Forschungszentrum Jülich



Institut für Biotechnologie

1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *Escherichia coli*: Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktionsbeziehungen

Martin Schürmann

Jül-3904

1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *Escherichia coli*: Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktionsbeziehungen

Martin Schürmann

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3904
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3904
D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli*: Biochemical characterization and structure/function-relationships

1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) from *Escherichia coli* catalyses the committed enzymatic step in the biosynthesis of thiamin, pyridoxal and isopentenyl diphosphate in a thiamin diphosphate (ThDP) dependent acyloin condensation of pyruvate and D-glyceraldehyde 3-phosphate (D-GAP). The aim of this work was to investigate the biochemical properties and the relationship of structure and function of DXS from *E. coli* as the first member of a new family of ThDP enzymes. Furthermore it was intended to analyse the possibility to employ the enzyme in chemo-enzymatic synthesis, since enzymes with ThDP as a cofactor have proven to be versatile tools in the organic synthesis of chiral building blocks and natural products. DXS was purified to apparent homogeneity as a fusion protein containing a carboxy-terminal his-tag at high yields. The enzyme showed a broad pH-spectrum ranging from pH 5.5 to 10.5 and a half-life of more than 47 days at 4°C in a Hepes buffer. DXS is reacting with a ping pong mechanism and has a high affinity towards its cofactors ThDP (K_M = 0.3 µM) and Mg^{2+} (K_M < 10 µM). The conversion of the physiological substrates pyruvate and D-GAP is catalysed with 4.3 U/mg protein and K_M-values of 0.10 and 0.44 mM by DXS, respectively. The enzyme could be used for the racemic resolution of D,L-glyceraldehyde, since only the D-form was converted with a specific activity of 4.3 U/mg and a K_M value of 10.4 mM. Hydroxypyruvate and α-ketobutyrate are competitive inhibitors of DXS with K_i values of 2.4 mM and 6.5 mM, respectively. Moreover they are alternative donor substrates with respect to pyruvate, which are converted with 0.3 U/mg and 0.1 U/mg, respectively. Short-chain aldehydes and aldoses from C_2-C_5 like glycolaldehyde and D-erythrose 4-phosphate served as alternative acceptor substrates and are converted at high rates of 71% and 84% respectively compared to D-glyceraldehyde. The complete conversion of pyruvate and D-ribose 5-phosphate with DXS yielded 1-deoxy-D-sedoheptulose 7-phosphate. A disaccharide of glucose and 1-deoxy-D-xylulose was synthesised in a coupled enzymatic reaction with DXS and sucrose synthase from *Solanum tuberosum*. The DXS from *E. coli* constitutes a homodimer of 142 kDa and shows similarities in domain structure and substrate binding to transketolases. A working model of the substrate channel of DXS was built comparing DXS and transketolase sequences with respect to known transketolase structures and verified by site-directed mutagenesis. Glu370 is responsible for the activation of ThDP and Phe107 for donor substrate binding. The histidine residues 49 and 257 are involved in catalysis, while Asp427 interacts with the C2-OH of the acceptor substrate. Arg478 complexes the phosphate group of acceptor substrates. Unphosphorylated substrates are converted with higher efficiency by a Arg478Gln mutein compared to wildtype DXS.

1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *Escherichia coli*: Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktionsbeziehungen

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) von *Escherichia coli* katalysiert in einer Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängigen Acyloin-Kondensation von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (D-GAP) die Eingangsreaktion der Biosynthesen zu Thiamin, Pyridoxal und Isopentenyldiphosphat. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften und der Zusammenhänge von Struktur und Funktion der DXS von *E. coli* als erstem Vertreter einer neuen Familie von ThDP-Enzymen. Weiterhin sollte die Einsatzmöglichkeit des Enzyms in chemo-enzymatischen Synthesen analysiert werden, da sich andere Enzyme, die ThDP als Kofaktor aufweisen, als vielseitige Werkzeuge in der organischen Synthese von chiralen Bausteinen und Naturstoffen erwiesen. Die DXS wurde mit einer Ausbeute von über 80% als Fusionsprotein mit carboxyterminalem His-tag mittels Ni^{2+}-Affinitätschromatographie in einem Schritt bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Enzym wies ein breites pH-Spektrum von 5,5 bis 10,5 und eine Halbwertszeit in Hepes-Puffer von über 47 Tagen bei 4°C auf. Die in einem Ping-Pong-Mechanismus reagierende DXS hat eine hohe Affinität zu ihren Kofaktoren ThDP (K_M = 0,3 µM) und Mg^{2+} (K_M < 10 µM). Die Reaktion der physiologischen Substrate Pyruvat und D-GAP wird von der DXS mit 4,3 U/mg Protein und K_M-Werten von 0,10 bzw. 0,44 mM katalysiert. Das Enzym konnte zur Racematspaltung von D,L-Glycerinaldehyd verwendet werden, da es alleine die D-Form mit einer spezifischen Aktivität von 4,3 U/mg und einem K_M-Wert von 10,4 mM umsetzt. Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat sind mit K_I-Werten von 2,4 mM bzw. 6,5 mM sowohl kompetitive Inhibitoren als auch alternative Donorsubstrate zu Pyruvat, die mit 0,3 U/mg bzw. 0,1 U/mg umgesetzt werden. Als alternative Akzeptorsubstrate werden kurze Aldehyde und Aldosen von C_2-C_5 wie Glykolaldehyd und D-Erythrose-4-Phosphat akzeptiert und mit Hydroxypyruvat als Donorsubstrat mit hohen Raten von 71% bzw. 84% verglichen mit D-Glycerinaldehyd umgesetzt. Mit der DXS konnte Pyruvat und D-Ribose-5-Phosphat vollständig zu 1-Desoxy-D-sedoheptulose-7-Phosphat umgesetzt werden. In einer gekoppelten enzymatischen Synthese mit der DXS und Saccharose Synthase aus *Solanum tuberosum* wurde ein Disaccharid aus Glukose und 1-Desoxy-D-xylulose dargestellt.
Die DXS von *E. coli* bildet ein Homodimer von 142 kDa und weist in seinem Domänenaufbau sowie bei der Substratbindung Ähnlichkeiten mit Transketolasen auf. Ein Substratkanal-Modell für die DXS wurde erstellt und durch ortsgerichtete Mutagenese überprüft. Glu370 ist für die Aktivierung von ThDP und Phe107 für die Donorsubstrat-Bindung verantwortlich. Die Histidinreste 49 und 257 sind an der Katalyse beteiligt, während Asp427 wahrscheinlich mit dem C2-OH des Akzeptorsubstrats interagiert. Arg478 komplexiert die Phosphatgruppe des Akzeptorsubstrats. Mit dem Arg478Gln-Mutein konnten unphosphorylierte Substrate effizienter umgesetzt werden als mit Wildtyp-DXS.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung 1

II Material und Methoden 13

1. Bakterienstämme und Plasmide 13

2. Chemikalien und Enzyme 15

2.1 Chemikalien 15

2.2 Enzyme 15

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen 16

3.1 Nährmedien 16

3.2 Medienzusätze und Kultivierungsbedingungen 17

4. Molekularbiologische Methoden 17

4.1 DNA-Präparation 17

4.2 DNA-Restriktion und -Ligation 17

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 18

4.4 Transformation von *E. coli* 19

4.5 Identifizierung rekombinanter *E. coli*-Zellen 19

4.6 DNA-Sequenzierung 20

4.7 Ortsgerichtete Mutagenese 21

4.8 Erzeugung von *dxs*-/*tktA*-Fusionen 22

5. Proteinbiochemische Methoden 23

5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 23

5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 23

5.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen 23

5.4 Aufschluss von *E. coli*-Zellen 24

5.5 Chromatographische Proteinreinigung 25

5.6 Dynamische Lichtstreuung von Proteinen 26

5.7 Ultrafiltration von Proteinen 26

6. Enzymaktivitäts-Bestimmungen 27

6.1 „High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) 27

6.2 Photometrische Enzymtests 28

7. LC-ESI-MS 29

8. Enzymatische Synthese mit der DXS und Saccharose-Synthase 29

9. Protein-Kristallisierung 30

III Ergebnisse **31**

1. Biochemische Charakterisierung der 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthase **31**

1.1 Überexpression und Reinigung 31

1.2 Temperatur, pH-Wert und Puffer beeinflussen die Aktivität und Stabilität 35

1.3 DXS hat eine hohe Affinität zu den Kofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+} 38

1.4 Enzymkinetik der DXS gegenüber ihren physiologischen Substraten 40

1.5 Die DXS-Reaktion verläuft nach einem Ping-Pong-Mechanismus 43

1.6 Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat sind kompetitive Inhibitoren der DXS 43

2. Substratspektrum und enzymatische Synthesen **46**

2.1 Donorsubstrat-Spektrum der DXS 46

2.2 Umsetzung von alternativen Akzeptorsubstraten 48

2.3 Synthese einer 1-Desoxyheptulose-7-P mit der DXS 51

2.4 Synthese eines Disaccharids mit DXS und Saccharose-Synthase 53

3. Bakterielle 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen **55**

3.1 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *Zymomonas mobilis* 55

3.2 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *Thermotoga maritima* 56

4. Struktur-Funktionsbeziehungen der DXS aus *Escherichia coli* **58**

4.1 DXS ist ein Homodimer 58

4.2 Ansätze zur Kristallisierung der DXS 60

4.3 Ortsgerichtete Mutagenese der DXS 61

4.4 Erzeugung von enzymatisch aktiven DXS/TKT-Hybridenzymen 70

IV Diskussion **73**

V Zusammenfassung **96**

VI Literatur **98**

VII Anhang **110**

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-2-Indoylphosphat
BL	BL21(DE3)
BLCP	BL21(DE3) CodonPlus RIL
BLS	BL21(DE3) pLysS
bp	Basenpaare
d	Tag
Da	Dalton
DHE	Dihydroxyethyl
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DX(P)	1-Desoxy-D-xylulose(-5-Phosphat)
DXR	1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase
DXS	1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase
EDTA	Ethylendiamenintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
h	Stunde
HE	Hydroxyethyl
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography"
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalaktopyranosid
k_{cat}	Wechselzahl (Anzahl der Katalysen pro Zeiteinheit), Einheit = [1/s]
K_D	Dissoziations-Konstante
K_i	Inhibitorische Konstante, Einheit = [M]
K_M	Michaelis-Konstante, Einheit = [M]
LC	"Liquid Chromatography"
min	Minuten
MEP	2-*C*-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MS	Massenspektroskopie
NAD(H)	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
nt	Nukleotid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Pyruvat-Decarboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDH-E1	E1-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes
PEG	Polyethylenglykol
P_i	anorganisches Phosphat
PP_i	Pyrophosphat
-P	Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SuSy	Saccharose Synthase
Tab.	Tabelle
ThDP	Thiamindiphosphat
TKT	Transketolase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit) in [µmol/min]
UDP	Uridindiphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
V_{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit, Einheit = [U/mg]
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-ß-D-galaktosid

Aminosäuren

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

Nukleobasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

I Einleitung

Enzyme als Katalysatoren in der organischen Synthese

In den letzten Jahren haben Enzyme als Biokatalysatoren in chemischen Prozessen zunehmend an Bedeutung gewonnen (Koeller & Wong, 2001; Schmid et al., 2001). Ihre Vorteile gegenüber klassischen chemischen Synthesen beruhen auf den zumeist milderen Reaktionsbedingungen, bei denen Enzyme aktiv sind. Enzymatische Reaktionen finden im Gegensatz zu vielen chemischen Reaktionen in neutralen, wässrigen Lösungen, bei Raumtemperatur und unter normalen Druckverhältnissen statt. Dies reduziert zum einen Abwasserbelastungen durch organische Lösungsmittel und Salze und macht zum anderen Prozessführungen unter extremen und dadurch kostenintensiven physikalischen Bedingungen unnötig. Aufgrund der zumeist ähnlichen Reaktionsbedingungen von Enzymen sind multienzymatische Prozesse zur Synthese komplexerer Verbindungen möglich. Der Aufbau von Enzymen aus einer Vielzahl der 20 verschiedenen Aminosäuren, die bis auf Glycin alle chiral sind, schafft die strukturelle Grundlage für eine weitere vorteilhafte Eigenschaft von Enzyme gegenüber den meisten chemischen Reaktionen: Enzyme sind in der Lage, polyfunktionale Moleküle wie zum Beispiel Kohlenhydrate selektiv zu binden und sowohl regio- als auch enantioselektiv umzusetzen, während in chemischen Reaktionen zumeist der aufwendige Einsatz von Schutzgruppen nötig ist (Walsh, 2001; Koeller & Wong, 2001; Schmid et al., 2001).

Die Kohlenhydrate stellen in der organischen Synthese eine interessante Stoffklasse dar, da sie in biologischen und pharmazeutischen Prozessen sowie als Bausteine für weitere chemo-enzymatische Synthesen von besonderer Bedeutung sind, aufgrund ihrer Vielzahl funktioneller Gruppen und Stereozentren auf rein chemischem Wege aber schwer zugänglich sind. In der chemo-enzymatischen Synthese von Kohlenhydraten und Kohlenhydrat-Derivaten haben sich neben C-O- und C-N-Bindungen knüpfenden Enzymen vor allem die C-C-Bindungen knüpfenden Enzyme der Klasse der Aldolasen sowie die Thiamindiphosphat-abhängigen Transketolasen als vielfältig einsetzbare Werkzeuge erwiesen (Drueckhammer et al., 1991; Takayama et al., 1997; Machajewski & Wong, 2000; Turner, 2000). Innerhalb der Gruppe von Enzymen, die den Kofaktor Thiamindiphosphat (ThDP) aufweisen, befinden sich mehrere C-C-Bindungen spaltende und knüpfende Enzyme mit

ausgeprägtem synthetischen Potential. So haben Transketolasen sowie Pyruvat-Decarboxylasen (PDC) und Benzoylformiat-Decarboxylasen (BFD) aus unterschiedlichen Organismen Anwendungen in organischen Synthesen gefunden (Schörken & Sprenger, 1998; Iding et al., 1998; Sprenger & Pohl, 1999).

Transketolasen (EC 2.2.1.1) katalysieren als Enzyme des Pentosephosphat-Weges den reversiblen Transfer einer Dihydroxyethyl-Gruppe („aktivierter Glykolaldehyd") von einem Ketose-Donorsubstrat auf ein Aldose-Akzeptorsubstrat. Auf diese Weise werden die Akzeptorsubstrate Ribose-5-Phosphat bzw. Erythrose-4-Phosphat mit dem Donorsubstrat Xylulose-5-Phosphat zu Sedoheptulose-7-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgesetzt (Wood, 1985). Das synthetische Potential der Transketolasen beruht zum einem auf der hohen Anzahl tolerierter nicht-physiologischer Akzeptorsubstrate (Schörken & Sprenger, 1998; Sprenger & Pohl, 1999; Turner, 2000) und zum anderen auf der enantioselektiven Bildung von Produkten mit 3*S*,4*R* (D-*threo*)-Konfiguration (Kobori et al., 1992). Die Verwendung von Hydroxypyruvat als Donor einer Dihydroxyethyl (DHE)-Gruppe ermöglicht durch die Abspaltung von CO_2 eine Verlagerung des Gleichgewichts auf die Seite der Produkte und dadurch vollständige Umsetzungen der Substrate (Srere et al., 1958; Abb. 1).

Neben den physiologischen Zuckerphosphat-Substraten werden auch unphosphorylierte α-Hydroxyaldehyde und α-Hydroxyaldehyde, die mit Azido-, Nitro-, Thio- oder Fluorofunktionen substituiert sind, von Transketolasen aus verschiedenen Organismen umgesetzt (Demuynck et al., 1991; Kobori et al., 1992; Dalmas & Demuynck, 1993; Hecquet et al., 1994; Schörken, 1997). Ebenso werden Aldehyde ohne α-Hydroxyylgruppe, darunter auch aromatische und ungesättigte, von Transketolasen toleriert (Demuynck et al., 1991; Hobbs et al., 1994; Morris et al., 1996, Schörken 1997). Die Transketolasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und Spinat fanden bereits in der Synthese des Glykosidase-Inhibitors Fagomin (Effenberger & Null, 1992, Hecquet et al., 1994) und der Darstellung des Käfer-Pheromons (+)-*exo*-Brevicomin (Myles et al., 1991) Anwendung, wobei Transketolase jeweils benutzt wurde, um Stereozentren in die Moleküle einzubringen. In einer effizienten Multi-Enzym-Ein-Topf Synthese wurde die Transketolase von *Escherichia coli* zur Herstellung von D-Xylulose-5-Phosphat eingesetzt (Zimmermann et al., 1999).

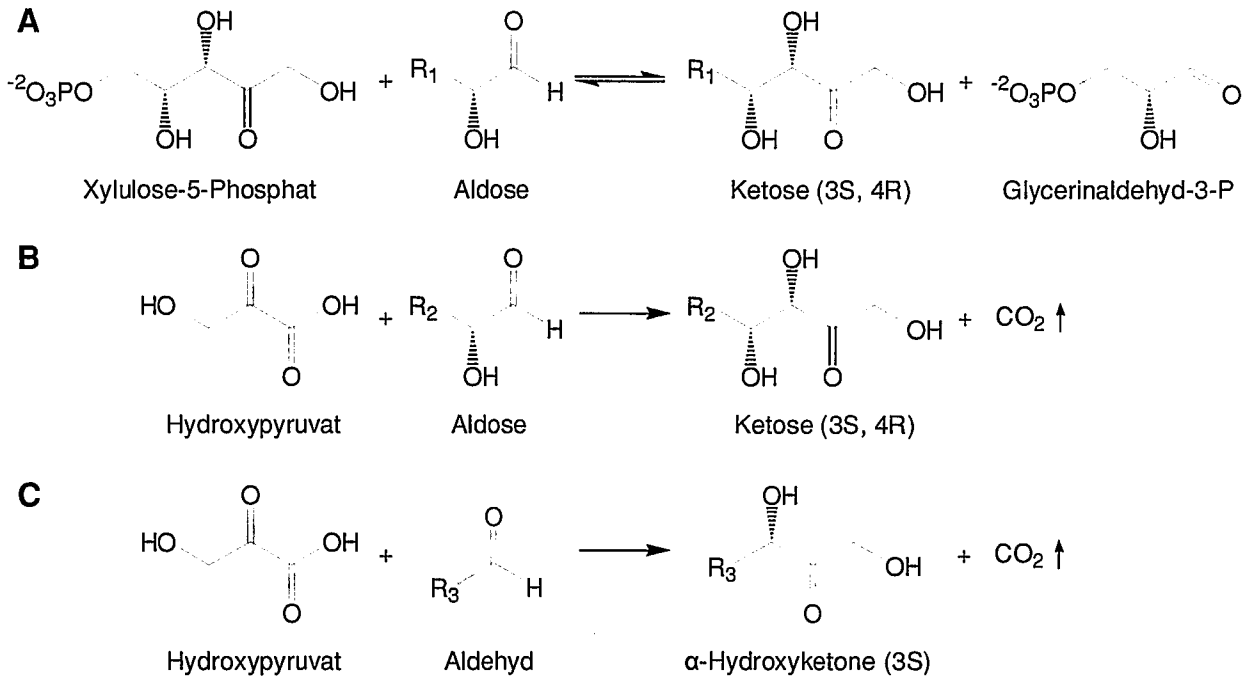


Abb. 1: Transketolase-katalysierte physiologische und nicht-physiologische Reaktionen. A: reversible, physiologische Reaktionen, R_1 = -CHOH-$CHOPO_3^{2-}$ oder - CHOH-CHOH-$CHOPO_3^{2-}$. **B:** Reaktionen mit dem Donorsubstrat Hydroxypyruvat und unterschiedlich substituierten α-Hydroxyaldehyden als Akzeptorsubstraten (Nitro-, Fluoro-, Thio-, Azido- und Desoxyzucker). **C:** Umsetzung von Hydroxypyruvat mit Aldehyden ohne α-Hydroxyylgruppe; Hydroxylierte, thiolierte und ungesättigte sowie aromatische Reste (R_3) werden toleriert.

Pyruvat-Decarboxylasen (PDC, EC 4.1.1.1) und Benzoylformiat-Decarboxylasen (BFD, EC 4.1.1.7) weisen in einer Nebenreaktion zur Decarboxylierung von Pyruvat und Mandelsäure ebenfalls Carboligase-Aktivität auf (Hanc & Kakac, 1956; Bringer-Meyer & Sahm, 1988; Wilcocks et al., 1992). Beide Enzyme sind in der Lage, Aldehyde an den ThDP-Kofaktor zu binden und auf Aldehyd-Akzeptorsubstrate zu übertragen. Bei der Umsetzung von Acetaldehyd und Benzaldehyd mit der BFD von *Pseudomonas putida* entstehen (*S*)-2-Hydroxypropiophenon [(*S*)-2-HPP] und (*R*)-Benzoin (Abb. 2) in hohen Enantiomeren-Überschüssen (Wilcocks et al., 1992; Iding et al., 1998), während PDC von *Zymomonas mobilis* aus diesen Substraten racemisches Acetoin und (*R*)-Phenylacetylcarbinol [(*R*)-PAC] (Abb. 2) mit einem Enantiomeren-Überschuss von über 98% herstellt (Pohl, 1997).

(*R*)-PAC ist eine Vorstufe des L-Ephedrin, die bislang in Ganzzell-Transformationen durch die C-C-knüpfende Aktivität der PDC in Hefe gewonnen wird (Knoll-Prozedur, Hildebrandt & Klavehn, 1932). Im Gegensatz zur enzymatischen Synthese von (*R*)-PAC treten in den Ganzzell-Transformationen mit Hefen neben Acetoin noch eine Reihe weiterer Nebenprodukte auf, die über 50% des Gesamtansatzes

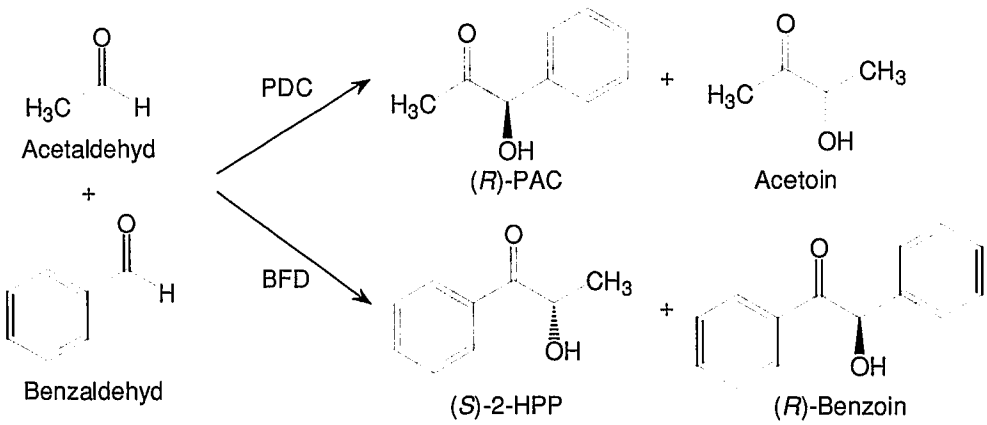


Abb. 2: Reaktionsprodukte von PDC/BFD mit Acetaldehyd und Benzaldehyd.

ausmachen können (Iding et al., 1998). Dieses Beispiel unterstreicht den Vorteil definierter enzymatischer Synthesen gegenüber Ganzzell-Biotransformationen, die komplexe metabolische Systemen aufweisen und dadurch zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten führen können.

Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

Thiamindiphosphat ist als biologisch aktive Form des Vitamins B_1 (Thiamin) ein essentieller Kofaktor in einer Reihe von Enzymen. Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme katalysieren eine grosse Bandbreite unterschiedlicher Reaktionen *in vivo*. Transketolasen katalysieren die reversible Umwandlung von Zuckerphosphaten, während α-Ketosäuredecarboxylasen ihre Produkte nach Abspaltung von CO_2 entweder freisetzen (Pyruvat-Decarboxylase, Benzoylformiat-Decarboxylase) oder nach einer Oxidierung freisetzen (Pyruvat-Oxidase) bzw. auf einen Akzeptor übertragen wie in Pyruvat-Dehydrogenasen. Die ebenfalls ThDP-abhängigen 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen übertragen nach Decarboxylierung von Pyruvat in einer Acyloin-Kondensation eine Hydroxyethyl-Gruppe („aktivierter Acetaldehyd") auf das Zuckerphosphat D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Trotz zum Teil erheblicher struktureller Unterschiede der Substrate der ThDP-Enzyme wird in allen eine C-C-Bindung in Nachbarschaft zu einer Carbonyl-Funktion durch einen nukleophilen Angriff des ThDP-Kofaktors gespalten.

ThDP ist aus drei chemisch unterschiedlichen Teilen aufgebaut (Abb. 3): Einem Diphosphat-Rest (PP), der der Verankerung über ein zweiwertiges Metallion dient (Lindqvist et al., 1992), einem Pyrimidinring (Pyr), der für die Verankerung und die Aktivierung des Kofaktors benötigt wird (Kern et al., 1997), sowie einem

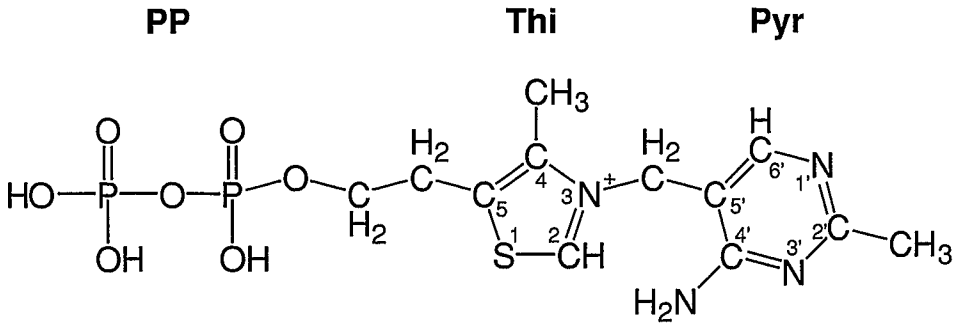


Abb. 3: Strukturformel und Nomenklatur von Thiamindiphosphat.
Pyr: Pyrimidinring, **Thi:** Thiazoliumring, **PP:** Diphosphat

Thiazoliumring (Thi), dessen C2 das katalytisch aktive Atom von ThDP aufweist (Breslow, 1958).

Die Kristallstrukturen mehrerer ThDP-abhängiger Enzyme darunter die der Transketolase von *S. cerevisiae* (Lindqvist et al., 1992), der Pyruvat-Oxidase von *Lactobacillus plantarum* (Muller & Schulz, 1993) und der Pyruvat-Decarboxylase aus *S. uvarum* (Dyda et al., 1993) wurden aufgeklärt. Ein Vergleich dieser drei Strukturen zeigte, dass die Bindung von ThDP in allen drei Enzymen über ein vergleichbares Strukturelement, die ThDP-Bindungsfalte, erfolgt (Muller et al., 1993). In allen diesen Strukturen weist der ThDP-Kofaktor V-Konformation auf, während freies ThDP vorwiegend in der F-Konformation vorliegt (Pletcher & Sax, 1972). Obwohl die Enzyme nur geringe Sequenzähnlichkeiten aufweisen, nehmen die Domänen, die den Diphosphat-Teil komplexieren (PP-Domänen) bzw. den Pyrimidinring binden (Pyr-Domänen), eine identische Faltung ein. Der Diphosphat-Teil des ThDP wird dabei jeweils von der PP-Domäne einer Untereinheit gebunden, während der Pyrimidinring mit der Pyr-Domäne einer zweiten, identischen Enzym-Untereinheit interagiert. Neben der geringen Gesamtähnlichkeit von Transketolase, Pyruvat-Oxidase und Pyruvat-Decarboxylase ist auch die Abfolge der Domänen innerhalb der Proteine unterschiedlich. Auf die aminoterminale Pyr-Domäne folgt in Transketolase die PP-Domäne und eine carboxyterminale Domäne bislang unbekannter Funktion (Schneider & Lindqvist, 1998), während die N-terminale PP- und die C-terminale Pyr-Domänen in Pyruvat-Decarboxylase und Pyruvat-Oxidase von Mitteldomänen unterbrochen werden, die der Bindung eines Aktivators (Dyda et al., 1993) bzw. eines FAD-Moleküls (Muller & Schulz, 1993) dienen.

Durch die Arbeit von Breslow (1958) wurde deutlich, dass das C2-Atom des Thiazoliumrings das reaktive Atom des Kofaktors darstellt, welches als Carbanion einen nukleophilen Angriff auf das C2 des Substrates durchführt. Der erste Schritt

zur Ausbildung des C2-Carbanions (Abb. 4) ist die Protonierung des N1' des Pyrimidinrings durch einen in ThDP-Enzymen konservierten Glutamatrest (Glu418 der Hefe-Transketolase, Glu51 der Hefe-PDC; Kern et al., 1997). Aufgrund der resultierenden Ladungsverschiebung im Pyrimidinring kann die 4'-Aminogruppe durch eine basische Aminosäure wie His481 der Hefe-Transketolase (Lindqvist et al., 1992) deprotoniert und als Iminogruppe ein Proton vom C2-Atom des Thiazoliumrings abstrahieren. In diesem carbanionischen Zustand ist es dem Thiazolium-C2 möglich, einen nukleophilen Angriff auf eine Substrat-Carbonylgruppe durchzuführen. Die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Thiazolium-C2 und dem Carbonyl-Kohlenstoff führt zur Spaltung einer C-C-Bindung im Substrat und Freisetzung eines Substrat-Fragmentes sowie zur Bildung eines carbanionischen Restsubstrat/ThDP-Intermediates. Je nach Art des Enzyms wird dieses Restsubstrat aus dem Intermediat entweder freigesetzt (PDC), auf ein Akzeptorsubstrat übertragen (Transketolase, 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase), oxidiert und freigesetzt (Pyruvat-Oxidase) oder oxidiert und auf einen Akzeptor transferiert (Pyruvat-Dehydrogenase).

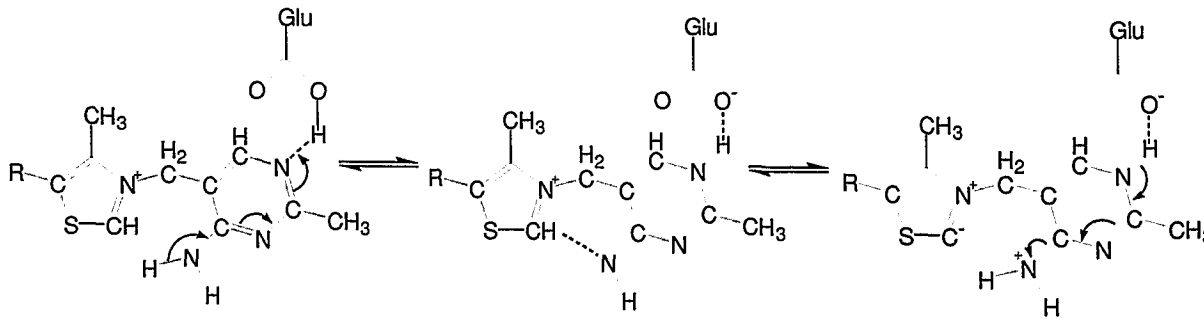


Abb. 4: Aktivierung von Thiamindiphosphat in Enzymen. Erläuterungen im Text.

Transketolase und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase

Transketolasen stellen mit den Pyruvat-Decarboxylasen und -Dehydrogenasen die wohl am besten untersuchten ThDP-abhängigen Enzyme dar. Die Transketolasen von *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden kristallisiert und ihre dreidimensionale Struktur aufgeklärt (Lindqvist et al., 1992; Nikkola et al., 1994; Littlechild et al., 1995). Durch die Kombination von ortsgerichteter Mutagenese, Proteinkristallogaphie, enzymkinetischen Untersuchungen und Struktur-Modellierungen sind Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus sowie die Enzym/Kofaktor- und die Enzym/Substrat-Interaktionen bei Transketolasen gewonnen worden (für eine Zusammenfassung siehe Schneider & Lindqvist, 1998; Schörken, 1997).

Transketolasen bilden Homodimere und binden an der Grenzfläche beider Untereinheiten zwei Moleküle Thiamindiphosphat, von denen jedes durch Wechselwirkungen mit der Pyr-Domäne der einen und der PP-Domäne der anderen Untereinheit und umgekehrt komplexiert wird (Lindqvist et al., 1992). Über ein Netzwerk von konservierten Glutamatresten (Glu418, Glu162 und Glu167) und Wassermolekülen sind die ThDP-Moleküle in beiden aktiven Zentren der Hefe-Transketolase miteinander verbunden und können so den Reaktionszustand des anderen aktiven Zentrums wahrnehmen und kooperativ katalytisch aktiv werden (Schneider & Lindqvist, 1998; Kovina & Kochetov; 1998). Über einen dieser konservierten Glutamatreste, Glu418, erfolgt die Aktivierung des ThDP-Kofaktors (Wikner et al., 1994; Kern et al., 1997). Das Ketose-Donorsubstrat wird durch eine Reihe von Wechselwirkungen mit Aminosäuren des aktiven Zentrums im Substrat-Kanal optimal zum ThDP-Kofaktor positioniert, von dem nur das aktive C2-Carbanion des Thiazoliumrings dem Substrat-Kanal zugänglich ist (Lindqvist et al., 1992).

Die Phosphatgruppe des Donorsubstrats wird in den Transketolasen von Hefe und *E. coli* durch Komplexierung mit den Aminosäureresten Arg359, Arg528, Ser386 und His469 bzw. Arg359, Arg521, Ser386 und His462 fixiert (Abb. 5, Nilsson et al., 1997; Schörken, 1997). Die Aspartatreste an den Positionen 477 der Hefe- und 470 der *E. coli*-Transketolase sind durch eine Wasserstoffbrücke zum Donorsubstrat-C4 dafür verantwortlich, dass enantioselektiv Substrate mit (*R*)-Konfiguration an C4 umgesetzt werden (Nilsson et al., 1997; Schörken, 1997; Nilsson et al., 1998). Durch den nukleophilen Angriff des Thiazolium-C2-Carbanions auf das Donorsubstrat-C2 und die Spaltung der Substrat-C2-C3-Bindung können His30 und His263 der Hefe-Transketolase das Proton der C3-Hydroxylgruppe abstrahieren (Wikner et al., 1997). Dadurch bildet sich eine Carbonylgruppe am früheren C3 bzw. dem C1 der entstandenen Aldose aus, welche daraufhin freigesetzt wird. Die an ThDP kovalent gebundene Dihydroxyethyl (DHE)-Gruppe wird durch Wasserstoffbrücken-Bindungen mit His69 und H103 stabilisiert (Wikner et al., 1995; Wikner et al., 1997).

Die Übertragung der DHE-Gruppe von ThDP auf das Akzeptorsubstrat läuft im Prinzip als Umkehrung der ersten Teilreaktion ab. Die Akzeptor-Aldose wird an ihrer Phosphatgruppe durch die selben Aminosäurereste wie das Donorsubstrat fixiert und durch eine Wasserstoffbrücke von Asp477 bzw. Asp470 mit der C2-Hydroxylgruppe des Akzeptorsubstrates werden selektiv Substrate mit D-Konfiguration umgesetzt (Nilsson et al., 1997; Schörken, 1997; Nilsson et al., 1998). Die C1-Carbonylfunktion

des Akzeptors wird durch His30 und His263 (His26 und His262 der *E. coli*-Transketolase) protoniert, wodurch der nukleophile Angriff der carbanionischen DHE-Gruppe auf das C1-Atom der Akzeptor-Aldose erleichtert wird (Wikner et al., 1997). Nach der Freisetzung des zweiten Produktes aus dem Substrat-Kanal kann der nächste katalytische Zyklus erfolgen.

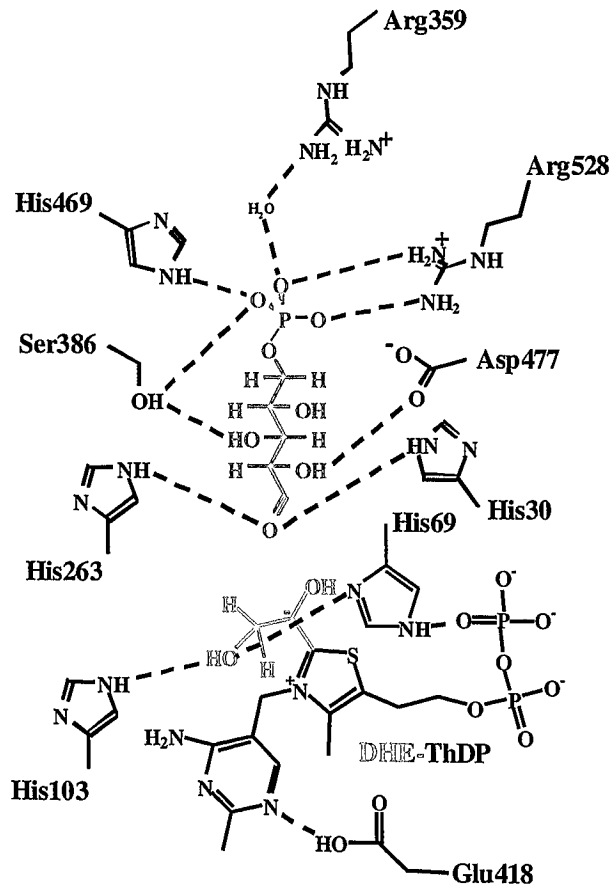


Abb. 5: Substratkanal und Protein/Kofaktor-Interaktionen der Transketolase von *S. cerevisiae*. Verändert nach Nilsson et al., 1997 und Schörken, 1997.

In einer Nebenreaktion setzen Hefe-Transketolase und ihre His103-Muteine Pyruvat als Donorsubstrat um (Feurle et al. 1998; S. Thorell, persönliche Mitteilung). Die Produkte dieser Reaktionen stellen, je nach Akzeptorsubstrat, neben CO_2 phosphorylierte oder unphosphorylierte 1-Desoxyketosen wie 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat (1-Desoxy-D-*threo*-pentulose-5-Phosphat, DXP) im Falle des Akzeptorsubstrates D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (D-GAP) dar. Vergleichbare Nebenaktivitäten weisen ebenfalls die E1-Untereinheiten von Pyruvat-Dehydrogenasen (PDH-E1) verschiedener Bakterien auf (Yokota & Sasajima, 1986). 1-Desoxy-D-xylulose (DX) bzw. die an C5 phosphorylierte Form ist eine biosynthetische Vorstufe für Thiamindiphosphat, Pyridoxalphosphat sowie

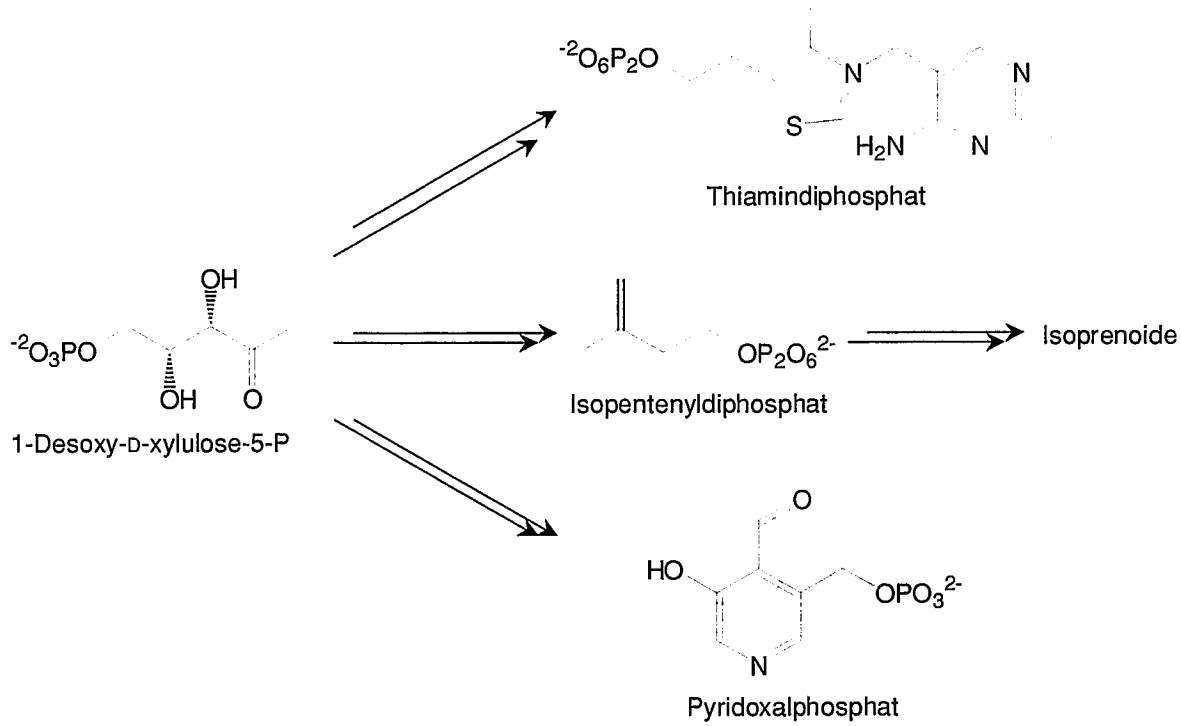


Abb. 6: 1-Desoxy-D-xylulose-5-P ist eine Vorstufe in den Biosynthesen zu Thiamindiphosphat, Pyridoxalphosphat und Isopentenyldiphosphat in *E. coli*.

Isopentenyldiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat, den Vorläufern aller Isoprenoide in *E. coli* (Abb. 6; David et al., 1982; Hill et al., 1989; Broers, 1994).
Die Fütterung von *E. coli*-Stämmen mit Mutationen im Triosephosphat-Stoffwechsel mit ^{13}C-markiertem Pyruvat und Glycerin zeigte, dass Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat die Vorstufen des aus DXP gebildeten Isopentenyldiphosphats in einem Mevalonat-unabhängigen Isoprenoid-Biosyntheseweg sind (Rohmer et al., 1996). Die Ähnlichkeit der Reaktionen von Transketolase und PDH-E1 legte nahe, dass ein Enzym, das die Reaktion von Pyruvat und D-GAP zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat (DXP) als Hauptfunktion katalysiert, sowohl Ähnlichkeiten mit Transketolasen als auch mit PDH-E1-Komplexen aufweist. Tatsächlich wurde aufgrund der Ähnlichkeit seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz zu diesen Enzymen in der Genom-Sequenz von *E. coli* das *dxs*-Gen für eine 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase identifiziert und kloniert (Sprenger et al., 1997). Erste Untersuchungen zeigten, dass in Bacteria und Pflanzen eine Familie von Proteinen mit hohen Ähnlichkeiten zur 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthase (DXS) aus *E. coli* existiert (Sprenger et al., 1997; Lois et al., 1998; Lange et al., 1998). Die DXS aus *E. coli* katalysiert die Thiamindiphosphat-abhängige Bildung von DXP aus Pyruvat und D-GAP (Abb. 7; Sprenger et al., 1997).

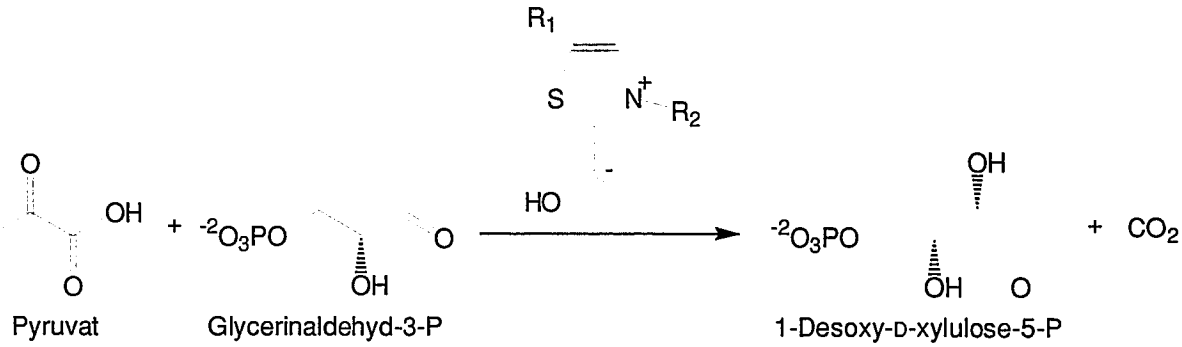


Abb. 7: Transfer einer Hydroxyethyl-Gruppe von Pyruvat auf GAP über ein kovalent gebundenes ThDP-Intermediat zur Bildung von DXP durch die DXS.

Ein neuer Biosyntheseweg zu Isoprenoiden

Die Inkorporationsexperimente in den Laboren von Rohmer, Sahm und Arigoni bewiesen die Existenz eines Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseswegs in *E. coli* (Broers, 1994; Rohmer et al., 1996). Die erste für den alternativen Isoprenoid-Biosyntheseweg spezifische Reaktion ist die Reduktion und Isomerisierung des, durch DXS aus Pyruvat und GAP gebildeten, 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat zu 2-*C*-Methylerythritol-4-Phosphat (MEP) durch die NADPH-abhängige 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR, Abb. 8). Neben der zuerst beschriebenen DXR aus *E. coli* (Takahashi et al., 1998) wurden mittlerweile *dxr*-Gene aus *Arabidopsis thaliana*, *Mentha* x *piperita*, *Plasmodium falciparum*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Synechococcus leopoliensis* kloniert (Schwender et al., 1999; Lange & Croteau, 1999; Jomaa et al., 1999; Grolle et al., 2000; Altincicek et al., 2000; Miller et al., 2000). Die biochemischen Eigenschaften der Enzyme wurden allerdings nur im Falle der DXR aus *E. coli* und *Z. mobilis* intensiver untersucht (Takahashi et al., 1998; Grolle et al., 2000).

Der alternative MEP-Weges zu Isoprenoiden ist in den meisten Bacteria, den Chloroplasten von Algen und höheren Pflanzen sowie in dem Malaria-Erreger *Plasmodium* vorhanden (Rohmer et al., 1996; Schwender et al., 1996, Eisenreich et al., 1996, Sprenger et al., 1997; Jomaa et al., 1999). In tierischen Zellen, Hefen und dem Cytosol von Pflanzen wird IPP über den Mevalonat-Weg aus drei Molekülen Acetyl-CoenzymA synthetisiert (Lynen et al., 1959; Beytía & Porter 1976; Bloch, 1992). Das exklusive Vorkommen des MEP-Weges in Bacteria, Pflanzen und Apicomplexa wie *Plasmodium* macht jedes der an diesem Biosyntheseweg beteiligten Enzyme zu einem Ziel potentieller Antibiotika, Herbizide und Antimalariamittel.

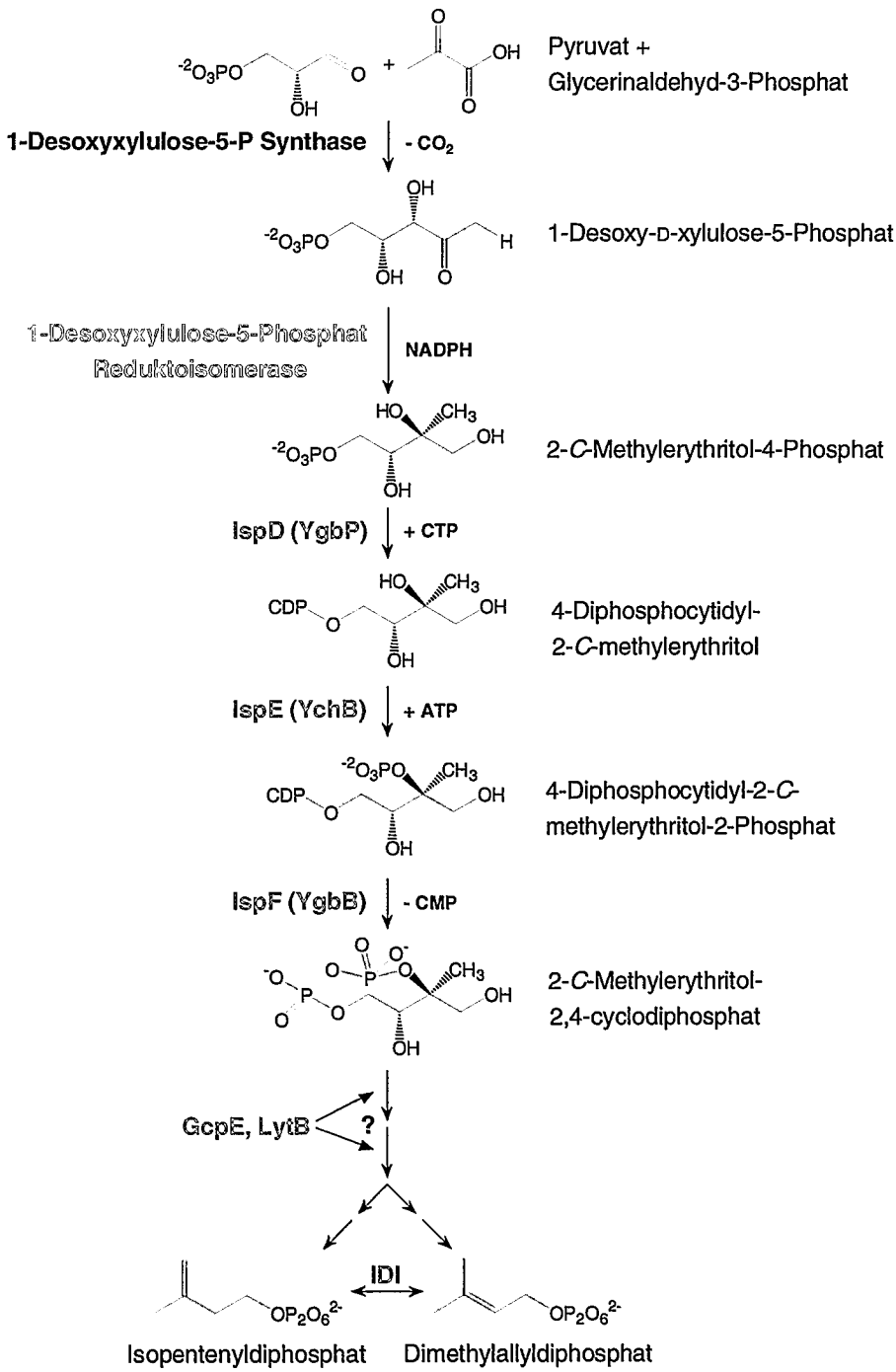


Abb. 8: Übersicht über den 2-*C*-Methylerythritol-4-Phosphat-Weg in *E. coli*.
IDI: Isopentenyldiphosphat-Isomerase, CDP: Diphosphocytidyl-Rest.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *E. coli* als erstem Vertreter und somit Modellbeispiel einer neuen Familie von Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen in Hinsicht auf seine biochemischen, strukturellen und funktionellen Eigenschaften sowie seines Potentials zum Einsatz in der chemo-enzymatischen Synthese.

Dazu musste zunächst ein stabiles Überexpressionssystem sowie eine reproduzierbare und effiziente Reinigungsmethode für die DXS aus *E. coli* etabliert werden, um grosse Mengen gereinigten Enzyms für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung zu haben.

Die Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften und des Substratspektrums der DXS war zum einen in Hinsicht auf ein besseres Verständnis der physiologischen Reaktion und zum anderen in Hinsicht auf die mögliche Verwendung der DXS zur Synthese von 1-Desoxyketosen als chirale Bausteine bzw. Substrat-Analoga des MEP-Weges interessant. Da die DXS ein potentielles Ziel für eine regulatorische Inhibierung durch Stoffwechselmetabolite sowie für Antibiotika, Herbizide und Antimalariamittel ist, wurde nach Substanzen gesucht, die die von der DXS katalysierte Reaktion inhibieren.

Mit strukturbiologischen Methoden und ortsgerichteter Mutagenese wurden Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen den strukturellen Grundlagen der Thiamindiphosphat-abhängigen DXS und ihrer enzymatischen Funktion angestrebt.

Schwerpunkt dieser Arbeit war also, grundlegende Erkenntnisse über die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *E. coli* zu gewinnen und ihre Eignung für die organische Synthese zu überprüfen.

II Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten genetischen Marker. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Stämme BL21(DE3) mit BL, BL21(DE3) pLysS mit BLS und BL21(DE3)CodonPlus-RIL mit BLCP abgekürzt.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
Escherichia coli		
LJ110	Wildtyp (W3110), prototroph	Bachmann et al., 1972
JM109	e14$^-$(McrA) *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 Δ(*lac-pro*AB) [F'*tra*D36 *pro*AB *lac*I^{q}ZΔM15]	Yanisch-Perron et al., 1985
BL21(DE3) ≡ BL	F$^-$ *omp*T *hsd*S$_B$ ($r_B^-m_B^-$) *gal* *dcm*$^+$ λ(DE3)	Novagen, Bad Schwalbach
BL21(DE3)pLysS ≡ BLS	F$^-$ *omp*T *hsd*S$_B$ ($r_B^-m_B^-$) *gal* *dcm*$^+$ λ(DE3) [T7*Lys* Cam^r]	Novagen, Bad Schwalbach
BL21(DE3) CodonPlus-RIL ≡ BLCP	F$^-$ *omp*T *hsd*S$_B$ ($r_B^-m_B^-$) *gal* *dcm*$^+$ λ(DE3) [*arg*U *ile*Y *leu*W Cm^r]	Stratagene, Heidelberg
XL1-Blue	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 *lac* [F' *pro*AB *lac*I^{q}ZΔM15 tn10(Tet^r)]	Stratagene, Heidelberg
Zymomonas mobilis		
ZM6 (ATCC 29191)	Wildtyp, prototroph	Swings & DeLey, 1977

Tab. 2: Verwendete Plasmide und ihre relevanten genetischen Marker.

Bezeichnung	Eigenschaften/Konstruktion	Referenz
pUC18/19	Amp^r, *lac*POZ', *ori* colE1	Vieira & Messing, 1982
pBluescriptII KS(-)	$P_{T7}P_{T3}P_{lac}$ *lacZ*', Amp^r, *ori* colE1	Stratagene, Heidelberg
pET-16b(+)	P_{T7}, Amp^r, ori_{pBR322}, N-term. 10xHis	Novagen, Bad Schwalbach
pET-22b(+)	P_{T7}, Amp^r, ori_{pBR322}, C-term. 6xHis	Novagen, Bad Schwalbach
pLysS	P_{tet}, Cm^r, ori_{p15A}, T7 *Lys*	Novagen, Bad Schwalbach
pUCdxs	*dxs E. coli* *Eco*RI/*Sph*I in pUC18	Grolle, 2000
pUC19dxs22	PCR-Produkt *dxs E. coli* in pUC19 *Sma*I	diese Arbeit
pUC18dxs22	*dxs E. coli* aus pUC19dxs22 *Bam*HI/*Sph*I in pUC18	diese Arbeit
pETdxs16	PCR-Produkt *dxs E. coli* *Nde*I/*Xho*I in pET-22b(+)	diese Arbeit
pETdxs22	*dxs E. coli* aus pUC19dxs22 *Nde*I/*Xho*I in pET-22b(+)	diese Arbeit
pBLdxsZm	PCR-Produkt *dxs Z. mobilis* in pBluescriptII KS(-) *Eco*RV	diese Arbeit
pETdxsZm	*dxs Z. mobilis* aus pBLdxsZm *Nde*I/*Hin*dIII in pET-22b(+)	diese Arbeit
pBLdxsTm	PCR-Produkt *dxs Thermotoga maritima* in pBluescriptII KS *Eco*RV	diese Arbeit
pETdxsZm	*dxs T. maritima* aus pBLdxsTm *Nde*I/*Xho*I in pET-22b(+)	diese Arbeit
pBLtktA	PCR-Produkt *tktA* aus chromosomaler *E. coli* LJ110 DNA in pBluescriptII KS(-) *Eco*RV	diese Arbeit
pETtktA	*tktA E. coli* aus pBLtktA *Nde*I/*Xho*I in pET-22b(+)	diese Arbeit

Tab. 2 (ff): Verwendete Plasmide und ihre relevanten genetischen Marker.

Bezeichnung	Eigenschaften/Konstruktion	Referenz
pBLDT1	1,9 kb PCR-Produkt *dxs/tktA*1 von *E. coli* in pBluescriptII KS(-) *Eco*RV	diese Arbeit
pETDT1	*dxs/tktA*1 aus pBLDT1 *Nde*I/*Xho*I in pET-22b(+)	diese Arbeit
pBLDT2	1,9 kb PCR-Produkt *dxs/tktA*2 von *E. coli* in pBluescriptII KS(-) *Eco*RV	diese Arbeit
pETDT2	*dxs/tktA*1 aus pBLDT2 *Nde*I/*Xho*I in pET-22b(+)	diese Arbeit
pBLDT3	1,9 kb PCR-Produkt *dxs/tktA*3 von *E. coli* in pBluescriptII KS(-) *Eco*RV	diese Arbeit
pETDT3	*dxs/tktA*3 aus pBLDT1 *Nde*I/*Xho*I in pET-22b(+)	diese Arbeit

2. Chemikalien und Enzyme

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden sofern nicht anders angegeben von Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Fluka (Neu-Ulm) im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen. Von weiteren Herstellern stammten folgende Produkte:

Amersham-Pharmacia (Freiburg): Chromatographie-Leersäulen XK16/40, MonoQ HR5/5, Superdex G-200 26/60, Gelfiltrations-Kalibrierungskit, DNA-Sequenzierungs-Reagenzien

Biomol (Hamburg): Hepes, IPTG, X-Gal, NADH, NAD, NADPH, Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol

Difco Laboratories (Detroit, USA): Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefe-Extrakt

Hampton Research (Laguna Niguel, USA): Kristallisierungsscreens

MBI Fermentas (St. Leon-Rot): DNA-Grössenstandard 1 kb-Leiter

Millipore (Bedford, USA): Centricon-30- und Centriprep-30-Ultrafiltrationseinheiten, YM-30-Ultrafiltrationsmembranen

New England Biolabs (Beverly, USA): vorgefärbte Molekulargewichts-Standards für Proteingele und Western-Blot

Qiagen (Hilden): DNA-Präparations- und Reinigungskits, Ni-NTA-Agarose und Ni-NTA-Superflow

Sigma (Deisenhofen): Anti-Meerschweinchen IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat, Substrate für Enzymtests

Stratagene (Heidelberg): QuikChange site-directed mutagenesis Kit

2.2 Enzyme

Alle Enzyme für molekularbiologische und enzymkinetische Anwendungen wurden mit zwei Ausnahmen von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen. Schafsleber-Sorbitoldehydrogenase (SDH) stammte von Sigma (Deisenhofen). 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase von *Zymomonas mobilis* wurde von S. Grolle und S. Bringer-Meyer zur Verfügung gestellt.

3. Anzucht von Bakterienkulturen

3.1 Nährmedien

Luria Bertani (LB)-Medium für *E. coli* (Sambrook et al., 1989):

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
ad 1000 ml A. dest.

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

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

10 g Hefe-Extrakt
1 g KH_2PO_4
1 g $(NH_4)SO_4$
0,5 g $MgSO_4x7H_2O$
20 g Glukose (nach dem Autoklavieren steril zugegeben)
ad 1000 ml A. dest.

3.2 Medienzusätze und Kultivierungsbedingungen

Die Selektion Antibiotika-resistenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch Zugabe steriler Antibiotikalösungen zum Medium. Für pUC-, pBluescriptII KS(-)-, pET-16b(+)- und pET-22b(+)-Derivate wurden Endkonzentrationen von 100 µg/ml Ampicillin und für pACYC-Derivaten (pLysS, CodonPlus-RIL) 34 µg/ml Chloramphenicol verwendet.
Die Kultivierung von *Zymomonas mobilis* erfolgte in 10 ml Vollmedium bei 30°C in gasdicht verschlossenen Anaerobgefässen (Bellco-Glas-Inc., New Jersey, USA). *E. coli*-Stämme wurden aerob bei 30°C bzw. 37°C auf Agarplatten oder unter Schütteln bei 180 Upm in Flüssigkultur angezogen. Bis zu einem Volumen von 5 ml LB-Medium wurden Flüssigkulturen in sterilen Reagenzgläsern kultiviert. Grössere Volumina (10 bis 1000 ml) wurden in mit höchstens 20% des Gesamtvolumens befüllten Erlenmeyerkolben angezogen.
Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden den Kulturen, die auf eine Start-OD_{600} von 0,05 in LB mit 200 µg/ml Carbenicillin angeimpft wurden, bei einer Zelldichte von $OD_{600} \approx 0,6$ Isopropyl-thiogalaktosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt und für 4 h weiter inkubiert. Die Expression der DXS von *E. coli* und ihrer Muteine sowie der DXS/TKT-Hybridenzyme erfolgte bei 30°C. Alle anderen Proteine wurden bei 37°C exprimiert.
Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen, die entweder aus 50% (v/v) einer Übernachtkultur und 50% (v/v) sterilem Glycerin oder aus 90% (v/v) Übernachtkultur und 10% (v/v) DMSO bestanden, angelegt und bei -80°C gelagert.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 DNA-Präparation

Chromosomale DNA von *E. coli* LJ110 und *Z. mobilis* ZM6 wurde unter Verwendung des „Genomic DNA Buffer Set" und der „Genomic-tip 100" (Qiagen, Hilden) gewonnen. Präparationen von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgten mit den Kits „QIAprep Spin Mini Kit" und „QIAGEN Plasmid Midi Kit" (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

4.2 DNA-Restriktion und -Ligation

Analytische Restriktionsansätze mit 100 – 500 ng DNA umfaßten ein Volumen von 10 µl und wurden in der Regel 1 h bei 37°C inkubiert. Für präparative Ansätze wurden bis zu 10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von bis zu 50 µl eingesetzt. Die

Restriktionsenzyme wurden jeweils in 5 – 10fachem Überschuss dosiert, um eine vollständige Restriktion zu gewährleisten. Die Auftrennung und Grössenbestimmung von DNA-Fragmenten, sowie die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen nach Sambrook et al. (1989).
Zum Umpuffern von DNA-Lösungen aus Restriktionsansätzen, zur Reinigung von PCR-Ansätzen und Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Purification Kit" (Qiagen, Hilden) eingesetzt.
Ligationen von restringierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten erfolgten entweder mit T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 – 18°C oder mit dem „Rapid DNA Ligation Kit" (Roche, Mannheim) über 15 min bei Raumtemperatur.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis & Faloona, 1987) wurde benutzt, um *in vitro* einen definierten DNA-Abschnitt von einem Plasmid oder chromosomaler DNA zu amplifizieren. Der zu amplifizierende Bereich wird dabei von zwei Primern mit bekannter DNA-Sequenz begrenzt. Zur späteren Klonierung der amplifizierten Gene in Expressionsvektoren wurden mit Hilfe der Primer zum Teil Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingeführt. Ein PCR-Ansatz (50 µl) enthielt:

10-30 ng	Plasmid-DNA oder 300 ng chromosomale DNA als Matrize
10 pmol	Primer 1
10 pmol	Primer 2
200 µM	Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix
1 x	Polymerase-Puffer
2,5 U	DNA-Polymerase

Zur Amplifizierung wurde Pwo-DNA-Polymerase (Roche) in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (DNA Engine, MJ Research) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Anlagerungstemperatur betrug für alle Reaktion 54°C – 58°C. Die zur Amplifikation von Genen als Primer verwendeten Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg) sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3: Bezeichnung und Sequenz der Oligonukleotide zur Amplifikation der aufgeführten Gene sowie eingeführte Restriktionsschnittstellen (fett).

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Schnittstelle
E. coli-dxs in pET-Vektoren		
ATG*Ec*	GCCC**CATATG**AGTTTTGATATTGCC	*Nde*I
TAA*Ec* pET-16b(+)	TGGA**CTCGAG**ATTATGCCAGCCAGGCCTTG	*Xho*I
TAA*Ec* pET-22b(+)	GTAG**CTCGAG**TGCCAGCCAGGCCTTGAT	*Xho*I
dxs aus *Z. mobilis* ZM6		
ATGZM6	GCAGAGTTTGATTTCAGGCCTATGTTTCCG	-
TAAZM6	TTAAGCGCGAGCGATGCTACCCATATTCGC	-
Z. mobilis-dxs in pET-22b(+)		
ATG*Zm*	CAGG**CATATG**TTTCCGAATGACAAG	*Nde*I
TAA*Zm*	CGAT**AAGCTT**GATTTAAGCGCGAGG	*Hin*dIII
T. maritima-dxs		
ATG*Tm*	AAGGTGAGA**CATATG**CTTCTGGACGAGATC	*Nde*I
TGA*Tm* pET-16b(+)	GCAGCA**CTCGAG**TCATACTTTCCCCTCCC	*Xho*I
TGA*Tm* pET-22b(+)	CCAGCATGA**CTCGAG**TACTTTCCCCTCCCT	*Xho*I
E. coli-tktA in pET-22b(+)		
ATG*tktAEc*	GTC**CATATG**TCCTCACGTAAAGAGCTTGCC	*Nde*I
TAA*tktAEc*	TGC**CTCGAG**CAGCAGTTCTTTTGCTTTCGC	*Xho*I

4.4 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen erfolgte nach Hanahan (1983). Die Zellen wurden entweder sofort verwendet oder in 200 µl Aliquots mit 50 µl eiskalten, sterilem 87% Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Zur Transformation wurden 50-200 ng Plasmid-DNA bzw. die Hälfte eines Ligationsansatzes zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben und diese 30 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgtem Hitzeschock (90 sec, 42°C) wurden die Zellen zur Regeneration mit 700 µl LB-Medium versetzt, 1 – 2 h bei 37°C geschüttelt, anschließend auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

4.5 Identifizierung rekombinanter *E. coli*-Zellen

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in die multiple Klonierungsstellen von pUC18, pUC19 oder pBluescriptII KS(-) wurden die transformierten JM109-Zellen mit Hilfe

des α-Komplementationstests überprüft (Ullman et al., 1967). Dazu wurde dem LB-Festmedium nach dem Autoklavieren neben dem Antibiotikum IPTG als Induktor und X-Gal als chromophore Substanz zugesetzt:

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
15 g Agar
ad 1000 ml A. dest.
15 ml 2% (w/v) X-Gal (in N,N'-Dimethylformamid)
3 ml 100 mM IPTG (in 70% (v/v) Ethanol)

Die Plasmide aus Kolonien, die nach Bebrütung über Nacht bei 37°C einen weissen Phänotyp aufwiesen, wurden präpariert und mittels Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein des gewünschten DNA-Fragments überprüft.

4.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungsreaktion beruhte auf der Kettenabbruch-Methode mit Didesoxynukleotiden nach Sanger et al. (1977). Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers mit dem „Thermo Sequenase Sequencing Kit" (Amersham-Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die Herstellung und Verwendung des Polyacrylamidgels erfolgte nach den Angaben des Geräteherstellers (MWG-Biotech). Es wurde ein 4,6% „Long Ranger" Gel mit 60 cm langen Glasplatten eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem LI-COR 4200 (MWG-Biotech). Die Aufnahme der Daten und deren Auswertung wurde mit dem Programm „Base ImagIR 4.1" durchgeführt.

Für Sequenzierungen aus pBluescriptII KS(-) wurden IRD-800 markierte T3- und T7-Promotor-Primer und für pET-Vektoren IRD-800 markierte T7-Promotor- und T7-Terminator-Primer verwendet (MWG-Biotech). Die sequenzspezifischen IRD-800 markierten Primer, mit denen die doppelsträngige Sequenzierung des *dxs*-Gen von *Z. mobilis* komplettiert wurde, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: *Z. mobilis-dxs* spezifische Sequenzierprimer und ihre Position im Gen

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Position
*dxs*ZM6sequp1	AAACGATCAAGACCGGTGCC	1069 –1088
*dxs*ZM6sequp2	GCTGCCGATATCGAAGTCGA	407 – 388
*dxs*ZM6seqdown1	TGGAAAATGTCCGCGATGCC	818 – 837
*dxs*ZM6seqdown2	ATTCTGCCTATCGGGAAAGG	1498 –1517

4.7 Ortsgerichtete Mutagenese

Die DXS-Muteine F107A und F107H wurden mittels „one-step overlap extension PCR" (Urban et al. 1997) hergestellt. Dafür mußte das Gen in zwei Orientierungen zum Universal oder Reverse Primer auf Plasmiden vorliegen. Dies wurde durch die Klonierung des *dxs*-Gens von *E. coli* in die Vektoren pUC18 und pUC19 erreicht. Für die PCR-Reaktion zur Mutagenese wurden die Mutageneseprimer in 100-fach niedrigerer Konzentration als der Reverse Primer eingesetzt, jeweils 10 ng der Plasmide pUC18dxs22 und pUC19dxs22 und 1 Unit Pwo-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim). Das erhaltene PCR-Produkt konnte mittels *Nde*I/*Xho*I-Klonierung in den Expressions-Vektor pET-22b(+) kloniert werden.

Alle anderen DXS-Muteine wurden mit dem „QuikChange site-directed mutagenesis Kit" (Stratagene, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers und dem Plasmid pETdxs22 als Matrize erzeugt. Die für die Mutagenesen verwendeten Oligonukleotide (MWG-Biotech) sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese der *E. coli*-DXS

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3' Richtung)
F107A 18	TCTGCACCCGGCCCCGTGGCGCG
F107A 19	CCACGGGGCCGGGTGCAGACCGCC
F107H 18	TCTGCACCCGCACCCGTGGCGCG
F107H 19	CCACGGGTGCGGGTGCAGACCGCC
H49A upper	CGTGAGCCGTTCCAGCGGGGCCTTCGCCTCCGGGCTGG
H49A lower	CCAGCCCGGAGGCGAAGGCCCCGCTGGAACGGCTCACG
H80A upper	GATTTGGGATGTGGGGGCGCAGGCTTATCCGC
H80A lower	GCGGATAAGCCTGCGCCCCCACATCCCAAATC
H80F upper	GATTTGGGATGTGGGGTTTCAGGCTTATCCGC

Tab. 5 (ff): Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese der *E. coli*-DXS

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3' Richtung)
H80F lower	GCGGATAAGCCTGAAACCCCACATCCCAAATC
H232A upper	GCTCAAACGCACCGAAGAAGCGATTAAAGGCATGGTAGTGC
H232A lower	GCACTACCATGCCTTTAATCGCTTCTTCGGTGCGTTTGAGC
H257A upper	CGGCCCGGTGGACGGTGCCGATGTGCTGGGGCTTATC
H257A lower	GATAAGCCCCAGCACATCGGCACCGTCCACCGGGCCG
E370A upper	CGACGTGGCAATTGCCGCGCAACACGCGGTGACC
E370A lower	GGTCACCGCGTGTTGCGCGGCAATTGCCACGTCG
E370Q upper	CGACGTGGCAATTGCCCAGCAACACGCGGTGACC
E370Q lower	GGTCACCGCGTGTTGCTGGGCAATTGCCACGTCG
D427A upper	GGCATTGTTGGTGCTGCCGGTCAAACCCATCAGG
D427A lower	CCTGATGGGTTTGACCGGCAGCACCAACAATGCC
D427E upper	GGCATTGTTGGTGCTGAAGGTCAAACCCATCAGG
D427E lower	CCTGATGGGTTTGACCTTCAGCACCAACAATGCC
R478Q upper	GCGGTGCGCTACCCGCAGGGCAACGCGGTCGGC
R478Q lower	GCCGACCGCGTTGCCCTGCGGGTAGCGCACCGC

4.8 Erzeugung von *dxs*-/*tktA*-Fusionen

Zur Erzeugung der DXS/TKT-Hybridenzyme DT1, DT2 und DT3 wurden in getrennten PCR-Ansätzen mit pETdxs22 als Matrize mit einem Primer vom 5'-Ende und Primern innerhalb des *dxs*-Gens 858, 861 und 864 bp des *dxs*-Gens amplifiziert (Tab. 6). Parallel wurden 1053, 1050 und 1047 bp des *tktA*-Gens mit einem Primer vom 3'-Ende und internen Primern des *tktA*-Gens von pETtktA amplifiziert. Nach Aufreinigung der Produkte wurden in weiteren PCR-Reaktionen mit den Produkten sowie dem 5'-*dxs*- und dem 3'-*tktA*-Primer die *dxs*- und *tktA*-Fragmente durch homologe Extensionen an den 5'-Enden der Fragmente miteinander fusioniert. Die drei resultierenden 1911 bp-Produkte wurden in pBluescript II KS(-) kloniert und zur Proteinexpression als His-tag-Fusionen *NdeI*/*XhoI* in pET-22b(+) umkloniert.

Tab. 6: Zur Generierung von *dxs/tktA*-Fusionen verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Produkt [bp]
5'-dxs	CATATGAGTTTTGATATTGCCAAATACCCG	
3'-tktA	GTGCTCGAGCAGCAGTTCTTTTGCTTTCGC	
dxsup1	CTTCCTGCGGATAAGCTTTACCTTTTTTGGTC ATGATATGCAGGAACTGC	858
tktAdown1	TCATGACCAAAAAAGGTAAAGCTTATCCGCA GGAAGCCGCTGAATTTACC	1053
dxsup2	CTTCCTGCGGATAAGCACGACCTTTTTTGGT CATGATATGCAGGAACTGC	861
tktAdown2	CATGACCAAAAAAGGTCGTGCTTATCCGCAG GAAGCCGCTGAATTTACCC	1050
dxsup3	CAGCGGCTTCCTGCGGATAACCACGACCTTT TTTGGTCATGATATGCAGG	864
tktAdown3	GACCAAAAAAGGTCGTGGTTATCCGCAGGAA GCCGCTGAATTTACCCGCC	1047

5. Proteinbiochemische Methoden

5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt von Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die Eichgerade mit Rinderserumalbumin war in einem Bereich von 25-400 µg/ml linear.

5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach deren Molekülgröße erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) in Anwesenheit von SDS (SDS-PAGE). Es wurden 12% Trenngele, überschichtet von 6% Sammelgelen nach Sambrook et al. (1989) verwendet. Jeweils 10 – 50 µg hitzedenaturiertes Protein (5 min 90°C) wurde in die Geltaschen appliziert und die Proteine im Gel nach dem Lauf mit Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung gefärbt (Weber & Osborn, 1969).

5.3 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Nach Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAGE wurden diese in einer Transferapparatur (MiniTrans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Biorad) auf eine Nylonmembran übertragen. Der Transfer erfolgte für 15 min bei 150 mA und 20 min

bei 300 mA. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte nach einer Methode von Burnette (1981). Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in Lösung 1 (0,9 % NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7,5, 3 % BSA) inkubiert und 2x30 min mit Lösung 2 (0,9 % NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7,5, 0,1 % (v/v) Tween20, 0,3 % BSA) gewaschen. Die polyklonalen Meerschweinchen-Anti-DXS Antikörper (Schörken, unveröffentlicht) wurden 1:1000 in Lösung 2 verdünnt und die Membran darin 1 h oder über Nacht inkubiert. Zur Entfernung ungebundenen, überschüssigen Antikörpers wurde erneut 2x30 min mit Lösung 2 gewaschen und dann mit Anti-Meerschweinchen IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:30.000) 1 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Lösung 2 folgte die Färbereaktion mit NBT und BCIP und somit der spezifische Nachweis Antikörper-markierter Proteine. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran 5 min mit 3 % TCA gewaschen.

5.4 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Ultraschallaufschluss:

Rekombinante *E. coli* JM109- und BL21(DE3)-Zellen wurden abzentrifugiert (Beckman JA10 Rotor, 5 min 5000g, 4°C), in 1/10 des Ausgangsvolumens mit Waschpuffer (20 mM Hepes, 20 mM Imidazol pH 8,0, 300 mM NaCl, je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT) gewaschen abzentrifugiert (Beckman JA10 Rotor, 5 min 5000g, 4°C) und in 12 ml Waschpuffer aufgenommen. Mittels Ultraschalldesintegration (Branson Sonifier, Duty Cycle 50%, Output 40 W, 8 x 30 sec mit jeweils 30 sec Pause unter Eiskühlung) wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (Beckman, JA 20 Rotor, 20.000 Upm, 1 h, 4°C) abgetrennt.

Zellaufschluss von BL21(DE3)pLysS (≡ BLS)-Stämmen:

Das pLysS-kodierte T7-Lysozym dient als natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase als Modulator der Protein-Expression, um den mRNA-Spiegel des Zielgens praktisch auf null zu halten. Diese Funktion erhöht vor allem bei Expression von für *E. coli* nachteiligen oder toxischen Proteinen die Stabilität der Expressionsvektoren. Durch Einfrieren der in Puffer resuspendierten Expressionsstämme und Wiederauftauen gelangt das pLysS-kodierte T7-Lysozym ins Periplasma und lysiert die Zellen. Diese Methode stellt einen Zellaufschluss dar, bei dem im Gegensatz zum Aufschluss mit Ultraschall, der Kugelmühle oder French-Press keine harschen mechanischen Kräfte auftreten.

Expressionskulturen von BLS-Stämmen wurden 4 h nach Induktion durch Zentrifugation geerntet (Beckman JA10 Rotor, 5 min 5000g, 4°C), in 1/10 Volumen Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (Beckman JA10 Rotor, 5 min 5000g, 4°C). Die Sedimente wurden in 2 ml oder 10 ml Waschpuffer aufgenommen und über Nacht bei -80°C gelagert. Der Aufschluss erfolgte durch vollständiges Auftauen bei 30°C und nachfolgender Inkubation auf Eis für 1 h. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Beckman JA20 Rotor, 1 h 39000g, 4°C) vom Rohextrakt abgetrennt.

5.5 Chromatographische Proteinreinigung

Die Reinigung der Proteine erfolgte mit dem ÄKTA Explorer (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Zur Steuerung des Gerätes und zur Aufzeichnung der Daten wurde die Unicorn 4.0-Software verwendet.

Ni^{2+}-Affinitätschromatographie

Affinitätschromatographie an immobilisierten Ni^{2+}-Ionen stellt eine effiziente Methode zur Reinigung von Fusionsproteine mit Polyhistidinschwänzen dar (Hochuli, 1990; Hochuli et al., 1987). Proteinmengen bis 10 mg wurden an einer mit 1 ml Ni-NTA-Superflow (Qiagen, Hilden) selbst gepackten HR5/5-Säule (Amersham-Pharmacia, Freiburg) gereinigt, während zur Reinigung von mehr als 10 mg Protein eine mit 25 ml Ni-NTA-Superflow (Qiagen, Hilden) gepackte XK16/40-Säule (Amersham-Pharmacia, Freiburg) verwendet wurde. Die Rohextrakte wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit Waschpuffer (20 mM Hepes, 20 mM Imidazol pH 8,0, 300 mM NaCl, je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT) äquilibrierte Ni-NTA-Superflowsäule aufgetragen. Nicht oder nur schwach bindende Proteine wurden mit 3 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer von der Säule gewaschen. Die spezifisch gebundenen His-tag-Fusionen wurden durch einen Imidazol-Stufengradienten von 3 SV Elutionspuffer (20 mM Hepes, 250 mM Imidazol pH 8,0, 300 mM NaCl, je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT) von der Säule verdrängt und in Fraktionen von 1 – 10 ml gesammelt.

Anionen-Austauschchromatographie

Zur Aufreinigung der in *E. coli* BLS exprimierten DXS von *Z. mobilis* als natives Protein wurde die Anionenaustauschsäule MonoQ HR5/5 (Amersham-Pharmacia,

Freiburg) verwendet. Der Rohextrakt wurde auf die mit Puffer A (50 mM Hepes pH 7,5, je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT) äquilibrierte Säule mit einer 10 ml fassenden Probenschleife aufgetragen und die Säule anschließend mit einem SV (1 ml) Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte über 20 Säulenvolumen mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0% bis 100% Puffer B (50 mM Hepes pH 7,5, 1 M NaCl, je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT). Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt.

Gelpermeations-Chromatographie

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex G-200 26/60-Säule (Amersham-Pharmacia, Freiburg) mit einer konstanten Geschwindigkeit von 2 ml/min durchgeführt. Als Puffer wurde 50 mM Hepes pH 7,5 mit 100 mM NaCl und je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ sowie DTT verwendet. Die Elution erfolgte mit 1 SV Puffer (320 ml). Die Eichproteine (Gelfiltration-Kalibrierungskit, Amersham-Pharmacia, Freiburg) wurden in den vom Hersteller angegebenen Konzentrationen über eine 2 ml-Probenschleife aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DXS von *E. coli* wurde ebenfalls die 2 ml-Probenschleife benutzt.

5.6 Dynamische Lichtstreuung von Proteinen

Die Dynamische Lichtstreuungs-Messungen wurden bei Pharmacia-Upjohn (Stockholm, Schweden) durchgeführt. 200 µl DXS-Proben wurden hierbei in eine Messzelle injiziert, in der das Enzym einem Laserstrahl ausgesetzt wurde. Aus der Streuung des Laserstrahls durch die Probe wurde der hydrodynamische Radius (R_h) des Proteins ermittelt und daraus das Molekulargewicht abgeleitet. Weiterhin liess sich mit dieser Technik feststellen, ob die Proteinproben homogen waren oder in verschiedenen Zustandsformen vorlagen.

5.7 Ultrafiltration von Proteinen

Zur Konzentrierung, Entsalzung oder Umpufferung von Proteinen wurden die schwerkraftunterstützten Ultrafiltrationseinheiten Centricon-30 und Centriprep-30 sowie eine 50 ml Amicon-Ultrafiltrationszelle mit YM-30-Membran (Millipore, Bedford, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

6. Enzymaktivitäts-Bestimmungen

Alle Aktivitätstests wurden soweit nicht anders angegeben bei 30°C und in Waschpuffer (20 mM Hepes, 20 mM Imidazol pH 8,0, 300 mM NaCl, je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT) durchgeführt.

6.1 „High Performance Liquid Chromatography" (HPLC)

Es wurde eine LaChrom-HPLC-Anlage der Firma Merck (Darmstadt) mit D-7000 Interface, L-7100 Gradientenpumpe, L-7200 Autosampler, L-7350 Säulenofen, L-7400 UV-Monitor (190 nm) und L-7490 Refraktionsindex-Detektor verwendet. Die Auftrennung von Substraten und Produkten erfolgte bei 65°C auf einer 300 x 7,8 mm Aminex HPX-87H Säule (Bio-Rad, München) mit sterilfiltrierter 6 mM H_2SO_4 als Laufmittel. Die Steuerung der LaChrom-Anlage und die Berechnung von Peakflächen wurden mit dem Programm MultiHSM-Manager durchgeführt. Produkte wurden anhand von Eichmessungen mit Referenz-Substanzen bestimmt, soweit diese erhältlich waren. Phosphorylierter Substrate und Produkte wurden vor der Analyse mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Roche, Mannheim) für 1 h bei 37°C dephosphoryliert. Zur Entfernung der Proteine aus den Proben wurden diese 5 min bei 95°C erhitzt und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden in HPLC-Gefässe überführt und analysiert.

Enzymtest 1: Die DXS-Aktivität wurde aus der in einem bestimmten Zeitraum gebildeten Menge 1-Desoxy-D-xylulose (DX) mit einer definierten Menge Enzym bestimmt. Die Quantifizierung von DX erfolgte anhand eines chemisch synthetisierten Standards (T. Begley, Ithaca, USA). Es wurden Substratkonzentrationen von 10 mM Pyruvat und 25 mM D-Glycerinaldehyd und pro Messpunkt 1 – 10 µg Protein eingesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von D-Glycerinaldehyd gestartet. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 min wurden 100 µl Probe in ein Eppendorfgefäss überführt und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (3 min 95°C) abgestoppt. Bei Messungen mit Rohextrakten oder niedrigen Proteinkonzentrationen wurden die Inkubationszeiten auf 30, 60 und 120 min ausgeweitet.

Variation von Enzymtest 1: Zur Untersuchung alternativer Donor- bzw. Akzeptorsubstrate der DXS wurde eine Abwandlung von Enzymtest 1 eingesetzt.

Donorsubstrate wurden in Konzentrationen von 50 mM zusammen mit den Standard-Akzeptorsubstraten D-Glycerinaldehyd oder D-Glycerinaldehyd-3-P mit DXS umgesetzt, während nicht-physiologische Akzeptorsubstrate (50 mM) mit dem Standard-Donorsubstrat Pyruvat inkubiert wurden. Die Umsetzung nicht-physiologischer Substrate durch die DXS wurde in Zeitabständen von 0,5, 1, 2, 4, 8 und 16 h nach Starten der Reaktion untersucht Als Kontrollen dienten jeweils Ansätze mit hitzeinaktivierter DXS. Die Umsetzung nicht-physiologischer Substrate konnte anhand der Abnahme der Substratkonzentrationen und dem Auftreten von neuen Produktpeaks, die in den Kontrollen nicht vorhanden waren, verfolgt werden.

Synthese einer 1-Desoxyheptulose-7-Phosphat: Je 50 mM Pyruvat und D-Ribose-5-Phosphat wurden mit 1 U DXS, die zuvor in 20 mM Hepes pH 7,0 mit jeweils 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT umgepuffert worden, in einem Volumen von 1 ml war über Nacht inkubiert. Die vollständige Umsetzung der Edukte wurde mittels HPLC überprüft und das Produkt NMR-spektroskopisch (in Kooperation mit Dr. A. A. DeGraaf) und mittels LC-ESI-MS charakterisiert (siehe 7.).

6.2 Photometrische Enzymtests

Die photometrischen Aktivitätstests mit bis zu 6 parallelen Messungen erfolgten in einem Ultrospec 3000pro Photometer (Amersham-Pharmacia, Freiburg) mit 1 ml Reaktionsvolumen oder bei bis zu 96 Einzelmessungen in einem Spectra Max Plus Mikrotiterplatten-Photometer (200 µl Volumen, Molecular Devices). Der Verbrauch und Bildung von NADH bzw. NADPH (Endkonzentrationen jeweils 0,3 mM) wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt (ε_{340} = 6,22 $mM^{-1}cm^{-1}$).

Enzymtest 2 (DXS/DXR-Test): In einem gekoppelten Enzymtest mit der DXS und der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) von *Z. mobilis* (Grolle et al., 2000) als Hilfsenzym konnte die Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat (DXP) aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-P (GAP) durch die nachfolgende, NADPH-abhängige Umsetzung zu Methylerythritol-4-P (MEP) als Extinktionsabnahme bei 340 nm nachgewiesen werden. Es wurden 1 U DXR und jeweils 10 mM Pyruvat und GAP, mit dessen Zugabe die Reaktion nach 5 min Vorinkubation bei 30°C gestartet wurde, eingesetzt.

Enzymtest 3 (DXS/SDH-Test): Mit dem alternativen Donorsubstrat Hydroxypyruvat (50 mM) wurden die nicht-physiologischen Akzeptorsubstrate Glykolaldehyd, D,L-Glycerinaldehyd und D-Erythrose (jeweils 50 mM) zu L-Erythrulose, D-Xylulose und D-Fruktose umgesetzt. Als Substrate der Schafsleber-Sorbitoldehydrogenase (SDH, Lindstad et al., 1998) werden diese unter äquimolarer NADH-Oxidation mit 1 U SDH reduziert.

Enzymtest 4: Mit D-Erythrose-4-P (50 mM) als Akzeptor entstand mit dem Donorsubstrat Hydroxypyruvat D-Fruktose-6-P, das mit der 6-Phosphoglukose Isomerase und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (von *Lactobacillus brevis*, Roche, Mannheim) zu 6-Phosphoglukonolacton oxidiert wurde. NADP wird dabei proportional reduziert. Aufgrund des geringen Reinheitsgrades von D-Erythrose-4-P (60%, Sigma) und einer Kontamination mit D-Fruktose-6-P musste dieses erst abreagieren, bevor die DXS-spezifische Reaktion durch Zugabe von 50 mM Hydroxypyruvat gestartet wurde.

7. LC-ESI-MS

Die aus der enzymatischen Synthese einer 1-Desoxyheptulose-7-P aus Pyruvat und D-Ribose-5-P mit DXS stammenden Proben wurden in Kooperation mit Dr. R. Brückner per Flüssig-Chromatographie (LC) an einem Dionex Ionenchromatograph DX300 mit GP50-Gradientenpumpe, EG40-Eluentengenerator mit 1 mM KOH Kartusche, chemischem Supressor zur Neutralisierung des Gradienten und nachgeschaltetem geerdeten ED40-Elektrochemischem Detektor mit einer Flussrate von 0,2 ml/min aufgetrennt. Im Massenspektroskop (MS)-Teil der PE Sciex API2000-Anlage (Applied Biosystems) wurden die molekularen Massen der aufgetrennten Substanzen bestimmt. Nach LC-Auftrennung oder durch Direkteinlass des Ansatzes wurden einzelne Substanzen in ein Spektrum von Fragmenten zerlegt und die molekulare Massen des Fragment-Spektrums im negativen Scan-Modus bestimmt.

8. Enzymatische Synthese mit der DXS und Saccharose-Synthase

Die Synthese eines Disaccharids aus 1-Desoxy-D-xylulose und Glukose mit gereinigter DXS von *E. coli* (5.5) und gereinigter Saccharose-Synthase SUS1 aus *Solanum tuberosum* in Zusammenarbeit mit N. Nettelstroth (AG PD Dr. Elling, Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erfolgte in einem Ein-Topf-„fed-batch"-Verfahren. Die Reaktion erfolgte bei 30°C über einen Zeitraum von

65 h mit 4 Probennahmen zu Beginn, im Laufe und nach Abstoppen der Reaktion. Nach jeder Probennahme wurde der Ansatz mit den Substraten und alkalischer Phosphatase aufgefüllt. Reaktionsansatz (1 ml):

5 mM	Pyruvat
20 mM	D-Glycerinaldehyd
1 mM	UDP-α-D-Glukose
1 U	Saccharose Synthase
1 U	alkalische Phosphatase
0,2 U	DXS
ad 1 ml	200 mM Hepes pH 8,0, 1,5 mM $MgCl_2$, 1,5 mM ThDP, 1 mM DTT

Mit alkalischer Phosphatase wurde bei der Umsetzung von UDP-α-D-Glukose freigesetztes UDP durch Dephosphorylierung aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entfernen und die Saccharose Synthase-Reaktion in Richtung der Produkte zu ziehen. Die entnommenen Proben wurden mittels HPLC-Analyse auf die Bildung eines Disaccharids und den Gesamtverbrauch von UDP-α-D-Glukose untersucht.

9. Protein-Kristallisierung

Die Versuche zur Kristallisierung der *E. coli*-DXS erfolgten in Zusammenarbeit mit Stina Thorell und Doreen Dobritzsch aus der Arbeitsgruppe von Prof. G. Schneider (Department of Molecular Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet Stockholm, Schweden). Es wurden Kristallisierungsscreens (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) nach der „hanging drop"-Methode angesetzt. Die verwendeten Screens (Crystal Screen I, II, Cryo und MembFac sowie Ammoniumsulfat-, NaCl-, Polyethylenglykol 6000- und 2-Methyl-2,4-pentandiol-Screen) bestanden aus je 24 bis 50 verschiedenen Lösungen, von denen je 800 µl in das Reservoir der Kristallisierungsplatten (24 Reservoirs pro Platte) gegeben wurde (Mutterlösung). Im „hanging drop"-Verfahren wurden 2 – 3 µl Proteinlösung auf ein Deckglas pipettiert, mit dem gleichen Volumen an Mutterlösung versetzt und das jeweilige, Silikon-gefettete Reservoir mit dem Deckglas luftdicht verschlossen. Die Kristallisierungs-Ansätze wurden sowohl bei 4°C als auch 20°C inkubiert. Ausgehend von den anfänglichen Versuchen mit den kommerziell erhältlichen Hampton-Screens wurden die Bedingungen mit selbst angesetzten Lösungen graduell variiert, um die Ergebnisse zu optimieren.

III Ergebnisse

Mit einer neuen, effizienten Expressions- und Reinigungsmethode wurden grosse Mengen gereinigter 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *Escherichia coli* gewonnen, um diese als Modellprotein einer neuen Familie von Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen zu charakterisieren. Untersucht wurden dabei:

- Biochemische Eigenschaften (1.1 - 1.5)
- Inhibition durch Stoffwechselmetabolite, Substrat- und Produkt-Analoga (1.6)
- Das Spektrum an Donor- und Akzeptorsubstraten (2.1 - 2.2)
- Das synthetische Potential am Beispiel der Synthese einer 1-Desoxyheptulose (2.3)
- Die Ein-Topf Synthese eines Disaccharids mit DXS und Saccharose-Synthase (2.4)
- Die DXS von *Zymomonas mobilis* und *Thermotoga maritima* (3.)
- Beziehungen von Struktur und Funktion durch Modellierung und Mutagenese (4.)

1. Biochemische Charakterisierung der 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthase

1.1 Überexpression und Reinigung

Zur Reinigung der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *E. coli* waren bereits Reinigungsprotokolle entwickelt worden. Das native Protein war über eine Ammoniumsulfat-Fällung und zwei Anionenaustausch-Chromatographien und ein Fusionsprotein mit aminoterminalem Glutathion-S-Transferase-Peptid (GST-DXS) mittels Affinitätschromatographie gereinigt worden (Sprenger et al., 1997; U. Schörken & S. Grolle, unveröffentlicht). Allerdings war die Reinigung der nativen DXS nur schlecht reproduzierbar (S. Grolle, persönliche Mitteilung) und die GST-DXS aufgrund des verwendeten Detergens Triton X-100 nicht für die Proteinkristallographie geeignet gewesen (S. Thorell, persönliche Mitteilung). Weiterhin hatte sich erwiesen, dass die Proteinausbeute in den verwendeten Expressionssystemen stark schwankte (S. Grolle, persönliche Mitteilung).

Zur Expression rekombinanter DXS wurde daher das pET-System (Abb. 9; Novagen, Bad Schwalbach) mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (≡ *E. coli* BL) verwendet, in dem das *dxs*-Gen unter die Kontrolle eines T7-Promotors gestellt wurde. Zur Reduzierung der basalen Proteinexpression in den Expressionsstämmen wurde optional das pLysS-Plasmid verwendet, das das Gen für T7-Lysozym, einem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, trägt. Solche pLysS enthaltenden

E. coli BL-Stämme (≡ *E. coli* BLS) konnten ausserdem durch einen Einfrier/Auftau-Zyklus anstelle der Ultraschallbehandlung aufgeschlossen werden (Abb. 9).

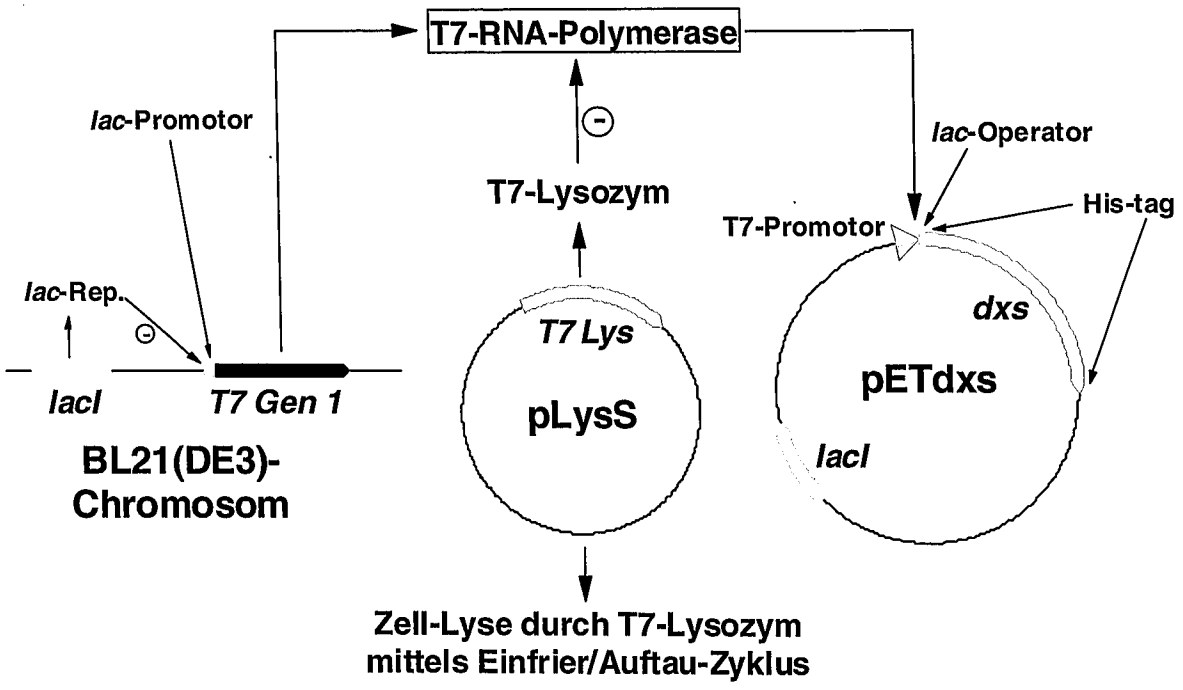


Abb. 9: Schematische Darstellung des pET-Systems. Das pLysS-kodierte T7-Lysozym fungiert als natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase (McAllister & Wu, 1978; McAllister et al., 1981). Durch Einfrieren und Auftauen der Zellen wird T7-Lysozym ins Periplasma freigesetzt und führt zur Lyse der *E. coli*-Zellen.

Das Gen für die 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthase (*dxs*) wurde unter Verwendung von sequenzspezifischen Primern aus chromosomaler DNA von *E. coli* W3110/LJ110 amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden in den PCR-Produkten *Nde*I- und *Xho*I-Schnittstellen eingefügt, mit denen die spezifischen Produkte in die entsprechend geöffneten Vektoren pET-16b(+) bzw. pET-22b(+) kloniert und die Expressionsvektoren pETdxs16 bzw. pETdxs22 generiert wurden. Durch diese Klonierung wurde die Expression der DXS als Fusionsproteine mit aminoterminalem 10x Poly-Histidinschwanz (His-tag) bzw. einen carboxyterminalen 6x His-tag ermöglicht. Über diesen His-tag erfolgte die Reinigung der DXS-Fusionsproteine mittels Ni^{2+}-Affinitätschromatographie. Die „in frame"-Fusion des *dxs*-Gens mit den His-tag-Kodierungssequenzen und die Abwesenheit von PCR-generierten Mutationen wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

In Rohextrakten von BL und BLS mit dem Plasmid pETdxs22 war die überexprimierte DXS in einer SDS-PAGE als stärkste Proteinbande mit einer apparenten Grösse von etwa 66 kDa erkennbar (Abb. 10), während in Rohextrakten von BL bzw. BLS mit pETdxs16 nur wenig bzw. keine rekombinante DXS auftrat (ohne Abbildung).

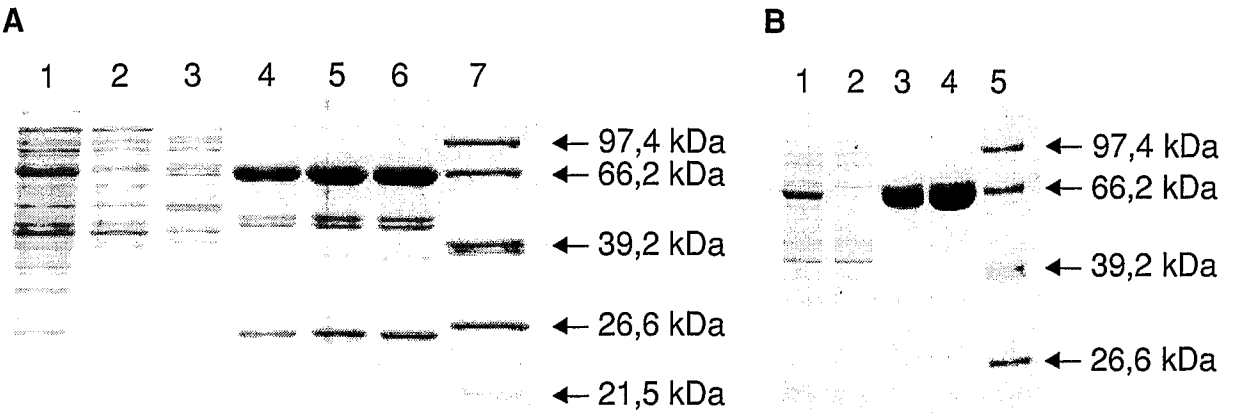


Abb. 10: SDS-PAGE Analyse der Reinigung der DXS mit C-terminalem His-tag aus den Expressionsstämmen *E. coli* BL (A) und BLS (B).
Jeweils 10 µg Protein entsprechende Volumina wurden aufgetragen.
A 1: Rohextrakt BL pETdxs22 2: Durchlauf 3: Waschfraktion
4: Elutionsfraktion 3 5: Elutionsfraktion 4 6: Elutionsfraktion 5
7: Grössen-Standard
B 1: Rohextrakt BLS pETdxs22 2: Durchlauf und Waschfraktion
3: Elutionsfraktion 3 4: Elutionsfraktion 4 5: Grössen-Standard

Mittels Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie (genaue Beschreibung in Material und Methoden) konnte enzymatisch aktive DXS mit carboxyterminalem His-tag aus Rohextrakten von BLS pETdxs22 in einem Schritt bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt werden (Abb. 10B). Dagegen traten bei Reinigung der DXS aus Rohextrakten von BL pETdxs22 noch eine Reihe von zusätzlichen, kleineren Banden auf, die auch durch erneute Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie nicht abgetrennt werden konnten (Abb. 10A).

Die Annahme, dass es sich bei diesen Banden um Fragmente der DXS und nicht um verunreinigende Proteine handelte, konnte in einer Western-Blot-Analyse mit spezifischen, polyklonalen Antiseren gegen die native DXS bestätigt werden. Während die gereinigte DXS aus BLS pETdxs22 nur ein Signal ergab, entsprach das Muster der Signale bei einer Reinigungsfraktion aus BL pETdxs22 dem Bild der SDS-PAGE (Abb. 11). Ein sehr ähnliches Signal-Muster ergab sich mit DXS, die als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (Schörken, unveröffentlicht) gereinigt worden war. Ebenso wiesen Rohextrakte von *E. coli* JM109 pUCdxs, die native DXS überexprimieren, im Western-Blot ein ähnliches Banden-Muster auf, während der Rohextrakt von JM109 mit Leerplasmid keine Reaktion mit DXS-Antikörpern zeigte. Eine Kreuzreaktion mit anderen *E. coli*-Proteinen als Grund für die multiplen Signale im Western-Blot konnte daher ausgeschlossen werden.

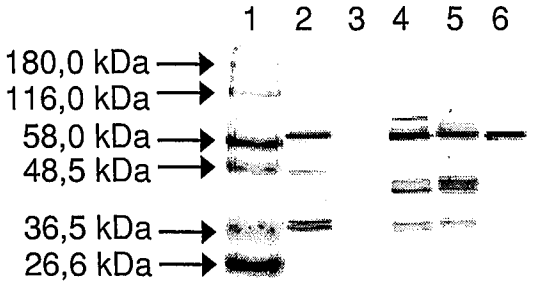


Abb. 11: Immunologischer Nachweis von DXS in Rohextrakten und gereinigter DXS mit polyklonalen Antikörpern gegen native DXS.
1: Grössen-Standard
2: 10 µg Rohextrakt JM109 pUCdxs
3: 10 µg Rohextrakt JM109 pUC18
4: 1 µg Glutathion-S-Transferase-DXS
5: 1 µg DXS aus BL pETdxs22
6: 1 µg DXS aus BLS pETdxs22

Die Proteinbanden in der SDS-PAGE (Abb. 10A) und die Signale im immunologischen Nachweis (Abb. 11) mit geringerer Grösse als DXS waren daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Zerfalls- oder Abbauprodukte der DXS zurückzuführen. Der Rohextrakt aus BLS pETdxs22 wurde durch Autolyse der Zellen durch das pLysS-kodierte T7-Lysozym nach Einfrieren und Wiederauftauen gewonnen. Im Gegensatz dazu stammten alle anderen im Western-Blot untersuchten Proben aus *E. coli*-Zellen, die mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden. Die mechanische Kraft des Ultraschall-Aufschlusses führte wahrscheinlich zu einer Fragmentierung der DXS an dafür sensiblen Stellen, was die charakteristischen Bandenmustern zur Folge hatte.

Unter Verwendung des Wirtsstammes BLS und des Vektors pETdxs22 konnte ein effizientes Überexpressions- und Reinigungsprotokoll etabliert werden: Aus Rohextrakten mit einem Anteil von 12 – 20 % rekombinanter DXS wurde in einer Ein-Schritt-Reinigung mittels Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie enzymatisch aktive, homogene DXS mit Ausbeuten von über 80% gewonnen (Tab. 7).

Tab. 7: Reinigungsschema für die DXS mit C-terminalem His-tag. Aus einer 2 l-Kultivierung von *E. coli* BLS pETdxs22 wurden 9,2 g DXS exprimierende Zellen (Nassgewicht) gewonnen. DXS-Aktivitäten wurden mit Enzymtest 1 bestimmt.

	Gesamt-Aktivität [U]	Protein-Menge [mg]	Spez. Aktivität [U/mg]	Reinigungs-Faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	648	1080	0,6	1,0	100
Ni^{2+}-Superflow	533	124	4,3	7,2	82

1.2 Temperatur, pH-Wert und Puffer beeinflussen die Aktivität und Stabilität

Die Toleranz eines Enzyms gegenüber Reaktionsparametern wie Temperatur, pH-Wert und Puffersystemen sind für die Anwendung als Biokatalysator in Synthesen von entscheidender Bedeutung. Kenntnisse über die Temperaturstabilität eines Enzyms sowie die Stabilität und Aktivität in verschiedenen Puffern und pH-Werten geben grundlegende Aufschlüsse über ein Enzym und erlauben eine optimale Reaktionsführung.

Mit einer erhöhten Reaktionstemperatur ging ebenfalls eine Erhöhung der Enzymaktivität der DXS einher, wie es mittels Enzymtest 1 nachgewiesen werden konnte. Enzymtest 1 erwies sich für das Temperaturprofil wie auch für die Untersuchung des pH-Spektrums der DXS als vorteilhaft, da bei diesem Aktivitätstest die aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd gebildete 1-Desoxy-D-xylulose mittels HPLC direkt quantifiziert wurde und kein Hilfsenzym nötig war, dessen Aktivität von den Reaktionsbedingungen ebenfalls beeinflusst werden konnte. Die DXS war innerhalb des untersuchten Temperaturbereiches von 4°C bis 65°C enzymatisch aktiv, mit einem Temperaturmaximum bei etwa 55°C (Abb. 12A).

Während unterhalb dieser Temperatur die Aktivität mit einem Q_{10} von durchschnittlich 2,2 anstieg, fiel die Enzymaktivität oberhalb des Temperaturmaximums deutlich ab. Die DXS zeigte damit *in vitro* ein für Enzyme mesophiler Organismen charakteristisches Temperatur-Verhalten (Bisswanger, 2000). Die Enzymaktivität betrug bei 4°C noch etwa ein Viertel der Aktivität bei Standard-Messbedingungen von 30°C. In der Arrhenius-Darstellung von Enzymaktivität und Temperatur zeigte die DXS-Aktivität ein lineares Verhalten (Abb. 12B), wodurch aus der Geradengleichung eine Aktivierungsenergie (E_a) ermittelt werden konnte. Die E_a der DXS lag mit 38,3 kJ/mol im Rahmen typischer Aktivierungsenergien von Enzymen von 40 – 50 kJ/mol (Bisswanger, 2000).

Ebenso wie die Enzymaktivität war auch die Stabilität der DXS abhängig von der Temperatur, bei der sie inkubiert wurde. Die Halbwertszeiten als Mass für die Stabilität der DXS wurden durch Inkubation des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen und Bestimmung der Enzymaktivität in regelmässigen Abständen bestimmt. Die DXS wies bei Lagerung bei 4°C eine Halbwertszeit von über 1,5 Monaten auf (Tab. 8). Die Halbwertszeiten bei 20 bzw. 30°C betrugen nur noch 4 bzw. 2 Tage, während die Aktivität im Bereich des Temperaturmaximums von 55°C bereits nach 11 Minuten auf die Hälfte des Ausgangswertes zurückging.

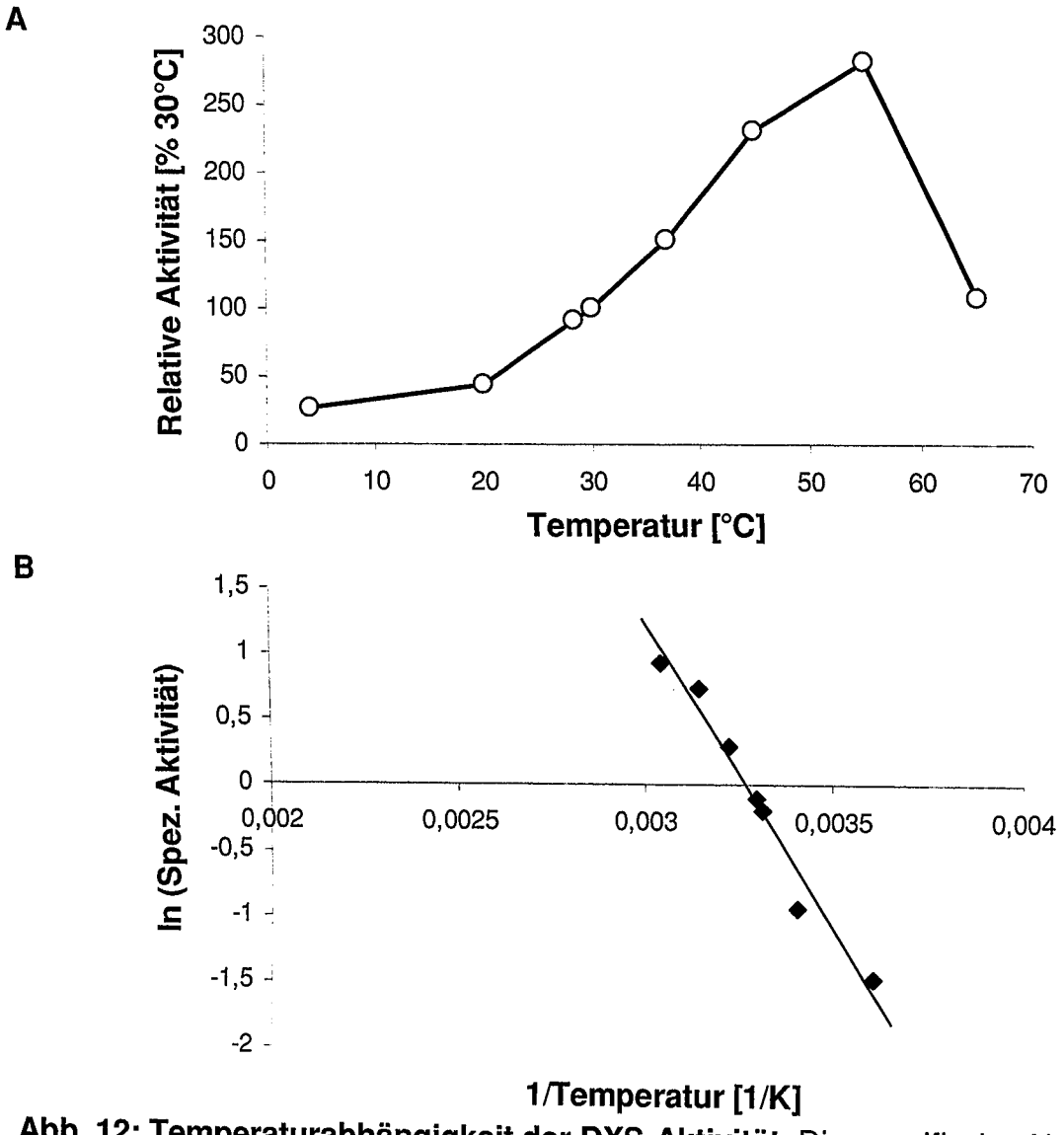


Abb. 12: Temperaturabhängigkeit der DXS-Aktivität. Die spezifische Aktivität von DXS wurde bei Temperaturen von 4°C bis 65°C mittels Enzymtest 1 bestimmt.
A: Direkte Auftragung der DXS-Aktivität in % der Enzymaktivität bei 30°C (Standard).
B: Arrhenius-Darstellung; Die Steigung der Geraden entspricht dem Quotienten aus der Aktivierungsenergie des Übergangszustandes (E_a) und der Gaskonstanten (R).

Enzymatische Umsetzungen mit der DXS sollten daher bei Temperaturen von 30°C oder niedriger durchgeführt werden, da der Aktivitätsverlust bereits nach kurzer Inkubationszeit hoch ist. Auch Umsetzungen bei 4°C sind möglich, da die DXS immer noch etwa 25% der Aktivität bei 30°C und eine zufriedenstellende Stabilität bei 4°C aufweist.

Tab. 8: Halbwertszeiten der DXS bei unterschiedlichen Temperaturen.
Die Enzymaktivitäten von DXS in Elutionspuffer mit 20 mM Hepes pH 8,0 wurden über einen Zeitraum von bis zu 70 Tagen nach Enzymtest 1 und 2 bestimmt.

Temperatur [°C]	4	20	30	37	45	55
Halbwertszeit	47,5 d	99 h	48 h	18 h	3,7 h	11 min

Neben der Temperatur hatte auch der Puffer, in dem die DXS gereinigt und gelagert wurde, einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms. Während die Halbwertszeit bei 4°C von DXS in Elutionspuffer pH 8,0 mit 20 mM Hepes 47,5 Tage betrug, war die Halbwertszeit bei 4°C in Elutionspuffer pH 8,0 mit 20 mM TrisHCl bzw. 20 mM Bicin mit 9,1 Tagen bzw. 2,1 Tagen deutlich geringer (Abb. 13). Eine Erklärung für diesen Einfluss der Puffersubstanz auf die Halbwertszeit der DXS könnte eine Reaktion des tertiären Amins von Tris oder von Bicin mit einer Aminosäure des aktiven Zentrums der DXS unter Bildung eines kovalenten, inaktiven Komplexes oder die Begünstigung einer irreversiblen Entfaltung der DXS durch Tris oder Bicin sein.

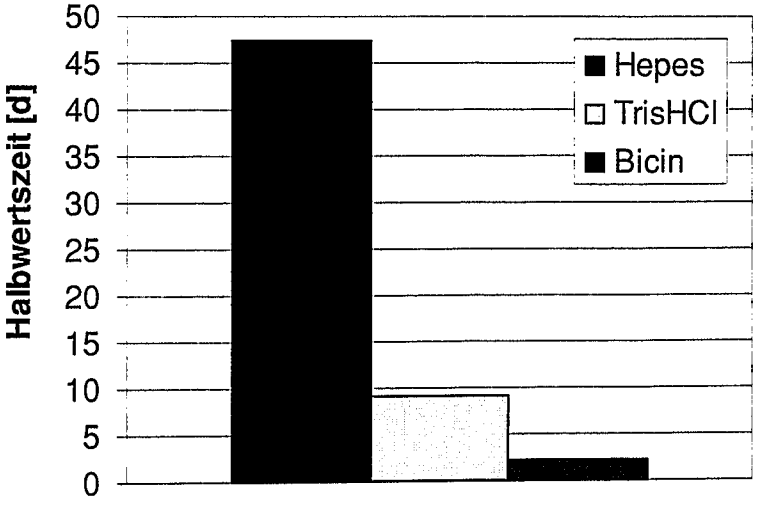


Abb. 13: Abhängigkeit der Halbwertszeit von Puffersubstanzen. DXS wurde in 20 mM Hepes, TrisHCl bzw. Bicin enthaltenden Puffern präpariert, gereinigt und gelagert. Die Enzymaktivität wurde über einen Zeitraum von bis zu 70 Tagen mittels Enzymtest 1 ermittelt.

Wie die Temperatur hatte auch der pH-Wert Einfluss auf die Enzymaktivität der DXS. In einem pH-Bereich von 5,5 bis 10,5 konnte unter Verwendung verschiedener Puffersyteme DXS-Aktivität nachgewiesen werden. Das Optimum mit 90 – 100% der maximalen Aktivität lag zwischen pH 6,5 und pH 8,0 (Abb. 14). Unterhalb von pH 6,5 sank die Aktivität schnell ab, so dass bei pH 5,0 keine Aktivität mehr nachweisbar war. Dagegen wies die DXS bis pH 10,0 noch mehr als 50% der maximalen Aktivität und somit im basischen einen relativ breiten Bereich hoher Restaktivität auf. Auffällig waren die deutlich niedrigeren DXS-Aktivitäten mit TrisHCl als Puffersubstanz. Diese erreichten maximal 60% der Aktivität verglichen mit den Mittelwerten der ebenfalls getesteten Puffersysteme MES, Imidazol, Hepes, Bicin, CHES und CAPS (Abb. 14).

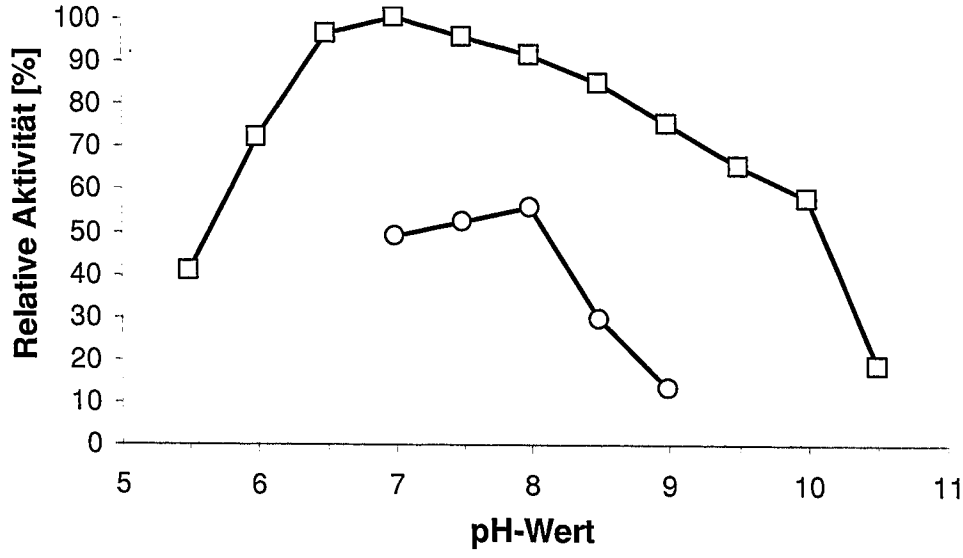


Abb. 14: pH-Profil der DXS-Aktivität. Relative Aktivität bezogen auf pH 7,0 (100 %) gemessen nach Enzymtest 1. Mittelwerte aus Messungen in je 50 mM Glycylglycin, Citrat, MES, Imidazol, Hepes, Bicin, CHES und CAPS (□) bzw. 50 mM TrisHCl (○).

Neben der Enzymaktivität war auch die Halbwertszeit der DXS in Tris-Puffer im Vergleich zu Hepes deutlich reduziert (Abb. 13). Ein solche Korrelation von Aktivität und Stabilität war im Falle von Bicin jedoch nicht zu beobachten. Obwohl die Halbwertszeit bei 4°C nur etwa 2 Tage betrug, war die DXS-Aktivität in Bicin vergleichbar hoch wie in den anderen Puffersytemen. Es scheinen daher zwei verschiedene Effekte vorzuliegen, von denen der eine langfristige Auswirkung auf das Enzym hat und damit seine Stabilität reduziert, während der zweite (direkt oder indirekt) die enzymatische Reaktion inhibiert.

1.3 DXS hat eine hohe Affinität zu den Kofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+}

Die enzymatische Aktivität der 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthase ist abhängig von der Anwesenheit des Kofaktors Thiamindiphosphat (ThDP, Sprenger et al., 1997). In ThDP-abhängigen Enzymen wie Transketolase, Pyruvat-Oxidase und Pyruvat-Decarboxylase wird der Diphosphat-Rest von ThDP zum einen über Wasserstoffbrücken-Bindungen mit Aminosäureresten des Enzyms und zum anderen über ein divalentes Metallion (Me^{2+}) wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} fixiert (Heinrich et al., 1972; Muller et al., 1993).

Zur Charakterisierung der Protein/Kofaktor-Interaktionen der DXS auf biochemischer Ebene wurde kofaktorfreie Apo-DXS benötigt. Diese konnte durch mehrmalige Dialyse von Holo-DXS gegen Puffer ohne ThDP (50 mM Hepes pH 7,0 bzw. 8,5, 1 mM DTT) und zweiwertige Kationen sowie Zugabe von 10 mM EDTA und erneuter

Dialyse, um EDTA und damit komplexierte Me^{2+}-Ionen wieder zu entfernen, gewonnen werden. Apo-DXS zeigte ohne Zugabe von ThDP keine Aktivität mehr (< 1 mU/mg). Diese konnte durch Zugabe von 1 mM ThDP und 1 mM Mg^{2+} bis auf 66% der Ausgangsaktivität rekonstituiert werden. Die alleinige Zugabe von ThDP bewirkte eine Rekonstitution von 63% verglichen mit der Aktivität bei Rekonstitution mit ThDP und Mg^{2+}. In Anwesenheit von EDTA fand keine Rekonstitution der Apo-DXS durch ThDP alleine statt. Dies deutete auf einen Restgehalt an Me^{2+}-Ionen in Apo-DXS oder einer Enzymtest-Komponente hin und unterstreicht die Abhängigkeit der ThDP-Bindung in der DXS durch zweiwertige Metallionen. Eine Rekonstitution der Apo-DXS war ebenfalls mit zweiwertigen Mangan-, Calcium- und Kobalt-, allerdings nicht mit Nickel- oder Zink-Ionen möglich. Mit Mn^{2+} wurden identische Aktivitäten bei deutlich geringerer Rekonstitutionszeit als mit Mg^{2+} erreicht (Tab. 9). Die Rekonstitution mit Ca^{2+} bzw. Co^{2+} verlief deutlich langsamer und führte zu geringeren Enzymaktivitäten. Die Reihenfolge der Reaktivierungs-Geschwindigkeit für DXS in Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen lautete (Tab. 9):

$$\mathbf{Mn^{2+} > Mg^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+}}$$

Mit 10 µM Mg^{2+} wurden noch immer 85% der Aktivität bezogen auf die Aktivität mit 1 mM Mg^{2+} erzielt, was bedeutet, dass der apparente K_M-Wert für Mg^{2+} unterhalb 10 µM lag. Aufgrund der hohen Restaktivität ohne Zugabe von Me^{2+}-Ionen konnte der exakte K_M-Wert nicht bestimmt werden.

Tab. 9: Rekonstitution der Apo-DXS mit zweiwertigen Metallionen. Apo-DXS wurde mit je 1 mM zweiwertigen Kationen und beiden Substraten vorinkubiert und der Aktivitätstest (Enzymtest 2) durch Zugabe von je 10 µM ThDP gestartet. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wurde anhand der NADPH-Abnahme verfolgt. n. n. = nicht nachweisbar

	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Ca^{2+}	Co^{2+}	- Me^{2+}	+ EDTA
Aktivität [% Mg^{2+}]	100	99	78	47	63	n. n.
Rekonstitutionszeit [s]	38	< 10	410	124	432	n. n.

Durch Bestimmung der DXS-Aktivitäten nach Rekonstitution mit variablen ThDP-Konzentrationen bei 1 mM Mg^{2+} konnte ein apparenter K_M-Wert für ThDP von 0,30 ± 0,04 µM ermittelt werden (Abb. 15). Die Affinität der DXS von *E. coli* gegenüber den Kofaktoren ThDP und Mg^{2+} lagen mit diesen Michaelis-Konstanten in Bereichen, der typisch ist für ThDP-abhängige Enzyme wie Pyruvat-Decarboxylasen (Bringer-Meyer

et al., 1986; Killenberger-Jabs et al., 1997), Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente (Fang et al., 1998) oder Transketolasen (Wood, 1985; Sprenger et al., 1995a).

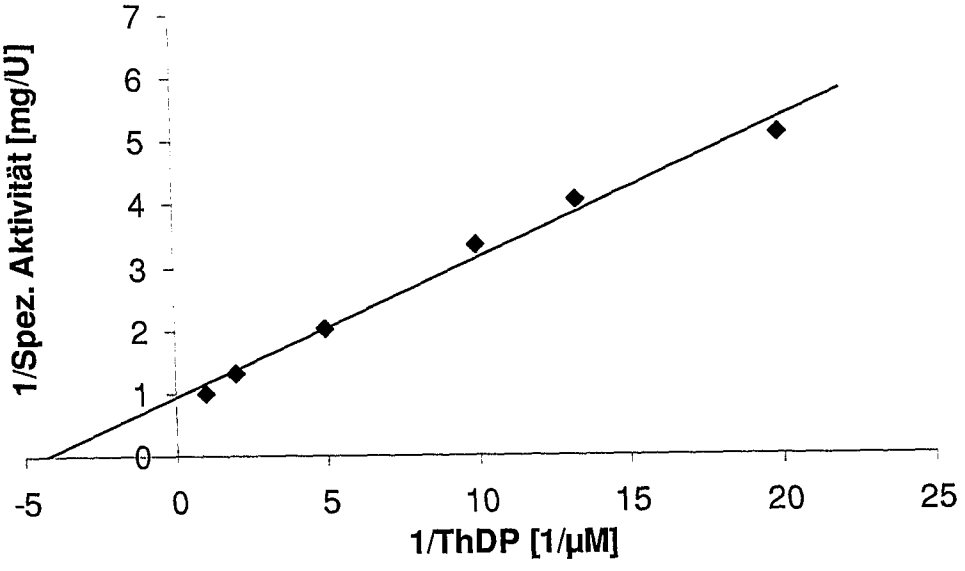


Abb. 15: Affinität der DXS gegenüber Thiamindiphosphat. Doppelt reziproke Auftragung der Enzymaktivität gegen die ThDP-Konzentration bei Rekonstitution von Apo-DXS mit 0,05 bis 1 µM ThDP und jeweils 1 mM Mg^{2+}. K_M (ThDP) = 0,30 µM.

1.4 Enzymkinetik der DXS gegenüber ihren physiologischen Substraten

Die Umsetzung von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat (DXP) und CO_2 stellt die physiologische Reaktion der DXS am Übergangspunkt von Zentralstoffwechsel und den Biosynthesewegen zu Isopentenyldiphosphat, Thiamindiphosphat und Pyridoxalphosphat in *E. coli* dar. Neben Glycerinaldehyd-3-Phosphat kann *in vitro* auch der nicht phosphorylierte Glycerinaldehyd als Akzeptor für die von der DXS übertragenen Hydroxyethylgruppe dienen (Sprenger et al., 1997; Lois et al., 1998). Es war allerdings unklar, ob diese Umsetzung, die zur Bildung der nicht phosphorylierten 1-Desoxy-D-xylulose (DX) führt, eine physiologische Relevanz in *E. coli* besitzt (Sprenger et al., 1997).

Die Michaelis-Konstanten (K_M) als Mass für die Affinität gegenüber einem Substrat und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) der *E. coli*-DXS wurden für das Donorsubstrat Pyruvat (Abb. 16) und die Akzeptorsubstrate Glycerinaldehyd-3-P und Glycerinaldehyd (Abb. 17) mit gereinigtem Enzym bestimmt. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten bzw. die Reaktionsgeschwindigkeiten für diese Substrate waren mit 4,1 bis 4,3 U/mg bzw. 4,3 bis 4,7 U/mg fast gleich (Tab. 10).

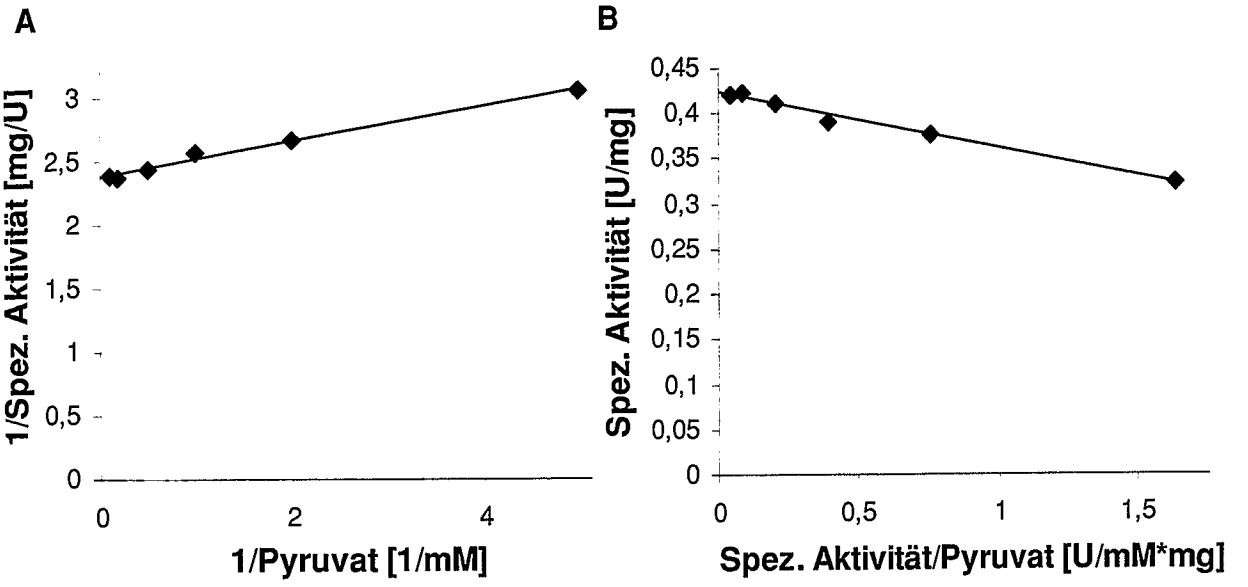


Abb. 16: Bestimmung kinetischer Parameter für das Donorsubstrat Pyruvat.
A: Lineweaver-Burk-Auftragung der DXS-Aktivität gegen die Pyruvat-Konzentration
B: Eadie-Hofstee-Auftragung von Enzymaktivität und Substrat-Konzentration

Im Falle von Glycerinaldehyd als Akzeptorsubstrat setzte DXS alleine die D-Form um, was sich in der nahezu vollständigen Umsetzung der Substrate Pyruvat- und D-Glycerinaldehyd (je 10 mM) nach Inkubation über Nacht widerspiegelte. Bei der Verwendung von 10 mM Pyruvat und 10 mM D,L-Glycerinaldehyd wurden beide Substrate über Nacht nur etwa zur Hälfte umgesetzt, während mit der L-Form von Glycerinaldehyd praktisch keine Abnahme der Edukte zu erkennen war und nur

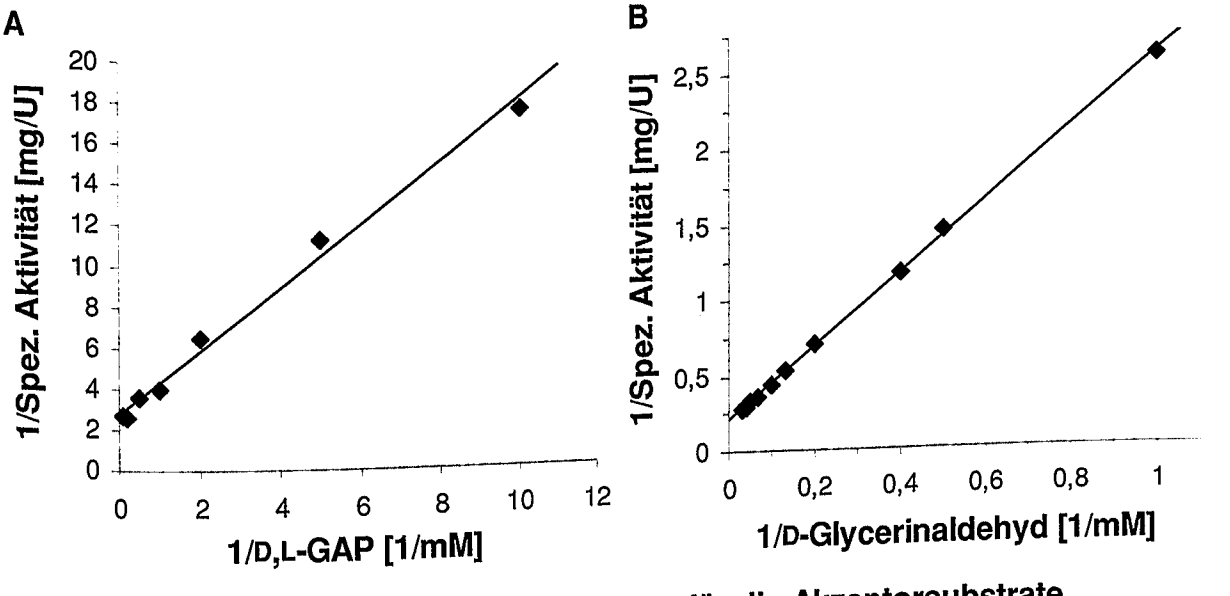


Abb. 17: Bestimmung kinetischer Parameter für die Akzeptorsubstrate Glycerinaldehyd-3-Phosphat (A) und D-Glycerinaldehyd (B). Lineweaver-Burk-Auftragung der Enzymaktivität gegen die Substrat-Konzentration. Die Bestimmung der DXS-Aktivität erfolgte nach Enzymtest 2 (A) bzw. 1 (B).

geringe Mengen DX detektiert (0,258 mM) wurden. Bei effektiv gleich hohen Konzentrationen von D-Glycerinaldehyd in DXS-Aktivitätstests mit dem racemischen Glycerinaldehyd (20 mM) und der D-Form von Glycerinaldehyd (10 mM) wurden nahezu gleich hohe Enzymaktivitäten erreicht, während mit 10 mM L-Glycerinaldehyd praktisch keine Aktivität festzustellen war (Abb. 18).

Aufgrund der selektiven Umsetzung der D-Form von Glycerinaldehyd, war davon auszugehen, dass DXS auch aus einem racemischen Gemisch von D,L-Glycerinaldehyd-3-P selektiv die D-Form umsetzte. D-Glycerinaldehyd-3-P und D-Glycerinaldehyd wurden zwar mit gleich hohen Aktivitäten umgesetzt, allerdings war die Affinität der DXS gegenüber D-Glycerinaldehyd-3-P um den Faktor 25 höher als gegenüber D-Glycerinaldehyd. Mit 10,4 mM lag der K_M-Wert für D-Glycerinaldehyd in einem Bereich, der eine physiologische Relevanz dieser Reaktion unwahrscheinlich erscheinen lässt. Die K_M-Werte für D-Glycerinaldehyd-3-P und Pyruvat lagen dagegen mit 0,44 mM und 0,10 mM deutlich niedriger, so dass diese Reaktion wahrscheinlich auch *in vivo* effektiv katalysiert werden kann.

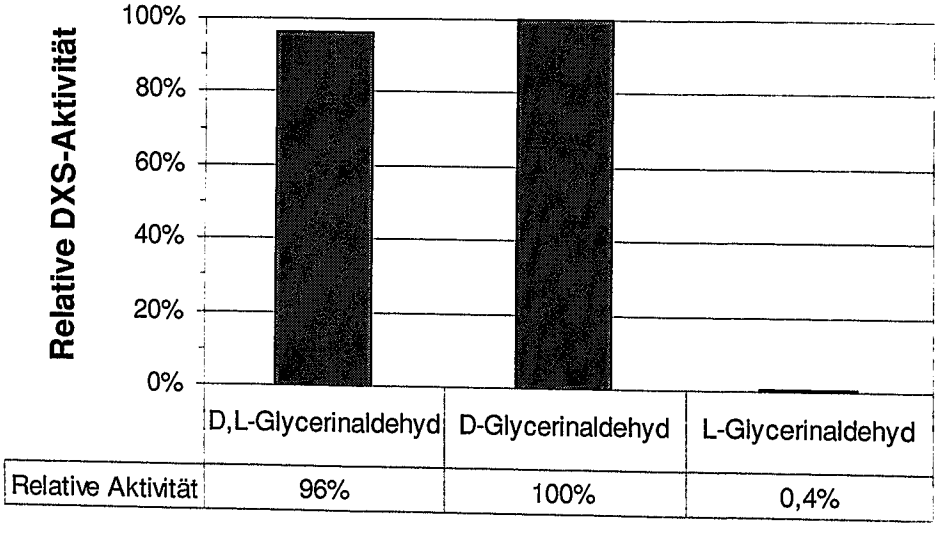


Abb. 18: Selektivität der DXS gegenüber Glycerinaldehyd. Die Aktivität von DXS mit 20 mM D,L-Glycerinaldehyd bzw. 10 mM D- und L-Glycerinaldehyd wurden nach Enzymtest 1 bestimmt und auf die höchste Aktivität bezogen.

Tab. 10: Kinetische Parameter für Pyruvat, D-GAP und D-Glycerinaldehyd. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen nach Enzymtest 1 für D-Glycerinaldehyd bzw. Enzymtest 2 für D-GAP gemäss Abbildungen 16-18 dar.

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]	V_{max} [U/mg]	K_M [mM]
Pyruvat	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,1	0,10 ± 0,04
D-GAP	4,1 ± 0,1	4,3 ± 0,1	0,44 ± 0,15
D-Glycerinaldehyd	4,3 ± 0,1	4,7 ± 0,1	10,43 ± 1,58

1.5 Die DXS-Reaktion verläuft nach einem Ping-Pong-Mechanismus

Im Verlauf der DXS-Reaktion werden die beiden Substrate Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-P gebunden und die beiden Produkte 1-Desoxy-D-xylulose-5-P und CO_2 freigesetzt. Eine solche Bi Bi-Reaktion kann je nach Abfolge der Substrat-Bindung und Produkt-Freisetzung klassifiziert und durch Bestimmung der K_M-Werte eines Substrates bei verschiedenen Konzentrationen des zweiten Substrates charakterisiert werden (Bisswanger, 2000).

Die Lineweaver-Burk-Auftragung zur Bestimmung der K_M-Werte für Pyruvat bei variablen D-Glycerinaldehyd-Konzentrationen (5 – 20 mM) zeigte eine Schar von parallelen Geraden (Abb. 19). Ein solcher Verlauf charakterisierte die DXS-Reaktion als einen Ping-Pong-Mechanismus, bei dem das erste Substrat (Pyruvat) gebunden wird, eine Teilreaktion abläuft (Bildung des Hydroxyethyl-ThDP-Intermediates) und das erste Produkt (CO_2) freigesetzt wird. Im zweiten Reaktionsteil wird das zweite Substrat (D-GAP) gebunden und es findet die zweite Teilreaktion (Aldol-Kondensation der Hydroxyethylgruppe mit D-GAP) sowie die Freisetzung des zweiten Produktes (DXP) statt.

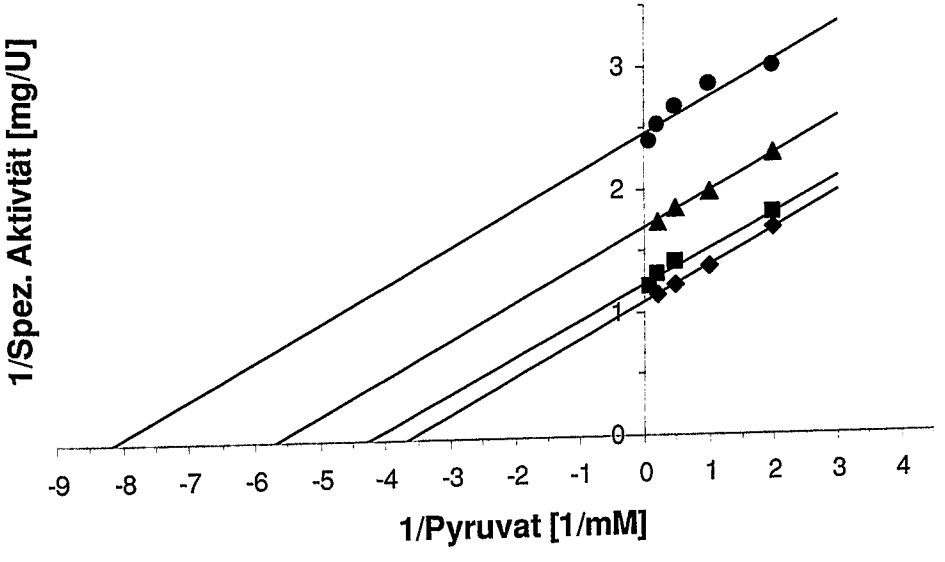


Abb. 19: Bestimmung des Reaktionsmechanismus der DXS. Doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung zur K_M-Bestimmung für Pyruvat bei D-Glycerinaldehyd-Konzentrationen von 5 mM (●), 10 mM (▲), 15 mM (■) und 20 mM (◆).

1.6 Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat sind kompetitive Inhibitoren der DXS

Auf eine inhibitorische Wirkung auf die Enzymaktivität der DXS wurden Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen untersucht. Zum einen wurde eine mögliche „Feedback"-Inhibierung durch Intermediate der Isoprenoid-, Thiamindiphosphat- und

Pyridoxalphosphat-Biosynthese und zum anderen Substanzen, die von ihrer Struktur den Substraten und dem Produkt der DXS-Reaktion verwandt sind, überprüft. Ausserdem wurden zwei Inhibitoren der ThDP-abhängigen Acetohydroxysäure-Synthasen (AHAS, LaRossa & Schloss, 1984; Hill et al., 1997) verwendet.

Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat, die wie Pyruvat α-Ketosäuren darstellen, inhibierten die Umsetzung von Pyruvat und D-GAP zu DXP signifikant. Als Substrat-Analoga zu Pyruvat (Abb. 20A) stellten sie kompetitive Inhibitoren der DXS dar, die mit Pyruvat um die Bindung im aktiven Zentrum der DXS konkurrieren, wie man aus der Bestimmung der K_M-Werte für Pyruvat in Anwesenheit verschiedener Inhibitor-Konzentrationen ableiten konnte (Abb. 20 B+C). Die aus Abbildung 20 ermittelten Inhibitions-Konstanten (K_i) betrugen für Hydroxypyruvat 2,4 ± 0,2 mM und für α-Ketobutyrat 6,5 ± 0,2 mM.

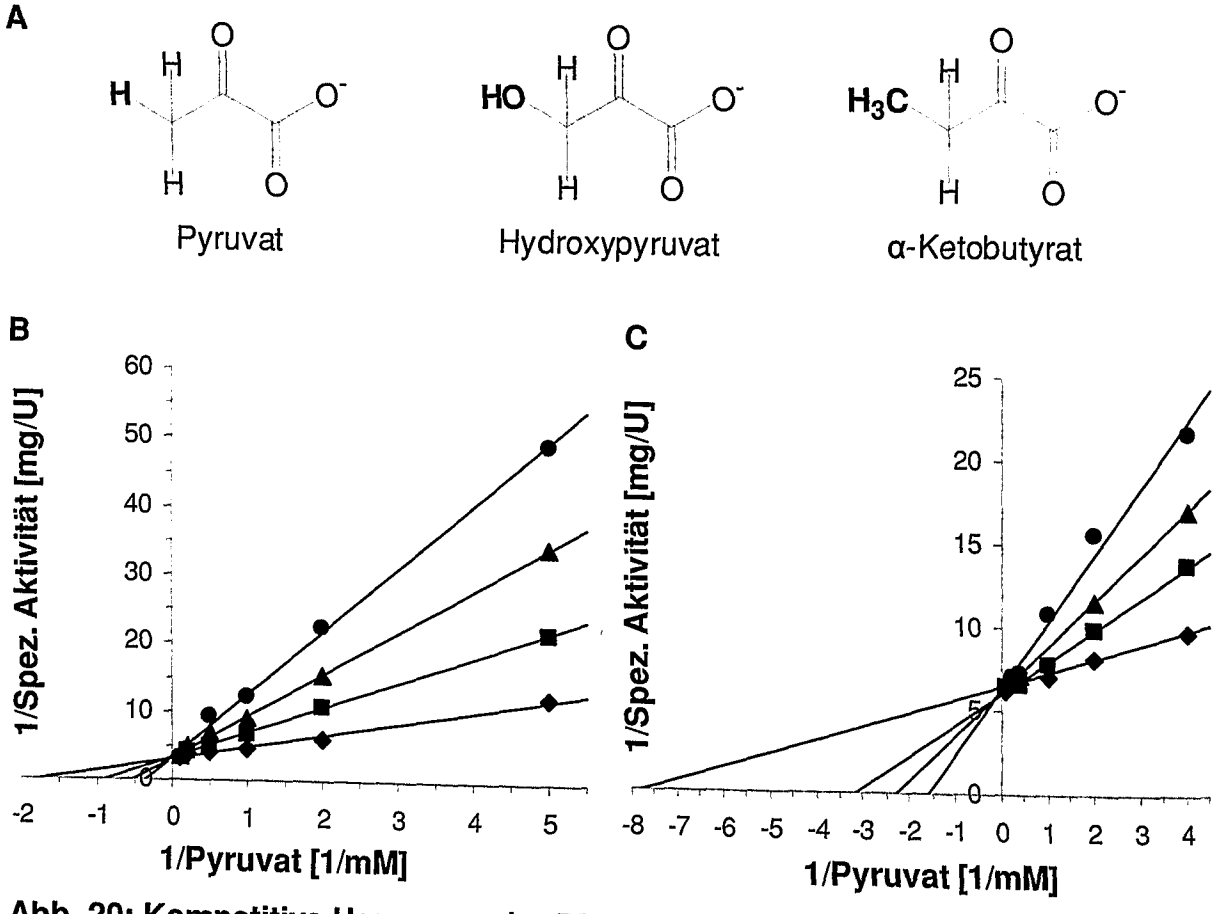


Abb. 20: Kompetitive Hemmung der DXS durch Pyruvat-Analoga.
A: Strukturformeln von Pyruvat, Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat.
B + C: Lineweaver-Burk-Auftragungen zur Ermittlung der K_i-Werte bei **A:** 10 mM (●), 5 mM (▲), 2,5 mM (■) und ohne Hydroxypyruvat (◆) bzw. **B:** 25 mM (●), 17,5 mM (▲), 10 mM (■) und ohne α-Ketobutyrat (◆)

Die Ergebnisse aller Substanzen, die auf Inhibierung der DXS getestet wurden, sind in Tabelle 11 zusammengefasst. In höheren Konzentrationen bewirkten nur ThDP (≥ 20 mM), Pyridoxalphosphat (3,2 mM), anorganisches Phosphat (≥ 10 mM) und DXP (10 mM) eine Erniedrigung der DXS-Aktivitäten. Aufgrund der relativ hohen Effektor-Konzentrationen ist eine physiologische Relevanz dieser Inhibition nicht wahrscheinlich und wurde nicht weiter untersucht. Die geringe Inhibition durch Geranylgeranyl-Pyrophosphat wurde wegen der geringen Löslichkeit in wässriger Phase und der späten Position in der Isoprenoid-Biosynthese, die eine regulatorische Funktion dieses Metaboliten unwahrscheinlich macht, nicht weiter verfolgt.

Tab. 11: Inhibition der DXS durch Intermediate der Isoprenoid-, Thiamin- und Pyridoxal-Biosynthese sowie durch Substrat- und Produkt-Analoga. DXS wurde mit den aufgeführten Substanzen für 15 min inkubiert und die Restaktivität im Vergleich zu einem Ansatz ohne potentiellen Inhibitor nach Enzymtest 1 ([1]) bzw. Enzymtest 2 ([2]) bestimmt. n. b. = nicht bestimmt, - = keine spezifische Hemmung.

Substanz	Konzentration [mM]	Restaktivität [%]	K_i [mM]
Isoprenoid-Biosynthese			
Isopentenyl-PP_i [1,2]	0,17	96	-
Dimethylallyl-PP_i [1,2]	0,17	95	-
Geranyl-PP_i [1,2]	0,14	98	-
Geraniol [1,2]	0,5	98	-
Farnesyl-PP_i [1,2]	0,12	91	-
Farnesol [1,2]	0,5	97	-
Geranylgeranyl-PP_i [1,2]	0,1	84	-
1-Desoxyxylulose-5-P [1]	10	84	n. b.
Thiamin-Biosynthese			
Thiamin [1]	20	108	-
Thiaminmonophosphat [1]	0,5	105	-
Thiamindiphosphat [1]	20	88	n. b.
Pyridoxal-Biosynthese			-
Pyridoxol [1]	0,5	104	-
Pyridoxal [1]	0,5	104	-
Pyridoxalphosphat [1]	3,2	69	-
Acetolactat-Synthase Inhibitoren			
Chlorosulfuron [1]	0,01	101	-
Sulfometuron-Methyl [1]	0,01	93	-

Tab. 11 (ff): Inhibition der DXS durch Intermediate der Isoprenoid-, Thiamin- und Pyridoxal-Biosynthese sowie durch Substrat- und Produkt-Analoga. DXS wurde mit den aufgeführten Substanzen für 15 min inkubiert und die Restaktivität im Vergleich zu einem Ansatz ohne potentiellen Inhibitor nach Enzymtest 1 ([1]) bzw. Enzymtest 2 ([2]) bestimmt. n. b. = nicht bestimmt, - = keine spezifische Hemmung.

Substanz	Konzentration [mM]	Restaktivität [%]	K_i [mM]
Substrat-/Produkt-Analoga			
Hydroxypyruvat [2]	2,5 – 10	kompetitiv	2,4 ± 0,2
α-Ketobutyrat [2]	10 – 25	kompetitiv	6,5 ± 0,2
Phosphat [1,2]	10 – 50	72	n. b.
Glycerin [1]	20	107	-
D-Arabinose-5-P [2]	3,5	107	-
Homo-1-Desoxyxylulose [2]	10	103	-

2. Substratspektrum und enzymatische Synthesen

2.1 Donorsubstrat-Spektrum der DXS

Neben dem physiologischen Hydroxyethyl-Gruppen („aktivierter Acetaldehyd")-Donor Pyruvat konnten mit der DXS auch strukturverwandte Substanzen als Donorsubstrate umgesetzt werden. Dies waren zum einen Acetaldehyd und Acetoin, bei deren Umsetzung ebenso wie bei Pyruvat ein aktivierter Acetaldehyd auf das Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd-3-P unter Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-P übertragen wurde. Zum anderen waren die α-Ketosäuren Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat nicht nur kompetitive Inhibitoren der DXS für Pyruvat (1.6), sondern dienten auch als Donorsubstrate. Bei der Umsetzung von Hydroxypyruvat bzw. α-Ketobutyrat wurde ein aktivierter Glykolaldehyd (Dihydroxyethyl-Gruppe) bzw. ein aktivierter Propionaldehyd auf die Akzeptorsubstrate transferiert (Abb. 21).

Die Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-P aus Acetaldehyd oder Acetoin und D-Glycerinaldehyd-3-P fand mit weniger als 1% der Reaktionsgeschwindigkeit mit Pyruvat als Donorsubstrat statt. Die Affinität der DXS gegenüber Acetaldehyd war bei einem K_M-Wert von 17,6 mM gering verglichen mit der Affinität gegenüber Pyruvat (K_M = 0,1 mM). Der K_M-Wert für Acetoin lag mit 77,2 mM etwa vier mal höher als die Michaelis-Konstante für Acetaldehyd.

Die Übertragung eines „aktivierten Glykolaldehydes" von Hydroxypyruvat auf D-Glycerinaldehyd bzw. D-Glycerinaldehyd-3-P unter Bildung von D-Xylulose bzw. D-Xylulose-5-P konnte mittels HPLC anhand von D-Xylulose-Standards

nachgewiesen werden. Für die Umsetzung von Hydroxypyruvat und D-Glycerinaldehyd zu D-Xylulose wurde mit der NADH-abhängigen Sorbitol-Dehydrogenase (SDH, Enzymtest 3) als Hilfsenzym ein V_{max} von 0,31 U/mg ermittelt. Der K_M-Wert für Hydroxypyruvat lag bei 4,8 mM. Der Transfer eines aktivierten Propionaldehydes von α-Ketobutyrat auf die Akzeptorsubstrate D-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd-3-P wurde durch Identifizierung und Quantifizierung des Reaktionsprodukts mittels HPLC anhand eines Standards authentischer 1,2-Didesoxy-D-*threo*-3-hexulose (Homo-1-Desoxy-D-xylulose; von Prof. Boland, Jena) nachgewiesen. Die Reaktion wurde von der DXS mit einer spezifischen

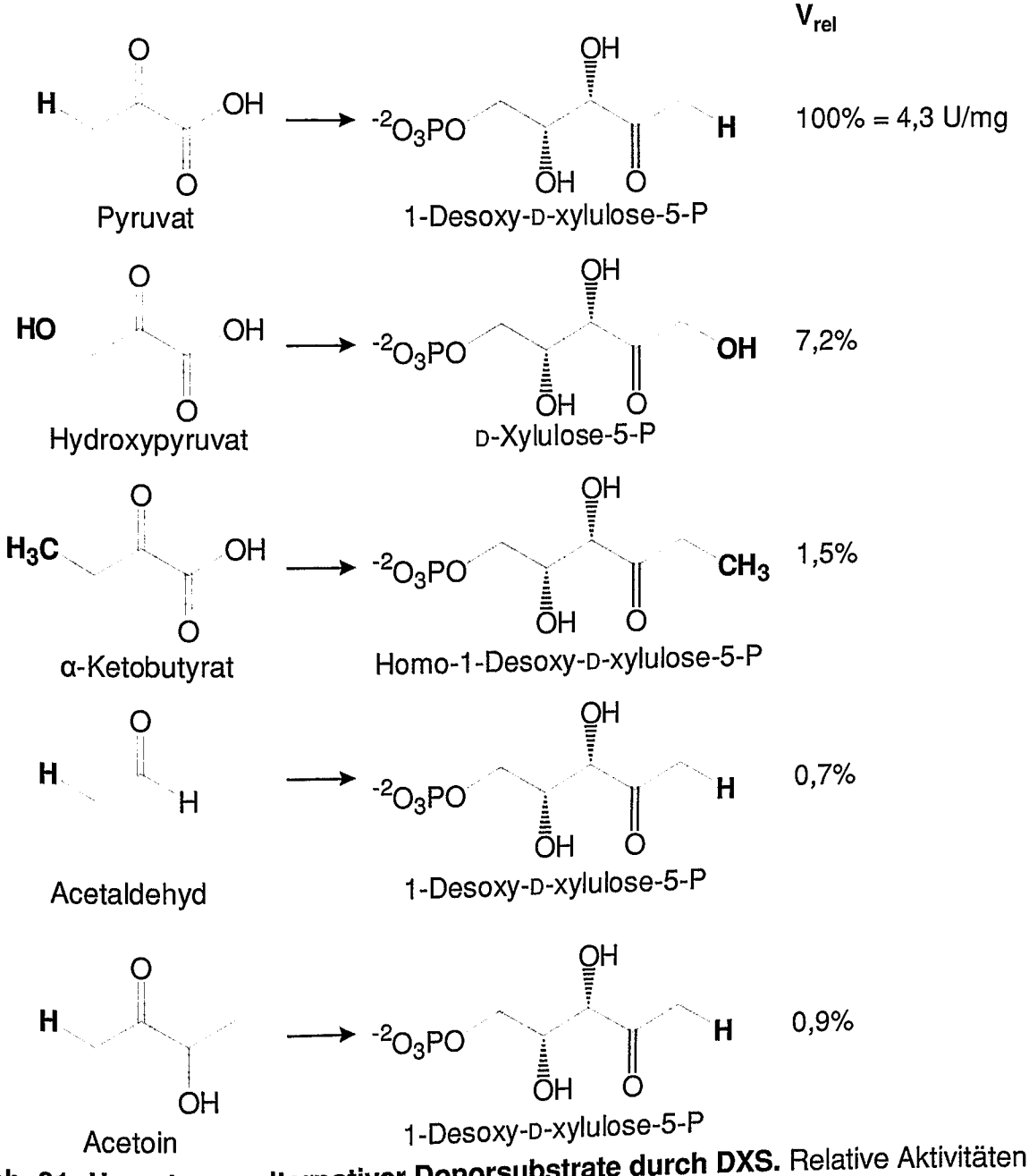


Abb. 21: Umsetzung alternativer Donorsubstrate durch DXS. Relative Aktivitäten mit D-GAP bzw. D-Glycerinaldehyd (Hydroxypyruvat) als Akzeptorsubstrat bezogen auf die physiologische Reaktion der DXS mit Pyruvat und D-GAP.

Aktivität von etwa 0,07 U/mg katalysiert, was 1,5% der Aktivität mit Pyruvat entsprach. Eine Übersicht der Donorsubstrate und der Reaktionsprodukte ist schematisch in Abbildung 21 dargestellt. Die kinetischen Parameter für Donor- und Akzeptorsubstrate der DXS sind in Tabelle 12 zusammengefasst.
Aufgrund der geringen Aktivität und der niedrigen Affinität der DXS gegenüber Acetaldehyd und Acetoin im Vergleich zu Pyruvat sind diese zum Einsatz in der enzymatischen Synthese als alternative aktivierter Acetaldehyd-Donoren wenig geeignet. Die bei der Verwendung von Hydroxypyruvat entstehenden Produkte können mit höheren Enzymaktivitäten ebenfalls mit Transketolase hergestellt werden (Zimmermann et al., 2000). Interessant sind dagegen die Produkte mit α-Ketobutyrat als Donorsubstrat, da diese vor allem in phosphorylierter Form chemisch schwer zugänglich sind (Grolle & Boland, persönliche Mitteilung). Durch Verwendung alternativer Akzeptorsubstrate zu D-Glycerinaldehyd-3-P und D-Glycerinaldehyd ist der Zugang zu einer Reihe von phosphorylierten und nicht phosphorylierten 1,2-Didesoxy-3-Ketosen möglich.

2.2 Umsetzung von alternativen Akzeptorsubstraten

Neben D-Glycerinaldehyd-3-P und D-Glycerinaldehyd konnte die DXS ebenfalls kurzkettige Aldehyde sowie Aldosen in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form als Akzeptorsubstrate für die Übertragung einer Hydroxyethyl-Gruppe verwenden. Die DXS-abhängige Umsetzung des Donorsubstrates Pyruvat mit den Akzeptorsubstraten Acetaldehyd, Glykolaldehyd, D-Erythrose, D-Erythrose-4-P, D- und L-Threose sowie D-Ribose und D-Ribose-5-P konnte mittels HPLC-Analyse anhand der Abnahme der Substrat-Peaks und dem Auftreten neuer Produkt-Peaks nachgewiesen werden (beispielhaft dargestellt für D-Ribose-5-P in Abb. 23B).
Unter Verwendung des Donorsubstrates Hydroxypyruvat (Enzymtest 3 bzw. 4) konnte die Affinität DXS für die Substrate Glykolaldehyd, D-Erythrose bzw. D-Erythrose-4-P umsetzt, bestimmt werden (Abb. 22). Die höchste Affinität und maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurden dabei für D-Erythrose-4-P mit einem K_M-Wert von 2 mM und einem V_{max}-Wert von 0,26 U/mg bestimmt, was 84% des V_{max}-Wertes der DXS mit Hydroxypyruvat und dem Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd entspricht. Glykolaldehyd wurde mit einem ähnlichen V_{max} von 0,22 U/mg (71% D-Glycerinaldehyd) bei einem deutlich höheren K_M-Wert von 23 mM umgesetzt. Die Umsetzung der unphosphorylierten D-Erythrose mit Hydroxypyruvat

durch die DXS fand mit einem V_{max} von 17% verglichen mit D-Glycerinaldehyd und einem K_M-Wert von 58 mM statt.

Das Fehlen einer endständigen Phosphatgruppe hatte im Fall von D-Glycerinaldehyd-3-P und D-Glycerinaldehyd keine Auswirkungen auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, führte aber zu einem deutlichen Anstieg des K_M-Wertes um den Faktor 25. Im Falle von D-Erythrose-4-P und D-Erythrose waren sowohl die Affinität als auch die Umsatzgeschwindigkeit für das unphosphorylierte Substrat deutlich niedriger. Eine Übersicht aller Substrate sowie der (zum Teil erwarteten) Produkte findet sich in Tabelle 12.

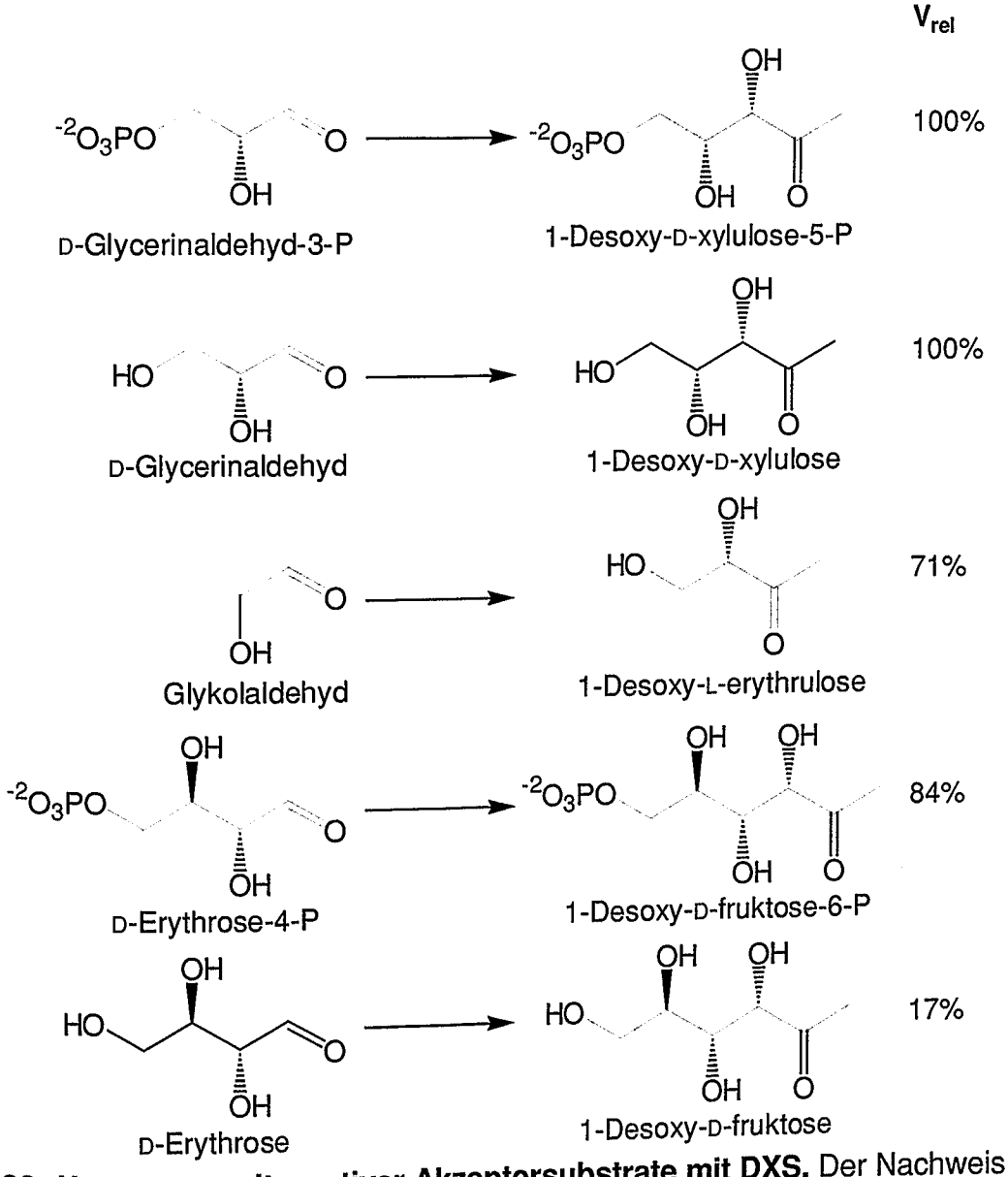


Abb. 22: Umsetzung alternativer Akzeptorsubstrate mit DXS. Der Nachweis der Reaktionen mit Pyruvat als Donorsubstrat erfolgte mittels HPLC-Analyse nach Enzymtest 1. Die relativen Enzymaktivitäten gegenüber Glykolaldehyd und D-Erythrose wurden unter Verwendung von Enzymtest 3 bzw. Enzymtest 4 für D-Erythrose-4-P mit Hydroxypyruvat als Donorsubstrat bezogen auf die Aktivität von DXS mit Hydroxypyruvat und D-Glycerinaldehyd (0,31 U/mg) bestimmt.

Standards für die erwarteten Produkte der Umsetzungen von Pyruvat mit D-Ribose, Ribose-5-Phosphat, D-Threose oder L-Threose waren weder kommerziell erhältlich noch leicht zu synthetisieren. Daher war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich die Produkte verlässlich zu quantifizieren, wie es für die Bestimmung der kinetischen Parameter der DXS für diese Substrate nötig gewesen wäre. Im Gegensatz zur stereoselektiven Umsetzung der D-Form von Glycerinaldehyd durch DXS wurden im Falle der C4-Aldose Threose sowohl die D- als auch die L-Form umgesetzt.

Tab. 12: Substratspektrum der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase. Aufgeführt sind die Spezifischen Enzymaktivitäten, V_{max}- und K_M-Werte für die Substrate, soweit diese bestimmbar waren, sowie die jeweiligen Produkte. Der Aktivitätsnachweis erfolgte nach Enzymtest 1 ([1]), 2 ([2]), 3 ([3]) oder 4 ([4]) bzw. Variationen dieser Tests. Die kinetischen Parameter für die Akzeptorsubstrate Glykolaldehyd, D-Erythrose und D-Erythrose-4-P wurden mit Hydroxypyruvat als Donorsubstrat nach Enzymtest 3 bzw. 4 durchgeführt. + = Umsetzung, ++ = vollständige Umsetzung, n. b. = nicht bestimmt

Substrat	V_{max} [U/mg]	K_M [mM]	Produkt
Donorsubstrate			
Pyruvat [1,2]	4,3 (100%)	0,1	1-Desoxyxylulose(-5-P)
Acetaldehyd [2]	0,029 (0,7%)	17,6	1-Desoxyxylulose-5-P
Acetoin [2]	0,037 (0,9%)	77,2	1-Desoxyxylulose-5-P
Hydroxypyruvat [1,3]	0,31 (7,2%)	4,8	Xylulose(-5-P)
α-Ketobutyrat [1]	0,067 (1,5%)	n. b.	Homo-1-Desoxyxylulose(-5-P)
Akzeptorsubstrate			
D-GAP [1,2]	4,3	0,4	1-Desoxy-D-xylulose-5-P
D-Glycerinaldehyd [1] (mit Pyruvat)	4,7	10,4	1-Desoxy-D-xylulose
L-Glycerinaldehyd [1]	0,02 (0,4%)	n. b.	1-Desoxy-D-xylulose
D-Glycerinaldehyd [3] (mit Hydroxypyruvat)	0,31 (100%)	10,4	D-Xylulose
Acetaldehyd [1]	+	n. b.	Acetoin
Glykolaldehyd [1,3]	0,22 (71%)	23	(1-Desoxy-) L-Erythrulose
D-Erythrose-4-P [1,4]	0,26 (84%)	2,0	(1-Desoxy-) Fruktose-6-P
D-Erythrose [1,3]	0,05 (17%)	58	(1-Desoxy-) Fruktose
D-Threose [1]	+	n. b.	1-Desoxy-D-sorbose
L-Threose [1]	+	n. b.	1-Desoxy-L-sorbose
D-Ribose-5-P [1]	++	n. b.	1-Desoxysedoheptulose-7-P
D-Ribose [1]	+	n. b.	1-Desoxysedoheptulose

2.3 Synthese einer 1-Desoxyheptulose-7-P mit der DXS

Mit gereinigter DXS aus *E. coli* konnten nahezu vollständige Umsetzungen der Substrate Pyruvat und D-Ribose-5-Phosphat erreicht werden. Das Auftreten von nur einem Produktpeak deutete auf die Enantioselektivität der Reaktion hin. Das Produkt war eine an Position 7 phosphorylierte 1-Desoxyheptulose, die analog zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat eine D-*threo*-Konfiguration aufweisen und somit eine 1-Desoxy-D-sedoheptulose-7-P darstellen sollte (Abb. 23).

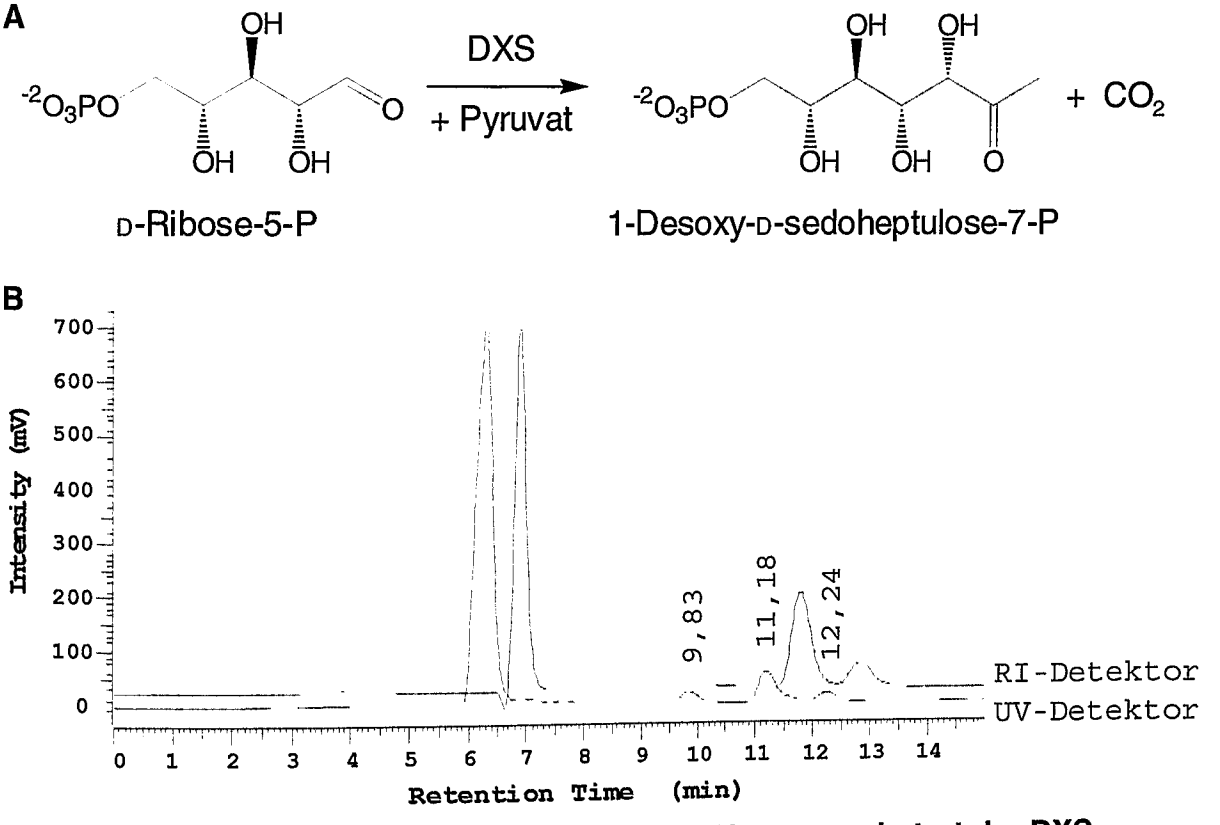


Abb. 23: D-Ribose-5-Phosphat als alternatives Akzeptorsubstrat der DXS.
A: Reaktionsschema der Umsetzung von Pyruvat mit D-Ribose-5-Phosphat mit DXS
B: HPLC-Nachweis der Substrate nach Dephosphorylierung: 9,83 min: Pyruvat; 11,18 min: D-Ribose(-5-P); 12,24 min: gebildetes Produkts; 6,30 min: Ausschlussvolumen der Säule

Die LC-MS-MS-Analyse des Reaktionsansatzes bestätigte die nahezu vollständige Umsetzung der Substrate und die Präsenz eines Produkts mit einer molekularen Masse von 273, welche der kalkulierten molekularen Masse einer phosphorylierten 1-Desoxysedoheptulose entspricht. Die Elektrospray-Ionisierung des Produkts ergab Fragmente mit molekularen Massen, die einer phosphorylierten Tetrose (199), Glykolaldehyd-Phosphat (139), Ethylenglykol (62), Phosphat (97) und Phosphit (79) entsprachen (Abb. 24A; R. Brückner, persönliche Mitteilung). Ähnliche Fragmente entstehen bei der Elektrospray-Ionisierung von D-Glukose-6-P und

1-Desoxy-D-xylulose-5-P (Feurle et al., 1998). Das Fragment mit der molekularen Masse 199 liess sich mittels MS-MS weiter zerlegen, wodurch erneut Glykolaldehyd-Phosphat (139), Ethylenglykol (62), Phosphat (97) und Phosphit (79) sowie ein Fragment mit der Masse eines Methanol-Phosphates (111) entstanden.

Die offenkettige Form der 1-Desoxysedoheptulose-7-P zyklisierte in wässriger Lösung, so dass im ^{1}H-NMR-Spektrum ein Halbacetal mit benachbarter Methylfunktion (C2 und C1) identifiziert werden konnte (A. A. DeGraaf, persönliche Mitteilung). Ebenso konnten unter Verwendung eines D-Sedoheptulose-Standards die Kohlenstoffatome 3 und 4 mit ihren Hydroxylgruppen mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie detektiert werden. Die endständige Phosphatgruppe an C7 wurde mittels ^{31}P-NMR nachgewiesen (Abb. 24B).

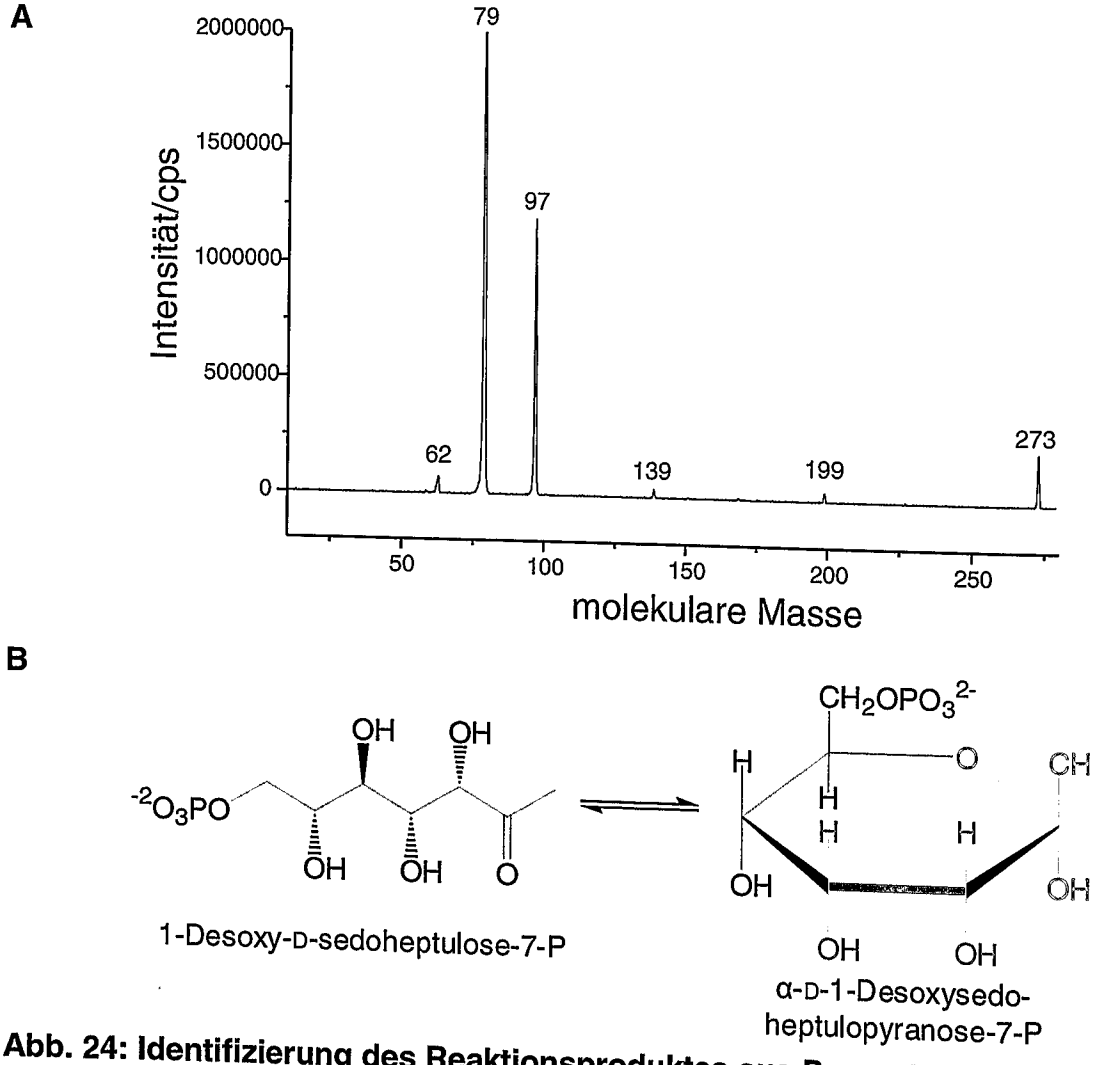


Abb. 24: Identifizierung des Reaktionsproduktes aus Pyruvat und D-Ribose-5-P
A: LC-ESI-MS-Analyse der 1-Desoxysedoheptulose-7-Phosphat.
B: Zyklisierung der offenkettigen 1-Desoxysedoheptulose-7-P zur Pyranoseform. Die farbig unterlegten Bereiche des Moleküls (blau = Phosphat-Ester an C7, rot = C2-Halbacetal mit C1-Methylgruppe und grün = C3- und C4-Hydroxylgruppen) wurden mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen.

2.4 Synthese eines Disaccharids mit DXS und Saccharose-Synthase

In Kooperation mit U. Römer und N. Nettelstroth (AG PD Dr. Elling, Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde DXS in einer gekoppelten enzymatischen Synthese zusammen mit der Saccharose-Synthase aus *Solanum tuberosum* (SuSy) eines Disaccharids aus 1-Desoxy-D-xylulose und D-Glukose eingesetzt. 1-Desoxy-D-xylulose wurde in einem Reaktionsansatz durch DXS aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd synthetisiert und als ringförmige Furanose (A. A. DeGraaf, persönliche Mitteilung) anstelle von D-Fruktose durch die SuSy mit Uridindiphosphat (UDP)-Glukose zu einem Disaccharid umgesetzt (Abb. 25). Dieses wurde als Saccharose-Peak nur in Ansätzen, die SuSy und DXS enthielten, detektiert (Abb. 26). Analog zur Umsetzung von D-Xylulose mit UDP-Glukose durch SuSy entstand wahrscheinlich ein α-D-Glucopyranosyl-β-D-1-Desoxyxylulofuranosid (Abb. 25).

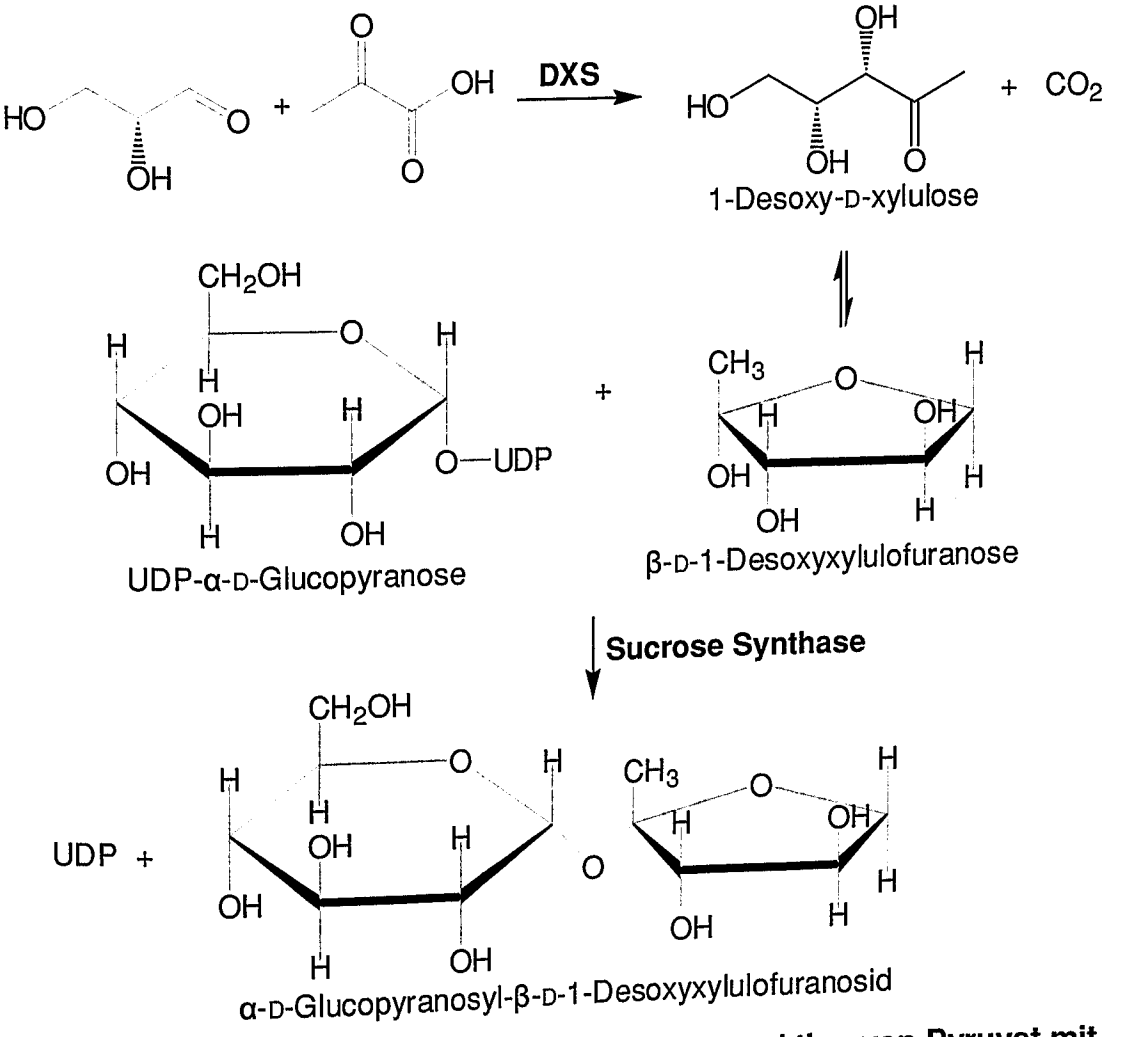


Abb. 25: Reaktionsschema der gekoppelten Enzymreaktion von Pyruvat mit D-Glycerinaldehyd und D-Glukose zu einem Disaccharid mit DXS und SuSy. Reaktionsbedingungen in Material + Methoden, Erläuterungen im Text.

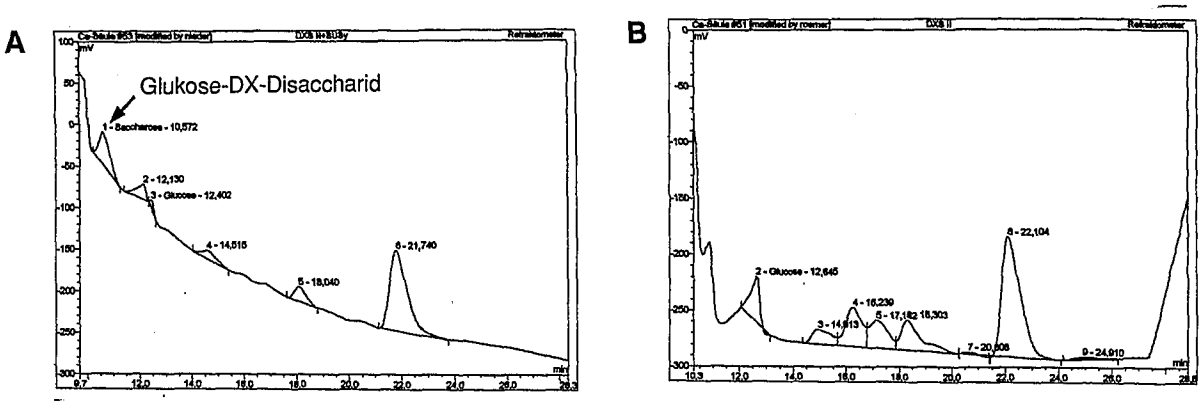


Abb. 26: HPLC-Analyse der Reaktionsansätze zur Synthese eines Disaccharids mit der 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthase und der Saccharose Synthase.
A: Reaktionsansatz mit DXS und SuSy; 90% der UDP-Glukose wurde verbraucht.
B: Reaktionsansatz nur mit DXS; keine Abnahme der UDP-Glukose

3. Bakterielle 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen

Der MEP-Biosyntheseweg zu Isopentenyldiphosphat ist in fast allen Bacteria mit Ausnahme der meisten gram-positiven Cocci, die den Mevalonat-Weg verwenden, verbreitet (Lange et al., 2000; Boucher & Doolittle, 2000; Wilding et al., 2000). Die Sequenzen von zahlreichen nachgewiesenen und hypothetischen bakteriellen 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen sind in Datenbanken zugänglich. Für vergleichende Studien mit der DXS aus *E. coli* in Hinsicht auf unterschiedliche Substratspektren, höhere Temperatur-Stabilität oder Kristallisierung wurden die Gene für die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen aus *Zymomonas mobilis* und *Thermotoga maritima* identifiziert, kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert.

3.1 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *Zymomonas mobilis*

Für die Amplifizierung des *dxs*-Gens von *Z. mobilis* standen die Sequenzdaten eines potentiellen *dxs*-Fragments von *Z. mobilis* ZM6 (G. A. Sprenger, unveröffentlicht), ein offener Leserahmen (ORF) aus einem noch nicht abgeschlossenen *Z. mobilis* ZM4-Genomprojekt (R. Overbeek, persönliche Mitteilung) und eines Cosmids mit einem DNA-Fragment von *Z. mobilis* ZM4 (Lee et al., unveröffentlicht) zur Verfügung. Die Sequenzdaten stimmten in einem Bereich von etwa 50 nt stromaufwärts des Start-Codons bis etwa 75 nt stromaufwärts des Stop-Codons bis auf wenige Rasterschübe überein. Stromabwärts dieses Bereiches zeigten sich deutliche Unterschiede in den ZM4-Sequenzen. Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben eine deutlich höhere Ähnlichkeit des C-Terminus des aus der Genprojekt-Sequenz abgeleiteten Proteins mit anderen DXS-Sequenzen als der C-Terminus des aus der

Cosmid-Sequenz abgeleiteten Proteins. Die Primer, mit denen das *dxs*-Gen aus chromosomaler DNA von *Z. mobilis* ZM6 amplifiziert wurde, waren daher aus den ersten beiden Sequenzen abgeleitet.

Das spezifische etwa 2 kb grosse PCR-Produkt wurde in den *Eco*RV-geöffneten Vektor pBluescript II KS(-) kloniert und die Nukleotidsequenz des resultierenden Plasmids pBLdxsZm unter Verwendung der vektorspezifischen T7-Promotor- und T3-Promotor-Sequenzierprimer bestimmt. Die vollständige doppelsträngige Sequenzierung des klonierten Produkts erfolgte unter Verwendung von 6 weiteren, sequenzspezifischen Sequenzierprimern (in Material und Methoden) und ergab einen offenen Leserahmen von 1950 nt für das *dxs*-Gens von *Z. mobilis* ZM6 (dxs_{Zmo}; die komplette Sequenz mit den Positionen der Sequenzierprimer und der abgeleiteten Aminosäuresequenz befindet sich im Anhang). 6 Nukleotide stromaufwärts des Start-Codons wurde eine potentielle, minimale Ribosomen-Bindestelle in Form einer AGG-Sequenz identifiziert. Das dxs_{Zmo}-Gen kodiert für ein Protein von 649 Aminosäuren und einer kalkulierten molekularen Masse von 70200.

Die vom dxs_{Zmo}-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz der 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthase von *Z. mobilis* (DXS_{Zmo}) wies zu den DXS-Sequenzen von Vertretern der α-Proteobakterien wie *Mesorhizobium loti* (64%; Tab.13) und der DXSA von *Rhodobacter capsulatus* (55%) sowie den plastidären DXS wie dem CLA1-Protein von *Arabidopsis thaliana* (53%) die höchste Identität auf. Der Verwandtschaftsgrad zu den DXS von γ-Proteobakterien wie *E. coli* und *Vibrio cholerae* war mit 50% und 51% geringer. Am niedrigsten war die Identität mit DXS-Sequenzen ursprünglicher Bakterien wie *Thermotoga maritima* und *Aquifex aeolicus* (41% und 48%).

Tab. 13: Sequenzähnlichkeiten der DXS aus *E. coli, Z. mobilis* und *T. maritima*. Prozentsatz identischer Aminosäuren der DXS aus *E. coli, Z. mobilis* und *T. maritima* (Nelson et al., 1999) mit den Sequenzen hypothetischer DXS von *Vibrio cholerae* (Heidelberg et al., 2000), *Mesorhizobium loti* (Kaneko, 2000) und *Aquifex aeolicus* (Deckert et al., 1998), die in Datenbankrecherchen die höchste Identität aufweisen.

% Identität	*E. coli*	*Z. mobilis*	*T. maritima*	*V. cholerae*	*M. loti*	*A. aeolicus*
E. coli	100	50	41	76	52	49
Z. mobilis	50	100	41	51	64	48
T. maritima	41	41	100	40	40	45
Vibrio cholerae	76	51	40	100	51	49
Mesorhizobium loti	52	64	40	51	100	48
Aquifex aeolicus	49	48	45	49	48	100

Für die heterologe Expression der DXS_{Zmo} in *E. coli* wurde das dxs_{Zmo}-Gen *Nde*I/*Hin*dIII in den Expressionsvektor pET-22b(+) kloniert, ohne in dem resultierenden Plasmid pETdxsZm eine His-tag-Kodierungssequenz zu erzeugen. Der Rohextrakt induzierter BLS-Zellen mit pETdxsZm wies die Anwesenheit eines Proteins von etwa 70 kDa, welches in der nicht induzierten Kontrolle nicht auftrat (Abb. 27).

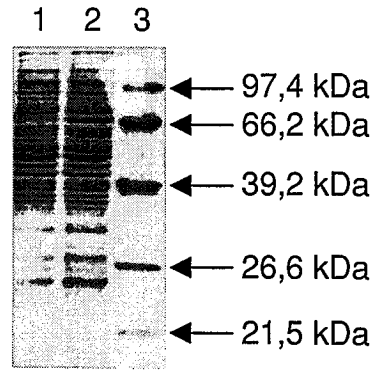


Abb. 27: Heterologe Expression der nativen DXS von *Z. mobilis* in *E. coli*.
Je 25 µg Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS pETdxsZm vor und 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden in einer SDS-PAGE analysiert.
1: vor Induktion 2: 4 h nach Induktion 3: Molekulargewichts-Standard

Die spezifische DXS-Aktivität in diesem Rohextrakt betrug 4,8 mU/mg, während im nicht induzierten Rohextrakt keine Aktivität nachweisbar war (< 1 mU/mg). Damit war die DXS-Aktivität auf die DXS_{Zmo} und nicht auf die chromosomal kodierte *E. coli*-DXS zurückzuführen. Bei deutlich erkennbarer Expression der DXS_{Zmo} (Abb. 27) lag nur eine zwölffach höhere DXS-Aktivität als in Rohextrakten des *E. coli*-Wildtypstamms LJ110 vor (0,4 mU/mg; Sprenger et al.,1997). Nach einer Anionenaustausch-Chromatographie an einer MonoQ HR5/5 des Rohextraktes konnte in keiner Fraktion mehr Aktivität nachgewiesen werden. Zusammen mit der geringen Aktivität bei grosser Proteinmenge im Rohextrakt war dies ein Indiz für eine instabile Faltung und rasche Denaturierung der DXS von *Zymomonas mobilis*.

3.2 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *Thermotoga maritima*

In der Genom-Sequenz des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* wurde ein offener Leserahmen mit hohen Sequenzähnlichkeiten der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthasen identifiziert (Nelson et al., 1999; Tab. 13). Da Enzyme aus hyperthermophilen Organismen in der Regel auch bei Expression in mesophilen Wirtsorganismen wie *E. coli* eine thermophile Faltung einnehmen (Vieille & Zeikus, 2001), war eine rekombinante DXS aus

T. maritima ein vielversprechender Kandidat für eine thermostabile 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase.

Das potentielle *dxs*-Gen von *T. maritima* (dxs_{Tma}) wurde mittels PCR aus chromosomaler DNA von *T. maritima* (von Prof. W. Liebl, Universität Göttingen) amplifiziert und wie das *dxs*-Gen aus *E. coli* unter Generierung von Kodierungssequenzen für einen amino- bzw. carboxyterminalen His-tag in die Vektoren pET-16b(+) bzw. pET-22b(+) kloniert. Die DNA-Sequenzierung der klonierten dxs_{Tma}-Gene bestätigte die „in frame"-Fusionen und Abwesenheit von PCR-bedingten Basenaustauschen.

Die Expression der *T. maritima*-DXS-Varianten DXS_{Tm16} bzw. DXS_{Tm22} von den Expressionsvektoren pETdxsTm16 bzw. pETdxsTm22 war in den *E. coli*-Wirtsstämmen BLS und BLCP, der aufgrund 12 in *E. coli* seltener AGA-Codons für Arginin im dxs_{Tma}-Gen verwendet wurde, nur gering (Abb. 28). Mittels Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie konnte enzymatisch aktive *T. maritima*-DXS angereichert werden. Für präparative Kultivierungen im 1 l-Massstab wurden aufgrund des effektiveren Zellaufschlusses und der höheren Proteinausbeuten die BLS-Stämme mit pETdxsTm16 bzw. pETdxsTm22 verwendet. Aus Rohextrakten dieser Kulturen konnten 4 mg bzw. 3 mg

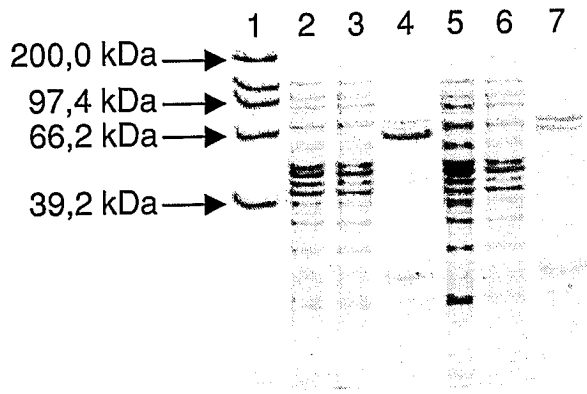


Abb. 28: Heterologe Expression und partielle Reinigung der *T. maritima*-DXS als Fusionsprotein mit carboxy- bzw. aminoterminalem His-tag. Jeweils 25 µg Rohextrakt von *E. coli* BLS mit pETdxsTm16 bzw. pETdxsTm22 vor und 20 h nach Induktion mit 1 mM IPTG sowie je 10 µg Fraktion 5 nach Ni^{2+}-Affinitäts-hromatographie wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

1: Molekulargewichts-Standard
2: pETdxsTm16 vor Induktion
3: pETdxsTm16 nach 20 h Induktion
4: DXS_{Tma16} Fraktion 5
5: pETdxsTm22 vor Induktion
6: pETdxsTm22 nach 20 h Induktion
7: DXS_{Tma22} Fraktion 5

DXS_{Tm16} bzw. DXS_{Tm22} mit spezifischen Aktivitäten von 0,19 U/mg angereichert werden (Abb. 28, Tab. 14). Die angereicherte *T. maritima*-DXS erwies sich allerdings

in vitro als nicht thermostabil, da sie bereits nach 5 min Inkubation bei 70°C keine Enzymaktivität mehr aufwies. Es ist möglich, dass die in *E. coli* exprimierte *T. maritima*-DXS aufgrund nicht optimaler Faltung ohne die homologen Chaperonsysteme oder bei den *in vitro*-Bedingungen im Rohextrakt und während der Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie keine hohe Temperaturstabilität besass. Weniger wahrscheinlich aber nicht auszuschliessen ist ebenso, dass die *T. maritima*-DXS auch in *T. maritima* selbst kein thermostabiles Enzym darstellt.

Tab. 14: Spezifische Enzymaktivitäten der partiell gereinigten Fusionsproteine DXS_{Tm16} und DXS_{Tm22}. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 40°C nach den Enzymtests 1 und 2. n. n. = nicht nachweisbar

DXS-Variante	DXS_{Tm16}	DXS_{Tm22}
Spezifische Aktivität [U/mg]	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,02
Spez. Aktivität nach 5 min 70°C [U/mg]	n. n.	n. n.

4. Struktur-Funktionsbeziehungen der DXS aus *Escherichia coli*

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen stellen eine neue Familie innerhalb der Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme dar (Sprenger et al., 1997). Während Transketolasen (TKT), die E1-Komponenten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexen (PDH-E1) und Pyruvat-Decarboxylasen (PDC), die die grössten Ähnlichkeiten zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen aufweisen, bereits intensiv untersucht sind, war über den Zusammenhang zwischen der dreidimensionalen Struktur und der Art und Weise, mit der die DXS ihre Substrate bindet und umsetzt, wenig bekannt. Aufschluss über Struktur-Funktionsbeziehungen bei der DXS von *E. coli* sollten daher die Kristallisierung und Aufklärung der 3D-Struktur in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Schneider (Karolinska Institut, Stockholm) sowie die ortsgerichtete Mutagenese konservierter Aminosäurereste erbringen.

4.1 DXS ist ein Homodimer

Der Oligomerisierungs-Zustand der DXS wurde mittels Gelpermeations-Chromatographie und Dynamische-Lichtstreuungs (DLS)-Experimenten untersucht. In Gelpermeations-Chromatographien an Superdex G-200-Säulen eluierte gereinigte DXS von *E. coli* jeweils in einem einzigen Peak. Auf einer zuvor mit Eichproteinen kalibrierten Superdex G-200 HR26/60-Säule wurde eine Molekulare Masse der DXS

von 142000 ermittelt (Abb. 29). Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit der kalkulierten Masse eines Dimers aus 2 identischen Untereinheiten mit einem 6xHis-tag von 136000.

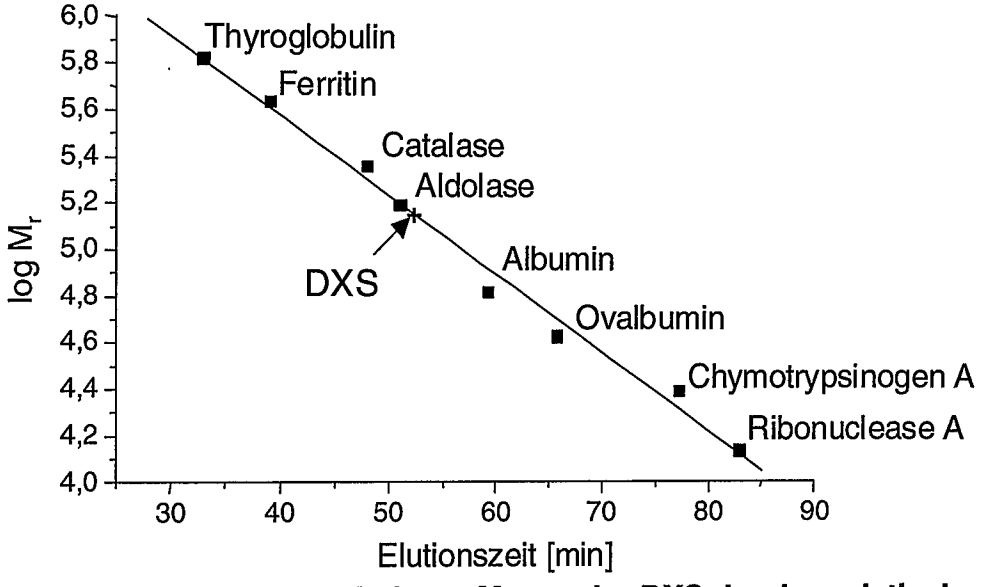


Abb. 29: Bestimmung der molekularen Masse der DXS durch analytische Gelfiltration mit einer Superdex G-200 HR 26/60-Säule. Eichproteine (■): Thyroglobulin = 669000, Ferritin = 440000, Catalase = 232000, Aldolase = 158000, Albumin = 67000, Ovalbumin = 43000, Chymotrypsinogen A = 25000, Ribonuklease A = 13700, DXS (+): 142000 (log M_r = 5,152)

Die DLS-Untersuchungen bei 4 bis 20°C legten ebenfalls eine Dimere Zustandsform der DXS nahe. Messungen mit gereinigtem Enzym in 50 mM Hepes-Puffer pH 7,5 mit je 1 mM ThDP und $MgCl_2$ ergaben einen hydrodynamischen Radius (R_h) von 4,9 nm, was einer molekularen Masse von 141000 entsprach (Tab. 15). DXS in Elutionspuffer (12 mg/ml) hatte dagegen einen R_h von 6,2 nm, entsprechend einer Molekularen Masse von 245000. Dieser Wert liess sich am besten mit einer tetrameren Zustandsform mit einer Masse von rechnerisch 272000 in Einklang bringen. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um ein Artefakt aufgrund der

Tab. 15: Untersuchung des Multimerisierungzustands der DXS mittels Dynamischer Lichtstreuung und Gelfiltration. Angegeben sind die gemessenen hydrodynamischen Radien (R_h) der DXS-Moleküle in den Proben und die daraus kalkulierten Molmassen. Zum Vergleich ist die mittels Gelfiltration (Abb. 29) ermittelte Masse aufgeführt. Die Puffer enthielten jeweils 1 mM ThDP und 1 mM $MgCl_2$.

Probe	R_h [nm]	Molekulare Masse	Zustandsform
Hepes pH 7,5 1 mg/ml	4,9 ± 0,2	141000 ± 17000	Dimer
Elutionspuffer 12 mg/ml	6,2 ± 0,3	245000 ± 30000	Tetramer
Hepes pH 7,5 1 mg/ml	-	142000 ± 20000	Dimer

Testbedingungen mit sowohl hohen Proteinkonzentrationen als auch hoher Osmolarität im Puffer (300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) und nicht um die physiologische, enzymatisch aktive Zustandsform der DXS, die, wie im Falle von Transketolasen (Sprenger et al., 1995a; Lindqvist et. al., 1992), höchstwahrscheinlich ein Homodimer ist.

4.2 Ansätze zur Kristallisierung der DXS

Die DLS-Untersuchungen der DXS ergaben ausserdem einen für die Kristallisierung wichtigen Aufschluss, da das Auftreten mehrerer Oligomerisierungs-Zustände oder aggregierten Proteins der entscheidende Grund sein kann, der den für die Kristallbildung nötigen Vorgang, die Bildung von geordneten Kristallisierungs-Nuklei verhindert (Bergfors, 1998). Die DXS lag unter den beiden untersuchten Bedingungen (4.2) zwar in unterschiedlichen Zustandsformen vor, trat aber in jeder dieser Bedingungen jeweils nur in einer einzigen Zustandsform auf. Die Kristallisierungs-Ansätze wurden daher sowohl mit DXS in Elutionspuffer im Anschluss an die Reinigung, wie auch mit DXS, die nach Reinigung in 50 mM Hepes-Puffer pH 7,5 mit je 1 mM ThDP, $MgCl_2$ und DTT umgepuffert wurde, angesetzt. Die DXS zeigte in beiden Puffersystemen ein prinzipiell gleiches Verhalten in den Kristallisierungs-Ansätzen.

Potentielle Proteinkristalle traten bei Verwendung von 0,8 M Ammoniumsulfat sowie 40 – 60 % 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) und leicht basischen pH-Werten (8,0 – 9,0) auf (Abb. 30). Die Kristalle wuchsen nur langsam (10 – 14 d) und waren zu klein, um sie auf Protein-spezifische Röntgenstrahl-Beugung zu untersuchen. Das Wachstum

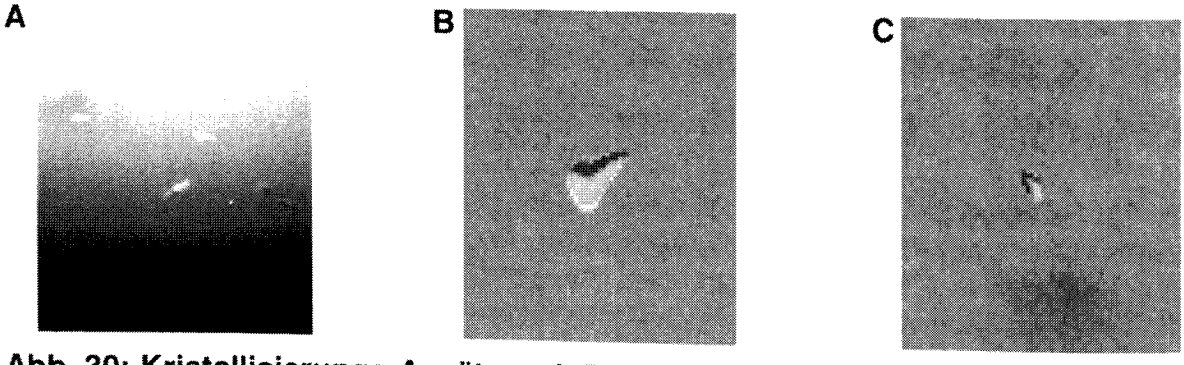


Abb. 30: Kristallisierungs-Ansätze mit DXS unter verschiedenen Bedingungen.
A: 10 mg/ml DXS in 0,8 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Bicin pH 9,0 nach 14 Tagen 4°C
B: 6 mg/ml DXS in 50 % 2-Methyl-2,4-pentandiol, 0,05 M Ammoniumsulfat, 0,1 M TrisHCl pH 8,5 nach 6 Tagen bei 20°C
C: 6 mg/ml DXS in 50 % 2-Methyl-2,4-pentandiol, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M TrisHCl pH 8,5 nach 8 Tagen bei 20°C

der Kristalle in Ansätzen mit MPD als Präzipitant konnte durch die Verwendung von Ammoniumsalzen wie Ammoniumsulfat und Ammoniumacetat als Ko-Präzipitanten leicht beschleunigt werden. Bislang hat allerdings kein Kristall aus diesen Ansätzen eine Grösse erreicht, die eine röntgenspektroskopische Untersuchung ermöglichen.

4.3 Ortsgerichtete Mutagenese der DXS

Da die dreidimensionale Struktur der DXS von *E. coli* bislang nicht bekannt ist und hieraus keine Hinweise auf Aminosäurereste, die an der Substrat-Bindung und Katalyse beteiligt sind, gewonnen werden konnten, musste die Identifizierung solcher meist konservierter Aminosäuren durch Sequenzvergleiche mit DXS-Sequenzen anderer Organismen sowie den Sequenzen verwandter Enzyme erfolgen. Transketolasen stellten hierbei mit etwa 15% Gesamtidentität die ähnlichste Familie der ThDP-abhängigen Enzyme dar, gefolgt von den PDH-E1 (13 %) und PDC (11%). Im Gegensatz zu den PDH-E1 und PDC waren im Vergleich von TKT- mit DXS-Aminosäuresequenzen konservierte Sequenzabschnitte über nahezu die gesamten Bereiche der TKT- und DXS-Sequenzen zu erkennen (Abb. 31). In diesen Abschnitten befanden sich auch solche Aminosäuren, die an der Ausbildung des Substratkanals (His66, Asp470 und Arg521; Numerierung entsprechend der TKTA von *E. coli*), der Kofaktor-Bindung und -Aktivierung (H66, Glu412 und His474) sowie der Katalyse (His26 und His262) in den Transketolasen von *E. coli* (Schörken,1997) und *Saccharomyces cerevisiae* (Zusammenfassung in Schneider & Lindqvist, 1998) beteiligt sind (Abb. 31 + 32). Dagegen schienen einige Aminosäuren des Substratkanals (Abb. 32), wie His100, das an der Stabilisierung des Dihydroxyethyl (DHE)-ThDP-Intermediates beteiligt ist, sowie Aminosäuren der Phosphat-Bindestelle (Ser386, Arg359 und H462) nicht konserviert zu sein.

Zur Untersuchung ihrer Funktion in der DXS von *E. coli* wurden mehrere dieser konservierten Aminosäurereste sowie der His100 der TKTA zugeordnete Phe107-Rest der *E. coli*-DXS durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht (Tab. 16) und die resultierenden Muteine charakterisiert.

Die Expression der Muteine erfolgte parallel zu Wildtyp-DXS in BLS. Durch Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie konnten die Muteine über ihren His-tag von der chromosomal kodierten Wildtyp-DXS abgetrennt und grösstenteils bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden (Abb. 33 + 34). Die Muteine H80A, E370A und D427A wurden nur sehr gering exprimiert (Abb. 34A). Durch die Ni^{2+}-Affinitäts-

Chromatographie konnte aus den Rohextrakten dennoch geringe Mengen der Muteine mit etwa 95% Homogenität gewonnen werden (Abb. 34B).

```
                    ▽                          ▽                          ▽
TKTA_Eco     24 SGHPGAPMGMA 34     58 DRFVLSNGHG 67     90 FRQLHSKTPGHPE 102
TKT_Hin      24 SGHPGAPMGMA 34     58 DRFVLSNGHG 67     90 FRQLHSKTPGHPE 102
TKL1_Sce     28 SGHPGAPLGMA 38     61 DRFVLSNGHA 70     93 FRQLGSRTPGHPE 105
TKT_Bsu      25 SGHPGMPMGAA 35     59 DRFVLSAGHG 68     91 FRQWGSKTPGHPE 103
TKT_Aae      54 SGHPGMPLGAS 64     88 DRFILSAGHG 97    120 FRQLNSKTPGHPE 132
DXS_Eco      47 SGHFASGLGTV 57     72 DQLIWDVGHQ 81     98 IRQKGG-LHPFPW 109
DXS_Hin      47 SGHLASGLGTV 57     72 DQLIWDVGHQ 81     98 IRQKDG-IHPFPW 109
CLA1_Ath    113 GGHLGSSLGVV 123   138 DKILWDVGHQ 147   164 MRQTNG-LSGFTK 175
DXS_Aae      44 GGHVGPSLGVV 54     69 DVIVWDIGHQ 78     95 LRQYKG-ISGFLR 106
DXS_Bsu      39 GGHIGPNLGVV 49     64 DKFLWDVGHQ 73     90 LRQYKG-LCGFPK 101
                  .** .  :*             * :: . **             :**  .    .

                    ▽                    ▽
TKTA_Eco    260 DSHGAPLGD 268     285 FEIPSEI 291     356 IASRKAS 362
TKT_Hin     259 DSHGAPLGD 267     284 FEIPAEY 290     356 IASRKAS 362
TKL1_Sce    261 SVHGAPLKA 269     288 FVVPQEV 294     356 VATRKLS 362
TKT_Bsu     260 GVHGAPLGK 268     286 FYVPSEV 292     354 LASRASS 360
TKT_Aae     287 EVHGKPMGK 295     318 FYVPEEA 324     377 MPTRKAS 383
DXS_Eco     230 EEHIKGMVV 238     254 VDGHDVL 260     320 PSYSKIF 326
DXS_Hin     230 EEHMKGVMF 238     256 VDGHNID 262     321 PTYSKIF 327
CLA1_Ath    308 DVYARGMIS 314     332 VDGHNID 338     400 QSYTTYF 406
DXS_Aae     230 EEFLKGLIS 238     254 IDGHDIK 260     319 PTWTSVF 325
DXS_Bsu     226 KDSLKYMLV 234     250 VDGHSYH 256     317 PSWSGLV 323
                    :                    .                   .

                    ▽                          ▽                          ▽
TKTA_Eco    408 YGVREFGMTA 417   461 THDSIGLGEDGPTHQPVE 478   518 ILSRQNL 524
TKT_Hin     409 YGVREFGMSA 418   462 THDSIGLGEDGPTHQPVE 479   519 IFTRQNL 525
TKL1_Sce    414 YGIREHAMGA 423   468 THDSIGVGEDGPTHQPIE 485   525 ALSRQNL 531
TKT_Bsu     407 FGVREFAMGA 416   460 THDSIAVGEDGPTHEPVE 477   517 VLTRQNL 523
TKT_Aae     430 YGVREHAMGT 439   483 SHDSIGLGEDGPTHQPVE 500   540 ILTRQKV 546
DXS_Eco     366 VAIAEQHAVT 375   418 IDRAGIVGADGQTHQGAF 435   475 RYPRGNA 481
DXS_Hin     367 VAIAEQHAVT 376   419 IDRAGIVGADGATHQGAF 436   476 RYPRGNA 482
CLA1_Ath    446 VGIAEQHAVT 455   498 MDRAGLVGADGPTHCGAF 515   555 RYPRGNG 461
DXS_Aae     365 VGIAEQHACT 374   417 IDRAGLVGDDGPTHHGVF 434   474 RYPRGAA 480
DXS_Bsu     363 VGIAEQHAAT 372   415 IDRAGLVGADGETHQGVF 432   472 RFPRGNG 478
                  .: *    :             . :  :* ** **                .*
```

Abb. 31: Konservierte Bereiche der Substrat- und Kofaktor-Bindung in Transketolasen und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen. Ausschnitte aus einem Vergleich von 5 TKT- und 5 DXS-Sequenzen mit Clustal W 1.74 (Thompson et al., 1994). TKTA_Eco = TKTA aus *E. coli* (Sprenger, 1993), TKT_Hin = hypothetische TKT aus *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995), TKL1_Sce = Transketolase 1 aus *S. cerevisiae* (Sundström et al., 1993), TKT_Bsu = hypothetische TKT aus *Bacillus subtilis* (Rose, 1996), TKT_Aae = hypothetische TKT aus *Aquifex aeolicus* (Deckert et al., 1998), DXS_Eco = DXS aus *E. coli* (Sprenger et al., 1997), DXS_Hin = hypothetische DXS aus *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), CLA1_Ath = DXS aus *Arabidopsis thaliana* (Mandel et al., 1996), DXS_Aae = hypothetische DXS aus *A. aeolicus* (Deckert et al., 1998), DXS_Bsu = hypothetische DXS aus *B. subtilis* (Kunst et al., 1997). * = identische Aminosäuren, : = konservierte Aminosäuren, . = teilweise konservierte Aminosäuren, ▽: durch ortsgerichtete Mutagenese in der *E. coli*-DXS ausgetauscht.

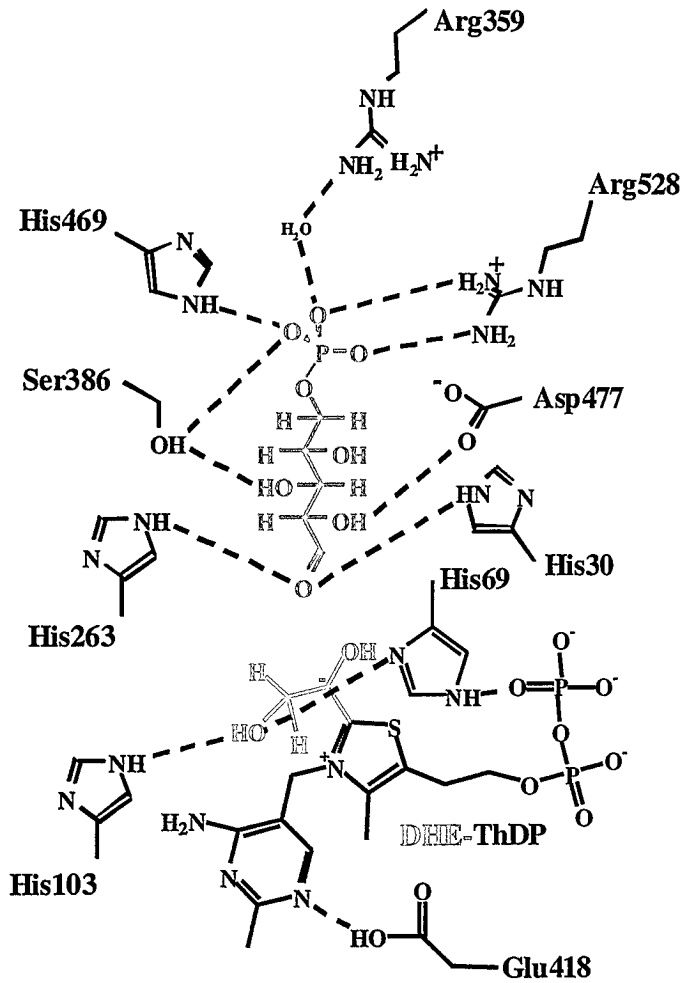


Abb. 32: Substrat-Kanal und Protein/Kofaktor-Interaktionen der Transketolase. Wechselwirkungen von Aminosäuren der Transketolase mit dem Akzeptorsubstrat D-Ribose-5-P (grün) und dem Dihydroxyethyl-Thiamindiphosphat-Intermediat (rot-blau) sind als unterbrochene Linien dargestellt (verändert nach Nilsson et al., 1997 und Schörken, 1997; Bezeichnung der Aminosäuren wie in der Hefe-Transketolase).

Tab. 16: Übersicht über die durchgeführten Mutagenesen der *E. coli*-DXS.

Position DXS	Austausch gegen	Position TKT	Funktion in TKT
His49	Alanin	His30	Säure/Base-Katalyse
His80	Phenylalanin, Alanin	His69	Substrat-/ThDP-Bindung
Phe107	Histidin, Alanin	His103	Donorsubstrat-Bindung
His232	Alanin	His263 ?	Säure/Base-Katalyse
His257	Alanin	His263 ?	Säure/Base-Katalyse
Glu370	Glutamin, Alanin	Glu418	ThDP-Aktivierung
Asp427	Glutamat, Alanin	Asp477	Akzeptorsubstrat-Bindung
Arg478	Glutamin	Arg528	Phosphat-Bindestelle

Phenylalanin-107

Die Positionierung von Phe107 der DXS zu His100 der TKT im Sequenzvergleich von TKT- und DXS-Sequenzen (Abb. 31) legte eine Wechselwirkung von Phe107 mit der Methylfunktion der von Pyruvat stammenden Hydroxyethylgruppe (HE) nahe. Der Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin bzw. Histidin führte zu einer deutlich verringerten Affinität der Muteine, was sich in einem Anstieg der K_M-Werte für Pyruvat um den Faktor 11 bzw. 6 widerspiegelte (Tab. 17). Ebenso war die maximale Umsatzrate (V_{max}) der Muteine F107A und F107H auf 15% bzw. 28% des Wildtyp-V_{max} reduziert. Der V_{max}-Wert für die Umsetzung des alternativen, hydrophileren Donorsubstrat Hydroxypyruvat war bei F107A mit 13% des Wildtypwerts im gleichen Ausmass wie für Pyruvat reduziert. Im Falle des F107H-Muteins war die maximale Umsatzgeschwindigkeit für Hydroxypyruvat mit 65% des Wildtyp-V_{max} deutlich weniger reduziert als der V_{max}-Wert für Pyruvat.

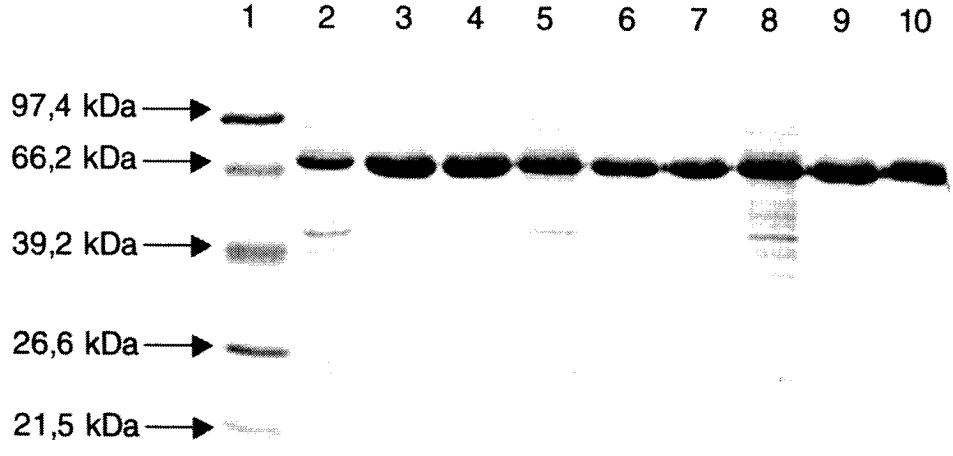


Abb. 33: Überexpression und Reinigung der DXS-Muteine F107A und F107H.
SDS-PAGE-Analyse von jeweils 25 µg Rohextrakt (RE) und 10 µg der Reinigungsfraktionen nach Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie. 1: Grössen-Standard

2: RE BLS pETdxs22	3: DXS Wildtyp Fr. 3	4: DXS Wildtyp Fr. 4
5: RE BLS pETdxsF107A	6: DXS F107A Fr. 3	7: DXS F107A Fr. 4
8: RE BLS pETdxsF107H	9: DXS F107H Fr. 3	10: DXS F107H Fr. 4

Im Gegensatz zum Donorsubstrat Pyruvat wiesen die F107-Muteine eine höhere Affinität zu Hydroxypyruvat auf. Die K_M-Werte von F107A und F107H für Hydroxypyruvat lagen mit 1,4 mM und 2,3 mM um den Faktor 3 bzw. 2 mal niedriger als bei Wildtyp-DXS. Mutein F107H katalysierte die Umsetzung von Hydroxypyruvat effizienter als die Wildtyp-DXS, da die nur leicht reduzierte Aktivität und die höhere Affinität von F107H zu Hydroxypyruvat einen 34% höheren k_{cat}/K_M-Wert zur Folge hatte.

Tab. 17: Kinetische Parameter für die DXS-Muteine F107A und F107H für die Donorsubstrate Pyruvat und Hydroxypyruvat. Parallel zur Wildtyp-DXS wurden die K_M- und V_{max}-Werte der Muteine für die Substrate Pyruvat, Hydroxypyruvat und D-GAP nach Enzymtest 2 und 3 bestimmt und in Relation zu den Werten für Wildtyp-DXS gesetzt.

	Wildtyp	**F107A** (% WT)	**F107H** (% WT)
V_{max} (Pyruvat) [U/mg]	4,30	0,65 (15%)	1,25 (28%)
K_M (Pyruvat) [mM]	0,10	1,14 (1140%)	0,62 (620%)
k_{cat}/K_M (Pyruvat) [1/M*s]	98443	1305 (1,3%)	4616 (4,7%)
V_{max} (Hydroxypyruvat) [U/mg]	0,31	0,04 (13%)	0,20 (65%)
K_M (Hydroxypyruvat) [mM]	4,80	1,42 (30%)	2,31 (48%)
k_{cat}/K_M (Hydroxypyruvat) [1/M*s]	148	64 (43%)	198 (134%)
K_M (D-GAP) [mM]	0,40	0,32 (80%)	0,28 (70%)

Die im Prinzip unveränderten K_M-Werte der F107-Muteine für das Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd-3-P unterstreichen, dass der Phenylalaninrest an Position 107 höchstwahrscheinlich an der Bindung des Donorsubstrates und der Stabilisierung des Hydroxyethyl-ThDP-Intermediates beteiligt ist. Durch den Austausch des hydrophoben Phenylalaninrestes 107 der DXS gegen die polaren Aminosäure Histidin wie in Transketolasen wurde eine DXS-Variante erzeugt, die das hydrophobere Donorsubstrat Pyruvat schlechter und das hydrophilere Hydroxypyruvat effizienter umsetzt als die Wildtyp-DXS.

Histidin-80

Für den His80 entsprechenden His69-Rest der Hefe-Transketolase (entspricht His66 der *E. coli*-TKTA) werden zwei Funktionen diskutiert. Er bildet Wasserstoffbrücken sowohl mit einer Phosphatgruppe des ThDP-Kofaktors als auch (analog zu His100) mit der C1-Hydroxylgruppe des DHE-ThDP-Intermediates aus (Wikner et al., 1997). Sowohl H80A als auch H80F wiesen nur geringe DXS-Aktivitäten von weniger als 1% bzw. 0,1% der Wildtyp-Aktivität auf (Tab. 18). Die Enzymaktivitäten der H80-Muteine waren zu gering, um deren kinetische Parameter zu bestimmen. Da beim Transfer einer HE-Gruppe von Pyruvat eine Stabilisierung der C1-Methylgruppe durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung nicht möglich ist, ist als Hauptfunktion von H80 wahrscheinlich eher die Fixierung des ThDP-Kofaktors anzusehen. Eine fehlerhafte Positionierung des Thiamindiphosphats aufgrund nicht optimaler Protein/Kofaktor-Wechselwirkungen könnte zu den nahezu inaktiven His80-Muteinen führen.

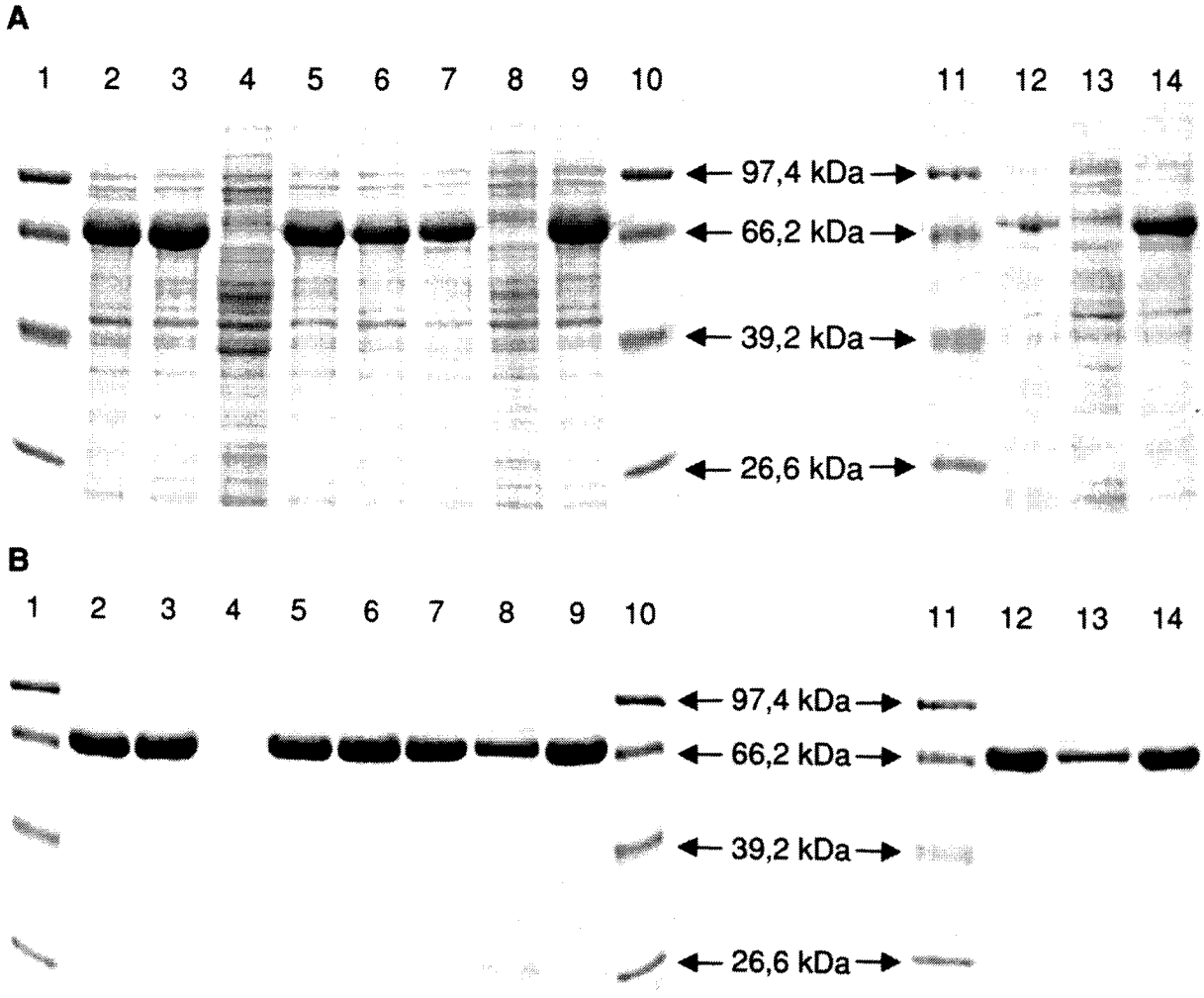


Abb. 34: Expression und Reinigung der Wildtyp-DXS sowie der DXS-Muteine H49A, H80A, H80F, H232A, H257A, E370A, E370Q, D427E, D427A und R478Q. SDS-PAGE-Analyse von jeweils 25 µg Rohextrakte (A) bzw. 10 µg Fraktion 3 nach Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie (B). 1, 10 und 11: Grössen-Standards
2: Wildtyp-DXS 3: H49A 4: H80A 5: H80F 6: H232A 7: H257A
8: E370A 9: E370Q 12: D427E 13: D427A 14: R478Q

Tab. 18: Spezifische Aktivität der Muteine H80A, H80F, E370A, E370Q und D427A. Die spezifischen Enzymaktivitäten wurden unter Verwendung von Enzymtest 2 bestimmt. Die relativen Aktivitäten beziehen sich auf parallel gemessene WT-DXS.

Mutein	H80A	H80F	E370A	E370Q	D427A
Spezifische Aktivität [U/mg]	0,032	0,001	0,14	0,003	0,69
Relative Aktivität [% Wildtyp]	0,74	0,02	3,25	0,08	16,0

Glutamat-370

Der Glutamatrest an Position 370 der DXS entsprach in Sequenzvergleichen Glu418 der Hefe-Transketolase (Glu412 der TKTA aus *E. coli*, Abb. 32 + 33) sowie Glu89 der menschlichen PDH-E1 (Fang et al., 1998) und Glu50 bzw. Glu51 der PDC aus

Zymomonas mobilis bzw. Hefe. Dieser in ThDP-Enzymen konservierte Glutamatrest bewirkt die Überführung des ThDP-Kofaktors in seine katalytisch aktive Zustandsform (Kern et al., 1997). Die Austausche des Glutamat-370 gegen Glutamin bzw. Alanin führten zu Muteinen mit sehr niedrigen Restaktivitäten von etwa 0,1% bzw. 3,3% Wildtyp-Aktivität. Eine Bestimmung kinetischer Parameter war aufgrund der geringen Enzymaktivitäten nicht möglich. Die niedrigen Restaktivitäten sind konsistent mit Untersuchungen an entsprechenden Glu-Muteinen der Hefe-TKT, der menschlichen PDH-E1 sowie PDC aus Hefe und *Z. mobilis*, die ebenfalls nur 0,05 bis 3% Restaktivität aufweisen (Wikner et al., 1994; Fang et al., 1998; Killenberger-Jabs et al., 1997; Candy et al., 1996). Zusammen mit der Positionierung von Glu370 in Sequenzvergleichen mit Transketolasen und PDH-E1-Komponenten legen diese Ergebnisse nahe, dass Glu370 in der DXS für die Aktivierung des ThDP verantwortlich ist.

Histidin-49, Histidin-232 und Histidin-257

Die Histidinreste an den Positionen 30 und 263 der Hefe-Transketolase (His26 und His262 der TKTA von *E. coli*) fungieren gemeinschaftlich als Säure/Base-Katalysatoren bei der Spaltung des ThDP-gebundenen Donorsubstrates zwischen C2 und C3 sowie bei der Ausbildung der neuen C-C-Bindung zwischen dem Aldehyd-Kohlenstoff des Akzeptorsubstrates und dem C2-Atom der ThDP-gebundenen Dihydroxyethyl-Gruppe (Wikner et al., 1997). Aufgrund des prinzipiell gleichen Reaktionsmechanismus von Transketolasen und DXS (Ping-Pong-Mechanismus; Klein & Brand, 1977 und 1.5) war das Vorkommen von His30 und His263 entsprechenden Histidinresten in der *E. coli*-DXS wahrscheinlich.

Während an Position 49 der *E. coli*-DXS ein His30 zugeordneter Histidinrest identifiziert wurde, der sich innerhalb eines in TKT und DXS stark konservierten Sequenzbereiches befand (Abb. 31), war die Zuordnung von His263 der Hefe-Transketolase zu His232 der *E. coli*-DXS im Sequenzvergleich nicht eindeutig. Ausser der hypothetischen DXS von *Haemophilus influenzae* wiesen keine weiteren untersuchten DXS-Sequenzen an dieser Position Histidinreste auf (Abb. 31). Ein in DXS-Sequenzen konserviertes Histidin befand sich allerdings 25 Aminosäuren weiter carboxyterminal, entsprechend His257 der *E. coli*-DXS. Aus diesem Grund wurden His49 und His232 sowie His257 der *E. coli*-DXS einzeln gegen Alanin ausgetauscht und die Enzymkinetiken für verschiedene Donor- und Akzeptorsubstrate untersucht.

Der Austausch von His232 gegen Alanin führte zu einem Mutein, dessen kinetischen Eigenschaften verglichen mit Wildtyp-DXS im Prinzip nicht verändert waren. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten betrugen für alle untersuchten Substrate durchschnittlich 99% der Wildtyp-V_{max}. Ebenso war die Affinität gegenüber Donor- und Akzeptorsubstraten nicht signifikant erniedrigt oder erhöht (Tab. 19). Im Gegensatz dazu waren die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten des H49A-Muteins für alle Substrate mit durchschnittlich unter 10% der Wildtyp-Werte drastisch reduziert. Dabei wurden die physiologischen Substrate Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-P (D-GAP) mit relativen V_{max}-Werten von 10% bzw. 21% noch am besten umgesetzt. Die Affinität von H49A zu Pyruvat und D-GAP war allerdings sieben bzw. drei mal niedriger als bei Wildtyp-DXS. Die K_M-Werte für die nicht-physiologischen Akzeptorsubstrate D-Glycerinaldehyd und Glykolaldehyd erschienen dagegen leicht reduziert. Auch das Mutein H257A wies signifikant niedrigere V_{max}-Werte als Wildtyp-DXS auf. Diese lagen allerdings mit durchschnittlich 49% Wildtyp-V_{max} höher als bei H49A. Auch im Falle von H257A war die Aktivität gegenüber Pyruvat und D-GAP verglichen mit den nicht-physiologischen Substraten am wenigsten reduziert (Tab. 19). Die Affinität von H257A gegenüber allen getesteten Substraten war im Vergleich mit Wildtyp-DXS nicht signifikant verändert.

Die Mutagenese der Histidinreste an den Positionen 49, 232 und 257 zeigte, dass His232 höchstwahrscheinlich weder an der Substrat-Bindung noch an der Katalyse in der DXS beteiligt ist. Ebenso wie bei His49 führt der Austausch von His30 der

Tab. 19: Kinetische Parameter für die DXS-Muteine H49A, H232A und H257A. Die K_M- und V_{max}-Werte für die Muteine wurden nach Enzymtest 2 und 3 parallel zu Messungen mit Wildtyp-DXS bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist als Prozent des Wildtyp-V_{max} und die Affinität als Vielfaches des K_M-Wertes der WT-DXS dargestellt. n. b.: nicht bestimmbar aufgrund zu geringer Aktivität.

Mutein	**H49A**		**H232A**		**H257A**	
Substrat	V_{max} [% WT]	K_M [* WT]	V_{max} [% WT]	K_M [* WT]	V_{max} [% WT]	K_M [* WT]
Pyruvat	10,4	6,88	96,8	0,84	54,3	1,01
Hydroxypyruvat	7,4	0,91	88,9	1,30	35,2	1,05
D-GAP	21,0	3,13	104,2	1,84	64,4	0,88
D-Glycerinaldehyd	5,3	0,42	78,3	1,37	46,7	1,69
Glykolaldehyd	3,7	0,63	110,1	1,05	39,2	0,63
D-Erythrose	n. b.	n. b.	116,7	0,79	54,8	0,79

Hefe-Transketolase gegen Alanin zu einer Erhöhung der K_M-Werte für Donor- und Akzeptorsubstrat sowie zu einem drastischen Aktivitätsverlust, der im Falle der H30A-TKT mit 1,5% Restaktivität (Wikner et al., 1997) grösser ist als bei der H49A-DXS. Das H263A-Mutein der Hefe-TKT weist wie H257A-DXS keine signifikanten Änderungen der K_M-Werte auf, hat aber mit 0,5% eine deutlich geringere Restaktivität als das DXS-Muteine H257A mit 49%. Trotz der höheren Restaktivitäten der His49- und His257-Muteine der DXS verglichen mit dem His30- und His263-Muteinen der Hefe-Transketolase ist es dennoch wahrscheinlich das His49 und His257 die Aufgabe von His30 und H263 als Säure/Base-Katalysatoren in der *E. coli*-DXS wahrnehmen, wenn der Ausfall eines der beiden Histidinreste in der DXS durch den anderen Histidinrest besser kompensiert werden kann als in Transketolase.

Aspartat-427

In dem Substratkanal-Modell der *E. coli*-TKTA bzw. der 3D-Struktur der Hefe-Transketolase bilden die Aspartatreste an den Positionen 470 bzw. 477 eine Wasserstoffbrücke mit der C2-Hydroxylgruppe des Akzeptorsubstrates oder C4 des Donorsubstrates aus (Schörken, 1997; Nilsson et al., 1998). Der Austausch des korrespondierenden Asp427 der *E. coli*-DXS gegen Alanin und Glutamat führte im Fall des D427A-Muteins zu einer deutlich verringerten Enzymaktivität von 16% des Wildtypwerts (Tab. 20), während die physiologische DXS-Reaktion von D427E noch mit 66% bis 79% des Wildtyp-V_{max} katalysiert wurde.

Die nicht-physiologischen Substrate wurden von D427E mit 20% bis 28% der Wildtyp-V_{max}-Werte umgesetzt. Aufgrund der geringen Proteinausbeute im Falle von D427A (Abb. 34) konnten die kinetischen Parameter für dieses Mutein nicht bestimmt werden. Die Affinitäten von D427E gegenüber den Donorsubstraten Pyruvat und Hydroxypyruvat sowie den Akzeptorsubstraten Glykolaldehyd und D-Erythrose waren nicht signifikant verändert. Die K_M-Werte für die C3-Substrate D-GAP bzw. D-Glycerinaldehyd waren dagegen auf das vierfache bzw. zweifache der K_M-Werte von Wildtyp-DXS erhöht. Dies bedeutete, dass die spezifische Erkennung des physiologischen sowie des strukturell ähnlichsten Akzeptorsubstrates durch die Verlängerung der Seitenkette unter Beibehaltung der Säurefunktion in D427E am stärksten betroffen war, während die katalytische Funktion kaum eingeschränkt war.

Tab. 20: Kinetische Parameter für die DXS-Muteine D427E und R478Q. Die K_M- und V_{max}-Werte sowie die k_{cat}/K_M-Werte für die Muteine wurden nach Enzymtest 2 und 3 parallel zu Messungen mit Wildtyp-DXS bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bzw. die Effizienz der Umsetzung sind als Prozent des Wildtyp-V_{max} bzw. des k_{cat}/K_M-Wertes von Wildtyp-DXS und die Affinität als Vielfaches des K_M-Wertes der Wildtyp-DXS dargestellt.

Mutein		**D427E**			**R478Q**	
Substrat	V_{max} [% WT]	K_M [* WT]	k_{cat}/K_M [% WT]	V_{max} [% WT]	K_M [* WT]	k_{cat}/K_M [% WT]
Pyruvat	66,4	0,7	94,6	9,8	3,2	3,1
Hydroxypyruvat	22,2	0,7	32,0	72,2	1,8	39,5
D-GAP	79,2	4,0	31,2	22,9	18,0	1,3
D-Glycerinaldehyd	20,0	2,1	9,6	85,0	2,3	37,5
Glykolaldehyd	27,8	1,3	21,0	79,8	0,7	119,6
D-Erythrose	25,8	0,9	27,8	40,8	0,3	121,5

Arginin-478

Die Arg478 der *E. coli*-DXS entsprechenden Argininreste an den Positionen 521 bzw. 528 der Transketolasen von *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* sind an der Komplexierung der endständigen Phosphatgruppe phosphorylierter Donor- und Akzeptorsubstrate beteiligt (Schörken 1997; Nilsson et al., 1997). In der *E. coli*-DXS wurde dieser langkettige, positiv geladene Argininrest gegen die ebenfalls langkettige polare Aminosäure Glutamin ausgetauscht. Das R478Q-Mutein zeigte deutlich reduzierte V_{max}-Werte für die physiologische Reaktion mit Pyruvat und D-GAP, während die V_{max}-Werte für nicht-physiologische Substrate nicht so stark reduziert waren (Tab. 20). Die Affinität von R478Q gegenüber dem phosphorylierten D-GAP lag 18 mal niedriger als in Wildtyp-DXS, was auf eine fehlende Fixierung der C3-Phosphatgruppe zurückgeführt werden konnte.

Die nicht-phosphorylierten alternativen Akzeptorsubstrate Glykolaldehyd und D-Erythrose wurden von R478Q mit höherer Affinität und zum Teil nur leicht reduziertem V_{max} verglichen mit Wildtyp-DXS umgesetzt, was sich in 20% höheren k_{cat}/K_M-Werten für diese Substrate widerspiegelte. R478Q katalysierte die Umsetzung von Glykolaldehyd und D-Erythrose somit effizienter als Wildtyp-DXS.

4.4 Erzeugung von enzymatisch aktiven DXS/Transketolase-Hybridenzymen

Die Tatsache, dass sich nahezu über die gesamten Sequenzbereiche von Transketolasen und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen konservierte

Bereiche fanden (Abb. 31), legte eine vergleichbare Domänenstruktur und -abfolge in Transketolasen und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen nahe. Aufgrund der fast identischen Faltung der Pyrimidin- und Pyrophosphat-Bindedomänen (Pyr- und PP-Domänen) in ThDP-abhängigen Enzymen (Muller et al., 1993) wurde versucht durch Fusion der potentiellen aminoterminalen Pyr-Domäne der *E. coli*-DXS mit der mittleren PP-Domäne und der carboxyterminalen Domäne der TKTA aus *E. coli* enzymatisch aktive DXS/TKT-Hybridenzyme zu erzeugen.

Die *dxs*- und *tktA*-Gene von *E. coli* wurden mittels „overlap extension-PCR" (Horton, 1997) an den Übergangsstellen von Pyrimidin (Pyr)- zu Pyrophosphat (PP)-Bindedomänen miteinander fusioniert. Die Fusion erfolgte nach den Positionen 285, 286 bzw. 287 der DXS und ab den Positionen 316, 317 bzw. 318 der Aminosäuresequenz von TKTA. Diese drei Positionen wurden gewählt, da die Transketolase der Hefe an dieser Stelle einen drei Aminosäuren langen „Loop" zwischen zwei langen α-Helices aufweist.

Die Expression der DXS/TKT-Hybridenzyme DT1, DT2 und DT3 erfolgte parallel zu Wildtyp-DXS und -TKTA als Fusionsproteine mit carboxyterminalem His-tag in *E. coli* BLS. Obwohl die Expression der Hybridenzyme im Gegensatz zu TKTA nur gering war, konnten die Hybride von etwa 70 kDa mittels Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie angereichert werden (Abb. 35). TKTA konnte wie die DXS mit carboxyterminalen His-tag in einem Schritt gereinigt werden.

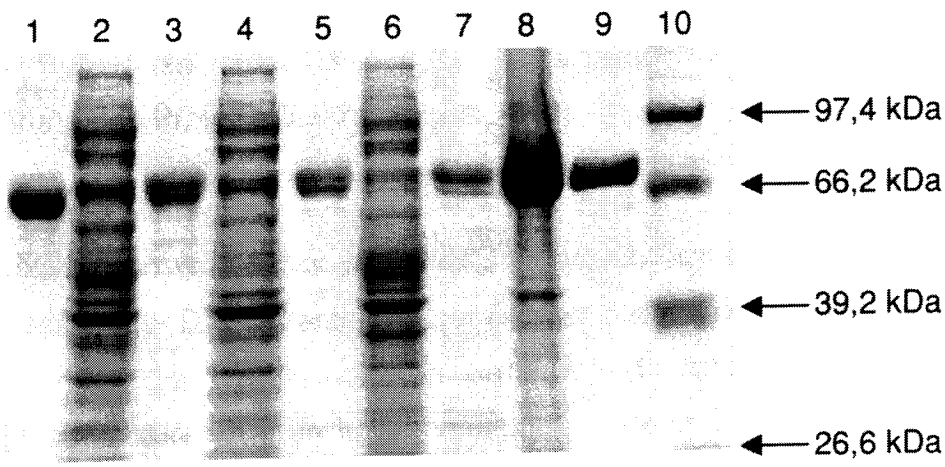


Abb. 35: Expression und Reinigung der Transketolase A und der DXS/TKT-Hybride als Fusionsproteine mit C-terminalem His-tag in BLS.
SDS-PAGE-Analyse der Rohextrakte (50 µg) und der Reinigungsfraktionen 3 (20 µg)
1: DXS 2: RE DT1 3: DT1 4: RE DT2 5: DT2
6: RE DT3 7: DT3 8: RE TKTA 9: TKTA 10: Grössen-Standard

Die DXS/TKT-Hybride waren in der Lage, die Umsetzung von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-P zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-P zu katalysieren, wie durch die gekoppelte Reaktion mit der 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Reduktoisomerase von *Z. mobilis* (Enzymtest 2) nachgewiesen werden konnte. DT1 und DT2 wiesen mit 42% bzw. 74% bezogen auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der DXS für Pyruvat hohe DXS-Aktivitäten auf. DT3 hatte mit 0,21 U/mg noch einen 4 mal höheren V_{max}-Wert für Pyruvat als Transketolase (Tab. 21). Der K_M-Wert der DXS/TKT-Hybride für Pyruvat entsprach dem K_M-Wert der DXS, während TKTA mit einem K_M-Wert von über 200 mM eine geringe Affinität gegenüber Pyruvat aufwies. Die Hybridenzyme wiesen eine sehr geringe Halbwertszeit auf, so dass die kinetischen Parameter für das Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd-3-P und andere Substrate nicht bestimmt werden konnten.

Es war durch den Austausch der Enzymdomäne von TKTA, in der sich die Aminosäuren der Donorsubstrat-Bindung befinden, gegen die entsprechende Domäne der DXS, also möglich enzymatisch aktive Hybride aus DXS und TKTA zu erzeugen, deren Affinitäten zum Donorsubstrat Pyruvat der Affinität der DXS entsprachen.

Tab. 21: Kinetische Parameter der DXS/TKT-Hybride für Pyruvat. Die K_M- und V_{max}-Werte der Hybrid-Proteine aus DXS und Transketolase wurden in parallelen Messungen mit Wildtyp-DXS und -TKT nach Enzymtest 2 bestimmt.

	V_{max} [U/mg] (% DXS)	**K_M [mM]**
DXS *E. coli*	4,3 (100)	0,100
DXS/TKT-Hybrid DT1	1,8 (42)	0,095
DXS/TKT-Hybrid DT2	3,2 (74)	0,075
DXS/TKT-Hybrid DT3	0,21 (5)	0,112
TKTA *E. coli*	0,05 (1)	214,0

IV Diskussion

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *Escherichia coli* setzt mit Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zwei Intermediate des Zentralstoffwechsels zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat um (Sprenger et al., 1997), von dem aus drei verschiedene Biosynthesewege zu den Vitaminen B_1 (Thiamin, David et al., 1982) und B_6 (Pyridoxol, Hill et al., 1989) sowie zu Isopentenyldiphosphat und Dimethylallyldiphosphat, den Vorläufern aller Isoprenoide (Broers, 1994), abzweigen. Die der DXS ähnlichsten Enzyme, die Transketolasen, Pyruvat-Decarboxylasen und Pyruvat-Dehydrogenasen, die ebenfalls den Kofaktor Thiamindiphosphat aufweisen, besitzen ein ausgeprägtes Potential, enantioselektiv C-C-Bindungen zu knüpfen (Schörken & Sprenger, 1998; Iding et al., 1998; Sprenger & Pohl, 1999; Turner, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es gewesen, Einsichten in die Biochemie und in Struktur-Funktionsbeziehungen der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *E. coli* zu gewinnen. Weiterhin wurden Erkenntnisse über das Potential dieses erst kürzlich als ersten Vertreter einer neuen Familie innerhalb der Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme entdeckten Enzyms (Sprenger et al., 1997; Lois et al., 1998) in der chemo-enzymatischen Synthese angestrebt.

Durch die Expression und Reinigung der *E. coli*-DXS als His-tag-Fusionsprotein wurde eine schnelle und effiziente Methode zur Präparation grosser Mengen gereinigter DXS etabliert. Dadurch war es möglich, die biochemischen Eigenschaften und das Substratspektrum der DXS zu untersuchen sowie Versuche zur Kristallisierung des Proteins durchzuführen.

Expression und Reinigung

Zur Überexpression wurde das pET-System gewählt, um eine strikte Kontrolle und hohe Expression der DXS zu erzielen. Der Einsatz des pLysS-Plasmids in den *E. coli* BL-Stämmen für die DXS-Expression ermöglichte zusätzlich einen alternativen Zellaufschluss zur Ultraschallbehandlung. Unter Verwendung dieses Expressionssystems konnten reproduzierbar grosse Mengen DXS (40 - 50 mg/l Kultur) als Fusionsprotein mit carboxyterminalem His-tag mittels Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie mit guten Ausbeuten von 80 bis 85% Gesamt-Aktivität bis zur apparenten Homogenität (>99%) gereinigt werden. Der Anteil von überexprimierter DXS in induzierten BLSpETdxs22-Stämmen betrug zwischen 15% und 25% des

Gesamtproteins im zellfreien Rohextrakt. Die DXS von *Streptomyces* sp. CL190, *Pseudomonas aeruginosa* und *Rhodobacter capsulatus* wurden ebenfalls als Fusionsproteine mit amino- oder carboxyterminalem His-tag gereinigt (Kuzuyama et al., 2000; Altincicek et al., 2000; Hahn et al., 2001).

Eine solche schnelle und effiziente Reinigungsprozedur war für die Charakterisierung der Wildtyp-DXS und der im Verlauf durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugten DXS-Muteine sowie der DXS/Transketolase-Fusionsproteine von Vorteil. Die chromosomal kodierte Wildtyp-DXS konnte durch die Ni^{2+}-Affinitäts-Chromatographie von den Enzymvarianten abgetrennt werden und ein Anteil der Wildtyp-DXS an der Restaktivität der Enzymvarianten dadurch ausgeschlossen werden.

Der Zellaufschluss der BLS-Stämme durch das pLysS-kodierte T7-Lysozyms lieferte im Gegensatz zum Ultraschallaufschluss intakte DXS ohne Abbau- oder Zerfallsprodukte. Ein spontaner Zerfall von Polypeptiden war von Brennan und Clarke (1993) an kritischen Aspartat- und Asparaginresten in Abhängigkeit von der Dielektrizität des Lösungsmittels beobachtet worden. Die aufgetretenen Fragmentgrössen liessen sich anhand der DXS-Aminosäuresequenz allerdings nicht mit einem Zerfall des Proteins an diesen AS-Resten vereinbaren. Für das Auftreten von gleichartigen DXS-Fragmenten aus drei verschiedenen DXS-Varianten (nativ, GST-Fusion und mit His-tag) nach Ultraschallaufschluss (Abb. 11), ist daher ein Zerfall der DXS an Aminosäureresten oder AS-Sequenzen wahrscheinlicher, die für mechanische Kräfte, wie sie bei Ultraschallaufschlüssen auftreten, anfällig sind.

Biochemische Charakterisierung der DXS von *E. coli*

Die enzymatische Aktivität der DXS ist abhängig von der Anwesenheit der Kofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+}. Durch Dialyse können diese entfernt und enzymatisch inaktives Apo-Enzym gewonnen werden, dessen Aktivität durch Zugabe von ThDP und Mg^{2+} rekonstituiert werden kann (Sprenger et al., 1997). Wie bei den ebenfalls ThDP-abhängigen Transketolasen (Heinrich et al., 1972; Sprenger et al., 1995a) konnten weitere zweiwertige Kationen wie Mn^{2+}, Ca^{2+} und Co^{2+} in Kombination mit ThDP Apo-DXS rekonstituieren, was durch Ni^{2+} und Zn^{2+} nicht möglich war. Die Geschwindigkeit der Rekonstitution war mit Mn^{2+} am schnellsten, gefolgt von Mg^{2+}, Co^{2+} und Ca^{2+}. Dabei waren die rekonstituierten Enzymaktivitäten für Mg^{2+} und Mn^{2+} fast identisch und höher als mit Ca^{2+} und Co^{2+}. Für die *E. coli*-DXS war von Kuzuyama und Mitarbeitern (2000) ebenfalls eine Verwendung von Mg^{2+} und

Mn^{2+} beschrieben worden. Die DXS-A von *Rhodobacter capsulatus* erreicht bei Rekonstitution mit Mg^{2+} und Mn^{2+} ebenfalls etwa gleich hohe Enzymaktivitäten dagegen mit Ca^{2+} nur etwa 40% dieser Enzymaktivitäten (Hahn et al., 2001).
Die Affinität der DXS von *E. coli* gegenüber ihren Kofaktoren Mg^{2+} und ThDP wurde in enzymkinetischen Messungen an Apo-DXS untersucht und sind daher als apparente K_M-Werte und nicht als Dissoziations-Konstanten (K_D) anzusehen. Der K_M-Wert für Mg^{2+} liegt unterhalb von 10 µM, da die Enzymaktivität bei dieser Konzentration noch 85% der maximalen Aktivität bei 1 mM Mg^{2+} betrug. Aufgrund der hohen Restaktivität von Apo-DXS, die alleine mit ThDP-Zugabe rekonstituiert wurde, konnte der exakte K_M-Wert für Mg^{2+} nicht bestimmt werden. Durch EDTA-Zugabe konnte die Rekonstitution mit ThDP unterbunden werden, so dass die beobachtete Rekonstitution mit ThDP wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der Substrate oder Puffer mit Metallionen oder auf eine unvollständige Entfernung der Metallionen während der Dialyse zurückzuführen ist.
Die DXS von *E. coli* weist gegenüber dem Kofaktor ThDP eine sehr hohe Affinität auf. Die apparente Michaelis-Konstante von 0,30 ± 0,04 µM liegt in einer Grössenordnung anderer ThDP-Enzyme wie der Hefe-Transketolase (0,28 µM, Kochetov et al., 1971) und der menschlichen Pyruvat-Dehydrogenase (0,72 µM, Fang et al., 1998), während die K_M-Werte für ThDP der Pyruvat-Decarboxylase von *Zymomonas mobilis* (1,28 µM, Bringer-Meyer et al., 1986) und der *E. coli*-TransketolaseA (8,0 µM, Sprenger et al., 1995a) höher liegen.

Die Stabilität und die Aktivität der DXS von *E. coli* zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Puffersubstanz, in der sie gelagert wurde bzw. in der die DXS-Reaktion ablief. Eine verringerte Aktivität in Tris-Puffer korrelierte mit einer geringeren Halbwertszeit des Enzyms bei Lagerung in Tris verglichen mit Hepes- und anderen organischen Puffern. Eine solcher Zusammenhang liegt bei Bicin-Puffer nicht vor: Bei vergleichbarer Aktivität wie in anderen Puffersystemen betrug die Halbwertszeit bei 4°C nur etwa 2 Tage. Bei der Transaldolase von *E. coli* war ebenfalls eine reduzierte Aktivität in Tris-Puffer beobachtet worden (Sprenger et al., 1995b), die auf eine Reaktion von Tris mit dem aktiven Lysinrest oder einer anderen Aminosäure des aktiven Zentrums zurückgeführt worden war. Die Inhibierung und Inaktivierung der DXS durch Tris könnte auf einen ähnlichen Effekt zurückzuführen sein. Die nicht reduzierte Enzymaktivität der DXS in Bicin-Puffer, in dem die Halbwertszeit deutlich

verringert war, deutet auf einen anderen, langfristigeren Effekt der Puffersubstanz auf die Enzymstabilität hin.

Die DXS wies *in vitro* keine ausgeprägte Temperaturstabilität auf. Während die Halbwertszeit bei 4°C in Elutionspuffer mit 20 mM Hepes mit 47 Tagen noch zufriedenstellend war, zeigte sie bei 30°C und 37°C relativ schnell Aktivitätsverluste. Bei höheren Temperaturen sind die Halbwertszeiten bereits sehr gering, was auf eine *in vitro*-Thermolabilität des Enzyms hinweist. In Untersuchungen von thermolabilen Proteinen in *E. coli* wurde unter anderem die DXS als ein thermolabiles Enzym identifiziert, das *in vivo* aggregiert und durch ClpB und das DnaK-Chaperonsystem disaggregiert wird (Mogk et al.,1999). Als Faktoren, die die Anfälligkeit von *E. coli*-Proteinen zu denaturieren und aggregieren fördern, werden eine Grösse von ≥ 70 kDa pro Untereinheit (Mogk et al., 1999) sowie das Auftreten vieler hydrophober Aminosäuren verantwortlich gemacht (Mitraki & King, 1989; Seckler & Jaenicke, 1992). Grössere Proteine, die aus mehreren Domänen aufgebaut sind, haben danach eine grössere Wahrscheinlichkeit sich partiell zu entfalten und, anstatt sich wieder in die native Form zurückzufalten, über intermolekulare hydrophobe Oberflächen, die normalerweise im Innern des Proteins verborgen sind, zu aggregieren. Obwohl die TransketolaseA von *E. coli* mit 72 kDa pro Untereinheit grösser ist als die DXS mit 67 kDa, weist sie *in vitro* bei Temperaturen > 30°C deutlich höhere Halbwertszeiten auf (Schörken, 1997) und ist auch *in vivo* kein thermolabiles Enzym bzw. DnaK/ClpB-Substrat (Mogk et al., 1999).

Der Vergleich der Aminosäure (AS)-Zusammensetzung der DXS und TransketolaseA von *E. coli* zeigte, dass 26,6 Mol% der AS der DXS hydrophobe AS wie Leucin, Isoleucin, Valin und Methionin sind, während TransketolaseA nur zu 21,5 Mol% aus diesen AS besteht. Der Anteil an hydrophoben AS ist in DXS demnach um ein Viertel höher als in TransketolaseA. Dies ist eine Tendenz, die sich generell auch in den Sequenzen von Transketolasen aus *Saccharomyces cerevisiae, Haemophilus influenzae, Bacillus subtilis* und *Aquifex aeolicus* sowie den DXS aus denselben Organismen (abgesehen von der Hefe *S. cerevisiae*, die keine DXS-Sequenz aufweist), *Arabidopsis thaliana, Thermotoga maritima* und *Zymomonas mobilis* wiederfindet. Die DXS-Sequenzen weisen mit durchschnittlich 26,4% Anteil von Leu, Ile, Val und Met ein fünftel mehr hydrophobe Aminosäuren auf als Transketolasen mit 22,4%. Dieser signifikant höhere Anteil an deutet darauf hin, dass die DXS aus anderen Organismen ebenfalls eine *in vivo*-Thermolabilität aufweisen könnten.

Statistische Untersuchungen von AS-Sequenzen hyperthermophiler und mesophiler Enzyme zeigten, dass Proteine aus hyperthermophilen Organismen einen etwa 2% höheren Anteil hydrophober AS aufweisen (Vieille & Zeikus, 2001). Für diese wird eine stabilisierende Wirkung aufgrund starker hydrophober Interaktionen im Innern der Proteine diskutiert (Vieille & Zeikus, 2001). Im heterologen Expressionssystem und im zellfreien System ohne die Organismus-spezifischen Chaperone könnte eine Entfaltung und Präsentation der hydrophoben Bereiche zur Einnahme einer inkorrekten Faltung oder Aggregation führen.
Die Untersuchungen mit den DXS aus dem mesophilen Bakterium *Z. mobilis* und dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* unterstützen diese Hypothese: Die in *E. coli* exprimierten DXS von *Z. mobilis* und *T. maritima* wiesen *in vitro* keine ausgeprägte Stabilität auf. Nach einer Anionenaustausch-Chromatographie bei Raumtemperatur bzw. 5 min Inkubation bei 70°C war in den DXS von *Z. mobilis* bzw. *T. maritima* keine Enzymaktivität mehr nachweisbar. Während über 90% der in *E. coli* exprimierten Enzyme von hyperthermophilen Organismen die gleichen Eigenschaften aufweisen wie die nativen Enzyme, existieren auch Beispiele für rekombinante hyperthermophile Enzyme, die veränderte Stabilitäten, Strukturen oder katalytische Eigenschaften aufweisen (Vielle & Zeikus, 2001). So bildet die in *E. coli* exprimierte 5'-Methylthioadenosin Phosphorylase von *Sulfolobus solfataricus* inkorrekte Disulfid-Brücken aus und ist daher weniger stabil als das native Enzym (Cacciapuoti et al., 1999). Die rekombinante Glutamat-Dehydrogenase von *Pyrococcus furiosus* nimmt einen nur partiell aktiven Oligomerisierungs-Zustand ein und ist weniger stabil als die native Form (Lebbink et al., 1995). Als Gründe für die veränderten Eigenschaften der rekombinanten Enzyme werden unter anderem fehlende posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und die Abwesenheit spezifischer Chaperonsysteme diskutitiert (Vieille & Zeikus, 2001).

Die DXS von *E. coli* setzte die Edukte Pyruvat und D-Glycerinaldehyd sowie die Produkte CO_2 und 1-Desoxy-D-xylulose nach einem Ping-Pong Bi Bi-Reaktionsmechanismus um bzw. frei. Ebenfalls nach einem Ping-Pong Bi Bi-Mechanismus reagieren die C2- bzw. C3- Gruppen übertragenden Enzyme Transketolase und Transaldolase (Klein & Brand, 1977; Kuhn und Brand, 1973). Charakteristisch für einen solchen Mechanismus ist eine alternierende Bindung der Edukte und Freisetzung der Produkte, wobei nach der Ablösung des ersten Produktes ein Intermediat am Enzym verbleibt und auf das zweite Produkt

übertragen wird (Bisswanger, 2000). In der von der DXS katalysierten Reaktion wird Pyruvat im aktiven Zentrum durch die Bindung an Thiamindiphosphat decarboxyliert und CO_2 als erstes Produkt freigesetzt (I in Abb. 36). An dem ThDP-Kofaktor verbleiben die beiden restlichen C-Atome von Pyruvat in Form einer kovalent gebundenen Hydroxyethylgruppe (HE = „aktivierter Acetaldehyd"; II). Die HE-Gruppe wird in einer Acyloin-Kondensation auf das Aldehyd-C1 des zweiten Eduktes D-GAP übertragen (III) und das zweite Produkt DXP gebildet (IV). Nachdem DXP den Substratkanals verlassen hat, steht die DXS für den nächsten katalytischen Zyklus bereit (V in Abb. 36).

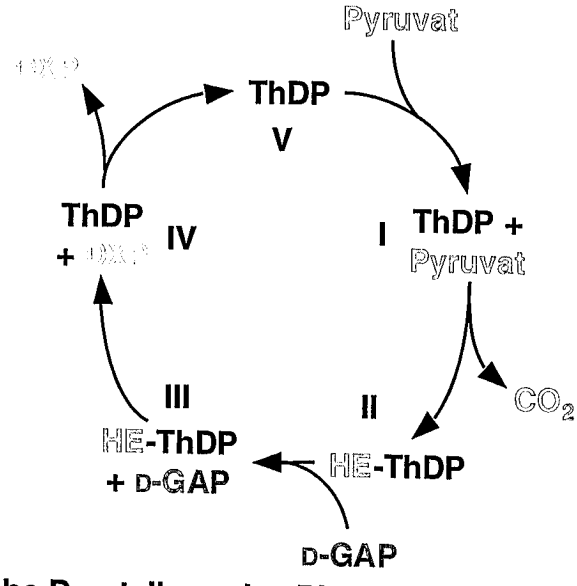


Abb. 36: Schematische Darstellung des Ping-Pong-Mechanismus der DXS.
ThDP: Thiamindiphosphat, HE-ThDP: Hydroxyethyl-Thiamindiphosphat-Intermediat, D-GAP: D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, DXP: 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *E. coli* katalysiert die Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat mit einer spezifischen Aktivität von 4,2 ± 0,2 U/mg. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der DXS für ihre physiologischen Substrate wurde ein gekoppelter Aktivitätstest mit der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerase (DXR) von *Z. mobilis* (Grolle et al., 2000) als Hilfsenzym etabliert. In diesem konnte die Bildung von DXP aus Pyruvat und D-GAP mittels NADPH-abhängiger Reduktion und Isomerisierung von DXP zu 2-*C*-Methyl-D-erythritol-4-Phosphat (MEP) spektrophotometrisch bei 340 nm kontinuierlich quantifiziert werden. Ein ähnlicher DXS-Aktivitätstest mit der DXR aus *E. coli* ist mittlerweile von Altincicek und Mitarbeitern (2000) beschrieben worden.

Die ermittelten maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) liegen mit 4,3 ± 0,1 U/mg für beide Substrate kaum höher als die tatsächlich gemessene Enzymaktivität. Dies kann zum einen auf die durch Freisetzung von CO_2 praktisch irreversibel in Richtung der Produkte verlaufende Reaktion zurückgeführt werden. Zum anderen wurden die Aktivitäts-Bestimmungen (Enzymtest 2, Material und Methoden) mit Pyruvat- und GAP-Konzentrationen durchgeführt, die mit jeweils 10 mM deutlich über den Michaelis-Konstanten von Pyruvat (K_M = 0,1 mM) und D-GAP (K_M = 0,44 mM) lagen. Affinitäten in gleichen Grössenordnungen waren für die DXS von *Streptomyces* sp. CL190 und *E. coli* (Kuzuyama et al., 2000) sowie die DXS-A und (für D-GAP) die DXS-B von *Rhodobacter capsulatus* (Hahn et al., 2001) beschrieben worden (Tab. 22). Die DXS-B von *R. capsulatus* weist mit 3 mM einen relativ hohen K_M-Wert für Pyruvat auf. Die Fähigkeit des entsprechenden *dxsB*-Gens aus *R. capsulatus* einen *E. coli*-Stamm, in dem das *dxs*-Gen disruptiert worden war, zu komplementieren, deutet darauf hin, dass es sich bei DXS-B um eine funktionelle DXS handelt (Hahn et al., 2001). Die V_{max}-Werte der bislang charakterisierten DXS von *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Altincicek et al., 2000) und *R. capsulatus* (Hahn et al., 2001) liegen in einem Bereich von etwa 1 bis 4 U/mg (Tab. 22).

Tab. 22: Kinetische Parameter bakterieller 1-Desoxy-D-xylulose-5-P Synthasen.
* Die maximale Reaktionsgeschwindigkeiten V_{max} waren bei 37°C bestimmt worden. Ausnahme sind die Daten aus dieser Arbeit, die bei 30°C ermittelt wurden.

Enzym	V_{max} [U/mg]	K_M (Pyruvat) [mM]	K_M (D-GAP) [mM]	Referenz
DXS *E. coli*	4,3*	0,10	0,44	diese Arbeit
DXS *E. coli*	4,0	n. b.	n. b.	Altincicek et al., 2000
DXS *E. coli*	300	0,10	0,24	Kuzuyama et al., 2000
DXS *Streptomyces* sp.	370	0,07	0,12	Kuzuyama et al., 2000
DXS *P. aeruginosa*	1,1	n. b.	n. b.	Altincicek et al., 2000
DXS-A *R. capsulatus*	1,9	0,61	0,15	Hahn et al., 2001
DXS-B *R. capsulatus*	1,4	3,00	0,12	Hahn et al., 2001

Von Kuzuyama und Mitarbeitern (2000) waren für die DXS von *E. coli* und *Streptomyces* sp. CL190 hundert mal höhere Enzymaktivitäten beschrieben worden. Diese waren im Unterschied zu den Daten aus anderen Untersuchungen, die über spektrophotometrische Aktivitätstests ermittelt wurden, mittels HPLC-Quantifizierung der Reaktionsprodukte bestimmt worden. Die vorliegende Diskrepanz in den Enzymaktivitäten ist bislang nicht zu erklären, da auch mit Enzymtest 1, der auf dem HPLC-Nachweis des Reaktionsproduktes basiert (Material und Methoden), mit den Akzeptorsubstraten D-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat keine höheren Aktivitäten als 4,3 U/mg beobachtet werden konnten.
Neben bakteriellen waren ebenfalls pflanzliche *dxs*-Gene wie aus *Arabidopsis thaliana*, *Mentha x piperita* und *Capiscum annuum* (Mandel et al., 1996; Lange et al., 1998; Bouvier et al., 1998) sowie die *dxs*-Gene aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Schwender et al., 1999) und *Plasmodium falciparum* (Jomaa et al., 1999) kloniert worden. Immunologische Untersuchungen an der DXS aus *Capiscum annuum* beweisen die Lokalisation der DXS in Chloroplasten und Chromoplasten (Bouvier et al., 1998).

Aufgrund der Irreversibilität der DXS-Reaktion und deren Schlüsselposition am Übergang vom Zentralstoffwechsel und den drei Biosynthesewegen zu Thiamindiphosphat, Pyridoxalphosphat und Isopentenyldiphosphat in *E. coli* ist eine Regulation der DXS-Aktivität in der Zelle auf transkriptioneller Ebene oder auf der Ebene der Enzymaktivität zu vermuten. Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren als Beispiel für verzweigende Biosynthesewege ist in *E. coli* sowohl auf transkriptioneller Ebene durch Repression und Attenuation als auch auf Enzymaktivitäts-Ebene durch allosterische Inhibition einzelner Enzyme reguliert (Pittard, 1996). Interessanterweise ist ThDP als Kofaktor der DXS an seiner eigenen Biosynthese beteiligt, eine Konstellation wie sie ebenfalls in den Biosynthesen von Pyridoxol und Biotin auftritt (Drewke et al., 1996; Sanyal et al., 1994). Da der MEP-Weg zu Isoprenoiden nur in Bakterien, Chloroplasten von Pflanzen und Algen sowie Apicomplexa wie dem Malaria-Erreger *Plasmodium* vorkommt (Rohmer et al., 1996; Schwender et al., 1996, Eisenreich et al., 1996, Sprenger et al., 1997; Jomaa et al., 1999), stellen Inhibitoren seiner Enzyme Kandidaten für Antibiotika, Herbizide bzw. Antimalariamittel dar. Spezifische Inhibitoren können ebenfalls wertvolle Hilfsmittel bei der Kristallisierung von Enzymen darstellen.

Erniedrigte DXS-Aktivitäten wurden nach Inkubation mit 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat, Geranylgeranyl-PP_i, Pyridoxalphosphat und anorganischem Phosphat beobachtet. Die Hemmung bei 10 mM DXP ist mit 84% Restaktivität nur gering und daher wahrscheinlich auf eine typische Produkthemmung bei einem Bi Bi-Reaktionsmechanismus zurückzuführen. Geranylgeranyl-PP_i ist als C_{20}-Terpenoid bereits in späteren Schritten der Isoprenoid-Biosynthese lokalisiert, so dass die ebenfalls relativ geringe Reduktion der DXS-Aktivität (84% Restaktivität) keine physiologische Relevanz besitzen sollte. Die bei relativ hohen Pyridoxalphosphat-Konzentrationen von 3,2 mM beobachtete 31% Reduzierung der DXS-Aktivität ist eher auf eine unspezifische Reaktion von Pyridoxalphosphat mit einem der Substrate oder exponierten Lysinresten des Enzyms zurückzuführen (G. Schneider, persönliche Mitteilung). Phosphat hatte in Konzentrationen von 10 - 50 mM nur eine geringe inhibitorische Wirkung auf die Umsetzung von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd (92% Restaktivität). Die Enzymaktivität der DXS gegenüber Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat war bei Phosphat-Konzentrationen von 10 - 50 mM um etwa 30% herabgesetzt. Diese Ergebnisse deuten auf eine Konkurrenz der anorganischen Phosphat-Ionen mit dem phosphorylierten Akzeptorsubstrat um die Bindung durch Aminosäuren im aktiven Zentrum hin. Allerdings handelt es sich bei der Inhibition der DXS durch Phosphat nur um eine schwache verglichen mit Enzymen wie der Methylglyoxal Synthase und der Fruktose-6-Phosphat-Aldolase von *E. coli*, die K_i-Werte von etwa 200 µM aufweisen (Hopper & Cooper, 1972; Schürmann & Sprenger, 2001).

Der fast komplette Aktivitätsverlust der DXS in Anwesenheit von hohen Thiamindiphosphat-Konzentrationen (50 mM) ist wahrscheinlich durch eine stetige, schnelle Verdrängung des enzymgebundenen ThDP mit ThDP-Molekülen aus dem Reaktionsansatz bedingt, so dass keine effektive Katalyse stattfinden kann. Ein eben solcher rapider Austausch von ThDP-Molekülen zwischen Holoenzym und Puffer ist von der Hefe-Transketolase bekannt (Kovina et al., 1997).

Bis auf die α-Ketosäuren Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat, die als Strukturanaloga von Pyruvat kompetitive Inhibitoren der DXS darstellten, konnten in dieser Arbeit keine Substanzen identifiziert werden, die die DXS auch in geringen Konzentrationen spezifisch inhibierten. Die inhibitorischen Konstanten für Hydroxypyruvat (K_i = 2,4 mM) und α-Ketobutyrat (K_i = 6,5 mM) liegen allerdings in einem Bereich der eine physiologische Bedeutung dieser Inhibierung unwahrscheinlich macht.

Hydroxypyruvat ist sowohl ein starker kompetitiver Inhibitor als auch ein alternatives Substrat der Pyruvat-Decarboxylase (Thomas et al., 1990). Die DXS von *E. coli* und *P. aeruginosa* werden durch das Pyruvat-Analogon Fluorpyruvat in geringen Konzentrationen inhibiert (Altincicek et al., 2000). Es war hierbei ein Inhibitions-Mechanismus wie bei der Inaktivierung der E1-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH-E1) von *E. coli* durch Fluoropyruvat postuliert worden. Tatsächlich ist Fluoropyruvat sowohl ein Inhibitor als auch ein Substrat der PDH-E1 und diese wird durch ein geeignetes Akzeptorsubstrat vor der irreversiblen Inaktivierung durch ein Reaktionsintermediat geschützt (Flournoy & Frey, 1989). Es ist daher plausibel, dass Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat zu Pyruvat alternative Donorsubstrate darstellen können, was durch DXS-Aktivitätstests, in denen Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat anstelle von Pyruvat eingesetzt wurden, gezeigt werden konnte.

Mittlerweile war auch für Ketoclomazon, ein Abbauprodukt des Herbizides Clomazon, eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der DXS von *C. reinhardtii* nachgewiesen worden (Mueller et al., 2000). Das bereits beschriebene Antibiotikum Fosmidomycin (Shigi, 1989) sowie dessen Derivate inhibieren als Strukturanaloga des Reaktionsintermediates 2-*C*-methylerythrose-4-Phosphat die DXR bakterieller und pflanzlicher Herkunft sowie die von *P. falciparum* (Kuzuyama et al., 1998; Schwender et al., 1999; Jomaa et al., 1999).

Durch Transkriptionsstudien, die auf der DNA-Chip Technologie basierten, ist mittlerweile gezeigt worden, dass die *dxs*- und *dxr*-Gene in *E. coli* nicht in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle reguliert werden (Oh & Liao, 2000a). Allerdings ist die Transkription des *dxs*-Gens um den Faktor 2 - 3 und in geringeren Ausmass auch die Transkription des *dxr*-Gens bei Überexpression eines Modellproteins wahrscheinlich aufgrund erhöhten Energieumsatzes und damit erhöhtem Bedarf an Chinonen, deren Seitenketten isoprenoiden Ursprungs sind, erhöht (Oh & Liao, 2000b).

In der Genom-Sequenz von *E. coli* existiert nur eine Kopie eines *dxs*-Gens und somit keine Isoenzym-Formen, die jeweils durch einen Metaboliten Isoprenoid-, ThDP- und Pyridoxalphosphat-Biosynthese spezifisch inhibiert werden könnten. Es ist daher wahrscheinlicher, dass eine „Feedback"-Inhibierung in den jeweils ersten Biosynthese-spezifischen Reaktionsschritten zu Isopentenyldiphosphat, ThDP- und Pyridoxalphosphat stattfinden kann.

Substratspektrum der DXS und enzymatische Synthesen

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *E. coli* setzt alternativ zum physiologischen Hydroxyethylgruppen-Donor Pyruvat ebenfalls Acetaldehyd und Acetoin sowie die α-Ketosäuren Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat als Donorsubstrate um. Bei der Umsetzung von Acetaldehyd bzw. Acetoin wurde eine Hydroxyethyl (HE)-Gruppe (= „aktivierter Acetaldehyd") mit niedrigen Reaktions-Geschwindigkeiten (etwa 1%) verglichen mit dem physiologischen HE-Donor Pyruvat auf das Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat übertragen. Hierbei konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass Acetaldehyd in diesen Testansätzen auch als Akzeptorsubstrat diente und der Anteil der auf Acetaldehyd übertragenen Hydroxyethyl-Gruppen in diesem Test nicht erfasst wurde. Obwohl Acetaldehyd eine leicht flüchtige Substanz darstellt, verliefen die Reaktionen in den photometrischen Aktivitätstests bei 30°C (Enzymtest 2) über mehrere Minuten in linearen Bereichen.

In der Reaktion von DXS mit Hydroxypyruvat wurde in einer Reaktion, wie sie bereits für die Transketolasen von *S. cerevisiae*, *E. coli* und Spinat beschrieben wurde (Srere et al., 1958; Datta & Racker, 1961; Bolte et al., 1987; Draths et al., 1992) eine Dihydroxyethyl (DHE)-Gruppe (= „aktivierter Glykolaldehyd") transferiert. Diese Reaktion wurde von der DXS mit 7% (verglichen mit dem Donorsubstrat Pyruvat) deutlich besser katalysiert als die mit Acetaldehyd und Acetoin. Bei der Umsetzung von α-Ketobutyrat als Donorsubstrat wurde eine Kohlenstoffeinheit aus drei C-Atomen übertragen, die formal einem „aktivierten Propionaldehyd" entsprechen sollte. Die Produkte mit den Akzeptorsubstraten D-Glycerinaldehyd und D-GAP stellten eine 1,2-Didesoxy-D-*threo*-3-hexulose bzw. deren an C6 phosphorylierte Form dar. Die Übertragung eines „aktivierten Propionaldehyds" auf aliphatische bzw. aromatische Aldehyd-Akzeptorsubstrate war für die Pyruvat-Decarboxylasen von *S. cerevisiae* und *Z. mobilis* beschrieben worden (Fuganti et al., 1988; Bornemann et al., 1996; Iding et al., 1998).

Auf Seiten der Akzeptorsubstrate tolerierte die DXS aus *E. coli* verschiedene Substrate, was eine Voraussetzung für deren Einsatz in enzymatischen Synthesen ist. Neben dem physiologischen Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurden mit dem Donorsubstrat Pyruvat ebenfalls kurzkettige Aldehyde wie Glykolaldehyd und Acetaldehyd sowie Aldosen in phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form umgesetzt. Die Aktivität der DXS gegenüber dem unphosphorylierten D-Glycerinaldehyd war bei etwa 25 mal höherem K_M-Wert

genauso hoch wie mit D-GAP. Die L-Form von Glycerinaldehyd wurde durch die DXS praktisch nicht umgesetzt. Die mittels HPLC beobachtete Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose ist wohl eher auf eine Verunreinigung des L-Glycerinaldehyds mit geringen Mengen D-Glycerinaldehyd oder einer langsamen Racemisierung über die Reaktionszeit von 16 h zurückzuführen, da bei der Umsetzung der L-Form mit Pyruvat nicht die detektierte 1-Desoxy-D-xylulose mit 3*S*,4*R*-Konfiguration entstände sondern das 3*S*,4*S*-Produkt 1-Desoxy-L-ribulose. Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *E. coli* kann zur Racematspaltung von D,L-Glycerinaldehyd und wahrscheinlich auch D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat benutzt werden, da die endständige Phosphatgruppe keinen Einfluss auf die Selektivität des Enzyms bezüglich der C2-Hydroxylgruppe haben sollte. Aufgrund einer vergleichbaren Enantioselektivität bezüglich der C2-Hydroxylgruppe des Akzeptorsubstrates war Transketolase zur Enantiomerentrennung von α-Hydroxyaldehyden benutzt worden (Ziegler et al., 1988; Effenberger et al., 1992).

Glykolaldehyd und D-Erythrose-4-Phosphat wurden mit dem alternativen Donorsubstrat Hydroxypyruvat noch mit hohen Reaktionsgeschwindigkeiten von 71% bzw. 84% Aktivität (verglichen mit D-Glycerinaldehyd) durch die DXS umgesetzt. Mit Hydroxypyruvat wurde die Umsetzung der unphosphorylierten D-Erythrose mit noch 17% der Aktivität bezogen auf das Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd katalysiert. Die Affinität der DXS gegenüber den nicht phosphorylierten Substraten ist, unabhängig von den zum Teil hohen V_{max}-Werten, deutlich niedriger als gegenüber den phosphorylierten Substraten D-GAP und D-Erythrose-4-P. Für die Transketolase von *E. coli* waren für nicht phosphorylierte Substrate ebenfalls hohe Enzymaktivitäten bei erhöhten K_M-Werten verglichen mit den phosphorylierten Substraten beschrieben worden (Sprenger et al., 1995a).

Die D- und L-Enantiomere der Threose sowie der C5-Zucker D-Ribose in phosphorylierter und unphosphorylierter Form waren ebenfalls geeignete Akzeptorsubstrate für die Übertragung einer HE-Gruppe von Pyruvat durch die DXS. Die kinetischen Parameter dieser Reaktionen konnten aufgrund eines fehlenden sensitiven HPLC-Nachweises der Reaktionsprodukte bzw. gekoppelten photometrischen Tests wie für die Substrate Glykolaldehyd und D-Erythrose(-4-P) nicht bestimmt werden. Die Umsetzung beider Enantiomere der Threose steht nicht notwendigerweise im Widerspruch zur enantioselektiven Umsetzung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Der Aminosäurerest Aspartat-427, der im DXS-

Substratkanalmodell (siehe Abschnitt Struktur-Funktionsbeziehungen) durch eine Wasserstoffbrücke die Konfiguration der C2-Hydroxylgruppe von Glycerinaldehyd als D-Konfiguration festlegt, könnte sowohl mit dem D-konfigurierten C3-OH von D-Threose als auch mit dem D-konfigurierten C2-OH von L-Threose wechselwirken und auf diese Weise beide Enantiomere im Substratkanal stabilisieren (Abb. 37).

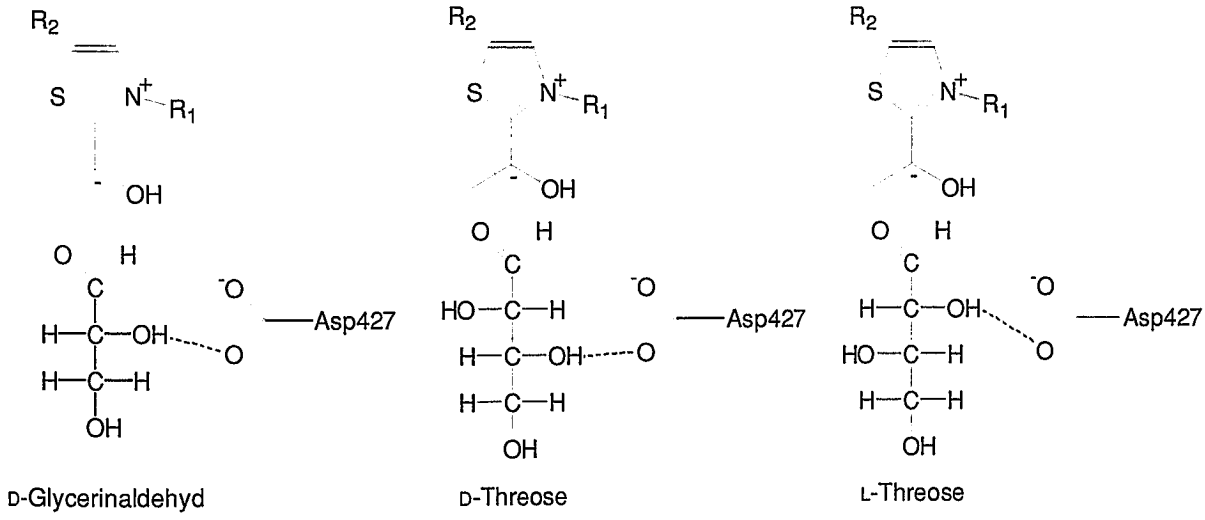


Abb. 37: Positionierung der Threose-Enantiomere durch Wechselwirkung mit der Substratkanal-Aminosäure Asp427 der *E. coli*-DXS. Erläuterungen im Text.

Mit dem Akzeptorsubstrat D-Ribose-5-Phosphat und dem Donorsubstrat Pyruvat konnten mit der DXS von *E. coli* vollständige Umsetzungen der Edukte erzielt werden. Das Produkt dieser Reaktion konnte mittels NMR-spektroskopischer und LC-ESI-MS Untersuchungen als 1-Desoxyheptulose-7-Phosphat identifiziert werden, die analog zur Umsetzung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat eine 3*S*, 4*R*-Konfiguration aufweisen und somit eine an C7 phosphorylierte 1-Desoxy-D-sedoheptulose darstellen sollte.
1-Desoxyketosen werden in einer Nebenreaktion von PDH-E1 Untereinheiten und Acetoin-Dehydrogenasen ebenfalls aus Pyruvat und einem Aldose-Akzeptorsubstrat synthetisiert (Yokota & Sasajima, 1984 & 1986). In diesen Umsetzungen waren allerdings nur unphosphorylierte Aldosen von C_2 bis C_4 als Akzeptorsubstrate eingesetzt worden, so dass als Produkte 1-Desoxyketosen von C_4 bis C_6 ohne endständige Phosphatgruppe entstanden waren. Zudem hatte die Übertragung einer HE-Gruppe auf D-Threose zur Bildung der beiden Epimere 1-Desoxy-D-sorbose und 1-Desoxy-D-tagatose geführt (Yokota & Sasajima, 1984 & 1986), so dass nur bedingt enantioselektive Umsetzungen stattgefunden hatten.

Die TransketolaseA von *E. coli* katalysierte ebenfalls einen HE-Gruppentransfer von Pyruvat auf D-GAP mit allerdings sehr niedriger Reaktionsgeschwindigkeit von 0,05 U/mg und geringer Affinität zum Donorsubstrat Pyruvat (K_M = 214 mM) verglichen mit einem V_{max} von 60 U/mg und einem K_M-Wert von 18 mM für Hydroxypyruvat (Sprenger et al., 1995a). Die geringe Aktivität der Hefe-Transketolase gegenüber Pyruvat war durch den Austausch von Histidin-103 gegen hydrophobe Aminosäuren wie Methionin auf etwa 1% der Aktivität der physiologischen Reaktionen (15 - 25 U/mg) gesteigert worden (S. Thorell, persönliche Mitteilung). Pyruvat-Decarboxylasen waren hauptsächlich verwendet worden, um eine Hydroxyethylgruppe von Pyruvat oder Acetaldehyd auf aliphatische, aromatische oder heterozyklische Aldehyde zu übertragen (Iding et al., 1998; Sprenger & Pohl, 1999). Das Potential der DXS zur Umsetzung solcher Aldehydsubstrate wurde bislang nicht untersucht. Wegen des hydrophoberen Charakters dieser Substrate im Vergleich zum physiologischen Substrat Glycerinaldehyd-3-Phosphat ist eine ähnlich gute Umsetzung wie mit der PDC allerdings unwahrscheinlich.

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase aus *E. coli* könnte als Biokatalysator eingesetzt werden, der die enantioselektive Bildung von 1-Desoxyketosen in phosphorylierter und unphosphorylierter Form aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Edukte und Produkte zu den physiologischen Substraten der DXS effektiver katalysiert als die Transketolasen, Pyruvat-Decarboxylasen und Pyruvat-Dehydrogenasen, für die entsprechende Reaktionen beschrieben worden waren. Durch die Verwendung des alternativen Donorsubstrates α-Ketobutyrat und Variation der Akzeptorsubstrate sind mit der DXS auch 1,2-Didesoxy-3-ketosen zugänglich.

Die Eignung der DXS zur Verwendung in chemo-enzymatischen Synthesen wird durch die gekoppelte Ein-Topf-Synthese eines Disaccharids aus Glukose und 1-Desoxy-D-xylulose aus UDP-Glukose, Pyruvat und D-Glycerinaldehyd mit der DXS und der Saccharose Synthase I aus *Solanum tuberosum* unterstrichen. Für solche Anwendungen war die Charakterisierung des pH-Wert/Aktivität-Profils, des Temperaturverhaltens sowie der Temperaturstabilität der DXS erforderlich. Dabei zeigte sich, dass die DXS von *E. coli* sowohl in einer ganzen Reihe von organischen Puffersystemen sowie in einem breiten pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 10,5 mit einem Optimum zwischen pH 6,5 und pH 8,0 enzymatisch aktiv ist. Lediglich TrisHCl- und Phosphat-Puffer sind aufgrund der inhibitorischen Wirkung der Puffersubstanz und der daraus resultierenden niedrigeren Enzymaktivitäten weniger geeignet.

Die DXS von *E. coli* stellt *in vivo* (Mogk et al., 1999) wie auch *in vitro* ein thermolabiles Enzym dar. Reaktionstemperaturen oberhalb von 37°C sind für Umsetzungen mit der DXS nicht geeignet, da die Halbwertszeiten von 18 h bei 37°C auf unter 4h bei 45°C absanken. Da die Halbwertszeit der DXS bei 20°C bzw. 30°C noch 4 bzw. 2 Tage betrug, sind Synthesen bei diesen Temperaturen möglich. Aufgrund der niedrigen Aktivierungsenergie von unter 40 kJ/mol wies die DXS auch bei 4°C mit 25% der Aktivität bei 30°C noch relativ hohe Aktivitäten bei einer langen Halbwertszeit von fast 48 Tagen auf. Deutlich höhere Aktivierungsenergien waren für die DXS aus *Streptomyces* sp. CL190 mit 99 kJ/mol ermittelt worden (Kuzuyama et al., 2000). Somit sind mit der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *E. coli* auch chemo-enzymatische Synthesen bei 4°C möglich.

In zukünftigen Untersuchungen kann das Substratspektrum der DXS von *E. coli* weiter analysiert werden. Interessant wären auf Seite der Donorsubstrate längerkettige oder verzweigte α-Ketosäuren wie zum Beispiel α-Ketovalerat oder α-Ketoisovalerat sowie Pyruvat-Analoga wie dem DXS-Inhibitor Fluorpyruvat, welches für Pyruvat-Dehydrogenase-E1 Untereinheiten sowohl einen Inhibitor als auch ein Substrat darstellt (Flourney & Frey, 1989). Als alternative Akzeptorsubstrate sind 2-Desoxyaldosen und verschieden substituierte α-Hydroxyaldehyde mit z. B. Azido-, Nitro- oder Thio-Funktion, welche auch alternative Akzeptorsubstrate von Transketolasen sind (Demuynck et al., 1991; Kobori et al., 1992; Dalmas & Demuynck, 1993; Hecquet et al., 1994; Schörken, 1997), von Interesse. Die Produkte dieser Umsetzungen könnten aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat daraufhin untersucht werden, ob sie als Substrate oder Inhibitoren der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Reduktoisomerasen (DXR) fungieren können.

Struktur-Funktionsbeziehungen bei der DXS

Bislang konnten keine zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur geeigneten Kristalle der 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase von *E. coli* gezüchtet werden. Dynamische Lichtstreuungs (DLS)-Untersuchungen mit der bis zur apparenten Homogenität gereinigten DXS, die für die Kristallisierungs-Ansätze verwendet wurde, zeigten, dass die gereinigte DXS jeweils nur in einer einzigen Zustandsform vorlag. Dies kann eine entscheidende Voraussetzung für die

Kristallisierung eines Proteins sein und führt bei etwa 70% der Proteine, für die dies zutrifft, zur erfolgreichen Kristallisierung (Bergfors, 1998).
Durch die DLS-Untersuchungen an der DXS sowie analytische Gelfiltration konnte die molekulare Masse der enzymatisch aktiven DXS auf 142000 ± 17000 bestimmt werden. Damit stellt die DXS von *E. coli* ein Homodimer aus zwei, rechnerisch 68000 schweren Untereinheiten dar. Die DXS von *Streptomyces* sp. CL190 und die DXS-A von *R. capsulatus* weisen mit 130000 bzw. 141000 molekulare Massen auf, die auch auf einen homodimeren Zustand schliessen lassen (Kuzuyama et al., 2000; Hahn et al., 2001). Prokaryontische und eukaryontische Transketolasen sind in der Regel ebenfalls Homodimere (Klein & Brand, 1977; Wood, 1985; Lindqvist et al., 1992; Sprenger et al., 1995a), während Pyruvat-Decarboxylasen Tetramere bilden (Dyda et al., 1993; Arjunan et al., 1996; Dobritzsch et al., 1998) und die E1-Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenasen in hochmolekularen Komplexen mit den E2- und E3-Untereinheiten vorliegen (Reed & Hackert, 1990; Mattevi et al., 1992).

Da bislang keine dreidimensionale Struktur einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase vorliegt, beschränkten sich die Untersuchungen zur Struktur und Funktion der DXS von *E. coli* auf den Vergleich der DXS mit verwandten Enzymen sowie den Austausch einzelner, konservierter Aminosäuren mittels ortsgerichteter Mutagenese und enzymkinetischer Charakterisierung der resultierenden Muteine. Weiterhin wurden DXS/Transketolase-Hybridenzyme generiert und partiell charakterisiert.
Bakterielle und pflanzliche 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen weisen die höchsten Identitäten zu den ebenfalls Thiamindiphosphat-abhängigen Transketolasen und Pyruvat-Dehydrogenase E1-Untereinheiten (PDH-E1) auf (Sprenger et al., 1997). Weiterführenden Sequenzanalysen mit in Datenbanken hinterlegten Aminosäuresequenzen von DXS, Transketolasen, PDH-E1 und Pyruvat-Decarboxylasen (PDC) zeigten, dass die höchsten Ähnlichkeiten von DXS-Sequenzen zu denen der Transketolasen bestehen. Ein detaillierter Vergleich von 5 DXS- und 5 Transketolase-Sequenzen, mit den DXS von *E. coli*, *Arabidopsis thaliana*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* und *Aquifex aeolicus* sowie den Transketolasen von *E. coli* (TKTA), *S. cerevisiae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* und *Aquifex aeolicus*, verdeutlichte, dass sich in Transketolasen und DXS konservierte Bereiche über die gesamte Länge der Sequenzen erstrecken (komplettes Alignment im Anhang, Ausschnitte in Abb. 31).

Unter diesen in DXS und Transketolasen konservierten Aminosäureresten fanden sich vor allem solche, die in Transketolasen an der Fixierung und Aktivierung des ThDP-Kofaktors, der Erkennung und Bindung von Donor- und Akzeptorsubstraten und der Katalyse beteiligt sind (Schneider und Lindqvist, 1998; Schörken, 1997). Durch den Abgleich dieser Sequenzanalysen mit der 3D-Struktur der Hefe-Transketolase und dem Substratkanal-Modell der TransketolaseA von *E. coli* konnte ein Modell des aktiven Zentrums der DXS von *E. coli* erstellt werden (Abb. 38).

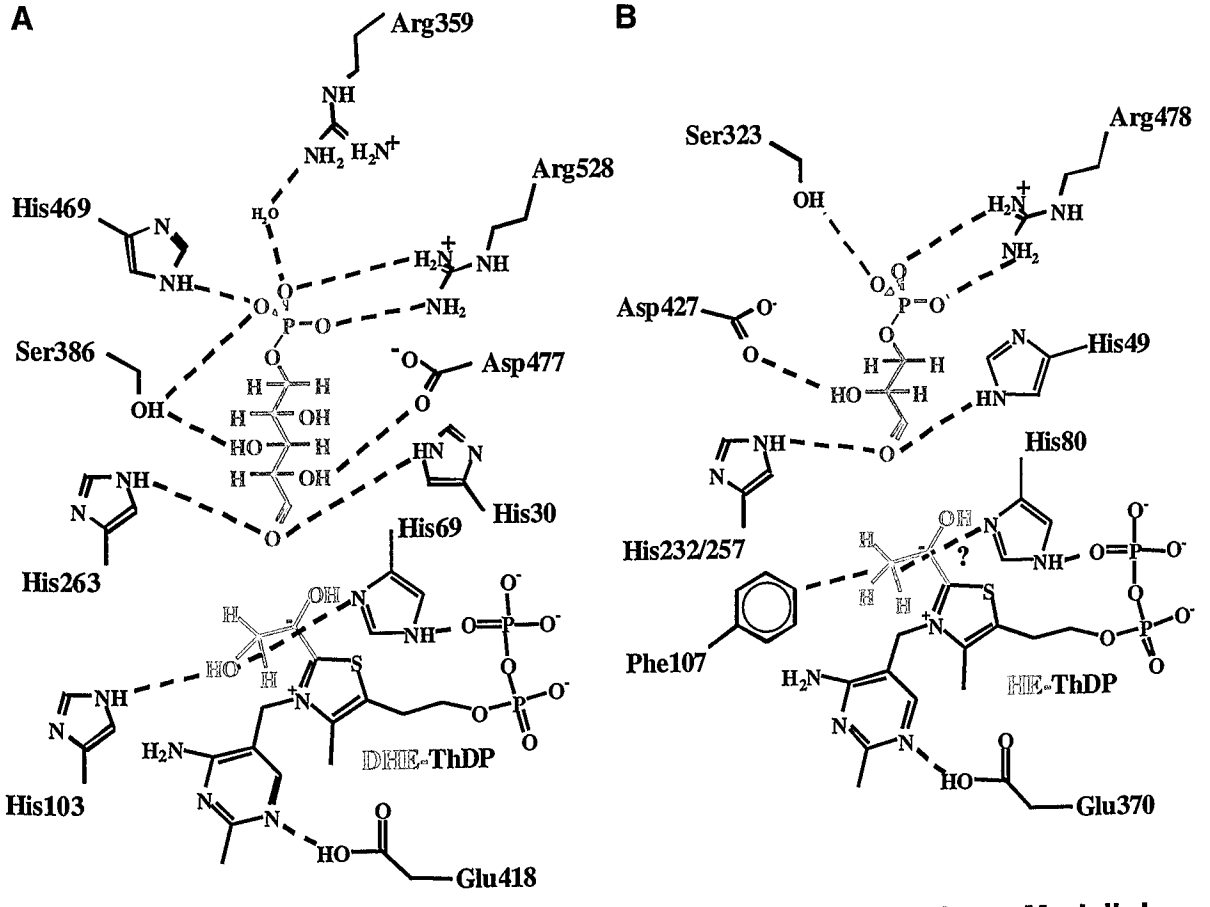


Abb. 38: Vergleich des Transketolase-Substratkanals (A) mit einem Modell der Protein/Substrat- und Protein/Kofaktor-Interaktionen der DXS von *E. coli* (B). **A:** Wechselwirkungen von Aminosäuren der Transketolase mit dem Akzeptorsubstrat D-Ribose-5-P (grün) und dem Dihydroxyethyl-Thiamindiphosphat-Intermediat (DHE-ThDP, rot-blau) sind als unterbrochene Linien dargestellt (verändert nach Nilsson et al., 1997 und Schörken, 1997; Die Bezeichnungen der Aminosäuren entsprechen der TKTA von *E. coli*). **B:** Aminosäuren der *E. coli*-DXS, die in Transketolase- und DXS-Sequenzen konserviert sind, und ihre postulierten Wechselwirkungen mit dem Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd-3-P (grün) sowie dem Hydroxyethyl-Thiamindiphosphat-Intermediat (HE-ThDP, rot-blau).

Die Thiamindiphosphat-Bindestelle ist stark konserviert

Die Konsensussequenz ThDP-abhängiger Enzyme (Reynen & Sahm, 1988; Hawkins et al., 1989), mit der unter anderem das zweiwertige Kation und der Pyrophosphat-

Teil von ThDP komplexiert wird, ist in den DXS Sequenzen ebenso vorhanden wie eine putative hydrophobe Tasche zur Bindung des ThDP-Pyrimidinrings, welche in den Transketolasen aus einer Triade der aromatischen Aminosäuren FxxFxxY (Lindqvist et al., 1992) und in DXS aus YxxFxxxxY (Y392, F395 und Y400 der *E. coli*-DXS) gebildet wird.

Glutamat-370 aktiviert den ThDP-Kofaktor

Das Netzwerk konservierter Glutamatreste an den Positionen 162, 167 und 418 der Hefe-Transketolase, über die die beiden ThDP-Moleküle eines Transketolase-Dimers miteinander „kommunizieren" (Schneider und Lindqvist, 1998; Kovina & Kochetov, 1998), ist in den DXS-Sequenzen nur in Form der Glu167 und Glu418 korrespondierenden Glu162- und Glu370-Reste der *E. coli*-DXS präsent. Der Austausch des dem Glu418-Rest, der in der Hefe-Transketolase die Aktivierung des ThDP-Kofaktors bewirkt (Wikner et al., 1994; Kern et. al., 1997), entsprechenden Glu370-Rests der *E. coli*-DXS gegen Alanin und Glutamin führte zu DXS-Muteinen mit drastisch reduzierten Enzymaktivitäten von ≤ 3% Wildtypaktivität. Die entsprechenden Glutamat-Muteine der Hefe-Transketolase (E418A/Q), der PDC von *Z. mobilis* und *S. cerevisiae* (E50Q/D bzw. E51A/Q) sowie der menschlichen PDH-E1 (E89A/Q/D) weisen ebenfalls drastisch reduzierte Enzymaktivitäten aufgrund einer verlangsamten Aktivierung von ThDP auf (Wikner et al., 1994; Candy et al., 1996; Killenberger-Jabs et al.,1997; Kern et al., 1997; Fang et al., 1998). Es ist daher wahrscheinlich, dass E370 diese Funktion in der *E. coli*-DXS übernimmt.

Donorsubstrat-Bindung durch Phenylalanin-107

Die Histidinreste an den Positionen 69 und 103 der Hefe-Transketolase sind durch Wasserstoffbrücken-Bindungen mit der C1-Hydroxylgruppe des Donorsubstrates an dessen Bindung und der Stabilisierung des DHE-ThDP-Intermediates beteiligt (Wikner et al., 1995 & 1997). Der Austausch von His103 gegen hydrophobe AS-Reste führte zu Transketolase-Muteinen die Pyruvat, welches an C1 keine Hydroxylgruppe aufweist, besser umsetzten als die Wildtyp-Transketolase der Hefe (S. Thorell, persönliche Mitteilung). Mit Phe107 befindet sich ein solcher in DXS-Sequenzen konservierter, hydrophober Rest an der entsprechenden Position der *E. coli*-DXS. Der Austausch von Phe107 gegen Ala und His bestätigte die Beteiligung dieser AS an der Bindung des Donorsubstrats Pyruvat, da die F107A- und F107H-Muteine eine reduzierte DXS-Aktivität und erhöhte K_M-Werte für Pyruvat aufwiesen.

In der Umkehrung der H103-Mutagenese der Transketolase zu hydrophoberen AS-Resten setzte das F107H-Mutein der DXS Hydroxypyruvat um 34% effizienter um als Wildtyp-DXS. Mit F107H wurde somit ein Mutein der *E. coli*-DXS erzeugt, das eine typische Transketolase-Reaktion effizienter katalysiert als die Wildtyp-DXS, während die H103-Muteine der Hefe-Transketolase die DXS-Reaktion mit höherer Aktivität durchführen als Wildtyp-Transketolase. Der Austausch von Phe gegen His führte wahrscheinlich zu einer hydrophileren Umgebung im aktiven Zentrum, so dass das hydrophilere Substrat Hydroxypyruvat bzw. das DHE-ThDP-Intermediat besser gebunden bzw. stabilisiert werden kann.

Ein His69 der Hefe-Transketolase entsprechender Histidinrest ist in allen Transketolase- und DXS-Sequenzen konserviert. Die diesem Histidinrest in Transketolasen zugeschriebene Funktion der Donorsubstrat C1-Bindung über eine Wasserstoffbrücke kann in 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen nicht wahrgenommen werden, da das physiologische Donorsubstrat der DXS Pyruvat an C1 keine Hydroxylgruppe aufweist. Der Austausch des entsprechenden His80-Rests der DXS von *E. coli* gegen Ala und Phe führte allerdings nicht zu einer besseren Umsetzung von Pyruvat, sondern zu Muteinen mit weniger als 1% Wildtypaktivität. Da His69 auch eine Wasserstoffbrücke zur Pyrophosphatgruppe des ThDP-Kofaktors ausbildet (Wikner et al., 1995), und in DXS keine hydrophile Stabilisierung des Donorsubstrat-C1 benötigt wird, ist die ThDP-Bindung durch die korrespondierenden Reste in den DXS womöglich von grösserer Bedeutung als in Transketolasen, so dass der Aktivitätsverlust in H80A und H80F auf eine schlechtere Bindung des ThDP-Kofaktors zurückgeführt werden kann.

Histidin-49 und -257 sind an der Katalyse beteiligt

Für die konservierten His30- und His263-Reste der Hefe-Transketolase war eine Beteiligung an der Säure/Base-Katalyse bei der Spaltung des Donorsubstrats und der Übertragung der DHE-Gruppe auf das Akzeptorsubstrat diskutiert worden (Wikner et al., 1997). Die enzymkinetische Charakterisierung der H49A-, H232A- und H257A-Muteine zeigte, dass sich H232A in allen untersuchten Eigenschaften wie Wildtyp-DXS verhielt, während H257A und besonders H49A deutlich in ihrer katalytischen Aktivität eingeschränkt waren. Darüber hinaus war die Affinität von H49A gegenüber den physiologischen Donor- und Akzeptorsubstraten, wie im Falle des H26A-Muteins der Hefe-Transketolase (Wikner et al., 1997), verringert. Die höhere Restaktivität der DXS-Muteine H49A und H257A deutet auf eine bessere

Kompensation des Ausfalls eines Histidinrestes durch den anderen, nicht mutierten Histidinrest hin.

Arginin-478 interagiert mit der Akzeptor-Phosphatgruppe

Die Phosphat-Bindestelle ist in den DXS anscheinend weniger ausgeprägt als in Transketolasen (Abb. 38), was mit den gleich hohen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der *E. coli*-DXS gegenüber D-Glycerinaldehyd und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat im Einklang steht. Alleine der Arg528 der Hefe-Transketolase entsprechende Argininrest scheint in DXS-Sequenzen konserviert zu sein. Der Austausch dieses Arg478-Restes der *E. coli*-DXS gegen einen langkettigen, polaren AS-Rest erzeugte ein DXS-Mutein mit deutlich erniedrigter Affinität gegenüber dem phosphorylierten D-Glycerinaldehyd bei unveränderten bis leicht niedrigeren K_M-Werten für nicht phosphorylierte Akzeptorsubstrate.
Der erhöhte K_M-Wert für das Donorsubstrat Pyruvat ist darauf zurückzuführen, dass aufgrund der erniedrigten Affinität von R478Q für D-GAP dieses Substrat bei den K_M-Bestimmungen für Pyruvat nicht in sättigenden Konzentrationen vorlag. Der Austausch einer positiv geladenen gegen eine polare Aminosäure im R478Q-Mutein bewirkte eine etwa 20% effizientere Umsetzung der unphosphorylierten Akzeptorsubstrate Glykolaldehyd und D-Erythrose, als sie von Wildtyp-DXS katalysiert wird. Der Grund liegt wahrscheinlich in der geringeren Länge und dem ungeladenen, hydrophilen Charakter der Glutamin-Seitenkette verglichen mit dem langen, geladenen Argininrest. Durch den Austausch von Arginin zu Glutamin ist wahrscheinlich mehr Platz im Substratkanal und es finden weniger störende Interaktionen zwischen dem Protein und den nicht physiologischen Substraten im Bereich der Phosphat-Bindestelle des DXS-Substratkanals statt.

Aspartat-427 interagiert mit Akzeptorsubstraten

Die Asp427 der DXS von *E. coli* korrespondierenden Asp477 bzw. Asp470 der Hefe- bzw. *E. coli*-Transketolase, bilden Wasserstoffbrücken zur C4-Hydroxylgruppe des Donor- und zur C2-Hydroxylgruppe des Akzeptorsubstrates aus und legen so die Konfiguration der akzeptierten Substrate auf D-*threo* für die Donor- und D für die C2-Hydroxylgruppe des Akzeptorsubstrates fest (Kobori et al., 1992; Nilsson et al., 1997, Schörken, 1997). Der Austausch des Asp427 der DXS von *E. coli* gegen Ala und Glu führte wie im Fall der Transketolasen zu Muteinen mit verringerter Aktivität für die Umsetzung der physiologischen Substrate (Nilsson et al., 1997, Schörken, 1997).

Die Restaktivität der DXS-Muteine D427A und D427E ist dabei mit 16% bzw. 73% deutlich höher als bei den Transketolase-Muteinen. Die höhere Restaktivität und die im Prinzip unveränderten K_M-Werte von D427E gegenüber den Donorsubstraten Pyruvat und Hydroxypyruvat bei erhöhten K_M-Werten für die Akzeptorsubstrate sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Asp427 in der Wildtyp-DXS keine Wechselwirkungen mit diesen C3-Donorsubstraten eingeht, sondern nur mit dem C2-OH des Akzeptorsubstrates interagiert, während in den Transketolase-Muteinen die Bindung von Donor- und Akzeptorsubstrat beeinträchtigt ist (Nilsson et al., 1997; Schörken, 1997). Ein auf den Sequenzvergleichen und den Untersuchungen der DXS-Muteine basierendes Modell des Substratkanals der DXS von *E. coli* ist in Abbildung 39 dargestellt.

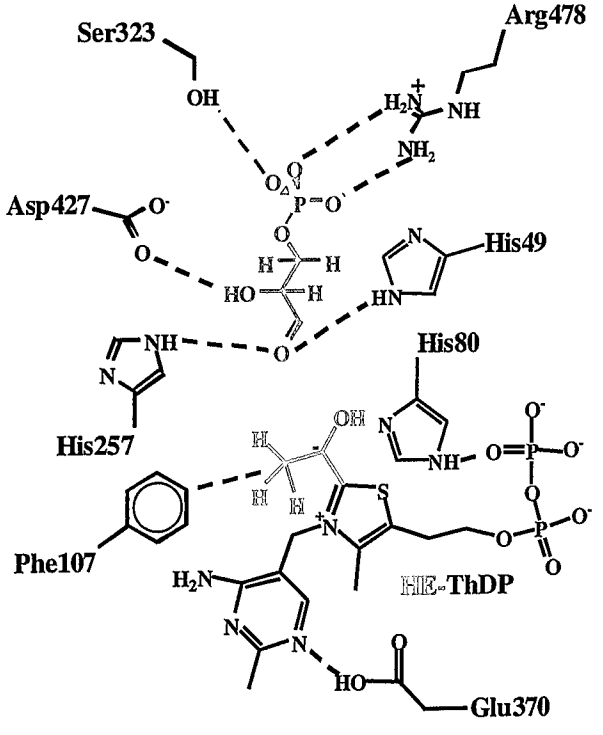


Abb. 39: Modell des Substratkanals der DXS von *E. coli*. Basierend auf Sequenz-Analysen von Transketolasen und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen sowie ortsgerichteter Mutagenese der *E. coli*-DXS.

Neben diesen durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugten Muteinen der *E. coli*-DXS existiert eine Enzymvariante des DXS-homologen CLA1-Proteins, die aus einer kältesensitiven Mutante von *A. thaliana* isoliert worden war (Araki et al., 2000). Diese weist einen Austausch von Aspartat zu Asparagin an Position 627 in der postulierten carboxyterminalen Domäne der DXS auf (Abb. 40 im Anhang). Asp627 ist in DXS- (Araki et al., 2000) und ebenfalls in Transketolase-Sequenzen konserviert (Abb. 40).

Die Funktion der carboxyterminalen Domäne in Transketolasen ist bislang unbekannt, da keine AS dieser Domäne an der Substrat- oder Kofaktor-Bindung bzw. der Katalyse beteiligt sind. Die carboxyterminale Domäne bildet in der Hefe-Transketolase hauptsächlich Kontakte zu der carboxyterminalen Domäne der zweiten Untereinheit aus (Schneider und Lindqvist, 1998) und Muteine ohne diese Domäne werden als „inclusion bodies" exprimiert (S. Thorell, persönliche Mitteilung). Der D627Q-Austausch in CLA1 könnte durch eine gestörte Wechselwirkung der beiden Untereinheiten zu dem von Araki und Mitarbeitern (2000) postulierten Verlust einer aktiven Konformation führen.

Mit dem D470E-Mutein der TransketolaseA von *E. coli* waren 2-Desoxyaldosen mit höherer Reaktionsgeschwindigkeit und Affinität als mit Wildtyp-TKTA umgesetzt worden (Schörken, 1997). Es könnte daher von Interesse sein, das entsprechende D427E-Mutein der *E. coli*-DXS in Hinsicht auf die Umsetzung von 2-Desoxyaldosen als Akzeptorsubstrate mit Pyruvat als Donorsubstrat zu überprüfen. Die resultierenden Produkte sollten 1,4-Didesoxy-2-Ketosen mit einem Stereozentrum an C3 darstellen. Mit dem Donorsubstrat α-Ketobutyrat könnten mit der DXS 1,2-Didesoxy-3-Ketosen mit Stereozentrum an C4 synthetisiert werden. Durch den Austausch von Phe107 gegen Ala könnte im aktiven Zentrum mehr Platz zur besseren Komplexierung und effizienteren Umsetzung von α-Ketobutyrat als in der Wildtyp-DXS geschaffen worden sein. Eine entsprechende Änderung der Substratspezifität von Pyruvat zu α-Ketobutyrat war für die Pyruvat-Oxidase von *E. coli* durch den Austausch des C1 von Pyruvat komplexierenden Val380-Rest gegen Alanin beschrieben worden (Chang & Cronan, 2000). Interessant für die Umsetzung unphosphorylierter Akzeptorsubstrate könnte das R478Q-Mutein der *E. coli*-DXS aufgrund seiner höheren Affinität und effizienteren Umsetzung solcher Substrate sein.

Durch die Erzeugung von enzymatisch aktiven Hybridenzymen aus der *E. coli*-DXS und der TransketolaseA von *E. coli* konnte ein ähnlicher Domänenaufbau von Transketolasen (Muller et al., 1993) und 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen bestätigt werden. Die Fusion der Pyrophosphat-Bindedomäne (PP-Domäne) und der carboxyterminalen Domäne der TransketolaseA von *E. coli* mit der aminoterminalen, potentiellen Pyrimidin-Bindedomäne (Pyr-Domäne) der DXS von *E. coli* führte zu

DXS/TKT-Hybriden, die in ihren Enzymaktivitäten und Affinitäten gegenüber dem Donorsubstrat Pyruvat der DXS ähnelten. Die Affinität und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von TKTA gegenüber Pyruvat war dagegen deutlich niedriger. Die Ähnlichkeit der kinetischen Parameter kann auf die Lokalisation der Aminosäurereste, die für Katalyse (His49 und His257) und für die Donorsubstrat-Bindung (Phe107) verantwortlich sind (Abb. 39), in der von der DXS stammenden Pyr-Domäne erklärt werden. Da die Substratkanal-Aminosäuren, die die Bindung und Positionierung (Ser386, Arg359, Asp470 und Arg521) des Akzeptorsubstrates bewirken (Abb. 38A; Schörken 1997), in der von TKTA stammenden PP-Domäne liegen, könnten die DXS/TKT-Hybride ein ähnlich breites Akzeptorsubstrat-Spektrum aufweisen wie die TKTA (Schörken, 1997). Durch die Kombination des Donorsubstrat-Spektrums der DXS mit dem Akzeptorsubstrat-Spektrum der TKTA wäre eine grosse Bandbreite von unterschiedlich substituierten Desoxyketosen zugänglich. Stabilere DXS/TKT-Hybridenzyme könnten in einem kombinatorischen Ansatz durch graduelle Verkürzung der *dxs*- und *tktA*-Gene und Ligation der Rest-Fragmente zum Beispiel nach der ITCHY-Methode (Ostermeier et al., 1999) mit nachfolgender Selektion auf DXS-Aktivität in einem *dxs*-negativen *E. coli*-Stamm erzeugt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthasen und Transketolasen trotz relativ geringer Sequenzähnlichkeit grundlegende Gemeinsamkeiten in ihrem Aufbau aufweisen. Neben der Ausbildung eines Homodimers sind dies vor allem der Aufbau in bestimmte Domänen und deren Abfolge sowie die Bindung und Umsetzung der Substrate. Diese gemeinsamen Strukturelemente könnten ausgenutzt werden, um mit rationalem Protein-Design oder kombinatorischen Ansätzen Enzymvarianten von DXS und Transketolase zu erzeugen, die bestimmte gewünschte Eigenschaften beider Enzyme zum Beispiel im Bereich des Substratspektrums aufweisen.

V Zusammenfassung

Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase (DXS) von *Escherichia coli* katalysiert in einer Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängigen Acyloin-Kondensation von Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (D-GAP) die Eingangsreaktion der Biosynthesen zu Thiamin, Pyridoxal und Isopentenyldiphosphat.
Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften und der Zusammenhänge von Struktur und Funktion der DXS von *E. coli* als erstem Vertreter einer neuen Familie von ThDP-Enzymen. Weiterhin sollte die Einsatzmöglichkeit des Enzyms in chemo-enzymatischen Synthesen analysiert werden, da sich andere Enzyme, die ThDP als Kofaktor aufweisen, als vielseitige Werkzeuge in der organischen Synthese von chiralen Bausteinen und Naturstoffen erwiesen.

1. Die DXS wurde mit einer Ausbeute von über 80% als Fusionsprotein mit carboxyterminalem His-tag mittels Ni^{2+}-Affinitätschromatographie in einem Schritt bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Enzym wies ein breites pH-Spektrum von 5,5 bis 10,5 und eine Halbwertszeit in Hepes-Puffer von über 47 Tagen bei 4°C auf. Die in einem Ping-Pong-Mechanismus reagierende DXS hat eine hohe Affinität zu ihren Kofaktoren ThDP (K_M = 0,3 µM) und Mg^{2+} (K_M < 10 µM). Die Reaktion der physiologischen Substrate Pyruvat und D-GAP wird von der DXS mit 4,3 U/mg Protein und K_M-Werten von 0,10 bzw. 0,44 mM katalysiert.

2. Das Enzym konnte zur Racematspaltung von D,L-Glycerinaldehyd verwendet werden, da es alleine die D-Form mit einer spezifischen Aktivität von 4,3 U/mg und einem K_M-Wert von 10,4 mM umsetzt. Hydroxypyruvat und α-Ketobutyrat sind mit K_i-Werten von 2,4 mM bzw. 6,5 mM sowohl kompetitive Inhibitoren als auch alternative Donorsubstrate zu Pyruvat, die mit 0,3 U/mg bzw. 0,1 U/mg umgesetzt werden. Als alternative Akzeptorsubstrate werden kurze Aldehyde und Aldosen von C_2-C_5 wie Glykolaldehyd und D-Erythrose-4-Phosphat akzeptiert und mit Hydroxypyruvat als Donorsubstrat mit hohen Raten von 71% bzw. 84% verglichen mit D-Glycerinaldehyd umgesetzt. Mit der DXS konnte Pyruvat und D-Ribose-5-Phosphat vollständig zu 1-Desoxy-D-sedoheptulose-7-Phosphat umgesetzt werden. In einer gekoppelten enzymatischen Synthese mit der DXS und Saccharose Synthase aus *Solanum tuberosum* wurde ein Disaccharid aus Glukose und 1-Desoxy-D-xylulose dargestellt.

3. Das *dxs*-Gen aus *Zymomonas mobilis* wurde kloniert und vollständig doppelsträngig sequenziert. Die *Z. mobilis*-DXS wurde ebenso wie die DXS von *Thermotoga maritima* in enzymatisch aktiver Form in *E. coli* heterolog exprimiert.

4. Die DXS von *E. coli* bildet ein Homodimer von 142 kDa und weist in seinem Domänenaufbau sowie bei der Substratbindung Ähnlichkeiten mit Transketolasen auf. Durch Sequenzvergleiche und Modellierungen wurde ein Substratkanal-Modell für die DXS erstellt und durch ortsgerichtete Mutagenese überprüft. Glu370 ist für die Aktivierung von ThDP und Phe107 für die Donorsubstrat-Bindung verantwortlich. Die Histidinreste 49 und 257 sind an der Katalyse beteiligt, während Asp427 wahrscheinlich mit dem C2-OH des Akzeptorsubstrats interagiert. Arg478 komplexiert die Phosphatgruppe des Akzeptorsubstrats. Mit dem Arg478Gln-Mutein konnten unphosphorylierte Substrate effizienter umgesetzt werden als mit Wildtyp-DXS.

VI Literatur

Altincicek, B., Hintz, M., Sanderbrand, S., Wiesner, J., Beck. E. & Jomaa, H. (2000). Tools for the discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 329-333

Araki, N., Kusumi, K., Masamoto, K., Niwa, Y. & Iba, K. (2000). Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiol. Plant.* **108:** 19-24

Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. & Jordan, F. (1996). Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2,3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **256:** 590-600

Bergfors, T.M. (1998). Protein crystallization: Techniques, strategies and tips. A laboratory manual. 1st Edition, IUL Biotechnologies Series, USA

Beytía, E.D. & Porter, J.W. (1976). Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **45:** 113-142

Bisswanger, H. (2000). Enzymkinetik Theorie und Methoden. 3. Ausgabe WILEY-VCH, Weinheim

Bloch, K. (1992). Sterol molecule: Structure, biosynthesis, and function. *Steroids* **57:** 378-383

Bolte, J., Demuynck, C. & Samaki, H. (1987) Utilization of enzymes in organic chemistry: transketolase catalysed synthesis of ketoses. *Tetrahedron Lett.* **28:** 5525-5528

Bornemann, S., Crout, D.H.G., Dalton, H., Kren, V., Lobell, M., Dean, G., Thomson, N. & Turner, M.M. (1996). Stereospecific formation of R-aromatic acyloins by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **I:** 425-430

Boucher, Y. & Doolittle, W.F. (2000). The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol. Microbiol.* **37 (4):** 703-716

Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R.A. & Camara, B. (1998). Dedicated role of plastid transketolases during early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant. Physiol.* **117:** 1423-1431

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

Brennan , T.V. & Clarke, S. (1993). Spontaneous degradation of aspartyl and asparaginyl residues: Effects of the solvent dielectric. *Protein Science* **2:** 331-338

Breslow, R. (1958). On the mechanism of thiamin action. IV. Evidence from studies on model systems. *J. Amer. Chem. Soc.* **80:** 3719-3726

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

Bringer, S., Finn, K. & Sahm, H. (1984). Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* **159:** 197-199

Bringer-Meyer, S., Schimz, K.-L. & Sahm, H. (1986). Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. *Arch. Microbiol.* **146:** 105-110

Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (1986). Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biocatalysis* **1:** 321-331

Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal. Biochem.* **112:** 195-203

Cacciapuoti, G., Fusco, S., Caiazzo, N., Zappia, V. & Porcelli, M. (1999). Heterologous expression of 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Characterization of the recombinant protein and involvement of disulfide bonds in thermophilicity and thermostability. *Protein Expression Purif.* **16:** 125-135

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

Candy, J.M., Koga, J., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G. (1996). The role of residues glutamate-50 and phenylalanine-496 in *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* **315:** 745-751

Chang, Y.-Y. & Cronan, J.E. Jr (2000). Conversion of *Escherichia coli* pyruvate oxidase to an 'α-ketobutyrate oxidase'. *Biochem. J.* **352:** 717-724

Dalmas, V. & Demuynck, C. (1993). Study of the specificity of a spinach transketolase on achiral substrates. *Tetrahedron Asymm.* **4:** 2383-2388

Datta, A.G. & Racker, E. (1961). Mechanism of transketolase. I. Properties of the crystalline yeast enzyme. *J. Biol. Chem.* **236:** 617-623

David, S., Estramareix, B., Fischer, J.-C. & Thérisod, M. (1982). The biosynthesis of thiamin. Synthesis [1,1,1,5-$^2H_4$]-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

Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olson, G.J. & Swanson, R.V. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus. Nature* **392 (6674):** 353-358

Demuynck, C., Bolte, J., Hecquet, L. & Dalmas, V. (1991). Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates: synthetic potential of transketolase. *Tetrahedron Lett.* **32:** 5085-5088

Dobritzsch, D., König, S., Schneider, G. & Lu, G. (1998). High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*: Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J. Biol. Chem.* **273 (32):** 20196-20204

Draths, K.M., Pompliano, D.L., Conley, D.L., Frost, J.W., Berry, A., Disbrow, G.L., Staversky, R.J. & Lievense, J.C. (1992). Biocatalytic synthesis of aromatics from D-Glucose: the role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* **114:** 3956-3962

Drueckhammer, D.G., Hennen, W.J., Pederson, R.L., Barbas, C.F., Gautheron, C.M., Krach, T. & Wong, C.-H. (1991). Enzyme catalysis in synthetic carbohydrate chemistry. *Synthesis* 499-525

Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M. , Farrenkopf, B. & Jordan, F. (1993). Catalytic centres in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution. *Biochemsitry* **32:** 6165-6170

Effenberger, F. & Null, V. (1992). Enzym-katalysierte Reaktionen 13: Eine neue, effiziente Synthese von Fagomin. *Liebigs Ann. Chem.*, 1211-1212

Effenberger, F., Null, V. & Ziegler, T. (1992). Enzyme-catalysed reactions 12: Preparation of optically pure L-2-hydroxyaldehydes with yeast transketolase. *Tetrahedron Lett.* **33:** 5157-5160

Eisenreich, W., Menhard, B., Hylands, P.J., Zenk, M.H. & Bacher, A. (1996). Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:** 6431-6436

Fang, R., Nixon, P.F. & Duggleby, R.G. (1998). Identification of the catalytic glutamate in the E1 component of human pyruvate dehydrogenase. *FEBS Letters* **437:** 273-277

Feurle, J., Jomaa, H., Wilhelm, M.,Gutsche, B. & Herderich, M. (1998). Analysis of phosphorylated carbohydrates by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry utilising a β-cyclodextrin bonded stationary phase. *J. Chromatogr. A* **803:** 111-119

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C.A., Gocayne, J.D., Scott, J.D., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen,

D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. & Venter, J.C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269 (5223)**: 496-512

Flourney, D.S. & Frey, P.A. (1989). Inactivation of pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* by fluoropyruvate. *Biochemistry* **28:** 9594-9602

Fujisaki, S., Hara, 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 (6):** 995-1000

Funganti, C., Grasselli, P., Poli, G., Servi, S. & Zorzella, A. (1988). Decarboxylative incorporation of α-oxobutyrate and α-oxovalerate into (*R*)-α-hydroxyethyl- and n-propyl ketones on reaction with aromatic and α,β-unsaturated aldehydes in baker's yeast. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988:** 1619-1621

Grolle, S., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (2000). Isolation of the *dxr* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *FEMS Microbiol. Letters* **191:** 131-137

Grolle, S. (2000). Untersuchungen zu einem neuen Isopentenyldiphosphat-Biosyntheseweg in *Escherichia coli* und *Zymomonas mobilis*: Identifizierung und Charakterisierung beteiligter Gene. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jül-3799

Hahn. F.M., Eubanks, L.M., Testa, C.A., Blagg, B.S.J., Baker, J.A. & Poulter, C.D. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus. J. Bacteriol.* **183 (1):** 1-11

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

Hanc, O. & Kakac, B. (1956). Hefecarboxylase und die Bildung von Phenylacetylcarbinol. *Naturwissenschaften* **43:** 498

Hawkins, C.F., Borges, A. & Perham, R.N. (1989). A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* **255:** 77-82

Hecquet, L., Lemaire, M., Bolte, L. & Demuynck, C. (1994). Chemo-enzymatic synthesis of precursors of fagomine and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinose. *Tetrahedron Lett.* **35:** 8791-8794

Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L.A., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleischmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C. & Fraser, C.M. (2000). DNA sequence

of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406 (6795):** 477-483

Heinrich, P.C., Steffen, H., Janser, P. & Wiss, O. (1972) Studies on the reconstitution of apotransketolase with thiamin pyrophosphate and analogs of the coenzmye. *Eur. J. Biochem.* **30:** 533-541

Hildebrandt, G. & Klavehn, W. (1932). Deutsches Patent 548 459

Hill, R.E., Sayer, B.G. & Spenser, I.D. (1989). Biosynthesis of vitamin B_6: Incorporation of D-1-deoxyxylulose. *J. Am. Chem. Soc.* **111:** 1916-1917

Hill, C.M., Pang, S.S. & Duggleby, R.G. (1997). Purification of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and reconstitution of active enzyme from its individual pure subunits. *Biochem J.* **327:** 891-898

Hobbs, G.R., Lilly, M.D., Turner, N.J., Ward, J.M. & Woodley, J.M. (1994). Development of transketolase as a catalyst for carbon-carbon bond formation. *ECB6*: proceedings of the 6th European congress on biotechnology, pp 463-466

Hochuli, E. (1990). Purification of recombinant proteins with metal chelate absorbants. In *Genetic engineering: Principles and methods* **12:** 87-98

Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A. (1987). New metal chelate absorbents selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411:** 177-184

Hopper, D.J. & Cooper, R.A. (1972). The purification and properties of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase. *Biochem. J.* **128:** 321-329

Horton, R.M. (1997) in Bruce, A.W. (ed.), *Methods in Molecular Biology,* vol. 67: PCR Cloning Protocols. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 141-149

Iding, H., Siegert, P., Mesch, K. & Pohl, M. (1998). Application of α-keto acid decarboxylases in biotransformations. *Biochim. Biophys. Acta* **1385:** 307-322

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

Kaneko, T. (2000) Unveröffentlicht. Accession Number NP_107784.

Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberger-Jabs, M., Wikner, C., Schneider, G. & Hübner, G. (1997). How thiamin diphosphate is activated in enzymes. *Science* **275:** 67-70

Killenberger-Jabs, M., König, S., Eberhardt, I., Hohmann, S. & Hübner, G. (1997) Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **36:** 1900-1905

Klein, H. & Brand, K. (1997). Reinigung und Eigenschaften der Transketolase aus *Candida utilis*. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **358:** 1325-1337

Kobori, Y., Myles, D.C. & Whitesides, G.M. (1992). Substrate specificity and carbohydrate synthesis using transketolase. *J. Org. Chem.* **57:** 5899-5907

Kochetov, G.A., Izotova, A.E. & Meshalkina, L.E. (1971). Inhibition of transketolase by analogues of the coenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43:** 1198-1203

Koeller, K.M. & Wong C.-H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature* **409:** 232-240

Kovina, M.V., Selivanov, V.A., Kochevova & Kochetov, G.A. (1997) Kinetic mechanism of active site non-equivalence in transketolase. *FEBS Lett.* **418:** 11-14

Kovina, M.V. & Kochetov, G.A. (1998) Cooperativity and flexibility of active sites in homodimeric transketolase. *FEBS Lett.* **440:** 81-84

Kuhn, E. & Brand, K. (1973). Computer analysis of the two-substrate reaction catalyzed by yeast and bovine transaldolase. *Biochemistry* **12:** 5217-5223

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., et al., Zumstein, E., Yoshikawa, H. & Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390 (6657):** 249-256

Kuzuyama, T., Takahashi, S., Watanabe, H. & Seto, H. (2000). Direct formation of 2-*C*-methyl-D-erythrol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **39:** 4509-4512

Kuzuyama, T., Takagi, M., Takahashi, S. & Seto, H. (2000). Cloning and Characterization of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-phosphate Synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, Which Uses both the Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182:** 891-897

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

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

Lange, B.M. & Croteau, R. (1999). 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 (1):** 170-174

Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W. & Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97:** 13172-13177

LaRossa, R.A. & Schloss, J.V. (1984). The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **259 (14):** 8753-8757

Lebbink, J.H., Eggen, R.I., Geerling, A.C., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Scandurra, R. & de Vos, W.M. (1995). Exchange of domains of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and the mesophilic bacterium *Clostridium officile*: Effects on catalysis, thermoactivity and stability. *Protein Eng.* **8:** 1287-1294

Lee, J.S., Jin, S.J., Kang, H.L. & Kang, H.S. (1998). Sequence analysis of 67E10 cosmid clone of *Zymomonas mobilis* ZM4, unveröffentlicht. Accession Nr. AF086791

Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. & Sundström, M. (1992). Three-dimensional structure of transketolase, a thiamin dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* **11 (7):** 2373-2379

Lindstad, R.I., Köll, P. & McKinley-McKee, J.S. (1998). Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.* **330:** 479-487

Littlechild, J., Turner, N.J., Hobbs, G.R., Lilly, M.D., Rawas, A. & Watson, H. (1995). Crystallization and X-ray crystallographic data with *Escherichia coli* transketolase. *Acta Cryst.* **51:** 1074-1076

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

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

Machajewski, T.D. & Wong, C.H. (2000). Die katalysierte asymmetrische Aldolreaktion. *Angew. Chem.* **112:** 1406-1430

Mandel, M.A., Feldmann, K.A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M. & Leon, P. (1996). CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* **9 (5):** 649-658

Mattevi, A., de Kok, A. & Perham, R.N. (1992). The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2:** 877-887

Mitraki, A. & King, J. (1989). Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Biotechnology* **7:** 690-697

McAllister, W.T. & Wu, H.-L. (1978). Regulation of transcription of the late genes of bacteriophage T7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75:** 804-808

McAllister, W.T., Morris, C., Rosenberg, A.H. & Studier, F.W. (1981). Utilization of bacteriophage T7 late promotors in recombinant plasmids during infection. *J. Mol. Biol.* **153:** 527-544

Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H. & Bukau, B. (1999). Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18:** 6934-6949

Morris, K.G., Smith, E.B., Turner, N.J., Lilly, M.D., Mitra, R.K. & Woodley, J.M. (1996). Transketolase from *Escherichia coli*: A practical procedure for using the biocatalyst for asymmetric carbon-carbon bond synthesis. *Tetrahedr. Asymm.* **7:** 2185-2188

Miller, B., Heuser, T. & Zimmer, W. (2000). Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **481:** 221-226

Mueller, C., Schwender, J., Zeidler, J. & Lichtenthaler, H.K. (2000). Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway to isoprenoid biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **28:** 792-793

Muller, Y.A. & Schulz, G.E. (1993). Structure of the Thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* **259:** 965-967

Muller, Y.A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G.E., Jordan, F. & Schneider, G. (1993). A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* **1:** 95-103

Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155:** 335-350

Myles, D.C., Andrulis III, P.J. & Whitesides, G.M. (1991). A transketolase-based synthesis of (+)-*exo*-brevicomin. *Tetrahedr. Lett.* **32:** 4835-4838

Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C. and Fraser, C.M (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399:** 323-329

Nikkola, M., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1994). Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **238:** 387-404

Nilsson, U., Meshalkina, L., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1997). Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **272 (3):** 1864-1869

Nilsson, U., Hecquet, L., Gefflaut, T., Guerard, C. & Schneider, G. (1998). Asp^{477} is a determinant of the enantioselectivity in yeast transketolase. *FEBS Letters* **424:** 49-52

Oh, M.-K. & Liao, J.C. (2000a). Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **16:** 278-286

Oh, M.-K. & Liao, J.C. (2000b). DNA microarray detection of metabolic responses to protein overproduction in *Escherichia coli*. *Metabol. Eng.* **2:** 201-209

Ostermeyer, M., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. (1999). A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnol.* **17:** 1205-1209

Pittard, A.J. (1996). Biosynthesis of the aromatic amino acids. In: Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikopf, Riley, M., Schlaechter, M. & Umbarger, H.E. (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd ed., Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington DC, pp 458-484

Pletcher, J. & Sax, M. (1972). Crystal and molecular structure of thiamine pyrophosphate hydrochloride. *J. Amer. Chem. Soc.* **94:** 3998-4005

Pohl, M. (1997). Protein design on pyruvate decarboyxlase (PDC) by site-directed mutagenesis. Application to mechanistical investigations, and tailoring PDC for the use in organic synthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **58:** 16-43

Reed, L.J. & Hackert, M.L. (1990). Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **265:** 8971-8974

Reynen, M. & Sahm, H. (1988). Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains. *J. Bacteriol.* **170:** 3310-3313

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. *J. Am. Chem. Soc.* **118 (11):** 2564-2566

Rose, M. (1996). Unveröffentlicht. Accession Number 1405446.

Sanyal, I., Lee, S.-L. & Flint, D.H. (1994). Biosynthesis of pimeloyl-CoA, a biotin precursor

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold spring Harbor Laboratory Press, New York

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

Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409:** 258-268

Schneider, G. & Lindqvist, Y. (1998). Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1385:** 387-398

Schörken, U. (1997). Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Transketolase und Transaldolase, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus *Escherichia coli.* Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jül-3418

Schörken, U. & Sprenger, G.A. (1998). Thiamin-diphosphate enzymes as catalysts in chemoenzymatic synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1385:** 229-243

Schürmann, M. & Sprenger, G.A. (2001). Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J. Biol. Chem.* **276 (14):** 11055-11061

Schwender, J., Seeman, M., Lichtenthaler, H.K. & Rohmer, M. (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side chains of chlororphylls 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., 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

Seckler, R. & Jaenicke, R. (1992). Protein folding and protein refolding. *FASEB J.* **6:** 2545-2552

Shigi, Y. (1989). Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. *J. Antimicrobial Chemotherapy* **34:** 131-145

Sprenger, G.A. (1993). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K-12 transketolase (*tkt*) gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1216:** 307-310

Sprenger, G.A., Schörken, U., Sprenger, G. & Sahm, H. (1995a). Transketolase A of *Escherichia coli* K-12: Purification and properties of the enzyme from recombinant strains. *Eur. J. Biochem.* **230:** 525-532

Sprenger, G.A., Schörken, U., Sprenger, G. & Sahm, H. (1995b). Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: Cloning of its gene *talB*, and characterization of the enzyme from recombinant strains. *J. Bacteriol.* **177 (20):** 5930-5936 .

Sprenger, G.A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, 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-phophate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94:** 12857-12862

Sprenger, G.A. & Pohl, M. (1999). Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **6:** 145-159

Srere, P.A., Cooper, J.R., Tabachnik, M. & Racker, E. (1958). The oxidation pentose Phosphate cycle. I: Preparation of substrates and enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **74:** 295-305

Sundström, M., Lindqvist, Y., Schneider, G., Hellmann, U. & Ronne, H (1993). Yeast *TKL1* gene encodes a transketolase that is required for efficient glycolysis and biosynthesis of aromatic amino acids. *J. Biol. Chem.* **268:** 24346-24352

Swings, J. & DeLey, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95:** 9879-9884

Takayama, S., McGarvey, G.J. & Wong, C.H. (1997). Microbial aldolases and transketolases: New biocatalytic approaches to simple and complex sugars. *Annu. Rev. Microbiol.* **51:** 285-310

Thomas, G., Diefenbach, R.J. & Duggleby, R.G. (1990). Inactivation of pyruvate decarboxylase by 3-hydroxypyruvate. *Biochem. J.* **266 (1):** 305-308

Turner, N.J. (2000). Applications of transketolases in organic synthesis. *Curr. Opin. Biotech.* **11:** 527-531

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

Urban, A., Neukirchen, S. & Jaeger, K.E. (1997). A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nuc. Acids Res.* **25 (11):** 2227-2228

Vieille, C. & Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65 (1):** 1-43

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

Walsh, C. (2001). Enabling the chemistry of life. *Nature* **409:** 226-231

Weber, K. & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **224:** 4406-4412

Wikner, C., Meshalkina, L., Nilsson, U., Nikkola, M., Lindqvist, Y., Sundström, M. & Schneider, G. (1994). Analysis of an invariant cofactor-protein interaction in thiamin diphosphate-dependent enzymes by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269:** 32144-32150

Wikner, C. Meshalkina, L., Nilsson, U., Bäckström, S., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1995). His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur. J. Biochem.* **233:** 750-755

Wikner, C., Nilsson, U., Meshalkina, L., Udekwu, C., Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1997). Identification of catalytically important residues in yeast transketolase. *Biochemistry* **36:** 15643-15649

Wilcocks, R., Ward, O.P., Collins, S., Dewdney, N.J., Hong, Y. & Prosen, E. (1992). Acyloin formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58 (5):** 1699-1704

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

Wood, T. (1985). The pentose phosphate pathway. Academic Press, Orlando, USA.

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:**103-109

Yokota, A. & Sasajima, K.-i. (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

Yokota, A. & Sasajima, K.-i. (1986). Formation of 1-deoxy-ketoses by pyruvate dehydrogenase and acetoin dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* **50 (10):** 2517-2524

Ziegler, T., Straub, A. & Effenberger, F. (1988). Enzym-katalysierte Synthese von 1-Desoxymannojrimycin und 1,4-Didesoxy-1,4-imino-D-arabinitol. *Angew. Chem.* **100:** 737-738

Zimmermann, F.T., Schneider, A., Schörken, U., Sprenger, G.A. & Fessner, W.-D. (1999). Efficient multi-enzymatic synthesis of D-xylulose 5-phosphate. *Tetrahedron: Asymmetry* **10:** 1643-1646

VII Anhang

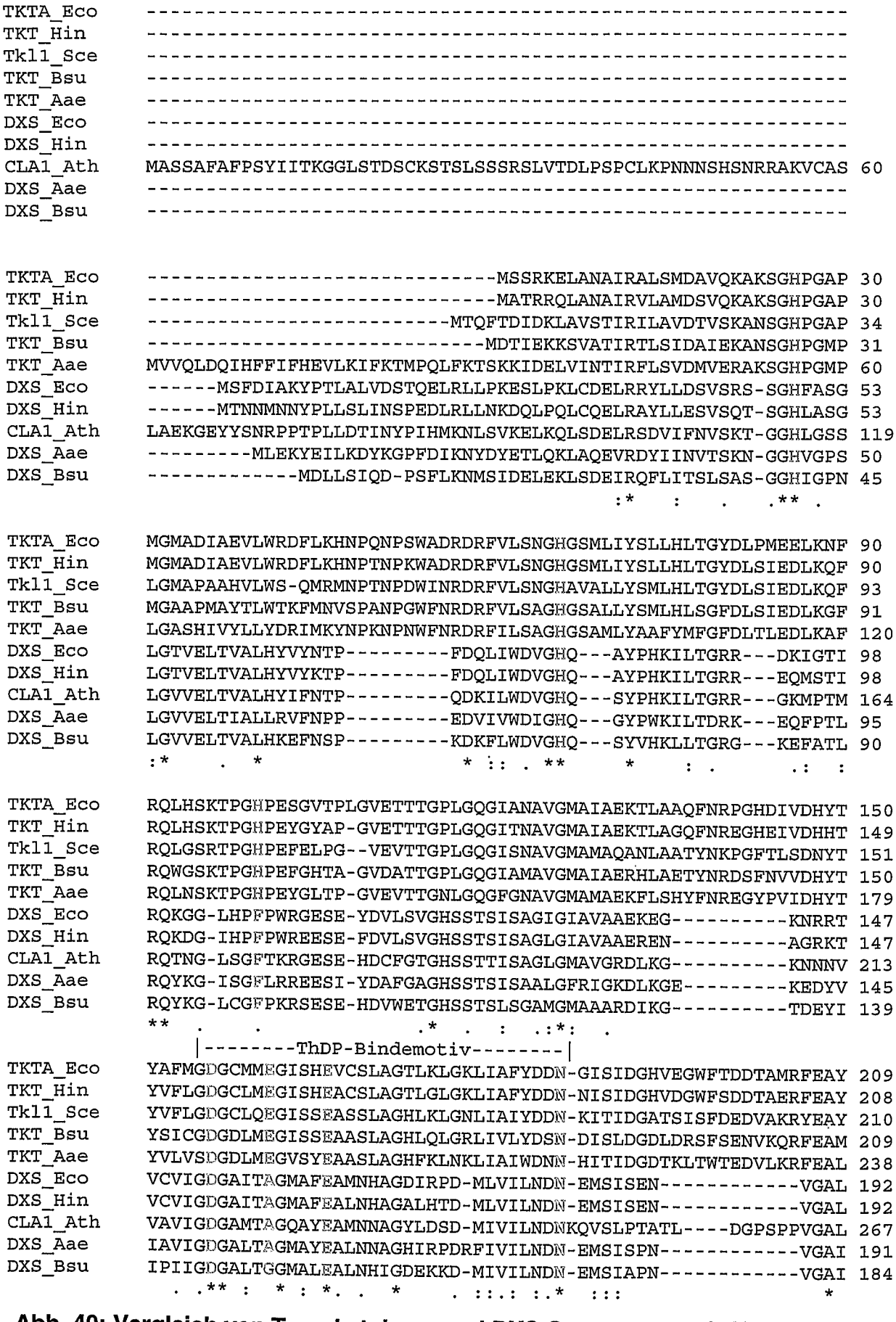


Abb. 40: Vergleich von Transketolase- und DXS-Sequenzen. vgl. Abb. 31.

```
TKTA_Eco    GWHVIRDIDG-HDAASIKRAVEEARAVTDKPSLLMCKTIIGFGSPNKAGTHDSHGAPLGD 268
TKT_Hin     GWQVIRNVDG-HDAEQIRAATILAQAEKGKPTLIICKTIIGFGSPNKSGSHDSHGAPLGD 267
Tkl1_Sce    GWEVLYVENGNEDLAGIAKAIAQAKLSKDKPTLIKMTTTIGYGS-LHAGSHSVHGAPLKA 269
TKT_Bsu     NWEVLYVEDG-NNIEELTAAIEKARQNEKKPTLIEVKTTIGFGSPNRAGTSGVHGAPLGK 268
TKT_Aae     GWEVYHLEDG-YNLDLLEETILKAK-ESDKPTFISVRTHIGYGTPLQDTP-EVHGKPMGK 295
DXS_Eco     NNHLAQLLSG-KLYSSLREGGKKVFSGVP-PIKELLK-----------RTEEHIKGMVV 238
DXS_Hin     NNHLARIFSG-SLYSTLRDGSKKILDKVP-PIKNFMK-----------KTEEHMKGVMF 238
CLA1_Ath    SSALSRLQSN-PALRELREVAKGMTKQIGGPMHQLAA-----------KVDVYARGMIS 314
DXS_Aae     STYLNRIISG-HFVQETRQKIKNFLQHFGETPLRIMK-----------LTEEFLKGLIS 238
DXS_Bsu     HSMLGRLRTA-GKYQWVKDELEYLFKKIPAVGGKLAATAE---------RVKDSLKYMLV 234
                  :                                                 :

                                                          PP-Domäne ↔ Pyr-Domäne
TKTA_Eco    AEIALTREQLGWKYAP-FEIPSEIYAQWDAK--EAGQAKESAWNEKFAAYAKAYPQEAAE 325
TKT_Hin     EEIDLTRKALGWEYAP-FEIPAEYYAEWSAK--EKGAAAEKSWEEKFAAYAKAYPELAAE 324
Tkl1_Sce    DDVKQLKSKFGFNPDKSFVVPQEVYDHYQKTILKPGVEANNKWNKLFSEYQKKFPELGAE 329
TKT_Bsu     EESKLTKEAYAWTYEEDFYVPSEVYEHFAVAVKESGEKKEQEWNAQFAKYKEVYPELAEQ 328
TKT_Aae     EIVEETKKKFGWPLEE-FYVPEEALN-YTRRKVEEGKALEEEWNKLYAEYREKYPDLAQT 353
DXS_Eco     P--GTLFEELGFNYIGPVDGHDVLGLITTLKNMRDLK--GPQFLHIMTKKGRGYEPAEKD 294
DXS_Hin     SPESTLFEELGFNYIGPVDGHNIDELVATLTNMRNLK--GPQFLHIKTKKGKGYAPAEKD 296
CLA1_Ath    GTGSSLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRTTGPVLIHVVTEKGRGYPYAERA 374
DXS_Aae     P--GVIFEELGFNYIGPIDGHDIKALEDTLNNVKDIK--GPVLLHVYTKKGKGYKPAEEN 294
DXS_Bsu     S--GMFFEELGFTYLGPVDGHSYHELIENLQYAKKTK--GPVLLHVITKKGKGYKPAETD 290
                  .  .     .                .          :   . :

TKTA_Eco    FTRRMKGEMPSDFDAKAKEFIAKLQANPAKIASRKASQNAIEAFGPLLPEFLGGSADLAP 385
TKT_Hin     FKRRVSGELPTNWAAESKAFIEKLQANPASIASRKASQNAIEAYAHVLPEFLGGSADLAS 384
Tkl1_Sce    LARRLSGQLPANWESKLPTYTAKDS----AVATRKLSETVLEDVYNQLPELIGGSADLTP 385
TKT_Bsu     LELAIKGELPKDWDQEVPVY-EKGS----SLASRASSGEVLNGLAKKIPFFVGGSADLAG 383
TKT_Aae     LEKALNKEWSLDWLEKVEEFKED-------MPTRKASGKVLNVMADYIPTMIGGSADLSE 406
DXS_Eco     PIT-FHAVPKFDPSSGCLPKSSGG-----LPSYSKIFGDWLCETAAKDNKLMAITPAMRE 348
DXS_Hin     PIG-FHGVPKFDPISGELPKNNS------KPTYSKIFGDWLCEMAEKDAKIIGITPAMRE 349
CLA1_Ath    DDK-YHGVVKFDPATGRQFKTTNE-----TQSYTTYFAEALVAEAEVDKDVVAIHAAMGG 428
DXS_Aae     PVK-WHGVAPYKVESGEIIKKSS -----PPTWTSVFGKALVELAERDEKIVAITPAMRE 347
DXS_Bsu     TIGTWHGTGPYKINTGDFVKPKAA-----APSWSGLVSGTVQRMAREDGRIVAITPAMPV 345
                        .                .          :         .:.  . :

TKTA_Eco    SNLTLWSGSKAIN------EDAAGNYIHYGVREFGMTAIANGISLHGG-FLPYTSTFLMF 438
TKT_Hin     SNLTLWSGSKPIRAH----ENVGGNYINYGVREFGMSAIMNGIALHGG-FIPYGATFLMF 439
Tkl1_Sce    SNLTRWKEALDFQPPSSGSGNYSGRYIRYGIREHAMGAIMNGISAFGANYKPYGGTFLNF 445
TKT_Bsu     SNKTTIKNAGDFTA-----VDYSGKNFWFGVREFAMGAALNGMALHGG-LRVFGGTFFVF 437
TKT_Aae     SVNTVLKKYGDFEA-----DTPTGRNVHYGVREHAMGTILNGMAYHGG-ILPYGGTFLIF 460
DXS_Eco     G----S-GMVEFSR------KFPDRYFDVAIAEQHAVTFAAGLAIGGY--KPIVAIYSTF 395
DXS_Hin     G----S-GMVEFSQ------RFPKQYFDVAIAEQHAVTFATGLAIGGY--KPVVAIYSTF 396
CLA1_Ath    G----T-GLNLFQR------RFPTRCFDVGIAEQHAVTFAAGLACEGL--KPFCAIYSSF 475
DXS_Aae     G----S-GLVEFAK------RFPDRFFDVGIAEQHACTFAAGLAAEGL--RPVAAYYSTF 394
DXS_Bsu     G----S-KLEGFAK------EFPDRMFDVGIAEQHAATMAAAMAMQGM--KPFLAIYSTF 392
            .          :             . .  .: *    :   .::  *       . :  *

TKTA_Eco    VEYARNAVRMAALMKQRQVMVYTHDSIGLGEDGPTHQPVEQVASLRVTPNMSTWRPCDQV 498
TKT_Hin     YEYAHNAVRMAALMKQRTLFVYTHDSIGLGEDGPTHQPVEQTASLRLIPNLETWRPCDQV 499
Tkl1_Sce    VSYAAGAVRLSALSGHPVIWVATHDSIGVGEDGPTHQPIETLAHFRSLPNIQVWRPADGN 505
TKT_Bsu     SDYLRPAIRLAALMGLPVTYVFTHDSIAVGEDGPTHEPVEQLASLRAMPNLSLIRPADGN 497
TKT_Aae     SEYMRPAIRTAALANLQVIFVYSHDSIGLGEDGPTHQPVEQLWSLRSIPNLWVVRPADAN 520
DXS_Eco     LQRAYDQVLHDVAIQKLPVLFAIDRAGIVGADGQTHQGAFDLSYLRCIPEMVIMTPSDEN 455
DXS_Hin     LQRAYDQLIHDVAIQNLPVLFAIDRAGIVGADGATHQGAFDISFMRCIPNMIIMTPSDEN 456
CLA1_Ath    MQRAYDQVVHDVDLQKLPVRFAMDRAGLVGADGPTHCGAFDVTFMACLPNMIVMAPSDEA 535
DXS_Aae     LQRAYDQVIHDVALQNLPVTFAIDRAGLVGDDGPTHHGVFDLSYLRCVPNMVVCAPKDEQ 454
DXS_Bsu     LQRAYDQVVHDICRQNANVFIGIDRAGLVGADGETHQGVFDIAFMRHIPNMVLMMPKDEN 452
              .     :             .  . :  :* ** **        :   *::    * *
```

Abb. 40 (ff): Vergleich von Transketolase- und DXS-Sequenzen. vgl. Abb. 31.

```
                                        Pyr-Domäne ↔ C-Domäne
TKTA_Eco    ESAVAWKYGVERQDGPTALILSRQNLAQQERT-EEQLANIARGGYVLKDCAGQ-PELIFI 556
TKT_Hin     ESAIAWQQAVERQDGPSALIFTRQNLAQMDRT-SAQLDAVKRGAYVLKDCDGT-PELIFI 557
Tkl1_Sce    EVSAAYKNSLESKHTPSIIALSRQNLPQLE---GSSIESASKGGYVLQDVAN--PDIILV 560
TKT_Bsu     ETAAAWKLAVQSTDHPTALVLTRQNLPTIDQTSEEALAGVEKGAYVVSKSKNETPDALLI 557
TKT_Aae     EVKYAWEIALKRKNGPTAIILTRQKVKTIDRSKYASPEGVRKGAYVIADTEGK-PDVVII 579
DXS_Eco     ECRQMLYTGYHYNDGPSAVRYPRGNAVGVELTPLEK---LPIGKGIVKRRGEK---LAIL 509
DXS_Hin     ECRQMLYTGYQCG-KPAAVRYPRGNAVGVKLTPLEM---LPIGKSRLIRKGQK---IAIL 509
CLA1_Ath    DLFNMVATAVAIDDRPSCFRYPRGNGIGVALPPGNKGVPIEIGKGRILKEGER---VALL 592
DXS_Aae     ELRDLLYTGIYSG-KPFALRYPRGAAYGVPTEGFKK---IEIGTWEELLEGED---CVIL 507
DXS_Bsu     EGQHMVHTALSYDEGPIAMRFPRGNGLGVKMDEQLKT--IPIGTWEVLRPGND---AVIL 507
            :       .       *  .  .*                    *                ::

TKTA_Eco    ATGSEVELAVAAYEKLTAEGVKARVVSMSSTDAFDKQDA-AYRESVLPKAVTARVAVEAG 615
TKT_Hin     ATGSEVELAVQAAEALSAEGKKVRVVSMPSTNRFDKQDA-AYRESVLPAAVTKRVAIEAG 616
Tkl1_Sce    ATGSEVSLSVEAAKTLAAKNIKARVVSLPDFFTFDKQPL-EYRLSVLPDNVP-IMSVEVL 618
TKT_Bsu     ASGSEVGLAIEAQAELAKENIDVSVVSMPSMDRFEKQSD-EYKNEVLPADVKKRLAIEMG 616
TKT_Aae     ATGSEVQVALGAKEILEQKGIKTRVVNMACCELFEEQPE-EYKREVLPPEVTKRVAVEAG 638
DXS_Eco     NFG----TLMPEAAKVAES-LNATLVDMRFVKPLDEALILEMAASHEALVTVEENAIMGG 564
DXS_Hin     NFG----TLLPSALELSEK-LNATVVDMRFVKPIDIEMINVLAQTHDYLVTLEENAIQGG 564
CLA1_Ath    GYGSAVQSCLGAAVMLEERGLNVTVADARFCKPLDRALIRSLAKSHEVLITVEEGSIGG- 651
DXS_Aae     AVGYPVYQALRAAEKLYKEGIRVGVVNARFVKPMDEKMLRDLANRYDTFITVEDNTVVGG 567
DXS_Bsu     TFGTTIEMAIEAAEELQKEGLSVRVVNARFIKPIDEKMMKSILKEGLPILTIEEAVLEGG 567
              *      :      :       . :..      ::                .      :

TKTA_Eco    IADYWYKYVGLNGAIVGMTTFG---------ESAPAELLFEEFGFTVDNVVAKAKELL-- 664
TKT_Hin     IADFWYKYVGFNGRVIGMNSFG---------ESAPADQLFKLFGFTVENVVAKAKEIL-- 665
Tkl1_Sce    ATTCWGKYAHQS---FGIDRFG---------ASGKAPEVFKFFGFTPEGVAERAQKTIAF 666
TKT_Bsu     SSFGWGKYTGLEGDVLGIDRFG---------ASAPGETIINEYGFSVPNVVNRVKALINK 667
TKT_Aae     RDTGWYKYVGSDGLVISLNEFG---------KSAPGSVLFEYYGFTPENVANKVIEKWFS 689
DXS_Eco     AGSGVNEVLMAHRKPVPVLNIG---LPDFFIPQGTQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA- 620
DXS_Hin     AGSAVAEVLNSSGKSTALLQLG---LPDYFIPQATQQEALADLGLDTKGIEEKILNFIAK 621
CLA1_Ath    FGSHVVQFLALDGLLDGKLKWRPMVLPDRYIDHGAPADQLAEAGLMPSHIAATALNLIGA 711
DXS_Aae     FGSGVLEFFAREGIMKRVINLG---VPDRFIEHGKQDILRNLVGIDAEGIEKAVRDALKG 624
DXS_Bsu     FGSSILEFAHDQGEYHTPIDRMG--IPDRFIEHGSVTALLEEIGLTKQQVANRIRLLMPP 625
                  :                                .         *:    :

TKTA_Eco    --------------
TKT_Hin     --------------
Tkl1_Sce    YKGDKLISPLKKAF 680
TKT_Bsu     --------------
TKT_Aae     --------------
DXS_Eco     --------------
DXS_Hin     QGNL---------- 625
CLA1_Ath    PREALF-------- 717
DXS_Aae     GRLI---------- 628
DXS_Bsu     KTHKGIGS------ 633
```

Abb. 40 (ff): Vergleich von Transketolase- und DXS-Sequenzen. vgl. Abb. 31.

```
  1  GCAGAGTTTG ATTTCAGGCC T ATG TTT CCG AAT GAC AAG ACG CCG TTG TTA GAC AAG
                             M   F   P   N   D   K   T   P   L   L   D   K

 58  ATC AAG ACA CCG GCA GAA TTG CGT CAA TTA GAT CGC AAC AGC CTC CGG CAA TTG
       I   K   T   P   A   E   L   R   Q   L   D   R   N   S   L   R   Q   L

112  GCG GAT GAA TTA CGG AAA GAG ACC ATC TCG GCA GTG GGT GTA ACC GGC GGA CAT
       A   D   E   L   R   K   E   T   I   S   A   V   G   V   T   G   G   H

166  CTC GGT TCC GGT CTC GGG GTT ATC GAA TTA ACG GTA GCC CTT CAC TAT GTT TTC
       L   G   S   G   L   G   V   I   E   L   T   V   A   L   H   Y   V   F

220  AAC ACG CCC AAA GAT GCT TTG GTT TGG GAT GTT GGG CAT CAA ACC TAT CCT CAC
       N   T   P   K   D   A   L   V   W   D   V   G   H   Q   T   Y   P   H

274  AAG ATT TTA ACA GGT CGC CGC GAT CGT ATT CGG ACA TTG CGG CAA CGA GAC GGT
       K   I   L   T   G   R   R   D   R   I   R   T   L   R   Q   R   D   G

328  TTG TCG GGC TTT ACG CAG CGA GCA GAG AGC GAA TAT GAC GCT TTT GGG GCG GCA
       L   S   G   F   T   Q   R   A   E   S   E   Y   D   A   F   G   A   A

382  CAT AGT TCG ACT TCG ATA TCG GCA GCG CTC GGC TTT GCG ATG GCC AGC AAA TTA
       H   S   S   T   S   I   S   A   A   L   G   F   A   M   A   S   K   L

436  TCC GAC AGC GAC GAC AAA GCA GTG GCG ATT ATC GGT GAT GGC TCG ATG ACG GCA
       S   D   S   D   D   K   A   V   A   I   I   G   D   G   S   M   T   A

490  GGC ATG GCT TAT GAA GCC ATG AAT AAC GCC AAG GCG GCG GGT AAG CGC CTG ATT
       G   M   A   Y   E   A   M   N   N   A   K   A   A   G   K   R   L   I

544  GTC ATT TTG AAT GAC AAT GAA ATG TCG ATT TCA CCG CCG GTG GGT GCT TTA TCT
       V   I   L   N   D   N   E   M   S   I   S   P   P   V   G   A   L   S

598  TCT TAT TTG AGC CGC CTG ATT TCC TCA CGA CCT TTC ATG AAT TTG CGC GAT ATC
       S   Y   L   S   R   L   I   S   S   R   P   F   M   N   L   R   D   I

652  ATG CGC GGT GTT GTC AAC CGG ATG CCA AAA GGC TTG GCA ACG GCT GCC CGC AAG
       M   R   G   V   V   N   R   M   P   K   G   L   A   T   A   A   R   K

706  GCC GAT GAA TAT GCA CGT GGT ATG GCA ACG GGC GGC ACC TTC TTT GAA GAG CTG
       A   D   E   Y   A   R   G   M   A   T   G   G   T   F   F   E   E   L

760  GGC TTT TAC TAT GTT GGC CCC GTG GAT GGC CAT AAT TTA GAT CAG CTC ATT CCG
       G   F   Y   Y   V   G   P   V   D   G   H   N   L   D   Q   L   I   P

814  GTT TTG GAA AAT GTC CGC GAT GCC AAG GAC GGC CCC ATT TTG GTG CAT GTC GTC
       V   L   E   N   V   R   D   A   K   D   G   P   I   L   V   H   V   V

868  ACC CGC AAA GGC CAA GGC TAT GCT CCG GCA GAG GCT GCC AAG GAC AAA TAT CAC
       T   R   K   G   Q   G   Y   A   P   A   E   A   A   K   D   K   Y   H

922  GCC GTG CAG CGC TTG GAT GTG GTT TCC GGC AAG CAG GCG AAA GCG CCC CCG GGA
       A   V   Q   R   L   D   V   V   S   G   K   Q   A   K   A   P   P   G

976  CCT CCC AGC TAT ACC TCT GTT TTC TCG GAA CAG CTG ATC AAG GAA GCT AAG CAA
       P   P   S   Y   T   S   V   F   S   E   Q   L   I   K   E   A   K   Q
```

Abb. 41: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des *dxs*-Gens von *Zymomonas mobilis* ZM6. Die putative Ribosomenbindestelle ist unterstrichen. Die verwendeten Sequenzierprimer sind durch Pfeile und Fettdruck gekennzeichnet.

```
1030  GAC GAT AAG ATT GTG ACC ATT ACG GCA GCT ATG CCG ACT GGC ACC GGT CTT GAT
        D   D   K   I   V   T   I   T   A   A   M   P   T   G   T   G   L   D

1084  CGT TTT CAG CAA TAT TTC CCT GAA AGA ATG TTT GAT GTC GGT ATT GCC GAA CAA
        R   F   Q   Q   Y   F   P   E   R   M   F   D   V   G   I   A   E   Q

1138  CAT GCC GTA ACC TTT GCG GCT GGT TTA GCG GCT GCC GGT TAC AAG CCT TTC TGT
        H   A   V   T   F   A   A   G   L   A   A   A   G   Y   K   P   F   C

1192  TGT CTC TAT TCG ACC TTC TTG CAG CGC GGC TAT GAC CAG TTG GTG CAT GAT GTC
        C   L   Y   S   T   F   L   Q   R   G   Y   D   Q   L   V   H   D   V

1246  GCT ATC CAG AAT TTG CCA GTG CGC TTC GCC GTC GAT CGT GCG GGT CTT GTC GGT
        A   I   Q   N   L   P   V   R   F   A   V   D   R   A   G   L   V   G

1300  GCC GAT GGG GCA ACC CAT GCG GGT AGC TTC GAT ATC GCC TTT ATG GTT AAT CTC
        A   D   G   A   T   H   A   G   S   F   D   I   A   F   M   V   N   L

1354  CCG AAT ATG GTC GTG ATG GCA CCT TCC GAT GAA GGC GAA TTG GCC AAT ATG GTG
        P   N   M   V   V   M   A   P   S   D   E   G   E   L   A   N   M   V

1408  CAT ACG ATG GCA CAT TAT GAC CAA GGC CCA ATC TCG GTA CGT TAT CCG CGC GGC
        H   T   M   A   H   Y   D   Q   G   P   I   S   V   R   Y   P   R   G

1462  AAT GGC GTG GGT GTC TCC TTG GAA GGC GAA AAG GAA ATT CTG CCT ATC GGG AAA
        N   G   V   G   V   S   L   E   G   E   K   E   I   L   P   I   G   K

1516  GGC CGC CTG ATC CGT CGT GGT AAG AAA GTG GCT ATC CTC TCT CTC GGC ACT CGA
        G   R   L   I   R   R   G   K   K   V   A   I   L   S   L   G   T   R

1570  TTG GAA GAA TCC TTG AAG GCT GCC GAT CGG CTT GAT GCT CAA GGT TTA TCG ACA
        L   E   E   S   L   K   A   A   D   R   L   D   A   Q   G   L   S   T

1624  TCG GTT GCT GAT ATG CGT TTT GCC AAG CCC TTG GAT GAA GCG CTA ACA CGC CAA
        S   V   A   D   M   R   F   A   K   P   L   D   E   A   L   T   R   Q

1678  CTT CTG AAA AGC CAT CAG GTC ATT ATT ACC ATT GAA GAA GGC GCT TTG GGT GGT
        L   L   K   S   H   Q   V   I   I   T   I   E   E   G   A   L   G   G

1732  TTT GCA ACC CAA GTC CTG ACG ATG GCT TCG GAT GAA GGC CTG ATG GAT GAC GGA
        F   A   T   Q   V   L   T   M   A   S   D   E   G   L   M   D   D   G

1786  TTG AAA ATC CGC ACC CTG CGT CTG CCG GAT CGG TTC CAG CCC CAA GAC AAG CAA
        L   K   I   R   T   L   R   L   P   D   R   F   Q   P   Q   D   K   Q

1840  GAA CGG CAA TAT GCC GAA GCC GGT CTT GAT GCT GAT GGC ATC GTT GCT GCG GTT
        E   R   Q   Y   A   E   A   G   L   D   A   D   G   I   V   A   A   V

1894  ATC TCC GCA TTG CAT CGT AAT TCT AAA CCC GTG GAA GTC GTC GAA ATG GCG AAT
        I   S   A   L   H   R   N   S   K   P   V   E   V   V   E   M   A   N

1948  ATG GGT AGC ATC GCT CGC GCT TAA
        M   G   S   I   A   R   A   -
```

Abb. 41 (ff): Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des *dxs*-Gens von *Zymomonas mobilis* ZM6. Die verwendeten Sequenzierprimer sind durch Pfeile und Fettdruck gekennzeichnet.

Danksagung

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

Herrn PD Dr. G. A. Sprenger danke ich für die Überlassung des Themas, stetige Diskussionsbereitschaft, sowie seine Ratschläge und wertvollen Anregungen, die massgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. M.-R. Kula danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen, die grosszügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein Dank gilt allen (ehemaligen) Mitarbeitern der AG Sprenger Johannes Bongaerts, Ulli Degner, Regine Halbach, Dirk Halbig, Sonja Hartmann, Ralf Jossek, Marco Krämer, Britta Meyer und Heidi Peter sowie Natascha Blaudeck und Peter Kreutzenbeck aus der AG Freudl, die immer für ein tolles Arbeitsklima sorgten.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre ständige Hilfsbereitschaft. Den Mitarbeitern der AG Bringer, insbesondere Sigrid Grolle, möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der DXS und Isoprenoid-Biosynthese danken. Dr. Albert A. DeGraaf und Dr. Ralf Brückner danke ich für die kompetente und engagierte Unterstützung bei der Charakterisierung der 1-Desoxyheptulose.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Gunter Schneider und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere bei Stina Thorell sowie Doreen Dobritzsch, für die unvergesslichen Aufenthalte in Stockholm, die hervorragende Kooperation und die Einweisung in die Strukturbiologie.

Weiterhin danke ich Ulrike Römer und Nadja Nettelstroth aus der AG von PD Dr. L. Elling im Institut für Enzymtechnologie für die gute Zusammenarbeit bei den Synthesen mit DXS und SuSy.

Meiner Frau Melanie, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, möchte ich ganz besonders danken, dass sie mir mit viel Verständnis, Geduld und Unterstützung immer zur Seite stand.

Meinen Eltern danke ich für ihre stetige moralische und tatkräftige Unterstützung.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereich 380 (Asymmetrische Synthesen mit chemischen und biologischen Methoden) und des Deutschen Akademischen Austauschdienstes im Rahmen des Deutsch-Schwedischen Austauschprogrammes gefördert.

Forschungszentrum Jülich

Jül-3904
August 2001
ISSN 0944-2952