



Institut für Biotechnologie

***Untersuchungen zu einem neuen Isopentenyl-
diphosphat-Biosyntheseweg in Escherichia coli
und Zymomonas mobilis: Identifizierung und
Charakterisierung beteiligter Gene***

Sigrid Grolle

***Untersuchungen zu einem neuen Isopentenyl-
diphosphat-Biosyntheseweg in Escherichia coli
und Zymomonas mobilis: Identifizierung und
Charakterisierung beteiligter Gene***

Sigrid Grolle

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3799

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3799

D 61 (Diss. Univ. Düsseldorf, 2000)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Investigation of a novel biosynthetic pathway to isopentenyl diphosphate in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*: Identification and characterization of involved genes

In the last few years, evidence has emerged that in bacteria a novel biosynthetic pathway to isopentenyl diphosphate exists. In this pathway isopentenyl diphosphate is formed from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate. In the first reaction step these C3 compounds are combined to 1-deoxyxylulose 5-phosphate whereby pyruvate is decarboxylated. The gene encoding the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase was identified in *E. coli* by searching for transketolase-homologous genes. The corresponding gene product was purified and was shown by NMR analysis to catalyze in a thiamin diphosphate (TPP) and Mg^{2+} dependent reaction the synthesis of 1-deoxyxylulose 5-phosphate. Phylogenetic investigation revealed that the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase belongs to a new family of TPP dependent enzymes. The *dxs* gene is located at 9 min on the *E. coli* chromosome and is organized in one operon with a putative aldoketo-reductase gene. The disruption of this *E. coli* gene yielded no phenotype which indicates that the gene is not involved in the novel pathway. The gene encoding the second enzyme of the pathway, the 1-deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase, was isolated from *Z. mobilis*. The 1-deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzes the NADPH and Mn^{2+} dependent rearrangement and subsequent reduction of 1-deoxyxylulose 5-phosphate to 2C-methylerythritol 4-phosphate. The enzyme activity is competitively inhibited by the antibiotic fosmidomycin with a K_i of 0,6 μM .

By using a *E. coli* strain engineered to produce the isoprenoide zeaxanthin the gene encoding IPP-isomerase, but no further genes of the novel pathway could be isolated from an *E. coli* expression gene library.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
I. Einleitung.....	1
II. Material und Methoden.....	10
1. Chemikalien und Enzyme	10
2. Bakterienstämme und Plasmide	11
3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	14
3.1. Nährmedien	14
3.2. Kultivierungsbedingungen.....	15
4. Molekulargenetische Methoden.....	16
4.1. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	16
4.2. Isolierung und Reinigung von DNA.....	16
4.3. Enzymatische Modifikation von DNA	17
4.4. DNA-Transfer in <i>E. coli</i>	18
4.5. Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> Zellen	19
4.6. Polymerasekettenreaktion.....	19
4.7. DNA-Sequenzierung	21
4.8. Erstellung von Plasmidgenbanken.....	22
4.9. Insertionsmutagenese.....	23
4.10. Nicht radioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin.....	23
4.11. Southern-Blot-Hybridisierung	24
5. Proteinbiochemische Methoden.....	25
5.1. Proteinkonzentrationsbestimmung	25
5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
5.3. Western-Blot Analyse.....	26
5.4. N-terminale Sequenzierung von Proteinen.....	27
5.5. Gelfiltration	27
6. Enzymaktivitätsmessungen	27
6.1. Bestimmung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität.....	27
6.2. Bestimmung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Aktivität	29
7. Isolierung von Enzymen	29
7.1. Isolierung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus <i>E. coli</i>	29
7.2. Isolierung des YajO Proteins aus <i>E. coli</i>	30
7.3. Isolierung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus <i>E. coli</i> und <i>Z. mobilis</i>	31
8. Enzymatische Synthese und Reinigung von Substanzen des MEP-Wegs.....	31
8.1. Enzymatische Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat	32
8.2. Enzymatische Synthese von [2- ¹⁴ C]-2-C-Methylerythritol 4-phosphat	34

9. Bestimmung des Zeaxanthin-Gehalts in rekombinanten <i>E. coli</i> Stämmen	34
III. Ergebnisse	36
1. Identifizierung und Charakterisierung des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase von <i>E. coli</i>	36
1.1. Klonierung des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase	36
1.2. Reinigung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase	40
1.3. NMR-Strukturanalyse von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat	42
2. Klonierung des <i>yajO</i> Gens aus <i>E. coli</i> und Untersuchungen zur Funktion des YajO Genprodukts	44
2.1. Sequenzanalyse der <i>dxs</i> Genregion	44
2.2. Charakterisierung des YajO Genprodukts	45
2.3. Klonierung des <i>yajO</i> Gens	47
2.4. Anreicherung und Charakterisierung des YajO Genprodukts	47
2.5. Disruption des <i>yajO</i> Gens in <i>E. coli</i> durch Insertionsmutagenese	50
3. Klonierung des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus <i>Z. mobilis</i> und biochemische Charakterisierung des Enzyms	53
3.1. Klonierung des Gens der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase	54
3.2. Sequenzanalyse der <i>dxr</i> Genregion	56
3.3. Sequenzanalyse der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase	58
3.4. Reinigung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase	60
3.5. Charakterisierung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase	62
4. Identifizierung weiterer Gene des MEP-Wegs über ein Carotinoid-Screeningsystem	70
IV. Diskussion	79
1. Umsatz von Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat zu 1-Deoxyxylulose 5-phosphat: Der erste Reaktionsschritt im MEP-Weg	79
2. Physiologische Funktion des YajO Genprodukts von <i>E. coli</i>	82
3. Umwandlung von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zu 2-C-Methylerythritol 4-phosphat: Der zweite Reaktionsschritt im MEP-Weg	85
4. Steigerung der Zeaxanthinproduktion in <i>E. coli</i> durch Expression von Genen des MEP-Wegs	89
5. Der 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg	91
V. Zusammenfassung	97
VI. Literaturverzeichnis	98
VII. Anhang	111

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère, Absorption, Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat
Bis-Tris-Propan	1,3-bis[tris(Hydroxymethyl)methylamino]propan
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
c	Centi (10^{-2})
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminoterminal Ende von Peptidketten
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfoxid
CDP	Cytidindiphosphat
Ches	2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonat
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
CSPD	3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl) Phenylphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
dem.	demineralisiert
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOX(P)	1-Deoxyxylulose (5-phosphat)
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EC	Enzym-Klassifizierungsnummer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alteri
ϵ	Extinktionskoeffizient
F	Farad
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd 3-phosphat
h	Stunde(n)
HMG-CoA	3-Hydroxy 3-methylglutaryl-CoA
HOMO-DOX	1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose
HOE 704	2-Dimethylphosphinoyl-2-hydroxyacetat
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
J	Kopplungskonstante
k	Kilo (10^3)

IV

Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LD	letale Dosis
m	Meter, Milli (10^{-3})
M	Molar, molekulare Masse, Mega (10^6)
MEP	2-C-Methylerythritol 4-phosphat
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonat
min	Minute
μ	Wachstumsrate; Micro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
N	Normal
NADP(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (reduziert)
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NMR	Kernspinresonanz
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm
ORF	offener Leserahmen
p	Pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
psi	pounds per square inch
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett; Sekunde
S/D	Shine-Dalgarno-Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sodium Saline Citrat
T	Temperatur
t	Triplett; Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
t_d	Verdopplungszeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
T_m	Schmelztemperatur
TPP	Thiamindiphosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

Aminosäuren

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

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

I. Einleitung

Isoprenoide bilden mit ca. 22.000 Verbindungen einer der wichtigsten Gruppen von Naturstoffen (Bach *et al.*, 1995). Diese Verbindungen sind ubiquitär verbreitet und übernehmen wichtige Funktionen in der Photosynthese (Carotinoide, Chlorophyll), in der Atmungskette (Ubichinon, Menachinon), im Aufbau von Membranen (Sterole, Hopanoide, Glycerinether, Dolichole), in der Pflanzenabwehr (Phytoalexine), in der Regulation von Wachstum und Entwicklung (Gibberlinsäure, Abscisinsäure, Juvenilhormon) und in der Kommunikation (ätherische Öle) (Dewick, 1999; Kannenberg & Poralla, 1999; Bach *et al.*, 1995; Gray, 1987; Heß, 1991; Richter, 1988). Der Grundbaustein der Isoprenoide ist eine verzweigtkettige C₅-Einheit, das Isopentenylidiphosphat. Nach der Anzahl der C₅-Einheiten werden die Isoprenoide in Hemi-, Mono-, Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra- oder Polyterpene gegliedert (Abb. 1) (Luthra *et al.*, 1999; Lichtenthaler, 1998; Heß, 1991). Die stoffliche Vielfalt der Isoprenoide resultiert aus der sekundären Modifikation der Isoprenketten durch Reduktion, Oxidation, Kohlenstoffeliminierung oder Verknüpfung mit Nicht-Isoprenoid-Komponenten (Heß, 1991; Richter, 1988).

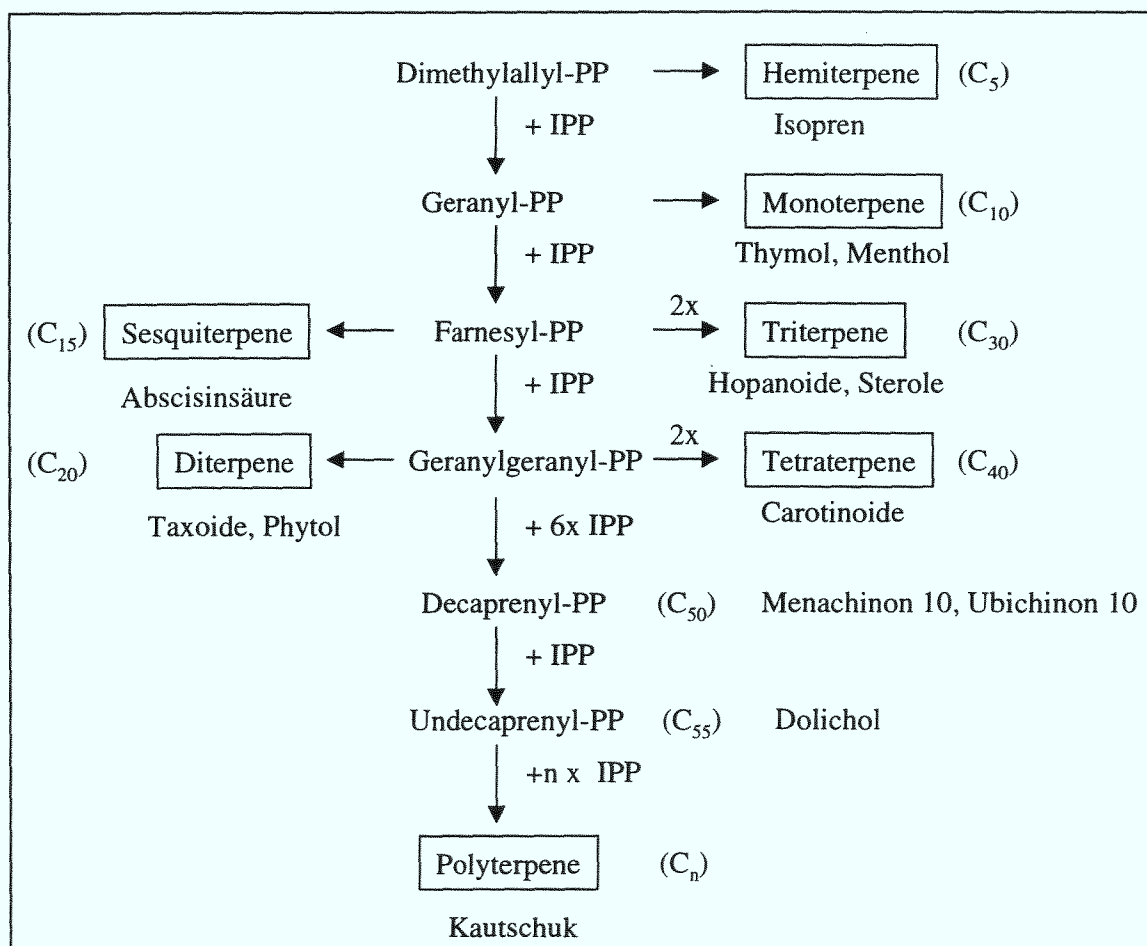


Abb. 1: Biosynthese und Klassifizierung von Isoprenoiden

Die Biosynthese des Grundbausteins Isopentenylidiphosphat erfolgt in tierischen Zellen und Hefen über den Mevalonat- oder Bloch-Lynen-Weg (Abb. 2). In den ersten Syntheseschritten kondensieren drei Moleküle Acetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) (Lynen *et al.*, 1959; Beytía & Porter, 1976; Spurgeon & Porter, 1981; Qureshi & Porter, 1981; Bloch, 1992). Diese Reaktionen werden durch die Acetyl-CoA-Acetyltransferase und der HMG-CoA-Synthase katalysiert. Hydroxymethylglutaryl-CoA wird im nachfolgenden Schritt durch die HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat reduziert. Aus Mevalonat entsteht dann unter Verbrauch von drei Molekülen ATP und der Abspaltung von einem Molekül Kohlendioxid Isopentenylidiphosphat. An den Phosphorylierungs- und Decarboxylierungsschritten sind die Mevalonat-Kinase, die Phosphomevalonat-Kinase und die Diphosphomevalonat-Decarboxylase beteiligt. Isopentenylidiphosphat steht über die Isopentenylidiphosphat-Isomerase im Gleichgewicht mit Dimethylallyldiphosphat, dem Ausgangsmolekül für die Isoprenoidsynthese. Beginnend mit Dimethylallyldiphosphat führt die sukzessive Addition von Isopentenylidiphosphat zu Geranyl-, Farnesyl-, Geranylgeranylidiphosphat und einer Reihe von langkettigeren Produkten (Abb. 1). Die Elongationsreaktionen werden von Prenyltransferasen katalysiert (Kellogg & Poulter, 1997).

Lange Zeit wurde angenommen, daß der Mevalonat-Weg auch in Prokaryonten ubiquitär vorhanden ist. Über *in vivo* Einbauversuche und *in vitro* Enzymtests konnte [^{14}C]-Mevalonat in die Isoprenoide von z.B. *Halobacterium cutirubrum*, *Lactobacillus ssp.*, *Myxococcus fulvus* und *Micrococcus luteus* eingebaut werden (Kushawa & Kates, 1979; Thorne & Kodicek, 1966; Durr & Shwayri, 1964; Kleinig & Reichenbach, 1973; Evans & Prebble, 1982). Allerdings traten bei der Untersuchung der Isoprenoidbiosynthese in Prokaryonten immer wieder Beobachtungen auf, die mit dem Mevalonat-Weg nicht in Einklang gebracht werden konnten. So berichteten Pandian *et al.* (1981), daß der Einbau von [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat und [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat in die Prenylseitenkette des Ubichinons von *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas sesami*, *Escherichia coli* und *Rhodopseudomonas capsulata* nicht nach dem klassischen Weg erfolgte. Die markierten Kohlenstoffe wurden ausschließlich in die Position C-1 der Isopentylidiphosphateinheit inkorporiert und nicht wie erwartet in C-2, C-4 und C-5 bzw. C-1 und C-3 (Abb. 2). Aus diesen Ergebnissen formulierten sie einen neuen Weg zum Isopentenylidiphosphat, den „Acetolactat-Weg“, in dem ausgehend von Pyruvat und Acetaldehyd über Hydroxymethylglutaryl-CoA Isopentenylidiphosphat entsteht.

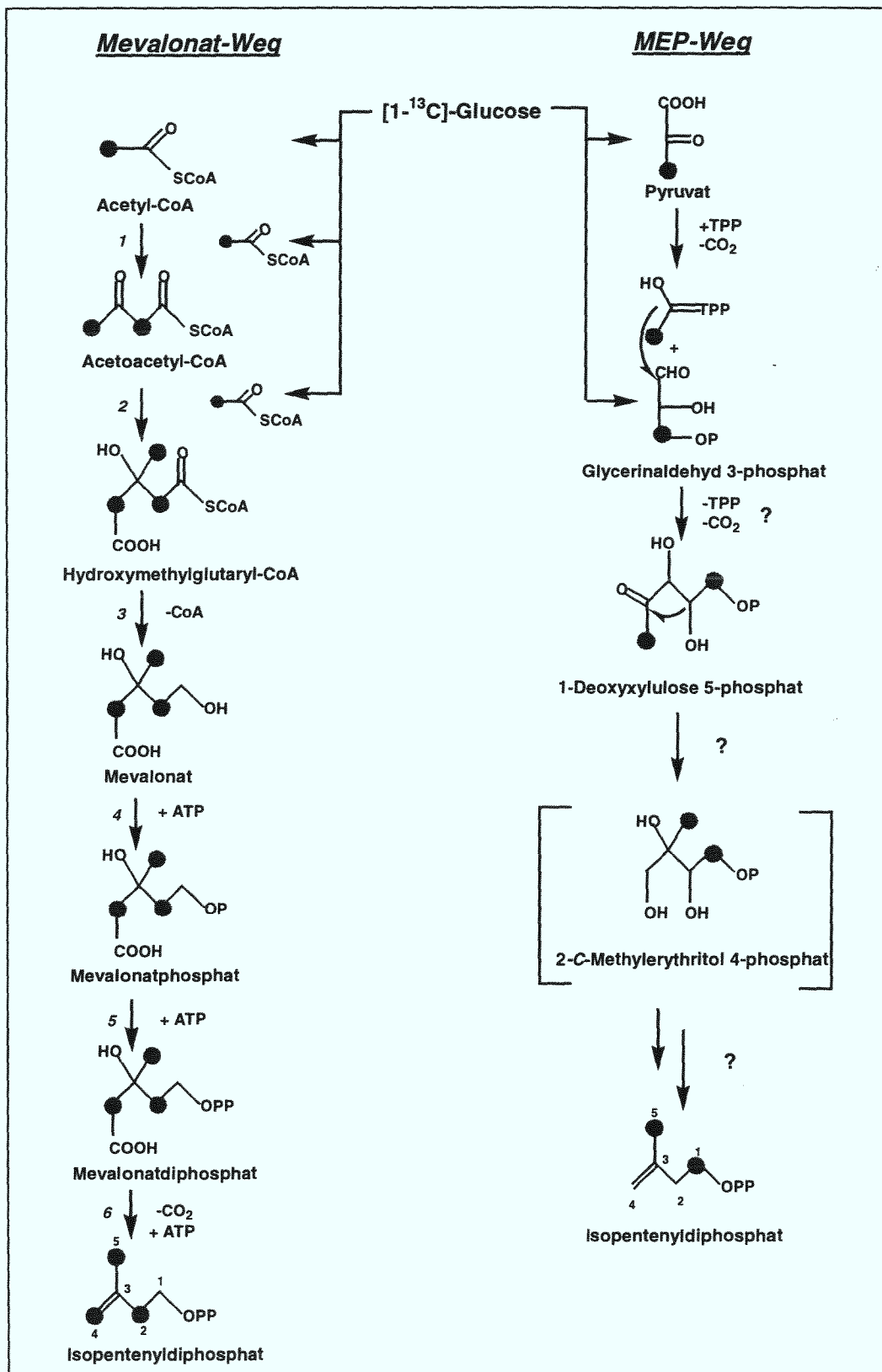


Abb. 2: Inkorporation von $[1-^{13}\text{C}]$ -Glukose über den Mevalonat bzw. über den 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg (MEP-Weg); der Glukoseabbau erfolgt über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg; 1: Acetyl-CoA-Acetyltransferase, 2: HMG-CoA-Synthase, 3: HMG-CoA-Reduktase, 4: Mevalonat-Kinase, 5: Phosphomevalonat-Kinase, 6: Diphosphomevalonat-Decarboxylase

Zhou und White (1991) konnten durch Einbauversuche die Annahme eines aktiven Acetolactat-Wegs in *E. coli* widerlegen. Sie wiesen nach, daß Intermediate des postulierten Wegs nicht in die Seitenkette des Ubichinons eingebaut wurden. Gleichzeitig beobachteten sie, daß ^{13}C -markiertes Acetat bei Fütterungsversuchen mit *E. coli* Fettsäuren, aber nicht Ubichinon markierte. $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose wurde dagegen in Fettsäuren und Ubichinon eingebaut. Sie konkretisierten zudem, daß Pyruvat und nicht Acetyl-CoA die Vorstufe zu Isopentenylidiphosphat darstellt. Eine Abweichung vom klassischen Biosyntheseweg zum Isopentenylidiphosphat zeigten auch Einbauversuche von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ - und $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ -Glukose in Pentalenolacton von *Streptomyces* UC5319 (Cane *et al.*, 1981). Cane *et al.* war es zuvor nicht gelungen, $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Acetat und $[^{14}\text{C}]$ -Mevalonat in das Sesquiterpen von *Streptomyces* UC5319 einzubauen. Diese Beobachtung machten auch Fujisaki *et al.* (1986a). $[^{14}\text{C}]$ -Mevalonat wurde im Gegensatz zu $[^{14}\text{C}]$ -Isopentenylidiphosphat nicht in Ubichinon 8 von *E. coli* eingebaut (Abb. 3). Unerklärlich war bis dahin auch, daß Mevinolin, ein Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, keinen Einfluß auf das Wachstum von *E. coli* zeigte (Zhou & White, 1991).

Den entscheidenden Beitrag zur Entdeckung und Formulierung eines neuen Biosynthesewegs zum Isopentenylidiphosphat brachten Untersuchungen über die Biosynthese von Hopanoiden. Hopanoide sind pentazyklische Triterpenoide mit amphiphilen Charakter (Abb. 3). Sie sind Bestandteil bakterieller Membranen und leisten einen Beitrag zur Erhöhung der Membranstabilität. Ihre Funktion ist vergleichbar mit der von Sterolen in eukaryontischen Membranen (Sahm *et al.*, 1993; Rohmer, 1993). Der Anteil an Hopanoiden in der Zellwandmembran liegt bei den meisten Bakterien in einer Größenordnung von 0,1-5 mg/g Zelltrockengewicht (Sahm *et al.*, 1993). Ein weitaus höherer Gehalt an Hopanoiden (30 mg/g Zelltrockengewicht) wurde in dem Ethanol produzierenden Bakterienstamm *Zymomonas mobilis* gefunden (Hermans *et al.*, 1991). *Z. mobilis* ist ein fakultativ anaerobes, obligat fermentatives, Gram-negatives Bakterium. Als Kohlenstoffquelle nutzt *Z. mobilis* Glukose, Fruktose und Saccharose (Swings & DeLey, 1977). Der Abbau von Glukose erfolgt über den Entner-Doudoroff-Weg (Kerstens & DeLey, 1968). Aus einem Mol Glukose entstehen nahezu stöchiometrisch zwei Mol Ethanol und CO_2 . Bis zu 13 % Ethanol kann *Z. mobilis* produzieren (Sahm *et al.*, 1993). Der hohe Hopanoidanteil ermöglicht dem Bakterium ein ungehindertes Wachstum bei steigender Ethanolkonzentration (Horbach *et al.*, 1991).

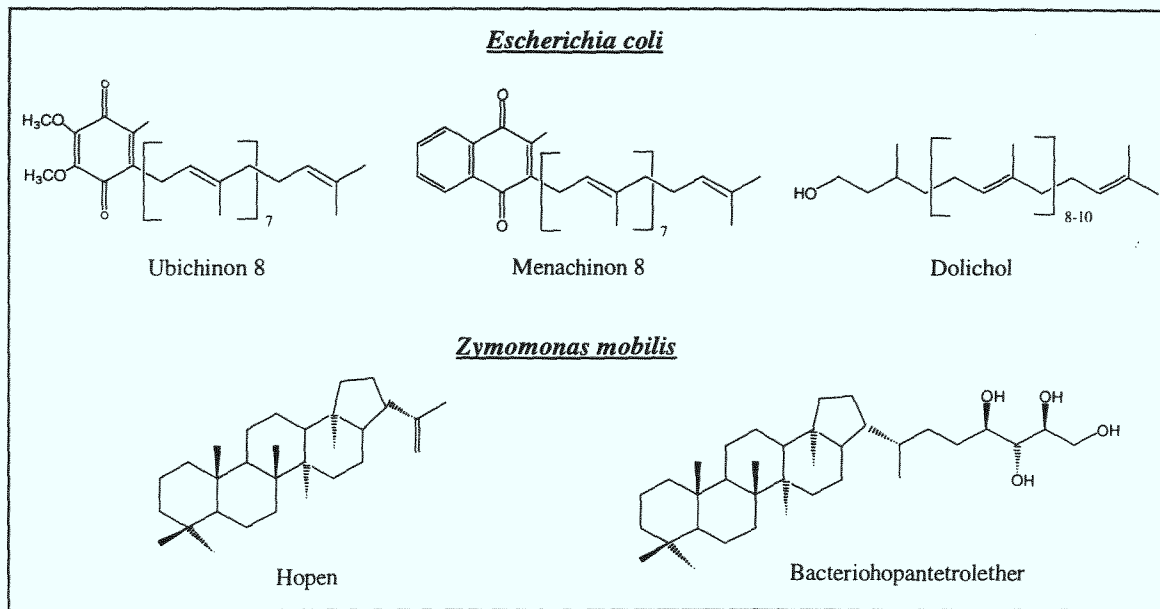


Abb. 3: Beispiele für Isoprenoide aus *E. coli* und *Z. mobilis*

Einbauversuche mit ^{13}C -markierter Glukose in Triterpenoide von *Z. mobilis* zeigten unerwartete Markierungsmuster in der Isopreneinheit (Abb. 2). Die Verteilung der Isotope ließ sich nicht mit dem direkten Einbau von Acetyl-CoA, das aus der Verwertung von [^{13}C]-Glukose entsteht, erklären. Zunächst wurden die abweichenden Markierungen mit zwei voneinander unabhängigen Acetatpools interpretiert, die zu unmarkierten Acetoacetyl-CoA und zu einem markierten Acetyl-CoA führten (Rohmer *et al.*, 1989). Um den genauen Ursprung der Kohlenstoffatome in der Isopreneinheit von Hopanoiden zu bestimmen, wurden Glukose Isotopomere, die entweder an der C-1, C-2, C-3, C-5 oder C-6 Position markiert waren, in Fütterungsversuche mit *Z. mobilis* eingesetzt (Rohmer *et al.*, 1993). Die Auswertung der Markierungsmuster über NMR-Untersuchungen ergab, daß C-3 und C-5 der Isopentenylidiphosphateinheit von C-2 und C-3 bzw. C-5 und C-6 der Glukose stammten. Die C-1, C-2 und C-4 von Isopentenylidiphosphat (IPP) stammten von C-6, C-5 und C-4 der Glukose. Unter Berücksichtigung des Glukosemetabolismus von *Z. mobilis* wurde davon ausgegangen, daß die Vorläufer von Isopentenylidiphosphat Pyruvat und ein Triosephosphat sind, wobei Pyruvat die C_2 -Einheit (C-3 und C-5 von IPP) und Triosephosphat die C_3 -Einheit (C-1, C-2, C-4 von IPP) bildet. Pyruvat entsteht in *Z. mobilis* über den Entner-Doudoroff-Weg sowohl direkt aus C-1, C-2 und C-3 der Glukose oder über Glycerinaldehyd 3-phosphat aus C-4, C-5 und C-6 der Glukose, so daß es zu einer Durchmischung der Markierungen wie bei der C_2 -Einheit im Isopentenylidiphosphat kommt. *Z. mobilis* ist nicht in der Lage, Pyruvat in Glycerinaldehyd 3-phosphat umzuwandeln (Sprenger, 1996; Bringer-Meyer & Sahm, 1989), so daß ein Triosephosphat nur aus C-4, C-5 und C-6 der Glukose entsteht. Daher konnte die C_3 -Einheit im Isopentenylidiphosphat nur aus einem Triosephosphat stammen. Bestätigt

wurden Pyruvat und ein Triosephosphat als Vorläufer des Isopentenylidiphosphats durch Fütterungsversuche mit *Methylobacterium fujisawaense*. Dieses Bakterium verwertet Glukose ebenfalls über den Entner-Doudoroff-Weg, ist aber im Gegensatz zu *Z. mobilis* in der Lage, Pyruvat in Glycerinaldehyd 3-phosphat umzuwandeln. Das Markierungsmuster in der Isopreneinheit von *M. fujisawaense* glich dem von *Z. mobilis* mit dem Unterschied, daß die C₃-Einheit sowohl durch C-1, C-2 und C-3 als auch C-4, C-5 und C-6 von Glukose markiert wurde. In den Bakterien *Escherichia coli* und *Alicyclobacillus acidoterrestris*, die Glukose über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg metabolisieren, führte die Verfütterung von [1-¹³C]-Glukose und [6-¹³C]-Glukose in beiden Fällen zu einem Einbau der Isotope in Position 1 und 5 von Isopentenylidiphosphat. Bei der Glykolyse wird Fruktose 1,6-diphosphat in zwei Triosephosphate gespalten, die über die Triosephosphat-Isomerase miteinander in Verbindung stehen, so daß zwischen der C₂- (Pyruvat) und C₃-Einheit (Triosephosphat) nicht differenziert werden konnte. Die Ergebnisse von Rohmer *et al.* (1993) standen im Gegensatz zum klassischen Mevalonat-Weg. Da zudem Mevalonat in *E. coli* und *Z. mobilis* als Intermediat in der Isoprenoidsynthese ausgeschlossen werden konnte (Horbach *et al.*, 1993), mußte für die Synthese von Isopentenylidiphosphat in diesen Bakterien ein neuer Weg existieren.

Unabhängig von den Markierungsversuchen in Bakterien führten Fütterungsversuche mit ¹³C-markierter Glukose an *Ginkgo biloba* Keimlingen in Diterpenen zu denselben Ergebnissen (Schwarz, Dissertation 1994; Cartayrade *et al.*, 1994). Die Markierungen von Ginkgoliden und Bilobalid wiesen ein vom Mevalonat-Weg abweichendes Markierungsmuster auf, das dem von *E. coli* glich. Sitosterol dagegen, von dem angenommen wird, daß die Synthese im Cytosol der pflanzlichen Zelle stattfindet, zeigte eine Markierung nach dem klassischen Mevalonat-Weg. Diese Arbeiten bewiesen zum ersten Mal, daß sich das Vorkommen des neuen Isopentenylidiphosphat-Biosynthesewegs nicht nur auf Bakterien beschränkt, sondern ein alternativer Weg zum Isopentenylidiphosphat auch in den Plastiden von höheren Pflanzen vorkommt.

Die Identifizierung von Glycerinaldehyd 3-phosphat und Pyruvat als Ausgangsprodukte für die Synthese von Isopentenylidiphosphat gelang über *E. coli* Mutanten mit Defekten im Triosephosphatstoffwechsel (Rohmer *et al.*, 1996). Mutanten, die keine Enolase, 3-Phosphoglycerin-Kinase, Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase, Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase oder Glycerolkinase besaßen, wurden nach Fütterungsversuchen mit [2-¹³C]-Pyruvat oder [2-¹³C]-Glycerol auf ihr Markierungsmuster in Ubichinon 8 hin untersucht. ¹³C-Markiertes Pyruvat wurde von allen Mutanten in die C₂-Untereinheit des Isoprens eingebaut, während keine Mutante ¹³C-markiertes Glycerol in die C₂-Einheit inkorporierte. Der Einbau von [2-¹³C]-Pyruvat in die C₃-Einheit der Isoprenuntereinheit erfolgte nur bei den Mutanten mit inaktiver

Triosephosphat-Isomerase, Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase und Glycerolkinase. [2-¹³C]-Glycerol wurde nur von den Mutanten mit inaktiver Enolase, 3-Phosphoglycerin-Kinase und Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase in die C₃-Einheit eingebaut. Diese Ergebnissen ließen den Schluß zu, daß Glycerinaldehyd 3-phosphat die Vorstufe der C₃-Einheit und Pyruvat die der C₂-Einheit des Isopentenylidiphosphats bilden.

Als ersten Reaktionsschritt im neuen Biosyntheseweg zum Isopentenylidiphosphat postulierten Rohmer *et al.* (1996) eine Kondensationsreaktion ähnlich der zu Transketolasen (Abb. 2). Pyruvat wird von einem TPP-abhängigen Enzym unter Decarboxylierung in Form einer aktivierten Hydroxyethyl-Gruppe auf Glycerinaldehyd 3-phosphat übertragen. Als Produkt entsteht ein 1-Deoxypentulose 5-phosphat. 1-Deoxyxylulose ist als Vorstufe für Thiamin (David *et al.*, 1981, 1982) und Pyridoxal (Hill *et al.*, 1989) bekannt und konnte in zellfreien Systemen als Syntheseprodukt von Pyruvat und Glycerinaldehyd identifiziert werden (Yokata *et al.*, 1984, 1986). Die Rolle von 1-Deoxyxylulose in der Isoprenoidbiosynthese wurde zuerst in *E. coli* beobachtet. Inkorporationsversuche mit [1-²H]- und [5,5-²H₂]-Deoxyxylulose führten zu einem Einbau des Zuckers in die Prenylseitenkette des Ubichinons von *E. coli* (Broers, Dissertation 1994). Nachfolgend konnte der Einbau von 1-Deoxyxylulose auch ins Isopren von *Chelidonium majus*, *Salix viminalis* und *Populus nigra* (Zeidler *et al.*, 1997), in das Phytol des Chlorophylls der Rotalge *Cyanidium caldarium*, der Grünalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlamydomonas reinhardtii*, sowie in *Lemna gibba* (Schwender *et al.*, 1997) gezeigt werden. Der erste Schritt im neuen Weg schien somit eine Acyloinkondensationsreaktion zwischen Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat zu sein, die zu 1-Deoxyxylulose 5-phosphat führt (Abb. 2).

Die Annahme, daß C-1, C-2 und C-4 des Isopentenylidiphosphats aus einem Triosephosphat stammen, setzte voraus, daß während der Biosynthese von Isopentenylidiphosphat über den neuen Weg eine Umlagerung stattfinden muß. Versuche mit [U-¹³C₆]-Glukose an *Z. mobilis* bestätigten aufgrund der Konservierung von ¹³C/¹³C-Kopplungskonstanten simultan eingebauter C-Einheiten, daß Isopentenylidiphosphat aus einer C₂- und C₃-Einheit hervorgeht (Rohmer *et al.*, 1996). Der Einbau von mehrfach markierter [2,3,4,5-¹³C₄]-1-Deoxyxylulose in β-Carotin, Lutein und Phytol von *Catharanthus roseus* bekräftigte, daß die Bildung von Isopentenylidiphosphat ausgehend von einer Pentulose über eine intramolekulare Umlagerung erfolgt, und daß alle fünf Kohlenstoffatome des Isopentenylidiphosphats aus 1-Deoxyxylulose stammen (Arigoni *et al.*, 1997). Schon früh wurde daher als nachfolgender Schritt eine Umlagerung von 1-Deoxyxylulose oder seinem Phosphat zu 2-C-Methylerythritol bzw. 2-C-Methylerythritol 4-phosphat postuliert (Abb. 2) (Rohmer *et al.*, 1993, 1996). Eine vergleichbare Reaktion wird von der Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase katalysiert, ein

Enzym, das in der Synthese von Valin involviert ist (Mrachko *et al.*, 1992). 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat kommt in *Desulfovibrio desulfuricans* (Santos *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1992) und unter oxidativen Streß auch in *Corynebacterium ammoniagenes* (Shchipanova *et al.* 1992; Ostrovsky *et al.*, 1992 a, b; Ostrovsky *et al.*, 1994) vor. Das freie Tetrol und Erythronolacton wurde aus höheren Pflanzen isoliert (Dittrich & Angyal, 1988; Shah *et al.*, 1976; Anthonsen *et al.*, 1976; Kringstad *et al.*, 1980). Eine Beteiligung von 2-C-Methylerythritol in der Isoprenoidsynthese wurde durch einen Vergleich des Einbaumusters von ^{13}C -markierter Glukose in 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat mit dem in Menachinon von *C. ammoniagenes* untersucht (Duvold *et al.*, 1997 a). In beiden Verbindungen zeigte sich die gleiche Isotopenverteilung wie sie nach dem neuen Weg zu erwarten war, somit mußten beiden Substanzen über dieselbe Reaktionsfolge synthetisiert worden sein. 2-C-Methylerythritol selbst konnte zudem in die Isoprenseitenkette von Ubichinon und Menachinon in *E. coli* eingebaut werden (Duvold *et al.*, 1997 b). 2-C-Methylerythritol oder ein Derivat dieser Verbindung scheint somit ein weiteres Intermediat im Isopentenylidiphosphat-Biosyntheseweg zu sein (Abb. 2).

Der neue Biosyntheseweg zum Isopentenylidiphosphat (MEP-Weg) konnte bislang in einer Vielzahl von Bakterien nachgewiesen werden. Er kommt sowohl in Gram-negativen Enterobacteriaceen (*E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Erwinia carotovora*, *Salmonella typhimurium*), in Pseudomonaden und verwandten Arten (*Pseudomonas aeruginosae*, *P. fluorescens*, *Burkholderia caryophylli*, *B. gladioli*, *Ralstonia pickettii*), in phototrophen Bakterien (*Rhodospseudomonas palustris*, *R. acidophila*), in Cyanobakterien (*Synechocystis* sp.) sowie in Gram-positiven Bakterien (*Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Corynebacterium ammoniagenes*), Mycobakterien (*Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis*) und Actinomyceten (*Nocardia brasiliensis*) vor (Rohmer *et al.*, 1993; Putra *et al.*, 1998 a; Duvold *et al.*, 1997 a, b; Proteau, 1998 a, b; Shigemori *et al.*, 1999). Nur einige wenige Bakterien scheinen Isopentenylidiphosphat über den Mevalonat-Weg zu synthetisieren (Rohmer *et al.*, 1999). So konnte die Umsetzung von Mevalonat in zellfreien Extrakten von dem Archaeobakterium *Halobacterium cutirubrum* und von den Gram-positiven Eubakterien *Lactobacillus plantarum* und *Staphylococcus carnosus* und dem Gram-negativen Bakterium *Myxococcus fulvus* gezeigt werden (Horbach *et al.*, 1993). Die Biosynthese des Diterpens Verrucosan-2 β -ol in dem phototrophen Bakterium *Chloroflexus aurantiacus* ist ein weiteres Beispiel für die Existenz des Mevalonat-Wegs in Bakterien (Rieder *et al.*, 1998). Interessanterweise tritt in dem Bakterium *Streptomyces aerioovifer* eine Dichotomie auf. Der Vertreter der Actinomyceten synthetisiert in der frühen Wachstumsphase Menachinon über den MEP-Weg und in der späten Wachstumsphase sekundäre Metabolite wie Naphterpin über den Mevalonat-Weg (Seto *et al.*, 1996).

Eine Vielzahl von NMR-Untersuchungen an Isoprenoiden aus höheren Pflanzen lassen erkennen, daß in Pflanzen eine Kompartimentierung existiert. Cytosolische Isoprenoide wie Sterole werden über den Mevalonat-Weg synthetisiert und plastidäre Isoprenoide über den MEP-Weg (Eisenreich *et al.*, 1996, 1997; Lichtenthaler *et al.*, 1997 a,b; Knöss *et al.*, 1997; Arigoni *et al.*, 1997; Contin *et al.*, 1998; Piel *et al.*, 1998; Milborrow & Lee, 1998; Stanjek *et al.*, 1999; Eichinger *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 1999). In Lebermoosen sowie in Rotalgen und Chrysophyta wird die Kompartimentierung beider Wege ebenfalls beobachtet (Thiel *et al.*, 1997, Adam *et al.*, 1998; Disch *et al.*, 1998; Cvejic & Rohmer, 2000). In Grünalgen werden sowohl Phytol, β -Carotin, Lutein als auch Chondrillasterol und Ergost-7-enol über den MEP-Weg synthetisiert (Schwender *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997 a). In Pilzen und Hefen konnte der MEP-Weg nicht nachgewiesen werden (Disch & Rohmer, 1998).

Ausgehend von diesem Kenntnisstand stellten sich für die vorliegende Arbeit die Fragen, welche Enzyme die postulierten Umsetzungsreaktionen katalysieren, welche Gene für die entsprechenden Enzyme kodieren und ob in Nachbarschaft zu diesen Genen noch weitere Gene des MEP-Wegs liegen. Zudem sollte über ein Screeningsystem der Frage nach noch weiteren beteiligten Genen und den entsprechenden Enzymen nachgegangen werden. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Versuche mit den Bakterien *E. coli* und *Z. mobilis* durchgeführt. Das Gram-negative Bakterium *E. coli* bietet den Vorteil, genetisch sehr gut zugänglich zu sein, während *Z. mobilis* wegen seiner hohen Hopanoidproduktion sehr interessant ist. Die Synthese von 30 mg/g Zellrockengewicht an Hopanoiden ließ vermuten, daß die Enzyme aus dem neuen Biosyntheseweg zum Isopentenylidiphosphat eine höhere Enzymaktivität als in *E. coli* aufwiesen.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Riedel-de-Haën (Seelze), Merck (Darmstadt) und Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Biochemikalien und Enzyme für molekulargenetische Arbeiten stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Promega (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach). Produkte anderer Hersteller sind nachfolgend aufgeführt.

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Q-Sepharose HP, Gelfiltrationskalibrierungsskit, PD10-Säulen, pUC18 *Bam*HI/BAP

Biomol, Hamburg

X-Gal

Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA

Acrylamid/Bisacrylamid, APS, TEMED

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefeextrakt

Gibco BRL GmbH, Eggenstein

Agarose, DNA-Molekulargewichtsstandard

Invitrogen BV, Leek, Niederlande

TOPO TA Cloning Kit

Novex, Frankfurt/Main

Probenpuffer nativ, Tris-Glycin Gradientengele

Pierce, Rockford, USA

BCA Protein Bestimmungsskit, GelCode Blue Stain Reagenz

Qiagen GmbH, Hilden

Ni-NTA-Agarose, Imidazol, DNA-Reinigungskits, Penta-His Antikörper

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Antibiotika, Rubidiumchlorid, Amidoschwarz, Anti-Maus IgG-AP-Konjugat, Molekulargewichtsstandard mit nicht denaturierten Proteinen, Tris, SDS, EDTA, D,L-Glycerinaldehyd 3-phosphat, Bis-Tris-Propane, Ches

NEN, Bad Homburg

[2-¹⁴C]-Pyruvat

Chemisch synthetisierte 1-Deoxyxylulose wurde freundlicherweise von T. P. Begley (Cornell University, Ithaca, USA) zur Verfügung gestellt. A. Jux (Max-Planck-Institut, Jena) synthetisierte dankenswerterweise 1,2-Dideoxy-D-threo-3-hexulose (HOMO-DOX). Fosmidomycin wurde freundlicherweise von H. Seto (Universität Tokyo, Japan) bereitgestellt. Die Substanz 2-Methylphosphinoyl-2-hydroxyacetat (HOE704) stammte von der Firma Agrevo (Frankfurt/Main).

2. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 und die verwendeten Plasmide in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 1: Bakterienstämme, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 Φ80lacZΔM15 hsdR17 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>	Hanahan, 1983
JM101	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) [F'<i>traD36 proAB lacI^qZ</i>ΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM109	<i>e14⁻ (McrA⁻) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac- proAB) [F'<i>traD36 proAB lacI^qZ</i> ΔM15]</i></i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
TOPO 10	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 <i>recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i></i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
XL10-Gold	<i>Tet^R, Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB- hsdSMR-mrr)173 <i>endA1 supE44 thi- 1 <i>recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'<i>proAB lacI^qZ</i> ΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R)</i></i></i>	Stratagene, Heidelberg
M15	<i>Nal^s Str^s Rif^s <i>lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁻ uvr⁺ lon⁺</i></i>	Qiagen, Hilden
SY327 λ pir	<i>F araD Δ(lac pro) argE(Am) <i>recA56 rif^r nalA</i></i>	Miller & Merkalonas, 1988
MC4100	<i>F araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
LJ110	Wildtyp (W3110 <i>fnr⁺</i>)	erhalten von Lengeler & Jahreis, Osnabrück
<i>Zymomonas mobilis</i>		
CP4 (ATCC 31821)	Wildtyp	Goncalves de Lima <i>et al.</i> , 1972

Tab. 2: Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit verwendet und konstruiert wurden

Plasmid	Größe [Bp]	relevante Merkmale	Referenz
pUC18/pUC19	2686	Amp ^R , <i>lacPOZ'</i> , <i>ori colE1</i>	Vieira & Messing, 1982
pUCBM20	2722	Amp ^R , <i>lacPOZ'</i> , <i>ori colE1</i>	Roche, Mannheim
pQE30	3462	Amp ^R , <i>lac</i> -Operator, 6xHistidin, <i>ori colE1</i>	Qiagen, Hilden
pQE40	4003	Amp ^R , <i>lac</i> -Operator, 6xHistidin, DHFR, <i>ori colE1</i>	Qiagen, Hilden
pREP4	3740	Kan ^R , <i>lacI</i> , <i>ori p15A</i>	Qiagen, Hilden
pGP704	3792	Amp ^R , <i>mobRP4</i> , <i>ori R6K</i>	Miller & Mekalanos, 1988
pCR2.1-TOPO	3906	Amp ^R , Kan ^R , <i>ori colE1</i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
pUCdxsbl	4590	<i>dxs</i> Gen (1904 Bp) aus <i>E. coli</i> in pUC18 inseriert (<i>Sma</i> I)	diese Arbeit
pBM20dxsr	4547	1901 Bp <i>Eco</i> RI/ <i>Sph</i> I Subfragment aus pUCdxsbl kloniert in pUCBM20	diese Arbeit
pUCdxsr	4535	1901 Bp <i>Eco</i> RI/ <i>Sph</i> I Subfragment aus pUCdxsbl kloniert in pUC18	diese Arbeit
pUCaldbl	3763	<i>yajO</i> Gen (1077 Bp) aus <i>E. coli</i> mit ATG-Start in pUC19 inseriert (<i>Sma</i> I)	diese Arbeit
pUC19aldredBH	3739	1070 Bp <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Subfragment aus pUCaldbl kloniert in pUC19	diese Arbeit
pUC4K	3914	Amp ^R , Kan ^R , <i>ori colE1</i>	Vieira & Messing, 1982
pUCaldredBHkan	4979	Kan ^R -Kassette kloniert in <i>Sca</i> I-Schnittstelle von pUC19aldredBH	diese Arbeit
pUCaldSG	3774	<i>yajO</i> Gen (1118 Bp) mit GTG-Start aus <i>E. coli</i> in pUC18 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pBMaldSG	3763	<i>yajO</i> Gen (1118 Bp) mit GTG-Start aus <i>E. coli</i> in pUCBM20 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pGPald762	4533	762 Bp <i>Hind</i> II/ <i>Sph</i> I <i>yajO</i> -Fragment aus pUCaldbl kloniert in pGP704 (<i>Sma</i> I/ <i>Sph</i> I)	diese Arbeit
pGPald734	4509	pGPald762 Δ <i>Bsu</i> 36I- <i>Xba</i> I Fragment	diese Arbeit

Plasmid	Größe [Bp]	relevante Merkmale	Referenz
pUCH8	11300	8,6 kBp <i>Hind</i> III-Fragment mit <i>dxr</i> aus <i>Z. mobilis</i> in pUC19 kloniert	diese Arbeit
pCRdxrz30	5116	<i>dxr</i> aus <i>Z. mobilis</i> (1201 Bp) kloniert in pCR2.1	diese Arbeit
pQE30dxrz	4626	1196 Bp <i>Sph</i> I/ <i>Hind</i> III Subfragment aus pCRdxrz30 kloniert in pQE30	diese Arbeit
pQEdxr	4659	<i>dxr</i> aus <i>E. coli</i> (1197 Bp) kloniert in pQE30 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pQEygbP	4150	<i>ygbP</i> aus <i>E. coli</i> (714 Bp) kloniert in pQE30 (<i>Sac</i> I/ <i>Hind</i> III)	diese Arbeit
pQEGcpE	4563	<i>gcpE</i> aus <i>E. coli</i> (1131 Bp) kloniert in pQE30 (<i>Bam</i> HI, <i>Kpn</i> I)	diese Arbeit
pACCAR25Δcrtx	10750	Cm ^R , <i>ori</i> p15A, <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>crtZ</i>	Misawa <i>et al.</i> , 1995
pRK-idi	11353	Tet ^R , <i>ori</i> RK2; <i>idi</i> von <i>Phaffia rhodozyma</i> in pRK404 kloniert	Albrecht <i>et al.</i> , in press
pUCIPP1/5	6402	<i>Sau</i> 3AI Fragmente (3716) mit <i>idi</i> aus <i>E. coli</i> kloniert in pUC18 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pUCIPP2	6494	<i>Sau</i> 3AI Fragmente (3808) mit <i>idi</i> aus <i>E. coli</i> kloniert in pUC18 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pUCIPP3	5100	<i>Sau</i> 3AI Fragmente (2415) mit <i>idi</i> aus <i>E. coli</i> kloniert in pUC18 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pUCIPP4	6528	<i>Sau</i> 3AI Fragmente (3842) mit <i>idi</i> aus <i>E. coli</i> kloniert in pUC18 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pUCIPP6	5655	<i>Sau</i> 3AI Fragmente (2969) mit <i>idi</i> aus <i>E. coli</i> kloniert in pUC18 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pUCIPP7	6402	<i>Sau</i> 3AI Fragmente (3716) mit <i>idi</i> aus <i>E. coli</i> kloniert in pUC18 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pUCIPP8	6200	<i>Sau</i> 3AI Fragmente (3514) mit <i>idi</i> aus <i>E. coli</i> kloniert in pUC18 (<i>Bam</i> HI)	diese Arbeit

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

3.1. Nährmedien

Zur Anzucht von *E. coli* wurde standardmäßig LB-Medium verwendet.

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
H ₂ O _{dem.}	ad 1000	l

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5 % (w/v) Agar hinzugegeben.

E. coli-Mutanten wurden in Minimalmedium angezogen.

Minimalmedium für *E. coli* (Tanaka *et al.*, 1967)

Lösung A	10 x		
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	46,9	g
	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	150,5	g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	26,4	g
	H ₂ O _{dem.}	ad 1000	ml
Lösung B	100 x		
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	7,4	g
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	147,0	g
	ZnCl ₂ x 2H ₂ O	13,5	g
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	28,0	g
	1 N HCl	1	ml
	H ₂ O _{dem.}	ad 1000	ml

Lösung A wurde autoklaviert. 1 ml Lösung B wurden zuerst in 89 ml H₂O verdünnt und dann autoklaviert. Nach der Sterilisation wurden 10 ml Lösung A und sterile Glukose zu einer Endkonzentration von 0,2 % (w/v) hinzugegeben.

Die Anzucht von *Z. mobilis* erfolgte in Vollmedium.

Vollmedium für *Z. mobilis* (Bringer *et al.*, 1984)

Hefeextrakt	10	g
KH ₂ PO ₄	1	g
(NH ₄)SO ₄	1	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5	g
Glukose	20	g
H ₂ O _{dem.}	ad 1000	l

Medienzusätze

Zur Selektion antibiotikaresistenter *E. coli* Stämme wurden den Medien nach dem Autoklavieren sterile Antibiotikallösungen zugeführt (Tab. 3).

Tab. 3: In Medien verwendete Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen zur Selektion antibiotikaresistenter *E. coli* Stämme (Sambrook *et al.*, 1989)

Antibiotika	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50-100 mg/ml H ₂ O _{dest.}	50-100 µg/ml
Kanamycin	25-50 mg/ml H ₂ O _{dest.}	25-50 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml 96 % Ethanol	20 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml 50 % Ethanol	15 µg/ml

3.2. Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 30 °C bzw. 37 °C auf Agarplatte oder in Flüssigkultur unter Schütteln. Für Expressionsversuche wurden die *E. coli*-Kulturen in 20-800 ml LB-Medium unter Verwendung von 100 ml, 500 ml bzw. 2 l Erlenmeyerkolben bei 37 °C angezogen. Bei einer OD_{600nm} von ca. 0,8 wurde die Expression der unter der Kontrolle des *lac*-Promotors liegenden Gene durch Zugabe von 0,1-0,4 mM IPTG induziert. Die Kultivierungszeit lag in Abhängigkeit vom zu exprimierenden Protein bei 4-16 h. Für Plasmidisolationen wurden 4 ml einer über Nacht in LB-Medium gewachsenen Kultur verwendet.

Die Kultivierung von *Z. mobilis* wurde bei 30 °C in Anaerobengefäßen (Bellco-Glas-Inc., New Jersey, USA) mit 10 ml Vollmedium durchgeführt. Die Bellco-Röhrchen waren dabei mit Butylgummistopfen und Aluminiumbördelkappen verschlossen.

Bestimmung des Bakteriumwachstums

Der Wachstumsverlauf von *E. coli* in Flüssigkulturen wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm fotometrisch bestimmt (Spectralphotometer DU-640, Beckman, München). Zur Beschreibung des Wachstumsverhaltens einer statischen Kultur in der exponentiellen Phase wurden die Wachstumsrate μ und die Verdopplungszeit t_d bestimmt. Die Wachstumsrate ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums und die Verdopplungszeit gibt den Zeitraum an, innerhalb dessen sich die Zelldichte verdoppelt. Die Berechnung der Wachstumsrate erfolgte aus den zu den Zeitpunkten t_0 und t gemessenen Bakteriendichte x_0 und x_t (Schlegel, 1992).

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden exponentiell wachsende *E. coli* Kulturen mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Für Zeiträume von vier Wochen konnte *E. coli* auf Agarplatten bei 4°C aufbewahrt werden.

Z. mobilis wurde in Bellco-Röhrchen mit 10 ml Vollmedium gehalten. Jede Woche wurde 1 ml der Stammkultur in 10 ml frisches Nährmedium überführt und bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Molekulargenetische Methoden

4.1. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Für das Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden Gefäße und Lösungen verwendet, die zuvor sterilisiert worden sind, um DNA abbauende Nukleasen zu inaktivieren.

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde durch Absorptionsmessung (Spectralphotometer DU-640, Beckman, München) bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) bestimmt. Eine $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 entsprach einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Sambrook *et al.*, 1989). Durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm konnte die Verunreinigung der DNA-Lösung durch Proteine erfaßt werden. Eine reine DNA-Lösung zeigt ein Verhältnis von $\Delta E_{260\text{nm}}$ zu $\Delta E_{280\text{nm}}$ von 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten, sowie die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in TAE-Agarosegelen nach Sambrook *et al.* (1989).

4.2. Isolierung und Reinigung von DNA

Plasmid-DNA-Präparationen aus *E. coli* erfolgten mit den entsprechenden Kits („QIAprep Spin Miniprep Kit“, „QIAGEN Plasmid Midi Kit“, Qiagen, Hilden). Genomische DNA aus *Z. mobilis* und *E. coli* wurde unter Verwendung der Genomic-tip 500 Säulen von der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt. Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zum Umpuffern von DNA-Lösungen bei Restriktionsansätzen, zur Reinigung von PCR-Ansätzen (4.6.) oder zur Abtrennung modifizierender Enzyme (4.3.) von Plasmid-DNA wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

Analytische Schnellpräparation von Plasmiden

Mit Hilfe der analytischen Schnellpräparation von Plasmiden konnten in großem Umfang Transformanten, bei denen keine Blau-Weiß-Selektion (4.5.) möglich war, nach rekombinanten Plasmiden untersucht werden.

Mittels einer Pipettenspitze wurden *E. coli* Kolonien von der Agarplatte abgehoben und in je 50 µl 10 mM EDTA (pH 8,0) suspendiert. Durch Zugabe von 50 µl Lysispuffer und Inkubation bei 70 °C für 5 min wurden die Zellen lysiert. Nachdem die Zellsuspension auf RT abgekühlt war, wurden zum Fällern der Proteine 1,5 µl 4 M KCl und DNA-Farbmarker hinzugegeben. Nach Inkubation auf Eis für 5 min wurde der Ansatz zentrifugiert (14.000 Upm, 4 °C, 5 min; Eppendorf, Hamburg). Von dem Überstand wurden 25 µl auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die „supercoiled“ Form rekombinanter Plasmid-DNA läuft im Vergleich zur Kontrolle, die aus dem ungeschnittenen Klonierungsvektor besteht, und zu den religierten Vektoren langsamer. Aufgrund dieses unterschiedlichen Laufverhaltens können rekombinante Plasmide identifiziert werden. Die genaue Analyse des rekombinanten Plasmids erfolgte nach erneuter Plasmidisolierung (s. o.) über analytische Restriktion (4.3.).

Lysis-Puffer

NaOH	0,2	M
SDS	0,5	% (w/v)
Saccharose	20	% (w/v)

Der Puffer wurde bei – 20 °C gelagert.

DNA-Farbmarker

EDTA	0,1	M
Saccharose	40	% (w/v)
Bromphenolblau	0,15	% (w/v)

4.3. Enzymatische Modifikation von DNA

Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Das sequenzspezifische Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte gemäß der Herstellerhinweise. Die Restriktionsansätze umfaßten mindestens ein Volumen von 10 µl. Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden ca. 1 µg DNA und für einen präparativen bis zu 10 µg DNA eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Enzym betrug 2-5 U/µg DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Der Ansatz wurde in der Regel 1-16 h bei 37 °C inkubiert. Bei mehrfacher Restriktion wurde zunächst mit einem Enzym gearbeitet. Erst nachdem das erste Enzym vollständig die DNA geschnitten hatte, wurde das zweite Enzym hinzugegeben.

Herstellung glatter DNA-Enden

Mittels Klenow-Enzym konnten in Gegenwart freier Desoxynukleotide überhängende 5'-Enden an DNA-Fragmenten aufgefüllt werden, so daß glatte Enden entstanden. Das Klenow-Enzym besitzt neben der 5'→3'-Polymeraseaktivität auch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, so daß 3'-Enden abgebaut werden können (Jacobsen *et al.*, 1974).

Alkalische Phosphatase Behandlung

Zur Vermeidung der Religation von linearisierten Vektoren bei der Ligation wurde die endständige Phosphatgruppe am linearem Plasmid mittels Alkalischer Phosphatase abgespalten (Sambrook *et al.*, 1989).

Ligation

Ligationen von DNA-Fragmenten erfolgten mit dem „rapid ligation kit“ (Roche, Mannheim) über 5 min bei RT oder über Nacht bei 16 °C mit der T4-DNA-Ligase (Sambrook *et al.*, 1989). Dabei wurde die 3-10-fache Menge an DNA-Fragment im molaren Verhältnis zur Vektor-DNA eingesetzt. PCR-Produkte mit einem 3'-Adenosin Überhang (4.6.) wurden mittels Topoisomerase in den Vektor pCR2.1-TOPO mit 3'-Thymidin Überhang eingebaut („Topo TA Cloning Kit“, Invitrogen, Leek, Niederlande).

4.4. DNA-Transfer in *E. coli*

Transformation

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983) oder hocheffiziente *E. coli* Zellen nach der Methode von Inoue (1990) hergestellt. Die Zellen wurden entweder direkt verwendet oder in 200 µl-Aliquots bei -70 °C gelagert. Zur Transformation wurden 50-500 ng Plasmid-DNA zu 200 µl kompetenter Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30-90 s bei 42 °C. Zur Regeneration wurden die Zellen für 45 min in 800 µl LB-Medium bei 37 °C geschüttelt. 25-100 µl Zellsuspension wurden pro Agarplatte ausgestrichen.

Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

Bei der Elektroporation wurde durch das Anlegen eines elektrischen Feldes Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen eingebracht. Zur Herstellung von für die Elektroporation geeigneter Zellen wurden exponentiell wachsende *E. coli* Zellen zweimal mit sterilem Wasser und zweimal mit steriler 10 %iger (v/v) Glycerinlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 %iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und aliquotiert. Die Zellen konnten entweder

direkt zur Elektroporation eingesetzt werden oder sie wurden bei -70 °C gelagert. Für die Elektroporation wurden zu 38 µl Zellen 2 µl DNA-Lösung gemischt. Das Anlegen des elektrischen Feldes erfolgte am „Gene pulser“ (BioRad Laboratories, München) mit folgenden Parametern:

Spannung	2,5 kV
Widerstand	200 Ω
Kapazität	25 µF

Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50-100 µl Zellsuspension auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht inkubiert.

4.5. Selektion rekombinanter *E. coli* Zellen

Die Selektion rekombinanter *E. coli* Zellen erfolgte zum einen über Antibiotikaresistenz und zum anderen über den X-Gal-Test. Beim X-Gal-Test wird ein spezielles Wirt/Vektorsystem genutzt (Ullman *et al.*, 1967), das die Unterscheidung zwischen religierten und rekombinanten Plasmiden erlaubt. Dazu wurden 50 µl IPTG (0,24 mg/ml H₂O_{dest.}) als Induktor und 50 µl X-Gal (20 mg/ml N,N'-Dimethylformamid) (Horwitz *et al.*, 1964) als Farbstoffreagenz auf die Agarplatten gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C zeigte sich eine Blau- oder Weiß-Färbung der Kolonien, wobei es sich bei den weißen Kolonien um Zellen mit rekombinanten Plasmid handelte.

4.6. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987) wurde genutzt, um *in vitro* einen definierten DNA-Abschnitt eines Plasmids oder chromosomaler DNA zu amplifizieren. Der zu amplifizierende Bereich wird dabei von zwei Primern mit bekannter DNA-Sequenz begrenzt. Zur späteren Klonierung von amplifizierten Genen in Expressionsvektoren können über die Primer Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in das amplifizierte DNA-Fragment eingebracht werden. Die PCR erfolgte in Ansätzen von 100 µl:

Reaktionansatz

Matrizen-DNA	100-500	ng
Primer 1	100	pmol
Primer 2	100	pmol
dNTP's	20	nmol
Polymerase-Puffer + Mg ²⁺	1	x
Polymerase	1-5	U
H ₂ O _{dest.}	ad 100	µl

Je nach Klonierungsstrategie wurde die Pwo-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) oder die Taq-DNA-Polymerase bzw. das „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim) verwendet. Die Taq-Polymerase und das „Expand High Fidelity PCR System“ wurden eingesetzt, wenn am 3'-Ende des Amplifikats ein überhängendes Adenindinukleotid erwünscht war, wie es zur Klonierung mit dem „TA-Cloning Kit“ (Invitrogen, Leek, Niederlande) erforderlich ist (4.3.). Die Pwo-Polymerase dagegen wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden genutzt. Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurde in einigen Fällen Polymerase-Puffer ohne Mg^{2+} -Ionen verwendet. Der Reaktionsansatz wurde zu Beginn 2 min bei 94 °C denaturiert und durchlief anschließend im Thermocycler PTC-200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) 30 mal folgenden Zyklus:

Denaturierung	30 s	94 °C
Anlagerung der Primer	30 s	50-65 °C
Polymerisierung	45-60 s	72 °C

Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur (T_m ; Tab. 4) der Primer (optimal 2°C unter T_m) (Newton & Graham, 1994) und die Dauer der Polymerisierung nach der Länge des Amplifikats (45 s bis 0,75 kbp; 60 s bis 1,5 kbp; PCR Application Manual, Roche, Mannheim). Zur Kontrolle wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und der Rest gereinigt (4.2.).

Oligonukleotidsynthese

Die in der PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Als Reinheitsgrad für die PCR reichten salzfreie Proben. Die zur Amplifikation von Genen und Genfragmenten aus den Genomen von *E. coli* und *Z. mobilis* verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4: Bezeichnung und Sequenz der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der genannten Gene genutzt wurden. Restriktionserkennungssequenzen sind fett gedruckt und klein geschrieben; T_m (Schmelztemperatur) = $69,3 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/L$; L=Länge der Primer (Chester & Marshak, 1993)

Name	Sequenz 5'→3'	T_m [°C]	eingefügte Schnittstelle
<u><i>E. coli</i></u>			
<u><i>yajO</i> Gen mit ATG-Start</u>			
ALDRED5	TT aa gcttACTGGGGTGAACGAATGCAGCC	51,6	<i>Hind</i> III
ALDRED3	TT gg atccTCATCAGGCCTGGACTCTTA	64,6	<i>Bam</i> HI
<u><i>yajO</i> Gen mit GTG-Start</u>			
ALDRED5L	AATT aa gcttGCAGGAAGGCGGCAAAC	66,0	<i>Hind</i> III
ALDRED3	TT gg acctTCATCAGGCCTGGACTCTTA	64,6	<i>Bam</i> HI
<u><i>dxs</i> Gen</u>			
DXSECO5	CC ga attcAGGCCCCTGATGAGTTTTGAT	67,8	<i>Eco</i> RI
DXSECO3	TT gc atgcAGGAGTGGAGTAGGGATTATG	64,7	<i>Sph</i> I
<u><i>dxr</i> Gen</u>			
DXR1	GGG gg atccAAGCAACTCACCATTCTGGGC	72,2	<i>Bam</i> HI
DXR2	GGG gg atccGCTTGCAGACGCATCACCTC	75,0	<i>Bam</i> HI
<u><i>ygbP</i> Gen</u>			
ygbP5	A Ag agctcGCAACCACTCATTTGGATGTTT	65,4	<i>Sac</i> I
ygbP3	CC aa gcttCGCATTATGTATTCTCCTGATG	65,4	<i>Hind</i> III
<u><i>gcpE</i> Gen</u>			
gcp1	GGG gg atccCATAACCAGGCTCCAATTCAA	53,3	<i>Bam</i> HI
gcp2	GGG gg taccTTTTTCAACCTGCTGAACGTC	53,3	<i>Kpn</i> I
<u><i>Z. mobilis</i></u>			
<u><i>dxr</i> Sonde</u>			
ZMOBILISDXR5	ATGCAGGCGAAAAGAACG	53,7	-
ZMOBILISDXR3	TTGTTCTGAAGGGACCTC	53,7	-
<u><i>dxr</i> Gen</u>			
dxrz301	T Ag catgcAGTCAGCCAAGAACAGTCACT	66,7	<i>Sph</i> I
dxrz302	CC aa gcttGGATCGAAAACATTATCCCCG	66,7	<i>Hind</i> III

4.7. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basierte auf der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977). Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers mit dem „AutoRead Sequencing Kit“ (Pharmacia LKB, Freiburg) durchgeführt. Es wurden die für pUC-

Vektoren passenden Primer verwendet (Fluorescein-M13 universal- und reverse sequencing primer, Pharmacia LKB, Freiburg). Die Reaktionsansätze wurden nach Denaturierung im Polyacrylamid-Gel (Long Ranger Single for Pharmacia, Biozym, Oldendorf) mit dem „Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer“ („A.L.F.“; Pharmacia LKB, Freiburg) analysiert. Bei der Detektion werden Fluoreszenz-Signale registriert, die bei der Anregung der Fluorescein-markierten Fragmente durch einen Laser entstehen. Die Auswertung der Signale wurde mit Hilfe des Computerprogramms „ALF-Win“ (Pharmacia LKB, Freiburg) durchgeführt.

Die Sequenzierung mittels „A.L.F.“ wurde zur Ansequenzierung und somit zur Kontrolle neuer rekombinanter Plasmide angewandt. Die DNA-Einzelstrang-Sequenzierung des Plasmids pUCH8 wurde über „Primer walking“ von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Zur Kontrolle der fehlerfreien Amplifikation von neuen Gensequenzen wurde die Firma Eurogentec (Belgien) mit DNA-Doppelstrangsequenzierungen beauftragt.

4.8. Erstellung von Plasmidgenbanken

Partielle Plasmidgenbank von *Z. mobilis* in *E. coli*

Zur Klonierung von chromosomalen DNA-Fragmenten, die das Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* trugen, wurde eine partielle *Hind*III-Genbank von *Z. mobilis* in *E. coli* angelegt. Dazu wurde 10 µg chromosomale DNA aus *Z. mobilis* mit dem *Hind*III Restriktionsenzym gespalten und die DNA-Fragmente nach vollständiger Restriktion auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Aus einem Größenbereich von 6-10 kBp, der vorher durch Southern-Hybridisierung (4.11.) mit einer spezifischen Sonde gegen das *dxr* Gen ermittelt wurde, wurden drei Fraktionen isoliert. Über erneute Hybridisierung wurde spezifiziert, in welcher Fraktion sich das gewünschte DNA-Fragment befand. Diese Fraktion wurde anschließend in die Ligation mit dem *Hind*III geschnittenen Vektor pUC19 eingesetzt. Die aus der Ligation hervorgegangenen Klone wurden anschließend durch Plasmidisolierung und Southern-Hybridisierung nach dem DNA-Fragment mit dem gewünschten Gen durchsucht. Dazu wurden die Klone auf Mikrotiterplatten angezogen. Jeweils acht Klone wurden vereinigt, die Plasmid-DNA isoliert, *Hind*III geschnitten und gegen eine DNA-Sonde hybridisiert. Die Plasmide aus einer positiven Probe wurden in *E. coli* transformiert und somit wieder vereinzelt. Über erneute Plasmidisolierung und Hybridisierung konnte dann das gewünschte Plasmid isoliert werden.

Größenfraktionierte Expressionsgenbank von *E. coli*

Zur Erstellung einer größenfraktionierten Expressionsgenbank wurde 20 µg chromosomale DNA aus *E. coli* LJ110 partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau*3AI gespalten (Sambrook *et al.*, 1989). Der Restriktionsansatz wurde anschließend über Gelelektrophorese

aufgetrennt. In einem Größenbereich von 2-4 kBp wurden aus fünf Agaroseblöcken die DNA-Fragmente eluiert und die einzelnen Fraktionen in die Ligation mit *Bam*HI linearisiertem und dephosphoryliertem pUC18-Vektor eingesetzt. Es folgte die Transformation (4.4.) der Ligationsansätze in ultrakompetente *E. coli* XL10-Gold Zellen (Stratagene, Heidelberg). Jeweils die Hälfte der Zellsuspension wurde auf eine Agarplatte mit IPTG und X-Gal ausplattiert. Die Zugabe von IPTG und X-Gal ermöglichte es, über Blau-Weiß-Selektion (4.5.) den prozentualen Anteil an Transformanten, in denen sich lediglich religierte Vektoren befanden, abzuschätzen. Die Kolonien wurden mit je 5 ml LB-Medium von der Agarplatte in Flüssigkultur gebracht, vereinigt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Aus der Zellkultur wurden zur Lagerung der Expressionsgenbank Glycerinstocks (3.2.) angelegt. Für den Einsatz der Plasmidgenbank in das Carotionoid-Screeningsystem (9.) wurde die Plasmid-DNA über „Plasmid Maxi-Kit“ (Qiagen, Hilden) aus 200 ml über Nacht gewachsener Zellkultur isoliert.

4.9. Insertionsmutagenese

Bei der Insertionsmutagenese werden chromosomal kodierte Gene durch die gezielte Integration eines Plasmids in die entsprechende Gensequenz unterbrochen und damit funktionell ausgeschaltet.

Mit Hilfe des Plasmids pGP704 (Miller & Mekalanos, 1988) wurden Insertionsmutationen in *E. coli* MC4100 durchgeführt. Ein am 5'- und 3'-Ende verkürzter DNA-Bereich wurde in die Multiklonierungsstelle des Vektors pGP704 kloniert. Zur Replikation des rekombinanten Plasmids, d.h. zur Vervielfältigung und Isolierung des Plasmids für Klonierungsarbeiten mußte die DNA in λ pir lysogene *E. coli* SY327 Zellen eingebracht werden. Diese Zellen sind mit dem Bakteriophagen λ , der das für die Replikation des Plasmids pGP704 notwendige *pir* Gen trägt, infiziert. Um eine Insertionsmutation zu erreichen, wurde das rekombinante Plasmid in den nicht lysogenen *E. coli* Stamm MC4100 transformiert und die Zellen auf Ampicillinresistenz selektiert. In nicht lysogenen Stämmen fehlt das für die Replikation des Plasmids notwendige Protein π , das Genprodukt des *pir* Gens, so daß es über einfache homologe Rekombination zur gezielten Integration des Plasmids in die Zielsequenz kommt. Die erhaltenen Mutanten wurden über Southern-Blot-Hybridisierung (4.11.) kontrolliert.

4.10. Nicht radioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin

Für Southern-Hybridisierungen wurden DNA-Fragmente, die als Sonden eingesetzt werden sollten, mit Digoxigenin (DIG) gekoppelten dUTP markiert. Die Markierung der DNA-Sonden erfolgte unter Verwendung des „DIG-High Prime Kits“ (Roche, Mannheim) nach der „Random-primed“ Methode von Feinberg & Vogelstein (1983). Bei dieser Methode wird die zu markierende DNA zunächst denaturiert und anschließend mit einem

Gemisch aus Hexanukleotiden mit zufallsbedingter Sequenz hybridisiert. Die angelagerten Hexanukleotide dienen als Primer für die Synthese eines komplementären DNA-Strangs durch die Klenow-Polymerase, wobei DIG-dUTP miteingebaut wird. Im Reaktionsansatz wurden 500-1000 ng denaturierte DNA und 4 µl „Dig-High Prime“ in einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt. Nach Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 37 °C wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Zur Abtrennung von uneingebautem freien DIG-dUTP wurde der Ansatz über LiCl/Ethanol-Fällung gereinigt. Die vakuumgetrocknete DNA wurde anschließend in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen. Die so gereinigte und markierte DNA-Sonde konnte anschließend in Southern-Blot-Hybridisierungen (4.11.) eingesetzt werden.

4.11. Southern-Blot-Hybridisierung

Die Southern-Blot-Hybridisierung wurde zur Identifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen eingesetzt. Dazu wurde enzymatisch geschnittene und gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen und fixiert (Southern, 1975). Die Membran mit der immobilisierten DNA wurde anschließend zum Nachweis spezifischer DNA-Banden in Hybridisierungsversuchen eingesetzt.

10-20 µg der zu analysierenden DNA wurde in einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als DNA-Molekulargewichtsstandard wurden 50-100 ng eines DIG-markierten DNA-Längenstandards (Roche, Mannheim) eingesetzt. Das DNA-Bandenmuster wurde durch Kapillar-Blotting auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (Qiabran Nylon Plus, Qiagen, Hilden). Vor dem Transfer mußte die DNA im Agarosegel depuriniert, fragmentiert und denaturiert werden. Dazu wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 N HCl und anschließend für 20 min in 0,5 M NaOH Lösung mit 1,5 M NaCl geschwenkt. Es folgte eine 20 minütige Inkubation in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl pH 7,2). Der Transfer der nun einzelsträngigen und fragmentierten DNA auf die Membran erfolgte über Nacht mit 10 x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na₃-Citrat pH 7,2). Nach der Übertragung wurde die DNA durch UV-Quervernetzung auf die Nylonmembran fixiert und die Membran in 2 x SSC Puffer gewaschen (Mikosch, 1999; Sambrook *et al.*, 1989).

Für die Hybridisierung wurde die Membran mit den immobilisierten DNA-Fragmenten in Folie eingeschweißt und für 1-4 h bei 60 °C in Hybridisierungslösung prähybridisiert (The DIG system user's guide for filter hybridization, Boehringer, Mannheim, 1995). Durch die Prähybridisierung werden unspezifische Bindungen der Sonde mit der Membran verhindert. Anschließend wurde die DIG-markierte DNA-Sonde (4.10.) denaturiert und im Volumenverhältnis 1:250 zur Hybridisierungslösung gegeben. Der Ansatz wurde über

Nacht bei 65°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran zweimal für 5 min bei RT mit Waschlösung 1 und zweimal für 15 min bei 60 °C mit Waschlösung 2 gewaschen, um nicht hybridisierte Sonden zu entfernen.

Hybridisierungslösung	5 x SSC, 2 % (w/v) Blocking Reagenz, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsacrosin, 0,02 % (w/v) SDS
Waschlösung 1	2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung 2	0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

Die Detektion der hybridisierten Gensonde erfolgte über immunologische Chemilumineszenzreaktion (The DIG system user's guide for filter hybridization, Boehringer, Mannheim, 1995). Die Membran wurde nach Angabe des Herstellers behandelt und mit verdünnten Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (15 mU/ml; Roche, Mannheim) inkubiert. Der Nachweis der Sonde wurde mit dem Chemilumineszenz-Substrat CSPD (Roche, Mannheim) geführt. Durch Spaltung von CSPD initiiert die Alkalische Phosphatase die Chemilumineszenz, die mittels Röntgenfilm (20,3 x 25,4 cm Roche, Mannheim) detektiert werden konnte.

5. Proteinbiochemische Methoden

5.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt, wobei die Eichgerade mit Proben von 25-100 µg BSA/ml aufgenommen wurde. Alternativ wurde das "BCA Protein Assay Kit" (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Größe erfolgte in 10-12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli (1970). Die Proben wurden vor dem Auftragen in 2 x SDS-Probenpuffer (120 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 % [v/v] Glycerin, 6 % [w/v] SDS, 10 % [v/v] β-Mercaptoethanol, 0,005 % [w/v] Bromphenolblau) aufgenommen und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben zentrifugiert und je nach Proteingehalt 5-25 µl des Überstandes in die Geltaschen des Sammelgels aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel in der Mini-Gel-Apparatur von Biometra (Göttingen). Die Proteinbanden im Gel wurden nach dem Lauf mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt (Weber & Osborn,

1969). Eine höhere Nachweisempfindlichkeit von Proteinen in Polyacrylamidgelen bot die Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987).

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteinproben in nativen 2 x Probenpuffer (200 mM Tris-HCl pH 8,6, 0,005 % [w/v] Bromphenolblau, 20 % [v/v] Glycerol) aufgenommen, gemischt und auf ein natives Tris-Glycin-Gradientengel (Novex, Frankfurt/Main) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in der XCell-Mini-Kammer (Novex, Frankfurt/Main) mit nativen Laufpuffer (25 mM Tris-Base pH 8,5, 19,2 mM Glycin) bei einer Stromstärke von 6-12 mA/Gel. Das Gel wurde anschließend für 5 min in $H_2O_{dest.}$ gewaschen und dann mit „GelCode Blue Stain“ (Pierce, Rockford, USA) gefärbt. Als Molekulargewichtsstandard wurden nicht denaturierte Proteine (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt.

5.3. Western-Blot Analyse

Diese Methode wurde zum Nachweis rekombinanter Proteine mit terminalen Histidinresten genutzt. Dabei wurden Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen (5.2.) auf Nylonmembranen übertragen und rekombinante Proteine anschließend über immunologische Farbreaktion detektiert (Burnette, 1981).

Polyacrylamidgele wurden nach dem Protokoll des Herstellers in der Semi-Dry Fast Blot-Kammer (Fastblot B 33, Biometra, Göttingen) auf PVDF-Membranen (PVDF Immobilon-P Transfer Membranes, Millipore, Bredford, USA) transferiert. Zur immunologischen Detektion wurde die Membran wie folgt behandelt (modifiziert nach: The QIAexpressionist, Qiagen, Hilden, 1998):

1. Membran 2 x 10 min in TBS waschen
2. 1 h in Blockingreagenz schwenken
3. 2 x 10 min in TBST waschen
4. 1 h in Blockingpuffer mit 1/2000 Penta-His-Antikörper schwenken
5. 2 x 20 min in TBST waschen
6. 1 h in Blockingpuffer mit 1/3000 Anti IgG-Maus Antikörper-Konjugat schwenken
7. 3 x 10 min in TBST waschen
8. Inkubation in 20 ml Färbelösung (NBT/BCIP ready-to-use, Roche, Mannheim)
9. Stoppen der Farbreaktion in $H_2O_{dest.}$

Die gefärbte Membran wurde getrocknet und das Bandenmuster ausgewertet. Zur Lagerung wurde die Membran in Folie eingeschweißt und lichtgeschützt aufbewahrt.

TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5
TBST	500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20, 20 mM Tris-HCl pH 7,5
Blockingpuffer	3 % (w/v) BSA in TBS

5.4. N-terminale Sequenzierung von Proteinen

Die aminoterminal Sequenzierung von Proteinen wurde nach dem Prinzip des Edman-Abbaus (Edman & Begg, 1967) von der Arbeitsgruppe Prof. Tschesche (Biochemie, Universität Bielefeld) durchgeführt. Die Proben wurden in immobilisierter Form auf PVDF-Membranen verschickt. Dazu wurden die gereinigten Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend über Semi-Dry-Elektrophorese (Fastblot B 33, Biometra, Göttingen) auf eine PVDF-Membran übertragen (Burnette, 1981). Der Proteintransfer erfolgte mit CAPS-Puffer (0,01 M CAPS, 10 % [v/v] Methanol). Zur Färbung der Proteine wurde die Membran mit den immobilisierten Proteinen für 30 min in Amidoschwarzlösung geschwenkt und dann für 30 min in 45 % (v/v) Methanol mit 7 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Zur Lagerung wurde die Membran getrocknet und zwischen zwei Whatmann 3MM Papieren in Folie eingeschweißt.

5.5. Gelfiltration

Das Molekulargewicht der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase wurde über eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 200 pg, Pharmacia, Freiburg) ermittelt. Die Bestimmung wurde bei einer Flußrate von 0,6 ml/min in Puffer (5 mM MgSO₄, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) durchgeführt. Die Eichung der Gelfiltrationssäule erfolgte mit Eichproteinen aus dem „Gelfiltration Calibration Kit“ (Amershan Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers.

6. Enzymaktivitätsmessungen

6.1. Bestimmung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität

Die Aktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in Rohextrakten oder angereicherten Fraktionen wurde über die Bildung des Reaktionsproduktes 1-Deoxyxylulose 5-phosphat bestimmt. Die gebildete Menge an 1-Deoxyxylulose 5-phosphat wurde über HPLC quantifiziert.

Reaktionsansatz (50 µl)

D,L-Glycerinaldehyd 3-phosphat	10	mM
Pyruvat	10	mM
[2- ¹⁴ C]-Pyruvat	1	µCi
MgCl ₂	20	mM
TPP	1,5	mM
DTT	1	mM
EDTA	0,5	mM
Na-Citrat-Puffer pH 6,0	200	mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Enzymprobe gestartet. Nach Inkubation des Reaktionsansatz für 1-4 h bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Perchlorsäure abgestoppt. Der Überstand wurde mit 8 µl 5 M K₂CO₃ neutralisiert. 15 µl des Überstandes wurden für 30-60 min bei 30 °C mit 1,5 µl Alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm, Roche, Mannheim) behandelt. Jeweils 10 µl der dephosphorylierten und 10 µl der noch phosphorylierten Probe wurden über Aminex HPX-87H HPLC-Säule (300 x 7,8 cm, Biorad, München) chromatografisch aufgetrennt und bei einer Flußrate von 0,6 ml/min mit 6 mM H₂SO₄ bei 65 °C eluiert. Die Substrate wurden fotometrisch bei einer Wellenlänge von 195 nm und über Radioaktiv-Monitor (LB506C, Berthold, Bad Wildbach) detektiert. Als Retentionszeiten bei UV-Absorption ergaben sich für Pyruvat (9,30 min), für Glycerinaldehyd (11,06 min) und für 1-Deoxyxylulose (11,36 min). Da der UV-Monitor und der Radioaktiv-Monitor in Reihe geschaltet waren, traten die Peaks im Radioaktiv-Monitor mit einer Verzögerung von 0,7 min auf. Die Menge an 1-Deoxyxylulose 5-phosphat wurde über eine Eichgerade mit chemisch synthetisierter 1-Deoxyxylulose ermittelt ($\text{DOX [mM]} = [\text{Peakfläche} - 15.556] / 35.722$). Die Enzymaktivität von 1 Unit ist definiert als die Menge an Enzym, die die Bildung von 1 µmol 1-Deoxyxylulose 5-phosphat pro Minute katalysiert.

Zur schnellen Kontrolle, ob in einer Probe 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität vorlag, wurde ein nicht-radioaktiver Ansatz mit unphosphorylierten Substrat gewählt.

Reaktionsansatz (100 µl)

D,L-Glycerinaldehyd	10	mM
Pyruvat	10	mM
DTT	1	mM
TPP	0,5	mM
MgCl ₂	5	mM
Tris-HCl pH 7,5	50	mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10-20 μ l Probe gestartet und für 30-60 min bei 30 °C inkubiert und durch Erhitzen für 3 min bei 95 °C abgestoppt. Der Überstand wurde wie oben beschrieben über HPLC analysiert.

6.2. Bestimmung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Aktivität

Die Aktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase wurde über den Verbrauch des Kofaktors NADPH bestimmt. Der Verbrauch an NADPH ließ sich fotometrisch (Spektralphotometer DU640, Beckman, München) über die Abnahme der Extinktion bei 340 nm verfolgen (ϵ_{340} NADPH = 6,22 mM⁻¹cm⁻¹).

Reaktionsansatz (500 μ l)

1-Deoxyxylulose 5-phosphat	3	mM
NADPH	0,25	mM
MnCl ₂	2	mM
Tris-HCl pH 8,0	100	mM

Im Reaktionsansatz wurde je nach Aktivität 10-50 μ l Enzymprobe eingesetzt. Rohextrakte wurden, um störende Nebenreaktionen zu vermeiden, über PD-10 Säulen (Pharmacia, Freiburg) nach Vorschrift des Herstellers mit 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 entsalzt. Insgesamt wurde der Reaktionsansatz in einem Volumen von 500 μ l in Quarzküvetten angesetzt (Schichtdicke 1 cm). Die Enzymreaktion wurde nach 2 min Vorlauf bei 40 °C durch Zugabe von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat gestartet. Eine Unit der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 μ mol NADPH pro min oxidiert.

7. Isolierung von Enzymen

7.1. Isolierung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli*

Durch Überexpression des *dxs* Gens wurde die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in *E. coli* in großen Mengen synthetisiert und anschließend unter nativen Bedingungen aus *E. coli* gereinigt. Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter 3.2. beschrieben.

Zellaufschluß: Rekombinante *E. coli* Zellen wurden nach der Zellernte in 5 Vol Puffer A/Vol Zellen aufgenommen und über Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier, Duty Cycle 50 %, Output 40 W, 10 x 30 s mit jeweils 30 s Pause unter Eiskühlung). Der Zellaufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert. Zelltrümmer wurden über Zentrifugation (Beckman, JA20-Rotor, 20.000 Upm, 60 min, 4 °C) abgetrennt.

Ammoniumsulfatfällung: Der zellfreie Extrakt wurde auf Eis und unter Rühren langsam mit fein zerstoßenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Salz vermischt. Nach Erreichen des Salzgehalts von 45 % (w/v) wurde der Ansatz über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Die gefällten Proteine wurden anschließend über Zentrifugation (Beckman, JA-20 Rotor, 14.000 Upm, 45 min, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Proteinsediment wurde in Ausgangsvolumen Puffer A resuspendiert.

Dialyse: Zur Entfernung des Salzes wurde die Enzymlösung in einer Ultrafiltrationskammer (Amicon 8200, YA30-Membran, Amicon Inc., Beverly, USA) auf ein Drittel des Anfangsvolumens eingengt und das Konzentrat anschließend mit Ausgangsvolumen Puffer A verdünnt.

Anionenaustausch-Chromatografie: Die entsalzte Proteinfraction wurde nachfolgend über zwei Anionenaustauscher gereinigt. Zunächst wurde die Probe auf eine mit Puffer A äquilibrierten Sepharose Q HP-Säule (Ø 26 mm, 100 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Mit einer Flußrate von 1 ml/min wurde die Proteinprobe in einem linearen Salzgradienten von 0-1 M NaCl aufgetrennt. Die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und, um die Salzkonzentration zu erniedrigen, mit 3 Vol Puffer A verdünnt. Anschließend wurde die Probe auf eine DEAE 650S-Tentakel-Säule (Meck, Darmstadt) unter den gleichen Bedingungen chromatografisch aufgetrennt.

Puffer A 1 mM DTT, 0,5 mM TPP, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl pH 7,5

7.2. Isolierung des YajO Proteins aus *E. coli*

Über homologe Überexpression wurde das YajO Protein, das eine mögliche Aldoketoreduktase darstellt, in *E. coli* angereichert und nachfolgend über mehrere Reinigungsschritte isoliert. Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter 3.2. beschrieben.

Zellaufschluß: Das Zellsediment des YajO produzierenden *E. coli* Stamms wurde in 1 ml Puffer (20 mM Bis-Tris-Propane pH 6,0)/g Feuchtgewicht resuspendiert und mittels Frenchpress (French Pressure Cell Press, American Inst., Maryland, USA) in dreimaligen Durchlauf bei 1400 psi aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden über Zentrifugation (Beckman, JA20-Rotor, 20.000 Upm, 60 min, 4 °C) abgetrennt.

Ammoniumsulfatfällung: Die Ammoniumsulfatfällung erfolgte in zwei Fraktionsschritten von 0-45 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und von 45-75% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, wobei, wie es die Analyse über SDS-PAGE ergab, das YajO Genprodukt in der zweiten Fraktion sedimentierte. Das Proteinsediment dieser Fraktion wurde in Ausgangsvolumen

Standardpuffer (1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl pH 7) resuspendiert und über Ultrafiltration (Amicon 8200, PM10-Membran, Amicon Inc., Beverly, USA) entsalzt.

Anionenaustausch-Chromatografie: Zur weiteren Anreicherung des YajO Genprodukts wurden zwei Anionenaustausch-Chromatografien wie unter 7.1. beschrieben in Standardpuffer mit 10 % (v/v) Glycerin durchgeführt.

7.3. Isolierung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* und *Z. mobilis*

Die Fusion eines terminalen Peptids, bestehend aus sechs Histidinresten, an die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* bzw. *Z. mobilis* ermöglichte es, die Proteine in einem Schritt über Affinitätschromatografie an Ni-NTA-Agarose (Hochuli, 1990; Hochuli *et al.*, 1987) zu reinigen.

Nach Überexpression der *dxr* Gene *E. coli* bzw. *Z. mobilis* (3.2.) wurde zum Aufschluß der rekombinanten *E. coli* Zellen das Zellsediment in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5-8) aufgenommen und mit 1 mg/ml Lysozym vermischt. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, 20 % Duty Cycle, Output Control 2, 4 x 30 s mit 30 s Pause unter Eiskühlung) behandelt. Zelltrümmer wurden über Zentrifugation (14.000 Upm, 45 min, 4°C, Eppendorf, Hamburg) entfernt. Größere Zellmengen von 10-20 ml wurden mit Hilfe der Frenchpress (3 x 1400 psi; French Pressure Cell Press, American Inst., Maryland, USA) aufgeschlossen. Zum Binden der Fusionsproteine an das Säulenmaterial wurde der Überstand zusammen mit 50 % Ni-NTA-Agarose für 1 h bei 4 °C in einem 50 ml Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Menge der eingesetzten Ni-NTA-Agarose richtete sich nach der Proteinmenge. Bei einer Bindekapazität von 5-10 mg/ml wurden 1 ml Säulenmaterial pro 10 mg Protein eingesetzt. Die mit Rohextrakt vorinkubierte Ni-NTA-Agarose wurde anschließend in leere 5 ml Säulen gefüllt und mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5-8, 50 mM Imidazol) gespült. Die Elution des 6xHis-tag-Proteins erfolgte mit sechs Säulenvolumen Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5-8, 200 bzw. 250 mM Imidazol). Die Ni-NTA-Agarose wurde in 70 % (v/v) Ethanol bei 4 °C gelagert und konnte nach Äquilibration mit Waschpuffer wiederverwendet werden.

8. Enzymatische Synthese und Reinigung von Substanzen des MEP-Wegs

Da 1-Deoxyxylulose 5-phosphat und 2-C-Methylerythritol 4-phosphat kommerziell nicht erhältlich sind, wurden die Substanzen *in vitro* enzymatisch synthetisiert. Die Synthese erfolgte sowohl mit unmarkierten als auch mit ¹⁴C-markierten Substraten.

8.1. Enzymatische Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat

Die *in vitro* Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat wurde in einem enzymgekoppelten Reaktionsansatz ausgehend von Pyruvat und Fruktose 1,6-diphosphat durchgeführt (Abb. 4). Glycerinaldehyd 3-phosphat wurde über die Spaltung von Fruktose 1,6-diphosphat durch die Fruktose 1,6-diphosphat-Aldolase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Mannheim) bereitgestellt. Die beiden Spaltprodukte Glycerinaldehyd 3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat liegen über die zugesetzte Triosephosphat-Isomerase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Mannheim) im Gleichgewicht. 1-Deoxyxylulose 5-phosphat entsteht aus der von der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase katalysierten Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat.

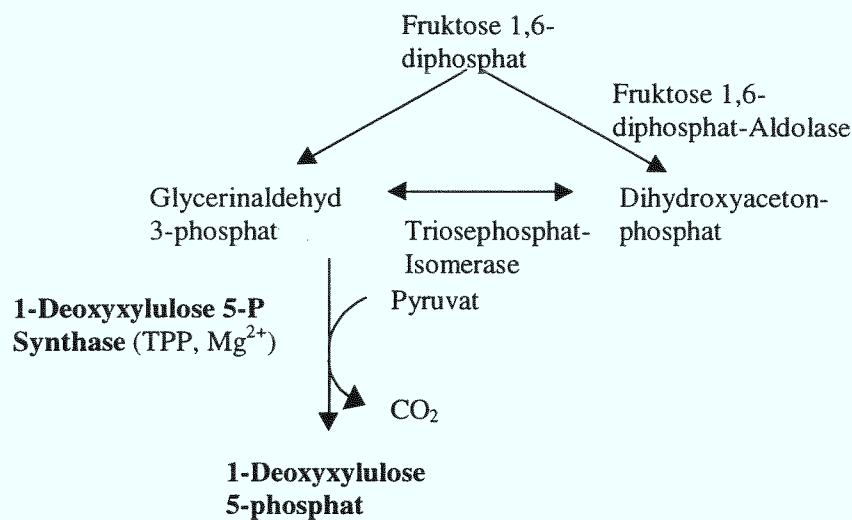


Abb. 4: *In vitro*-Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat ausgehend von Fruktose 1,6-diphosphat und Pyruvat

Reaktionsansatz (40-50 ml)

Fruktose 1,6 diphosphat	25	mM
Pyruvat	50	mM
Fruktose 1,6 diphosphat-Aldolase	2	U
Triosephosphat-Isomerase	10	U
1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase	10	U
Puffer	1	x

Puffer (2 x) 5 mM MgCl₂, 0,5 mM TPP, 0,25 mM DTE, 200 mM Tris-HCl pH 7,0

Der Reaktionsansatz wurde sterilfiltriert und bei 30 °C inkubiert. Um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen, wurden in gewissen Zeitabständen 15 µl Aliquots entnommen, mit

Alkalischer Phosphatase behandelt und über HPLC analysiert (6.1.). Die Retentionszeiten betrugen dabei für Fruktose 11,92 min und für Dihydroxyaceton 14,88 min. Die Inkubation dauerte bis zu 48 h.

Die Synthese von [2-¹⁴C]-1-Deoxyxylulose 5-phosphat erfolgte ausgehend von einem Gemisch an [2-¹⁴C]-Pyruvat und unmarkierten Pyruvat nach dem gleichen Prinzip. Allerdings war das Reaktionsvolumen wesentlich verringert und die Endkonzentrationen der Substrate wurden variiert.

Reaktionsansatz

Fruktose 1,6-diphosphat	33	mM
Pyruvat	56	mM
[2- ¹⁴ C]-Pyruvat [250 µCi]	10	mM
Fruktose 1,6-diphosphat-Aldolase	1	U
Triosephosphat-Isomerase	50	U
1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase	0,8	U
Puffer	ad 1	ml

Die Inkubation wurde 30 h bei 30 °C durchgeführt.

Bei der Aufreinigung von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat aus dem Reaktionsansatz machte man sich die unterschiedliche Löslichkeit von Bariumsalzen in Wasser und Alkohol zu nutze (Cardini & Leloir, 1962). Zu dem Reaktionsansatz wurde im Volumenverhältnis 1:10 1 M BaCl₂-Lösung gegeben. In diesem ersten Reinigungsschritt wurden wasserunlösliche Bariumsalze, wie sie mit Fruktose 1,6-biphosphat, Dihydroxyacetonphosphat und TPP eingegangen werden, abgetrennt. Der sich bildende weiße Niederschlag wurde über Zentrifugation (5000 Upm, 5 min, 4 °C, Heraeus, Düsseldorf) sedimentiert. Das Sediment wurde noch mehrmals mit H₂O_{dest.} gewaschen und die Überstände vereint. Im nächsten Schritt wurden durch Zugabe von 3 Vol 96 % (v/v) Ethanol in den Überstand wasserlösliche, aber alkoholunlösliche Bariumverbindungen wie 1-Deoxyxylulose 5-phosphat und Glycerinaldehyd 3-phosphat gefällt. Pyruvat bildet ein wasser- und alkohollösliches Salz und wurde daher bei dieser Fraktionierung abgetrennt. Nach Inkubation des Ansatz für 30 min bei -20 °C wurden die unlöslichen Salze durch Zentrifugation (5000 Upm, 15 min, 4 °C, Heraeus, Düsseldorf) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde 1-Deoxyxylulose 5-phosphat durch mehrmaliges Waschen des Sediments mit H₂O_{dest.} wieder in Lösung gebracht. Die Überstände wurden vereinigt und unter Vakuum (Savant Instruments Inc., New York, USA) getrocknet. Es bildete sich ein gelbes Salz.

8.2. Enzymatische Synthese von [2-¹⁴C]-2-C-Methylerythritol 4-phosphat

Die Synthese von [2-¹⁴C]-2-C-Methylerythritol 4-phosphat wurde ausgehend von der Vorstufe [2-¹⁴C]-1-Deoxyxylulose 5-phosphat (8.1.) und mit Hilfe der gereinigten 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* (7.3.) nach folgenden Ansatz durchgeführt.

Reaktionsansatz (1 ml)

[2- ¹⁴ C]-1-Deoxyxylulose 5-phosphat	13	mM
NADPH	20	mM
MnCl ₂	1	mM
Tris-HCl pH 7,5	100	mM
1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase	0,2-0,6	mg

Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 5 h. Der Reaktionsverlauf wurde über HPLC verfolgt (6.1.). 2-C-Methylerythritol eluiert dabei bei einer Retentionszeit von 11,54 min. Die Probe wurde vor der HPLC-Analyse mit Perchlorsäure abgestoppt und nach Neutralisierung mit Alkalischer Phosphatase behandelt (6.1.).

9. Bestimmung des Zeaxanthin-Gehalts in rekombinanten *E. coli* Stämmen

In Versuchen mit rekombinanten *E. coli* Stämmen, die in der Lage sind, das Isoprenoid Zeaxanthin zu produzieren, wurde der Einfluß der Expression von Genen aus dem MEP-Weg auf die Synthese dieses gelben Pigments untersucht. Dazu wurde die Menge an produzierten Zeaxanthin nach Extraktion des Pigments aus den Zellen fotometrisch quantifiziert (Lichtenthaler *et al.*, 1987). Die Quantifizierung wurde mit Zellen aus der späten stationären Phasen durchgeführt, da erst in dieser Wachstumsphase die Produktion an Carotinoiden ihren maximalen Wert erreicht (Sandmann *et al.*, 1999).

Die Anzucht der rekombinanten *E. coli* JM101 [pACCAR25Δctx] Zellen erfolgte ausgehend von einer Einzelkultur über Tag bei 37 °C in 5 ml LB-Medium. Mit 1 % Inokulum dieser Vorkultur wurde abends eine 50 ml Hauptkultur beimpft und bei 30 °C inkubiert. Nach Wachstum über Nacht wurde die Expression der Zeaxanthin-Synthese Gene durch Zugabe von 0,4 mM IPTG in die Zellkultur induziert. Nach Wachstum bei 30 °C für weitere 24 h wurden die Zellen abzentrifugiert und lyophilisiert (Christ, Osterode). Da Carotinoide fettlöslich sind, erfolgte die Extraktion des Zeaxanthins aus den Zellen mit organischen Lösungsmittel. Dazu wurden 5-10 mg der lyophilisierte Zellen für 15-20 min in 20 ml Methanol bei 50 °C inkubiert. Der Überstand wurde nachfolgend über Extraktion mit 20 ml 10 % (v/v) Ether in Petrolether und zweimaliger Extraktion mit 20 ml H₂O_{dest.} gereinigt. Durch diese Extraktionsschritte wurde das Methanol entfernt und das Zeaxanthin in 10 % (v/v) Ether in Petrolether gelöst. Für eine bessere Phasentrennung

wurde in den einzelnen Extraktionsschritten einige ml 96 % (v/v) vergällter Ethanol hinzugegeben. Der gereinigte Extrakt wurde dann bei 30 °C unter N₂-Begasung auf 2 ml eingeeengt. Über die Absorption der Probe bei 454 nm gegen Petrolether wurde die Zeaxanthinmenge bestimmt.

$$[\mu\text{g Zeaxanthin} / \text{g TG}] = \frac{A_{454} \times \text{Vol [ml]}}{0,25 \times \text{TG [g]}}$$

Da Carotinoide lichtempfindlich sind, wurden alle Arbeiten unter Gelblicht durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Identifizierung und Charakterisierung des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase von *E. coli*

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß die Synthese von Isopentenylidiphosphat im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Biosyntheseweg von den C₃-Verbindungen Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat ausgeht (Rohmer *et al.*, 1996). Zudem zeigten Inkorporationsversuche mit ¹³C-markierter 1-Deoxyxylulose in *E. coli*, daß diese Pentulose eine Vorstufe des Isopentenylidiphosphats ist (Broers, Dissertation 1994). Die Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat aus Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat erfordert eine Acyloinkondensation, in der Pyruvat decarboxyliert wird. Diese Reaktion kann als Nebenaktivität von TPP-abhängigen Enzymen wie beispielsweise der E1-Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenasekomplexes oder der Pyruvat-Decarboxylase katalysiert werden (Yokata & Sasajima, 1984, 1986; Bringer-Meyer & Sahm, 1988). Auch Transketolasen übertragen C₂-Einheiten von einem Ketose-Donorsubstrat auf ein Aldose-Akzeptorsubstrat (Sprenger, 1995). Die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase sollte daher Sequenzhomologien zu TPP-abhängigen Enzymen besitzen. Ausgehend von diesen Überlegungen sollte das Gen für die postulierte 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase über Sequenzvergleiche mit TPP-abhängigen Enzymen in *E. coli* identifiziert und die spezifische 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität des Genprodukts nachgewiesen werden.

1.1. Klonierung des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase

Mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997) war es möglich, über das Computerprogramm BLAST (Altschul *et al.*, 1997) nach offenen Leserahmen auf dem Chromosom von *E. coli* zu suchen, deren abgeleitete Proteinsequenz Homologien zur Transketolase und zur E1-Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenasekomplexes besitzen. Ein Vergleich des Genoms mit der bekannten Proteinsequenz der Transketolase A aus *E. coli* (Sprenger *et al.*, 1991, 1992) führte zur Identifizierung von insgesamt drei ähnlichen Proteinen. Neben der Transketolase B (Iida *et al.*, 1993), deren Proteinsequenz zu 75 % identisch ist mit der der Transketolase A, und der Pyruvat Dehydrogenase (15,7 % Identität) (Stephens *et al.*, 1983) wurde ein weiteres Protein gefunden, dessen Funktion noch nicht bekannt war. Die Identität dieses unbekannten Proteins zu den Transketolasen A und B und zu der Pyruvat Dehydrogenase lag bei nur 14,8 %, 13,5 % bzw. 11,6 %. Aber ein Vergleich der Sequenzen ergab, daß das unbekannte Protein die charakteristischen Aminosäurereste für eine TPP-Bindestelle (Hawkins *et al.*, 1989), wie sie auch in der Transketolase A und B von *E. coli* vorkommt, besitzt (Abb. 5).

Abb. 5: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Transketolase A und B aus *E. coli* (tktA bzw. tktB) und der möglichen 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* (dxs); eine mögliche TPP-Bindestelle ist eingerahmt; konservierte Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet.

Das Gen für dieses funktionell nicht charakterisierte Protein liegt bei 9 min auf der Genomkarte von *E. coli* und ist nur 24 Bp stromabwärts vom Stopcodon des *ispA* Gens, das für die Farnesyldiphosphat Synthase kodiert (Fujisaki *et al.*, 1990), lokalisiert. Die Lage des Gens in Nachbarschaft zu einem Gen aus der Isoprenoidbiosynthese, das Vorhandensein einer möglichen TPP-Bindestelle und die Tatsache, daß dieses der einzige offene Leserahmen mit unbekannter Funktion war, der über Sequenzvergleich mit der Transketolase A im Genom von *E. coli* identifiziert wurde, machten dieses Gen zu einem vielversprechenden Kandidaten für das Gen der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase.

Zur Untersuchung der biochemischen Funktion des offenen Leserahmens wurde der Genbereich über PCR mit chromosomaler DNA von *E. coli* LJ110 amplifiziert. Der amplifizierte Bereich umfaßte neben dem ATG-Startcodon eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (AGG), die 6 Bp vor dem ATG-Start liegt. Das 1,9 kBp große DNA-Fragment wurde in den mit dem Restriktionsenzym *Sma*I linearisierten Vektor pUC18 subkloniert und dann über die Schnittstellen *Eco*RI und *Sph*I in den Vektor pUCBM20 kloniert. Das so erhaltene Konstrukt pBM20dxsr trug nun unter der Kontrolle des *lac*-Promotors ein Gen, das für ein 620 Aminosäuren großes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 67.616 und einem isoelektrischen Punkt bei 6,16 kodierte.

Die erste Bestätigung, daß das Gen für eine 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase kodiert, brachte der Vergleich der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität im Rohextrakt von *E. coli* Wildtyp mit der im Rohextrakt von *E. coli* JM109 [pBM20dxsr], in dem das mögliche *dxs* Gen überexprimiert wurde. Die Aktivitätsmessung erfolgte über Radioaktiv-HPLC. Diese Methode wurde schon erfolgreich bei der Bestimmung einer 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase-Enzymaktivität in Rohextrakten verschiedener Bakterien eingesetzt (T. Wiegert, persönliche Mitteilung). Rohextrakt von *E. coli* LJ110 und *E. coli* JM109 [pBM20dxsr] wurden zusammen mit den Substraten [2-¹⁴C]-Pyruvat und D,L-Glycerinaldehyd 3-phosphat, sowie dem Kofaktor TPP und Mg²⁺ für 2 h bei 30 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Enzymreaktion wurden die phosphorylierten und dephosphorylierten Produkte im Reaktionsansatz über HPLC analysiert. Phosphorylierte Produkte wie Glycerinaldehyd 3-phosphat treten im Ausschlußvolumen der Säule auf. Erst nach Behandlung mit Alkalischer Phosphatase kommt es zu einer Auftrennung der Zucker über die Säule. In Abb. 6 ist das HPLC-Profil des Reaktionsansatzes mit zellfreiem Extrakt von *E. coli* JM109 [pBM20dxsr] zu sehen. Ein Vergleich des mit Alkalischer Phosphatase unbehandelten mit dem behandelten Reaktionsansatz zeigt, daß der radioaktive Ausschlußpeak bei 6,06 min nach Alkalischer Phosphatase-Behandlung verschwand und ein neuer Peak bei einer Retentionszeit von 11,36 min (UV) und 12,12 min (Radioaktiv) auftrat. Die Retentionszeit des neuen Peaks entsprach der von chemisch synthetisierter 1-Deoxyxylulose. Auf diese Weise konnte eine 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase

Aktivität sowohl im zellfreien Extrakt von *E. coli* LJ110 als auch von *E. coli* JM109 [pBM20dxsr] nachgewiesen werden. Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten aber zeigte, daß es durch die Expression des klonierten Gens zu einer 20-fachen Steigerung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität kam (Tab. 5). Dieser Anstieg bekräftigte die Vermutung, daß der klonierte offene Leserahmen für ein Enzym kodiert, das Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat zu 1-Deoxyxylulose 5-phosphat umsetzt.

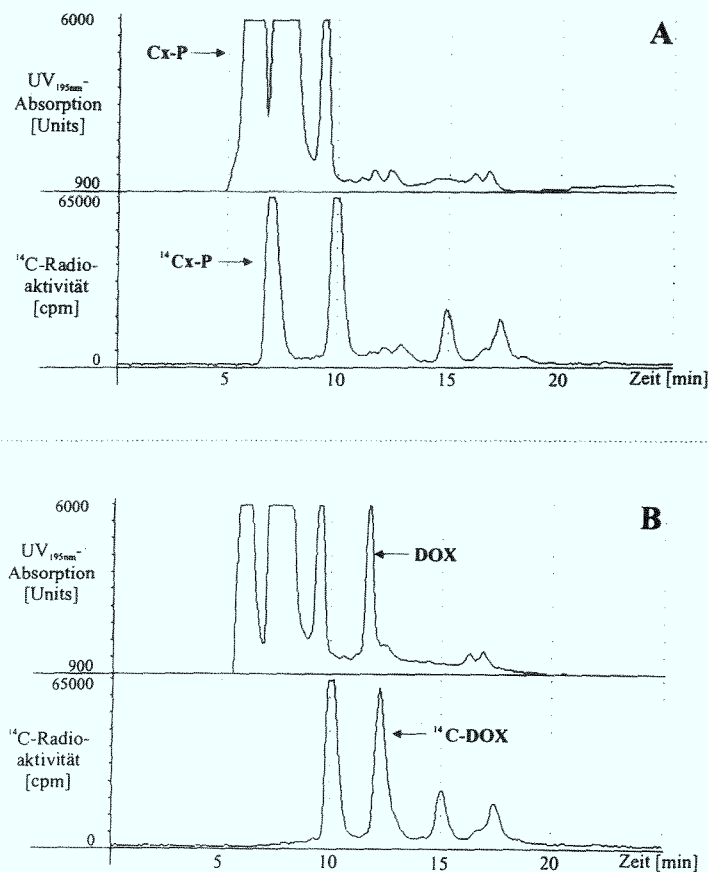


Abb. 6: HPLC-Elutionsprofil des Reaktionsansatzes mit zellfreiem Extrakt von *E. coli* JM109 [pBM20dxsr]. Der UV- und Radioaktiv-Monitor sind in Serie geschaltet, so daß die Retentionszeiten der Peaks im Radioaktiv-Monitor verzögert auftreten. A: Reaktionsansatz vor Phosphatase-Behandlung; phosphorylierte Produkte (Cx-P) treten im Ausschlußvolumen auf. B: Reaktionsansatz nach Dephosphorylierung. 1-Deoxyxylulose (DOX) eluiert bei 11,36 bzw. 12,12 min. Peaks bei 9,3 min (UV) und 10 min (¹⁴C) stammen vom Pyruvat; die anderen Peaks stammen von den eingesetzten Komponenten oder stellen andere Reaktionsprodukte dar.

Tab. 5: 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Aktivität gemessen im zellfreien Extrakt verschiedener *E. coli* Stämme. Die Aktivität wurde über Radioaktiv-HPLC bestimmt.

Stämme	Spezifische Aktivität [mU/mg Protein]
<i>E. coli</i> LJ110	0,4
<i>E. coli</i> JM109 [pBM20dxsr] + IPTG	8,0

1.2. Reinigung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase

Der eindeutige Beweis, daß das *dxs* Gen für eine 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase kodiert, wurde über die Reinigung des *dxs* Genprodukts erbracht.

Die Reinigung des Transketolase ähnlichen Proteins erfolgte nach homologer Überexpression des Gens in *E. coli* über mehrere Aufreinigungsschritte, die in Tab. 6 aufgeführt sind. Über eine Ammoniumsulfatfällung und zwei Anionenaustausch-Chromatografien konnte aus 2,6 g Gesamtprotein 1,7 mg homogenes Protein isoliert werden. Über SDS-PAGE wurde der Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte belegt und die Homogenität des 65 kDa großen Proteins nach der Reinigungsprozedur nachgewiesen (Abb. 7).

Tab. 6: Reinigung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus 9,6 l Gesamtkultur *E. coli* JM109 [pBM20dxsr]. Die Aktivität wurde über Radioaktiv-HPLC bestimmt.

Reinigungsschritt	Aktivität [U]	Protein [mg]	Spez. Akt. [mU/mg Protein]	Ausbeute [%]	Faktor
Rohextrakt	21,0	2630,0	8,0	100	1,0
Ammoniumsulfatfällung	11,3	150,0	75,3	54	9,4
Q-Sepharose HP	4,0	14,5	275,9	19	34,5
DEAE 650S-Tentakel	0,9	1,7	529,4	4	66,2

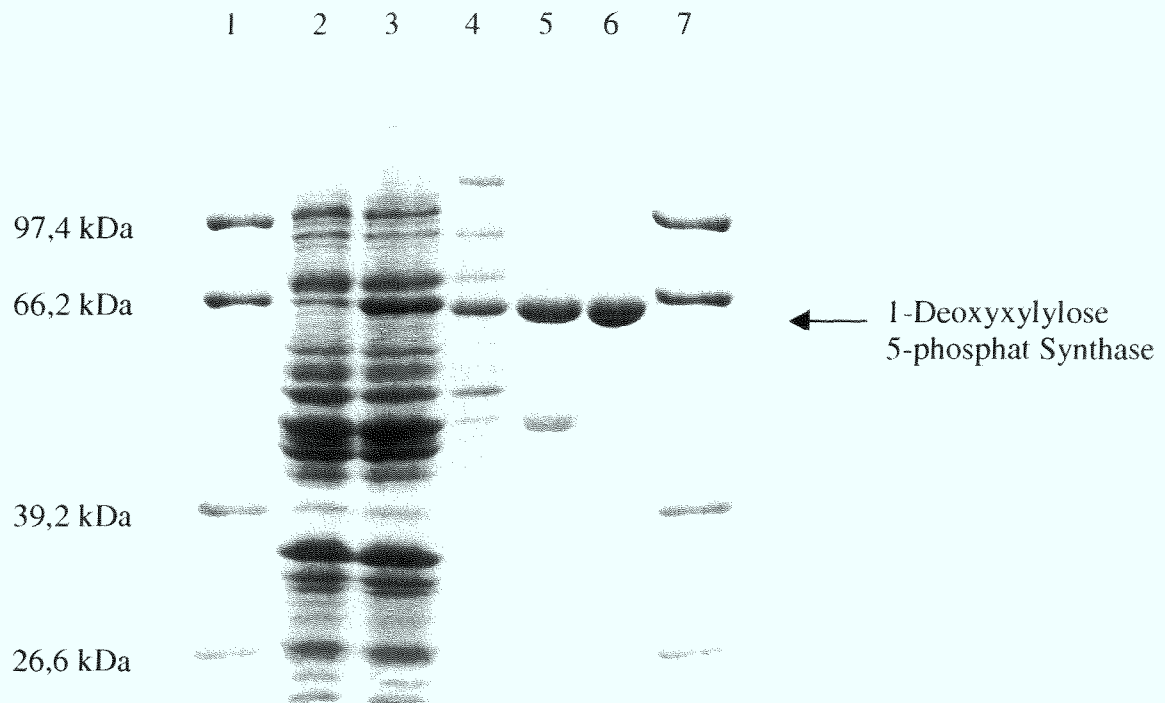


Abb. 7: SDS-Polyacrylamidgel mit den einzelnen Reinigungsschritten der 1-Deoxyxylylose 5-phosphat Synthase Anreicherung (Coomassie gefärbt); Spur 1/7: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: zellfreier Extrakt von *E. coli* JM109 [pBM20dxsr] ohne Induktion, Spur 3: zellfreier Extrakt von *E. coli* JM109 [pBM20dxsr] nach Induktion mit 0,4 mM IPTG, Spur 4: nach Ammoniumsulfatfällung, Spur 5: nach Q-Sepharose HP, Spur 6: nach DEAE-650S-Tentakel

Zur Überprüfung der korrekten Proteinsequenz und des Translationsstarts wurde das gereinigte Protein aminoterminal ansequenziert. Die Aminosäuresequenz aus der Sequenzierung des N-Terminus (FDIAKY) stimmte mit der vom klonierten Gen abgeleiteten Aminosäuresequenz überein, wobei das Formylmethionin und der zweite Aminosäurerest Serin aus versuchstechnischen Gründen nicht sicher identifiziert wurden.

Die Bestätigung der korrekten Proteinsequenz und die Anreicherung des Proteins bis zu einer spezifischen Aktivität von 0,53 U/mg (Tab. 6) belegten, daß der klonierte offene Leserahmen aus *E. coli* für eine 1-Deoxyxylylose 5-phosphat Synthase kodiert.

1.3. NMR-Strukturanalyse von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat

Zur Bestätigung der Struktur des enzymatisch synthetisierten 1-Deoxyxylulose 5-phosphats wurden NMR-Analysen durchgeführt. Dazu wurde das Zuckerphosphat in einer enzymgekoppelten *in vitro*-Synthese hergestellt. Dieser Ansatz wurde gleichzeitig dazu verwendet, 1-Deoxyxylulose 5-phosphat in ausreichender Menge als Substrat für biochemische Untersuchungen nachfolgender Schritte im MEP-Weg zu gewinnen.

Die Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat erfolgte in Ansätzen von 50 ml. Als Ausgangssubstrate dienten Pyruvat und Fruktose 1,6-diphosphat, die in Konzentrationen von 25 mM bzw. 50 mM eingesetzt wurden. Durch die Spaltung von Fruktose 1,6-diphosphat mit Hilfe der Fruktose 1,6-diphosphat-Aldolase wurde D-Glycerinaldehyd 3-phosphat bereitgestellt. D-Glycerinaldehyd 3-phosphat stand über die Triosephosphat-Isomerase mit Dihydroxyacetonphosphat im Gleichgewicht. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat entstand aus der von der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase katalysierten Kondensation von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd 3-phosphat. Die Enzymkopplung erlaubte die Bereitstellung des ansonsten teurer erhältlichen und enantiomerisch nicht sehr reinen Substrats D-Glycerinaldehyd 3-phosphat aus dem weit aus günstigeren Zucker Fruktose 1,6-diphosphat. Der Reaktionsansatz wurde 48 h bei 30 °C inkubiert. Nach dieser Zeit war die Reaktion zu nahezu 60 % abgelaufen. Die lange Inkubationszeit und nicht 100 %ige Umsetzung erklärt sich mit der geringen spezifischen Aktivität und Thermolabilität der gereinigten 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase. Die Reinigung von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat aus dem Reaktionsansatz erfolgte über Barium-Fraktionierung. Bei dieser Methode werden organische Phosphatkomponenten aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit als Bariumsalz voneinander getrennt. Die Reinheit der Probe wurde über HPLC bestätigt. Aus einem 50 ml Ansatz konnten 0,23-0,38 g 1-Deoxyxylulose 5-phosphat als Bariumsalz gewonnen werden. Das entsprach einer Ausbeute von 44-73 % bezogen auf die gebildete Menge an 1-Deoxyxylulose 5-phosphat im Reaktionsansatz.

Das so synthetisierte und gereinigte 1-Deoxyxylulose 5-phosphat wurde anschließend mittels NMR-Messungen analysiert. Die Ergebnisse der NMR-Messungen sind in Abb. 8 und Abb. 9 dargestellt. Im ^1H -NMR-Spektrum treten aufgrund der vier Protonensorten, die sich in unterschiedlicher chemischer Umgebung befinden, vier Grundsignale auf. Anhand der Intensitäten kann das Singulett der Methylgruppe ($\delta=2,34$) und das Triplett der Methylengruppe ($\delta=3,09$) zugeordnet werden. Die Resonanzsignale der beiden einzelnen H-Atome am C-3- ($\delta=4,57$) bzw. C-4-Atom ($\delta=4,37$) treten aufgrund des Einflusses der benachbarten Protonen als Dublett bzw. Dublett-Triplett auf. Die Signale des Dubletts liegen 1,88 Hz voneinander entfernt (Kopplungskonstante $J_{b,c}=1,88$ Hz). Die Kopplungskonstanten des Dublett-Tripletts betragen $J_{b,c}=1,88$ Hz (Dublett) und $J_{c,d}=6,5$ Hz

(Triplett). Die Aufspaltung des Resonanzsignals der Methylengruppe in ein Triplett läßt darauf schließen, daß die Protonen zusätzlich zum Proton H_b mit einem Phosphor-Atom koppeln. Das Vorhandensein einer Phosphatgruppe wird durch die ^{31}P -NMR-Spektroskopie (Abb. 9) eindeutig belegt. Das Signal des ^{31}P -Atoms ($\delta=5,18$) koppelt mit den benachbarten Protonen und spaltet sich daher in ein Triplett auf. Die NMR-Spektren zeigten somit die für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zu erwartenden Signale. In Zusammenarbeit mit T. Begley (Cornell University, Ithaca, New York, USA) konnte zudem ein Vergleich zwischen der *in vitro* synthetisierten Substanz und dem in seiner Arbeitsgruppe chemisch hergestellten 1-Deoxyxylulose 5-phosphat durchgeführt werden (Taylor *et al.*, 1998). Die Übereinstimmung beider Spektren bestätigte, daß es sich bei der gereinigten Substanz um 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat handelte. Die NMR-Analyse belegte nun eindeutig, daß bei der Synthese von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd 3-phosphat durch die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat entsteht.

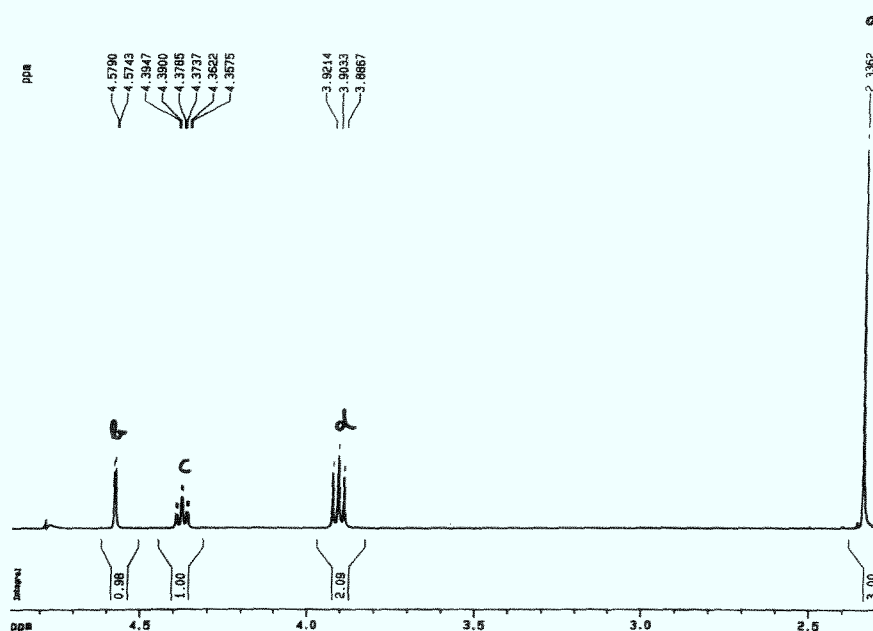


Abb. 8: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz; D_2O) des 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphats, das aus D-Glycerinaldehyd 3-phosphat und Pyruvat durch die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* *in vitro* synthetisiert wurde; Signalzuordnung: a: H-1, b: H-3, c: H-4, d: H-5 des 1-Deoxyxylulose 5-phosphats

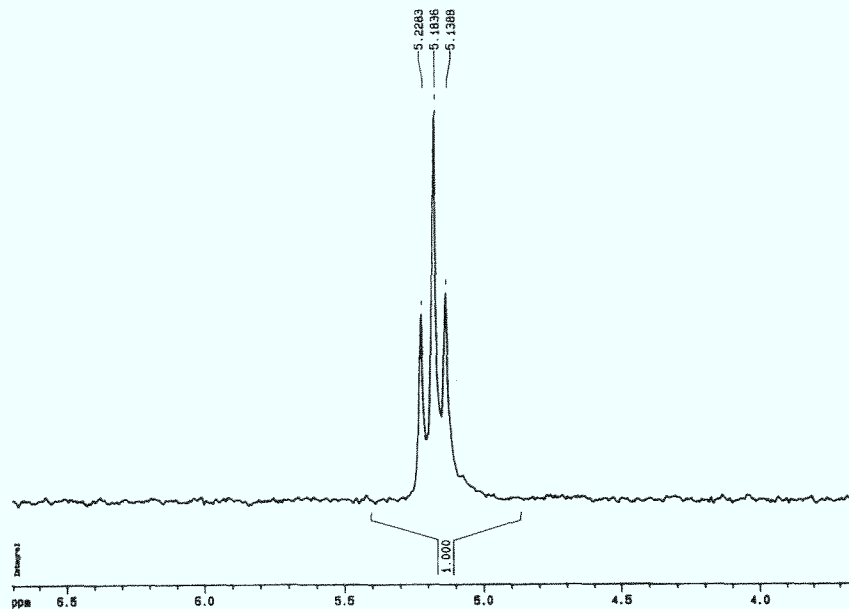


Abb. 9: ^{31}P -NMR-Spektrum (162 MHz; D_2O) des 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphats, das aus D-Glycerinaldehyd 3-phosphat und Pyruvat durch die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli in vitro* synthetisiert wurde

2. Klonierung des *yajO* Gens aus *E. coli* und Untersuchungen zur Funktion des YajO Genprodukts

2.1. Sequenzanalyse der *dxs* Genregion

Da Gene eines Biosynthesewegs in Bakterien oft in Operons organisiert sind, war es möglich, daß in der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Genregion noch weitere Gene aus dem 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg lokalisiert sind. Daher wurden die Gene in Nachbarschaft zum *dxs* Gen näher untersucht.

Die computerunterstützte Analyse der *dxs* Genregion in *E. coli* zeigte, daß neben dem *dxs* Gen noch drei weitere Gene mit gleicher Orientierung auf dem Chromosom wie das *dxs* Gen zu finden sind (Abb. 10). 24 Bp stromaufwärts des *dxs* Gens liegt das Gen für die Farnesyldiphosphat Synthase (*ispA* Gen) (Fujisaki *et al.*, 1990). Dem *ispA* Gen folgt stromaufwärts ein 243 Bp großer offener Leserahmen mit Ähnlichkeit zu einem Gen der kleinen Untereinheit der Exodeoxynuklease (*xseB*). Das Stopcodon für das *xseB* Gen überschneidet sich mit dem Startcodon des *ispA* Gens. Vor dem *xseB* Gen finden sich Sequenzen mit Ähnlichkeit zu den Konsensussequenzen für die Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{32} (Fujisaki *et al.*, 1990). 179 Bp stromabwärts des *dxs* Gens folgt ein offener Leserahmen,

der für ein 324 Aminosäuren großes Protein kodiert, dessen abgeleitete Proteinsequenz Ähnlichkeit zu Proteinen aus der Aldoketoreduktase Superfamilie zeigt. Lois *et al.* (1998) konnten durch Versuche mit Reverser Transkriptase nachweisen, daß die Gene *ispA*, *dxs* und *yajO* als ein Transkript abgelesen werden. Fujisaki *et al.* (1990) vermuteten aufgrund der Promotorstrukturen vor dem *xseB* Gen, daß die Gene *xseB* und *ispA* kotranskribiert werden. Die Gene *xseB*, *ispA*, *dxs* und *yajO* würden demnach ein Operon bilden.

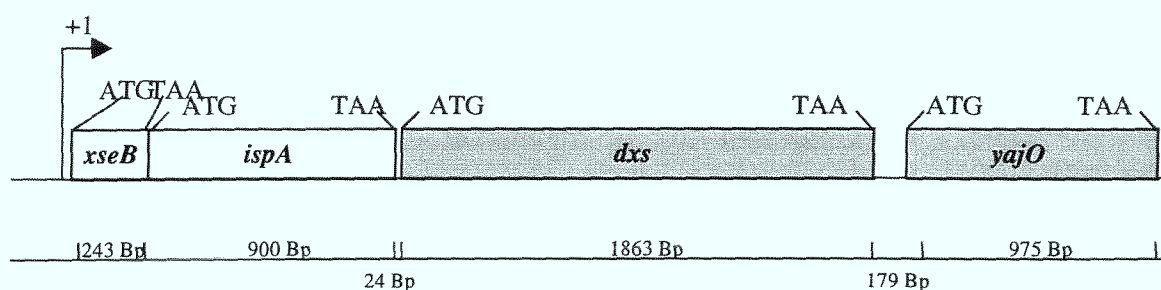


Abb. 10: 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Genregion in *E. coli*; *xseB*: Gen für putative Exodeoxynuklease Untereinheit, *ispA*: Gen für Farnesylidiphosphat-Synthase, *dxs*: Gen für 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase, *yajO*: Gen für putative Aldoketoreduktase

Da die weitere Umsetzung von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zum Isopentenylidiphosphat Reduktionen erfordert, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei dem *yajO* Gen um ein funktionelles Gen aus dem 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg handelte. Um die Funktion des YajO Proteins zu untersuchen, wurde das Gen kloniert und das gereinigte Genprodukt näher untersucht.

2.2. Charakterisierung des YajO Genprodukts

Das *yajO* Gen kodiert für ein Polypeptid aus 324 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 36.420 und einem isoelektrischen Punkt von 5,01. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des YajO Genprodukts zeigte hohe Ähnlichkeiten zu Enzymen aus der Aldoketoreduktase Superfamilie (Tab. 7). Die höchste Identität weist die YajO Proteinsequenz zu einer möglichen Aldoketoreduktase aus *Streptomyces coelicolor* auf (60,1 %). 43,6 % und 41,3 % Identität besitzt das YajO Protein zu einer möglichen Oxidoreduktase aus *Schizosaccharomyces pombe* und zu dem hypothetischen Protein Lpg20 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die hohe Identität zu putativen Kalium-Kanal β -Untereinheiten aus *Arabidopsis thaliana* (38,2 %) und *Deinococcus radiodurans* (37,7 %) begründet sich auf den Sequenzaufbau der Untereinheiten, die aus einem C-

terminalen Bereich mit hoher Homologie zu Aldoketoreduktase besteht (McCormack & McCormack, 1994).

Tab. 7: Vergleich der abgeleiteten YajO Proteinsequenz zu Proteinen aus der Aldoketoreduktase Superfamilie; ermittelt aus Proteindatenbanken unter Verwendung des Programms BlastP (Altschul *et al.*, 1997); Acc. No.: Accession-Nummer

Organismus	Protein	Acc. No.	Identität [%]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	putative Aldoketoreduktase	CAB61562	60,1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	putative Oxidoreduktase	CAB69636	43,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	hypothetische Protein Lpg20p	NP_015237	41,3
<i>Bacillus subtilis</i>	putative Oxidoreduktase	P46905	38,4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative K ⁺ -Kanal β -Untereinheit	AAB80621	38,2
<i>Deinococcus radiodurans</i>	putative K ⁺ -Kanal β -Untereinheit	AAF11861	37,7
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	putative dTDP-4-keto-L-6-deoxy-hexose 2,3-Reduktase	AAB84068	35,5
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aryl-Alkohol Dehydrogenase	Q01752	29,0
<i>Pichia stipitis</i>	Xylose-Reduktase	P31867	25,0

Sequenzähnlichkeiten (35,5 %) fanden sich auch zwischen dem YajO Genprodukt und einer möglichen dTDP-4-keto-L-6-deoxy-hexose 2,3-Reduktase aus *Saccharopolyspora erythraea*. Die dTDP-4-keto-L-6-deoxy-hexose 2,3-Reduktase ist ein Enzym der Erythromycin-Biosynthese und katalysiert vermutlich einen Reduktionsschritt in der Biosynthese von Mycarose, einen Grundbaustein des Erythromycins (Summers *et al.*, 1997).

Die Identität des YajO Genprodukts zu bereits bekannten und untersuchten Proteinen liegt bei 29 % für die Aryl-Alkohol Dehydrogenase aus dem Pilz *Phanerochaete chrysosporium* (Reiser *et al.*, 1994) und bei 25 % für die Xylose-Reduktase aus *Pichia stipitis* (Amore *et al.*, 1991). Die Aryl-Alkohol Dehydrogenase ist am Abbau von Lignin beteiligt, indem sie aromatische Benzaldehyde zu ihren entsprechenden Alkoholen reduziert (Reiser *et al.*, 1994). Die Xylose-Reduktase katalysiert die Reduktion von Xylose zu Xylit (Amore *et al.*, 1991).

2.3. Klonierung des *yajO* Gens

Biochemische Untersuchungen mit dem gereinigten Enzym sollten Aufschluß über die katalytische Aktivität des YajO Proteins bringen. Dazu wurde das *yajO* Gen aus *E. coli* über PCR amplifiziert, das Amplifikat in einen Expressionsvektor kloniert und das Gen in einem homologen System überexprimiert. Das über das Expressionssystem synthetisierte Protein wurde anschließend gereinigt.

Für den offenen Leserahmen stromabwärts vom *dxs* Gen zeigten sich zwei mögliche Startpunkte (Abb. 12). Der erste Startpunkt beginnt mit einem GTG-Codon und zeigt 13 Bp stromaufwärts vom Start eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (AGGAG). Dieser offene Leserahmen umfaßt 1047 Bp und kodiert für ein 39,058 kDa großes Protein. Der zweite mögliche Startpunkt liegt 72 Bp stromabwärts und beginnt mit einem ATG-Codon. Sieben Basenpaare vor dem Startpunkt ist die Sequenz AGGAG zu erkennen, die einen möglichen Translationsstart darstellt. Der zweite Leserahmen umfaßt insgesamt 975 Bp und kodiert für ein 36,42 kDa großes Protein. Um den Startpunkt zu ermitteln, wurden beide Genbereiche mittels PCR amplifiziert. Über ungepaarte Basen in den Primern konnten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Hind*III und *Bam*HI eingefügt werden. Über diese Schnittstellen wurden die amplifizierten Genbereiche in die Vektoren pUC19/pUCBM20 kloniert. Die Konstrukte wurden als pUCaldSG/pBMaldSG (1047 Bp ORF) bzw. pUC19aldredBH (975 Bp ORF) bezeichnet. In Expressionsversuchen bei verschiedenen Wachstumstemperaturen ($T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), in verschiedenen Wirtszellen (*E. coli* JM109 bzw. DH5 α) und mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen zeigte sich nur mit dem Vektor pUC19aldredBH eine deutliche Überproduktion des YajO Genprodukts. Dies ließ den Schluß zu, daß die Translation beim zweiten Startpunkt d.h. beim ATG-Codon beginnt.

2.4. Anreicherung und Charakterisierung des YajO Genprodukts

Um zu untersuchen, welche enzymatische Aktivität das YajO Genprodukt im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg besitzt, wurde das Protein gereinigt und in verschiedenen Reaktionsansätzen seine katalytische Aktivität getestet.

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte nach homologer Überexpression des *yajO* Gens in *E. coli* über Ammoniumsulfatfällung, Ultrafiltration und zweimaliger Anionenaustausch-Chromatografie. Das Protein konnte über diese Reinigungsprozedur bis zu einer Homogenität von ca. 80 % angereichert werden (Abb. 11). Aus 435 mg Gesamtprotein konnten 46 mg Protein gewonnen werden. Die im SDS-Gel bestimmte molekulare Masse

von 37 kDa stimmte gut mit dem aus der Aminosäuresequenz kalkulierten Wert von 36,42 kDa überein.

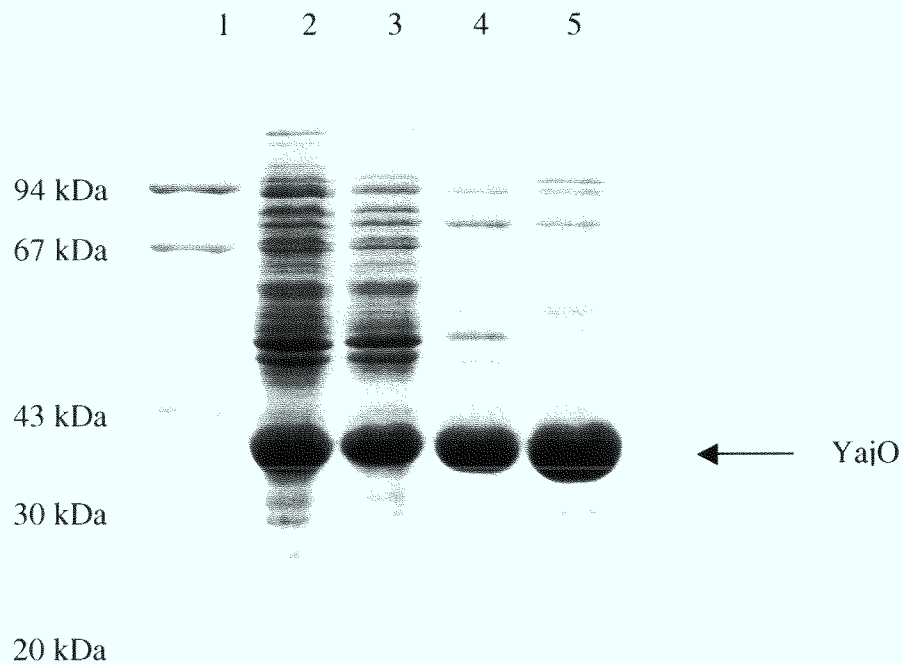


Abb. 11: SDS-Polyacrylamidgel mit den einzelnen Reinigungsschritten der YajO Anreicherung aus *E. coli* (Coomassie gefärbt); Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: zellfreier Extrakt von *E. coli* JM109 [pUC19aldredBH] nach Induktion mit 0,4 mM IPTG; Spur 3: nach Ammoniumsulfatfällung, Spur 4: nach Q-Sepharose HP Säule; Spur 5: nach DEAE-650S-Tentakel-Säule

Zur Kontrolle, daß das richtige Protein angereichert wurde, wurde die N-terminal Sequenz des angereicherte Proteins bestimmt. Die ermittelte Aminosäuresequenz MQYNPLGKTD stimmte mit der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Proteinsequenz überein (Abb. 12). Zugleich wurde damit noch einmal bestätigt, daß die Translation des Proteins beim ATG-Startcodon beginnt.

```

                                S/D
...TCAGTTGCAGGAAGGCGGCAAACGAGTGAAGCCCCAGGAGCTTACATAAGTAA
1. Start
GTGACTGGGGTGAACGAATGCAGCCGCGACACATGCAACTTGAAGTATGACGAGTATAGCAGGAGTGGCAGC 72
M T G V N E C S R S T C N L K Y D E Y S R S G S 24
2. Start
ATGCAATACAACCCCTTAGGAAAAACCGACCTTCGCGTTTCCCGACTTTGCCTCGGCTGTATGACCTTTGGC 144
M Q Y N P L G K T D L R V S R L C L G C M T F G 48

GAGCCAGATCGCGGTAATCACGCATGGACACTGCCGAAGAAAGCAGCCGTCCCATAATTAAACGTGCACTG 216
E P D R G N H A W T L P E E S S R P I I K R A L 72

GAAGGCGGCATAAATTTCTTTGATACCGCCAACAGTTATTCTGACGGCAGCAGCGAAGAGATCGTCGGTCCG 288
E G G I N F F D T A N S Y S D G S S E E I V G R 96

GCACTGCGGGATTTCGCGCGTCGTGAAGACGTGGTCGTTGCGACCAAAGTGTTCATCGCGTTGGTGATTTA 360
A L R D F A R R E D V V V A T K V F H R V G D L 120

CCGGAAGGATTATCCCGTGCAGCAAATTTGCGCTCTATCGACGACAGCCTGCGACGTCTCGGCATGGATTAT 432
P E G L S R A Q I L R S I D D S L R R L G M D Y 144

GTCGATATCCTGCAAATTCATCGCTGGGATTACAACACGCCGATCGAAGAGACGCTGGAAGCCCTCAACGAC 504
V D I L Q I H R W D Y N T P I E E T L E A L N D 168

GTGGTAAAAGCCGGGAAAGCGCGTTATATCGGCGCGTCATCAATGCACGCTTCGCAGTTTGCTCAGGCACTG 576
V V K A G K A R Y I G A S S M H A S Q F A Q A L 192

GAACTCCAAAAACAGCACGGCTGGGCGCAGTTTGTGAGTATGCAGGATCACTACAATCTGATTTATCGTGAA 648
E L Q K Q H G W A Q F V S M Q D H Y N L I Y R E 216

GAAGAGCGCGAGATGCTACCACTGTGTTATCAGGAGGGCGTGGCGGTAATTCCATGGAGCCCGCTGGCAAGG 720
E E R E M L P L C Y Q E G V A V I P W S P L A R 240

GGCCGTCTGACGCGTCCGTGGGAGAAACTACCGCACGACTGGTGTCTGATGAGGTGGGGAAAAATCTCTAT 792
G R L T R P W G E T T A R L V S D E V G K N L Y 264

AAAGAAAGCGATGAAAATGACGCGCAGATCGCAGAGCGGTTAACAGGCGTCAGTGAAGAAGTGGGGGCGACA 864
K E S D E N D A Q I A E R L T G V S E E L G A T 288

CGAGCACAAAGTTGCGCTGGCCTGGTTGTTGAGTAAACCGGGCATTGCCGCACCGATTATCGGAAGTTCGCGC 936
R A Q V A L A W L L S K P G I A A P I I G T S R 302

GAAGAACAGCTTGATGAGCTATTGAACGCGGTGGATATCACTTTGAAGCCGGAACAGATTGCCGAAGTGGAA 1008
E E Q L D E L L N A V D I T L K P E Q I A E L E 326

                                Stop
ACGCCGTATAAACCGCATCCTGTCGTAGGATTTAAATAAGAGTCCAGGCCTGATGA... 1047
T P Y K P H P V V G F K - 338

```

Abb. 12: DNA-Sequenz des *yajO* Genbereichs und abgeleitete Aminosäuresequenz des YajO Genprodukts; die möglichen Startcodons und das Stopcodon sind fett hervorgehoben; die möglichen Ribosomenbindestellen (S/D) sind eingerahmt

Zum Nachweis einer Enzymaktivität des YajO Genprodukts wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst wurde untersucht, ob das Protein die Umsetzung von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat katalysiert. Neben 1-Deoxyxylulose 5-phosphat und dem Kofaktor NAD(P)H enthielten die Testansätze weitere Komponenten, die für die Aktivität verschiedener Enzyme der Aldoketoreduktase-Familie wichtig waren (K_2SO_4 , PLP [Bohren *et al.*, 1991]; KCl, EDTA [Zepeda *et al.*, 1990]). Es konnte allerdings keine substratabhängige Oxidation von NAD(P)H beobachtet werden. Auch die Bestimmung der Aktivität über den

Verbrauch von [2-¹⁴C]-1-Deoxyxylulose 5-phosphat mittels HPLC brachte keinen Nachweis einer 1-Deoxyxylulose 5-phosphat verwertenden Aktivität. Da das YajO Genprodukt nachweislich 1-Deoxyxylulose 5-phosphat nicht als Substrat nutzte, wurde angenommen, daß es die Umsetzung eines späteren Intermediats im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg katalysiert. Weil andere Intermediate noch nicht bekannt oder nicht zur Verfügung standen, wurde mit zellfreiem Extrakt von *E. coli* JM109 [pUC19aldredBH] gearbeitet. Dahinter stand die Überlegung, daß die fehlenden Schritte von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zu dem Substrat des YajO Proteins durch die entsprechenden Enzyme im zellfreien Extrakt katalysiert werden und die Umsetzung von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat durch das Überangebot an YajO begünstigt wird. Zusätzlich wurde Rohextrakt eingesetzt, da wichtige Enzyme möglicherweise membrangebunden sind. Aber auch unter diesen Bedingungen konnte kein Verbrauch an [2-¹⁴C]-1-Deoxyxylulose 5-phosphat gemessen werden. Somit konnte dem YajO Protein keine enzymatische Funktion zugeordnet werden.

2.5. Disruption des *yajO* Gens in *E. coli* durch Insertionsmutagenese

Da für das angereicherte YajO Genprodukt keine spezifische enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte, sollte die Bedeutung des *yajO* Gens in *E. coli* durch die Disruption des Gens untersucht werden. Wenn das Gen am Biosyntheseweg zum Isopentenylidiphosphat beteiligt ist, dann wäre die Disruption des Gens für die Zelle letal, da Isopentenylidiphosphat in *E. coli* ein essentieller Grundbaustein für Verbindungen wie Ubichinon, Menachinon und Dolichol ist. So sind *E. coli* Mutanten, in denen das *dxs* Gen deletiert wurde, nur durch Supplementation mit 1-Deoxyxylulose lebensfähig (Charon *et al.*, 2000).

Für die Disruption wurde der Insertionsvektor pGP704 genutzt, der nur in λ pir lysogenen Zellen (*E. coli* SY327 λ pir) repliziert werden kann, da diese das für die Funktion des Replikationsursprungs wichtige Protein π besitzen (Miller & Merkalonas, 1984, 1988). In nicht lysogenen Zellen integriert dieser Vektor durch einfache homologe Rekombination in das Wirtschromosom, wodurch gezielt Gene disruptiert werden können (Abb. 13). Mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Sph*I wurde ein 762 Bp großes Fragment des *yajO* Gens aus dem Vektor pUCaldbl geschnitten und in den mit den Enzymen *Sma*I und *Sph*I linearisierten Vektor pGP704 ligiert. Aus diesem Konstrukt pGPald762 wurde dann ein 28 Bp großes *Xba*I/*Bsu*36I DNA-Fragment deletiert. Das so erhaltene Plasmid pGPald734 enthielt ein 746 Bp großes Fragment des *yajO* Gens, dem 14 Bp am 5'- und 214 Bp am 3'-Ende fehlten.

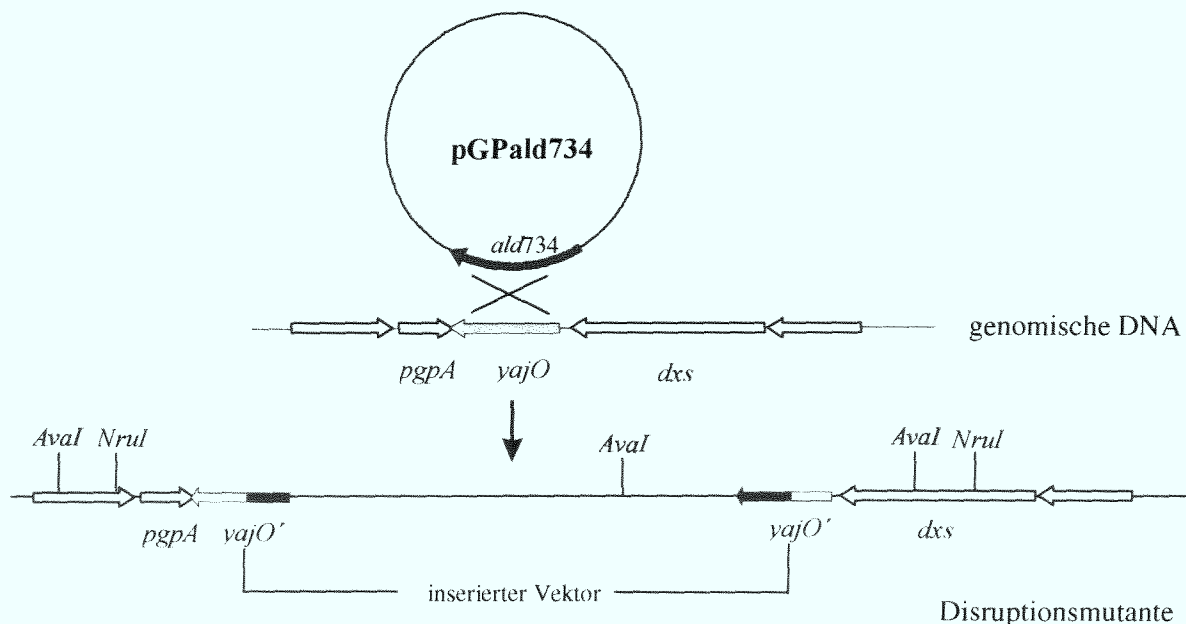


Abb. 13: Schematische Darstellung der Disruption des *yajO* Gens in *E. coli* über Inerstionsmutagenese mit dem Vektor pGPald734; genomische DNA: *pgpA*: Phosphatase, *dxs*: 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase

Der *E. coli* Stamm MC4100 wurde durch Elektroporation mit dem Konstrukt pGPald734 transformiert und Mutanten auf Ampicillin-Platten selektioniert. Für den Fall, daß die Mutation letal ist, wurden in einem parallelen Ansatz Mutanten mit dem Vektor pUCaldredBHkan komplementiert. Der Vektor pUCaldredBHkan trug das intakte *yajO* Gen, dessen Expression durch IPTG-Zugabe induziert werden konnte. Mit beiden Ansätzen wurden Mutanten gewonnen. Der Nachweis der gezielten Disruption des *yajO* Gens erfolgte über Southern-Blot-Hybridisierung. Dazu wurde chromosomale DNA von *E. coli* MC4100 und *E. coli* MC4100 pGPald743:aldred isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *AvaI* und *NruI* geschnitten. Nach Auftrennung der geschnittenen DNA im Agarosegel wurde das Bandenmuster auf Nylonmembran transferiert und bei 60 °C hybridisiert. Als Gensonde wurde ein Digoxigenin markiertes 395 Bp *HincII/EcoRV yajO* Fragment eingesetzt. Das Ergebnis der Hybridisierung wurde auf Röntgenfilm dokumentiert.

Beim Wildtyp *E. coli* MC4100 zeigten sich in den Restriktionsansätzen Hybridisierungssignale bei 2,5 kBp (*AvaI*) und 2,4 kBp (*NruI*) (Abb. 14). Die Größe der Fragmente stimmte gut mit den Größen überein, die nach den bekannten Restriktionskarten des *E. coli* Genoms erwartet wurden. Bei den Mutanten *E. coli* MC4100 pGPald743:aldred.1/2 traten im *NruI*-Restriktionansatz Banden (7 kBp) auf, die genau um die Größe des inserierten Vektors (4,5 kBp) verschoben waren. Im Ansatz mit *AvaI* geschnittener DNA hybridisierte die homologe Sonde mit zwei DNA-Fragmenten (2,5 kBp

und 4,5 kBp), da das Restriktionsenzym *Ava*I einmal in der Vektorsequenz schneidet. Diese Ergebnisse bestätigten die gezielte Disruption des *yajO* Gens.

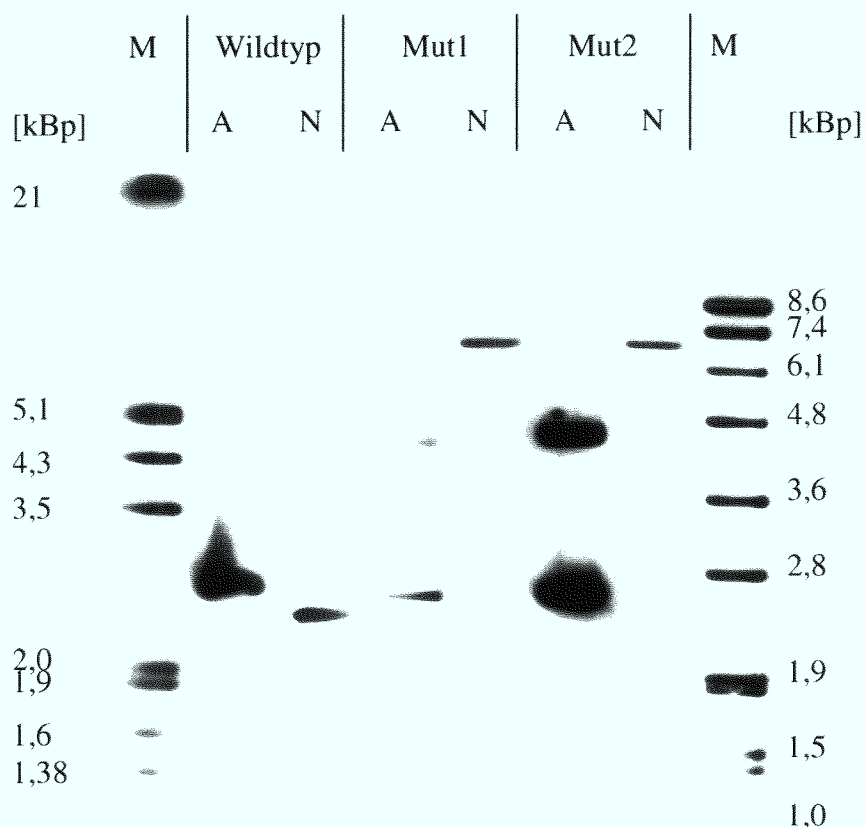


Abb. 14: Southern-Blot-Analyse chromosomaler DNA aus *E. coli* MC4100 (Wildtyp) und den Mutanten *E. coli* MC4100 pGPald743.1:aldred (Mut1) und pGPald743.2:aldred (Mut2) mit einer spezifischen Sonde gegen das Gen *yajO* zur Überprüfung der Disruption des *yajO* Gens; chromosomale DNA wurde mit *Ava*I (A) und *Nru*I (N) geschnitten; Dig-Marker III und VII (M)

Die Tatsache, daß keine Komplementation des Gens für die Mutagenese notwendig war, zeigte, daß die Inaktivierung des *yajO* Gens nicht letal für *E. coli* ist. Um den Einfluß der Disruption von *yajO* auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* zu untersuchen, wurden die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose angezogen und das Wachstum bei 660nm verfolgt (Abb. 15). Die Wachstumsrate von *E. coli* MC4100 lag bei $0,92 \text{ h}^{-1}$. Die Mutanten wuchsen mit annähernd den gleichen Geschwindigkeiten ($0,77\text{-}0,80 \text{ h}^{-1}$). Die *yajO* Mutante von *E. coli* zeigte somit unter den gewählten Wachstumsbedingungen keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp.

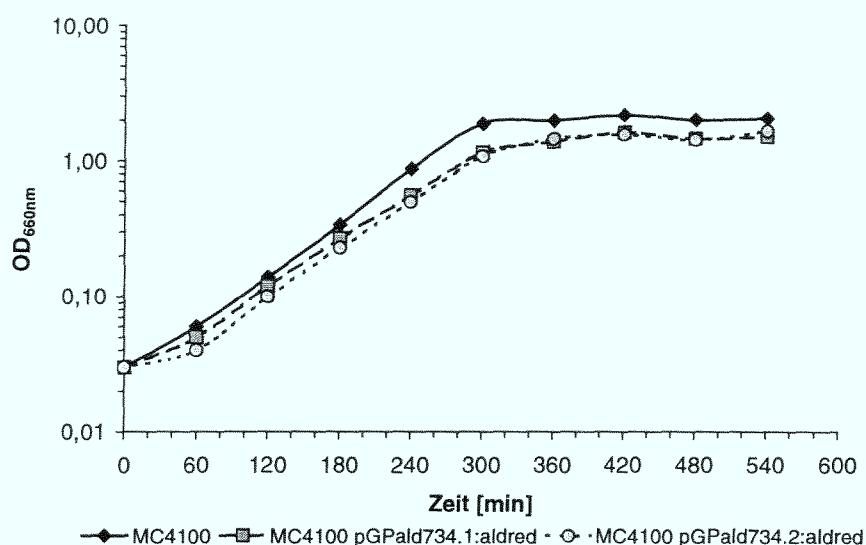


Abb. 15: Wachstum der *yajO* Mutanten *E. coli* MC4100 pGPald743.1:aldred und *E. coli* MC4100 pGPald743.2:aldred im Vergleich zu *E. coli* MC4100 in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose

Sowohl die biochemischen als auch die genetischen Untersuchungen ließen demnach nicht erkennen, daß dem *yajO* Gen und seinem Genprodukt eine Funktion im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg zukommt.

3. Klonierung des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* und biochemische Charakterisierung des Enzyms

Das Enzym, welches in *E. coli* 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zu 2-C-Methylerythritol 4-phosphat umsetzt, wurde kürzlich von Takahashi *et al.* (1998) identifiziert. Nachfolgend wurden noch weitere 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerasen aus *Synechocystis* sp. (Proteau *et al.*, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Schwender *et al.*, 1999) und *Mentha x piperita* (Lange & Croteau, 1999 a) beschrieben. Mit Ausnahme der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* wurde keines der Enzyme näher biochemisch charakterisiert. Um die Eigenschaften der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase genauer zu untersuchen, wurde das Enzym aus *Z. mobilis* gereinigt. *Z. mobilis* ist ein anaerobes, Gram-negatives, Ethanol produzierendes Bakterium, das zum Schutz vor hohen Alkoholkonzentrationen Hopanoide in der Cytoplasmamembran besitzt. Bis zu 30 mg Hopanoide/mg Zell-Trockengewicht sind in *Z. mobilis* enthalten (Sahm *et al.*, 1993). Möglicherweise besitzen die Enzyme des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Wegs in *Z. mobilis* aufgrund dieser großen Menge an Isoprenoiden größere Aktivitäten als die Enzyme in *E. coli*. Ein weiterer Aspekt für die Arbeiten mit *Z. mobilis* war die Klonierung

des *dxr* Gens und die Untersuchung der benachbarten Gene. Da Gene in Bakterien oft in Operons organisiert sind, war es denkbar, daß neben dem *dxr* Gen noch weitere Gene des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Wegs liegen.

3.1. Klonierung des Gens der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase

Von R. Overbeek (Argonne National Laboratory, USA) wurde die Sequenz des *dxr* Gens aus *Z. mobilis* zur Verfügung gestellt. Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Synechocystis* sp. mit *Z. mobilis* ließ allerdings erkennen, daß am N- und C-Terminus der Proteinsequenz von *Z. mobilis* noch Sequenzbereiche fehlten. Am N-Terminus waren nicht die für die postulierte NADPH-Bindestelle konservierten Aminosäurereste vorhanden (Takahashi *et al.*, 1998; Lange & Croteau, 1999; Proteau *et al.*, 1999; Schwender *et al.*, 1999) und der C-Terminus war um ca. 90 Aminosäuren kürzer als die Vergleichssequenzen (Abb. 18).

Das vollständige *dxr* Gen wurde über Southern-Blot-Hybridisierung aus *Z. mobilis* isoliert. Dazu wurden Primer von der bekannten DNA-Sequenz abgeleitet, die in der PCR mit chromosomaler DNA von *Z. mobilis* CP4 ein 409 Bp Fragment amplifizierten. Das Fragment wurde Digoxigenin markiert und als Sonde in Southern-Blot-Hybridisierungen eingesetzt. Zunächst erfolgte die Auswahl geeigneter Restriktionsfragmente, die den Bereich um das *dxr* Gen umfassen. Hierzu wurde chromosomale DNA aus *Z. mobilis* CP4 mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, in einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert. Die auf der Membran immobilisierte DNA wurde mit der spezifischen *dxr* Gensonde bei 60 °C unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Das Hybridisierungsergebnis wurde auf einem Röntgenfilm dokumentiert (Abb. 16). Wie in Abb. 16 zu erkennen ist, hybridisierte die homologe *dxr* Sonde mit einem 1,45 kBp großen *Bam*HI, einem 1,48 kBp großen *Eco*RV, einem 8,6 kBp großen *Hind*III und einem 19 kBp großen *Eco*RI-Fragment.

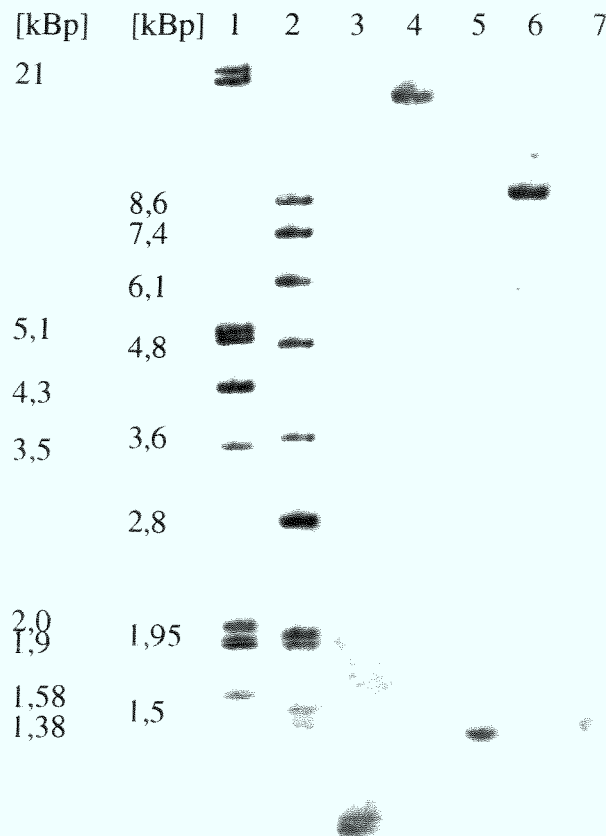


Abb. 16: Southern-Blot-Hybridisierung mit restriktionsgespaltener chromosomaler DNA aus *Z. mobilis* mit der spezifischen *dxr* Gensonde, genutzte Restriktionsenzyme *EcoRI* (Spur 4), *BamHI* (Spur 5), *HindIII* (Spur 6), *EcoRV* (Spur 7); Spur 1. Dig-Marker III, Spur 2. Dig-Marker VII, Spur 3: Sonde

Um einen DNA-Bereich zu klonieren, der neben dem *dxr* Gen auch flankierende Bereiche umfaßt, sollte das ca. 8,6 kBp *HindIII* Fragment kloniert werden. Zu diesem Zweck wurde eine größenselektionierte *HindIII*-Plasmid Genbank erstellt. Chromosomale DNA von *Z. mobilis* wurde mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* vollständig gespalten. Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente im Agarosegel wurden in einem Bereich von 6-10 kBp drei Fraktionen mit DNA-Fragmenten isoliert. Durch erneute Southern-Hybridisierung wurde spezifiziert, in welcher Fraktion sich das gewünscht DNA-Fragment befand. Diese DNA-Fragmente wurden dann in die Ligation mit *HindIII* linearisiertem pUC19-Vektor eingesetzt. *E. coli* wurde anschließend mit dem Ligationsansatz transformiert. Die so erhaltene Genbank wurde nach Plasmidisolierung und anschließender Southern-Blot-Hybridisierung mit der spezifischen Sonde nach dem *dxr* Gen durchsucht. Hierzu wurden je acht Klone aus der Genbank vereint, die Plasmide isoliert, mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Über Hybridisierung mit der homologen *dxr* Sonde konnten sieben von vierundzwanzig Plasmidgemischen mit positiven Signal detektiert werden. Die

Klone aus drei dieser Fraktionen wurden anschließend einzeln angezogen, das Plasmid isoliert und über Southern-Blot-Hybridisierung nach dem *dxr* Gen untersucht. Vier von vierundzwanzig Klonen besaßen das 8,6 kBp *Hind*III-DNA-Fragment mit dem *dxr* Gen.

3.2. Sequenzanalyse der *dxr* Genregion

Da Gene, die funktionell zusammengehören, oft in Operons organisiert sind, wurde, mit dem Ziel weitere relevante Gene des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Wegs zu finden, das komplette 8,6 kBp *Hind*III-Fragment über „primer walking“ nach der Methode von Sanger (1977) sequenziert. Die Einzelstrangsequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

Über computerunterstützte Analyse (Clone Manager 5.02, Scientific & Education Software) konnten insgesamt acht offene Leserahmen in dem sequenzierten DNA-Bereich identifiziert werden (Abb. 17, Tab. 8). Ihre mögliche Funktion wurde über Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken (BlastP 2.0.9, Altschul *et al.*, 1997) ermittelt. So konnte die für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase kodierende DNA-Sequenz im mittleren Bereich des *Hind*III-DNA-Fragments identifiziert werden. Die vollständige DNA-Sequenz des *dxr* Gens befindet sich im Anhang dieser Arbeit. In der EMBL-Datenbank wird die Sequenz unter der Accession-Nummer CAB60758 geführt. Das *dxr* Gen umfaßt einen Bereich von 1167 Bp. Der G+C Gehalt des *dxr* Gens beträgt 48,4 % und liegt damit im Bereich des für das *Z. mobilis* Chromosom ermittelten Werts von 48,5 % (Swings & de Ley, 1977). 10 Bp vor dem ATG-Startcodon an Position 3833 liegt eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (GGAG). Ein möglicher Terminationspunkt konnte stromabwärts des *dxr* Gens nicht ausgemacht werden. Das Startcodon des *dxr* Gens überschneidet sich mit dem Stopcodon des stromaufwärtsliegenden offenen Leserahmens (630 Bp), dessen GTG Startcodon sich wiederum mit dem Stopcodon des nachfolgenden Gens (669 Bp) überlagert (Tab. 8). Aufgrund dieser überlappenden Sequenz ist es denkbar, daß das *dxr* Gen zusammen mit den zwei davor liegenden Genen transkribiert wird. Nach Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen handelt es sich bei den offenen Leserahmen um die Gene einer möglichen Undecaprenyldiphosphat-Synthetase und einer Phosphatidat-Cytidyltransferase. Die Phosphatidat-Cytidyltransferase ist ein Enzym aus der Biosynthese von Membranlipiden. Die Undecaprenyldiphosphat-Synthetase ist an der Isoprenoidbiosynthese beteiligt. Das Enzym katalysiert die Kondensation von Farnesyldiphosphat mit Isopentenylidiphosphat Einheiten zu Undecaprenyldiphosphat. Undecaprenyldiphosphat bildet die Dolichole, Lipidcarrier, die am Transport von Polysacchariden für die äußere Zellwand beteiligt sind. Homologe Sequenzen finden sich in vielen Prokaryonten (z.B. *Haemophilus. influenzae*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*), wobei die Undecaprenyldiphosphat-Synthetase aus *E. coli* gut charakterisiert ist

(Fujisaki *et al.*, 1986 b; Apfel *et al.*, 1999). In *E. coli* liegt das Gen für die UPP-Synthetase stromabwärts des *dxr* Gens (Apfel *et al.*, 1999).

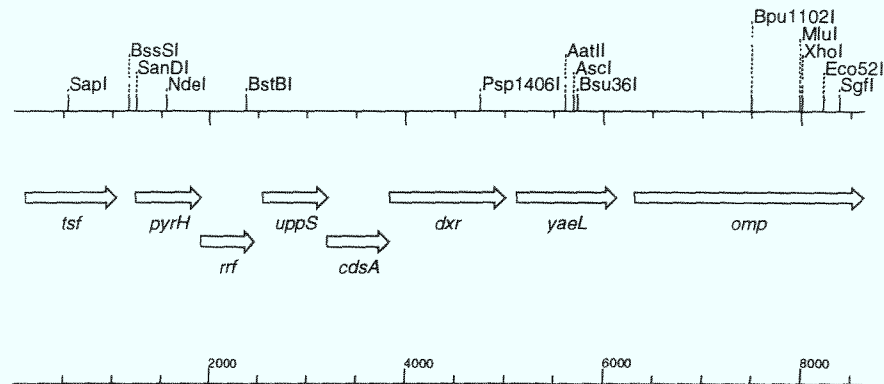


Abb. 17: Genetische Karte des sequenzierten 8612 Bp *Hind*III-DNA-Fragments aus *Z. mobilis*; Pfeile kennzeichnen die Position und Länge putativer Gene für einen Elongationsfaktor (*tsf*), für eine Uridin-Monophosphatkinase (*pyrH*), für einen Ribosomenrecycling-Faktor (*rrf*), für eine Undecaprenyldiphosphat-Synthetase (*uppS*), für eine Phosphatidat-Cytidyltransferase (*cdsA*), für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (*dxr*), für eine Protease (*yaeL*) und für ein „outer membrane protein“ (*omp*).

Stromaufwärts des *uppS* Gens liegen drei weitere offene Leserahmen mit Homologien zu Genen für einen Elongationsfaktor TS, für eine Uridin-Monophosphatkinase und für einen Ribosomen Recycling Faktor aus verschiedenen Prokaryonten. Der Elongationsfaktor TS und der Ribosomen Recycling Faktor sind an der Translation beteiligt, die UMP-Kinase phosphoryliert UMP zu UDP unter Verbrauch von ATP. 118 Bp stromabwärts vom *dxr* Gen ist ein offener Leserahmen (1008 Bp) lokalisiert, dessen abgeleitete Proteinsequenz über einen Bereich von 211 Aminosäuren eine Identität von 32 % zum YaeL Genprodukt aus *E. coli* aufweist (Blattner *et al.*, 1997). Die Funktion des Proteins aus *E. coli* ist bislang unbekannt. Allerdings zeigt die YaeL Proteinsequenz Ähnlichkeit zu einer Metalloprotease aus *Chlamydia pneumoniae* (Identität 37 % [62/166 Aminosäuren]) (Kalman *et al.*, 1998) und *C. trachomatis* (Identität 34 % [57/166 Aminosäuren]) (Stephens *et al.*, 1998) und einer putativen Zinkprotease aus *Treponema pallidum* (Identität 29 % [62/207 Aminosäuren]) (Fraser *et al.*, 1998) und *Borrelia burgdorferi* (Identität 26 % [56/211 Aminosäuren]) (Fraser *et al.*, 1997). Möglicherweise kommt dem YaeL Protein aus *Z. mobilis* die Funktion einer Protease zu. Weiter stromabwärts folgt ein Genbereich, der für ein putatives „outer membrane protein“ kodiert. Der Sequenzbereich ist allerdings nicht vollständig auf dem isolierten *Hind*III-Fragment enthalten.

Tab. 8: Identifizierte offene Leserahmen in der *dxr* Geregion von *Z. mobilis*, die Positionen auf dem 8,6 kBp *Hind*III-Fragment und ihre mögliche Funktionen

Gen	Start	Ende	putatives Enzym
<i>tsf</i>	121	1044	Elongationsfaktor Ts (307 aa)
<i>pyrH</i>	1238	1906	Uridylat-Monophosphatkinase (222 aa)
<i>rrf</i>	1906	2463	Ribosomenrecycling-Faktor (185 aa)
<i>uppS</i>	2539	3207	Undecaprenyldiphosphat-Synthetase (222 aa)
<i>cdsA</i>	3204	3833	Phosphatidat-Cytidylyltransferase (209 aa)
<i>dxr</i>	3833	4999	1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (388 aa)
<i>yaeL</i>	5118	6125	Protease (335 aa)
<i>omp</i>	6311	-	omp Protein

3.3. Sequenzanalyse der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase

Das *dxr* Gen von *Z. mobilis* kodiert für ein 388 Aminosäuren langes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 41.841,7 und einem isoelektrischen Punkt bei 5,63. Der Vergleich der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Aminosäuresequenz von *Z. mobilis* mit Sequenzen von *E. coli*, *Synechocystis sp.* und *B. subtilis* zeigte, daß auch in *Z. mobilis* die N-terminalen Aminosäurenreste für die mögliche NADPH-Bindestelle konserviert sind (Abb. 18). Das Sequenzmotiv G-x-x-G-x-x-G weicht etwas vom bekannten Motiv G-x-G-x-x-G ab (Rossmann *et al.*, 1975).

	#####	
ECOL	---MKQLTILGSTGSIGCSTLDVVRHNPEHFRVVALVAG-KNVTRMVEQCLEFSPRYAVM	56
ZYMO	MSQPRTVTVLGATGSIGHSTLDLIERNLDYQVIALTAN-RNVKDLADAAKRTNAKRAVI	59
SYNY	--MVKRISILGSTGSIGTQTLDIVTHHPDAFQVVGLAAG-GNVALLAQQVAEFRPEIVAI	57
BASCU	---MKNICLLGATGSIGEQTLDVLRHQDQFQLVSMISFG-RNIDKAVPMIEVFQPKFVSV	56
	* * * * *	
ECOL	DDEASAKLLKTMLOQ-QGSRTEVLSGQQAACDMALEDVDQVMAAIVGAAGLLPTLAAIR	115
ZYMO	ADPSLYNDLKEALAG-SSVEAAAG---ADALVEAAMMGADWTMAAIGCAGLKATLAAIR	115
SYNY	RQAEKLEDLKAAVAELTDYQPMYVVGEEGVVEVARYGDAESVVTGIVGCAGLLPTMAAIA	117
BASCU	GDLDITYHKLKQMS---FSFECQIGLGEGLIEAAVMEEVDIVVNALLGSVGLIPTLKAIE	113
	* * * * *	
ECOL	AGKTILLANKESLVTCGRLFMDAVKQSKAQLLPVDSEHNAIFQSLPQPIQHNLYADLEQ	175
ZYMO	KGKTVALANKESLVSAAGLMIDAVREHGTLLPVDSEHNAIFQCFP---H-----HNR	165
SYNY	AGKDIALANKETLIAGAPVVLPLVEKMGVKLLPADSEHSAIFQCLQ-----GVPE	167
BASCU	QKKTIALANKETLVTAGHIVKEHAKKYDVPLLPVDSEHSAIFQALQ-----GEQA	163
	* * * * *	
ECOL	NGVVSILLTGSGGPFRETPLRDLATMTDPQACRHPNWSMGRKISVDSATMMNKGLEVIEA	235
ZYMO	DYVRRIIITASGGPFRTTSLAEMATVTPERAVQHNPWSMGAKISIDSATMMNKGLELIEA	225
SYNY	GGLRRIILTASGGAFRDLPVERLPFVTVDALKHPNWSMGQKITIDSATLMNKGLEVIEA	227
BASCU	KNIERLIITASGGSFRDKTREELESVTVEDALKHPNWSMGAKITIDSATMMNKGLEVIEA	223
	* * * * *	
ECOL	RWLFNASASQMEVLIHPQSVIHSMVRYQDGSVLAQLGEPDMRTPIAHTMAWPNRVNS-GV	294
ZYMO	FHLFQIPLKFEILVHPQSVIHSMVRYQDGSVLAQLGEPDMRTPIGHTLAWPKRMET-PA	284
SYNY	HYLFGLDYDHIDIVIHPQSIHSLIEVQDTSVLAQLGWPDMRLPLLYALSWPERIYT-DW	286
BASCU	HWLFDIPYEQIDVVLHKEIHSMVFEHDKSVIAQLGTPDMRVPIQYALTYPDRLPLPDA	283
	* * * * *	
ECOL	KPLDFCKLSALTFAAPDYDRYPCLKLAMEAFEQGQAATTALNAANEITVAFLAQQIRFT	354
ZYMO	ESLDFTKLRQMDFEAPDYERFPALTLAMESIKSGGARPAVMNAANEIAVAFLDKKIGFL	344
SYNY	EPLDLVKAGSLSFREPDHDKYPCMLAYGAGRAGGAMPAVLNAANEQAVFLQEKISFL	346
BASCU	KRLELWEIGSLHFEKADFDRFRCLQFAFESGKIGGTMPVTLNAANEVAVAAFLAGKIPFL	343
	* * * * *	
ECOL	DIAALNLS--VLEKMDMREPQCVDVLSVDANAREVARKEVMRLAS--	398
ZYMO	DIAKIVEK--TLDHYTPATPSSLEDVFAIDNEARIQAAALMESLPA--	388
SYNY	DIPRLIEKTCDLVYGQNTASPDLETILAADQWARRTVLENSACVATRP	394
BASCU	AIEDCIEK--ALTRHQLKKPSWRFTFKKWTIPGDTSIQYSHKVVCS-	388
	* * * * *	

Abb. 18: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* (ECOL), *Z. mobilis* (ZYMO), *Synechocystis sp.* (SYNY) und *B. subtilis* (BASCU); die mögliche NADPH-Bindestelle ist mit # und identische Aminosäuren mit * gekennzeichnet; die von R. Overbeek bekannte *dxr* Sequenz von *Z. mobilis* ist kursiv geschrieben

Die höchste Identität weist die Proteinsequenz aus *Z. mobilis* zur 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* und *H. influenzae* (48,2 bzw. 47,4%), die geringste zu *Helicobacter pylori* (28 %) auf (Tab. 9). Insgesamt wurden bislang über Datenbanksuche in 14 Prokaryonten und in drei Eukaryonten (*Mentha x piperita*, *Arabidopsis thaliana* und *Artemisia annua*) identische Sequenzen gefunden. Interessanterweise findet sich ein homologes Protein auch in dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*.

Tab. 9: Identitäten der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerasesequenz aus *Z. mobilis* zu anderen möglichen 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Sequenzen, Acc.-No.: Accession-Nummer

Organismus	Identität [%]	Acc.-No.
<i>Escherichia coli</i>	48,2	P45568
<i>Haemophilus influenzae</i>	47,4	P44055
<i>Synechocystis sp.</i>	42,0	Q55663
<i>Arabidopsis thaliana</i>	41,5	CAB43344
<i>Synechocystis sp.</i>	40,7	CAB65435
<i>Bacillus subtilis</i>	40,5	O31753
<i>Treponema pallidum</i>	38,6	AAC65574
<i>Mentha x piperita</i>	38,4	AAD24768
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37,4	Q10798
<i>Deinococcus radiodurans</i>	36,9	AAF11074
<i>Aquifex aeolicus</i>	35,5	O66722
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	35,4	AAD18489
<i>Chlamydia trachomatis</i>	35,1	AAC97662
<i>Thermotoga maritima</i>	33,8	AAD35970
<i>Plasmodium falciparum</i>	32,7	AAD03739
<i>Helicobacter pylori</i>	28,0	P56139

3.4. Reinigung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase

Die Reinigung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *Z. mobilis* erfolgte in einem Schritt über Affinitätschromatografie. Das Gen wurde dazu in den Vektor pQE30 kloniert. Bei dem pQE30-Expressionssystem wurden dem Protein N-terminal sechs Histidinreste angehängt, die es ermöglichten, das rekombinante Protein über Metallchelate-Affinitätschromatografie zu reinigen (Hochuli *et al.*, 1987, 1990). Das *dxr* Gen von *Z. mobilis* wurde zunächst vom 8,6 kbp *HindIII*-Fragment mit den Primern *dxrz301* und *dxrz302* gezielt amplifiziert und in den Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO subkloniert. Anschließend wurde das Gen aus dem Konstrukt pCR_{dxrz30} über die in der PCR eingebrachten Schnittstellen *SphI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pQE30 ligiert. Über Doppelstrangsequenzierung wurde die fehlerfreie Amplifikation der *dxr* DNA-Sequenz bestätigt.

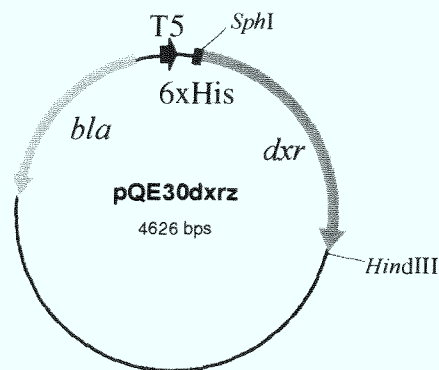


Abb. 19: Schematische Darstellung des Plasmids pQE30dxrz; T5: T5-Promotorbereich, 6xHis: kodierender Bereich für sechs Histidinreste, *dxr*: Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis*, *bla*: Ampicillinresistenz vermittelndes Gen

Das Plasmid pQE30dxrz (Abb. 19) wurde anschließend in *E. coli* M15 [pREP4] transformiert. Dieser Stamm trägt auf dem Plasmid pREP4 das *lacI^q*-Repressorgen, wodurch der T5-Phagenpromotor in diesem Stamm bis zur Induktion reprimiert ist. Zur Expression des *dxr* Gens wurde der *E. coli* Stamm M15 [pREP4, pQE30dxrz] in LB-Medium angezogen und bei einer OD_{600nm} von 0,8 mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach Zellernte und Zellaufschluß wurde das rekombinante Enzym aus dem Rohextrakt unter nativen Bedingungen über 50 % Ni-NTA-Agarose gereinigt. Bei einer Ausbeute von 76 %, konnte eine 12-fache Anreicherung des Proteins erzielt werden (Tab. 10) Die spezifische Enzymaktivität im Rohextrakt betrug 1,1 U/mg. Das gereinigte rekombinante Enzym besaß eine spezifische Aktivität von 13,8 U/mg. Die Homogenität der Probe wurde über SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 20). Wie in Abb. 20 in Spur 3 zu sehen ist, lag ein großer Teil des Proteins in unlöslicher Form vor. Allerdings reichte der Anteil an löslichem Protein aus, um eine zufriedenstellende Ausbeute (76 %) bei der Reinigung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase zu erzielen.

Tab. 10: Anreicherung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *Z. mobilis* aus *E. coli* [pREP4, pQE30dxrz]. Die Enzymaktivität wurde über NADPH-Oxidation bestimmt. Der Rohextrakt wurde für die Aktivitätsmessung entsalzt.

Reinigungsschritt	Aktivität	Protein	Spez. Akt.	Ausbeute	Anreicherung
	[U]	[mg]	[U/mg]	[%]	[-fach]
Rohextrakt	229,9	209	1,1	100	1
Affinitäts- chromatographie	174	13,3	13,1	76	12

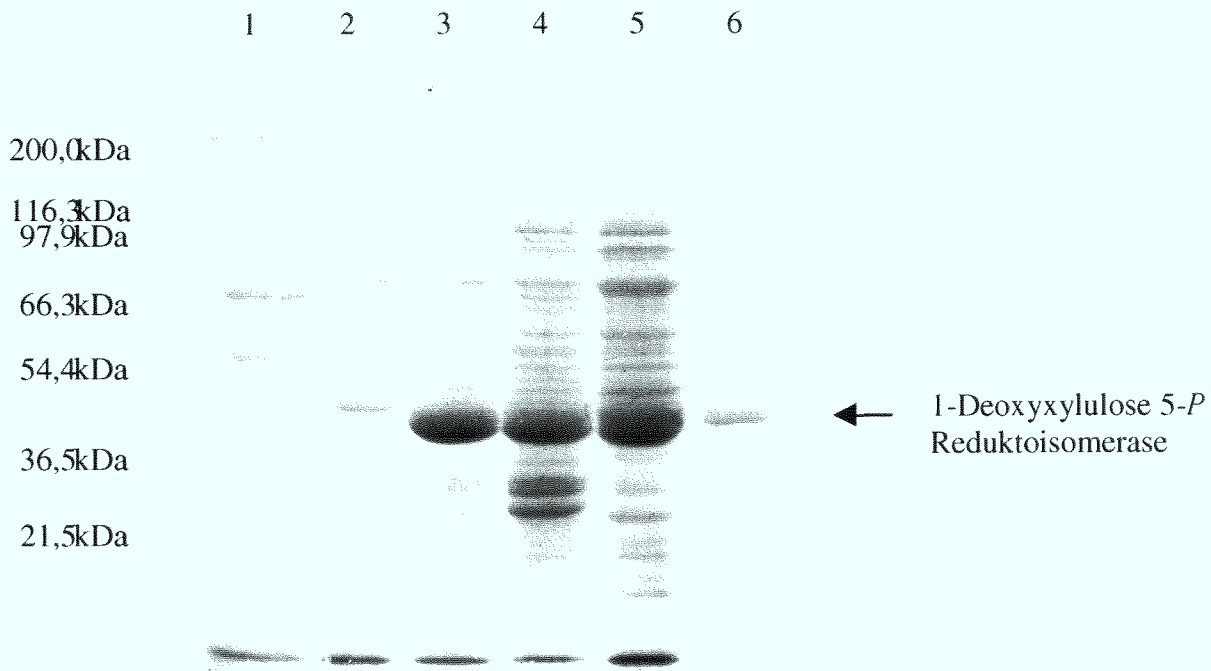


Abb. 20: SDS-Polyacrylamidgel mit der gereinigten rekombinanten 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli*; (Coomassie gefärbt); Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: Rohextrakt *E. coli* M15 [pREP4, pQE30dxrz] vor Induktion; Spur 3: Rohextrakt *E. coli* M15 [pREP4, pQE30dxrz] nach Induktion mit IPTG; Spur 4: Zelltrümmer nach Zellaufschluß; Spur 5: Überstand nach dem Zellaufschluß; Spur 6: über Affinitätschromatografie gereinigtes Protein

3.5. Charakterisierung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase

Da bislang nur wenig über die biochemischen Eigenschaften von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerasen bekannt ist (Takahashi *et al.*, 1998), wurde das Enzym aus *Z. mobilis* biochemisch näher untersucht.

Die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmte molekulare Masse der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *Z. mobilis* betrug 39 kDa und wich somit etwas vom berechneten Wert von 43,282 kDa ab (Abb. 20). Bei der zweimal wiederholten Bestimmung des Molekulargewichts der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase über Gelfiltration eluierte das Protein in zwei Fraktionen, die einem Molekulargewicht von 217.000 bzw. 98.000 – 118.000 entsprachen (Abb. 21). In beiden Fraktionen konnte 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Aktivität nachgewiesen werden. Das bestimmte Molekulargewicht ist im Vergleich zur Untereinheit mit M_r 39.000 um den Faktor 5,6 bzw. 2,5-3 größer.

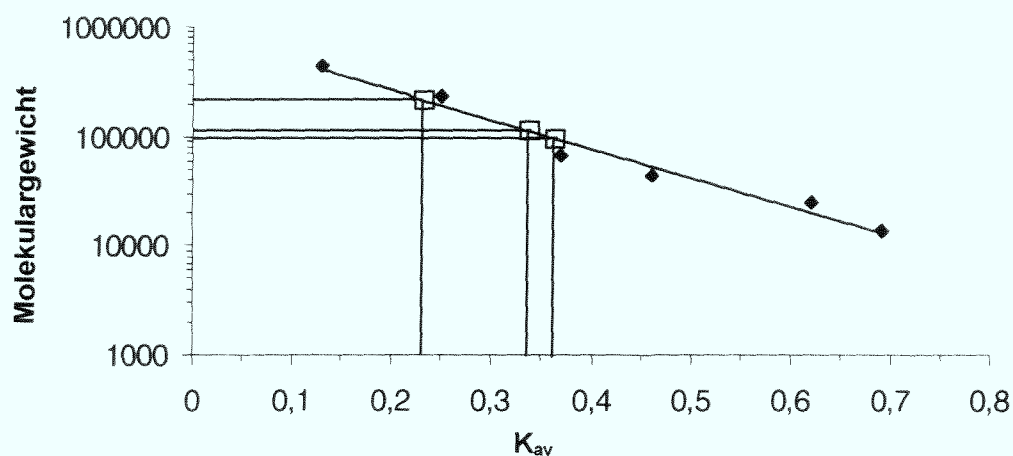


Abb. 21: Eichgerade zur Molmassenbestimmung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* über Gelfiltration; Eichproteine: Ferritin (440.000), Katalase (232.000), Albumin (67.000), Ovalbumin (43.000), Chymotrypsinogen (25.000), Ribonuklease (13.700); $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ mit V_e : Elutionsvolumen, V_0 : Leervolumen der Säule (188,82 ml), V_t : Säulenvolumen (318,58 ml)

In einem nativen Gradientengel traten drei Banden mit einem Molekulargewicht von 315.550, 198.800 und 85.300 auf. Diese Größen entsprachen einem Faktor von 8,1, 5,1 und 2,2. Bei Zugabe des Reduktionsmittel DTE war nur noch die Proteinbande bei 85.300 zu erkennen (Abb. 22).

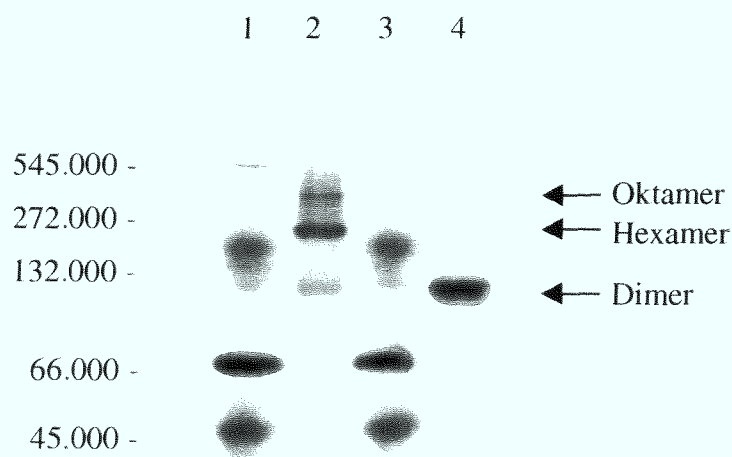


Abb. 22: Natives Tris-Glycin Gradientengel (4-20 %) mit der gereinigten 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis*; Spur 1: Göbenstandard, Spur 2: Proteinprobe ohne DTE, Spur 3: Göbenstandard, Spur 4: Proteinprobe mit 10 mM DTE

Die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* wurde als Tetramer, Hexamer und Oktamer isoliert (Takahashi *et al.*, 1998). Die pflanzliche Acetohydroxysäure-Isomereduktase, ein Enzym mit vergleichbarer Reaktion aus der Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren, ist ein stabiles Homodimer (Halgand *et al.*, 1999; Biou *et al.*, 1997). Auf dem Hintergrund dieser Literaturdaten und aufgrund der Meßergebnisse liegt der Schluß nahe, daß die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* in Gegenwart von DTE ausschließlich als Dimer vorliegt. Die hexamere und oktameren Form entsteht über Disulfidbindungen. Da im Cytoplasma von *E. coli* keine Enzyme nachgewiesen sind, die Sulfid-Bindungen knüpfen und ein reduzierendes Milieu vorliegt (Bessette *et al.*, 1999), ist anzunehmen, daß das Enzym im Cytoplasma als Dimer auftritt und die oligomeren Formen ein *in vitro*-Artefakt sind.

Das Temperaturoptimum der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase liegt in einem Bereich von 50 °C bis 60 °C. Bei 57 °C erreichte die Aktivität einen maximalen Wert von 30 U/mg (Abb. 23). Allerdings verlor das Enzym bei dieser Temperatur schon nach 2 min seine Aktivität. Bei 37 °C und 40 °C hingegen blieb die Enzymaktivität über 40 min stabil.

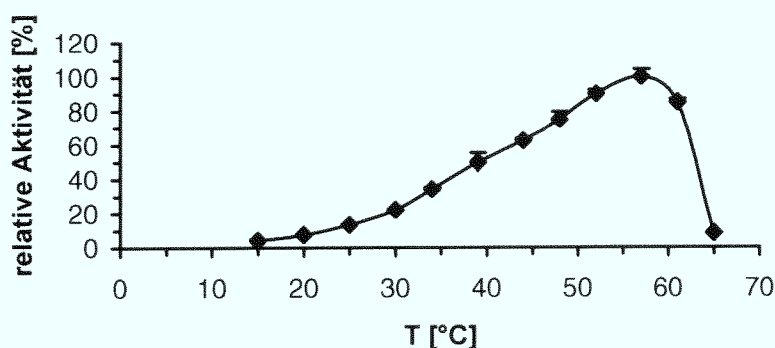


Abb. 23: Temperaturoptimumkurve der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis*; die Enzymaktivität wurde über NADPH-Oxidation bestimmt; 100% entspricht eine Aktivität von 30 U/mg Protein

Das pH-Optimum der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* liegt im leicht alkalischen Bereich (Abb. 24). Das Enzym weist aber auch im neutralen Bereich noch eine hohe Aktivität auf (85% der maximalen Aktivität) und selbst bei einem pH-Wert von 6,5 sind noch 63 % der maximalen Aktivität erhalten. Ein Einfluß der verschiedenen Puffersysteme (Tab. 11) auf die Aktivität des Enzyms wurde nicht beobachtet.

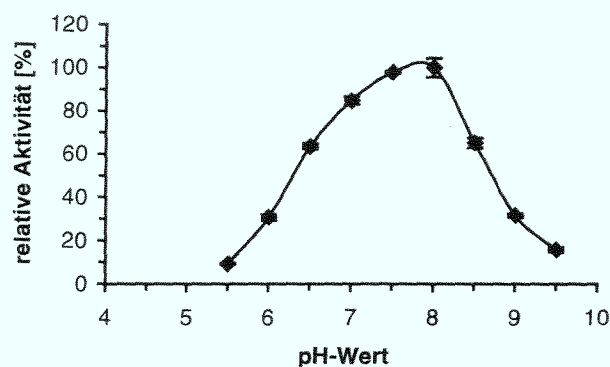


Abb. 24: pH-Optimumkurve der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis*; die Enzymaktivität wurde über NADPH-Oxidation bestimmt; 100 % Aktivität entsprechen 30 U/mg

Tab. 11: Puffersysteme, die zur Bestimmung des pH-Optimums der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* verwendet wurden

pH-Bereich	Puffer (100 mM)
5,5 – 6,5	MES
6,5 – 7,5	Bis-Tris
7,5 – 9,0	Tris
9,0 – 9,5	Ches

Kuzuyama *et al.* (1998) wiesen nach, daß die Reaktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* von zweifach positiv geladenen Ionen abhängig ist. Wie Aktivitätsmessungen mit verschiedenen zweiwertigen Kationen zeigten, besteht diese Ionenabhängigkeit auch bei der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis*. In Abb. 25 ist zu erkennen, daß die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit verschiedener zweiwertiger Kationen in der Reihenfolge Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} und Cu^{2+} abnimmt. Während in Gegenwart von Ba^{2+} , Ca^{2+} und Cu^{2+} noch geringe Enzymaktivitäten meßbar waren (< 20 % der maximalen Aktivität), konnten mit den Ionen Zn^{2+} , Ni^{2+} und Fe^{2+} keine signifikanten Aktivitäten mehr nachgewiesen werden. Mit der Chelatierung aller Metallkationen durch EDTA konnte die Enzymaktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase komplett unterbunden werden.

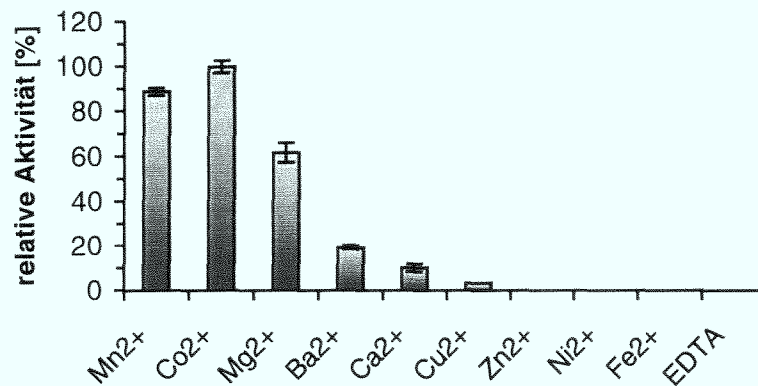


Abb. 25: Aktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* in Abhängigkeit verschiedener zweifach positiv geladener Ionen und EDTA; die Enzymaktivität wurde über NADPH-Oxidation bestimmt; 100 % Aktivität entsprechen 22 U/mg

Da das Substrat 1-Deoxyxylulose 5-phosphat durch die Reinigung als Bariumsalz vorliegt, wurde der Einfluß hoher Barium-Konzentrationen auf die Enzymaktivität untersucht. Aktivitätsmessungen ergaben, daß in Gegenwart von bis zu 20 mM BaCl₂ im Reaktionsansatz keine Abnahme oder Zunahme der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Aktivität zu erkennen war.

Wie Versuche mit NADH und NADPH ergaben, nutzt die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase NADPH als spezifischen Kofaktor. Die Affinität des Enzyms zu seinem Kofaktor ist, wie der K_M -Wert von $0,005 \pm 0,003$ mM belegt, sehr hoch. Ähnliche Affinitäten zu ihrem Kofaktor NADPH besitzen auch anabole Enzyme wie die Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase (0,0057 mM [Dumas *et al.*, 1989]; 0,0015 mM [Hofler *et al.*, 1975]) und die Hxydroxymethylglutaryl-CoA Reduktasen (0,087 mM [Kawachi & Rudney, 1970]); 0,01 mM [Madhosingh & Orr, 1978]). Eine im Vergleich zum Kofaktor geringere Affinität besitzt die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase zu ihrem Substrat 1-Deoxyxylulose 5-phosphat (Abb. 26). Der gemessene K_M -Wert von 0,299 mM liegt in einem Bereich, der für vergleichbare anabole Enzyme wie der Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase (K_M [Acetolactat] 0,29 bzw. 0,32 mM) bestimmt wurde (Hofler *et al.*, 1975; Kirtani *et al.*, 1966). Der v_{max} Wert der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* liegt, wie in Abb. 26 zu erkennen ist, bei 19,5 U/mg.

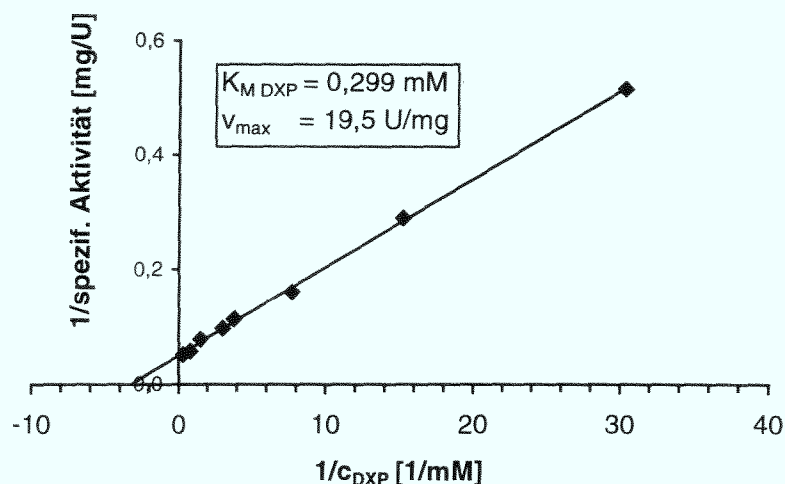


Abb. 26: Doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung der spezifischen Aktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* gegen die Substratkonzentration an 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zur Bestimmung von v_{max} der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase und des K_{M} -Wert von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat

Da bei Fütterungsversuchen mit *E. coli* 1-Deoxyxylulose und nicht die phosphorylierte Form ins Ubichinon eingebaut wurde (Broers, Dissertation 1994) und die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase sowohl aus Glycerinaldehyd 3-phosphat und Pyruvat 1-Deoxyxylulose 5-phosphat, als auch aus Glycerinaldehyd und Pyruvat 1-Deoxyxylulose synthetisieren kann, wurde untersucht, ob neben 1-Deoxyxylulose 5-phosphat auch 1-Deoxyxylulose von der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase umgesetzt wird. Aber es konnte weder eine substratabhängige Oxidation von NADPH, noch ein Verbrauch an radioaktivmarkierter $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -1-Deoxyxylulose über HPLC bestimmt werden. Somit nutzt die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase spezifisch 1-Deoxyxylulose 5-phosphat als Substrat.

Der neue Biosyntheseweg zum Isopentenylidiphosphat kommt nur in Bakterien, Algen und in den Plastiden von Pflanzen, nicht aber in Hefen und tierischen Zellen vor, daher stellen seine Enzyme interessante Angriffspunkte für neue Antibiotika und Herbizide dar (Rohmer, 1998). Um mögliche Inhibitoren zu identifizieren, wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Enzymaktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase untersucht. Fosmidomycin ist als gemischter Inhibitor für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* bekannt (Kuzuyama *et al.*, 1998). In welcher Weise der Inhibitor auf die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* wirkt, wurde in Reaktionsversuchen mit steigender

Fosmidomycin-Konzentration ermittelt. In einer reziproken Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zeigte sich, daß die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase kompetitiv durch Fosmidomycin gehemmt wird (Abb. 27). Während der $v_{\max}$ -Wert bei den verschiedenen Fosmidomycin-Konzentrationen annähernd gleich bleibt nimmt der K_M -Wert für 1-Deoxyxylulose 5-phosphat mit steigender Konzentration zu (Tab. 12).

Tab. 12: K_M -Werte und $v_{\max}$ -Werte der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase bei steigender Fosmidomycinkonzentration ermittelt aus Abbildung 25

Fosmidomycin [nM]	K_M DXP [mM]	$v_{\max}$ [U/mg]
0	0,277	10,6
400	0,612	11,7
600	0,722	11,3
800	1,01	13,1

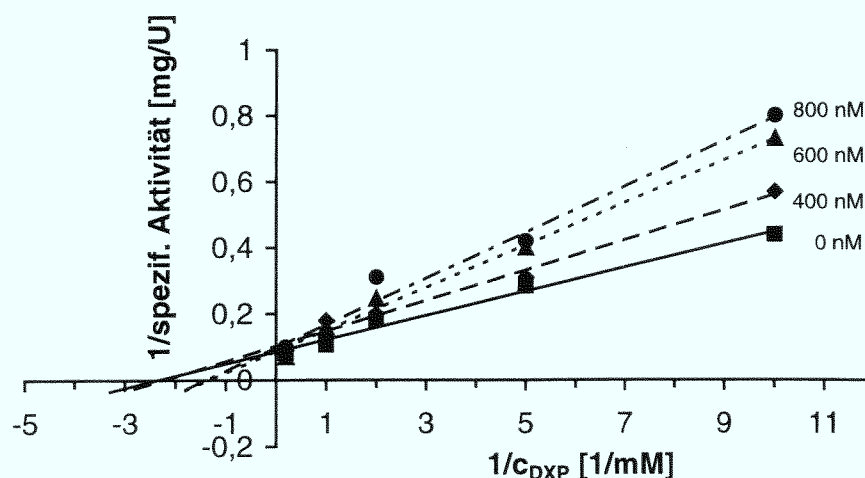


Abb. 27: Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Aktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* gegen die Substratkonzentration an 1-Deoxyxylulose 5-phosphat bei steigender Fosmidomycinkonzentration zur Bestimmung des Inhibitortyps

Der aus der Auftragung der apparenten K_M -Werte gegen die Inhibitorkonzentration ermittelte K_i -Wert beträgt 600 nM (Abb. 28). Mit einem K_i von 0,6 μM , der weit unter dem K_M -Wert für 1-Deoxyxylulose 5-phosphat liegt, stellt Fosmidomycin einen sehr starken Inhibitor für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase dar.

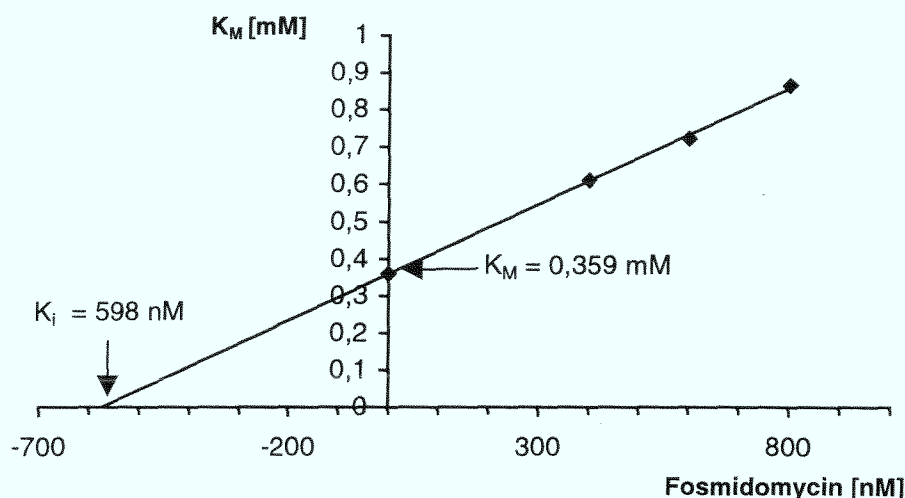


Abb. 28: Auftragung der apparenten K_M -Werte gegen die Fosmidomycin-Konzentration zur Bestimmung des K_i -Werts

Als ein weiterer möglicher Inhibitor der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase wurde die Substanz Hoe704 getestet (Abb. 29). Hoe704 ist ein starker, kompetitiver Inhibitor der Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase (Schulz *et al.*, 1988; Schulz & Taggeselle, 1988). Da der Reaktionsmechanismus dieses Enzyms aus der Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren dem der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase ähnelt, wurde der Inhibitor im 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Enzymtest untersucht. Es zeigte sich allerdings bis zu einer Konzentration von 5 mM Hoe704 kein Effekt.

Weitere Inhibitoren könnten Strukturanaloga zum Substrat 1-Deoxyxylulose 5-phosphat sein. Daher wurde die chemisch synthetisierte Substanz HOMO-DOX (Abb. 29) auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht. Es war allerdings bis zu einer Konzentration von 5 mM HOMO-DOX im Reaktionsansatz kein Einfluß auf die Enzymaktivität zu erkennen. Die Verbindung wurde von der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase auch nicht als Substrat genutzt.

Ebenfalls wurde untersucht, ob die unphosphorylierte Form des 1-Deoxyxylulose 5-phosphats inhibierend wirkt. Mit Enzymtests konnte die inhibitorische Wirkung von

1-Deoxyxylulose auf die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase ausgeschlossen werden.

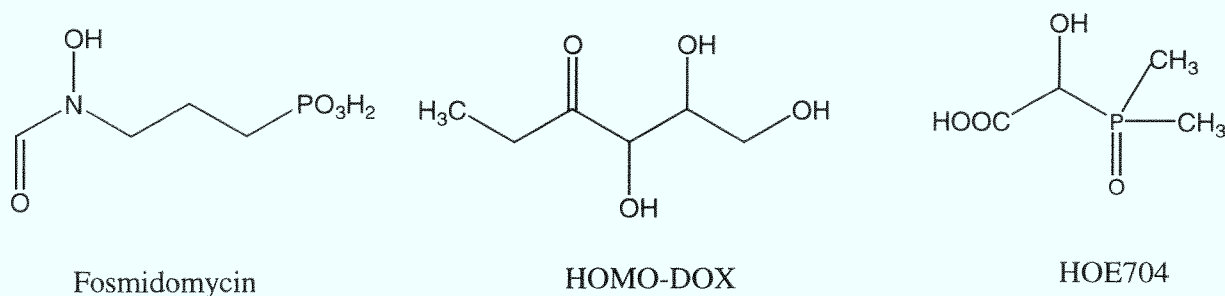


Abb. 29: Substanzen, die als mögliche Inhibitoren für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase getestet wurden

4. Identifizierung weiterer Gene des MEP-Wegs über ein Carotinoid-Screeningsystem

Zur Identifizierung weiterer Gene des neuen MEP-Wegs wurde ein Screeningsystem etabliert, dem folgende Überlegungen zu Grunde lagen: Ein möglicher Ansatz zur Identifizierung von Genen aus Biosynthesewegen ist die Suche nach auxotrophen Mutanten, die mit einem Intermediat oder dem Endprodukt des Biosynthesewegs supplementiert werden müssen. Durch Komplementation dieser Mutanten mit einer Genbank, können dann die beteiligten Gene identifiziert werden. Auf diese Weise konnte z.B. das *dxr* Gen, welches für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase kodiert, aus *E. coli* isoliert werden (Takahashi *et al.*, 1998). Für die nachfolgenden Gene im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg stellt sich aber das Problem, daß keine weiteren Intermediate, die möglicherweise zur Supplementation genutzt werden können, bekannt sind und Zwischenstufen vom Isopentenylidiphosphat bis zu den Endprodukten Menachinon, Dolichol und Isopentenylidiphosphat-tRNA von *E. coli* nicht aufgenommen werden (Fujisaki *et al.*, 1986). Daher wurde ein Screeningsystem etabliert, bei dem als sichtbarer Marker für die Identifizierung weiterer Gene aus dem 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg ein rekombinanter *E. coli* Stamm eingesetzt wurde, der in der Lage ist, Zeaxanthin zu synthetisieren (Misawa *et al.*, 1995). Die Bildung von Carotinoiden wie z.B. Zeaxanthin ist durch enzymatische Schritte in der Isoprenoidbiosynthese limitiert. So ist nachgewiesen worden, daß in der Biosynthese von Carotinoiden in *E. coli* der Isomerisierungsschritt von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat, sowie die Bildung von Farnesylidiphosphat und Geranylgeranylidiphosphat Flaschenhälse darstellen

(Kajiwara *et al.*, 1997; Hemmi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Weitere limitierende Schritte liegen in der Biosynthese des C₅-Grundbausteins Isopentenylidiphosphat (Sandmann, persönliche Mitteilung). Durch die Überexpression eines Gens aus dem MEP-Weg sollte es demnach zu einer gesteigerten Synthese von Carotinoiden in rekombinanten *E. coli* Zellen kommen.

Zur Entwicklung des neuen Carotinoid-Screeningsystems wurde *E. coli* JM101 mit dem Plasmid pACCAR25Δcrtx (Misawa *et al.*, 1995) transformiert. Das Konstrukt pACCAR25Δcrtx exprimiert die Carotinoid-Biosynthesegene *crtE* (GGPP-Synthase), *crtY* (Lycopene-Cyclase), *crtI* (Phytoen-Desaturase), *crtB* (Phytoen-Synthase) und *crtZ* (β-Carotin-Hydroxylase) von *Erwinia uredovora*. Diese rekombinanten *E. coli* Zellen (*E. coli* JM101 [pACCAR25Δcrtx]) bilden auf Agarplatten aufgrund der Zeaxanthin-Produktion gelbe Kolonien und produzieren in Flüssigkultur 115,5 µg Zeaxanthin /g TG (Tab. 13). Das Plasmid pACCAR25Δcrtx trägt eine Chloramphenicolresistenz und kann, da es von den Klonierungsvektor pACYC abstammt, in der Zelle mit pUC-Derivaten koexistieren.

Zum Testen des Screeningsystems wurden zunächst die bereits bekannten Gene der frühen Schritte der Isoprenoidbiosynthese in *E. coli* JM101 [pACCAR25Δcrtx] exprimiert, dazu gehörten die Gene der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli*, der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* bzw. *Z. mobilis*, sowie das Gen der Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus der Hefe *Phaffia rhodozyma* (Tab. 13). Die Expression des Gens der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer 2,3-fachen Steigerung der Zeaxanthin-Produktion in *E. coli* JM101 [pACCAR25Δcrtx]. Durch das Einbringen der Plasmide pQE30dxr und pQEdxrz, die das Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* bzw. *Z. mobilis* tragen, wurde die Carotinoid-Produktion um den Faktor 1,4 bzw. 1,9 gesteigert. Gleichzeitige Genexpressionen der beiden ersten Gene aus dem MEP-Weg mit dem Gen der Isopentenylidiphosphat-Isomerase (*idi*-Gen) aus der Hefe *Phaffia rhodozyma* ergaben eine weitere Steigerung der Zeaxanthin-Produktion um den Faktor 2,4 (*dxr/idi*) und 3 (*dxs/idi*), das entspricht einer Zeaxanthinmenge von 273,5 bzw. 345 µg/g TG (Tab. 13). Die Steigerung verhielt sich nicht additiv und lag unter der Summe der Mengen, die nur mit den Genen *dxs* (261,0 µg Zeaxanthin/g TG) oder *idi* (233,0 µg Zeaxanthin/g TG) erzielt wurden.

Tab. 13: Bildung von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli* JM101 [pACCAR25 Δ crtx] Zellen in Abhängigkeit von der Überexpression der Gene für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase (pETdxs) aus *E. coli*, 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* (pQE30dxr) und *Z. mobilis* (pQEdxrz) und für die Isopentenylidiphosphat-Isomerase (pRH-idi) aus *Phaffia rhodozyma*; die Werte ergeben sich aus Doppelwertbestimmungen

Plasmidkombination	$\mu\text{g Zeaxanthin/g TG}$	Steigerungsfaktor
pUC19	$115,5 \pm 1,5$	1,0
pETdxs	$261,0 \pm 1,0$	2,3
pQE30dxr	$162,5 \pm 2,5$	1,4
pQEdxrz	$218,5 \pm 11,5$	1,9
pRH-idi	$233,0 \pm 1,0$	2,0
pRH-idi + pETdxs	$345,0 \pm 8,0$	3,0
pRH-idi + pQE30dxr	$273,5 \pm 2,5$	2,4

Der Einfluß der Expression von Genen des 2-C-Methylethritol 4-phosphat-Wegs auf die Bildung von Zeaxanthin war auch visuell nach dreitägiger Inkubation der rekombinanten Stämme auf Agarplatte durch eine intensivere Gelbfärbung der Kolonien zu erkennen (Abb. 30). Die intensivste Gelbfärbung zeigten Zellen, die mit dem pRH-idi Plasmid, welches das Gen für die Isopentenylidiphosphat-Isomerase trägt, transformiert wurden. Im Vergleich dazu wiesen Transformanten mit den Plasmiden pQEdxr und pETdxs eine geringere Gelbfärbung auf. Insgesamt gesehen unterschied sich die Farbintensität aller mit Genen aus dem MEP-Weg transformierten *E. coli* Zellen von der Kontrolle, so daß dieses Carotinoid-Screeningsystem zur Identifizierung weiterer Gene aus dem MEP-Weg eingesetzt wurde.

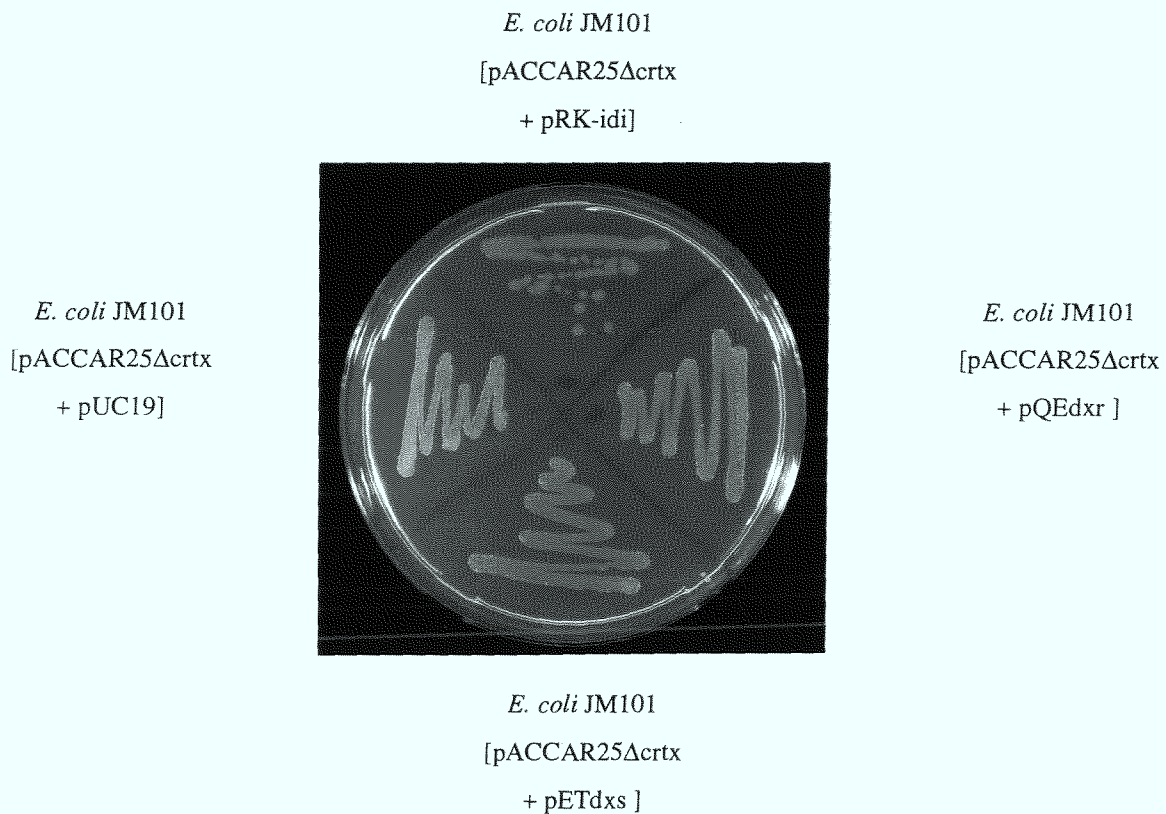


Abb. 30: LB_{amp,cm}-Platte mit Kolonien des Zeaxanthin-produzierenden Stammes *E. coli* JM101 [pACCAR25Δcrtx] transformiert mit den Plasmiden pUC19, pQE30dxr, pETdxs bzw. pRH-idi

Für die Suche nach weiteren Genen des MEP-Wegs wurde eine größenfraktionierte Expressionsgenbank aus *E. coli* erstellt. Diese Expressionsgenbank wurde nach Genen, die eine Steigerung der Zeaxanthinmenge in dem Wirt *E. coli* [pACCAR25Δcrtx] bewirkten, gescreent. Dazu wurde *E. coli* [pACCAR25Δcrtx] mit der Gesamtplasmid-DNA der Expressionsgenbank transformiert und 3 Tage auf Agarplatten kultiviert. Ungefähr 15.000 Kolonien wurden aus der Expressionsgenbank erhalten. 8 Kolonien wiesen im Vergleich zu der übrigen Genbank einen tief gelben Phänotyp auf. Die Plasmid-DNA dieser Kolonien wurde isoliert. Da sich die isolierte Plasmid-DNA sowohl aus dem Plasmid aus der Genbank als auch aus dem Plasmid pACCAR25Δcrtx zusammensetzte, wurde das Plasmid-Gemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der Größenunterschiede konnten die zirkulären Plasmide voneinander getrennt und das Plasmid aus der Plasmidgenbank gezielt aus dem Gel extrahiert werden. Die isolierten Plasmide wurden als pUCIPP1-8 bezeichnet. Zur Bestätigung, daß die Plasmide einen positiven Effekt auf die Zeaxanthinbildung ausübten, wurden die rekombinanten *E. coli* Stämme in Flüssigmedium kultiviert und die gebildete Menge an Zeaxanthin über Methanol-Extraktion quantifiziert. Alle acht Plasmide bewirkten einen Anstieg der Carotinoid-Produktion im Vergleich zu

E. coli [pACCAR25 Δ crtx + pUC19]. Der Effekt war allerdings unterschiedlich ausgeprägt (Tab. 14). Die Expression der Gene von den Plasmiden pUCIPP2, pUCIPP4 und pUCIPP5 führte zu annähernd der gleichen Steigerung (Faktor 1,7 bzw. 2,0) wie sie durch die Expression des Gens für die Isopentenylidiphosphat-Isomerase erzielt wurde (Faktor 2,0; Tab. 13). Die Menge an Zeaxanthin, die in *E. coli* [pACCAR25 Δ crtx] in Kombination mit den Plasmiden pUCIPP3, pUCIPP6, pUCIPP7 und pUCIPP8 quantifiziert wurde (276,5-331,5 μ g Zeaxanthin/g TG; Faktor 1,7 bzw. 2,0), erreichte Werte vergleichbar mit der Plasmidkombination pRH-idi + pQEdxr (273,5 μ g Zeaxanthin/g TG; Faktor 2,0). Den geringsten Einfluß auf die Bildung von Zeaxanthin wies mit einem Faktor von 1,3 das Plasmid pUCIPP1 auf.

Tab. 14: Bildung von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli* [pACCAR25 Δ crtx] Zellen, die die über das Carotinoid-Screening isolierten Plasmide pUCIPP1-8 besitzen; die Werte ergeben sich aus Doppelwertbestimmungen

Plasmidkombination	μ g Zeaxanthin/g TG	Faktor
pUC19	115,5 $\pm$ 1,5	1,0
pUCIPP1	148,5 $\pm$ 0,5	1,3
pUCIPP2	229,0 $\pm$ 11,0	2,0
pUCIPP3	331,5 $\pm$ 0,5	2,9
pUCIPP4	195,0 $\pm$ 4,0	1,7
pUCIPP5	236,5 $\pm$ 2,5	2,0
pUCIPP6	276,5 $\pm$ 0,5	2,4
pUCIPP7	294,0 $\pm$ 1,0	2,5
pUCIPP8	282,0 $\pm$ 6,0	2,4

Um die Gene, die auf den klonierten DNA-Fragmenten der Plasmide pUCIPP1-8 lokalisiert sind, zu bestimmen, wurden beide Enden der inserierten Fragmente und teilweise auch das ganze Insert sequenziert. Über Computer unterstützte Analyse wurden offene Leserahmen bestimmt (Clone-Manager 5.02) und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen zur Datenbankenrecherche mit Hilfe der BLAST-Software (Altschul *et al.*, 1997) eingesetzt. Da das ganze *E. coli* Genom bekannt ist (Blattner *et al.*, 1997), konnten Aussagen über die Position im Genom, die ganze Sequenz und, falls bekannt, über die Genprodukte gemacht werden. Die Länge der inserierten Fragmente bewegte sich zwischen 2,4 kBp (pUCIPP3) und 3,8 kBp (pUCIPP2, 4; Abb. 31). Die Auswertung ergab, daß in allen acht Plasmiden, das Isopentenylidiphosphat-Isomerase Gen (546 Bp) aus *E. coli* kloniert wurde. In sieben Fällen trug das Fragment zusätzlich zum Isopentenylidiphosphat-Isomerase Gen die komplette Sequenz des benachbarten *ygfU* Gen (1518 Bp). Die Funktion dieses Genprodukts ist unbekannt, die Proteinsequenz zeigt allerdings hohe Ähnlichkeiten zur Xanthin-Permeasen aus *B. subtilis*. Arbeiten von Hemmi

et al. (1998) zeigten, daß die gesteigerte Expression des *idi* Gens und nicht der benachbarter Gene zu einer Steigerung der Carotinoidmenge führt. Die Isolierung des Plasmid pUCIPP3, auf dem nur das *idi* Gen vorhanden ist, verstärkt die Annahme, daß allein das Isopentenylidiphosphat-Isomerasegen den gesteigerten Einfluß auf die Zeaxanthinmenge ausübt.

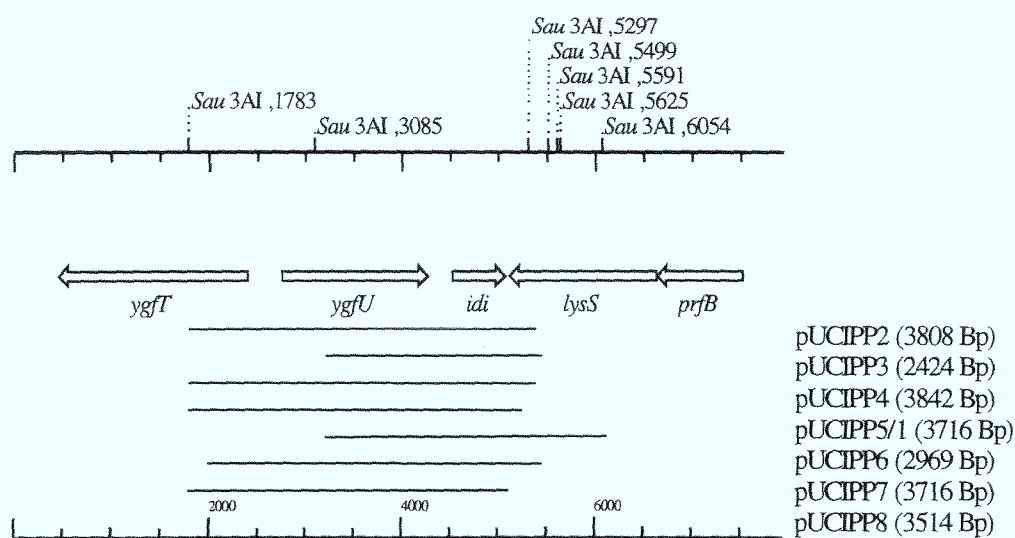


Abb. 31: Genetische Karte der Isopentenylidiphosphat-Isomerase Genregion (7929 Bp) in *E. coli*; durch Striche angedeutet sind die in den Plasmiden pUCIPP1-8 klonierten Bereiche; *ygfT*: Gen für eine putative Oxidoreduktase, *ygfU*: Gen mit Ähnlichkeit zum Xanthin-Permease Gen aus *B. subtilis*, *idi*: Gen für Isopentenylidiphosphat-Isomerase, *lysS*: Gen für Lysyl tRNA Synthetase, *prfB*: Gen für Releasing Faktor 2

Aus den Sequenzierungsdaten konnte zusätzlich eine Aussage über die Orientierung des *idi* Gens zum *lac*-Promotor des Vektors pUC18 gemacht werden. Während auf den Plasmiden pUCIPP1, 2, 4, 5 und 8 das *idi* Gen in der Orientierung des *lac*-Promotors lag, trat eine divergente Anordnung in den Plasmiden pUCIPP3, 6 und 7 auf. Vergleicht man die gebildeten Zeaxanthinmengen der einzelnen rekombinanten *E. coli* Zellen miteinander, so fällt auf, daß die Produktion unabhängig von der Orientierung des *idi* Gens zum *lac*-Promotor des pUC18-Plasmids ist (Tab. 14). Die Gründe dafür liegen im Vorhandensein eines eigenen Promotors. Die DNA-Sequenz im Bereich vor dem ATG-Start des *idi* Gens weist eine Shine-Dalgarno-Sequenz und einen möglichen Promotorbereich auf, der vom allgemeinen *E. coli* Sigmafaktor σ^{70} erkannt wird (Abb. 32). Demnach kann die Transkription des *idi* Gens über die Kontrolle des eigenen Promotors erfolgen und nicht über die des *lac*-Promotors. Durch das Vorhandensein eines weiteren Promotors, über dessen Regulation keine Untersuchungen vorliegen, ist die Expression des *idi* Gens nicht

Tab. 15: Bildung von Zeaxanthin in rekombinanten *E. coli* [pACCAR25Δcrtx] Zellen in Abhängigkeit von der Überexpression der Gene für das YajO Protein (pUC19aldredBH) und für die CDP-2-C-Methylerythritol 4-phosphat Synthase (pQEygbP); der Faktor bezieht sich auf die Zeaxanthinmenge gebildet in *E. coli* [pACCAR25Δcrtx] mit den Leervektoren pUC19 bzw. pQE30; die Werte ergeben sich aus Doppelwertbestimmungen

Plasmid	μg Zeaxanthin/g TG	Steigerungsfaktor
pUC19	115,5 ± 1,5	1
pUC19aldredBH	142,0 ± 9,0	1,2
pQE30	107,0 ± 1,2	1
pQEygbP	126,3 ± 3,4	1,2

Vor kurzem konnte das Gen *ygbP* aus *E. coli* als CDP-2-C-Methylerythritol 4-phosphat Synthase identifiziert werden (Rodich *et al.*, 1999). Das Enzym katalysiert die weitere Umsetzung von 2-C-Methylerythritol 4-phosphat mit CTP zu 4-Diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. Um den Einfluß dieses neuen Enzyms des MEP-Wegs mit dem der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase auf die Zeaxanthinsynthese zu vergleichen, wurde das Gen über PCR mit chromosomaler DNA von *E. coli* amplifiziert und über die Schnittstellen *SacI/HindIII* in den Vektor pQE30 kloniert. Durch die Klonierung des Gens in den Vektor pQE30 werden dem Protein N-terminal sechs Histidinreste angehängt, die es ermöglichen, daß Protein über Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen den His-tag eindeutig zu identifizieren. Vor dem Einsatz des Plasmids pQEygbP im Testsystem, wurde die homologe Überexpression des Gens kontrolliert. Nach Induktion der Genexpression mit IPTG zeigte sich im SDS-PAGE eine dominante Proteinbande bei der erwarteten Größe von 27,4 kDa. Der eindeutige Nachweis, daß es sich um das YgbP Protein handelt, erfolgte über Western-Blot Analyse (Abb. 33). Neben der Bande des YgbP Proteins bei 27 kDa wurden noch drei weitere Proteinbanden im Rohextrakt von *E. coli* M15 [pQEygbP] angefärbt. Da diese Banden allerdings auch in den Kontrollen d.h. in Rohextrakten von *E. coli* M15 mit Leervektor bzw. dem Kontrollvektor pQE40 auftraten, handelt es sich hierbei um unspezifische Markierungen. Die Auftragung des Überstandes und des Zellpellets nach dem Zellaufschluß ließ erkennen, daß der größte Teil des überproduzierten Enzyms in löslicher Form vorlag. Die Sequenzierung der DNA-Sequenz bestätigte die fehlerfreie Amplifikation der Gensequenz. Im Wirt *E. coli* [pACCAR25Δcrtx] führte die Expression des Gens zu einer Steigerung der Zeaxanthinmenge um den Faktor 1,2. Die Steigerung ist geringer als die, welche durch die Überproduktion an 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase erzielt

wurde. Die Bereitstellung von CDP-2-C-Methylerythritol 4-phosphat ist somit in diesem Testsystem kein limitierender Schritt bei der Synthese von Zeaxanthin.

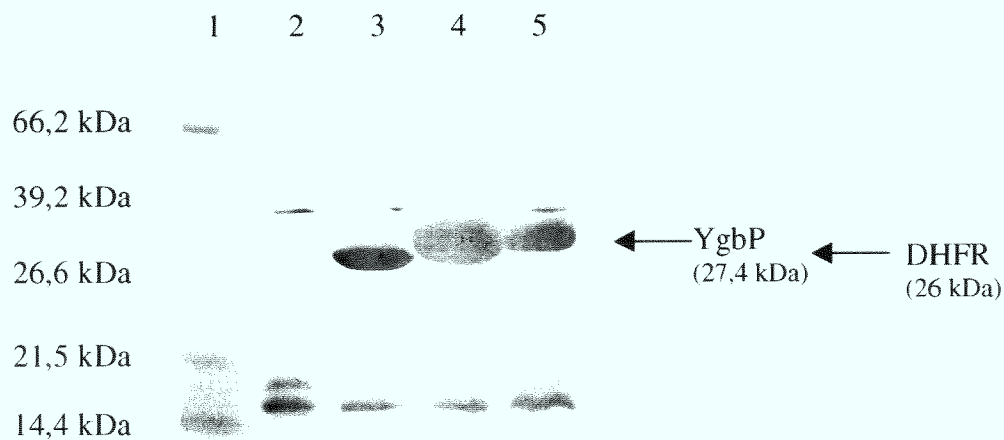


Abb. 33: Western-Blot mit Antikörpern gegen den His-tag zum Nachweis der rekombinanten CDP-2-C-Methylerythritol 4-phosphat Synthase aus *E. coli*; Spur 1: Molekulargewichtsstandard („prestrained molecular weight standard, broad range“, New England Biolabs, Schwalbach), Spur 2: zellfreier Extrakt von *E. coli* M15 [pQE30], Spur 3: zellfreier Extrakt von *E. coli* M15 [pQE40] als Positivkontrolle, exprimiert DHFR Protein (26 kDa), Spur 4: zellfreier Extrakt von *E. coli* M15 [pQEygbP1], Spur 5: Zellpellet nach dem Zellaufschluß von *E. coli* M15 [pQEygbP1]

IV. Diskussion

1. Umsatz von Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat zu 1-Deoxyxylulose 5-phosphat: Der erste Reaktionsschritt im MEP-Weg

Mit der Klonierung des *dxs* Gens aus *E. coli* und der Aufreinigung des Enzyms konnte zum ersten Mal eine 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase, welche die Umsetzung von Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat zu 1-Deoxyxylulose 5-phosphat katalysiert, aus einem Organismus isoliert werden. Eine Datenbankrecherche mit der Proteinsequenz der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase von *E. coli* über das BLASTP Programm (Altschul *et al.*, 1997) zeigt, daß homologe Enzyme zur 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in einer Vielzahl von Bakterien und Pflanzen, nicht aber in Tieren oder Hefen vorkommen (Abb. 34). Gleichzeitig lassen sich über die Suche nach möglichen 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthasen Transketolasen und E1-Untereinheiten des Pyruvat Dehydrogenasekomplexes bzw. Oxoisovalent Dehydrogenasekomplexes finden (Abb. 34). Ein Stammbaum, erstellt aus dem Sequenzvergleich von Transketolasen, E1-Untereinheiten und 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthasen, ist in Abb. 34 dargestellt. Da ein Sequenzvergleich der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase mit verschiedenen Datenbanken zu über 100 homologen Sequenzen führte, wurde lediglich eine ausgewählte Anzahl von Sequenzen, deren Funktion möglichst schon gesichert ist und die aus möglichst unterschiedlichen Organismen stammen, berücksichtigt. Wie der Stammbaum zeigt, sind die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase ähnlichen Proteine untereinander phylogenetisch näher verwandt als mit Transketolasen und E1-Untereinheiten (Abb. 34). Sie stellen somit eine neue Proteinfamilie der TPP-abhängigen Enzyme dar.

Inzwischen konnte das Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *Synechocystis leopoliensis* (Miller *et al.*, 1999), *Streptomyces* sp. CL190 (Kuzuyama *et al.*, 2000 a), *Bacillus subtilis* und *Synechocystis* sp. 6803 (Harker & Bramley, 1999) kloniert werden. Auch pflanzliche 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase Gene aus *Mentha x piperita* (Lange *et al.*, 1998), *Capsicum annuum* (Bouvier *et al.*, 1998), *Chlamydomonas reinhardtii* (Schwender *et al.*, 1999) und *Arabidopsis thaliana* (Mandel *et al.*, 1996) wurden identifiziert. Signalpeptidsequenzen am N-Terminus der pflanzlichen 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthasen deuten darauf hin, daß die Enzyme in den Plastiden lokalisiert sind (Lange *et al.*, 1998; Bouvier *et al.*, 1998; Schwender *et al.*, 1999; Mandel *et al.*, 1996). Immunoblot Untersuchungen bei *Capsicum annuum* beweisen die Lokalisation der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in Chloroplasten und Chromoplasten (Bouvier *et al.*, 1998). Das Vorkommen der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in Plastiden steht im Einklang mit ¹³C-Glukose Markierungsversuchen, in denen gezeigt werden konnte, daß cytosolische Isoprenoide (Sterole) über den Mevalonat-Weg und plastidäre

Isoprenoide (Carotionoide, Chlorophyll) über den 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg synthetisiert werden (Lichtenthaler *et al.*, 1997 a, b; Adam *et al.*, 1998). Eine Mutation im *dxs* Gen aus *A. thaliana* führte zu einer Albinopflanze, in der der Gehalt an Chlorophyllen und Carotinoiden bis auf 0,2 % bzw. 2,6 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Der Mangel an Pigmenten führte zu einer frühen Stagnation in der Entwicklung der Pflanze und verdeutlicht die bedeutsame Rolle der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in der Chloroplastenentwicklung (Mandel *et al.*, 1996). Der Nachweis der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in Cyanobakterien (Miller *et al.*, 1999) ist ein Hinweis darauf, daß das Gen des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Wegs über den Endosymbiontenprozess in die Pflanze gelangte und anschließend in das pflanzliche Genom integrierte (Mandel *et al.*, 1996).

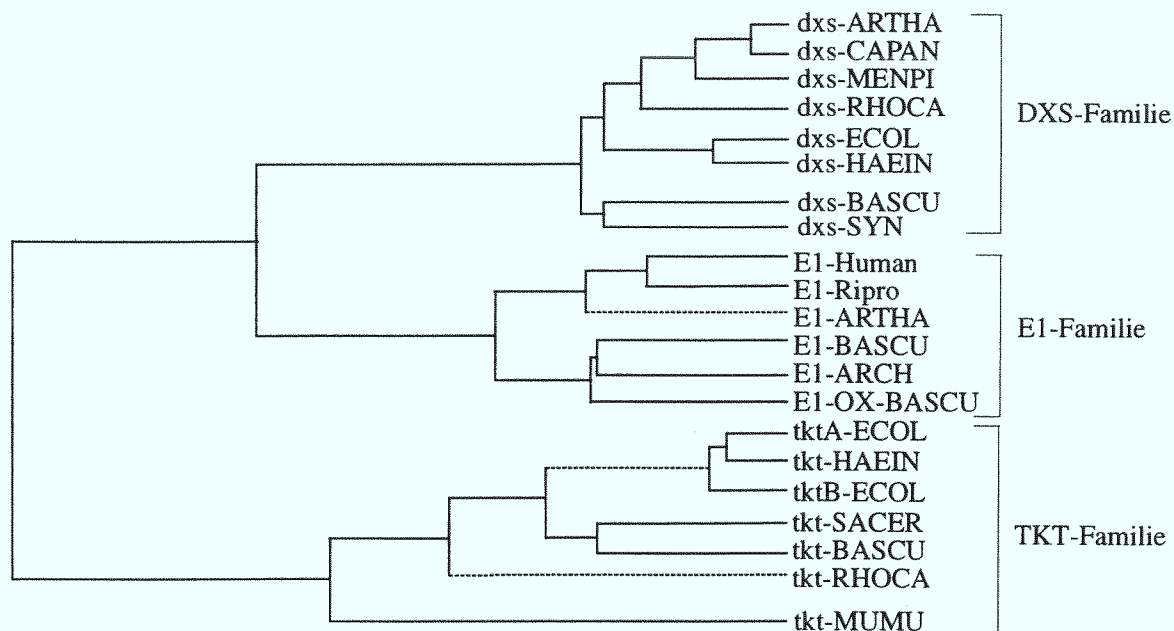


Abb. 34: Phylogenetischer Stammbaum der Transketolasen (TKT), E1-Untereinheiten des Pyruvat Dehydrogenasekomplexes (E1) und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase (DXS); ARTHA: *Arabidopsis thaliana*; CAPAN: *Capsicum annuum*; MENPI: *Mentha x piperita*; RHOCA: *Rhodobacter capsulatus*; ECOL: *Escherichia coli*; HAEIN: *Haemophilus influenzae*; BASCU: *Bacillus subtilis*; SYN: *Synechocystis* sp.; Human: *Homo sapiens*; Ripro: *Rickettsia prowazekii*; ARCH: *Acholeplasma laidlawi*; OX: Oxoisovalerat Dehydrogenase Untereinheit; SACER: *Saccharomyces cerevisiae*; MUMU: *Mus musculus*

Die Synthese von 1-Deoxyxylulose konnte in Rohextrakten von zahlreichen Bakterien nachgewiesen werden (Yokata & Sasjima, 1984). Als Enzym, welches die TPP- und Magnesium-abhängige Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd zu 1-Deoxyxylulose katalysiert, wurde die E1-Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenase-

komplexes ausgemacht (Yokata & Sasajima, 1986). Da unphosphoryliertes Glycerinaldehyd im Zentralstoffwechsel nicht auftritt und *E. coli* Mutanten mit einer Deletion der Gene für den Pyruvat Dehydrogenasekomplex ($\Delta aceEF$) nur auxotroph für Acetat nicht aber für andere Supplemente sind (Chang & Cronan, 1982), ist der Umsatz von Pyruvat und Glycerinaldehyd durch die E1-Untereinheit als Nebenaktivität zu bewerten. Diese Aktivität ist demnach nicht verantwortlich für die Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat in *E. coli*. Transketolasen können theoretisch auch die Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat katalysieren. *E. coli* Mutanten, die keine Aktivität für die beiden Transketolasen A und B besitzen, sind zwar bedürftig für Pyridoxin, aromatische Aminosäuren und Vitamine, aber nicht für Intermediate aus dem 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthesezweig der Pyridoxinsynthese (Zhao & Winkler, 1994). Die beiden Transketolasen aus *E. coli* sind folglich nicht an der Biosynthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat beteiligt (Zhao & Winkler, 1994). Der eindeutige Nachweis, daß die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase auch *in vivo* die Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat katalysiert, wurde mit *E. coli*-Mutanten geführt, in denen das *dxs* Gen deletiert wurde. Die *dxs* Mutanten sind auxotroph für 1-Deoxyxylulose (Charon *et al.*, 2000).

Bislang ist nur wenig über die biochemischen Eigenschaften der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase bekannt. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Aktivität der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in zellfreien Extrakten von rekombinanten *E. coli* Zellen lag mit 8 mU/mg Protein über den Werten der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* (1,1 mU/mg Protein) (Lois *et al.*, 1998), *B. subtilis* (11,5 μ U/mg Protein) und *Synechocystis* sp. (10,4 μ U/mg Protein) (Harker & Bramley, 1999). Die unterschiedlichen Aktivitäten zwischen *E. coli* und *B. subtilis* und *Synechocystis* sp. erklären sich zum einen mit dem heterologen Expressionssystem, das für die beiden letzt genannten Organismen verwendet wurde. Die Diskrepanz kann aber auch in der Art des Enzymtests begründet sein. Die gebildete Menge an 1-Deoxyxylulose 5-phosphat wurde nicht, wie in dieser Arbeit über HPLC bestimmt, sondern über Auftrennung der Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatografie und Quantifizierung der Radioaktivität des [2- ^{14} C]-1-Deoxyxylulose 5-phosphats über Flüssigszintillation (Harker & Bramley, 1999). Vergleicht man die spezifische Aktivität der gereinigten 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli*, mit der aus *Streptomyces* sp. CL190 und *E. coli*, gereinigt von Kuzuyama *et al.* (2000 a), so fällt der enorme Unterschied zwischen den spezifischen Aktivitäten der Enzyme auf. Kuzuyama *et al.* (2000) ermittelten, im Vergleich zu dem in der vorliegenden Arbeit gemessenen Wert von 0,53 U/mg Protein, $v_{\max}$ -Werte von 370 U/mg Protein (*Streptomyces* sp. CL190) und 300 U/mg Protein (*E. coli*). Es ist zu berücksichtigen, daß es sich bei dem in dieser Arbeit gemessenen Wert nicht um $v_{\max}$ handelt, aber den Größenbereich sicherlich annähernd widerspiegelt. Die

Gründe für die große Abweichung liegen vor allem im Anreicherungsprozeß des Enzyms. Die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* ist nachweislich ein thermolabiles Protein (Mogk *et al.*, 1999), somit begünstigt ein schnelles Aufreinigungsverfahren die Stabilität des Enzyms. Die Proteinreinigung in der vorliegenden Arbeit erfolgte über mehrere zeitintensive Schritte, die zu einem Verlust von 96 % der anfänglich vorhandenen Aktivität führten. Kuzuyama *et al.* (2000 a) hingegen reinigten die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in einem Schritt über Ni-NTA-Affinitätschromatografie auf, so daß der Thermolabilität des Enzyms entgegengewirkt wurde. Schwierigkeiten bei der Expression des *dxs* Gens wiesen in der vorliegenden Arbeit zudem darauf hin, daß das *dxs* Genprodukt schon in geringen Mengen toxisch für *E. coli* ist. Kuzuyama *et al.* (2000) verwendeten zur Expression des Gens einen *E. coli* Stamm, in dem das Repressorgen *lacI^q* in hoher Kopienzahl vorlag. Dadurch wurde verhindert, daß die Expression des *dxs* Gens schon vor Induktion mit IPTG erfolgte. In dem Stamm *E. coli* JM109, der in der vorliegenden Arbeit zur homologen Expression genutzt wurde, war das Gen für den Repressor chromosomal kodiert und die Repression damit weniger effektiv. Trotzdem erscheint der $v_{\max}$ -Wert der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *Streptomyces* sp. CL190 und *E. coli* sehr hoch. Zum Vergleich, für die Transketolase A aus *E. coli* lassen sich je nach Substrat $v_{\max}$ -Werte von 55-100 U/mg ermitteln (Schörken, Dissertation 1997).

Im Genom von *E. coli* finden sich interessanterweise in der näheren Umgebung des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase auch drei Gene aus der Thiaminbiosynthese (*thiJ,I,L*) (Blattner *et al.*, 1997; Backstrom, 1996). 1-Deoxyxylulose 5-phosphat ist nicht nur als Vorstufe für Isopentenylidiphosphat bekannt, sondern stellt auch ein Intermediat in der Synthese von Thiamin und Pyridoxalphosphat dar (Hill *et al.*, 1989, 1996; Himmeldirk *et al.*, 1996; David *et al.*, 1981, 1982). Es ist bemerkenswert, jedoch nicht selten, daß der Kofaktor an seiner eigenen Biosynthese beteiligt ist. Dieser Zusammenhang findet sich auch bei der Biosynthese von Pyridoxin (Drewke *et al.*, 1996) und Biotin (Sanyal *et al.*, 1994). In Pflanzen geht ein Thiaminmangel immer mit der Ausprägung eines Albinophänotyps einher (Komeda *et al.*, 1988; McHale *et al.*, 1988; Proebsting *et al.*, 1990), der durch Supplementation mit Thiamin oder anderen Vorstufen wieder komplementiert werden kann. Dieser Phänotyp läßt sich mit der TPP-Abhängigkeit der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase erklären (Lange *et al.*, 1998).

2. Physiologische Funktion des *yajO* Genprodukts von *E. coli*

Die Lokalisation des *yajO* Gens von *E. coli* in einem Operon mit dem für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase kodierenden Gen (Lois *et al.*, 1998), sowie die Sequenzähnlichkeit der abgeleiteten Proteinsequenz zu Enzymen aus der Aldoketoreduktase Superfamilie sprachen dafür, daß dem Genprodukt eine Funktion im

neuen 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg zukommen könnte. Biochemische und genetische Untersuchungen konnten eine Beteiligung des YajO Genprodukts im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg allerdings nicht bestätigen. Das bis zu einer Homogenität von ca. 80 % gereinigte Protein zeigte keine katalytische Aktivität mit 1-Deoxyxylulose 5-phosphat als Substrat und die Disruption des *yajO* Gens war nicht letal für *E. coli*.

Die Superfamilie der Aldoketoreduktasen umfaßt monomere, cytosolische Oxidoreduktasen, die NAD(P)H abhängige Reduktionen eines breiten Spektrums an Carbonylverbindungen katalysieren (Bohren, 1989). Zu dieser Familie gehören u.a. Aldehyd-Reduktasen (EC 1.1.1.2), Aldose-Reduktasen (EC 1.1.1.21) und Hydroxysteroid Dehydrogenasen (EC 1.1.1.213). Die Proteine haben alle ca. 320 Aminosäuren, besitzen eine (α/β)₈-Barrel Struktur und kommen in Säugetieren, Amphibien, Pflanzen, Hefen und Bakterien vor (Jez *et al.*, 1997). Der Vergleich der YajO Proteinsequenz mit konservierten Sequenzbereichen, die kennzeichnend für Proteine aus der Aldoketoreduktase Superfamilie sind (Jez *et al.*, 1997), ergab, daß wichtige Aminosäuren für die Substratbindung und des katalytischen Bereichs auch in der YajO Aminosäuresequenz konserviert sind. So finden sich zum einen in der YajO Proteinsequenz die konservierten Aminosäurereste Aspartat, Tyrosin, Leucin und Histidin des aktiven Zentrums und zum anderen die hoch konservierten Reste Alanin, Tyrosin und Histidin für die Substratbindestelle. Abweichend von der Konsensussequenz kommt anstelle von Tryptophan an der Position 86 die Aminosäure Prolin vor.

Tab. 16: Konservierte Aminosäuren des aktive Zentrums (unterstrichen) und der Substratbindestelle (kursiv) der Aldoketoreduktasen (Jez *et al.*, 1997) im Vergleich zur YajO Proteinsequenz; konservierte Aminosäuren des YajO Proteins wurden über Sequenzvergleich mit Aldose-Reduktase von Mensch, Ratte und Schwein, Aldehyd-Reduktase von Mensch und Ratte und Prostaglandin F-Synthase von Rind bestimmt

	Rest	50	52	55	84	86	117
Konsensussequenz		<u>D</u>	A	<u>Y</u>	<u>L</u>	W	<u>H</u>
YajO Protein		<u>D</u>	A	<u>Y</u>	<u>L</u>	P	<u>H</u>

Allerdings besitzt das YajO Protein nicht alle für die Kofaktorbindung strikt konservierten Aminosäurereste, die von Jez *et al.* (1997) aus Sequenzvergleich von 42 Oxidoreduktasen und aus den bekannten Strukturen von fünf Aldoketoreduktasen bestimmt wurden (Tab. 16). So ist nur die strikt konservierte Aminosäure Aspartat in der YajO Proteinsequenz zu finden. Die anderen strikt konservierten Reste Asparagin, Glutamin und Serin kommen dagegen nicht vor (Tab. 17). Das Fehlen der konservierten Aminosäuren auch in den zu dem YajO Protein am nächsten verwandten Proteinen, läßt vermuten, daß

die Kofaktorbindung in dieser Enzymfamilie über andere konservierte Aminosäuren erfolgt. Das YajO Protein besitzt wie alle Aldoketoreduktasen kein Rossmann-Motiv zur Bindung des Kofaktors (Rondeau *et al.*, 1992).

Tab. 17: Konservierte Aminosäurereste für die NAD(P)H-Bindung in Aldoketoreduktasen (Jez *et al.*, 1997) im Vergleich zur YajO Proteinsequenz; konservierte Aminosäuren in YajO Protein wurden aus dem Sequenzvergleich mit Aldose-Reduktase von Mensch, Ratte und Schwein, Aldehyd-Reduktase von Mensch und Ratte und Prostaglandin F-Synthase von Rind bestimmt: fett: strikt konservierte Reste, kursiv: konservative Reste

	Rest	24	50	166	167	190	216	219	270	271	276	279	280
Konsensussequenz		W	D	<i>S</i>	N	Q	<i>Y</i>	<i>L</i>	<i>K</i>	S	<i>R</i>	<i>Q</i>	<i>N</i>
YajO Protein		W	D	<i>S</i>	<i>S</i>	E	W	<i>L</i>	A	Q	W	S	K

Über die Sequenz des YajO Proteins läßt sich mittels computerunterstützter Strukturanalyse eine α/β -Stuktur vorhersagen, die charakteristisch für Aldoketoreduktasen ist (Rondeau *et al.*, 1992). Das YajO Protein stellt aufgrund der charakteristischen strukturellen und sequenzspezifischen Eigenschaften einen Vertreter der Aldoketoreduktase Superfamilie dar.

Biochemische Untersuchungen mit dem gereinigten YajO Protein zeigten, daß die Carbonylverbindung 1-Deoxyxylulose 5-phosphat vom YajO Protein nicht umgesetzt wird. Seit kurzem ist bekannt, daß 1-Deoxyxylulose 5-phosphat von der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase zu 2-C-Methylerythritol 4-phosphat umgesetzt wird (Kuzuyama *et al.*, 1998). Enzyme der Aldoketoreduktase Superfamilie katalysieren die reversible Reduktion von Carbonylverbindungen. Da 2-C-Methylerythritol 4-phosphat ein verzweigtkettiger Zucker ohne Carbonylverbindung ist und die weitere Umsetzung von 2-C-Methylerythritol 4-phosphat zu Isopentenylidiphosphat Reduktionsschritte und keine Oxidationsschritte voraussetzt, ist es unwahrscheinlich, daß das YajO Protein einen nachfolgenden Schritt im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg katalysiert.

Die Genorganisation um das Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in anderen Organismen im Vergleich zu *E. coli* ist ein weiterer Aspekt, der Zweifel an der Beteiligung des *yajO* Gens im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg aufkommen läßt. Wie eigene Datenbankrecherchen ergaben, finden sich in den Organismen *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *Aquifex aeolicus* (Deckert *et al.*, 1998), *Synechocystis* PCC6903 (Kaneko *et al.*, 1996), *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), *Rhodobacter capsulatus* (Youvan *et al.*, 1984), *Thermotoga maritima* (Nelson *et al.*, 1999), *Treponema pallidum* (Fraser *et al.*, 1998), *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996), *Helicobacter pylori* J99 (Alm *et al.*, 1999) und 26695 (Tomb *et al.*, 1997), *Chlamydia*

pneumoniae (Kalman *et al.*, 1998), *Chlamydia trachomatis* (Stephens *et al.*, 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), *Deinococcus radiodurans* (White *et al.*, 1999) und *Roseobacter denitrificans* (Kortluke *et al.*, 1998) kein benachbarter offener Leserahmen in der *dxs* Genregion mit Homologien zu einem Protein aus der Aldoketoreduktase Superfamilie. In *H. influenzae*, dem zu *E. coli* am nächsten verwandten Organismus, finden sich nur die Gene für eine Exonuklease und einer Farnesyldiphosphat Synthase. Zudem wäre zu erwarten gewesen, daß eine ähnliche Proteinsequenz zu YajO auch in den inzwischen sequenzierten Organismen, in denen nachweislich die bereits bekannten Gene für den 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg vorhanden sind (Tab. 19), zu finden ist. Der Sequenzvergleich mit Proteinen aus der Datenbank ließ solche homologen Proteine nicht erkennen. Im Gegenteil, die YajO Proteinsequenz wies die höchste Identität zu putativen Aldoketoreduktasen aus den Hefen *Schizosaccharomyces pombe* (43,6 %) und *Saccharomyces cerevisiae* (41,3 %) auf – Organismen, in denen der 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg nicht aktiv ist.

Die Disruption des *yajO* Gens brachte keinen veränderten Phänotyp. Der Rückschluß, daß dieses Gen nicht essentiell für *E. coli* ist, kann nicht eindeutig gezogen werden, da sich im *E. coli* Genom zwei weitere offene Leserahmen mit 27,5 % (*yghZ*) und 26,6 % (*ydjG*) Identität zur *yajO* Sequenz befinden. Die entsprechenden Genprodukte könnten als mögliche Oxidoreduktasen die Funktion des YajO Proteins übernehmen. Es ist auch denkbar, daß die Funktion von einem Protein ohne Sequenzähnlichkeit, aber mit gleicher katalytischer Aktivität übernommen wird.

Die Expression des *yajO* Gens in Carotinoid produzierenden *E. coli* Stämmen führte zu einem leichten Anstieg der Zeaxanthinsynthese. Hemmi *et al.* (1998) konnten zeigen, daß die Lycopensynthese in rekombinanten *E. coli* Stämmen durch die Expression von Aldehyd Dehydrogenasen bzw. von Enzymen aus dem Krebszyklus gesteigert wird. Diesen Einfluß erklären die Autoren im Falle der Aldehyd Dehydrogenasen durch den gesteigerten Verbrauch von toxischen Aldehyden, die sich unter reduktiven Bedingungen, wie sie durch die Carotinoidsynthese in den Zellen hervorgerufen werden könnten, in größeren Mengen ansammeln. Enzyme aus dem Krebszyklus könnten eine höhere Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten bewirken. Es ist denkbar, daß das YajO Protein einen ähnlichen Effekt hervorruft.

3. Umwandlung von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zu 2-C-Methylerythritol 4-phosphat: Der zweite Reaktionsschritt im MEP-Weg

Noch vor der Identifizierung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *E. coli* (Takahashi *et al.*, 1998; Kuzuyama *et al.*, 1998 a) war postuliert worden, daß 1-Deoxyxylulose 5-phosphat in einer ähnlich zu der von der Acetohydroxysäure-Isomeroreduktase (EC 1.1.1.68) aus dem Valin und Isoleucin Biosyntheseweg

katalysierten Reaktion zu 2-C-Methylerythritol 4-phosphat umgelagert wird (Rohmer *et al.*, 1996). Die Acetohydroxysäure-Isomereduktase katalysiert eine Zweischnittreaktion, in der das Substrat, 2-Acetylactat oder 2-Aceto-2-hydroxybutyrat über eine Verschiebung einer Alkylgruppe und einer NADPH-abhängigen Reduktion zu 2,3-Dihydroxy-3-isovalerat bzw. 2,3-Dihydroxy-3-methylvalerat umgesetzt wird (Enzyme Handbook, 1995). Obwohl die Proteinsequenzen der Acetohydroxysäure-Isomereduktase und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase sich nicht ähneln, weisen die Enzyme vergleichbare biochemische Eigenschaften auf (Tab. 18). Beide Enzyme haben ein pH-Optimum um pH 7,5 (Dumas *et al.*, 1989; Arfin & Umbarger, 1969; Kirtani *et al.*, 1966) und benötigen NADPH als spezifischen Kofaktor (Biou *et al.*, 1997). Die Bindung des Kofaktors erfolgt bei der Acetohydroxysäure-Isomereduktase über ein N-terminales Bindemotiv (Biou *et al.*, 1997, Rossmann *et al.*, 1975), das sich auch in der Sequenz bakterieller 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerasen wiederfindet (G-x-x-G-x-x-G). Die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* und *E. coli* können Mn^{2+} , Co^{2+} und Mg^{2+} als divalente Kationen nutzen, während die Acetohydroxysäure-Isomereduktase spezifisch Mg^{2+} benötigt. Dieser Unterschied erklärt möglicherweise die Tatsache, daß eine putative Mg^{2+} Bindestelle der Acetohydroxysäure-Isomereduktase (Dumas *et al.*, 1993) in bakteriellen 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase-Sequenzen nicht konserviert ist. Die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *Z. mobilis* kommt im Gegensatz zu der von *E. coli* als Homodimer vor. Acetohydroxysäure-Isomereduktasen bilden sowohl dimere (Spinat, Dumas *et al.*, 1989) als auch tetramere Formen (*Salmonella typhimurium*, Hofer *et al.*, 1975).

Tab. 18: Biochemische Eigenschaften der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *Z. mobilis*, *E. coli* (Takahashi *et al.*, 1998; Kuzuyama *et al.*, 1998 a) und der Acetohydroxysäure-Isomereduktase (Enzyme Handbook, 1995)

Eigenschaften	1-Deoxyxylulose 5-P Reduktoisomerase <i>Z. mobilis</i>	1-Deoxyxylulose 5-P Reduktoisomerase <i>E. coli</i>	Acetohydroxysäure- Isomereduktase (EC 1.1.1.68)
M_r	39 kDa	42 kDa	59, 57 kDa
oligomere Form	Dimer	Tetramer	Dimer, Tetramer
T-Optimum	57 °C	-	25 °C, 37 °C
pH-Optimum	7,5-8,0	7,5-8,0	7,5-8,5
divalente Kationen	Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+}	Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+}	Mg^{2+}
V_{max}	19,5 U/mg Protein	-	-
K_M Substrat	$0,329 \pm 0,03$ mM	-	0,002-0,78 mM
K_M NADPH	$0,005 \pm 0,003$ mM	-	0,0015 mM, 0,0057mM
K_i Fosmidomycin	600 nM	38 nM	-

Bei der Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase aus *Salmonella typhimurium* (Arfin & Umbarger, 1969) und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Synechocystis* PCC 6803 (Proteau *et al.*, 1999), sowie aus *E. coli* (Radykewicz *et al.*, 2000) handelt es sich um eine Klasse B Dehydrogenase. Klasse B Dehydrogenasen transferieren stereospezifisch das H_{si} vom C-4-Atom des Kofaktors auf das Substrat. Weder die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *Z. mobilis* noch von *E. coli* können 1-Deoxyxylulose zu 2-C-Methylerythritol umsetzen. 1-Deoxyxylulose, die in Inkorporationsversuchen in die Prenylseitenkette des Ubichinons von *E. coli* eingebaut wurde (Putra *et al.*, 1998 b), muß demnach vor dem Eintritt in den 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg durch eine Kinase phosphoryliert oder durch das Phosphotransferase-System in die Zelle aufgenommen werden.

Die *dxr* Genregionen von *Z. mobilis* und *E. coli* sind ähnlich organisiert, unterscheiden sich allerdings in der Lokalisation des *dxr* Gens. Das *dxr* Gen von *E. coli* ist von den zwei Leserahmen des möglichen Ribosomenrecycling Faktor TS und der Undecaprenyldiphosphat Synthetase flankiert (Apfel *et al.*, 1999), während das *dxr* Gen von *Z. mobilis* zwischen den Genen für die Phosphatidat-Cytidylyltransferase und der putativen Protease YaeL liegt. In der Nachbarschaft des *dxr* Gens aus *Z. mobilis* konnte kein offener Leserahmen ausgemacht werden, der möglicherweise einen weiteren Schritt in der Biosynthese zum Isopentenylidiphosphat katalysiert. Auch in der Nachbarschaft des *dxr* Gens in den sequenzierten Bakteriengenomen, die nachweislich ein zur 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase und zur 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase homologes Gen besitzen, konnten keine putativen Gene aus dem 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg ausgemacht werden.

Von Fosmidomycin, ein Antibiotikum von *Streptomyces lavendulae*, ist schon längere Zeit bekannt, daß es sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien wirkt (Okuhara *et al.*, 1980). In Konzentrationen von bis zu 12,5 µg/ml hemmt Fosmidomycin das Wachstum von *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi* und *Pseudomonas aeruginosae* (Okuhara *et al.*, 1980). Keine wachstumshemmende Wirkung besitzt Fosmidomycin gegen *Staphylococcus aureus*. Die Substanz zeichnet sich durch eine sehr geringe Toxizität bei Tieren aus (LD₅₀>5g/kg; Okuhara *et al.*, 1980). Erst kürzlich konnten Kuzuyama *et al.* (1998 b) zeigen, daß Fosmidomycin ein spezifischer gemischter Inhibitor der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *E. coli* ist. Der K_i-Wert liegt bei 38 nM. Gegen die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase von *Z. mobilis* wirkt Fosmidomycin als kompetitiver Inhibitor mit einem K_i-Wert von 600 nM. Zum Vergleich, der K_i-Werte des starken kompetitiven Inhibitor Hoe704 (2-Dimethylphosphinoyl-2-hydroxyacetat) der Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase liegt bei 100 nM (Schulz & Taggeselle, 1988). In Versuchen mit reifenden Tomaten und illuminierten etolierten

Weizenkeimlingen wurde die Biosynthese von Carotinoiden und Chlorophyll durch Fosmidomycin gehemmt (Zeidler *et al.*, 1998). Auch die Isoprenemission in *Populus nigra*, *Plantanus x acerifolia* und *Chelidonium majus* wurde durch Fosmidomycin (I_{50} 0,5-1,0 x 10^{-6} M) beeinflusst (Zeidler *et al.*, 1998). In Chromoplasten von *Capsicum annuum* und *Narcissus pseudonarcissus* verhinderte Fosmidomycin den Einbau von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat in die Carotinoide, aber nicht den von 2-C-Methylerythritol 4-phosphat (Fellermeier *et al.*, 1999). Durch das Vorkommen des neuen 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Wegs nur in Pflanzen, Algen und Bakterien stellen seine Enzyme neue Angriffspunkte für Antibiotika und Herbizide dar. Fosmidomycin und ein Strukturhomologon FR-900098 konnten in Tierversuchen schon erfolgreich gegen den Erreger der Malaria *Plasmodium vinckei* eingesetzt werden (Jomaa *et al.*, 1999 a). Plasmodien besitzen ein ungewöhnliches, sich selbst replizierendes Organell, den Apicoplasten (Ridley, 1999). Das Plastiden ähnliche Organell ist assoziiert mit Enzymen, die man auch in bakteriellen und pflanzlichen, nicht aber in tierischen Biosynthesewegen findet – der 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg ist ein solches Beispiel. Mit der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* stehen zwei Testsysteme für neue Inhibitoren zur Verfügung. HOMO-DOX, ein Strukturanalogon des 1-Deoxyxylulose 5-phosphats, zeigte keinen Einfluß auf die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Aktivität. Möglicherweise konnte wegen der fehlenden Phosphatgruppe keine Bindung von HOMO-DOX an das Enzym erfolgen, daher sollen noch Versuche mit phosphorylierter HOMO-DOX unternommen werden. Zudem existieren Überlegungen fluoridierte Substratanaloga als Inhibitoren zu testen. Versuche mit 1-Fluoro- und 1,1-Difluoro-Analoga der 1-Deoxyxylulose beeinflussten *in vivo* das Wachstum von *E. coli* (Bouvert & O'Hagan, 1999) allerdings nicht. Der direkte Einfluß auf die Enzymaktivität wurde noch nicht untersucht. Als Inhibitor für Transketolasen sind derivatisierte Pyruvatverbindungen wie p-Hydroxyphenylpyruvat (Solovjeva & Kochetov, 1999) bekannt. Ein weiteres Pyruvatanalogon AE F 154546 (Agrevo) konnte nachweislich als kompetitiver Inhibitor der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase ausgemacht werden (Bringer-Meyer, persönliche Mitteilung). Allerdings könnten solche Substrathomologe wegen der Ähnlichkeit der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase zu Transketolasen Nebenwirkungen im menschlichen System verursachen. Nicht alle Bakterien synthetisieren Isopentenylidiphosphat über den 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg. So konnte in den Bakterien *Halobacterium cutirubrum*, *Lactobacillus plantarum*, *Myxococcus fulvus* und *Staphylococcus carnosus* der Mevalonat-Weg nachgewiesen werden (Horbach *et al.*, 1993). Für pharmazeutische Anwendungen ist es interessant, mittels eines Screenings mit Fosmidomycin oder anderen Inhibitoren eine Klassifizierung der Bakterien nach dem Vorkommen des alten und neuen Biosynthesewegs vorzunehmen.

4. Steigerung der Zeaxanthinproduktion in *E. coli* durch Expression von Genen des MEP-Wegs

Carotinoide finden neben ihrer natürlichen Aufgabe als Schutzfaktor gegen oxidative Schäden in Pflanzen und Mikroorganismen, auch eine große Anwendung in der Industrie. Sie werden als Nahrungsmittelzusätze, Farbstoffe für Lebensmittel, in pharmazeutischen Produkten und zur Prävention gegen Hautkrebs eingesetzt (Sandmann *et al.*, 1999). In den letzten Jahren sind Bestrebungen unternommen worden, Carotinoide biotechnologisch zu produzieren. Durch das Einbringen des Carotinoid Biosynthese Gencluster aus *Erwinia uredovora* in *E. coli* ist es Misawa *et al.* (1990) gelungen, Carotinoide in *E. coli* zu synthetisieren. Zur Zeit werden solche rekombinanten *E. coli* Stämme noch nicht als Produzenten, aber als Marker zur Identifizierung von Flaschenhälsen in der Biosynthese von Carotinoiden eingesetzt (Harker & Bramley, 1999; Wang *et al.*, 1999; Sandmann *et al.*, 1999). In drei von einander unabhängigen Ansätzen konnte über solche Markersysteme in der Hefe *Pfaffia rhodozyma* und der einzelligen Grünalge *Haematococcus pulchellus* die Isopentenylidiphosphat-Isomerase als limitierendes Enzym ausgemacht werden (Kajiwarra *et al.*, 1997; Verdoes & van Ooyen, 1999; Sun *et al.*, 1998). Es war, wie im Falle dieser Arbeit, das einzige Gen, das im rekombinanten *E. coli*-System eine deutliche Gelbfärbung der Kolonien hervorrief. Die Steigerungen der Carotinoidmengen, die durch die Expression eines heterologen Isopentenylidiphosphat-Isomerase Gens in *E. coli* erzielt wurden, lagen bei einem Faktor von 2,1 (Zeaxanthin) (Verdoes & van Ooyen, 1999), 1,3 (β -Carotin) (Verdoes & van Ooyen, 1999), 1,5, 2,7 und 1,6 (β -Carotin) (Kajiwarra *et al.*, 1999). Die homologe Expression des Isopentenylidiphosphat-Isomerase Gens in *E. coli* ergab eine maximale Steigerung in der Zeaxanthinproduktion um den Faktor 2,9 (Tab.13).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die homologe Expression der Gene *dxs*, *dxr* und *ygbP* aus dem 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg ebenfalls zu einem Anstieg der Zeaxanthinbiosynthese führte, wobei die *dxs* Expression mit einem Faktor von 2,3 den stärksten Einfluß im Vergleich zu *dxr* (1,4) und *ygbP* (1,2) aufwies. In Arbeiten von Harker und Bramley (1999) mit den 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthasen aus *B. subtilis* und *Synechocystis* PCC 6803 konnte durch die Expression der Gene die Menge an Lycopon und Ubichinon 8 in *E. coli* verdoppelt werden. Kombinationsversuche in der vorliegenden Arbeit ergaben, daß die gleichzeitige Expression des Gens der Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus *P. rhodozyma* und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase aus *E. coli* zur höchsten Ausbeute an Zeaxanthin führte. Obwohl die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase, die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase und die CDP-2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Synthase einen meßbaren Einfluß auf den Carotinoidgehalt in *E. coli* haben, konnten die Gene über das Carotinoid-Screeningsystem nicht identifiziert werden. Das Screening erlaubte vom Ansatz her nur die Identifizierung von Genen, die einen limitierenden Schritt in der Synthese von

Isopentenylidiphosphat katalysieren. Ein Vergleich der k_{cat}/K_M -Werte der Isopentenylidiphosphat-Isomerase ($4,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Hahn *et al.*, 1999) mit der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase ($2,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase ($2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Kuzuyama *et al.*, 2000) weist daraufhin, daß die Isopentenylidiphosphat-Isomerase den limitierenden Schritt im 2-C-Methylerythritol 4-phosphat-Weg darstellt. Wegen ihres nicht sichtbaren Einflusses auf die Gelbfärbung der Kolonien sind *ygbP* und *dxr* nicht gefunden worden. Die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase konnte möglicherweise über das Carotinoid-Screening nicht identifiziert werden, da schon die gezielte Expression der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase in *E. coli* aufgrund der vermutlichen Toxizität des Enzymprodukts Schwierigkeiten machte.

Der Identifizierung der Isopentenylidiphosphat-Isomerase über das Carotinoid-Screeningsystem überraschte, da das Isopentenylidiphosphat-Isomerasegen in *E. coli* (Hahn *et al.*, 1999) und *Rhodobacter capsulatus* (Hahn *et al.*, 1996) nicht essentiell ist. Interessanterweise ergeben Datenbankrecherchen, daß sich in den Genomen der Bakterien wie *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *A. aeolicus* (Deckert *et al.*, 1997) und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith *et al.*, 1997) keine Gene mit Sequenzhomologie zur Isopentenylidiphosphat-Isomerase finden, sondern nur in den Bakterien *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* und *Streptomyces coelicolor*. Existiert ein Isoenzym zu der Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus *E. coli*, so zeigt es keinerlei Sequenzähnlichkeiten. Weitere Ungereimtheiten ergeben sich durch Einbauversuche mit 1-Deoxy-[4- ^2H]-xylulose in die Isoprenoidseitenkette des Ubichinon 8 von *E. coli* (Giner *et al.*, 1998). Nach dem Reaktionsmechanismus der Isopentenylidiphosphat-Isomerase und der Prenyltransferasen geht das markierte H-Atom von Position C-4 des 1-Deoxyxylulose 5-phosphat bei der Isomerisierung und Elongation verloren. Versuche mit *Catharanthus roseus* bestätigen diese Eliminierung (Arigoni *et al.*, 1999). In der Isoprenoidseitenkette des Ubichinons in *E. coli* bleibt allerdings ein Deuterium erhalten und zwar in der ursprünglichen Dimethylallyldiphosphat Startereinheit. Alle anderen C_5 -Einheiten, die in Form von Isopentenylidiphosphat bei der Elongation eingebaut werden, zeigen diese Markierung nicht (Giner *et al.*, 1998). Einbauversuche mit [3,5,5,5- $^2\text{H}_4$]-2-C-Methylerythritol 4-phosphat in die Prenylseitenkette des Ubichinons und Menachinons von *E. coli* bestätigen, daß das C-3-H-Atom nur in der Dimethylallyldiphosphat-Einheit erhalten bleibt (Charon *et al.*, 2000). Zudem fanden Charon *et al.*, (2000), daß es zu keinem Deuteriumaustausch zwischen der Position C-4 und C-5 im Isopentenylidiphosphat bzw. Dimethylallyldiphosphat kommt, so wie es in Isopentenylidiphosphat-Isomerase Reaktionen in Pflanzen und Pilzen stattfindet. Sie erklärten das Fehlen dieses Austauschs von Protonen zwischen den Methylgruppen von Isopentenylidiphosphat bzw.

Dimethylallyldiphosphat damit, daß die Isopentenylidiphosphat-Isomerase Aktivität in *E. coli* im Gegensatz zu der aus Pflanzen stereoselektiv ist, oder, was sie unter Berücksichtigung des Deuteriumverlusts an Position C-3 von 2-C-Methylerythritol 4-phosphat für wahrscheinlicher halten, daß Dimethylallyldiphosphat und Isopentenylidiphosphat ausgehend von 2-C-Methylerythritol 4-phosphat über zwei unabhängige Wege synthetisiert werden. Bei Hemmung der Isopentenylidiphosphat-Isomerase in *Mentha x piperita* zeigte sich allerdings, daß Isopentenylidiphosphat und nicht Dimethylallyldiphosphat das Endprodukt des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Wegs ist (McCaskill & Croteau, 1998). Diese Beobachtung ließe sich nicht mit zwei unabhängigen Wegen erklären. Es bleibt demnach noch zu klären, welche Rolle die Isopentenylidiphosphat-Isomerase im MEP-Weg übernimmt.

5. Der 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg

Erst kürzlich sind drei weitere Gene des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Wegs in *E. coli* identifiziert worden (Rodich *et al.*, 1999; Lange & Croteau, 1999 b; Lüttgen *et al.*, 2000; Kuzuyama *et al.*, 2000 b; Herz *et al.*, 2000). Das Intermediat 2-C-Methylerythritol 4-phosphat wird weiter zu 4-Diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol umgesetzt (Abb. 35) (Rodich *et al.*, 1999; Kuzuyama *et al.*, 2000 b). Das Enzym, die 4-Diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol Synthase oder 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Cytidyltransferase, bildet ein Dimer, das Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Co^{2+} als divalente Ionen und CTP als spezifischen Kofaktor benötigt. Das pH-Optimum liegt bei 8,3 (Rodich *et al.*, 1999). CDP-2-C-Methylerythritol wird dann im nächsten Biosyntheseschritt an der Hydroxyl-Gruppe des C-2-Atoms phosphoryliert, so daß 4-Diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol 2-phosphat entsteht. Die ATP abhängige Phosphorylierungsreaktion wird vom YchB Protein aus *E. coli* katalysiert (Lüttgen *et al.*, 2000). Durch das Enzym YgbB wird 4-Diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol 2-phosphat unter Abspaltung von CMP zu 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat zyklisiert (Herz *et al.*, 2000). Das Enzym benötigt Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor.

2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat ist schon lange als eine Substanz bekannt, die in *Corynebacterium ammoniagenes* und anderen pflanzenpathogenen Bakterien bei oxidativen Streß in der Zelle akkumuliert wird (Ostrovsky *et al.*, 1992 a, b, 1994, 1998; Lysak *et al.*, 1999). Bislang wurde 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat als ein „dead end product“ in den Zellen angesehen. Herz *et al.* (2000) konnten jetzt allerdings zeigen, daß $[2-^{14}C]$ -2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat in die Carotinoide von intakten Chromoplasten aus *Capsicum annuum* eingebaut wird. Die Akkumulation von 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat in Gegenwart von Benzylviologen als starkes Oxidationsmittel ist möglicherweise dadurch zu verstehen, daß an der weiteren Umsetzung von 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat zu Isopentenylidiphosphat sauerstoff-

empfindliche Enzyme, wie Fe-S-Proteine beteiligt sind. Ihre Inhibition führt zur Akkumulation des zyklischen Phosphats. Für diese Annahme spricht, daß die Akkumulation des zyklischen Phosphats zu einer Verringerung des Isoprenoidgehalts in Bakterien führt (Ostrovsky *et al.*, 1998).

Weitere Intermediate, die über die Umsetzung von 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat zu Isopentenylidiphosphat bzw. Dimethylallyldiphosphat führen, sind noch nicht bekannt. Über NMR-Untersuchungen kann man allerdings schon Aussagen über das Schicksal eines jeden H-Atoms von Glukose, 1-Deoxyxylulose 5-phosphat oder 2-C-Methylerythritol 4-phosphat zum Isopentenylidiphosphat machen. Aus solchen Untersuchungen weiß man, daß die H-Atome der Methyl-Gruppe (Giner & Jaun, 1998), der Methylengruppe (Stanjek *et al.*, 1999) und das H-Atom vom C-3 aus 1-Deoxyxylulose 5-phosphat in den Isoprenoiden erhalten bleiben, während das H-Atom von der Position C-4 der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat verloren geht (Giner *et al.*, 1998; Proteau, 1998 b). Der Einbau von $[1,1-^2\text{H}_2]$ -2-C-Methylerythritol und $[3,5,5,5-^2\text{H}_4]$ -2-C-Methylerythritol in die Prenylseitenkette von Ubichinon und Menachion von einer *E. coli dxs* Mutante zeigt, daß die C-1 und C-5 H-Atome vollständig eingebaut werden (Charon *et al.*, 2000). Das H-Atom von Position C-3 des 2-C-Methylerythritols (entspricht C-4 der 1-Deoxyxylulose) wird in keiner der vom Isopentenylidiphosphat stammenden Moleküle der Prenylseitenkette wiedergefunden. Zudem zeigen Fütterungsversuche mit $[1-^2\text{H}]$ -Glukose an *Z. mobilis*, daß die H-Atome an Position 4 und 2 in der Isopentenylidiphosphat Einheit aus Reduktionsreaktionen mit NAD(P)H stammen (Charon *et al.*, 1999). Die Markierung an der Position C-4 vom Isopentenylidiphosphat ist mit der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase Reaktion zu erklären. Der zweite Reduktionsschritt ist bislang nicht bekannt. Dieser Schritt erfordert aber ein Einbringen eines pro-S H-Atoms, da das pro-R Wasserstoff vom Isopentenylidiphosphat bei der Isomerase- und Elongationsreaktion verloren geht. Der Verlust des H-Atoms von Position C-4 des 1-Deoxyxylulose 5-phosphats, welches der Position C-3 des 2-C-Methylerythritol 4-phosphats entspricht, könnte durch Oxidation der Hydroxylgruppe zu einer Carbonylgruppe stattfinden. Allerdings erfordert die weitere Umsetzung eher eine Wassereliminierung, die aber aufgrund des Verbleibs der C-4-H-Atome am 2-C-Methylerythritol 4-phosphat nicht zu erklären ist. Der Verbleib der H-Atome gibt Einblick in mögliche Reaktionsschritt, klärt sie aber noch nicht völlig auf.

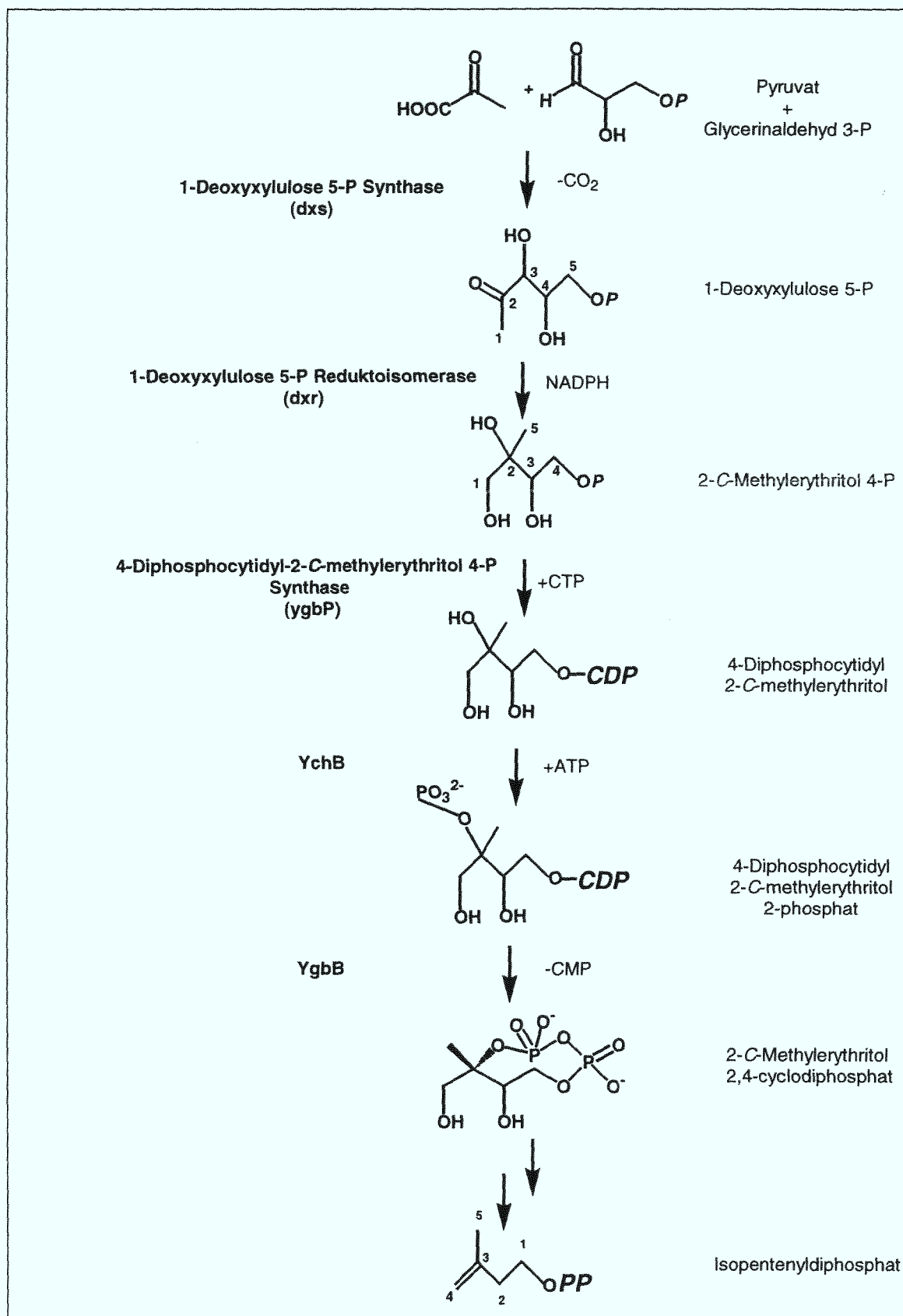


Abb. 35: Biosynthese von Isopentenyl diphosphat über den 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg

Hilfreiche Informationen über weitere Intermediate des MEP-Wegs könnten Arbeiten mit $\gamma\delta$ -T-Zellen bringen. Erst kürzlich konnte die Verbreitung des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Wegs in Bakterien in Zusammenhang mit der Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen gebracht werden (Jomaa *et al.*, 1999 b). $\gamma\delta$ -T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort von Säugetieren bei Infektionen durch Mikroorganismen wie z.B. Mycobakterien, Listeria und Salmonellen (Morita *et al.*, 1999). Sie erkennen nicht-peptidische, niedermolekulare Pyrophosphatverbindungen und Nukleotid-Konjugate als Antigene (Tanaka *et al.*, 1995; Constant *et al.*, 1994; Belmant *et al.*, 1999). Jomaa *et al.* (1999 b) konnten zeigen, daß niedermolekulare Fraktionen von Bakterien, die Isopentenylidiphosphat über den MEP-Weg synthetisieren, $\gamma\delta$ -T-Zellen aktivieren. Die Aktivierung wurde verstärkt, wenn die Bakterien in Gegenwart von 1-Deoxyxylulose kultiviert wurden. Bakterien mit dem Mevalonat-Weg führten zu keiner Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen. 1-Deoxyxylulose, 1-Deoxyxylulose 5-phosphat und 2-C-Methylerythritol 4-phosphat konnten als Antigene ausgeschlossen werden. Allerdings konnten Belmant *et al.* (1999) 3-Formyl 1-butyl-diphosphat und deren Nukleotid-Konjugate als $\gamma\delta$ -T-Zellen aktivierende Substanz identifizieren (Abb. 36). Es ist denkbar, daß diese Verbindung ein weiteres Intermediat im MEP-Weg darstellt.

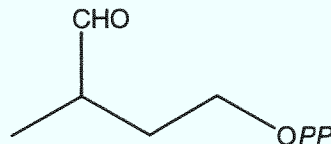


Abb. 36: Struktur der Verbindung 3-Formyl-1-butyl-diphosphat

Neben der Identifizierung von Intermediaten bleibt auch die Frage nach den weiteren Genen und Enzymen des MEP-Wegs. Die bislang bekannten Gene des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Wegs liegen verstreut über das Genom von *E. coli*. Das Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase liegt bei 9 min, für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase bei 4 min, für die 4-Diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol Synthase (YgbP) und für YgbB bei 62 min, sowie für das YchB Protein bei 27 min. Lediglich die Gene *ygbP* und *ygbB* liegen in *E. coli* als ein Operon vor (Rodich *et al.*, 1999). Diese Organisation findet sich auch in vielen anderen Bakterien wie z.B. in *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* und *Mycobacterium tuberculosis*. Bei *Z. mobilis* *Helicobacter pylori*, *Rhodobacter capsulatus* und *Treponema pallidum* treten bifunktionale Proteine mit Domänen sowohl vom YgbP als auch YgbB Protein auf (Herz *et al.*, 2000). In *Aquifex aeolicus*, *Chlamydia trachomatis* und *C. pneumoniae* und weiteren Bakterien liegen die beiden Gene dagegen in unterschiedlichen Genomabschnitten vor (Herz *et al.*, 2000).

Das YchB Protein wurde über systematische Computersuche nach Proteinen, die dem Verbreitungsmuster der *dxs*, *dxr*, *ygbP* und *ygbB* Gene in den sequenzierten Bakteriengenomen folgte, identifiziert (Tab. 19) (Lüttgen *et al.*, 2000). Es zeigte sich schon früh, daß nicht in allen Bakterien der 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg existiert (Horbach *et al.*, 1993) und spätestens seit der Entdeckung der 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (Takahashi *et al.*, 1998) zeichnete sich ein bestimmtes Verbreitungsmuster in den Genomen für die Gene des 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Wegs ab. Auch im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde daher schon früh dieser Ansatz zur Identifizierung weiterer Gene des MEP-Wegs genutzt. Für die Suche wurde die Datenbank „Clusters of orthologous groups of proteins (COGs)“ des „National Centers of Biological Information“ verwendet. Die Suche konzentrierte sich auf Gene mit noch unbekannter bis nur wenig charakterisierter Funktion, eventuell mit möglichen Sequenzmotiven für eine ATP- oder NAD(P)H-Bindestelle. Sequenzhomologien sollten in allen Organismen, in denen das *dxs* und *dxr* Gen vorkommt, verbreitet sein, nicht aber in denen ohne *dxs* bzw. *dxr* Homologa. Es wurden über die Datenbank COGs keine Gene, die diese Kriterien erfüllten, gefunden. Die Gene *yhbB*, *ygbP* und *ygbB*, die an der Umsetzung von 2-C-Methylerythritol 4-phosphat zu 2-C-Methylerythritol 2,4-cyclodiphosphat beteiligt sind, wurden nicht identifiziert, da *yhbB* nicht in *Chlamydia pneumoniae* auftrat und *ygbP* sowie *ygbB* zusätzliche homologe Gene in *Mycoplasma genitalium* und *Mycoplasma pneumoniae* aufwiesen.

Weiteren Einblick in die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat über den 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg werden sicherlich Arbeiten von Kuzuyama *et al.* (2000) bringen. Sie haben in *E. coli* die Gene für die Mevalonat-Kinase, die Phosphomevalonat-Kinase und die Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase aus *Streptomyces* sp. Stamm CL190 transformiert, so daß dieser rekombinante *E. coli* Stamm Mevalonat als Vorstufe für die Isoprenoide nutzen kann. Mutationen, die den MEP-Weg betreffen, sind somit nicht mehr letal für die Zelle, da *E. coli* in Gegenwart von Mevalonat einen partiellen Mevalonat-Weg für die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat nutzen kann. Ein Screening nach Mevalonat-auxotrophen *E. coli* Stämmen, d.h. nach Stämmen mit Defekt im MEP-Weg, führte zur Identifizierung von 33 Mutanten. Eine Mutante trug den Defekt im Gen für die 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Cytidyltransferase (Abb. 35). Die Charakterisierung der 32 weiteren Mutanten ist in Arbeit.

Tab. 19: Verbreitung von Genen aus dem 2-C-Methylerythritol 4-phosphat Weg in den sequenzierten Organismen (Lüttgen *et al.*, 2000), die in der Datenbank COGs (Clusters of orthologous groups of proteins) aufgenommen sind

Organismus	dxs	dxr	ygbP	ygbB	ychB
Bakterien					
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+	+	+
<i>Aquifex aeolicus</i>	+	+	+	+	+
<i>Synechocystis</i> sp.	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>Thermotoga maritima</i>	+	+	+	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	+
<i>Treponema pallidum</i>	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	+	+	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	+	+	+	+	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	+	+	+	+	+
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	-	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>Rickettsia prowazekii</i>	-	-	-	-	-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	-	-	-	-	-
Archaea					
<i>Pyrococcus horikoshi</i>	-	-	+	-	-
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	-	-	-	-	-
<i>Methanococcus jannaschii</i>	-	-	-	-	-
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	-	-	-	-	-
Eukaryont					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

V. Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben eine Reihe von stoffwechselphysiologischen Untersuchungen gezeigt, daß in verschiedenen Bakterien ein neuer Isopentenylidiphosphat-Biosyntheseweg vorhanden ist. Als erste Reaktionsschritte in diesem neuen Weg wurden eine Acyloinkondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat zu 1-Deoxyxylulose 5-phosphat und eine anschließende Umlagerungsreaktion zu 2-C-Methylerythritol 4-phosphat postuliert. Ziel dieser Arbeit war es, die Gene für die Enzyme dieser beiden Stoffwechselreaktionen aus *E. coli* und *Z. mobilis* zu identifizieren und nach weiteren Genen des neuen Biosynthesewegs zu suchen.

1. Das Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase konnte aufgrund von Sequenzhomologien zu Transketolasen im Genom von *E. coli* identifiziert werden. Nach Überexpression dieses Gens in *E. coli* wurde das Enzym isoliert und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen, daß das gereinigte Enzym in einer TPP- und Mg^{2+} -abhängigen Reaktion die spezifische Synthese von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat aus Pyruvat und Glycerinaldehyd 3-phosphat katalysiert (0,53 U/mg Protein). Wie phylogenetische Untersuchungen ergaben, gehört die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase zu einer neuen Familie von TPP-abhängigen Enzymen.
2. Benachbart zu dem Gen für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Synthase liegt auf dem Chromosom von *E. coli* ein Gen für eine mögliche Aldoketoreduktase. Die Inaktivierung dieses Gens ergab allerdings keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp, so daß für dieses Gen keine Funktion im neuen Biosyntheseweg nachgewiesen werden konnte.
3. Das Gen für das zweite Enzym in diesem Stoffwechselweg, die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase, wurde über einen bekannten Sequenzabschnitt aus einer Genbank von *Z. mobilis* identifiziert und kloniert. Nach Überexpression des Gens in *E. coli* wurde das Enzym mittels Affinitätschromatografie gereinigt. Wie eine biochemische Charakterisierung ergab, katalysiert dieses NADPH-abhängige Enzym die Umlagerung und Reduktion von 1-Deoxyxylulose 5-phosphat zu 2-C-Methylerythritol 4-phosphat mit einer spezifischen Aktivität von 19,5 U/mg Protein. Diese Reaktion wird durch das Antibiotikum Fosmidomycin kompetitiv gehemmt ($K_i = 0,6 \mu M$).
4. Über ein Screeningsystem mit einem *E. coli* Stamm, der das Isoprenoid Zeaxanthin bildet, konnte ferner aus einer Genbank von *E. coli* das Gen für die IPP-Isomerase, jedoch leider keine weiteren Gene des neuen Isopentenyl-Biosynthesewegs isoliert werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Adam, K. P., Thiel, R., Zapp, J., Becker, H. (1998). Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde-pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpos natans* and *Conocephalum conicum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **354** (1): 181-187.
- Alm, R. A., Ling, L.-S. L., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**: 176-180.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amore, R., Kötter, P., Küster, C., Ciriacy, M., Hollenberg, C. (1991). Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent xylose reductase-encoding gene (XYL1) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. *Gene* **109**: 89-97.
- Anthonsen, T., Hagen, S., Kazi, M. A., Shah, S. W., Tagar, S. (1976). 2-C-Methyl-erythritol, a new branched alditol from *Convolvulus glomeratus*. *Acta Chem. Scand.* **30** (1): 91-93.
- Apfel, C. A., Takács, B., Fountoulakis, M., Stieger, M., Keck, W. (1999) Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential *uppS* gene. *J. Bacteriol.* **181** (2), 483-492.
- Arfin, S. M., Umbarger, H., E. (1969). Purification and properties of the acetohydroxy acid isomeroreductase of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **244** (5): 1118-1127.
- Arigoni, D., Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewicz, T., Zenk, M. H., Bacher, A. (1999). Dimethylallyl pyrophosphat is the comitted precursor of isopenteyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**: 1309-1314.
- Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 10600-10605.
- Aulabaugh, A., Schloss, J. V. (1990). Oxalyl hydroxamates as reaction-intermediate analogous for ketol-acid reductoisomerase. *Biochemistry* **29**: 2824-2830.
- Bach, T. (1995). Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants – a review. *Lipids*, **30**: 191-202.
- Backstrom, A. D. (1996). The biosynthesis of thiamin in *Escherichia coli* K-12: structural genes for thiamin biosynthetic enzymes (*thiCEFGH* and *thiJ*) and function of the *thiE* gene product. Thesis, Cornell University, USA.
- Belmant, C., Espinosa, E., Poupot, R., Peyrat, M.-A., Guiraud, M., Poquet, Y., Bonneville, M., Fournié, J.-J. (1999). 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate a novel mycobacterial metabolite-activating human $\gamma\delta$ T cells, *J. Biol. Chem.* **274** (45): 32079-32084.
- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13702-13708.
- Beytia, E. D., Porter, J. W. (1976). Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 113-142.
- Biou, V., Dumas, R., Cohen-Addad, C., Douce, R., Job, D., Pebay-Peyroula, E. (1997). The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroreductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1,65 Å resolution. *Embo Journal* **16**: 3405-3415.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A.,

- Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Bloch, K. (1992). Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* **57**: 378-383.
- Blum, H., Beier, H. J., Gross, H. J. (1987). Improved silver staining method of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bohren, K. M., Bullock, B., Wermuth, B., Gabbay, K. H. (1989). The Aldo-keto reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **264** (16): 9547-9551.
- Bohren, K. M., Page, J. L., Shankar, R., Henry, S. P., Gabbay, K. H. (1991). Expression of human aldose and aldehyde reductases. *J. Biol. Chem.* **266**: 24031-24037.
- Bouvert, D., O'Hagan, D. (1999). The synthesis of 1-fluoro- and 1,1-difluoro-analogues of 1-deoxy-D-xylulose. *Tetrahedron Lett.* **55**: 10481-10486.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R. A., Camara, B. (1998). Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.* **117**: 1423-1431.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bringer, S., Finn, K., Sahm, H. (1984). Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **159**: 197-199.
- Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1988). Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biocatalysis* **1**: 321-331.
- Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1989). Junction of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 529-536.
- Broers, S. T. J. (1994). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. Dissertation ETH Nr. 10978. Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz.
- Burnette, W. N. (1981). „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.* **112**: 195-203.
- Cane, D. E., Rossi, T., Tillman, A. M., Pachlatko, J. P. (1981). Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis. Biosynthesis of pentalenolactone from [U-¹³C₆]glucose and [6-²H₂]glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 1838-1843.
- Cardini, C. E., Leloir, L. F. (1962). General procedure for isolation and analyzing tissue organic phosphates. In: *Methods in Enzymology VI*, Academic Press, New York.
- Cartayrade, A., Schwarz, M., Jaun, B., Arigoni, D. (1994). Detection of two independent mechanistic pathways for the early steps of isoprenoid biosynthesis in *Ginkgo biloba*. Poster presented at the 2nd Symposium of the European Network on Plant Terpenoids, Strasbourg, Frankreich.
- Chang, Y.-Y., Cronan, J. E. (1982). Mapping nonselectable genes of *Escherichia coli* by using transposon Tn10: location of a gene affecting pyruvate oxidase. *J. Bacteriol.* **151** (3): 1279-1289.
- Charon, L., Hoeffler, J.-F., Pale-Grosdemange, C., Lois, L.-M., Campos, N., Boronat, A., Rohmer, M. (2000). Deuterium-labelled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem. J.* **346**: 737-742.
- Chester, N., Marshak, D. R. (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **209**: 284-290.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.

- Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.-A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., Fournié, J.-J.** (1994). Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* **264**: 267-270.
- Contin, A., van der Heijden, R., Lefeber, A. W. M., Verpoorte, R.** (1998). The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett.* **434**: 413-416.
- Cvejić, J. H., Rohmer, M.** (2000). CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. *Phytochem.* **53**: 21-28.
- David, S., Estramareix, B., Fischer, J.-C., Thérissod, M.** (1982). The biosynthesis of thiamin. Synthesis of [1,1,1,5-²H₄]-1-deoxy-D-threo-2-pentulose and incorporation of this sugar in biosynthesis of thiazole by *Escherichia coli* cells. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 2131-2137.
- David, S., Estramareix, Fischer, J.-C., Thérissod, M.** (1981). 1-Deoxy-D-threo-2-pentulose: the precursor of the five-carbon chain of thiazole and thiamine. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 7341-7342.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R.** (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**: 353-358.
- Dewick, P. M.** (1999). The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* **16**: 97-130.
- Disch, A., Rohmer, M.** (1998). On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* **168**: 201-208.
- Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M.** (1998). Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem. J.* **333**: 381-388.
- Dittrich, P., Angyal, S. J.** (1988). 2-C-Methyl-D-erythritol in leaves of *Liriodendron tulipifera*. *Phytochemistry.* **27** (3): 935.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Drewke, C., Klein, M., Clade, D., Arenz, A., Müller, R., Leistner, E.** (1996). 4-O-Phosphoryl-L-threonine, a substrate of the *pdxC*(*serC*) gene product involved in vitamin B₆ biosynthesis. *FEBS Lett.* **390**: 179-182.
- Dumas, R., Curien, G., DeRose, R. T., Douce, R.** (1993). Branched-chain-amino-acid biosynthesis in plants: molecular cloning and characterization of the gene encoding acetohydroxy acid isomeroreductase (ketol-acid reductoisomerase) from *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem J.* **294**: 821-828.
- Dumas, R., Joyard, J., Douce, R.** (1989). Purification and characterization of acetohydroxyacid reductoisomerase from spinach chloroplasts. *Biochem. J.* **262**: 971-976.
- Durr, I. F., Shwayri, A. N.** (1964). Metabolism of mevalonic acid by *Lactobacillus plantarum*. *J. Bac.* **88**: 361-366.
- Duvold, T., Calí, P., Bravo, J.-M., Rohmer, M.** (1997 b). Incorporation of 2-C-methyl-D-erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonate-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* **38**: 6181-6184.
- Edman, P., Begg, G.** (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**: 80-91.
- Eichinger, D., Bacher, A., Zenk, M. H., Eisenreich, W.** (1999). Analysis of metabolic pathways via quantitative prediction of isotope labeling patterns: a retrobiosynthetic ¹³C NMR study on the monoterpene loganin. *Phytochem.* **51**: 223-236.
- Eisenreich, W., Menhard, B., Hylands, P. J., Zenk, M. H., Bacher, A.** (1996). Studies of the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6431-6436.

- Eisenreich, W., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A. (1997). Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Lett.* **38** (22): 3889-3892.
- Enzyme Handbook** (1995). D. Schomburg, Salzmann M. (Eds.), Springer-Verlag Berlin, Deutschland.
- Evans, J. A., Prebble, J. N. (1982). The biosynthesis of menaquinone and carotinoids by isolated membranes of *Micrococcus luteus*. *Microbios. Lett.* **21**: 149-159.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Fellermeier, M., Kis, K., Sagner, S., Maier, U., Bacher, A., Zenk, M. H. (1999). Cell-free conversion of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate and 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate into β -carotene in higher plants and its inhibition by fosmidomycin. *Tetrahedron Lett.* **40**: 2743-2746.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly by *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Flesch, G., Rohmer, M. (1988). Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. *Eur. J. Biochem.* **175**: 405-411.
- Fowler, D. J., Hamilton, J. T. G., Humphrey, A. J., O'Hagan, D. (1999). Plant terpene biosynthesis. The biosynthesis of linalyl acetate in *Mentha citrata*. *Tetrahedron Lett.* **40**: 3803-3806.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R. A., Lathigra, R., White, O. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**: 580-586.
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., Gwinn, M. (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**: 375-388.
- Fujisaki, S., Hiroshi, H., Nishimura, Y., Horiuchi, K., Nishino, T. (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., Nishino, T., Katsuki, H. (1986a). Biosynthesis of isoprenoids in intact cells of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **99**: 1137-1146.
- Fujisaki, S., Nishino, T., Katsuki, H. (1986b). Isoprenoid synthesis in *Escherichia coli*. Separation and partial purification of four enzymes involved in the synthesis. *J. Biochem.* **99**: 1327-1337.
- Giner, J.-L., Jaun, B. (1998). Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: retention of the methyl H-atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *Tetrahedron Lett.* **39**: 8021-8022.
- Giner, J.-L., Jaun, B., Arigoni, D. (1998). Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: The fate of the 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *Chem. Commun.* 1857-1858.
- Goncalves de Lima, O., Schumacher, I. E., De Aranjó, J. M. (1972). New observation about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife* **12**: 57-69.
- Gray, J. C. (1987). Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Adv. Bot. Res.* **14**: 25-91.
- Hahn, F. M., Baker, J. A., Poulter, C. D. (1996). Open reading frame 176 in the photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus* encodes *idi*, a gene of isopentenyl diphosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **178**: 619-624.
- Hahn, F. M., Hurlburt, A. P., Poulter, C. D. (1999). *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **181** (15): 4499-4504.
- Halgand, F., Dumas, R., Biou, V., Andrieu, J.-P., Thomazeau, K., Gagnon, J., Douce, R., Forest, E. (1999). Characterization of the conformational changes of acetohydroxy acid isomeroreductase induced by the binding of Mg^{2+} ions, NADPH, and a competitive inhibitor. *Biochemistry* **38**: 6025-6034.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harker, M., Bramley, P. M.** (1999). Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett.* **448**: 115-119.
- Hawkins, C. F., Borges, A., Perham, R. N.** (1989). A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* **225**: 77-82.
- Hemmi, H., Ohnuma, S., Nagaoka, K., Nishino, T.** (1998). Identification of genes affecting lycopene formation in *Escherichia coli* transformed with carotenoid biosynthetic genes: candidates for early genes in isoprenoid biosynthesis. *J. Biochem.* **123**: 1088-1096.
- Hermans, M. A. F., Neuss, B., Sahm, H.** (1991). Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. *J. Bac.* **173**: 5592-5595.
- Herz, S., Wungsintaweeikul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphat to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclophosphate. *Proc. Acad. Nat. Sci. USA*, in press.
- Heß, D.** (1991). Terpenoide. In: *Pflanzenphysiologie*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Hill, R. E., Himmeldirk, K., Kennedy, I. A., Pauloski, R. M., Sayer, B. G., Wolf, E., Spenser, I. D.** (1996). The biogenetic anatomy of vitamin B₆. *J. Biol. Chem.* **271**: 30246-30435.
- Hill, R. E., Sayer, B. G., Spenser, I. D.** (1989). Biosynthesis of vitamin B₆: Incorporation of D-1-deoxyxylulose. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 1916-1917.
- Himmeldirk, K., Kennedy, I. A., Hill, R. E., Sayer, B. G., Spenser, I. D.** (1996). Biosynthesis of vitamins B₁ and B₆ in *Escherichia coli*: concurrent incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into thiamin (B₁) and pyridoxal (B₆). *Chem. Commun.* 1187-1188.
- Hochuli, E.** (1990). Purification of recombinant proteins with metal chelat absorbents. In *Genetic Engineering: Principles and Methods* **12**: 87-98.
- Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A.** (1987). New metal chelate absorbents selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatography* **411**: 177-184.
- Hofler, J. G., Decedue, C. J., Luginbuhl, G. H., Reynolds, J. A., Burns, R. O.** (1975). The subunit structure of α -acetohydroxyacid isomeroreductase from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **250** (3): 877-882.
- Horbach, S., Neuss, B., Sahm, H.** (1991). Effect of azasqualene on hopanoid biosynthesis and ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**: 347-350.
- Horbach, S., Sahm, H., Welle, R.** (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: Two different pathways? *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 135-140.
- Horwitz, J. P., Chua, J., Curby, R. J., Tomson, A. J., DaRooge, M. A., Fisher, B. E., Mauricio, J., Klundt, I.** (1964). Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indoyl- β -D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **7**: 574.
- Iida, A., Teshiba, S., Mizobuchi, K.** (1993). Identification and characterization of the tktB gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175** (17): 5375-5383.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jacobsen, H., Klenow, H., Overgaard-Hansen, K.** (1974). The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **45** (2): 623-627.
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., Penning, T. M.** (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* **326**: 625-636.
- Jomaa, H., Feuerle, J., Lühs, K., Kunzmann, V., Tony, H.-P., Herderich, M., Wilhelm, M.** (1999b). V γ 9/V δ 2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends

on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **25**: 371-378.

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

Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K., Misawa, N. (1997). Expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **324**: 421-426.

Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Olinger, L., Grimwood, J. (1998). Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. Program in infectious disease, University California, Berkeley, USA. Accession: NC_00922.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein coding regions. *DNA Res.* **3** (3): 109-136.

Kannenbergh, E. L., Poralla, K. (1999). Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* **86**: 168-176.

Kawachi, T., Rudney, H. (1970). Solubilization and purification of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. *Biochemistry* **9** (8): 1700-1705.

Kellogg, B. A., Poulter, C. D. (1997). Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 570-578.

Kerstens, K., DeLey, J. (1986). The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *J. Microbiol. Serol.* **31**: 393-406.

Kiritani, K., Narise, S., Wagner, R. P. (1966). The reductoisomerase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **241** (9): 2047-2051.

Kleinig, H., Reichenbach, H. (1973). Biosynthesis of carotinoid glucoside esters in *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*): Inhibition by nicotine and carotinoid turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **306**: 249-256.

Knöss, W., Reuter, B., Zapp, J. (1997). Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochem. J.* **326**: 449-454.

Komeda, Y., Tanaka, M., Nishimune T. (1988). A *thi-1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is defective for a thiamine-phosphate-synthesizing enzyme: thiamine phosphate pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **88**: 248-250.

Kortluke, C., Breese, K., Gad'on, N., Labahn, A., Drews, G. (1997). Structure of the *puf* operon of the obligately aerobic, bacteriochlorophyll α -containing bacterium *Rhodobacter capsula* *puf* *puc* deletion mutant. *J. Bacteriol.* **179** (17): 5247-5258.

Kringstad, R., Singsaas, A. O., Rusten, G., Baekkemoen, G., Paulsen, B. S., Nordal, A. (1980). 2-C-Methylaldotetrionic acid, a new lactone-forming acid present in plants. *Phytochemistry* **19**: 543-545.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 246-256.

Kushwaha, S. C., Kates, M. (1979). Studies of the biosynthesis of C_{50} carotenoids in *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1292-1297.

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

Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Dairi, T., Seto, H. (2000b). Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-

erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **41**: 703-706.

Kuzuyama, T., Takagi, M., Takahashi, S., Seto, H. (2000a). Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. strain CL190, which uses both the mevalonate and non-mevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182** (4): 891-897.

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

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

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

Lange, B. M., Croteau, R. (1999b). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proc. Acad. Nat. Sci. USA* **96** (24) : 13714-13719.

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

Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., Schwender, J., Disch, A., Seemann, M. (1997a). A novel mevalonate-independent pathway for the biosynthesis of carotenoids, phytol and prenyl chain of plastoquinone-9 in green algae and higher plants. In: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids* p. 177-182. (Williams, J. P., Khan, M. U. Ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology* 148: 357-373. Packer, L., Douce, R. (eds). Academic Press, San Diego, USA.

Lichtenthaler, H. K. (1998). The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Fett/Lipid* **100** (4/5): 128-138.

Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997b). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**: 271-274.

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

Luthra, R., Luthra P. M., Kumar, S. (1999). Redefined role of mevalonate-isoprenoid pathway in terpenoid biosynthesis in higher plants. *Curr. Sci.* **76** (2): 133-135.

Lüttgen, H., Rodich, F., Herz, S., Wungsintaweeikul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A., Eisenreich, W. (2000). Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Prod. Acad. Nat. Sci. USA* **97** (3): 1062-1067.

Lynen, F., Agranoff, B. W., Eggerer, H., Henning, U., Möslin, E. M. (1959). γ - γ -Dimethylallyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat, biologische Vorstufen des Squalens. *Angew. Chem.* **71**: 657-663.

Lysak, E. I., Demina, G. R., Matveeva, E. V., Ogrel, O. D., Trutko, S. M., Ostrovskii, D. N. (1999). Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate in bacteria. *Microbiol.* **68** (1): 1-9.

- Madhosingh, C. Orr, W.** (1978). Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. Purification and properties of the enzyme from *Fusarium oxysporum*. *Biochim. Biophys. Acta* **523**: 283-296.
- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., León, P.** (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* **9**: 649-658.
- McCaskill, D., Croteau, R.** (1999). Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Tetrahedron Lett.* **40**: 653-656.
- McCormack, T., McCormack, K.** (1994). Shaker K⁺ channel β subunits belong to an NAD(P)H-dependent oxidoreductase superfamily. *Cell* **79**: 1133-1135.
- McHale, N. A., Hanson, K. R., Zeltich, I.** (1988). A nuclear mutation in *Nicotina sylvestris* causing a thiamine-reversible defect in synthesis of chloroplast pigments. *Plant Physiol.* **88**: 930-935.
- Mikosch, T.** (1999). Blottingverfahren und Hybridisierung. S. 245. In: *Genetische Methoden 2.* Auflage. Gassen, H. G., Schrimpf, G. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Milborrow, B. V., Lee, H.-S.** (1998). Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI* Carotenoids and ABA are formed by the 'non-mevalonate' triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**: 507-512.
- Miller, B., Heuser, T., Zimmer, W.** (1999). A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. *FEBS Lett.* **460**: 485-490.
- Miller, V. L., Mekalanos, J. J.** (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K.** (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovara* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172** (12): 6704-6712.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., Miki, W.** (1995). Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* **177**: 6575-6584.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Lanen, H., Bukau, B.** (1999). Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK und ClpB. *EMBO J.* **18** (24): 6934-6949.
- Morita, C. T., Lee, H. K., Leslie, D. S., Tanaka, Y., Bukowski, J. F., Märker-Hermann, E.** (1999). Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by human $\gamma\delta$ T cells. *Microbes and Infection* **1**: 175-186.
- Mrachko, G. T., Chunduru, S. K., Calvo, K. C.** (1992). The pH dependence of the kinetic parameters of ketol acid reductoisomerase indicates a proton shuttle mechanism for alkyl migration. *Arch. Biochem. Biophys.* **294** (2): 446-453.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K.** (1999). Direct Submission. The Institute of Genomic Research, Rockville, USA. Accession: AE000512.
- Newton, C. R., Graham, A.** (1994). PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Okuhara, M., Kuroda, Y., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H.** (1980). Studies on new phosphonic acid antibiotics. III. Isolation and characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J. Antibiotics* **33** (1): 24-28.

- Ostrovsky, D., Diomina, G., Lysak, E., Matveeva, E., Ogrel, O., Trutko, S. (1998). Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains. *Arch. Microbiol.* **171**: 69-72.
- Ostrovsky, D., Diomina, G., Shipanova, I., Sibeldina, L., Shashkov, A. (1994). Bacterial oxidative stress substance spontaneously recycles to form 2-methylbutane-1,2,3,4-tetraol-1,2-cyclophospho-4-phosphate. *BioFactors*. **4** (3/4): 155-159.
- Ostrovsky, D., Kharatian, E., Dubrovsky, T., Ogrel, O., Shipanova, I., Sibeldina, L. (1992b). The ability of bacteria to synthesize a new cyclopyrophosphate correlates with their tolerance to redox-cycling drugs: on a crossroad of chemotherapy, environmental toxicology and immunobiochemical problems. *BioFactors*. **4** (1): 63-68.
- Ostrovsky, D., Kharatian, E., Malarova, I., Shipanova, I., Sibeldina, L., Shashkov, A., Tantsirev, G. (1992a). Synthesis of a new organic pyrophosphate in large quantities is induced in some bacteria by oxidative stress. *BioFactors*. **3** (4): 261-264.
- Pandian, S., Saengchjan, S., Raman, T. S. (1981). An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochem. J.* **196**: 675-681.
- Piel, J., Donath, J., Bandemer, K., Boland, W. (1998). Induzierte und konstitutiv emittierte Pflanzendüfte: Mevalonat-unabhängige Biosynthese terpenoider Duftstoffe. *Angew. Chem.* **110** (18): 2622-2625.
- Proebsting, W. M., Maggard, S. P., Guo, W. W. (1990). The relationship of thiamine to the *Alt* locus of *Pisum sativum* L. *J. Plant Physiol.* **13**: 231-235.
- Proteau, P. J., Woo, Y.-H., Williamson, R. T., Phaosiri, C. (1999). Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate isomeroreductase. *Org. Lett.* **1**: 921-923.
- Proteau, P.J. (1998). Biosynthesis of Phytol in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470: Utilization of the Non-mevalonate Pathway. *J. Nat. Prod.* **61**: 841-843.
- Proteau, P.J. (1998). Probing the non-mevalonate pathway to phytol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470 using deuterium-labeled glucose. *Tetrahedron Lett.* **39**: 9373-9376.
- Putra, S. R., Disch, A., Bravo, J.-M., Rohmer, M. (1998a). Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some Gram-negative bacteria and mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 169-175.
- Putra, S. R., Lois, L. M., Campos, N., Boronat, A., Rohmer, M. (1998b). Incorporation of [2,3-¹³C₂]- and [2,4-¹³C₂]-D-1-deoxyxylulose into ubiquinone of *Escherichia coli* via the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**: 23-26.
- Qureshi, N., Porter, J. W. (1981). Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. In: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. (Porter, J. W. und Spurgeon, S.L. Eds.). John Wiley and Sons, New York **1**: 47-93.
- Radykewicz, T., Rodich, F., Wungsintaweeikul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H., Arigoni, D. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS Lett.* **465**: 157-160.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., Hopwood, D. A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21** (1): 77-96.
- Reiser, J., Muheim, A., Hardegger, M., Frank, G., Fiechter, A. (1994). Aryl-alcohol dehydrogenase from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **269**: 28152-28159.
- Richter, G. (1988). Isoprenoide. In: *Stoffwechselphysiologie der Pflanze*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Ridley, R. G. (1999). Planting the seeds of new antimalarial drugs. *Science* **285**: 1502-1503.

- Rieder, C., Strauß, G., Fuchs, G., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (1998). Biosynthesis of the diterpene verrucosan-2 β -ol in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Biol. Chem.* **273**: 18099-18108.
- Rodich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1999). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (21): 11758-11763.
- Rohmer, M. (1993). The biosynthesis of triterpenoids of the hopane series in the Eubacteria: A mine of new enzyme reactions. *Pure & Appl. Chem.* **65** (6): 1293-1298.
- Rohmer, M. (1998). Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? *Progress in drug research* **50**: 135-154.
- Rohmer, M. (1999). The discovery of the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**: 565-574.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**: 517-524.
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1996). Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118** (11): 2564-2566.
- Rohmer, M., Sutter, B., Sahm, H. (1989). Bacterial Sterol Surrogates. Biosynthesis of the Side-chain of Bacteriohopanetetrol and of a Carbocyclic Pseudopentose from ¹³C-Labelled Glucose in *Zymomonas mobilis*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1471-1472.
- Rondeau, J.-M., Tête-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J.-M., Barth, P., Biellmann, J. F., Moras, D. (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **355**: 469-472.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C.-I., Banaszak, L. J. (1975). Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. In: *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed), 3rd Ed. Academic Press **11**: 61-102.
- Sagner, S., Eisenreich, W., Fellermeier, M., Latzel, C., Bacher, A., Zenk, M. H. (1998). Biosynthesis of 2-C-Methyl-D-erythritol in Plants by Rearrangement of the Terpenoid Precursor, 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *Tetrahedron Lett.* **39**: 2091-2094.
- Sagner, S., Latzel, c., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1998). Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into monoterpenes and carotenoids in higher plants. *Chem. Commun.* 221-222.
- Sahm, H., Rohmer, M., Bringer-Meyer, S., Sprenger, G. A., Welle, R. (1993). Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**: 247-273.
- Sambrook, J., Fritsch, F., Maniatis, T. (1989). In: *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Sandmann, G., Albrecht, M., Schnurr, G., Knörzer, O., Böger, P. (1999). The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Tibtech* **17**: 233-237.
- Sanger, F., Nickeln, S., Coulson, A. R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santos, H., Fareleira, P., Pedregal, C., LeGall, J., Xavier, A. V. (1991). In vivo ³¹P-NMR studies of *Desulfovibrio* species. *Eur. J. Biochem.* **201**: 283-287.
- Sanyal, I., Lee, S.-L., Flint, D. H. (1994). Biosynthesis of pimeloyl-CoA, a biotin precursor in *Escherichia coli*, follows a modified fatty acid synthesis pathway: ¹³C-labeling studies. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 2637-2638.
- Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie* (7. Auflage). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Schörken, U.** (1997). Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Transketolasen und Transaldolasen, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus *Escherichia coli*. Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Jül-3418.
- Schulz, A., Spönemann, P., Köcher, H., Wengenmayer, F.** (1988). The herbicidally active experimental compound Hoe 704 is a potent inhibitor of the enzyme acetolactate reductoisomerase. *FEBS Lett.* **238** (2): 375-378.
- Schulz, A., Taggeselle, P.** (1988). The experimental herbicide Hoe 704 inhibits the biosynthesis of branched chain amino acids and pantoate in *Klebsiella pneumoniae*. In: Biosynthesis of branched chain amino acids. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Schwarz, M. K.** (1994). Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: eine überraschende Geschichte. Dissertation, ETH Nr. 10951, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz.
- Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K.** (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **455**: 140-144.
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M.** (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* **316**: 73-80.
- Schwender, J., Zeidler, J., Gröner, R., Müller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F. W., Lichtenthaler, H. K.** (1997). Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* **414**: 129-134.
- Segel, I. H.** (1975). Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley-Interscience Publication, New York, USA.
- Seto, H., Orihara, N., Furihata, K.** (1998). Studies on the Biosynthesis of Terpenoids Produced by Actinomycetes. Part 4. Formation of BE-40644 by the Mevalonate and Non-Mevalonate Pathways. *Tetrahedron Lett.* **39** : 9497- 9500.
- Seto, H., Watanabe, H., Furihata, K.** (1996). Simultaneous Operation of the mevalonate and non-mevalonate pathway in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioovifer*. *Tetrahedron Lett.* **37** (44): 7979-7982.
- Shah, S. W., Brandänge, S., Behr, D., Dahmén, J., Hagen, S., Anthonsen, T.** (1976). Absolute configuration of 2-C-methylerythritol from *Convolvulus glomeratus*. *Acta Chem. Scand.* **B30**: 903.
- Shchipanova, I. N., Kharat'yan, E. F., Sibel'dina, L. A., Ogrel', O. D., Ostrovskii, D. N.** (1992). On the nature of a new energy-storing compound formed in bacteria in response to oxidative stress. *Biokhimiya.* **57** (6): 862-872.
- Shigemori, H., Komaki, H., Yazawa, K., Mikami, Y., Nemoto, A., Tanaka, Y., Kobayashi, J.** (1999). Biosynthesis of diterpenoid moiety of brasilicardin A via non-mevalonate pathway in *Norcadia brasiliensis*. *Tetrahedron Lett.* **40**: 4353-4354.
- Silhavy, T. J., Berman, M., Enquist, L. W.** (1993). Experiments with gene fusions, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H.-M., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R.** (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179** (22): 7135-7155.
- Solovjeva, O. N., Kochetov, G. A.** (1999). Inhibition of transketolase by p-hydroxyphenylpyruvate. *FEBS Lett.* **462**: 246-248.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **8**: 503-517.
- Sprenger, G. A.** (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**: 301-307.

- Sprenger, G. A.** (1991). Cloning and preliminary characterization of the transketolase gene from *Escherichia coli* K-12. In: Bisswanger H., Ullrich, J. (eds) Biochemistry and physiology of thiamin diphosphate enzymes. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 322-326.
- Sprenger, G. A.** (1995). Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. Arch. Microbiol. **164**: 324-330.
- Sprenger, G. A.** (1992). Localisation of the transketolase (*tkt*) gene on the *Escherichia coli* physical map. J. Bacteriol. **174**:1707-1708.
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., DeGraaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S., Sahm, H.** (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 12857-12862.
- Spurgeon, S. L., Porter, J. W.** (1981). Introduction. In: Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. (Porter, J. W. und Spurgeon, S.L. Eds.). John Wiley and Sons, New York 1: 1-46.
- Stanjek, V., Piel, J., Boland, W.** (1999). Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae). Phytochem. **50**: 1141-1145.
- Stephens, P. E., Darlison, H. M., Lewis, H. M., Guest, J. R.** (1983). The pyruvate dehydrogenase complex in *Escherichia coli* K-12. Nucleotide sequence encoding dihydrolipoamide acetyltransferase component. Eur. J. Biochem. **133**: 481-489.
- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C. J., Fan, J., Aravind, L., Mitchell, W. P.** (1998). Direct Submission. Program in infectious disease, University California, Berkeley, USA. Accession: AE001273.
- Summers, R. G., Donadio, S., Staver, M. J., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C. R., Katz, L.** (1997). Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. Microbiol. **143**: 3251-3262.
- Sun, Z., Cunningham, F. X., Gantt, E.** (1998). Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerase and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. Prod. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 11482-11488.
- Swings, J., de Ley, J.** (1977). The biology of *Zymomonas mobilis*. Bacteriol. Rev. **41**: 1-46.
- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., Seto, H.** (1998). A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 9879-9884.
- Tanaka, S., Lerner, S. A., Lin, E. C. C.** (1967). Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. J. Bacteriol. **93**: 642-648.
- Tanaka, Y., Morita, C.T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M. B., Bloom, B. R.** (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells, Nature **375**: 155-158.
- Taylor, S. V., Vu, L. D., Begley, T. P., Schörken, U., Grolle, S., Sprenger, G. A., Bringer-Meyer, S., Sahm, H.** (1998). Chemical and enzymatic synthesis of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. J. Org. Chem. **63**: 2375-2377.
- Thiel, R., Adam, K. P., Zapp, J., Becker, H.** (1997). Isopentenyl diphosphate biosynthesis in liverworts. Pharm. Pharmacol. Lett. **7** (2/3): 103-105.
- Thorne, K. J. I., Kodicek, E.** (1966). The structure of bactoprenol, a lipid formed by *Lactobacilli* from mevalonic acid. Biochem. J. **99**: 123-127.
- Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A.** (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature **388**: 539-547.

- Turner, D. L., Santos, H., Fareleira, P., Pacheco, I., LeGall, J., Xavier, A.V. (1992). Structure determination of a novel cyclic phosphocompound isolated from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biochem. J.* **285**: 387-390.
- Ullmann, A., Jacob, F., Monod, J. (1967). Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **24**: 339.
- Verdoes, J. C., van Ooyent, A. J. J. (1999). Isolation of the isopentenyl diphosphate isomerase encoding gene of *Phaffia rhodozyma*; improved carotenoid production in *Escherichia coli*. *Acta Bat. Gallica* **146**: 43-53.
- Vieira, L., Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Wang, C.-W., Oh, M.-K., Liao, J. C. (1999). Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **62** (2): 235-241.
- Weber, K., Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **224**: 4406-4412.
- White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H. (1999). Genome sequence of the radioresistance bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**: 1571-1577.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yokata, A., Sasajima, K. (1986). Formation of 1-deoxy-ketoses by pyruvate dehydrogenase and acetoin dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* **50** (10): 2517-2524.
- Yokata, A., Sasajima, K. (1984). Formation of 1-deoxy-D-threo-pentulose and 1-deoxy-L-threo-pentulose by cell-free extracts of microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **48** (1): 149-158.
- Youvan, D. C., Bylina, E. J., Alberti, M., Begusch, H., Hearst, J. E. (1984). Nucleotide and deduced polypeptide sequence of the photosynthetic reaction-center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *Rhodobacter capsulatus*. *Cell* **37** (3), 949-957.
- Zeidler, J. G., Lichtenthaler, H. K., May, H. U., Lichtenthaler, F. W. (1997). Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z. Naturforsch.* **52c**: 15-23.
- Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C., Wiesner, J., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H., Lichtenthaler, H. K. (1998). Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z. Naturforsch.* **53c**: 980-986.
- Zepeda, S., Monasterio, O., Ureta, T. (1990). NADP⁺-dependent D-xylose dehydrogenase from pig liver. *Biochem. J.* **266**: 637-644.
- Zhao, G., Winkler, M. E. (1994). An *Escherichia coli* K-12 *tktA tktB* mutant deficient in transketolase activity requires pyridoxine (vitamin B₆) as well as the aromatic amino acids and vitamins for growth. *J. Bacteriol.* **176** (19): 6134-6138.
- Zhou, D., White, R. H. (1991). Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **273**: 627-634.

VII. Anhang

Die in dieser Arbeit ermittelte Nukleotidsequenz des Gens für die 1-Deoxyxylulose 5-phosphat Reduktoisomerase aus *Z. mobilis* ist in der EMBL-Genbank unter der Accession Nummer CAB60758 vollständig aufgeführt und ist nachfolgend abgebildet.

```
1  ATGAGTCAGC CAAGAACAGT CACTGTTTTA GGGGCGACCG GATCCATTGG TCATTCAACA
61 CTGGATTTAA TCGAACGGAA TTTAGATCGG TATCAGGTCA TCGCTTTGAC CGCCAACCGC
121 AATGTCAAAG ATCTGGCCGA TCGGGCGAAA AGAACGAATG CCAAGCGGGC GGTTATCGCT
181 GACCCGTCGC TTTATAATGA TCTGAAAGAG GCTTTGGCCG GAAGCTCTGT TGAGGCAGCC
241 GCGGGTGCTG ATGCCTTGGT CGAAGCCGCC ATGATGGGTG CCGATTGGAC AATGGCAGCC
301 ATTATCGGTT GCGCCGGTCT AAAAGCGACG CTTGCAGCTA TTCGCAAGGG CAAAACGGTC
361 GCTTTAGCGA ATAAGGAATC CTTAGTTTCA GCTGGTGGCT TGATGATCGA TGCCGTGCGG
421 GAACATGGCA CGACGCTTCT TCCTGTCGAT TCCGAGCATA ACGCTATTTT CCAATGCTTC
481 CCGCATCATA ATCGCGACTA TGTTGCGCGG ATTATTATTA CGGCCAGCGG AGGTCCCTTC
541 AGAACAAAGT CTCTTGCCGA AATGGCAACG GTCACGCCAG AACGCGCGGT TCAGCATCCC
601 AACTGGTCAA TGGGTGCCAA AATTTCTATC GATTCTGCTA CAATGATGAA TAAAGGGCTT
661 GAATTGATAG AAGCCTTTCA TCTCTTCCAG ATTCCATTAG AAAAATTTGA AATTTTGGTT
721 CATCCTCAGT CAGTTATTCA CTCCATGGTG GAATATTTGG ATGGTTCTAT CCTTGCCAG
781 ATCGGTAGTC CTGATATGAG AACACCGATC GGTCATACTT TGGCTTGGCC AAAGCGGATG
841 GAAACACCAG CCGAATCGTT GGATTTTACC AAATTGCGCC AGATGGATTT TGAGGCACCG
901 GATTATGAAC GTTTTCCGGC ATTAACCTTG GCAATGGAAT CCATCAAATC AGGTGGGGCT
961 CGTCTGCGG TAATGAATGC CGCTAATGAA ATAGCTGTGG CGGCCTTCCT TGATAAGAAA
1021 ATCGGTTTTT TTGATATCGC TAAAATTGTC GAGAAAACAT TAGATCATTA TACACCCGCA
1081 ACCCGTCTT CTTTGGAAGA TGTCTTTGCG ATTGACAATG AAGCGCGGAT ACAAGCCGCT
1141 GCTTTAATGG AGAGTTTGCC CGCGTGA
```


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

Danksagung

Herrn Prof. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Alfermann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Stephanie Bringer-Meyer für ihre fachliche und moralische Unterstützung während der Promotion und für die Durchsicht des Manuskripts für die vorliegende Arbeit.

Bei Herrn Prof. Sandmann, Universität Frankfurt, bedanke ich mich für die freundliche Unterweisung in die Carotinoid-Extraktion und für das Überlassen der notwendigen Plasmide für das Carotinoid-Screeningsystem.

Herrn Dr. A. de Graaf danke ich für die NMR-Messungen.

Bei der „Bringer-family“ Lotti, Ute und Svenja möchte ich mich für die herzliche Freundschaft, für die vielen lustigen Stunden im Labor und auch fernab der KFA, und für die gute fachliche Zusammenarbeit bedanken. Frau Chmielus danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei meiner Arbeit.

Anja, Ines und Petra (für die „brenzligen“ und fröhlichen Essen und sonstigen gemeinsamen Unternehmungen), Johannes, Sybille und Britta (für die nette Kaffeerunde), Uli (für die gute Starthilfe in Sachen DXS-Reinigung), Melanie und Martin (für pETdxs) und allen anderen Mitarbeitern der AG Sprenger danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die fröhliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn S. Peters möchte für die fotografischen Arbeiten und sein unermüdliches Bestreben, das Beste aus einem Foto zu machen, danken.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre am Institut und die ständige Hilfsbereitschaft möchte ich allen Mitarbeitern des IBTs danken.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich in all den Jahren meiner Ausbildung immer unterstützt und ermutigt haben.

Die Arbeit wurde in Teilen von der Firma Agrevo gefördert.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3799
Juli 2000
ISSN 0944-2952

