von IDP mit IDI stammt.

Reaktionsansätze: 7,5 nmol IDP, 150.000 cpm [^{14}C]IDP, 1,5 mM MnCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 5 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 μg der IDI aus *E. coli* (51; 152; 507 μU ; 1,5; 5,1; 15,2 mU) bzw. *C. sativa* (133; 399 μU ; 1,3; 4; 13,3; 39,9 mU) sowie ohne Enzym, Gesamtvolumen 150 μl

Inkubation: 1 h bei 37 °C

Auswertung: Nachweis, der auf der Säurelabilität des DMADP beruht (Zusatz von 200 μl 12 M HCl in Methanol (20 % (v/v)), 100 μl Wasser, 20 min Inkubation bei 37 °C, Zusatz von 400 μl Chloroform und kräftiges Mischen zur Extraktion alkoholischer Verbindungen, Erfassung des radioaktiven Anteils (2.8.2))

Für kinetische Untersuchungen wurde dem oben beschriebenen Reaktionsansatz (150 μl Gesamtvolumen) 400 μU IDP-Isomerase aus *E. coli* bzw. aus *C. sativa* zugesetzt und für 0; 10; 20; 30; 60 min; 2 und 5 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Kontrolle der

Umsetzung erfolgte nach der Methode, die auf der Säurelabilität des DMADP beruht (Abschnitt 2.4.8). Der graphischen Darstellung (Abb. 52) wurde entnommen, dass die Bestimmung der K_M -Werte bei einer Inkubationszeit von 30 min erfolgen sollte.

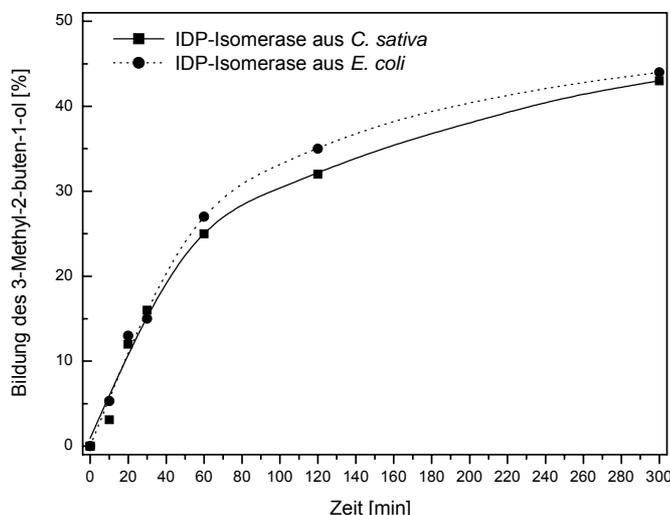


Abb. 52:

Kinetische Umsetzungen von ^{14}C -IDP mit den IDP-Isomerasen aus *E. coli* bzw. aus *C. sativa* und Auftragung der Inkubationszeiten gegen die Bildung des 3-Methyl-2-buten-1-ol, hervorgegangen durch Hydrolyse aus DMADP, das aus der Umsetzung von IDP mit IDI stammt.

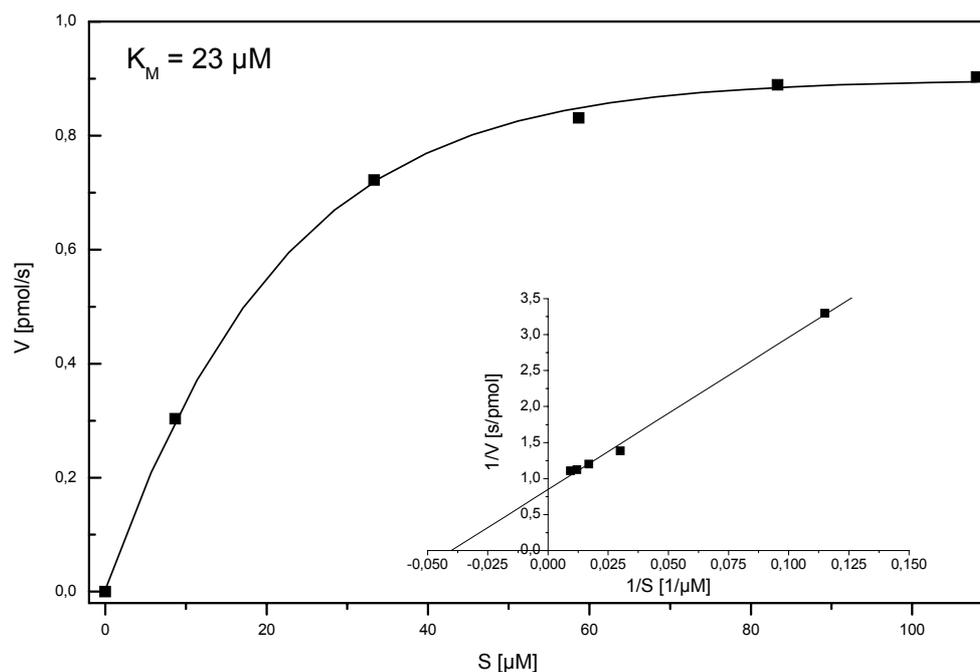
Reaktionsansätze: 7,5 nmol IDP, 150.000 cpm [^{14}C]IDP, 1,5 mM MnCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 5 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 400 μU (0,8 μg) der IDI aus *E. coli* bzw. 400 μU (0,3 μg) der IDI aus *C. sativa*, Gesamtvolumen 150 μl

Inkubation: 0, 10, 20, 30, 60 min; 2 und 5 h bei 37 °C

Auswertung: Nachweis, der auf der Säurelabilität des DMADP beruht (Zusatz von 200 μl 12 M HCl in Methanol (20 % (v/v)), 100 μl Wasser, 20 min Inkubation bei 37 °C, Zusatz von 400 μl Chloroform und kräftiges Mischen zur Extraktion alkoholischer Verbindungen, Erfassung des radioaktiven Anteils (2.8.2))

3.3.3.4 K_M -Werte der IDP-Isomerasen

Für die Bestimmung des K_M -Wertes der IDP-Isomerase aus *E. coli* wurden dem oben beschriebenen Reaktionsansatz 150.800 cpm [^{14}C]IDP (1,3 nmol, spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) und 150.800 cpm [^{14}C]IDP mit 3,7; 7,5; 11,2 bzw. 14,9 nmol unmarkiertem Isopentenylidiphosphat zugesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 150 μl . Nach Zugabe von 400 μU der IDP-Isomerase aus *E. coli* wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und nach der oben beschriebenen Methodik analysiert. In Abbildung 53 sind die Sättigungskurve (Darstellung der Substratkonzentration von IDP in Abhängigkeit von der Reaktionsgeschwindigkeit), die doppelt reziproke Auftragung und die daraus erhaltene Michaelis-Menten-Konstante wiedergegeben. Für die Umsetzung mit IDP betragen die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) der IDP-Isomerase aus *E. coli* 23 μM und 1,44 pmol/s. Die Messwerte basieren auf sechs Versuchsreihen.

**Abb. 53:**

Bestimmung des K_M -Wertes der rekombinanten IDP-Isomerase aus *E. coli* für IDP als Substrat

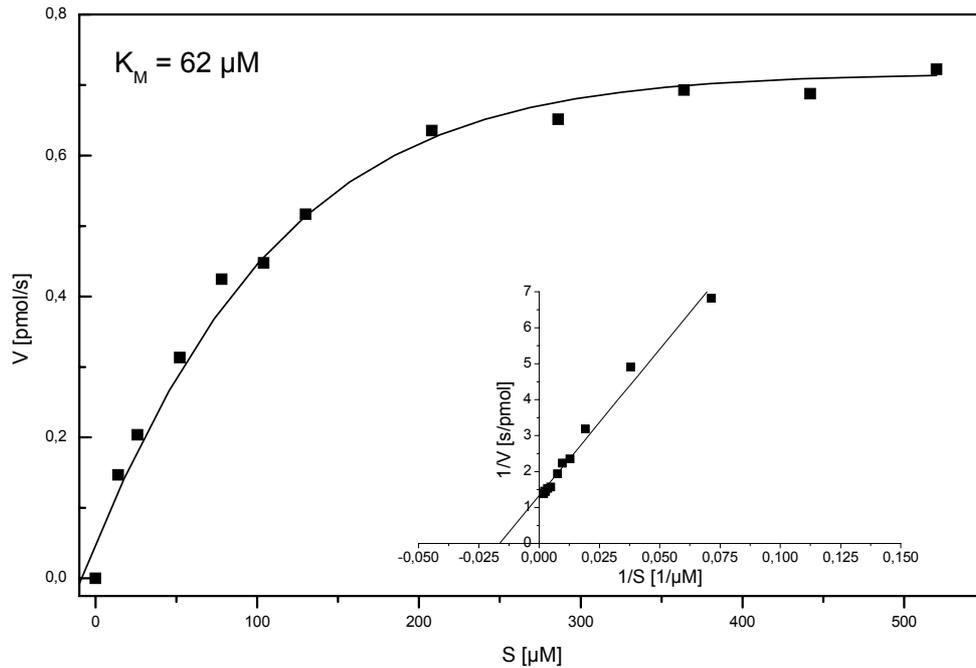
Reaktionsansätze: 150.800 cpm [^{14}C]IDP (1,3 nmol) und 150.800 cpm [^{14}C]IDP mit 3,7; 7,5; 11,2 bzw. 14,9 nmol unmarkiertem IDP (Endkonzentrationen: 9, 33, 59, 83 bzw. 108 μM IDP), 1,5 mM MnCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 5 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 400 μU der IDP-Isomerase aus *E. coli*, Gesamtvolumen 150 μl

Inkubation: 30 min bei 37 $^\circ\text{C}$

Auswertung: Nachweis, der auf der Säurelabilität des DMADP beruht (Zusatz von 200 μl 12 M HCl in Methanol (20 % (v/v)), 100 μl Wasser, 20 min Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$, Zusatz von 400 μl Chloroform und kräftiges Mischen zur Extraktion alkoholischer Verbindungen, Erfassung des radioaktiven Anteils (2.8.2))

K_M -Wert = 23 μM ; V_{max} = 1,44 pmol/s

Der K_M -Wert der IDP-Isomerase aus *C. sativa* konnte nach Zugabe von 24.360 cpm [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP (0,42 nmol, spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) und 24.360 cpm [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP mit 0,28; 0,88; 2,18; 3,48; 4,78; 6,08; 9,98; 13,88; 17,78; 21,68 bzw. 25,58 nmol unmarkiertem IDP zum oben beschriebenen Reaktionsansatz (50 μl Gesamtvolumen) und Zusatz von 200 μU Enzym durch Inkubation für 30 min bei 37 $^\circ\text{C}$ bestimmt werden. Nach saurer Hydrolyse konnte durch Vermessen des radioaktiven Anteils die Umsetzung zu 3-Methyl-2-buten-1-ol erfasst werden. Die Auftragung nach Michaelis und Menten zeigt den Verlauf einer typischen Sättigungskurve (Abb. 54). Nach doppelt reziproker Auftragung der Messwerte nach Lineweaver und Burk konnte der K_M -Wert der IDP-Isomerase aus *C. sativa* für die Umsetzung mit IDP mit 62 μM bestimmt werden. Die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) beträgt 0,68 pmol/s. Die Messwerte basieren auf fünf Versuchsreihen.

**Abb. 54:**

Bestimmung des K_M -Wertes der rekombinanten IDP-Isomerase aus *C. sativa* für IDP als Substrat

Reaktionsansätze: 24.360 cpm [^{14}C]IDP (0,42 nmol) und 24.360 cpm [^{14}C]IDP mit 0,28; 0,88; 2,18; 3,48; 4,78; 6,08; 9,98; 13,88; 17,78; 21,68 bzw. 25,58 nmol unmarkiertem IDP (Endkonzentrationen: 14, 26, 52, 78, 104, 130, 208, 286, 364, 442 bzw. 520 μM IDP), 1,5 mM MnCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 5 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 200 μU der IDP-Isomerase aus *C. sativa*, Gesamtvolumen 50 μl

Inkubation: 30 min bei 37 °C

Auswertung: Nachweis, der auf der Säurelabilität des DMADP beruht (Zusatz von 200 μl 12 M HCl in Methanol (20 % (v/v)), 100 μl Wasser, 20 min Inkubation bei 37 °C, Zusatz von 400 μl Chloroform und kräftiges Mischen zur Extraktion alkoholischer Verbindungen, Erfassung des radioaktiven Anteils (2.8.2))

K_M -Wert = 62 μM , V_{max} = 0,68 pmol/s

3.3.3.5 Gleichgewichtseinstellungen

Zur Überprüfung der Einstellung der durch die IDI katalysierten Gleichgewichtsreaktion zwischen IDP und DMADP wurden dem oben beschriebenen Reaktionsansatz (50 μl Gesamtvolumen) unterschiedliche Stoffmengen an Substrat zugegeben. Die Umsetzungen erfolgten mit 0,25 nmol (29.000 cpm) [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) sowie mit 2,25 und 24,75 nmol unmarkiertem IDP unter Zusatz von jeweils 0,25 nmol (29.000 cpm) [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP. Als Gesamtstoffmengen des Substrats ergaben sich 0,25; 2,5 und 25 nmol. Nach Zugabe der IDP-Isomerase aus *E. coli* bzw. *C. sativa* im Überschuss (15 mU bzw. 40 mU) wurde zur endgültigen Einstellung des Gleichgewichtes für 19 h bei 37 °C inkubiert. Der Verlauf der Umsetzungen konnte nach saurer Hydrolyse und Erfassen der radioaktiven Verteilung der Verbindungen, die mit Chloroform extrahierbar waren, verfolgt werden.

Es war zu beobachten, dass sich das Gleichgewicht bei Inkubation mit der IDI aus *C. sativa*, unabhängig von der zur Reaktion eingesetzten Stoffmenge, bei etwa 50 % Bildung an DMADP einstellte, was einer Verteilung IDP : DMADP von 1:1 entsprach (Abb. 55). Nach

Inkubation mit dem Enzym aus *E. coli* traten Unterschiede in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffmenge auf. Bei der Reaktion mit 0,25 nmol IDP konnte eine Bildung von 8 % DMADP, bei der mit 2,5 nmol IDP eine Umsetzung zu 33 % DMADP nachgewiesen werden. Wenn mit 25 nmol IDP inkubiert wurde, resultierte ein mit der IDI aus *C. sativa* vergleichbarer Wert von 50 %. Die Verteilung zwischen IDP und DMADP liegt somit bei 1:11,5 (0,25 nmol), 1:2 (2,5 nmol) und 1:1 (25 nmol) (Abb. 55).

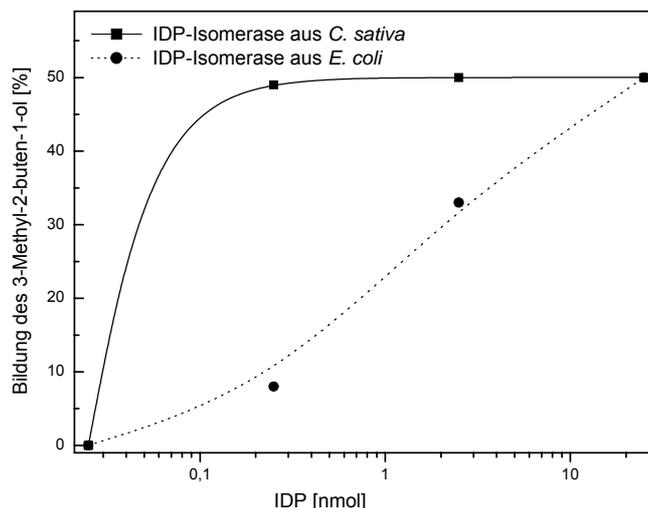


Abb. 55:

Gleichgewichtsverteilung nach Inkubation von IDP mit der IDI aus *E. coli* bzw. aus *C. sativa* im Überschuss und Auftragung der eingesetzten Stoffmengen an IDP gegen die Bildung des 3-Methyl-2-buten-1-ol, hervorgegangen durch Hydrolyse aus DMADP, das aus der Umsetzung von IDP mit IDI stammt.

Reaktionsansätze: 0,25 nmol (29.000 cpm) [^{14}C]IDP bzw. 0,25 nmol (29.000 cpm) [^{14}C]IDP und 2,25 nmol unmarkiertes IDP bzw. 0,25 nmol (29.000 cpm) [^{14}C]IDP und 24,75 nmol unmarkiertes IDP, 1,5 mM MnCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 5 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 15 mU der IDP-Isomerase aus *E. coli* bzw. 40 mU der IDP-Isomerase aus *C. sativa*, Gesamtvolumen 50 μl

Inkubation: 19 h bei 37 °C

Auswertung: Nachweis, der auf der Säurelabilität des DMADP beruht (Zusatz von 200 μl 12 M HCl in Methanol (20 % (v/v)), 100 μl Wasser, 20 min Inkubation bei 37 °C, Zusatz von 400 μl Chloroform und kräftiges Mischen zur Extraktion alkoholischer Verbindungen, Erfassung des radioaktiven Anteils (2.8.2))

3.4 Untersuchungen zur Funktion der IDP-Isomerase an *Nicotiana benthamiana*

Nach erfolgreicher Klonierung und Expression der am Alternativen Terpenbiosyntheseweg beteiligten Enzyme, dem Nachweis ihrer katalytischen Aktivität und ihrer Verwendung zur Synthese von Intermediaten sollte an die enzymatische Charakterisierung anschließend die Funktion der IDP-Isomerase in einem pflanzlichen Organismus untersucht werden.

Um einen Rückschluss auf die Funktion der IDP-Isomerase in *N. benthamiana* zu ziehen, wurde mit dem VIGS-System („virus-induced gene-silencing“) eine moderne Methode verwendet, die es ermöglicht, ein Gen in Pflanzen gezielt auszuschalten (Baulcombe, 2004). Das VIGS-System macht sich das zuerst bei Pflanzen entdeckte Phänomen der RNA-Interferenz (RNA_i) zu Nutze, um posttranskriptional die Expression von Genen der Wirtspflanze zu unterdrücken und dadurch die Ausbildung eines funktionsfähigen Proteins zu verhindern. Das Ausschalten führt im Vergleich zu Wildtyp-Organismen zu einem veränderten Phänotyp des betreffenden Gens. Das VIGS-System nutzt das TRV („tobacco rattle virus“), um die Information zum Ausschalten des Gens in die Pflanze einzuschleusen. Dabei handelt es sich um ein RNA-Virus, in dessen Genom eine cDNA-Teilsequenz des Gens eingebaut ist, das in der Pflanze ausgeschaltet werden soll. Bei der Replikation des Virus in der Pflanze entsteht doppelsträngige RNA, die zu siRNAs prozessiert wird. Ein Teil der entstandenen siRNAs ist komplementär zur mRNA des endogenen Gens. Diese mRNA wird dann abgebaut und das entsprechende Protein entsteht in der Pflanze nicht mehr.

3.4.1 Makroskopische Untersuchungen

Die mit dem Plasmid pTV Nb IDI infizierten *N. benthamiana* Pflanzen (2.6.1) zeigten zehn Tage nach der Infiltration oberhalb der infiltrierten Blätter erste Anzeichen einer Infektion. Es konnte beobachtet werden, dass infizierte Pflanzen im Vergleich zu den mit dem Leervektor pTVØØ infizierten Kontrollpflanzen (zur Vereinfachung als pTV Nb IDI- bzw. Leervektor-pflanze bezeichnet) in ihrer Entwicklung gehemmt waren. Mit pTV Nb IDI infizierte Pflanzen zeigten vier bis fünf Wochen nach Infiltration deutlich ausgeprägte phänotypische Veränderungen (Abb. 56 und 57). Neu entwickelte Blätter variierten sehr stark in ihrem Pigmentierungsmuster. Das Spektrum reichte von hellgelben Blättern bis zu grünen Blättern. Typisch für diese Blätter waren sowohl das gesprenkelte Erscheinungsbild als auch die grüne Spitze der ansonsten hellgelben Blattspreite. Bei einigen Blättern konnten grüne Inseln auf hellgelber Blattspreite beobachtet werden. Das phänotypische Erscheinungsbild – das virusvermittelte Auftreten hellgelber Blattbereiche – lässt sich durch die eingeschränkte Synthese von Chlorophyllen und Carotinoiden erklären, die durch Blockade der IDP-Isomerase verursacht wurde. Hingegen zeigten mit pTVØØ infizierte Pflanzen keine Veränderungen in der Pigmentierung.

Die extrem deutlichen phänotypischen Veränderungen sind in den Abbildungen 56 und 57 zu erkennen.

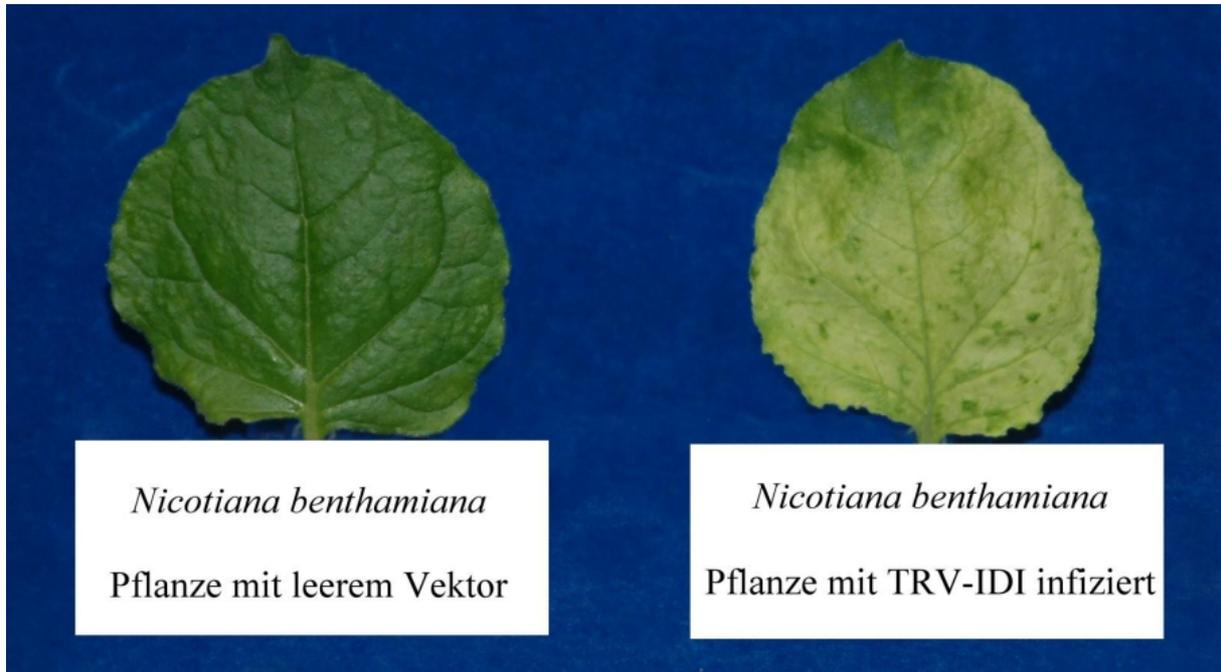


Abb. 56:
Blätter der *N. benthamiana* Pflanzen

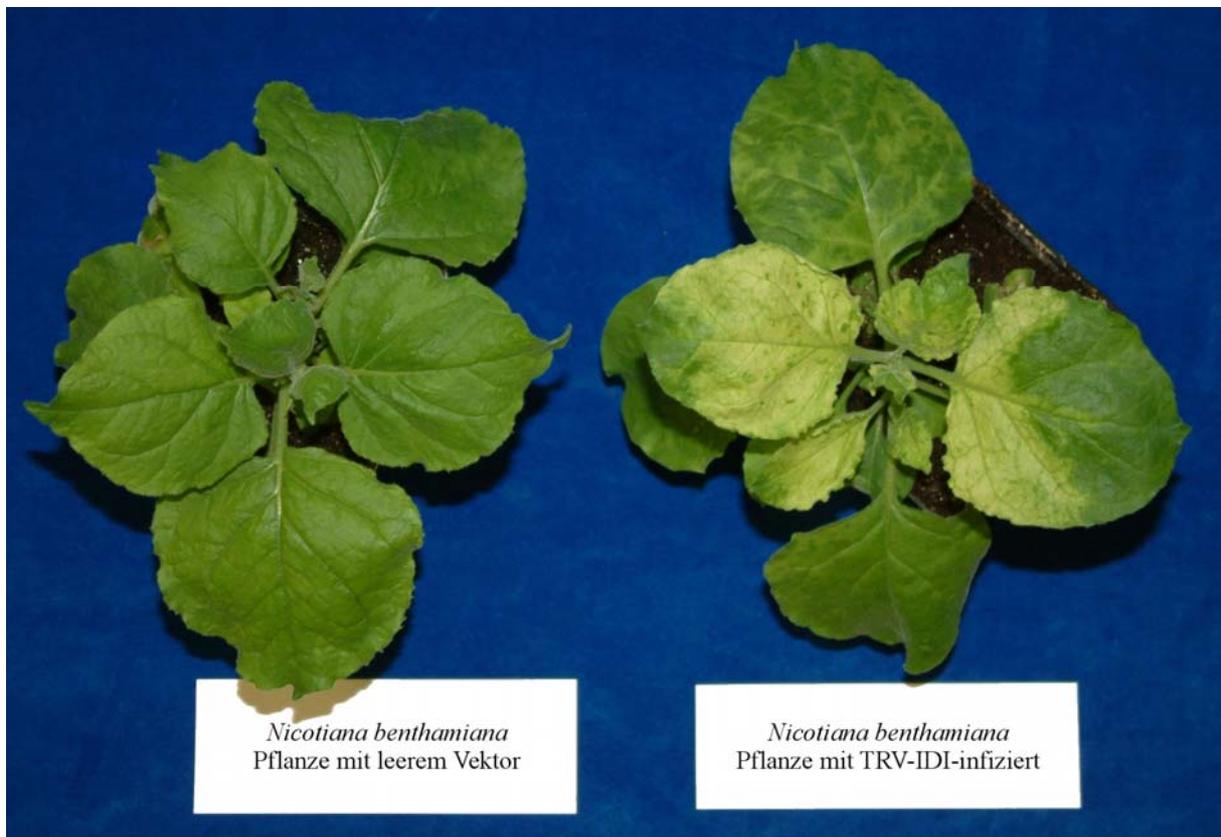


Abb. 57:
N. benthamiana Pflanzen

3.4.2 Mikroskopische Untersuchungen

Die zielgerichtete Ausschaltung des *idi*-Gens zeigte phänotypisch deutliche Veränderungen. Im Anschluß erfolgte eine vergleichende mikroskopische Analyse (2.6.2) des Blattgewebes.

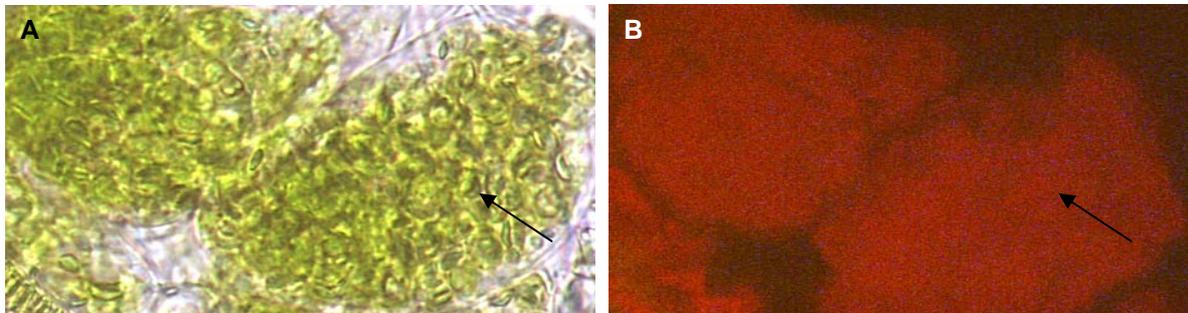


Abb. 58:

Mikroskopische Darstellung (Vergrößerung 1:40) von Zellen des Schwammparenchyms aus *N. benthamiana* Leervektorpflanzen

A Lichtmikroskopische Aufnahme

B Aufnahme der roten Fluoreszenz

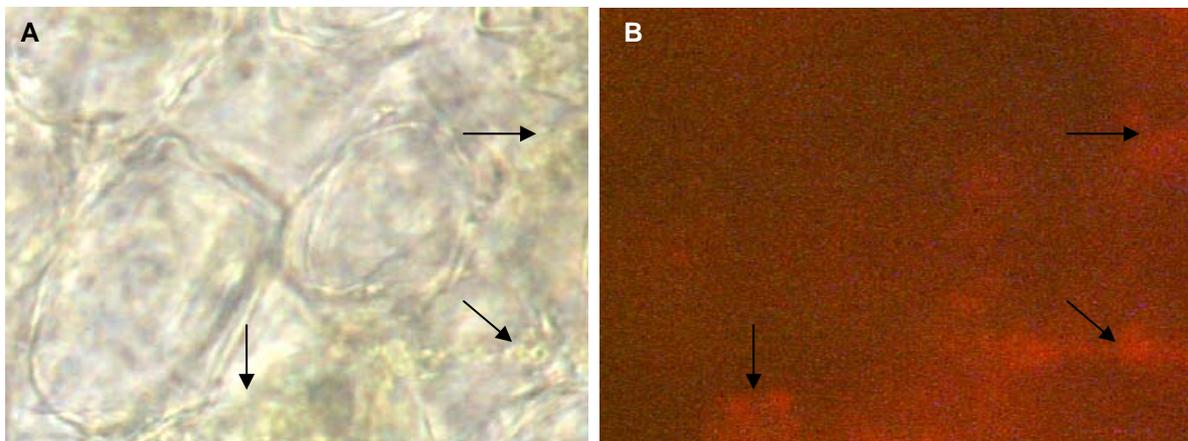


Abb. 59:

Mikroskopische Darstellung (Vergrößerung 1:40) von Zellen des Schwammparenchyms aus hellgelben Blattbereichen der mit pTV Nb IDI infizierten *N. benthamiana* Pflanzen

A Lichtmikroskopische Aufnahme

B Aufnahme der roten Fluoreszenz

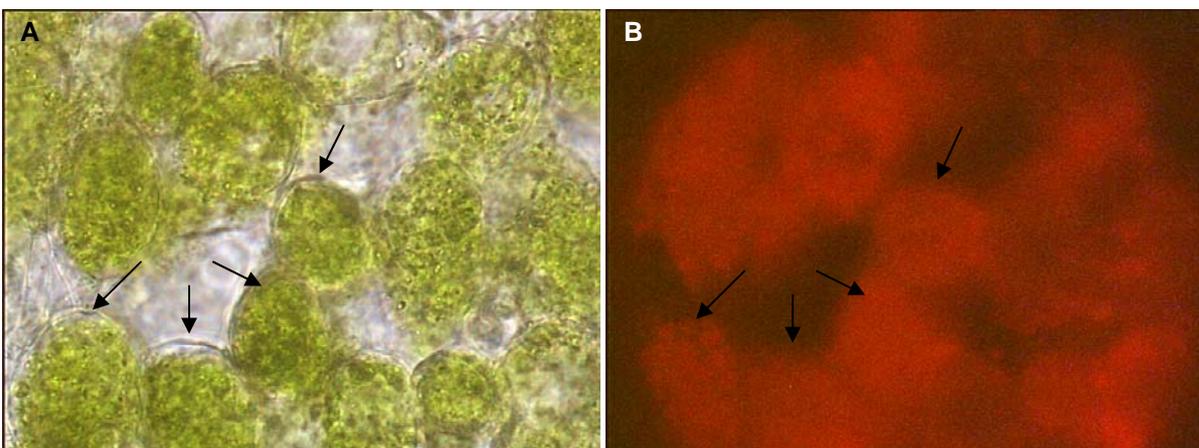


Abb. 60:

Mikroskopische Darstellung (Vergrößerung 1:40) von Zellen des Schwammparenchyms aus grünen Blattbereichen der mit pTV Nb IDI infizierten *N. benthamiana* Pflanzen

A Lichtmikroskopische Aufnahme

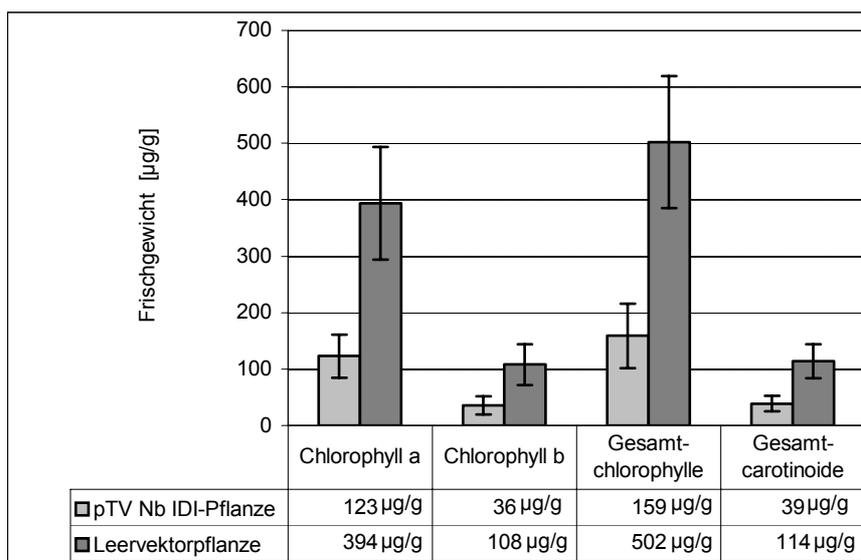
B Aufnahme der roten Fluoreszenz

Bei Tageslicht ist grünes Chlorophyll im Blattgewebe zu erkennen, unter UV-Anregung erscheint es hingegen rot. Aus den lichtmikroskopischen Bildern des Schwammparenchyms lässt sich eine deutliche Unterscheidung in Bereiche mit sehr starkem und mit geringem Vorkommen an Chloroplasten erkennen. In Zellen von *N. benthamiana* Leervektorpflanzen liegen die Chloroplasten dicht gedrängt vor (Abb. 58 A). Bei Betrachtung der Objekte unter Licht des grünen Wellenlängenbereiches waren die rot fluoreszierenden Chloroplasten deutlich zu erkennen (Abb. 58 B). In hellgelben Bereichen der mit pTV Nb IDI infizierten Pflanzen fanden sich Zellen mit geringer Chloroplastendichte (Abb. 59 A). Daher war eine rote Fluoreszenz nur schwer zu erkennen (Abb. 59 B). Dagegen kamen in den grünen Blattbereichen wiederum zahlreiche Chloroplasten vor (Abb. 60 A), die unter Licht des grünen Wellenlängenbereiches rot fluoreszierten (Abb. 60 B).

3.4.3 Untersuchung der Pigmentzusammensetzung

Die Analyse der Zusammensetzung der Photosynthesepigmente im Blattgewebe von *N. benthamiana* Pflanzen, welche mit dem Plasmid pTV Nb IDI bzw. dem Leervektor pTV $\emptyset\emptyset$ infiziert wurden, erfolgte durch Quantifizierung der Chlorophylle a und b, der Gesamtchlorophylle und -carotinoide (2.6.3). Mit dieser Methode (Page *et al.*, 2004) konnte der Effekt auf die Isoprenoidbiosynthese gemessen werden, der durch das Ausschalten des *idi*-Gens und der daraus bedingten unterdrückten Expression der IDI verursacht wurde.

Blattgewebe, das die charakteristischen Merkmale der Infektion mit pTV Nb IDI zeigte (hellgelbe Blattregionen), wurde von grünen Blattbereichen abgetrennt. Von Kontrollpflanzen wurden vergleichbare Blätter gleichen Alters verwandt. Mit organischem Lösungsmittel erfolgte die Extraktion der Pigmente. Die Konzentration der Chlorophylle a und b, der Gesamtchlorophylle und -carotinoide wurde in $\mu\text{g je g}$ Frischgewicht in Abbildung 61 dargestellt. Im Vergleich zur Carotinoid- und Chlorophyllkonzentration im Blattgewebe der Kontrollpflanze war der Gehalt an Pigmenten im Blattgewebe der pTV Nb IDI-Pflanze um ca. 67 % herabgesetzt (Reduzierung bei Chlorophyll a um 69 %, bei Chlorophyll b um 67 %, bei Gesamtchlorophyllen um 68 % und bei Gesamtcarotinoiden um 66 %). Der verminderte Gehalt der Carotinoid- und Chlorophyllkonzentration der pTV Nb IDI-Pflanze im Unterschied zur Kontrollpflanze lässt sich auf das Ausschalten der IDP-Isomerase und die dadurch eingeschränkte Pigmentsynthese zurückführen. Die quantitative Analyse der Pigmentzusammensetzung zeigte ebenso wie die makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen durch die *idi*-Defizienz bedingte deutliche Veränderungen. Die dargestellten Ergebnisse waren wie bei Page *et al.* (2004) reproduzierbar.

**Abb. 61:**

Darstellung der Konzentrationen von Chlorophyll a und b, der Gesamtchlorophylle und -carotinoide im Blattgewebe von *N. benthamiana* Pflanzen, welches mit dem Plasmid pTV Nb IDI bzw. dem Leervektor pTVØØ infiziert wurde – nach Extraktion von 100 - 150 mg Blattmaterial mit a) 300 µl Methanol für 5 min, b) 300 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl für 5 min und c) 800 µl Chloroform für 10 min jeweils bei 4 °C mit 60 rpm auf einem Rotationsschüttler und spektralphotometrischer Analyse eines Aliquotes der organischen Phase bei 470 nm, 645 nm und 662 nm; Bestimmung der Konzentration an Carotinoiden und Chlorophyllen nach Lichtenthaler (1987); Fehlerbalken geben ± SD aus 12 Messreihen an

3.4.4 *In vivo* Applikation von 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und Mevalonsäurelacton

Da es in der voranliegenden Arbeit möglich war, alle nötigen Enzyme des DXP-Weges aktiv darzustellen, standen isotopenmarkierte Verbindungen für Fütterungsexperimente zur Verfügung. *In vivo* Applikationsexperimente erfolgten mit ¹⁴C-markiertem 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und ¹⁴C-markiertem Mevalonsäurelacton an Blätter von *N. benthamiana*, die mit dem Plasmid pTV Nb IDI oder dem Leervektor pTVØØ infiziert waren und die charakteristischen phänotypischen Merkmale des VIGS zeigten. Zur Vereinfachung wurde die Bezeichnung pTV Nb IDI- und Kontrollblatt bzw. -pflanze gewählt.

Ziel dieser *in vivo* Experimente war es, den quantitativen Einbau der markierten Vorstufen in Xanthophylle, Chlorophylle, Carotinoide und Sterole zu analysieren, um den Anteil des DXP- bzw. MVA-Weges im Stoffwechsel von *N. benthamiana* verfolgen zu können. Dabei sollte ¹⁴C-DXP – das erste Intermediat des Alternativen Terpenbiosyntheseweges – vermehrt in Carotinoide und Chlorophylle eingebaut werden. Die Applikation von ¹⁴C-Mevalonsäurelacton – einem Intermediat des MVA-Weges – sollte vorwiegend einen Einbau in Sterole zeigen. Es wurde davon ausgegangen, dass die Applikation von ¹⁴C-DXP bzw. ¹⁴C-Mevalonsäurelacton an Kontrollblätter – im Vergleich zu pTV Nb IDI-Blättern – zu einer vermehrten Bildung von Carotinoiden bzw. Sterolen führt. Ob die Applikation dieser Verbindungen an pTV Nb IDI-Blätter zu vergleichbaren Resultaten führt oder durch die Blockade der IDP-Isomerase die Biosynthese von Carotinoiden bzw. Sterolen beeinträchtigt wird, war zu klären.

An etwa 10 - 12 cm² große, gleich alte Blätter der pTV Nb IDI- und der Kontrollpflanze wurden 2 µCi [3,4,5-¹⁴C₃]DXP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) (3.2.3.2) bzw. 2 µCi [¹⁴C₅]Mevalonsäurelacton (spezifische Aktivität 11,8 µCi/µmol) appliziert (2.6.4) (Versuch A). Für eine verbesserte Analytik wurde die Substratmenge jeweils auf 3 µCi der ¹⁴C-markierten Verbindungen erhöht und die Stoffmenge durch Zusatz von 2 µmol der unmarkierten Verbindungen DXP bzw. Mevalonsäurelacton heraufgesetzt (Versuch B).

Auf der Basis der Erkenntnisse von Page *et al.* (2004) und Laule *et al.* (2003) wurde ein Trennungsgang zur Aufarbeitung des biologischen Materials entwickelt. Die Bestimmung der radioaktiven Verteilung aller anfallenden Extrakte erfolgte indem jeweils ein Aliquot in Szintillatorlösung gegeben und vermessen wurde (2.8.2).

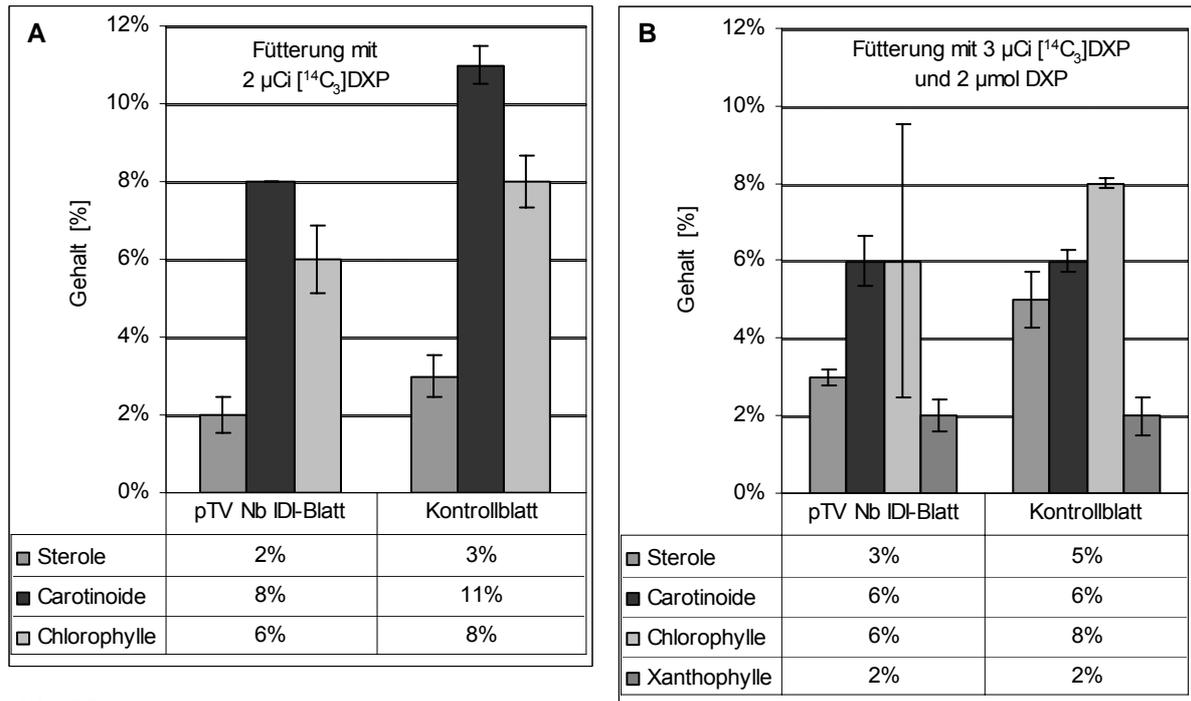
Nach 24 h wurde das Blatt gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sofort mit 10 ml 80 % (v/v) Ethanol für 20 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Unter gleichen Bedingungen erfolgte ein zweiter Extraktionsschritt. Die vereinigten Extrakte wurden mittels Rotationsverdampfer bei 30 °C und Niedrigdruck bis zur Trockne eingeengt und nacheinander in zweimal 500 µl Wasser aufgenommen. Durch anschließende zweimalige Extraktion mit 750 µl Ethylacetat wurden insbesondere länger-kettige Isoprenoide und Sterole von den phosphorylierten Verbindungen separiert. Alkoholische Verbindungen wie 1-Deoxy-D-xylulose und 2C-Methyl-D-erythritol konnten sowohl in der organischen als auch in der wässrigen Phase nachgewiesen werden.

Die organische Phase wurde abgenommen, im Vakuum-Konzentrator bis zur Trockne eingeengt und der Einbau der applizierten Radioaktivität in Chlorophyllen, Xanthophyllen und Carotinoiden (deren Bestimmung erfolgte hinsichtlich β-Carotin/Phytoen) bestimmt. Nach Aufnahme in 30 µl Hexan und bandenförmigem Auftragen auf das Dünnschichtchromatogramm 1 erfolgte die Entwicklung in LM9 (2.7.1). Detektiert wurde mit dem Radio-DC-Scanner. Weiterhin erfolgte die Erfassung der Sterole in der Ethylacetat-Phase. Nach Zusatz von 2 ml 6 % (w/v) methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung wurde eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde viermal mit 2 ml Hexan ausgeschüttelt, die Hexanphase eingeengt und dünnschichtchromatographisch (DC1) in Dichlormethan (LM6) aufgetrennt. Nach der Auswertung mittels Radio-DC-Scanner konnte auf den Einbau der ¹⁴C-Markierung in Sterole geschlossen werden.

Der nach Extraktion mit Ethanol verbliebene Blattrückstand wurde gleichermaßen behandelt. Nach Ausschütteln mit dreimal 3 ml Hexan erfolgte das weitere Vorgehen wie vorher beschrieben.

Ein Aliquot der wässrigen Phase wurde mittels HPLC analysiert, um den Einbau in phosphorylierte Verbindungen als auch weitere Verbindungen wie Alkohole zu erfassen.

Der anhand der radioaktiven Markierung verfolgte Einbau in die mit Ethylacetat extrahierten Verbindungen ist in den Abbildungen 62 und 63 dargestellt.

**Abb. 62:**

Prozentualer Einbau der ^{14}C -Markierung zwischen den mit Ethylacetat extrahierten Verbindungen nach Applikation von

A 2 μCi [$^{14}\text{C}_3$]DXP

B 3 μCi [$^{14}\text{C}_3$]DXP und 2 μmol DXP

an ein pigmentgestörtes pTV Nb IDI-Blatt im Vergleich zum Kontrollblatt.

Die Fehlerbalken geben \pm SD aus 3 Messreihen an.

Nach Applikation von ^{14}C -DXP lag der Einbau in Carotinoide im Versuch A im Vergleich zum Kontrollblatt (11 %) beim pTV Nb IDI-Blatt (8 %) um das 1,4-fache niedriger, nach Applikation der größeren Stoffmenge (Versuch B) war dieser jedoch gleich (6 %). Wie angenommen wurde, war der Einbau in Chlorophylle im pTV Nb IDI-Blatt (6 %) geringer als im Kontrollblatt (8 %). In die Gesamtheit der Carotinoide und Chlorophylle wurde der Hauptanteil der Markierung eingebaut.

Die erfasste Markierung in Sterolen war im pTV Nb IDI-Blatt (A: 2 %, B: 3 %) im Vergleich zum Kontrollblatt (A: 3 %, B: 5 %) um das 1,5-fache herabgesetzt. Der Einbau in Xanthophylle wurde nur im Versuch B erfasst, wobei dieser in pTV Nb IDI- und Kontrollblatt (2 %) zu gleichen Teilen bestimmt wurde. Die mit Ethylacetat extrahierten Verbindungen wiesen einen Gesamteinbau der ^{14}C -Markierung von 16 % (A) bzw. 15 % (B) in das pTV Nb IDI-Blatt und von 22 % (A) bzw. 21 % (B) in das Kontrollblatt auf.

Der geringe Einbau in Sterole, der nach Extraktion des Blattes erfasst wurde, lag unter 0,2 %, im pTV Nb IDI-Blatt jedoch niedriger als im Kontrollblatt. Des Weiteren konnte ein Einbau der Markierung in nicht näher charakterisierte Verbindungen, welche neben den Sterolen nach Verseifung auftraten, im pTV Nb IDI-Blatt (A: 7 %, B: 9 %) und im Kontrollblatt (A: 12 %, B: 11 %) erfasst werden.

Der überwiegende Anteil der applizierten Radioaktivität verblieb in der wässrigen Phase – bei dem pTV Nb IDI-Blatt wurden 43 % (A) und 52 % (B) und bei dem Kontrollblatt 57 % (A)

und 43 % (B) erfasst. Die HPLC-Analyse zeigte, dass es sich größtenteils um dephosphorylierte Verbindungen handelte. 92 % (A) und 87 % (B) dieser Verbindungen wurden im pTV Nb IDI-Blatt erfasst. Daneben konnte ein geringer Anteil an DXP (A: 5 %, B: 3 %) und IDP (A: 3 %, B: 10 %) detektiert werden. Die wässrige Phase des Kontrollblattes zeigte neben den dephosphorylierten Verbindungen (A: 95 %, B: 93 %) nur einen geringen Anteil an DXP (A: 5 %, B: 7 %). Es waren nur geringfügige Unterschiede der stofflichen Zusammensetzung der wässrigen Phasen zu beobachten. Der Anteil an radioaktiver Markierung im Rückstand nach der Extraktion des Blattes betrug nach den Applikationsexperimenten mit DXP 10 %.

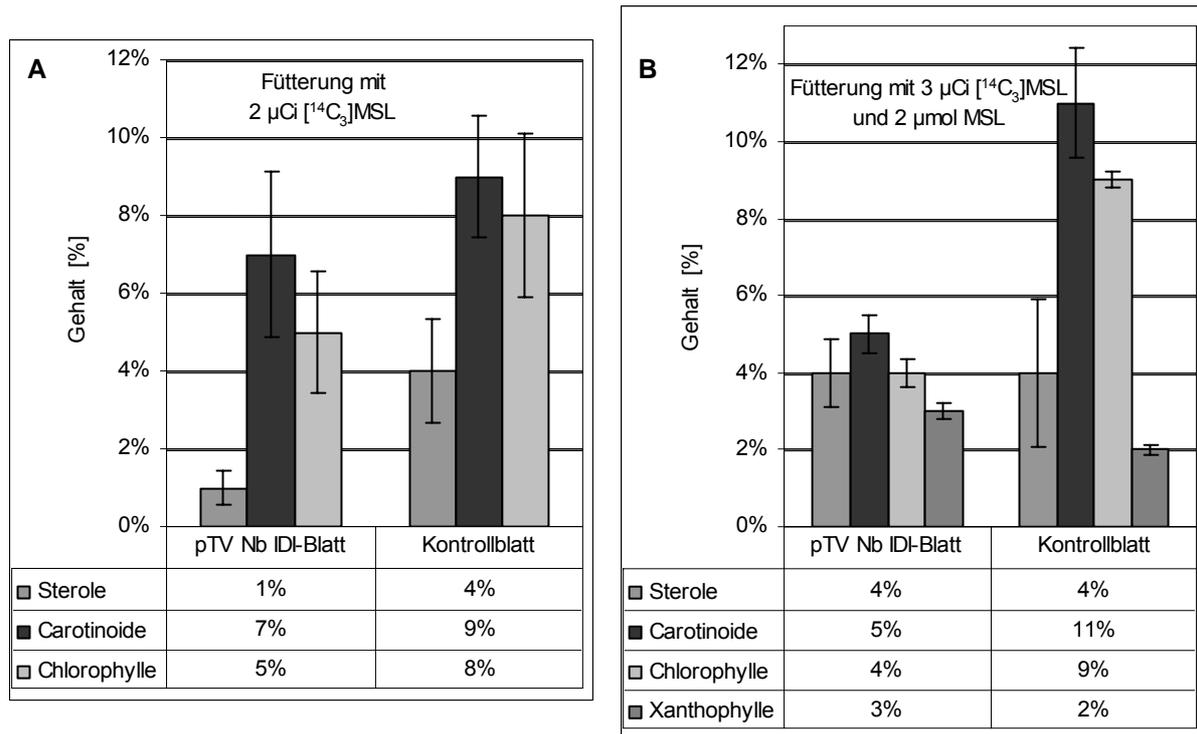


Abb. 63:

Prozentualer Einbau der ¹⁴C-Markierung zwischen den mit Ethylacetat extrahierten Verbindungen nach Applikation von

A 2 µCi [¹⁴C₅]Mevalonsäurelacton

B 3 µCi [¹⁴C₅]Mevalonsäurelacton und 2 µmol Mevalonsäurelacton

an ein pigmentgestörtes pTV Nb IDI-Blatt im Vergleich zum Kontrollblatt.

Die Fehlerbalken geben ± SD aus 3 Messreihen an.

Carotinoide und Chlorophylle stellten auch nach der Applikation von Mevalonsäurelacton die Stoffgruppen mit dem größten Einbau der ¹⁴C-Markierung der mit Ethylacetat extrahierbaren Verbindungen dar. Für Carotinoide wurden im pTV Nb IDI-Blatt (A: 7 %, B: 5 %) niedrigere Einbauraten im Vergleich zum Kontrollblatt (A: 9 %, B: 11 %) erfasst. Nach Applikation der größeren Stoffmenge (B) betrug dieser Einbau mehr als das Doppelte. Die Einbaurate in Chlorophylle war in den Versuchen A und B vergleichbar. Mit 5 % (A) und 4 % (B) beim pTV Nb IDI-Blatt war der Einbau im Vergleich zum Kontrollblatt (A: 8 %, B: 9 %) etwa um die Hälfte erniedrigt.

Bei Sterolen betrug die Einbaurate in das pTV Nb IDI-Blatt ein Viertel (A: 1 %) im Vergleich zum Kontrollblatt (A und B: 4 %). Jedoch wurden bei dem pTV Nb IDI-Blatt im Versuch B ebenfalls 4 % Einbau in Sterolen detektiert. Der Einbau in Xanthophylle wurde nur im

Versuch B erfasst, wobei dieser im pTV Nb IDI-Blatt (3 %) im Vergleich zum Kontrollblatt (2 %) um das 1,5-fache höher war. Die mit Ethylacetat extrahierten Verbindungen wiesen einen Gesamteinbau der ^{14}C -Markierung von 12 % (A) und 15 % (B) in das pTV Nb IDI-Blatt und von 23 % (A) und 27 % (B) in das Kontrollblatt auf. Die geringsten Einbauraten (< 0,3 %) fanden sich bei den Sterolen, die nach der Extraktion des Blattes erfasst wurden, wobei beim Vergleich der Blätter bei der Kontrollpflanze die höhere Menge detektierbar war. Des Weiteren konnte ein Einbau der Markierung in nicht genauer charakterisierte Verbindungen, welche neben den Sterolen nach Verseifung auftraten, im pTV Nb IDI-Blatt (A: 6 %, B: 4 %) und im Kontrollblatt (A: 10 %, B: 12 %) erfasst werden.

In die wässrige Phase war mit 59 % (A) und 53 % (B) in das pTV Nb IDI-Blatt sowie 66 % (A) und 50 % (B) in das Kontrollblatt der weitaus größte Einbau zu verzeichnen. Aus den HPLC-Ergebnissen war zu entnehmen, dass neben dem nicht umgesetzten Mevalonsäurelacton einige weitere Verbindungen auftraten, die nicht näher charakterisiert wurden. Der Anteil an radioaktiver Markierung im Rückstand nach der Extraktion des Blattes betrug nach Applikation von Mevalonsäurelacton unter 1 %.

Applikationsexperimente mit ^{14}C -markierten Vorstufen an pigmentgestörten pTV Nb IDI-Blättern und vergleichend dazu an mit dem Leervektor infizierten Kontrollblättern dienten der Analyse des quantitativen Einbaus der ^{14}C -Markierung in Carotinoide, Chlorophylle, Xanthophylle und Sterole. Ebenso wurde der Einbau in die wässrige Phase erfasst. Die durchgeführten Fütterungsexperimente mit ^{14}C -DXP und ^{14}C -Mevalonsäurelacton als Vorstufen der plastidären und cytosolischen Terpenbiosynthese an Blättern der pTV Nb IDI- und Kontrollpflanzen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede.

3.4.5 *In vitro* Applikation von 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und Isopentenylidiphosphat

Zur weiteren Überprüfung der Isomerase-Aktivität pigmentgestörter pTV Nb IDI *N. benthamiana* Pflanzen erfolgten Untersuchungen an aus Blättern isolierten Chloroplasten. Aus Blättern von unbehandelten *N. benthamiana* Wildtyppflanzen isolierte Chloroplasten dienten zur Kontrolle. Zur Vereinfachung wurden die Bezeichnungen pTV Nb IDI- und Wildtypblatt bzw. -pflanze verwendet.

3.4.5.1 Chloroplastentrennungen am Saccharosestufengradienten

Mit der Chloroplastentrennung am Saccharosegradienten sollte eine Auftrennung in die jeweiligen Plastiden aus hellgelben und grünen Bereichen des pTV Nb IDI-Blattes ermöglicht werden. Für die Präparation (2.6.5) wurde Blattgewebe der pTV Nb IDI- und Wildtyppflanzen eingesetzt. Nach der Trennung der Chloroplasten des pTV Nb IDI- bzw. des Wildtypblattes ist beobachtet worden, dass sich Chloroplasten zwischen den Saccharoseschichten bei beiden Proben auf gleicher Höhe, aber in unterschiedlichen Konzentrationen anreichern. In Abbildung 64 ist die Verteilung der Chloroplasten nach der Zentrifugation dargestellt.

**Abb. 64:**

Verteilung der Chloroplasten an den Grenzschichten verschiedener Saccharosekonzentrationen nach Ultrazentrifugation

A Chloroplasten aus dem Blattgewebe der Wildtypfpflanze (3 g Frischgewicht)

B Chloroplasten aus dem Blattgewebe der pTV Nb IDI-Pflanze (3 g Frischgewicht)

3.4.5.2 Applikation von $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ und $[1-^{14}\text{C}]\text{IDP}$ an isolierte Chloroplasten

Ziel dieser Applikationsexperimente an isolierten Chloroplasten aus *N. benthamiana* Pflanzen mit blockierter IDP-Isomerase im Vergleich zu Wildtyppflanzen war festzustellen,

- ob nach Applikation von $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ ein Einbau in IDP, DMADP oder vorangehende Intermediate wie 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat (HMBDP) erfasst werden kann sowie
- ob, und wenn ja, welcher Anteil der radioaktiven Markierung nach Applikation markierter Vorstufen ($[1-^{14}\text{C}]\text{IDP}$) in länger-kettigen Isoprenoiden detektiert werden kann.

Der Reaktionsansatz zur Umsetzung mit $0,1 \mu\text{Ci } [1-^{14}\text{C}]\text{IDP}$ (1,72 nmol, spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) enthielt 100 mM Hepes-KOH pH 7,6, 2 mM MnCl_2 , 10 mM MgCl_2 und 5 mM NaF in einem Endvolumen von 500 μl . Der Ansatz mit $0,15 \mu\text{Ci } [3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ (0,97 nmol, spezifische Aktivität 155,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) (3.2.3.2) umfasste neben den für die vorhergehende Reaktion notwendigen Bestandteilen 2 mM NADP^+ , 1 mM NADPH, 1 mM CTP und 6 mM ATP pH 7,0 im angegebenen Gesamtvolumen. Nach Zugabe von 40 μg Chlorophyll wurde für 4 h oder über Nacht (ca. 14 h) im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Die Inkubation des Kontrollversuchs verlief ohne Chlorophyll. Der Reaktionsabbruch erfolgte in Anlehnung an Fellermeier *et al.* (2001) durch Zusatz von 1 ml Ethylacetat und 20-minütige Rotation auf

einem Überkopfschüttler. Nach der Extraktion wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet, zur Erfassung der radioaktiven Markierung ein Aliquot im Szintillationszähler vermessen (2.8.2), mit dem Vakuum-Konzentrator eingengt und nach Aufnehmen in 30 µl Ethylacetat dünnschichtchromatographisch bestimmt (DC1, LM7 oder LM8 (2.7.1), Detektion mit Radio-DC-Scanner bzw. Phosphorimager). Durch Zugabe eines Aliquotes in Szintillatorlösung konnte die radioaktive Markierung der wässrigen Phase bestimmt werden. Deren Zusammensetzung wurde direkt und nach Inkubation mit 0,5 U Alkalischer Phosphatase (2 h, 30 °C) mittels Radio-HPLC analysiert.

Nach Auswertung der Ergebnisse anhand der Verteilung der radioaktiven Markierung fand sich weder nach der Applikation von $[1-^{14}\text{C}]\text{IDP}$ noch von $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ an isolierten Chloroplasten aus pTV Nb IDI- bzw. Wildtyppflanzen und Inkubation für 4 h oder über Nacht ein im Vergleich zum Kontrollversuch (Inkubation ohne Chlorophyll) gesteigerter Anteil an Radioaktivität in der organischen Phase wieder. Bei dem Vergleich der Einbauraten in die organischen Phasen (im Durchschnitt 1 %) war ebenso kein Unterschied zwischen der mit pTV Nb IDI infiltrierte und der unbehandelten Pflanze erkennbar. Die DC-Analyse zeigte keinen Einbau in Carotinoide bzw. längerkettige Isoprenoide.

Mit 1 % der radioaktiven Markierung konnte nach Applikation der Vorstufe $[1-^{14}\text{C}]\text{IDP}$ in längerkettigen Isoprenoiden nur ein geringer Anteil erfasst werden. Die Resultate lassen darauf schließen, dass IDP von den isolierten Chloroplasten nicht aufgenommen wurde und daher der Einbau in die organische Phase so gering und vergleichbar dem des Kontrollwertes war. $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ wurde aufgrund der ermittelten Einbauraten in die organischen Phasen von durchschnittlich 1 % ebenfalls nicht von den isolierten Chloroplasten aufgenommen.

Die HPLC-Analyse der wässrigen Phasen nach Applikation von $[1-^{14}\text{C}]\text{IDP}$ zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Kontrollversuch einerseits und den Proben mit isolierten Chloroplasten aus pTV Nb IDI- und Wildtyppflanze andererseits. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten hatten keinen Einfluss auf die geringe Einbaurate. Nach Inkubation mit Alkalischer Phosphatase wurde bei allen Proben und dem Kontrollwert 3-Methyl-3-buten-1-ol als Signal mit > 90 % in HPLC-Analyse detektiert.

Die HPLC-Analyse der wässrigen Phasen nach Applikation von $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ an isolierte Chloroplasten aus pTV Nb IDI- und Wildtyppflanze lieferte unabhängig von der betreffenden Zwischenschicht und der Inkubationszeit annähernd gleiche Resultate. Mit 83 % stellte DXP die Hauptkomponente der wässrigen Phase dar, was die Annahme aus den Daten der Einbauraten in die organische Phase bekräftigt, dass $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ nicht von den isolierten Chloroplasten aufgenommen wurde. Daneben kamen dephosphorylierte Verbindungen wie 1-Deoxy-D-xylulose (DX) und 2C-Methyl-D-erythritol (ME) mit einem Anteil von 10 %, eine Verbindung, die der Retentionszeit von 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (cMEDP) entsprach, mit 2 % und weitere nicht näher charakterisierte Verbindungen vor.

Nach der Hydrolyse mit Alkalischer Phosphatase trat im HPLC-Chromatogramm nur ein Signal mit der Retentionszeit der dephosphorylierten Verbindungen auf. Bei der Verbindung mit einer Retentionszeit gleich derer vom cMEDP kann es sich somit nicht um dieses Intermediat handeln, da es als zyklische Phosphatverbindung nicht durch die Alkalische Phosphatase angegriffen werden würde. Ein Einbau an radioaktiver Markierung in IDP, DMADP oder HMBDP konnte nach Applikation von [3,4,5-¹⁴C₃]DXP nicht erfasst werden.

4 Diskussion

Etwa 40 % der Weltbevölkerung leben in Malaria-Risikoländern. Die Zahl der Neuinfektionen an Malaria wird auf mehrere hundert Millionen Menschen im Jahr geschätzt. Allein in Afrika fordert die Infektionskrankheit unter Kindern dreimal mehr Opfer als AIDS. Ursache für diese alarmierende Situation sind die schnelle Verbreitung und die zunehmende Resistenzentwicklung des Malaria-Erregers z. B. gegenüber Chloroquin. Zudem wurde die Entwicklung neuartiger gegen Malaria wirkende Arzneistoffe vernachlässigt (Wiesner *et al.*, 2003).

Auch die durch *Mycobacterium tuberculosis* verursachte weltweit verbreitete Infektionskrankheit Tuberkulose führt mit etwa einer Millionen Menschen zu einer hohen Zahl an Todesopfern, wobei überwiegend Entwicklungsländer betroffen sind (Rohdich *et al.*, 2004). Die Erreger entwickeln zunehmend Resistenzen gegenüber Tuberkulostatika.

Die gegenwärtig durch beide Infektionskrankheiten hervorgerufene Gesundheitsgefahr erfordert neue Zielstrukturen für antiinfektiv wirkende Arzneistoffe. Sowohl bei dem zu den Apicomplexa gehörenden Malaria-Erreger *P. falciparum* als auch bei dem Eubakterium *Mycobacterium tuberculosis* konnten die Gene *dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *ispG* und *ispH* des Deoxyxylulosephosphat-Weges identifiziert werden (Eisenreich *et al.*, 2004). Über diesen Stoffwechselweg findet in *P. falciparum* und anderen Arten der Apicomplexa die Isoprenoid-Biosynthese statt (Stock, 2004). Da der Alternative Terpenbiosyntheseweg nicht im menschlichen Organismus anzutreffen ist, bieten sich seine Proteine als geeignete Zielstruktur für Arzneistoffe zur Therapie der Malaria und der Tuberkulose an.

Die pflanzliche Terpenbiosynthese über den plastidären Deoxyxylulosephosphat-Weg ist in den letzten Jahren grundlegend untersucht worden. Wie in der Einleitung beschrieben, wurden neben bakteriellen zahlreiche pflanzliche Gene und Enzyme des DXP-Weges kloniert und exprimiert. In höheren Pflanzen liefert der Stoffwechselweg essenzielle Verbindungen wie beispielsweise die Phytol-Seitenkette der an der Lichtreaktion beteiligten Photosynthesepigmente. Aus diesem Grund dienen die Enzyme des DXP-Weges als Zielstrukturen neuartiger Herbizide.

4.1 Klonierung und Expression von Enzymen des Alternativen Terpenbiosyntheseweges

Für die Aufklärung der einzelnen Biosyntheseschritte des DXP-Weges sind die Intermediate dieses Stoffwechselweges notwendig. Von Bedeutung sind dabei vor allem radioaktiv- bzw. schwerisotopenmarkierte Intermediate, die kommerziell nicht zur Verfügung stehen. Sie können durch chemische oder enzymatische Synthese gewonnen werden. Für die enzymatische Darstellung konnten die am Alternativen Terpenbiosyntheseweg beteiligten kommerziell

nicht erhältlichen *E. coli*-Enzyme DXS, DXR, IspD, IspE, IspF, GcpE, LytB und XylB als DXP-bildendes Enzym (1.2.2) bereitgestellt werden (3.1). Mit Ausnahme von *dxr* wurden die isolierten cDNAs kloniert. Nach Expression in *E. coli* konnten die rekombinanten Proteine im Milligramm-Maßstab gewonnen werden.

Die Enzyme des Deoxyxylulosephosphat-Weges wurden wie einleitend beschrieben (1.2.2) von anderen Arbeitsgruppen identifiziert und gereinigt. Die Reinigung des Enzyms DXS aus einem rekombinanten *E. coli*-Stamm erfolgte bei Sprenger *et al.* (1997) durch Ammoniumsulfat-Fällung und Anionenaustauschchromatographie. Das dort beschriebene Protein zeigte mit 0,85 U/mg Protein eine geringfügig niedrigere spezifische Aktivität im Vergleich zu der in dieser Arbeit gewonnenen rekombinanten DXS (0,9 U/mg).

Von Wungsintaweeikul (2001a) wurde die mehrstufige Reinigung der endogenen Enzyme XylB, DXR und IspD aus dem *E. coli*-Stamm DH5 α in acht, sieben bzw. vier chromatographischen Schritten beschrieben. 30 μ g XylB und 500 μ g DXR konnten jeweils aus 400 g *E. coli*-Zellen gewonnen werden. Eine Teilanreicherung von IspD aus 330 g *E. coli*-Zellen führte zu 73 mg IspD-angereichertem Gesamtprotein. Bei durchschnittlich 4 g *E. coli*-Zellen aus einem Liter Bakterienkultur war für diese Art der Reinigung ein hoher zeitlicher und materieller Aufwand erforderlich.

Eine effektivere Methode zur Gewinnung von Enzymen stellt der Einsatz rekombinanter Bakterienstämme dar. Die in dieser Arbeit bereitgestellten DXP-Weg-Enzyme mit Hexahistidin-Fusion wurden nach Proteininduktion mit IPTG aus den rekombinanten *E. coli*-Stämmen isoliert. Von Wungsintaweeikul (2001a) wurden XylB, DXR, IspD, IspE und IspF ebenso als rekombinante Enzyme gewonnen, wobei DXR und IspF mit His-Tag exprimiert wurden. In Tabelle 5 ist eine vergleichende Übersicht der Ergebnisse der Proteinreinigung der Enzyme von Wungsintaweeikul (2001a) zu den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen dargestellt. Sowohl die Gesamtausbeuten an gereinigtem Protein als auch die spezifischen Aktivitäten waren mit den Ergebnissen von Wungsintaweeikul (2001a) vergleichbar. Die Auswahl der Expressionssysteme beeinflusst die Gesamtausbeuten der Enzyme. Im Vergleich dieser Arbeit zu Wungsintaweeikul (2001a) wurde für die Expression sowohl ein anderer Vektor als auch ein anderer *E. coli*-Stamm eingesetzt.

Mit 6,6 mg wurde in dieser Arbeit mehr gereinigtes IspE bereitgestellt im Vergleich zu den 2,4 mg Enzym von Wungsintaweeikul. Die Gesamtausbeute der gereinigten Enzyme XylB, DXR und IspD lag bei Wungsintaweeikul um den Faktor 2 - 3 höher. Eine Ausnahme stellt das Enzym IspF mit einer ungewöhnlich hohen Gesamtausbeute an gereinigtem Protein von 273 mg und der hohen spezifischen Aktivität von 72 U/mg dar. Die Bereitstellung von Proteinen des DXP-Weges im Milligramm-Maßstab war reproduzierbar. Die zur Reinigung gewählte Metall-Chelat-Affinitätschromatographie ist gegenüber mehrstufigen Anreicherungsverfahren mit hohem experimentellen Aufwand von Vorteil.

Tab. 5

Proteinreinigung der rekombinanten Enzyme XylB, DXR, IspD, IspE und IspF des DXP-Weges von Wungsintaweekul (2001a) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit. Die Enzyme DXR und IspF der Arbeit von Wungsintaweekul und die Enzyme der vorliegenden Arbeit (XylB, DXS, DXR, IspD, IspE und IspF) wurden als Proteine mit His-Tag exprimiert. Die Gegenüberstellung umfasst Angaben zur eingesetzten Menge an *E. coli*-Zellen, dem Verfahren der Proteinreinigung, dem gewonnenen gereinigten Protein und der spezifischen Aktivität. Dem Vergleich liegt die Annahme zugrunde, dass aus einem Liter Kulturvolumen ($OD_{600} = 1$) 4 g *E. coli*-Zellen gewonnen werden konnten. Das Enzym DXS wurde nicht von Wungsintaweekul gereinigt; die spezifische Aktivität (Sprenger *et al.*, 1997) wurde mit 0,85* U/mg gekennzeichnet.

		Wungsintaweekul 2001a			vorliegende Arbeit			
Enzym aus rekombinanten <i>E. coli</i> -Stamm	eingesetzte Zellmenge	Proteinreinigung	gereinigtes Protein	spezifische Aktivität [U/mg]	eingesetzte Zellmenge	Proteinreinigung	gereinigtes Protein	spezifische Aktivität [U/mg]
XylB	7,8 g	Sepharose Q FF Hydroxyapatit Source 15Q	52 mg	1,6	4 g	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Talon-Harz)	14,6 mg	1,7
DXS	—	—	—	0,85*	4 g		19 mg	0,9
DXR	2 g	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Ni ²⁺ -Sephrose)	55 mg	6,8	4 g		36 mg	4,4
IspD	5 g	Sepharose Q FF Red Sepharose Source 15Q	15 mg	22,7	4 g		6,2 mg	21,8
IspE	2 g	Sepharose Q FF Phenyl-sepharose 6FF Superdex 75 HR	1,2 mg	34	4 g		6,6 mg	28,8
IspF	7,3 g	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Ni ²⁺ -Sephrose)	273 mg	72	4 g		5,1 mg	12,1

Die rekombinanten Enzyme DXS, DXR, IspD, IspE, IspF, und XylB konnten als lösliche, katalytisch aktive Proteine gewonnen und zur Darstellung markierter kommerziell nicht verfügbarer Intermediate genutzt werden. DXS fand bei den Synthesen von ¹³C- und ¹⁴C-markiertem DXP (3.2.3) und zusammen mit DXR von ¹⁴C-markiertem MEP (3.2.4) Verwendung. IspD und IspE wurden zur Darstellung ihres jeweiligen ¹⁴C-markierten Reaktionsprodukts CDP-ME und CDP-MEP eingesetzt. Die Verbindungen wurden zur Einführung einer HPLC-analytischen Trennmethode für Intermediate des DXP-Weges verwendet (Raschke *et al.*, 2004). Die enzymatische Synthese von [¹⁴C₂]cMEDP aus [U-¹⁴C₃]Pyruvat und unmarkiertem D-GAP wurde mit DXS, DXR, IspD, IspE und IspF durchgeführt (Gao *et al.*, 2002).

Wie die Enzyme des DXP-Weges, welche die Reaktionen bis zum zyklischen Diphosphat cMEDP katalysieren, wurden in dieser Arbeit ebenso GcpE und LytB aus *E. coli* als Proteine mit His₆-Fusion exprimiert. Zu Beginn dieser Arbeit waren *gcpE* und *lytB* als Gene des DXP-

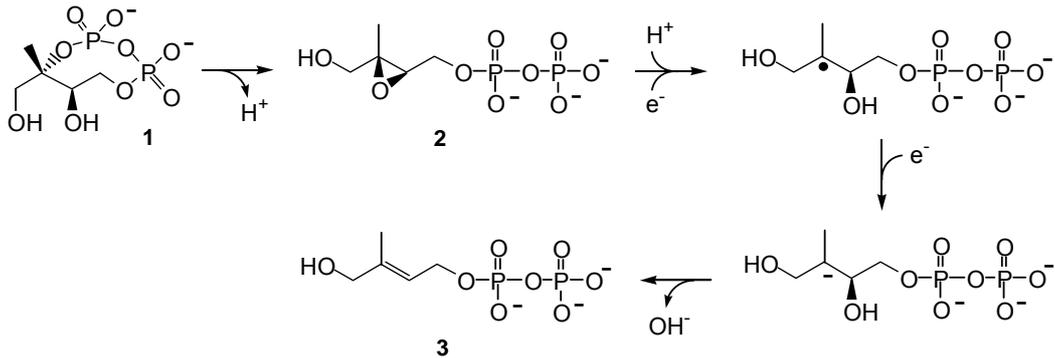
Weges identifiziert. Jedoch wurden deren enzymatische Reaktionen in diesem Stoffwechselweg erst in neueren Arbeiten beschrieben, worauf nachfolgend näher eingegangen wird.

Die 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Reduktase (GcpE oder IspG) katalysiert die reduktive Ringöffnung der zyklischen Phosphatverbindung cMEDP. Nach Isolation und Strukturaufklärung wurde als Reaktionsprodukt 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat (HMBDP) identifiziert (Hintz *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001c). Im letzten Reaktionsschritt verzweigt sich der DXP-Weg. Es kommt zu einer gleichzeitigen Bildung von IDP und DMADP. Die 1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase (LytB oder IspH) setzt HMBDP in IDP und DMADP um (Rohdich *et al.*, 2002), welche in einem Verhältnis von 5:1 (Rohdich *et al.*, 2002) bzw. 6:1 (Rohdich *et al.*, 2003) detektiert werden konnten.

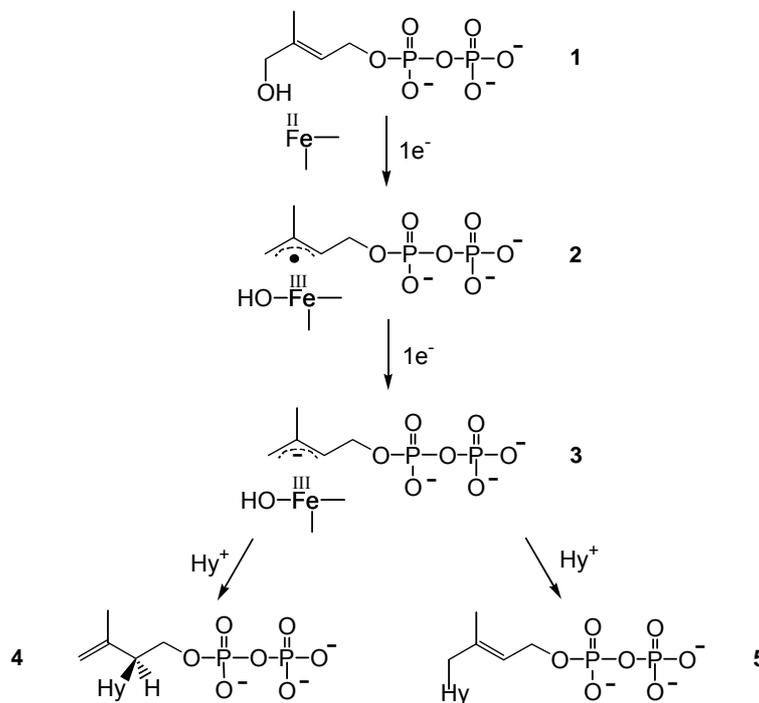
Obwohl die Sequenzidentitäten durch Datenbankanalyse bestätigt wurden und die Induktionsbanden der überexprimierten Enzyme im SDS-Gel das erwartete Molekulargewicht aufwiesen (Abb. 24 und 25 in Abschnitt 3.1.8), konnte die katalytische Aktivität von GcpE und LytB mit den beschriebenen Umsetzungen (2.4.7) nicht nachgewiesen werden. Veröffentlichungen, die erst im späten Verlauf dieser Arbeit erschienen waren, können die fehlende Aktivität der Enzyme GcpE und LytB erklären. Die mutmaßliche Ursache dafür liegt in der Sauerstoffempfindlichkeit dieser Proteine. Bei der Charakterisierung der *E. coli*-Enzyme GcpE (Seemann *et al.*, 2002; Kollas *et al.*, 2002) und LytB (Altincicek *et al.*, 2002; Wolff *et al.*, 2003) konnten sauerstoffsensible [4Fe-4S] Cluster als prosthetische Gruppen beider Proteine beschrieben werden. Für die katalytische Aktivität ist die Gegenwart eines Reduktionssystems erforderlich (Wolff *et al.*, 2003; Rohdich *et al.*, 2003). Bakterielle Enzyme nutzen Flavodoxin, Flavodoxinreduktase und NADPH als Reduktionssystem.

Für die katalytischen Umsetzungen mit den bakteriellen Enzymen GcpE und LytB vorgeschlagene Reaktionsmechanismen sind in den Abbildungen 65 und 66 dargestellt. Das zyklische Diphosphat cMEDP wird durch Katalyse von GcpE zu einer Epoxid-Verbindung umgesetzt, die anschließend durch Einführung eines Elektrons geöffnet wird (Rohdich *et al.*, 2003). Durch Eliminierung der Hydroxylgruppe entsteht das Intermediat HMBDP. Dieses wird LytB-katalysiert über eine radikalische und eine anionische Allylverbindung zu IDP und DMADP umgesetzt (Rohdich *et al.*, 2003). Untersuchungen mit rekombinantem LytB aus *E. coli* in D₂O als Lösungsmittel zeigten, dass das eingefügte Wasserstoffatom aus dem deuterierten Wasser stammt (Rohdich *et al.*, 2004).

Kürzlich konnte GcpE erstmals aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben werden (Seemann *et al.*, 2005). Es handelt sich um die erste für höhere Pflanzen beschriebene Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms. Die Sequenz des Enzyms GcpE aus *A. thaliana* enthält ein Transportpeptid, welches die Lokalisierung in den Chloroplasten nahe legt. Die katalytische Aktivität dieser pflanzlichen GcpE wurde nur in Gegenwart eines 5-Deazaflavin-Semichinon-Radikals beschrieben, nicht aber bei Verwendung des bakteriellen Reduktionssystems.

**Abb. 65:**

Vorgeschlagerener Mechanismus für die GcpE-katalysierte Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (cMEDP, 1) über eine Epoxid-Verbindung (2) zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat (HMBDP, 3) (Eisenreich *et al.*, 2004)

**Abb. 66:**

Vorgeschlagerener Mechanismus für die durch LytB katalysierte Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat (HMBDP, 1) über eine radikalische (2) und eine anionische (3) Allylverbindung zu IDP (4) und DMADP (5); Hy zeigt die Einfügung des Wasserstoffatoms an (Eisenreich *et al.*, 2004)

Weiterhin konnte das Gen *ispG* in den Pflanzen *Lycopersicon esculentum*, *Catharanthus roseus* und *Oryza sativa* und aus dem Malaria-Erreger *P. falciparum* nachgewiesen werden (Rohdich *et al.*, 2004).

Auf der Basis dieser neuen Erkenntnisse ist die Wiederholung des Aktivitätstests unter anaeroben Bedingungen von Interesse. Dafür stehen die in dieser Arbeit bereitgestellten Expressionsstämme für GcpE und LytB zur Verfügung. Die Enzyme können auch unter Zusatz von FeCl_3 , Na_2S und Dithiothreitol auf ihre Aktivität hin getestet werden, denn in Gegenwart dieser Verbindungen konnte eine teilweise Wiederherstellung der enzymatischen

Aktivität der unter aeroben Bedingungen gewonnenen, katalytisch inaktiven Enzyme GcpE und LytB erzielt werden (Seemann *et al.*, 2002; Wolff *et al.*, 2003). Katalytisch aktive GcpE ist insbesondere für die Synthese von HMBDP aus variabel markiertem cMEDP bedeutend.

Nachdem einleitend der Stand des DXP-Weges vom Jahr 2000 dargestellt wurde (Abb. 6), ist der Alternativen Terpenbiosyntheseweg unter Berücksichtigung neuer Intermediate und Enzyme zusammenfassend in Abbildung 67 dargestellt.

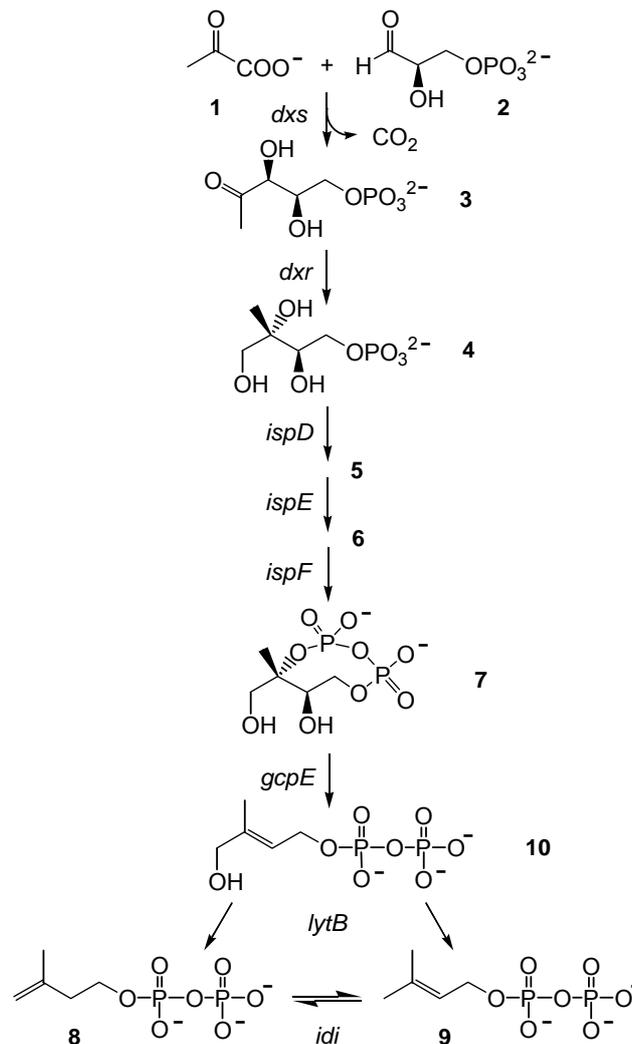


Abb. 67:

Der Alternative Terpenbiosyntheseweg (Stand 2005)

- 1 Pyruvat
- 2 D-Glyceraldehyd 3-phosphat
- 3 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat (DXP)
- 4 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat (MEP)
- 5 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME)
- 6 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphat (CDP-MEP)
- 7 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (cMEDP)
- 8 Isopentenylidiphosphat (IDP)
- 9 Dimethylallyldiphosphat (DMADP)
- 10 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat (HMBDP)

4.2 Synthese von Intermediaten des Alternativen Terpenbiosyntheseweges

Um grundlegende Abläufe von Biosynthesewegen zu erfassen, mechanistische Aspekte eines Stoffwechselweges aufzuklären und Strukturen beteiligter Intermediate zu analysieren, müssen geeignete Synthesewege zur Darstellung einzelner Intermediate entwickelt werden, da diese kommerziell häufig nicht zur Verfügung stehen. Mit diesen Synthesemethoden sollte eine praktisch unbegrenzte Vielfalt markierter Verbindungen möglich sein, welche beispielsweise für Fütterungsexperimente an Zellkulturen, isolierten Plastiden und Blattmaterial eingesetzt werden können. ^{14}C -markierte Verbindungen eignen sich zur hochempfindlichen Radio-Detektion, ^{13}C -markierte Metabolite für NMR- und GC-MS-Analysen.

Verschiedene chemische Methoden sind zur Synthese unmarkierter Intermediate des DXP-Weges beschrieben worden. Die Darstellung isotope markierter Verbindungen gestaltete sich schwieriger, da zur chemischen Synthese mehrfach markierter Intermediate bestimmte Strategien, zahlreiche Reaktionsschritte und die Isolierung einzelner Zwischenprodukte über ein oder mehrere Reinigungsschritte erforderlich sind (Hecht *et al.*, 2001b). Mit enzymatischen Synthesen kann im Vergleich zur chemischen Darstellung in kurzer Reaktionszeit eine hohe Ausbeute erzielt werden. Die Reaktionsprodukte weisen zudem eine hohe Stereoselektivität auf. Synthesen laufen im wässrigen Milieu und häufig als Ein-Topf-Reaktion ab.

Zur Synthese von radioaktiv- und schwerisotopenmarkiertem Pyruvat wurde der rekombinante *E. coli*-Stamm YYC202 verwendet (Gerharz *et al.*, 2001). Aufgrund mehrerer Mutationen im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex scheidet der Stamm nach Glucosezugabe Pyruvat aus. Mehrstufige chemische oder enzymkatalysierte Umsetzungen lassen sich durch Einsatz des *E. coli*-Stammes YYC202 vermeiden. Die Kultivierung des Stammes und die Entwicklung eines Syntheseablaufes zur Darstellung von Pyruvat im Kulturmedium erfolgten im Rahmen dieser Arbeit (Gao *et al.*, 2003).

Uniform ^{13}C - bzw. ^{14}C -markierte Glucose wurde mit einer Bakteriensuspension von *E. coli* YYC202-Zellen umgesetzt (3.2.2.2 bzw. 3.2.2.1). Das gewonnene $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]$ Pyruvat wies in der Radio-HPLC und papierchromatographischen Analyse keine radioaktiv markierten Verunreinigungen auf. Die erhaltene Gesamtradioaktivität betrug 89,5 μCi , was einer Ausbeute von 89,5 % $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]$ Pyruvat (spezifische Aktivität 155,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) entsprach. So ließ sich in einem geringen Reaktionsvolumen ohne Verdünnung der radioisotopen Markierung uniform markiertes Pyruvat mit hoher spezifischer Aktivität darstellen. Die Identität des $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ Pyruvat wurde durch ^{13}C -NMR-Analyse bestätigt.

Im Gegensatz dazu kann Pyruvat durch Katalyse der Glutamat-Pyruvat-Transaminase aus der Aminosäure L-Alanin mit ^{14}C -Markierung dargestellt werden. Bei dieser Transaminierungsreaktion dient α -Ketoglutarat als Akzeptor für die Aminogruppe (Fellermeier, 2000). Vergleichsweise zu ^{14}C -markiertem L-Alanin ist die Verwendung von ^{14}C -Glucose kosten-

günstiger. Zudem ist die leichte und flexible Handhabung des *E. coli*-Stammes YYC202 von Vorteil. Variabel markierte Glucose kann mit der entsprechenden Markierung beispielsweise zu ^{14}C -, ^{13}C - oder ^3H -markiertem Pyruvat umgesetzt werden. Der Stamm wird außerdem in biotechnologischen Herstellungsprozessen zur industriellen Pyruvatproduktion genutzt. Als zentrales Intermediat des zellulären Metabolismus kann Pyruvat als Ausgangsstoff zur Darstellung verschiedener Substanzen wie L-Dopa, L-Ephedrin oder L-Tryptophan eingesetzt werden (Gerharz, 2003).

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat hat als gemeinsame Vorstufe der strukturell abwechslungsreichen Terpene und der Vitamine Thiamin und Pyridoxol besondere Bedeutung im Stoffwechsel. Daher stellt ein günstiger Weg zur Gewinnung von DXP verschiedenster Markierungsmuster die Grundlage weiterer Untersuchungen dar. Durch enzymkatalysierte Ein-Topf-Reaktion läßt sich aus isotoopenmarkierter Glucose und/oder isotoopenmarkiertem Pyruvat unterschiedlich isotoopenmarkiertes DXP darstellen (Hecht *et al.*, 2001a). Die Einführung einer Markierung in den Positionen 1 und/oder 2 kann durch Umsetzung von entsprechend markiertem Pyruvat mit unmarkiertem D-GAP erfolgen. Für eine Markierung in den Positionen 3, 4, und/oder 5 wird Glucose geeigneter Markierung mit unmarkiertem Pyruvat zur Reaktion gebracht.

Die enzymatische Synthese von $[3,4,5\text{-}^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ erfolgte in einer Ein-Topf-Reaktion aus kommerziell erhältlicher $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$, Natriumpyruvat, den glycolytischen Enzymen Hexokinase, Glucose 6-phosphat-Isomerase, Fructose 6-phosphat-Kinase, Aldolase sowie Triosephosphat-Isomerase und dem rekombinanten DXS (Schuhr *et al.*, 2001). Unter den gewählten Bedingungen konnte $[3,4,5\text{-}^{14}\text{C}_3]\text{DXP}$ mit einer Ausbeute von 80 % (Radio-DC-Scanner) gewonnen werden. Das Produkt zeigte in der Radio-HPLC keine radioaktiven Verunreinigungen. Die bei der Synthese über die in Abbildung 68 dargestellten ersten fünf Reaktionen mit den Enzymen der Glycolyse (A - E) gebildeten Intermediate werden nach ihrer Entstehung direkt weiter bis zu D-GAP (6) umgesetzt, aus dem mit Pyruvat (7) und DXS (F) sofort DXP (8) synthetisiert wird. Störungen durch Abbauprodukte oder Enzyminhibition sind somit vermeidbar. Durch ^{13}C -NMR-Analyse konnte die Identität der markierten Reaktionsprodukte belegt werden.

Katalysiert durch die rekombinante DXS konnte isotoopenmarkiertes DXP mit Markierungen in den Positionen 1 und 2 synthetisiert werden. Mit dem *E. coli*-Stamm YYC202 synthetisiertes $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]\text{Pyruvat}$ wurde mit D-GAP und DXS zu $[1,2\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{DXP}$ umgesetzt, welches ohne radioaktive Verunreinigungen (Radio-HPLC) mit einer Ausbeute von 78 % (Radio-DC-Scanner) gewonnen werden konnte. Mit der gleichen Methode wurde aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{D-Glucose}$ $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{DXP}$ mit 66 % Ausbeute synthetisiert.

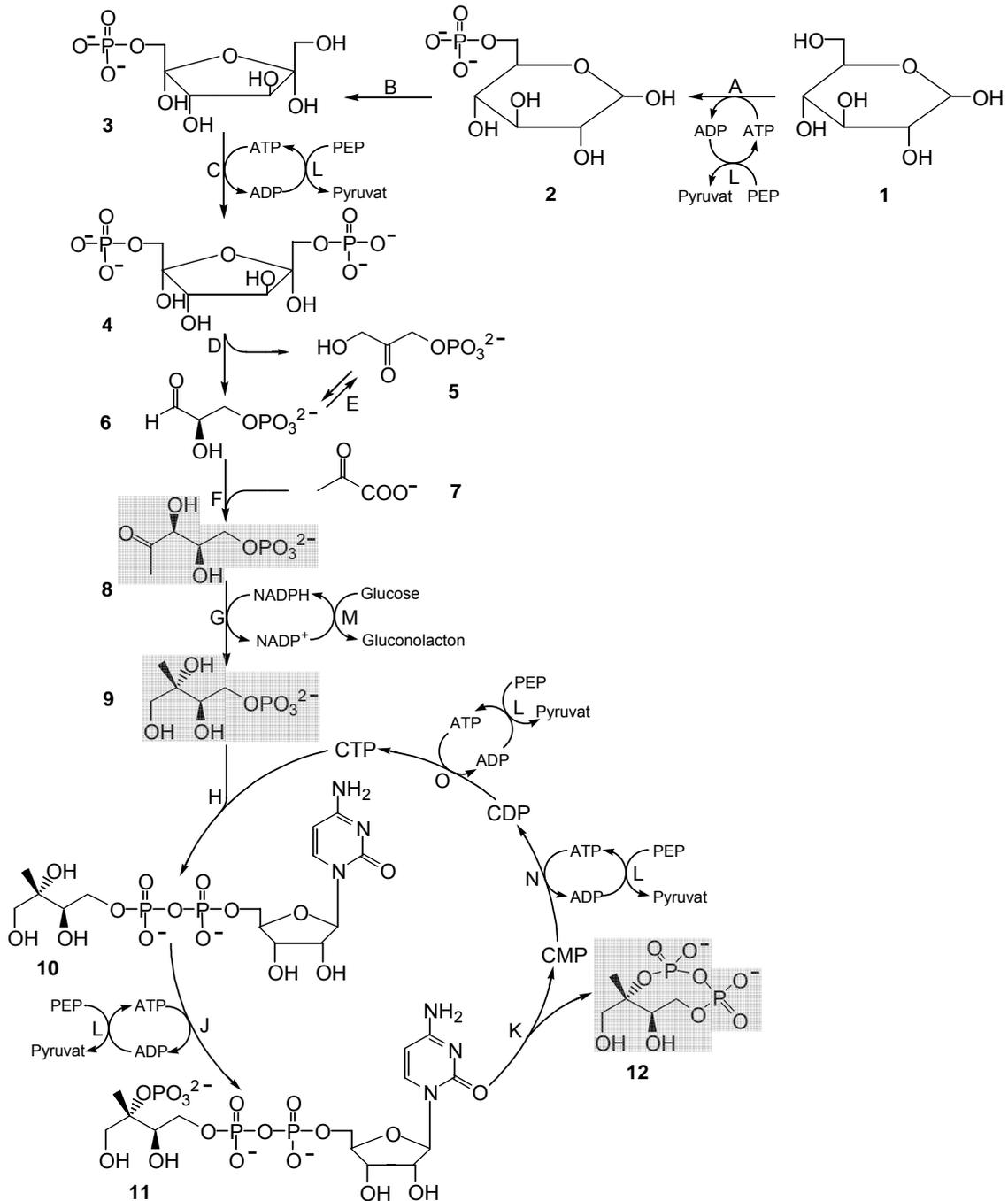


Abb. 68:

Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat (12) – neben den Intermediaten (1 - 12), den Enzymen der Glycolyse (A - E) und des DXP-Weges (F - K) sind die Cofaktor-Recycling-Enzyme (L - O) dargestellt; (nach Hecht *et al.*, 2001a; Schuhr *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Verbindungen sind grau unterlegt.

- | | | | |
|---|------------------------------|----|--|
| 1 | Glucose | 7 | Pyruvat |
| 2 | Glucose 6-phosphat | 8 | 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat |
| 3 | Fructose 6-phosphat | 9 | 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat |
| 4 | Fructose 1,6-diphosphat | 10 | 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol |
| 5 | Dihydroxyacetonphosphat | 11 | 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphat |
| 6 | D-Glycerinaldehyd 3-phosphat | 12 | 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat |
-
- | | | | | | |
|---|------------------------------|---|------|---|-------------------------------|
| A | Hexokinase | F | DXS | L | Pyruvatkinase |
| B | Glucose 6-phosphat-Isomerase | G | DXR | M | Glucosedehydrogenase |
| C | Fructose 6-phosphat-Kinase | H | IspD | N | Nukleosid Monophosphat-Kinase |
| D | Aldolase | J | IspE | O | Nukleosid Diphosphat-Kinase |
| E | Triosephosphat-Isomerase | K | IspF | | |

Durch chemische Synthese konnte deuteriummarkiertes $[5,5-^2\text{H}_2]$ DXP mit einer Ausbeute von 83 % gewonnen werden (Thiel und Adam, 1999). Taylor *et al.* (1998) synthetisierten unmarkiertes DXP. Aus Diethyl-D-tartrat wurde durch chemische Synthese über sieben Reaktionsschritte DXP mit einer Gesamtausbeute von 5 % dargestellt. Enzymkatalysiert wurden Fructose 1,6-diphosphat und Pyruvat zu DXP mit einer 47%igen Ausbeute umgesetzt. 58 % Ausbeute erzielte die DXP-Darstellung über fünf Reaktionsschritte aus dem kommerziell erhältlichen D-Threitol (Blagg und Poulter, 1999). Hecht *et al.* (2001a) konnten sowohl unmarkiertes als auch DXP variabler Markierungsmuster unter Verwendung der glycolytischen Enzyme (Abb. 68) und rekombinanter DXS darstellen und als gereinigte Substanzen isolieren. Deren Ausbeuten sind mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ausbeuten an DXP angegeben (Tabelle 6), wobei die Ausbeuten des hier synthetisierten ^{13}C - bzw. ^{14}C -markierten DXP radiochemisch durch Einsatz mit dem DC-Scanner bestimmt wurden.

Tab. 6

Vergleich der Ausbeuten von unmarkiertem und unterschiedlich isopenmarkiertem DXP

DXP	Ausbeute	Art der Synthese	Literaturangabe
unmarkiert	5%	chemisch	Taylor <i>et al.</i> , 1998
unmarkiert	47%	enzymatisch	Taylor <i>et al.</i> , 1999
unmarkiert	58%	chemisch	Blagg und Poulter, 1999
unmarkiert	46%	enzymatisch	Hecht <i>et al.</i> , 2001a
$[5,5-^2\text{H}_2]$	83%	chemisch	Thiel und Adam, 1999
$[2-^{13}\text{C}_1]$	61%	enzymatisch	Hecht <i>et al.</i> , 2001a
$[1,2-^{13}\text{C}_2]$	40%	enzymatisch	Hecht <i>et al.</i> , 2001a
$[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$	53%	enzymatisch	Hecht <i>et al.</i> , 2001a
$[\text{U}-^{13}\text{C}_5]$	47%	enzymatisch	Hecht <i>et al.</i> , 2001a
$[2-^{14}\text{C}]$	73%	enzymatisch	Hecht <i>et al.</i> , 2001a
$[1,2-^{13}\text{C}_2]$	66%	enzymatisch	diese Arbeit -
$[1,2-^{14}\text{C}_2]$	78%	enzymatisch	Bestimmung radio-
$[3,4,5-^{14}\text{C}_3]$	80%	enzymatisch	chemisch mit DC-Scanner

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ausbeuten an isopenmarkiertem DXP sind mit denen von Hecht *et al.* (2001a) angegebenen Ausbeuten vergleichbar oder liegen darüber (Tabelle 6). Von Blagg und Poulter (1999) gewonnenes unmarkiertes DXP wurde in geringerer Ausbeute im Vergleich zu dieser Arbeit gewonnen. Aufgrund der geringen Gesamtausbeute von 5 % erscheint die chemische DXP-Synthese von Taylor *et al.* (1998) zur Einführung variabler Isotopenmarkierungen als ungeeignet. Der chemischen Darstellung gegenüber sind die enzymkatalysierten Synthesen von Vorteil. Bei dem hier gewonnenen $[3,4,5-^{14}\text{C}_3]$ DXP und den von Hecht *et al.* (2001a) beschriebenen Synthesen konnten zahlreiche Reaktionsschritte durch die Ein-Topf-Methode kombiniert werden. Zudem ist die Einführung praktisch aller denkbaren Markierungsmuster in DXP möglich.

Die Darstellung von [1,2-¹⁴C₂]DXP und [1,2-¹³C₂]DXP erfolgte über zwei getrennte Reaktionsschritte. Durch den *E. coli*-Stamm YYC202 wurde Pyruvat gebildet. Vor der weiteren Umsetzung von ¹³C-markiertem Pyruvat war eine Reinigung notwendig. Im zweiten Reaktionsschritt wurde Pyruvat mit den rekombinanten Enzymen umgesetzt. Der Erwerb glycolytischer Enzyme ist für die Darstellung nicht erforderlich. Sowohl durch diesen Syntheseweg als auch mit dem von Hecht *et al.* (2001a) gewählten Reaktionsablauf lässt sich ¹³C-markiertes DXP im Milligramm-Maßstab darstellen.

Mit dem *E. coli*-Stamm YYC202 aus [U-¹⁴C₆]D-Glucose gewonnenes ¹⁴C-markiertes Pyruvat wurde in der vorliegenden Arbeit mit D-GAP und den rekombinanten Enzymen DXS und DXR zu [1,2-¹⁴C₂]MEP einer Ausbeute von 95 % umgesetzt. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte mit dem DC-Scanner.

Unmarkiertes MEP wurde aus 1,2-Propandiol durch siebenstufige chemische Synthese mit einer Gesamtausbeute von 32 % dargestellt (Koppisch *et al.*, 1999). Zur Einführung einer Tritium-Markierung in MEP konnten in einer aufwändigen 14-stufigen Synthese 9 % Gesamtausbeute an [1-³H]MEP erzielt werden (Kis *et al.*, 2000). Wie DXP konnten Hecht *et al.* (2001b) auch MEP aus isotoopenmarkierter Glucose und Pyruvat durch Ein-Topf-Reaktion darstellen (Abb. 68). Zur Katalyse wurden die glykolytischen Enzyme und rekombinante DXS und DXR eingesetzt. Die erzielten Ausbeuten von [U-¹³C₅]MEP und [1,3,4-¹³C₃]MEP betragen 50 % und 41 %. Mit den unterschiedlichen Darstellungsmethoden wurden Gesamtausbeuten an unmarkiertem und isotoopenmarkiertem MEP von bis zu 50 % erzielt.

Die in dieser Arbeit zur MEP-Synthese eingesetzte Vorgehensweise ist aufgrund der deutlich höheren Ausbeute von 95 % von Vorteil. Zudem ist die Reinigung des Zwischenprodukts ¹⁴C-Pyruvat nicht erforderlich. Jedoch kann die Umsetzung nicht als Ein-Topf-Reaktion durchgeführt werden. Ins Kulturmedium abgegebenes Pyruvat muß von den *E. coli*-Zellen abgetrennt werden und steht anschließend zur weiteren Synthese zur Verfügung.

In dieser Arbeit synthetisiertes [1,2-¹⁴C₂]MEP wurde in einer weiteren Reaktion unter Katalyse des aus *Narcissus pseudonarcissus* isoliertem Stromaprotein zu [1,2-¹⁴C₂] cMEDP umgesetzt. Die mit dem Radio-DC-Scanner bestimmte Ausbeute betrug 80 %, die erzielte spezifische Aktivität 103,7 µCi/µmol.

Die erste chemische Synthese von cMEDP führte über 4 Reaktionsschritte zu einer Ausbeute von 42 % (Giner und Ferris, 2002). Die enzymkatalysierte Darstellung von isotoopenmarkiertem cMEDP wurde eher beschrieben (Schuhr *et al.*, 2001). Für diese Ein-Topf-Reaktion, deren Syntheseroute in Abbildung 68 dargestellt ist, waren bis zu zehn aufeinander folgende Reaktionsschritte und bis zu 15 Enzyme erforderlich. Neben den Enzymen der Glycolyse (A - E) und des DXP-Weges (F - K) wurden zur Rückgewinnung der beteiligten Cofaktoren ATP, CTP und NADPH Recycling-Enzyme (L - O) eingesetzt. Dadurch können erhebliche Einsparungen bei der cMEDP-Synthese erzielt werden. Die Ausbeuten an gereinigtem

Produkt lagen zwischen 50 - 80 %. [2-¹⁴C]cMEDP wurde mit einer spezifischen Aktivität von 15,8 µCi/µmol synthetisiert.

Mit aus Chloroplasten von *Spinacea oleracea* isoliertem Stromaprotein und Stroma aus den Chromoplasten von *Capsicum annuum* und *Narcissus pseudonarcissus* kann in Gegenwart der Cofaktoren radioaktiv- bzw. schwerisotopenmarkiertes DXP in cMEDP umgesetzt werden (Gao *et al.*, 2003). Dieses ist ein geeigneter Weg zur enzymatischen Synthese des zyklischen Diphosphates mit hoher spezifischer Radioaktivität. Zudem kann die Methode zur Darstellung von ¹³C-markiertem cMEDP im Milligramm-Maßstab eingesetzt werden.

Da die chemische Synthese von isotopenmarkiertem cMEDP schwer durchführbar ist und hohe Kosten verursacht, ist auch hier die enzymkatalysierte Darstellung die Methode der Wahl. Zudem liegt die Ausbeute der chemischen Darstellung (42 % bei Giner und Ferris, 2002) unter den Ausbeuten enzymatischer Synthesen (80 % in der vorliegenden Arbeit und 50 - 80 % bei Schuhr *et al.*, 2001).

Durch Einsatz des *E. coli*-Stammes YYC202 und der im Rahmen dieser Arbeit über-exprimierten rekombinanten Enzymen konnten variabel isotopenmarkierte Intermediate des DXP-Weges dargestellt werden.

4.3 IDP-Isomerase aus *C. sativa* und aus *E. coli*

Für Organismen, die Isoprenoide über den MVA-Weg synthetisieren, ist die IDP/DMADP-Isomerase lebensnotwendig, denn erst durch die Isomerisierung von IDP entsteht DMADP. Dagegen ist die Bedeutung der IDP-Isomerase im Alternativen Terpenbiosyntheseweg noch unklar. Im bakteriellen *E. coli*-System ist das für die IDI codierende Gen nicht essenziell, denn die zielgerichtete Inaktivierung des Gens in *E. coli* zeigte, dass das Zellwachstum nur gering beeinflusst wurde (Hahn *et al.*, 1999).

Bei dem freundlicherweise von Herrn Prof. A. Böck, LMU München, zur Verfügung gestellten *E. coli*-Stamm ID16, bei dem das für die IDI codierende Gen ebenfalls deletiert war, konnten bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierung ebenso nur geringe wachstumshemmende Effekte beobachtet werden. Im Vergleich zum *E. coli*-Wildtyp kam es zu verlangsamtem Zellwachstum des *E. coli*-Stammes ID16.

Die Funktion der IDP-Isomerase in höheren Pflanzen ist noch nicht geklärt. Im cytosolischen MVA-Weg ist IDI zur Biosynthese von Sterolen, Sesqui- und Triterpenen zwingend notwendig. Bei der plastidären Biosynthese von Carotinoiden, Phytol, Mono- und Diterpenen über den DXP-Weg ist es jedoch nicht klar, ob die IDI erforderlich ist.

Unterdessen wurde im *Streptomyces*-Stamm CL190 die Existenz eines neuen Typs von IDP-Isomerasen entdeckt (Kaneda *et al.*, 2001). Diese IDP-Isomerasen vom Typ II stehen strukturell und mechanistisch nicht im Zusammenhang mit den Typ I-Enzymen. Im Gegensatz zu IDP-Isomerasen vom Typ I erfordern die Enzyme vom Typ II neben zweiwertigen Metall-

ionen für katalytische Umsetzungen FMN und NADPH (Kaneda *et al.*, 2001). Mutmaßliche Gensequenzen, die für IDP-Isomerasen vom Typ II codieren, konnten in Archaeobakterien und einigen Eubakterien identifiziert werden, nicht aber in Pilzen, höheren Pflanzen und Tieren (Laupitz *et al.*, 2004).

Wie einleitend vorgestellt (1.2.3) wurden bislang schon zahlreiche IDP-Isomerasen vom Typ I identifiziert. Aus *Arabidopsis thaliana* sind zwei Isoformen beschrieben (Campbell *et al.*, 1997). In *Nicotiana tabacum* finden sich zwei unterschiedliche cDNA-Klone, die für eine IDI1 im Chloroplasten und eine cytosolische IDI2 codieren (Nakamura *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die für IDI codierende Sequenz aus der isolierten *E. coli*-cDNA als bakterielles Enzym kloniert. Ferner konnte durch Homologie-Klonierung die IDI aus einer von Dr. J. Page zur Verfügung gestellten *Cannabis sativa*-cDNA-Bibliothek isoliert werden. Aus *C. sativa* wurde bislang noch keine IDP-Isomerase beschrieben. Die Identifizierung des *idi*-Gens erfolgte aufgrund ihrer Homologie zu anderen *idi*-Sequenzen. Die *idi*-Sequenz aus *C. sativa* trägt eine N-terminale Erweiterung. Bei der Klonierung wurde diese Plastidtransportsequenz nicht in das Expressionskonstrukt übernommen, da das Enzym für analytische Zwecke eingesetzt werden sollte. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu anderen Typ I-IDP-Isomerasen und ihrer katalytischen Aktivität, für die nur zweiwertige Metallionen erforderlich sind, handelt es sich sowohl bei der bakteriellen als auch bei der pflanzlichen IDI um IDP-Isomerasen vom Typ I.

Mit der IDI aus *C. sativa* und anderen heterologen IDP-Isomerasen wurden ein Sequenzvergleich und eine Stammbaumanalyse durchgeführt (Abb. 69 und 70). Neben IDP-Isomerasen aus Pflanzen – *A. thaliana* (Campbell *et al.*, 1997) als Dikotyledone und *O. sativa* (Cunningham und Gantt, 2000) als Monokotyledone – wurden die IDI des Menschen (*H. sapiens* IDI1, Hahn *et al.*, 1996b), einer Hefe (*S. cerevisiae*, Anderson *et al.*, 1989) und eines Eubakteriums (Hahn *et al.*, 1999) in diesen Vergleich einbezogen. Die IDI aus *C. sativa* ist zu 72 % mit der IDI1 und 61 % mit der IDI2 aus *A. thaliana* sowie zu 68 % mit der IDI aus *O. sativa* identisch. Weiterhin zeigt die IDI aus *C. sativa* zur IDP-Isomerase des Menschen 42 %, zur IDI aus *S. cerevisiae* 32 % und nur 18 % Identität zur IDI aus *E. coli*.

Im Vergleich zu den IDP-Isomerasen der anderen Organismen besitzt nur die neue IDI aus *C. sativa* eine C-terminale Erweiterung von etwa 35 Aminosäuren. Mit dem Programm Prosite wurden vier Phosphorylierungsstellen in den Sequenz-Abschnitten identifiziert, die in allen IDP-Isomerasen vorkommen. In der C-terminalen Extension befinden sich weitere drei Phosphorylierungsstellen, die mögliche Funktionen im Stoffwechsel bei Aktivierungs-, Deaktivierungs- oder Signaltransduktionskaskaden besitzen können.

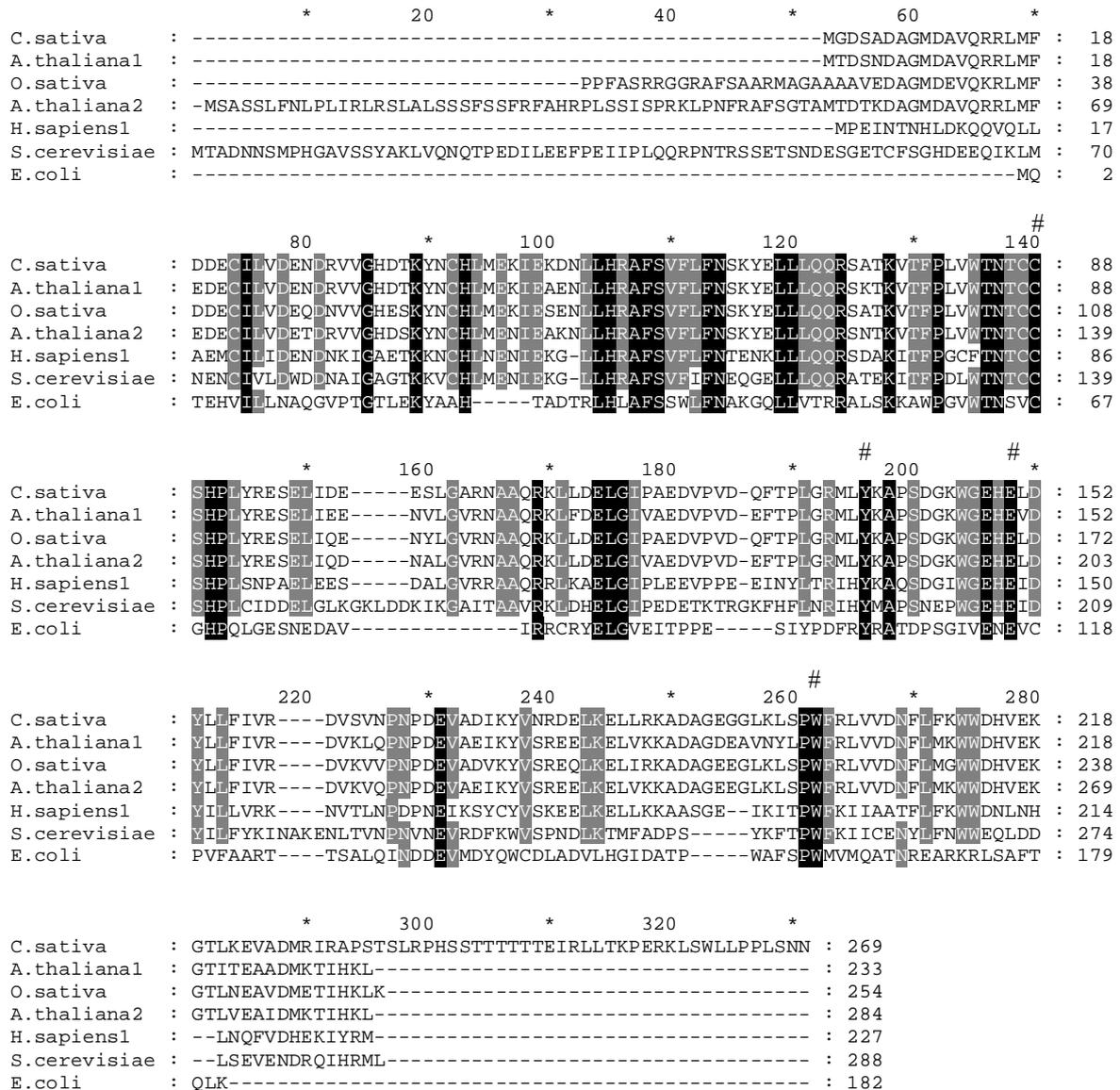
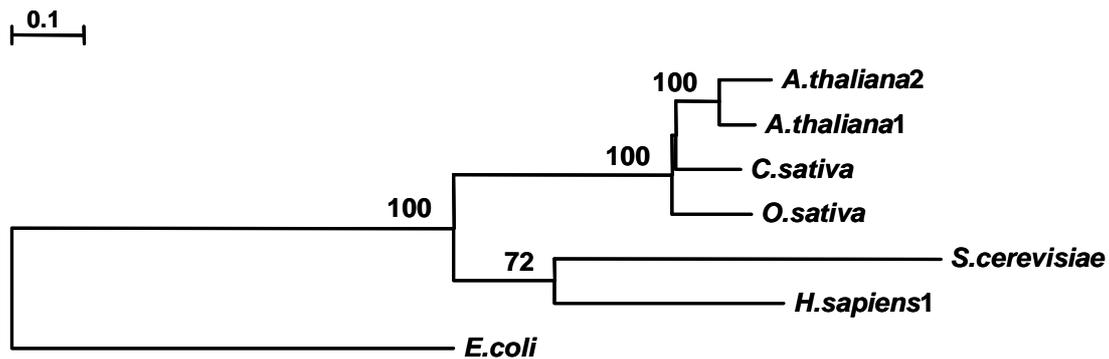


Abb. 69:

Homologievergleich der Aminosäuresequenz der IDP-Isomerase aus *C. sativa* mit IDP-Isomerasen anderer Organismen. Konservierte Aminosäuren sind in weißer Schrift auf schwarzem Hintergrund angegeben. Aminosäuren, die in mehr als 80 % der Sequenzen Identität zeigen, sind grau unterlegt. Die an der Isomerisierung von IDP zu DMADP mutmaßlich beteiligten Aminosäuren Cystein, Glutaminsäure, Tyrosin und Tryptophan der IDP-Isomerase sind durch ein # gekennzeichnet. Einige der pflanzlichen Sequenzen enthalten eine dem Startcodon vorangestellte Sequenz, die für ein Chloroplastentransportpeptid codieren kann. Für den Vergleich wurden die folgenden Aminosäuresequenzen ausgewählt (Protein-Bank-Nummer): *Cannabis sativa*; *Arabidopsis thaliana* 1 (AAC49932); *Arabidopsis thaliana* 2 (AAC49920); *Oryza sativa* (AF188065); *Homo sapiens* 1 (Q13907); *Saccharomyces cerevisiae* (AAA34708); *Escherichia coli* (Q46822). Der Vergleich wurde mit Clustal W 1.83 (Thompson *et al.*, 1994) und der GeneDoc Software (Nicholas und Nicholas, 1997) erstellt.

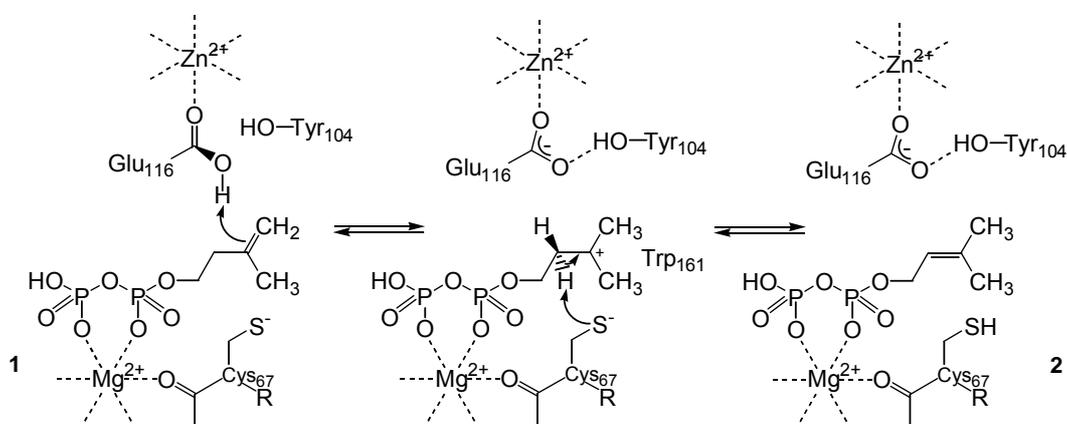
Durch die Stammbaumanalyse (Abb. 70) konnte gezeigt werden, dass die IDI aus *C. sativa* im Vergleich zu den IDP-Isomerasen des Menschen, der Hefe *S. cerevisiae* und des Bakteriums *E. coli* nähere Verwandtschaft zu den pflanzlichen Enzymen aus *A. thaliana* und *O. sativa* aufweist.

**Abb. 70:**

Verwandtschaft der IDI aus *C. sativa* mit heterologen IDP-Isomerasen

Der Stammbaum wurde mit der Treecon Software erstellt (Van de Peer und De Wachter, 1994). Als Grundlage diente ein Aminosäuresequenzvergleich, der mit Clustal W 1.83 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt wurde. Für eine Aussage über die Verlässlichkeit der einzelnen Cluster wurden die durch 100-faches „bootstrap-resampling“ erhaltenen Zahlen angegeben. Die Verknüpfung der einzelnen Äste erfolgte mit dem Neighbour-joining Algorithmus. Als „outgroup“ wurde die IDP-Isomerase aus *E. coli* verwendet.

Ein Vergleich zwischen verschiedenen IDP-Isomerasen auf Ebene der Aminosäuresequenzen ist in Abbildung 69 dargestellt. Die Aminosäuren Cystein und Glutaminsäure – Cys-139 und Glu-207 in *S. cerevisiae* und dazu korrespondierend Cys-67 und Glu-116 in *E. coli* – besitzen für die katalytische Aktivität der IDP-Isomerasen eine entscheidende Bedeutung (Street *et al.*, 1994; Wouters *et al.*, 2003). Eine Substitution der Thiolgruppe in Cys-139 durch Wasserstoff oder eine Methylgruppe würde zur Inaktivierung des Enzyms führen. Ebenso notwendig für die Aktivität ist die Carboxylgruppe in der Aminosäure Glu-207. In *E. coli* wird als weitere an der katalytischen Reaktion beteiligte Aminosäure Tyrosin Tyr-104 angenommen (Rohdich *et al.*, 2004). An dem Prozess der Protonierung und Deprotonierung (Abb. 71) scheinen die Aminosäuren Cystein, Glutaminsäure und Tyrosin beteiligt zu sein (Rohdich *et al.*, 2004). Beim Homologievergleich der Aminosäuresequenzen der IDP-Isomerasen (Abb. 69) finden sich die aus *S. cerevisiae* und *E. coli* beschriebenen Aminosäuren Cystein, Glutaminsäure und Tyrosin korrespondierend in den Sequenzen von *C. sativa*, *A. thaliana*, *O. sativa* und *H. sapiens* wieder.

**Abb. 71:**

Vorgeschlagener Mechanismus für die Isomerisierung von IDP (1) zu DMADP (2) katalysiert durch die IDP-Isomerase mit Angabe der Aminosäurereste des *E. coli*-Proteins (Rohdich *et al.*, 2004)

IDP-Isomerasen vom Typ I besitzen ein Zn^{2+} -Ion, welches mutmaßlich die Protonierung des IDP aktiviert (Carrigan *et al.*, 2003). Als weitere Aminosäure scheint Tryptophan – Trp-161 in *E. coli* – im Reaktionsmechanismus zur Stabilisierung der Übergangsverbindung Bedeutung zu haben (Rohdich *et al.*, 2004). Im Sequenzvergleich findet sich auch dieses Tryptophan als konservierte Aminosäure wieder.

Nach der Klonierung der für die IDP-Isomerasen aus *E. coli* und *C. sativa* codierenden Sequenzen wurden die Enzyme mit Histidin-Fusion exprimiert. Die rekombinanten Enzyme konnten mit der bakteriellen Expressionsmethode im Milligramm-Maßstab gewonnen werden. Die Gesamtmenge an gereinigter *E. coli*-IDI aus einem Liter Kulturvolumen betrug 4,8 mg. Im Vergleich dazu lieferte die heterologe Expression der IDI aus *C. sativa* mit 15 mg Enzym aus einem Liter Expressionsvolumen dreimal mehr gereinigtes Protein.

Das für die *E. coli*-IDI im Rahmen der Genauigkeit der SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht betrug 25 kDa und differiert zu dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht der Monomere von 20,5 kDa. Diese Abweichung steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hahn *et al.* (1999). Aus Zellextrakt wurde dort über Ionenaustausch- und Hydrophobe Interaktionschromatographie rekombinante IDI aus *E. coli* gewonnen. Die Reinheit war vergleichbar mit dem in dieser Arbeit erzielten Reinheitsgrad. Das experimentell bestimmte (24,5 kDa) und das theoretisch vorhergesagte (20,5 kDa) Molekulargewicht differierten bei Hahn *et al.* (1999) wie in der vorliegenden Arbeit. Wie bei dem *E. coli*-Enzym traten bei der IDI aus *C. sativa* Abweichungen zwischen dem durch SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht (ca. 34 kDa) und dem vorhersagbaren (30,9 kDa) auf. Vergleichbare Diskrepanzen zwischen dem experimentell bestimmten und dem berechneten Molekulargewicht traten bei IDI aus *S. cerevisiae* auf (Anderson *et al.*, 1989).

Nach der Klonierung der neuen IDP-Isomerase aus *C. sativa* sollte dieses Enzym und die bereits beschriebene IDP aus *E. coli* im Folgenden enzymatisch charakterisiert werden. Vorgehend musste die an den Aktivitätsnachweis anschließende Analytik überprüft werden. Die Ionenpaar-reversed-Phase HPLC-Methode wurde von McCaskill und Croteau (1993) zur Trennung der Intermediate des Acetat-Mevalonat-Weges sowie von den Prenyldiphosphaten GDP, FDP und GGDP entwickelt. Die eindeutige Trennung von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat wurde in dieser Arbeit publiziert (Abb. 72A).

Eine modifizierte HPLC-Methode wurde zur Trennung der Intermediate des DXP-Weges eingesetzt (Fellermeier, 2000; Gao *et al.*, 2002). Die von McCaskill und Croteau angegebenen Retentionszeiten zur Trennung von IDP (78 min) und DMADP (63 min) konnten bestätigt werden (Abb. 72B). Dafür wurde $[1-^{14}C]$ IDP mit einer von Herrn Prof. A. Bacher, Technische Universität München, zur Verfügung gestellten IDP-Isomerase aus *E. coli* zu $[1-^{14}C]$ DMADP umgesetzt, da markiertes DMADP kommerziell nicht erhältlich ist (Raschke *et al.*, 2004).

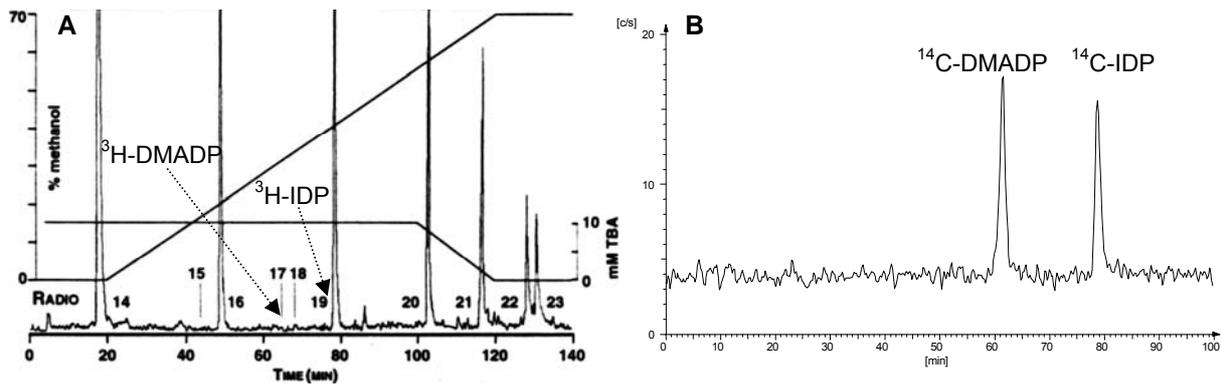


Abb. 72:

- A** HPLC-Chromatogramm mit der Ionenpaar-reversed-Phase HPLC-Methode und Detektion der Radioaktivität zur Trennung von Intermediaten des Acetat-Mevalonat-Weges (McCaskill und Croteau, 1993) – Angabe von [^3H]DMADP und [^3H]IDP
- B** HPLC-Chromatogramm mit der modifizierte HPLC-Methode und Detektion der Radioaktivität zur Trennung von Intermediaten des DXP-Weges (Fellermeier, 2000; Gao *et al.*, 2002) – Angabe von [^{14}C]DMADP und [^{14}C]IDP

Von Rohdich *et al.* (2003) publizierte Ergebnisse ließen Zweifel an der für DMADP angegebenen Retentionszeit von 63 min aufkommen. Das auftretende Signal sollte von einer anderen Verbindung stammen. Die HPLC-Methode wurde aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse und dem bis dahin ungeklärten Ausbleiben der Aktivität der rekombinanten IDP-Isomerasen aus *E. coli* und *C. sativa* überprüft.

Der von Herrn Prof. A. Böck, LMU München, zur Verfügung gestellte *E. coli*-Stamm ID16 konnte IDP trotz Deletion der IDP-Isomerase zu einer Verbindung umsetzen, die bei 63 min bei dieser HPLC-Methode eluiert. Das diese Reaktion katalysierende Enzym sollte aus dem Rohextrakt des *E. coli*-Stammes ID16 durch einen Proteinreinigungsprozess gewonnen und die Verbindung, die ein Signal bei 63 min erzeugt, identifiziert werden. Die Reinigung des IDP umsetzenden Enzyms aus dem *E. coli*-Stamm ID16 erfolgte durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (30 - 60 %) und vier chromatographische Schritte. Das mit einer 377-fachen Anreicherung gewonnene Protein wurde mit präparativer Polyacrylamid-Gel-elektrophorese unter nativen Bedingungen gereinigt und eluierte Proteine, die Enzymaktivität zeigten (3.3.2.1), über ein SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt. Die erhaltene Proteinsequenz führte nach Datenbankanalyse zu dem Enzym Anorganische Pyrophosphatase.

Durch die Kombination der ausgewählten chromatographischen Methoden konnte die Anorganische Pyrophosphatase bis zur Homogenität gereinigt werden. Das Enzym ist für die Abspaltung von Phosphatgruppen verantwortlich und damit in der Lage, IDP zu Isopentenylmonophosphat zu katalysieren. Die Anorganische Pyrophosphatase aus *E. coli* ist ein bereits bekanntes Enzym. Sie wurde von Wong *et al.* schon 1970 beschrieben.

Die aus dem *E. coli* ID16-Stamm angereicherte enzymatische Aktivität, die IDP umzusetzen vermochte, ist vermutlich auf erhöhte Konzentrationen an IDP zurückzuführen. Aufgrund der Deletion des *E. coli*-Stammes ID16 in dem für die IDP-Isomerase codierenden Gen ist die Isomerisierung von IDP zu DMADP im Vergleich zum *E. coli*-Wildtyp IDP nicht möglich. Falls erhöhte IDP-Spiegel im bakteriellen Organismus toxische Auswirkungen haben (Martin

et al., 2003), wird der *E. coli*-Stamm versuchen, IDP zu eliminieren. Durch Induktion der Anorganischen Pyrophosphatase ist eine gesteigerte Dephosphorylierung des toxischen IDP zu IMP möglich. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit den *N. benthamiana* Pflanzen, bei denen das *idi*-Gen ausgeschaltet war, erzielt werden (Page *et al.*, 2004). IDP wird vermehrt zu IMP dephosphoryliert. Folglich kann die IDI eine regulierende Funktion auf das Verhältnis von IDP zu DMADP haben, vor einem Ungleichgewicht der C₅-Vorstufen schützen und dadurch die Terpenbiosynthese über den DXP-Weg optimieren (Page *et al.*, 2004).

Bei dem in der Radio-HPLC bei 63 min auftretenden Signal handelt es sich um Isopentenylmonophosphat. Möglicherweise war die zur Darstellung von [1-¹⁴C]DMADP bereitgestellte IDP-Isomerase mit Anorganische Pyrophosphatase kontaminiert (Raschke *et al.*, 2004) und setzte deshalb IDP zu IMP um, das mit einer Retentionszeit von 63 min eluierte.

Die Anreicherung der IDP-umsetzenden Anorganischen Pyrophosphatase ermöglichte eine Neuordnung HPLC-analytischer Signale. IDP und DMADP können mit der HPLC-Methode nach McCaskill und Croteau nicht getrennt werden. Sie eluieren gemeinsam mit einer Retentionszeit von 78 min. Aus diesem Grund konnte die katalytische Aktivität der IDP-Isomerasen nach Umsetzung mit IDP und HPLC-Analyse nicht gezeigt werden.

Nach Umsetzung von IDP mit den IDP-Isomerasen aus *C. sativa* bzw. aus *E. coli* und nachfolgender Inkubation mit Anorganischer Pyrophosphatase konnten HPLC-analytisch zwei Signale detektiert werden. Durch Abspaltung einer Phosphatgruppe werden Dimethylallylmonophosphat (61 min) und Isopentenylmonophosphat (63 min) gebildet.

Wird nach Umsetzen von IDP mit IDI mit Alkalischer Phosphatase inkubiert, erfolgt die Dephosphorylierung zu den alkoholischen Verbindungen. 3-Methyl-3-buten-1-ol (Isopentenylalkohol) und 3-Methyl-2-buten-1-ol (Dimethylallylalkohol) eluieren bei Retentionszeiten von 39 min und 42 min. Mit Hilfe dieser Methode konnte die katalytische Aktivität der IDP-Isomerasen aus *C. sativa* bzw. *E. coli* eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 49 und 50).

Nach Überprüfung der an den Aktivitätsnachweis der IDP-Isomerasen anschließenden HPLC-Analytik wurden die Enzyme enzymatisch charakterisiert. Nach Umsetzungen von IDP mit IDP-Isomerasen wurde jedoch zur Detektion der auf der Säurelabilität von Allyldiphosphaten beruhende Nachweis eingesetzt (Satterwhite, 1985). Mit dieser Methode konnte im Vergleich zur HPLC-Analyse ein schnelleres Ergebnis erzielt werden. Allylverbindungen wie DMADP, GDP, FDP und GGDP reagieren in Gegenwart von Säuren leicht zu ihren korrespondierenden Alkoholen, beispielsweise das DMADP zu 3-Methyl-2-buten-1-ol. Isopentenyldiphosphat als Homoallylverbindung ist dagegen im sauren Milieu stabil. Die gebildeten Alkohole lassen sich mit unpolaren Lösungsmitteln wie Chloroform, Petrolether, Toluol und Hexan extrahieren und können dadurch vom IDP abgetrennt werden (Ramos-Valdivia *et al.*, 1997a).

Von diesem Nachweis wurden unterschiedliche Varianten beschrieben. Der Reaktionsabbruch kann durch Zugabe von 4:1 (v/v) Methanol:Salzsäure erfolgen und nach der Inkubation mit Chloroform extrahiert werden (Ramos-Valdivia *et al.*, 1997b). Die Reaktion wurde mit 25 %

konzentrierter Salzsäure in Methanol abgebrochen, inkubiert und die Alkohole mit Toluol extrahiert (Kaneda *et al.*, 2000). Für die GDP-Synthase und die FDP-Synthase ist beschrieben worden, dass nach Umsetzung mit den Substraten mit 3 N Salzsäure inkubiert wurde und die Extraktion mit Hexan erfolgte (Tholl *et al.*, 2001).

Für den Nachweis der katalytischen Aktivität der IDP-Isomerasen wurden unterschiedliche Konzentrationen an Salzsäure bzw. Methanol:Salzsäure getestet. Die Salzsäure sollte zur Hydrolyse in konzentrierter Form angewandt werden. Für den Nachweis der katalytischen Aktivität eignete sich die im Abschnitt 2.4.8 beschriebene Methode mit konzentrierter Salzsäure und Chloroform als Extraktionsmittel.

Der Bestimmung der K_M -Werte der IDP-Isomerasen vorausgehende Umsetzungen dienen der Ermittlung der Reaktionsparameter wie der einzusetzenden Enzymmenge (IDP-Isomerase aus *E. coli* 400 μ U bzw. aus *C. sativa* 200 μ U) und der Inkubationszeit (30 min). Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) der IDP-Isomerase aus *E. coli* gegenüber IDP wurde mit 23 μ M bestimmt. Demgegenüber sind die für die Umsetzung mit IDP bestimmten K_M -Werte aus *E. coli* Wildtyp mit 3,5 μ M (Durbecq *et al.*, 2001) und eines rekombinanten *E. coli*-Stammes mit 7,9 μ M (Hahn *et al.*, 1999) als niedriger einzustufen. Diese drei K_M -Wert-Bestimmungen beruhen auf der Methode nach Ramos-Valdivia *et al.* (1997b). Der hier bestimmte K_M -Wert erscheint im Vergleich mit den genannten Werten aus vorherigen Bestimmungen als zu hoch. Der Unterschied könnte durch die Anwesenheit der Histidin-Fusion verursacht worden sein, da in der Literatur Beispiele beschrieben sind, dass der His-Tag die enzymatische Aktivität beeinträchtigen kann. Der Einfluss der Histidin-Fusion auf Struktur und Aktivität wurde beispielsweise bei der rekombinanten Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* untersucht (Araujo *et al.*, 2000). Gegenüber der Aktivität des endogenen Enzyms betrug die Aktivität des Enzyms mit His₆-Fusion ein Fünftel, was durch sterische Behinderungen des His-Tags bedingt sein kann.

Der K_M -Wert der IDP-Isomerase aus *C. sativa* betrug für IDP 62 μ M. Bei einem Vergleich von Michaelis-Menten-Konstanten verschiedener Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* mit 43 μ M (Street und Poulter, 1990), *Homo sapiens* mit 33 μ M (Hahn *et al.*, 1996b) und *Cinchona robusta* mit 5,1 μ M (Ramos-Valdivia *et al.*, 1997b) ist auch hier der relativ hohe Wert auffällig. Die Anwesenheit der Octahistidin-Fusion könnte möglicherweise die IDP-Isomerase aus *C. sativa* in ihrer Fähigkeit, IDP zu binden, beeinträchtigt haben.

Eine prokaryontische und eine eukaryontische IDP-Isomerase konnten im Rahmen dieser Arbeit kloniert, exprimiert und enzymatisch charakterisiert werden. Funktionale Untersuchungen wurden in einer anderen Pflanze durchgeführt. In *Nicotiana benthamiana* war bereits ein System etabliert, welches funktionale Analysen nach Stilllegung eines Gens erlaubte (Robertson, 2004). Für Studien an der IDP-Isomerase wurde daher diese Pflanze ausgewählt.

4.4 Funktion der IDP-Isomerase in *Nicotiana benthamiana*

Nach der enzymatischen Charakterisierung der IDP-Isomerasen aus *E. coli* und *C. sativa* sollte die IDP-Isomerase im lebenden Organismus untersucht werden. Zur Bestimmung der Funktion pflanzlicher Gene und Proteine sind verschiedene Herangehensweisen möglich. Einerseits kann die Genexpression herabgesetzt werden, andererseits können Mutanten erzeugt werden, die nicht mehr in der Lage sind, für ein funktionales Protein zu codieren. Chemische Mutagenese, das Einsetzen von Transposons oder die Agrobakterien-vermittelte Transformation von Pflanzen mit bestimmten Konstrukten, um Unterbrechungen der codierenden Sequenz zu erzielen, finden neben dem hier angewandten VIGS-System als weitere Technologien zur Funktionsüberprüfung von pflanzlichen Genen Verwendung (Burch-Smith *et al.*, 2004). Dabei zeigen mit dem VIGS-System erzeugte Mutanten häufig einen milderen Phänotyp als genetische Mutanten, welche bereits auf der Stufe des Embryos tödliche Auswirkungen haben können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des *idi*-Gens in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen durch VIGS („virus induced gene silencing“) unterdrückt, das für die IDP-Isomerase in diesen Pflanzen codiert. Dazu erfolgte die Klonierung eines Sequenzabschnittes des *idi*-Gens in das TRV („tobacco rattle virus“) als viralem Transportvektor. Nach der Infiltration der Pflanzen kommt es durch posttranskriptionelle Veränderungen zu einem partiellen Abbau der mRNA des *idi*-Gens, was das Ausbleiben der Translation der IDP-Isomerase verursacht.

In *Nicotiana tabacum* sind zwei unterschiedliche cDNA-Klone für IDP-Isomerasen beschrieben worden. Sie codieren für eine plastidäre IDI1 (DXP-Weg) und eine cytosolische IDI2 (MVA-Weg) (Nakamura *et al.*, 2001). Die zum Ausschalten des *idi*-Gens eingesetzte 453 Basenpaare umfassende Sequenz aus *N. benthamiana* zeigt eine höhere Ähnlichkeit zur IDI1 aus *N. tabacum* als zur IDI2-Isoform (Page *et al.*, 2004). Da sich die codierenden Regionen der IDI1 und IDI2 jedoch nur geringfügig unterscheiden, sollten durch das VIGS-System beide IDI-Isoformen erfasst sein.

Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen dienen der Charakterisierung der mit dem Plasmid pTV Nb IDI infizierten *N. benthamiana* Pflanzen im Vergleich zu den mit dem Leervektor pTVØØ infizierten Kontrollpflanzen. Unterschiede im Pigmentierungsmuster traten deutlich bei neu entwickelten Blättern hervor. Diese zeigten bei pTV Nb IDI-Pflanzen ein hellgelbes bis grünes, teilweise gesprenkeltes Erscheinungsbild im Vergleich zu den gleichmäßig grünen Blättern der Kontrollpflanzen. Mit pTV Nb IDI infizierte Pflanzen können in ihrem phänotypischen Erscheinungsbild mit *N. benthamiana* Pflanzen, deren GcpE- bzw. LytB-Gen ausgeschaltet ist, verglichen werden (Page *et al.*, 2004). Für diese Pflanzen ist neben der gestörten Pigmentierung das Vorkommen gewellter Blattränder charakteristisch, das bei den mit dem Virus-Konstrukt des *idi*-Gens infizierten Pflanzen nicht beobachtet wurde. Die Blattspreiten der pTV Nb GcpE-Pflanzen waren weiß oder hellgelb. Das Erschei-

nungsbild der Blätter der pTV Nb *LytB*-Pflanzen hingegen variierte stärker. Bei einigen Blättern zeigten sich die durch das Ausschalten des *lytB*-Gens verursachten Auswirkungen nur entlang der Blattadern, andere Blätter waren völlig weiß oder hellgelb. In Abhängigkeit von dem in seiner Aktivität beeinträchtigten Enzym zeigten sich bei diesen *N. benthamiana*-Mutanten deutliche Unterschiede im Phänotyp.

Bei mikroskopischen Untersuchungen der mit pTV Nb *IDI* infizierten Pflanzen waren im Schwammparenchym von hellgelben Blattbereichen Zellen mit geringer Chloroplastendichte zu erkennen, in grünen Blattbereichen und in Kontrollpflanzen jedoch zahlreiche Chloroplasten sichtbar. Unter UV-Anregung erschien das Chlorophyll in den Kontrollblättern sehr deutlich, hingegen war keine rote Chlorophyll-Fluoreszenz in den pTV Nb *IDI*-Blättern zu beobachten. Diese Unterschiede zwischen infizierten und Kontrollblättern sind vermutlich auf die unterdrückte Expression des *idi*-Gens zurückzuführen. Die Störung des Terpenbiosyntheseweges bedingt die erhebliche Reduktion der Chloroplasten in den hellgelben Blattbereichen des pTV Nb *IDI*-Blattes. Die weiße oder hellgelbe Färbung von Blättern der pTV Nb *GcpE*- und pTV Nb *LytB*-Pflanzen ist möglicherweise auf das Fehlen von Chloroplasten zurückzuführen, das durch Ausschalten der Gene *gcpE* und *lytB* in den Pflanzen bedingt ist.

Bei den drei *N. benthamiana*-Mutanten *GcpE*, *LytB* und *IDI* wurde die Ultrastruktur lichtmikroskopisch und mit einem Transmissionselektronenmikroskop analysiert (Page *et al.*, 2004). Die Struktur des Mesophylls der pTV Nb *IDI*-Blättern war kaum beeinträchtigt. Dagegen wurden infolge des Ausschaltens der Gene *gcpE* und *lytB* bei den pTV Nb *GcpE*- und pTV Nb *LytB*-Pflanzen stärkere Auswirkungen auf die Blattstruktur beobachtet.

Auf der Ebene der stofflichen Zusammensetzung sollte die unterschiedliche Verteilung der Photosynthesepigmente der in der Funktion der IDP-Isomerase blockierten *N. benthamiana* Pflanzen im Vergleich zu den Leervektorpflanzen erfasst werden. Es wurde gezeigt, dass die eingeschränkte Pigmentsynthese eine Reduzierung von Gesamtchlorophyllen und -carotinoiden um etwa 67 % bedingt. In vergleichbaren Experimenten wurde neben den hier untersuchten Pflanzen auch der Carotinoid- und Chlorophyllgehalt der schon beschriebenen *N. benthamiana*-Mutanten *GcpE* und *LytB* analysiert (Page *et al.*, 2004). Gesamtchlorophylle waren um 98 %, die Gesamtcarotinoidkonzentration um 96 % gegenüber der Kontrollpflanze herabgesetzt. Ebenso wie bei der makroskopischen und mikroskopischen Analyse zeigte das Ausschalten der Gene auf die Pigmentsynthese bei den *N. benthamiana*-Mutanten *GcpE* und *LytB* im Vergleich zu pTV Nb *IDI*-Pflanzen erheblich stärkere Effekte.

Im Zusammenhang mit den phänotypischen Beobachtungen finden sich in der Literatur zahlreiche weitere Beispiele, bei denen zur funktionalen Analyse eines Enzyms die Stilllegung des Gens erfolgte, welches für das betreffende Protein codiert.

Die Phytoen-Desaturase (*pds*), ein essenzielles Gen der Carotinoid-Biosynthese, konnte durch TRV-Vermittlung ausgeschaltet werden (Ratcliff *et al.*, 2001). Bei infizierten Pflanzen kam es

zum Ausbleichen der für die Photosynthese verantwortlichen Regionen und somit zur Ausbildung weißer Blätter.

In *Arabidopsis thaliana* wurde die Expression des *CLA1*-Gens untersucht, welches für die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase (DXS) des Alternativen Terpenbiosyntheseweges codiert (Estevez *et al.*, 2001). Bei Mutanten führte eine Unterbrechung der codierenden Sequenz dieses Gens zur Beeinträchtigung der Carotinoid- und Chlorophyllsynthese. Daraus lässt sich schließen, dass dem *CLA1*-Gen zur Funktionalität des DXP-Weges eine entscheidende Rolle zukommt.

Durch die Isolierung und Charakterisierung von *Arabidopsis clb*-Mutanten („chloroplast biogenesis“) war es möglich, an der frühen Chloroplasten-Entwicklung beteiligte Gene zu beschreiben (Gutierrez-Nava *et al.*, 2004). Das *clb4*-Gen ist korrespondierend zum *ispG*-Gen. Durch T-DNA-Integration erzeugte *clb4*-Mutanten zeigen Defekte der 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Reduktase (GcpE). Dadurch bedingt weisen die Pflanzen weiße Phänotypen auf (Gutierrez-Nava *et al.*, 2004). Die Charakterisierung der *Arabidopsis clb6*-Mutante erfolgte wenig später. Das für LytB katalysierende *ispH*-Gen wurde durch Mutation so verändert, dass Pflanzen weiße Phänotypen zeigten (Guevara-Garcia *et al.*, 2005).

Applikationsexperimente mit ^{14}C -markierten Vorstufen an pigmentgestörten pTV Nb IDI- und an Kontrollblättern dienten dazu, den quantitativen Einbau der ^{14}C -Markierung in Carotinoide, Chlorophylle, Xanthophylle und Sterole zu bestimmen. Ebenso wurden ^{14}C -markierte Verbindungen in der wässrigen Phase erfasst.

Der Vergleich der mikroskopischen Untersuchungen zeigte, dass in den hellgelben Blattregionen nur ein geringes Vorkommen an Chloroplasten nachzuweisen ist, in den Kontrollpflanzen dagegen eine hohe Chloroplastendichte vorkommt. Demzufolge sollte der Gesamteinbau der Markierung aufgrund der unterschiedlichen Chloroplastendichte im pTV Nb IDI-Blatt geringer sein als im Kontrollblatt, was durch die Fütterungsexperimente belegt werden konnte.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtchlorophyll- und Carotinoidkonzentration zeigten, dass der Pigmentgehalt im Blattgewebe der pTV Nb IDI-Pflanze nur ein Drittel dessen im Blattgewebe der Kontrollpflanze beträgt. Wenn IDI den limitierenden Faktor darstellt, könnte der Gesamteinbau der Markierung in das Blattgewebe der pTV Nb IDI-Pflanze demzufolge ein Drittel im Vergleich zu diesem ins Kontrollblatt betragen. Jedoch betrug der Gesamteinbau der Markierung in die pigmentgestörten Blätter bis zu zwei Drittel des Gesamteinbaus in das Kontrollblatt. Die Markierungsdichte korreliert nicht mit dem Pigmentgehalt. Sie ist bezogen auf die Konzentration an Chlorophyll in dem pTV Nb IDI-Blatt höher als im Blattgewebe der Kontrollpflanze.

Obwohl die Expression der IDI unterdrückt ist und die Pigmentsynthese nur eingeschränkt erfolgen kann, sind die pTV Nb IDI-Pflanzen lebensfähig und können applizierte Vorstufen in ihren Stoffwechsel einbauen. Jedoch bedingten die deutlichen Unterschiede zwischen IDI-supprimierten Pflanzen und Kontrollpflanzen auf makroskopischer Ebene keine signifikanten Unterschiede bei den Fütterungsexperimenten mit ^{14}C -markierten Vorstufen. Dieses lässt sich

möglicherweise auf den zwischen cytosolischer und plastidärer Terpenbiosynthese stattfindenden „Crosstalk“ zurückführen. Dieser konnte in zahlreichen Applikationsexperimenten mit Intermediaten des DXP- bzw. des MVA-Weges zweifelsfrei nachgewiesen werden (Laule *et al.*, 2003; Bick und Lange, 2003; Schuhr *et al.*, 2003; Hemmerlin *et al.*, 2003).

Daran anschließend wurden zur *in vitro* Untersuchung der Terpenbiosynthese Chloroplasten aus den hellgelben Bereichen pigmentgestörter Blätter und aus Kontrollblättern isoliert und am Saccharosegradienten getrennt. Mit diesen Plastiden wurden ^{14}C -DXP- und ^{14}C -IDP-Fütterungsexperimente durchgeführt. Deutliche Unterschiede im Markierungsmuster konnten nicht gemessen werden.

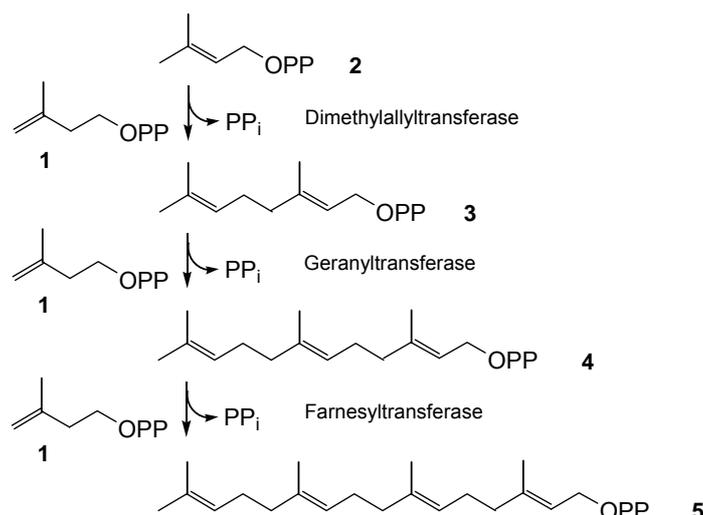
Zum einen kann die Ursache dafür eine unzureichende Aufnahme der applizierten Substrate in die Chloroplasten sein. Jedoch wurde die Aufnahme von ^{14}C -DXP und ^{14}C -IDP in Chloroplasten über ein plastidäres Transportprotein beschrieben (Flügge und Gao, 2005). Zudem wurde die Aufnahme von Substraten des DXP-Weges in isolierte Chromoplasten von *Capsicum annuum* und *Narcissus pseudonarcissus* eindeutig belegt (Fellermeier, 2000). Andererseits erfolgte in dieser Arbeit keine elektronenmikroskopische Analyse der Chloroplasten. Möglicherweise war der strukturelle Aufbau der Plastiden durch das Ausschalten des *idi*-Gens verändert.

Der plastidäre DXP-Weg verzweigt in seinem letzten Reaktionsschritt (Abbildung 67). Durch Katalyse der 1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase (LytB) wird HMBDP in IDP und DMADP umgesetzt. In *E. coli* erfolgt die Bildung in einem Verhältnis von 5:1 (Rohdich *et al.*, 2002) bzw. 6:1 (Rohdich *et al.*, 2003).

Die C_5 -Vorstufen IDP und DMADP werden durch Kopf-Schwanz-Kondensationen zu azyklischen Kohlenwasserstoffen umgesetzt. Diese Vorläuferverbindungen der Terpene werden durch mehrstufige Kondensationen synthetisiert (Abb. 73). Bei der Bildung von GDP (C_{10}) wird IDP und DMADP im Verhältnis 1:1 umgesetzt, bei FDP (C_{15}) im Verhältnis 2:1. Beim nächstfolgenden Kondensationsprodukt GGDP (C_{20}) beträgt das Verhältnis 3:1.

Alle höheren Kondensationsprodukte leiten sich zum Beispiel durch Schwanz-Schwanz-Kondensationen von diesen Prenyldiphosphaten ab. Bei dieser Reaktion bleibt das ursprüngliche Verhältnis von IDP zu DMADP bestehen.

Mit dem Verhältnis von 5:1 bis 6:1 IDP zu DMADP liefert LytB über den DXP-Weg kontinuierlich mehr IDP als für die beschriebenen Synthesen der Prenyldiphosphate notwendig ist. Im physiologischen System kompensiert die IDP-Isomerase diesen Unterschied durch Umwandlung von IDP zu DMADP. Wenn dieses Enzym aber aufgrund der unterdrückten Expression des *idi*-Gens in zu geringer Konzentration gebildet wird, tritt eine zu hohe IDP-Konzentration auf. Bei Martin *et al.* (2003) wurde eine Hemmung des bakteriellen Wachstums durch erhöhte IDP-Konzentrationen beschrieben.

**Abb. 73:**

Synthese azyklischer Kohlenwasserstoffe durch Kopf-Schwanz-Kondensationen

- | | | | |
|---|----------------------------------|---|----------------------------------|
| 1 | Isopentenyl diphosphat (IDP) | 3 | Geranyl diphosphat (GDP) |
| 2 | Dimethylallyl diphosphat (DMADP) | 4 | Farnesyl diphosphat (FDP) |
| | | 5 | Geranylgeranyl diphosphat (GGDP) |

Pflanzen, deren *idi*-Gen ausgeschaltet ist, können IDI nicht mehr in physiologischen Konzentrationen translatieren. Aus dem DXP-Weg bereitgestelltes IDP reichert sich in den Zellen an. Die Biosynthese der Prenyldiphosphate GDP, FDP, GGDP und längerkettiger Isoprenoide ist nur noch eingeschränkt möglich. Erhöhte IDP-Konzentrationen können toxische Auswirkungen haben und Wachstumsverzögerungen der Pflanzen verursachen. Der IDP-Stoffwechsel in den Chloroplasten aus mit dem Plasmid pTV Nb IDI infizierten *N. benthamiana* Pflanzen wurde analysiert (Page *et al.*, 2004). Im Vergleich zu Kontrollpflanzen zeigte sich, dass Chloroplasten aus pigmentgestörtem Pflanzengewebe IDP vermehrt zu IMP dephosphorylieren. In diesen Pflanzen wird möglicherweise ein Mechanismus zur metabolischen Inaktivierung des IDP induziert. Der Einfluss der Deletion des *idi*-Gens im bakteriellen System wurde im vorangehenden Abschnitt 4.3 diskutiert.

Bei den mit dem Plasmid pTV Nb IDI infizierten *N. benthamiana* Pflanzen ist das Enzym LytB offenbar in der Lage, HMBDP umzusetzen und die Synthese terpenoide Verbindungen über den plastidären DXP-Weg zu ermöglichen. Im Vergleich zu den mit dem Leervektor pTV $\emptyset\emptyset$ infizierten Kontrollpflanzen lag die Syntheserate bei 33 %. Falls die eingeschränkte Synthese isoprenoide Verbindungen aber nicht auf die Katalyse von LytB zurückzuführen ist, ließe sich diese auf die durch das partielle Ausschalten des Gens verbleibende Restkonzentration an IDI zurückführen. Eine effektive Carotinoid- und Chlorophyllbiosynthese ist durch die LytB katalysierte Reaktion des HMBDP zu IDP und DMADP nicht möglich. Die IDP-Isomerase ist zum Überleben der *N. benthamiana* Pflanzen nicht zwingend erforderlich. Die plastidäre Terpenbiosynthese kommt auch in Pflanzen vor, deren Expression der IDI unterdrückt ist. In Übereinstimmung mit Page *et al.* (2004) ist die IDP-Isomerase jedoch für eine physiologische Terpenbiosynthese und die normale Entwicklung der Pflanze notwendig.

5 Zusammenfassung

Der Deoxyxylulosephosphat-Biosyntheseweg (DXP-Weg) erlangt neben dem länger bekannten Acetat-Mevalonat-Weg zunehmend an Bedeutung. Dieser als Alternativer Terpenbiosyntheseweg bezeichnete Stoffwechselweg kommt in Säugetieren nicht vor. Daher stellen seine Enzyme und Intermediate ideale Zielstrukturen für innovative Antibiotika, Antimalaria-Mittel und Herbizide dar.

1.) Zur Aufklärung der Biosyntheseschritte des Deoxyxylulosephosphat-Weges ist die Darstellung von kommerziell nicht verfügbaren Intermediaten erforderlich. Für enzymatische Synthesen von Metaboliten wurden die codierenden Sequenzen der sieben *Escherichia coli*-Enzyme 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase (DXS), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase (IspD), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase (IspE), 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase (IspF), 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Reduktase (GcpE) und 1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase (LytB) sowie die D-Xylulokinase (XylB) als 1-Deoxy-D-xylulose phosphorylierendes Enzym kloniert. Die Identitäten der Sequenzen wurden durch Datenbankanalyse verifiziert. Diese Enzyme und die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (DXR) des Alternativen Terpenbiosyntheseweges konnten durch Proteinexpression mit Hexahistidin-Fusion und Reinigung mit Metall-Chelat-Affinitätschromatographie als lösliche Proteine im Milligramm-Maßstab dargestellt werden. Die Gesamtmenge an gereinigtem Enzym aus einem Liter Kulturvolumen lag zwischen 4,0 mg für die 1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase und 36 mg für die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase. Durch den Nachweis der katalytischen Aktivitäten konnte die Identität der rekombinanten Enzyme des Deoxyxylulosephosphat-Weges bestätigt werden.

2.) Metabolite des Alternativen Terpenbiosyntheseweges konnten durch unterschiedliche Synthesemethoden in verschiedenen Markierungsmustern gewonnen werden. Pyruvat wurde unter Verwendung des *E. coli*-Stammes YYC202 dargestellt. Der Stamm besitzt die Fähigkeit, aus kommerziell zugänglicher, markierter Glucose Brenztraubensäure zu erzeugen und ins Medium auszuschcheiden. Auf diese Weise konnten $[U-^{14}C_3]$ Pyruvat und $[U-^{13}C_3]$ Pyruvat synthetisiert werden. Das uniform markierte Pyruvat wurde mit D-Glyceraldehyd 3-phosphat, der anderen C_3 -Vorstufe des Alternativen Terpenbiosyntheseweges, unter Katalyse der rekombinanten 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase umgesetzt. $[1,2-^{14}C_2]$ 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und $[1,2-^{13}C_2]$ 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat konnten mit einer Ausbeute von 78 % und 66 % dargestellt werden.

3.) Die Funktion der Isopentenylidiphosphat-Isomerase (IDI) bei der Synthese lebensnotwendiger isoprenoider Verbindungen in höheren Pflanzen ist noch ungeklärt, in Bakterien ist dieses Enzym entbehrlich. Aus einer cDNA-Bibliothek (Dr. J. Page) wurde die Isopentenylidiphosphat-Isomerase von *Cannabis sativa* durch Homologie-Klonierung isoliert. Der offene Leserahmen umfasst 810 Nukleotide und codiert für ein Protein mit 269 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht der Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus *Cannabis sativa* beträgt 30,9 kDa. Die neue Sequenz zeigt 72 % Identität mit der Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus *Arabidopsis thaliana*, 42 % mit der humanen Isopentenylidiphosphat-Isomerase sowie 18 % mit dem Enzym aus *Escherichia coli*. Die Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Cannabis sativa* und aus *Escherichia coli* wurden mit Polyhistidin-Fusion kloniert. Die Identität der Sequenz des Enzyms aus *Escherichia coli* wurde durch Datenbankanalyse bestätigt. Durch Proteinexpression und Reinigung mit Metall-Chelat-Affinitätschromatographie konnten lösliche Isopentenylidiphosphat-Isomerasen gewonnen werden. Die Gesamtmenge an gereinigtem Protein aus einem Liter Kulturvolumen betrug 4,8 mg für das Enzym aus *Escherichia coli* und 15,0 mg für das aus *Cannabis sativa*.

4.) Obwohl unterschiedliche Expressionsvektoren und -stämme verwendet wurden, zeigten die rekombinanten Isomerasen nach Umsetzung mit Isopentenylidiphosphat in der HPLC-Analyse zunächst keine katalytische Aktivität. Daraufhin wurde die eingesetzte HPLC-Methode zur Trennung phosphorylierter Verbindungen nach McCaskill und Croteau überprüft. Das für Dimethylallyldiphosphat erfasste Signal bei 63 min sollte von einer anderen Verbindung stammen. Um diese Verbindung zu identifizieren, wurde Isopentenylidiphosphat mit Proteinfractionen aus dem *Escherichia coli*-Stamm ID16 umgesetzt. Nach HPLC-analytischer Trennung trat ein Signal bei 63 min auf, obwohl die Isopentenylidiphosphat-Isomerase in diesem Stamm deletiert war. Das Enzym, das durch Reaktion mit Isopentenylidiphosphat eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 63 min erzeugt, wurde aus dem *Escherichia coli*-Stamm ID16 über sechs Anreicherungsschritte zur Homogenität gereinigt. Durch Proteinsequenzierung konnte die Anorganische Pyrophosphatase identifiziert werden. Das Enzym dephosphoryliert Isopentenylidiphosphat zu Isopentenylmonophosphat. Das Signal bei 63 min wird nicht von Dimethylallyldiphosphat, sondern von Isopentenylmonophosphat verursacht. Die Trennung von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat ist mit der HPLC-Methode nach McCaskill und Croteau nicht möglich. Die Isomere eluieren gemeinsam mit einer Retentionszeit von 78 min.

5.) Durch Katalyse der Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Cannabis sativa* und aus *Escherichia coli* wurde Isopentenylidiphosphat teilweise zu Dimethylallyldiphosphat isomerisiert. Die Produkte dieser Reaktion wurden durch Dephosphorylierung in ihre korrespondierenden nichtphosphorylierten Alkohole überführt und konnten nach Neuordnung der HPLC-analytischen Signale getrennt werden. Somit gelang der Nachweis der katalytischen Aktivität der rekombinanten Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Cannabis sativa* und aus

Escherichia coli. Der K_M -Wert und die Maximalgeschwindigkeit der Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Escherichia coli* betragen 23 μM und 1,44 pmol/s. Für das Enzym aus *Cannabis sativa* wurden die entsprechenden Werte mit 62 μM und 0,68 pmol/s bestimmt.

6.) Die funktionale Untersuchung einer weiteren Isopentenylidiphosphat-Isomerase wurde an *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. In diesen Pflanzen war durch Virus-vermittelte RNA-Interferenz („virus induced gene silencing“) das für die Isopentenylidiphosphat-Isomerase codierende *idi*-Gen ausgeschaltet. Neu entwickelte Blätter von Pflanzen, die mit dem Virus-Konstrukt des *idi*-Gens (Dr. J. Page) infizierten waren, zeigten ein hellgelbes bis grünes, teilweise gesprenkeltes Erscheinungsbild im Vergleich zu den gleichmäßig grünen Blättern der Kontrollpflanzen. Bei mikroskopischer Analyse der mit dem Virus-Konstrukt des *idi*-Gens infizierten Pflanzen waren im Schwammparenchym von hellgelben Blattbereichen Zellen mit geringer Chloroplastendichte zu erkennen. Die Zellen der Kontrollpflanzen zeigten zahlreiche Chloroplasten. Durch Ausschalten des *idi*-Gens wurden Gesamtchlorophylle und -carotinoide auf etwa 67 % reduziert. Die Isopentenylidiphosphat-Isomerase scheint in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen zur Synthese isoprenoider, z. B. an der Photosynthese beteiligter, Verbindungen eine funktionale Bedeutung zu haben.

Fütterungsexperimente mit ^{14}C -1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und ^{14}C -Mevalonsäurelacton als Vorstufen der plastidären bzw. cytosolischen Terpenbiosynthese an Blätter von pigmentgestörten und Kontrollpflanzen zeigten keine unterschiedlichen prozentualen Einbauraten in Carotinoide, Chlorophylle, Xanthophylle und Sterole. Zur *in vitro* Untersuchung der Terpenbiosynthese wurden Chloroplasten aus diesen Pflanzen isoliert und am Saccharosegradienten getrennt. In Fütterungsexperimenten wurden die Plastiden mit ^{14}C -1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat bzw. ^{14}C -Isopentenylidiphosphat inkubiert. Ein Einbau der radioaktiven Markierung in Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat bzw. in längerkettige Isoprenoide wurde nicht detektiert.

6 Literaturverzeichnis

- Adam, K.P., Thiel, R., Zapp, J. (1999). Incorporation of 1-[1-¹³C]deoxy-D-xylulose in chamomile sesquiterpenes. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 127-132.
- Adam, P., Eisenreich, W., Fellermeier, M., Hecht, S., Rohdich, F., Schuhr, C.A., Wungsintaweekul, J., Zenk, M.H., Bacher, A. (2000). International Patent Application PCT/EP01/06255.
- Agranoff, B.W., Eggerer, H., Henning, U., Lynen, F. (1960). Biosynthesis of terpenes. VII. Isopentenyl pyrophosphate isomerase. *J. Biol. Chem.* **235**, 326-332.
- Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. (2003). Pharmacological studies supporting the therapeutic use of *Ginkgo biloba* extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* **36**, S8-S14.
- 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.
- Altincicek, B., Kollas, A., 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., 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.
- Anderson, M.S., Muehlbacher, M., Street, I.P., Proffitt, J., Poulter, C.D. (1989). Isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. An improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**, 19169-19175.
- Araki, N., Kusumi, K., Masamoto, K., Niwa, Y., Iba, K. (2000). Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Physiol. Plant.* **108**, 19-24.
- Araujo, A.P.U., Oliva, G., Henrique-Silva, F., Garratt, R.C., Cáceres, O., Beltramini, L.M. (2000). Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Research Comm.* **272**, 480-484.
- Arfin, S.M., Umbarger, H.E. (1969). Purification and properties of the acetohydroxy acid isomeroreductase of *Salmonella typhimurium*. *J. Biochem.* **244**, 1118-1127.
- Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10600-10605.

- 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.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th edition. A compendium of methods from current protocols in molecular biology. Wiley New York.
- Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V., Francis, M.J.O. (1972). The biosynthesis of monoterpenes. *Chem. Rev.* **72**, 115-155.
- Banthorpe, D.V., Doonan, S., Gutowski, J.A. (1977). Isopentenyl pyrophosphate isomerase from pig liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 381-390.
- Baulcombe, D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 109-113.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Bick, J.A., Lange, B.M. (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **415**, 146-154.
- Blagg, B.S., Poulter, C.D. (1999). Synthesis of 1-deoxy-D-xylulose and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. *J. Org. Chem.* **64**, 1508-1511.
- Bochar, D.A., Friesen, J.A., Stauffacher, C.V., Rodwell, V.W. (1999). Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. *Comprehensive Natural Products Chemistry. Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. D.E. Cane (Ed.) **2**, 15-44, Pergamon, Oxford, UK.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R.A., Camara, B. (1998). Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.* **117**, 1423-1431.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Broers, S.T.J. (1994). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. Dissertation Nr. 10978, ETH Zürich, Schweiz.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal.* **39**, 734-746.
- Campbell, M., Hahn, F.M., Poulter, C.D., Leustek, T. (1997). Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **36**, 323-328.

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.

Carrigan, C.N., Poulter, C.D. (2003). Zinc is an essential cofactor for type I isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9008-9009.

Cassera, M.B., Gozzo, F.B., D'Alexandri, F.L., Merino, E.F., del Portillo, H.A., Peres, V.J., Almeida, I.C., Eberlin, M.N., Wunderlich, G., Wiesner, J., Jomaa, H., Kimura, E.A., Katzin, A.M. (2004). The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **279**, 51749-51750.

Charon, L., Pale-Grosdemange, C., Rohmer, M. (1999). On the reduction steps in the mevalonate independent 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in the bacterium *Zymomonas mobilis*. *Tetrahedron Lett.* **40**, 7231-7234.

Cunningham, F.X., Jr., Gantt, E. (2000). Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 119-123.

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., Poulter C.D. (1985). Synthesis of allylic and homoallylic isoprenoid pyrophosphates. *Methods Enzymol.* **110**, 130-144.

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

Disch, A., Rohmer, M. (1998). On the absence of the glyceraldehyd 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 201-208.

Disch, A., Hemmerlin, A., Bach, T.J., Rohmer, M. (1998). Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem. J.* **331**, 615-621.

Dogbo, O., Camara, B. (1987). Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **920**, 140-148.

Durbecq, V., Sainz, G., Oudjama, Y., Clantin, B., Bompard-Gilles, C., Tricot, C., Caillet, J., Stalon, V., Droogmans, L., Villeret, V. (2001). Crystal structure of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *EMBO J.* **20**, 1530-1537.

Duvold, T., Bravo, J.-M., Pale-Grosdemange, C., Rohmer, M. (1997a). Biosynthesis of 2C-methyl-D-erythritol, a putative C₅ intermediate in the mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **38**, 4769-4772.

Duvold, T., Cali, P., Bravo, J.-M., Rohmer, M. (1997b). Incorporation of 2C-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., Hintz, M., Reichenberg, A., Kollas, A.K., Wiesner, J., Jomaa, H. (2003). Microbial isoprenoid biosynthesis and human $\gamma\delta$ T cell activation. *FEBS Lett.* **544**, 4-10.
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M.H., Bacher, A. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology* **5**, R221-R233.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**, 78-84.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 1401-1426.
- Enfissi, E.M.A., Fraser, P.D., Lois, L.M., Boronat, A., Schuch, W., Bramley, P.M. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and nonmevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.* **3**, 17-27.
- Englard, S., Seifter, S. (1990). Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* **182**, 285-300.
- Estevez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., Leon, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **276**, 22901-22909.
- Fellermeier, M. (2000). Untersuchungen zum Alternativen Terpenbiosyntheseweg in Pflanzen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Kis, K., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Zenk, M.H. (2001). Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis. The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6302-6310.
- Flesch, G., Rohmer, M. (1988). Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. *Eur. J. Biochem.* **175**, 405-411.
- Flügge, U.I., Gao, W. (2005). Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. *Plant Biol.* **7**, 91-97.
- Fraser, P.D., Pinto, M.E., Holloway, D.E., Bramley, P.M. (2000). Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* **24**, 551-558.
- 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.
- Gao, W., Raschke, M., Alpermann, H., Zenk, M.H. (2003). A facile enzymatic synthesis of isotopically labeled 2-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate by spinach chloroplast stroma. *Helv. Chem. Acta* **86**, 3568-3577.

- Gerharz, T., Zelic, B., Takors, R., Bott, M. (2001). Method for the fermentative production of pyruvate. German patent application DE10129711.4.
- Gerharz, T. (2003). Pyruvate production based on acetate auxotrophic *Escherichia coli* strains. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* i-xi, 1-133.
- Giner, J.L., Ferris, W.V., Jr. (2002). Synthesis of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclopyrophosphate. *Org. Lett.* **4**, 1225-1226.
- Guevara-Garcia, A., San Roman C., Arroyo, A., Cortes, M.E., Gutierrez-Nava, M. de la Luz, Leon, P. (2005). Characterization of the Arabidopsis *clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell.* **17**, 628-643.
- Gutierrez-Nava, M. de la Luz, Gillmor, C.S., Jimenez, L.F., Guevara-Garcia, A. Leon, P. (2004). Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiology* **135**, 471-482.
- Guzman, M. (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 745-755.
- Hahn, F.M., Baker, J.A., Poulter, C.D. (1996a). Open reading frame 176 in the photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* encodes *idi*, a gene for isopentenyl diphosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **178**, 619-624.
- Hahn, F.M., Xuan, J.W., Chambers, A.F., Poulter, C.D. (1996b). Human isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase: overproduction, purification, and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 30-34.
- 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.
- Hanahan, D. (1983). Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**, 63-113.
- Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Amslinger, S., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Rohdich, F., Bacher, A. (2001a). Enzyme-assisted preparation of isotope-labeled 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate. *J. Org. Chem.* **66**, 3948-3952.
- Hecht, S., Wungsintaweekul, J., Rohdich, F., Kis, K., Radykewicz, T., Schuhr, C.A., Eisenreich, W., Richter, G., Bacher, A. (2001b). Biosynthesis of terpenoids: efficient multistep biotransformation procedures affording isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate using recombinant 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase. *J. Org. Chem.* **66**, 7770-7775.
- Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2001c). Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14837-14842.

Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**, 819-832.

Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., Bach, T.J. (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 26666-26676.

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.

Hill, R.E., Himmeldirk, K., Kennedy, I.A., Panolski, R.M., Sayer, B.G., Wolf, E., Spenser, I.D. (1996). The biogenetic anatomy of vitamin B₆. A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 30426-30435.

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.

Hohmann, C. (2004). Antibiotika-Resistenzen. Die Situation ist nicht dramatisch. *Pharm. Ztg.* **149**, 732-733.

Jez, J.M., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P. (2000). Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902.

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

Jones, B.L., Porter, J.W. (1985). Enzymatic synthesis of phytoene. *Methods Enzymol.* **110**, 209-220.

Joyard, J., Dorne, A.J., Douce, R. (1987). Use of thermolysin to probe the cytosolic surface of the outer envelope membranes from plastids. *Methods Enzymol.* **148**, 195-206.

Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y., Seto, H. (2001). An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 932-937.

Kennedy, I.A., Hemscheidt, T., Britten, J., Spenser, I.D. (1995). 1-Deoxy-D-xylulose. *Can. J. Chem.* **73**, 1329-1337.

Kis, K., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Zenk, M.H., Bacher, A. (2000). An efficient preparation of 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphoric acid and its derivatives. *J. Org. Chem.* **65**, 587-592.

Köhler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., Roos, D.S. (1997). A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* **275**, 1485-1489.

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.

Koppisch, A.T., Blagg, B.S., Poulter, C.D. (1999). Synthesis of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate: the first pathway-specific intermediate in the methylerythritol phosphate route to isoprenoids. *Org. Lett.* **2**, 215-217.

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

Kuzuyama, T., Shimizu, T., Takahashi, S., Seto, H. (1998b). Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7913-7916.

Kuzuyama, T., Takagi, M., Takahashi, S., Seto, H. (2000a). Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 891-897.

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

Kuzuyama, T. (2003). Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1619-1627.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lange, B.M., Wildung, M.R., McCaskill, D., Croteau, R. (1998). A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2100-2104.

Lange, B.M., Croteau, R. (1999a). Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 170-174.

- Lange, B.M., Croteau, R. (1999b). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13714-13719.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruißsem, W., Lange, M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6866-6871.
- Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Zepeck, F., Kaiser, J., Richter, G., Schramek, N., Steinbacher, S., Huber, R., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F. (2004). Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2658-2669.
- Lawrence, D.L., Cline, K., Moore, G.A. (1997). Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid-localized low-molecular-weight heat shock protein. *Plant Mol. Biol.* **33**, 483-492.
- Lell, B., Ruangweerayut, R., Wiesner, J., Missinou, M.A., Schindler, A., Baranek, T., Hintz, M., Hutchinson, D., Jomaa, H., Kremsner, P.G. (2003). Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 735-738.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**, 350-382.
- Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **50**, 47-65.
- 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.
- Mandel, M., Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., Keasling, J.D. (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* **21**, 796-802.
- 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. (1993). Procedure for the isolation and quantification of the intermediates of the mevalonic acid pathway. *Anal. Biochem.* **215**, 142-149.

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

Mullis, K.B., Fallona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.

Nakamura, A., Shimada, H., Masuda, T., Ohta, H., Takamiya, K. (2001). Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. *FEBS Lett.* **506**, 61-64.

Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.

Okuhara, M., Kuroda, Y., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. (1980). Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J. Antibiotics* **33**, 24-28.

Page, J.E., Hause, G., Raschke, M., Gao, W., Schmidt, J., Zenk, M.H., Kutchan, T.M. (2004). Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. *Plant Physiol.* **134**, 1401-1413.

Patterson, D.R. (1987). Rohm and Haas Co., US Patent 4693742.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.

Putra, S.R., Lois, L.M., Campos, N., Boronat, A., Rohmer, M. (1998). Incorporation of [2,3-¹³C₂]- and [2,4-¹³C₂]-D-1-deoxyxylulose into ubiquinone of *Escherichia coli* via the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 23-26.

Qureshi, N., Porter, J.W. (1981). Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* **1**, 47-94, Porter, J.W. and Spurgeon, S.L. (eds), Wiley New York.

Ralph, S.A., Van Dooren, G.G., Waller, R.F., Crawford, M.J., Fraunholz, M.J., Foth, B.J., Tonkin, C.J., Roos, D.S., McFadden, G.I. (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 203-216.

Ramos-Valdivia, A.C., van der Heijden, R., Verpoorte, R. (1997a). Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Nat. Prod. Rep.* **14**, 591-603.

Ramos-Valdivia, A.C., van der Heijden, R., Verpoorte, R., Camara, B. (1997b). Purification and characterization of two isoforms of isopentenyl-diphosphate isomerase from elicitor-treated *Cinchona robusta* cells. *Eur. J. Biochem.* **249**, 161-170.

- Raschke, M., Fellermeier, M., Zenk, M.H. (2004). A high-performance liquid chromatography method for the analysis of intermediates of the deoxyxylulose phosphate pathway. *Anal. Biochem.* **335**, 235-243.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., Baulcombe, D.C. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **25**, 237-245.
- Robertson, D. (2004). VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 495-519.
- Rodriguez-Concepcion, M., Campos, N., Lois, L.M., Maldonado, C., Hoeffler, J.F., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., Boronat, A. (2000). Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **473**, 328-332.
- Rodriguez-Concepcion, M., Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* **130**, 1079-1089.
- Rodriguez-Concepcion, M., Fores, O., Martinez-Garcia, J.F., Gonzalez, V., Phillips, M.A., Ferrer, A., Boronat, A. (2004). Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during Arabidopsis seedling development. *Plant Cell* **16**, 144-156.
- 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-2C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11758-11763.
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C.A., Hecht, S., Zenk, M.H., Bacher, A. (2000a). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6451-6456.
- Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Lüttgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Schramek, N., Zenk, M.H., Bacher, A. (2000b). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8251-8256.
- Rohdich, F., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A., Bacher, A. (2001a). Biosynthesis of terpenoids. 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3190-3197.
- Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001b). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 535-540.
- 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., 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.

Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W. (2004). Perspectives in anti-infective drug design. The late steps in the biosynthesis of the universal terpenoid precursors, isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Bioorg. Chem.* **32**, 292-308.

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.

Rohmer, M. (1999a). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565-574.

Rohmer, M. (1999b). A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. *Comprehensive Natural Products Chemistry. Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. D.E. Cane (Ed.) **2**, 45-67, Pergamon, Oxford, UK.

Roos, D.S., Crawford, M.J., Donald, R.G., Fraunholz, M., Harb, O.S., He, C.Y., Kissinger, J.C., Shaw, M.K., Striepen, B. (2002). Mining the Plasmodium genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**, 35-46.

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

Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H. (1998). Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into monoterpenes and carotenoids in higher plants. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 221-222.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Satterwhite, D.M. (1985). Isopentenyl diphosphate isomerase. *Methods Enzymol.* **110**, 92-99.

Schreyer, R., Böck, A. (1973). Phenotypic suppression of a fructose-1,6-diphosphate aldolase mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **115**, 268-276.

Schuhr, C.A., Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Bacher, A., Rohdich, F. (2001). Studies on the non-mevalonate pathway - preparation and properties of isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Eur. J. Org. Chem.*, 3221-3226.

- Schuhr, C.A., Radykewicz, T., Sagner, S., Latzel, C., Zenk, M.H., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F., Eisenreich, W. (2003). Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem. Reviews*. **2**, 3-16.
- Schwarz, M.K. (1994). Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. Dissertation Nr. 10951, ETH Zürich, Schweiz.
- Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K. (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **455**, 140-144.
- Schwenkreis, P., Tegenthoff, M. (2003). Therapeutic use of cannabinoids in neurology. *Schmerz* **17**, 367-373.
- 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.
- Seemann, M., Wegner, P., Schünemann, V., Bui, B.T., Wolff, M., Marquet, A., Trautwein, A.X., Rohmer, M. (2005). Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 131-137.
- Seto, H., Watanabe, H., Furihata, K. (1996). Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathway in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aeriovifer*. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7979-7982.
- Shigi, Y. (1989). Inhibition of bacterial isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. *J. Antimicrob. Chemoth.* **24**, 131-145.
- Sprenger, G.A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A.A., Taylor, S.V., Begley, T.P., Bringer-Meyer, S., Sahn, H. (1997). Identification of a thiamin-dependent 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.
- Stahl, E., Kaltenbach, U. (1961). Thin-layer chromatography. VI. Trace analysis of sugar mixtures on layers of Kieselgur G. *J. Chromatog.* **5**, 351-355.
- Stock, I. (2004). Therapie der Malaria. *Med. Monatsschr. Pharm.* **27**, 260-272.
- Street, I.P., Poulter, C.D. (1990). Isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase: construction of a high-level heterologous expression system for the gene from *Saccharomyces cerevisiae* and identification of an active-site nucleophile. *Biochemistry* **29**, 7531-7538.
- Street, I.P., Coffman, H.R., Baker, J.A., Poulter, C.D. (1994). Identification of Cys139 and Glu207 as catalytically important groups in the active site of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *Biochemistry* **33**, 4212-4217.

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

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

Taylor, S.V., Vu, L.D., Begley, T.P. (1998). Chemical and enzymatic synthesis of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. *J. Org. Chem.* **63**, 2375-2377.

Thiel, R., Adam, K.P. (1999). Synthesis of [5,5-²H₂]-1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *Tetrahedron Lett.* **43**, 5307-5308.

Tholl, D., Croteau, R., Gershenzon, J. (2001). Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Arch. Biochem. Biophys.* **386**, 233-242.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569-570.

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

Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., Schlitzer, M. (2003). New antimalarial drugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 5274-5293.

Wolff, M., Seemann, M., Bui, B.T., Frapart, Y., Tritsch, D., Estrabot, A.G., Rodriguez-Concepcion, M., Boronat, A., Marquet, A., Rohmer, M. (2003). Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein. *FEBS Lett.* **541**, 115-120.

Wong, S.C.K.; Hall, D.C., Josse, J. (1970). Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. 3. Molecular weight and physical properties of the enzyme and its subunits. *J. Biol. Chem.* **245**, 4335-4345.

Wouters, J., Oudjama, Y., Barkley, S.J., Tricot, C., Stalon, V., Droogmans, L., Poulter, C.D. (2003). Catalytic mechanism of *Escherichia coli* isopentenyl diphosphate isomerase involves Cys-67, Glu-116, and Tyr-104 as suggested by crystal structures of complexes with transition state analogues and irreversible inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**, 11903-11908.

Wungsintaweekul, J. (2001a). Enzymes of the alternative terpenoid pathway in *Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wungsintaweekul, J., Herz, S., Hecht, S., Eisenreich, W., Feicht, R., Rohdich, F., Bacher, A., Zenk, M.H. (2001b). Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 310-316.

Zhang, F.L., Casey, P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241-269.

Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C., Wiesner, J., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H., Lichtenthaler, H.K. (1998). Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z. Naturforsch.* **53c**, 980-986.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. *h.c.* M.H. Zenk für die Überlassung des interessanten Themas, das die Weiterbildung sowohl im biochemischen als auch im molekularbiologischen Bereich ermöglichte. Sein fortwährendes Interesse und zahlreiche wissenschaftliche Anregungen sowie die optimalen Arbeitsbedingungen hatten wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. T.M. Kutchan danke ich insbesondere für die Möglichkeit, am Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle arbeiten zu können und die damit verbundene Bereitstellung zahlreicher Arbeitsmittel.

Frau Prof. Dr. B. Dräger danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen vor und während des Erstellens der Arbeit.

Für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken und wertvolle Anregungen zur Durchführung der Aufgabenstellungen danke ich Herrn Dr. J. Page ebenso wie für die *C. sativa*-cDNA-Bibliothek und die Virus-Konstrukte tragenden *Agrobacterium tumefaciens*.

Herrn Prof. Dr. A. Böck, LMU München, danke ich für die Bereitstellung des *E. coli*-Stammes ID16. Für den pyruvatbildenden *E. coli*-Stamm YYC202 danke ich Herrn Prof. H. Sahm und Herrn Prof. M. Bott, Forschungszentrum Jülich. Der Stamm M15-pQEDXRECO wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. F. Rohdich, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München, bereitgestellt.

Mein Dank gilt Frau Dr. A. Porzel, IPB Halle, für die Aufnahme von NMR-Spektren und ihre Hilfestellung bei der Auswertung der Ergebnisse, Herrn Dr. J. Schmidt, IPB Halle, für die Aufnahme von Massenspektren und Herrn Dr. G. Hause für die Einweisung in die mikroskopischen Arbeiten. Bei Herrn Dr. Piotrowski und Herrn Dr. Pollmann, Ruhr-Universität Bochum, bedanke ich mich für die Durchführung der Proteinsequenzierung.

Für die angenehme Laboratmosphäre sowohl im Biozentrum als auch im IPB danke ich den Kollegen aus unterschiedlichsten Kulturen. Besonders danke ich für die gemeinsame Arbeit am DXP-Weg Herrn Dr. W. Gao, der verschiedene Intermediate synthetisierte, und Frau M. Raschke. Ganz herzlich danke ich Herrn Ch. Böttcher für die Zusammenarbeit während der Enzymreinigung.

Von unschätzbarem Wert war die ausdauernde Hilfe von Frau Dr. U. Schäfer, Herrn Dr. D. Wilken und Herrn Dr. J.W. Müller während meiner Zeit im Labor und beim Erstellen dieser Arbeit.

Besten Dank all denen, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben.

Meinen herzlichsten Dank sage ich allen Freunden, Verwandten und Bekannten für offene Ohren, zahllose Gedanken, Mut machende Worte und tatkräftige Unterstützung.

Teile der vorliegenden Arbeit fanden Eingang in folgende Veröffentlichungen:

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.

Gao, W., Raschke, M., Alpermann, H., Zenk, M.H. (2003).

A facile enzymatic synthesis of isotopically labeled

2-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate by spinach chloroplast stroma.

Helv. Chem. Acta **86**, 3568-3577.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Maria Henriette Alpermann
Friedenstr. 14, 39307 Genthin
geboren am 19.04.1974 in Templin
ledig

Schul-, Berufsausbildung, Studium und Praktika

09/ 1980 - 07/ 1990	Realschulabschluss, Polytechnische Oberschule Tucheim
09/ 1990 - 09/ 1993	Pharmazeutisch-technische Assistentin, Ingenieurschule für Pharmazie Leipzig und Einhorn-Apotheke Genthin
08/ 1993 - 06/ 1995	Allgemeine Hochschulreife, Bismarck-Gymnasium Genthin
10/ 1995 - 09/ 2000	Pharmaziestudium, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/ 1999 - 04/ 2000	Pharmazie-Praktikantin, Salutas Pharma GmbH Barleben, Erstellung der Diplomarbeit
05/ 2000 - 10/ 2000	Pharmazie-Praktikantin, Pelikan-Apotheke Magdeburg
07/ 2000	Diplompharmazeutin
11/ 2000	Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeiten

01/ 2001 - 04/ 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. <i>h.c.</i> M.H. Zenk
seit 06/ 2004	Apothekerin, Kröllwitz-Apotheke und Südstadt-Apotheke Halle

Genthin, 10.10.2005

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Genthin, 10.10.2005