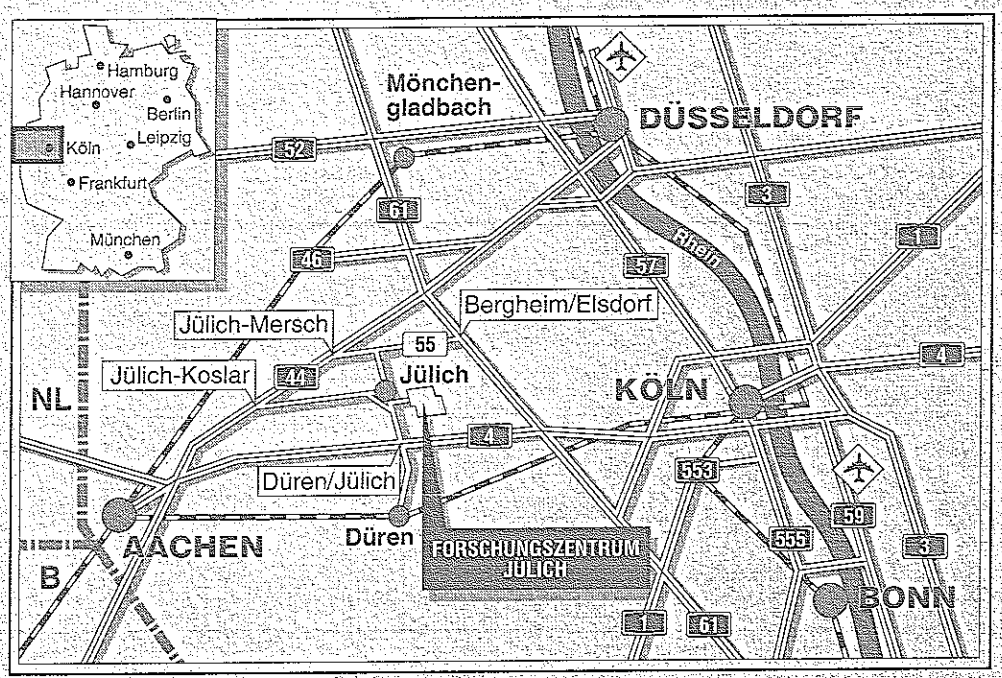
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Klonierung und Charakterisierung von Genen der Hopanoid-Biosynthese in *Zymomonas mobilis*

Ina Gertrud Reipen



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2926
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-2926
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Klonierung und Charakterisierung von Genen der Hopanoid-Biosynthese in *Zymomonas mobilis*

Ina Gertrud Reipen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bla	ß-Lactamase-Gen
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat, Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPP	Farnesylpyrophosphat, Farnesyldiphosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat, Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranylpyrophosphat, Geranyldiphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
IAA	Isoamylalkohol
IPP	Isopentenylpyrophosphat, Isopentenyldiphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
min	Minute
NADP, NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat oxidiert, reduziert
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SHC	Squalen-Hopen-Cyclase
shc	Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis*
SOC	Squalenoxidcyclase
tet	Tetracyclinresistenz-Gen
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Unit, Enzymeinheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
w/v	weight per volume = Gewicht pro Volumen
UV	Ultraviolett

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

I. Einleitung

Seit Mitte der siebziger Jahre findet das Gram-negative, obligat fermentative Bakterium *Zymomonas mobilis* aufgrund seiner hohen Ethanolbildungskapazität zunehmendes wissenschaftliches und industrielles Interesse (ROGERS et al., 1982; BRINGER et al., 1984; SAHM et al., 1992; SPRENGER et al., 1993; SPRENGER, 1993; DOELLE et al., 1993). *Z.mobilis* baut die Substrate Glucose, Fructose und Saccharose anaerob effizient über den Entner-Doudoroff-Weg ab (ENTNER & DOUDOROFF, 1952; GIBBS & DE MOSS, 1951; KERSTERS & DE LEY, 1968). Der Entner-Doudoroff-Weg liefert netto nur ein Mol ATP pro Mol umgesetzter Glucose. Dagegen werden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die traditionell zur Ethanolproduktion eingesetzt wird, die Substrate über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg metabolisiert. Hierbei ist die Netto-Energieausbeute doppelt so hoch. Die Energielimitierung des Stoffwechsels in *Z.mobilis* führt, durch einen geringeren Einbau der Glucose in die Biomasse, zu einer Ethanolausbeute, die gegenüber der der Hefe um 5% erhöht ist, und fast den theoretisch maximalen Wert erreicht (BUCHHOLZ et al., 1987). Auch die Ethanolbildungsrate in *Z.mobilis* ist sechs- bis siebenfach höher als in der Hefe (BUCHHOLZ et al., 1987), so daß die Ethanolproduktion mit *Z.mobilis* auch im Vergleich mit den traditionellen Verfahren unter Einsatz der Hefe *S.cerevisiae* wirtschaftlich interessant ist.

Wichtig für eine effiziente Ethanolproduktion mit *Z.mobilis* ist auch die hohe Ethanoltoleranz dieses Organismus, die durchaus mit der der Hefe *S.cerevisiae* vergleichbar ist. *Z.mobilis* toleriert Alkoholkonzentrationen bis zu 13% im Medium (ROGERS et al., 1982). Während in der Hefe das tetracyclische Triterpenoid Ergosterol als Membrankomponente einen entscheidenden Beitrag zur Ethanoltoleranz leistet (THOMAS et al., 1978; BUTTKE et al., 1980), sind an der Ethanoltoleranz von *Z.mobilis* pentacyclische Triterpenoide, die Hopanoide, wesentlich beteiligt (HORBACH et al., 1991).

Die Hopanoide sind als Membrankomponenten bei Eubakterien weit verbreitet. Bis heute wurden etwa 200 verschiedene Bakterienstämme auf ihr Vorkommen untersucht und nur aus wenigen Gruppen, wie den Schwefelpurpurbakterien und den Enterobakterien, sind keine hopanoidhaltigen Vertreter bekannt (SAHM et al., 1993). Für *Z.mobilis* wurde bisher der höchste Hopanoidgehalt ermittelt. Er beträgt 30 mg/g Trockengewicht, das entspricht 40-50% des Gesamtlipids (HERMANS et al., 1991). Die entscheidende Bedeutung der Hopanoide für die Ethanoltoleranz von *Z.mobilis* konnte durch Inhibierung der Hopanoid-Biosynthese gezeigt werden. Durch Einsatz des Substratanalogons Azasqualen kann die Squalen-Hopen-Cyclase, ein Schlüsselenzym der Hopanoid-Biosynthese, in *Z.mobilis* gehemmt werden (FLESCH & ROHMER, 1987). Dies führt zu einer Verringerung des Hopanoidgehaltes der Membranen in *Z.mobilis*. Der verringerte Hopanoidgehalt hat eine drastische Erniedrigung der Wachstumsrate von *Z.mobilis* in Anwesenheit von steigenden Ethanolkonzentrationen im Medium zur Folge (HORBACH, Diplomarbeit 1990; HORBACH et al., 1991).

Daß der Einbau von Hopanoiden in die prokaryontische Zellmembran generell ein Mechanismus der Anpassung an extreme Umweltbedingungen oder besondere Anforderungen zu sein scheint, zeigen andere Beispiele: Große Mengen eines Hopanoids (20-50% des Gesamtlipids) wurden in dem Stickstoff-Fixierer *Frankia* ssp. gefunden. Die Hopanoide in den Vesikelmembranen dieses Organismus scheinen wesentlich am Schutz der Nitrogenase vor molekularem Sauerstoff beteiligt zu sein (BERRY et al., 1991 und 1993). Durch einen hohen Hopanoidgehalt (bis zu 16% des Gesamtlipidgehaltes) zeichnet sich auch das Gram-positive, thermoacidophile Bakterium *Alicyclobcillus acidocaldarius* aus. Es konnte gezeigt werden, daß der Hopanoidgehalt in *A.acidocaldarius* stark durch die Wachstumstemperatur beeinflußt wird (PORALLA et al., 1984). Bei einer Wachstumstemperatur von 65°C war der Hopanoidgehalt der Zellen siebenmal höher als in Kulturen, die bei 50°C angezogen wurden.

Sowohl bei den in Prokaryonten weit verbreiteten Hopanoiden als auch bei den membranständigen Sterolen, deren Vorkommen bis auf wenige Ausnahmen auf Eukaryonten beschränkt ist, handelt es sich um cyclische Triterpenoide. Ihre gemeinsame Ausgangssubstanz ist die acyclische C_{30}-Verbindung Squalen. In den hopanoidsynthetisierenden Bakterien finden sich im allgemeinen nur Spuren der primären C_{30}-Cyclisierungsprodukte Hopen (Diplopten) und Diplopterol. Bei den eigentlichen funktionellen Membrankomponenten handelt es sich in der Hauptsache um C_{35}-Bacteriohopanderivate, die über eine zusätzliche polyhydroxylierte C_5-Alkyleinheit verfügen, die mit dem Hopengerüst verknüpft ist. Diese C_5-Alkyleinheit kann dann ihrerseits weiter modifiziert sein. In *Z.mobilis* konnten bisher sechs verschiedene Hopanoide nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um die einfachen C_{30}-Hopane Hopen und Diplopterol (Abb.I.1; BARROW et al., 1983), die im Vergleich zu den C_{35}-Bacteriohopanderivaten mengenmäßig aber nur einen geringen Anteil ausmachen. Als C_{35}-Bacteriohopanderivate treten hauptsächlich auf: Bacteriohopantetrol, Bacteriohopantetrolglycosid und Bacteriohopantetrolether (BRINGER et al., 1985; TAHARA et al., 1986; SMITH, 1985; FLESCH, 1987; FLESCH & ROHMER, 1989). In geringen Mengen nachgewiesen wurde das Glucosaminyl-32-oxobacteriohopan-33,34,35,-triol (FLESCH & ROHMER, 1989).

Die C_{35}-Hopanoide, wie das Tetrahydroxybacteriohopan, weisen eine Molekülstruktur und molekulare Dimensionen auf, die denen der membranständigen Sterole von Eukaryonten sehr ähnlich sind. Beide Substanzklassen bestehen aus einem hydrophoben, planaren, rigiden Ringsystem, das eine Schicht der Phospholipid-Doppelschicht überspannen kann (Abb.I.1.). Beide Verbindungen verfügen über eine hydrophile Komponente, die 3-Hydroxygruppe am Ringsystem der Sterole bzw. die polare Seitenkette der Hopanoide. Diese hydrophilen Elemente geben den Molekülen insgesamt einen amphiphilen Charakter. Aufgrund dieser Übereinstimmungen beeinflussen Sterole und Hopanoide die Membraneigenschaften auf ähnliche Weise. Ihre regulative Wirkung auf die Membran beruht auf einer Verminderung der Membranfluidität oberhalb der Phasenübergangstemperatur, indem sie die Beweglichkeit der Fettsäurereste der Phospholipide einschränken. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur dagegen verhindern sie die dichte Packung der Phospholipide und führen dadurch zu einer

Erhöhung der Membranfluidität (DEMEL & DE KRUYFF, 1976; KANNENBERG, 1983; KANNENBERG et al., 1983; HERMANS, Dissertation 1991). Daß es sich bei den Hopanoiden um Funktionsäquivalente zu den Membransterolen handelt, konnte sowohl in einem artifiziellen System, an Liposomen, gezeigt werden (KANNENBERG, 1983) als auch durch biologische Befunde untermauert werden. Der Ciliat *Tetrahymena pyriformis* baut exogen im Medium angebotene Sterole in seine Membran ein. Fehlen Sterole im Medium, so synthetisiert er das hopanoidähnliche Tetrahymanol und Spuren von Diplopterol (CONNER et al., 1968). Auf das Angebot von exogenen Sterolen angewiesen ist *Mycoplasma mycoides*. Ersetzt man Cholesterol im Medium durch Diplopterol, so ist das Wachstum von *M.mycoides* weiterhin möglich (KANNENBERG & PORALLA, 1982).

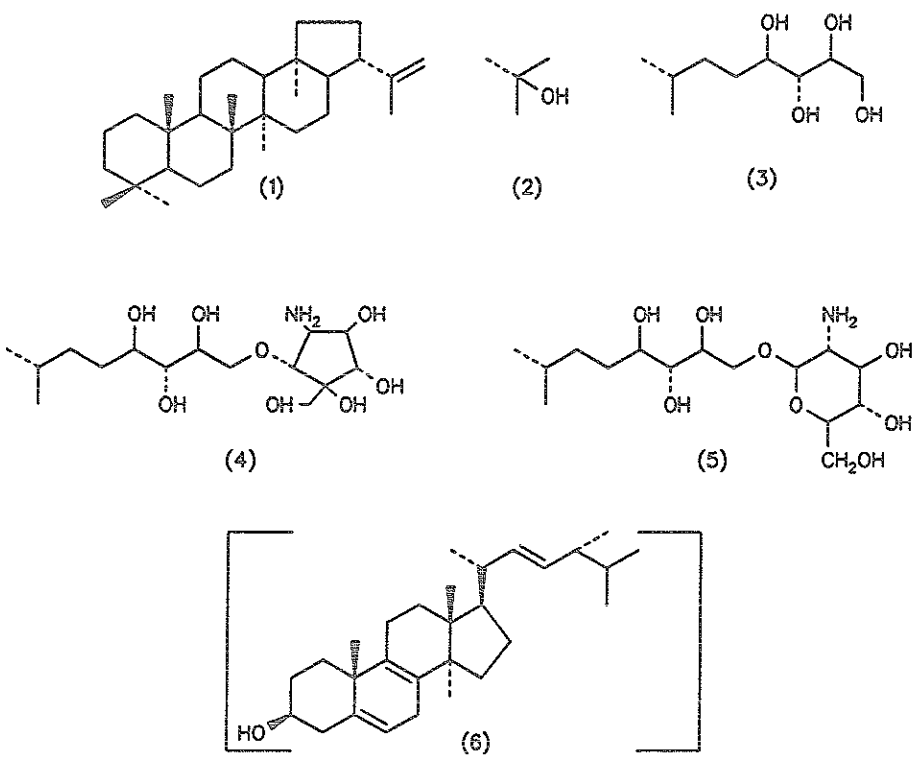


Abb.I.1: Hopanoide aus *Z.mobilis*. Dargestellt sind Hopen (1) sowie die Seitenketten von Diplopterol (2), Bacteriohopantetrol (3), Bacteriohopantetrolether (4) und Glucosaminylbacteriohopantetrol (5). Zum Vergleich der Molekülstrukturen von Hopanoiden und Sterolen ist auch die Struktur des Ergosterols (6) wiedergegeben.

Die Biosynthese der Hopanoide kann in drei Abschnitte eingeteilt werden. Die erste Reaktionsfolge umfaßt die Synthese des Isopentenylpyrophosphats, des C_5-Bausteins aller Isoprenoide bzw. Terpenoide (RUZICKA, 1963). Im zweiten Abschnitt findet die sukzessive Verknüpfung von sechs C_5-Einheiten zum Squalen statt. Diese ersten beiden Reaktionsfolgen treten generell auch bei der Synthese der Sterole und anderer Isoprenoide auf. Spezifisch für die Hopanoid-Biosynthese ist dagegen der dritte Syntheseabschnitt. Er schließt die Cyclisierung des

Squalens zum Hopengerüst, die Verknüpfung des Hopens mit einer nichtprenylischen C_5-Verbindung und weitere Modifizierungen bis zu den C_{35}-Bacteriohopanderivaten, den funktionellen Membrankomponenten, ein.

In Eukaryonten ist die Biosynthese des zentralen Intermediats der Isoprenoid-Biosynthese, des Isopentenylpyrophosphats (IPP), gut untersucht. Sie erfolgt auf dem Acetoacetat-Weg (Abb.I.2; BEYIA & PORTER, 1976). Dabei findet zunächst die Verknüpfung von drei Molekülen Acetyl-CoA zum 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) statt. Dieses Zwischenprodukt wird zum Mevalonat reduziert, welches in zwei Schritten zum Mevalonatpyrophosphat phosphoryliert wird. Durch Dehydrierung und Decarboxylierung entsteht schließlich IPP. Diese Reaktionsfolge wurde auch in verschiedenen Bakterien nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, daß in zellfreien Extrakten von *Myxococcus fulvus, Staphylococcus carnosus, Lactobacillus plantarum* und *Halobacterium cutirubrum* ^{14}C-Acetyl-CoA und ^{14}C-Hydroxymethylglutaryl-CoA zu Mevalonat umgesetzt werden. Darüber hinaus werden ^{14}C-Mevalonsäure, ^{14}C-Mevalonatphosphat und ^{14}C-Mevalonatpyrophosphat in diesen Bakterien in ^{14}C-IPP überführt (HORBACH et al., 1993).

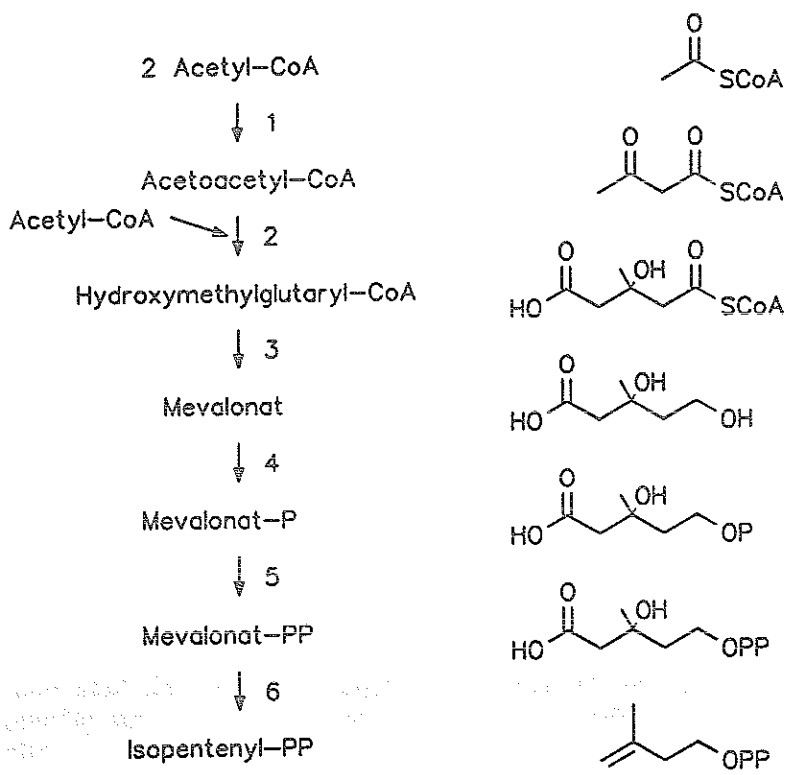


Abb.I.2: Biosynthese von Isopentenylpyrophosphat auf dem Acetoacetat-Weg (Abb. modifiziert nach SAHM et al., 1993). Beteiligte Enzyme: Acetyl-CoA-Acetyltransferase (1), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase (2), Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reductase (3), Mevalonat-Kinase (4), Phosphomevalonat-Kinase (5) und Pyrophosphomevalonat-Anhydrodecarboxylase (6).

Weitere Untersuchungen zur Isoprenoid-Biosynthese in Prokaryonten führten in den letzten Jahren aber zu dem Ergebnis, daß der Acetoacetat-Weg nicht, wie früher angenommen, auf alle

Prokaryonten übertragen werden kann. Insbesondere Versuche zur Inkorporation von ^{14}C-Acetat in die Polyprenylseitenkette der Ubichinone von *Azotobacter vinelandii, Escherichia coli, Pseudomonas sesami* und *Rhodopseudomonas capsulata* sowie von ^{14}C- und ^{13}C-markiertem Acetat und ^{13}C-Glucose in die Hopanoide von *Methylobacterium organophilum, Rhodopseudomonas acidophila, Rhodopseudomonas palustris* und *Z.mobilis* führten zur Ermittlung von Markierungsmustern, die nicht mit einer Biosynthese des IPPs über den Acetoacetat-Weg in Einklang zu bringen sind (PANDIAN et al., 1981; FLESCH & ROHMER, 1988; ZHOU & WHITE, 1991; ROHMER et al., 1989; SAHM et al., 1993; ROHMER et al., 1993). Offensichtlich sind mindestens zwei verschiedene Biosynthesewege zur Bildung des IPPs in Bakterien verwirklicht. Die Daten, die in den Markierungsexperimenten gewonnen wurden, führten zur Formulierung eines neuen, noch hypothetischen Biosyntheseweges, in dem IPP nicht über HMG-CoA und Mevalonat als Intermediate gebildet wird, sondern aus der Addition eines durch Thiamin aktivierten Acetaldehyds an ein Dihydroxyaceton-Derivat hervorgeht (ROHMER et al., 1993).

Im Gegensatz zur Biosynthese des C_5-Bausteins, des IPPs, scheint die Verknüpfung der C_5-Einheiten zu den höheren Isoprenoiden in Eukaryonten und Prokaryonten auf gleichartige Weise zu erfolgen (Abb.I.3). Für die Verknüpfung von zwei C_5-Einheiten ist in Eukaryonten zunächst die durch die IPP-Isomerase katalysierte Isomerisierung eines Moleküls IPP zur allylischen Form, dem Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), erforderlich. In *Z.mobilis* konnte eine IPP-Isomerase-Aktivität jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise entsteht das DMAPP in *Z.mobilis* und anderen Prokaryonten nicht durch Isomerisierung des IPPs, sondern ist selbst auch ein Produkt der andersartigen, unter Prokaryonten verbreiteten IPP-Synthese (WELLE & HORBACH, persönliche Mitteilung). Die 1'-4- (Kopf-an-Schwanz-) Verknüpfung von IPP und DMAPP zur C_{10}-Verbindung, dem Geranylpyrophosphat (GPP), und von GPP und IPP zur C_{15}-Einheit, dem Farnesylpyrophosphat (FPP), wird von einer Prenyltransferase, der FPP-Synthase, katalysiert. Das Farnesylpyrophosphat stellt einen wichtigen Verzweigungspunkt in der Biosynthese der Isoprenoid-Derivate dar. So entstehen durch die Verknüpfung mit weiteren C_5-Einheiten die Lipidkomponente des Dolichols und die Polyprenylseitenkette der Ubichinone. Vom FPP geht auch die Synthese der Carotinoide aus. Darüberhinaus findet in Eukaryonten die Übertragung von Prenylresten auf bestimmte Proteine statt. Farnesyliert werden zum Beispiel nukleäre Lamine, *ras*-Proteine und die "mating-type"-Faktoren in Hefen (GLOMSET et al., 1990; MALTESE, 1990). Katalysiert durch die Squalen-Synthase entsteht durch die 1'-1- (Kopf-an-Kopf-) Verknüpfung von zwei Molekülen FPP die C_{30}-Verbindung, das Squalen, das Substrat für die Cyclisierungsreaktion, aus der in Eukaryonten das Sterol- und in Prokaryonten das Hopanoid-Grundgerüst hervorgeht. In der Hopanoid-Biosynthese wird das Squalen direkt durch die Squalen-Hopen-Cyclase zum Hopen (Diplopten) cyclisiert. Als Nebenprodukt entsteht zu einem geringem Anteil Diplopterol (NEUMANN & SIMON, 1986; OCHS et al., 1990). Die Squalen-Hopen-Cyclase ist das erste für die Hopanoid-Biosynthese spezifische Enzym und somit ein Schlüsselenzym dieses Biosyntheseweges.

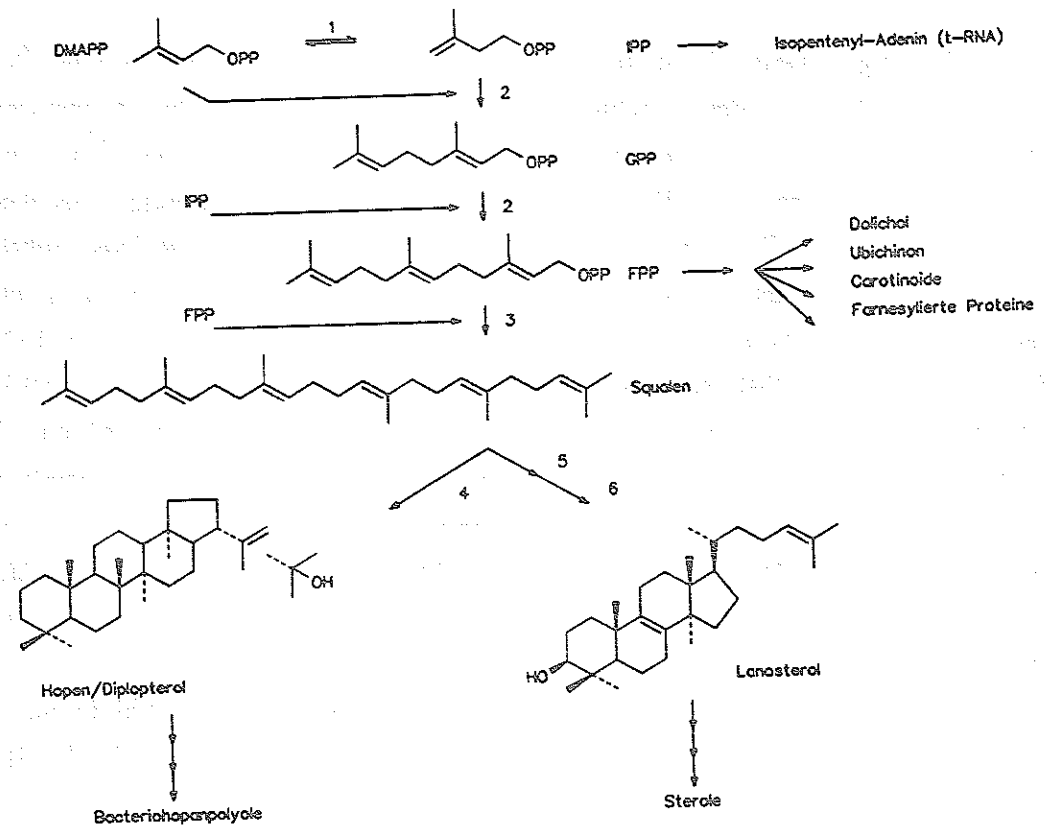


Abb.I.3: Biosynthese von Squalen ausgehend von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Cyclisierung des Squalens zu Hopen und Diplopterol bzw. Lanosterol (Abb. modifiziert nach SAHM et al., 1993). DMAPP, Dimethylallylpyrophosphat; GPP, Geranylpyrophosphat; FPP, Farnesylpyrophosphat. Beteiligte Enzyme: Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (1), Farnesylpyrophosphat-Synthase (2), Squalen-Synthase (3), Squalen-Hopen-Cyclase (4),Squalen-Epoxidase (5) und Squalenoxid-Lanosterol-Cyclase (6).

Im Gegensatz zu der anaeroben Hopanoid-Synthese ist für die Sterolsynthese die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs erforderlich. Squalen wird vor der Cyclisierung zunächst durch eine Squalen-Monooxygenase zu Squalen-2,3-epoxid oxidiert. Das Squalenepoxid ist das Substrat für Squalenoxid-Cyclasen (SOC), die es zu Cycloartenol (in Algen und höheren Pflanzen) oder Lanosterol (in Pilzen und Tieren) cyclisieren. Die Übereinstimmungen in der Biosynthese der Hopanoide und Sterole, die Ähnlichkeit der Cyclisierungsmechanismen sowie ihre strukturelle und funktionelle Äquivalenz führten zu der Hypothese, daß es sich bei den anaerob synthetisierten Hopanoiden um die Vorläufer der Sterole handeln könne, und daß prokaryontische Squalen- und eukaryontische Squalenoxid-Cyclasen phylogenetisch verwandt sind. Möglicherweise stellen die Squalenoxid-Cyclasen eine Weiterentwicklung der evolutionär älteren, primitiveren Squalencyclasen dar (ROHMER et al., 1979; PORALLA, 1982; OURISSON 1989). Die enzymatische Reaktion, die zur C-C-Verknüpfung des Hopengerüstes mit der polyhydroxylierten C_5-Alkyleinheit und damit zur Synthese der C_{35}-Bacteriohopane führt, ist bisher kaum aufgeklärt. Versuche zur Inkorporation radioaktiver Substrate haben ergeben, daß in

R.palustris, R.acidophila, M.organophilum und *Z.mobilis* eine D-Pentose aus dem nicht oxidativen Pentosephosphat-Weg der Vorläufer der Bacteriohopan-Seitenkette ist (FLESCH & ROHMER, 1988; ROHMER et al., 1989). Die Pentose wird über ihr C_5-Kohlenstoffatom an das Hopangerüst gebunden.

Die Biosynthese der Isoprenoide ist auch in bezug auf ihre Genetik in Eukaryonten gut untersucht. Insbesondere für das Modellsystem der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist es in den letzten Jahren gelungen, zum Teil temperatursensitive, Mutanten für die meisten Teilschritt der Isoprenoid-Biosynthese zu isolieren (KARST & LACROUTE, 1977; CHAMBON et al., 1990 und 1991). Ein besonderer Vorteil des Modellsystems Hefe besteht darin, daß *S.cerevisiae* in der Lage ist, exogen angebotene Sterole aus dem Medium aufzunehmen, so daß Mutationen der Isoprenoid-Biosynthese nicht letal sind, wenn die Hefe-Mutanten auf entsprechend supplementiertem Medium wachsen. In den letzten Jahren konnten die Gene folgender Enzyme des Acetoacetat-Wegs der Isoprenoid-Synthese aus *S.cerevisiae* kloniert und charakterisiert werden: HMGCoA-Reductase: BASSON et al., 1986 und 1988; Mevalonat-Kinase: OULMOUDEN & KARST, 1991; Phosphomevalonat-Kinase: TSAY & ROBINSON, 1991; IPP-Isomerase: ANDERSON et al., 1989; FPP-Synthase: ANDERSON et al., 1989; Squalen-Synthase: JENNINGS et al., 1991; FEGUEUR et al., 1991; Squalen-Epoxidase: JANDROSITZ et al, 1991. Das Gen für eine Acetoacetyl-CoA-Thiolase konnte aus *Saccharomyces uvarum* kloniert werden (DEQUIN et al., 1988). Aus *Candida albicans* wurde das Gen einer Squalenoxid-Cyclase kloniert (KELLY et al., 1990), sequenziert und charakterisiert (BUNTEL & GRIFFIN, 1992; ROESSNER et al., 1993).

In Prokaryonten ist die Genetik der Biosynthese einer weiteren Klasse von Terpenoiden, den Carotinoiden, gut untersucht. Die Gene der Carotinoid-Biosynthese konnten bereits aus mehreren Bakterien kloniert und charakterisiert werden (aus *Erwinia herbicola:* PERRY et al., 1986; ARMSTRONG et al., 1990; *Rhodobacter capsulatus*: ARMSTRONG et al., 1989; *Erwinia uredovora*: MISAWA et al., 1990; *Staphylococcus aureus*: WIELAND et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Die Isolierung der Gene der Carotinoid-Biosynthese wurde durch zwei Umstände wesentlich erleichtert: Bei den Produkten der Carotinoid-Biosynthese handelt es sich um farbige Verbindungen, deren Synthese in Bakterien aufgrund der hervorgerufenen Koloniefärbung leicht zu detektieren ist, und in allen bisher untersuchten Fällen liegen die Gene der Carotinoid-Biosynthese in Prokaryonten in Form großer Gencluster vor.

Darüber hinaus sind bisher aber nur wenige Daten verfügbar, die die Genetik der eigentlichen Isoprenoid- und Hopanoid-Biosynthese in Prokaryonten betreffen. Ein Grund hierfür besteht darin, daß bisher kaum Mutanten isoliert werden konnten, die eine Klonierung von Genen der Isoprenoid-Biosynthese durch ein einfaches Selektionssystem, etwa über Komplementation, erlauben würden.

Aminoglycosid-Antibiotika (z.B. Kanamycin) wurden verwendet um Mutanten der Isoprenoid-Biosynthese aus *E.coli* zu isolieren (SHERMAN et al., 1989). Die Selektion beruhte darauf, daß die Aufnahme der Aminoglycosid-Antibiotika energieabhängig ist. Die Resistenz gegenüber

diesen Antibiotika geht oft einher mit einem Defekt der respiratorischen Ubichinone, die über Prenylseitenketten verfügen. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten *E.coli*-Mutanten mit verminderten Aktivitäten von IPP-Isomerase, FPP-Synthase und Prenyltransferase isoliert werden. Aufgrund der relativ hohen verbleibenden Restaktivitäten der Enzyme, waren diese Mutanten aber nicht zur Klonierung der involvierten Gene geeignet.

Bestimmte kationische Detergenzien wie Octodecyltrimethylammoniumchlorid (OTAC) inhibieren in geringen Konzentrationen spezifisch das Wachstum hopanoidhaltiger Bakterien (FLESCH & ROHMER, 1987). Es konnten *Z.mobilis*-Mutanten isoliert werden, die diesem Detergenz gegenüber resistent waren. Weitere Untersuchungen ergaben aber, daß Hopanoid-Gehalt und Zusammensetzung dieser Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert waren (MICHEL et al., 1992).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden zwei Gene der prokaryontischen Isoprenoid- bzw Hopanoid-Biosynthese kloniert und charakterisiert. Es handelte sich dabei um das Gen der FPP-Synthase aus *Escherichia coli* und das der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius*. Die Klonierung des Gens für die FPP-Synthase aus *E.coli* (*ispA*) gelang durch die Komplementation einer *E.coli*-Mutante mit temperatursensitiver FPP-Synthaseaktivität (FUJISAKI et al., 1989 und 1990). Kürzlich gelang die Klonierung einer weiteren thermostabilen bakteriellen FPP-Synthase aus *Bacillus stearothermophilus* (KOYAMA et al., 1993). In beiden Fällen erfolgte die Klonierung der Gene der FPP-Synthasen über ein aufwendiges Screening der Enzymaktivitäten in einer Vielzahl von *E.coli*-Transformanten.

Bei dem Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* handelte es sich um das erste klonierte und charakterisierte Gen eines Enzyms, das spezifisch ist für die bakterielle Hopanoid-Biosynthese (OCHS, Dissertation 1990; OCHS et al., 1992). Der Klonierung dieses Gens ging die Reinigung des Enzyms aus *A.acidocaldarius* voraus (NEUMANN & SIMON, 1986; SECKLER & PORALLA, 1986; OCHS et al., 1990). Durch die Bestimmung der Aminosäuresequenz des Aminoterminus des gereinigten Proteins wurden Sequenzdaten gewonnen, die zur Herstellung von Oligonukleotidsonden verwendet werden konnten. Der Einsatz dieser radioaktiv markierten, degenerierten Oligonukleotide als DNA-Sonde in Hybridisierungsexperimenten mit chromosomaler DNA aus *A.acidocaldarius* führte zur Klonierung des Gens der Squalen-Hopen-Cyclase.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zu der weiteren Aufklärung der prokaryontischen Hopanoid-Biosynthese zu leisten. Dazu sollte zunächst, durch Einsatz des Gens der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* als heterologer Gensonde, das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* kloniert und charakterisiert werden. Durch die Sequenzanalyse von DNA-Bereichen in der Nachbarschaft des Gens der Squalen-Hopen-Cyclase sollte überprüft werden, ob weitere Gene der Hopanoid-Biosynthese, ähnlich wie die prokaryontischen Gene der Carotinoid-Biosynthese, gemeinsam mit dem Gen der Squalen-Hopen-Cyclase in Form eines Genclusters vorliegen. Wenn möglich, sollten so weitere Gene der Hopanoid-Biosynthese kloniert und charakterisiert werden.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firma MERCK AG, Darmstadt verwendet. Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von den Firmen BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim und NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach bezogen. Produkte anderer Hersteller sind der nachfolgenden Liste zu entnehmen.

(1(n)-^{3}H) Farnesylpyrophosphat, Triammoniumsalz	AMERSHAM LIFE SCIENCE, Braunschweig
Farnesylpyrophosphat, Triammoniumsalz	ARC-BIOTREND, Köln
(1,5,9,14,20,24-^{14}C) Squalen	
IPTG (kristallin)	BIOMOL, Hamburg
NADPH (Tetranatriumsalz)	
X-Gal (kristallin)	
Acrylamid	BIORAD, München
Bisacrylamid	
Ampicillin, Natriumsalz	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim
Chloramphenicol, kristallisiert	
Desoxynukleotide	
DIG DNA Labeling and Detection Kit	
Nylonmembran, positiv geladen	
Rinderserumalbumin, Fraktion V	
Tetracyclin, Hydrochlorid	
Harnstoff	BRL, Eggenstein
Qiagen-Säulen	DIAGEN, Düsseldorf
Geneclean Kit	DIANOVA, Hamburg
Bacto-Trypton	DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA
Hefe-Extrakt	
MacConkey Agar Base	
Gas Generating Kit	OXOID Deutschland, Wesel
(4-^{14}C) Isopentenylpyrophosphat, Triammoniumsalz	NEN-DUPONT, Dreieich
(4,8,12,13,17,21,-^{3}H) Squalen	
Biodyne A Transfermembran	PALL BIOSUPPORT DIVISION, Dreieich
AutoRead^{TM} Sequencing Kit	PHARMACIA LKB, Freiburg
Deoxy-CED Phosphoramidite	
NAP^{TM}-10 Säulen	
1-H Tetrazol	
Erase a base Kit	PROMEGA/SERVA, Heidelberg
Taq-Polymerase	
NL17 Membranfilter 0,45 μm	SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel

NY 13N Nytran Transfermembran 0,45 μm	
Nalidixinsäure	SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	
Borsäure	SIGMA CHEMIE, München
Ethidiumbromid	
Laurylsarcosinat	
Trizma Base	

2. Bakterienstämme und Plasmide

Herkunft und Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. Die Bezeichnung der genetischen Marker erfolgte dabei nach BACHMANN & LOW (1980).

Tab.II.1: Verwendete *E.coli*- und *Z.mobilis*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Escherichia coli		
DH5	*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	LOW, 1968
DH5α	*supE44 lacU169(φ80 Δ(lacZ)M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*	HANAHAN, 1983
NM522	*hsd5 Δ(lac-proAB) supE thi F' proAB lacI^q Δ(lacZ)M15*	GOUGH & MURRAY, 1983
JM109	*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' traD36 proAB$^+$ lacI^q Δ(lacZ)M15*	YANISH-PERRON, 1985
S17-1	*thi F$^-$ endAR hsdR* (r^-m^+) *supE* lambda$^-$ *pro* ::RP4-2	SIMON et al., 1983
Zymomonas mobilis		
CP4 (ATCC 31821)	Wildtyp	GONCALVES DE LIMA et al., 1972

Das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase, das als DNA-Sonde eingesetzt wurde, stammt aus dem Gram-positiven thermoacidophilen Bakterium *Alicyclobacillus* (früher: *Bacillus) acidocaldarius* DSM 406 (ATCC 27009) (OCHS et al., 1992).

Tab.II.2: Verwendete und in dieser Arbeit konstruierte Plasmide			
Plasmid	**Größe**	**Relevante Marker**	**Referenz**
pUC18, 19	2,7 kb	*bla lacZα*	VIEIRA & MESSING, 1982
pUCBM20	2,7 kb	*bla lacZα*	BOEHRINGER MANNHEIM
pGEM7Zf$^+$	3,9 kb	*bla lacZα*	PROMEGA, Heidelberg
pSUP104	9,5 kb	*tet cat*	SIMON et al., 1983
pZY507	10,1 kb	*cat lacI^q*	SCHILZ, 1993
pZY601	5,6 kb	*bla shc*	DIESE ARBEIT
pZY602	5,6 kb	*bla shc'*	DIESE ARBEIT
pZY603	14,5 kb	*cat lacI^q*	DIESE ARBEIT
pZY611	7,0 kb	*bla orf3 shc*	DIESE ARBEIT
pZY612	7,0 kb	*bla orf3' shc'*	DIESE ARBEIT
pZY614	7,0 kb	*bla orf1' orf2' orf3'*	DIESE ARBEIT

Kurze Charakterisierung der wichtigsten in dieser Arbeit konstruierten Plasmide:

pZY601: 2,9 kb DraI-Fragment chromosomaler DNA aus *Z.mobilis*, inseriert in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC19, das auf dem DraI-Fragment codierte *shc*-Gen befindet sich in Leserichtung zum *lacZ*-Promotor (Abb.III.4).
pZY602: wie pZY601, das *shc*-Gen liegt aber in entgegengesetzter Orientierung zum *lacZ*-Promotor (Abb.III.4).
pZY603: 4,3 kb HindIII-Fragment chromosomaler DNA aus *Z.mobilis*, inseriert in die HindIII-Schnittstelle des Vektors pZY507, die auf dem HindIII-Fragment codierten Leseraster *shc* und *orf3* befinden sich in Leserichtung zum *lacZ*-Promotor (Abb.III.8).
pZY611: 4,3 kb HindIII-Fragment chromosomaler DNA aus *Z.mobilis*, inseriert in die HindIII-Schnittstelle des Vektors pUC19, die auf dem HindIII-Fragment codierten offenen Leseraster *shc* und *orf3* liegen in Leserichtung zum *lacZ-Promotor* (Abb.III.4).
pZY612: wie pZY611, *shc* und *orf3* befinden sich aber in entgegengesetzter Leserichtung zum *lacZ*-Promotor (Abb.III.4).
pZY614: 4,5 kb SspI-Fragment chromosomaler DNA aus *Z.mobilis*, inseriert in SmaI-Schnittstelle des Vektors pUCBM20, die auf dem SspI-Fragment codierten offenen Leseraster *orf1*, *orf2* und *orf3* liegen in entgegengesetzter Orientierung zum *lacZ*-Promotor.

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht der *E.coli* Stämme erfolgte in:

LB-Vollmedium (LENNOX, 1955)

10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, Aqua dest. ad 1l, pH 7,0.

Zur Unterscheidung von *E.coli*- und *Z.mobilis*-Zellen nach der Filterkreuzung fand folgendes Medium Verwendung:

McConkey Agar (McCONKEY, 1905)

40g McConkey Agar Base der Fa.DIFCO, Aqua dest. ad 1l.
Die Kohlenstoffquelle wurde getrennt autoklaviert und dem autoklavierten Medium mit einer Endkonzentration von 10g/l zugegeben.

Für die Kultivierung von *Z.mobilis* wurde als Komplettmedium eingesetzt:

Vollmedium (VM) (BRINGER et al., 1984)

10g Hefeextrakt, 1g KH_2PO_4, 1g $(NH_4)SO_4$, 0,5g $MgSO_4$, Aqua dest. ad 1l.
Als Kohlenstoffquelle wurden 2-5% Glukose nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Zur Herstellung fester Nährböden wurden den Medien 18g/l Agar zugesetzt.

Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen den Medien zugesetzt:

	E.coli	*Z.mobilis*
Ampicillin	100 µg/ml	--
Chloramphenicol	25 µg/ml	100 µg/ml
Nalidixinsäure	40 µg/ml	40 µg/ml
Tetracyclin	15 µg/ml	100 µg/ml

Die Anzucht der *E.coli*-Kulturen erfolgte aerob, in Flüssigkulturen unter Schütteln, bei 37°C.

Die Kultivierung von *Z.mobilis* wurde in Anaerobgefäßen der Firma BELLCO-GLASS-INC., New Jersey, USA oder in 100ml- bzw. 200ml- Glaskolben (Glasbläserei KFA Jülich GmbH) bei 30°C durchgeführt. Alle Gefäße wurden mit Butylgummi-Stopfen und Aluminiumbördelkappen verschlossen. Kulturen in 100ml- bzw. 200ml- Glaskolben wurden mit sterilen Einwegfiltern (SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel) versehen, um ein Entweichen des gebildeten CO_2 zu ermöglichen. Die Anzucht von *Z.mobilis* auf Agarplatten erfolgte bei 30°C in einem Anaerobentopf (OXOID Anaerobic), der mit Hilfe eines Edelmetallkatalysators (OXOID, Wesel) durch ein H_2/CO_2-Gasgemisch (Oxoid Gas-Generating-Kit) anaerobisiert wurde.

Das Zellwachstum in Flüssigkulturen wurde photometrisch durch Trübungsmessung (SHIMADZU UV-160 Spektralphotometer, SHIMADZU, Düsseldorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Bei einer $OD_{600} \geq 0{,}3$ wurde die Bakterienkultur vor einer weiteren Messung mit Medium verdünnt. Für *E.coli* entspricht einer Absorptionseinheit bei 600 nm eine Zellzahl von ca. $1x10^9$/ml Kultur, für *Z.mobilis* liegt sie bei ca. $2x10^8$/ml.

Zur Stammhaltung von *E.coli*- bzw. *Z.mobilis*- Stämmen wurden glycerinhaltige (70%) Dauerkulturen angelegt, die bei -20 C aufbewahrt wurden.

4. Genetische Methoden

4.1 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (HANAHAN, 1985). Die Zellen wurden portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Zur Transformation von 200 μl kompetenten Zellen wurden 100 bis 1000 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von maximal 20 μl eingesetzt (HANAHAN, 1985).

4.2 Filterkreuzung von *E.coli* und *Z.mobilis*

Da bisher keine effiziente Methode zur Transformation von *Z.mobilis* etabliert werden konnte, wurden geeignete Plasmide in Filterkreuzungen durch Konjugation von *E.coli* nach *Z.mobilis* überführt. Als Donor diente dabei der *E.coli* Stamm S17-1. Dieser Stamm enthält ein chromosomal integriertes Derivat des Plasmids RP4, das die für die Mobilisation eines Plasmids mit der RP4-spezifischen *mob*-Region notwendigen Transfer- (*tra*-) Gene trägt (SIMON et al., 1983). Der *Z.mobilis*-Rezipient wurde über Nacht in Vollmedium angezogen und in der

Filterkreuzung eingesetzt. Eine Übernachtkultur des rekombinanten *E.coli* S17-1 Donorstammes wurde in frisches antibiotikahaltiges LB-Medium überimpft (1:50) und nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6-0,8 zur Konjugation eingesetzt. Donor- und Rezipientenzellen wurden in Vollmedium gewaschen und, auf eine Zellzahl von $2x10^9$/ml konzentriert, in Vollmedium aufgenommen. Zur Konjugation wurden $2x10^8$ Donorzellen mit $1x10^8$ Rezipientenzellen gemischt und auf sterile Membranfilter (NL17, 0,45 μm, ϕ 2,5 cm SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel), die zuvor auf Vollmediumplatten gelegt worden waren, in einem Volumen von 150 μl aufgetropft. Nach 4 h Inkubation bei 30°C wurden die Zellen mit 1 ml Vollmedium von den Filtern in sterile 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße abgeschwemmt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (13000 UpM, 1 min) sedimentiert, in 200 μl Vollmedium resuspendiert und auf VM-Agarplatten mit Nalidixinsäure und dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Da sich *Z.mobilis* gegenüber Nalidixinsäure resistent verhält, konnte diese hier zur Gegenselektion von *E.coli* eingesetzt werden. Nach anaerober Inkubation bei 30°C über einen Zeitraum von 3-6 Tagen wurden die Bakterienkolonien auf Vollmedium-Platten mit Antibiotikum und, zur Unterscheidung von *Z.mobilis* und *E.coli* Kolonien, parallel dazu auf McConkey Agarplatten ausgestrichen. Aufgrund der darin enthaltenen Gallensalze wuchs *Z.mobilis* auf dem McConkey-Nährboden nicht.

5. Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

5.1 Präparation chromosomaler DNA aus *Z.mobilis*

Die Präparation chromosomaler DNA aus *Z.mobilis* wurde nach einer Methode von EDDY et al. (1988) durchgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte dabei durch Lysozymeinwirkung und mehrmaliges aufeinanderfolgendes Einfrieren und Auftauen der Zellen. Zur Entfernung der Proteine folgten mehrere Phenol/Chloroform-Extraktionen. Schließlich konnte die chromosomale DNA nach Zugabe von eiskaltem absolutem Ethanol durch Aufwickeln an einem Glasstäbchen in hochmolekularer Form gewonnen werden.

5.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* im kleinen Maßstab erfolgte durch alkalischen Aufschluß von 2-4 ml Übernachtkulturen (modifiziert nach BIRNBOIM & DOLY, 1979). Die selektiven Übernachtkulturen (LB-Medium mit Antibiotikum) rekombinanter Einzelkolonien wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation sedimentiert (Sigma-Kühlzentrifuge 202 MK, 13000 UpM, 4°C, 2 min). Die Zellen wurden in 100 μl Lösung I (50

mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8) resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Lösung II (1% SDS, 0,3 N NaOH) lysiert. Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurden durch Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, 1,8 M Essigsäure) die chromosomale DNA und Proteine weitgehend gefällt und durch die folgende Zentrifugation (13000 UpM, 4°C, 10 min) vom plasmidhaltigen Überstand getrennt. Zur Entfernung verbliebener Proteine wurde der Überstand einmal mit Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1, v:v:v) und einmal mit Chloroform/IAA (24:1, v:v) extrahiert. Durch Zugabe des 2,5fachen Volumens reinen Ethanols und Zentrifugation (13000 UpM, 4°C, 5 min) erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA. Das Plasmid-Präzipitat wurde einmal in 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed Vac Concentrator der Fa. Bachhofer) getrocknet, in 20 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen, mit 0,5 µl RNase (10 mg/ml) versehen und 30 min bei 37°C inkubiert.
Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde nach einer Methode von SAMBROOK et al., (1989) durch eine LiCl- Fällung der RNA und eine Isopropanolfällung weiter aufgereinigt.
Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E.*coli im größeren Maßstab wurden 50 ml Kulturen wie oben beschrieben in entsprechend größeren Volumen aufgearbeitet oder die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte, gemäß der Vorschrift des Herstellers, mit Hilfe von QIAGEN-pack100 Säulen (DIAGEN, Düsseldorf).

5.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *Z.mobilis*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *Z.mobilis* wurden 10 ml Übernachtkulturen in VM mit Antibiotikazusatz angezogen. Auch hier erfolgte wie im Fall der *E.coli*-Kulturen ein alkalischer Aufschluß (modifiziert nach BIRNBOIM & DOLY, 1979), wobei Lösung I aber zusätzlich frisch gelöstes Lysozym enthielt (10 mg/ml). Die in Lösung I resuspendierten Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Die weitere Präparation entsprach der unter 5.2 beschriebenen Methode, wobei die Phenol/Chloroform/IAA- und Chloroform/IAA-Extraktionen jeweils mindestens zweimal durchgeführt wurden.

6. Techniken zur Rekombination und Analyse von DNA

6.1 Allgemeine rekombinante DNA-Techniken

Allgemeine rekombinante DNA-Techniken, wie Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, gelelektrophoretische Analyse von Restriktionsfragmenten, Auffüllung überstehender DNA-Enden durch Klenow-Polymerase, Behandlung mit alkalischer Phosphatase und Ligation von DNA-Fragmenten wurden entsprechend der Vorschriften von SAMBROOK et al. (1989) bzw. gemäß der Herstellerhinweise zu den verwendeten Enzymen durchgeführt.

6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung definierter DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen wurde die enzymatisch gespaltene DNA bei 50 V Spannung in einem Tris/Acetat-Puffersystem (40 mM Tris/HCl, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden im Gel wurden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht, und die gesuchte DNA-Bande wurde unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit Hilfe von Glasmilch (GENECLEAN-Kit, DIANOVA, Hamburg) direkt aus der geschmolzenen Agarose isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

6.3 Oligonukleotidsynthese und Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion

Die Synthese von Oligonukleotiden, die in Polymerase-Kettenreaktionen (Polymerase Chain Reaction, PCR, MULLIS & FALOONA, 1987) zur Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten als Primermoleküle eingesetzt werden sollten, wurde an einem DNA-Synthese-Gerät (GENE ASSEMBLER) der Firma PHARMACIA-LKB, Freiburg im 0,2 μmol Maßstab unter Abspaltung der letzten Tritylgruppe durchgeführt. Verwendet wurden dabei die Desoxynukleotid-Phosphoramidite sowie die Reagenzien der Firma PHARMACIA sowie Chemikalien der Firma RATHBURN Chemicals Ltd.
Nach der Synthese erfolgte die Abspaltung der Oligonukleotide vom Säulenmaterial durch eine Übernachtinkubation der Säule in konzentriertem Ammoniak (35%) bei 55°C. Zur Aufreinigung und Umpufferung der Oligonukleotide wurde die Ammoniak-Lösung auf eine NAP^{TM}10-Säule (PHARMACIA, Freiburg) gegeben. Die Oligonukleotide wurden mit Aqua dest. oder TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) eluiert und waren nach photometrischer Bestimmung der

DNA-Konzentration durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (Spektralphotometer UV-160 der Firma SHIMADZU) einsatzbereit.
Die PCR-Reaktionen wurden in 50 μl Ansätzen durchgeführt (SAMBROOK et al., 1989), die Standardbedingungen im Ansatz waren dabei:

Menge der eingesetzten Matrizen-DNA		$\approx$ 100 ng
Menge der eingesetzten Primer	jeweils	$\approx$ 50-100 ng
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	jeweils	100 μM
Taq-Polymerase		5 u.

Als Puffer wurde der vom Hersteller der Taq-Polymerase (BOEHRINGER MANNHEIM, PROMEGA/SERVA, Heidelberg) mitgelieferte 10fach konzentrierte Inkubationspuffer verwendet.
Die PCR-Reaktionsansätze wurden mit 50 μl Paraffin-Öl versehen, und die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte im DNA-Incubator I der Firma BIOEXELLENCE/BIOZYM DIAGNOSTIK, Hameln. Es wurden 30 Reaktions-Zyklen mit folgenden Temperaturen und Inkubationszeiten durchgeführt:

Denaturierung der Matrizen-DNA	1,8 min	94°C
Anlagerung der Primermoleküle	1,5 min	45°C
Taq-Polymerase-Reaktion	3 min	70°C.

Zur Kontrolle der Reaktionsprodukte wurde jeweils 1/10 des Reaktionsansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

6.4 DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP

Zur Herstellung von DNA-Sonden für DNA-DNA-Hybridisierungs-Experimente nach SOUTHERN (1975) wurden DNA-Fragmente nach der "random primed"- Methode (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983) durch den Einbau von Digoxigenin-gekoppeltem dUTP markiert. Dabei wurden die "Dig-DNA Labeling and Detection-Kits" der Firma BOEHRINGER MANNHEIM verwendet. Die Markierung der gereinigten, frisch denaturierten DNA-Fragmente ($\approx$1 μg pro Markierungsansatz) erfolgte gemäß der Vorschrift der Firma BOEHRINGER. Die Markierungsansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.
Alternativ zu dieser Methode wurden PCR-Amplifikationsprodukte direkt während der PCR-Reaktion durch den Einbau von Dig-dUTP markiert. Dazu wurde die dTTP-Konzentration des unter 6.3 beschriebenem PCR-Reaktionsansatzes von 100 μm auf 50 μM gesenkt und Dig-dUTP in einer Konzentration von 100 μM hinzugefügt.

6.5 DNA-DNA-Hybridisierung nach SOUTHERN (1975)

Zum Nachweis spezifischer DNA-Banden auf Agarose-Gelen, wurde die mit Restriktionsendonucleasen gespaltene DNA (1-5 μg) auf 0,8%igen Agarosegelen in TBE-Puffer (89 mM Tris/HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8) elektrophoretisch aufgetrennt. Das DNA-Bandenmuster wurde entweder mit der von SOUTHERN (1975) entwickelten Kapillartransfer-Methode über Nacht oder durch Vakuum-Transfer (Vakuum-Blot Apparatur LKB 2016 VacuGene der Firma PHARMACIA/LKB, Freiburg) innerhalb von 3 h auf eine Nylonmembran (Biodyne A PALL, Dreieich oder positiv geladene Nylonmembran der Firma BOEHRINGER MANNHEIM) übertragen und durch eine 3minütige UV-Belichtung fixiert.
Die Hybridisierung der Membran mit den Dig-dUTP markierten DNA-Sonden in formamidhaltigem Hybridisierungspuffer, die nachfolgenden Waschschritte, sowie die Detektion der Hybride wurden wie von BOEHRINGER MANNHEIM beschrieben durchgeführt.
Zur Einstellung von Hybridisierungsbedingungen unterschiedlicher Stringenz wurden sowohl die Formamidkonzentration in der Hybridisierungslösung (25-50%) als auch die Hybridisierungstemperatur variiert (35° - 42°C).

Hybridisierungslösung: 5 x SSC, 25-50% Formamid, 0,02% SDS,
0,1% N-Laurylsarkosin, 2% Blocking-Reagenz

Die Detektion der Hybride erfolgte durch einen Phosphatase-gekoppelten anti-Dig-Antikörper über Chemiluminiszenz mit AMPPD (3-(2'-Spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetan) als Substrat.

6.6 Koloniehybridisierung

Die Koloniehybridisierung ist eine Methode zur Überprüfung einer größeren Anzahl von rekombinanten Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines bestimmten DNA-Fragmentes (GRUNSTEIN & HOGNESS, 1975). Zunächst wurden jeweils 100 rekombinante *E.coli*-Klone sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle auf eine antibiotikahaltige LB-Platte in reproduzierbarem Muster ausgestrichen. Nach Anwachsen der Klone über Nacht wurde vorsichtig eine Nylonmembran (Biodyne A, PALL, Dreieich) auf die Agaroberfläche aufgebracht und leicht angedrückt, so daß sich nach Abziehen der Membran Zellmaterial aller angewachsenen Kolonien auf der Membran befanden. Es folgte ein alkalischer Aufschluß der Zellen, indem die Membran mit dem Zellmaterial nach oben für 5 min auf ein mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl getränktes Whatman 3MM™-Papier gelegt wurde. Danach wurde die Membran kurz auf frisches Whatman-Papier gelegt, um überschüssige Denaturierungslösung zu entfernen. Anschließend folgte eine Neutralisierung des Filters auf einem mit 1 M Tris/HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCL getränktem

Whatman-Papier. Nach 5 min wurde die Membran auf frischem Whatman-Papier luftgetrocknet und 3 min bei UV-Belichtung fixiert. Nach der Fixierung wurde nicht gebundenes Zellmaterial durch Waschen für 3 h in 3 x SSC, 0,1% SDS bei 50°C entfernt. Der Filter wurde in dieser Form, wie unter 6.5 beschrieben, zur Hybridisierung mit Dig-dUTP-markierten DNA-Sonden eingesetzt.

6.7 Erstellung von partiellen Plasmid-Genbanken von *Z.mobilis* in *E.coli*

Zur Klonierung von chromosomalen DNA-Fragmenten aus *Z.mobilis,* die in vorhergehenden Southern-Blot Hybridisierungen Signale hervorgerufen hatten, wurden partielle Genbanken von *Z.mobilis* in *E.coli* angelegt. Dazu wurde die mit Restriktionsenzymen gespaltene chromosomale DNA aus *Z.mobilis* auf einem präparativen Agarosegel (siehe 6.2) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente im gesuchten Größenbereich wurden ausgeschnitten und präpariert (siehe 6.2). Die so isolierten chromosomalen DNA-Fragmente wurden in Ligationsreaktionen mit dem linearisierten und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektorplasmid pUC19 (pUC18, pUCBM20) eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen verwendet. Dabei wurden *E.coli*-Wirtsstämme gewählt, die eine Selektion rekombinanter Klone mit und ohne Insertion im Vektorplasmid aufgrund des auf dem Vektor vorhandenen Gens *lac*Zα (ß-Galactosidase) ermöglichten (NM522, DH5α).
Die Zellen wurden auf ampicillinhaltigen LB-Platten, die zusätzlich X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-galactopyranosid, 2%ig in Dimethylformamid, jeweils 50 μl pro LB-Platte) enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag konnten weiße und blaue Kolonien unterschieden werden. Die weißen Kolonien exprimierten keine funktionsfähige ß-Galactosidase, so daß es nicht zur Spaltung des Substrates X-Gal und damit zur Blaufärbung der Kolonien kam. Diese Kolonien enthielten in den meisten Fällen ein Plasmid mit einer Insertion. Die weißen Kolonien wurden auf selektiven LB-Platten ausgestrichen und nachfolgend durch Präparation der Plasmid-DNA und Southern Hybridisierung bzw. durch Koloniehybridisierung auf das Vorhandensein des gesuchten DNA-Fragmentes überprüft.

6.8 Erstellung von Deletionsklonen zur Sequenzierung

Die zur Sequenzierung verwendeten Deletionsklone wurden mit der von HENIKOFF (1984) entwickelten Methode durch Verkürzung linearisierter Plasmide mit Hilfe des Enzyms Exonuklease III hergestellt. Dabei wurde das "Erase a base"-System der Firma PROMEGA, Heidelberg entsprechend der Herstellervorschrift verwendet.

6.9 DNA-Sequenzierung nach SANGER mit dem A.L.F. DNA-Sequencer

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode von SANGER et al., (1977) unter Einsatz von T7-Polymerase (TABOR & RICHARDSON, 1987). Sie wurde mit dem "Automated Laser Fluorescent (A.L.F) DNA-Sequencer" der Firma PHARMACIA/LKB, Freiburg durchgeführt (ANSORGE, et al., 1986). Dabei erfolgte die Markierung der synthetisierten DNA-Moleküle durch die Verwendung von Primermolekülen, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die Produkte der T7-Polymerase-Reaktion wurden wie beim konventionellen Verfahren im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei erfolgte beim Durchtritt der Moleküle an einer bestimmten Stelle des Gels eine Anregung des Fluoreszensfarbstoffs durch einen Laserstrahl, wobei die Moleküle über Dioden detektiert wurden. Die Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe eines speziellen Computerprogrammes der Firma PHARMACIA (A.L.F.-Manager V2.21).

Die Sequenzreaktionen wurden mit dem "AutoRead™Sequencing Kit" der Firma PHARMACIA/LKB mit den darin enthaltenen Fluoreszenzprimern (M13 sequencing- und M13 reverse sequencing primer) durchgeführt. In jedem Reaktionsansatz wurde etwa 5 µg gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt.

Reaktionsschema:

(bis auf 1 N NaOH und 1 N HCl alle Lösungen aus "AutoRead™- Sequencing"-Kit)

- 5 µg Plasmid-DNA in 8 µl H_2O, Zugabe von 2 µl Primer und 1 µl 1 N NaOH, 5 min 70°C
- Zugabe von 2 µl Annealing-Puffer, 3 µl DMSO, 1 µl 1 N HCl, 15 min 37°C
- Zugabe von 2 µl Extension-Puffer, 2 µl T7 DNA-Polymerase (verdünnt auf 1,5 u/µl)
- Zugabe von jeweils 4,5 µl des Reaktionsansatzes zu 2,5 µl der vier auf 37°C vorgewärmten Nukleotid-Mixe, 5 min 37°C
- nach exakt 5 min Inkubation Abstoppen der Reaktionen durch Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer
- Reaktionansätze konnten bei -20°C aufbewahrt werden, unmittelbar vor dem Auftragen auf das Sequenzgel erfolgte eine Denaturierung der Proben für 5 min bei 80°C

Sequenzgel:	33,6 g	Harnstoff (BRL, Eggenstein)
	24 ml	Acrylamidlösung (18 g Acrylamid, 1 g Bis-acrylamid, ad 100 ml Aqua bidest.)
	25 ml	Aqua bidest.
	4,8 ml	10xTBE
	280 µl	Ammoniumpersulfat (10%ig) (PHARMACIA)
	70 µl	TEMED (PHARMACIA, Freiburg)
10 x TBE:	121,14 g	Trizma Base (SIGMA, München)
	51,32 g	Borsäure (SIGMA, München)
	3,72 g	EDTA (SIGMA, München)
		ad 1000 ml Aqua bidest.

Laufpuffer: 0,6 x TBE

Zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen fanden folgende Computerprogramme Verwendung: "MicroGenie 7.0" der Firma Beckman, Palo Alto, USA, und "PC-Gene, release 6.60" der Firma IntelliGenetics Inc. Genf, Schweiz. Zum Zeichnen von Plasmid- und Restriktionskarten wurden die Programme "Clone 3" und "Enhance" der Firma Scientific & Educational Software, State Line, USA verwendet. Bei den Datenbank-Recherchen in der EMBL-Datenbank/Heidelberg wurde das Programm HUSAR verwendet.

7. Nachweis von Enzymaktivitäten

7.1 Herstellung von lyophilisierten Zellen

Zum Nachweis von Enzymaktivitäten der Isoprenoid-Biosynthese in *E.coli* und *Z.mobilis* wurden lyophilisierte Zellen und zellfreie Rohextrakte eingesetzt. Zur Herstellung lyophilisierter Zellen wurden *E.coli* und *Z.mobilis* Kulturen in LB- bzw. Vollmedium (bei rekombinanten Stämmen mit Antibiotikazusatz) bis zu einer $OD_{600} \approx$ 1-2 angezogen. Die Zellen wurden geerntet (BECKMANN GPKR-Zentrifuge, 3700 UpM, 4°C, 15 min), einmal in K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 8) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation auf eine $OD_{600} \approx$ 200 konzentriert. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert (jeweils 70 μl) und mindestens 30 min bei -70°C aufbewahrt. Die gefrorenen Zellen wurden in einer Gefriertrocknungsanlage (LYOVAC GT2 LEYBOLD, HERAEUS, Köln) getrocknet und bis zum Einsatz im Enzymtest bei -70°C aufbewahrt.

7.2 Herstellung von zellfreien Rohextrakten

Zur Herstellung zellfreier Rohextrakte wurde ein X-Press-Aufschluß der *Z.mobilis*- und *E.coli*-Zellen durchgeführt. Die *Z.mobilis*- bzw. *E.coli*-Kulturen (200 ml Vollmedium bzw. 100 ml LB-Medium, bei rekombinanten Klonen mit Antibiotikazusatz) wurden dazu bis zu einer $OD_{600} \approx$ 1,5-2 angezogen. Bei rekombinanten Stämmen erfolgten die letzten 3 h des Wachstums nach Zugabe von 1 mM IPTG im Medium. Die Zellen wurden geerntet (Beckmann-Zentrifuge, 3700 UpM, 4°C, 15 min), in K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5, 14 mM Mercaptoethanol, Puffer vor Zugabe des Mercaptoethanols 5 min mit Argon begast) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 1 ml des Phosphatpuffers aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einen auf -20°C vorgekühlten X-Press-Zylinder überführt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Die gefrorene Zellsuspension wurde viermal durch die Öffnung des X-Press-Zylinders gepreßt (X-Presse ENERPAC RD2510 BACHOFER, Reutlingen), wobei die Bakterienzellen durch die auftretenden Scherkräfte aufgebrochen wurden. Nach dem Aufschluß wurde der Rohextrakt in kleine Bechergläser überführt, aufgetaut und zur Herabsetzung der Viskosität mit 4 μl DNaseI

versehen. Der Rohextrakt wurde in dieser Form nach der Bestimmung der Proteinkonzentration im Enzymtest eingesetzt. Aliquotierter Rohextrakt wurde bei -70°C aufbewahrt.
Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt, wobei Rinderserumalbumin als Eichsubstanz diente.

7.3 Nachweis der Farnesylpyrophosphat-Synthaseaktivität

Der Nachweis der Farnesylpyrophosphat-Synthaseaktivität erfolgte durch die Bestimmug des Umsatzes von ^{14}C-Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) zu Geranylpyrophosphat (GPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) in lyophilisierten *E.coli*- und *Z.mobilis*- Zellen bzw. in zellfreien Rohextrakten (modifiziert nach CHAMBON et al., 1990). Zu den lyophilisierten Zellen (siehe 7.1) wurden 5 μl ^{14}C-IPP (50 nCi/μl, Konzentration im Testansatz 50 μM) und 3 μl DMAPP (100 μM im Testansatz) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit 92 μl K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 8) auf 100 μl aufgefüllt und mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Die Durchführung des Enzymtestes mit Rohextrakten erfolgte unter gleichen Bedingungen mit einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml im Reaktionsansatz. Zur Überführung der Prenylphosphate in die entsprechenden Prenylalkohole wurden die Reaktionsansätze mit 20-30 Einheiten alkalischer Phosphatase weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Reaktionsansätze mit dem doppelten Volumen Hexan extrahiert. Die Substrate und Produkte in der organischen Phase wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und identifiziert (siehe 7.6).

7.4 Nachweis der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität

Die Aktivitätsbestimmung der Squalen-Hopen-Cyclase beruhte auf dem Test von SECKLER & PORALLA (1986).

Squalen-Lösung: 500 μM Squalen
0,1 % Triton X-100
100 mM Na-Citrat pH6
(Lösung im Ultraschallbad emulgiert)

Reaktionsansatz: 25 μl Squalen-Lösung
200 nCi ^{3}H-Squalen (spez. Aktivität 16,2 Ci/mmol)
25 μl K-Phosphatpuffer (1 M, pH 5,64, 5% CHAPS)
0-50 μl Rohextrakt (3 mg/ml Protein im Testansatz)
ad 250 μl Aqua bidest.

Die Inkubation erfolgte für 1-4 h bei 30°C.
Die Reaktionsansätze wurden mit 500 μl Hexan/Isopropanol (3:2, v/v) extrahiert. Die Isoprenoide in der organischen Phase wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und identifiziert (7.6).
Nach der Auswertung der DC-Platten mit Hilfe eines DC-Radioscanners (7.6) erfolgte die Berechnung der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivitäten durch die Integration der durch den Radioscanner ermittelten Peakflächen des Substrates (Squalen) und des Produktes (Hopen). Der Berechnung der Umsätze wurde eine Ausgangskonzentration des Squalens von 50 μM im Testansatz zugrundegelegt. Die Angabe der Enzymaktivitäten erfolgt in U (units). Durch ein U werden 1 μmol Substrat pro Minute umgesetzt.

7.5 Nachweis der Squalen-Synthaseaktivität

Der Nachweis der Squalen-Synthaseaktivität beruht auf der Methode von AGNEW (1986).

Reaktionsansatz (200 μl): 50 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,5)
10 mM $MgCl_2$
5 mM NADPH
25 μM FPP
1 μCi ^{3}H-FPP (spez Aktivität 18 mCi/mmol)
Rohextrakt (3 mg/ml Protein im Testansatz)

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 30°C.
Nach Zugabe von 20 Einheiten alkalischer Phosphatase wurden die Reaktionsansätze für weitere 2h bei 37°C inkubiert. Nach Extraktion mit 400 μl Hexan/Isopropanol (3:2, v/v) wurde die organische Phase auf Kieselgel-DC-Platten aufgetragen (7.6).

7.6 Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Identifizierung von Produkten und Substraten

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Produkte und Substrate erfolgte wie von OCHS (Dissertation, 1990) beschrieben. Die organischen Phasen aus den Enzymtestansätzen wurden auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Schichtdicke 0,25 mm, MERCK, Darmstadt) aufgetragen. Zur Identifizierung der Substanzen wurden zusätzlich Referenzsubstanzen aufgetragen. Die DC-Platten wurden etwa 7 cm in Chloroform und nach Trocknen etwa 16 cm in Hexan entwickelt. Die Platten wurden mit Hilfe eines DC-Radioscanners (Modell Berthold LB 2821 der Firma Berthold, Wildbad) ausgewertet. Um markierte Referenz-Substanzen sichtbar zu machen, wurden die Platten nach der Messung auf dem Radioscanner in Jod-Dampf angefärbt.

7.7 Produktnachweis durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Zur eindeutigen Identifizierung des Substrats- und Produktpeaks in den Tests zum Nachweis der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität wurden zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennungen durchgeführt. Wegen der besseren und schnelleren autoradiographischen Detektierbarkeit von ^{14}C im Vergleich zu ^{3}H, wurde in diesen Versuchen ^{14}C-Squalen als Substrat eingesetzt. Der Extrakt eines Reaktionsansatzes wurde punktförmig auf eine DC-Platte aufgetragen. Die DC-Platte wurde dann zunächst in Chloroform und Hexan entwickelt. Nach dem Trocknen wurde die Platte um 90° gedreht und in Ethylessigester/Hexan (1:1, v/v) entwickelt. In beiden Dimensionen wurden als Standards Squalen, Hopen und der Extrakt des Enzymtests mitgeführt. Nach dem Trocknen der DC-Platte wurde ein Röntgenfilm (X-OMAT, KODAK) aufgelegt und 6 Tage bei -70°C exponiert.

8. Immunologische Methoden

8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die Proteine der Rohextrakte der verschiedenen *Z.mobilis* und *E.coli*- Stämme wurden elektrophoretisch auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (LÄMMLI, 1970). Vor dem Auftragen wurden die Proteine (50 µg/Spur) 5 min bei 100°C in Probenpuffer aufgekocht. Als Puffersystem für die Elektrophorese diente Tris-Glycin (50 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder in 0,1% Coomassie Brilliant Blue, 7,5% Eisessig, 30% Methanol unter leichtem Schütteln angefärbt, oder die Proteinbanden wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert ("Immuno-Blot", 8.2). Als

Molekulargewichtsstandards wurden "COMBITHEK Eichproteine (BOEHRINGER MANNHEIM) oder "prestained Molecular Weight Standard Mixture" (SIGMA, München) eingesetzt.

8.2 "Immuno-Blot" der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine

Zur Überprüfung der Frage, ob die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* mit Antikörpern gegen das Enzym aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* kreuzreagiert, wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (NY 13N Nytran Transfermembran, SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel) übertragen. Der Transfer auf die Nitrocellulose und der Antikörpernachweis wurden nach der Methode von TOWBIN et al., (1979) durchgeführt.
Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose erfolgte in Tris-Glycin Puffer (25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM Glycin) bei 30 V für 3h (TRANS-BLOT^{TM}-CELL, BIORAD). Zur Sättigung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen auf der Nitrocellulose wurde diese unter leichtem Schütteln 1 h bei 37°C in Lösung I (3% BSA Fraktion V, 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,9% NaCl) inkubiert. Die Antikörper gegen die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* (aus Kaninchen), die von der Arbeitsgruppe von Prof. Poralla (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt worden waren, wurden 1:1000 in Lösung II (0,3% BSA Fraktion V, 10 mM Tris/HCl pH 7,7; 0,9% NaCl, 0,1% TWEEN 20) verdünnt. Die Membran wurde 1h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln in dieser Antikörperlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 30 min) mit Lösung II wurde die Membran 1h bei 37°C mit Peroxidase-gekoppeltem Anti-Kaninchen IgG (1:1000 in Lösung II) inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen (je 30 min) in Lösung II entfernt. Gebundene Antikörper wurden durch Zugabe von 100 ml Lösung III (3 mM α-Chloronaphthol, 20% Ethanol; 0,15% Perhydrol) nachgewiesen.

III. Ergebnisse

1. Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung des Gens für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis*

1.1 DNA-DNA Hybridisierungsexperimente mit dem Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* als heterologer Gensonde

Die heterologe Gensonde, die für die DNA-DNA-Hybridisierungsexperimente zur Klonierung des Gens für die Squalen-Hopen-Cyclase (SHC) aus *Z.mobilis* verwendet wurde, wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Poralla (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um ein 640 bp großes PCR-Fragment aus dem Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase des Gram-positiven, thermoacidophilen Bakteriums *Alicyclobacillus acidocaldarius* (OCHS et al., 1992). Das Fragment stammte aus dem mittleren Bereich des Gens. Es umfaßte die codierende Region für die Aminosäuren 242-454 des 627 Aminosäuren codierenden Gens. Dieses Fragment wurde durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP markiert und in Hybridisierungsexperimenten mit chromosomaler DNA aus *Z.mobilis*, die zuvor mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten worden war, als DNA-Sonde eingesetzt. Unter Hybridisierungsbedingungen relativ hoher Stringenz (50% Formamid im Hybridisierungspuffer, 40°C Hybridisierungstemperatur) konnten zunächst keine DNA-Hybride detektiert werden. Bei mittleren Stringenzbedingungen (30-40% Formamid, 40°C) traten jedoch deutliche und reproduzierbare Hybridisierungssignale mit der chromosomalen DNA aus *Z.mobilis* auf (Abb.III.1). Aufgrund der guten Qualität der erzielten Signale wurden im Anschluß an diese Hybridisierungsexperimente Versuche zur Klonierung von signalerzeugenden DNA-Fragmenten aus *Z.mobilis* unternommen.

1.2 Klonierung chromosomaler DNA-Fragmente aus *Z.mobilis*, die mit der Gensonde aus *A.acidocaldarius* Hybride bilden

In den Hybridisierungsexperimenten trat auf der HindIII-gespaltenen DNA aus *Z.mobilis* ein Signal in der Größenordnung von etwa 4,3 kb auf. Im Fall der DraI-gespaltenen DNA entstanden zwei kleinere Signale in der Größe von etwa 3 und 3,5 kb. Zur Klonierung dieser Fragmente wurden zwei partielle Genbanken im Vektor pUC19 angelegt. Eine der Genbanken enthielt HindIII-Fragmente in dem mit HindIII linearisierten Vektor im Größenbereich von 3,5-4,5 kb. In der zweiten partiellen Genbank wurden DraI-Fragmente in der Größe von 2,5-4 kb in den mit SmaI linearisierten Vektor inseriert. Da die DNA-Hybride mit der heterologen Gensonde aus *A.acidocaldarius* in den Southern Hybridisierungen erst bei relativ milden

Hybridisierungsbedingungen auftraten, schien die Methode der Koloniefilter-Hybridisierung für die Detektion der gesuchten Fragmente nicht erfolgversprechend.

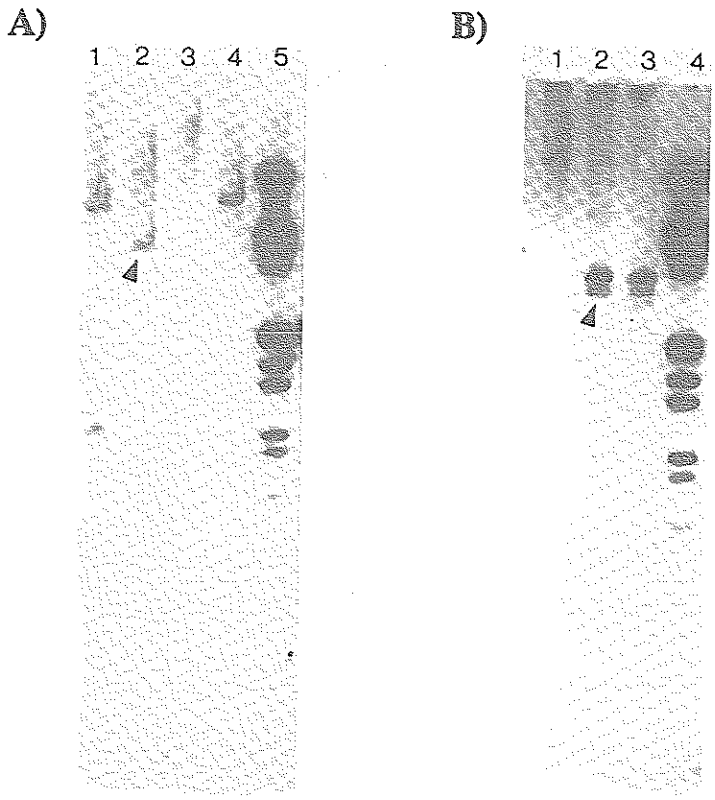


Abb. III.1: Southern Hybridisierung mit der SHC-Gensonde aus *A.acidocaldarius* und chromosomaler DNA von *Z.mobilis* CP4.
A: (1) EcoRI, (2) HindIII, (3) PstI, (4) PvuII, (5) Molekulargewichtsstandard λ/HindIII+EcoRI mit Digoxigenin markiert.
B: (1) KpnI, (2) DraI, (3) DraI+PvuII, (4) λ/EcoRI+HindIII.
Mit Pfeilen markiert sind die Fragmente, die kloniert wurden.

Bei dieser Methode tritt stets eine unspezifische Hintergrundfärbung der Kolonien auf, so daß ausschließlich starke Signale, die meist nur durch homologe Gensonden erzielt werden, detektiert werden können. Daher wurde eine etwas aufwendigere Methodik angewandt. Jeweils zehn verschiedene Klone der DraI-Genbank wurden gemeinsam über Nacht für eine Präparation der Plasmid-DNA angezogen. Diese Plasmid-DNA-Präparationen wurden mit EcoRI + HindIII gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Der überprüfte Anteil der DraI-Genbank umfaßte 640 Klone. Die Southern Blots wurden anschließend, wie unter "Material und Methoden" beschrieben, in Hybridisierungsexperimenten mit der SHC-Gensonde aus *A.acidocaldarius* unter den geeigneten milden Bedingungen (40% Formamid, 40°C) eingesetzt. In diesen Hybridisierungen wurden mehrere Plasmid-Gruppen detektiert, in denen ein Signal auftrat. Anschließend wurden Plasmid-DNA-Präparationen von den einzelnen Klonen von vier der in Frage kommenden Plasmidgruppen der DraI-Genbank durchgeführt. Die

Wiederholung des Hybridisierungsexperimentes mit den Plasmidpräparationen der einzelnen Klone führte schließlich zur Identifizierung von vier DraI-Klonen, die ein deutliches Hybridisierungssignal erzeugten (Abb.III.2). Die vier Klone der DraI-Bank enthielten ein 2,9 kb großes DraI-Fragment.

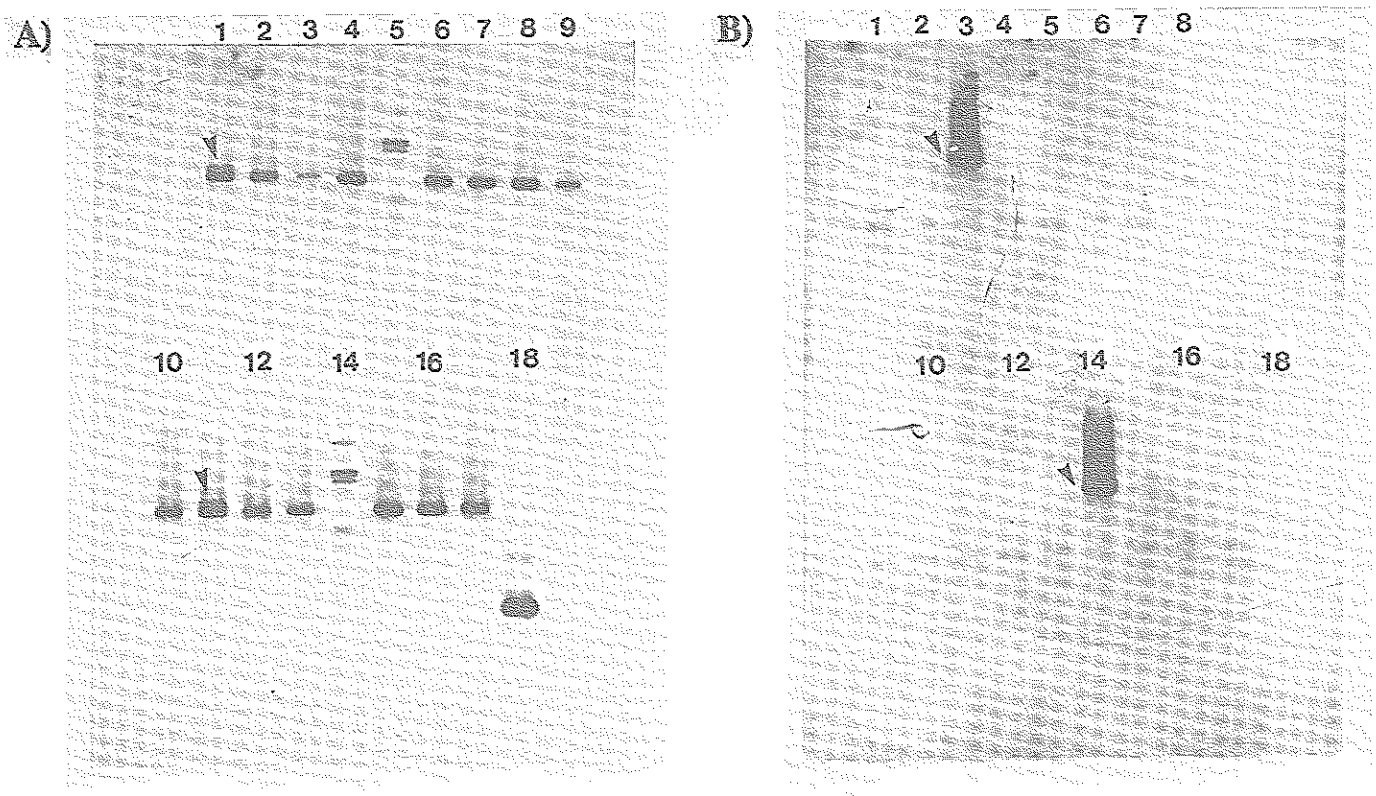


Abb.III.2: Southern Hybridisierungen mit chromosomaler DNA von *Z.mobilis* CP4.
A: Hybridisierung der SHC-Gensonde aus *A.acidocaldarius* auf Klone der partiellen DraI-Genbank (mit EcoRI+HindIII gespalten); (5) und (14) Molekulargewichtsstandards λ/EcoRI+HindIII, (18) PCR-Fragment, das als Gensonde eingesetzt wurde, die pUC19-Vektorbanden erzeugten unter den wenig stringenten Hybridisierungsbedingungen stets ein Signal. Zusätzliche Signale, die durch chromosomale CP4/DraI-Fragmente erzeugt wurden (1 und 11), sind durch Pfeile markiert.
B: Hybridisierung mit dem 2,9 kb DraI-Fragment aus *Z.mobilis* als DNA-Sonde mit Klonen der partiellen HindIII-Genbank (mit HindIII gespalten); jede Spur enthält bis zu zehn Klone, (8) und (18) Molekulargewichtsstandards λ/EcoRI+HindIII (nicht mit Digoxigenin markiert), mit Pfeilen markiert sind zwei 4,3 kb große HindIII-Fragmente (3 und 14), die Signale erzeugten.

Ein signalerzeugendes DraI-Fragment in der Größe von 3,5 kb konnte nicht isoliert werden. Wahrscheinlich beruhte das Auftreten eines Signals dieser Größe auf unvollständig gespaltenen DraI-Fragmenten. Da das 4,3 kb umfassende HindIII-Fragment in einem ersten Versuch nicht mit der Gensonde aus *A.acidocaldarius* kloniert werden konnte, wurde das klonierte DraI-Fragment isoliert, mit Digoxigenin markiert und als homologe DNA-Sonde in Southern Hybridisierungen mit den Klonen der HindIII-Genbank eingesetzt. Es wurden 840 Klone der HindIII-Genbank untersucht. Zwei Klone wurden identifiziert, die ein starkes Signal mit dem DraI-Fragment

erzeugten (Abb.III.2). Die beiden HindIII-Klone enthielten ein etwa 4,3 kb großes HindIII-Fragment. Die Restriktionskartierung der klonierten Fragmente (Abb.III.3) zeigte, daß das signalerzeugende 4,3 kb HindIII-Fragment offensichtlich das 2,9 kb große DraI-Fragment vollständig enthielt. Dieses Ergebnis wurde durch die Nukleotid-Sequenzdaten bestätigt.

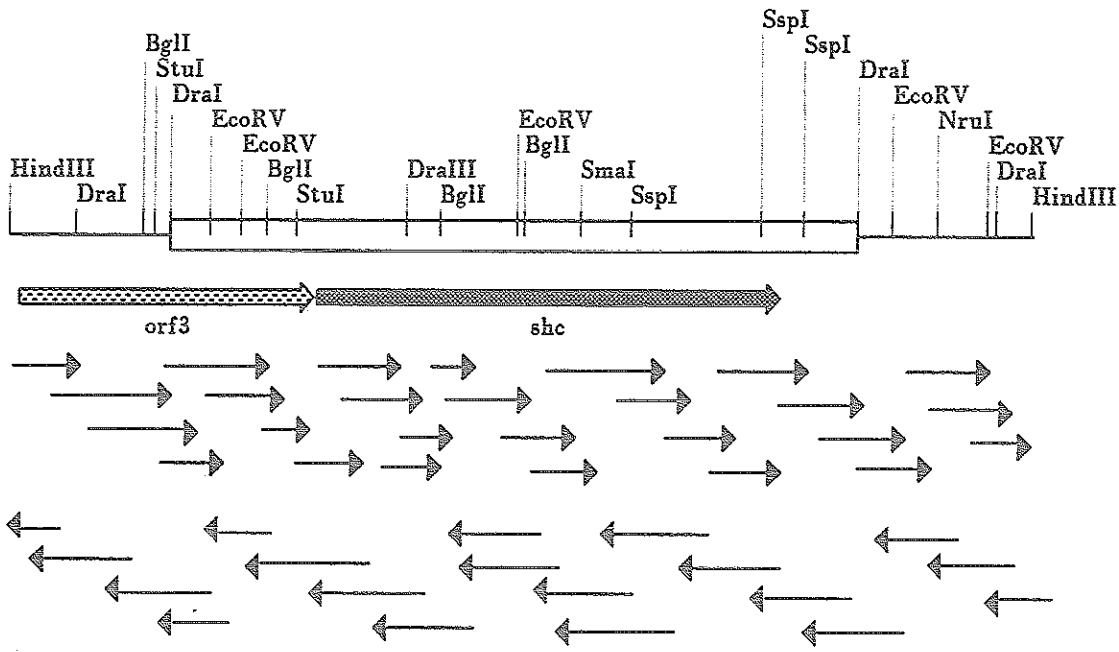


Abb.III.3: Restriktionskarte des chromosomalen HindIII-Fragmentes aus *Z.mobilis*, das in Hybridisierungsexperimenten mit der DNA-Sonde aus dem Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* ein Signal erzeugte. Angegeben sind nur die Schnittstellen der wichtigsten Restriktionsenzyme. Das HindIII-Fragment umfaßt 4,3 kb. Durch den Rahmen ist die Lage des zunächst klonierten, ebenfalls signalerzeugenden, 2,9 kb großen DraI-Fragmentes gekennzeichnet. Die Pfeile stellen die Sequenzierungsstrategie dar. Angegeben ist auch die Lage der durch die Sequenzierung identifizierten offenen Leseraster *orf3* und *shc*.

1.3 Analyse der Nukleotidsequenz des klonierten HindIII-Fragmentes aus *Z.mobilis*

Grundlage der Sequenzierung des klonierten DraI- und HindIII-Fragmentes waren die Plasmide pZY601, pZY602 sowie pZY611 und pZY612 (Abb.III.4). Es handelt sich in allen Fällen um Derivate des Vektors pUC19. Das gesamte 4347 bp umfassende klonierte HindIII-Fragment wurde doppelsträngig sequenziert. Dabei wurden durch ExonukleaseIII-Behandlung verkürzte Plasmide und Plasmide, die subklonierte Restriktionsfragmente enthielten, verwendet. Die Sequenzierungsstrategie ist der Abb.III.3 zu entnehmen. Die Bestimmung der DNA-Sequenz des HindIII-Fragmentes ergab, daß es zwei große, offene Leseraster umfaßte (Abb.III.5). Das erste

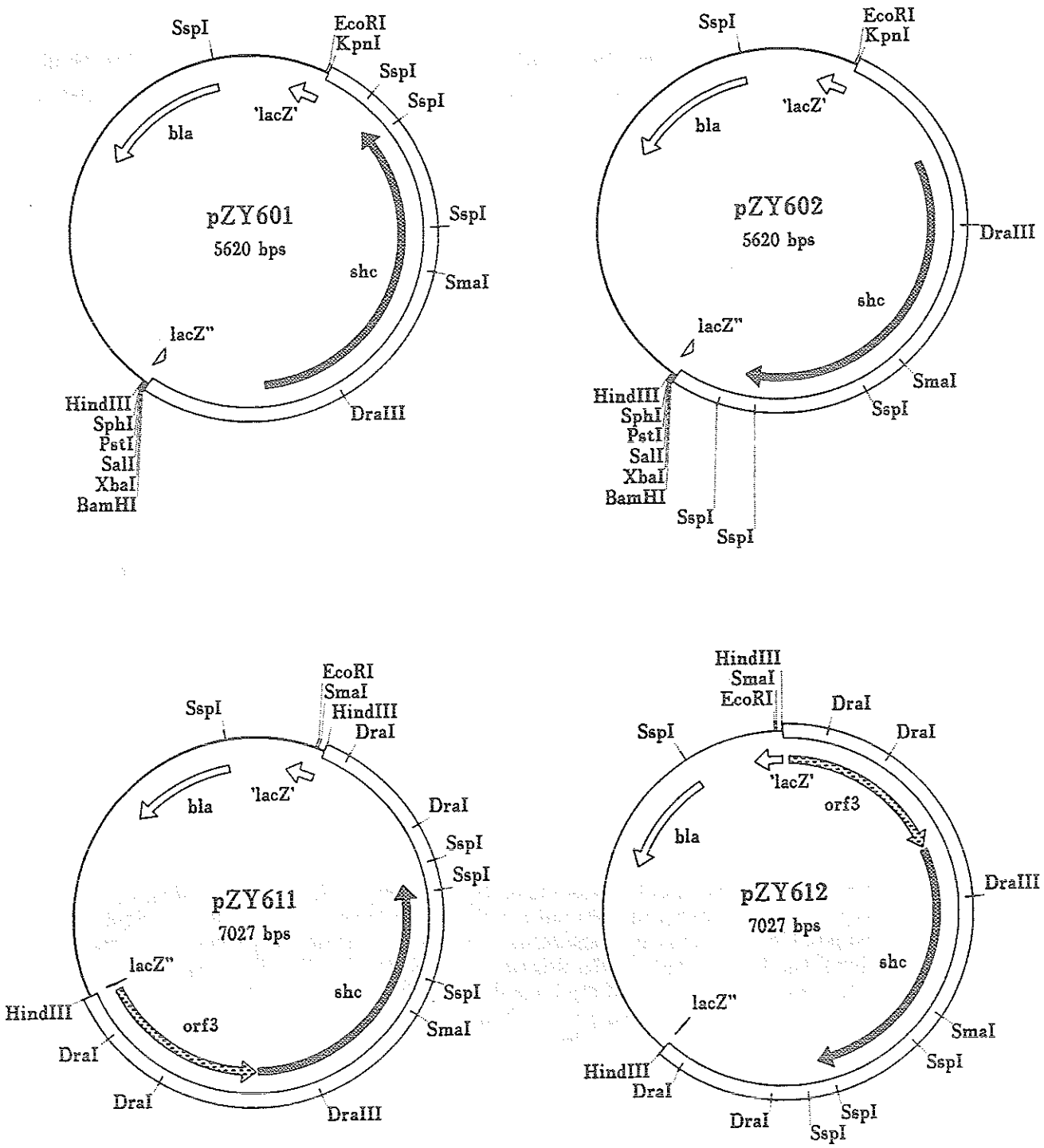


Abb.III.4: Plasmidkarten der Plasmide pZY601, pZY602 sowie pZY611 und pZY612. Die Plasmide enthalten die chromosomalen Restriktionsfragmente aus *Z.mobilis*, die in den Hybridisierungsexperimenten mit der DNA-Sonde aus dem Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* Signale erzeugten. pZY601 und pZY602 enthalten das 2,9 kb DraI-Fragment, pZY611 und pZY612 das 4,3 kb HindIII-Fragment, jeweils in beiden möglichen Orientierungen zum *lacZ*-Promotor. Wiedergegeben sind nur die Schnittstellen der wichtigsten Restriktionsenzyme. Die Lage der durch die Sequenzierung lokalisierten offenen Leseraster *orf3* und *shc* auf den Fragmenten ist durch Pfeile markiert; *bla*, Gen für ß-Lactamase; *lacZ*, Gen für ß-Galactosidase.

Leseraster, es erhielt die Bezeichnung *orf3*, beginnt mit einem ATG/Met-Startcodon in Position 45 des HindIII-Fragmentes und erstreckt sich über einen Bereich von 1245 bp bis zur Position 1289, es endet mit einem TAA-Stoppcodon. In einem Abstand von nur 14 bp beginnt an Position 1304 das zweite offene Leseraster, welches 1977 bp umfaßt und an Position 3280 mit einem TAA-Stoppcodon endet. Sequenzvergleiche ergaben, daß die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Leserasters deutliche Übereinstimmungen mit der Aminosäuresequenz der SHC aus *A.acidocaldarius* aufwies. Es erhielt daher die Bezeichnung *shc*.

```
AAGCTTGCCCTGTTATGGACTTTGCTCAGATTGAAGGTGACTTCATGAGTGTAACGCATA-   60
                                          MetSerValThrHisI
                                          ORF3

TTATCGGGGCGGGACTGGCTGGATTATCTGCCGCGGTAGCGATTACCCATGCTGGAGGAC-  120
leIleGlyAlaGlyLeuAlaGlyLeuSerAlaAlaValAlaIleThrHisAlaGlyGlyA

GCGTCAAAATTTATGAAGCCTCGGCCATGGCTGGGGGACGGGCGCGTTCCTATCATGATA-  180
rgValLysIleTyrGluAlaSerAlaMetAlaGlyGlyArgAlaArgSerTyrHisAspL

AAAAGCTGGGGATTGAAATTGACAATGGCAATCATATGCTGCTGTCAGGCAATCATTCTG-  240
ysLysLeuGlyIleGluIleAspAsnGlyAsnHisMetLeuLeuSerGlyAsnHisSerA

CCAAGACCTATTTGAAAAGAATAGGGGCAGAGCATCGTTTTAAAAGTCCAAAAGAGGCCG-  300
laLysThrTyrLeuLysArgIleGlyAlaGluHisArgPheLysSerProLysGluAlaA

CCTTTTCTTTTTGTGATCTAAGCGACAAAGAACGCTTTACCATTAAGTTAAGTAATGGCC-  360
laPheSerPheCysAspLeuSerAspLysGluArgPheThrIleLysLeuSerAsnGlyP

CCTTACCTTGGTGGGTTTTATGCGCCAAAAGCCGCGTCCCTCATAGCAAAGCCAAGGATT-  420
roLeuProTrpTrpValLeuCysAlaLysSerArgValProHisSerLysAlaLysAspT

ATTTAGCGTTATTGTCGCTGTTATTGGCAGATCATAATACGAAAATAGGTGACCTTGTTC-  480
yrLeuAlaLeuLeuSerLeuLeuLeuAlaAspHisAsnThrLysIleGlyAspLeuValP

CGGATAATACGGCTTTATGGCGTAAATTGCTTGATCCTTTTTTTGTATCGGTTCTCAATA-  540
roAspAsnThrAlaLeuTrpArgLysLeuLeuAspProPhePheValSerValLeuAsnT

CACCGGCAAGAGAAGGGGCTGCCTGTCTGGCGGCAGCGGTTATTCGGGAAACTTTGATGA-  600
hrProAlaArgGluGlyAlaAlaCysLeuAlaAlaAlaValIleArgGluThrLeuMetL

AAGGGGGTAAGGCCTGTATCCCCCGTATCGCTTATCCCAATTTGGCAAGCAGTTTTATTG-  660
ysGlyGlyLysAlaCysIleProArgIleAlaTyrProAsnLeuAlaSerSerPheIleA

ACCCTGCGCTTGACTATTTAAAAGCCAGAGGGGTCGAAGTTGATTTCCGTAACCGCCTCC-  720
spProAlaLeuAspTyrLeuLysAlaArgGlyValGluValAspPheArgAsnArgLeuA

GTCAAATCCATTTTTCAGGTCAGGATGTCGCCTCTCTGGAATTTGCTCATCAGGATGTAA-  780
rgGlnIleHisPheSerGlyGlnAspValAlaSerLeuGluPheAlaHisGlnAspValL

AGCTGGGAAAAGGCGATAAAGTGATTATCGCTTTGCCTGCTTGGGTCGTTCAATCCTTGA-  840
ysLeuGlyLysGlyAspLysValIleIleAlaLeuProAlaTrpValValGlnSerLeuI

TACCAGATATCGAAACGCCGGATAAATATCAGGCGATTATCAACGCTCATTTCCTGATGA-  900
leProAspIleGluThrProAspLysTyrGlnAlaIleIleAsnAlaHisPheLeuMetL
```

AGCCTACTGCGGCTATGCCTCATATTATGGGTGTTGTCGGAGGAACCGCTGATTGGATTT- 960
ysProThrAlaAlaMetProHisIleMetGlyValValGlyGlyThrAlaAspTrpIleP

TCACTTTTGAAAATCGGATATCGGTTACGATCAGCGCCGCTAATCATTTATTGGCGCTTG-1020
heThrPheGluAsnArgIleSerValThrIleSerAlaAlaAsnHisLeuLeuAlaLeuG

AAAAAGAAGAACTGGTTAAGCGTATCTGGGATGATATTCAGACCGTTTATGCTTTCAAAC-1080
luLysGluGluLeuValLysArgIleTrpAspAspIleGlnThrValTyrAlaPheLysG

AGGATATGCCTAAATGGCAGGTCGTGACTGAGAAAAGAGCCACTTTTGAAGCGACTGTCG-1140
lnAspMetProLysTrpGlnValValThrGluLysArgAlaThrPheGluAlaThrValG

AGCAGAATAATCGTCGCCCACCGGCGGTTACAGCGTGGAATAACCTGTTTTTAGCCGGAA-1200
luGlnAsnAsnArgArgProProAlaValThrAlaTrpAsnAsnLeuPheLeuAlaGlyA

ATTGGGTGAGAACAGGCCTGCCTGCGACTATTGAAAGCGCTATACGATCTGGCCAGACTG-1260
snTrpValArgThrGlyLeuProAlaThrIleGluSerAlaIleArgSerGlyGlnThrA

CGGCTGATCTCGCTTTATCCCATTCATAATTAGAAAGCCCATAATGACTGTATCGACTTC-1320
laAlaAspLeuAlaLeuSerHisSerEnd MetThrValSerThrSe
SHC

CTCGGCTTTTCATCATAGCCCGTTGTCTGATGATGTTGAGCCGATTATCCAAAAGGCCAC-1380
rSerAlaPheHisHisSerProLeuSerAspAspValGluProIleIleGlnLysAlaTh

CCGTGCCTTGCTTGAGAAGCAGCAGCAGGATGGCCATTGGGTTTTTGAATTGGAAGCCGA-1440
rArgAlaLeuLeuGluLysGlnGlnGlnAspGlyHisTrpValPheGluLeuGluAlaAs

TGCAACCATTCCCGCTGAATACATCCTGTTAAAGCATTATTTGGGTGAACCCGAAGATTT-1500
pAlaThrIleProAlaGluTyrIleLeuLeuLysHisTyrLeuGlyGluProGluAspLe

AGAAATAGAGGCCAAGATAGGTCGCTATTTGCGTCGTATTCAGGGCGAGCATGGCGGATG-1560
uGluIleGluAlaLysIleGlyArgTyrLeuArgArgIleGlnGlyGluHisGlyGlyTr

GTCTTTGTTTTATGGTGGTGATCTTGATTTGAGCGCCACGGTCAAAGCCTATTTTGCCTT-1620
pSerLeuPheTyrGlyGlyAspLeuAspLeuSerAlaThrValLysAlaTyrPheAlaLe

GAAAATGATCGGAGATTCTCCTGATGCGCCTCATATGCTTCGAGCCAGAAATGAAATTTT-1680
uLysMetIleGlyAspSerProAspAlaProHisMetLeuArgAlaArgAsnGluIleLe

GGCACGGGGTGGGGCGATGCGTGCCAATGTCTTTACACGTATTCAATTAGCTCTGTTCGG-1740
uAlaArgGlyGlyAlaMetArgAlaAsnValPheThrArgIleGlnLeuAlaLeuPheGl

GGCAATGTCATGGGAGCATGTCCCTCAAATGCCCGTAGAGTTGATGTTGATGCCGGAATG-1800
yAlaMetSerTrpGluHisValProGlnMetProValGluLeuMetLeuMetProGluTr

GTTTCCGGTTCACATCAATAAAATGGCCTATTGGGCAAGAACCGTTTTAGTCCCGTTATT-1860
pPheProValHisIleAsnLysMetAlaTyrTrpAlaArgThrValLeuValProLeuLe

GGTTTTACAGGCGTTAAAGCCTGTCGCCCGTAATCGGCGCGGTATCTTGGTTGATGAATT-1920
uValLeuGlnAlaLeuLysProValAlaArgAsnArgArgGlyIleLeuValAspGluLe

ATTTGTGCCGGATGTTTTACCGACCCTTCAGGAAAGCGGTGACCCTATATGGCGTCGTTT-1980
uPheValProAspValLeuProThrLeuGlnGluSerGlyAspProIleTrpArgArgPh

TTTTTCGGCACTTGATAAGGTATTGCATAAAGTAGAACCTTATTGGCCGAAAAATATGCG-2040
ePheSerAlaLeuAspLysValLeuHisLysValGluProTyrTrpProLysAsnMetAr

CGCGAAGGCTATTCATAGCTGTGTCCATTTTGTGACCGAGCGTTTGAATGGTGAAGACGG-2100
gAlaLysAlaIleHisSerCysValHisPheValThrGluArgLeuAsnGlyGluAspGl

GTTGGGTGCTATTTATCCGGCGATTGCCAATAGCGTCATGATGTATGATGCCTTGGGATA-2160
yLeuGlyAlaIleTyrProAlaIleAlaAsnSerValMetMetTyrAspAlaLeuGlyTy

TCCCGAAAACCATCCAGAAAGAGCCATTGCCCGTCGGGCTGTCGAAAAATTGATGGTGTT-2220
rProGluAsnHisProGluArgAlaIleAlaArgArgAlaValGluLysLeuMetValLe

AGATGGCACGGAAGATCAGGGTGATAAAGAAGTCTACTGTCAGCCTTGTTTATCCCCGAT-2280
uAspGlyThrGluAspGlnGlyAspLysGluValTyrCysGlnProCysLeuSerProIl

TTGGGATACCGCTTTGGTTGCCCATGCCATGTTGGAAGTCGGAGGCGATGAGGCTGAAAA-2340
eTrpAspThrAlaLeuValAlaHisAlaMetLeuGluValGlyGlyAspGluAlaGluLy

ATCGGCTATTTCTGCCTTGAGCTGGTTAAAGCCGCAACAAATTTTGGATGTAAAGGGCGA-2400
sSerAlaIleSerAlaLeuSerTrpLeuLysProGlnGlnIleLeuAspValLysGlyAs

TTGGGCATGGCGGCGGCCTGATCTCAGACCCGGGGGATGGGCCTTTCAATATAGAAATGA-2460
pTrpAlaTrpArgArgProAspLeuArgProGlyGlyTrpAlaPheGlnTyrArgAsnAs

CTATTATCCCGATGTCGATGATACGGCTGTTGTGACTATGGCGATGGATCGAGCCGCAAA-2520
pTyrTyrProAspValAspAspThrAlaValValThrMetAlaMetAspArgAlaAlaLy

ATTGTCGGATCTTCACGATGATTTTGAGGAATCTAAAGCGCGTGCCATGGAATGGACCAT-2580
sLeuSerAspLeuHisAspAspPheGluGluSerLysAlaArgAlaMetGluTrpThrIl

TGGGATGCAAAGCGATAATGGCGGTTGGGGCGCTTTCGATGCCAATAACAGCTATACTTA-2640
eGlyMetGlnSerAspAsnGlyGlyTrpGlyAlaPheAspAlaAsnAsnSerTyrThrTy

TCTGAATAATATTCCCTTTGCTGATCATGGCGCGTTACTTGATCCGCCAACGGTCGATGT-2700
rLeuAsnAsnIleProPheAlaAspHisGlyAlaLeuLeuAspProProThrValAspVa

CTCGGCACGCTGCGTTTCAATGATGGCGCAAGCCGGTATCTCGATTACAGATCCCAAAAT-2760
lSerAlaArgCysValSerMetMetAlaGlnAlaGlyIleSerIleThrAspProLysMe

GAAAGCGGCAGTTGATTATCTTCTGAAAGAGCAAGAAGAGGATGGTAGCTGGTTCGGGCG-2820
tLysAlaAlaValAspTyrLeuLeuLysGluGlnGluGluAspGlySerTrpPheGlyAr

TTGGGGTGTCAATTACATATATGGCACATGGTCGGCCTTATGTGCATTGAATGTGGCCGC-2880
gTrpGlyValAsnTyrIleTyrGlyThrTrpSerAlaLeuCysAlaLeuAsnValAlaAl

TTTACCCCATGATCATTTAGCTGTTCAGAAAGCTGTGGCTTGGCTGAAAACTATTCAAAA-2940
aLeuProHisAspHisLeuAlaValGlnLysAlaValAlaTrpLeuLysThrIleGlnAs

TGAAGATGGTGGTTGGGGTGAAAATTGCGATAGCTATGCCCTTGATTATAGCGGATACGA-3000
nGluAspGlyGlyTrpGlyGluAsnCysAspSerTyrAlaLeuAspTyrSerGlyTyrGl

GCCGATGGATTCGACGGCTTCCCAAACAGCATGGGCTTTATTGGGCTTGATGGCTGTTGG-3060
uProMetAspSerThrAlaSerGlnThrAlaTrpAlaLeuLeuGlyLeuMetAlaValGl

GGAAGCTAATTCCGAGGCCGTGACAAAGGGTATAAACTGGTTGGCACAAAATCAGGATGA-3120
yGluAlaAsnSerGluAlaValThrLysGlyIleAsnTrpLeuAlaGlnAsnGlnAspGl

AGAAGGATTGTGGAAAGAAGATTATTATAGTGGCGGTGGTTTTCCCCGTGTTTTTTATCT-3180
uGluGlyLeuTrpLysGluAspTyrTyrSerGlyGlyGlyPheProArgValPheTyrLe

TCGGTATCACGGTTATTCCAAATATTTTCCTCTTTGGGCTTTAGCGCGCTATCGCAATTT-3240
uArgTyrHisGlyTyrSerLysTyrPheProLeuTrpAlaLeuAlaArgTyrArgAsnLe

GAAAAAAGCCAATCAGCCGATTGTTCATTATGGGATGTAACAGGCTGATTTTATAACCTG-3300
uLysLysAlaAsnGlnProIleValHisTyrGlyMetEnd

TTAGTAATGAAATACGTCTAAATCAAAATACGGCTGATTTTTTGGCCGTATTTTTTTGTA-3360

TTATCATATTGTTTTTATAAAATATTGTGATGATTGGCGGGGTATTATGAAGGAAAAAAT-3420

ATGCTGAACCATATCCTTGCTGTGACCGGAATAGATCGTGAAGCACGGGCGGCGGCGCAA-3480

TGTGAAAAAGTTTTGTCTCTGGCAGGGGGAGGGGATAGTATTCGTCTCGAAGAATCTTTG-3540

CGCCGAATTATGCAAGAAAACACGATTGCCGGTTTAGTGAGTTTTGGTTTGGCTGGCGCT-3600

TTGGATTCTGATTTAAAAGTAGGCGATTGGGTTGTCGGAAGCCATTTAACAGGGAATGTC-3660

GATGCCGATTGCGATGAAGCATGGCAAGACTCGCTTGAGAAAATTTTCCCTAAATTAAAA-3720

AAGGGAATAATTTATTCAGATGGCAGTCTTGTTTCCGATATCGCCCAGAAACAAGACATT-3780

CAGAAAAAACAAAAGCTATCGCCGTTGATATGGAATCCCATATCGTTGCCCGAATAGCCC-3840

AAGAATATAATTGTCCATTTATTATTTTAAGAGTGATTTCAGATCAGGCCGATCACGCTC-3900

TGCCTCCCGCTTTTTCGGTGGCGATGCAGCCTGATGGCAGCGTCGCGATACCAGCCCTAC-3960

TGAAATCATTGTTATTGAAACCGAGCCAAATACCGGCTTTCGTCACGACAGCAAAGGCCG-4020

CAACGAAAGCCTTGAAAGAGTTAGGCCGCGTCGGTTTCCTTTTTGGCAGCAGCCTCGGCT-4080

TCCCGGATTTCGGCTAAACGCTGCTGAACGTGATCGGAGAACACGTCCTTGGCGCGACGC-4140

TGATTGGCAAGGCTGATATCGGGTGCCATAGCACCTTCTGTTTTGATGCCTTTTAAAGCA-4200

ACCATAGCAGCTTTCAACGGATGGCGAACCGTGTCGATAACCGCCGTGGCTTCAAAACCA-4260

GAGTGAACCATACAGTCTTGGCATTTTTCATAATTGCCAACGCCGTAATCATCCCAAGCC-4320

GTATTTTCCATAAGGTCTTTGAAGCTT-4347

Abb.III.5: Nukleotidsequenz des chromosomalen HindIII-Fragmentes aus *Z.mobilis*, auf dem das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* (*shc*) lokalisiert wurde. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *shc*-Gens und des benachbarten offenen Leseraster *orf3* sind im 3-Buchstabencode wiedergegeben. Mögliche Ribosomenbindestellen sind unterstrichen. Eine mögliche Terminationsstruktur im Anschluß an das *shc*-Leseraster ist doppelt unterstrichen.

1.4 Charakterisierung des *shc*-Gens aufgrund seiner Sequenzdaten

Das *shc*-Leseraster erstreckt sich über 1977 bp. Im Abstand von 7 bp vor dem Startcodon ATG befindet sich eine mögliche Ribosomenbindestelle (AGAAA). Nach dem Stoppcodon folgt eine mögliche Terminationsstruktur mit einer freien Bildungsenergie von -24,8 Kcal/mol (Abb.III.5). Die Codons des Leserasters codieren ein Protein, das 658 Aminosäuren umfaßt und ein

abgeleitetes Molekulargewicht von 74.1 kDa aufweist. Der berechnete isoelektrischen Punkt liegt bei 5.02. Die Anzahl der Aminosäuren und das Molekulargewicht des codierten Proteins liegen damit in der gleichen Größenordnung wie die der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* (627 Aminosäuren, 69,5 kDa). Die Aminosäurezusammensetzung des *shc*-Genproduktes ist der Tabelle III.1 zu entnehmen. Auffällig ist der hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren (34,7%). Besonders häufig treten die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin auf (4,6% und 3,5%), eine weitere Übereinstimmung mit der SHC aus *A.acidocaldarius* (Anteil der aromatischen Aminosäuren 9,6%). Die Durchführung eines Hydrophobizitätsplots (KYTE & DOOLITTLE, 1982) mit einer Fenstergröße von neun Aminosäuren für die Aminosäuresequenz des *shc*-Leserasters führte nicht zur Identifizierung möglicher Transmembranhelices. Der G+C-Gehalt des *shc*-Gens beträgt 47,2 % und liegt damit nur wenig unterhalb des für das *Z.mobilis*-Chromosoms ermittelten Wertes von 48,5 % (SWINGS & DELEY, 1977).

Tab.III.1: Abgeleitete Aminosäurezusammensetzung des Gens der Squalen-Hopen-Cyclase (*shc*) aus *Z.mobilis*. Das Gen codiert 658 Aminosäuren. Angegeben ist jeweils die Anzahl jedes Aminosäurerestes im codierten Protein sowie der prozentuale Anteil (in Klammern).

Ala	72	(10,9)	Leu	64	(9,7)
Arg	32	(4,9)	Lys	29	(4,4)
Asn	23	(3,5)	Met	24	(3,6)
Asp	46	(7,0)	Phe	19	(2,9)
Cys	6	(0,9)	Pro	35	(5,3)
Gln	23	(3,5)	Ser	33	(5,0)
Glu	41	(6,2)	Thr	22	(3,3)
Gly	48	(7,3)	Trp	23	(3,5)
His	19	(2,9)	Tyr	30	(4,6)
Ile	28	(4,2)	Val	41	(6,2)

sauer	(Asp + Glu)	87	(13,2)
basisch	(Arg + Lys)	61	(9,3)
aromatisch	(Phe + Trp + Tyr)	72	(10,9)
hydrophob	(Phe + Trp + Tyr + Ile + Leu + Met + Val)	229	(34,7)

Ein Vergleich des Codongebrauchs im *shc*-Leseraster mit dem in stark exprimierten glykolytischen bzw. schwach exprimierten Genen ist in Tab.III.2 angestellt. Zum Vergleich ist auch der Codongebrauch im *shc*-Gen aus *A.acidocaldarius* aufgeführt. Die Analyse des Codongebrauchs spricht dafür, daß es sich bei dem *shc*-Leseraster in *Z.mobilis* um ein niedrig exprimiertes Gen handelt. In drei Fällen wird ein bestimmtes Codon in allen betrachteten *Z.mobilis*-Genen bevorzugt (Gebrauch zu mehr als 66%). Es handelt sich dabei um: Glu-GAA, His-CAT, Tyr-TAT. In den stark exprimierten glykolytischen Genen werden darüber hinaus

folgende Codons bevorzugt: Cys-TGC, Gln-CAG, Gly-GGT, Phe-TTC. Diese Auswahl ist in den schwach exprimierten Genen und im *shc*-Gen nicht zu beobachten. Bei diesen Genen tritt dagegen eine Bevorzugung folgender Codons auf: Asp-GAT, Lys-AAA. Zusätzlich werden im *shc*-Gen die Codons Asn-AAT, Cys-TGT und Phe-TTT bevorzugt. In den Fällen von Cys-TGT und Phe-TTT steht die Auswahl der Codons im *shc*-Gen im direkten Gegensatz zum Codongebrauch in den stark exprimierten Genen. Der Gebrauch einer Reihe von Codons wird in den glykolytischen Genen weitgehend vermieden: Arg-AGA,-CGG,-CGA, Gly-GGG, Ile-ATA, Leu-CTA, Pro-CCC, Thr-ACA. Eine Diskriminierung dieser Codons tritt weder im Fall der schwach exprimierten Gene noch im Fall des *shc*-Gens auf. Dieser Codongebrauch war auch ein Hinweis darauf, daß das *shc*-Gen ein Enzym des anabolen Stoffwechsels codierte. Versuche zur Identifizierung des RNA-Transkriptes des *shc*-Gens in Northern-Hybridisierungen mit einer für das *shc*-Leseraster spezifischen RNA-Sonde blieben erfolglos. Auch durch CONWAY und Mitarbeiter konnten bisher nur stark exprimierte Gene des katabolen Stoffwechsels aus *Z.mobilis* auf der Ebene des mRNA-Transkriptes charakterisiert werden (EDDY et al., 1991; HESMAN et al., 1991; BARNELL et al., 1992; MEIJA et al., 1992, LIU et al., 1992; SHARK & CONWAY, 1992; CONWAY, persönliche Mitteilung). Im Vergleich des bevorzugten Codongebrauchs im Gen für die SHC von *A. acidocaldarius* und dem der Gene aus *Z.mobilis* treten kaum Übereinstimmungen auf. Im Falle des *A.acidocaldarius* Genes ist eine deutliche Bevorzugung der Codons zu beobachten, die in ihrer dritten Position ein G oder C enthalten. Diese Codonauswahl trägt wesentlich zu dem hohen G+C-Gehalt des Genes bei, der 66 % beträgt. Das Genom von *A.acidocaldarius* zeichnet sich insgesamt durch einen hohen G+C-Gehalt aus, der bei 61,1% liegt (DEINHARD, 1987). Der hohe chromosomale G+C-Gehalt soll in *A.acidocaldarius* wie in anderen thermophilen Organismen vermutlich eine Stabilisierung der DNA- und RNA-Strukturen bei hohen Umgebungstemperaturen bewirken (KAGAWA et al., 1984). Der deutliche Unterschied im G+C-Gehalt der Gene für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* und *Z.mobilis* war sicher einer der Gründe, weshalb Hybridisierungssignale in den durchgeführten Southern Hybridisierungen nur unter milden Hybridisierungsbedingungen erzielt werden konnten.

Tab.III.2: Gegenüberstellung des Codongebrauchs im Gen der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* (*shc Z.m.*), in Genen der hoch exprimierten glykolytischen Enzyme und in schwach exprimierten Genen aus *Z.mobilis*. Zum Vergleich ist auch der Codongebrauch im Gen für die SHC aus *A.acidocaldarius* dargestellt (*shc A.a.*).

As	Codon	glykolyt. Gene*	schwach exprimierte Gene**	*shc Z.m.*	*shc A.a.*
Ala	GCG	12	15	17	57
Ala	GCA	21	17	18	3
Ala	GCT	69	28	32	13
Ala	GCC	26	29	42	37
Arg	AGG	0	3	0	11
Arg	AGA	1	9	8	6
Arg	CGG	2	8	9	19
Arg	CGA	1	6	3	11
Arg	CGT	26	16	20	14
Arg	CGC	15	18	9	43
Asn	AAT	16	27	30	2
Asn	AAC	20	12	5	13
Asp	GAT	33	49	65	26
Asp	GAC	23	15	5	45
Cys	TGT	3	4	6	10
Cys	TGC	7	4	3	11
Gln	CAG	20	17	17	24
Gln	CAA	4	16	18	10
Glu	GAG	3	10	20	41
Glu	GAA	50	51	42	11
Gly	GGG	1	10	12	18
Gly	GGA	5	8	11	13
Gly	GGT	59	33	32	18
Gly	GGC	24	29	18	59
His	CAT	15	19	24	10
His	CAC	7	4	5	10
Ile	ATA	1	6	8	3
Ile	ATT	21	35	26	8
Ile	ATC	33	33	9	18
Leu	TTG	22	23	44	13
Leu	TTA	9	17	27	0
Leu	CTG	33	21	8	16
Leu	CTA	1	6	0	3
Leu	CTT	25	23	17	3
Leu	CTC	11	10	2	42
Lys	AAG	20	13	15	24
Lys	AAA	35	36	29	0

Tab.III.2: Fortsetzung

As	Codon	glykolyt. Gene*	schwach exprimierte Gene**	*shc Z.m.*	*shc A.a.*
Met	ATG	27	18	36	14
Phe	TTT	12	20	24	5
Phe	TTC	27	14	5	19
Pro	CCG	28	14	21	43
Pro	CCA	6	5	3	6
Pro	CCT	12	16	14	5
Pro	CCC	1	7	15	5
Ser	AGT	4	6	2	3
Ser	AGC	11	15	17	14
Ser	TCG	4	6	14	21
Ser	TCA	5	8	3	6
Ser	TCT	15	12	8	2
Ser	TCC	12	9	8	13
Thr	ACG	13	11	8	29
Thr	ACA	2	9	8	2
Thr	ACT	8	8	8	0
Thr	ACC	30	16	11	16
Trp	TGG	10	12	35	33
Tyr	TAT	13	20	39	3
Tyr	TAC	5	5	6	37
Val	GTG	6	12	11	37
Val	GTA	3	5	8	2
Val	GTT	52	31	23	6
Val	GTC	19	23	21	18

Die Häufigkeit jedes einzelnen Codons wurde auf ein 1000 Aminosäuren umfassendes Protein normiert. AS, Aminosäure; unterstrichen sind die Codons, die zu mehr als 66% zur Codierung einer Aminosäure verwendet werden, welche durch mehr als ein Codon repräsentiert wird.

* Zusammenstellung glycolytischer Enzyme aus *Z.mobilis*: *adhB, eda, edd, gap, glf, glk, pdc, pgi, pgk, zwf* (SHARK und CONWAY, 1992).

** Zusammenstellung schwach exprimierter Gene aus *Z.mobilis*: *phoC, sacA, adhA, levU, lig, groES, groEL, grp, ptsz, gluP, gluE, gluM* (BRINGER-MEYER, unveröffentlicht), *grp, ptsz, gluP, gluE, gluM* (PEEKHAUS, unveröffentlicht).

1.5 Sequenzvergleiche zwischen *shc*-Leseraster aus *Z.mobilis*, SHC aus *A.acidocaldarius* und der Squalenoxid-Lanosterol-Cyclase aus *Candida albicans*

Betrachtet man die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *shc*-Leserasters aus *Z.mobilis* und des Gens für die SHC aus *A.acidocaldarius*, so sind die Übereinstimmungen relativ gering (Abb.III.6). Der Anteil an identischen Aminosäuren beträgt 33%, der der konservierten Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften liegt bei 14%. Berücksichtigt man nun noch den stark unterschiedlichen G+C-Gehalt und Codongebrauch in den beiden Genen, ist es erstaunlich, daß mit Hilfe der heterologen Gensonde aus *A.acidocaldarius* das *shc*-Gen aus *Z.mobilis* kloniert werden konnte. Der Vergleich der DNA-Sequenzen der Gensonde und des *shc*-Gens in dem Bereich, der aufgrund der Übereinstimmungen auf Aminosäureebene der Gensonde entspricht, ergibt eine Übereinstimmung auf Nukleotid-Ebene von 56% (Abb.III.7). Das als Gensonde verwendete DNA-Fragment codiert die Aminosäuren 242-454 der SHC aus *A.acidocaldarius*. Es reicht damit in die carboxyterminale Hälfte des Proteins hinein. Vergleicht man nur die carboxyterminalen Hälften der beiden Proteine, beginnend mit der Aminosäure 303 für die SHC aus *A.acidocaldarius* und 320 für das *shc*-Gen aus *Z.mobilis*, so sind hier die Übereinstimmungen wesentlich stärker ausgeprägt als bei der Betrachtung der Proteine über ihre gesamte Länge. Der Anteil identischer Aminosäuren beträgt in diesem Bereich 44%. Besonders die carboxyterminalen Bereiche der beiden prokaryontischen Squalen-Cyclasen zeigen eine auffallende Ähnlichkeit mit der einzigen bisher klonierten und sequenzierten eukaryontischen Cyclase (Abb.III.6). Es handelt sich um die Aminosäuresequenz des Gens für die Squalenoxid-Lanosterol-Cyclase aus *Candida albicans* (KELLY et al., 1990; BUNTEL & GRIFFIN, 1992; ROESSNER et al., 1993). Der Anteil an identischen Aminosäuren in den carboxyterminalen Proteinhälften der prokaryontischen Cyclasen und der eukaryontischen Cyclase liegt zwischen 28 und 29 %. Allen drei Aminosäuresequenzen ist das mehrmalige Auftreten eines konservierten Aminosäuremotivs gemeinsam: Arg/Lys Gly/Ala X_{2-3} Tyr/Phe/Trp X_4 Gln X_{2-5} Gly X Trp wobei X für eine beliebige Aminosäure steht (PORALLA et al., Veröffentlichung eingereicht). Dieses Motiv erhielt aufgrund der besonders guten Konservierung des Glutamin- und des Tryptophanrestes die Bezeichnung QW-Motiv. Es tritt viermal in konservierten Abständen in den carboxyterminalen Bereichen der drei Proteine auf. Darüber hinaus ist es in den beiden prokaryontischen Cyclasen noch jeweils zweimal in den aminoterminalen Proteinhälften vorhanden. Eine Region (*shc*: Aminosäure 377-400), die vermutlich Substratbindungsfunktion hat (ABE & PRESTWICH, zur Veröffentlichung eingereicht, MARRERO et al., 1992), ist in allen drei Proteinen gut konserviert (Abb.III.6). Eine Datenbankrecherche (FASTA-Programm, EMBL-SWISSPIR Protein-Datenbank, September 1993) mit der Aminosäuresequenz des *shc*-Leserasters ergab keine signifikante Übereinstimmung mit weiteren Proteinen.

```
                                                                                  .         .         .
shcZ                                                                    MTVSTSSAFHHSPLSDDVEPIIQKATRALLEKQQQDGHWVFELEADA
shcA                                                                      MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNV
lcyC   MYYSEEIGLPKTDISRWRLRSDALGRETWHYLSQSECESEPQSTFVQWLLESPDFPSPPSSDIHTSGEAARKGADFLKLLQLDNGIFPCQYKGPH
                                                                                                  *   *   *

        50         .         .         .         .         .         100         .         .         .
shcZ   TIPAEYILLKHYLGEPEDLEIEAKIGRYLRRIQGEH-GGWSLFYGGDLDLSATVKAYFALKMIGDSPDAPHMLRARNEILARGGAH-RANV----
shcA   TNEAEYVLLCHIL-DRVDRDRMEKIRRYLLHEQREDARGPCTRVGRRTSTRPSRRTSRSSISACRATRSRCRRRSGSF-RARAGSSRRACSRDVA
lcyC   FMTIGYVTANYYSKTEIPEPYRVEHIRYIVNTAHPVDGGWGLHSVDKSTCFGTTHNYVCLRLLGMEKDHPVLVKARKT-LHRLGGAIKNPHHWGK
           *                   **         *                                                        * *
                 .         150         .         .         .         .         200         .         .
shcZ   --FTRIQLALFGAMS-WEHVPQMPVELMLMPEWFPVHINKMAYWARTVLVPLLVLQALKPVARNRRGILVDELFVPDVLPTLQESGDPIWRRFFR
shcA   GAGGRISVGEGAHGPAGDHVPRQAHAAQHLRVWLVGSGDRR-GALDCDEPPAGVPAARAGARARAVRDRRASAPAPPREGVGGSSTRST-GRCTG
lcyC   -AWLSI----LNLYEWEGVNPAPPELWR-LPYWLPIHPAKWWVHTRAIYLPLGYTSANRVQCELDPLLKEIRNEIYVPSQLPYESIKFGNQRNN-
           *             *         *                   *    *                                        *     *
                 .         .         250         .         .         .         .         300         .
shcZ   HLIRYCIKVEPYWPKNMRAKAIHSCVHFVTER--LNGEDGLGAIYPAIANSVHMY-DALGYPENHPERAIARRA-VEKLHVLDGTEDQGDKEV--
shcA   LRSCRCTRSAAAEIRALDWLLERQAG------DGSWGGIQPPWFYALIGLKIL---DNTQHPAFIKGWEGLELYGVELDYGGWHF----------
lcyC   ----VCGVDLYYPHTKILDFANSILSKWEAVRPKWLLNWVNKKVYDLIVKEYQNTEYLCIAPVSFAFNMVVTCH-YEGSESENFKKLQNRMNDVL
           *                                           *  *            *            *
                 .         .         .         .         350         .         .         .         .
shcZ   --------YCQPCLSPIWDTALVAHAMLEVGGDEAEKSAISAL---SWLKPQQILDVKGDWAWRRPDLRPGGWAFQYRNDYYPDVDDTAVVTHA-
shcA   ----------QASISPVWDTGL-AVLALPAGLPADHDRLVKAG---EWLLDRQIT-VPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWA-
lcyC   FHGPQGHTVMGTNGVQVWDAAFMVQYFFHTGLVDDPKYHDMIRKSYLFLVRSQFTENCVDGSF-RDRRK-GAWPFSTKEQGYTVSDCTAEAMKAI
                          **         *                  *  *     *   *     *  *     *   * **    *
                 .         .         .         .         .         450         .         .         .
shcZ   -MDRAAKLSDLHDDFEESKARAMEWTIGMQSDN-GGWGAFDANNSYTYLNNIPFADHGALLDPPTVDVSARCVSMMAQAGISITDPKMK------
shcA   -LNTLRLPDEPQRDANTKGFR---WIVGMQSSN-GGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDLTAHV---LECFGSFGYDDAWKVIR---
lcyC   IMVRNHASFADIRDEIKDENLFDAVEVLLQIQNVGEWE-YGSFSTYEGIKA-PLLLEKLNPAEVFNNINVEYPYVECTDSSVLGLTYFAKYYPDY
                   *                 *  * * *                *

                 .         .         .         .         .         .         .         .         .
shcZ   ----------AAVDYLLKEQEE-DGSWFGRWGVNYIYGTWSALCCIEC--GRFTPDHLAVQKA-VAWLKTIQNEDGGWGENCDSY-ALDYSGYEP
shcA   ----------RAVEYLKREQKP-DGSWFGRWGVNYLYGTG-AVVSALKAVGIDTREPYI-QKALDDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGA
lcyC   KPELIQKTISSAIWYILDSQDNIDGSWYGCWGICYTYASMFALWALH-TVGLDYESSSAVKKG-CDFLISKQLPDGGWSESMKGCETHSY--VNG
                 *  *    *   **** * **  * *    *         *         *         *  **** *         *
                 .         .         .         600         .         .         .         650
shcZ   MDSTASQTAWALLGLMAVGEANSEAVTKGINWLAQNQDEEGLWKEDYYSGGGFPRVFYLRYHGYSKYFPLWALARYRNLKKANQPIVHYGM+
shcA   --STPSQTAWALMALIAGGRAESEAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYYTGTASPGDFYLGYTMYRHVFPTLALGRYKQAIERR+
lcyC   ENSLVVQSAWALIGLILGNYPDEEPIKRGIQFLMKRQLPTGEWKYEDIEG-VFNHSCAIEYPSYRFLFPIKALGLYKNKYGDKVLV+
         *   * ****  *         *    *   *   *   * *      *         *  *   **  **  *
```

Abb.III.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen der bisher klonierten Squalencyclasen; *shcZ*, abgeleitete Aminosäuresequenz des *shc*-Gens aus *Z.mobilis*; *shcA*, SHC aus *A.acidocaldarius*; *lcy*, Squalen-Lanosterol-Cyclase aus *Candida albicans*. Mit * markiert sind identische Aminosäuren in allen drei Proteinen. Mit Linien ober- und unterhalb der Sequenzen sind die mehrfach auftretenden QW-Motive sowie eine mögliche Substratbindungsstelle gekennzeichnet. Beginn und Ende des Bereichs, über den sich die Gensonde aus *A.acidocaldarius* erstreckt, sind durch Pfeile markiert. Die Numerierung bezieht sich auf die abgeleitete Aminosäuresequenz des *shc*-Gens aus *Z.mobilis*.

```
Aa  TCCGCGCCTTGGACTGGTTGCT--CGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAGCTGGGGCGGGAT
     |    ||  ||  |   |||    ||||||   |   || || | | | | ||| |  ||
Zm   CATAGCTGTGTCCATTTTGTGACCGAGCGTTTGAATGGTGAAGACGGGTTGGGTGCTAT
                                                          -2103

Aa  TCAGCCGCC--TTGGTTTTA-CGCGCTCATCG-----GCCTCAAGAT-TCTCGACATG-A
    | | ||| |  |||     || ||   | ||        ||||   ||| || ||| |    |
Zm  TTATCCGGCGATTGCCAATAGCGTCATGATGTATGATGCCTTGGGATATCCCGAAAACCA

Aa  CGCAGCATCCGGCGTTCATCAA-GGGCTGGGAAGGTCTAGA-GCTGT---ACGGCGTGGA
     ||| |    | | ||   |   ||||||   |     | || | |||   | ||||  |||
Zm  TCCAGAAAGAGCCATTGCCCGTCGGGCTGTCGAAAAATTGATGGTGTTAGATGGCACGGA

Aa  -GCT--GGATTACGGAGGATGGATGTTTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGG
     | |  || | |   || |       | ||||| |||   | || ||| | |||||| ||
Zm  AGATCAGGGTGATAAAGAAGTCTACTGTCAGCCTTGTTTATCCCCGATTTGGGATACC--

Aa  CCTCGCCGTGCTCGCGC-TGCC-TGCGGGGCTTCCG-GCCGATCACG---ACCGCTTGGT
        ||  || | || | ||||| ||  ||   || | | ||||| | |   |     | ||
Zm  -----GCTTTGGTTGCCCATGCCATGTTGGAAGTCGGAGGCGATGAGGCTGAAAAATCGGC

Aa  CAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAG---ATCACGGTTCC---GGGCGACTGGGC
     |    | | |  | |    |||  | | |||    ||   || |     |||||| |||||
Zm  TATTTCTGCCTTGAGCTGGTTAAAGCCGCAACAAATTTTGGATGTAAAGGGCGATTGGGC

Aa  GGTGAAGCGCCCGAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCCAGT-TCGACAACGTGTACT
       |  ||| ||  | |||||  || || || |  || || || | | ||  | |  || |
Zm  ATGGCGGCGGCCTGATCTCAGACCCGGGGGATGGGCCTTTCAATATAGAA-ATGACTATT

Aa  ACCCGGACGTGGACGACACGGCCGTCGTGGTGTGGGCGCTCAA-CACCCTGCGC--TTGC
    | || || || || || ||||| || |||     |||| |  | |   | ||    |||
Zm  ATCCCGATGTCGATGATACGGCTGTTGTGACTATGGCGATGGATCGAGCCGCAAAATTGT

Aa  CGGACGAGC-CGCAGCGGGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTG-----TCGGCA
    ||||     | ||  |           |      ||| |  | |  |||| ||     | ||| |
Zm  CGGATCTTCACGATGATTTTGAGGAATCTAAAGCGCGTGCCATGGAATGGACCATTGGGA

Aa  TGCAGAGCTCGAACGGCGGTTGGGGCGCCTACGACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGA
    |||| |||    || |||||||||||||| | ||| | | | ||||        |   | ||
Zm  TGCAAAGCGATAATGGCGGTTGGGGCGCTTTCGATGCCAATAACAGCTATACTTATCTGA

Aa  ACCACATCCCGTTCTGC-GACTTCGGCGAAGTGACC-GATCCGCCGTCAGAGGACCTCAC
    |   | || || ||  || ||    ||||   | ||  |||||||  | |  ||  || |
Zm  ATAATATTCCCTTT-GCTGATCATGGCGCG-TTACTTGATCCGCCAACGGTCGATGTCTC

Aa  CGCCCAC-GTGCTCGAGTGTTTCGGCAG
     || | | | | |  | ||| |   ||
Zm  GGCACGCTGCGTTTCAATGATG--GCG  -2728
```

Abb.III.7: Vergleich der Nukleotidsequenzen der Gensonde aus *A.acidocaldarius* (Aa) und dem entsprechenden Fragment aus dem *shc*-Gen von *Z.mobilis* (Zm). Die Anzahl identischer Nukleotide liegt bei 56%.

2. Expression des Gens für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* in *Z.mobilis* und *E.coli*

2.1 Expression des *shc*-Gens in *Z.mobilis*

Um den Nachweis zu erbringen, daß auf dem klonierten chromosomalen HindIII-Fragment aus *Z.mobilis* das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase lokalisiert ist, wurde untersucht, ob plasmidcodierte Kopien des DNA-Fragmentes in *Z.mobilis* zu einer meßbaren Erhöhung der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität führten. Zunächst wurde das 4,3 kb HindIII-Fragment in den für *Z.mobilis* geeigneten Vektor pZY507 überführt (Abb.III.8). Dieser Vektor (SCHILZ, 1993) ist ein Derivat des Vektors pSUP104 (SIMON et al., 1983), der über ein breites Wirtsspektrum verfügt, durch Konjugation nach *Z.mobilis* überführbar ist und in *Z.mobilis* repliziert wird. Die Selektion rekombinanter *Z.mobilis*-Stämme kann durch die plasmidvermittelte Resistenz gegenüber Chloramphenicol erfolgen. Zusätzlich verfügt das Plasmid pZY507 über den *tac*-Promotor und das *lacI*^{q}-Gen. Der *tac*-Promotor ist auch in *Z.mobilis* aktiv und vermittelt die Expression eines in Leserichtung hinter den *tac*-Promotor inserierten Gens (ARFMAN et al., 1992). Das *lacI*^{q}-Gen codiert den *lac*-Repressor, welcher die Expression, ausgehend vom *tac*-Promotor, fast vollständig reprimiert. Durch Zusatz von IPTG ins Medium kann die Repression aufgehoben werden. Der Vektor pZY507 stellt also ein auch in *Z.mobilis* regulierbares Expressionssystem dar (SCHILZ, 1993).
Das HindIII-Fragment konnte in eine singuläre HindIII-Schnittstelle hinter den *tac*-Promotor inseriert werden. Das Konstrukt pZY603, das den *shc*-Leseraster in Leserichtung hinter dem *tac*-Promotor enthielt, wurde in einer Filterkreuzung durch Konjugation nach *Z.mobilis* überführt. Die Anwesenheit des Plasmids in *Z.mobilis* wurde durch eine Plasmidpräparation aus dem rekombinanten *Z.mobilis*-Stamm und anschließende Retransformation von *E.coli* nachgewiesen. Die *E.coli* Retransformanten enthielten das intakte pZY603-Plasmid.
Die Enzymtests wurden mit zellfreien Rohextrakten der *Z.mobilis*-Stämmen CP4 und CP4/pZY603 durchgeführt. Erwartungsgemäß fand in beiden Rohextrakten ein Umsatz von Squalen zu Hopen statt. Die Identifizierung des Substrat- und Produkt-Signals auf den Dünnschichtchromatogrammen erfolgte mit Hilfe von Referenzsubstanzen (Squalen, ^{3}H-Squalen, Hopen). Durch die Entwicklung der DC-Platte in den Laufmitteln Chloroform und Hexan wurde eine deutliche Trennung von Squalen und Hopen erzielt (Abb.III.9), wobei sich Hopen schneller von der Startfront entfernte als Squalen (Rf-Werte: Squalen, 0,55; Hopen, 0,67). Auch das zweite Produkt der SHC-Reaktion Diplopterol war erkennbar. Aufgrund der durch die OH-Gruppe erhöhten Polarität wanderte Diplopterol in den unpolaren Laufmitteln weniger schnell als Squalen und Hopen (Rf-Wert: 0,19). Das Diplopterol-Signal wurde aber aufgrund des Fehlens von gereinigtem Diplopterol als Referenzsubstanz nicht eindeutig identifiziert.

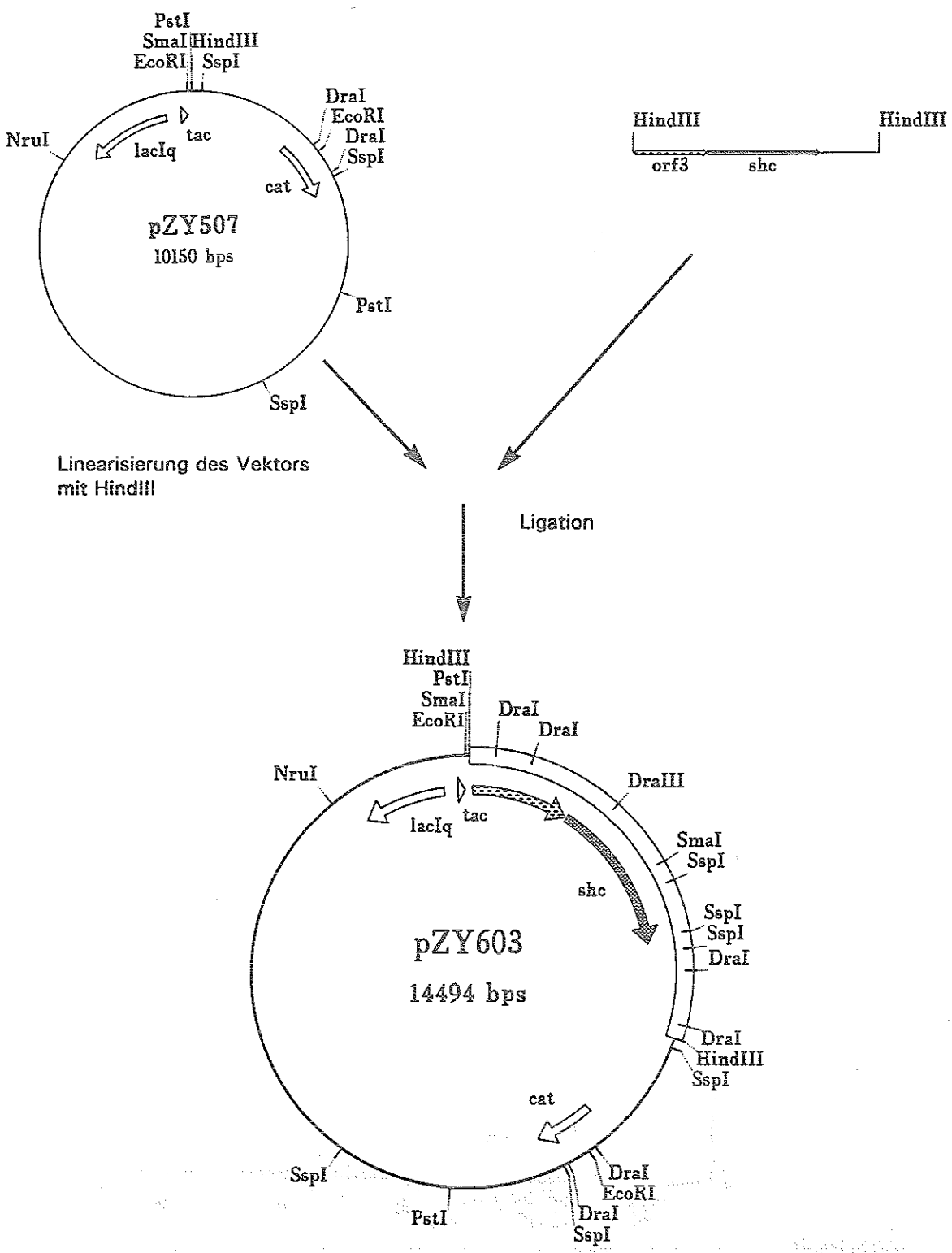


Abb.III.8: Schema der Konstruktion eines Plasmids (pZY603) zur Expression des *shc*-Gens aus *Z.mobilis* in *Z.mobilis*. Die Insertion des 4,3 kb HindIII-Fragmentes, auf dem das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase (*shc*) aus *Z.mobilis* lokalisiert ist, erfolgt in die singuläre HindIII-Schnittstelle des Vektors pZY507. Die offenen Leseraster *orf3* und *shc* liegen in Leserichtung zum *tac*-Promotor; *cat*, Gen für Chloramphenicol-transacetylase; *lacIq*, Gen für den *lac*-Repressor; *tac*, *tac*-Promotor.

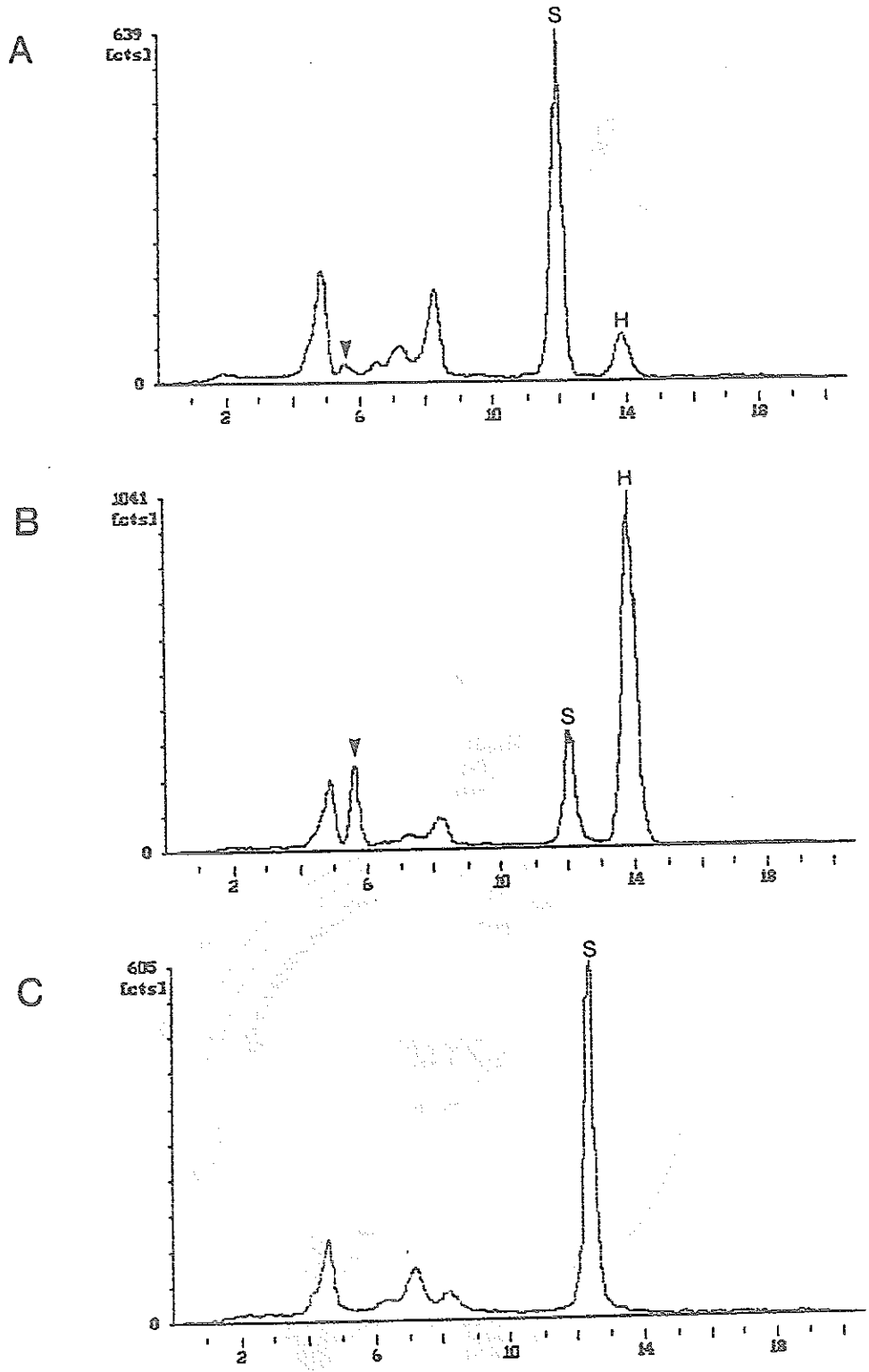


Abb.III.9:
Nachweis einer erhöhten Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität im Rohextrakt des rekombinanten *Z.mobilis*-Stammes, der das *shc*-Gen auf zusätzlichen plasmidcodierten Kopien enthält. Dargestellt sind die Auswertungen von Dünnschichtchromatogrammen durch den Radioscanner; Substrat: Squalen/^{3}H-Squalen; A, CP4-Wildtyp; B, CP4/pZY603; C, Kontrollversuch ohne Rohextrakt; S = Squalen; H = Hopen. Bei dem mit einem Pfeil markierten Peak handelt es sich wahrscheinlich um Diplopterol. Die Peaks ohne Bezeichnung treten auch im Kontrollversuch ohne Rohextrakt auf. Es handelt sich um Verunreinigungen des ^{3}H-Squalens. Inkubationszeit 3 h, X-Achse: Laufstrecke in cm, Y-Achse: während der Messzeit detektierte Impulse. Unterschiede in der Anzahl der detektierten Impulse wie zwischen A und B sind methodisch bedingt, die Extraktion der Reaktionsansätze schwankt in ihrer Effizienz.

Beim Vergleich der Chromatogramme war festzustellen, daß der Squalen-Umsatz im Stamm CP4/pZY603 gegenüber dem Umsatz in CP4 ohne Plasmid auf das Fünffache erhöht war (Tab.III.3). Die erhöhte SHC-Aktivität im Stamm CP4/pZY603 war ein deutlicher Hinweis darauf, daß das *shc*-Leseraster auf dem klonierten HindIII-Fragment die Squalen-Hopen-Cyclase in *Z.mobilis* codierte.

Tab.III.3: Squalen-Hopen-Cyclase Aktivitäten in den Rohextrakten verschiedener *Z.mobilis*- und *E.coli*-Stämme. Die Angabe der Enzymaktivitäten erfolgt in U (units).

Z.mobilis	CP4	0,06	mU/mg
	CP4/pZY603	0,3	mU/mg
E.coli	DH5/pZY507	nicht nachweisbar	
	DH5/pZY603	0,2	mU/mg
	DH5/pZY611	0,4	mU/mg

2.2 Expression des *shc*-Gens in *E.coli*

Da *E.coli* über keine eigene meßbare Squalen-Hopen Cyclaseaktivität verfügt (OCHS et al., 1992), war eine durch die Expression des *shc*-Leserasters in rekombinanten *E.coli*-Stämmen hervorgerufene SHC-Aktivität ein überzeugender Beweis, daß es sich bei dem *shc*-Leseraster tatsächlich um das Gen für die Squalen-Hopen Cyclase in *Z.mobilis* handelte.
Es wurden zellfreie Rohextrakte folgender *E.coli*-Stämme in SHC-Tests eingesetzt: DH5/pZY507, DH5/pZY603 (Abb.III.8) und DH5/pZY611 (Abb.III.4). Alle Kulturen wurden während der letzten 3h ihres Wachstums in Gegenwart von IPTG angezogen.
Die Auswertung der DC-Chromatogramme mit dem Radioscanner (Abb.III.10) zeigte, daß im Rohextrakt des Stammes DH5/pZY507, der nur das Vektorplasmid ohne Insert enthielt, kein Umsatz von Squalen zu Hopen stattgefunden hatte. In den Stämmen, die die Konstrukte mit dem HindIII-Fragment enthielten (DH5/pZY603, DH5/pZY611), wobei sich das *shc*-Leseraster in Leserichtung hinter dem *tac* bzw *lacZ*-Promotor befand, war dagegen eine deutliche Hopen-Bildung festzustellen.
Der Umsatz war im Stamm DH5/pZY611 gegenüber dem im Stamm DH5/pZY603 auf das Zweifache erhöht (Tab.III.3). Der Unterschied der Enzymaktivitäten beruhte mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem Kopienzahleffekt. Bei dem Vektor pUC19 im Konstrukt pZY611 handelte es sich um einen "high copy number"-Vektor (VIEIRA & MESSING, 1977; SAMBROOK et al., 1989), während der Vektor pZY507 des Konstruktes pZY603 ein "low copy number"-Vektor war (SIMON et al., 1983).
Weitere Versuche mit den *E.coli*-Stämme DH5/pZY601 und DH5/pZY602 (Abb.III.4) zeigten, daß in *E.coli* die Expression des *shc*-Gens abhängig war von der Orientierung des Gens zum

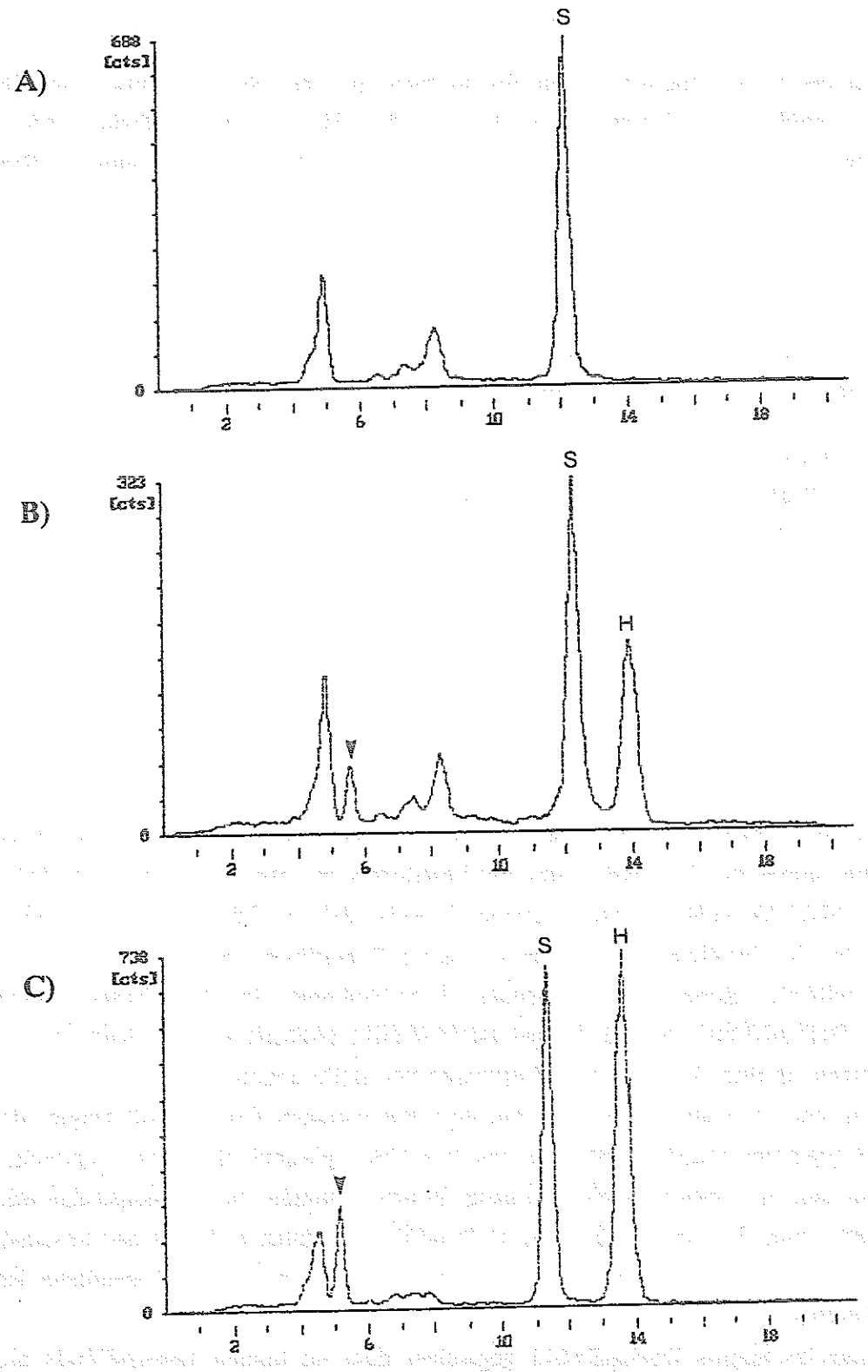


Abb.III.10:
Nachweis einer Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität in Rohextrakten rekombinanter *E.coli*-Stämme, die das *shc*-Gen aus *Z.mobilis* auf plasmidcodierten Kopien enthalten. Substrat: Squalen/^{3}H-Squalen; A, DH5/pZY507; B, DH5/pZY603; C, DH5/pZY611; Bezeichnungen und Erläuterungen wie Abb.III.9; A und B, Inkubationszeit 3h; C, Inkubationszeit 1h. Der Extrakt des Reaktionsansatzes von C wurde nicht auf der gleichen DC-Platte aufgetrennt wie A und B, daher befinden sich die Substanzpeaks nicht genau in der gleichen Position wie die von A und B.

lacZ-Promotor. Nur im Stamm DH5/pZY601, in dem das *shc*-Gen im Vektor pUC19 in Leserichtung zum *lacZ*-Promotor orientiert vorlag, trat eine Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität auf. Um abzusichern, daß es sich bei den in den SHC-Enzymtests mit dem Radioscanner detektierten radioaktiven Substanzen tatsächlich um Squalen und Hopen handelte, wurde der Hexan/Isopropanol-Extrakt eines SHC-Tests mit dem Rohextrakt des *E.coli*-Stammes DH5/pZY611 in einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abb.III.11). Die Autoradiographie der zweidimensionalen DC zur Detektion der radioaktiven Substanzen sowie die Anfärbung der "kalten" Referenzsubstanzen auf der DC-Platte im Joddampf ergab, daß eines der beiden starken Signale in beiden Dimensionen das gleiche Laufverhalten wie die Hopenreferenz zeigte. Das zweite Signal stimmte in seinem Laufverhalten in beiden Dimensionen mit dem des Squalens überein. Bei einem dritten Signal, welches sich in beiden Laufmitteln nur wenig vom Startpunkt entfernte, handelte es sich wahrscheinlich um Diplopterol.

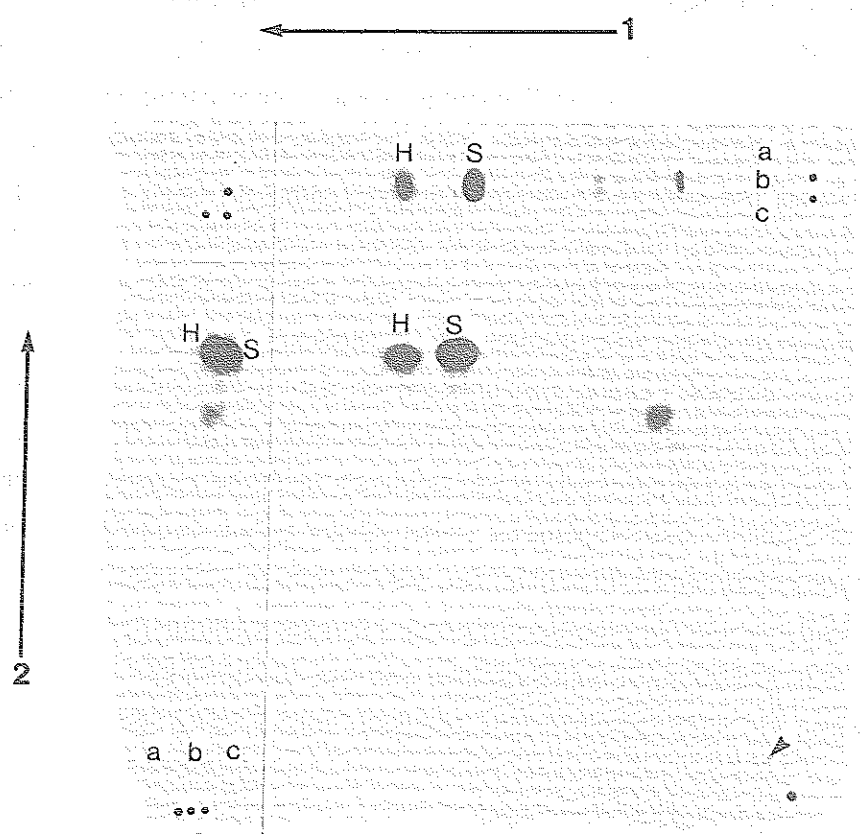


Abb.III.11:
Nachweis der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität im Rohextrakt des rekombinanten *E.coli*-Stammes DH5/pZY611 durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Abgebildet ist die Autoradiographie der DC-Platte. Der Pfeil 1 markiert die Laufrichtung des 1. Laufmittelsystems (Chloroform, Hexan), Pfeil 2 markiert die Laufrichtung des 2. Laufmittels (Ethylessigester/Hexan); a, Hopenreferenz; b, Extrakt des Reaktionsansatzes; c, Squalen-Referenz. Die "kalten" Referenzsubstanzen (auf der Autoradiographie nicht sichtbar) wurden auf der DC-Platte im Joddampf angefärbt. Der kleine Pfeil markiert den Punkt des Probenauftrags, bei den kleinen Punkten handelt es sich um Orientierungshilfen (radioaktive Tinte), H = Hopen, S = Squalen.

2.3 Enzymtests mit Farnesylpyrophospat (FPP) bzw. Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) als Substrat

Da zunächst die Vermutung bestand, daß es sich bei dem Leseraster *orf3*, das sich in 5'-Richtung vor dem *shc*-Gen befand, um das Gen für die Squalen-Synthase handelte, wurden Enzymtests durchgeführt, um festzustellen, ob plasmidcodierte Kopien des *orf3*-Leserasters eine Squalen-Synthaseaktivität vermittelten. Dazu wurden die Rohextrakte der verschiedenen *Z.mobilis* und *E.coli*-Stämme mit ^{3}H-FPP bzw. ^{14}C-IPP und DMAPP als Substrate inkubiert. Bei der Inkubation der Rohextrakte der *Z.mobilis*-Stämme CP4 und CP4/pZY603 mit ^{3}H-FPP als Substrat unter Zusatz von NADPH trat ein deutlicher Umsatz des FPP zum Squalen auf (Abb.III.12). Diese Reaktion wurde durch die Squalen-Synthase katalysiert. Das gebildete Squalen wurde durch die Squalen-Hopen-Cyclase zu einem großen Teil zum Hopen cyclisiert. Im Falle des rekombinanten Stammes CP4/pZY603 war der Umsatz von FPP zu Squalen und Hopen deutlich gegenüber dem Umsatz im Wildtyp erhöht. Dieses Ergebnis sprach zunächst dafür, daß es sich bei dem offenen Leseraster *orf3* um das Gen für die Squalen-Synthase in *Z.mobilis* handelte. Der *E.coli*-Wildtyp zeigte im Enzymtest keine nachweisbare Squalen-Synthaseaktivität (JENNINGS et al., 1991). Auch im rekombinanten Stamm DH5/pZY603 trat keine durch die plasmidcodierten Kopien des *orf3* vermittelte Squalen-Synthaseaktivität auf. Es fand kein Umsatz des FPP zum Squalen statt, und es war kein Hopen nachweisbar. Dieses Ergebnis und die Analyse der Sequenzdaten des *orf3* (siehe 3.1) zeigten, daß es sich bei *orf3* nicht um das Gen für die Squalen-Synthase handelte. Die Inkubation der Rohextrakte mit ^{14}C-IPP und DMAPP als Substraten führte zu entsprechenden Ergebnissen. In den Rohextrakten der *Z.mobilis*-Stämme erfolgte der Umsatz der Substrate bis zum Squalen und Hopen (Abb.III.13). Außer der Squalen-Synthase und der Squalen-Hopen-Cyclase war demnach auch die Farnesylpyrophosphat-Synthase aktiv. Neben dem Squalen- und Hopenpeak traten stärker polare Produktpeaks auf, bei denen es sich um die dephosphorylierten Produkte der FPP-Synthase Geraniol und Farnesol handelte. Auch in diesem Fall war der Umsatz der Substrate im rekombinanten *Z.mobilis*-Stamm höher als im Wildtyp. In den getesteten *E.coli*-Extrakten trat nur ein geringer Umsatz der Substrate zu Geraniol und Farnesol auf. Detektierbare Mengen von Squalen oder Hopen wurden nicht gebildet.

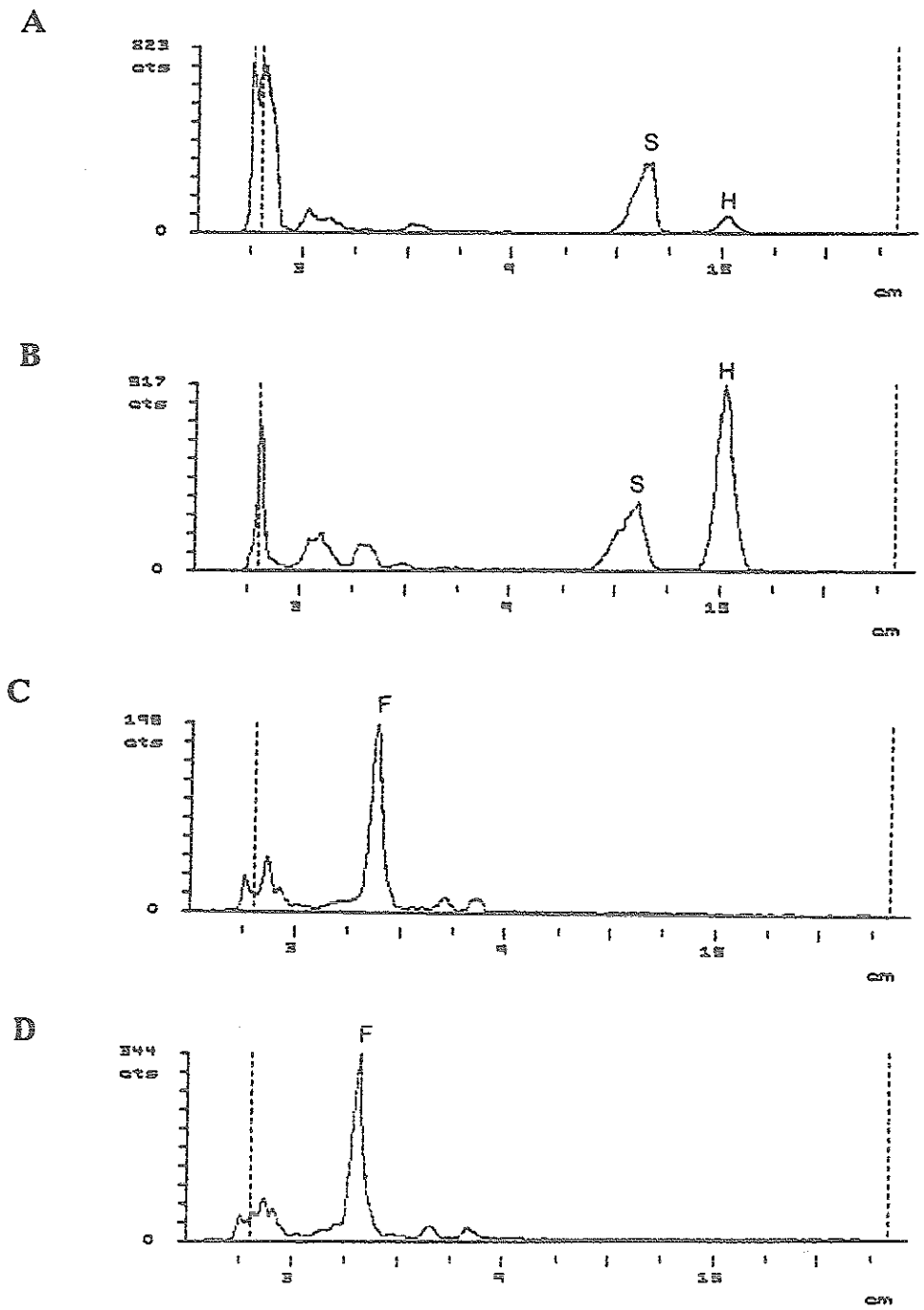


Abb.III.12: Versuche zum Umsatz von FPP/^{3}H-FPP in Rohextrakten verschiedener *Z.mobilis*- und *E.coli*-Stämme zum Nachweis einer Squalen-Synthaseaktivität. Dargestellt sind die Auswertungen von Dünnschichtchromatogrammen durch den Radioscanner. A, *Z.mobilis* CP4-Wildtyp; B, CP4/pZY603; C, *E.coli* DH5/pZY507; D, DH5/pZY603; Inkubationsdauer 2 h. Proteinkonzentrationen in den Reaktionsansätzen: A, 4 mg/ml; B, 2 mg/ml; C und D, 3 mg/ml; F = Farnesol, sonst Bezeichnungen und Erläuterungen wie in Abb.III.9. Bei dem Peak auf den Startlinien handelt es sich um FPP, das aufgrund seiner Polarität im verwendeten Laufmittelsystem auf der Startlinie liegen bleibt. Im Fall von C und D wurden die Reaktionsansätze nach der Inkubationszeit mit alkalischer Phosphatase behandelt, so daß nicht umgesetztes FPP zum größten Teil in den Alkohol Farnesol überführt wurde. Peaks ohne Markierung wurden nicht näher identifiziert.

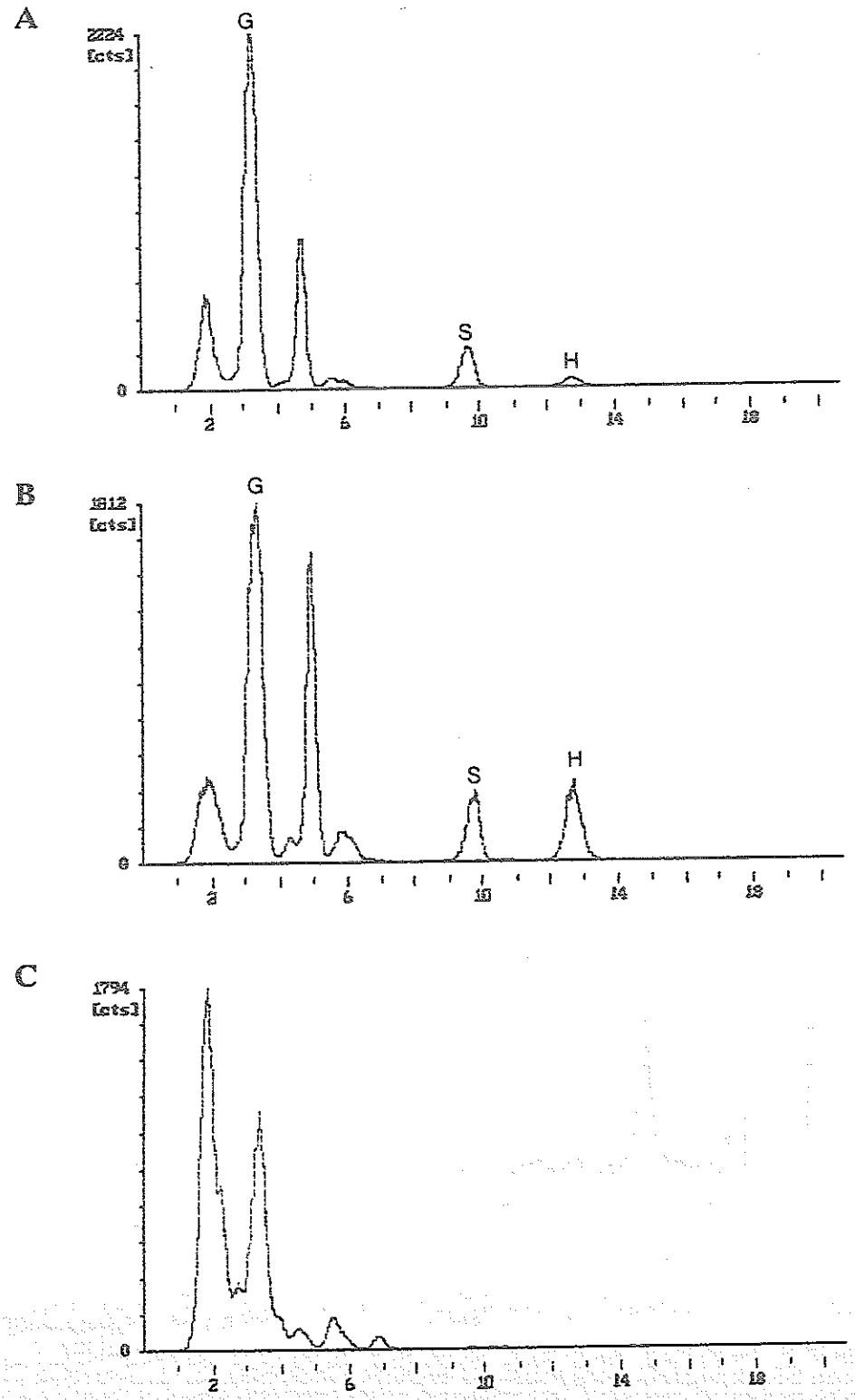
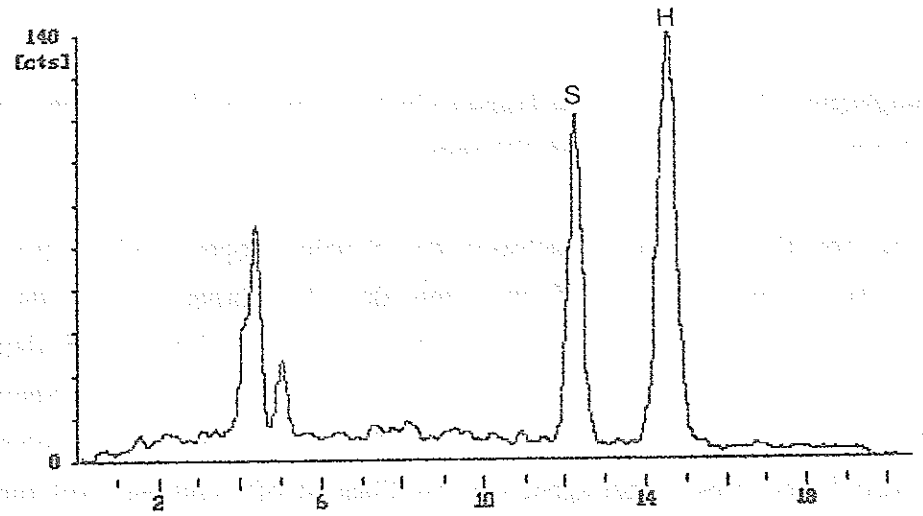


Abb.III.13: Versuche zum Umsatz von ^{14}C-IPP und DMAPP in Rohextrakten verschiedener *Z.mobilis*- und eines *E.coli*-Stammes. A, *Z.mobilis* CP4-Wildtyp; B, CP4/pZY603; C, *E.coli* DH5/pZY603; Inkubationszeit 4 h; Bezeichnungen und Erläuterungen wie Abb.III.9. Bei den mit G bezeichneten Peaks handelt es sich wahrscheinlich um Geraniol. Peaks ohne Bezeichnung wurden nicht näher identifiziert.

2.4 Immunologischer Test auf Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* in Rohextrakten verschiedener *Z.mobilis*- und *E.coli*-Stämme

Zur Überprüfung der Frage, ob ein Nachweis der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* in *Z.mobilis* und rekombinanten *E.coli*-Stämmen mit den Antikörpern gegen das Enzym aus *A.acidocaldarius* möglich war, d.h., ob eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem Protein aus *Z.mobilis* auftrat, wurden Rohextrakte der verschiedenen *Z.mobilis* und *E.coli*-Stämme in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zusätzlich wurde der Rohextrakt eines rekombinanten *E.coli*-Stammes aufgetragen, der das Plasmid pP2 enthielt. Auf diesem Plasmid befand sich das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius*. Die Expression dieses Gens in dem *E.coli*-Stamm war zuvor im SHC-Test nachgewiesen worden (Abb.III.14). Die Proteinbanden wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese Membran wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Poralla an der Universität Tübingen) behandelt. Die Ergebnisse dieses Immunoblottings ergaben, daß offensichtlich keine Kreuzreaktion der Antikörper gegen die SHC aus *A.acidocaldarius* mit der SHC aus *Z.mobilis* stattfand. In allen Extrakten traten schwache Banden auf, die wahrscheinlich auf unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen waren. In den Spuren des Rohextraktes der *E.coli*-Stämme, die das Plasmid pP2 enthielten, wurde eine Bande im Größenbereich unterhalb des 88 kDa-Molekulargewichtsmarkers stärker angefärbt. Hierbei handelte es sich um die Squalen-Hopen Cyclase aus *A.acidocaldarius*. Im Stamm NM522/pP2 trat ein zusätzliches Signal im Bereich von 38 kDa auf. Möglicherweise stellte diese Bande ein Abbauprodukt der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* in *E.coli* dar. Im Falle der Rohextrakte aus CP4 und CP4/pZY603 trat keine deutlich gefärbte Bande im erwarteten Größenbereich auf. Das prominenteste Signal lieferte eine Bande im Größenbereich oberhalb des 33,5 kDa-Markers. Dieses Ergebnis stimmte mit einer Beobachtung von OCHS (OCHS, Dissertation, 1990) überein, der die SHC-Antikörper ebenfalls gegen Proteine aus *Z.mobilis* (lyophilisierte Zellen) hybridisierte. Hierbei trat ebenfalls ein Signal bei etwa 30 kDa auf. Der Vermutung, daß es sich hierbei um ein Abbauprodukt der Cyclase in *Z.mobilis* handelte, stand entgegen, daß diese Bande im rekombinanten Stamm nicht deutlich stärker hervortrat als im Wildtyp, und daß eine gefärbte Bande dieser Größe bei den rekombinanten *E.coli*-Stämmen, die das *shc*-Gen aus *Z.mobilis* exprimierten, nicht auftrat.

A)



B)

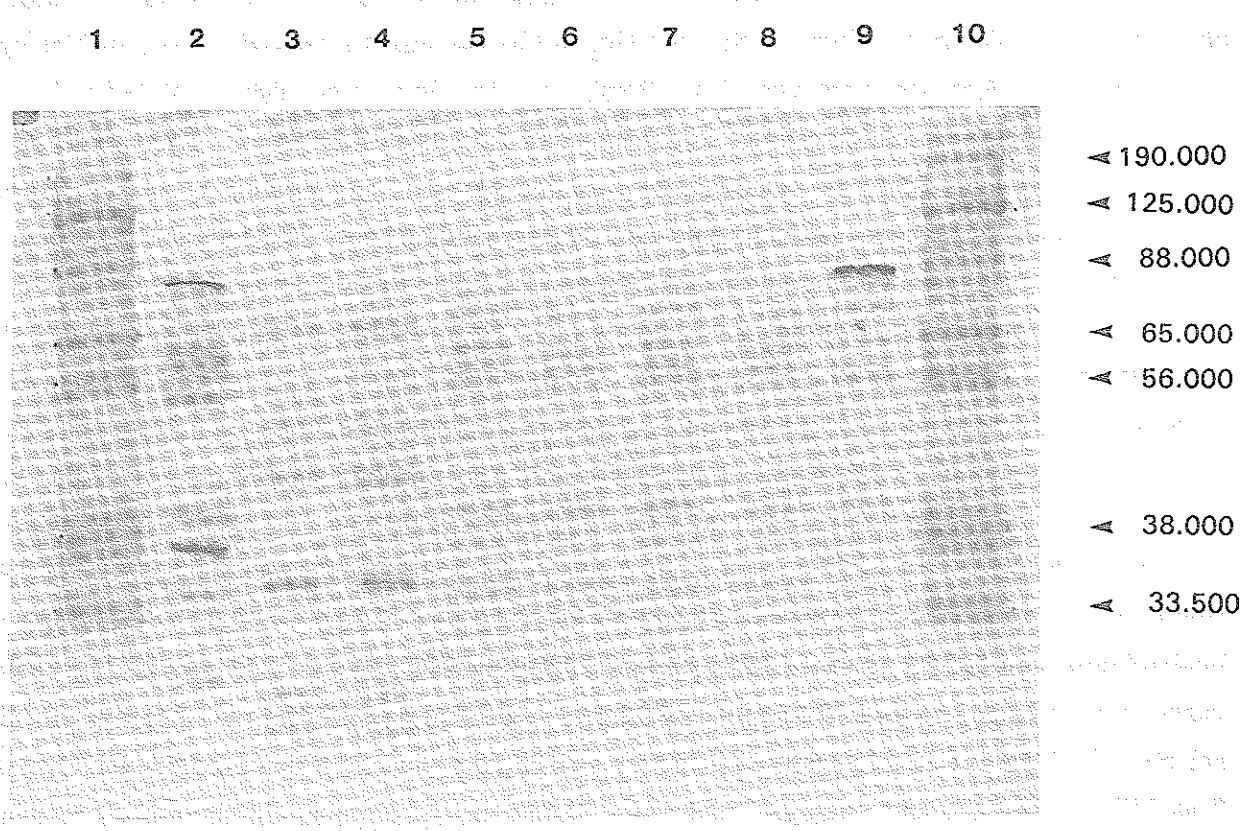


Abb.III.14:

A) Nachweis der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität im Rohextrakt eines rekombinanten *E.coli*-Stammes, der das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* plasmidcodiert enthält (JM109/pP2). Bezeichnungen wie Abb.III.9. Die Inkubationszeit betrug 1 h.

B) Immunoblot von Rohextrakten verschiedener *E.coli*- und *Z.mobilis*-Stämme nach Behandlung mit Antikörpern gegen die SHC aus *A.acidocaldarius*. Spur1) und 10), Molekulargewichtsstandards; 2) *E.coli* NM522/pP2, enthält das Gen für die SHC aus *A.acidocaldarius*; 3) CP4-Wildtyp; 4) CP4/pZY603; 5) *E.coli* JM109/pUC19; 6) JM109/pZY604, enthält das *shc*-Gen aus *Z.mobilis* als PCR-Fragment in pUC19; 7) JM109/pZU601; 8) JM109/pZY611; 9) JM109/pP2.

3. Charakterisierung der zum *shc*-Gen benachbarten Gene

3.1 Charakterisierung des offenen Leserasters *orf3* aufgrund der Sequenzdaten

Auf dem klonierten 4,3 kb HindIII-Fragment wurde in 5'-Richtung vor dem *shc*-Gen ein weiterer offener Leseraster lokalisiert. Vor dem ATG-Startcodon dieses Leserasters in Position 45 des HindIII-Fragmentes befindet sich im Abstand von 12 bp eine mögliche Ribosomenbindestelle (GAAGG). Der Leseraster endet in Position 1289 mit einem TAA-Stoppcodon und codiert 414 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 45,5 kDA. Der G+C-Gehalt des Gens beträgt 46,6%. Mit einem Anteil hydrophober Aminosäuren an der Aminosäurezusammensetzung von 32% hat das ORF3 insgesamt einen hydrophoben Charakter. Die Durchführung eines Hydrophobizitäts-Plots, wobei der Mittelwert der Hydrophobizität über neun Aminosäuren berechnet wurde (KYTE & DOOLITTLE, 1982), führte zur Identifizierung von zwei hydrophoben Regionen (As 3-22 VTHIIGAGLAGLSAAVAITH, As 253-269 VIIALPAWVVQSLIPDI, Abb.III.15).

Während es sich bei der hydrophoben Region im Bereich der Aminosäurereste 253 - 269 um eine Transmembranhelix handeln könnte, ergaben Datenbank-Recherchen, daß die aminoterminale hydrophobe Region (As 3 - 22) zu einer möglichen FAD/NADP-Bindungsstelle gehört. Die Datenbank-Recherche (FASTA-Programm, EMBL/SWISSPIR-Proteindatenbank, August-September 1993) erbrachte folgende Befunde: Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *orf3* zeigt Übereinstimmungen mit Phytoendehydrogenasen verschiedener Organismen (Abb.III.16). Auch zu einer möglichen Squalendehydrogenase aus *Staphylococcus aureus* (WIELAND et al., Veröffentlichung eingereicht) bestehen Ähnlichkeiten.

Besonders auffällig ist das Vorhandensein der FAD/NADP-Bindungsstelle am Aminoterminus aller Dehydrogenasen (Domäne I). Diese FAD/NADP-Bindungsstelle tritt vollständig konserviert auch am Aminoterminus der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *orf3* auf. Der Vergleich der verschiedenen Dehydrogenasen demonstriert das Auftreten weiterer konservierter Aminosäuren, die zumindest zum Teil auch im ORF3 erhalten sind. Eine weitere Domäne (II), die in allen anderen Dehydrogenasen gut konserviert ist, fehlt jedoch im ORF3 vollständig (zur möglichen Funktion dieser Domäne siehe IV.3).

```
                        ______________I______________
ZmORF3        MSVTHIIGAGLAGLSAAVAITHAGGRVKIYEASAMAGGRARSYHDKKLGIEIDNGNHMLLSGNHSAKTYLKRIGAEHRFKSPKEAA
Sau-D          MKIAVIGAGVTGLAAAARIASQGHEVTIFEKNNNVGGRHNQL--KKDGFTFDMGPTIVMMPDVYKDVF-TACGKNYE-DYIELRQ
CrtDRc      MRSETDVVVIGARMGGLAAAIGAAAAGLRVTVVEAGDAPGGKARAV--PTPGGPADTGPTVLTMRHVLDALF-AACGTRAE-EHLTLIP
CrtIEu         MKPTTVIGAGFGGLALAIRLQAAGIPVLLLEQRDKPGGRAYVY--EDQGFTFDAGPTVITDPSAIEELF-ALAGKQLK-EYVELLP
CrtIEh         MKKTVVIGAGFGGLALAIRLQAAGIPTVLLEQRDKPGGRAYVW--HDQGFTFDAGPTVITDPTALEALF-TLAGRRME-DYVRLLP
CrtIRc   MSKNTEGMGRAVVIGAGLGGLAAAMRLGAKGYKVTVVDRLDRPGGRGSSI--TKGGHRFDLGPTIVTVPDRLRELW-ADCGRDFD-KDVSLVP
NcAl1     MAETQRPRSAIIVGAGAGGIAVAARLAKAGVDVTVLEKNDFTGGRCSLI-HTKAGYRFDQGPSLLLLPGLFRETF-EDLGTTLEQEDVELLQ
                  ***** **** * *   *  *   *  *  ***         *   * ***          *    *         *

ZmORF3   ------------------------------FSFCDLSDKE-RFTIKLSNGPLPWWVLCAKS--------RVPHSKAKDYLALLSLLLADHNTK
Sau-D    LRYIYDVYFDHDDRITVPTDLAELQQMLESIEPGSTHG--FMSFLTDVYKKYEIARRYFLE----RTYRKPSDFYNMTSLVQGAKLKTLNHAD
CrtDRc   LPRLARHFWPDGSSLDLFTD-TEANIEAIRAFAGDKEAAAFRRFDHLTTGLWEAFHRSVIA------APKPDLWRIAAATVTRPQLWPALRPG
CrtIEu   VTPFYRLCWESGKVFNYDNDQTRLEAQIQQFNPRDVEG--YRQFLDYSRAVFKEGYLKLGT------VPFLSFRDMLRAAPQLAKLQAWRSVY
CrtIEh   VKPFYRLCWESGKTLDYANDSAELEAQITQFNPRDVEG--YRRFLAYSQAVFQEGYLRLGS------VPFLSFRDMLRAGPQLLKLQAWQSVY
CrtIRc   MEPFYTIDFPDGEKYTAYGDDAKVKAEVARISPGDVEG--FRHFMWDAKARYEFGYENLGR------KPMSKLWDLIKVLPTFGWLRADRSVY
NcAl1    CFPNYNIWFSDGKRFSPTTDNATMKVEIEKWEGPD--G--FRRYLSWLAEGHQHYETSLRHVLHRNFKSIELLADPRLVVTLLMALHPFESIW
                 *      *             * *   * *                                                  *

ZmORF3   IGDLVPD----NTALWRKLLDPFFVSVLNTPAREGAACLAAAVIR----ETLMKGGKACIPRIAYPNLASSFIDPALDYLKARGVE------V
Sau-D    QLIEHYI----DNEKIQKLLAPQTLYIGIDPKRGPSLYSIIPMIEMMFGVHFIKGGHYGHAQGLAQLNKDLGVNIELNAEIEQIII------D
CrtDRc   LTMRDLLAHHFKDPRLAQLFGRYATYVGGRPGATPAVLSLIWQAEVQ-GVWAIREGMHGVAAALARVAEAKGVRFHYGAKAKRIVR------K
CrtIEu   SKVASYI----EDEHLRQAFSFHSLLVGGNPFATSSIYTLIHALEREWGVWFPRGGTGALVQGMIKLFQDLGGEVVLNARVSHMET------T
CrtIEh   QSVSRFI----EDEHLRQAFSFHSLLVGGNPFTTSSIYTLIHALEREWGVMFPEGGTGALVNGMVKLFTDLGGEIELNARVEELVV------A
CrtIRc   GHAKKMV----KDDHLRFALSFHPLFIGGDPFHVTSMYILVSQLEKKFGVHYAIGGVQAIADAMAKVITDQGGEMRLNTEVDEILV-----SR
NcAl1    HRAGRYF----KTDRMQRVFTPATMYMGMSPFDAPATYSLLQYSELAEGIWYPRGGFHKVLDALVKIGERMGVKYRLNTGVSQVLTDGGKNGK
                                   * *     * *   *  **   **              *   **

                                                  ____________________
ZmORF3   DFRNRLRQIHFSGQ-----DVASL-EFAHQDVKLGKGDKVIIALPAWVV----QSLIPDIETPDKYQ-----AIINAH---FLMKPTAAMPHI
Sau-D    PKFKRADAIKVNGDIRKFDKILCTADFPSVAESLMPDFAPIKKYPPHKIADLDYSCSAFLMYIGIDI--DVTDQVRLHNVIFSDDFRGNIEEI
CrtDRc   -EGRVTAVEIETGVSIPCGACIFNGDPGALRDGLLG---DAARASMEKSPRPAPSLSAWVWAFGATP---IGVDLAHHNVFFTADP-ELEFGP
CrtIEu   -GNKIEAVHLEDGRRFLTQAVASNADVVHTYRDLLSQ-HPAAVKQSNKLQTKRMSNSLFVLYFGLNH---HHDQLAHHTVCFGPRYRELIDEI
CrtIEh   -DNRVSQVRLADGRIFDTDAVASNADVVNTYKKLLGH-HPVGQKRAAALERKSMSNSLFVLYFGLNQ---PHSQLAHHTICFGPRYRELIDEI
CrtIRc   -DGKATGIRLMDGTELPAQVVVSNADAGHTYKRLLRN-RDRWRWTDEKLDKKRWSMGLFVWYFGTKGTAKMWKDVGHHTVVVGPRYKEHVQDI
NcAl1    -KPKATGVQLENGEVLNADLVVVHADLVYTYNNLLPKEIGGIKKYANKLNNRKASCSSISFYWSLSG---MAKELETHNIFLAEEYKESFDAI
                 *      *  ***      **                  * *   * *            *  *    *   *

         ________________II_________________
ZmORF3   ----------------------------------------MGVVGGTADWIFTFENRISVTISAANHLLALEKEEL-VKRIWDDIQTVYAF
Sau-D    FE-GRLSYDPSIYVYVPAVADKSLAPEGKTGIYVL-MPTPELKTGSGI--DWSDEALTQQIKEIIYRKLATIEVFEDIKSHIVSETIFTPNDF
CrtDRc   IGAGEMPEEPTLYICAQDREMQAPVPEIERFEIINMGPAGHQPFP-------QEEA---QCRARTFPMLAAMGLTFSPDPE--TRALTTPALL
CrtIEu   FNHDGLAEDFSLYLHAPCVTDSSLAPEGCGSYYVL-APVPHLGTANL---DWTVEG---PKLRDRIFAYLEQHYMPGLRSQLVTHRMFTPFDF
CrtIEh   FTGSALADDFSLYLHSPCVTDPSLAPPGCASFYVL-APVPHLGNAPL---DWAQEG---PKLRDRIFDYLEERYMPGLRSQLVTQRIFTPADF
CrtIRc   FIKGELAEDMSLYVHRPSVTDPTAAPKGDDTFYVL-SPVPNLGFDMGV--DWSVEA---EKYKAKVLKVIEERLLPGVAEKITEEVVFTPETF
NcAl1    FERQALPDDPSFYIHVPSRVDPSAAPPDRDAVIAL-VPVGHLLQNGQPELDWPTLV---SKARAGVLATIQARTGLSLSPLITEEIVNTPYTW
         *   * * * *  *   *  **       * *   *       **                                          ** *

ZmORF3   KQDMPKWQVVTEKRATFEATVEQNNRRPPAVTAWNNLFLAG--NWVRTGLPATIESAIRS-GQTAADLALSHS*
Sau-D    -EQTYHAKFGSAFGLMQL*
CrtDRc   -SRRFPGSLGAIYGGSPEGTL-ATFRRPLARTGLKGLYLAGGGTHPGAGVPMALTSGTHAARALLADRISAAK*
CrtIEu   -RDQLNAYHGSAFSVEPVLTQSAWFRPHNRDKTITNLYLVGAGTHPGAGIPGVIGSAKATAGLMLEDLI*
CrtIEh   -HDTLDAHLGSAFSIEPLLTQSAWFRPHNRDSDIANLYLVGAGTHPGAGIPGVVASAKATASLMIEDLQ*
CrtIRc   -RDRYLSPLGAGFSLEPRILQSAWFRPHNASEEVDGLYLVGAGTHPGAGVPSVIGSGELVAQ-MIPDAPKPETPAAAAPKARTPRAKAAQ*
NcAl1    -ETKFNLSKGAILGLAHDFFNVLAFRPRTKAQGMDNAYFVGASTHPGTGVPIVLAGAKITAE-QILEETFPKNTKVPWTTNEERNSERMRKEMD
                *            **          ** *  **** * *   *

NcAl1    EKITEEGIIMRSNSSKPGRRGSDAFEGAMEVVNLLSQRAFPLLVALMGVLYFLLFVR*
```

Abb.III.16: (vorhergehende Seite) Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *orf3* mit Aminosäuresequenzen verschiedener Phytoen-Dehydrogenasen sowie einer möglichen Squalen-Dehydrogenase.
Identische Aminosäurereste in mindestens fünf der sieben verglichenen Sequenzen sind durch * gekennzeichnet. Die aminoterminale FAD/NADP-Bindungsstelle ist durch eine Linie ober- und unterhalb der Aminosäuresequenzen markiert und als Domäne I bezeichnet. Ebenfalls durch eine Linie ober- und unterhalb der Aminosäuresequenzen ist ein zweiter gut konservierter Bereich gekennzeichnet (II), der aber im ORF3 vollständig fehlt. Durch eine Linie oberhalb der Sequenzen ist eine weitere hydrophobe Region markiert, bei der es sich um eine Transmembranhelix handeln könnte. ZmORF3: abgeleitete Aminosäuresequenz des *orf3* aus *Z.mobilis*, Sau-D: Squalen-Dehydrogenase aus *Staphylococcus aureus* (WIELAND et al., Veröffentlichung eingereicht), CrtIRc und CrtDRc: Phytoen- und Methoxyneurosporen-Dehydrogenasen aus *Rhodobacter capsulatus* (ARMSTRONG et al., 1989), CrtIEu: Phytoen-Dehydrogenase aus *Erwinia uredovora* (MISAWA et al., 1990), CrtIEh: Phytoen-Dehydrogenase aus *Erwinia herbicola* (ARMSTRONG et al., 1990), NcAl1: Phytoen-Dehydrogenase aus *Neurospora crassa* (SCHMIDHAUSER et al., 1990).

3.2 Klonierung und Sequenzierung eines weiteren mit dem bereits klonierten HindIII-Fragment überlappenden chromosomalen DNA-Fragmentes aus *Z.mobilis*

Der geringe Abstand (14 bp) zwischen dem Ende des *orf3* und dem Beginn des *shc*-Leserasters legte die Vermutung nahe, daß beide Leseraster als Operon organisiert vorlagen. Da in bisher allen untersuchten prokaryontischen Organismen die Gene der Carotinoid-Biosynthese in Form großer Gencluster vorliegen (ARMSTRONG et al., 1989, MISAWA et al., 1990, HUNDLE et al., 1991), erschien es möglich, daß in *Z.mobilis* auch die Gene der Isoprenoid-Biosynthese als Gencluster oder Operon organisiert sind. Daher wurde ein weiteres chromosomales DNA-Fragment aus *Z.mobilis* isoliert, das mit dem bereits klonierten HindIII-Fragment überlappte. Da die DNA-Sequenz in 3'-Richtung hinter dem *shc*-Gen die Ausbildung einer Transkriptions-Terminationsstruktur ermöglichte und kein weiterer größerer offener Leseraster im Anschluß auf das *shc*-Gen folgte, konnten weitere Gene des Operons nur in 5'-Richtung vor *orf3* und *shc* lokalisiert sein. Zur Klonierung eines überlappenden DNA-Fragmentes wurde daher das in 5'-Richtung vor dem *shc*-Gen gelegene, terminale HindIII/EcoRV-Fragment als DNA-Sonde eingesetzt. Dieses Fragment umfaßte 851 bp. Mit Hilfe dieser DNA-Sonde wurde ein 4,5 kb großes SspI-Fragment kloniert, das in Southern-Hybridisierungen ein DNA-Hybrid mit der Sonde bildete (Abb.III.17).
Die Klonierung dieses Fragmentes erfolgte nach der Anlage einer partiellen SspI-Genbank aus *Z.mobilis* in dem mit SmaI linearisierten Vektor pUCBM20 durch Koloniefilter-Hybridisierung. Das klonierte SspI-Fragment überlappte in einem Bereich von 2647 bp mit dem bereits klonierten HindIII-Fragment und reichte mit 1841 bp darüber hinaus. Dieser zusätzliche DNA-Bereich

wurde bis auf 150 bp am 5'-Terminus, die nur einzelsträngig sequenziert wurden, doppelsträngig sequenziert. Die Restriktionskarte des Fragmentes und die Sequenzierungsstrategie sind der Abb.III.18 zu entnehmen. Auch in diesem Fall wurden Plasmide mit subklonierten Restriktionsfragmenten und durch Exonuklease III verkürzte Fragmente zur Sequenzierung verwendet.

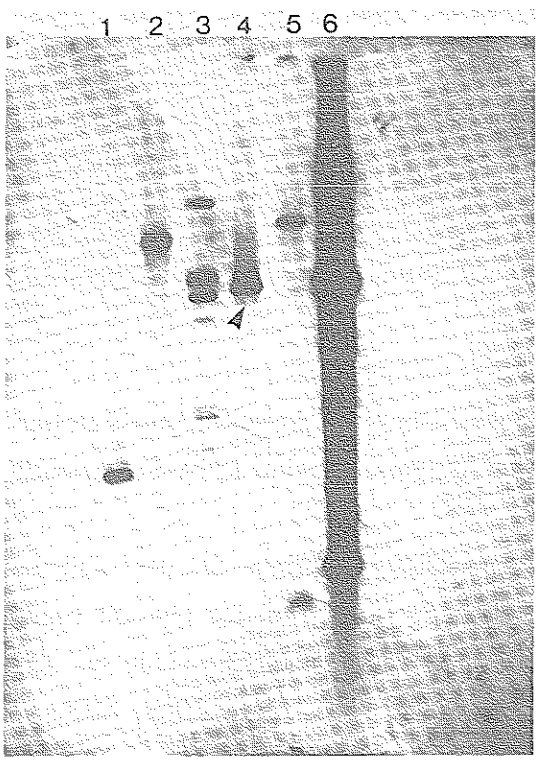


Abb.III.17: Southern Hybridisierung zur Identifizierung eines chromosomalen Restriktionsfragmentes aus *Z.mobilis*, das mit dem bereits klonierten HindIII-Fragment überlappt. Als DNA-Sonde wurde das terminale HindIII/EcoRV-Fragment des HindIII-Fragmentes eingesetzt, das in 5'-Richtung vor *orf3* und *shc* liegt. (1) CP4/EcoRV, (2) CP4/SmaI, (3) Molekulargewichtsstandard λ/EcoRI/HindIII mit Digoxigenin markiert, (4) CP4/SspI, (5) CP4/StuI, (6) pZY612 ungeschnitten als positive Kontrolle, mit einem Pfeil markiert ist das 4,5 kb große SspI-Fragment, das im folgenden kloniert wurde.

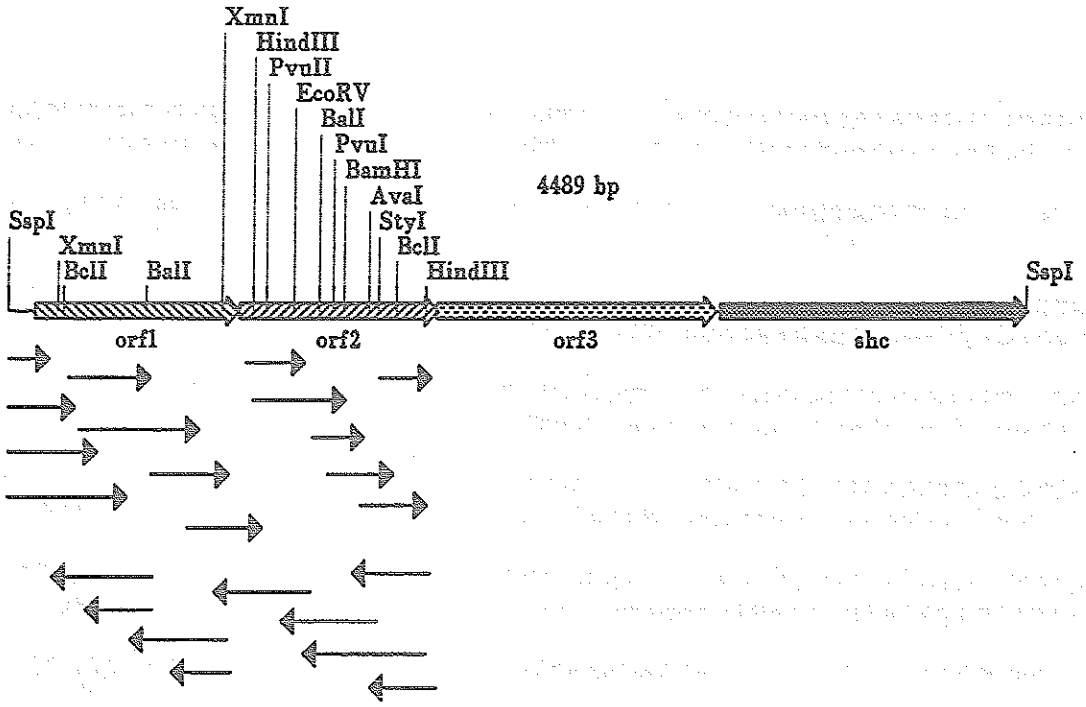


Abb.III.18: Restriktionskarte des klonierten chromosomalen SspI-Fragmentes aus *Z.mobilis*, das mit dem bereits klonierten HindIII-Fragment überlappt. Das SspI-Fragment umfaßt 4,5 kb. Die Pfeile stellen die Sequenzierungsstrategie für den zusätzlichen, neuen Bereich dar. Angegeben ist auch die Lage der durch die Sequenzierung identifizierten offenen Leseraster *orf1* und *orf2*.

Die Ermittlung der Nukleotidsequenz ergab, daß sich auf dem klonierten Fragment zwei weitere offene Leseraster befanden (Abb.III.19).

```
CATTACATTTTTATCACCGCTCTCCTCTTTGGGGTTTAGCGCTTCCCTTAATTGCGGCCT-   60
  LeuHisPheTyrHisArgSerProLeuTrpGlyLeuAlaLeuProLeuIleAlaAlaP

TTTATAGCTGTGCGACATTTTTTTCTGCCGTGCATGTCTGGCAAGGGCGAGGCGGTATGT-  120
heTyrSerCysAlaThrPhePheSerAlaValHisValTrpGlnGlyArgGlyGlyMetT
                                                        ORF1

GGAAGGGGCGTGCGCAAGCACGTAATAGGTCTGTGAGTATTAAAACAAAAAACAAGCTAA-  180
rpLysGlyArgAlaGlnAlaArgAsnArgSerValSerIleLysThrLysAsnLysLeuA

ATGCAGCCGCTTTGGTTTCTGGAAAAGGACATCAGGATGAAAATTTTCCGGTGGCTTCTT-  240
snAlaAlaAlaLeuValSerGlyLysGlyHisGlnAspGluAsnPheProValAlaSerP

TTCTGATCAATCCCGAATATCGGCCTATTATTATGGCATTCTATCAGTTTGCCCGCCAAG-  300
heLeuIleAsnProGluTyrArgProIleIleMetAlaPheTyrGlnPheAlaArgGlnA

CTGATGATGTCGCTGATAATGTGATCGCAAGCAAAAAAGACCGCTTGGCTATCCTTGAGG-  360
laAspAspValAlaAspAsnValIleAlaSerLysLysAspArgLeuAlaIleLeuGluA

ATATGCGCAGCAGTTTGACAGGCGAAAGCCAGAGCGAGCCTAATGCCGTTGTCTTGCGCC-  420
spMetArgSerSerLeuThrGlyGluSerGlnSerGluProAsnAlaValValLeuArgG
```

AGACTTTGATAAACCATGGTCTCGATCATACGATTGTTCATGGTCTTGATCTGTTGGAAG- 480
lnThrLeuIleAsnHisGlyLeuAspHisThrIleValHisGlyLeuAspLeuLeuGluA

CCTTCCGGCGTGATGTATCCGTCAATCGTTACGAAAATTGGGACGCTTTGATGGATTATT- 540
laPheArgArgAspValSerValAsnArgTyrGluAsnTrpAspAlaLeuMetAspTyrC

GCCGTTATTCGGCCTCTCCTGTTGGGCGCTTTGTTTTGGATGTCCATAAGGAATCCCGTA- 600
ysArgTyrSerAlaSerProValGlyArgPheValLeuAspValHisLysGluSerArgA

ACCTTTGGCCAATGAATGATGCTTTATGCACGGCTTTACAGGTCATCAATCATCTTCAGG- 660
snLeuTrpProMetAsnAspAlaLeuCysThrAlaLeuGlnValIleAsnHisLeuGlnA

ATTGCGGTAAAGATTATCGCATGATGAACCGTATTTATATCCCAAGCGATATTATGGAAG- 720
spCysGlyLysAspTyrArgMetMetAsnArgIleTyrIleProSerAspIleMetGluA

CGGTGGGTGCTACCGCTGGAGATTTAGGCTGTTTCCATGCCTCATTGCCTTTACGTCAGG- 780
laValGlyAlaThrAlaGlyAspLeuGlyCysPheHisAlaSerLeuProLeuArgGlnA

CTATTGAGACCGCTGCCTTGAAAACAAAATCTCTTTTGAAACGGTCTTCTAGTTTTTCTG- 840
laIleGluThrAlaAlaLeuLysThrLysSerLeuLeuLysArgSerSerSerPheSerV

TCGCTATTCACGACAAGCGGTTGGGGGTTGAAGTCGCGGTTATCCAACGCTTGGCGGAAA- 900
alAlaIleHisAspLysArgLeuGlyValGluValAlaValIleGlnArgLeuAlaGluS

GCCTGACCGAATGTTTAACTAAGCATGATCCGTTATCCGAACGGGTTCACCATAATAAAG- 960
erLeuThrGluCysLeuThrLysHisAspProLeuSerGluArgValHisHisAsnLysA

CTGAAACTTTGGGACTGGCCTTTGTCGCCGCCGCAGGGAGATTATTTTCTTAATGACTTC-1020
laGluThrLeuGlyLeuAlaPheValAlaAlaAlaGlyArgLeuPheSerEndEnd
MetThrSe
ORF2

GGCCATGAAAAAGATTCAGCCAGAGGCTTTTTCCGAAAAATCATCGGATAGCCAAGCTTC-1080
rAlaMetLysLysIleGlnProGluAlaPheSerGluLysSerSerAspSerGlnAlaSe

GGTCAGCGGTGCAAAAAGCAGCAGCTTCTATATCGGTATGCGGGTTTTGCCGCCAGCTGA-1140
rValSerGlyAlaLysSerSerSerPheTyrIleGlyMetArgValLeuProProAlaGl

GCGGGAAGCGATGTATGCTATTTACAACTTCTGTCGCCAAGTGGATGACATTGCCGATGA-1200
uArgGluAlaMetTyrAlaIleTyrAsnPheCysArgGlnValAspAspIleAlaAspAs

TCTGGAAGGCAGCCAAGAGGAAAGAAAGCAAGCGCTTGACGCATGGCGGCATGATATCAA-1260
pLeuGluGlySerGlnGluGluArgLysGlnAlaLeuAspAlaTrpArgHisAspIleAs

TGCCCTTTACGCTGGTGAGCCCTGCGGACAGGCCGCTTTTCTGAAAGAACCGGTTGCCCG-1320
nAlaLeuTyrAlaGlyGluProCysGlyGlnAlaAlaPheLeuLysGluProValAlaAr

TTTCCATTTGAGACAAGAAGATTTTATTGCCGTTATTGACGGTATGGCCATGGATTTGAA-1380
gPheHisLeuArgGlnGluAspPheIleAlaValIleAspGlyMetAlaMetAspLeuLy

GGGGCCTATCGTTTTTCCTGATGAAGCAACCCTTGATCTTTATTGCGATCGCGTTGCTTC-1440
sGlyProIleValPheProAspGluAlaThrLeuAspLeuTyrCysAspArgValAlaSe

GGCTGTCGGGCGGCTGTCTGTCTATGTTTTTGGCATGGATCCCAATATAGGGGAATCTTT-1500
rAlaValGlyArgLeuSerValTyrValPheGlyMetAspProAsnIleGlyGluSerLe

GGCTTACCATCTTGGCCGAGCGTTACAATTAACCAATATCTTGCGTGATATTGACGAAGA-1560
uAlaTyrHisLeuGlyArgAlaLeuGlnLeuThrAsnIleLeuArgAspIleAspGluAs

```
TGCCGAAATCGGGCGTTGTTATCTGCCTCGGGAACCGCTTGAAAAAGCCGGTATTCCATT-1620
pAlaGluIleGlyArgCysTyrLeuProArgGluProLeuGluLysAlaGlyIleProLe

GGATATTGAAAAAGCCTTGGCTGATCCACGTCTCGACAAGGTTTGCCGTGATCTCGCTTG-1680
uAspIleGluLysAlaLeuAlaAspProArgLeuAspLysValCysArgAspLeuAlaTr

GCAGGCCGAAGGGCATTATGCGGCCTCTGATCATATTATCCATAATCGCCCCAAAGGCTA-1740
pGlnAlaGluGlyHisTyrAlaAlaSerAspHisIleIleHisAsnArgProLysGlyTy

TTTGATTGCGCCTCGTTTGATGGCAGCAGCCTATTCTGCTTTATTGCGTAAAATGTTGGC-1800
rLeuIleAlaProArgLeuMetAlaAlaAlaTyrSerAlaLeuLeuArgLysMetLeuAl

GCAAGGGTGGAAAAATCCTCGGAAGAAAGTCAAACATAACAAGCTTGCCCTGTTATGGAC-1860
aGlnGlyTrpLysAsnProArgLysLysValLysHisAsnLysLeuAlaLeuLeuTrpTh
                                          HindIII

TTTGCTCAGATTGAAGGTGACTTCATGAGTGTAACGCATATTATCGGGGCGGGACTGGCT-1920
rLeuLeuArgLeuLysValThrSerEnd
                         MetSerValThrHisIleIleGlyAlaGlyLeuAla
                         ORF3

GGATTATCTGCCGCGGTAGCGATTACCCATGCTGGAGGACGCGTCAAAATTTATGAAGCC-1980
GlyLeuSerAlaAlaValAlaIleThrHisAlaGlyGlyArgValLysIleTyrGluAla

TCGGCCATGGCTGGGGGACG-2000
SerAlaMetAlaGlyGlyAr
```

Abb.III.19: Nukleotid-Sequenz des chromosomalen SspI-Fragmentes aus *Z.mobilis*, das mit dem bereits klonierten HindIII-Fragment, auf dem sich das *shc*-Gen befindet,überlappt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen, der auf dem SspI lokalisierten offenen Leseraster orf1 und orf2 sind im 3-Buchstabencode wiedergegeben. Dargestellt sind die ersten 2000 Basen des SspI-Fragmentes, der Übergang des SspI-Fragmentes in das HindIII-Fragment ist durch die HindIII-Schnittstelle markiert. Mögliche Ribosomenbindestellen sind unterstrichen. Das mögliche ATG/Met-Startcodon des ORF1 ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Der Startpunkt des ersten Leserasters *orf1* war nicht genau festzulegen. Möglicherweise beginnt er mit einem ATG-Startcodon an Position 117 des SspI-Fragmentes. Im Abstand von 8 bp befindet sich eine mögliche Ribosomenbindestelle (GAGG) vor dem Startcodon. Es läßt sich aber nicht ausschließen, daß das 5'-Ende des Leserasters über das klonierte SspI-Fragment hinausreicht. Das *orf1* endet an Position 1013 mit einem TAA-Stoppcodon, dem ein TGA-Stoppcodon folgt. Beide Stoppcodons überlappen mit dem Startcodon des sich anschließenden Leserasters *orf2*. Vor dem Startcodon des *orf2* befindet sich im relativ großen Abstand von 16 bp eine mögliche Ribosomenbindestelle (GGAGA). Das *orf2* endet in Position 1888 des SspI-Fragmentes (Position 46 des HindIII-Fragmentes) mit einem TGA-Stoppcodon. In diesem Fall überlappt das Stoppcodon über vier Basen mit dem ATG-Startcodon des nachfolgenden Leserasters *orf3*. Auf dem Gegenstrang der klonierten DNA-Region konnten keine größeren Leseraster (≥ 150 Aminosäuren) lokalisiert werden.

3.3 Charakterisierung der offenen Leseraster *orf1* und *orf2* aufgrund der Sequenzdaten

Für die Sequenzvergleiche wurde der Startpunkt des *orf1* an Position 117 des SspI-Fragmentes angenommen. Unter dieser Voraussetzung codiert das *orf1* 298 Aminosäurereste mit einem Molekulargewicht von 33,3 kDa. Der Leseraster *orf2* codiert 291 Aminosäurereste mit einem berechneten Molekulargewicht von 32,6 kDa. Beide abgeleiteten Aminosäuresequenzen enthalten keine möglichen Transmembranhelices. Mit den Aminosäuresequenzen beider Leseraster wurden Datenbank-Recherchen durchgeführt (FASTA-Programm, EMBL/SWISSPIR-Proteinbank, September 1993), die in beiden Fällen zu ähnlichen Ergebnissen führten. Beide Aminosäuresequenzen verfügen über Regionen, die starke Ähnlichkeit zu drei konservierten Domänen in Phytoen- und Squalen-Synthasen (Abb.III.20) aufweisen. Im Leseraster *orf2* sind fast alle der konservierten Aminosäuren der Domänen I, II und III (CHAMOWITZ et al., 1992) erhalten. Auch im *orf1* sind die Domänen noch gut erkennbar. Im Bereich der Domäne III sind jedoch einige der gut konservierten Aminosäuren nicht mehr erhalten.

Abb.III.20: (folgende Seite) Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *orf1* und *orf2* aus *Z.mobilis* mit Aminosäuresequenzen von Phytoen- bzw Squalensynthasen verschiedener Organismen.
Die Lage von drei gut konservierten Domänen (I, II, III) ist durch Linien ober- und unterhalb der Aminosäuresequenzen markiert. Durch * sind identische oder ähnliche Aminosäuren in mindestens sechs der elf verglichenen Sequenzen gekennzeichnet. Über den Domänen I und III der Synthasen sind die Consensussequenzen der konservierten Domänen I und II der Prenyltransferasen wiedergegeben. ZmORF2 und ZmORF1: abgeleitete Aminosäuresequenzen von *orf2* und *orf1* aus *Z.mobilis*; CrtBEh, CrtBEu, CrtBRc, CrtBTt: Phytoen-Synthasen aus *Erwinia herbicola* (ARMSTRONG et al., 1990), *Erwinia uredovora* (MISAWA et al., 1990), *Rhodobacter capsulatus* (ARMSTRONG et al., 1989), *Thermus thermophilus* (HOSHINO et al.; 1993); Sccpys: Phytoensynthase aus *Synechococcus* PCC7942 (CHAMOWITZ et al., 1992); Synpys: Phytoensynthase aus *Synechocystis* (MARTINEZ-FEREZ et al., unveröffentlicht);Sausqs: Squalen-Synthase aus *Staphylococcus aureus* (WIELAND et al., Veröffentlichung eingereicht); Tompys: Phytoensynthase aus Tomate (RAY et al., 1987); ERG9Sc: Squalen-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* (JENNINGS et al., 1991).

```
Tompys                                                                                                                  MSVALL

Tompys    WVVSPCDVSNGTSFMESVREGNRFFDSSRHRNLVSNERINRGGGKQTNNGRKFSVRSAILATPSGERTMTSEQMVYDVVLRQAALVKRQL
ERG9Sc                                                                                                                  MGKLLQLALHPVEM

                                                                                E     I L  DD  D
ZmORF2          MTSAMKKIQPEAFSEKSSDSQASVSGAKSSSFYIGHRVLPPAEREAHYAIYNFCRQVDDIADDL-------EGSQEERKQALD
ZmORF1     MWKGRAQARNRSVSIKTKNKLNAAALVSGKGHQDENFPVASFLINPEYRPIIMAFYQFARQADDVADN-----------------VIA
CrtBEh                      MSQPPLLDHATQTMANGSKSFATAAKLFDPATRRSVLMLYTWCRHCDDVIDDQTHGFASEAAAEEEATQRLA
CrtBEu                                  MAVGSKSFATASKLFDAKTRRSVLMLYAWCRHCDDVIDDQ-------TLGFQARQPALQ
CrtBRc                      MIAEADMEVCRELIRTGSYSFHAASRVLPARVRDPALALYAFCRVADDEVDEV--------GAPRDKAAAVL
CrtBTt                  MKMPASMEPDWKALLRVLRAHSATFYLGSLLFPKEARKGAWAVYAACRLGDEAVDG-----------EGGGPEALE
Synpys    RPSLMLQLPKPSPSAKPCASVEEAYEICRQVTAQYAKTFYLGTLLMPPAKRRAIWAIYLWCRRTDELVDGP--------QAATTTPETLD
Sccpys         MLQMIPARPSRALASLSEAYEECRQITARYAKTFYLGTLLMPEAKRQAIWAIYVWCRRTDELVDGP--------QAAQTNFATLD
Sausqs                      MTMMDMNFKYCHKIMKKHSKSFSYAFDLLPEDQRKAVWAIYAVCRKIDDSIDVY-----------GDIQFLI
Tompys    RSTNELEVKPDIPIPGNLGLLSEAYDRCGEVCAEYAKTFNLGTMLMTPERRRAIWAIYVWCRRTDELVDGP--------NASYITPAALD
ERG9Sc    KAALKLKFCRTPLFSIYDQSTSPYLLHCFELLNLTSRSFAAVIRELHPELRNCVTLPYLILRALDTIEDDM-------SIEHDLKIDLLR
                                                  * **     * **  *  * *** ***  *****                 **

                                                                                          II
ZmORF2    AWRHDINAL-------YAGEPCGQAAF---LKEPVARFHLRQEDF---IAVIDGHAMDLKGPIV-FPDEATLDL----------YCDRVA
ZmORF1    SKKDRLAILE-DMRSSLTGESQSEPNA--VVLRQTLINHGLDHTIVHGLDLLEAFRRDVSVNR--YENWDALMD----------YCRYSA
CrtBEh    -RLRTLTLAA------FEGAEMQDPAFAAFQ-EVALTHGITPRMA---LDHLDGFAMDVAQTR--YVTFEDTLR----------YCYHVA
CrtBEu    TPEQRLMQLEMKTRQAYAGSQMHEPAF--AAFQEVAMAHDIAPA--YAFDHLEGFAMDVREAQ--YSQLDDTLR----------YCYHVA
CrtBRc    KLGDRLEDI-------YAGRPRNPSDRAFA--AVVEEFEMPRELP---EALLEGFAWDAEGRW--YHTLSDVQA----------YSARVA
CrtBTt    AWWAGVERA-------YRGRPLAEWEKGLAW--ALERWDIPFEAF---LHMREGFLTDLGPVR--LGTEAELLR----------YCYQVA
Synpys    HWERRLEGI-------FAGQPQDDADVALV--DTLETFPLDIQPF---RDMIAGQRMDLYRSR--YQTFEELDL----------YCYRVA
Sccpys    AWERRLERL-------FAGEPEDDCDVALV--DTLARYPLDIQPF---RDMIEGQRMDLLQMR--YSTFEDLYT----------YCYRVA
Sausqs    QIKEDIQSIEKYP---YEHHHFQSDRRIMMA-LQHVAQHKNIAFQ--SFYNLIDTVYKVNILQCLKRTLELFG----------YCYGVA
Tompys    RWENRLEDV-------FNGRPFDMLDG---ALDTVSNFPVDIQPF---RDMIEGMRMDLRKSR--YKNFDELYL----------YCYYVA
ERG9Sc    HFHEKLLLTKWS----FDGNAPDVKARAVLTDFESILIEFHKLKPEYQE-VIKEITEKMGNGMADYILDENYNLMGLQTVHDYDVYCHYVA
             **  *       *** *            *                ****  ***   *  * * ***            *** **

                                                G  FQ  DD  D     III
ZmORF2    SAVGRLSVYVFGMD----------PNIGESLAYHLGRALQLTNILRDIDEDAEI-GRCYLPREPLEKAGI-PLDIEKALADPR-LDKV
ZmORF1    SPVGRFVLDVHKESR----------NLWPMNDALCTALQVINHLQDCGKDYRMMNRIYIPSDIMEAVGATAGDLGCFHASLP-LRQA
CrtBEh    GVVGLMMARVMGVR----------DERVLDRACDLGLAFQLTNIARDIIDDAAI-DRCYLPAEWLQDAGLTPENYAARENRAA-LARV
CrtBEu    GVVGLMMAQIMGVR----------DNATLDRACDLGLAFQLTNIARDIVDDAHA-GRCYLPASWLEHEGL-NKENYAAPENRQALSRI
CrtBRc    AAVGAMMCVLMRVR----------NPDALARACDLGLAMQMSNIARDVGEDARA-GRLFLPTDWMVEEGI---DPQAFLADPQ-PTKG
CrtBTt    GTVGRMMAPIAGGG----------KEAEARAVKLGQAMQLTNILRDVGEDLER-DRVYLPLDLLRAHGVEVEDLRAGRVTPGYRALM
Synpys    GTVGLMSSAVLGVDTGNGQAPWQPDAVYIPQEEAIALGVANQLTNILRDVGEDVER-GRIYLPLEDLERFNYSEQDLLNGVNDDRWRSLM
Sccpys    GTVGLMSQPVMGIESTNSRAPWDPTTPPDPTQEALALGIANQLTNILRDVGEDARR-GRIYLPQEELAQFNYSEQDLFNGVIDDRLRAFM
Sausqs    GRRSSIDADFSDHET----------HQTYDVARRLGESLQLINILRDVGEDFDN-ERIYFSKQRLKQYEVDIAEVYQNGVMNHYIDLW
Tompys    GTVGLMSVPIMGIA------PESKATTESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARR-GRVYLPQDELAQAGLSDEDIFAGRVTDKWRIFM
ERG9Sc    GLVGDGLTRLIVIAKF------ANESLYSNEQLYESMGLFLQKTNIIRDYNEDLVD-GRSFWPKEIWSQYAPQLKDFMKPENEQLGLDCI
          **** *    ***                  *  **** **************   ** *** * *   **   **         ** *

ZmORF2    CRDLAWQAEGHYAASDHIIHNRP--KGYLIA-PRLMAAAYSALLRKMLAQG---WKNPRKKVKHNKLALLWTLLRLKVTS   291
ZmORF1    IETAALKTKSLLKRSSFSVAIHDKRLGVEVA---VIQRLAESLTECLTKHDPLSERVHHMKA-ETLGLAFVAAAGRLFS   336
CrtBEh    AERLIDAAEPYYISSQAGLHDLP--PRCAWA-IATARSVYREIGIKVKAAGGSAWDRRQHTSKGEKIAMLMAAPGQVIRAKTTRVTP
CrtBEu    ARRLVQEAEPYYLSATAGLAGLPLRSAWAIATAKQVYRKIGVKVEQAGQQA---WDQRQSTTTPEKLTLLLAASGQALTSRMRAHPPRPA
CrtBRc    IRRVTERLLNRADRLYWRAATGVRLLPFDCRPGIMAAGKIYAAIGAEVAKAKYDNITRRAHTTKGRKLWLVANSAMSATATSMLPLSPRV
CrtBTt    AHLECKARALYREGLAGLGHLKVGRAAIALAALQYRG-ILDKLRLSGYDNLGRRAHLKAWERALLLPKAFLAARFPPRPEGSP   289
Synpys    KFEIDRARHYFEDAERGIRALNRDARWPVWTALMLYKGILDVIEANNYNVFNRRAYVPTPK
Sccpys    QFQLDRARDYFEQAERCIELSHDARWPVWASLMLYRE-ILDVIEQNNYDVFRKRAYVPTWRKLCSLPVAMLRATVL   307
Sausqs    EYYAAIAEKDFQDVHDQIKVFSIEASPIIELAARIYIEILGRS   254
Tompys    KKQIHRARKFFDEAEKGVTELSSASRFPVWASLVLYRKILDEIEANDYNNFTKRAYVSKSKQVDCITYCICKISCASYKNASLQR  412
ERG9Sc    NHLVLNALSHVIDVLTYLASIHEQSTFQFCAIPQVMAIATLALVFNNREVLEGNVKIRKGTTCYLILKSRTLRGCVEIFDYYLRDIKSKL
             *  *      *  *                  **

CrtBEh    RPAGLWQRPV   309
CrtBEu    ---HLWQRPL   296
CrtBRc    HAKPEPEVAHLVDAAAHRNLHPERSEVLISALMALKARDRRGLAMD   339
Synpys    ---HLWQRPL
ERG9Sc    AVQDPNFLKLNIQISKIEQFHEEMYQDKLPPNVKPNETPIFLKVKERSRYDDELVPTQQEEEYKFNMVLSIILSVLLGFYYIYTLHRA 444
```

IV. Diskussion

1. Charakterisierung des Gens für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis*

Das im Verlauf dieser Arbeit klonierte Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* (*shc)* codiert 658 Aminosäuren mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 74,1 kDa. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen des *shc*-Genproduktes aus *Z.mobilis* und der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* ergab einen Anteil von identischen Aminosäuren in beiden Proteinen von 33%. Dieser Prozentsatz sprach dafür, daß eine phylogenetische Verwandtschaft der beiden Proteine angenommen werden konnte. Für zwei Proteine gleicher Funktion ist dieser Wert aber vergleichsweise gering. So liegt beispielsweise der Anteil von identischen Aminosäuren beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der Phosphoglycerat-Kinase oder der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Z.mobilis* und anderen Organismen wie *Aspergillus nidulans, Saccharomyces cerevisiae* und dem Menschen bzw. *Bacillus stearothermophilus, S.cerevisiae* , *Thermus aquaticus, E.coli* und dem Menschen zwischen 44 und 55% (CONWAY & INGRAM, 1988; CONWAY et al., 1987). Andererseits zeigen Vergleiche der Aminosäuresequenzen bereits klonierter Gene von Enzymen der Isoprenoid-Biosynthese, daß die Konservierung von Aminosäuren in Enzymen gleicher Funktion aus unterschiedlichen Organismen insgesamt nicht sehr hoch ist, und sich auf bestimmte Domänen konzentriert. Die Phytoensynthasen aus *Erwinia herbicola* und *Rhodobacter capsulatus* enthalten nur 33% identische Aminosäuren (ARMSTRONG et al., 1992). Bei den Squalen-Synthasen aus *Saccharomyces cerevisiae, Schizosacharomyces pombe* und dem Menschen beträgt die Übereinstimmung nur 36% (ROBINSON et al., 1993). Auffallend bei der Betrachtung der Aminosäurezusammensetzung des *shc*-Genproduktes war der hohe Anteil an aromatischen Aminosäuren. Er beträgt 10,9%. Insbesondere Tryptophan und Tyrosin treten sehr häufig auf (3,5 und 4,6%). Der hohe Anteil an aromatischen Aminosäuren ist ebenfalls charakteristisch für die SHC aus *A.acidocaldarius* (OCHS, Dissertation 1990). Darüber hinaus stimmen beide prokaryontischen Enzyme in dieser Eigenschaft mit der einzigen bisher klonierten und sequenzierten eukaryontischen Squalenoxid-Cyclase, der aus *Candida albicans*, überein (BUNTEL & GRIFFIN, 1992; BUNTEL & GRIFFIN, Veröffentlichung eingereicht). Da die Cyclisierung von Squalen und Squalenoxid über kationische Intermediate erfolgt (JOHNSON et al., 1987; JOHNSON et al., 1993) wurde von BUNTEL und GRIFFIN die "Aromaten-Hypothese" (aromatic hypothesis) aufgestellt. Demnach wären die aromatischen Reste der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin mit ihrer hohen Elektronendichte essentiell für die Cyclase-Aktivität, da sie an der Faltung des Substrates und an der Stabilisierung der positiv geladenen Übergangszustände und Intermediate während der Cyclisierungsreaktionen beteiligt sind.

Die Aminosäuresequenzen der drei bisher klonierten Squalen- bzw. Squalenoxid-Cyclasen weisen neben dem hohen Gehalt an aromatischen Aminosäuren weitere Gemeinsamkeiten auf. Insbesondere die carboxyterminalen Hälften der Proteine zeigen auffällige Übereinstimmungen. In allen Fällen tritt mehrfach ein konserviertes Aminosäuremotiv auf. Dieses Motiv enthält stets die Aminosäuren Gln und Trp und erhielt daher die Bezeichnung QW-Motiv (PORALLA et al., Veröffentlichung eingereicht). Die konservierte Aminosäureabfolge dieses Motivs lautet: Arg/Lys Gly/Ala X_{2-3} Tyr/Phe/Trp X_4 Gln X_{2-5} Gly X Trp (X = beliebige Aminosäure). Die QW-Motive sind jeweils umgeben von einer ß-Faltblattstruktur am N-Terminus und einem ß-Turn am C-Terminus. Das QW-Motiv wiederholt sich in den drei Cyclasen im C-terminalen Bereich viermal, wobei die einzelnen QW-Motive jeweils durch etwa 60 Aminosäuren getrennt sind. In den beiden prokaryontischen Sequenzen finden sich zwei weitere Wiederholungen dieses Motivs im aminoterminalen Bereich der Proteine. Das beschriebene Aminosäuremotiv tritt darüber hinaus ebenfalls in einem sequenzierten Peptid der gereinigten Squalenoxid-Cyclase aus Rattenleber auf (ABE & PRESTWICH, Veröffentlichung eingereicht). Von PORALLA et al. (Veröffentlichung eingereicht) wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese QW-Motive wesentlich an der Katalyse der Polycyclisierungsreaktion beteiligt seien. Die Forderung nach mindestens drei sich wiederholenden katalytischen Elementen mit Stellen hoher Elektronendichte zur Stabilisierung der carbokationischen Intermediate während der Cyclisierungsreaktion wurde bereits von JOHNSON et al. (1987) gestellt. Möglicherweise stellen die QW-Motive mit ihren aromatischen Aminosäuren diese Elemente dar. Ob und welche Funktion die QW-Motive in der Katalyse der Squalen(oxid)-Cyclasereaktion haben, ließe sich jetzt, nach der Klonierung und Charakterisierung der Gene von zwei prokaryontischen Squalen-Cyclasen und einer eukaryontischen Squalenoxid-Cyclase, möglicherweise durch *in vitro*-Mutagenese-Experimente klären. Ziel dieser Experimente wäre die gezielte Veränderung eines oder mehrerer der QW-Motive, ohne eine Störung der Sekundärstruktur der Cyclase herbeizuführen. Eine Überprüfung der veränderten Cyclase in bezug auf ihre Substratspezifizität und ihr Produktspektrum könnte dann weitere Einsicht in den Mechanismus der Polycyclisierungsreaktion ergeben.

Abgesehen von der funktionellen Bedeutung, die die QW-Motive für den Mechanismus der Squalen(oxid)-Cyclasereaktion haben könnten, unterstützt das konservierte Auftreten dieser Motive in den Squalen(oxid)-Cyclasen von drei phylogenetisch relativ weit entfernten Organismen die Hypothese des gemeinsamen evolutionären Ursprungs der Cyclasen, wie sie bereits seit 1974 postuliert wird (NES, 1974; ROHMER et al., 1979; OURISSON et al., 1987; OURISSON, 1987). OURISSON geht davon aus, daß es sich bei den eukaryontischen Squalenoxid-Cyclasen um eine Weiterentwicklung der primitiveren prokaryontischen Squalen-Cyclasen handelt. Folgende Eigenschaften deuten darauf hin, daß es sich bei den prokaryontischen Cyclasen um die entwicklungsgeschichtlich älteren und primitiveren Enzyme handelt: Die direkte Cyclisierung von Squalen zu Hopen ist ein anaerober Prozeß, dagegen wird in Eukaryonten Squalen in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff durch eine Squalen-Epoxidase in das Oxid überführt, das anschließend von Squalenoxid-Cyclasen cyclisiert werden

kann. Die Entwicklung der Squalenoxid-Cyclasen konnte also erst erfolgen, nachdem die Evolution bereits Photosynthese betreibende Organismen hervorgebracht hatte. Darüber hinaus verfügen die bakteriellen Squalen-Cyclasen im Gegensatz zu den eukaryontischen Squalenoxid-Cyclasen nur über eine gering ausgeprägte Substratspezifizität. Während Squalenoxid-Cyclasen nur (3S)-Oxidosqualen als Substrat akzeptieren, cyclisieren Squalen-Cyclasen neben ihrem natürlichem Substrat Squalen beide Enantiomere des Oxidosqualens und verschiedene Polyprenole (NEUMANN & SIMON, 1986; OURISSON et al., 1987; ABE et al., Veröffentlichung eingereicht).

Ein weiterer Hinweis auf die enge entwicklungsgeschichtliche Beziehung zwischen den prokaryontischen und eukaryontischen Cyclasen ergibt sich durch die kürzlich gelungene Lokalisierung der vermutlichen Substratbindungstelle in der gereinigten Squalenoxid-Cyclase aus Rattenleber (ABE & PRESTWICH, Veröffentlichung eingereicht). Durch die Bindung eines radioaktiv markierten irreversiblen Inhibitors ((^{3}H) 29-Methyliden-2,3-Oxidosqualen) an das gereinigte Rattenleber-Enzym und anschließende CNBr-Spaltung konnte ein Peptid isoliert werden, das vermutlich die Substratbindungstelle umfaßt. Die Aminosäuresequenz des Peptids (Abb.IV.1) zeigt starke Ähnlichkeit mit einem Bereich aus der Squalenoxid-Cyclase aus *C.albicans* (50% Identität mit Arg^{413}-Val^{442}) und Regionen aus den bakteriellen Squalen-Cyclasen (37% Identität mit Lys^{356}-Leu^{385} aus *A.acidocaldarius,* 30% Identität mit Arg^{375}-Ala^{404} aus *Z.mobilis).* Die nähere Analyse ergab, daß zwei benachbarte Asp-Reste in der konservierten Region (Asp-Asp-Thr-Ala-Glu-Ala) gleich stark durch das Substratanalogon markiert wurden. Diese hochkonservierte Substrat-Bindungsstelle zeigt Ähnlichkeit mit der bekannten Consensus-Sequenz Asp-Asp-X-X-Asp/Glu ($DDX_{2-4}D/E$-Motiv), die in allen bisher sequenzierten Prenyltransferasen und Sesquiterpen-Cyclasen auftritt (CARATTOLI et al., 1991; ASHBY et al., 1992; MARRERO et al., 1992; FACCHINI & CHAPPELL, 1992; KOYAMA et al., 1993; PROCTER & HOHN, 1993). Diesen Enzymen ist gemeinsam, daß sie Prenyldiphosphate als Substrat erkennen. ASHBY et al. (1990) schlugen vor, daß die konservierten Aspartatreste an der Bindung der Prenyldiphosphate durch die Bildung von Mg^{2+}-Salzbrücken zwischen Substrat und katalytischem Zentrum beteiligt sind.

Kürzlich wurde durch gerichtete Mutagenese-Experimente an der Farnesylpyrophosphat-Synthase der Ratte gezeigt, daß der erste Aspartatrest der konservierten Domäne in der FPP-Synthase an der Katalyse der Reaktion beteiligt ist (MARRERO et al., 1992). Die Substitution des ersten Aspartatrestes durch Glutamat verringerte die V_{max} der FPP-Synthasereaktion um das 90-fache. Das konservierte Auftreten dieses $DDX_{2-4}D/E$-Motivs in Squalen(oxid)-Cyclasen, deren Substrat nicht über einen Diphosphatrest verfügt, führte zu der Formulierung einer erweiterten Funktion dieses aspartatreichen Aminosäuremotivs, die auch in einer Stabilisierung der als Intermediate in der Terpen- und Sterol-Synthese auftretenden tertiären oder allylischen Kationen bestehen könnte (ABE & PRESTWICH, Veröffentlichung eingereicht).

```
SOC Ratte   H K G G F P F S T L D G G W I V A D D T A E A L K A V L
SOC Ca      R K G A W P F S T K E Q G Y T V S D C T A E A M K A I I
SHC Aa      K P G G F A F Q F D N V Y Y P D V D D T A V V V W A L N
SHC Zm      R P G G W A F Q Y R N D Y Y P D V D D T A V V T M A M D

TDS   Fs                      Y T Y T L V L D D S K D D P Y P T M
FPPS  Ec                      G L A F Q V Q D D I L D V V G D T A
HPPS  Sc                      G I C F Q L V D D M L D F T V S G K
GGPPS Eh                      G S A F G I A D D L K D A L M S A E
```

Abb.IV.1: Gegenüberstellung der möglichen Substrat-Bindungsstellen der Squalen- und Squalenoxid-Cyclasen und den Prenyldiphosphat-Bindungsstellen einer Sesquiterpen-Cyclase und verschiedener Prenyltransferasen.
Durch Fettdruck hervorgehoben sind die Aspartat- und Glutamatreste des konservierten $DDX_{2-4}D/E$ Motivs. SOC, Squalenoxid-Cyclase aus der Ratte (ABE & PRESTWICH, zur Veröffentlichung eingereicht) und aus *Candida albicans* (Ca); SHC, Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* (Aa) und *Z.mobilis* (Zm); TDS Fs, Trichodien-Synthase aus *Fusarium sporotrichioides* (HOHN & BEREMAND, 1988); FPPS Ec, FPP-Synthase aus *E.coli* (FUJISAKI et al.,1990); HPPS Sc, Hexaprenylpyrophosphat-Synthase aus *S.cerevisiae* (ASHBY & EDWARDS, 1990); GGPPS Eh, Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase aus *Erwinia herbicola* (MATH et al., 1992).

Allen bisher untersuchten Squalen(oxid)-Cyclasen ist gemeinsam, daß es sich um membranassoziierte Proteine handelt, deren Solubilisierung den Einsatz von Detergenzien erfordert. Die Membranassoziation scheint aber auf unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen. Die SOC aus *C.albicans* verfügt über zwei erkennbare hydrophobe Regionen (As 329-345 und As 645-664), die an der Verankerung des Enzyms an der Membran beteiligt sein könnten (BUNTEL & GRIFFIN, 1992). Hydrophobizitätsplots der Aminosäuresequenzen der Squalen-Cyclasen aus *A.acidocaldarius* und *Z.mobilis* führten nicht zur Identifizierung möglicher Transmembranhelices. Für die Membranassoziation der SHC aus *A.acidocaldarius* ist möglicherweise der Arginin-Reichtum (10,5%) dieses Proteins mitverantwortlich (OCHS, 1990). Der hohe Gehalt an der kationischen Aminosäure könnte eine verstärkte Bindung des Proteins an die Membran durch ionische Wechselwirkungen mit den Phospholipiden zur Folge haben. Welche Eigenschaften der Cyclase aus *Z.mobilis*, abgesehen von ihrem insgesamt hydrophoben Charakter (Anteil hydrophober Aminosäuren an der Aminosäuresequenz = 34,7%), ihre Membranassoziation bewirken, ist bisher ungeklärt.

2. Expression des *shc*-Gens in *Z.mobilis* und *E.coli*

Obwohl es sich bei der Squalen-Hopen-Cyclase um ein membranassoziertes Protein handelt, wurden zum Nachweis der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität nicht durch Ultrazentrifugation abgetrennte Membranfraktionen, sondern der Gesamtrohextrakt der Zellen eingesetzt. Für den *Z.mobilis*-Wildtyp (CP4) wurde so im Rohextrakt eine SHC-Aktivität von 0,06 mU/mg Protein ermittelt. Geht man davon aus, daß die Membranproteine etwa 20% des Gesamtproteingehaltes ausmachen, korreliert dieser Wert gut mit der SHC-Aktivität von 0,3 mU/mg Protein, die von HORBACH (Diplomarbeit, 1990) in der Membranfraktion von *Z.mobilis* ZM6 (ATCC 29191) gemessen wurde. Ebenfalls in solubilisierten Membranfraktionen wurden von MICHEL et al., (1992) Squalen-Hopen-Cyclaseaktivitäten von 0,08 mU/mg (*Z.mobilis* ZM6) und von TAPPE (Dissertation, 1993) von 0,06 mU/mg ermittelt. Die *in vitro* meßbare Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität von *Z.mobilis* liegt in der gleichen Größenordnung wie die von *Rhodopseudomonas palustris*. Für dieses schwefelfreie Purpurbakterium wurden spezifische Aktivitäten der Squalen-Hopen-Cyclase von 0,07 mU/mg im Rohextrakt und 0,16 mU/mg in der Membranfraktion ermittelt (KLEEMANN, 1992). Höher waren dagegen die Enzymaktivitäten, die für *A.acidocaldarius* bestimmt wurden. Die Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität lag in diesem Organismus bei 0,4 mU/mg im Rohextrakt und bei 25 mU/mg im Solubilisat der Membranfraktion (OCHS, 1990). Eine Ursache für diese, im Vergleich, hohen gemessenen Enzymaktivitäten ist die ausgeprägte Thermostabilität der Squalen-Hopen-Cyclase aus dem, an extreme Umweltbedingungen angepaßten, thermoacidophilen Bakterium *A.acidocaldarius* (OCHS, 1990). Im Gegensatz dazu erwies sich die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* in Versuchen zu ihrer Aufreinigung als sehr labiles Enzym (TAPPE, Dissertation 1993). Die plasmidcodierten Kopien des *shc*-Gens führten in dem rekombinanten *Z.mobilis*-Stamm CP4/pZY603 zu einer Erhöhung der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität auf das Fünffache der Enzymaktivität im Wildtyp (0,3 mU/mg). Auch in den rekombinanten *E.coli*-Stämmen vermittelten die plasmidcodierten Kopien des *shc*-Gens das Auftreten einer Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität in den Rohextrakten. Die SHC-Aktivität war nur in *E.coli*-Stämmen nachweisbar, die ein Plasmidkonstrukt enthielten, in dem das *shc*-Gen in richtiger Leserichtung zum *lacZ*-Promotor inseriert vorlag. Dies ließ den Schluß zu, daß die Expression des *shc*-Gens in *E.coli* nicht von einem geneigenen Promotor initiiert wurde, sondern vom *lacZ*-Promotor ausging. Vergleicht man die Enzymaktivität in dem rekombinanten *E.coli*-Stamm (DH5/pZY603) mit der des rekombinaten *Z.mobilis*-Stamm (CP4/pZY603), so liegen die ermittelten SHC-Aktivitäten in der gleichen Größenordnung (0,2 mU/mg und 0,3 mU/mg). Es scheint keine deutlichen Unterschiede in der Effizienz der Expression des plasmidcodierten Gens bzw. der Stabilität des Genproduktes in *E.coli* und *Z.mobilis* zu geben. Im rekombinanten *E.coli*-Stamm DH5/pZY611, der das *shc*-Gen auf einem Vektor mit hoher Kopienzahl (pUC19) enthielt, wurde eine Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität von 0,4 mU/mg ermittelt. Im Vergleich dazu wurde im Homogenat des rekombinanten *E.coli*-Stammes, der über das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase

aus *A.acidocaldarius* auf dem Vektor pUC19 verfügte, eine SHC-Aktivität von 1,8 mU/mg gemessen (OCHS et al., 1992).

3. Charakterisierung des offenen Leserasters *orf3*

Carotinoide sind als Pigmente in der Natur weit verbreitet. Sie werden von allen photosynthesebetreibenden Organismen und darüber hinaus von einer Reihe photosynthetisch nicht aktiver Pilze und Bakterien synthetisiert. Die meisten der über 500 bisher identifizierten Carotinoide besitzen ein C_{40}-Gerüst, bestehend aus acht Isopren-Einheiten (Tetraterpenoide). In allen bisher untersuchten Fällen sind die Gene der Enzyme der Carotinoid-Biosynthese in Prokaryonten in Form großer Gencluster organisiert, das heißt, sie befinden sich in enger Nachbarschaft zueinander (ARMSTRONG et al., 1989; MISAWA et al., 1990; ARMSTRONG et al, 1990). Es erschien daher möglich, daß auch die Gene der Hopanoid-Biosynthese in *Z.mobilis* als Gencluster vorlagen. Tatsächlich ergab die Sequenzierung des 4,3 kb umfassenden chromosomalen HindIII-Fragmentes aus *Z.mobilis,* daß sich in relativ enger Nachbarschaft vor dem *shc*-Leseraster ein weiterer großer offener Leseraster befand.
Eine Datenbank-Recherche (FASTA-Programm, EMBL/SWISSPIR-Proteindatenbank, August-September 1993) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *orf3* ergab, daß der Aminoterminus des ORF3 eine deutliche Ähnlichkeit mit den Aminotermini von Phytoen-, Squalen- und Methoxyneurosporen-Dehydrogenasen aufwies (Abb.III.17). Bei diesen Dehydrogenasen handelt es sich um Enzyme der Carotinoid-Biosynthese. Sie katalysieren sequentielle Desaturierungsreaktionen (Abb.IV.2), die Phytoen, das C_{40}-Grundgerüst der Carotinoide, über die Intermediate Phytofluen, ζ-Caroten und Neurosporen in das vollständig konjugierte C_{40}-Gerüst, das Lycopen, überführen (COOLBEAR & THRELFALL, 1989; GOODWIN, 1993).

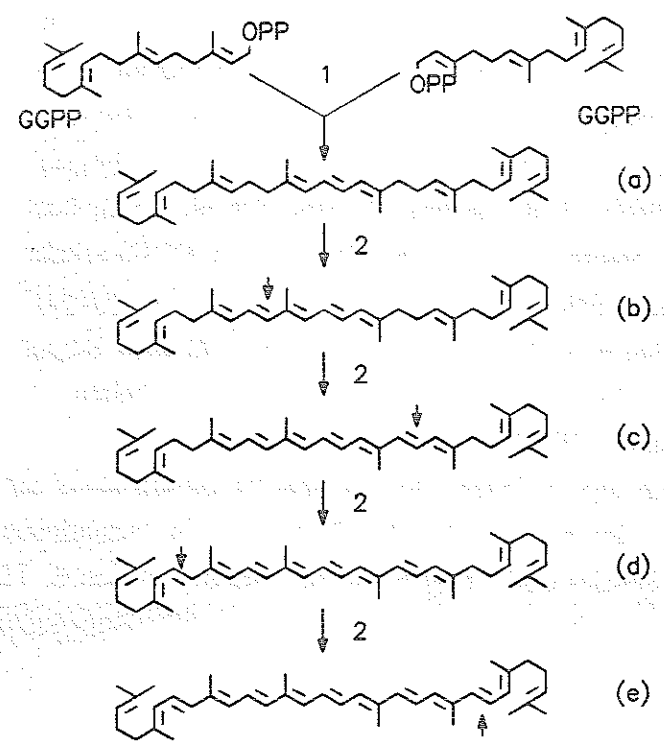


Abb.IV.2:
Biosynthese der Carotinoide ausgehend von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP C_{20}). Die Verknüpfung der beiden GGPP-Moleküle wird durch die Phytoen-Synthase (1) katalysiert. Die Überführung von Phytoen (a) in Lycopen (e) erfolgt durch sequentielle Desaturierungsreaktionen katalysiert durch Carotinoid-Desaturasen (2); (b), Phytofluen; (c), ζ-Caroten; (d), Neurosporen (Abb. modifiziert nach PFANDER, 1992).

Allen Desaturasen und dem ORF3 ist gemeinsam, daß sie am Aminoterminus über eine mögliche ADP-Bindungsfalte mit ßαß-Struktur für FAD oder NADP-Cofaktoren verfügen (Abb.IV.3; WIERENGA et al., 1986; BORK & GRUNWALD, 1990; BAKER et al., 1992).

```
                        ßßßßßß αααααααααααα  ßßßßßß
                        bk k G G  G   k  k   G  k k s

ZmORF3                MSVTHIIGAGLAGLSAAVAITHAGGRVKIYEASAMAGGRARSY
Sau-D                  MKIAVIGAGVTGLAAAARIASQGHEVTIFEKNNNVGGRMNQL
CrtDRc              MRSETDVVVIGARMGGLAAAIGAAAAGLRVTVVEAGDAPGGKARAV
CrtIEu                MKPTTVIGAGFGGLALAIRLQAAGIPVLLLEQRDKPGGRAYVY
CrtIEh                MKKTVVIGAGFGGLALAIRLQAAGIPTVLLEQRDKPGGRAYVW
CrtIRc          MSKNTEGMGRAVVIGAGLGGLAAAMRLGAKGYKVTVVDRLDRPGGRGSSI
NcAl1            MAETQRPRSAIIVGAGAGGIAVAARLAKAGVDVTVLEKNDFTGGRCSLI

Consensus                   VIGAG GGLA A RL  AG  V   E  D  GGR
```

Abb.IV.3: Vergleich der ADP-ßαß-Bindungsfalte am Aminoterminus verschiedener Phytoen-Dehydrogenasen und des ORF3 aus *Z.mobilis*. In den ersten beiden Zeilen ist der für ADP-Bindungstellen charakteristische "fingerprint" dargestellt (nach WIERENGA et al., 1986 und ARMSTRONG et al., 1993) dabei entspricht b einem basischen oder hydrophilen, k einem kleinen oder hydrophoben und s einem sauren Aminosäurerest. In der letzten Zeile wurde eine Consensussequenz für die ADP-Bindungsfalte der Phytoen-Dehydrogenasen abgeleitet (nach ARMSTRONG et al., 1993). Proteinbezeichnungen und Referenzen wie Abb.III.16.

Vergleiche der Primärstruktur verschiedener Carotinoid-Desaturasen (NcAl1, CrtDRc, CrtIRc) mit denen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase aus *Azotobacter vinelandii* und der Glutathion-Reductase des Menschen ergaben, daß die Carotinoid-Desaturasen konservierte Aminosäurereste enthalten, die bei den Disulfid-Oxidoreductasen die FAD-Bindung und die Dimerisierung der Polypeptide vermitteln (BARTLEY et al., 1990). Bisher wurde weder der Cofaktor-Bedarf der Carotinoid-Desaturasen näher untersucht, noch ist bekannt, ob die Desaturasen in Pilzen und Bakterien als Dimer vorliegen. In Pflanzen treten diese Enzyme als Komponenten von Multienzym-Komplexen der Carotinoid-Biosynthese auf (BRAMLEY, 1985; COOLBEAR & THRELFALL, 1989). Sieht man von der charakteristischen aminoterminalen ADP-Bindungsfalte ab (Abb.IV.3), ist die Übereinstimmug des ORF3 mit den anderen Desaturasen nicht sehr hoch. Weitere in den Desaturasen konservierte Aminosäuren sind nur zum Teil auch im ORF3 erhalten (Abb.III.16). Auffällig ist auch das vollständige Fehlen einer in allen anderen Dehydrogenasen gut konservierten Domäne im carboxyterminalen Bereich. Diese Domäne entspricht einer Region, die in den Disulfid-Oxidoreductasen für die Wechselwirkung der Untereinheiten der Enzymdimere verantwortlich ist (BARTLEY et al., 1990).

Für die Essigsäurebakterien *Acetobacter aceti ssp. xylinum* und *Acetobacter pasteurianus ssp pasteurianus* wurde das Auftreten von Hopanoiden mit ungesättigten Hopangerüsten beschrieben (ROHMER & OURISSON 1986). In diesen Spezies treten Hopanoide auf, die in Position 6, 11 oder 6 und 11 des Hopangerüstes über eine Doppelbindung verfügen. Da in *Z.mobilis* Hopanoide

mit ungesättigtem Hopangerüst nicht nachgewiesen wurden (FLESCH & ROHMER, 1989; SCHULENBERG-SCHELL et al., 1989; BARROW & CHUCK, 1990; HERMANS et al., 1991, SAHM et al., 1993), ist die mögliche Funktion einer Desaturase in *Z.mobilis* unklar. Denkbar ist, daß *Z.mobilis* über ein Gen für eine Desaturase verfügt, dieses aber nicht mehr aktiv ist. Zur Aufklärung der Funktion des *orf3* bzw. des Genproduktes sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

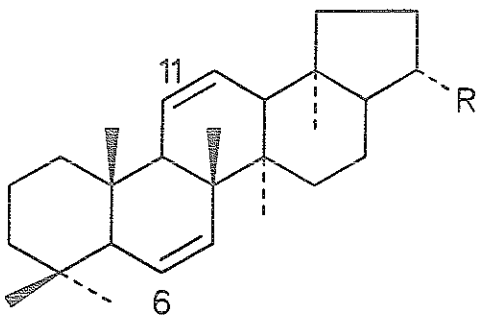


Abb.IV.4:
Ungesättigtes Hopangerüst, wie es in den Hopanoiden von *Acetobacter aceti* und *Acetobacter pasteurianus* auftritt.

Das ORF3 hat mit einem Anteil hydrophober Aminosäuren an der Aminosäurenzusammensetzung von 32,2% einen insgesamt hydrophoben Charakter. Es verfügt neben der hydrophoben FAD/NADP-Bindungsstelle über eine weitere hydrophobe Region (Aminosäure 253-269), die als Transmembranhelix zur Verankerung des Proteins in der Membran dienen könnte. Hydrophobe Helices, die als Membrananker dienen könnten, treten auch in anderen Carotinoid-Desaturasen auf (CHAMOWITZ et al., 1991).

4. Charakterisierung der offenen Leseraster *orf1* und *orf2*

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen, der im 5'-Bereich vor dem *orf3* identifizierten offenen Leseraster *orf1* und *orf2* weisen beide signifikante Übereinstimmungen mit drei konservierten Domänen von Phytoen- und Squalen-Synthasen auf. Bei Phytoen-Synthasen handelt es sich um Schlüsselenzyme der Carotinoid-Biosynthese. Sie katalysieren die Verknüpfung von zwei C_{20}-Einheiten (Geranylgeranylpyrophosphat, GGPP) zum C_{40}-Grundgerüst der Carotinoide, dem Phytoen. Eine Erklärung für die Übereinstimmungen zwischen Squalen- und Phytoen-Synthasen ergibt sich aus der Ähnlichkeit der Substrate und des Mechanismus der katalysierten Reaktionen beider Enzyme (Abb.IV.5; ROBINSON et al., 1993). Sowohl Squalen- als auch Phytoen-Synthasen katalysieren die 1'-1- ("Kopf-an-Kopf-") Kondensation von zwei Molekülen eines Prenyl-Substrates (zwei Moleküle FPP (C_{15}) bzw. zwei Moleküle GGPP (C_{20})). Damit unterscheiden sie sich hinsichtlich der Substrate und der Kondensationsreaktion von den Prenyltransferasen, die die 1'-4- ("Kopf-an-Schwanz-") Kondensation eines allylischen Prenylsubstrates (DMAPP, GPP, FPP) mit einem homoallylischen Prenylsubstrat (IPP)

katalysieren (COOLBEAR & THRELFALL, 1989). In den Synthasereaktionen tritt ein stabiles Intermediat mit einem Cyclopropylringgerüst (Präsqualenpyrophosphat bzw. Präphytoenpyrophosphat) auf. Beide Enzyme sind in den bisher untersuchten Fällen bifunktionell (DOGBO et al., 1988; JENNINGS et al., 1991; HOSHINO et al., 1993; ZHANG et al., 1993). Nach der Verknüpfung der beiden Substratmoleküle zum Cyclopropyl-Intermediat katalysieren sie auch die Überführung dieses Intermediates in die nichtcyclischen Produkte Squalen bzw. Phytoen. Im Unterschied zu den Phytoen-Synthasen ist der zweite Reaktionsschritt der Squalen-Synthasen mit einer Reduktion verbunden und abhängig von NADPH als Cofaktor.

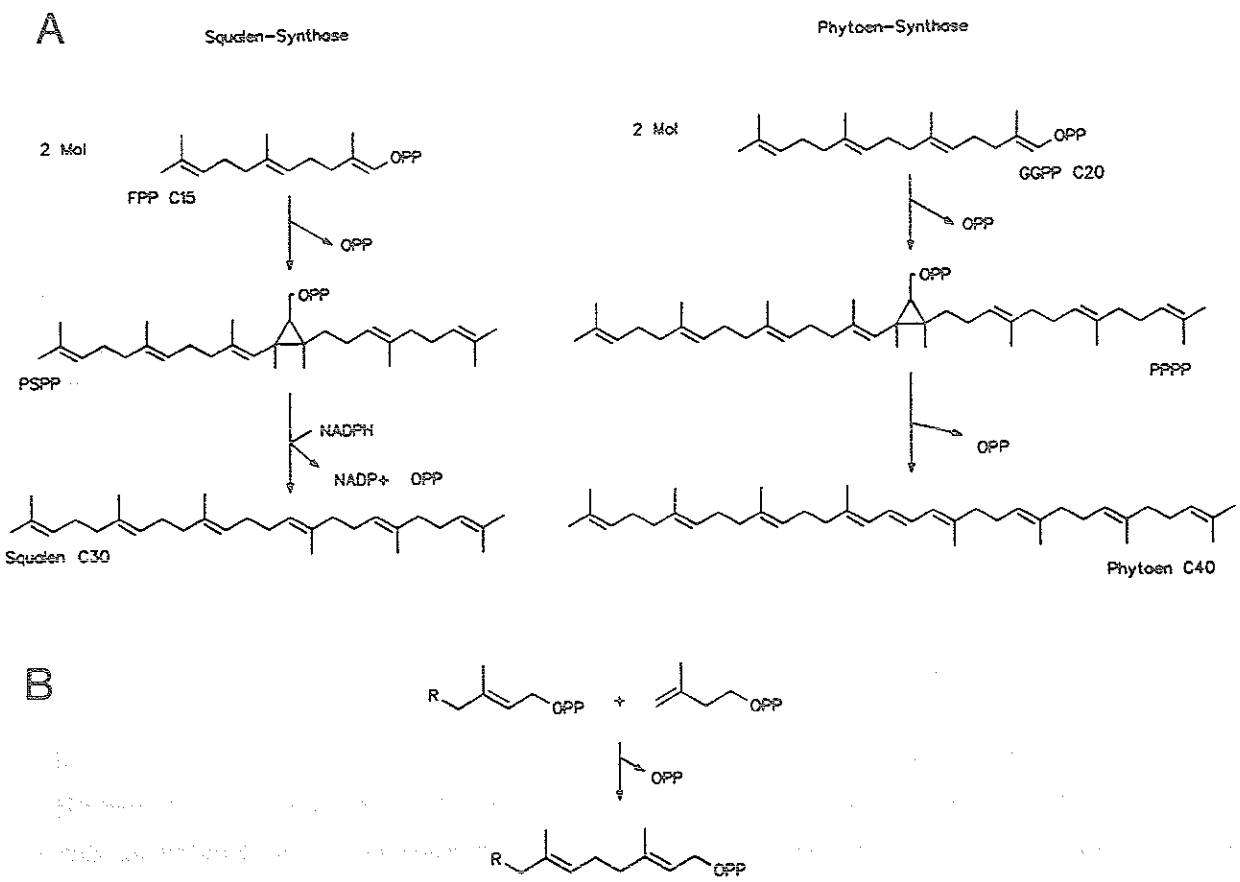


Abb.IV.5: A) Reaktionen der Squalen- und Phytoensynthasen. FPP, Farnesylpyrophosphat; GGPP, Geranylgeranylpyrophosphat; PSPP, Präsqualenpyrophosphat; PPPP, Präphytoenpyrophosphat (Abb. modifiziert nach ROBINSON et al., 1993).

B) Reaktion der Prenyltransferasen. Im Gegensatz zur 1'-1-Dimerisierung der Squalen- und Phytoensynthasen wird durch Prenyltransferasen eine 1'-4-Verknüpfung katalysiert.

Keine der Squalen- oder Phytoen-Synthasen weist eine signifikante Sequenzübereinstimmung mit den Aminosäuresequenzen von Prenyltransferasen wie FPP- oder GGPP-Synthasen auf (ARMSTRONG et al., 1993). Dennoch zeigen zwei Domänen der Synthasen (I und III Abb.III.20) eine gewisse Übereinstimmung mit den konservierten Domänen I und II, den postulierten Prenyldiphosphat-Bindungsstellen der Prenyltransferasen (ASHBY & EDWARDS, 1990; ASHBY et al., 1992). So tritt in Domäne I der Synthasen ebenso wie in den Squalen- und Squalenoxid-Cyclasen die Consensus-Sequenz $DDX_{2-4}D/E$ auf. In der Domäne III der Synthasen ist dieses Motiv nicht vollständig erhalten, doch es besteht eine schwache Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz der Domäne II der Prenyltransferasen. Im ORF2 sind fast alle der konservierten Aminosäuren der Synthasen erhalten. Im ORF1 ist die Übereinstimmung weniger hoch. Vergleicht man ORF1 und ORF2 miteinander, so beträgt der Anteil identischer Aminosäuren in beiden Polypeptiden nur 24%. Die Übereinstimmungen konzentrieren sich stark auf die drei konservierten Domänen. Eine Genduplikation liegt daher im Falle von *orf1* und *orf2* wahrscheinlich nicht vor. Die Analyse der Aminosäuresequenzen von ORF1 und ORF2 legt nahe, daß zumindest eines der beiden Leseraster die Squalen-Synthase in *Z.mobilis* codiert. Welche Funktion in diesem Fall die zweite Synthase haben könnte, ist unklar. Es läßt sich aber nicht ausschließen, daß es sich bei ORF1 und ORF2 um zwei Untereinheiten eines Enzyms handelt. Ein derartiger Fall wurde bisher aber nicht beschrieben. Zur Aufklärung ihrer Funktion bieten sich die Klonierung der einzelnen Leseraster in geeignete Vektoren und anschließende Versuche zu ihrer Expression in *E.coli* und *Z.mobilis* an. Gelingt die endgültige Identifizierung des Gens für die Squalen-Synthase aus *Z.mobilis*, so würde es sich dabei um die zweite klonierte und sequenzierte prokaryontische Squalen-Synthase nach der möglichen Squalen- oder Dehydrosqualen-Synthase aus *Staphylococcus aureus* (WIELAND et al., Veröffentlichung eingereicht) handeln. Kürzlich wurden die Sequenzen der Gene weiterer eukaryontischer Squalen-Synthasen veröffentlicht (aus dem Menschen und aus *Schizosaccharomyces pombe,* ROBINSON et al., 1993; aus der Ratte, Mc KENZIE et al., 1992), so daß mit der Sequenz der Squalen-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* (JENNINGS et al., 1991, FEGUEUR et al., 1991) insgesamt vier eukaryontische Sequenzen verfügbar sind. Eine ausführliche vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen der Squalen- und Phytoen-Synthasen, die gezielte Mutagenese konservierter Aminosäuren sowie die Konstruktion und Expression von Squalen-/Phytoen-Synthase-Hybridproteinen könnten wesentlich zur Aufklärung von Fragestellungen in bezug auf Substrat- und Cofaktor-Bindung und Reaktionsmechanismus dieser Enzymklasse beitragen.

Die gleichzeitige Expression der Gene der Squalen-Synthase und der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis* in *E.coli* könnten zur Etablierung eines neuen anabolen Stoffwechselweges, der Hopen-Synthese in *E.coli* führen. Dieses System würde eine Möglichkeit eröffnen, neue Erkenntnisse über die Biosynthese und physiologische Wirkung der Hopanoide zu gewinnen.

Die hohe Übereinstimmung in mehreren Domänen der Aminosäuresequenzen von prokaryontischen und eukaryontischen Squalen- und Phytoen-Synthasen gibt, ähnlich wie im Fall der Squalen- und Squalenoxid-Cyclasen, Anlaß für die Hypothese, daß es sich bei diesen

Enzymen um divergente Entwicklungen aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein handelt (ROBINSON et al., 1993).
Die Ergebnisse der Analyse der Aminosäuresequenzen zeigt, daß es sich bei keinem der beiden Leseraster *orf1* und *orf2* um das Gen für eine Prenyltransferase aus *Z.mobilis* handelt. Zur vollständigen genetischen Aufklärung der Isoprenoid-/Hopanoid-Biosynthese in *Z.mobilis*, ausgehend von der C_5-Einheit, dem IPP, bis zum Hopen fehlt zumindest noch das Gen für eine FPP-Synthase sowie möglicherweise das einer IPP-Isomerase. Darüber hinaus sollte *Z.mobilis* aber auch noch über eine weitere Prenyltransferase verfügen, die für die Synthese der Isopren-Seitenkette des in *Z.mobilis* nachgewiesenen Ubichinons 10 zuständig ist (STROHDEICHER et al., 1990) sowie über eine Hydroxybenzoat-Polyprenyltransferase, die die Verknüpfung der Polyprenylseitenkette mit dem Hydroxybenzoat katalysiert. Die Gene für beide Enzyme wurden bereits aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert und sequenziert. Beide Proteine besitzen eine postulierte Prenyldiphosphat-Bindungstelle, ähnlich der Domäne II der Prenyltransferasen (ASHBY & EDWARDS 1990, ASHBY et al., 1992).

5. Operon-Organisation der charakterisierten offenen Leseraster

Die Sequenzierung eines 6,2 kb großen chromosomalen DNA-Bereiches aus *Z.mobilis* führte zur Identifizierung von vier offenen Leserastern. Bei einem der offenen Leseraster (*shc*) handelt es sich um das Gen für die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Z.mobilis*. Für eine Beteiligung der drei weiteren offenen Leseraster (*orf1, orf2, orf3*) an der Hopanoid-Biosynthese in *Z.mobilis* spricht neben den bereits dargestellten Sequenzvergleichen auch ihre enge gemeinsame Organisation. Die Leseraster liegen alle in gleicher 5'-3'-Orientierung und in enger Nachbarschaft zueinander vor (Abb. IV.6). Die Leseraster *orf1* und *orf2* sowie *orf2* und *orf3* überlappen jeweils im Stopp-Startcodon-Bereich miteinander. Die intergenische Region zwischen *orf3* und *shc* umfaßt nur 14 Nukleotide. Diese Organisation der Leseraster läßt es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß es sich hier um eine Transkriptionseinheit, also ein Operon handelt. Die Organisation von zwei oder mehreren Genen in Form eines Operons wurde schon mehrfach für *Z.mobilis* beschrieben. Dabei handelte es sich sowohl um hochexprimierte Gene des glykolytischen Stoffwechsels (CONWAY et al., 1987; CONWAY & INGRAM, 1988; BARNELL et al., 1990) als auch um schwach exprimierte Gene des anabolen Stoffwechsels (SHARK & CONWAY, 1992).
Das Überlappen von Leserastern wie im Fall von *orf1* und *orf2* sowie *orf2* und *orf3* ist ein Hinweis darauf, daß zusätzlich zur Transkriptionskopplung eine Translationskopplung vorliegt. Translationskopplung bedeutet, daß die Translation eines Genes wesentlich von der Translation des auf der gemeinsamen mRNA in 5'-Richtung vorausgehenden Leserasters abhängt (ZALKIN & EBBOLE, 1988). Eine effiziente Translationskopplung wird in vielen Fällen durch das Überlappen von Terminations- und Initiationscodon erreicht. Bereits für eine Vielzahl von Biosynthese-Genen, die benachbart in einem Operon organisiert vorliegen, konnte eine derartige

Translationskopplung nachgewiesen werden: *E.coli; trpE-trpD* (OPPENHEIM & YANOFSKY, 1980); *galT-galK* (SCHÜMPERLI et al., 1982); *rplK-rplA* (BAUGHMAN & NOMURA, 1983); *trpB-trpA* (AKSOY et al., 1984); *ilvD-ilvA* (HARMS et al., 1988); *Salmonella typhimurium;* Gene der Cobalamin-Biosynthese (ROTH et al., 1993). Durch Genfusionen wurden auch schon künstliche Translationskopplungsgruppen hergestellt (ZAGHLOUL et al., 1985; PEIJNENBURG et al., 1990; VAN DE GUCHTE et al., 1991).

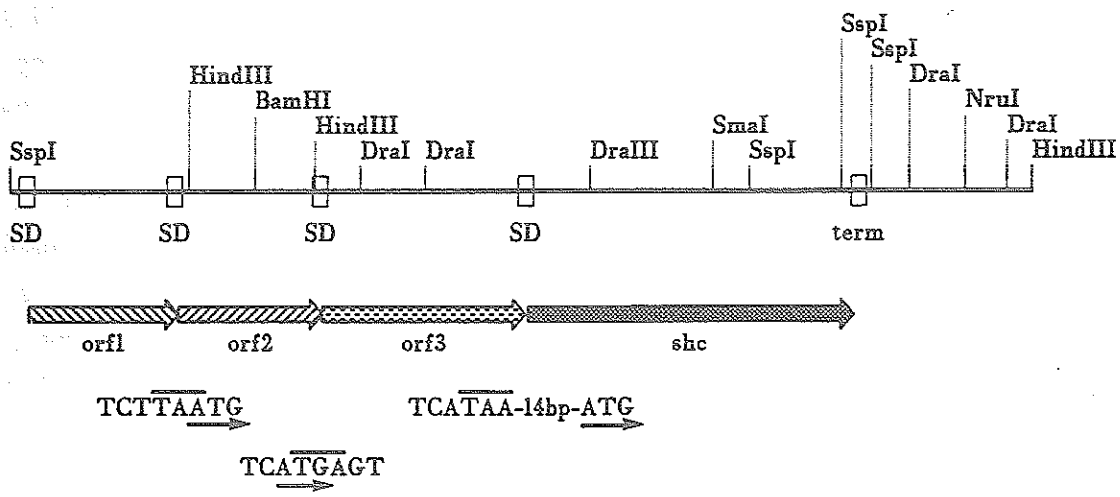


Abb.IV.6: Organisation der vier auf dem 6,2 kb umfassenden sequenzierten DNA-Fragment aus *Z.mobilis* CP4 lokalisierten offenen Leseraster. Angegeben ist die Lage der Leseraster, der möglichen Ribosomenbindestellen (SD) sowie einer möglichen Terminationsstruktur im Anschluß an das *shc*-Gen. Darüber hinaus sind die Überlappungen im Stopp-/Startcodonbereich zwischen den Leserastern *orf1* und *orf2* sowie *orf2* und *orf3* dargestellt. Über- bzw. unterstrichen sind jeweils das Stoppcodon des vorhergehenden und das Startcodon (Pfeil) des nachfolgenden, offenen Leserasters.

Eine Translationskopplung hat eine stöchiometrische Synthese der beteiligten Genprodukte zur Folge. Die Regulation der Expression durch eine Translationskopplung erscheint besonders sinnvoll für Polypeptide, die als Untereinheiten in einem bestimmten Zahlenverhältnis zueinander in Protein- bzw. Enzymkomplexen vorliegen. Eine Koordination der Synthese verschiedener Untereinheiten durch Translationskopplung konnte zum Beispiel für die H^+-ATPase in *E.coli* gezeigt werden (HELLMUTH et al., 1991). Für Enzyme der Carotinoid-Biosynthese in Pflanzen wurde beschrieben, daß sie in Form von Enzymkomplexen vorliegen (COOLBEAR & THRELFALL, 1989). Möglicherweise liegen auch die Enzyme der Hopanoid-Biosynthese in *Z.mobilis* in Form eines Enzymkomplexes vor. Dies erscheint insbesondere aufgrund des hydrophoben Charakters von Substraten und Produkten (Squalen, Hopen) der Hopanoid-Biosynthese sinnvoll. Der bisher einzige beschriebene Fall von überlappenden Genen in *Z.mobilis* geht nicht mit einer Translationskopplung einher. Es handelt sich dabei um die Gene *zwf*

(Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) und *edd* (6-Phosphogluconat-Dehydratase) (BARNELL et al., 1990), die im Terminations- Initiationscodonbereich mit acht Nukleotiden überlappen. Dieser Überlappungsbereich ist größer als in den Fällen, für die eine Translationskopplung beschrieben wurde. Die Regulation der Expression des *zwf*- und *edd*-Gens, die mit zwei weiteren Genen in einem Operon organisiert vorliegen, erfolgt durch eine komplexe Prozessierung des polycistronischen mRNA-Transkriptes (LIU ET Al., 1992).
Mit dem 14 Nukleotide unfassenden Abstand zwischen dem 3'-Ende des Leserasters *orf3* und dem Initiationscodon des *shc*-Leserasters könnte auch das *shc*-Gen noch Mitglied der Translationskopplungsgruppe sein. Falls aber noch eine Translationskopplung vorliegt, so wird sie im Falle des *shc*-Gens wahrscheinlich weniger effizient sein als für die drei vorausgehenden Leseraster.
Während die Leseraster *orf 1, 2* und *3* über Ribosomenbindungsstellen verfügen (AGGA, GGAGA, GAAGG), die in dieser oder ähnlicher Form auch vor hoch exprimierten Genen auftreten (SPRENGER et al., 1993), befindet sich vor dem *shc*-Gen nur eine mögliche Ribosomenbindungsstelle, die bisher noch nicht für *Z.mobilis* beschrieben wurde (AGAAA). Hierbei könnte es sich um eine weniger effektive Ribosomenbindungsstelle handeln, die gemeinsam mit dem Codongebrauch für eine niedrige Expression des *shc*-Gens verantwortlich ist. Die Limitierung der Hopen-Synthese durch die Squalen-Hopen-Cyclasereaktion, wie sie in den durchgeführten Enzymtests mit IPP und DMAPP bzw. FPP als Substrat auftrat, könnte auf dem vermutlich insgesamt niedrigen Expressionsniveau des *shc*-Gens beruhen.
Mit einem Abstand von 26 bp folgen im Anschluß an das *shc*-Gen Nukleotidsequenzen, die auf mRNA-Ebene die Ausbildung einer rho-unabhängigen Transkriptions-Terminationsstruktur ermöglichen (PLATT, 1981 und 1986). Da auf dem sequenzierten, 1067 Nukleotide umfassenden Bereich in 3'-Richtung hinter dem *shc*-Gen kein weiteres größeres offenes Leseraster lokalisiert werden konnte, ist es wahrscheinlich, daß es sich bei dem *shc*-Gen um das letzte Gen innerhalb der postulierten Transkriptionseinheit handelt. Eine Promotorstruktur, die der Promotor-Consensussequenz für hochexprimierte Gene in *Z.mobilis* (CONWAY et al., 1991) entspricht, konnte vor dem *orf1* nicht identifiziert werden. Promotorsequenzen für schwach exprimierte Gene in *Z.mobilis* wurden bisher nicht beschrieben. Die Vermutung liegt nahe, daß sich vor dem *orf1* noch weitere Gene befinden, die Elemente der Transkriptionseinheit sind. Es wäre daher sinnvoll, ein weiteres chromosomales DNA-Fragment, das mit dem 5'-Bereich des *orf1* überlappt, aus *Z.mobilis* zu klonieren und zu sequenzieren. Möglicherweise könnten so weitere Gene identifiziert werden, die die aufgrund des Fehlens von Genen einer FPP-Synthase und einer IPP-Isomerase noch bestehenden Lücken in der genetischen Aufklärung der Hopanoid-Biosynthese von der C_5-Einheit, dem IPP, bis zum Hopen in *Z.mobilis* schließen.
Weitgehend offen bleiben weiterhin sowohl die biochemische als auch die genetische Aufklärung der Biosynthese der C_5-Einheit, des Isopentenylpyrophosphats, sowie der Derivatisierung und Modifizierung des Hopens zu den komplexen Hopanoiden, die die eigentlichen Membrankomponenten darstellen.

V. Zusammenfassung

Das Gram-negative, obligat fermentative Bakterium *Zymomonas mobilis* weist mit 30 mg/g Trockengewicht den höchsten bisher ermittelten Hopanoidgehalt auf. Die Hopanoide, pentacyclische Triterpenoide (Isoprenoide), sind als Membrankomponenten wesentlich an der hohen Ethanoltoleranz von *Z.mobilis* beteiligt. Über die Genetik der Isoprenoid- und Hopanoid-Biosynthese in Prokaryonten sind bisher nur wenige Daten verfügbar. Ziel dieser Arbeit war es, durch die Klonierung und Charakterisierung von Genen der Hopanoid-Biosynthese aus *Z.mobilis* zur Aufklärung dieses Biosyntheseweges beizutragen.

Mit Hilfe einer heterologen Gensonde aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* konnte das Gen der Squalen-Hopen-Cyclase, eines Schlüsselenzyms der Hopanoid-Biosynthese, aus *Zymomonas mobilis* kloniert werden. Das Gen (*shc*) codiert ein Polypeptid mit 658 Aminosäuren und einem abgeleiteten Molekulargewicht von 74,1 kDa. Die Aminosäuresequenz weist signifikante Übereinstimmungen mit der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A.acidocaldarius* auf. Die C-terminalen Bereiche der beiden bakteriellen Squalen-Cyclasen zeigen eine deutliche Ähnlichkeit mit der carboxyterminalen Region der bisher einzigen klonierten und sequenzierten, eukaryontischen Squalenoxid-Cyclase aus *Candida albicans*. Allen drei Enzymen ist das mehrfache Auftreten des konservierten Aminosäuremotiv Arg/Lys Gly/Ala X_{2-3} Tyr/Phe/Trp X_4 Gln X_{2-5} Gly X Trp (X steht für eine beliebige Aminosäure) gemeinsam. Dieses Motiv erhielt aufgrund der besonders guten Konservierung des Glutamin- und des Tryptophanrestes die Bezeichnung QW-Motiv. Das mehrfache Auftreten dieses QW-Motivs in konservierten Abständen ist ein charakteristisches Merkmal der Squalen(oxid)-Cyclasen. Die Übereinstimmungen in der Primärstruktur der prokaryontischen Squalen-Cyclasen und der eukaryontischen Squalenoxid-Cyclase unterstützen die Theorie, daß es sich um divergente Entwicklungen mit einem gemeinsamen evolutionären Ursprung handelt.

Das *shc*-Gen aus *Z.mobilis* konnte sowohl in *Z.mobilis* als auch in *Escherichia coli* erfolgreich exprimiert werden. Im rekombinanten *Z.mobilis*-Stamm führten die plasmidcodierten Kopien des *shc*-Gens zu einer Erhöhung der Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität im zellfreien Rohextrakt auf das Fünffache des für den Wildtyp ermittelten Wertes (Wildtyp 0,06 mU/mg Protein, rekombinanter *Z.mobilis*-Stamm 0,3 mU/mg Protein). Im rekombinanten *E.coli*-Stamm vermittelten die plasmidcodierten Kopien des *shc*-Gens eine Squalen-Hopen-Cyclaseaktivität (0,2 mU/mg Protein), über die der *E.coli*-Wildtyp nicht verfügt.

Durch die Sequenzierung der zum *shc*-Gen benachbarten DNA-Regionen konnten drei weitere offene Leseraster identifiziert werden (*orf1*, *orf2*, *orf3*). Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergab, daß es sich bei diesen Leserastern um weitere Gene der Hopanoid-Biosynthese aus *Z.mobilis* handeln könnte. Das 5'-Ende von *orf1* konnte anhand der vorliegenden Sequenzdaten nicht eindeutig festgelegt werden. Wahrscheinlich codiert *orf1* ein Polypeptid, das 298 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33,2 kDa umfaßt. *orf2* codiert 291

Aminosäuren mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 32,6 kDa. In den Aminosäuresequenzen beider Leseraster sind Bereiche mit signifikanten Übereinstimmungen zu drei konservierten Domänen von Phytoen- und Squalen-Synthasen vorhanden. Bei einem der beiden Leseraster könnte es sich um das Gen für die Squalen-Synthase aus *Z.mobilis* handeln. Die Funktion des zweiten Leserasters ist bisher unklar. *orf3* codiert 414 Aminosäuren, die ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 45,5 kDa ergeben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz verfügt wie die Phytoen-Dehydrogenasen über eine charakteristische ADP-ßαß-Bindungsfalte am Aminoterminus und weist darüber hinaus weitere Übereinstimmungen mit den Phytoen-Dehydrogenasen auf.

Die enge Nachbarschaft der vier identifizierten Gene weist darauf hin, daß sie in Form eines Operons organisiert vorliegen. Zumindest im Falle der Leseraster *orf1*, *orf2* und *orf3* liegt anscheinend zusätzlich zur Transkriptionskopplung auch eine Translationskopplung vor.

VI. Literaturverzeichnis

Abe, I., M. Rohmer und G.D. Prestwich. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. Veröffentlichung eingereicht bei Chemical Reviews.

Abe, I. und G.D. Prestwich. Active site mapping of affinity labeled rat oxidosqualene cyclase. Veröffentlichung eingereicht bei J. Biol. Chem.

Agnew, W.S. 1985. Squalene synthetase. Methods in Enzymology **110**: 359-373.

Aksoy, S., C.L. Squires und C. Squires. 1984. translational coupling of the *trpB* and *trpA* genes at the *Escherichia coli* tryptophan operon. J. Bacteriol. **157**: 363-367.

Anderson, M.S., M. Muehlbacher, I.P. Street, J. Proffitt und C.D. Poulter. 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.

Anderson, M.S., J.G. Yarger, C.L. Burck und C.D. Poulter. 1989. Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **264**: 19176-19184.

Ansorge, W. (1986). A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. J. Biochem. Biophys. Methods **13**: 315.

Arfman, N., V. Worrel und L.O. Ingram. 1992. Use of the *tac*-promotor and *lac-I*^{q} for the controlled expression of *Zymomonas mobilis* fermentative genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. **174**: 7370-7378.

Armstrong, G.A., M. Alberti, F. Leach und J.E. Hearst. 1989. Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Gen. Genet. **216**: 254-268.

Armstrong, G.A., M. Alberti und J.E. Hearst. 1990. Conserved enzymes mediate the early reactions of carotenoid biosynthesis in nonphotosynthetic and photosynthetic prokaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 9975-9979.

Armstrong, G.A., B.S. Hundle und J.E. Hearst. 1993. Evolutionary Conservation and structural similarities of carotenoid biosynthesis gene products from photosynthetic and nonphotosynthetic organisms. Methods in Enzymology **214**: 297-311.

Ashby, M.N. und P.A. Edwards. 1990. Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. J. Biol. Chem. **265**: 13157-13164.

Ashby, M.N., D.H. Spear und P.A. Edwards. 1990. in Molecular Biology of Atherosclerosis: Twentieth Steenbock Symposium (A. Attie, Herausgeber) 27-34, Elsevier, New York.

Ashby, M.N., S.Y. Kutsunai, S. Ackerman, A. Tzagoloff und P.A. Edwards. 1992. *COQ2* is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:-polyprenyltransferase. J. Biol. Chem. **267**: 4128-4136.

Bachmann, B.J., und K.B. Low. 1980. Linkage map of *Escherichia coli* K12. Microbiol. Rev. **44**: 1-56.

Baker, P.J., K.L. Britton, D.W. Rice, A. Rob und T.J. Stillman. 1992. Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint regions of the nucleotide binding fold. implications for nucleotide specificity. J. Mol. Biol. **228**: 662-671.

Barnell, W.O., Kyung Cheol Yi und T. Conway. 1990. Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. J. Bacteriol. **172:** 7227-7240.

Barnell, W.O., J. Liu, T.L. Hesman, M. C. O'Neill und T. Conway. 1992. The *Zymomonas mobilis glf, zwf, edd,* and *glk* genes form an operon: localization of the promoter and identification of a conserved sequence in the regulatory region. J. Bacteriol. **174:** 2816-2823.

Barrow, K.D., J.G. Collins, P.L. Rogers und G.M. Smith. 1983. Lipid composition of an ethanol-tolerant strain of *Zymomonas mobilis.* Biochim. Biophys. Acta **753:** 324-330.

Barrow, K.D. and J.-A. Chuck. 1990. Determination of hopanoid levels in bacteria using high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry **184:** 395-399.

Bartley, G.E., T.J. Schmidhauser, C. Yanofsky und P.A. Scolnik. 1990. Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. J. Biol. Chem. **265:** 16020-16024.

Basson, M.E., M. Thorsness und J. Rine. 1986. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83:** 5563-5567.

Basson, M.E., M. Thorsness, J. Finer-Moore, R.M. Stroud und J. Rine. 1988. Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A reductase, the rate limiting enzyme of sterol biosynthesis. Mol. Cell. Biol. **8:** 3797-3808.

Baughman, G. und M. Nomura. 1983. Localization of the target site for translational regulation of the L11 operon and direct evidence for translational coupling in *Escherichia coli.* Cell **34:** 979-988.

Berry, A.M., R.A. Moreau und A.D. Jones. 1991. Bacteriohopanetetrol: abundant lipid in *Frankia* cells and in nitrogen-fixing nodule tissue. Plant Physiol. **95:** 111-115.

Berry, A.M., O.T. Harriott, R.A. Moreau, S.F. Osman, D.R. Benson und A.D. Jones. 1993. Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90:** 6091-6094.

Beyía, E.D. und J.W. Porter. 1976. Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. Annu. Rev. Biochem. **45:** 113-142.

Bird, C.R., J.A. Ray, J.D. Fletcher , J.M. Boniwell, A.S. Bird, C. Teulieres, I. Blain, P.M. Bramley und W. Schuch. 1991. Using antisense RNA to study gene function: Inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. Bio/Technology **9:** 635-639.

Birnboim, H.C. und J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7:** 1513-1523.

Björk, G.R., J.U. Ericson, C.E.D. Gustafsson, T.G. Hagervall, Y.H. Jönsson und P.M. Wikström. 1987. Transfer RNA modification. Ann. Rev. Biochem. **56:** 263-287.

Bork, P. und C. Grunwald. 1990. Recognition of different nucleotide-binding sites in primary structures using a property-pattern approach. Eur. J. Biochem. **191:** 347-358.

Bradford, M.M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72:** 248-254.

Bramley, P. M. 1985. The *in vitro* biosynthesis of carotenoids. Advances in Lipid Research. **21:** 243-279.

Bringer, S., H. Sahm und W. Swyzen. 1984. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. Biotechnol. Bioeng. Symp. **14:** 311-319.

Bringer, S., R.K. Finn, und H. Sahm. 1984. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. **139:** 376-381.

Bringer, S., T. Härtner, K. Poralla und H. Sahm. 1985. Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continous cultures of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. **140:** 312-316.

Buchholz, S.E., M.M. Dooley und D.E. Eveleigh. 1987. *Zymomonas* - an alcoholic enigma. TIBTECH **5:** 199-203.

Buntel, C.J. und J.H. Griffin. 1992. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the oxidosqualene cyclase from *Candida albicans*. J. Am. Chem. Soc. **114:** 9711-9713.

Buntel, C.J. und J.H. Griffin. Evolution of sterol and triterpene cyclases. Veröffentlichung eingereicht.

Buttke, T.M., S. Jones und K. Bloch. 1980. Effect of sterol side chains on growth and membrane fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 144: 124-130.

Carattoli, A., N. Romano, P. Ballario, G. Morelli und G. Macino. 1991. The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (Albino 3) reveals highly conserved regions among prenyltransferases. J. Biol. Chem. **266:** 5854-5859.

Chambon, C., V. Ladeveze, A. Oulmouden und F. Karst. 1990. Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthase. Curr. Genet. **18:** 41-46.

Chambon, C. V. Ladeveze, M. Servouse, L. Blanchard, C. Javelot, B. Vladescu und F. Karst. 1991. Sterol pathway in yeast. Identification and properties of mutant strains defective in mevalonate diphosphate decarboxylase and farnesyl diphosphate synthetase. Lipids **26:** 633-636.

Chamowitz, D., N. Misawa, G. Sandmann und J. Hirschberg. 1992. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. FEBS **296:** 305-310.

Conner, R.L., J.R. Landrey, C.H. Burns und F.B. Mallory. 1968. Cholesterol inhibition of pentacyclic triterpenoid biosynthesis in *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. **15:** 600-605.

Conway, T., G.W. Sewell und L.O. Ingram. 1987. Glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: Cloning, sequencing, and identification of promoter region. J. Bacteriol. **169:** 5653-3662.

Conway, T. und L.O. Ingram. 1988. Phosphoglycerate kinase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing, and localization within the *gap* operon. J. Bacteriol. **170:** 1926-1933.

Conway, T. und L.O. Ingram. 1989. Similarity of *Escherichia coli* propanediol oxidoreductase (*fucO* product) and an unusual alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **171:** 3754-3759.

Coolbear, T. und D.R. Threlfall. 1989. Biosynthesis of terpenoid lipids. In Microbial Lipids Volume 2, Academic press, 116-254.

Deinhard, G. 1987. *Bacillus acidoterrestris sp. nov.* und *Bacillus cycloheptanicus sp. nov.*, zwei neue acidophile *Bacillus*-Arten, die omega-alicyclische Fettsäuren enthalten. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Demel, R.A. und B. De Kruyff. 1976. The Function of sterols in membranes. Biochimica et Biophysica Acta **457:** 109-132.

Dequin, S., R. Gloeckler, C.J. Herbert und F. Boutelet. 1988. Cloning, sequencing and analysis of the yeast *S.uvarum ERG10* gene encoding acetoacetyl CoA thiolase. Curr. Genet. **13:** 471-478.

Doelle, H.W., L. Kirk, R. Crittenden und Hsien Toh. 1993. *Zymomonas mobilis* - Science and industrial application. Crit. Rev. Biotechnol. **13:** 57-98.

Dogbo, O., A. Laferriere, A. D'Harlingue und B. Camara. 1988. Carotenoid biosynthesis: isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85:** 7054-7058.

Eddy, C.K., O.H. Smith. und K.D. Noel. 1988. Cosmid cloning of five *Zymomonas trp* genes by complementation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida trp* mutants. J. Bacteriol. **170:** 3158-3163.

Eddy, C.K., K.F. Keshav, Haejung An, E.A. Utt, J.P. Mejia und L.O. Ingram. 1991. Segmental message stabilization as a mechanism for differential expression from the *Zymomonas mobilis gap* operon. J. Bacteriol. **173:** 245-254.

Entner, N. und M. Doudoroff. 1952. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila.* J. Biol. Chem. **196:** 853-862.

Facchini, P.J. und J. Chappel. 1992. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89:** 11088-11092.

Fegueur, M., L. Richard, A.D. Charles und F. Karst. 1991. Isolation and primary structure of the ERG9 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding squalene synthetase. Curr. Genet. **20:** 365-372.

Feinberg, K. und R. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132:** 6-13.

Flesch, G. 1987. Biosynthèses des bactèriohopanepolyols, triterpènoids bactériens. Inhibiteurs de la squalène-cyclase de procaryotes. Thèse, l'Universitè de Haute-Alsace, Mulhouse.

Flesch, G. und M. Rohmer. 1987. Growth inhibition of hopanoid sythesizing bacteria by squalene cyclase inhibitors. Arch. Microbiol. 147: 100-104.

Flesch, G. und M. Rohmer. 1988. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. Eur. J. Biochem. **175:** 405-411.

Flesch, G. und M. Rohmer. 1989. Prokaryotic triterpenoids. A novel hopanoid from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis.* Biochem. J. **262:** 673-675.

Fujisaki, S., H. Hara, Y. Nishimura, K. Horiuchi und T. Nishino. 1990. Cloning and nucleotide sequence of the *ispA* gene responsible for farnesyl diphosphate synthase activity in *Escherichia coli.* J. Biochem. **108:** 995-1000.

Fujisaki, S., T. Nishino, H. Katsuki, H. Hara, Y. Nishimura und Y. Hirota. 1989. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant having temperature sensitive farnesyl dipshosphate synthase. J. Bacteriol. **171:** 5654-5658.

Gibbs, M. und R. de Moss. 1951. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri.* Arch. Biochem. Biophys. **343:** 478-479.

Glomset, J.A., M.H. Gelb und C.C. Farnsworth. 1990. Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. Trends Biochem. Sci. **15:** 139-142.

Goncalves de Lima, O., I.E. Schumacher, und J.M. De Aranjo. 1972. New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. recifensis. Rev Inst. Antibiot. Univ. Recife. **12:** 57-69.

Goodwin, T.W. 1993. Biosynthesis of carotenoids: an overview. Meth. Enzymol. **214:** 330-340.

Gough, J.A. und N.E. Murray. 1983. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. J. Mol. Biol. **166:** 1-19.

Grunstein, M. und D.S. Hogness. 1975. Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72:** 3961-3965.

van de Guchte, M., J. Kok und G. Venema. 1991. Distance-dependent translational coupling and interference in *Lactococcus lactis*. Mol. Gen. Genet. **227:** 65-71.

Gunasekaran, P., T. Karunakaran, B. Cami, A.G. Mukundan, L. Preziosi und J. Baratti. 1990. Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. **172:** 6727-6735.

Hanahan,D. 1983. Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166:** 557-580.

Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of E.coli. DNA Cloning Volume 1, ed. D.M. Glover, IRL Press Oxford, Washington DC.

Harms, E., E. Higgins J.-W. Chen und H.E. Umbarger. 1988. Translational Coupling between *ilvD* and *ilvA* genes of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170:** 4798-4807.

Hellmuth, K., G. Rex, B. Surin, R. Zinck und U.E.G. Mc Carthy. 1991. Translational coupling varying in efficiency between different pairs of genes in the central region of the *atp* operon of *Escherichia coli*. Molec. Microbiol. **5:** 813-824.

Henikoff, S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene **28:** 351-359.

Hermans, M.A.F., B. Neuss und H. Sahm. 1991. Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. J. Bacteriol. **173:** 5592-5595.

Hesman, T.L., W.O. Barnell und T. Conway. 1991. Cloning characterization and nucleotide sequence analysis of a *Zymomonas mobilis* phosphoglucose isomerase gene that is subject to carbon source-dependent regulation. J. Bacteriol. **173:** 3215-3223.

Hohn, T.M. und P.D. Beremand. 1989. Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. Gene **79:** 131-138.

Horbach, S. 1990. Einfluß von Hemmstoffen der Hopanoidbiosynthese auf die Ethanoltoleranz bei *Zymomonas mobilis*. Diplomarbeit, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Horbach, S., B. Neuss und H. Sahm. 1991. Effect of azasqualene on hopanoid biosynthesis and ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. **79:** 347-350.

Horbach, S., H. Sahm und R. Welle. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different pathways? FEMS Microbiol. Lett. **111:** 135-140.

Hoshino, T., R. Fujii und T. Nakahara. 1993. Molecular cloning and sequence analysis of the *crtB* gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigments. Appl. Environ. Microbiol. **59:** 3150-3153.

Hundle, B.S., P. Beyer; H. Kleinig, G. Englert und J.E. Hearst. 1991. Carotenoids of *Erwinia herbicola* and an *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster. Phytochemistry and Phytobiology **54:** 89-93.

Jandrositz, A., F. Turnowsky und G. Högenauer. 1991. The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene **107:** 155-160.

Jennings, S.M., Y.H. Tsay, T.M. Fisch und G.W. Robinson. 1991. Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88:** 6038-6042.

Johnson, W.S., S.J. Telfer, Soan Cheng und U. Schubert. 1987. Cation-stabilizing auxiliaries: A new concept in biomimetic polyene cyclization. J. Am. Chem. Soc. **109:** 2517-2518.

Johnson, W.S., S.D. Lindell und J. Steele. 1987. Rate enhancement of biomimetic polyene cyclizations by a cation-stabilizing auxiliary. J. Am. Chem. Soc. **109:** 5852-5853.

Johnson, W.S., R.A. Buchanan, W.R. Bartlett, F.S. Tham und R.K. Kullnig. 1993. The fluorine atom as a cation-stabilizing auxiliary in biomimetic polyene cyclizations. 3. Use to effect regiospecific control. J. Am. Chem. Soc. **115:** 504-515.

Kagawa, Y., M. Ishizuka, T. Saishu und S. Nakao. 1986. Stable structure of thermophilic proton ATPase beta subunit. J. Biochem. **100:** 923-934.

Kannenberg, E. 1983. Membraneigenschaften von Hopanoiden und Lipiden, die Fettsäuren mit endständigen Verzweigungen und Ω-Cyclohexanringen enthalten. Dissertation, Universität Tübingen.

Kannenberg, E. und K. Poralla. 1980. A hopanoid from the thermo-acidophilic *Bacillus acidocaldarius* condenses membranes. Naturwissenschaften **67:** 458-459.

Kannenberg, E. und K. Poralla. 1982. The influence of hopanoids on growth of *Mycoplasma mycoides*. Arch. Microbiol. **133:** 100-102.

Kannenberg, E., A. Blume, A. McElhaney, R.N. Poralla. 1983. Monolayer and calorimetric studies pf phosphatidylcholines containing branched-chain fatty acids and of their interactions with cholesterol and a bacterial hopanoid in model membranes. Biochim. Biophys. Acta **783:** 11-116.

Karst, F. und F. Lacroute. 1977. Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutants deficient in the early steps of the pathway. Molec. Gen. Genet. **154:** 269-277.

Kelly, R., S.M. Miller, M.H. Lai und D.R. Kirsch. 1990. Cloning and characterization of the 2,3-oxidosqualene cyclase-coding gene of *Candida albicans*. Gene **87:** 177-183.

Kersters, K. und J. de Ley. 1968. The occurence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. **31:** 393-406.

Kleemann, G. 1992. Hopanoidgehalt und Fettsäuremuster zweier *Rhodopseudomonas*-Arten und Reinigung der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Rhodopseudomonas palustris*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Koyama, T., S. Obata, M. Osabe, A. Takeshita, K. Yokoyama, M. Uchida, T. Nishino und K. Ogura. 1993. Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. J. Biochem. **113:** 355-363.

Kyte, J. und R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. J. Mol. Biol. **157:** 105-132.

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

Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology **1:** 190-206.

Liu, J., W.O. Barnell und T. Conway. 1992. The polycistronic mRNA of the *Zymomonas mobilis glf-zwf-edd-glk* operon is subject to complex transcript processing. J. Bacteriol. **174:** 2824-2833.

Low, B. 1968. Formation of merodiploids with a class of rec$^-$ recipient strains of *Escherichia coli* K12. Proc. Natl. Acad. Sci. **60:** 160-167.

Maltese, W.A. 1990. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. FASEB Journal **4:** 3319-3328.

Marrero, P.F., C.D. Poulter und P.A. Edwards. 1992. Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity. J. Biol. Chem. **267:** 21873-21878.

Martinez-Férez I.M. und A. Vioque. 1992. Nucleotide sequence of the phytoene desaturase gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and characterization of a new mutation which confers resistance to the herbicide norflurazon. Plant Molec. Biol. **18:** 981-983.

Math, S.K., J.E. Hearst und C.D. Poulter. 1992. The *crtE* gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89:** 6761-6764.

McConkey, A. 1905. Lactose fermenting bacteria in faeces. J. Hyg. **5:** 333-378.

McKenzie, T.L., G. Jiang, J.R. Straubhaar,D.G. Conrad und I. Shechter. 1992. Molecular cloning, expression, and characterization of the cDNA for the rat hepatic squalene synthase. J. Biol. Chem. **267:** 21368-21374.

Mejia, J.P., M.E. Burnett, H. An, W.O. Barnell, K.F. Keshav, T. Conway und L.O. Ingram. 1992. Coordination of expression of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: a simple hypothesis based on mRNA stability. J. Bacteriol. **174:** 6438-6443.

Michel, G.P.F., B. Neuß, C.H. Tappe und J. Baratti. 1992. Isolation and characterization of *Zymomonas mobilis* mutants resistant to octadecyltrimethylammonium chloride, a detergent acting on hopanoid-producing bacteria. Arch. Microbiol. **157:** 116-124.

Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura und K. Harashima. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172:** 6704-6712.

Mullis, K.B. und F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology **155:** 335-350.

Nes, W.R. 1974. Role of sterols in membranes. Lipids **9:** 596-612.

Neumann, S. und H. Simon. 1986. Purification, partial characterization and substrate specificity of a squalene cyclase from *Bacillus acidocaldarius*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler **367:** 723-729.

Ochs, D. 1990. Squalen-Hopen-Cyclase aus *Bacillus acidocaldarius*: Reinigung, Klonierung und Sequenzierung. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Ochs, D., C.H. Tappe, P. Gärtner, R. Kellner und K. Poralla. 1990. Properties of purified squalene-hopene cyclase from *Bacillus acidocaldarius*. Eur. J. Biochem. **194:** 75-80.

Ochs, D., C. Kaletta, K.-D. Entian, A. Beck-Sickinger und K. Poralla. 1992. Cloning, expression, and sequencing of squalen-hopene cyclase, a key enzyme in triterpenoid metabolism. J. Bacteriol. **174:** 298-302.

Oppenheim, D.S. und C. Yanofsky. 1985. Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. Genetics **95:** 785-795.

Oulmouden, A. und F. Karst. 1991. Nucleotide sequence of the *ERG12* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mevalonate kinase. Curr. Genet. **19:** 9-14.

Ourisson, G. 1989. The evolution of terpenes to sterols. Pure & Appl. Chem. **61:** 345-348.

Ourisson, G., P. Albrecht und M. Rohmer. 1979. The hopanoids. Palaeochemistry and biochemistry of a group of natural products. Pure & Appl. Chem. **51:** 709-729.

Ourisson, G., P. Albrecht und M. Rohmer. 1984. The microbial origin of fossil fuels. Sci. Am. **251:** 44-51.

Ourisson, G., M. Rohmer und K. Poralla. 1987. Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. Ann. Rev. Microbiol. **41:** 301-333.

Pandian, S., S. Saengchjan und T.S. Raman. 1981. An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. Biochem. J. **196:** 675-681.

Peijnenburg, A.A.C.M., G. Venema und S. Bron. 1990. Translational coupling in a *penP-lacZ* gene fusion in *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*: use of AUA as a start codon. Mol. Gen. Genet. **221:** 267-272.

Perry, K.L., T.A. Simonitch, K.J. Harrison-Lavoie und S.T. Liu. 1986. Cloning and regulation of *Erwinia herbicola* pigment genes. J. Bacteriol. **168:** 607-612.

Pfander, H. 1992. Carotenoids: an overview. Methods in Enzymology **213:** 3-13.

Platt, T. 1981. Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon. Cell **24:** 10-23.

Platt, T. 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. Ann. Rev. Biochem. **55:** 339-372.

Poralla, K. 1982. Considerations on the evolution of steroids as membrane components. FEMS Microbiol. Lett. **13:** 131-135.

Poralla, K., E. Kannenberg und A. Blume. 1980. A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. FEBS Lett. **113:** 107-110.

Poralla, K., T. Härtner und E. Kannenberg. 1984. Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. FEMS Microbiol. Lett. **23:** 253-256.

Poralla, K., A. Hewelt, G.D. Prestwich, I. Abe, I. Reipen und G. Sprenger. A repetitive QW motif in squalene and oxidosqualene cyclases. Zur Veröffentlichung eingereicht bei TIBS.

Prince, R.C. 1987. Hopanoids: the world's most abundant biomolecules? Trends Biochem. Sci: **12:** 455-456.

Proctor, R.H. und T.M. Hohn. 1993. Aristolochene Synthase. Isolation, characterization, and bacterial expression of a sesquiterpenoid biosynthetic gene *(Ari1)* from *Penicillium roqueforti.* J. Biol. Chem. **268:** 4543-4548.

Ray, J., C. Bird, M. Maunders, D. Grierson und W. Schuch. 1987. Sequence of pTOM5, a ripening related cDNA from tomato. Nucl. Acids. Res. **15:** 10587.

Robinson, G.W., Y.H. Tsay, B.K. Kienzle, C.A. Smith-Monroy und R.W. Bishop. 1993. Conservation between human and fungal squalene synthetases: similarities in structure, function, and regulation. Molec. Cell. Biol. **13:** 2706-2717.

Roessner, C.A., C. Min, S.H. Hardin, L.W. Harris-Haller, J.C. McCollum und A.I. Scott. 1993. Sequence of the *Candida albicans erg7* gene. Gene **127:** 149-150.

Rogers, P.L., K.J. Lee, M.L. Skotnicki und D.E. Tribe. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis.* Adv. Biochem. Eng. **23:** 37-84.

Rohmer, M. und G. Ourisson. 1976. Dérivés du Bactériohopane: Variations structurales et Répartition. Tetrahedron Letters **40:** 3637-3640.

Rohmer, M. und G. Ourisson. 1986. Unsaturated bacteriohopanepolyols from *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum.* J. Chem. Research (S) 356-357.

Rohmer, M., P. Bouvier und G. Ourisson. 1979. Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76:** 847-851.

Rohmer, M., B. Sutter und H. Sahm. 1989. Bacterial sterol surrogates. Biosynthesis of the side-chain of bacteriohopanetetrol and of a carbocyclic pseudopentose from ^{13}C-labelled glucose in *Zymomonas mobilis.* J. Chem. Soc. Chem. Commun. **19:** 1471-1472.

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

Roth, J.R., J.G. Lawrence, M. Rubenfield, S. Kieffer-Higgins und G.M. Church. 1993. Characterization of the cobalamin (vitamin B_{12}) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium.* J. Bacteriol. **175:** 3303-3316.

Ruzicka, L. 1963. Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene. Pure Appl. Chem. **6:** 493-523.

Sahm, H., S. Bringer-Meyer und G. Sprenger. 1992. The genus *Zymomonas mobilis.* In: The Procaryotes, Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 2287-2301.

Sahm, H., M. Rohmer, S. Bringer-Meyer, G.A. Sprenger und R. Welle. 1993. Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. Advances in microbial physiology **35:** 247-273.

Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

Schilz, S. 1993. Entwicklung von Vektorsystemen zur regulierten Verminderung der Pyruvatdecarboxylase-Aktivität in *Zymomonas mobilis*. Diplomarbeit, RWTH Aachen.

Schmidhauser, T.J., F.R. Lauter, V.E.A. Russo und C. Yanofsky. 1990. Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. Mol. Cell. Biol. **10:** 5064-5070.

Schulenberg-Schell, H., B. Neuss und H. Sahm. 1989. Quantitative determination of various hopanoids in microorganisms. Analytical Biochemistry **181:** 120-124.

Schümperli, D., K. Mc Kenney, D.A. Sobieski und M. Rosenberg. 1982. Translational coupling at an intercistronic boundary of the *Escherichia coli* galactose operon. Cell **30:** 865-871.

Seckler, B. und K. Poralla. 1986. characterization and partial purification of squalene-hopene-cyclase from *Bacillus acidocaldarius*. Biochem. Biophys. Acta **881:** 356-363.

Shark, K.B. und T. Conway. 1992. Cloning and molecular characterization of the DNA ligase gene *(lig)* from *Z.mobilis*. FEMS Micobiol. Lett. **96:** 19-26.

Sherman, M.M., L.A. Petersen und C.D. Poulter. 1989. Isolation and characterization of isoprene mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171:** 3619-3628.

Simon, R., U. Priefer und A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology **1:** 784-790.

Simon, R., U. Priefer und A. Pühler. 1983. Vector plasmids for in-vivo and in-vitro manipulations of Gram-negative bacteria. In: Pühler, A. (ed.) Molecular genetics of the bacteria-plant interaction, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 98-106.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98:** 503-517.

Sprenger, G.A. 1993. Approaches to broaden the substrate and product range of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* by genetic engineering. J. Biotechnol. **27:** 225-237.

Sprenger, G.A., M.A. Typas und C. Drainas. 1993. Genetics and genetic engineering of *Zymomonas mobilis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology **9:** 17-24.

Strohdeicher, M., B. Neuß, S. Bringer-Meyer und H. Sahm. 1990. Electron transport chain of *Zymomonas mobilis*. Interaction with the membrane-bound glucose dehydrogenase and identification of ubiquinone 10. Arch. Microbiol. **154:** 536-543.

Swings, J. und J. de Ley. 1977. The biology of *Zymomonas mobilis*. Bacteriol. Rev. **41:** 1-46.

Tabor, S. und C.C. Richardson. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 polymerase . Proc Natl. Acad. Sci. USA **84:** 4767-4771.

Tahara, Y., H. Yuhura, Y. Ogawa und Y. Yamada. 1986. Tetrahydroxypentane-substituted pentacyclic triterpene isolated from *Zymomonas mobilis*. Agric. Biol. Chem. **50:** 1345-1346.

Tahara, Y., T. Yamashita, M. Kondo und Y. Yamada. 1988. Isolation of *Zymomonas mobilis* mutant deficient in tetrahydroxyhopane biosynthesis. Agric. Biol. Chem. **52:** 3189-3190.

Tappe, C.H. 1993. Squalen-Hopen-Cyclasen: Reinigung, Charakterisierung und Inhibitor-Experimemte. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Thomas, D.S., J.A. Hossack und A.H. Rose. 1978. Plasmamembrane lipid composition and the ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* is affected by plasma-membrane lipid composition. Arch. Microbiol. **122:** 49-55.

Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76:** 4350-4354.

Tsay, Y.H. und G.W. Robinson. 1991. Cloning and characterization of *ERG8*, an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. Mol. Cell. Biol. **11:** 620-631.

Vieira, J. und J. Messing. 1982. The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19:** 259-268.

Wieland, B., E. Gloria-Maercker, G. Thumm, M. Lechner, C. Feil, K. Poralla und F. Götz. 1993. Genetic analysis of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. Veröffentlichung eingereicht.

Wierenga, R.K., P. Terpstra und W.G.J. Hol. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding ßαß-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. J. Mol. Biol. **187:** 101-107.

Yanish-Perron, C., J. Viera und J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33:** 103-119.

Zaghloul, T.I., F. Kawamura und R.H. Doi. 1985. Translational coupling in *Bacillus subtilis* of a heterologous *Bacillus subtilis- Escherichia coli* gene fusion. J. Bacteriol. **164:** 550-555.

Zalkin, H. und D. J. Ebbole. 1988. Organization and regulation of genes encoding biosynthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. **263:** 1595-1598..

Zhang, D., S.M. Jennings, G.W. Robinson und C.D. Poulter. 1993. Yeast squalene synthase: expression, purification, and characterization of soluble recombinant enzyme. Archives of Biochemistry and Biophysics **304:** 133-143.

Zhou, D. und R. White. 1991. Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochem. J. **273:** 627-634.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Poralla für die Überlassung der Gensonde aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

Herrn Dr. G. A. Sprenger danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Hilfe bei der Auswertung der Sequenzdaten.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dipl.-Biol. Silke Horbach und bei Herrn Dr. R. Welle für ihre sachkundige Unterstützung bei der Durchführung der Enzymtests.

Bei den (ehemaligen) Mitarbeitern der *Zymomonas*-Arbeitsgruppe, Doris Dohmen-Olma, Stephan Schilz, Gerda Sprenger, Peter Weisser und Thomas Wiegert bedanke ich mich für das schöne Arbeitsklima, das mir über manche Durststrecke hinweghalf.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 1 danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2926
Juli 1994
ISSN 0944-2952