

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

Isotopologperturbationsmethoden zur Untersuchung von Stoffwechselnetzwerken

Ralf Laupitz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.- Prof. Dr. S. Weinkauf

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
3. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 13.01.06 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 10.05.06 angenommen.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von August 2002 bis Oktober 2005 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
bidest	bidestilliert
BSA	Bovine Serum Albumine
Cys	Cystein
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
emp	Glykolyse/Glukoneogenese
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	Free Induction Decay
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde
His	Histidin
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Idi	Isopentenylidiphosphat-Isomerase
Ile	Isoleucin
IPP	Isopentenylidiphosphat

IspH	1-Hydroxy-2-methyl-2-(<i>E</i>)-butenyl-4-diphosphat Reduktase
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kelvin
k	katalytische Rate
Kan	Kanamycin
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
min	Minute
MWB	Welshimer Minimalmedium
NMR	nuclear magnetic resonance/ magnetische Kernresonanz
NADH	Nikotinamiddinukleotid (reduziert)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
n.b.	nicht bestimmbar
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
R _f	Ratio of fronts
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
TA	Transaldolasereaktion
Tca	Citratcyklus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tk	Transketolasereaktion
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan

Tyr	Tyrosin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Val	Valin
Vis	visible

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher, meinem Doktorvater, gilt mein besonderer Dank für das Überlassen eines hochinteressanten und zukunftsweisenden Themas und für die stete Unterstützung meiner Arbeit. Sein Entgegenkommen ermöglichte es mir außerdem, am Werner-Heisenberg-Gymnasium Erfahrungen als „Lehrer“ sammeln zu können. Auch dafür schulde ich ihm Dank.

Bei Herrn Dr. W. Eisenreich bedanke ich mich für die Hilfe bei den Projekten Störung/Relaxation und Idi-2 sowie für die Einführung in die experimentelle NMR-Spektroskopie. Mit seiner Geduld und Erfahrung stand er mir bei allen spektroskopischen Problemen mit Rat und Tat zur Seite.

Herr Dr. F. Rohdich war immer für mich ansprechbar, unterstützte mich und gab mir viele richtungsweisende Hilfestellungen. In guter Erinnerung werden mir auch die lustigen Schwimm- und Snooker-Abende bleiben. Vielen Dank für alles!

Ich danke Herrn Dr. Mückter für das Ermöglichen des Kaninchen-Projektes sowie seine praktische Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Ferdinand Zepeck für die enge und effektive Zusammenarbeit. Die vielen intensiven und nicht immer sinnvollen Diskussionen auf den Gebieten der Biochemie, Politik und Gesellschaft verschönten meine Promotionszeit und bereicherten mich sehr.

Meiner Laborkollegin, Frau C. Schwarz, danke ich für ihre Unterstützung bei allen NMR-spektroskopischen sowie chromatographischen Aufgaben und das Wohlfühl-Arbeitsklima.

Mein Dank geht an Herrn Dr. N. Schramek für die Hilfe bei allen kinetischen Fragestellungen. Er zeigte außerdem unermüdlichen Einsatz bei dem Versuch, meine sportliche Leistungsfähigkeit zu steigern.

Sehr viel Ermutigung und mentale Unterstützung erfuhr ich von Herrn Dr. S. Hecht an langen Abenden beim „Griechen“ und beim „Alten Wirt“. Danke dafür!

Meinen Praktikanten und Auszubildenden Martin, Carmen, Hannes, Lukas und Matthias danke ich für ihr Interesse und die Erledigung der praktischen Aufgaben im Labor.

Ich danke Herrn F. Wendling für seine unschätzbare wichtige, schnelle und effektive Hilfe bei allen anfallenden HPLC- und Computerproblemen.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau A. König. Ihre Nebentätigkeit als „Head-Hunterin“ ermöglichte mir die „Lehrtätigkeit“ am WHG.

Herrn R. Feicht, Frau K. Gärtner, Herrn C. Grasberger und Frau A. König danke ich für die vielen kleinen und größeren Hilfestellungen.

Vielen Dank den aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Dr. P. Adam, Dr. S. Amslinger, T. Gräwert, Dr. I. Haase, Dr. C. Huber, Dr. J. Kaiser, M. Lee, Dr. L. Margl, S. Marsch, E. Ostrojenkova, Dr. T. Radykewicz und Dr. W. Römisch für das angenehme Arbeitsklima.

Mein tief empfundener Dank geht an meinen Freund Olli für seine Steuergelder, mit denen er mir das Studieren ermöglicht hat.

Ich danke meinen Eltern für ihre liebevolle Begleitung und meinem Bruder Jörg, der mir in allen Lebenslagen als „24h-Hotline“ zur Verfügung stand.

Frocy danke ich sehr für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre umfassende Unterstützung.

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits publiziert:

1. F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupitz, T. Gräwert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher und D. Arigoni
The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1586-1591 (2003).
2. W. Eisenreich, C. Ettenhuber, R. Laupitz, C. Theus und A. Bacher
Isotopolog perturbation techniques for metabolic networks. Metabolic recycling of nutritional glucose in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6764-6769 (2004).
3. R. Laupitz, S. Hecht, S. Amslinger, F. Zepeck, J. Kaiser, G. Richter, N. Schramek, S. Steinbacher, R. Huber, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich und F. Rohdich
Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2658-2669 (2004).
4. T. Gräwert, J. Kaiser, F. Zepeck, R. Laupitz, S. Hecht, S. Amslinger, N. Schramek, E. Schleicher, S. Weber, M. Haslbeck, J. Buchner, C. Rieder, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich und F. Rohdich
IspH protein of *Escherichia coli*: Studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12847-12855 (2004).
5. R. Laupitz, T. Gräwert, C. Rieder, F. Zepeck, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich und W. Eisenreich
Stereochemical studies on the making and unmaking of isopentenyl diphosphate in different biological systems. *Chem. Biodiversity* **1**, 1367-1376 (2004).

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS STOFFWECHSELNETZWERK	1
1.2	ISOTOPOLOGE UND ISOTOPOMERE	3
1.3	STÖRUNG UND RELAXATION	5
1.4	RETROBIOSYNTHESE	6
1.5	MODELLORGANISMEN	8
1.5.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.5.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.5.3	<i>Kaninchen</i>	10
1.6	TERPEN- UND ISOPRENOIDBIOSYNTHESE	11
1.7	ZIELSETZUNG	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	MATERIALIEN	20
2.1.1	<i>Chemikalien</i>	20
2.1.2	<i>Kulturmedien</i>	21
2.1.3	<i>Trennmedien</i>	23
2.1.4	<i>Reagenzien</i>	24
2.1.5	<i>Proteinmarker</i>	27
2.1.6	<i>Klone</i>	28
2.1.7	<i>Enzyme</i>	28
2.1.8	<i>Organismen</i>	29
2.2	GERÄTE	30
2.2.1	<i>Piccolo</i>	30
2.2.2	<i>Gefriertrocknung</i>	31
2.2.3	<i>HPLC</i>	31
2.2.4	<i>Ultraschallgerät</i>	31
2.2.5	<i>French-Press</i>	32
2.2.6	<i>UV/Vis-Spektroskopie</i>	32
2.2.7	<i>NMR-Spektroskopie</i>	32
2.2.8	<i>Analytische Ultrazentrifuge</i>	33
2.2.9	<i>Massenspektrometrie</i>	33
2.2.10	<i>Sequenzanalyse</i>	33
2.2.11	<i>Refraktometrie</i>	33
2.2.12	<i>Glove-Box</i>	34
2.2.13	<i>FPLC</i>	34
2.2.14	<i>Sonstige Geräte</i>	34
2.3	METHODEN	36

2.3.1	<i>Anzucht der Versuchsorganismen</i>	36
2.3.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.3.1.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	37
2.3.1.3	Weißes Neuseelandkaninchen (New Zealand White Rabbit).....	37
2.3.2	<i>Dünnschichtchromatographie</i>	37
2.3.3	<i>Isolierung und Reinigung von Glukose</i>	38
2.3.3.1	Aus <i>Drosophila melanogaster</i>	38
2.3.3.2	Aus Blutproben eines Weißen Neuseelandkaninchens (<i>New Zealand White Rabbit</i>)	38
2.3.4	<i>Isolierung und Reinigung von Aminosäuren</i>	39
2.3.5	<i>NMR-Spektroskopie</i>	41
2.3.6	<i>Berechnung der ¹³C-Anreicherungen</i>	42
2.3.6.1	Berechnung der relativen ¹³ C-Anreicherung	42
2.3.6.2	Berechnung der absoluten ¹³ C-Anreicherung.....	43
2.3.6.3	Berechnung der ¹³ C ¹³ C-Kopplungen	45
2.3.7	<i>Formale Darstellung von Markierungsmustern</i>	46
2.3.8	<i>Genetischer Algorithmus und Stoffwechselsimulation</i>	50
2.3.9	<i>Induzierte Anzucht</i>	50
2.3.10	<i>Zellaufschluss</i>	51
2.3.11	<i>Proteinreinigung</i>	51
2.3.12	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	52
2.3.13	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	52
2.3.14	<i>Durchführung der enzymatischen Assays</i>	53
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	54
3.1	STÖRUNGS-/RELAXATIONSEXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DES STOFFWECHSELS VERSCHIEDENER ORGANISMEN.....	54
3.1.1	<i>In vivo-Störungs-/Relaxationsexperimente mit Listeria monocytogenes</i>	54
3.1.1.1	Der Zentralstoffwechsel von <i>Listeria monocytogenes</i> EGD (Wildtyp)	54
3.1.2	<i>Der Einfluss des Virulenzfaktors PRFA auf den Aminosäurestoffwechsel in Listeria monocytogenes</i>	64
3.1.3	<i>Untersuchungen zum Glukose-Stoffwechsel in Drosophila melanogaster</i>	69
3.1.4	<i>Untersuchungen zum Glukose-Stoffwechsel in Säugetieren am Beispiel Kaninchen</i>	79
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DER ISOPENTENYLDIPHOSPHAT: DIMETHYLALLYLDIPHOSPHAT ISOMERASE TYP-II.....	92
3.2.1	<i>Biochemische Charakterisierung des Proteins Idi-2</i>	92
3.2.1.1	Hydrodynamische Studien mit dem Protein Idi-2 aus <i>Bacillus subtilis</i>	93
3.2.1.2	Katalytische Eigenschaften des Proteins Idi-2 aus <i>Bacillus subtilis</i>	95

3.2.2	<i>Mechanistische Untersuchungen zur Idi-2 katalysierten reversiblen Isomerisierung von IPP in DMAPP.....</i>	<i>105</i>
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	112
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	116
ANHANG		

1 Einleitung

Eine große Zahl von Stoffwechselwegen konnte durch Markierungsexperimente mit radioaktiven Vorstufen entdeckt und untersucht werden. Ein klassisches Beispiel dafür ist der nach Melvin Calvin benannte Calvinzyklus zur CO₂-Fixierung in der Dunkelreaktion der Photosynthese. In den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts waren die ersten mit ¹⁴C, ³²P, ³⁵S und später auch mit ³H markierten Verbindungen kommerziell erhältlich. Trotz der niedrigeren Nachweisempfindlichkeit gegenüber radioaktiven Tracern (Rauschenbach et al., 1974) hat vor allem die fortschreitende Entwicklung der NMR- und Massenspektroskopie dazu beigetragen, die routinemäßige Anwendung von Stabilisotopen zur Aufklärung von Biosynthesewegen zu ermöglichen. So haben Fütterungsexperimente mit ²H- und ¹³C-markierten Verbindungen in den letzten 30 Jahren große Bedeutung erlangt und Experimente mit Radioisotopen nach und nach verdrängt. Mit Einsatz der NMR-Spektroskopie und stabilisotopmarkierter Vorstufen ist es möglich, die Anreicherung eines Isotops an einer bestimmten Position in einem Zielmolekül zu bestimmen.

1.1 Das Stoffwechselnetzwerk

Die zu untersuchende Reaktion im Stoffwechsel ist nicht als ein eindimensionales lineares System zu betrachten. Beim Einbau einer markierten Vorstufe in ein Zielmolekül ist es oftmals falsch, vorauszusetzen, dass es nur einen einzigen Stoffwechselweg von der Vorstufe zum Biosyntheseprodukt gibt. Lässt man somit den Einbau der markierten Vorstufe in das Zielmolekül über Seitenwege des Stoffwechsels außer Acht, sind fehlerhafte Interpretationen des erhaltenen Markierungsmusters im Zielmolekül bereits vorprogrammiert.

Der Stoffwechsel mit seinen mehreren 100 bis wenigen 1000 Einzelreaktionen ist somit selbst in primitivsten Organismen als ein Stoffwechselnetzwerk zu betrachten (Abbildung 1.1).

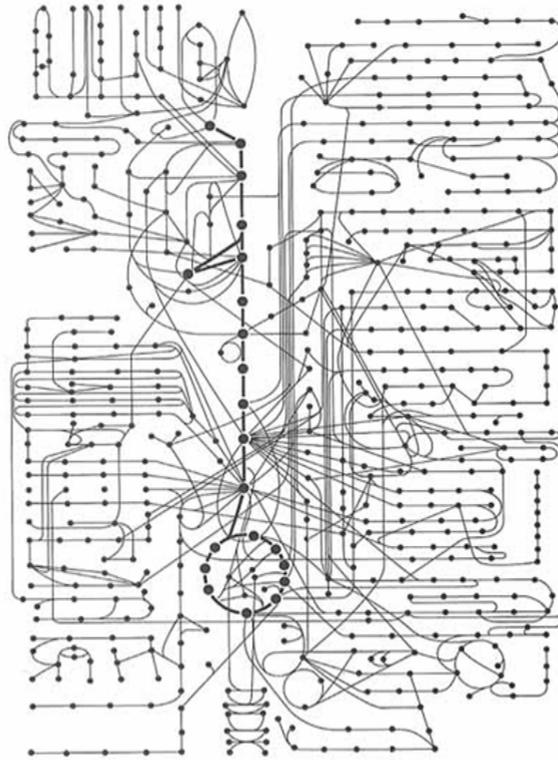


Abbildung 1.1 Die Biosynthesewege sind in Form eines Stoffwechselnetzwerks miteinander verknüpft. Die Punkte stellen Intermediate im Stoffwechsel dar.

Eine Vernetzung in diesem Zusammenhang bedeutet, dass ein Produkt einer Reaktion wiederum als Substrat oder Regulator einer anderen Reaktion in diesem Netzwerk dienen kann. Darüber hinaus können Metabolite als Substrate mehrerer Stoffwechselwege aktiv sein. Die Markierung eines Moleküls erreicht daher oftmals mit unterschiedlicher Effektivität verschiedene Stoffwechselfools, und letztlich wird unter Umständen nur ein Teil der Isotopenmarkierung im Endprodukt zu finden sein. Die Vernetzung des Stoffwechsels führt außerdem dazu, dass über intermediäre Stoffwechselprodukte eine Vielzahl verschiedener Isotopomere des untersuchten Metaboliten entstehen, und die Markierung einer Vorstufe an verschiedene Positionen im Zielmolekül gelangen kann (Abbildung 1.2). Die Bestimmung der exakten Zusammensetzung solcher Mischungen stellt hohe Anforderungen an die analytischen Methoden und ist erst seit jüngerer Zeit möglich.

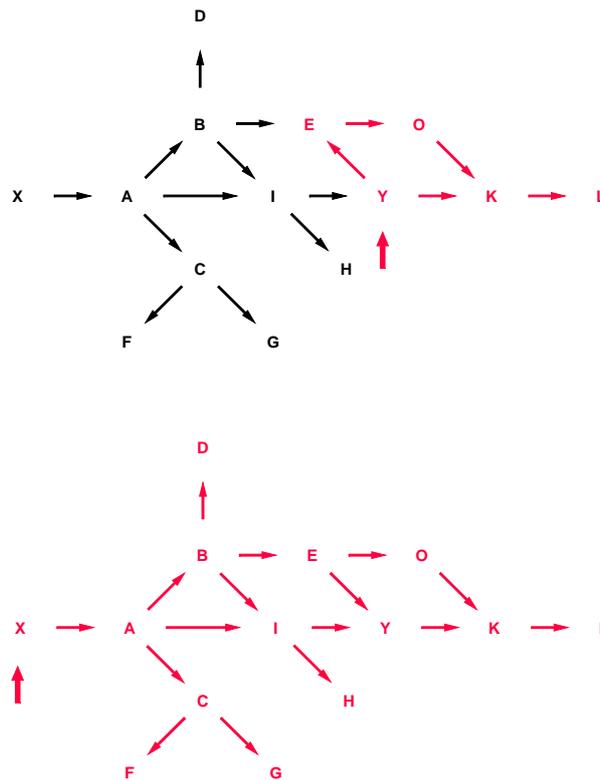


Abbildung 1.2 Modellvorstellung für den Fluss spezieller Metaboliten (Verbindung Y) oder genereller Vorstufen (Verbindung X) bei biosynthetischen Tracerstudien (Rieder, 1999; Bacher et al., 1999)

Die Verknüpfungen im Netzwerk sind nicht beliebig, sondern werden thermodynamisch kontrolliert. Die Topologie von Stoffwechselnetzwerken hat den typischen Charakter eines „small world network“ oder „scale free network“. Die Knoten in diesem hierarchisch aufgebauten Netzwerk sind mit ihrer unmittelbaren Umgebung hoch vernetzt.

1.2 Isotopologe und Isotopomere

Isotopomere und isotopologe Verbindungen kommen in natürlicher Materie als ein komplexes Gemisch vor. In der Literatur werden die Begriffe der Isotopologe und Isotopomere oftmals fälschlicherweise als gleichbedeutend behandelt. IUPAC definiert Isotopomere als Moleküle mit der gleichen Anzahl von Isotopen (z.B. alle einfach ^{13}C -markierten Glukosen), während

als Isotopologe Moleküle bezeichnet werden, die ein bestimmtes Isotop (z.B. ^{13}C) in unterschiedlicher Anzahl im Molekül aufweisen.

Die Verteilung der natürlichen Kohlenstoffisotope ^{12}C und ^{13}C in einem Molekül kann zu einer großen Zahl verschiedener Isotopologe führen. Die Anzahl z der möglichen Isotopologe eines Moleküls ergibt sich aus der Formel $z = 2^n$, wobei n die Zahl der Kohlenstoffatome in der Verbindung angibt. Zum Beispiel können im Falle der aus drei Kohlenstoffatomen bestehenden Aminosäure Alanin $z = 2^3 = 8$ verschiedene Isotopologe entstehen. Diese verschieden markierten Verbindungen sind mit ihren natürlichen Häufigkeiten in Tabelle 1.1 angegeben.

Tabelle 1.1 Die natürliche Häufigkeit der stabilen Kohlenstoffisotopologe von Alanin.

Isotopolog	Natürliche Häufigkeit [mol%]
[U- $^{12}\text{C}_3$]	96,67
[1- $^{13}\text{C}_1$]	1,1
[2- $^{13}\text{C}_1$]	1,1
[3- $^{13}\text{C}_1$]	1,1
[1,2- $^{13}\text{C}_2$]	0,012
[1,3- $^{13}\text{C}_2$]	0,012
[2,3- $^{13}\text{C}_2$]	0,012
[U- $^{13}\text{C}_3$]	0,00013

Aus dieser Zusammenstellung ist zu erkennen, dass mehrfach markierte Isotopologe nur in sehr geringer Konzentration in der Natur vorkommen. Dies ist auf den niedrigen ^{13}C -Gehalt von 1,1 % in natürlicher Materie zurückzuführen.

Die künstliche Zufuhr isotopangereicherter Verbindungen in den Stoffwechsel führt zu einer Störung des natürlichen Isotopoggleichgewichts. Die dadurch in erhöhtem Maße entstehenden mehrfach markierten Verbindungen müssen bei der Analyse der Metabolite besonders berücksichtigt werden, da sie die entscheidenden Informationen über das Stoffwechselgeschehen liefern.

1.3 Störung und Relaxation

Stabilisotopmarkierte Vorstufen, die einem bestimmten Organismus als Stoff- und/oder Energiequelle zugeführt werden, stören das natürliche Isotopogleichgewicht. Die dabei verwendete Vorstufe sollte vom untersuchten Organismus effizient aufgenommen und im untersuchten Stoffwechselnetzwerk verwertet werden können. Als besonders geeignet dafür haben sich die kommerziell erhältlichen ^{13}C -markierten Glukose-Isotopomere herausgestellt. Der Einsatz mehrfach markierter Vorstufen in Störexperimenten hat sich als äußerst hilfreich erwiesen, da dadurch die Bildung mehrfach markierter Isotopologe (z.B. $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$) zu erwarten ist. Diese besitzen eine hohe Nachweisempfindlichkeit in der NMR-Spektroskopie, da das Auftreten mehrfach markierter Isotopologe in natürlicher Materie nur maximal 0,01 mol % (für ein $^{13}\text{C}_2$ -Fragment, Tabelle 1.1) beträgt. Die Folge daraus ist ein niedriger Hintergrund durch mehrfach markierte Isotopologe in natürlicher Materie.

In der Regel werden im Experiment die eingesetzten Isotopologe mit unmarkierten Vorstufen stark verdünnt, um die statistische Rekombination ^{13}C -markierter Metabolite nahezu ausschließen zu können. Somit findet bei anabolen Stoffwechselwegen fast ausnahmslos eine Rekombination von ^{13}C -markierten Fragmenten mit unmarkierten Fragmenten statt, die durch katabole Prozesse aus der im Überschuss vorhandenen unmarkierten Vorstufe entstanden sind. Die biochemisch entstehenden Stoffwechselprodukte sind eine komplexe Mischung aus Isotopomeren, die über mehrere Stoffwechselwege aus einem bestimmten Metaboliten gebildet werden. Es kann außerdem zu positionellen Neuformierungen der Isotopmarkierung kommen, wenn die markierte Vorstufe über zyklische Stoffwechselwege recycled wird. Eine in das Stoffwechselnetz eingebrachte Störung pflanzt sich über das gesamte Netzwerk fort. Die Verteilung des von außen über die markierte Vorstufe eingebrachten Stabilisotops (z.B. ^{13}C) verläuft dabei nicht zufällig. Die Markierung des analysierten Zielmetaboliten spiegelt vielmehr die Gesamtheit der Prozesse im Stoffwechselnetzwerk wider, die für seine Bildung verantwortlich sind. Die metabole Antwort auf eine in das Stoffwechselnetzwerk eingeführte Störung kann als Relaxationsvorgang beschrieben werden. Ein Knoten in diesem hierarchisch aufgebauten Netzwerk (Abbildung 1.1) ist mit seiner Umgebung hoch vernetzt. Die Folge dieses hohen Vernetzungsgrades ist die schnelle Relaxation bei einer Störung von außen. Bei einer Störung mit isotopmarkierten Vorstufen sind solch schnelle Relaxationsvorgänge für die Einstellung von steady-state-Isotopgleichgewichten von großer Bedeutung. Die Messung der Relaxation unter Einsatz von natürlichen ^{13}C -markierten Stoff- und/oder Energiequellen als

Vorstufe erlaubt die quantitative Beschreibung der beteiligten Prozesse im Netzwerk unter physiologischen *in vivo*-Bedingungen.

Die Annahme liegt nahe, dass die umfassende Untersuchung eines Stoffwechselnetzwerks die Messung vieler Metabolite erforderlich macht. In dieser Arbeit wird anhand mehrerer Beispiele gezeigt, dass bereits die Analyse einiger weniger (z.B. verschiedener Aminosäuren) oder sogar eines einzigen Schlüsselmetaboliten (z.B. Glukose) ausreicht, um bestimmte Bereiche des Stoffwechselnetzwerks in verschiedenen Organismen qualitativ wie auch quantitativ zu beschreiben.

1.4 Retrobiosynthese

Bei Störungs- und Relaxationsexperimenten werden vornehmlich generelle Stoff- und/oder Energiequellen (z.B. Glukose oder Acetat) eingesetzt, die in verschiedene Stoffwechselprodukte umgewandelt werden können. Das Verfahren der Retrobiosynthese erlaubt, aus der Analyse der gemessenen Endprodukte eines Stoffwechselweges die Isotopologzusammensetzung wichtiger Verzweigungsstellen (Knoten) im Stoffwechselnetzwerk zu rekonstruieren. Solche Knoten sind häufig vorkommende Stoffwechselintermediate. Die Grundlage dafür bieten die bekannten Biosynthesewege. Des Weiteren ermöglicht dieses Verfahren, die Biosynthesewege sowie den Fluss der Metabolite innerhalb eines Organismus zu interpretieren. Analog zur synthetisch organischen Chemie wird bei dieser Methode das Symbol „ \Rightarrow “ benutzt. Dadurch wird die biosynthetische Verknüpfung der Markierungsmuster des gemessenen Endprodukts mit seiner biosynthetischen Vorstufe dargestellt (Bacher et al, 1999). Die retrobiosynthetischen Beziehungen zwischen dem Produkt und dem Vorläufer können sich in Abhängigkeit vom untersuchten Organismus unterscheiden und müssen deshalb jeweils neu bestimmt werden. Die Ausgangsverbindungen aller Biosynthesewege, z.B. Glykolyse, Pentosephosphatweg, Citratcyklus, werden aus zentralen Stoffwechselzwischenprodukten synthetisiert. Die analytische Bestimmung der Markierungsmuster dieser Intermediate des zentralen Stoffwechsels, wie unter anderem Acetyl-CoA und Glycerinaldehyd-3-Phosphat, bereitet oftmals Schwierigkeiten, da diese Verbindungen nur in geringer steady-state-Konzentration in natürlicher Materie vorkommen. Die Markierungsmuster der Intermediate des zentralen Stoffwechsellpools, wie beispielsweise verschiedene Zuckerphosphate, Dicarbonsäuren und Acetyl-CoA, sind mit hoher Präzision

über Retrobiosynthese aus den Isotopologmustern der Metabolite, wie z.B. Aminosäuren, ableitbar (Eisenreich et. al, 1993; Rieder, 1999; Eichinger, 1993; Eichinger 1997). Oftmals lassen sich die Isotopologe eines bestimmten Metaboliten aus mehreren Aminosäuren gleichzeitig ableiten, sodass eine hohe Datensicherheit und eine hohe statistische Genauigkeit gewährleistet sind.

Die Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat und α -Ketoglutarat können direkt aus den Aminosäuren Alanin, Aspartat und Glutamat abgeleitet werden, da diese durch Transaminierung der Zentralmetabolite synthetisiert werden (Abbildung 1.3).

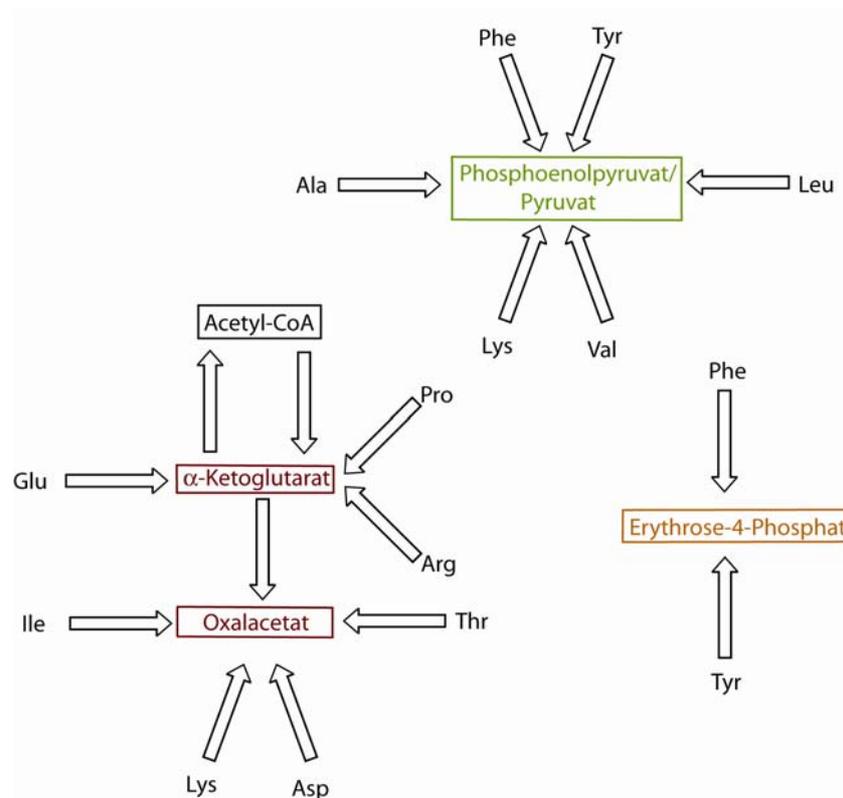


Abbildung 1.3 Rekonstruktion der Zentralmetabolite durch Retrobiosynthese aus den Aminosäuren. Die Metabolite aus der Glykolyse, in der sich Pyruvat und Phosphoenolpyruvat im Isotopologgleichgewicht befinden, sind grün, die aus dem geschlossenen Citratcyklus rot und die aus dem Pentosephosphatweg orange dargestellt. Die in diesem Stoffwechselnetzwerk gezeigte Biosynthese von Lysin verläuft über Aspartat.

Darüber hinaus ist das Markierungsmuster in Glutamat und Prolin in das von α -Ketoglutarat übertragbar. Das Markierungsmuster von 3-Phosphoenolpyruvat ist in den Seitenketten der

aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin zu finden. Aus der Aminosäure Leucin ist die Markierung in Acetyl-CoA erhältlich. Unter Berücksichtigung des Citratcyklusses ist dieses Markierungsmuster auch aus den Aminosäuren Glutamat, Prolin und Arginin bestimmbar. Aus der Analyse von Aspartat, Threonin, Isoleucin und Lysin lässt sich das Markierungsmuster in Oxalacetat ermitteln, wobei auch hier eine Verknüpfung über den Citratcyklus mit Acetyl-CoA und α -Ketoglutarat gegeben ist. Das Markierungsmuster von Erythrose-4-Phosphat kann aus der Markierung des aromatischen Rings in Tyrosin und Phenylalanin bestimmt werden.

1.5 Modellorganismen

Störungs- und Relaxationsexperimente sind theoretisch auf alle existierenden Organismengruppen anwendbar. Sie können unter Miteinbeziehung der Methode der Retrobiosynthese zur qualitativen und quantitativen Beschreibung von Stoffwechselnetzwerken in Bakterien, Pflanzen und Tieren eingesetzt werden. In dieser Arbeit wird anhand des Bakteriums *Listeria monocytogenes*, des sich entwickelnden Insekts *Drosophila melanogaster* und des Kaninchens New Zealand White Rabbit die beschriebene Methode dargestellt. Als Störquelle diente in den durchgeführten Experimenten $[U-^{13}C_6]$ Glukose, die den Modellorganismen als Nahrungszusatzstoff oder, wie im Falle des Kaninchens, intravenös zugeführt wurde.

1.5.1 *Listeria monocytogenes*

Der im Störexperiment eingesetzte Mikroorganismus ist das unter Laborbedingungen gut handhabbare Bakterium *Listeria monocytogenes*, das in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Werner Goebel (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) untersucht wurde. *Listeria monocytogenes* ist ein gram-positives, stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes, nicht sporulierendes und fakultativ anaerobes Bakterium. Es lebt im Boden, im Wasser, auf Pflanzen und fakultativ intrazellulär in tierischen Zellen. Die Vermehrung dieses parasitären Bakteriums ist sehr effektiv. Das Bakterium tritt aus dem primären Phagosom in das Cytosol des Wirtes über. Mit Hilfe sich verlängernder Aktinfilamente können benachbarte Zellen infiziert werden. Die für die Virulenz von *Listeria monocytogenes* essentiellen Gene

sind bekannt, und die dabei stattfindenden Prozesse wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht. Hingegen sind die Anforderungen an den Stoffwechsel bei der Vermehrung des Bakteriums im Cytoplasma bisher wenig erforscht. Einige Experimente weisen allerdings darauf hin, dass der Stoffwechsel zur schnellen Vermehrung des Bakteriums im Cytosol des Wirtes bestimmte Veränderungen erfährt (Chico-Calero et al., 2002; Knuth et al., nicht veröffentlicht). Erkenntnisse zum Stoffwechsel eines humanpathogenen Bakteriums, wie beispielsweise *Listeria monocytogenes*, können zu einem tieferen Verständnis der für die bakterielle Vermehrung im Wirt notwendigen Wirt/Pathogen-Beziehung führen. Im Idealfall kann dies zur Identifikation neuer Zielsubstanzen zur Chemotherapie der von diesem Organismus ausgelösten Krankheit, der Listeriose, beitragen.

Auch wenn das letzte Jahrzehnt eine enorme Menge Genomdaten der wichtigsten humanpathogenen Organismen geliefert hat, so muss man feststellen, dass selbst eine vollständige Beschreibung des Proteoms nicht zu einer umfassenden Beschreibung des Stoffwechsels führen kann. Die Methode der Störung und Relaxation ist hierfür ein sehr hilfreiches Verfahren, das die Beobachtung des Stoffwechselflusses unter *in vivo*-Bedingungen ermöglicht und somit zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien beiträgt.

1.5.2 *Drosophila melanogaster*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist seit ihrer Entdeckung vor rund hundert Jahren zu einem der „erfolgreichsten“ Labortiere der Welt geworden. Neben ihrer geringen Größe und der damit verbundenen leichten Handhabbarkeit im Labor zeichnet sie sich durch eine hohe Fortpflanzungsrate mit einer neuen Generation innerhalb von nur zwölf Tagen aus. Vor allem in der Genetik und der Entwicklungsbiologie spielt diese Fliege bis heute eine äußerst wichtige Rolle. Nachdem die Fruchtfliege erstmals um 1900 zu Forschungszwecken in einem Labor in Harvard eingesetzt wurde, entdeckte Thomas Hunt Morgan 1909 Chromosomen und Gene in den Zellen dieser Spezies und arbeitete die Grundlagen der modernen Genetik aus. Hermann Muller, ein Mitarbeiter Morgans, rief mit Röntgenstrahlen künstliche Mutationen an der Fruchtfliege hervor, um an den Mutationen Gene und deren Funktion zu identifizieren. In den dreißiger Jahren arbeitete Theodosius Dobzhansky mit wilden Varianten von *Drosophila* und begann, Evolutionsforschung und Genetik zusammenzuführen. 1946 entdeckte Ed Lewis ein Kontrollgen der Fruchtfliege, das wie ein molekularer Architekt die Aufbauarbeit des

Körpers organisiert und koordiniert. Christiane Nüsslein-Volhard schließlich wurde im Jahre 1995 für ihr Mammutprojekt der Kartierung aller Gene, die das Embryonalstadium der Fruchtfliege organisieren, mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Das vollständig sequenzierte Genom der Fliege zeigt eine große Anzahl mit zum Menschen homologer Gene, die in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen des Menschen, wie z.B. Parkinson oder Alzheimer, gebracht werden. Im Genom der Fliege finden sich aber auch Gene, die für Stoffwechselerkrankungen des Menschen, wie beispielsweise *Diabetes mellitus*, verantwortlich gemacht werden. Mutanten von *Drosophila melanogaster* sind leicht verfügbar. Die an Stoffwechselprozessen beteiligten Gene dieser mutierten Insekten können fehlen oder nicht funktionsfähig sein. Die Fruchtfliege ist somit ein ideales Studienobjekt, um mit Hilfe der Störungs-/Relaxationsmethode das Stoffwechselgeschehen und den Einfluss bestimmter Gene auf den Metabolismus zu untersuchen. Der große Vorteil dieser Methode ist die über die direkte Funktion eines Gens hinausgehende Beschreibung von Prozessen, die weit entfernt im Stoffwechselnetzwerk stattfinden.

1.5.3 Kaninchen

Viele Fortschritte in der Medizin sind untrennbar mit dem Einsatz von Tierexperimenten in der Grundlagenforschung verbunden. Ein Beispiel für die medizinische Anwendung von Erkenntnissen aus der tierexperimentellen Forschung ist die Entwicklung therapeutischer Methoden auf dem Gebiet der Stoffwechselerkrankung *Diabetes mellitus*. Versuche an Kaninchen führten in den zwanziger Jahren des vorigen Jahrhunderts zur Identifizierung des Hormons Insulin, das den Blutzuckerspiegel reguliert. Diese Versuche trugen maßgeblich zum Verständnis der Wirkung des Insulins auf den Blutzuckerspiegel bei und halfen, neue Therapien zu entwickeln. In der physiologischen Forschung wurden später Kaninchen durch Ratte und Maus abgelöst. Auch bei der Entwicklung von Impfstoffen und bei der Wirksamkeitsprüfung von Arzneimitteln wird das Kaninchen in der wissenschaftlichen Forschung eingesetzt. Der Aufbau der Körperzellen und die biochemischen Prozesse, die den Lebensvorgängen zu Grunde liegen, sind bei verschiedenen Tierarten sehr ähnlich. Durch die molekulare Genetik wurde der Beweis erbracht, dass alle heutzutage existierenden Organismen den gleichen Ursprung haben, und dass die den Körperaufbau bestimmenden und im Laufe der Zeit modifizierten Gene die Grundlage für die Evolution der Lebewesen bilden.

Durch diese Ähnlichkeiten sind sogar menschliche Gene und Stoffwechselprozesse mit denen von Bakterien, Pilzen und Hefen vergleichbar. Somit ist es prinzipiell möglich, wissenschaftliche Befunde aus den Untersuchungen der allgemeinen Stoffwechselwege von Mikroorganismen auf höhere Tiere und auf den Menschen zu übertragen. Die Vorgänge im Körper bei höher entwickelten Tieren und beim Menschen sind deutlich komplexer als bei niederen Organismen, da diese Prozesse auf einer Vielzahl spezialisierter Zelltypen und Organen beruhen. Wegen der großen Übereinstimmung von Zell- und Organfunktionen bei Mensch und Säugetier ist davon auszugehen, dass eine Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse vom Tier auf den Menschen meistens gerechtfertigt ist. Somit ist das Säugetier Kaninchen ein idealer Modellorganismus, um einen tieferen Einblick in das Stoffwechselnetzwerk des Menschen zu gewinnen. Durch Einbauexperimente und mit Hilfe der Methode der Störung und Relaxation kann dieser Modellorganismus zu wichtigen Fortschritten bei der Diagnostik von Stoffwechselerkrankungen des Menschen beitragen.

Ein Beispiel für die Aufklärung eines Stoffwechselweges durch Markierungsexperimente mit ^{13}C -markierten Vorstufen ist die Entdeckung des Mevalonat-unabhängigen Biosyntheseweges zur Synthese von Terpenen und Isoprenoiden.

1.6 Terpen- und Isoprenoidbiosynthese

Terpene und Isoprenoide zählen mit ihren mehr als 30 000 bekannten verschiedenen Verbindungen zu einer der größten Stoffklassen in der Natur. In allen Organismen sind Terpene bzw. terpenoide Verbindungen an zentralen Stoffwechselvorgängen beteiligt. Die biologische Funktion und Anwendung dieser meist aus dem Pflanzenreich stammenden Sekundärstoffe sind sehr vielfältig. Viele Terpene dienen in Pflanzen der chemischen Kommunikation, z. B. als Lockstoff von Insekten, oder der chemischen Abwehr zum Schutz vor Fressfeinden. Ubichinon spielt in der Atmungskette als Elektronentransporter eine Rolle und das Steroid Cholesterin dient zur Stabilisierung von Membranen. Die Phytolseitenkette von Chlorophyll verankert den Photorezeptor in der Membran, und Carotenoide wie β -Carotin dienen als Lichtschutzpigmente in Pflanzen (Abbildung 1.4).

Auch das kommerzielle Interesse an Terpenen ist gewachsen. So wird unter anderem das aus der Eibe stammende Diterpen Taxol wegen seiner cytostatischen Wirkung als Chemotherapeutikum zur Behandlung von Krebs verwendet. Die Antioxidantien Lycopin und Lutein werden als Nahrungsergänzungstoffe diskutiert.

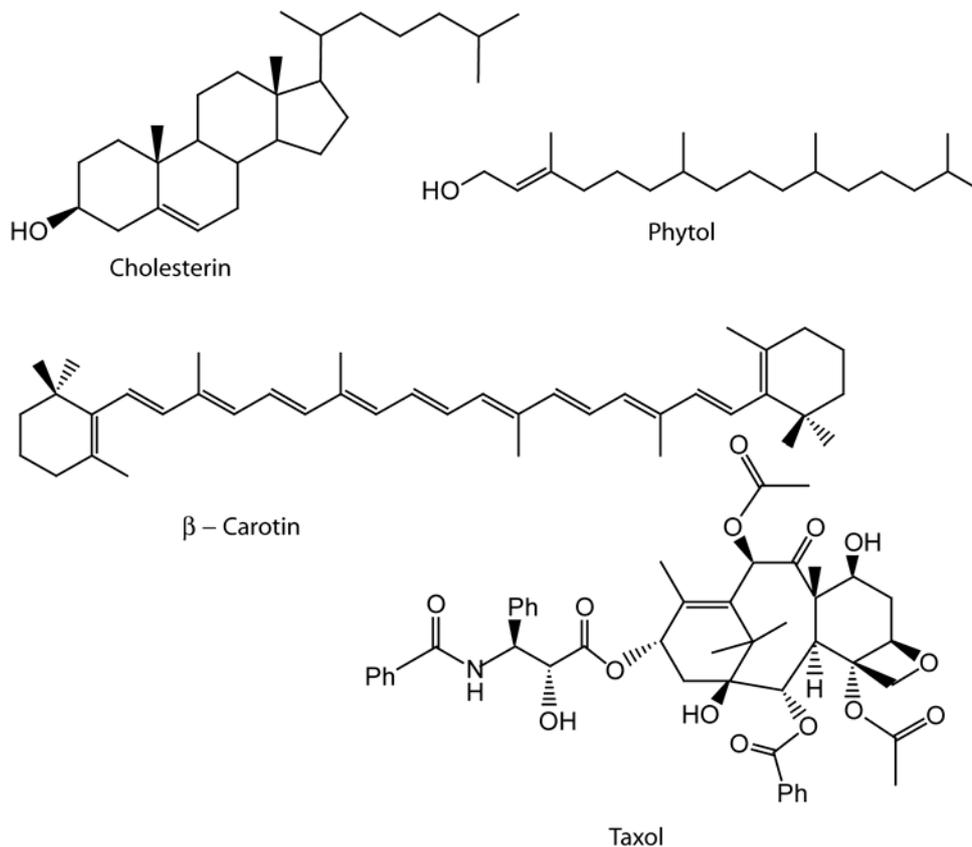


Abbildung 1.4 Eine Auswahl wichtiger Vertreter von Terpenen.

Trotz ihrer strukturellen Vielfalt werden alle Isoprenoide oder terpenoide Verbindungen aus den zwei C_5 -Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aufgebaut. Die Synthese der höheren Terpene erfolgt durch Kondensationsreaktion von IPP an DMAPP zu Geranylidiphosphat (Rohmer, 1999). DMAPP dient hierbei im Rahmen von Prenyltransferasereaktionen als elektrophile Startereinheit zur Kettenverlängerung mit IPP. Durch Kondensationsreaktionen weiterer IPP-Einheiten entstehen Farnesylidiphosphat und Geranylgeranioldiphosphat. Durch Kondensation zweier Geranylgeranioldiphosphate werden Polyprenylidiphosphate gebildet. Geranylidiphosphat, Farnesylidiphosphat, Geranylgeranioldiphosphat und Polyprenylidiphosphate dienen als Vorstufen der Mono-, Sesqui-, Diterpene und Carotenoide.

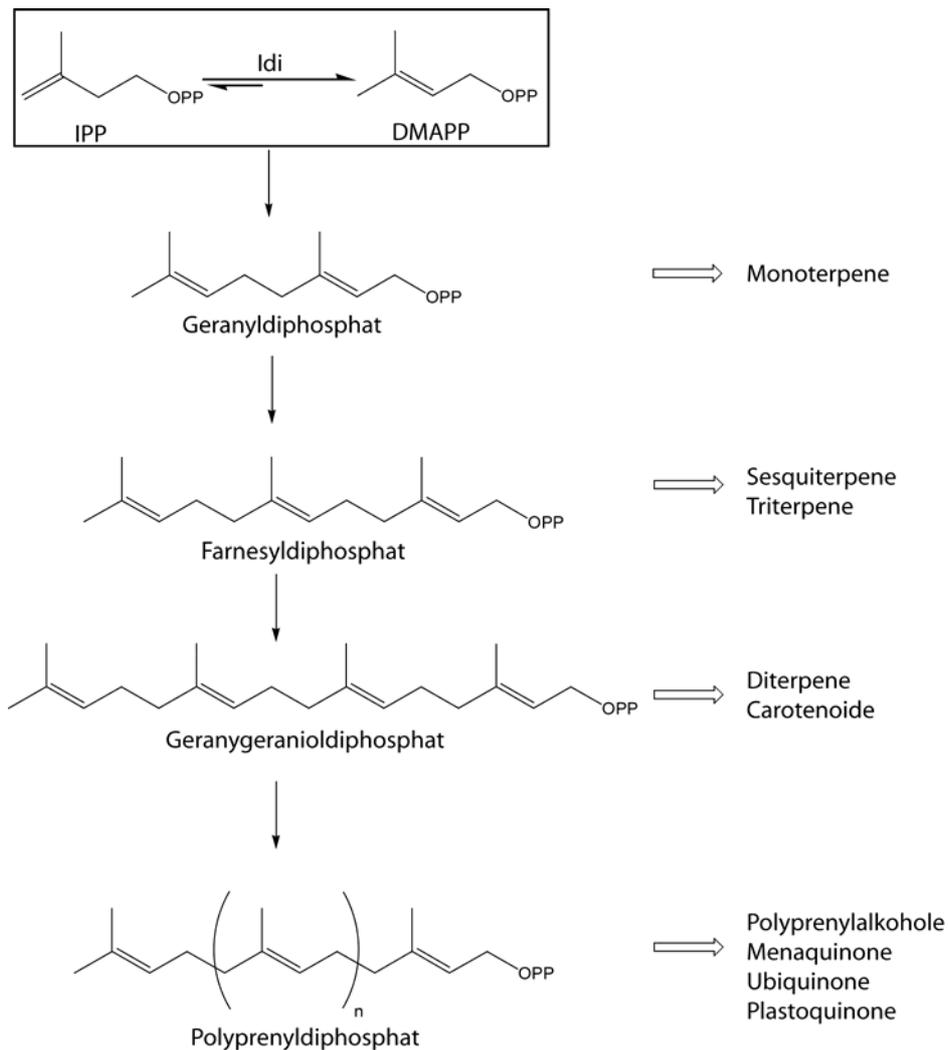


Abbildung 1.5 Biosynthese der höheren Isoprenoide durch Kondensationsreaktion von IPP an DMAPP.

Die hohe Diversität der Terpenoide wird durch Oxidations-, Cyclisierungs- und Umlagerungsreaktionen der gebildeten Grundstufen (Abbildung 1.5) erreicht.

Über Jahrzehnte hinweg wurde die Ansicht vertreten, dass die beiden Terpenorstufen IPP und DMAPP ausschließlich über den so genannten Mevalonatweg gebildet werden. Arbeiten an Säugetierzellen und Hefen in den 60er Jahren haben gezeigt, dass hierbei die Biosynthese ausgehend von Acetyl-CoA über Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonsäure zu IPP erfolgt.

Durch Arbeiten an Bakterien und Pflanzen häuften sich die Befunde, dass es zu dem Mevalonatweg einen alternativen Stoffwechselweg zur Synthese von IPP und DMAPP geben muss. Markiertes Acetat bzw. Mevalonat wurde nicht oder nur mit sehr geringen Inkorporationsraten in Carotine, Monoterpene und Diterpene von Pflanzen eingebaut (Banthorpe et al., 1972). Es wurde angenommen, dass die zugegebenen Stoffe für die in den Plastiden der Pflanzenzelle stattfindende Biosynthese undurchlässig seien. Außerdem führte die Inhibierung der Mevalonsäuresynthese nicht gleichzeitig zu einer verminderten Bildung von Chlorophyll oder Carotenoiden, während die im Cytoplasma der Zelle stattfindende Biosynthese von Sterol weitestgehend unterdrückt wurde (Reviews: Rohmer, 1999; Eisenreich et al., 1998). Aus diesen Daten wurde gefolgert, dass in Pflanzen zwei voneinander unabhängige kompartmentgetrennte Stoffwechselwege zur Synthese von IPP und DMAPP existieren. Diese Annahme wurde durch Einbauversuche mit stabilisotopmarkierten Vorstufen bestätigt (Rohmer et al., 1993; Schwarz, 1994; Broers, 1994; Eisenreich et al., 1996; Lichtenthaler et al., 1997; Review: Eisenreich et al., 1998; Eisenreich et al. 2001; Rohmer, 1999). Der neu entdeckte Stoffwechselweg wird als alternativer Terpenbiosyntheseweg oder Desoxyxylulosephosphatweg bezeichnet, der von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat ausgeht und über 1-Desoxyxylulose-5-phosphat und 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyl-1-diphosphat verläuft (Abbildung 1.6).

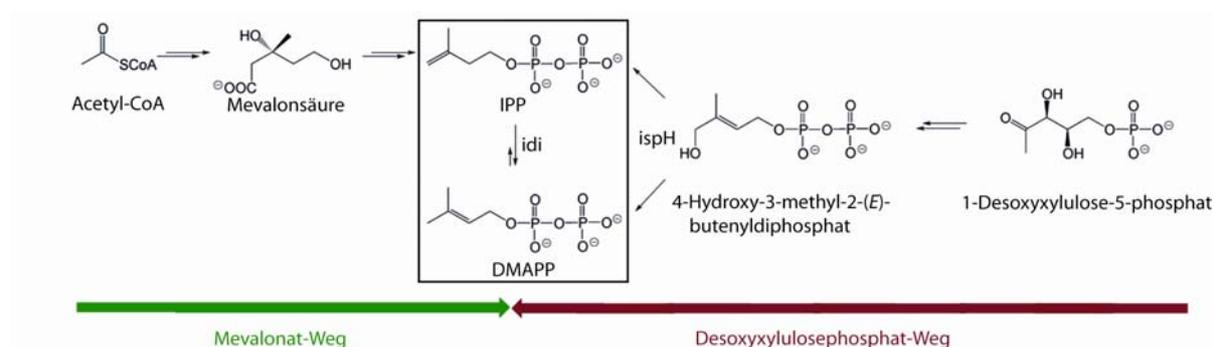


Abbildung 1.6 Mevalonatweg und Desoxyxylulosephosphatweg zur Synthese von IPP und DMAPP.

Die Verteilung der beiden Terpenbiosynthesewege in den Organismen wird derzeit intensiv unter Zuhilfenahme der heutzutage verfügbaren Genomsequenzen untersucht. Der Mevalonatweg wird von Archaeobakterien, Pilzen (z.B. Hefe), einigen Protozoen und Tieren verwendet (Disch und Rohmer, 1998b). Der größte Anteil der Bakterien, darunter zahlreiche

humanpathogene Vertreter mit Ausnahme von Staphylococcen und Streptococcen, und der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* benutzt den alternativen Terpenbiosyntheseweg (Eisenreich et al., 2003). In einigen Algen, Moosen, höheren Pflanzen und in Abhängigkeit vom Entwicklungszyklus der *Streptomyces* (Seto et al., 1996) konnte eine Koexistenz beider Stoffwechselwege nachgewiesen werden. In höheren Pflanzen findet man die Enzyme des Mevalonatweges im Cytosol und den Mitochondrien, während die des Desoxyxyluloseweges in den Plastiden lokalisiert sind (Review: Eisenreich et al., 1998, 2001; Rohdich et al., 2001). Der intrazelluläre Parasit *Listeria monocytogenes* benutzt beide Stoffwechselwege, während einigen primitiven parasitär lebenden Bakterien (z.B. Mykoplasma) Gene für beide Wege fehlen.

Die Enzyme des alternativen Terpenbiosyntheseweges sind hoch interessante Targets zur Entwicklung neuer Antiinfektiva, da die Bildung von Terpenen in Säugetieren ausschließlich über den Mevalonatweg verläuft. Auch die Entwicklung neuer Herbizide wird durch das Vorhandensein des Desoxyxylulosephosphatweges zur Synthese essentieller pflanzlicher Terpene (z.B. Carotine, Phytol) möglich.

Die reversible Umwandlung der beiden Terpenbausteine IPP und DMAPP wird durch das Enzym Isopentenylidiphosphat-Isomerase (Idi, EC 5.3.3.2) katalysiert. In manchen Bakterien und Protozoen sowie in den Plastiden von Pflanzen wird sowohl DMAPP als auch IPP aus 4-Hydroxy-3-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat über die IspH-katalysierte Reaktion im Desoxyxylulosephosphatweg gebildet (Abbildung 1.6).

In Organismen, die den Desoxyxylulosephosphatweg benutzen, ist somit die Idi nicht essentiell. Dies wird durch das Fehlen entsprechender Gene im Genom mancher dieser Organismen bestätigt (Tabelle 1.2) (Review: Eisenreich et al., 2004). In *Streptomyces* wurde eine Isopentenylidiphosphat-Isomerase ohne jegliche erkennbare Sequenzähnlichkeit mit den bis dahin beschriebenen Isopentenylidiphosphat-Isomerasen gefunden (Kaneda et al., 2001). Homologievergleiche führten zur Entdeckung möglicher Orthologe in den Genomen von Archaeobakterien und einigen gram-positiven Eubakterien (Tabelle 1.2). Die neu entdeckte Proteinfamilie wird als Isopentenylidiphosphat-Isomerase Typ-II, während die zuvor gefundene als Typ-I bezeichnet wird, die vor allem in Eukaryonten und vielen Bakterien vorkommt. Der Sequenzvergleich zeigt, dass die Isomerase Typ-II in vielen humanpathogenen Keimen auftritt. Somit erscheinen für die Entwicklung von Inhibitoren dieser Enzymklasse hauptsächlich Organismen als geeignet, die IPP ausschließlich über den Mevalonatweg synthetisieren, und für die damit eine Idi essentiell ist. Zahlreiche

humanpathogene Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus pneumoniae*, benutzen zur Terpenbiosynthese den Mevalonatweg zusammen mit der Isomerase Typ-II. Da bei Mensch, Tier und Pflanze keine Isomerasen vom Typ-II auftreten, sind somit bei der Behandlung mit Typ-II-Inhibitoren keine oder nur sehr geringe Nebenwirkungen zu erwarten. Die in Tabelle 1.2 angegebene Klassifizierung verschiedener Spezies berücksichtigt den verwendeten Terpenbiosyntheseweg und die An- bzw. Abwesenheit der Gene für das Protein Idi-I und Idi-II.

Tabelle 1.2 Klassifizierung von Mikroorganismen aufgrund der Verteilung der Isoprenbiosynthesewege und der *idi*-Gene (+: Anwesenheit der entsprechenden Gene im Genom; -: Abwesenheit der entsprechenden Gene im Genom).

	Desoxyxylulosephosphat-Weg	Mevalonat-Weg	Idi-I	Idi-II
Klasse 1 (Desoxyxylulosephosphatweg + Isomerase Typ-I)				
<i>Corynebacterium</i> sp.	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-
<i>Mycobacterium</i> sp.	+	-	+	-
<i>Salmonella</i> sp.	+	-	+	-
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	+	-
<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	+	-
Klasse 2 (Desoxyxylulosephosphatweg + Isomerase Typ-II)				
<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	+
<i>Chlorobium tepidum</i>	+	-	-	+
<i>Deinococcus radiodurans</i>	+	-	-	+
<i>Mesorhizobium loti</i>	+	-	-	+
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	+	-	-	+
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	+	-	-	+
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	+	-	-	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	-	-	+
Klasse 3 (Mevalonatweg + Isomerase Typ-I)				
<i>Coxiella burnetii</i>	-	+	+	-

	Desoxyxylulose- phosphat-Weg	Mevalonat- Weg	Idi-I	Idi-II
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+	-
Klasse 4 (Mevalonatweg + Isomerase Typ-II)				
<i>Borrelia burgdorferi</i>	-	+	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	+
<i>Lactobacillus</i> sp.	-	+	-	+
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	-	+	-	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	+	-	+
<i>Streptococcus</i> sp.	-	+	-	+
Klasse 5 (Desoxyxylulosephosphatweg + keine Isomerase)				
<i>Aquifex aeolicus</i>	+	-	-	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	+	-	-	-
<i>Treponema pallidum</i>	+	-	-	-
<i>Thermotoga maritima</i>	+	-	-	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	+	-	-	-
Klasse 6 (Desoxyxylulosephosphatweg + Mevalonatweg + Isomerase Typ-II)				
<i>Listeria</i> sp.	+	+	-	+

Der Reaktionsmechanismus der Isopentenylidiphosphat-Isomerase wurde am Enzym aus Hefe und *Escherichia coli* untersucht (Leyes et al., 1999). Die Reaktion verläuft über eine antarafaciale (1,3)-Übertragung von Wasserstoff, bei der IPP protoniert und der kationische Übergangszustand deprotoniert wird (Abbildung 1.7). Mittels deuteriertem IPP konnte NMR-spektroskopisch gezeigt werden, dass bei der Bildung von DMAPP das Re-Proton an C-2 von IPP in das Lösungsmittel ausgewaschen wird.

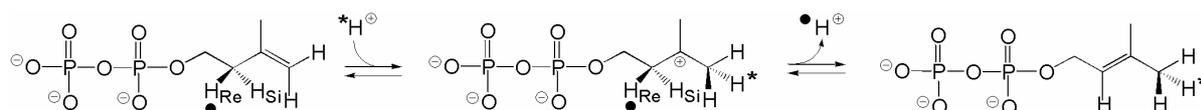


Abbildung 1.7 Stereochemischer Verlauf der Reaktion, katalysiert von Isopentenylidiphosphat-Isomerase Typ-I.

Die durch Röntgenkristallographie aufgeklärte Struktur der Isopentenylidiphosphat-Isomerase Typ-I (Wouters et al., 2003a; Wouters et al., 2003b) aus *E. coli* im Komplex mit Inhibitoren lässt den Ablauf der Reaktion wie folgt vermuten (Abbildung 1.8). An das Carboxylsäure-Sauerstoffatom von Glu-116 wird Zn^{2+} koordinativ gebunden (Carrigan und Poulter, 2003). Dadurch erfolgt eine erleichterte Abspaltung eines Protons von Glu-116 unter möglicher Mitwirkung der Hydroxylgruppe von Tyr-104. In IPP wird die Re-Seite der Doppelbindung vom Proton angegriffen, und es entsteht ein Allylkation im Übergangszustand, wobei eine Stabilisierung der positiven Ladung durch das benachbarte Trp-161 stattfindet. Das Re-Proton an C-2 des Übergangszustands wird anschließend an das Thiolatom von Cys-67 übertragen.

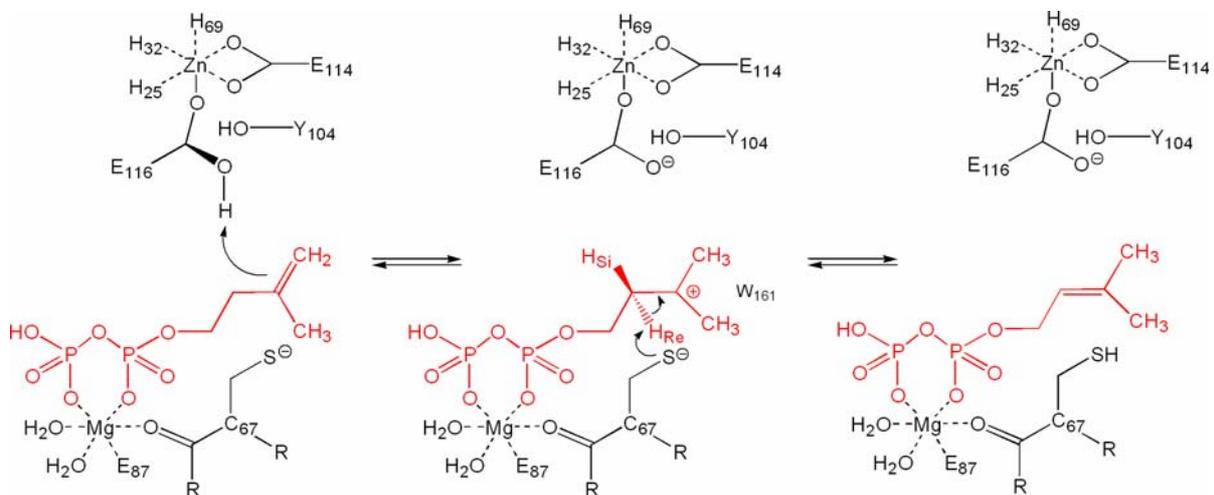


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Isopentenylidiphosphat-Isomerase Typ-I aus *Escherichia coli* und vermuteter Ablauf der katalysierten Reaktion.

Die durch Röntgenkristallographie im Komplex mit FMN gelöste Struktur der Isomerase vom Typ-II aus *Bacillus subtilis* (Steinbacher et al., 2003) zeigt keinerlei Ähnlichkeit mit Strukturen von Isomerasen Typ-I. Außerdem katalysieren Isomerasen vom Typ-II die reversible Umwandlung von IPP in DMAPP in Anwesenheit zweiwertiger Kationen, FMN und NADPH oder NADH, während Isomerasen vom Typ-I kein NADPH oder NADH zur Aktivität benötigen. Der mechanistische Verlauf der von der Idi-II katalysierten Isomerisierungsreaktion bleibt durch diese strukturellen Unterschiede, die verschiedenen Abhängigkeiten von Cofaktoren und das Fehlen konservierter Cysteinreste in den Aminosäuresequenzen, wie sie beim Typ-I vorkommen, offen.

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter Zuhilfenahme der Methode der Störung und Relaxation der Kohlenstoffwechsel in *Listeria monocytogenes* retrobiosynthetisch über NMR-Spektroskopie beschrieben werden. Die für die Virulenz des Bakteriums verantwortlichen Gene sind bekannt. Insbesondere der Virulenzfaktor PRFA spielt bei der Infektion einer Wirtszelle eine entscheidende Rolle. Die Untersuchung des Einflusses von PRFA auf die Aminosäurebiosynthese in *Listeria monocytogenes* war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Mit Hilfe von Einbauexperimenten in *Drosophila melanogaster* und in ein Weißes Neuseelandkaninchen sollte gezeigt werden, dass sich der Kohlenhydratstoffwechsel höherer Tiere qualitativ wie auch quantitativ NMR-spektroskopisch abbilden lässt.

Die neu entdeckte Isopentenylidiphosphat-Isomerase vom Typ-II, die sich sowohl strukturell wie auch hinsichtlich der benötigten Cofaktoren von der bis dahin bekannten Idi-I unterscheidet, sollte biochemisch charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war die Aufklärung der Stereochemie der von der Idi-II katalysierten Reaktion.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den kommerziellen Anbietern Riedel-de Haën (New Jersey, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) bezogen.

Kommerziell erworbene stabilisotopmarkierte Verbindungen:

Die stabilisotopmarkierten Verbindungen [U- $^{13}\text{C}_6$]Glukose, [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetat und [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Laktat wurden geliefert von Campro Scientific GmbH (Berlin, Deutschland), Omicron (Indiana, USA) oder Cambridge Isotope (Massachusetts, USA).

Synthese der Substrate für die Isopentenylidiphosphat-Isomerase:

Die Synthesen der Substrate Isopentenylidiphosphat, Dimethylallyldiphosphat und [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$]Dimethylallyldiphosphat wurde von Dr. Sabine Amslinger am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Lösungsmittel für Analytik und präparative Isolierung von Naturstoffen:

Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und die an der HPLC eingesetzten Laufmittel filtriert und entgast.

NMR-Lösungsmittel:

Als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurden die in Tabelle 2.1 zusammengefassten Verbindungen eingesetzt.

Tabelle 2.1 Zusammenfassung der als deuterierte Lösungsmittel bei der NMR-Spektroskopie eingesetzten Verbindungen.

Lösungsmittel	Deuterierungsgrad	Hersteller, Stadt, Land
Methyl- <i>d</i> 3 Alkohol- <i>d</i> 1 (CD ₃ OD),	99,8 Atom % D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Deuteriumchlorid (DCl)	37 wt. % Lösung in D ₂ O, 99,5 Atom % D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdeuteroxid (NaOD),	40 wt. % Lösung in D ₂ O, 99,9 + Atom % D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Deuteriumoxid (D ₂ O),	99,9 Atom % D	euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
Chloroform D (CDCl ₃)	99,8 Atom % D	euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich

2.1.2 Kulturmedien**Medium zur Zellanzucht von *Escherichia coli*:**

Die Zellen von *Escherichia coli* wurden in Luria-Bertani-Medium angezogen.

Die der Resistenz des Klons entsprechenden Antibiotika wurden in das erkaltete Medium gegeben (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Zusammenfassung der verwendeten Medien und deren Vorschriften zur Zellanzucht von *Escherichia coli*.

Medium	Vorschrift
LB(Luria Bertani)-Medium	10 g Caseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl gelöst in 1 l deionisiertem Wasser autoklavieren (121 °C, 1,3 bar, 25 min)
LBamp-Medium	180 mg Ampicilin (5 mM) auf 1 Liter autoklaviertes LB-Medium
LBampKan-Medium	180 mg Ampicilin (5 mM) 50 mg Kanamycin (80 µM) auf 1 Liter autoklaviertes LB-Medium

Medium zur Anzucht von *Drosophila melanogaster*:

Das zur Anzucht von *Drosophila melanogaster* eingesetzte Medium wurde modifiziert nach Roberts, D.B. (1998) in *Drosophila: A Practical Approach*, ed. Roberts, D.B. (IRL, Oxford) Seiten 1-38).

Das Kulturmedium bestand aus 80 g Maismehl, 10 g Sojamehl, 8 g Trockenhefe, 4 g Agar, 11 g Rübensirup und 40 g Malzextrakt.

Die Mischung wurde bei 121°C und 1,3 bar 25 Minuten lang autoklaviert. In diese Lösung wurden [U-¹³C₆]Glukose, 6,3 ml Propionsäure und 750 mg Methyl-para-hydroxybenzoesäure als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben.

Medium zur Anzucht von *Listeria monocytogenes*:

Die Anzucht der Bakterien-Stämme erfolgte am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg und wurde von Dr. Jörg Slaghuis durchgeführt. Das Welshimer Minimalmedium (MWB Minimalmedium) enthielt 0,96 g natürlich ¹³C-angereicherte Glukose, 0,04 g [U-¹³C₆]Glukose, 0,66 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,64 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,04 g

Magnesiumsulfat, 10 mg Eisen-(III)-citrat, 0,01 g Leucin, 0,01 g Isoleucin, 0,01 g Valin, 0,01 g Methionin, 0,01 g Arginin, 0,01 g Cystein, 0,06 g Glutamin, 0,01 g Histidin, 0,05 mg Riboflavin, 0,1 mg Thiamin, 0,05 mg Biotin und 0,5 µg Thiooctinsäure in einem Volumen von 100 ml. Dieses wurde in 10 l MWB-Medium überführt, welches 4,0 g [U-¹³C₆]Glukose (99,9 % ¹³C-Anreicherung) und 96 g Glukose mit natürlicher Häufigkeit von ¹³C (1,1 % ¹³C-Anreicherung) enthielt.

2.1.3 Trennmedien

Säulenchromatographie

Dowex 50WX8 (200-300 mesh); Serva (Heidelberg, Deutschland)

Dowex 1X8 (100-200 mesh); Serva (Heidelberg, Deutschland)

Dowex 1X8 (200-300 mesh); Serva (Heidelberg, Deutschland)

Kieselgel 60; Merck (Darmstadt, Deutschland)

Chelating Sepharose für Nickel-Säule; Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)

Vorbereitung von Dowex 50WX8 (Kationenaustauscher, H⁺-Form):

Das Dowex 50WX8-Material (H⁺-Form) (ungefähr 120 g) wurde für drei Stunden in 400 ml 2 M Natronlauge belassen. Das Harz wurde anschließend mit destilliertem Wasser pH-neutral gewaschen, mehrere Stunden in 400 ml 3 M HCl suspendiert und wiederum mit destilliertem Wasser neutralisiert. Nach erneuter Aufnahme in 400 ml 3 M HCl und mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser war das Harz einsatzfähig.

Vorbereitung von Dowex 50WX8 (Kationenaustauscher, NH₄⁺-Form):

Das Dowex 50WX8-Material (NH₄⁺-Form) (ungefähr 120 g) wurde für drei Stunden in 400 ml 2 M Natronlauge belassen. Das Harz wurde anschließend mit destilliertem Wasser pH-neutral gewaschen, für drei Stunden in 400 ml 3 M HCl suspendiert und wiederum mit destilliertem Wasser neutralisiert. Nach erneuter Aufnahme in 400 ml 2 M NH₄HCOO-Lösung für ungefähr 15 Stunden und mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser war das Harz einsatzfähig.

Vorbehandlung von Dowex 1X8 (Anionenaustauscher, Formiat-Form):

Das Dowex 1X8-Material (Cl-Form) (ungefähr 120 g) wurde für zwei Stunden in 400 ml 1 M HCl belassen. Das Harz wurde anschließend mit destilliertem Wasser pH-neutral gewaschen, für eine Stunde in 400 ml 1 M NaOH suspendiert und wiederum mit destilliertem Wasser neutralisiert. Nach erneuter Aufnahme in 400 ml 2 M NH_4HCOO -Lösung für ungefähr 15 Stunden und mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser war das Harz einsatzfähig.

Dünnschichtchromatographie:

Cellulose (20 x 20 cm, auf PE); Schleicher & Schuell MicroScience GmbH (Dassel, Deutschland)

Kieselgel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm, auf Aluminium); Merck (Darmstadt, Deutschland)

HPLC:

RP 18 Säule, Lichtrosorb (präparativ, 250 x 4,5 cm); YMC Europe GmbH (Schermbach, Deutschland)

Nucleosil SB 10 (präparativ); Macherey und Nagel (Düren, Deutschland)

Rezex RPM Monosaccharid-Blei-Säule, Phenomenex (Kalifornien, USA)

Aminopac PA 10 (Durchmesser 2 mm), Dionex (Idstein, Deutschland)

Carbopac PA 10 (Durchmesser 4 mm), Dionex (Idstein, Deutschland)

2.1.4 Reagenzien

Die Tabelle 2.3 zeigt die verwendeten Puffer bzw. Lösungen mit ihrer Zusammensetzung und ihrem Einsatzgebiet.

Tabelle 2.3 Verwendete Puffer bzw. Lösungen mit ihren Vorschriften und ihrem Einsatzbereich.

Lösung/Puffer	Vorschrift	Einsatzbereich
Acrylamid-Lösung	38,9 % (G/V) Acrylamid 1,2 % (G/V) Bisacrylamid	SDS-Gel-Elektrophorese
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS)	10 % APS-Lösung	SDS-Gel-Elektrophorese
Bradford-Reagenz	25 mg Serva Blue G in 11,7 ml Ethanol gelöst 25 ml 85 %iges H ₃ PO ₄ auf 250 ml mit H ₂ O auffüllen, 15 h rühren, filtrieren und bei 4 °C lichtgeschützt lagern Eichkurve wird mit BSA-Lösung (Proteinstandard) erstellt.	Bestimmung der Proteinkonzentration
Bromphenolblau-Lösung	0,25 % (G/V)	SDS-Gel-Elektrophorese
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (G/V) Coomassie-Blue R-250 45 % (V/V) Methanol 9 % Eisessig	SDS-Gel-Elektrophorese
Färbelösung	5 g Coomassie Brilliant Blue G-250 454 ml Methanol 454 ml destilliertes Wasser 92 ml Eisessig	SDS-Gel-Elektrophorese
Elektrophoresepuffer für Polyacrylamidgele	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (G/V) SDS	SDS-Gel-Elektrophorese

Lösung/Puffer	Vorschrift	Einsatzbereich
Entfärber I	50 % (V/V) Methanol 10 % (V/V) Eisessig	SDS-Gel-Elektrophorese
Entfärber II	30 % (V/V) Methanol 10 % (V/V) Eisessig	SDS-Gel-Elektrophorese
Ninhydrinreagenz (Jork et al., 1998)	3 mg Ninhydrin in 100 ml Butanol	Anfärben der Aminosäuren nach Trennung über Dünnschichtchromatographie
Proteinaufschlusspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 mg/ml DNase I 30 µl/ml PMSF-Lösung	Aufschluss der bakteriellen Zellen
Chromatographie-Puffer A zur Proteinreinigung	100 mM Tris 500 mM NaCl 20 mM Imidazol Lösung mit 12 M HCl auf pH 8,0 eingestellt, filtriert und entgast	Chromatographische Reinigung des rekombinanten Proteins Idi-2
Chromatographie-Puffer B zur Proteinreinigung	100 mM Tris 500 mM NaCl 500 mM Imidazol Lösung mit 12 M HCl auf pH 8,0 eingestellt, filtriert und entgast	Chromatographische Reinigung des rekombinanten Proteins Idi-2
Trenngel (8 %)	2 ml Acrylamidlg. (40 %) 2,5 ml Trennpuffer 5,5 ml Wasser bidest. 50 µl APS (10 %) 5 µl TEMED (90-100 %)	SDS-Gel-Elektrophorese

Lösung/Puffer	Vorschrift	Einsatzbereich
Sammelgel (4 %)	0,5 ml Acrylamidlg. (40 %) 2,5 ml Sammelgelpuffer 2,0 ml Wasser entgast 50 µl APS (10 %) 5 µl TEMED (90-100 %)	SDS-Gel-Elektrophorese
Pefabloc		Protease-Inhibitor bei Zellaufschluss
Sammelgelpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,2 % (G/V) SDS	SDS-Gel-Elektrophorese
SDS-Probenauftragspuffer	30 % (V/V) Glycerin 10 % (G/V) Saccharose 5 % (G/V) SDS 3 % (V/V) 2-Mercapto- ethanol 0,02 % (G/V) Bromphenolblau 60 mM Tris-HCl, pH 6,8	SDS-Gel-Elektrophorese
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % (G/V) SDS	SDS-Gel-Elektrophorese

2.1.5 Proteinmarker

Zur Analyse der nach der chromatographischen Reinigung des Proteins Idi-II erhaltenen Fraktionen wurde ein Proteinmarker (Tabelle 2.4) auf das SDS-Gel aufgetragen. Es wurde sowohl ein gekaufter als auch ein im Labor hergestellter Marker eingesetzt.

Tabelle 2.4 Zusammenfassung der bei der SDS-Gelelektrophorese verwendeten Proteinmarker.

Marker	Bandengröße [kDa]	Bezugsquelle
Protein-Marker 1	66; 45; 30; 20; 13	Laboreigener Protein-Marker
Protein-Marker 2	66; 45; 36; 29; 24; 20,1; 14,2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.6 Klone

Die in dieser Arbeit verwendeten Klone sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

Tabelle 2.5 Zusammenfassung der verwendeten Klone.

Stamm	Exprimiertes Protein
M15[pREP4]pNCO113idi2	Idi-I
XL1pQE30idi2	Idi-II
M15[pREP4]pQE30idi2	Idi-II

2.1.7 Enzyme

Die in Tabelle 2.6 aufgeführten käuflichen Enzyme wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) oder Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) erworben. Die nicht kommerziell erhältlichen Enzyme wurden am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie von Dr. Felix Rohdich rekombinant hergestellt.

Tabelle 2.6 Zusammenfassung der verwendeten Enzyme.

Enzym	EC-Nummer	Herkunft
Laktatdehydrogenase aus Schweinemuskel	1.1.1.27	Boehringer Mannheim, Deutschland
DNAse I	3.1.21.1	Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland
Idi-I aus <i>Escherichia coli</i>	5.3.3.2	Dr. Felix Rohdich
Idi-II aus <i>Bacillus subtilis</i>	5.3.3.2	Dr. Felix Rohdich

2.1.8 Organismen

Drosophila melanogaster

Der Stamm *Drosophila melanogaster* Oregon R* wurde vom Lehrstuhl für Genetik des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie (Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

New Zealand White Rabbit (Weißes Neuseelandkaninchen)

Das Kaninchen, ein vier Jahre alter männlicher Weißer Neuseeländer (New Zealand White Rabbit) mit einem Körpergewicht von 3,7 kg, wurde am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie and Toxikologie der Ludwig-Maximilian-Universität München (München, Deutschland) gehalten. Das Tier wurde von der Firma Interfauna (Tuttlingen, Deutschland) bezogen.

Listeria monocytogenes

Es wurden *Listeria monocytogenes* EGD (Serovar 1/2a, Wildtyp) von S.H.E. Kaufmann (Berlin, Deutschland) sowie die Mutanten *Lm* Δ *prfA* und *Lm* Δ *prfA*pPRFA* (Tabelle 2.7) untersucht. Die Anzucht der Zellen wurde von Dr. Jörg Slaghuis am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die Mutante *Lm* Δ *prfA* trägt eine *in*

frame-Deletion des Gens *prfA*, welches für den Transkriptionsfaktor PrfA für mehrere Virulenzgene codiert (Böckmann et al., 1996). Der Stamm *Lm* Δ *prfA*pPRFA* wurde durch Transformation mit einem Multicopy-Plasmid mit dem Gen *prfA** in die deletierte Mutante hergestellt. Dieses Gen codiert wegen des Austauschs G145S für eine grundlegend aktive Version des Proteins PrfA (benannt mit PrfA*) (Ripio et al., 1997). Aufgrund der erhöhten Anzahl von *prfA**-Genkopien wird das Protein PrfA* vom Stamm *Lm* Δ *prfA*pPRFA* überexprimiert.

Tabelle 2.7 Zusammenfassung der verwendeten Stämme von *Listeria monocytogenes* (nach Diplomarbeit Johanna Bussemer, 2004).

Stamm	Eigenschaften	Quelle
EGD	Wildtyp Stamm EGD, Serovar 1/2a	Glaser <i>et al.</i> , 2001
EGD Δ <i>prfA</i>	Δ <i>prfA</i> Stamm EGD, Serovar 1/2a, <i>in frame</i> Mutation des genomischen <i>prfA</i> -Gens	Böckmann <i>et al.</i> , 1997
Δ <i>prfA</i> pPRFA*	Δ <i>prfA</i> mit pERL-Plasmid, konstitutiv PrfA- überexprimierender Stamm (pPRFA*); Stamm EGD, Serovar 1/2a	Marr, Dissertation

2.2 Geräte

2.2.1 Piccolo

Die Reinigung des rekombinanten Proteins Idi-2 wurde auf einer Nickel-Chelating Sepharose-Säule bei 10 °C durchgeführt. Die Säule wurde an eine Piccolo-Anlage angeschlossen, die mit den folgenden Bestandteilen von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) ausgestattet war:

Fraktionssammler GradiFrac

Schlauchpumpe Pump P-1

Mischer Mixer 5 mPa

Schreiber Rec102

Photometer: Optical Unit UV-1

Control Unit UV-1

2.2.2 Gefriertrocknung

In wässriger Lösung befindliche Substanzen wurden mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 von Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode/Harz, Deutschland) mit angeschlossener Chemie-Hybrid-Pumpe RC5 von Vacuubrand (Wertheim, Deutschland) getrocknet.

Anlagensteuerung LDC-1M

Elektrischer Anschluss 230 V, 50 Hz

Temperatur 50 °C

Druck 0,2 mbar

2.2.3 HPLC

Aminosäuren wurden mit dem BioLC-System von Dionex (Idstein, Deutschland), bestehend aus dem Autosampler AS 50, der amperometrischen Messzelle ED 50 und der Gradientenpumpe GS 50, chromatographisch analysiert. Die Trennsäule Aminopac PA 10 mit einem Durchmesser von 2 mm wurde mit dem Säulenofen AS 50 temperiert.

2.2.4 Ultraschallgerät

Bakterienzellen von *Escherichia coli* wurden mit Hilfe des Ultraschallgeräts Branson Sonifier B-12A mit „L“-Konverter von Branson SONIC Power Company (Connecticut, USA) aufgeschlossen. Mit der Kontrollstellung 4 wurde die Leistung des Gerätes auf 90 % eingestellt.

2.2.5 French-Press

Die Zellen von *Escherichia coli* wurden mit Hilfe des Zellaufschlussgeräts Basic Z Model von Constant Systems LTD (Daventry, England) mit dem angeschlossenen Umwälzthermostaten Haake C40 von Thermo Electron Corporation (Massachusetts, USA) bei einem Druck von 1,8 kbar und einer Temperatur von 8 °C aufgeschlossen.

2.2.6 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Messung von Absorptionsspektren und zur Bestimmung von Extinktionskoeffizienten kam ein Ultrospec 2000 Spektrometer von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) zum Einsatz.

2.2.7 NMR-Spektroskopie

^1H -, ^2H - und ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie wurde mit Geräten von Bruker (Karlsruhe, Deutschland) mit den Magnetfeldstärken von 250 MHz, 360 MHz und 500 MHz durchgeführt. Das hauptsächlich eingesetzte 500 MHz-Spektrometer lieferte bei 11,75 Tesla ^1H -Resonanzfrequenzen von 500,13 MHz und ^{13}C -Resonanzfrequenzen von 125,77 MHz.

Die Messung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte mit Hilfe eines ^{13}C -/ ^1H -Dualprobenkopfes. Die zweidimensionalen Experimente mit Detektion von Protonen wurden unter Benutzung eines ^1H -/ ^{13}C -/ ^{15}N -Tripelresonanzprobenkopfes durchgeführt.

Die Aufnahme sowie die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR 1.3, bzw. 1D/2D-WINNMR 5.0 von Bruker (Karlsruhe, Deutschland). NMR-Signale wurden mit der Software NMRSIM von Bruker (Karlsruhe, Deutschland) simuliert.

2.2.8 Analytische Ultrazentrifuge

Zur hydrodynamischen Untersuchung des Proteins Idi-2 diente die analytische Ultrazentrifuge Optima XL-1 von Beckman Coulter (Kalifornien, USA). Die Zentrifuge war mit Interferenz- und UV-Optik ausgestattet. Doppelsektorzellen mit Aluminiumgehäuse und Saphirfenstern wurden mit Probe und Referenz befüllt und die Sedimentationsläufe bei einer Drehzahl von 60 000 Upm bei 20 °C unter Vakuum durchgeführt.

2.2.9 Massenspektrometrie

Das Protein Idi-2 wurde mit einem Biflex III MALDI-TOF Massenspektrometer von Bruker (Karlsruhe, Deutschland) von Helmut Krause am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität München massenspektroskopisch analysiert.

2.2.10 Sequenzanalyse

Die Aminosäuresequenz der Isopentenylidiphosphat-Isomerase vom Typ-II wurde durch die automatische Didesoxynukleotid-Methode mittels eines 377 Prisma-Sequenzers von Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim, Deutschland) von Dr. Peter Köhler am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München bestimmt. N-terminale Peptidsequenzen wurden durch Pulsed-Liquid-Mode PE Biosystems Model 492 von Perkin-Elmer erhalten.

2.2.11 Refraktometrie

Zur refraktometrischen Detektion der chromatographisch gereinigten Glukose wurde das Differentialrefraktometer GAT LCD 201 von Gamma Analysen Technik GmbH (Bremerhaven, Deutschland) eingesetzt.

2.2.12 Glove-Box

Die verwendete Glove-Box (160 cm x 80 cm x 116 cm) ist eine Eigenkonstruktion des Lehrstuhls für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München. In der Box wurde unter Formiergas-Atmosphäre (95 % N₂ und 5 % H₂) von Air Liquid (Düsseldorf, Deutschland) mit Vakuumpumpe Speedivac von Edwards Hochvakuum GmbH (Frankfurt/Main, Deutschland) und Platin-Katalysatoren von Coy Laboratory Products Inc. (Michigan, USA) gearbeitet.

2.2.13 FPLC

Zur anaeroben Reinigung des rekombinanten Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis* kam die FPLC-Anlage LKB-GP 10 von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) zum Einsatz.

2.2.14 Sonstige Geräte

Die Tabelle 2.8 fasst die sonstigen in dieser Arbeit eingesetzten Geräte zusammen.

Tabelle 2.8 Zusammenfassung der sonstigen in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenfeinwaage	1602 MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
DC-Kammer	-	Desaga GmbH, Wiesloch, Deutschland
Elektrophoresekammer	H6 „Baby gel“ mit Spannungsquelle LKB-GPS 200/400	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Universalgerät für UV- 254/366 und Tageslicht	-	Desaga, Heidelberg, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller
Photodokumentation	-	ITF Labortechnik GmbH; Wasserburg, Deutschland
Fraktionssammler	SuperFrac	Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland
Kühlzentrifuge	GS-15R	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
Magnetheizrührer	-	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Membran-Vakuumpumpe	-	Greiffenberger Antriebs- technik, Marktredwitz, Deutschland
pH-Meter	E603 mit Standard- Glaselektrode	Deutsche Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Rotationsverdampfer	Membranpumpe- Vakuumpumpe Rotavator RE 120 Wasserbad	Vacuumbrand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland Büchi Labortechnik, Essen, Deutschland Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Trockenschrank	-	Bachofer, Weilheim/Teck, Deutschland
Wasserbad	Type 3024	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Schüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Zentrifugen	Sorvall RC2B, RC5B und RC5B Plus mit den Rotoren GS3, GSA und SS34, Z 230 H	DuPont Instruments, Bad Homburg, Deutschland Hermle, Gosheim, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge	A14	Jouan (Thermo Electron Corporation), Massachusetts, USA

Gerät	Modell	Hersteller
Waagen	SCALTEC SBA 32, max. 120 g, d = 0,0001 g SCALTEC SBA 52, max. 2200 g, d = 0,01 g	Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Sanoklav	Wolf, Geislingen, Deutschland
Blutzuckermessgerät	Accu Chek sensor comfort	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Heizblock	DRI.BLOCK DB-2A	Techne, Staffordshire, Großbritannien

2.3 Methoden

2.3.1 Anzucht der Versuchsorganismen

2.3.1.1 *Listeria monocytogenes*

Die Anzucht der Stämme *Listeria monocytogenes* EGD, *AprfApPRFA** und *AprfA* erfolgte am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg durch Dr. Jörg Slaghuis.

Die Stämme wurden in 100 ml modifiziertem Welshimer Minimalmedium (MWB) (Premaratne et al., 1991) bis zur späten logarithmischen Phase angezogen. Das Medium enthielt eine Mischung aus 0,96 g Glukose mit einer natürlichen ^{13}C -Anreicherung, 0,04 g $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose, 0,66 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,64 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,04 g Magnesiumsulfat, 10 mg Eisen-(III)-citrat, 0,01 g Leucin, 0,01 g Isoleucin, 0,01 g Valin, 0,01 g Methionin, 0,01 g Arginin, 0,01 g Cystein, 0,06 g Glutamin, 0,01 g Histidin, 0,05 mg Riboflavin, 0,1 mg Thiamin, 0,05 mg Biotin und 0,5 μg Thiooctylsäure. Diese 100 ml Kultur wurde in 10 l MWB-Medium überführt, das aus 4,0 g $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose (99,9 % ^{13}C -Anreicherung) and 96 g Glukose mit natürlichem ^{13}C -Gehalt (1,1 % ^{13}C -Anreicherung) zusammengesetzt war. Die Zellkultur wurde aerob bei 37 °C bis zur stationären Phase

inkubiert. Das Sterilisieren der Kultur wurde durch Zugabe von Natriumazid bis zu einer Endkonzentration von 10 mM gewährleistet. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation geerntet und dreimal mit phosphatgepufferter Saline gewaschen. Die Lagerung des Zellpellets erfolgte bei 4 °C.

2.3.1.2 *Drosophila melanogaster*

Der Stamm *Drosophila melanogaster Oregon R** war während der Anzucht dem Tag-/Nachtrhythmus ausgesetzt. Die Fruchtfliegen wurden bei Raumtemperatur in kleinen (Durchmesser 6 cm, Höhe ca. 12 cm) mit Medium ca. 5 cm befüllten Plastikzylindern gehalten. Diese Gefäße wurden mit Papierfilter bestückt, um den Fliegen zusätzliche Bewegungsfläche zu bieten. Sobald das Medium in einem Probengefäß annähernd verbraucht war, wurde dieser Zylinder zum Ruhigstellen der Fliegen in einen Kühlschrank bei 4 °C gestellt. Anschließend wurden die Fruchtfliegen in eine Plastiktüte geschüttet und nach optisch sichtbaren Mutationen (z.B. abweichende Flügelfärbung, Augenfärbung, Größe) untersucht. Die mutierten Fliegen wurden abgetötet und die restlichen Insekten in ein neu mit Medium gefülltes Probengefäß geschüttet. Die Ernte der Fruchtfliegen erfolgte durch Abtöten der Insekten bei -20 °C.

2.3.1.3 Weißes Neuseelandkaninchen (New Zealand White Rabbit)

Das Kaninchen (*New Zealand White Rabbit*) wurde am Walther-Straub-Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Ludwig-Maximilian-Universität München gehalten.

2.3.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Identifikation der isolierten Aminosäuren aus *Listeria monocytogenes* wurden ausgewählte Fraktionen auf eine DC-Platte getüpfelt, und die Platte wurde in eine Kammer mit dem Laufmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser (50/20/30) gestellt. Die DC-Platte wurde mit Ninhydrinreagenz (Jork et al., 1998) besprüht und anschließend bei 100 °C 15 Minuten

entwickelt. Anhand von mitlaufenden Referenzsubstanzen konnten die Aminosäuren der einzelnen Fraktionen mit ihrem R_f -Wert zugeordnet werden.

2.3.3 Isolierung und Reinigung von Glukose

2.3.3.1 Aus *Drosophila melanogaster*

Die abgetöteten und gefrorenen Fliegen (18,4 g) wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert und die Zellmasse bei Raumtemperatur in 300 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wurde für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 300 ml Wasser suspendiert und nochmals für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt und zentrifugiert. Beide Zentrifugationen liefen bei 6000 Upm in einem GS3 Rotor bei 20 °C über eine Zeit von 30 Minuten ab. Die Extrakte wurden vereinigt und lyophilisiert.

Die Glukose wurde aus dem gewonnenen Extrakt über eine Rezex RPM Monosaccharid Blei-Säule isoliert und gereinigt. Die auf 75 °C temperierte Säule wurde mit Wasser unter einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min eluiert. Das Eluat wurde mittels eines Differential-Refraktometers detektiert. Das Retentions-Volumen der Glukose betrug 8,2 ml. Die Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

2.3.3.2 Aus Blutproben eines Weißen Neuseelandkaninchens (*New Zealand White Rabbit*)

Das Kaninchen wurde in einer Klemmbox fixiert. Nach Rasur der Ohren wurden die Venen freigelegt, mittels eines Butterfließ in das linke Ohr des Kaninchens gestochen und über einen Perfusor dem Tier 616 mg [$U\text{-}^{13}\text{C}_6$]Glukose, gelöst in 11 ml aqua ad injectabilia-steril, infundiert. Die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Blutproben wurden in Röhrchen gesammelt (Tabelle 2.9), die als Glykolyse- und Gerinnungshemmer NaF-Lösung (1 %, V/V) enthielten.

Zwischen den Blutentnahmen wurde dem Kaninchen Kochsalzlösung mit Heparin zugeführt. Dabei entsprach das Volumen der Kochsalzlösung dem Volumen der zuvor gezogenen Blutprobe.

Durch Zentrifugation der Probenröhrchen bei 4800 Upm über 15 Minuten bei 4 °C erfolgte die Trennung zwischen den Zellen und dem Blutplasma/–serum. Die Proteine wurden aus dem Serum durch Zugabe von Ethanol gefällt und anschließend über eine Zentrifugation bei 12000 Upm, 10 Minuten lang und bei 4 °C abgetrennt. Das Ethanol wurde über einen Rotationsverdampfer entfernt und der zurückgebliebene Feststoff mit Wasser aufgenommen.

Tabelle 2.9 Zeitpunkte der Blutentnahme und Volumina der Proben.

Zeitpunkt [min]	Blutvolumen [ml]
10	0,5
20	0,5
45	2,0
90	2,0
120	4,0
240	4,0

Glukose wurde durch Affinitätschromatographie mit einer Affigel Boronat Säule isoliert und gereinigt. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit 139 mM Ammoniaklösung. Die Säule wurde mit einer 265 mM Ameisensäure eluiert und Fraktionen mit je 1,5 ml gesammelt. Die Detektion der Glukose (Retentionsvolumen 3,0 ml) erfolgte durch ein Blutzuckermessgerät. Die gesammelten Glukose enthaltenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und auf einer Säule (0,7 x 4 cm) Dowex 50WX8 (H⁺-Form) gereinigt, die mit Wasser eluiert wurde. Das Retentionsvolumen der Glukose betrug 2,0 ml. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt.

2.3.4 Isolierung und Reinigung von Aminosäuren

Die Isolierung und Reinigung der Aminosäuren aus *Listeria monocytogenes* erfolgte nach der von Eichinger (1997) beschriebenen Methode, die von Christine Schwarz und Carmen Liebl vom Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie durchgeführt wurde.

Die Zellmasse wurde in 600 ml destillierten Methanol gelöst und unter Rückfluss eine Stunde gekocht und filtriert. Der Rückstand wurde in 300 ml Dichlormethan gelöst und 60 min unter Rückfluss gekocht. Die Mischung wurde filtriert, der Rückstand in 250 ml 1 M Natriumhydroxid suspendiert und die Mischung für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Neutralisation der Lösung durch Zugabe von 15 ml konzentrierter Salzsäure wurde das Protein durch 15 ml 25 % Trichloressigsäure gefällt. Nach der Zentrifugation der Mischung wurde das Pellet in 200 ml 6 M Salzsäure suspendiert, die 8 ml Thioglykolsäure enthielt. Im Anschluss an 24-stündiges Kochen unter Rückfluss und Schutzgasatmosphäre wurde die Mischung filtriert, am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen eingengt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 8 ml Wasser gelöst und anschließend einer Trennung über drei verschiedene Ionenaustauscher-Harze unterworfen.

Säule 1 mit Dowex 50WX8-Harz (H^+ -Form):

Die Säule (2 x 34 cm) diente zur Abtrennung der basischen Aminosäuren. Die gewählten Bedingungen führten zur Abtrennung der zuerst eluierenden sauren und neutralen Aminosäuren von Phenylalanin, Tyrosin, Lysin, Histidin und schließlich Arginin.

Nach dem Auftragen der oben beschriebenen konzentrierten Lösung wurde zunächst mit ca. 200 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde schrittweise mit je 1000 ml 0,2 M Ammoniumformiat (pH 4,5), 1000 ml 0,2 M Ammoniumformiat (pH 6,5) und 1500 ml 0,5 M Ammoniumformiat, (pH 6,5) eluiert. Lysin, Histidin und Arginin enthaltende Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert. Die Fraktionen der neutralen und sauren Aminosäuren wurden zusammen lyophilisiert und nach Lösen in 10 ml Wasser auf die Säule 2 aufgetragen.

Säule 2 mit Dowex 1X8 (Formiat-Form):

Die Säule (2 x 24 cm) wurde zur Abtrennung der unter den Elutionsbedingungen zuerst eluierenden neutralen Aminosäuren von Aspartat und Glutamat verwendet.

Die Elution der Säule erfolgte mit 150 ml destilliertem Wasser und anschließend mit 250 ml 10 mM Ameisensäure. Die Fraktionen von Glutamat und Aspartat wurden gesammelt und lyophilisiert. Die Fraktionen der neutralen Aminosäuren wurden zusammen lyophilisiert und nach Lösen in 10 ml Wasser auf die Säule 3 aufgetragen.

Säule 3 mit Dowex 50WX8 (H⁺-Form):

Die Säule (3 x 33 cm) diente zur Trennung der neutralen Aminosäuren, die in der Reihenfolge Serin/Threonin, Alanin/Glycin, Valin/Prolin, Isoleucin/Methionin und schließlich Leucin mit einem linearen Salzsäuregradienten eluiert wurden.

Die Säule wurde mit 100 ml Wasser gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0 auf 3 M Salzsäure (Gesamtvolumen 2 l) eluiert. Die Fraktionen wurden zusammen auf ein kleines Volumen am Rotationsverdampfer eingeeengt und lyophilisiert.

Cystein und Tryptophan werden unter diesen Reaktionsbedingungen weitgehend zerstört und können deshalb nicht bestimmt werden. Asparagin und Glutamin werden zu Aspartat und Glutamat umgewandelt.

Die Detektion der aminosäurehaltigen Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie mit Cellulose-Platten (Laufmittelzusammensetzung: 1-Butanol/Eisessig/Wasser: 4/1/1) unter Verwendung von Referenzsubstanzen und der Färbereaktion mit Ninhydrin. Die zusammengehörenden Fraktionen wurden vereinigt und bis zur weitgehenden Abtrennung von Ammoniumformiat lyophilisiert.

Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin wurden über eine präparative HPLC getrennt. Als Säule diente die RP-18-Lichtrosorb-Säule und als Fließmittel bidest. Wasser mit einer Flussgeschwindigkeit von 40 ml min⁻¹. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Das Retentionsvolumen von Tyrosin betrug 800 ml, das von Phenylalanin 1600 ml. Die erhaltenen Proben wurden im Vakuum eingeeengt und lyophilisiert.

2.3.5 NMR-Spektroskopie

Die Proben wurden in einem deuterierten Lösungsmittel aufgenommen und in 5-mm NMR-Röhrchen gefüllt. Eindimensionale Spektren wurden am mit 20 Hz rotierenden Röhrchen gemessen, während mehrdimensionale Experimente am ruhenden Röhrchen durchgeführt wurden. Die Messungen verliefen in der Regel bei einer Temperatur von 300 K.

Die Parametersätze zur Messung von ¹H-NMR-Spektren waren wie folgt: Senderfrequenz 500,13 MHz; 32 K Datensatz; 45° Pulswinkel 4 µs; spektrale Breite 5,5 Hz. Bei der Messung

der ^1H -Spektren wurde die Unterdrückung des Wassersignals bei 4,75 ppm durch eine Vorsättigung bei der niedrigstmöglichen Energiestufe erreicht.

Bei der Messung von ^{13}C -NMR-Spektren wurden folgende Parametersätze verwendet: Senderfrequenz 125,77 MHz; 32 K Datensatz; 30° Pulswinkel 3 μs ; spektrale Breite 5,5 Hz. Die zusammengesetzte Pulssequenz WALTZ sorgte dabei für eine ^1H -Entkopplung.

Vor der Fourier-Transformation wurde der Free Induction Decay (FID) mit 256 K Nullen aufgefüllt und mit einer Gauß-Lorentz-Funktion multipliziert. Die typischen Parameter dafür waren für gb 0,01 bis 0,4 und für lb -1 bis -5. Vor der Integration der Signale im Spektrum erfolgte eine Korrektur der Phase und der Basislinie.

2.3.6 Berechnung der ^{13}C -Anreicherungen

2.3.6.1 Berechnung der relativen ^{13}C -Anreicherung

In der ^{13}C -NMR-Spektroskopie liefert der Quotient aus den Integralen einer im Experiment ^{13}C -angereicherten Probe und einer Probe mit natürlichem ^{13}C -Gehalt die relative ^{13}C -Anreicherung für alle ^{13}C -Atome nach Gleichung 1. Beide Proben müssen dazu mit identischen Magnetfeldstärken spektroskopiert werden.

$$\%^{13}\text{C}_{rel.} = \frac{c_{I^*}}{c_I} \cdot \frac{1}{f} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 1}$$

$\%^{13}\text{C}_{rel.}$: relative ^{13}C -Anreicherung.

c_{I^*} : Integralintensität des ^{13}C -Signals einer künstlich angereicherten Probe im ^{13}C -NMR-Spektrum.

c_I : Integralintensität des ^{13}C -Signals im ^{13}C -NMR-Spektrum einer Probe mit natürlichem ^{13}C -Gehalt.

f: Kalibrierungsfaktor = kleinstes Ergebnis für $\frac{c_{I^*}}{c_I}$ in einer Probe.

2.3.6.2 Berechnung der absoluten ^{13}C -Anreicherung

Aufgrund der $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Kopplung zwischen dem Kohlenstoffisotop ^{13}C und dem an dieses Atom gebundenen Wasserstoffatom ^1H ergeben sich im ^1H -NMR-Spektrum die ^{13}C -Satelliten S1 und S2, benachbart zum Zentralsignal Z, deren Abstand der $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstante entspricht (Abbildung 2.1).

Das Zentralsignal Z repräsentiert den Anteil der Moleküle dieser Verbindung, die an dieser Position im Molekül das Kohlenstoffisotop ^{12}C tragen, und bei denen demnach keine $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Kopplung auftritt. Die Satelliten S1 und S2 stellen die Moleküle dar, bei denen dieses Kohlenstoffatom ^{13}C -markiert ist.

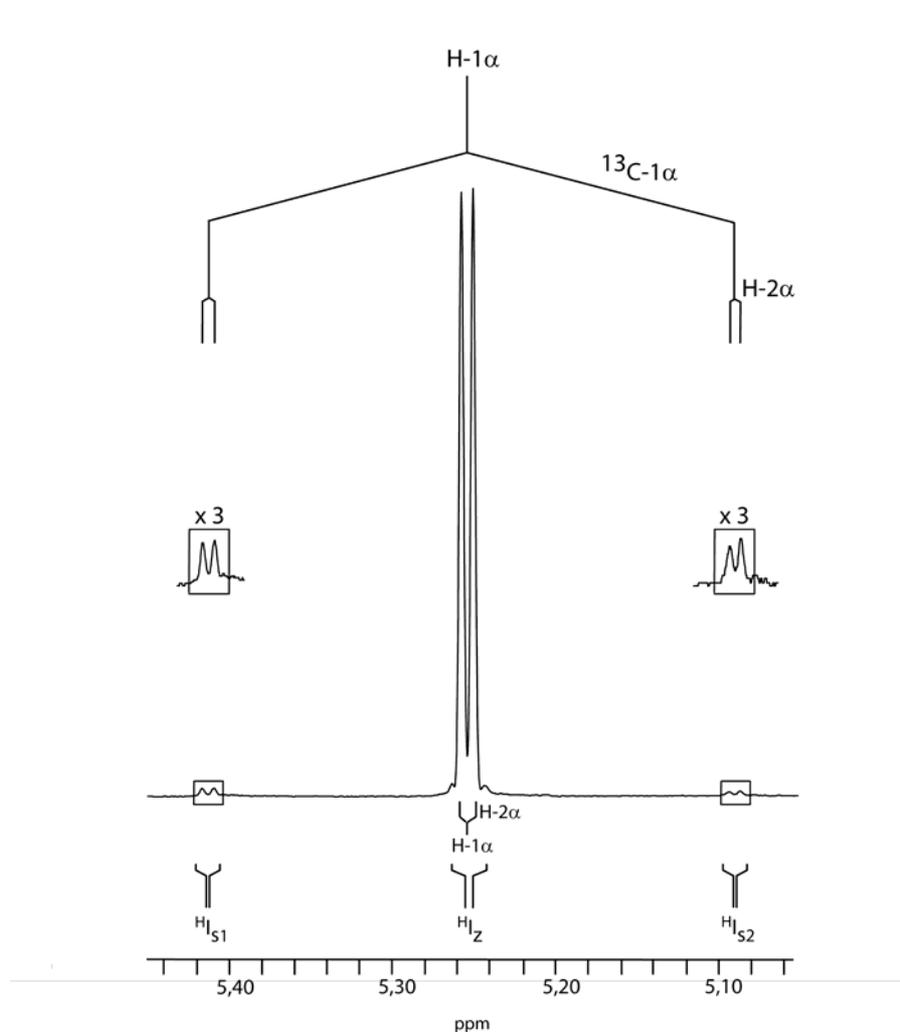


Abbildung 2.1 Das Signal für H-1 α im ^1H -NMR-Spektrum von Glukose, isoliert aus *Drosophila melanogaster*. Die Fliege wurde auf einem mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose angereicherten Medium kultiviert.

Die absolute ^{13}C -Anreicherung einzelner protonentragerender C-Atome lässt sich nach der Integration des Zentralsignals und der ^{13}C -Satelliten im ^1H -Spektrum aus Gleichung 2 berechnen.

$$\%^{13}\text{C}_{abs.} = \frac{H I_s}{H I_s + H I_z} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 2}$$

$\%^{13}\text{C}_{abs.}$: Absolute ^{13}C -Anreicherung.

$H I_s = H I_{s1} + H I_{s2}$: Summe der Integrale beider ^{13}C -Satelliten im ^1H -NMR-Spektrum.

$H I_z$: Integral des Zentralsignals im ^1H -NMR-Spektrum.

Die Berechnung der absoluten ^{13}C -Anreicherung eines beliebigen Kohlenstoffatoms C_x einer ^{13}C -markierten Verbindung erfolgt nach Gleichung 3, hergeleitet aus den Gleichungen 1 und 2. Der Wert der relativen ^{13}C -Anreicherung eines protonentragerenden C-Atoms C_+ nach Gleichung 1 dient dabei als Standardwert.

$$\%^{13}\text{C}_x = \frac{c I_x^*}{c I_x} \cdot \frac{\%^{13}\text{C}_+}{\frac{c I_+^*}{c I_+}} \quad \text{Gleichung 3}$$

$\%^{13}\text{C}_x$: Absolute ^{13}C -Anreicherung eines beliebigen Kohlenstoffatoms C_x einer ^{13}C -markierten Verbindung.

$c I_x^*$: Integral des ^{13}C -Signals im ^{13}C -NMR-Spektrum der ^{13}C -angereicherten Probe.

$c I_x$: Integral des ^{13}C -Signals im ^{13}C -NMR-Spektrum der Probe mit natürlichem ^{13}C -Gehalt.

$\%^{13}\text{C}_+$: Absolute ^{13}C -Anreicherung eines protonentragerenden Kohlenstoffatoms C_+ bestimmt aus dem ^1H -NMR-Spektrum nach Gleichung 2.

$c I_+^*$: Integralintensität von C_+ im ^{13}C -NMR-Spektrum der ^{13}C -angereicherten Probe.

$c I_+$: Integralintensität von C_+ im ^{13}C -NMR-Spektrum in der Probe mit natürlichem ^{13}C -Gehalt.

2.3.6.3 Berechnung der ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen

Aufgrund der ^{13}C - ^{13}C -Kopplung in mehrfach ^{13}C -markierten Verbindungen ergeben sich im ^{13}C -NMR-Spektrum ^{13}C -Satelliten S1 und S2, benachbart zum Zentralsignal Z (Abbildung 2.2). Der Abstand dieser Satelliten entspricht der für diese Kopplung charakteristischen Kopplungskonstante. Der prozentuale Anteil eines Satellitenpaares im ^{13}C -Spektrum wird durch den Quotienten der Summe der Signalintegrale der Satelliten zum Integral des Gesamtsignals bestimmt (Gleichung 4).

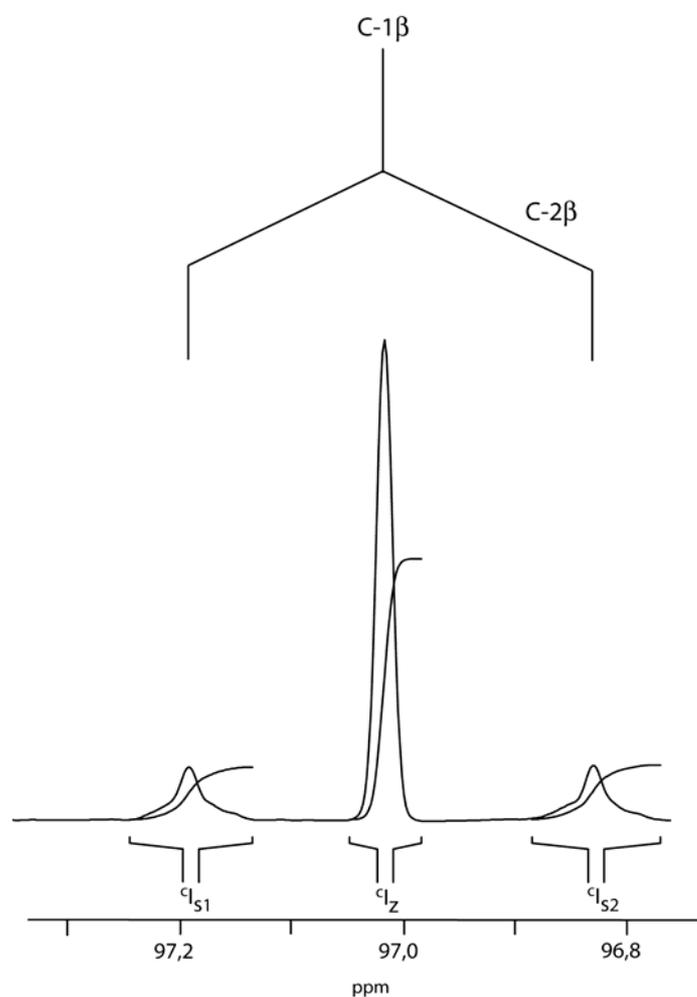


Abbildung 2.2 ^{13}C - ^{13}C -Kopplung zwischen den Kohlenstoffatomen C-1 β und C-2 β im ^{13}C -NMR-Spektrum von Glukose, isoliert aus *Drosophila melanogaster*. Die Fliege wurde auf einem mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glukose angereicherten Medium kultiviert.

$$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C} = \frac{cI_s}{cI_s + cI_z} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 4}$$

$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$: prozentualer Anteil der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung.

$cI_s = cI_{s1} + cI_{s2}$: Summe der Integrale beider ^{13}C -Satelliten im ^{13}C -NMR-Spektrum.

cI_z : Integral des Zentralsignals im ^{13}C -NMR-Spektrum.

Die Multiplikation der absoluten ^{13}C -Anreicherung eines bestimmten C-Atoms mit dem prozentualen Anteil der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung dieses Kohlenstoffatoms liefert nach Gleichung 5 die Konzentration des dazugehörigen Isotopologs in mol %.

$$\text{mol}\% = \frac{\%^{13}\text{C}^{13}\text{C} \cdot \%^{13}\text{C}_{abs.}}{100} \quad \text{Gleichung 5}$$

$\text{mol}\%$: Konzentration eines Isotopologs in mol %.

$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$: $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung des C-Atoms.

$\%^{13}\text{C}_{abs.}$: Absolute ^{13}C -Anreicherung des C-Atoms.

2.3.7 Formale Darstellung von Markierungsmustern

In der Strukturformel eines Moleküls zeigt ein Punkt an einem bestimmten Kohlenstoffatom eine ^{13}C -Anreicherung dieser Position ohne signifikante Anreicherung der benachbarten Kohlenstoffatome an (Punktmarkierung). Ein Balken in der Formel stellt benachbarte ^{13}C -angereicherte Positionen dar, die als ^{13}C -Block aus der Vorstufe unter Erhalt der ^{13}C -Konnektivität entstanden sind (Bindungsmarkierung). Die verschiedenen Isotopologe einer Verbindung können im gleichen Molekül durch mehrere Punkt- und/oder Bindungsmarkierungen dargestellt werden (Abbildung 2.3). Die dazu angeführten Zahlen geben die Konzentration des jeweiligen Isotopologs gegenüber unmarkiertem Material in mol % an.

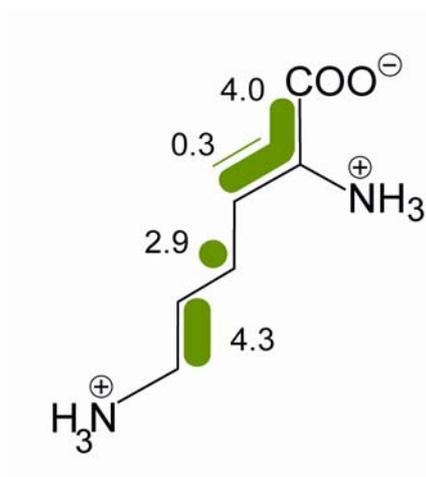


Abbildung 2.3 Formale Darstellung von Markierungsmustern am Beispiel Lysin. Es werden die Isotopologe $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ - in einer Konzentration von 4,0 mol %, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ - in einer Konzentration von 0,3 mol %, $[4-^{13}\text{C}_1]$ - in einer Konzentration von 2,9 mol % und $[5,6-^{13}\text{C}_2]$ Lysin in einer Konzentration von 4,3 mol % gezeigt.

Skalare Kopplungen in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie sind typischerweise nicht über mehr als drei Bindungen aufgelöst. Somit ist es nicht immer möglich, das komplette Markierungsmuster eines mehrfach ^{13}C -markierten Isotopologs eindeutig aus den Signalmultiplizitäten abzuleiten. Für diesen Fall bietet sich die sogenannte Binärnomenklatur durch X-Gruppen an (Eisenreich et al., 2004), auf die im Folgenden am Beispiel der Verbindung Glukose eingegangen wird.

In dieser Nomenklatur wird das Molekül Glukose durch einen 6-stelligen Code dargestellt, wobei die erste Ziffer in diesem Code das Kohlenstoffatom C-1, die zweite das Kohlenstoffatom C-2 usw. kennzeichnet. Kohlenstoffatome des Isotops ^{13}C werden mit „1“, Kohlenstoffatome des Isotops ^{12}C werden mit „0“ symbolisiert. Glukose, die an allen sechs Positionen im Molekül Kohlenstoff des Isotops C-12 besitzt, wird binär mit {000000} beschrieben. Vollmarkierte $[U-^{13}\text{C}_6]$ Glukose bezeichnet man mit {111111}. Die Binärnotation für $[1-^{13}\text{C}_1]$ Glukose lautet {100000}, die für $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ Glukose {111000} und die für $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Glukose {011000}.

Das „X“ in diesem Code stellt eine Variable dar, die entweder einem ^{12}C oder einem ^{13}C entspricht, die aber aufgrund der oben erwähnten begrenzten Auflösung in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie nicht direkt bestimmbar ist. Mit Hilfe dieses variablen Elements werden in der Binärnotation so genannte „X-Gruppen“ beschrieben, d.h. Mengen von Isotopologen. Die Notation {11X000} stellt somit beispielsweise eine Menge dar, die sich aus den beiden

Isotopologen $\{111000\}$ und $\{110000\}$, also $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ Glukose und $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose, zusammensetzt. Theoretisch gibt es 64 (2^6) stabile Kohlenstoff-Isotopologe von Glukose, die sich durch die X-Gruppe $\{XXXXXX\}$ darstellen lassen.

Der in Abbildung 2.4 gezeigte Ausschnitt aus einem ^{13}C -NMR-Spektrum von Glukose veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem im Experiment erhaltenen ^{13}C -NMR-Spektrum und den daraus ableitbaren X-Gruppen. Gezeigt ist das Signal des Kohlenstoffatoms C-1 des β -Anomers von Glukose.

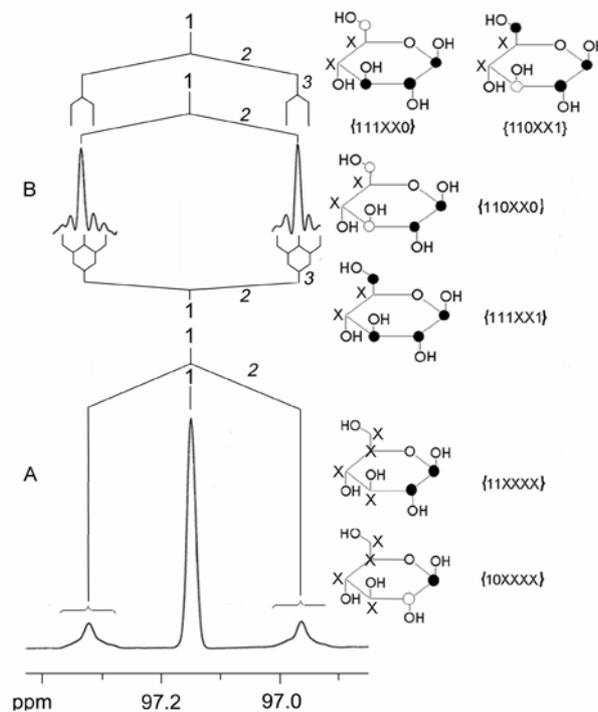


Abbildung 2.4 ^{13}C -NMR-Signal von C-1 β von Glukose, isoliert aus *Drosophila melanogaster*. Die Fliege wurde auf einem mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose angereicherten Medium kultiviert. Auf Grundlage der bekannten ^{13}C - ^{13}C -Kopplungskonstanten sind die koppelnden ^{13}C -Atome an den Kopplungsbäumen kursiv angegeben. Benachbart dazu sind die entsprechenden X-Gruppen als Strukturformel dargestellt. Punkte entsprechen einem ^{13}C -Isotop, Kreise einem ^{12}C -Isotop. Unbestimmbare Positionen (^{12}C oder ^{13}C) sind mit einem X gekennzeichnet. Neben den Strukturformeln sind die dazugehörigen X-Gruppen dargestellt. Darin entspricht 1 einem ^{13}C -, 0 einem ^{12}C - und X einem ^{13}C - oder ^{12}C -Isotop. A, ^{13}C -NMR-Spektrum, berechnet mit einer schwachen Gauß-Funktion ($l_b = -1$; $g_b = 0,1$ nach Bruker-Terminologie). B, Satellitensignale im ^{13}C -NMR-Spektrum, berechnet mit einer starken Gauß-Funktion ($l_b = -2$; $g_b = 0,4$ nach Bruker-Terminologie).

Die X-Gruppe {1XXXXX} beschreibt alle Isotopologe mit dem Kohlenstoffisotop ^{13}C an Position 1. Das in Abbildung 2.4A gezeigte Signal ist mit einer „schwachen“ Gauß-Funktion ($l_b = -1$; $g_b = 0,1$ nach Bruker-Terminologie) berechnet. Das zentrale Signal stellt die Summe der Isotopologe dar, die an Position C-1 das Kohlenstoffisotop ^{13}C und an Position C-2 das Isotop ^{12}C tragen. Somit ist dieses Signal mit der X-Gruppe {10XXXX} zu bezeichnen. Die in diesem Signal benachbart zum Zentralsignal auftretenden Satelliten mit einer Kopplungskonstante von 46 Hz repräsentieren die Isotopologe, bei denen die Kohlenstoffatome C-1 und C-2 koppeln und somit ^{13}C -markiert vorliegen. Diese Isotopologe werden durch die Notation {11XXXX} zusammengefasst. Eine Rangfolge innerhalb der X-Gruppen wird dadurch deutlich, dass die X-Gruppe {11XXXX} gleichzeitig eine Übergruppe für die Untergruppe {110XX0}, {111XX1}, {111XX0}, {110XX1}, {11XX11} und {11XX00} darstellt. Diese Untergruppen werden unter Benutzung einer „stärkeren“ Gauß-Funktion im NMR aufgrund entsprechender Fernkopplungen detektierbar (Abbildung 2.4B). Die NMR-spektroskopisch erfassbaren X-Gruppen und ihre hierarchische Gliederung in Über- und Untergruppen sind in Abbildung 2.5 zusammengefasst.

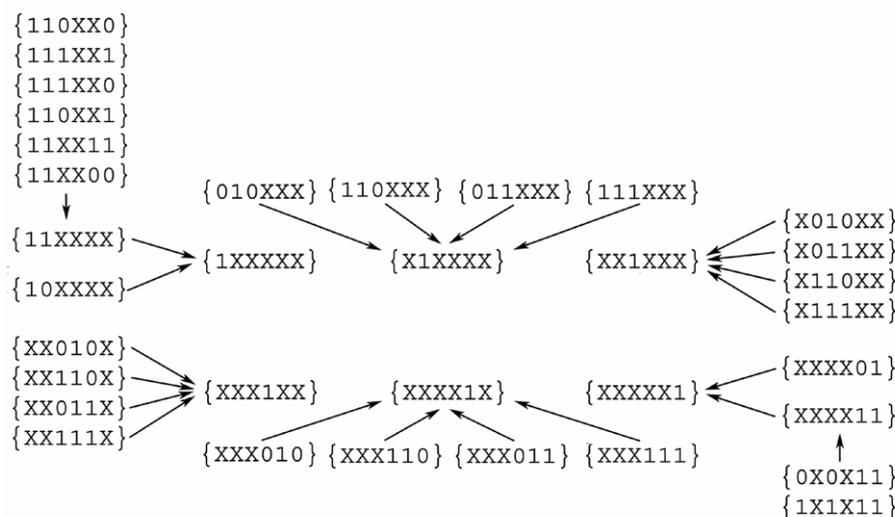


Abbildung 2.5 Hierarchie der NMR-spektroskopisch erfassbaren X-Gruppen. Pfeile verbinden Untergruppen mit ihren dazugehörigen Übergruppen.

2.3.8 Genetischer Algorithmus und Stoffwechselsimulation

Die Konzentrationen der einzelnen Isotopologe von Glukose konnten durch eine computerunterstützte Dekonvolution der X-Gruppen mit Hilfe des genetischen Algorithmusses GeneHunter library von WardSystems Inc. (Maryland, USA) von Dr. Christian Ettenhuber berechnet werden (Eisenreich et al., 2004). Die Stoffwechselprozesse wurden von Dr. Christian Ettenhuber mittels der Software 4 F simuliert (Ettenhuber et al., 2005).

2.3.9 Induzierte Anzucht

Das Überführen bakterieller Zellen von *Escherichia coli* aus einer Dauerkultur in LB-Medium mittels einer Impföse diente zur Herstellung einer Vorkultur, die für ungefähr 16 Stunden unter Schütteln bei 37 °C bebrütet wurde. Dabei wurde für die XL1-Stämme mit dem Plasmid pQE-30 LBamp-Medium und für die M15-Stämme mit den Plasmiden pREP4 und pQE-30 LBampKan-Medium verwendet.

Mit dem Überimpfen aus der Vorkultur in das LB-Medium der Hauptkultur 1:50 (V/V) wurde die induzierte Anzucht begonnen. Die Hauptkultur wurde im Schüttler bei 37 °C in Schüttelkolben angezogen. Während dieser Inkubation konnte durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) das Wachstum der Zellen verfolgt werden. Als Referenz diente unbewachsenes LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika.

Die Induktion fand bei einer Extinktion zwischen 0,5 und 0,7 durch Zugabe von Isopropylthio- β -D-galactosid zu einer Endkonzentration von 2 mM statt. Die Kultur wurde anschließend für einen Zeitraum von 5 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation der Bakterienkultur. Anschließend wurde das Pellet in 0,9 % (G/V) Natriumchloridlösung (Saline) resuspendiert, und die gewaschenen Zellen wurden nochmals zentrifugiert. Beide Zentrifugationsschritte liefen bei 4800 Upm, 4 °C und 30 Minuten Laufzeit ab.

Zur Gewinnung anaeroben Idi-Proteins vom Typ 2 wurde die 30-minütige Zentrifugation in sauerstoffundurchlässigen Stahlzylindern bei 4800 Upm und 4 °C durchgeführt. Die Resuspension der Zellen in gekochter und entgaster Saline fand in einer Glove-Box statt.

Das erhaltene Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.3.10 Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellen wurden in 100 mM Trishydrochlorid, 0,5 M Natriumchlorid und 20 mM Imidazolhydrochlorid (pH 8,0) resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden Pefa-Bloc und DNase I zugegeben. Die in der Suspension enthaltenen Zellen wurden mittels einer French-Press unter 1,8 kbar und 8°C aufgeschlossen. Der Rohextrakt-Überstand wurde durch Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 4°C , 13000 Upm und einer Laufzeit von 30 Minuten gewonnen.

Die Zellaufschlüsse zur Gewinnung anaeroben Idi-2-Proteins erfolgten unter Formiergasatmosphäre und die anschließende Zentrifugation bei 4°C , 13000 Upm über 30 Minuten in sauerstoffundurchlässigen Stahlzylindern.

2.3.11 Proteinreinigung

Der His-Tag in dem rekombinanten Idi-2-Protein aus dem Organismus *Bacillus subtilis* ermöglichte eine chromatographische Reinigung des Proteins über eine Nickel-Chelating Sepharose Säule und eine Elution über einen Imidazolgradienten.

Die Nickel-Chelat-Sepharose FF-Säule wurde mit 100 mM Trishydrochlorid, 0,5 M Natriumchlorid und 20 mM Imidazolhydrochlorid (pH 8,0) unter einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml min^{-1} äquilibriert. Der Rohextrakt-Überstand wurde mit 2 ml min^{-1} aufgetragen und anschließend mit 100 mM Trishydrochlorid, 0,5 M Natriumchlorid und 20 mM Imidazolhydrochlorid (pH 8,0) bei der gleichen Flussgeschwindigkeit gewaschen. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 20 bis 500 mM Imidazol in 150 ml, 100 mM Trishydrochlorid, pH 8,0 und 0,5 M Natriumchlorid bei einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml min^{-1} . Das Retentionsvolumen von Idi-2 betrug 20 ml. Die Proteinfractionen wurden vereinigt und für ungefähr 16 h gegen 100 mM Trishydrochlorid (pH 8,0) bei 10°C dialysiert und bei -80°C gelagert.

Die Reinigung anaeroben Idi-2-Proteins erfolgte mit gekochten und entgasten Puffern und Lösungen in der Glove-box. Die Dialyse fand bei 10°C in einem sauerstoffundurchlässigen Dreihalskolben statt.

2.3.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Expression und die Sauberkeit des gereinigten Proteins wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert.

Das Trenngel und das Sammelgel wurden in einer Gelapparatur hergestellt. Das noch flüssige Trenngel (8 %) wurde blasenfrei zwischen die Glas- und die Al₂O₃-Platte gegossen. Nach ca. 15 Minuten dauernder Polymerisation wurde das Gel mit 30 % Isopropanol überschichtet, das Isopropanol anschließend entfernt und der Auftragskamm eingesetzt. Danach wurde das Sammelgel (4 %) über das Trenngel eingefüllt. Nach 15-minütiger Polymerisation des Sammelgels konnte das fertige Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt werden. Die Elektrophoresekammern wurden mit Elektrophoresepuffer befüllt und der Auftragskamm entfernt. Ein Aliquot der nach dem Reinigungschromatogramm in Frage kommenden Fraktionen, des Rohextrakt-Überstands, des Durchlaufs und des Pellets wurden zusammen mit SDS-Probenauftragspuffer bei 100 °C für 15 Minuten erhitzt und anschließend jeweils 15 µl dieser hergestellten Proben in die Gelkammern pipettiert. Zusätzlich wurden 4 µl eines Proteinstandards zur Größenbestimmung der Proteinbanden auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 25 mA pro eingesetztem Gel durchgeführt und dauerte ungefähr eine Stunde. Jedes Gel wurde in der Färbelösung ungefähr 20 Minuten lang gefärbt, anschließend jeweils 15 Minuten in den zwei Entfärbelösungen entfärbt und fotografisch dokumentiert.

2.3.13 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976; Read *et al.* 1981; Compton *et al.* 1985).

Die Messungen wurden im UV/Vis-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm durchgeführt. Als Referenz diente eine Lösung von 50 µl H₂O bidest. mit 950 µl Bradford-Reagenz. In der Messküvette wurden 50 µl der Probe mit 950 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Probe wurde dabei vorher so verdünnt, dass die Extinktion im linearen Bereich der mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellten Kalibriergeraden lag. Aus der gemessenen Absorption konnte mittels dieser Eichgeraden die Konzentration des Proteins ermittelt werden. Es wurden

verschiedene Verdünnungsstufen der Probe vermessen, wobei aus dem Mittelwert der Einzelmessungen das Ergebnis hervorging.

2.3.14 Durchführung der enzymatischen Assays

Die Ansätze für die enzymatischen Reaktionen der Isopentenylidiphosphat-Isomerase II, die unter aeroben Bedingungen DTT, NADPH bzw. NADH, verschiedene zweiwertige Metallkationen, FMN und IPP oder DMAPP bzw. [3,4,5-¹³C₃]DMAPP als Substrat beinhalteten, wurden in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 8) bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz der anaeroben Reaktionsmischungen erfolgte in einer Glove-box. Das Starten der Reaktion fand durch Zugabe des Proteins Idi-2 statt. Ein Abstoppen der Enzymaktivität zu einem definierten Zeitpunkt konnte durch Zugabe von EDTA im Überschuss zur Konzentration der Metallkationen erreicht werden.

Für die enzymatischen Tests zur potentiellen Laktatdehydrogenase-Aktivität der Isopentenylidiphosphat-Isomerase vom Typ-II wurde TrisHCl (100 mM, pH 8), NADH und als Substrat [2,3-¹³C₂]Pyruvat verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Enzyms Idi-2 begonnen und der Reaktionsansatz bei 37 °C aerob inkubiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Störungs-/Relaxationsexperimente zur Untersuchung des Stoffwechsels verschiedener Organismen

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass es durch Einbau des stabilen Kohlenstoffisotops ^{13}C in einen Organismus möglich ist, das Stoffwechselnetzwerk unter *in vivo*-Bedingungen qualitativ wie auch quantitativ zu beschreiben. Als Beispiele werden Einbauexperimente mit verschiedenen Stämmen des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes*, dem sich entwickelnden Insekt *Drosophila melanogaster* und dem Säugetier Kaninchen (*New Zealand White Rabbit*) vorgestellt. In allen Untersuchungen wurde $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$ als Störverbindung eingesetzt.

3.1.1 *In vivo*-Störungs-/Relaxationsexperimente mit *Listeria monocytogenes*

Mit Hilfe der retrobiosynthetischen Methode (Eisenreich et al. 1993; Szyperski, 1995; Bacher et al., 1999) können auf der Basis bekannter Biosynthesewege aus den Isotopologmustern von Aminosäuren die Isotopologmuster der entsprechenden Vorstufen (z.B. Acetyl-CoA, Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat) abgeleitet werden. Diese Vorstufen sind im Stoffwechselnetzwerk als Knotenpunkte anzusehen, aus deren Analyse wichtige Informationen über den Zentralstoffwechsel in *Listeria monocytogenes* zu gewinnen sind.

3.1.1.1 Der Zentralstoffwechsel von *Listeria monocytogenes* EGD (Wildtyp)

Die Untersuchung des Zentralstoffwechsels des Bakteriums *Listeria monocytogenes* fand mit Hilfe eines Einbauexperimentes unter Anwendung der Störungs-/Relaxationsmethode statt. Der Bakterien-Stamm *LmEGD* (Wildtyp) wurde in einem Medium, bestehend aus 96 %

Glukose mit natürlichem ^{13}C -Gehalt und 4 % $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose, angezogen. Die aus der sauren Hydrolyse der geernteten bakteriellen Zellen gewonnenen Aminosäuren wurden chromatographisch gereinigt und über ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert.

In diesem Experiment konnten 15 verschiedene Aminosäuren isoliert und NMR-spektroskopisch analysiert werden. Die ^{13}C -NMR-Spektren von zehn dieser Aminosäuren weisen Multipletts auf. Diese auftretenden $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplungen sind auf den Einbau der Störverbindung $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose in das Stoffwechselnetzwerk und deren Beteiligung an der Biosynthese dieser Aminosäuren zurückzuführen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Isolierte Aminosäuren aus *Listeria monocytogenes* EGD (Wildtyp) nach Anzucht in einem mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose angereicherten Medium.

Aminosäure	Markierungen aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose	Zusatz im Medium
Asp	+	-
Glu	+	0,6 g/l Gln
Phe	+	-
Tyr	+	-
Lys	+	-
Arg	-	0,1 g/l
His	-	0,1 g/l
Gly	+	-
Ala	+	-
Ser	+	-
Thr	+	-
Val	-	0,1 g/l
Pro	+	-
Ile	-	0,1 g/l
Leu	-	0,1 g/l

Das Kohlenstoffatom C-2 von Glutamat erscheint im ^{13}C -NMR-Spektrum als ein Pseudo-Triplett. Dabei repräsentiert das Zentralsignal das $[2-^{13}\text{C}_1]$ Isotopolog (Abbildung 3.1A, linke Spalte). Die beiden benachbarten Satelliten (gezeigt in Blau) entstehen durch $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung zwischen dem Kohlenstoffatom C-2 und einem direkt gebundenen ^{13}C -Atom. Die Kopplungskonstante von 34,5 Hz zeigt, dass sich das koppelnde Kohlenstoffisotop an Position 3 im Molekül befindet (Glawischnig et al., 2001). Die Konzentration dieses $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Glutamats kann aus den relativen Intensitäten der Signale im Multipllett mit 1,1 mol % bestimmt werden (Anhang, Tabelle 1). Die in Grün gezeigten Signale mit geringer Intensität weisen ein dupliziertes Duplett mit Kopplungskonstanten von 53,4 Hz und 34,5 Hz auf.

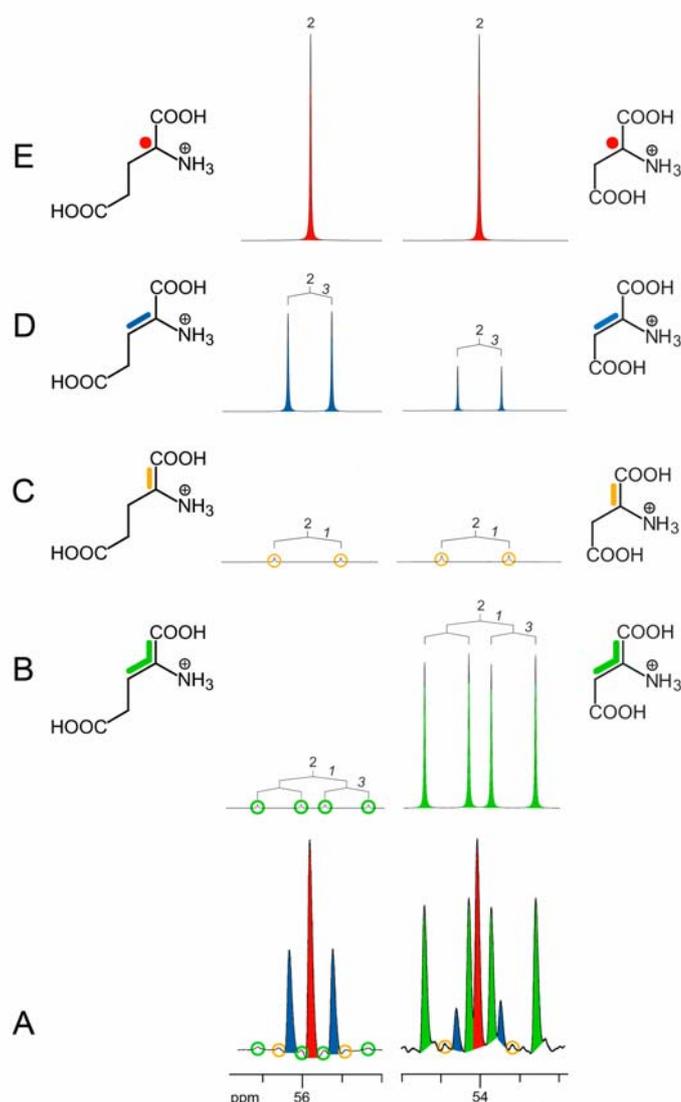


Abbildung 3.1 Signal von Kohlenstoffatom C-2 im ^{13}C -NMR-Spektrum von Glutamat (linke Spalte) und Aspartat (rechte Spalte), isoliert aus *Listeria monocytogenes* EGD. Das Bakterium wurde in einem Medium mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose, gelöst in unmarkierter Glukose (1:25; G/G), angezogen. A, ^{13}C -NMR-

Signale, gemessen unter ^1H -Entkopplung. B-E, simulierte Signale der Isotopologe, basierend auf den chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten (Anhang, Tabelle 1). Die dazugehörigen Isotopologe sind neben den Signalen gezeigt. Die Kopplung benachbarter Kohlenstoffatome wird durch Balken, isolierte nicht koppelnde ^{13}C -Atome werden durch einen Punkt symbolisiert. Die Amplituden der simulierten Signale entsprechen der relativen Konzentration der einzelnen Isotopologe in der Mischung.

Das zu diesen Signalen gehörende Isotopolog trägt an den Positionen 1, 2 und 3 das Kohlenstoffisotop ^{13}C . Das in Abbildung 3.1 gelb dargestellte Duplett mit der Kopplungskonstante von 53,4 Hz entsteht durch eine Kopplung von C-2 mit C-1. Dieses $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Glutamat kommt mit einer Konzentration von unter 0,1 mol % vor und wird deshalb in der weiteren Betrachtung vernachlässigt.

Die rechte Spalte in Abbildung 3.1A zeigt das für das Kohlenstoffatom C-2 von Aspartat erhaltene Signalmuster, das aus sieben Signalen mit signifikanter Intensität besteht. Die Zuordnung dieser Signale zu den verschiedenen Isotopologen des Moleküls gelingt durch die bekannten Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungen über numerische Simulation. Die für die Isotopologe simulierten Signale sind in Abbildung 3.1B-E (rechte Spalte) dargestellt. In dem experimentell erhaltenen Spektrum lassen sich $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -, $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ - und $[1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3]$ Aspartat in Konzentrationen von 1,2, 0,5 und 3,6 mol % identifizieren.

Komplexer ist das Signalmuster des Ringkohlenstoffatoms C-6/8 von Tyrosin (Abbildung 3.2). Unter Zuhilfenahme der bekannten Kopplungskonstanten (Glawischnig et al., 2000) ist aus den mehr als 12 Linien das signifikante Auftreten der mehrfach markierten Isotopologe $[6,7,8,9\text{-}^{13}\text{C}_4]$ -, $[7,8,9\text{-}^{13}\text{C}_3]$ - und $[6,8\text{-}^{13}\text{C}_1]$ Tyrosin in Konzentrationen von 1,5, 1,3 und 1,6 mol % abzuleiten.

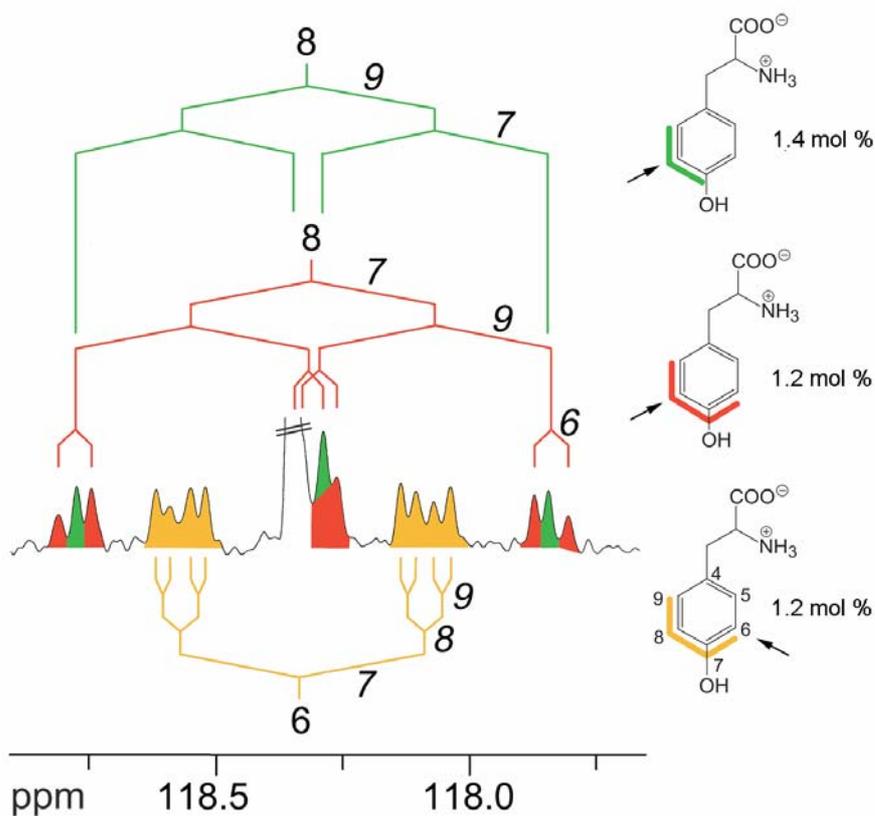


Abbildung 3.2 ^{13}C -NMR-Signal des Kohlenstoffatoms C-6/8 von Tyrosin, isoliert aus *Listeria monocytogenes* EGD, kultiviert in einem mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose angereicherten Medium. Die ^{13}C -koppelnden Signale, die dazugehörigen ^{13}C -Kopplungsmuster und Isotopologe sind gleichfarbig markiert.

Die verzweigt-kettigen Aminosäuren und das Histidin zeigen keine Kopplungen im Molekül. Diese Aminosäuren werden somit nicht in signifikanter Menge aus exogener Glukose gebildet. Möglicherweise werden diese Verbindungen über ABC-Transporter aus dem Medium aufgenommen und in zelluläres Protein eingebaut.

Aus der spektroskopischen und retrobiosynthetischen Analyse der markierten Aminosäuren sind folgende Ergebnisse abzuleiten:

1.) *Listeria monocytogenes* ist mit einem unvollständigen Citratzyklus ausgestattet.

Das humanpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* besitzt einen unvollständigen Citratzyklus (Abbildung 3.3). Oxalacetat wird nicht aus α -Ketoglutarat gebildet, da sich das Markierungsmuster von Oxalacetat nicht auf das von α -Ketoglutarat übertragen lässt. Die Isotopologe $[\text{1,2,3-}^{13}\text{C}_3]$ - und $[\text{2,3-}^{13}\text{C}_2]$ Oxalacetat sind jedoch aus dem Markierungsmuster

von Pyruvat und/oder Phosphoenolpyruvat abzuleiten. Die Bildung von Oxalacetat erfolgt somit in *Listeria monocytogenes* ausschließlich über die „anaplerotische Reaktion“ durch Carboxylierung von Pyruvat und/oder Phosphoenolpyruvat und nicht über den Citratcyklus aus α -Ketoglutarat.

In den Markierungsmustern von Alanin, Threonin und Aspartat sind vornehmlich die [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]Isotopologe zu finden, während in geringerer Menge die [2,3- $^{13}\text{C}_2$]Isotopologe auftreten (Abbildung 3.3). Aus der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren lässt sich ebenfalls dieses Markierungsmuster für Phosphoenolpyruvat retrobiosynthetisch ableiten (Abbildung 3.6). Außerdem ist das Kohlenstoffatom in der γ -Carboxylgruppe von Aspartat und in der Methylgruppe von Threonin signifikant mit dem Isotop ^{13}C angereichert (Abbildung 3.3). Diese Befunde lassen auf die Herkunft aller drei Aminosäuren aus Pyruvat schließen. Durch Transaminierung von Pyruvat entsteht Alanin, und die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat oder Pyruvat führt zur Bildung von Aspartat. Das Markierungsmuster von Threonin zeigt, dass Aspartat die biosynthetische Vorstufe von Threonin darstellt.

Die Decarboxylierung von [U- $^{13}\text{C}_3$]- und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]Pyruvat führt zur Bildung von [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA. Durch Kondensation dieses zentralen Stoffwechselintermediats mit [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]Oxalacetat bildet sich eine Isotopologmischung aus [1,2- $^{13}\text{C}_2$]- und [3,4,3'- $^{13}\text{C}_3$]Citrat (Abbildung 3.3). Darüber hinaus werden durch das Vorhandensein von [2,3- $^{13}\text{C}_2$]Oxalacetat geringe Mengen von [3,4- $^{13}\text{C}_2$]Citrat synthetisiert. Auf Grundlage der bekannten klassischen Stereospezifität der von dem Enzym Aconitase katalysierten Reaktion (Abbildung 3.3) sollte die Decarboxylierung dieser Isotopologmischung vornehmlich [2,3- $^{13}\text{C}_2$]- und [4,5- $^{13}\text{C}_2$]2-Ketoglutarat liefern, welche durch reduktive Transaminierung in das entsprechende Isotopologmuster von Glutamat umgewandelt werden. Die Bestätigung dieses erwarteten Markierungsmusters für Glutamat fand im Experiment statt. Das Auftreten der Glutamat-Isotopologe in einer dreimal geringeren Konzentration als vermutet ist auf die Verdünnung des neu gebildeten Glutamats mit Glutamat, das aus unmarkiertem und dem Medium in relativ hoher Konzentration (0,6 g/l) zugeführten Glutamins stammt, zurückzuführen.

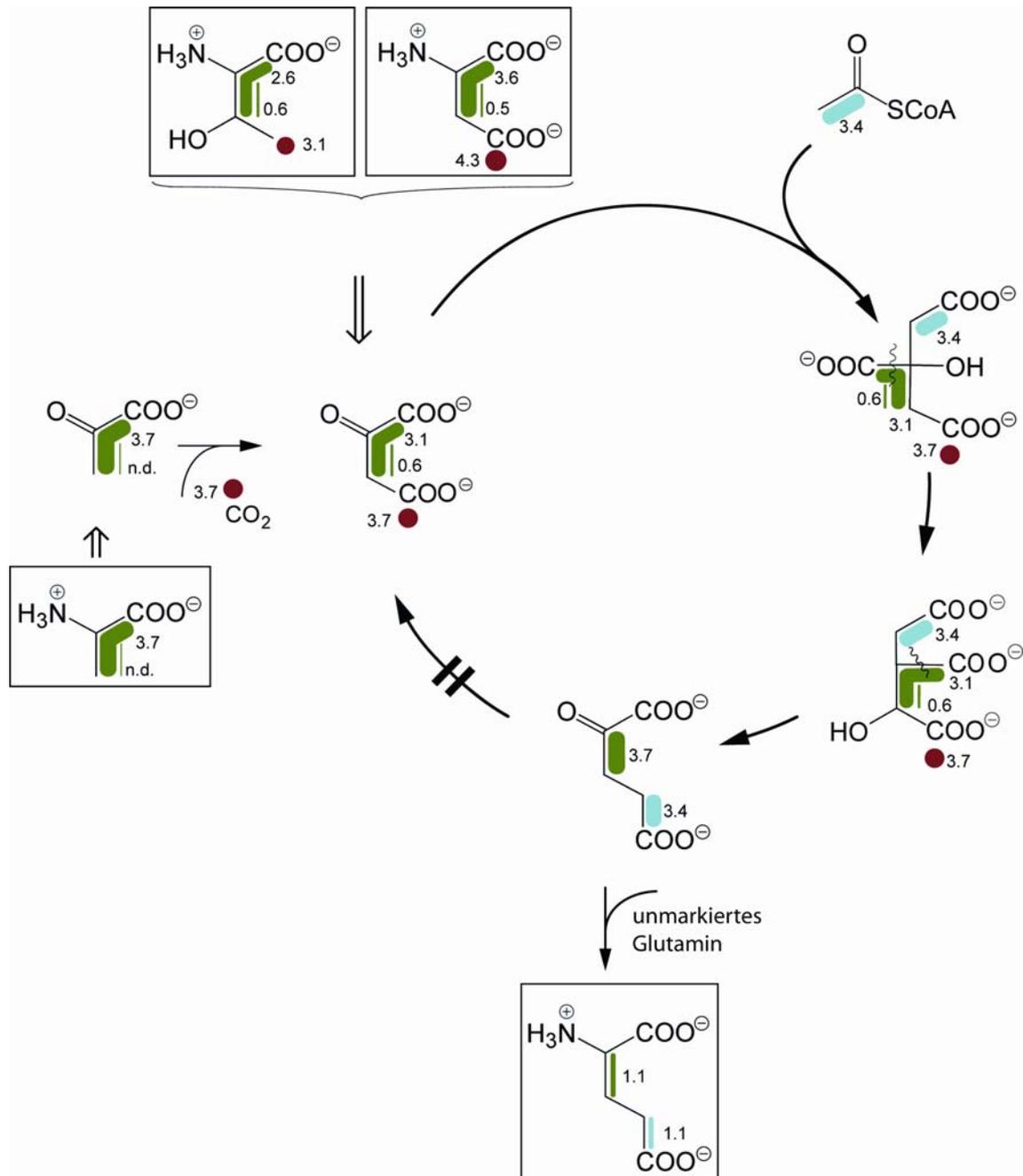


Abbildung 3.3 Unvollständiger Citratcyclus in *Listeria monocytogenes*, rekonstruiert aus dem Störexperiment mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose. Die Isotopologe der in Kästen angegebenen Aminosäuren wurden direkt über NMR-Spektroskopie bestimmt, während sich die Isotopologe zentraler Stoffwechselintermediate retrobiosynthetisch aus den Isotopologen der Aminosäuren ergeben (Retropfeil \Rightarrow). Isotopologe, die aus dem gleichen Stoffwechselfool stammen, sind durch einheitliche Farben gekennzeichnet. Die Isotopologe von Oxalacetat sind nicht aus dem Markierungsmuster von α -Ketoglutarat abzuleiten. Somit ist die Bildung von Oxalacetat über den Citratcyclus ausgeschlossen.

2.) Lysin entsteht ausschließlich aus Aspartat und Pyruvat.

Das Markierungsmuster von Lysin besteht aus den Isotopologen $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ -, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -, $[4-^{13}\text{C}_1]$ - und $[5,6-^{13}\text{C}_2]$ Lysin. Aus dem Vergleich dieses Markierungsmusters mit den Isotopologmustern von Aspartat, Pyruvat, Glutamat und Acetyl-CoA ist ersichtlich, dass Lysin ausschließlich aus Aspartat und Pyruvat gebildet wird (Abbildung 3.4). Die Biosynthese aus α -Ketoglutarat und Acetyl-CoA findet gemäß dem Markierungsmuster von Lysin nicht statt (Abbildung 3.4). Aus dem nicht symmetrischen Isotopologmuster von Lysin ist zu schließen, dass keine symmetrischen Intermediate, wie L,L-Diaminopimelat, in freier Form auftreten.

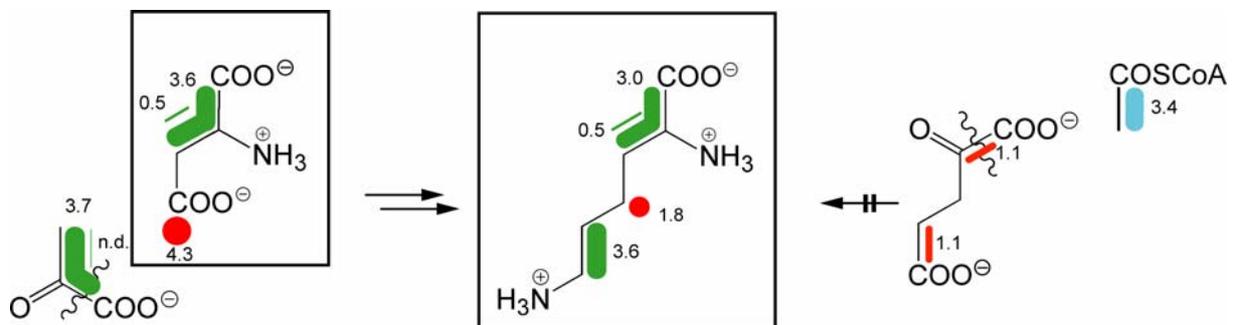


Abbildung 3.4 Die Biosynthese von Lysin in *Listeria monocytogenes*, abgeleitet aus dem Störexperiment mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glukose. Die Biosynthese von Lysin verläuft ausschließlich aus Aspartat und Pyruvat.

3.) Serin wird hauptsächlich aus dem Triosephosphatpool gebildet. Die Biosynthese von Glycin verläuft über Serin.

Das Markierungsmuster von Serin gleicht weitgehend dem von Alanin. Dadurch wird die Annahme bestätigt, dass Serin vornehmlich durch Dehydrogenierung von 3-Phosphoglycerat, anschließender Transaminierung und Dephosphorylierung gebildet wird (Abbildung 3.5). Der alternative Biosyntheseweg, d.h. die Hydroxymethylierung von Glycin, liefert $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Serin, das in deutlich geringerer Menge auftritt. Somit wird ein bedeutend kleinerer Anteil, nämlich nur 6 % der synthetisierten Verbindung über den C1-Stoffwechsel aus Glycin gebildet. Die Isotopologmuster von Glycin und Serin verdeutlichen, dass die Biosynthese von Glycin über Serin verläuft.

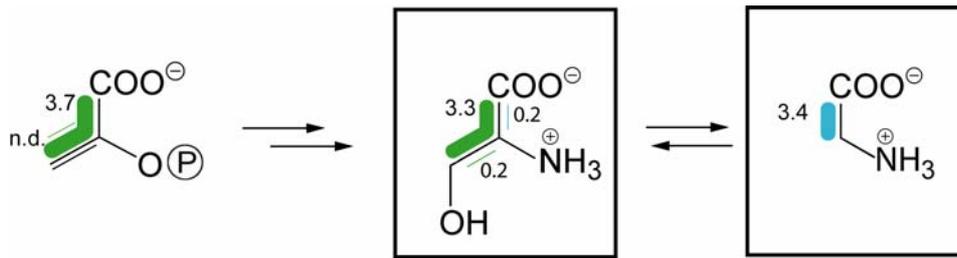


Abbildung 3.5 Die Biosynthese von Serin und Glycin in *Listeria monocytogenes* aus dem Störexperiment mit $[U-^{13}C_6]$ Glukose. Die Bildung von Serin aus Phosphoenolpyruvat ist gegenüber der Synthese aus Glycin stark bevorzugt. Die Biosynthese von Glycin verläuft über Serin.

4.) Die aromatischen Aminosäuren entstehen über den Shikimatweg.

Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin werden, wie erwartet, über den Shikimatweg synthetisiert (Abbildung 3.6).

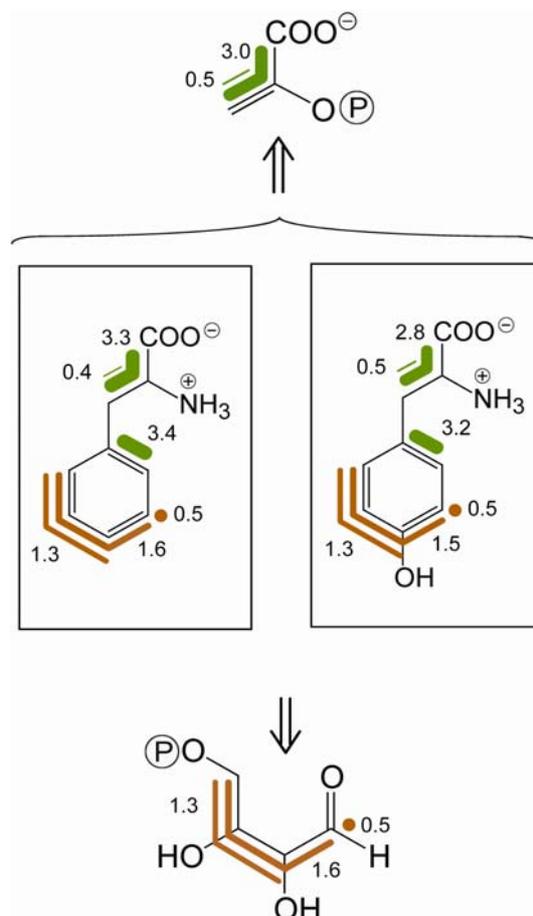


Abbildung 3.6 Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin in *Listeria monocytogenes* aus dem Störexperiment mit $[U-^{13}C_6]$ Glukose verläuft über den Shikimatweg.

Das Isotopologmuster von Tyrosin und Phenylalanin spiegelt direkt das Markierungsmuster zweier zentraler Stoffwechselintermediate, Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat, wider. Die Seitenketten in diesen Aminosäuren stammen aus Phosphoenolpyruvat, während Erythrose-4-Phosphat am Aufbau des aromatischen Rings beteiligt ist (Abbildung 3.6).

Aus dem Markierungsmuster der Vorstufe Erythrose-4-Phosphat ist zu erkennen, dass in diesem Molekül vornehmlich die Isotopologe $[U-^{13}C_4]$ mit 1,6 mol % und $[2,3,4-^{13}C_3]$ mit 1,3 mol % vorkommen. Die Entstehung des $[U-^{13}C_4]$ Isotopologs ist ausgehend von $[U-^{13}C_6]$ Fruktose-6-Phosphat über die Transketolasereaktion im Pentosephosphatweg zu erklären. Die Transaldolasereaktion im Pentosephosphatweg liefert das $[2,3,4-^{13}C_3]$ Isotopolog. Das Isotopologmuster in den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren weist eindeutig auf das Vorhandensein glykolytischer Prozesse und die daraus entstehenden $[2,3-^{13}C_2]$ Isotopologe im Triosephosphatpool hin.

Die vorhandenen Genomdaten für *Listeria monocytogenes* (Glaser et al., 2001) bestätigen das Fehlen des Schlüsselenzyms α -Ketoglutaratdehydrogenase und untermauern somit den in diesem Experiment erhaltenen Befund eines unvollständigen Citratcyklusses. Das für die Pyruvat-Carboxykinase codierende Gen existiert. Somit ist die Möglichkeit der Bildung von Oxalacetat durch Carboxylierung von Pyruvat gegeben. Darüber hinaus sind die Gene für die Schlüsselenzyme der Biosynthese von Lysin über Aspartat und für die Bildung der aromatischen Aminosäuren vorhanden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt bleibt ungeklärt, warum das Markierungsmuster von Lysin kein symmetrisches Isotopolog aufweist, da im Genom von *Listeria monocytogenes* alle Gene der Biosynthese von Lysin über succinylierte Intermediate (z.B. für die Bildung von (L,L)-Diaminopimelat) vorhanden sind. Möglicherweise kann das Heranziehen von Transkriptomdaten zur Aufklärung dieser noch offenen Fragestellung beitragen.

Dieses Fütterungsexperiment mit dem Mikroorganismus *Listeria monocytogenes* beweist, dass man mit Hilfe des Störungs-/Relaxationskonzepts in der Lage ist, Stoffflüsse in zentralen Teilen des Stoffwechselnetzwerks pathogener Lebewesen zu beschreiben. Somit ergibt sich für die Zukunft die Möglichkeit, die Situation des Stoffwechsels intrazellulärer Bakterien mit Hilfe von Störungs-/Relaxationsexperimenten an infizierten Säugetierzellen näher zu untersuchen.

3.1.2 Der Einfluss des Virulenzfaktors PRFA auf den Aminosäurestoffwechsel in *Listeria monocytogenes*

Das Ziel dieses Experiments war es, den Einfluss des Virulenzfaktors PRFA auf den Stoffwechsel in *Listeria monocytogenes in vivo* zu messen. Dazu wurden zusätzlich zu dem in 3.1.1.1 gezeigten Wildtyp-Stamm *LmEGD* die mutierten Stämme $\Delta prfA$ und $\Delta prfApPRFA^*$ unter den in 3.1.1.1 dargestellten Versuchsbedingungen angezogen. Die drei Versuchsstämme unterscheiden sich in der Expressionsstärke des für die Virulenz des Bakteriums verantwortlichen Proteins PRFA. Während der Wildtyp-Stamm *EGD* die natürliche Expression dieses Proteins aufweist, ist im Stamm *Listeria monocytogenes* $\Delta prfA$ das für PRFA codierende Gen deletiert und somit die Expression dieses Virulenzfaktors unterdrückt. Der Stamm *L. monocytogenes* $\Delta prfApPRFA^*$ hingegen zeigt eine Überexpression des Proteins PRFA*, einer noch aktiveren Variante des Virulenzfaktors PRFA. Aus allen drei Stämmen wurden Aminosäuren isoliert, chromatographisch gereinigt und die Isotopologmuster über NMR-Spektroskopie bestimmt und verglichen. Im Anhang sind in den Tabellen 1A, 1B und 1C sowie in der Abbildung 1 die NMR-Daten und die Isotopologmuster der isolierten Aminosäuren zusammengefasst.

Die Gegenüberstellung der für die drei Stämme erhaltenen Isotopologmuster zeigt, dass in allen drei Fällen aufgrund des Fehlens der α -Ketoglutaratdehydrogenase der Citratcyclus nicht vollständig ist, und somit Oxalacetat durch Carboxylierung von Pyruvat gebildet wird. Die Bildung von Serin erfolgt, wie oben erwähnt, über zwei alternative Biosynthesewege. Gemäß der Markierungsmuster von Serin ist in allen drei untersuchten Stämmen eine Bevorzugung der Synthese aus Phosphoglycerat gegenüber der aus Glycin zu verzeichnen. Jedoch steigt das Verhältnis in Richtung des Biosyntheseweges aus Glycin im Stamm *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ auf 22 % an, während in den Stämmen $\Delta prfApPRFA^*$ und *EGD* nur 13 % bzw. 6 % des Serins aus Glycin gebildet werden. Die Analyse zusätzlicher aus dem Bakterium hydrolysiertes Aminosäuren zeigt, dass die Isotopologmuster von Glycin, Alanin, Serin, Threonin und Phenylalanin mehrfach ^{13}C -markierte Isotopologe in signifikant erhöhter Konzentration aufweisen (Anhang, Tabelle 1 und Abbildung 1). In den NMR-Spektren von Arginin sind keine Kopplungssatelliten und damit keine ^{13}C -markierten Isotopologe in NMR-spektroskopisch messbarer Menge vorhanden. Die NMR-Signale von Valin, Isoleucin und Leucin weisen Kopplungssatelliten geringer Intensität auf. Die Amplituden dieser Satelliten unterscheiden sich in den Experimenten mit *LmEGD*, *Lm* $\Delta prfA$ und *Lm* $\Delta prfApPRFA^*$ signifikant (Abbildung 3.7).

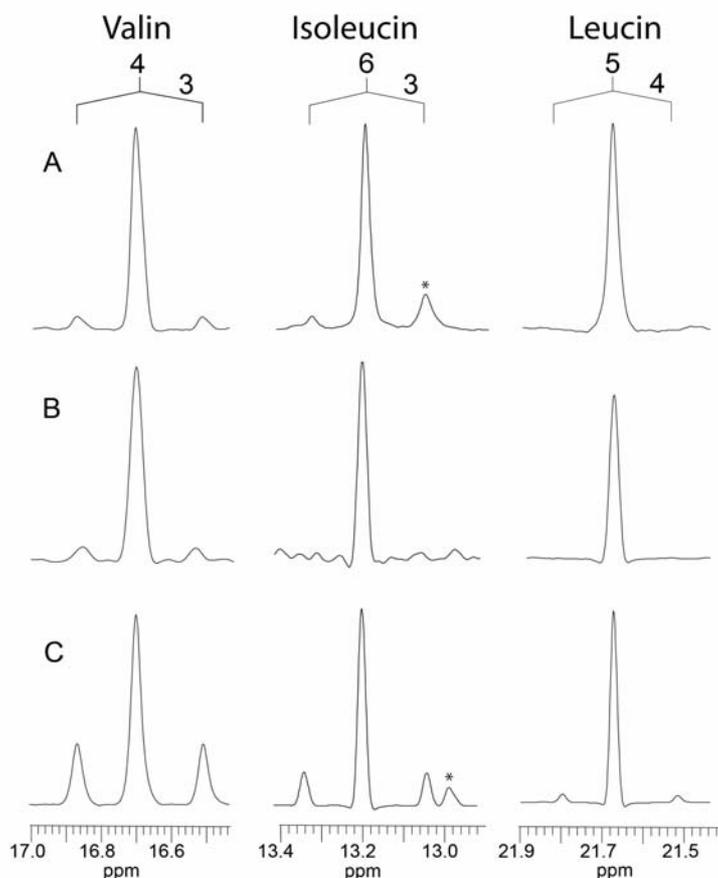


Abbildung 3.7 ¹³C-NMR-Signale der Methyl-Gruppen 4 in Valin, 6 in Isoleucin und 5 in Leucin, isoliert aus A, *L. monocytogenes* EGD, B, *L. monocytogenes* $\Delta prfA$, und C, *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ PRFA*, kultiviert in einem mit [U-¹³C₆]Glukose angereicherten Medium. *, Signal einer Verunreinigung.

Das Vorhandensein mehrfach ¹³C-markierter Isotopologe einer Aminosäure beweist, dass zumindest ein Teil dieser Verbindung unter den gewählten Versuchsbedingungen *de novo* biosynthetisiert worden ist. Aus den Ausschnitten der ¹³C-NMR-Spektren in Abbildung 3.7 ist zu erkennen, dass der Stamm $\Delta prfA$ PRFA* im Vergleich zu den beiden anderen Versuchstämmen die größte Menge mehrfach ¹³C-markierter Isotopologe der Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin synthetisiert (Abbildung 3.7C).

In Tabelle 3.2 sind die durchschnittlichen ¹³C-Anreicherungen der markierten Aminosäuren aus den untersuchten drei Stämmen zusammengefasst. Die ¹³C-Anreicherungen treten im Bereich von 0,1 bis zu 4 % auf.

Tabelle 3.2 Durchschnittliche ^{13}C -Anreicherung der Kohlenstoffatome der Aminosäuren, isoliert aus den Stämmen *Listeria monocytogenes* $\Delta prfA$, EGD und $\Delta prfA\text{pPRFA}^*$, kultiviert in einem Medium mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose und unmarkierter Glukose in einem Verhältnis 1:25 (G/G). Die ^{13}C -Anreicherungen an den Kohlenstoffatomen an Position C-1 sind in der statistischen Betrachtung aufgrund der großen Ungenauigkeit der quantitativen Analyse dieser Position nicht berücksichtigt.

Aminosäure	<i>$\Delta prfA$</i>	EGD	<i>$\Delta prfA\text{pPRFA}^*$</i>
Alanin	4,2 % \pm 0,2	4,0 % \pm 0,1	4,1 % \pm 0,3
Glycin	2,3 %	3,8 %	4,1 %
Threonin	3,9 % \pm 0,1	3,4 % \pm 0,2	3,1 % \pm 0,8
Serin	3,6 % \pm 1,0	3,1 % \pm 1,1	4,0 %
Lysin	3,6 % \pm 0,5	3,0 % \pm 0,6	3,9 % \pm 0,5
Tyrosin	3,3 % \pm 0,2	3,1 % \pm 0,2	3,4 % \pm 0,5
Phenylalanin	3,4 % \pm 0,2	3,4 % \pm 0,3	3,2 % \pm 0,2
Aspartat	3,8 %	3,9 %	4,2 % \pm 0,3
Glutamat	1,2 % \pm 0,1	0,9 % \pm 0,1	0,6 % \pm 0,2
Prolin	nicht bestimmbar	0,6 % \pm 0,1	1,4 % \pm 0,1
Valin	0 % \pm 0,1	0 % \pm 0,1	0,7 % \pm 0,1
Leucin	0 %	0 % \pm 0,1	0,3 % \pm 0,1
Isoleucin	0 %	0,2 % \pm 0,1	0,4 % \pm 0,1
Arginin	0 % \pm 0,1	0 % \pm 0,1	0 % \pm 0,1

Wegen der im Medium vorliegenden Störverbindung $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose und der unmarkierten Glukose im Verhältnis 1:25 (G/G) entspricht eine ^{13}C -Anreicherung einer Aminosäure von 4 % einer vollständigen *de novo* Biosynthese (100 %) dieser Aminosäure aus der verabreichten Glukose im Medium. Diese Betrachtung ermöglicht es somit, aus den ^{13}C -

Anreicherungen der isolierten Aminosäuren die dazugehörigen *de novo* Biosyntheseraten zu berechnen, die in Tabelle 3.3 und Abbildung 3.8 dargestellt sind.

Tabelle 3.3 *De novo* Biosyntheseraten der Aminosäuren, isoliert aus den Stämmen *Listeria monocytogenes AprfA*, EGD und *AprfApPRFA**, kultiviert in einem Medium mit [U-¹³C₆]Glukose und unmarkierter Glukose in einem Verhältnis von 1:25 (G/G). Die Raten sind aus dem Verhältnis der durchschnittlichen ¹³C-Anreicherung (Tabelle 3.2) und der ¹³C-Anreicherung der Glukose im Medium (4%) berechnet.

Aminosäure	<i>de novo</i> Biosyntheseraten [%]		
	<i>AprfA</i>	EGD	<i>AprfApPRFA*</i>
Alanin	104±5	99±3	102±9
Glycin	57	94	102
Threonin	97±2	85±6	77±19
Serin	89±25	77±26	99
Lysin	89±13	74±16	97±12
Tyrosin	82±6	77±5	84±13
Phenylalanin	84±6	84±7	79±5
Aspartat	94	97	104±7
Glutamat	30±1	22±2	15±5
Prolin	n.d.	15±1	35±2
Valin	0±2	0±2	17±4
Leucin	0±0	0±1	7±4
Isoleucin	0±0	5±1	10±1
Arginin	0±0	0±0	0±0

Die Tabelle 3.3 und die Abbildung 3.8 zeigen, dass die verabreichte Glukose-Mischung im Medium als hauptsächliche Kohlenstoffquelle bei der Biosynthese von Alanin, Threonin, Serin, Lysin, Tyrosin, Phenylalanin, Aspartat und Glycin (mit Ausnahme der *AprfA*-Mutanten) gedient hat.

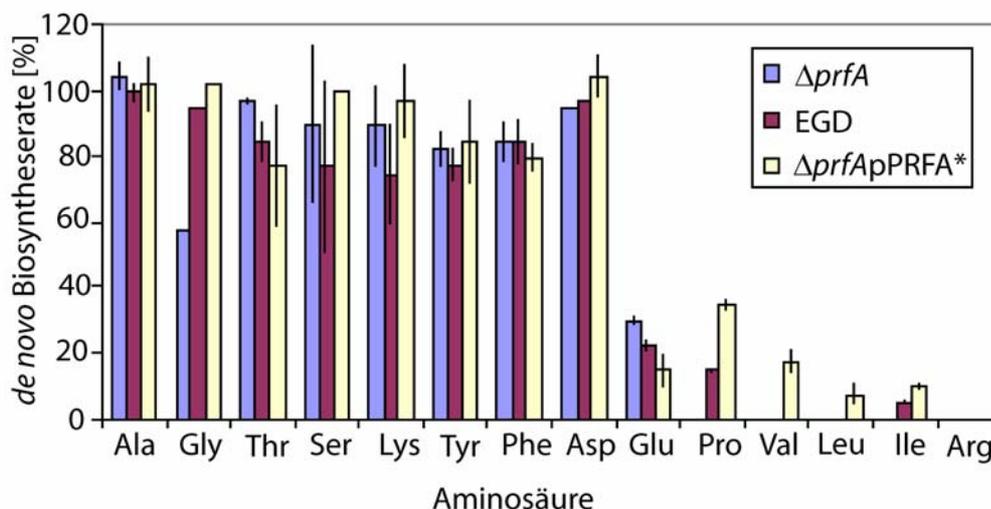


Abbildung 3.8 *De novo* Biosyntheseraten der Aminosäuren in verschiedenen Stämmen von *Listeria monocytogenes*, kultiviert in einem Medium mit $[U-^{13}C_6]$ Glukose.

Auf der anderen Seite werden nur geringe Mengen von Glutamat, Prolin, Valin, Leucin und Isoleucin *de novo* synthetisiert. Der hauptsächliche Anteil dieser Verbindungen stammt aus dem unmarkierten Material im Medium.

Es ist hervorzuheben, dass die *de novo* Biosyntheserate von Valin, Leucin und Isoleucin stark von der Expressionsstärke des Virulenzfaktors PRFA beeinflusst wird. Im PRFA-hyperexprimierenden mutierten Stamm *AprfApPRFA** ist die *de novo* Biosynthese dieser verzweigtkettigen Aminosäuren stark bevorzugt (Tabelle 3.3, Abbildung 3.8).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es mit Hilfe des Störungs/Relaxationskonzepts und von Einbauexperimenten mit $[U-^{13}C_6]$ Glukose in verschiedene Stämme von *Listeria monocytogenes* möglich ist, den Einfluss des Virulenzfaktors PRFA auf den Aminosäure-Stoffwechsel abzubilden. Während man in allen drei Stämmen einen unvollständigen Citratcyklus, keine endogene Synthese vieler Aminosäuren und wenig Cycling im Kohlenhydratpool findet, so sind dennoch große Unterschiede in der Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren erkennbar. Der PRFA-hyperexprimierende Stamm (*AprfApPRFA**) zeigt im Vergleich zum Wildtyp (EGD) und zum Stamm mit fehlendem

Virulenzfaktor (*AprfA*) eine deutlich erhöhte *de novo* Biosynthese von Valin, Isoleucin und Leucin. Mit Hilfe von Einbauexperimenten können somit wichtige Informationen über zentrale Stoffwechselprozesse in pathogenen Mikroorganismen erhalten werden.

3.1.3 Untersuchungen zum Glukose-Stoffwechsel in *Drosophila melanogaster*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist einer der am meisten untersuchten tierischen Versuchsorganismen. Das Genom der Fruchtfliege besitzt viele Paraloge oder Orthologe, die an Erkrankungen des Menschen beteiligt sind (Myers et al., 2000; Scherzer et al., 2003; Lau et al., 2003; Apostol et al., 2003). Trotz der vielen Erkenntnisse über die Genetik und Entwicklung dieses Tieres ist bis heute wenig über die metabolische Dynamik in diesem Insekt bekannt. Mit ihrem vollsequenzierten Genom stellt die Fruchtfliege somit einen idealen Modellorganismus für die Etablierung des Störungs-/Relaxationskonzepts zur Stoffwechselforschung in höheren Organismen dar. Ein Einbauversuch mit der Störsubstanz [U-¹³C₆]Glukose sollte zu einem tieferen Verständnis des Kohlenhydratstoffwechsels in *Drosophila melanogaster* führen.

Die Fliegen wurden in einem Medium, das 30 mM [U-¹³C₆]Glukose enthielt, vom Ei bis zum adulten Organismus über alle Entwicklungsstadien hinweg angezogen und anschließend einer Extraktion mit Wasser unterzogen. Die chromatographische Reinigung des erhaltenen Rohextrakts lieferte Glukose, die NMR-spektroskopisch analysiert wurde.

Das ¹³C-NMR-Spektrum des Rohextrakts zeigt nur eine sehr geringe Anzahl von Signalen mit signifikanter Intensität. Die meisten dieser Signale können der Verbindung Glukose zugeordnet werden. Das unter natürlichen Umständen in hoher Konzentration in der Hämolymphe des Insekts vorkommende Dimer Trehalose wird nicht detektiert. In welchem Ausmaß die aus dem wässrigen Extrakt von *Drosophila melanogaster* gewonnene Glukose durch enzymatische oder spontane Spaltung von Trehalose oder Glykogen während der Extraktion gebildet worden ist, konnte allerdings nicht bestimmt werden.

Die über ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmte Reinheit der nach der Chromatographie des Rohextrakts erhaltenen Glukose liegt bei über 95 %. Die ^1H -NMR-Signale für H-1 α ($\delta = 5,26$ ppm) und H-1 β ($\delta = 4,51$ ppm) sind voneinander und von den anderen sich überlappenden Signalen ($\delta = 3,96$ - $3,23$ ppm) getrennt. Sowohl H-1 α als auch H-1 β zeigen Satellitenpaare, die durch $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Kopplung ($^1J_{\text{CH}} = 170$ Hz) entstehen. Die Analyse dieser Signale führt zur Bestimmung der Absolutanreicherung auf 2,2 %, bezogen auf einen natürlichen ^{13}C -Gehalt von 1,1 %. Die übrigen Kohlenstoffpositionen der Glukose werden, bezogen auf diesen Wert, kalibriert.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum der gereinigten Glukose weist 12 komplexe Signalgruppen für das α - und β -Anomere der Glukose auf. Die beiden Anomere kommen in einem Konzentrationsverhältnis $\alpha:\beta = 0,7:1,0$ vor. Alle Signale sind komplexe Multipletts, die durch $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung entstehen (Tabelle 3.4, Abbildung 3.9).

Tabelle 3.4 Zusammenfassung der ^{13}C -NMR-Daten von Glukose.

Position	Chemische Verschiebung ^a [ppm]	$^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstante ^b [Hz]	^{13}C Isotope-shift ^c [ppb]
1 α	93,28	46,3(2 α), 3,0(6 α), 2,0(5 α)	8 (2 α)
2 α	72,79	45,6(1 α), 38,2(3 α), 2,7(4 α)	11 (1 α), 29 (3 α), 40 (1 α , 3 α)
3 α	74,05	38,2(2 α), 38,7(4 α), 3,5(6 α), 1,4(5 α)	-7 (2 α), -3 (2 α , 4 α)
4 α	70,90	40,9(5 α), 39,2(3 α), 3,0(2 α)	22 (5 α), 42 (3 α , 5 α)
5 α	72,55	43,4(6 α), 40,3(4 α), 2,0(1 α), 1,7(3 α)	6 (6 α)
6 α	61,85	43,4(5 α), 3,5(1 α), 3,6(3 α)	11 (6 α)
1 β	97,20	46,1(2 β), 4,2(3 β), 4,1(6 β)	8 (2 β)
2 β	75,41	45,8(1 β), 38,9(3 β), 2,3(4 β)	12 (1 β), 22 (3 β), 34 (1 β , 3 β)

Position	Chemische Verschiebung ^a [ppm]	¹³ C ¹³ C-Kopplungskonstante ^b [Hz]	¹³ C Isotope-shift ^c [ppb]
3β	77,10	39,4(4β), 38,9(2β), 2,3(5β), 4,0(6β), 4,2(1β)	- 8 (2β)
4β	70,83	40,5(5β), 38,7(3β), 3,5(2β)	13 (5β), 30 (3β, 5β)
5β	77,19	43,2(6β), 40,8(4β), 2,3(3β)	6 (6β), 5 (4β)
6β	61,97	43,2(5β), 4,1(1β), 4,2(3β)	12 (5β)

- a bezogen auf den externen Standard Natriumtrimethylsilylpropansulfonat.
- b bestimmt aus dem ¹³C-NMR-Spektrum von kommerziell erhältlichlicher Glukose. Die jeweiligen Kopplungspartner sind in Klammern angegeben.
- c bestimmt aus den ¹³C-NMR-Spektren von Mischungen kommerziell erhältlichlicher ¹³C-markierter Glukose und Glukose mit einem natürlichen ¹³C-Gehalt. Hochfeld-shifts sind mit positiven Vorzeichen angegeben. Die für die Isotopop-shifts verantwortlichen Atome sind in Klammern angegeben.

Das ¹³C-NMR-Spektrum (Abbildung 3.9) zeigt, dass es sich bei der isolierten Glukose um eine komplexe Mischung verschiedener Isotopologe handelt. Als Folge von Schwerisotop-shifts (Tabelle 3.4) und aufgrund von Kopplungen höherer Ordnung sind die jeweiligen Satellitenpaare nicht streng symmetrisch benachbart zu dem das [¹³C₁]Isotopolog repräsentierenden Zentralsignal angeordnet.

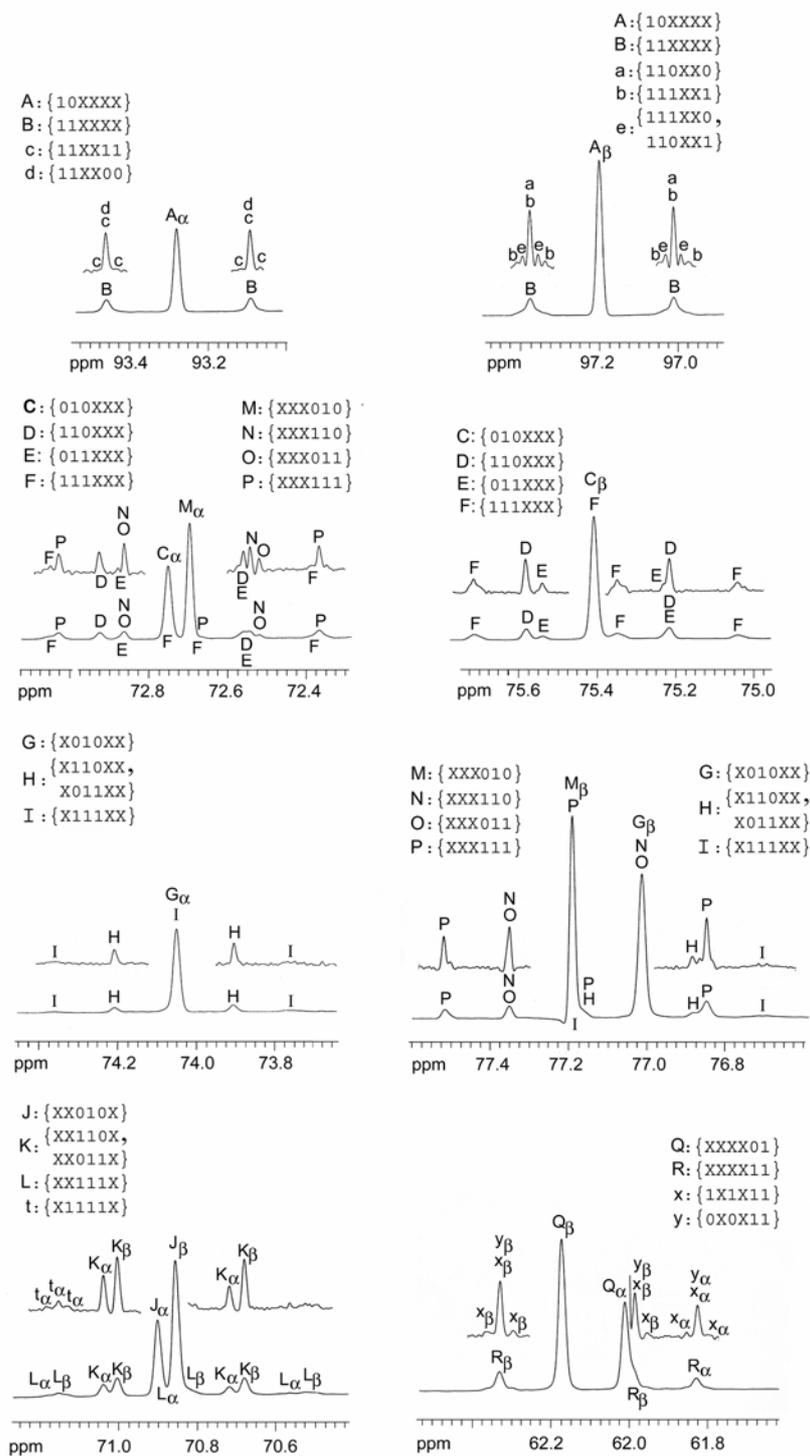


Abbildung 3.9 ^{13}C -NMR-Signale von Glukose, isoliert aus *Drosophila melanogaster*, kultiviert in einem Medium mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose. Die oberen Linien zeigen Ausschnitte aus dem Spektrum, das mit einer stärkeren Gauß-Funktion ($l_b = -2$, $g_b = 0,4$; nach Bruker-Terminologie) berechnet wurde. Die Benennung der Signale erfolgt gemäß den entsprechenden X-Gruppen.

Die Auswertung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren liefert die Konzentrationswerte der verschiedenen X-Gruppen in mol % (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Ergebnis der Analyse der X-Gruppen von Glukose nach durchlaufenem Stoffwechsel in *Drosophila melanogaster*.

X-Gruppe	Signal ^a	Molare Häufigkeit [mol %]		
		α -Glukose	β -Glukose	Durchschnitt
10XXXX	A	1,54	1,50	1,52
11XXXX	B	0,66	0,70	0,68
110XX0	a		0,32	
111XX1	b		0,24	
11XX11	c	0,15		
11XX00	d	0,52		
111XX0,110XX1	e		0,15	
010XXX	C	1,31	1,34	1,33
110XXX	D	0,42	0,32	0,37
011XXX	E	0,11	0,11	0,11
111XXX	F	0,36	0,43	0,39
X010XX	G	1,58	1,51	1,55
X110XX, X011XX	H	0,32	0,46	0,39
X111XX	I	0,30	0,23	0,27
XX010X	J	1,51	1,53	1,52
XX110X, XX011X	K	0,43	0,47	0,45
XX111X	L	0,26	0,19	0,23
XXX010	M	1,46	1,52	1,49
XXX110, XXX011	N	0,27	0,26	0,26
XXX111	P	0,47	0,42	0,45
XXXX01	Q	1,61	1,64	1,63
XXXX11	R	0,59	0,56	0,58
1X1X11	x	0,24	0,26	0,25
0X0X11	y	0,35	0,30	0,33

^a Gemäß Signalsignaturen in der Abbildung 3.9.

Aus den über NMR-Spektroskopie bestimmten Konzentrationen der X-Gruppen werden mittels eines genetischen Algorithmusses die Konzentrationen der verschiedenen Isotopologe bestimmt. Für diese Berechnungen werden die in der Tabelle 3.5 fett dargestellten Daten zu Grunde gelegt. Der Durchschnittsfehler in diesen Berechnungen beträgt 0,04 mol % mit einer Standardabweichung von 0,06.

Das Ergebnis der Konzentrationen der Glukose-Isotopologe, die aus dem Fütterungsexperiment mit *Drosophila melanogaster* gewonnen wurden, ist in Abbildung 3.10 zusammengefasst und wird mit den im natürlichen Gleichgewicht vorkommenden Isotopolog-Konzentrationen verglichen.

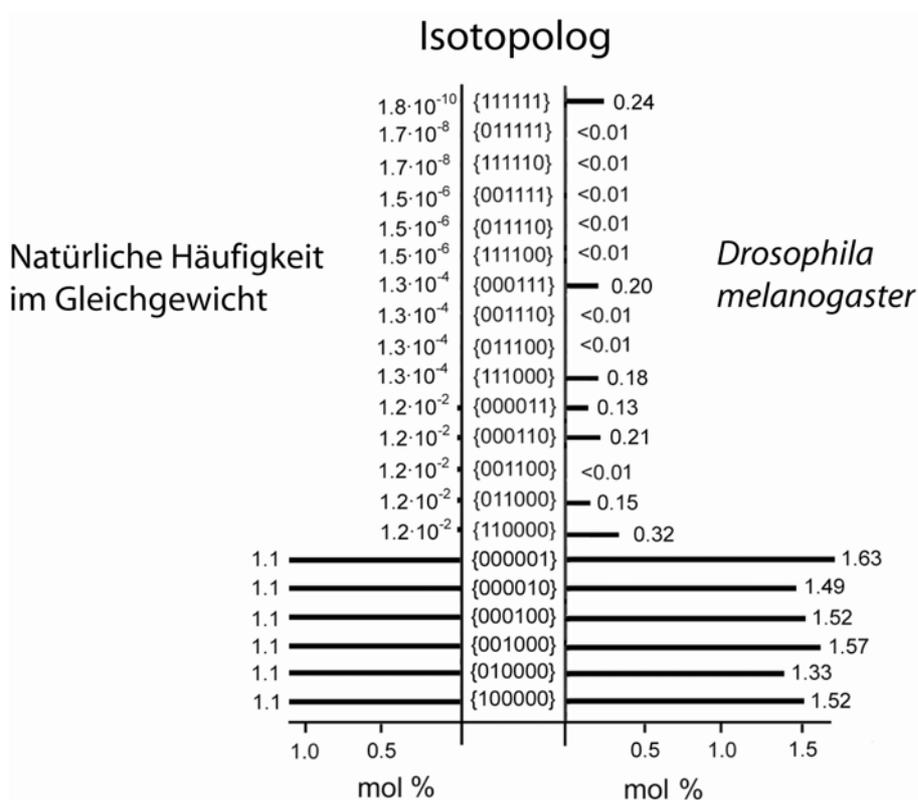


Abbildung 3.10 Vergleich der natürlichen Häufigkeit von ausgewählten Isotopologen mit ihrem Auftreten in *Drosophila melanogaster*, kultiviert auf einem Medium mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glukose.

Sieben mehrfach markierte Isotopologe werden mit signifikanter Häufigkeit berechnet. Das voll markierte Isotopolog {111111}, das ursprünglich im Medium vorhanden war, kommt noch mit einer Konzentration von 0,24 mol % vor. Das Isotopolog {110000} ist mit 0,32 mol % die am häufigsten auftretende mehrfach ^{13}C -markierte Spezies in der

Hämolymphe der Fliege. Die dreifach markierten Isotopologe {111000}, {000111} und das doppelt markierte Isotopolog {000011} treten ungefähr gleich häufig mit Konzentrationen von 0,1 bis 0,2 mol % auf. Die Häufigkeiten aller anderen mehrfach markierten Spezies liegen unter 0,01 mol %.

Die Konzentrationen aller einzelmarkierten Isotopologe weisen Werte über der natürlichen Häufigkeit von 1,1 mol % auf. Die Isotopologe {100000}, {001000}, {000100}, {000010} und {000001} kommen mit Konzentrationen im Bereich von 1,5 bis 1,6 mol % vor. Die Konzentration der Spezies {010000} liegt mit 1,3 mol % hingegen nur geringfügig über der natürlichen Häufigkeit. Diese Daten belegen, dass die ins Medium eingebrachte vollmarkierte [U-¹³C₆]Glukose im Stoffwechsel fragmentiert, metabolisiert und anschließend in die einzelmarkierten Isotopologe eingebaut wird.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse lassen sich Rückschlüsse auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in *Drosophila melanogaster* ziehen. Es ist festzustellen, dass das hier dargestellte experimentelle System zum Einbau ¹³C-markierten Materials in den Kohlenhydratpool von *Drosophila melanogaster* eingesetzt werden kann. Die analysierten Glukose-Isotopologe spiegeln dabei die komplexe biosynthetische Vergangenheit dieser detektierten Spezies wider. Aus den Isotopologmustern lassen sich die Markierungsmuster intermediär auftretender Verbindungen, wie z.B. Triosephosphat, Oxalacetat und Acetyl-CoA, retrobiosynthetisch ableiten.

Die ursprünglich im Medium vorhandene ¹³C-Anreicherung von 3,9 mol % ist durch die Stoffwechselaktivität der Fliege auf 0,24 mol % (Konzentration des Isotopologs {111111}) verringert worden. Somit wurden 94 % der anfänglich im Medium vorhandenen Glukosemoleküle mindestens einmal gespalten und wieder neu aufgebaut.

Die Isotopologe {111000} und {000111} kommen in etwa gleich hoher Konzentration vor. Sie werden durch Glukoneogenese aus [U-¹³C₃]Triosephosphat-Einheiten gebildet. Die Biosynthese dieser dreifach markierten Intermediate erfolgt entweder durch Glykolyse oder durch den nicht-oxidativen Zweig des Pentosephosphatweges aus [U-¹³C₆]Glukose (Abbildung 3.11).

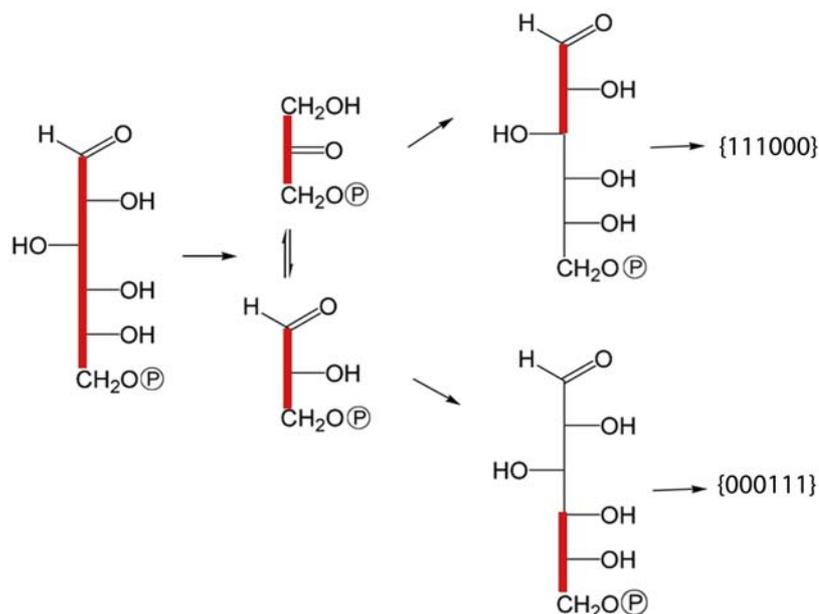


Abbildung 3.11 Die Bildung der Isotopologe {111000} und {000111} durch die Reaktionssequenz aus Glykolyse bzw. nicht-oxidativem Zweig des Pentosephosphatweges und Glukoneogenese. In Rot dargestellte Bindungen repräsentieren miteinander verbundene ¹³C-Atome, die aus der im Medium vorhandenen [U-¹³C₆]Glukose stammen.

Die Spezies {110000} weist die höchste Konzentration unter den mehrfach markierten Isotopologen von Glukose auf. Die Bildung dieser Verbindung kann durch die Transketolase-Reaktion im nicht-oxidativen Zweig des Pentosephosphatweges erklärt werden. Dabei wird eine [¹³C₂]-Einheit, die aus markierter Glukose stammt, auf ein unmarkiertes Erythrose-4-Phosphat-Molekül aus der im Überschuss vorliegenden unmarkierten Glukose übertragen (Abbildung 3.12). Die Reaktion einer unmarkierten C₂-Einheit mit vollmarkiertem [U-¹³C₄]-Erythrose-4-Phosphat führt zur Synthese des Isotopologs {001111} (Abbildung 3.12). Dieses Isotopolog wird allerdings nicht in signifikanter Menge gebildet, sondern nur in einer Konzentration von unter 0,01 mol % detektiert. Die von der Transaldolase im Pentosephosphatweg katalysierte Reaktion führt zur Bindungsspaltung zwischen C-3 und C-4 in Hexosen. Eine sich anschließende Glukogoneogenese hat den Verlust des Isotopologs {001111} zur Folge, jedoch nicht den des Isotopologs {110000}. Die im Experiment erhaltenen relativen Häufigkeiten der beiden Isotopologe {110000} und {001111} bilden somit die kooperative Wirkung von Transketolase und Transaldolase im experimentellen System ab.

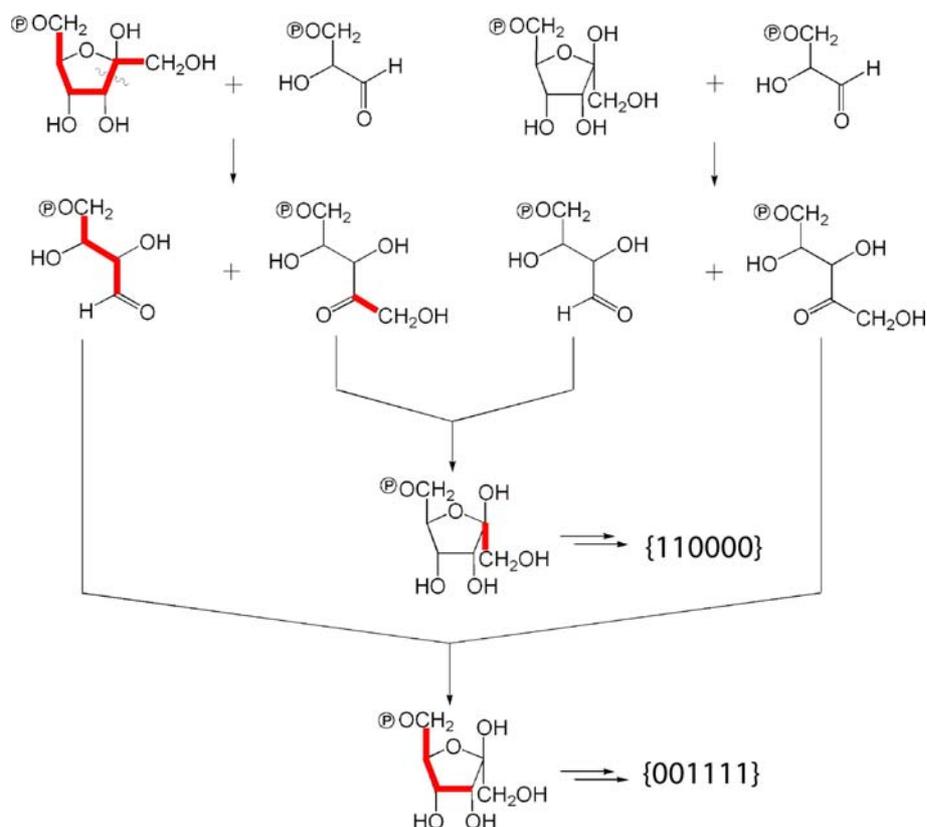


Abbildung 3.12 Die Bildung der Isotopologe {110000} und {001111} Glukosephosphat durch die katalytische Aktivität der Transketolase im Pentosephosphatweg. In Rot dargestellte Bindungen repräsentieren miteinander verbundene ^{13}C -Atome, die aus der im Medium vorhandenen [U- $^{13}\text{C}_6$]Glukose stammen.

Die Reaktionssequenz aus Glykolyse und Glukoneogenese liefert aus dem Isotopolog {110000} die Spezies {000011}. Trotzdem ist im Experiment die Konzentration des Isotopologs {110000} ungefähr dreimal höher als die des Isotopologs {000011}. Daraus ist zu folgern, dass der bidirektionale Stofffluss über Glykolyse und Glukoneogenese nicht groß genug ist, um den Gleichgewichtszustand dieser beiden Isotopologe herzustellen.

Die beiden Isotopologe {011000} und {000110} kommen in relativ hoher Konzentration vor. Die ähnlichen Häufigkeiten dieser beiden Spezies lassen vermuten, dass sie beide auf anabolischem Weg über Glukoneogenese aus [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glycerinaldehyd-3-Phosphat, das sich im Gleichgewicht mit [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Dihydroxyaceton-3-Phosphat befindet, gebildet wurden. Die Bildung dieser beiden Triosephosphat-Einheiten erfolgt durch eine komplexe Reaktionssequenz aus Citratcyclus und Coricyclus. Die Verbindung [U- $^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA kann aus verschiedenen in der Hämolymphe der Fliege vorhandenen Glukose-Isotopologen,

eine Markierung in Proteine über die *de novo* Biosynthese von Aminosäuren einzuführen. Die Markierung von Stoffwechselintermediaten ist bei *Drosophila melanogaster* im Falle von quantitativer Proteomik von hohem Interesse (Krijgsveld et al., 2003).

Der Einfluss endosymbiontischer Mikroorganismen auf den Stoffwechsel in *Drosophila melanogaster* ist bis heute wenig erforscht. Es ist denkbar, durch Zusatz von Antibiotika in das Nährmedium der Fliege die Existenz und damit die Stoffwechselaktivität der Bakterien zu unterbinden, um somit die metabolische Situation in der Fliege genau von der im Bakterium zu unterscheiden.

3.1.4 Untersuchungen zum Glukose-Stoffwechsel in Säugetieren am Beispiel Kaninchen

Die Ergebnisse des beschriebenen Experiments mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* haben gezeigt, dass sich das Störungs-/Relaxationskonzept auch auf höhere Organismen ausdehnen lässt. Die Voraussetzungen waren gegeben, Isotopologstudien an höheren Säugetieren durchzuführen. Bereits in der Vergangenheit wurde der Stoffwechsel durch Einbringen ^{13}C -markierter Glukose in den Blutkreislauf von Säugetieren untersucht. Das hier vorgestellte Störungs-/Relaxationskonzept bietet die Möglichkeit, das am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligte Stoffwechselgeschehen mit allen seinen Einzelreaktionen *in vivo* genau abzubilden.

In diesem Versuch wurden einem Kaninchen (New Zealand White Rabbit) intravenös 11 ml einer 301 mM Ringer-Lösung mit vollmarkierter $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose (166 mg pro kg Körpergewicht) über einen Zeitraum von einer Minute verabreicht und in Zeitintervallen Blutproben aus der Vene eines Ohres entnommen. Aus den so gewonnen Proben wurde das Blutserum von Blutplasma und -zellen getrennt und aus dem Serum Glukose isoliert. Dieser Glukoseextrakt wurde chromatographisch gereinigt und anschließend über ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert. Die Berechnung mittels eines genetischen Algorithmusses der aus den Spektren erhaltenen X-Gruppen lieferte insgesamt sechs mehrfach ^{13}C -markierte Glukose-Isotopologe als eine Funktion der Zeit.

In Abbildung 3.14 sind Ausschnitte der ^1H -Spektren der aus dem Blut in Zeitintervallen gewonnenen Glukoseproben dargestellt.

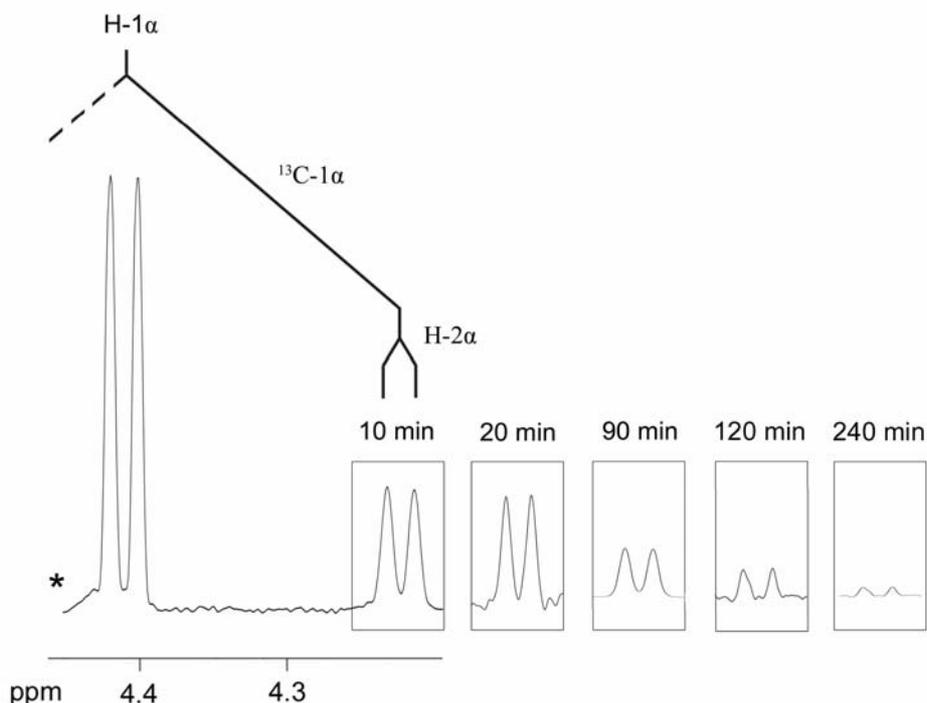


Abbildung 3.14 Der zeitliche Verlauf des C-1 α -Satelliten des H-1 α -Signals im ^1H -NMR-Spektrum der Glukose. Der Stern weist auf das beginnende Wassersignal im ^1H -NMR-Spektrum hin. Das Kopplungsmuster des Signals von H-1 α ist symmetrisch. Somit kann der fehlende, vom Wassersignal unterdrückte Satellit rekonstruiert werden. Aufgrund technischer Schwierigkeiten war die exakte Bestimmung der Probe 45 min nicht möglich.

Das H-1 α -Signal erscheint aufgrund der ^1H ^1H -Kopplung mit dem Proton an Position 2 (Kopplungskonstante, 7,9 Hz) als ein Duplett. Die Satelliten entstehen durch eine ^1H ^{13}C -Kopplung (Kopplungskonstante, 165,6 Hz) des ^1H -Isotops an Position 1 mit einem ^{13}C -Isotop an gleicher Position. Aus dem Quotienten der Integrale der ^{13}C -Satelliten und des das Zentralsignal einschließenden Gesamtsignals lässt sich somit der Anteil der Glukosemoleküle, die an Position 1 das Kohlenstoffisotop ^{13}C tragen, berechnen. Die Integrale der Satellitensignale der aus natürlichem Material gewonnenen Glukose sind mit 1,1 % des Gesamtsignals relativ klein. Im Vergleich dazu sind die Integrale der Satelliten der aus dem Kaninchenblut isolierten Glukosemoleküle anfänglich groß, nehmen aber im Verlauf der Zeit ab (Abbildung 3.14). Diese Tatsache spiegelt den Abfluss der vollmarkierten Glukose aus dem Blut in andere Stoffwechselkompartimente, wie Leber und Interzellularraum, und den in umgekehrter Richtung gleichzeitigen Einstrom unmarkierter Glukose in das Blut wider. Diese

Stoffflüsse führen zu einer Verdünnung der $[U-^{13}C_6]$ Glukose im Blut und einer damit verbundenen Abnahme der Intensitäten der Satellitensignale.

Glukose liegt in wässriger Lösung als Mischung von α - und β - Anomer in einem Konzentrationsverhältnis von 0,6:1,0 vor. Die Kohlenstoffatome beider anomerer Spezies weisen in der NMR-Spektroskopie unterschiedliche Werte der chemischen Verschiebung auf. Somit entstehen im ^{13}C -NMR-Spektrum für alle $[^{13}C_1]$ Isotopologe insgesamt 12 Linien. Die NMR-Spektren der aus dem Blutserum gewonnenen Glukose sind komplexer als das Spektrum der Glukose aus natürlichem Material oder das Spektrum der vollmarkierten $[U-^{13}C_6]$ Glukose. Der Grund hierfür ist, dass die gemessenen Glukoseproben aus verschiedenen Isotopologen bestehen. Diese sind durch Stoffwechselprozesse entstanden, an denen die gefütterte $[U-^{13}C_6]$ Glukose zusammen mit unmarkierten Metaboliten beteiligt waren. Bei diesem unmarkierten Material handelt es sich vor allem um Glukose mit einer natürlichen ^{13}C -Häufigkeit, die im Körper des Kaninchens schon vor dem Zufüttern markierter Glukose vorhanden war. Diese unmarkierten Glukosemoleküle liegen zum einen in freier Form vor, stammen aber zum anderen auch aus dem Glykogen-Pool des Kaninchens. Das komplizierte Kopplungsmuster im ^{13}C -NMR-Spektrum entsteht durch $^{13}C^{13}C$ -Kopplung und ist auf Grundlage der Kopplungskonstanten der beiden Glukose-Anomere zu erklären. Die Abbildung 3.15 zeigt Ausschnitte aus den ^{13}C -NMR-Spektren der aus dem Blut gewonnenen Glukose zu verschiedenen Zeitpunkten. Das Kopplungsmuster des Signals für das Kohlenstoffatom C-1 β ist dargestellt. Die zeitliche Veränderung des Signals für das Kohlenstoffatom C-1 des β -Anomers der Glukose ist zu erkennen. Die Amplituden des Zentralsignals wurden auf gleiche Intensität kalibriert, um die Veränderung der Signalhöhen der anderen mehrfach markierten Isotopologe zu verdeutlichen. Der Kopplungsbaum, der am Signalausschnitt des Spektrums der zum Zeitpunkt 10 Minuten entnommenen Glukose-Probe dargestellt ist, zeigt, dass durch das Zentralsignal das Glukose-Isotopolog $[^{13}C_1]$ repräsentiert wird. Die ^{13}C -Signale, die durch die Kopplung zwischen C-1, C-2, C-3 und C-6 entstehen, entsprechen der am Anfang des Experiments intravenös verabreichten vollmarkierten $[U-^{13}C_6]$ Glukose.

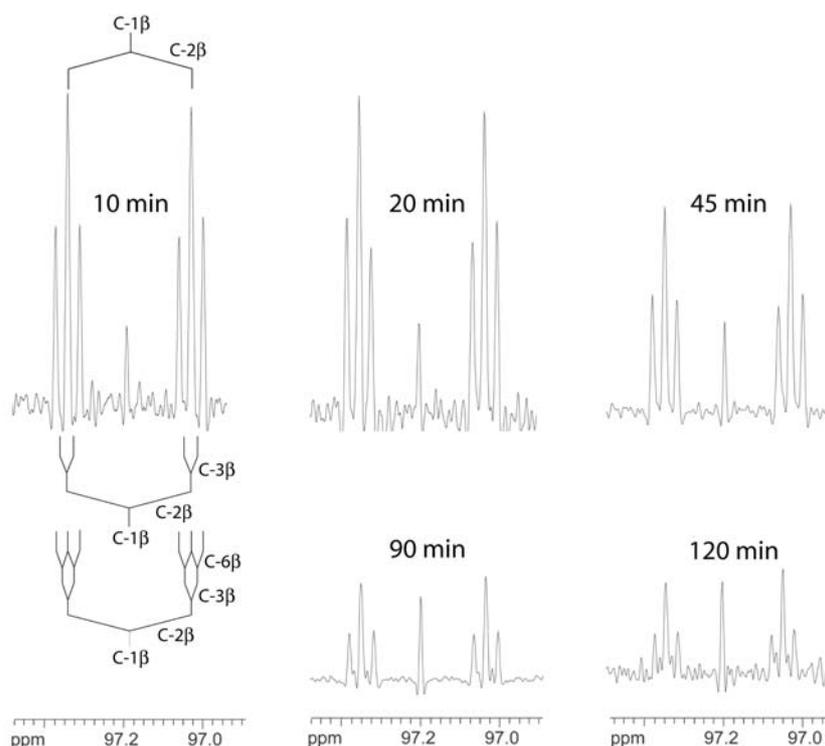


Abbildung 3.15 Das Signal von C-1 β von Glukose in den ^{13}C -NMR-Spektren von Glukose nach über 10 bis 120 Minuten ablaufenden Stoffwechselprozessen. Das Signal zum Zeitpunkt 90 Minuten zeigt den Übergang der zugeführten vollmarkierten $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glukose zu den ^{13}C -NMR-Signalen der im Stoffwechsel entstehenden Isotopologe.

Die weiteren in diesem Spektrum vorhandenen Linien sind Satellitensignale, die durch $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung in mehrfach markierten Isotopologen entstehen. Die Kopplung zwischen C-1 und C-2 ergibt Linien im NMR-Spektrum, die für ein Isotopolog charakteristisch sind, das an Position 1 und an Position 2, aber nicht an Position 3 ein Kohlenstoffatom des Isotops ^{13}C trägt. Die durch eine $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung zwischen dem Kohlenstoffatom C-1 und ^{13}C -Atomen an den Positionen C-2 und C-3 entstehenden Satellitensignale repräsentieren das Isotopolog, das an den Positionen C-1, C-2 und C-3 das Kohlenstoffisotop ^{13}C im Molekül besitzt und somit eine Bindungskopplung über drei direkt miteinander verbundene Kohlenstoffatome zeigt. Eine ^{13}C -Markierung an Position C-6 führt zu einer weiteren Aufspaltung des Signals. Die Kopplungskonstanten zwischen dem Kohlenstoffatom C-1 und den Kohlenstoffatomen C-4 und C-5 sind zu klein und daher in diesen bei einer Magnetfeldstärke von 500 MHz gemessenen NMR-Spektren nicht aufgelöst.

Die Integrale der einzelnen Signallinien stehen mengenmäßig in einem direkten Zusammenhang mit der Isotopologzusammensetzung dieser bestimmten Glukoseprobe. Da es

häufig zu einer Überlagerung verschiedener Einzelsignale kommt, und darüber hinaus eine Signalauflösung durch zu kleine Kopplungskonstanten oftmals nicht möglich ist, werden nicht einzelne Isotopologe durch diese Linien im Signal erfasst, sondern nur Summen bestimmter Isotopologgruppen. Aus diesen Gruppen ist es möglich, durch die beschriebene numerische Lösung die Konzentrationen einzelner Isotopologe zu bestimmen.

Die numerische Lösung wird dadurch erleichtert, dass nur Isotopologe erfasst werden, die einzelne ^{13}C -Atome oder nicht unterbrochene Gruppen von zwei bis sechs ^{13}C -Atomen besitzen. Diese Näherung basiert auf der Annahme, dass natürliche Glukose in einem signifikanten Überschuss zu der gefütterten $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$ im Organismus vorliegt (Eisenreich et al., 2004). Allerdings liegt die vollmarkierte $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$ in diesem hier beschriebenen Experiment anfänglich in einer Häufigkeit von ungefähr 40 % vor. Trotzdem scheint die getroffene Hypothese richtig, da die Neubildung von Glukose aus Stoffwechselfragmenten nicht im Blutserum, sondern im Zellgewebe stattfindet. Die Konzentration von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$ ist in den Zellen signifikant niedriger als im Blut, da das Blutvolumen im Vergleich zum Gesamtvolumen des Inter- und Intrazellularraums klein ist. Außerdem besteht ein Überschuss von Glukose und Glykogen im Vergleich zum Glukosegehalt des Serums.

Die Tabelle 3.6 stellt eine Zusammenfassung aller durch numerische Lösung gefundenen Glukose-Isotopologe dar. Von den 21 in den genetischen Algorithmus eingegangenen Isotopologen sind sechs Isotopologe der Spezies $^{13}\text{C}_1$ und acht mehrfach ^{13}C -markierte Glukosespezies in signifikanter Konzentration berechnet worden.

Tabelle 3.6 Isotopologzusammensetzung des Blutserums zwischen 10 Minuten und 120 Minuten nach Störung des ^{13}C -Gleichgewichts mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$.

Isotopolog	Zeit				
	10 min	20 min	45 min	90 min	120 min
100000	1,20 mol %	1,20 mol %	1,20 mol %	1,63 mol %	1,27 mol %
010000	1,09 mol %	1,11 mol %	1,18 mol %	1,60 mol %	1,22 mol %
001000	1,19 mol %	1,27 mol %	1,27 mol %	1,95 mol %	1,38 mol %
000100	1,14 mol %	1,12 mol %	1,10 mol %	1,57 mol %	1,26 mol %
000010	1,09 mol %	1,08 mol %	1,14 mol %	1,84 mol %	1,36 mol %
000001	1,19 mol %	1,20 mol %	1,17 mol %	1,90 mol %	1,37 mol %
110000	1,19 mol %	1,16 mol %	1,47 mol %	2,06 mol %	0,56 mol %
011000	0,05 mol %	0,08 mol %	0,03 mol %	0,03 mol %	0,03 mol %
000110	0,02 mol %	0,06 mol %	0,04 mol %	0,06 mol %	0,04 mol %
000011	0,09 mol %	0,08 mol %	0,13 mol %	1,17 mol %	0,69 mol %
111000	0,14 mol %	3,13 mol %	1,58 mol %	1,24 mol %	0,82 mol %
000111	0,36 mol %	3,47 mol %	1,61 mol %	1,27 mol %	0,89 mol %
001111	0,79 mol %	0,77 mol %	0,83 mol %	1,02 mol %	0,16 mol %
111111	32,20 mol %	30,34 mol %	27,91 mol %	13,60 mol %	8,05 mol %

In Abbildung 3.16 ist der zeitliche Verlauf der Konzentration des dem Kaninchen zugeführten Isotopologs {111111} und der über ^1H -Spektroskopie bestimmten ^{13}C -Absolutanreicherung aufgetragen. Die kontinuierliche Abnahme der Isotopologkonzentration und der absoluten ^{13}C -Anreicherung wird durch Stoffwechselprozesse und die damit verbundene Zerlegung der vollmarkierten Glukose bestimmt. Außerdem steht diese Verbindung im ständigen Austausch mit unmarkierter Glukose und Glykogen aus dem Zellgewebe.

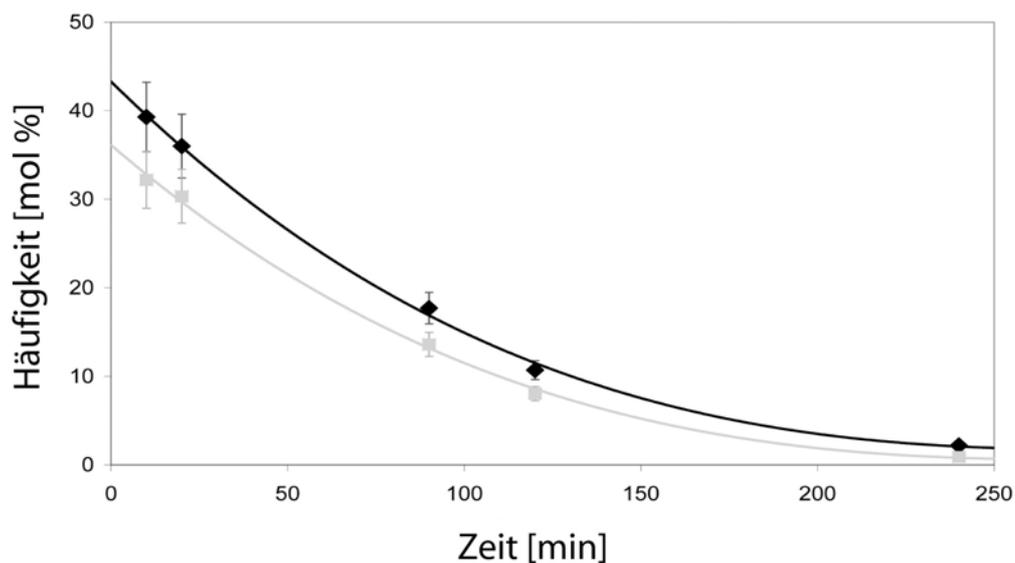


Abbildung 3.16 Zeitlicher Verlauf der absoluten ^{13}C -Anreicherung, berechnet aus der $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Kopplung von H-1 α mit C-1 α (rhombische Datenpunkte). Die Häufigkeiten von ^{13}C von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$, bestimmt aus der X-Gruppen-Berechnung, sind mit quadratischen Datenpunkten dargestellt. Die Kurve dieser Funktion erreicht als Grenzwert 1,1 mol % für das C-1 α -Signal bzw. 10^{-10} mol % für $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$.

Die Konzentrationen der sechs einfach ^{13}C -markierten Isotopologe erfahren eine kontinuierliche Zunahme bis zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Verabreichung der Störverbindung $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$ (Abbildung 3.17).

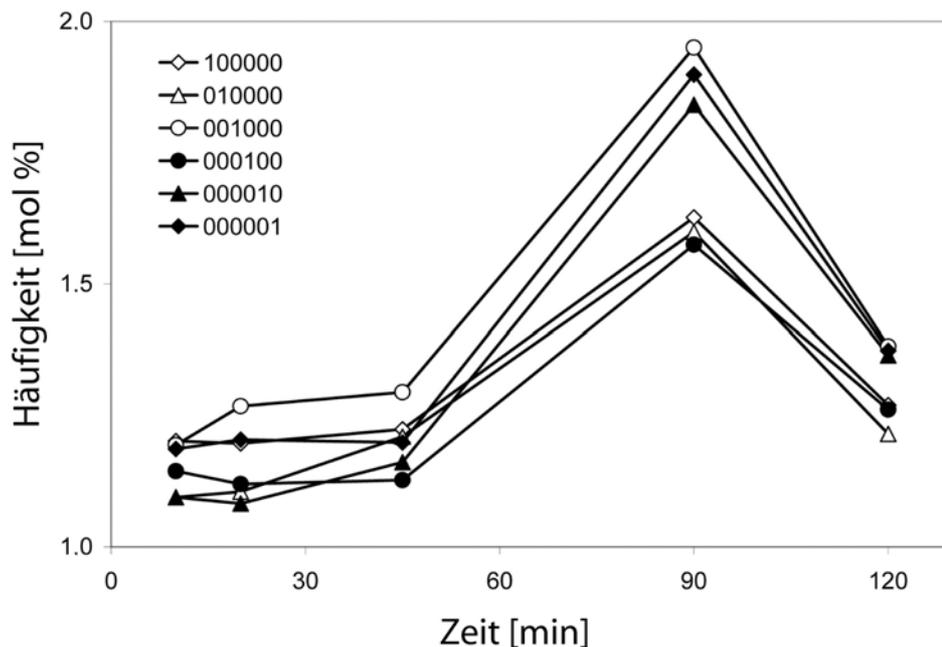


Abbildung 3.17 Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der einfach markierten Isotopologe von Glukose, isoliert aus dem Kaninchenblut, über den Zeitraum 10 und 120 Minuten nach Störung des ^{13}C -Gleichgewichts mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$.

Diese Isotopologe sind bereits vor dem Experiment in der natürlich vorkommenden Glukose mit einer Häufigkeit von 1,1 mol % im Stoffwechsel des Kaninchens vorhanden. Während der Dauer des Experiments werden Isotopologkonzentrationen von bis zu 1,8 mol % erreicht. Dieser Konzentrationsanstieg ist mit Fragmentationsprozessen der angebotenen $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$ und der Neubildung von Glukosemolekülen aus den Fragmenten durch das Stoffwechselgeschehen zu erklären. Die Abnahme der Konzentration im Zeitraum zwischen 90 und 120 Minuten ist auf die zunehmende Verdünnung ^{13}C -markierten Materials zurückzuführen.

Die Abbildung 3.18 zeigt den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen der mehrfach markierten Isotopologe mit Ausnahme des in Abbildung 3.16 gezeigten Isotopologs $\{111111\}$.

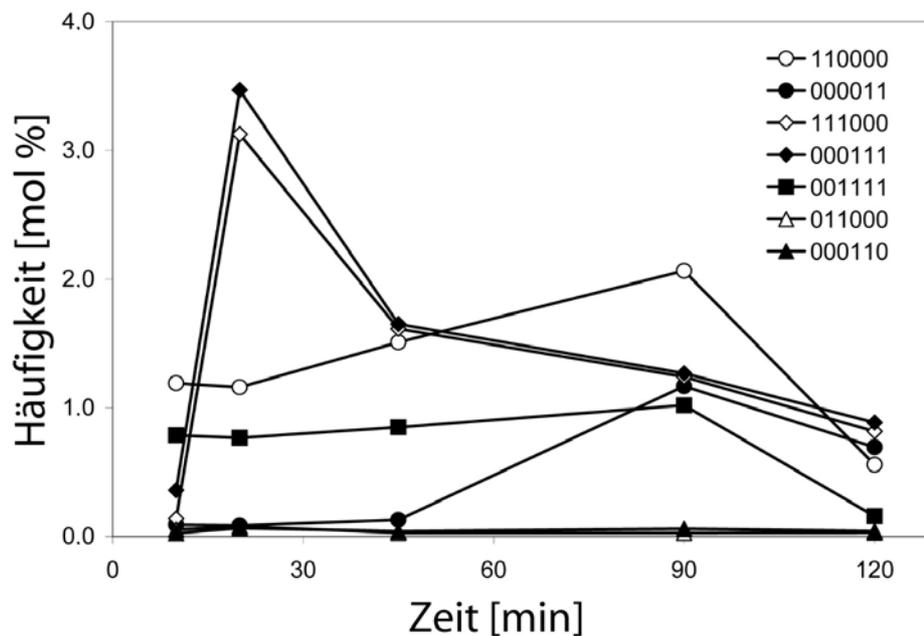


Abbildung 3.18 Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der mehrfach markierten Isotopologe von Glukose, isoliert aus dem Kaninchenblut, über den Zeitraum 10 und 120 Minuten nach Störung des ^{13}C -Gleichgewichts mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$.

Eine Messung der Konzentrationen zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde nicht durchgeführt. Trotzdem sind die Konzentrationen der mehrfach markierten Isotopologe zu diesem Zeitpunkt theoretisch bekannt. Sie entsprechen den Konzentrationen der Isotopologe unter natürlichen Bedingungen, d.h. ohne Störung des ^{13}C -Gleichgewichts mit der Störsubstanz $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glukose}$ von außen. Eine Messung dieser Konzentrationen ist mit den hier verwendeten Methoden nicht möglich.

Die in Abbildung 3.18 dargestellten Konzentrationen der Isotopologe weisen einen sehr unterschiedlichen zeitlichen Verlauf auf. Die Isotopologe $\{110000\}$ und $\{001111\}$ sind durch einen sehr schnellen Anstieg ihrer Konzentrationen charakterisiert. Das Isotopolog $\{110000\}$ erreicht anschließend eine lange Plateauphase, in der sich keine Konzentrationsänderungen abspielen. Danach nimmt die Konzentration wieder für einen Zeitraum von ungefähr einer Stunde zu, bevor eine Abnahme festzustellen ist. Auf der anderen Seite ist für die Konzentrationen der Isotopologe $\{111000\}$ und $\{000111\}$ ein anfänglicher sigmoidaler Anstieg zu verzeichnen. Die Konzentrationen der beiden Isotopologe erreichen ein Maximum von ungefähr 3,5 mol % nach einer Zeit von 20 Minuten. Anschließend gehen die Konzentrationen für beide Isotopologe auf ungefähr 1 mol % zurück. Das Isotopolog

{000011} zeigt einen verzögerten sigmoidalen Anstieg seiner Konzentration und erreicht nach 120 Minuten eine Konzentration von etwa 1 mol %. Die Konzentrationen der Isotopologe {011000} und {000110} übersteigen zu keinem Zeitpunkt den Wert 0,1 mol %. Die Konzentrationen sind jedoch gegenüber der Konzentration der in natürlicher Materie vorkommenden Isotopologe eindeutig erhöht.

Alle hier dargestellten Prozesse können zumindest qualitativ einfach erklärt werden. Das ähnliche Verhalten der Konzentrationen der Isotopologe {110000} und {001111} deutet auf die gleichen Entstehungsprozesse durch die Aktivität der Transketolase im Pentosephosphatweg hin. Dieses Enzym katalysiert die Übertragung eines C₂-Fragments zwischen Kohlenhydratphosphaten. Somit liefert die Übertragung eines aus der vollmarkierten [U-¹³C₆]Glukose stammenden ¹³C₂-Fragments auf ein unmarkiertes Erythrose-4-Phosphat-Molekül, das aus der im Überschuss vorhandenen unmarkierten Glukose stammt, [1,2-¹³C₂]Glukose-6-Phosphat. Zur gleichen Zeit bildet die Reaktion auch [U-¹³C₄]Erythrose-4-Phosphat, das in [3,4,5,6-¹³C₄]Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden kann. Die Dephosphorylierungsreaktion dieser beiden Glukose-6-Phosphate führt zur Bildung der Glukose-Isotopologe {110000} und {001111}. Diese beiden Isotopologe werden anschließend aus der Leber in das Blut abgegeben. Der schnelle Anstieg ihrer Konzentrationen im Serum ist dadurch zu erklären, dass zu ihrer Bildung nur sehr wenige enzymatische Schritte notwendig sind. Sie werden durch Phosphorylierung der angebotenen vollmarkierten Glukose, Isomerisierung des Glukose-6-Phosphats zu Fruktose-6-Phosphat, anschließender Transketolaseaktivität, Isomerisierung zu Glukose-6-Phosphat und abschließender Dephosphorylierung synthetisiert.

Die Isotopologe {111000} und {000111} können durch eine ähnliche Reaktionsabfolge gebildet werden. Jedoch ist an ihrer Biosynthese nicht die Transketolase, sondern die Transaldolase beteiligt. Aber auch die Reaktionsfolge aus Glykolyse mit anschließender Glukoneogenese führt zur Bildung dieser beiden Moleküle. An dieser Abfolge von Glykolyse und Glukoneogenese sind im Vergleich zu dem Pentosephosphatweg, bei dem die Transaldolase und Transketolase eine Rolle spielen, eine viel größere Zahl von Einzelreaktionen beteiligt. Somit wäre die verzögerte Bildung dieser beiden Isotopologe zu erwarten, falls sie ausschließlich nur über diesen Stoffwechselweg gebildet werden würden. Demgegenüber scheint überraschend, dass bei einer von der Transaldolase katalysierten Reaktionssequenz keine schnellere Bildung der Glukose-Isotopologe {111000} und {000111} stattfindet, wie es bei der Synthese der {110000} und {001111} Isotopologe über die Transketolase-Reaktion der Fall ist.

Das niedrigere Konzentrationsplateau des Isotopologs {001111} gegenüber dem des Isotopologs {110000} ist unter Einbeziehung der beteiligten Stoffwechselwege zu erklären. Ein metabolischer Angriff auf das Isotopolog {001111} führt zu einer Mischung der beiden Isotopologe {001000} und {000111}. Die gleichen Produkte entstehen auch im Pentosephosphatweg unter katalytischer Aktivität der Transaldolase. Demgegenüber entsteht beim Durchlaufen der gleichen Stoffwechselwege aus dem Isotopolog {110000} eine Mischung der Isotopologe {000011} und {110000}. Daraus ist zu schließen, dass das Isotopolog {110000} weniger leicht im Stoffwechsel weiterverarbeitet wird und somit ein höheres Konzentrationsplateau als das Isotopolog {001111} besitzt. Die Bildung des Isotopologs {001000} kann durch die vollständige Zerlegung der angebotenen vollmarkierten Glukose über eine Reihe enzymkatalysierter Reaktionen erklärt werden.

Die Bildung der Isotopologe {011000} und {000110} ist durch eine Folge von Reaktionen unter Einbeziehung des Citratcyklus erklärbar. Die Glykolyse und die darauf folgende Aktivität der Pyruvatdehydrogenase führen zur Bildung von $[U-^{13}C_2]$ Acetyl-CoA. Dieses wird in $[1,2-^{13}C_2]$ Succinat und schließlich in eine Mischung aus $[1,2-^{13}C_2]$ - und $[3,4-^{13}C_2]$ Oxalacetat umgewandelt. Durch die Decarboxylierung von $[1,2-^{13}C_2]$ Oxalacetat entsteht $[1,2-^{13}C_2]$ Pyruvat, welches sich zu den Isotopologen {011000} und {000110} durch Glukoneogenese umsetzt. Der Nachweis der Glukoneogenese über Oxalacetat belegt, dass es mit Hilfe dieses angewendeten Konzepts möglich ist, auch Stoffwechselvorgänge in muskulärem Gewebe (und vermutlich auch in der Leber) abzubilden. Erythrocyten besitzen keine Mitochondrien und damit keinen Citratcyklus.

Die von der Transketolase katalysierte Reaktion im Pentosephosphatweg bildet aus dem Isotopolog {011000} eine Isotopologmischung aus {010000} und {001000}. Dieser Prozess führt somit zur endgültigen Zerlegung der vollmarkierten Glukose in einfach markierte Isotopologe. Es ist bekannt, dass der durch die Transketolase katalysierte Bindungsbruch zwischen C2 und C3 ein äußerst schneller Prozess ist. Erwartungsgemäß erreicht die Konzentration des Isotopologs {011000} unter den experimentellen Bedingungen zu keinem Zeitpunkt ein hohes Niveau.

Das Isotopolog {110000} wird relativ schnell in der von der Transketolase katalysierten Reaktion in hoher Konzentration gebildet. Die anschließende oxidative Decarboxylierung führt zur Synthese von $[1-^{13}C_1]$ Pentosephosphat. Durch Übertragung des einfach markierten C2-Fragments auf unmarkiertes Erythrose-4-Phosphat entsteht das Isotopolog {100000}. Aus diesem bildet sich in einem Recycling-Prozess über Glykolyse und Glukoneogenese das

Isotopolog {000001}. Die biosynthetischen Prozesse, die an der Bildung aller detektierten Isotopologe beteiligt sind, werden in Abbildung 3.19 zusammengefasst.

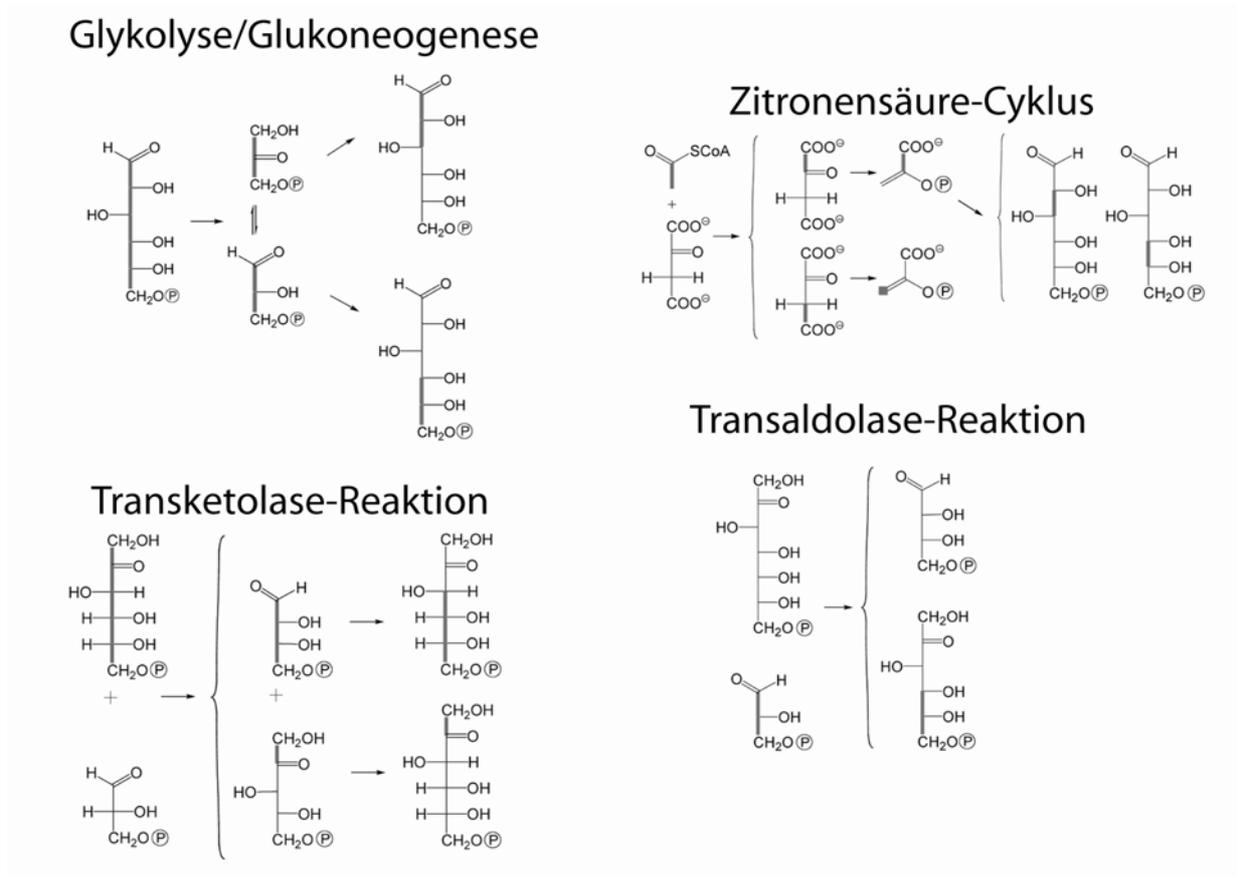


Abbildung 3.19 Die Bildung der in diesem Experiment detektierten Isotopologe ist über bekannte Stoffwechselwege erklärbar: Glykolyse, Glukoneogenese, Citratcyklus und Pentosephosphatweg.

Die Isotopologe, die sich nicht durch bisher bekannte Stoffwechselprozesse erklären lassen, sind in dieser hier durchgeführten Analyse nicht detektiert worden.

Die Software 4F ermöglicht die Simulation der zeitlichen Abhängigkeit der Aktivität der verschiedenen am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligten Stoffwechselwege. Die Grundlage dafür bieten die über die Zeit aufgetragenen Konzentrationen der einzelnen Isotopologe. Das Ergebnis dieser Simulation zeigt Abbildung 3.20. Die Glykolyse weist über den gesamten Versuchszeitraum eine relativ hohe Aktivität auf, die vor allem in den ersten 20 Minuten stark zunimmt. Die Tätigkeit der Transketolase steigt ab diesem Zeitpunkt an und erreicht zum Zeitpunkt 90 Minuten ein Maximum. Die relativen Anteile der Transaldolase und des

Citratcyklusses sind bis zu 90 Minuten nach Beginn des Experiments vergleichsweise gering. Allerdings ist dann eine Zunahme der Aktivität des Citratcyklusses festzustellen.

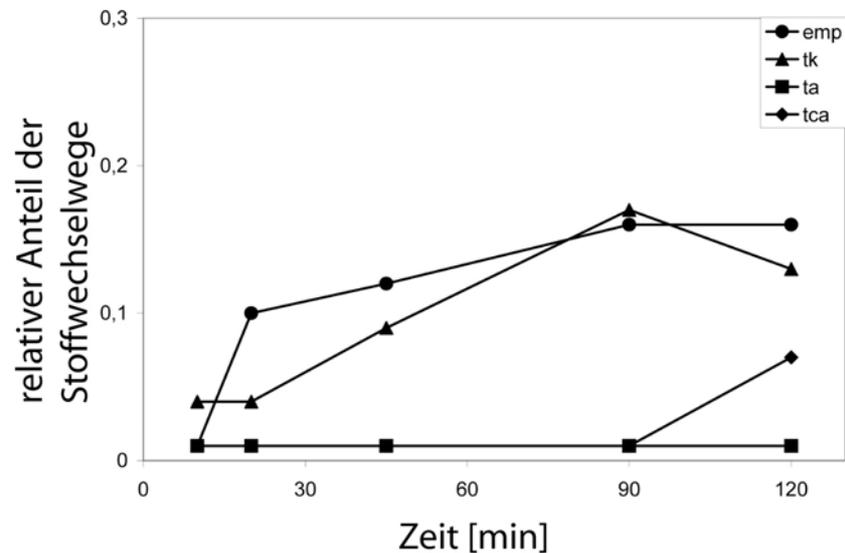


Abbildung 3.20 Das Ergebnis der Simulation mittels der Software 4F unter Benutzung der für die Stoffwechselwege gebräuchlichen Abkürzungen. emp = Glykolyse/Glukoneogenese, tca = Citratcyklus, tk = Transketolase-Reaktion, ta = Transaldolase-Reaktion.

In dieser Stoffwechseluntersuchung mit einem Säugetier, dem Kaninchen, konnte gezeigt werden, dass intravenös verabreichte $[U-^{13}C_6]$ Glukose zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen diagnostischen „Fingerabdruck“ in den NMR-Spektren der analysierten Blutglukose hinterlässt. Die Analyse dieser typischen Isotopologmuster erlaubt ein tieferes Verständnis der Stoffwechselprozesse, die mit der Blutglukose in einem metabolen Zusammenhang stehen. Die Analyse der aus dem Serum isolierten Glukose liefert Informationen über den Glukose-Katabolismus über Glykolyse oder Transaldolase-Aktivität, wie auch über Anabolismus über Glukoneogenese. Außerdem ist es möglich, die jeweiligen Anteile der Stoffwechselwege, die an der Neubildung der Glukose beteiligt sind, nämlich Pentosephosphatweg, Glykolyse/Glukoneogenese und Cori-Cyklus, zu allen Zeitpunkten der Blutentnahme zu bestimmen.

3.2 Untersuchungen zur Funktion der Isopentenylidiphosphat: Dimethylallyldiphosphat Isomerase Typ-II

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Isopentenylidiphosphat:Dimethylallyldiphosphat Isomerase Typ-II (Idi-2) aus *Bacillus subtilis* biochemisch charakterisiert. Darüber hinaus konnte die Stereospezifität der von diesem Enzym katalysierten Reaktion aufgeklärt werden.

3.2.1 Biochemische Charakterisierung des Proteins Idi-2

Die Reinigung des rekombinanten Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis* erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-Chelat-Sepharose-Säule. Die Homogenität des gereinigten Enzyms wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese überprüft. Die Abbildung 3.21 zeigt das erhaltene SDS-Gel. Dieses Gel beweist, dass die weitgehende Reinheit des Proteins Idi-2 vor den im Anschluss durchgeführten Experimenten gewährleistet war.

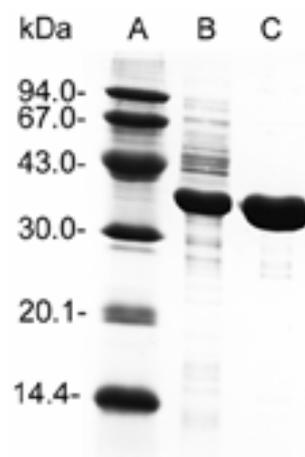


Abbildung 3.21 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. A, Molekularer Massenmarker; B, Zellextrakt des rekombinanten *E. coli* M15-pQEidi2 hyperexprimierenden *idi-2* Gens aus *Bacillus subtilis*; C, rekombinantes Idi-2 Protein aus *Bacillus subtilis* nach Reinigung durch Affinitätschromatographie über eine Nickel-Chelat-Sepharose-Säule.

Der partielle N-terminale Edman-Abbau bestätigte die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz MRGSHHHHHGGSVTRAE mit der Sequenz des rekombinanten Gens. Die über Massenspektroskopie durch MALDI-TOF bestimmte Proteinmasse von 38463 Da stimmt weitgehend mit der berechneten Masse von 38455 Da überein.

3.2.1.1 Hydrodynamische Studien mit dem Protein Idi-2 aus *Bacillus subtilis*

Die Röntgenstrukturanalyse des Enzyms Idi-2 aus *Bacillus subtilis* liefert eine D₄ symmetrische homooktamere Struktur mit einer relativen Masse von 309 kDa bei Anwesenheit von FMN (Steinbacher et al., 2003). Die Untersuchung des möglichen Einflusses der Substrate und Cofaktoren auf die Quartärstruktur des Enzyms erfolgte mit Hilfe von Sedimentationsexperimenten durch analytische Ultrazentrifugation. Das Enzym Idi-2 sedimentiert als einzelne symmetrische Bande mit einem Sedimentationskoeffizienten von 10,0 S, wenn weder Substrat noch Cofaktor in der Lösung mit dem Enzym vorliegen (Abbildung 3.22).

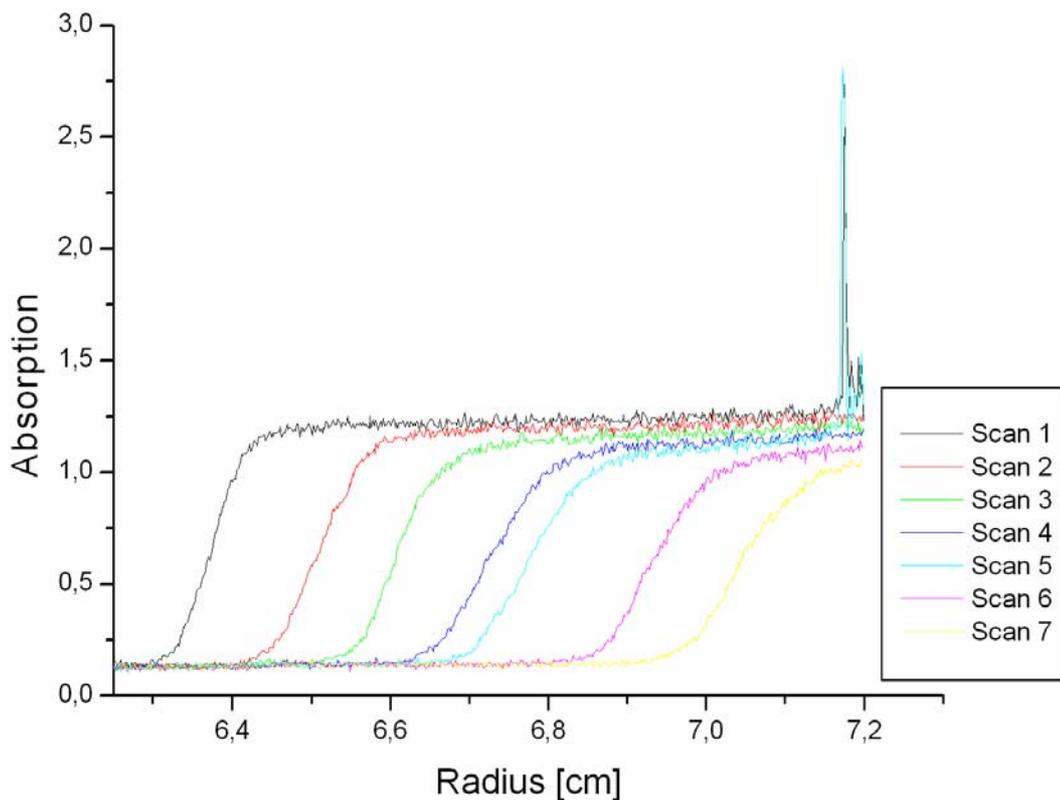


Abbildung 3.22 Absorptionsspektren während der Ultrazentrifugation von Idi-2 (2,6 mg/ml) in 100 mM Trishydrochlorid pH 8. Die Messungen fanden bei einer Temperatur von 20 °C, 60000 Upm und einer Wellenlänge von 280 nm statt. Als Referenz diente 100 mM Trishydrochlorid pH 8. Die Scans wurden in Zeitintervallen von jeweils 5 min aufgenommen.

Dieser erhaltene Sedimentationskoeffizient stimmt mit der publizierten Oktamerstruktur überein (Steinbacher et al., 2003). In der Assay-Mischung, d.h. unter Anwesenheit von Idi-2, dem Substrat DMAPP und den Cofaktoren FMN, NADPH und Mg^{2+} , sedimentiert das Protein mit einem einer Tetramerstruktur entsprechenden Sedimentationskoeffizienten von 4,0 S (Abbildung 3.23).

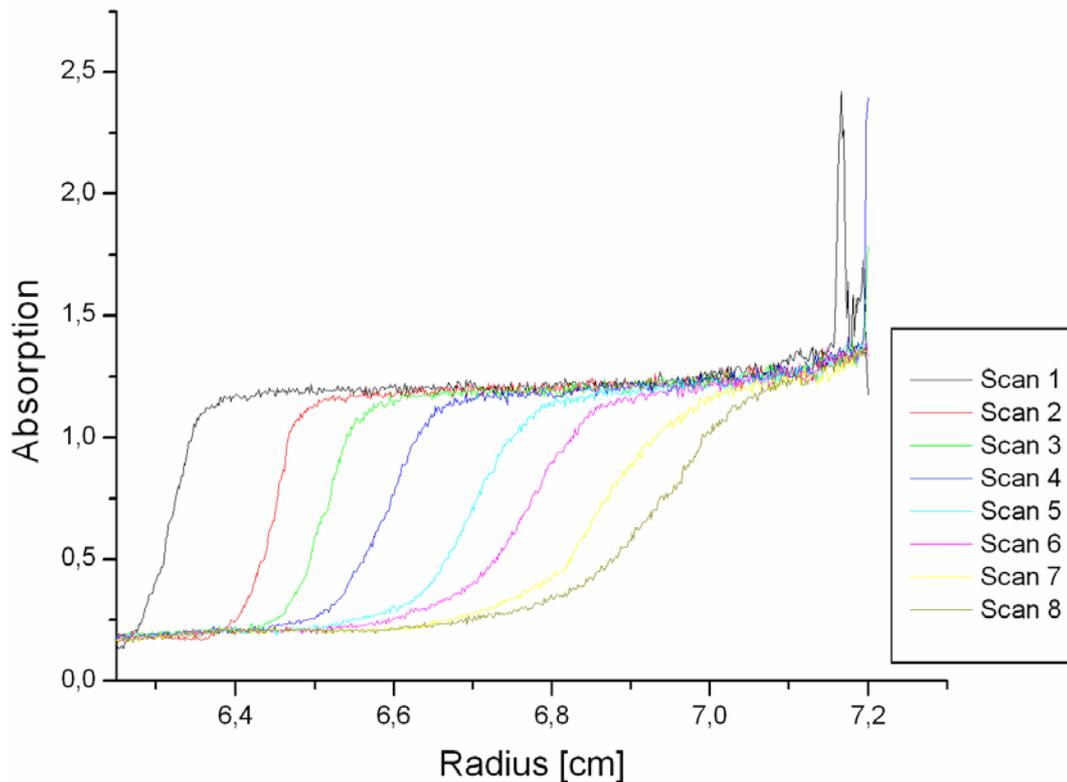


Abbildung 3.23 Absorptionsspektren während der Ultrazentrifugation von Idi-2 (3,5 mg/ml) mit 110 μ M FMN, 270 μ M NADPH, 1 mM Mg^{2+} und 1 mM DMAPP in 100 mM Trishydrochlorid pH 8. Die Messungen fanden bei einer Temperatur von 20 °C, 60000 Upm und einer Wellenlänge von 465 nm statt. Als Referenz diente 100 mM Trishydrochlorid pH 8. Die Scans wurden in Zeitintervallen von jeweils 5 min aufgenommen.

Diese erhaltenen Befunde weisen darauf hin, dass das Protein im aktiven Zustand nach Bindung der Cofaktoren und des Substrats eine Konformationsänderung vom Oktamer zum Tetramer durchläuft.

3.2.1.2 Katalytische Eigenschaften des Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis*

Das Enzym Idi-2 katalysiert die reversible Umwandlung von Isopentenylidiphosphat in Dimethylallyldiphosphat. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von IPP und DMAPP erfolgte auf der Basis von $^1\text{H}^{13}\text{C}$ und $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Korrelations-Spektroskopie mit ^{13}C -markierten Verbindungen (Rohdich et al., 2002). Die bekannten NMR-Daten dieser Substrate bzw. Produkte der von der Idi-2 katalysierten Reaktion ermöglichen das Verfolgen der ablaufenden Isomerisierung mittels NMR-Spektroskopie (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 NMR-Daten von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat.

Position	Chemische Verschiebung [ppm]		Kopplungskonstante [Hz]		
	^1H	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	J_{HH}	J_{PH}	J_{CC}^{b}
Isopentenylidiphosphat					
1	4,10		6,6	6,6	
2	2,43		6,7		
3		143,4			71, 41
4	4,88	111,3			71, 3
5	1,80	21,4			41, 3
Dimethylallyldiphosphat					
1	4,49		6,6	6,6	
2	5,48		7,1		
3		139,7			41, 42
4 (<i>E</i> -Methyl)	1,79	24,7			42, 4
5 (<i>Z</i> -Methyl)	1,75	17,0			41, 4

^abezogen auf den externen Standard Trimethylsilylpropansulfonat.

^berhalten durch $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{DMAPP}$ und $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{IPP}$.

Die Inkubation der Reaktionsmischung wurde mit der Zugabe von Idi-2 gestartet und lief aerob bei einer Temperatur von 37 °C in Anwesenheit des Substrats IPP, der Cofaktoren NADPH, FMN und zweiwertiger Metallionen ab. Im NMR-Spektrum ist die kontinuierliche Zunahme der zum DMAPP gehörenden Signale zu erkennen, während gleichzeitig die Signalintegrale des IPP konstant kleiner werden. Nach einer bestimmten Zeit ist ein Gleichgewichtszustand zwischen IPP und DMAPP erreicht, in dem keine Änderung der Stoffmengenkonzentrationen zu verzeichnen ist. In Abbildung 3.24 sind die ^1H -Signale der Methylgruppen des Ausgangsstoffs IPP und des enzymatisch entstehenden DMAPP gezeigt.

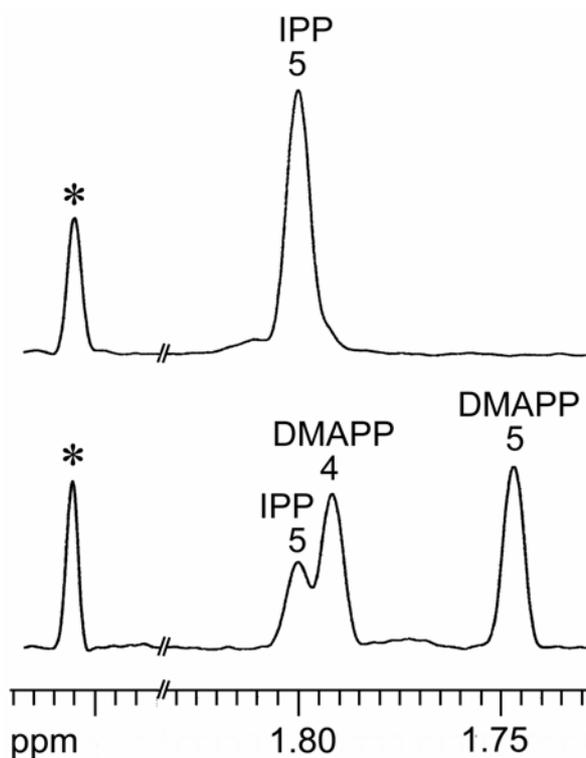


Abbildung 3.24 ^1H -NMR-Spektren von DMAPP und IPP. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von DMAPP, das durch die katalytische Aktivität des Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis* unter aeroben Bedingungen gebildet wurde. Die Assay-Mischung beinhaltete 100 mM Trishydrochlorid, pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, 2,5 mM NADPH, 10 μM FMN, 2 mM Natriumacetat und 10,8 mM IPP. *, Interner Standard (Natriumacetat).

In Abbildung 3.25 ist der umgekehrte Reaktionsverlauf, d.h. die Umwandlung von DMAPP in IPP, unter sonst gleichen Versuchsbedingungen dargestellt. Das ^1H -Spektrum des Gleichgewichtszustands von IPP und DMAPP zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem

Spektrum des Experiments, bei dem als Substrat IPP eingesetzt wurde (Abbildung 3.24).

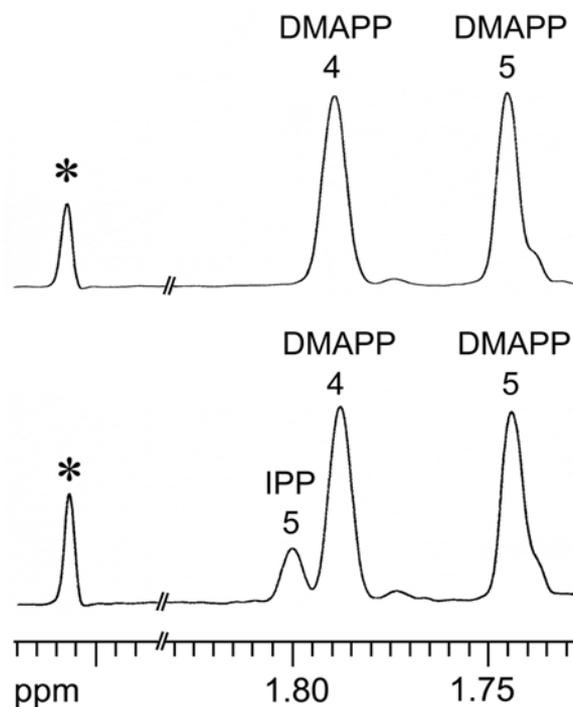


Abbildung 3.25 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von DMAPP und IPP. Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von IPP, das durch die katalytische Aktivität des Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis* unter aeroben Bedingungen gebildet wurde. Die Assay-Mischung beinhaltete 100 mM Trishydrochlorid, pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, 2,5 mM NADPH, 10 μM FMN, 2 mM Natriumacetat und 10,8 mM DMAPP. *, Interner Standard (Natriumacetat).

Als interner Standard wurde in den Reaktionsmischungen Natriumacetat verwendet. Dadurch konnten direkt aus den Signalintegralen die Konzentrationen von IPP bzw. DMAPP bestimmt werden. Die Abbildung 3.26 stellt den Konzentrationsverlauf von IPP und DMAPP als Funktion der Zeit dar.

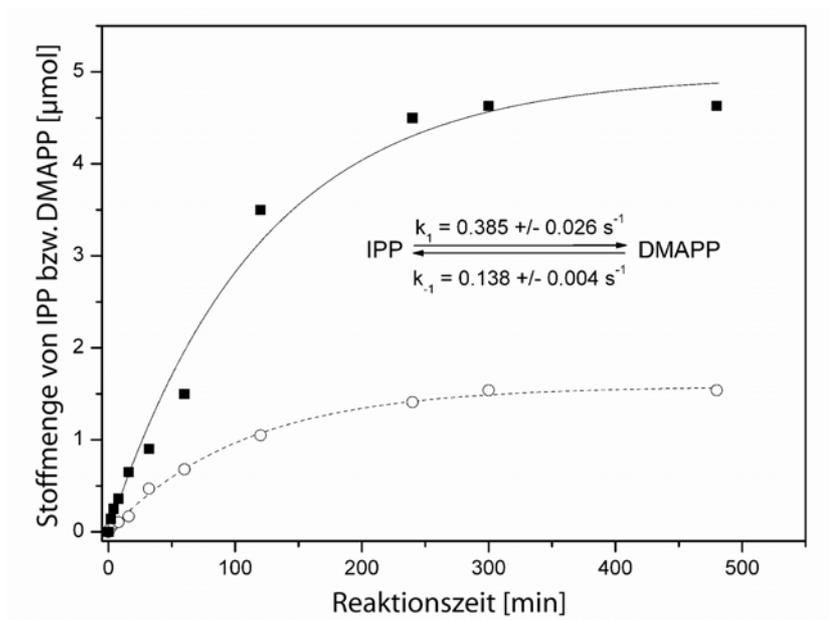


Abbildung 3.26 Katalytische Raten der reversiblen Umwandlung von IPP und DMAPP, die durch das Protein Idi-2 aus *Bacillus subtilis* katalysiert wird. Die Raten wurden durch arithmetischen Durchschnitt aus vielen Iterationen der Kurven Zeit gegen Stoffmenge gebildeten IPP und DMAPP mit Hilfe der Software DYNAFIT (Kuzmic, 1996) berechnet. Die Reaktionsmischungen beinhalteten 100 mM Trishydrochlorid, pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, 2,5 mM NADPH, 10 μM FMN, 2 mM oder 3 mM Natriumacetat, und 10,8 mM IPP oder DMAPP. ■, Bildung von DMAPP aus IPP; ○, Bildung von IPP aus DMAPP.

Die beschriebenen Versuchsbedingungen (10,8 mM IPP oder DMAPP und 0,2 mg Enzyme pro ml) führen bei der Reaktion der reversiblen Umwandlung von IPP in DMAPP zu einem Gleichgewichtszustand nach einer Inkubationsdauer von ca. vier Stunden (Abbildung 3.26).

Die Bestimmung der Reaktionsraten für die reversible Umwandlung von IPP in DMAPP erfolgte mittels ^1H -NMR-Spektroskopie. Die Benutzung von Mg^{2+} als Cofaktor führt zu katalytischen Aktivitäten von $0,63 \pm 0,042$ und $0,23 \pm 0,007 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Tabelle 3.8). Diese Werte stimmen weitgehend mit den Aktivitäten des aus *Escherichia coli* stammenden Enzyms Idi-1 überein (Hahn et al., 1999). Das Verhältnis der Aktivitäten ist im Bereich des für diese reversible Reaktion früher bestimmten Verhältnisses der Gleichgewichtskonstanten von ca. 3:1 (Street et al., 1990).

Die in dieser Reaktion ablaufende Isomerisierung ist ebenfalls über ^{13}C -NMR-Spektroskopie zu verfolgen. Dazu wird als Substrat $[3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3]\text{DMAPP}$ verwendet. Man erkennt die Abnahme der ^{13}C -gekoppelten Signale der *Z*- und *E*-Methylgruppen des DMAPP, die bei

einer chemischen Verschiebung von 17,0 und 24,7 ppm im Spektrum erscheinen. Außerdem nimmt das Signal des quartären Kohlenstoffatoms des DMAPP bei 139,7 ppm ab. Gleichzeitig entstehen drei neue Signale bei einer chemischen Verschiebung von 143,4, 111,3 und 21,4 ppm, die zu den Kohlenstoffatomen 3,4 und 5 von IPP gehören. (Tabelle 3.7 und Abbildung 3.27). Innerhalb der Genauigkeit dieser Versuchsbedingungen liegen die über ^{13}C -NMR-Spektroskopie und die über ^1H -Spektroskopie bestimmten spezifischen Aktivitäten im gleichen Bereich.

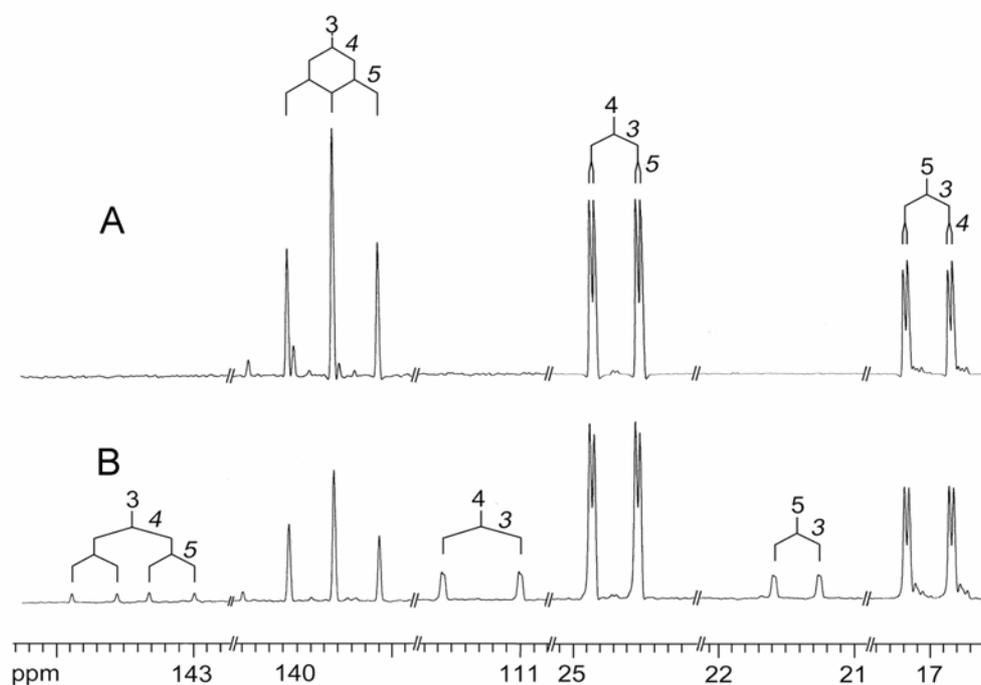


Abbildung 3.27 ^{13}C -NMR-Signale. A, $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{DMAPP}$; B, Mischung aus $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{DMAPP}$ und $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{IPP}$. Das $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{IPP}$ wurde durch die katalytische Aktivität des Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis* unter aeroben Bedingungen gebildet. Die Reaktionsmischungen beinhalteten 100 mM Trishydrochlorid, pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, 2,5 mM NADPH, 10 μM FMN und 5,2 mM $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{DMAPP}$.

Das länger bekannte Protein Idi-1 benötigt zur katalytischen Aktivität nur zweiwertige Kationen (Poulter und Rilling 1981, Koyama und Ogura, 1999). Als notwendige Cofaktoren für die Aktivität des Proteins Idi-2 aus *Streptomyces* sp. CL190 und *Staphylococcus aureus* wurden FMN, NADPH bzw. NADH und zweiwertige Metallkationen unter aeroben wie auch

unter anaeroben Bedingungen angenommen (Kaneda et al., 2001). Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Enzyms Idi-2 von Cofaktoren unter Sauerstoffausschluss wurde das Protein unter anaeroben Bedingungen in einer Glove-Box gereinigt. Für die Aktivität des Proteins unter diesen Bedingungen sind weiterhin FMN und zweiwertige Metallionen notwendig, wohingegen eine enzymatisch katalysierte reversible Umsetzung von IPP in DMAPP auch ohne Zusatz von NADPH oder NADH festzustellen ist. Die katalytischen Aktivitäten sind unter aeroben wie auch unter anaeroben Versuchsbedingungen ähnlich (Tabelle 3.8). Unter aeroben Bedingungen benötigt Idi-2 aus *Bacillus subtilis* NADPH, FMN und zweiwertige Kationen zur katalytischen Aktivität und gleicht somit in dieser Abhängigkeit der Idi-2 aus *Streptomyces*. Sobald jedoch das Protein anaerob gereinigt und die enzymatische Reaktion unter Sauerstoffausschluss durchgeführt wird, ist zur Aktivierung des Enzyms kein NADPH mehr erforderlich.

Tabelle 3.8 Zusammenfassung der katalytischen Aktivitäten des Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis* unter verschiedenen Bedingungen.

Bedingung	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
Umwandlung von IPP in DMAPP	
aerob ^a	$0,63 \pm 0,042^c$
anaerob	$0,62 \pm 0,037^c$
Umwandlung von DMAPP in IPP	
aerob ^a	$0,23 \pm 0,007^c$
anaerob	$0,19 \pm 0,093^c$
Umwandlung von $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{DMAPP}$ in $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{IPP}$	
aerob	0,08
Umwandlung von $[2,3-^{13}\text{C}_2]\text{Pyruvat}$ in $[2,3-^{13}\text{C}_2]\text{Laktat}$	
aerob ^b	0,001

Die Reaktionsmischungen beinhalteten MgCl_2 .

^a Die Reaktionsmischungen beinhalteten NADPH und Dithiothreitol.

^bDie Reaktionsmischungen beinhalteten NADH.

^cDie Aktivitäten wurden aus den Ratenkonstanten berechnet (Abb. 3.26).

Die Rolle des FMN bleibt weiterhin unbekannt. Photometrische Reaktionsansätze zeigten weder unter aeroben noch unter anaeroben Versuchsbedingungen einen Hinweis auf die Reduktion des FMN während der Reaktion. Es konnten experimentell somit keine Hinweise auf einen Redox-cycling-Prozess des FMN gefunden werden. Die an der Bindung des FMN beteiligten Aminosäurereste der Idi-2 sind über eine große Zahl von Orthologen absolut konserviert (Abbildung 3.28). Diese Tatsache spricht für eine essentielle Rolle des FMN, auch wenn das Enzym Idi-2 aus *Bacillus subtilis* nur eine sehr geringe Affinität zu diesem Cofaktor zeigt und kein Redoxprozess bei der Isomerisierung zwischen IPP und DMAPP abläuft. Die Substratbindestelle des Enzyms ist weiterhin unbekannt. Dennoch tritt eine Gruppe absolut konservierter Aminosäurereste in unmittelbarer Nähe zur FMN-Bindestelle auf. In dieser Gruppe befinden sich auch die polaren Aminosäuren H147, N149, Q152 und E153. Somit ist die Möglichkeit gegeben, dass das Substrat benachbart zum Isoalloxazin-Teil des FMN gebunden wird. In Abwesenheit eines direkten Hinweises auf die Beteiligung eines ablaufenden Redox-Prozesses ist anzunehmen, dass das FMN eine dipolstabilisierende Wirkung auf ein kationisches Intermediat oder einen Übergangszustand der Reaktion zeigt. Eine ähnliche Funktion wurde für das Tryptophan 121 im Falle des Proteins Idi-1 aus *E. coli* postuliert (Wouters et al., 2003).

Das rekombinante Enzym Idi-2 zeigt eine absolute Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von zweiwertigen Metallionen. Die höchsten Aktivitäten des Proteins aus *Bacillus subtilis* konnten durch Zugabe des Cofaktors Ca^{2+} in die Reaktionsmischung erreicht werden. Die Konzentration der jeweiligen Metallionen in der Mischung betrug 10 mM. In Tabelle 3.9 sind die bestimmten Aktivitäten mit den getesteten Metallionen zusammengefasst. Für die Idi-2 aus *Streptomyces* wurde eine andere Reihenfolge der durch zweiwertige Metallionen bedingten Aktivierung bestimmt (Kaneda et al., 2001).

Tabelle 3.9 Vergleich der Aktivierung des Proteins Idi-2 durch zweiwertige Kationen.

Metallion	Relative Aktivität (%)
Ca^{2+}	100
Mg^{2+}	65
Mn^{2+}	17
Zn^{2+}	0,2
Ni^{2+}	< 0,005
Cu^{2+}	< 0,005
Co^{2+}	< 0,005

Die Genome prokaryotischer Organismen tragen die *idi-2*-Gene zusammen mit einem paralogem *lldD*-Gen. Dieses Gen kodiert für die L-Laktat-Dehydrogenase, die die reversible Umwandlung von Laktat in Pyruvat katalysiert. Dieser Befund führte zur Untersuchung einer eventuell vorhandenen Redoxaktivität der Typ-2 Isomerase. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurde als Substrat $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat eingesetzt. Die Zweifachmarkierung dieses Moleküls diente zur gleichzeitigen Erhöhung der Sensitivität und Selektivität. Mit Zusatz des Cofaktors NADH in die Reaktionsmischung war die Bildung von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat aus $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat über ^{13}C -NMR-Spektroskopie festzustellen (Abbildung 3.29). Die aus dem ^{13}C -Spektrum berechnete katalytische Rate wurde mit $1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bestimmt (Tabelle 3.8). Durch Zugabe von FMN in die Reaktionsmischung konnte keine Erhöhung der katalytischen Aktivität erreicht werden.

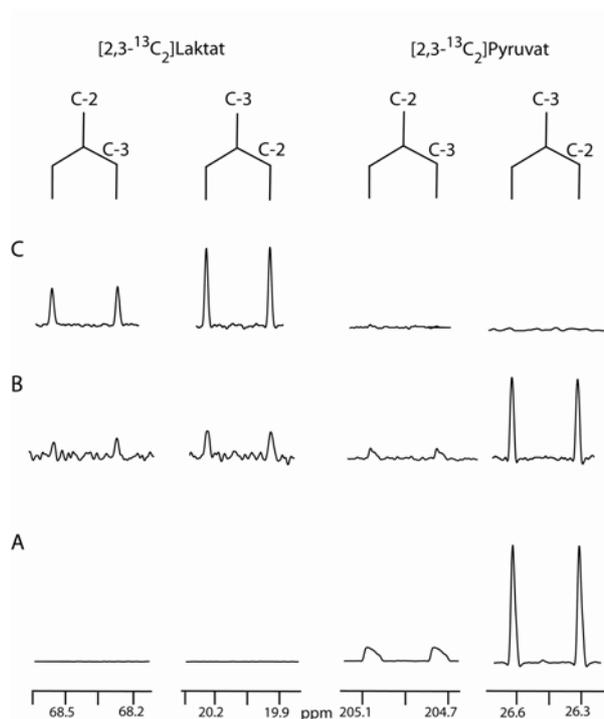


Abbildung 3.29 ^{13}C -NMR-Signale zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation. A, vor Beginn der Inkubation, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat; B, Inkubationsdauer 4 h, Mischung aus $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat; C, Inkubationsdauer 16 h, $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat. Das $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat wurde durch die katalytische Aktivität des Proteins Idi-2 aus *Bacillus subtilis* unter aeroben Bedingungen gebildet. Die Reaktionsmischung beinhaltete 9 μM Idi-2, 100 mM Trishydrochlorid, pH 8,0, 15 mM NADH, und 1,6 mM $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat.

Die Expression des Enzyms Idi-2 erfolgte in *Escherichia coli*. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass in der Probe des gereinigten Proteins des Typs Idi-2 Enzyme des Wildtyps von *E. coli* vorhanden waren. Die in diesem Experiment beobachtete Umsetzung von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat in $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat könnte dann durch eine Laktatdehydrogenase-Aktivität durch *E. coli*-Wildtyp-Hintergrundaktivitäten hervorgerufen werden. Um diese möglicherweise vorhandenen Hintergrundaktivitäten auszuschließen, wurde eine Proteinprobe hergestellt, die aus einem *E. coli*-Stamm exprimiert wurde, der den Expressionsvektor ohne Insert besaß. Die Affinitätschromatographie erfolgte nach der üblichen Reinigungsvorschrift. Insbesondere wurde bei der Sammlung des Eluats das Retentionsvolumen des Proteins Idi-2 berücksichtigt. Die Analyse dieser Probe auf vorhandene Laktatdehydrogenaseaktivität fiel negativ aus. Damit ist die im ^{13}C -Spektrum festgestellte enzymatische Katalyse der Umsetzung von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat in $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat auf die Redoxaktivität des Proteins Idi-2 zurückzuführen.

3.2.2 Mechanistische Untersuchungen zur Idi-2 katalysierten reversiblen Isomerisierung von IPP in DMAPP

Die von der Idi-1 katalysierte Reaktion ist als ein reversibler (1,3)-antarafacialer Protonen-Additions-/Eliminierungsmechanismus bekannt. Dabei wird das H-Atom der Re-Seite von C2 des IPP übertragen und die (*E*)-Methylgruppe des DMAPP aus der endständigen Methylengruppe des IPP gebildet. Die Regiospezifität dieser Reaktion ist durch eine niedrige Genauigkeit charakterisiert (Fellermeier et al., 2001). Die Struktur des Proteins vom Typ-1 aus *E. coli* konnte über Röntgenstrukturanalyse gelöst werden (Wouters et al., 2002, Wouters et al., 2003, Carrigan et al., 2003, Durbecq et al., 2001). Der angenommene Protonierungs-/Deprotonierungsmechanismus der von der Idi-1 katalysierten Reaktion verläuft dabei unter Beteiligung der Aminosäurereste Cys-67, Glu-116 und wahrscheinlich Tyr-104 (Wouters et al., 2004). Inwieweit die Reaktion über ein kationisches Intermediat oder über einen Übergangszustand verläuft, ist noch aufzuklären. Die vorhandenen experimentellen Daten sind mit einer Stabilisierung beider möglichen geladenen Spezies durch den Indolrest von Trp-161 in Einklang zu bringen.

Die Untersuchung der (*Z*)/(*E*)-Spezifität der Typ-II Isomerase des rekombinanten Enzyms von *Bacillus subtilis* (Laupitz et al., 2004) erfolgte durch aerobe Inkubation mit unmarkiertem IPP, Mg²⁺, NADPH und FMN in einer Reaktionslösung, die ungefähr 80 % D₂O (V/V) enthielt. Die Inkubation der Reaktionslösung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C innerhalb des NMR-Magneten. Der Reaktionsverlauf wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt. Nach einem Zeitintervall von fünf Minuten war das zur Methylgruppe des IPP gehörende Signal gegenüber den Signalen der (*E*)- und (*Z*)-Methylgruppen des DMAPP noch dominierend (Abbildung 3.30A). Nach 120 Minuten hingegen war in dem gleichen Maße ein intensives Signal für die (*Z*)-Methylgruppe des DMAPP entstanden wie die Intensität des IPP-Methylsignals abgenommen hatte (Abbildung 3.30B). Der leichte Hochfeldshift, den man für die übrigen Komponenten dieses Signals beobachtet, hängt mit der zunehmenden Menge an ²H-Atomen an den Positionen C-2 und C-4 zusammen. Im Gegensatz zum Signal der (*Z*)-Methylgruppe des DMAPP bleibt die Intensität des Signals der (*E*)-Methylgruppe niedrig. Diese Beobachtung zeigt, dass die ²H-Atome aus dem Lösungsmittel spezifisch in die Position der (*E*)-Methylgruppe des DMAPP eingebaut werden. Somit ist für die Isomerase vom Typ-2 die gleiche (*E*)/(*Z*)-Spezifität festzustellen, die schon zuvor für die Typ-1 Isomerase gezeigt werden konnte (Street et al., 1990).

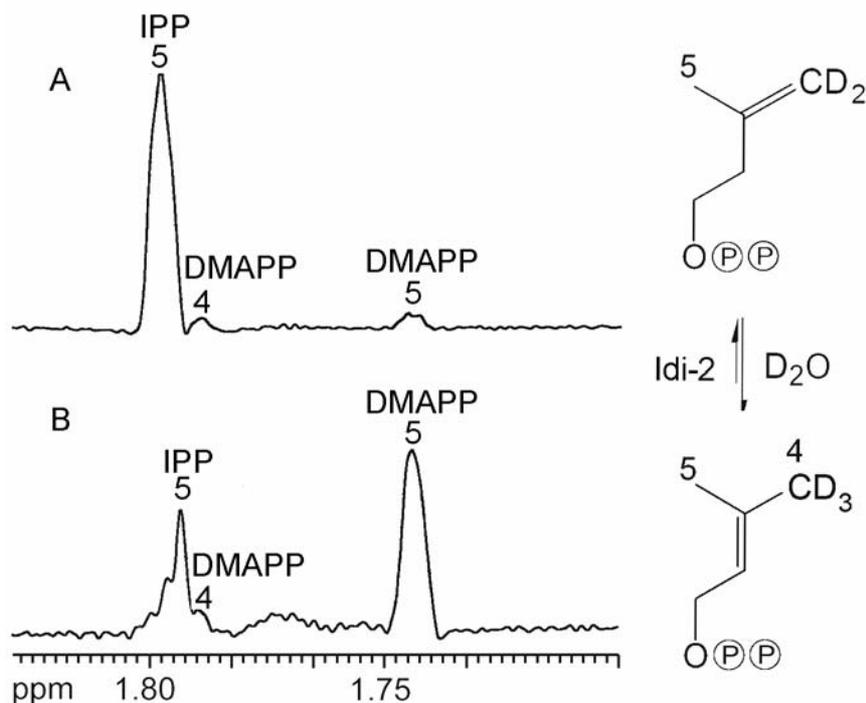


Abbildung 3.30 $^1\text{H-NMR}$ Signale von IPP und DMAPP, beobachtet in einer Reaktionsmischung aus 80 % D_2O , FMN, NADPH, IPP und rekombinante IPP-Isomerase vom Typ-2 aus *Bacillus subtilis*. A, beobachtete Signale nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C; B, beobachtete Signale nach 120 Minuten Inkubation bei 37 °C.

Die Untersuchung des stereochemischen Verlaufs an der Position C-2 von IPP während der von der Typ-II Isomerase katalysierten Reaktion erfolgte über eine dreistufige Strategie. Zunächst wurde eine Probe hergestellt, in der das Substrat IPP an Position C-2 mit Deuterium markiert war. Die anschließende Umsetzung dieser Probe mit der Isomerase vom Typ-1 diente zur Überprüfung der absoluten Konfiguration, da von diesem Enzym bekannt ist, dass es spezifisch das H_{Re} -Atom an Position C-2 vom IPP ablöst (Leyes et al., 1999). Der abschließende Vergleich dieses Versuchsergebnisses mit dem des gleichen Experiments mit der Isomerase vom Typ-2 sollte die Stereochemie der von der Idi-2 katalysierten Reaktion aufklären.

Die Herstellung des an Position C-2 deuterierten IPP erfolgte unter Benutzung der von dem Protein IspH katalysierten Reaktion des alternativen Terpenbiosyntheseweges (Altincicek et al., 2002, Rohdich et al., 2002, Adam et al., 2002, Wolff et al., 2003). Es ist bekannt, dass in dieser Reaktion das H-Atom, das an die Position C-2 des Moleküls IPP eingebaut wird, spezifisch an die H_{S1}-Position des Produkts gelangt (Rieder et al., 2000, Neundorf et al., 2003, Hoeffler et al., 2002, Eisenreich et al., 2004).

Eine Probe von [3,4-¹³C₂]1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat wurde in einer Reaktionsmischung, bestehend aus IspH-Protein, Flavodoxin, Flavodoxinreduktase und NADH, bei 37 °C inkubiert. Dieser Reaktionsansatz liefert die Referenzlösung A mit dem erwarteten Konzentrationsverhältnis von 6,3:1 für [1,2-¹³C₂]IPP und [1,2-¹³C₂]DMAPP. Der gleiche Reaktionsansatz wurde in einem Puffer mit ungefähr 90 % D₂O durchgeführt (Lösung B). Beide Lösungen wurden ohne weitere Reinigungsschritte ¹³C-NMR-spektroskopisch vermessen. Die Vorteile der in diesem Experiment verwendeten ¹³C-Markierung sind bei Betrachten der Spuren A und B in Abbildung 3.31 offensichtlich. Aufgrund der Sensitivität sind nur die ¹³C-angereicherten Atome des Substrats und der beiden Produkte spektroskopisch detektierbar. Die richtige Zuordnung dieser Signale wird über die charakteristischen ¹³C¹³C-Kopplungskonstanten überprüft. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Deuterium-Markierung quantitativ aus den relativen Intensitäten der Isotop-geshifteten ¹³C-Signale bestimmt werden. Ein Vergleich der zum IPP gehörenden Signale in den Spuren A und B in Abbildung 3.31 mit den in Tabelle 3.10 zusammengefassten Werten zeigt, dass die Deuterium-Markierung aus dem Lösungsmittel in die Position C-2 des IPP bei Ablauf der Reaktion in D₂O eingebaut wird. Die relativen Intensitäten der geshifteten und der nicht geshifteten Signale liefern einen Einbau von 0,6 Deuteriumatomen in Position C-2 von IPP. Die Abweichung vom Wert 0,9 des Lösungsmittels ist auf die sechsfache Benachteiligung des Deuterium-Einbaus zu Gunsten des Protons zurückzuführen. Die Ursache dafür kann ein kinetischer Isotopeffekt, ein ungünstiger Fraktionierungsfaktor der Protonendonorseite, eine teilweise limitierte Zugänglichkeit der aktiven Lösungsmittelmoleküle oder eine unvorhersehbare Kombination aller dieser Faktoren sein. Ein ähnlicher Einbau von Deuteriumatomen aus dem Lösungsmittel ist natürlich für die Position C-4 des Substrats in dem zu DMAPP führenden Zweig der IspH-Reaktion zu erwarten. Dieser Deuterium-Einbau ist aber aufgrund der Entfernung der Position C-4 zu einem ¹³C-markierten Kohlenstoffatom im DMAPP über ¹³C-NMR-Spektroskopie nicht nachweisbar.

Tabelle 3.10 ^{13}C -NMR-Daten von $[1,2-^{13}\text{C}_2,2-^2\text{H}_1]\text{IPP}$ und $[1,2-^{13}\text{C}_2,2-^2\text{H}]\text{DMAPP}$.

Position	Chemische Verschiebung [ppm]	Kopplungskonstante [Hz]			^2H -shift [ppb]
		J_{CC}	J_{CP}	J_{CD}	
IPP					
1	64,02	38,3	5,8		40
2	37,79	38,3	7,5	20	345
DMAPP					
1	62,48	49,8	5,3		77
2	119,23	49,8	8,2	n.b.	n.b.

Zur Überprüfung der vorhergesagten absoluten Konfiguration des in Experiment B deuterierten IPP wurde eine Probe der ursprünglichen Lösung lyophilisiert, um das D_2O möglichst vollständig aus der Mischung zu entfernen. Der getrocknete Rückstand wurde in H_2O gelöst und diese Lösung mit der Isomerase vom Typ-1 inkubiert. Im Gleichgewichtszustand der Umsetzung liegt ein Konzentrationsverhältnis zwischen DMAPP und IPP von ungefähr 3:1 vor (Street et al., 1990). In der Anfangsphase der Isomerisierungsreaktion dominiert die Umwandlung von IPP in DMAPP. Die ^{13}C -NMR-Signale der schon zum Teil im Gleichgewicht vorliegenden Reaktionsmischung sind in Spur C der Abbildung 3.31 dargestellt. Die dazugehörigen NMR-Daten sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst. Mit der Abnahme der relativen Intensität der ansonsten unveränderten IPP-Signale erfolgt eine Intensitätszunahme der Signale des ursprünglichen DMAPP im Vergleich zu Spur B in Abbildung 3.31. Diese Signale sind auf die Bildung Deuterium-freier Moleküle aus der Deuterium-freien Komponente der IPP-Vorstufe zurückzuführen. Zusätzlich zeigt das ^{13}C -NMR-Spektrum neue Hochfeld-verschobene Signale für das Kohlenstoffatom C-1 von DMAPP. Die dazugehörigen Verschiebungswerte sind nur mit der Bildung von DMAPP-Molekülen, die an Position C-2 ein Deuteriumatom tragen, in Einklang zu bringen. Entsprechende α -geshiftete Signale werden aufgrund der verlängerten Relaxationszeit, die durch das Deuteriumatom an dieser Position entsteht, nicht detektiert.

Das Wasserstoffatom, das in Position C-2 von IPP in der von dem IspH-Protein katalysierten Reaktion eingeführt wird, bleibt somit spezifisch an der H_{Si}-Position gebunden. Mit der bekannten Stereochemie der von der Isomerase vom Typ-1 aus *Escherichia coli* (Leyes et al., 1999) katalysierten Reaktion kann man nun die Stereochemie der Isomerase vom Typ-2 aus *Bacillus subtilis* ableiten. Dazu wird eine definierte Probe von (S)-[2-²H₁]IPP im Lösungsmittel H₂O in Anwesenheit der Isomerase vom Typ-2 umgesetzt. Die ¹³C-NMR-Signale der entstandenen Mischung sind in Abbildung 3.31D dargestellt. Die relativen Intensitäten der Signale von DMAPP und IPP zeigen, dass sich in diesem Versuch diese beiden Verbindungen näher am Gleichgewichtszustand der Konzentrationen von ungefähr 3:1 befinden als im vorangegangenen Experiment. Die Signalsignaturen in Abbildung 3.31C und D sind jedoch gleich. Aus diesem Befund ist zu schließen, dass die Isomerase vom Typ-2 die gleiche Stereochemie wie die Idi-1 besitzt und das gleiche Proton (C-2)-H_{Re} von IPP überträgt.

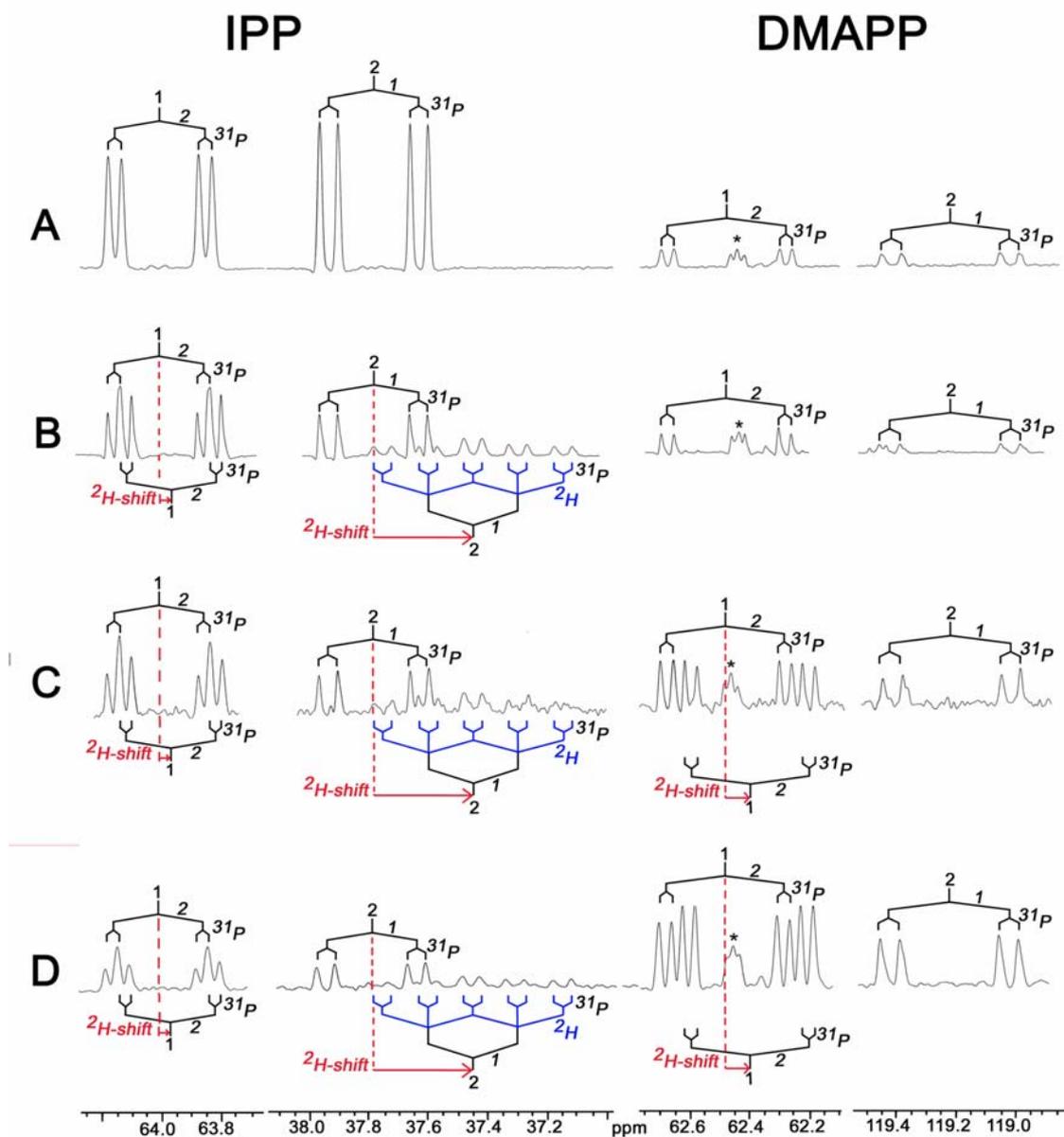


Abbildung 3.31 Die ^{13}C -NMR-Signale von IPP und DMAPP, beobachtet in einer Reaktionsmischung aus $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat, IspH-Protein, Flavodoxin, Flavodoxin-Reduktase und NADH. A, im Lösungsmittel H_2O ; B, im Lösungsmittel D_2O ; C, in einer Reaktionsmischung (Lösungsmittel H_2O) mit (S)- $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2, 2\text{-}^2\text{H}_1]$ IPP und IPP-Isomerase Typ-I; D, in einer Reaktionsmischung (Lösungsmittel H_2O) mit (S)- $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2, 2\text{-}^2\text{H}_1]$ IPP und IPP-Isomerase-Typ-II. Die Kopplungsmuster und ^2H -Isotop-shifts sind angezeigt. *, Signal, hervorgerufen durch eine Verunreinigung.

In Abbildung 3.32 ist der stereochemische Verlauf der von den Proteinen IspH und IPP-Isomerase (Typ-I oder Typ-II) katalysierten Reaktionen zusammengefasst.

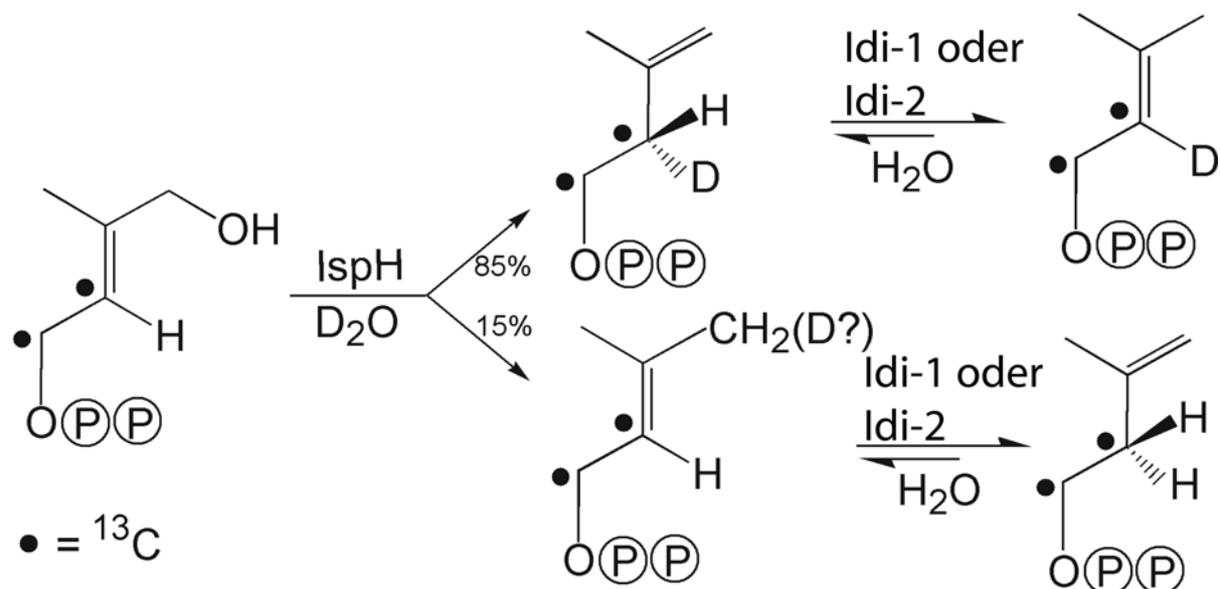


Abbildung 3.32 Schema des stereochemischen Verlaufs der von den Proteinen IspH und IPP-Isomerase (Typ-I oder Typ-II) katalysierten Reaktionen. Die gefüllten Kreise symbolisieren die ^{13}C -Markierung von [3,4- $^{13}\text{C}_2$]1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat.

Weitere Experimente sind notwendig, um den genauen Mechanismus der von der Isomerase Typ-2 katalysierten Reaktion aufzuklären. Darüber hinaus ist die essentielle katalytische Rolle des Cofaktors FMN im anaeroben Prozess der reversiblen Isomerisierungsreaktion von IPP in DMAPP nicht geklärt (Laupitz et al., 2004). Die in diesen Versuchen gezeigten mechanistischen Eigenschaften können zufällig sein. Es ist mit den bis hierher gewonnenen Erkenntnissen nicht zulässig, eine noch engere Verwandtschaft der Mechanismen beider Isomerisierungs-Reaktionen auszuschließen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In vivo-Einbauversuche mit isotopmarkierten Vorstufen werden seit vielen Jahrzehnten zur Untersuchung von Stoffwechselprozessen eingesetzt. Das Hauptaugenmerk solcher Experimente liegt meist auf dem Versuch, eine bestimmte Einzelreaktion im Stoffwechsel nachzuweisen. Dabei wird der Stoffwechsel oftmals als eindimensionales System betrachtet, und der mögliche Einbau in das Zielmolekül über Seitenwege im Stoffwechsel bleibt unberücksichtigt. Dies kann zu fehlerhaften Interpretationen der erhaltenen Einbaudaten und somit zu falschen Zuteilungen von Stoffwechselprozessen führen.

In dieser Dissertation wird anhand mehrerer Beispiele gezeigt, dass es mit Hilfe eines Stör-/Relaxationskonzepts sowie mit Hilfe des Retrobiosynthesekonzepts möglich ist, metabolische Vorgänge in ihrer gesamten Vernetzung im Stoffwechsel unter weitgehend physiologischen Bedingungen qualitativ wie auch quantitativ abzubilden. Es wurden Einbauexperimente mit der Störverbindung [U-¹³C₆]Glukose an verschiedenen Modellorganismen, dem pathogenen Bakterium, dem Insekt und dem Säugetier durchgeführt. Die aus diesen Versuchen erhaltenen Informationen erlauben weitreichende Aussagen über die Funktionsweise der in diesen Organismen ablaufenden zentralen Stoffwechselreaktionen.

In einem Modellexperiment mit dem humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* konnte die Isotopologzusammensetzung verschiedener Aminosäuren unter definierten Bedingungen nach Wachstum in einem Medium mit [U-¹³C₆]Glukose erfasst werden. Aus der retrobiosynthetischen Analyse der detektierten Aminosäuren ist zu schließen, dass dieser Mikroorganismus mit einem unvollständigen Citratcyklus ausgestattet ist, und die Bildung von Oxalacetat über die „anaplerotische Reaktion“ durch Carboxylierung von Pyruvat und/oder Phosphoenolpyruvat erfolgt. Die Aminosäure Lysin entsteht ausschließlich aus Aspartat und Pyruvat. Es zeigte sich, dass die Biosynthese von Serin hauptsächlich über den Triosephosphatpool und von Glycin über Serin verläuft. Die aromatischen Aminosäuren werden über den Shikimatweg gebildet.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht zu erklären, warum das Markierungsmuster von Lysin kein symmetrisches Isotopolog aufweist, da im Genom von *Listeria monocytogenes* alle Gene der Biosynthese von Lysin über succinylierte Intermediate (z.B. für die Bildung von (L,L)-Diaminopimelat) vorhanden sind. Möglicherweise kann das Heranziehen von Transkriptomdaten zur Aufklärung dieser noch offenen Fragestellung beitragen.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss des Virulenzfaktors PRFA auf die metabolische Situation von *Listeria monocytogenes* untersucht. In drei Stämmen, die sich in der Expressionsstärke dieses Virulenzfaktors unterscheiden, findet man einen unvollständigen Citratzyklus, keine endogene Synthese vieler Aminosäuren und wenig Cycling im Kohlenhydratpool. Dennoch sind große Unterschiede in der Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren festzustellen. Der PRFA-hyperexprimierende Stamm ($\Delta prfApPRFA^*$) zeigt im Vergleich zum Wildtyp (EGD) und dem Stamm mit fehlendem Virulenzfaktor ($\Delta prfA$) eine deutlich erhöhte *de novo* Biosynthese von Valin, Isoleucin und Leucin. Die Zunahme der *de novo* Biosynthese im Stamm $\Delta prfApPRFA^*$ kann durch einen verringerten Transport der verzweigtkettigen Aminosäuren aus dem Medium in die Bakterienzelle bei Anwesenheit des Virulenzfaktors PRFA erklärt werden.

Die Übertragung dieser Befunde auf die metabolische Situation des Wirtsorganismus ist eine weiterführende Fragestellung, zu deren Aufklärung Störexperimente mit infizierten Säugerzellen beitragen sollten. Dieses hier angewendete Methodenkonzept eignet sich zur Aufklärung von miteinander vernetzten Stoffwechselprozessen in Bakterien. Zusammen mit anderen analytischen Verfahren, wie z.B. Transkriptomanalysen, sollte dieses Verfahren zur Aufdeckung möglicher Angriffspunkte für neuartige Antiinfektiva in pathogenen Mikroorganismen beitragen.

Zur Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels in höheren Organismen wurde ein Einbauexperiment mit dem sich entwickelnden Insekt *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Die erhaltene komplexe Isotopologmischung zeigt, dass die verabreichte vollmarkierte [$U-^{13}C_6$]Glukose nur zu einem kleinen Teil ohne vorherige Prozessierung (d.h. Recycling) in der Hämolymphe des Insekts erscheint. Der größte Teil der gemessenen Glukose-Isotopologe hat eine komplexe metabolische Vorgeschichte und wird durch katabole und anabole Stoffwechselreaktionen synthetisiert. Die Biosynthese aller beobachteten Isotopologe kann durch die Stoffwechselreaktionen Glykolyse, Pentosephosphatzyklus und Coricyklus erklärt werden.

Die aus diesem Experiment erhaltenen Daten lassen es viel versprechend erscheinen, analoge Störexperimente mit veränderten Medienzusammensetzungen und/oder mit Stoffwechselmutanten von *Drosophila melanogaster* durchzuführen. Diese weiterführenden Experimente könnten dazu beitragen, die Dynamik des hochdimensionalen Systems zu verstehen und die Auswirkungen von bestimmten Genen auf die Stoffwechselsignatur zu erforschen.

Das beschriebene Störexperiment mit *Drosophila melanogaster* bereitete die Grundlage, das beschriebene Methodenkonzept auf Säugetiere auszudehnen. Dazu wurde einem Kaninchen die Störverbindung [U-¹³C₆]Glukose zugeführt, und zu bestimmten Zeitpunkten wurden Blutproben entnommen. Es war festzustellen, dass die Störsubstanz bereits nach kurzer Zeit einen diagnostischen „Fingerabdruck“ in den erhaltenen Isotopologmischungen hinterlässt. Diese charakteristischen Isotopologmuster ermöglichen einen Einblick in alle Stoffwechselprozesse, die mit der Blutglukose in einem metabolen Zusammenhang stehen. Durch die Analyse der Glukoseisotopologie war es möglich, die Anteile der Glukoneogenese über Pentosephosphatweg, Glykolyse und Cori-Cyklus zu allen Zeitpunkten genau zu bestimmen. Mit Hilfe dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass es die angewendeten Isotopologmethoden ermöglichen, den Kohlenhydratstoffwechsel in höheren Organismen unter *in vivo*-Bedingungen abzubilden. Somit erscheint dieses hier vorgestellte Methodenkonzept dazu geeignet, in Zukunft Anwendungen im Bereich der Diagnostik und Therapiekontrolle von Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. Diabetes, zu finden.

Isotopmarkierte Vorstufen waren entscheidende Hilfsmittel bei der Aufklärung von Biosynthesewegen. Im Arbeitskreis konnte auf diesem Wege die Biosynthese von zahlreichen Naturstoffen bestimmt werden, darunter viele terpenoide Verbindungen. Alle Terpene leiten sich von IPP und DMAPP ab, die durch die Isopentenylidiphosphatisomerase ineinander übergeführt werden können. Die menschliche Isopentenylidiphosphat-Isomerase vom Typ 1 hat keine nachweisbare Ähnlichkeit zu der in pathogenen Mikroorganismen existierenden Isomerase vom Typ 2.

Somit besteht die Möglichkeit, Inhibitoren für das bakterielle Enzym zu entwickeln, die wenige oder keine hemmenden Effekte für das menschliche Enzym aufweisen. In dieser Dissertation werden die Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung der Isopentenylidiphosphat-Isomerase vom Typ 2 und zur Stereochemie der von diesem Enzym katalysierten reversiblen Umwandlung der beiden universellen Terpenvorstufen IPP und DMAPP vorgestellt. Es zeigt sich, dass dieses Enzym unter Sauerstoffausschluss FMN und zweiwertige Kationen (Mg²⁺ oder Ca²⁺) zur katalytischen Aktivität benötigt. Aerobe Bedingungen erfordern zusätzlich das Vorhandensein von NADPH oder NADH zur Aktivierung des Enzyms. Die genaue Rolle des FMN bleibt ungelöst. Es konnten experimentell keine Hinweise auf einen Redox-cycling-Prozess des FMN während der Reaktion weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen gefunden werden. Das in den Genomen prokaryotischer Organismen zusammen mit den *idi-2*-Genen vorkommende

paraloge *lldD*-Gen kodiert für die L-Laktat-Dehydrogenase. In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Redoxaktivität der Idi-2 bei der Umwandlung von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat in $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat mit einer katalytischen Rate von $1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nachgewiesen werden. Mit Hilfe der bekannten Stereochemie der Isopentenylidiphosphat-Isomerase vom Typ 1 konnte der stereochemische Verlauf an der Position C-2 von IPP während der von der Typ-II Isomerase katalysierten Reaktion gelöst werden. Es zeigte sich, dass die Idi-2 genauso wie die Idi-1 das Proton (C-2)- H_{Re} von IPP während der Isomerisierungsreaktion überträgt.

5 Literaturverzeichnis

1. Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Gräwert, T., Arigoni, D., Bacher, A. & Rohdich, F. (2002) Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12108-12113.
2. Altincicek, B., Duin, E. C., Reichenberg, A., Hedderich, R., Kollas, A. K., Hintz, M., Wagner, S., Wiesner, J., Beck, E. & Jomaa, H. (2002) LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **532**, 437-440.
3. Apostol B. L., Kazantsev, A., Raffioni, S., Illes, K., Pallos, J., Bodai, L., Slepko, N., Bear, J. E., Gertler, F. B., Hersch, S., Housman, D. E., Marsh, J. L., Thompson, L. M. (2003) A cell-based assay for aggregation inhibitors as therapeutics of polyglutamine-repeat disease and validation in drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5950-5955.
4. Bacher A., Rieder C., Eichinger D., Arigoni D., Fuchs G., und Eisenreich W. (1999) Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. *FEMS Microbiology Rev* **22**, 567-598.
5. Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V., Francis, M.J.O. (1972) The biosynthesis of monoterpenes. *Chem. Rev.* **72**, 115-155.
6. Böckmann, R., Dickneite, C., Middendorf, B., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1996) Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron. *Mol Microbiol* **22**, 643-653.

7. 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.
8. Broers, S.T.J. (1994) Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli.*, Dissertation Nr. 10978, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz.
9. Carrigan, C. N., Poulter, C. D. (2003) Zinc is an Essential Cofactor for Type I Isopentenyl Diphosphate: Dimethylallyl Diphosphate Isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9008-9009.
10. Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scotti M.; Slaghuis J., Goebel W., Vazquez-Boland, J. A. (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 431-436.
11. Compton, S. J., Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**, 369-374.
12. Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenberg, H. K., Rohmer, M. (1998a) Mevalonate versus glyceraldehyde phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis*. *Biochem. J.* **333**, 381-388.
13. Disch, A., Hemmerlin, A., Bach, T. J., Rohmer, M. (1998b) Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate in the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem. J.* **331**, 615-621.
14. Durbecq, V., Sainz, G., Oudjama, Y., Clantin, B., Bompard-Gilles, C., Tricot, C., Caillet, J., Stalon, V., Droogmans, L. & Villeret, V. (2001) Crystal structure of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *EMBO J.* **20**, 1530-

- 1537.
15. Eichinger, D. (1993) Isolierung des Monoterpens Loganin aus *R. serpentina*. Diplomarbeit, Technische Universität München.
16. Eichinger, D. (1997) Retroanalytische NMR-Untersuchungen zur Biosynthese der Indolalkaloidvorstufen Loganin und von Anthrachinoglykosiden in höheren Pflanzen. Dissertation, Technische Universität München.
17. Eisenreich, W., Strauß, G., Werz, U., Fuchs, G. und Bacher, A. (1993); Retrobiosynthetic analysis of carbon fixation in the phototropic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Eur. J. Biochem.* **215**, 619-632.
18. 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.
19. Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M. H. & Bacher, A. (1998) The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology* **5**, R221-R233.
20. Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* **6**, 78-84.
21. Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2003) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci* **61**, 1-26.
22. Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. & Rohdich, F. (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1401-1426.

23. Eisenreich, W., Ettenhuber, C., Laupitz, R., Theus, C., Bacher, A. (2004) Isotopolog perturbation techniques for metabolic networks: metabolic recycling of nutritional glucose in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**, 6764-6769.
24. Ettenhuber, C., Spielbauer, G., Margl, L., Hannah, L. Curtis, Gierl, A., Bacher, A., Genschel, U., Eisenreich, W. (2005) Changes in flux pattern of the central carbohydrate metabolism during kernel development in maize. *Phytochemistry* **66**, 2632-2642.
25. Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, M., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Kis, K., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. & Zenk, M. H. (2001) Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis: the role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6302-6310.
26. Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J. C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**, 849-852.
27. Glawischnig, E., Tomas A., Eisenreich, W., Spieller, P., Bacher, A., Gierl, A. (2000) Auxin biosynthesis in maize kernels. *Plant Physiol.* **123**, 1109-1119.
28. Glawischnig, E., Gierl, A., Tomas, A., Bacher, A. & Eisenreich, W. (2001) Retrobiosynthetic nuclear magnetic resonance analysis of amino acid biosynthesis and

- intermediary metabolism. Metabolic flux in developing maize kernels. *Plant Physiol.* **125**, 1178-1186.
29. Hahn, F. M., Hurlburt, A. P. & Poulter, C. D. (1999) *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J. Bacteriol.* **181**, 4499-4504.
30. Hoeffler, J.-F., Hemmerlin, A., Grosdemange-Billiard, C., Bach, T. J., Rohmer, M. (2002). Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Biochem. J.* **366**, 573-583.
31. Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. (1998) Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Basel, Cambridge, New York.
32. Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa Y. & Seto H. (2001) An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces sp.* strain CL190. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 932-937.
33. Koyama, T. & Ogura, K. (1999) Isopentenyl diphosphate, isomerase and prenyltransferases. In Comprehensive natural product chemistry (Cane, D., ed.) Vol. 2, pp. 69-96. Pergamon, Oxford.
34. Krijgsveld, J., Ketting R. F., Mahmoudi T., Johansen, J., Artal-Sanz, M., Verrijzer, C. P., Plasterk, R. & Heck R. (2003) Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* **21**, 927-931.
35. Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237**, 260-273.
36. Lau, G. W., Goumnerov B. C, Walendziewicz C. L., Hewitson J., Xiao W., Mahajan-Miklos S., Tompkins R. G., Perkins L. A., Rahme L. G. (2003) The *Drosophila*

- melanogaster* toll pathway participates in resistance to infection by the gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **71**, 4059-4066.
37. Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Zepeck, F., Kaiser, J., Richter, G., Schramek, N., Steinbacher, S., Huber, R., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. & Rohdich, F. (2004) Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid pathways. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2658-2669.
38. Leyes, A. E., Baker, J. A., Hahn, F. M., Poulter, C. D. (1999) Biosynthesis of Isoprenoids in *Escherichia coli*: Stereochemistry of the Reaction Catalyzed by Isopentenyl Diphosphate:Dimethylallyl Diphosphate Isomerase. *Chem. Commun.*, 717-718.
39. Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds *via* a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**, 271-274.
40. Myers E. W., Sutton G. G., Delcher A. L., Dew I. M., Fasulo D. P., Flanigan M. J., Kravitz S. A., Mobarry C. M., Reinert K. H., Remington K. A., Anson E. L., Bolanos R. A., Chou H. H., Jordan C. M., Halpern A. L., Lonardi S., Beasley E. M., Brandon R. C., Chen L., Dunn P. J., Lai Z., Liang Y., Nuskern D. R., Zhan M., Zhang Q., Zheng X., Rubin G. M., Adams M. D., Venter J. C. (2000) A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* **287**, 2196-2204.
41. Neundorff, I., Koehler, C., Hennig, L., Findeisen, M., Arigoni, D., Welzel, P. (2003). Evidence for the combined participation of a C10 and a C15 precursor in the biosynthesis of moenocinol, the lipid part of the moenomycin antibiotics. *ChemBioChem.* **4**, 1201-1205.
42. Poulter, C. D. & Rilling, H. (1981) Conversion of farnesyl pyrophosphate to squalene. In Biosynthesis of isoprenoid compounds (Porter, J. W. & Spurgeon, S. L., eds.) Vol. 1, pp. 162-209. John Wiley, New York.

43. Premaratne, R. J., Lin, W. J. & Johnson, E. A., (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3046-3048.
44. Rauschenbach, P., Schmidt, H. L., Simon, H. (Hrsg.), Tykva, R., und Wenzel, M. (1974); Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen. Springer Verlag, Berlin.
45. Read, S. M., Northcote, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**, 53-64.
46. Rieder, C. (1999) Retrobiosynthetic studies of carbon flux by NMR detected stable isotope incorporation. Biosynthesis of molybdopterin and of Verrucosan diterpenes. Dissertation, Technische Universität München.
47. Rieder, C., Jaun, B., Arigoni, D. (2000). On the early steps of cineol biosynthesis in *Eucalyptus globulus*. *Helvetica Chimica Acta* **83**, 2504-2513.
48. Ripio, M. T., Dominguez-Bernal, G., Lara, M., Suarez, M. & Vazquez-Boland, J. A. (1997) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**, 1533-1540.
49. Roberts, D. B., (1998) A Practical Approach. *Drosophila*, 1-38.
50. Rohdich, F., Eisenreich, W., Wungsintaweeikul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Bacher, A. (2001) Biosynthesis of terpenoids 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3190-3197.
51. Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D.,

- Bacher, A. & Eisenreich, W. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1158-1163.
52. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Setter, B., Sahn, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524.
53. Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565-574.
54. Scherzer C. R., Jensen R. V., Gullans S. R., Feany M. B. (2003) Gene expression changes presage neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2457-2466.
55. Schwarz, M. K. (1994) Terpen-Biosynthese in *Gingko biloba*: Eine überraschende Geschichte. Dissertation Nr. 10951, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz.
56. Seto, H., Watanabe, H., Furihata, K. (1996) Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aeriovifer*. *Tetrahedron Letters* **37**, 7979-7982.
57. Steinbacher, S., Kaiser, J., Gerhardt, S., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A. & Rohdich, F. (2003) Crystal structure of the type II isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **329**, 973-982.
58. Street, I. P., Christensen, D. J. & Poulter, C. D. (1990) Hydrogen exchange during the enzyme-catalyzed isomerization of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 8577-8578.

59. Szyperski, T. (1995) Biosynthetically directed fractional ^{13}C -labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.* **232**, 433-448.
60. Wolff, M., Seemann, M., Bui, B. T. S., Frapart, Y., Tritsch, D., Estrabot, A. G., Rodriguez-Concepción, M., Boronat, A., Marquet, A. & Rohmer, M. (2003) Isoprenoid biosynthesis *via* the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein. *FEBS Lett.* **541**, 115-120.
61. Wouters, J., Oudjama, Y., Barkley, S. J., Tricot, C., Stalon, V., Droogmans, L. & Poulter, C. D. (2003) Catalytic mechanism of *Escherichia coli* isopentenyl diphosphate isomerase involves Cys-67, Glu-116, and Tyr-104 as suggested by crystal structures of complexes with transition state analogues and irreversible inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**, 11903-11908.
62. Wouters, J., Oudjama, Y., Ghosh, S., Stalon, V., Droogmans, L. & Oldfield, E. (2003) Structure and Mechanism of Action of Isopentenylpyrophosphate-Dimethylallylpyrophosphate Isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3198-3199.
63. Wouters, J., Oudjama, Y., Stalon, V., Droogmans, L. & Poulter, C. D. (2004) Crystal structure of the C67A mutant of isopentenyl diphosphate isomerase complexed with a mechanism-based irreversible inhibitor. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **54**, 216-221.

Anhang Tabelle 1A. NMR-Daten der Aminosäuren aus *Listeria monocytogenes* EGD gewachsen auf einem Medium mit [U-¹³C₆]Glukose. Die Kopplungspartner sind in Klammern hinter der Kopplungskonstante angegeben.

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
Alanin				
1	168,8	59,4 (2)	32,0 [1- ¹³ C ₁], 68,0 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,6 [1- ¹³ C ₁], 3,4 [1,2,3- ¹³ C ₃]
2	48,4	60,0 (1) 33,3 (3)	25,2 [2- ¹³ C ₁], 74,8 [1,2,3- ¹³ C ₃],	1,3 [2- ¹³ C ₁], 3,7 [1,2,3- ¹³ C ₃],
3	15,0	33,7 (2)	22,2 [3- ¹³ C ₁], 77,8 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,1 [3- ¹³ C ₁], 3,9 [1,2,3- ¹³ C ₃]
Glycin				
1	171,6	59,1 (2)	32,6 [1- ¹³ C ₁], 67,4 [1,2- ¹³ C ₂]	1,5 [1- ¹³ C ₁], 3,1 [1,2- ¹³ C ₂]
2	39,9	59,6 (1)	29,4 [2- ¹³ C ₁], 70,6 [1,2- ¹³ C ₂]	1,5 [2- ¹³ C ₁], 3,6 [1,2- ¹³ C ₂]
Threonin				
1	175,9	54,4 (2)	30,2 [1- ¹³ C ₁], 69,8 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,3 [1- ¹³ C ₁], 3,0 [1,2,3- ¹³ C ₃]
2	58,1	56,6 (1) 36,1 (3)	31,2 [2- ¹³ C ₁], 13,0 [2,3- ¹³ C ₂], 46,5 [1,2,3- ¹³ C ₃], 9,3 [1,2- ¹³ C ₂]	1,4 [2- ¹³ C ₁], 0,6 [2,3- ¹³ C ₂], 2,1 [1,2,3- ¹³ C ₃], 0,4 [1,2- ¹³ C ₂]
3	65,0	36,1 (2)	26,4 [3- ¹³ C ₁], 73,6 [(1),2,3- ¹³ C ₃] und [3,4- ¹³ C ₂]	1,1 [3- ¹³ C ₁], 3,0 [(1),2,3- ¹³ C ₃] und [3,4- ¹³ C ₂]
4	19,0	37,1 (3)	89,4 [4- ¹³ C ₁], 10,6 [3,4- ¹³ C ₂]	4,2 [4- ¹³ C ₁], 0,5 [3,4- ¹³ C ₂]
Serin				
1	170,0	59,3 (2)	41,1 [1- ¹³ C ₁], 58,9 [1,2- ¹³ C ₂] und [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,4 [1- ¹³ C ₁], 2,1 [1,2- ¹³ C ₂] und [1,2,3- ¹³ C ₃]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
2	54,4	59,2 (1) 36,1 (3)	23,7 [2- ¹³ C ₁], 3,3 [1,2- ¹³ C ₂], 4,7 [2,3- ¹³ C ₂], 68,3 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,2 [2- ¹³ C ₁], 0,2 [1,2- ¹³ C ₂], 0,2 [2,3- ¹³ C ₂], 3,3 [1,2,3- ¹³ C ₃]
3	59,1	36,4 (2)	31,1 [3- ¹³ C ₁], 68,9 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]	1,1 [3- ¹³ C ₁], 2,3 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]
Lysin				
1	171,5	58,5 (2)	30,1 [1- ¹³ C ₁], 69,9 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,4 [1- ¹³ C ₁], 3,3 [1,2,3- ¹³ C ₃]
2	52,6	59,1 (1) 33,7 (3)	23,2 [2- ¹³ C ₁], 69,6 [1,2,3- ¹³ C ₃], 7,2 [2,3- ¹³ C ₂]	0,9 [2- ¹³ C ₁], 2,7 [1,2,3- ¹³ C ₃], 0,3 [1,2- ¹³ C ₂]
3	29,1	33,7 (2)	25,6 [3- ¹³ C ₁], 74,4 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]	1,1 [3- ¹³ C ₁], 3,2 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]
4	21,4	34,7 (3)	91,9 [4- ¹³ C ₁], 8,1 [3,4- ¹³ C ₂]	2,9 [4- ¹³ C ₁], 0,3 [3,4- ¹³ C ₂]
5	26,2	35,6 (6)	25,6 [5- ¹³ C ₁], 74,4 [5,6- ¹³ C ₂]	1,1 [5- ¹³ C ₁], 3,2 [5,6- ¹³ C ₂]
6	39,4	36,2 (5)	22,6 [6- ¹³ C ₁], 77,4 [5,6- ¹³ C ₂]	1,1 [6- ¹³ C ₁], 3,9 [5,6- ¹³ C ₂]
Tyrosin				
1	182,7	53,4 (2)	31,7 [1- ¹³ C ₁], 68,3 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,3 [1- ¹³ C ₁], 2,8 [1,2,3- ¹³ C ₃]
2	57,4	32,9 (3) 53,3 (1)	23,3 [2- ¹³ C ₁], 11,6 [2,3- ¹³ C ₂], 65,1 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,0 [2- ¹³ C ₁], 0,5 [2,3- ¹³ C ₂], 2,8 [1,2,3- ¹³ C ₃]
3	39,8	32,3 (2)	25,9 [3- ¹³ C ₁], 74,1 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]	1,2 [3- ¹³ C ₁], 3,3 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]
4	123,5	56,3 (5/9)	24,7 [4- ¹³ C ₁], 75,3 [4,5,9- ¹³ C ₂]	1,0 [4- ¹³ C ₁], 3,2 [4,5,9- ¹³ C ₂]
5/9	130,4	56,3 (4)	26,5 [5/9- ¹³ C ₁], 73,5 [4,5,9- ¹³ C ₂]	1,1 [5/9- ¹³ C ₁], 3,2 [4,5,9- ¹³ C ₂]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
6/8	118,4	61,5 (6-7) 8,3 (6-8) 3,4 (6-9) 52,6 (8-7) 8,3 (8-6) 64,2 (8-9)	38,1 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 33,3 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 28,6 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,6 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 1,4 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 1,2 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
7	164,8	58,6 (6) 60,3 (8)	32,6 [7- $^{13}\text{C}_1$] 25,5 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 41,9 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,3 [7- $^{13}\text{C}_1$], 1,1 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 1,8 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
Phenylalanin				
1	182,2	53,4 (2)	28,6 [1- $^{13}\text{C}_1$], 71,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,5 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	57,1	53,4 (1) 32,1 (3)	22,2 [2- $^{13}\text{C}_1$], 8,9 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 68,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,1 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	40,5	33,1 (2)	25,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 74,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	138,0	55,8 (5/9)	25,2 [4- $^{13}\text{C}_1$], 74,8 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [4- $^{13}\text{C}_1$], 3,6 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]
5/9	129,1	55,7 (4)	24,4 [5,9- $^{13}\text{C}_1$], 75,6 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [5,9- $^{13}\text{C}_1$], 3,1 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]
6/8	128,3	54,5 (8-9) 54,4 (8-7) 54,4 (6-7) 6,4 (6-8)	37,2 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 30,2 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 37,2 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,6 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 1,3 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 1,6 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
7	126,4	51,8 (6) 52,8 (8)	24,7 [7- $^{13}\text{C}_1$], 29,5 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 36,4 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,1 [7- $^{13}\text{C}_1$], 1,3 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 1,6 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
Aspartat				
1	182,4	53,6 (2)	34,2 [1- $^{13}\text{C}_1$], 65,8 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,9 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,7 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	53,9	35,2 (3) 53,6 (1)	23,7 [2- $^{13}\text{C}_1$], 10,1 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 69,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,2 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,5 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,5 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	43,2	35,5 (2)	23,5 [3- $^{13}\text{C}_1$], 76,5 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,8 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
4 Glutamat	180,2	n.b. (3)	100,0 [4- $^{13}\text{C}_1$]	5,4 [4- $^{13}\text{C}_1$]
1	183,0	n.b. (2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	2,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	55,8	34,4 (3)	50,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 50,0 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 1,0 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
3	31,8	34,7 (2)	47,6 [3- $^{13}\text{C}_1$], 52,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 1,1 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	34,1	51,2 (5)	42,1 [4- $^{13}\text{C}_1$], 57,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	0,8 [4- $^{13}\text{C}_1$], 1,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	182,8	51,3 (4)	45,0 [5- $^{13}\text{C}_1$], 55,0 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	0,9 [5- $^{13}\text{C}_1$], 1,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
Valin				
1	170,5	58,9 (2)	90,1 [1- $^{13}\text{C}_1$], 9,9 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
2	57,4	59,5 (1)	89,2 [2- $^{13}\text{C}_1$], 10,8 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
3	28,1	35,2 (4,5)	87,9 [3- $^{13}\text{C}_1$], 12,1 [3,4(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]	1,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [3,4(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]
4	16,7	34,5 (3)	87,3 [4- $^{13}\text{C}_1$], 12,7 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]	1,0 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]
5	16,3	n,d,	100,0 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,2 [5- $^{13}\text{C}_1$]
Prolin				
1	170,4	59,5(2)	99,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 0,6 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,6 [1- $^{13}\text{C}_1$], 0,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
2	58,7	31,1 (3)	47,7 [2- $^{13}\text{C}_1$], 52,3 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	0,8 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,8 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
3	27,4	32,0 (2)	54,2 [3- $^{13}\text{C}_1$], 45,8 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	0,9 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,7 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	22,6	33,2 (4,5)	49,9 [4- $^{13}\text{C}_1$], 50,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	0,8 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,8 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	45,7	32,8 (4)	47,1 [5- $^{13}\text{C}_1$], 52,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	0,8 [5- $^{13}\text{C}_1$], 0,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
Leucin				
1	170,9	n.b. (2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	1,2 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	50,4	n.b. (1)	100,0 [2- $^{13}\text{C}_1$]	1,2 [2- $^{13}\text{C}_1$]
3	37,5	34,6 (4, 6)	97,5 [3- $^{13}\text{C}_1$], 2,5 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,03 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]
4	22,8	34,5 (3,5,6)	97,4 [4- $^{13}\text{C}_1$], 2,6 [3,4- $^{13}\text{C}_2$] und [4,6- $^{13}\text{C}_2$] und [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,03 [3,4- $^{13}\text{C}_2$] und [4,6- $^{13}\text{C}_2$] und [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	20,7	37,6 (4)	100,0 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$]
6	20,1	36,1 (4)	100,0 [6- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [6- $^{13}\text{C}_1$]
Isoleucin				
1	169,8	59,0 (2)	93,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 6,6 [1,2- $^{13}\text{C}_3$]	1,2 [1- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_3$]
2	56,2	59,1 (1)	89,2 [2- $^{13}\text{C}_1$], 10,8 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
3	34,5	34,7 (6)	93,3 [3- $^{13}\text{C}_1$], 6,7 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]
4	23,7	34,7 (5)	94,4 [4- $^{13}\text{C}_1$], 5,6 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	10,1	35,7 (4)	93,2 [6- $^{13}\text{C}_1$], 6,8 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [6- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
6	13,2	34,7 (3)	91,9 [5- $^{13}\text{C}_1$], 8,1 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [5- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]
Arginin				
1	176,3	n.b.	100 [1- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	56,3	n.b.	100 [2- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$]
3	29,6	n.b.	100 [3- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$]
4	26,0	n.b.	100 [4- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [4- $^{13}\text{C}_1$]
5	42,6	n.b.	100 [6- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [6- $^{13}\text{C}_1$]
6	158,9	n.b.	100 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$]

Anhang Tabelle 1B. NMR-Daten der Aminosäuren aus *Listeria monocytogenes* $\Delta prfA$ gewachsen auf einem Medium mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glukose. Die Kopplungspartner sind in Klammern hinter der Kopplungskonstante angegeben.

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
Alanin				
1	168,8	59,4 (2)	27,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 72,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,2 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	48,4	60,0 (1) 33,3 (3)	18,4 [2- $^{13}\text{C}_1$], 81,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 4,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	15,0	33,7 (2)	21,7 [3- $^{13}\text{C}_1$], 78,3 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 4,1 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
Glycin				
1	171,6	59,1 (2)	29,0 [1- $^{13}\text{C}_1$], 71,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,3 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
2	39,9	59,6 (1)	30,4 [2- $^{13}\text{C}_1$], 69,6 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 3,4 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
Threonin				
1	175,9	54,4 (2)	26,5 [1- $^{13}\text{C}_1$], 73,5 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,8 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	58,1	56,6 (1) 36,1 (3)	20,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 8,8 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 67,7 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$], 3,5 [1,2- $^{13}\text{C}_2$],	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$], 0,2 [1,2- $^{13}\text{C}_2$],
3	65,0	36,1 (2)	22,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 76,1 [(1),2,3- $^{13}\text{C}_2$] und [3,4- $^{13}\text{C}_2$],	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,8 [(1),2,3- $^{13}\text{C}_2$] und [3,4- $^{13}\text{C}_2$], 0,2 [(1),2,3,4- $^{13}\text{C}_{3(4)}$]
4	19,0	37,1 (3)	3,6 [(1),2,3,4- $^{13}\text{C}_{3(4)}$] 91,7 [4- $^{13}\text{C}_1$], 8,3 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]	4,7 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,4 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]
Serin				
1	170,0	59,3 (2)	25,6 [1- $^{13}\text{C}_1$], 74,4 [1,2- $^{13}\text{C}_2$] und [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,2 [1,2- $^{13}\text{C}_2$] und [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	54,4	59,2 (1) 36,1 (3)	19,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 14,6 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 7,3 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 59,1 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,8 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 0,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
Lysin				
3	59,1	36,4 (2)	35,1 [3- ¹³ C ₁], 64,9 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]	1,4 [3- ¹³ C ₁], 2,6 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]
1	171,5	58,5 (2)	25,9 [1- ¹³ C ₁], 74,1 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,6 [1- ¹³ C ₁], 4,4 [1,2,3- ¹³ C ₃]
2	52,6	59,1 (1) 33,7 (3)	20,5 [2- ¹³ C ₁], 65,8 [1,2,3- ¹³ C ₃], 13,7 [2,3- ¹³ C ₂]	0,9 [2- ¹³ C ₁], 2,9 [1,2,3- ¹³ C ₃], 0,5 [2,3- ¹³ C ₂]
3	29,1	33,7 (2)	22,7 [3- ¹³ C ₁], 77,3 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]	1,0 [3- ¹³ C ₁], 3,4 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]
4	21,4	34,7 (3)	92,4 [4- ¹³ C ₁], 7,6 [3,4- ¹³ C ₂]	4,0 [4- ¹³ C ₁], 0,4 [3,4- ¹³ C ₂]
5	26,2	35,6 (6)	23,3 [5- ¹³ C ₁], 76,7 [5,6- ¹³ C ₂]	1,2 [5- ¹³ C ₁], 4,0 [5,6- ¹³ C ₂]
6	39,4	36,2 (5)	22,3 [6- ¹³ C ₁], 77,7 [5,6- ¹³ C ₂]	1,2 [6- ¹³ C ₁], 4,0 [5,6- ¹³ C ₂]
Tyrosin				
1	182,7	53,4 (2)	29,4 [1- ¹³ C ₁], 70,6 [1,2,3- ¹³ C ₃]	1,4 [1- ¹³ C ₁], 3,4 [1,2,3- ¹³ C ₃]
2	57,4	32,9 (3) 53,3 (1)	22,5 [2- ¹³ C ₁], 6,0 [2,3- ¹³ C ₂], 71,5 [1,2,3- ¹³ C ₃]	0,9 [2- ¹³ C ₁], 0,2 [2,3- ¹³ C ₂], 2,9 [1,2,3- ¹³ C ₃]
3	39,8	32,3 (2)	20,4 [3- ¹³ C ₁], 79,6 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]	0,9 [3- ¹³ C ₁], 3,3 [1,2,3- ¹³ C ₃] und [2,3- ¹³ C ₂]
4	123,5	56,3 (5/9)	21,7 [4- ¹³ C ₁], 78,3 [4,5,9- ¹³ C ₂]	1,0 [4- ¹³ C ₁], 3,7 [4,5,9- ¹³ C ₂]
5/9	130,4	56,3 (4)	25,5 [5/9- ¹³ C ₁], 74,5 [4,5,9- ¹³ C ₂]	1,1 [5/9- ¹³ C ₁], 3,2 [4,5,9- ¹³ C ₂]
6/8	118,4	61,5 (6-7) 8,3 (6-8) 3,4 (6-9) 52,6 (8-7) 8,3 (8-6) 64,2 (8-9)	30,3 [6,8- ¹³ C ₁], 31,4 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₃], 38,3 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₄],	1,3 [6,8- ¹³ C ₁], 1,4 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₃], 1,7 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₄]
7	164,8	58,6 (6) 60,3 (8)	23,8 [7- ¹³ C ₁], 19,1 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₃], 57,1 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₄]	1,1 [7- ¹³ C ₁], 0,9 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₃], 2,6 [5,9,6,8,7- ¹³ C ₄]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
Phenylalanin				
1	182,2	53,4 (2)	27,7 [1- $^{13}\text{C}_1$], 72,3 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,8 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	57,1	53,4 (1)	20,5 [2- $^{13}\text{C}_1$], 5,7 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 73,8	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,3 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,7 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	40,5	32,1 (3) 33,1 (2)	[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] 21,9 [3- $^{13}\text{C}_1$], 78,1 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	0,9 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	138,0	55,8 (5/9)	21,8 [4- $^{13}\text{C}_1$], 78,2 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [4- $^{13}\text{C}_1$], 3,4 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]
5/9	129,1	55,7 (4)	41,5 [5,9- $^{13}\text{C}_1$], 58,5 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	1,8 [5,9- $^{13}\text{C}_1$], 2,6 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]
6/8	128,3	54,5 (8-9) 54,4 (8-7) 54,4 (6-7) 6,4 (6-8)	26,4 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 30,0 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 43,6 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,2 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 1,4 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 2,0 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
7	126,4	51,8 (6) 52,8 (8)	23,3 [7- $^{13}\text{C}_1$], 19,1 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 57,6 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,0 [7- $^{13}\text{C}_1$], 0,8 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 2,5 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
Aspartat				
1	182,4	53,6 (2)	23,1 [1- $^{13}\text{C}_1$], 76,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	53,9	35,2 (3) 53,6 (1)	22,3 [2- $^{13}\text{C}_1$], 8,6 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 69,1	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	43,2	35,5 (2)	[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] 19,6 [3- $^{13}\text{C}_1$], 80,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	180,2	n.b. (3)	100,0 [4- $^{13}\text{C}_1$]	4,6 [4- $^{13}\text{C}_1$]
Glutamat				
1	183,0	n.b. (2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	2,3 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	55,8	34,4 (3)	62,3 [2- $^{13}\text{C}_1$], 37,7 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,9 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
3	31,8	34,7 (2)	61,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 38,9 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,9 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
4	34,1	51,2 (5)	62,1 [4- $^{13}\text{C}_1$], 37,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	182,8	51,3 (4)	65,3 [5- $^{13}\text{C}_1$], 34,7 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [5- $^{13}\text{C}_1$], 0,8 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
Valin				
1	170,5	58,9 (2)	87,0 [1- $^{13}\text{C}_1$] 13,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [1- $^{13}\text{C}_1$] 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
2	57,4	59,5 (1)	89,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 10,9 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
3	28,1	35,2 (4,5)	92,4 [3- $^{13}\text{C}_1$], 7,6 [3,4(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]	0,9 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [3,4(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]
4	16,7	34,5 (3)	85,0 [4- $^{13}\text{C}_1$], 15,0 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]	0,9 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,2 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]
5	16,3	n.b.	100,0 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$]
Prolin				
1	170,4	59,5(2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	n.d.
2	58,7	31,1 (3)	62,3 [2- $^{13}\text{C}_1$], 37,7 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	n.d.
3	27,4	32,0 (2)	64,5 [3- $^{13}\text{C}_1$], 35,5 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	n.d.
4	22,6	33,2 (4,5)	65,6 [4- $^{13}\text{C}_1$], 34,4 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	n.d.
5	45,7	32,8 (4)	65,1 [5- $^{13}\text{C}_1$], 35,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	n.d.
Leucin				
1	170,9	n.b. (2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	50,4	n.b. (1)	100,0 [2- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$]
3	37,5	34,6 (4, 6)	100,0 [3- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$]
4	22,8	34,5 (3,5,6)	100,0 [4- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [4- $^{13}\text{C}_1$]
5	20,7	37,6 (4)	100,0 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$]
6	20,1	36,1 (4)	100,0 [6- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [6- $^{13}\text{C}_1$]
Isoleucin				
1	169,8	59,0 (2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	56,2	59,1 (1)	100,0 [2- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$]
3	34,5	34,7 (6)	100,0 [3- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
4	23,7	34,7 (5)	100,0 [4- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [4- $^{13}\text{C}_1$]
5	10,1	35,7 (4)	100,0 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$]
6	13,2	34,7 (3)	100,0 [6- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [6- $^{13}\text{C}_1$]
Arginin				
1	176,3	n.b.	100 [1- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	56,3	n.b.	100 [2- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$]
3	29,6	n.b.	100 [3- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$]
4	26,0	n.b.	100 [4- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [4- $^{13}\text{C}_1$]
5	42,6	n.b.	100 [6- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [6- $^{13}\text{C}_1$]
6	158,9	n.b.	100 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$]

Anhang Tabelle 1C. NMR-Daten der Aminosäuren aus *Listeria monocytogenes* $\Delta\text{prfApPRFA}^*$ gewachsen auf einem Medium mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glukose. Die Kopplungspartner sind in Klammern hinter der Kopplungskonstante angegeben.

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
Alanin				
1	168,8	59,4 (2)	26,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 73,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,5 [1- $^{13}\text{C}_1$], 4,0 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	48,4	60,0 (1) 33,3 (3)	29,8 [2- $^{13}\text{C}_1$], 70,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,5 [2- $^{13}\text{C}_1$], 3,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	15,0	33,7 (2)	21,8 [3- $^{13}\text{C}_1$], 78,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,2 [3- $^{13}\text{C}_1$], 4,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
Glycin				
1	171,6	59,1 (2)	27,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 72,6 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [1- $^{13}\text{C}_1$], 4,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
2	39,9	59,6 (1)	26,9 [2- $^{13}\text{C}_1$], 73,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [2- $^{13}\text{C}_1$], 3,7 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
Threonin				
1	175,9	54,4 (2)	36,0 [1- $^{13}\text{C}_1$], 64,0 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,8 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,3 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	58,1	56,6 (1) 36,1 (3)	21,2 [2- $^{13}\text{C}_1$], 7,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 65,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$], 5,5 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	0,7 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,3 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 2,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$], 0,2 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
3	65,0	36,1 (2)	23,8 [3- $^{13}\text{C}_1$], 76,2 [(1),2,3- $^{13}\text{C}_{2(3)}$] und [3,4- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,7 [(1),2,3- $^{13}\text{C}_{2(3)}$] und [3,4- $^{13}\text{C}_2$]
4	19,0	37,1 (3)	4,0 [(1),2,3,4- $^{13}\text{C}_{3(4)}$] 92,4 [4- $^{13}\text{C}_1$], 7,6 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]	0,2 [(1),2,3,4- $^{13}\text{C}_{3(4)}$] 4,3 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,4 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]
Serin				
1	170,0	59,3 (2)	29,6 [1- $^{13}\text{C}_1$], 70,4 [1,2- $^{13}\text{C}_2$] und [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,7 [1- $^{13}\text{C}_1$], 4,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$] und [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	54,4	59,2 (1) 36,1 (3)	19,4 [2- $^{13}\text{C}_1$], 10,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 7,9 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 62,7 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,5 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 0,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	59,1	36,4 (2)	30,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 69,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
Lysin				
1	171,5	58,5 (2)	27,3 [1- $^{13}\text{C}_1$], 72,7 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,6 [1- $^{13}\text{C}_1$], 4,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	52,6	59,1 (1) 33,7 (3)	21,3 [2- $^{13}\text{C}_1$], 70,7 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$], 1,2 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 6,8 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 3,5 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 0,3 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
3	29,1	33,7 (2)	20,6 [3- $^{13}\text{C}_1$], 75,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 4,3 [2,3,4- $^{13}\text{C}_3$]	1,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 0,2 [2,3,4- $^{13}\text{C}_3$]
4	21,4	34,7 (3)	89,6 [4- $^{13}\text{C}_1$], 10,4 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]	4,0 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,5 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]
5	26,2	35,6 (6)	21,4 [5- $^{13}\text{C}_1$], 78,6 [5,6- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [5- $^{13}\text{C}_1$], 4,2 [5,6- $^{13}\text{C}_2$]
6	39,4	36,2 (5)	22,2 [6- $^{13}\text{C}_1$], 77,8 [5,6- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [6- $^{13}\text{C}_1$], 4,3 [5,6- $^{13}\text{C}_2$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
Tyrosin				
1	182,7	53,4 (2)	26,3 [1- $^{13}\text{C}_1$], 73,7 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	0,9 [1- $^{13}\text{C}_1$], 2,5 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	57,4	32,9 (3) 53,3 (1)	20,6 [2- $^{13}\text{C}_1$], 1,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 6,2 [2,3- $^{13}\text{C}_2$] 72,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,0 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$], 0,3 [2,3- $^{13}\text{C}_2$] 3,6 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	39,8	32,3 (2)	25,9 [3- $^{13}\text{C}_1$], 74,1 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,3 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	123,5	56,3 (5/9)	24,7 [4- $^{13}\text{C}_1$], 75,3 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [4- $^{13}\text{C}_1$], 3,2 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]
5/9	130,4	56,3 (4)	23,6 [5/9- $^{13}\text{C}_1$], 76,4 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [5/9- $^{13}\text{C}_1$], 3,6 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]
6/8	118,4	61,5 (6-7) 8,3 (6-8) 3,4 (6-9) 52,6 (8-7) 8,3 (8-6) 64,2 (8-9)	32,4 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 37,0 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 30,6 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,6 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 1,5 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 1,9 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
7	164,8	58,6 (6) 60,3 (8)	22,3 [7- $^{13}\text{C}_1$], 22,9 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 54,8 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	0,8 [7- $^{13}\text{C}_1$], 0,9 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 2,1 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
Phenylalanin				
1	182,2	53,4 (2)	25,9 [1- $^{13}\text{C}_1$], 74,1 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,2 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	57,1	53,4 (1) 32,1 (3)	20,4 [2- $^{13}\text{C}_1$], 5,6 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 74,0 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	0,9 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,2 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,4 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	40,5	33,1 (2)	21,8 [3- $^{13}\text{C}_1$], 78,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 4,0 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	138,0	55,8 (5/9)	21,8 [4- $^{13}\text{C}_1$], 78,2 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	0,9 [4- $^{13}\text{C}_1$], 3,1 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]
5/9	129,1	55,7 (4)	26,5 [5,9- $^{13}\text{C}_1$], 73,5 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [5,9- $^{13}\text{C}_1$], 2,9 [4,5,9- $^{13}\text{C}_2$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
6/8	128,3	54,5 (8-9) 54,4 (8-7) 54,4 (6-7) 6,4 (6-8)	33,1 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 35,5 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 31,5 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]	1,4 [6,8- $^{13}\text{C}_1$], 1,5 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_3$], 1,4 [5,9,6,8,7- $^{13}\text{C}_4$]
7	126,4	51,8 (6) 52,8 (8)	n.b.	n.b.
Aspartat				
1	182,4	53,6 (2)	29,2 [1- $^{13}\text{C}_1$], 70,8 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,5 [1- $^{13}\text{C}_1$], 3,3 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	53,9	35,2 (3) 53,6 (1)	20,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 7,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 72,5 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,4 [2,3- $^{13}\text{C}_2$], 3,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
3	43,2	35,5 (2)	21,7 [3- $^{13}\text{C}_1$], 78,3 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 3,9 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$] und [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	180,2	n.b. (3)	100,0 [4- $^{13}\text{C}_1$]	4,6 [4- $^{13}\text{C}_1$]
Glutamat				
1	183,0	n.b. (2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	1,7 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	55,8	34,4 (3)	61,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 38,9 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	0,9 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,5 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
3	31,8	34,7 (2)	61,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 39,0 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,6 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	34,1	51,2 (5)	64,3 [4- $^{13}\text{C}_1$], 35,7 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,7 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	182,8	51,3 (4)	64,4 [5- $^{13}\text{C}_1$], 35,6 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$], 0,6 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
Valin				
1	170,5	58,9 (2)	63,2 [1- $^{13}\text{C}_1$], 36,8 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,6 [1- $^{13}\text{C}_1$], 1,0 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
2	57,4	59,5 (1)	61,8 [2- $^{13}\text{C}_1$], 38,2 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,7 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
3	28,1	35,2 (4,5)	59,6 [3- $^{13}\text{C}_1$], 40,4 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]	1,0 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,7 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]
4	16,7	34,5 (3)	59,9 [4- $^{13}\text{C}_1$], 40,1 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]	1,0 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,7 [3,4,(5)- $^{13}\text{C}_{2(3)}$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
5	16,3	n.b.	100,0 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,8 [5- $^{13}\text{C}_1$]
Prolin				
1	170,4	59,5(2)	100,0 [1- $^{13}\text{C}_1$]	2,5 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	58,7	31,1 (3)	60,8 [2- $^{13}\text{C}_1$], 39,2 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [2- $^{13}\text{C}_1$], 1,0 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
3	27,4	32,0 (2)	60,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 39,9 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]	1,6 [3- $^{13}\text{C}_1$], 1,1 [2,3- $^{13}\text{C}_2$]
4	22,6	33,2 (4,5)	62,7 [4- $^{13}\text{C}_1$], 37,3 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	45,7	32,8 (4)	63,5 [5- $^{13}\text{C}_1$], 36,5 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [5- $^{13}\text{C}_1$], 0,9 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
Leucin				
1	170,9	n.b. (2)	89,9 [1- $^{13}\text{C}_1$], 10,1 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]	1,5 [1- $^{13}\text{C}_1$], 0,2 [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]
2	50,4	n.b. (1)	90,5 [2- $^{13}\text{C}_1$], 9,5 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]
3	37,5	34,6 (4, 6)	98,9 [3- $^{13}\text{C}_1$], 1,1 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,0 [3,4- $^{13}\text{C}_2$]
4	22,8	34,5 (3,5,6)	91,6 [4- $^{13}\text{C}_1$], 8,4 [3,4- $^{13}\text{C}_2$] und [4,6- $^{13}\text{C}_2$] und [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [3,4- $^{13}\text{C}_2$] und [4,6- $^{13}\text{C}_2$] und [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	20,7	37,6 (4)	92,7 [5- $^{13}\text{C}_1$], 7,3 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [5- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
6	20,1	36,1 (4)	97,8 [6- $^{13}\text{C}_1$], 2,2 [4,6- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [6- $^{13}\text{C}_1$], 0,2 [4,6- $^{13}\text{C}_2$]
Isoleucin				
1	169,8	59,0 (2)	74,9 [1- $^{13}\text{C}_1$], 25,1 [1,2- $^{13}\text{C}_3$]	1,4 [1- $^{13}\text{C}_1$], 0,5 [1,2- $^{13}\text{C}_3$]
2	56,2	59,1 (1)	77,1 [2- $^{13}\text{C}_1$], 22,9 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]	1,2 [2- $^{13}\text{C}_1$], 0,3 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]

Position	Chemische Verschiebung $\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Kopplungskonstante J_{CC} [Hz]	Signalanteil der benannten Isotopologen [%]	Isotopolog [mol %]
3	34,5	34,7 (6)	73,6 [3- $^{13}\text{C}_1$], 26,4 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$], 0,3 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]
4	23,7	34,7 (5)	94,9 [4- $^{13}\text{C}_1$], 5,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,5 [4- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
5	10,1	35,7 (4)	96,2 [6- $^{13}\text{C}_1$], 3,8 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]	1,4 [6- $^{13}\text{C}_1$], 0,1 [4,5- $^{13}\text{C}_2$]
6	13,2	34,7 (3)	73,2 [5- $^{13}\text{C}_1$], 26,8 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$], 0,4 [3,6- $^{13}\text{C}_2$]
Arginin				
1	176,3	n.b.	100 [1- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [1- $^{13}\text{C}_1$]
2	56,3	n.b.	100 [2- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [2- $^{13}\text{C}_1$]
3	29,6	n.b.	100 [3- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [3- $^{13}\text{C}_1$]
4	26,0	n.b.	100 [4- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [4- $^{13}\text{C}_1$]
5	42,6	n.b.	100 [6- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [6- $^{13}\text{C}_1$]
6	158,9	n.b.	100 [5- $^{13}\text{C}_1$]	1,1 [5- $^{13}\text{C}_1$]

Anhang Abbildung 1. Isotopologmuster der Aminosäuren aus den *Listeria monocytogenes*-Stämmen kultiviert auf einem Medium mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glukose. Die farbigen Balken symbolisieren benachbarte ^{13}C -Atome. Die Balkenbreiten sind auf die Konzentration des jeweiligen Isotopologs abgestimmt. Isolierte ^{13}C -Atome (mit benachbarten ^{12}C -Atomen) sind durch gefüllte Kreise dargestellt. Die Zahlen entsprechen der ^{13}C -Anreicherung in mol%.

