

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**IspH-Protein aus *Escherichia coli* und
IspDF-Protein aus *Campylobacter jejuni*:
Untersuchung und Charakterisierung**

Tobias Wilhelm Gräwert

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. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 21.03.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.05.2006 angenommen.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Juni 2003 bis Februar 2006 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Bacher für die Möglichkeit, mich einer interessanten Aufgabenstellung zu widmen, deren Bearbeitung bereits als Student begann, sowie für das ständige Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bei Dr. Felix Rohdich bedanke ich mich für die Einführung in die biochemischen Arbeitsmethoden, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und für die sehr gute Zusammenarbeit.

Dr. Wolfgang Eisenreich danke ich für gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Auswertung zahlreicher NMR-Spektren.

Dr. Stefan Hecht möchte ich für viele gute Ratschläge sowie für die Einführung in die NMR-Spektroskopie dank sagen.

Meinen Arbeitskollegen Ferdinand Zepeck, Ralf Laupitz, Dr. Johannes Kaiser, Matthias Lee, Katrin Gärtner und Richard Feicht danke ich für die häufige Mithilfe an meinen Projekten.

Ferner gilt mein Dank:

Herrn Fritz Wendlig, der mich jederzeit bei Computer- und HPLC-Problemen unterstützte,

Frau Astrid König und Frau Heidi Hofner, die mir allzu häufig lästige Materialbeschaffungen abnahmen,

Frau Christine Schwarz, Frau Angela Grygier und Herrn Christoph Grassberger für die Erledigung der Büroarbeit,

sowie allen anderen aktiven wie ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für das ruhige und angenehme Arbeitsklima.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, sowie meiner Freundin, die mich alle während meiner Promotion mental und materiell unterstützten.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits publiziert:

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.

Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Gräwert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. (2003). The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1586-1591.

Gräwert, T., Kaiser, J., Zepeck, F., Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Schramek, N., Schleicher, E., Weber, S., Haslbeck, M., Buchner, J., Rieder, C., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F. (2004). IspH protein of *Escherichia coli*: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 12847-12855.

Gabrielsen, M., Rohdich, F., Eisenreich, W., Gräwert, T., Hecht, S., Bacher, A., Hunter, W. N. (2004). Biosynthesis of isoprenoids-A bifunctional IspDF protein from *Campylobacter jejuni*. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3028-3035.

Laupitz, R., Gräwert, T., Rieder, C., Zepeck, F., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F., Eisenreich, W. (2004). Stereochemical studies on the making and unmaking of isopentenyl diphosphate in different biological systems. *Chemistry & Biodiversity* **1**, 1367-1376.

Zepeck, F., Gräwert, T., Kaiser, J., Schramek, N., Eisenreich, W., Bacher, A., Rohdich, F. (2005). Biosynthesis of Isoprenoids. Purification and Properties of IspG Protein from *Escherichia coli*. *J Org Chem.* **70**, 9168-9174.

1 EINLEITUNG	1
1.1 Hintergrund	1
1.1.1 Der Mevalonat-Weg	2
1.1.2 Der Mevalonat-unabhängige Weg	5
1.2 Wirtschaftliche Bedeutung des IspH-Proteins	8
1.2.1 Medizinische Anwendungsmöglichkeiten	8
1.2.2 Angriffspunkt für neue Herbizide	10
1.3 Das bifunktionelle IspDF aus <i>Campylobacter jejuni</i>	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Enzyme	15
2.1.3 Kultur-Medien	16
2.1.4 Puffer und Lösungen	17
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> Stämme	21
2.1.6 Plasmide	22
2.1.7 Oligonukleotide	22
2.1.8 Chemikalien	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1.1 Stammhaltung	25
2.2.1.2 Induzierte Anzucht von Expressionsklonen	25
2.2.1.3 Minipräparation	26
2.2.1.4 Plasmid-DNA-Isolierung	26
2.2.1.5 Isolierung genomischer bakterieller DNA	27
2.2.1.6 DNA-Reinigung	27
2.2.1.7 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	27
2.2.1.8 DNA-Verknüpfung durch T4-Ligase (Ligation)	28

2.2.1.9	Transformation	29
2.2.1.9.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	29
2.2.1.9.2	Elektroporation	30
2.2.1.10	Vervielfältigung von Genen durch Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
2.2.1.11	<i>In vitro</i> -Mutagenese durch PCR	32
2.2.1.12	Erzeugen einer chromosomalen <i>ispH(lytB)</i> -Mutante	32
2.2.1.13	In-vivo-Wachstumskinetik	33
2.2.2	Proteinchemische Methoden	34
2.2.2.1	Ultraschallaufschluß	34
2.2.2.2	French Press Aufschluss	35
2.2.2.3	Nickel-Affinitätschromatographie	35
2.2.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	36
2.2.2.5	Aufnahme von UV/Vis-Spektren	36
2.2.2.6	Bestimmung des Eisengehalts von IspH	37
2.2.2.7	HPLC-gestützter IspH-Assay	37
2.2.2.8	NMR-gestützter IspH-Assay	39
2.2.2.9	Photometrisch gestützter IspH-Assay	40
2.2.2.10	Untersuchungen zur Chemie der IspH-Reaktion	41
2.2.2.11	Assay zur Bestimmung der IspD-Aktivität	42
2.2.2.12	Assay zur Bestimmung der IspF-Aktivität	42
2.2.2.13	Assay zur <i>in vitro</i> Umwandlung von 12 in 15	43
2.2.3	Physikalische Methoden	44
2.2.3.1	Agarosegelelektrophorese	44
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	45
2.2.3.3	2D-Elektrophorese	45
2.2.3.4	ESR-Spektroskopie	46
2.2.3.5	NMR-Spektroskopie	46
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	47
3.1	Stand der Forschung bezüglich der Funktion von IspH-Protein	47
3.1.1	Klonierung von <i>ispH</i>	52
3.1.2	Herstellung rekombinanten IspH-Proteins	59
3.1.3	Affinitätschromatographische Reinigung von His ₆ - IspH-Protein	60
3.1.4	Detektion von Proteinen des <i>isc</i> -Operons mittels 2D- Gelelektrophorese	63
3.1.5	UV-Vis-spektroskopische Untersuchung des IspH- Proteins	65
3.1.6	ESR-Spektroskopische Untersuchung des IspH- Proteins	67

3.1.7	<i>In vitro</i> -Assays zur biochemischen Charakterisierung von IspH	70
3.1.7.1	HPLC-gestützter IspH-Assay	70
3.1.7.2	Optimierung des Elektronenflusses bei der IspH-Reaktion	72
3.1.7.3	pH-Wert- und Metallionen-Abhängigkeit des IspH-Proteins	75
3.1.7.4	Vergleich verschiedener IspH-Assays	77
3.1.7.5	Untersuchung von IspH-Mutantenproteinen	80
3.1.7.6	NMR-gestützter IspH-Assay	81
3.1.7.7	Photometrischer IspH-Assay	84
3.1.8	Komplementationsstudie mit der <i>E. coli ispH</i> -knock-out-Mutante	86
3.1.9	Chemie der IspH-Reaktion	89
3.2	Untersuchung des rekombinanten IspDF- Proteins aus <i>Campylobacter jejuni</i>	96
3.2.1	Charakterisierung der IspD-Domäne von IspDF aus <i>C. jejuni</i>	100
3.2.1.1	pH-Wert- und Metallionen-Abhängigkeit der IspD-Domäne	101
3.2.1.2	Kinetische Untersuchungen an der IspD-Domäne von IspDF aus <i>C. jejuni</i>	104
3.2.2	Charakterisierung der IspF-Domäne von IspDF aus <i>C. jejuni</i>	104
3.2.2.1	pH-Wert- und Metallionen-Abhängigkeit der IspF-Domäne	106
3.2.2.2	Kinetische Untersuchungen an der IspF-Domäne von IspDF aus <i>C. jejuni</i>	108
3.2.3	Eigenschaften der IspD- und IspF-Domäne von IspDF aus <i>Campylobacter jejuni</i> im Vergleich	109
3.2.4	Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat in 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit IspDF aus <i>C. jejuni</i> und IspE aus <i>E. coli</i>	110
3.2.5	Vergleich der IspD- und IspF-Domäne des IspDF- Proteins aus <i>C. jejuni</i> mit orthologen Enzymen	112
4.	ZUSAMMENFASSUNG	113
4.1	Ausblick	114
5	LITERATURVERZEICHNIS	115

Abkürzungen

SI-Einheiten und Elementsymbole sind nicht aufgeführt.

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
bidest.	bidestillata
BSA	bovines Serumalbumin
CDP	Cytidindiphosphat
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidintri-phosphat
DAF	Desazaflavin
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribunucleosidtriphosphate
Dpmd	5-Diphosphomevalonat-Decarboxylase
DTT	Dithiothreitol
DXP	Desoxyxylulosephosphat
Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
Fdx	Ferredoxin

FldA	Flavodoxin
Fpr	Favodoxin- / Ferredoxin-Reduktase
gb	gauss broadening
G/V	Gewicht pro Volumen
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
His ₆ -Taq	Histidin(6x)-Taq
HMBPP	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat
Hmgs	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Synthase
Hmgr	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase
HPLC	high performance liquid chromatography
IEF	Isoelektrischefokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IspC	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase
IspDF	Enzym, das die IspD- und IspF-Reaktion katalysiert
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat-Synthase
IspG	1-Hydroxy-2-methyl-2-E-butenyl-4-diphosphat Synthase
IspH	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase
kb	Kilobasen
lb	line broadening
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorptionionization-time of flight
Mk	Mevalonat-Kinase
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADH (/H ⁺)	Nicotinamidadenindinucleotid reduzierte Form
NADPH (/H ⁺)	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat oxidierte Form
NEB	New England Biolabs
NMR	nucleic magnetic resonance

OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pI	isoelektrischer Punkt
Pmk	5-Phosphomevalonat-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	anorganisches Diphosphat
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
STET	Saccharose Triton X-100 EDTA Tris
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
<i>Taq.</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	terrific-broth
TBC	Tuberkulose
TE	Tris EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
Vis	visible
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Terpene gehören mit ihren mehr als 35000 bekannten Verbindungen (Sacchettini und Poulter, 1997) zu einer der größten Naturstoffklassen. Fast alle Terpene werden aus nur zwei C-5 Molekülen, Isopentenylidiphosphat (**1**, früher Isopentenylpyrophosphat, IPP) und Dimethylallyldiphosphat (**2**, früher Dimethylallylpyrophosphat, DMAPP) aufgebaut. Obwohl Terpene aus nur zwei einfachen Molekülen aufgebaut werden, sind die Strukturen mit ihren biologischen Funktionen und die Anwendungsmöglichkeiten dieser Substanzen sehr vielfältig.

Cholesterin ist heutzutage in unserer Wohlstandsgesellschaft als Hauptverantwortlicher für Ablagerungen in Blutgefäßen (Arteriosklerose) in aller Munde. Allerdings wird dabei schnell vergessen, dass dieser Vertreter der Steroide essentieller Bestandteil der Zellmembranen eukaryontischen Zellen ist. Über die Einlagerung von Cholesterin in Membranen wird deren Fluidität reguliert (Berg *et al.*, 2002). Bei der Phytolseitenkette des Chlorophylls höherer Pflanzen handelt es sich um eines der häufigsten natürlich vorkommenden organischen Moleküle (Abb. 1).

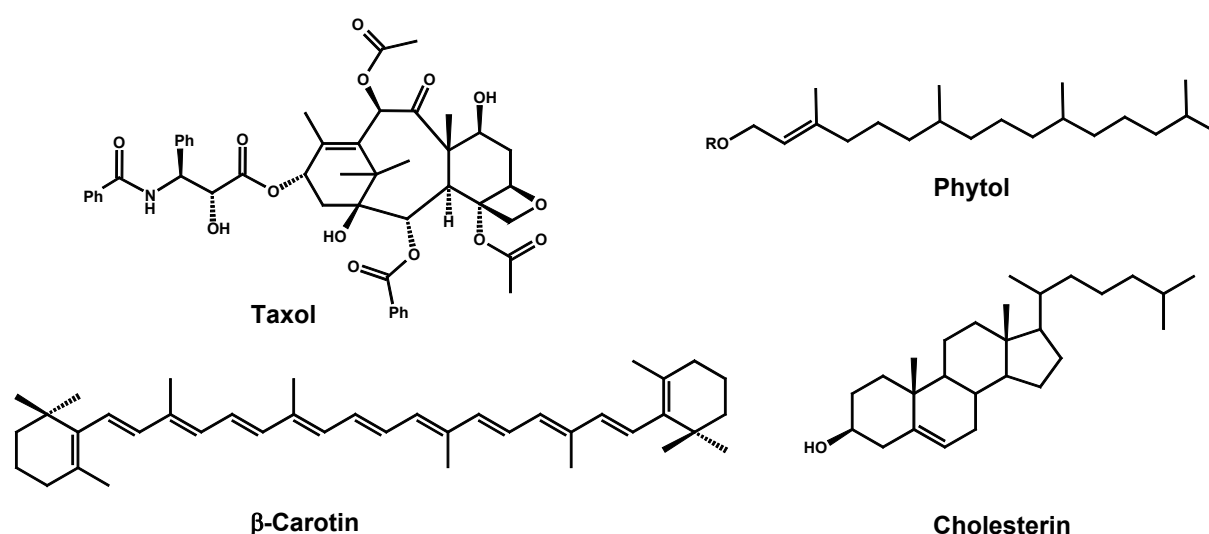


Abbildung 1: Auswahl wichtiger Vertreter von Terpenen (aus Hecht, 2002).

Dieser Alkohol wird benötigt, um den grünen Blattfarbstoff in der Thylakoidmembran zu verankern. β -Carotin und Xanthophyll fungieren in Pflanzen als Lichtschutzpigmente (Berg *et al.*, 2002). Diese und andere Carotine haben als Antioxidantien große wirtschaftliche Bedeutung erlangt.

Das Diterpen (Abb. 2) Taxol, ein Chemotherapeutikum zur Behandlung von Krebs, stammt wie die meisten Terpene aus dem Pflanzenreich (Adam, 2002). Terpene werden der Klasse der Sekundärmetabolite zugeordnet (Abb. 1, Review: Eisenreich *et al.*, 2001).

Weitere Anwendungen finden Terpene in Lebensmitteln. So hat β -Carotin mittlerweile einen festen Platz als natürlicher Farbstoff in Butter, Käse, Brause und etlichen weiteren Lebensmitteln. Ein weiteres Beispiel stellt Humulon dar, ein aus Hopfendolden stammendes Terpen, das maßgeblich für den bitteren Geschmack und die Stabilität des Bieres verantwortlich ist (Hecht, 2002).

1.1.1 Der Mevalonat-Weg

Die Kondensation von **1** mit **2** zu Geranyl-diphosphat ist der erste Schritt zur Biosynthese aller höheren Terpene (Review: Rohmer, 1999). Der dabei entstandene C-10-Körper Geranyl-diphosphat kann nun durch ein- oder mehrmalige Addition des C-5-Körpers **1** zunächst in Farnesyl-diphosphat und anschließend in Geranylgeranioldiphosphat umgewandelt werden (Abb. 2).

Die hohe Diversität von Terpenen wird ausgehend von den so erzeugten Grundstrukturen durch Oxidationen, Umlagerungen und Cyclisierungen erzielt (Review: Rohmer, 1999).

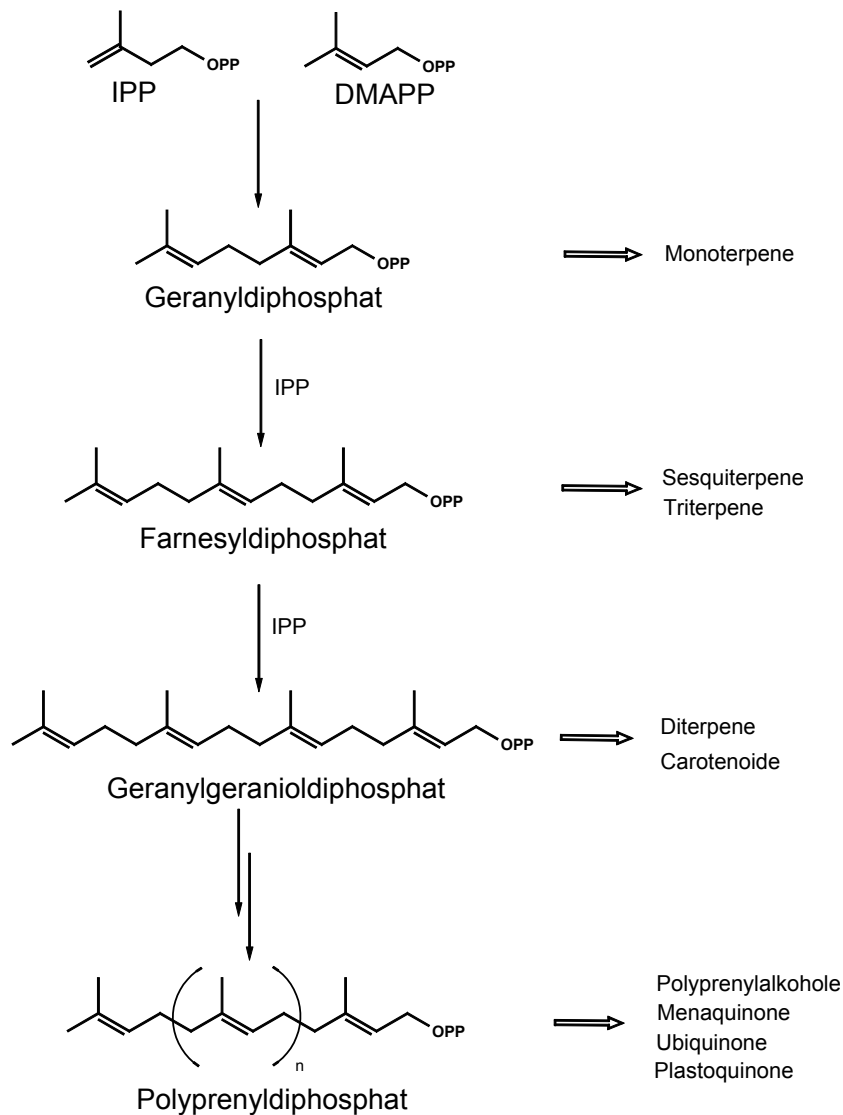


Abbildung 2: Biosynthese der höheren Isoprenoide ausgehend von IPP (1) und DMAPP (2) (aus Adam, 2002).

Nach den Arbeiten von Bloch, Lynen und Cornforth (Spurgeon und Porter, 1981) ging man lange Zeit davon aus, dass die Biosynthese von 1 und 2 (Reviews: Bloch, 1992; Bochar *et al.*, 1999; Bach, 1995) ausschließlich ausgehend von Acetat über Mevalonat erfolgt (Abb. 3). Dieser Stoffwechselweg wird als Mevalonat-Weg bezeichnet. In einem ersten Schritt reagieren, katalysiert von der 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Synthase, in diesem Weg zwei Moleküle Acetyl-CoA (3) zu Acetoacetyl-CoA (4). Im zweiten Schritt entsteht durch Kondensation eines weiteren Moleküls 3 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (5). Dieser Schritt wird ebenfalls von der 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Synthase katalysiert. Im Folgenden wird (5) von der 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase zur namensgebenden Mevalonsäure (6)

reduziert. Nach zwei von der Mevalonat-Kinase und der 5-Phosphomevalonat-Kinase katalysierten Pyrophosphorylierungen unter Verbrauch von 2 ATP-Molekülen, wird im letzten Reaktionsschritt, katalysiert von der 5-Diphosphomevalonat-Decarboxylase, die OH-Gruppe in Position C-2 phosphoryliert. Bei gleichzeitiger Eliminierung der neu entstandenen Phosphatgruppe erfolgt eine Decarboxylierung, wodurch **1** entsteht. Eine Isomerase katalysiert die Umwandlung zu **2** (Abb. 3).

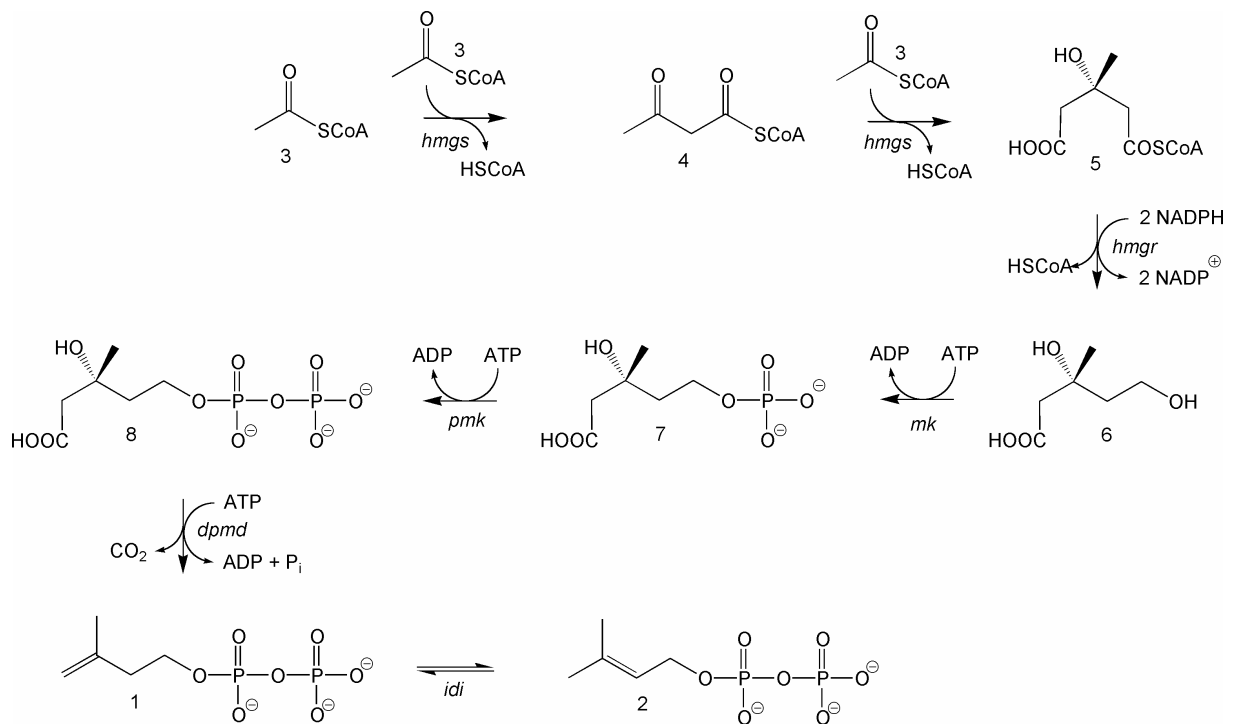


Abbildung 3: Biosyntheseschema von **1** und **2** ausgehend von Acetyl-CoA.

1, Isopentenylpyrophosphat. **2**, Dimethylallylpyrophosphat. **3**, Acetyl-CoA. **4**, Acetoacetyl-CoA. **5**, 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA. **6**, Mevalonat. **7**, 5-Phosphomevalonat. **8**, 5-Diphosphomevalonat (aus Adam, 2002).

1.1.2 Der Mevalonat-unabhängige Weg

Bis Mitte der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts herrschte die Lehrbuchmeinung vor, dass **1** und **2** ausschließlich über den Mevalonat-Weg (s.o., Abb. 3) synthetisiert würden (Spurgeon und Porter, 1981). Zunehmend wurden jedoch dazu widersprüchliche Ergebnisse gefunden. In Pflanzen wurde markiertes Mevalonat nur mit sehr geringer Ausbeute in Carotine, Monoterpene und Diterpene eingebaut (Banthorpe *et al.*, 1972). Die Biosynthese dieser Sekundärmetabolite erfolgt in Plastiden. Aus diesen Erkenntnissen wurde zunächst gefolgert, dass das Kompartiment der pflanzlichen Plastide für die verfütterten Substanzen impermeabel ist.

Ein weiteres Indiz kam durch die Inhibierung der Mevalonatbildung zu Stande. Die im Cytoplasma ablaufende Sterolbiosynthese konnte durch Blockieren des Mevalonat-Wegs auf der Stufe von **6** zu einem Großteil unterbunden werden. Eine Auswirkung auf die in den Plastiden stattfindende Biosynthese von Carotinoiden und Chlorophyll konnte jedoch nicht festgestellt werden (Reviews: Rohmer, 1999; Eisenreich *et al.*, 1998). Aus diesen Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass höheren Pflanzen zwei unabhängige Biosynthesewege für **1** und **2** zur Verfügung stehen, welche getrennt von einander in den Plastiden und im Cytoplasma ablaufen. In den Neunziger Jahren gelang den Arbeitsgruppen um Rohmer und Arigoni (Rohmer, 1993; Schwarz 1999; Broers 1994) unabhängig voneinander der Nachweis, dass es eine Mevalonat-unabhängige Biosynthese von Terpenen geben muss (Review: Eisenreich *et al.*, 1998; Eisenreich *et al.*, 2001; Rohmer 1999).

Diese wird als alternativer Terpenbiosynthese-Weg, Desoxyxylulosephosphat-Weg, Methylerythritolphosphat-Weg oder Mevalonat-unabhängiger Weg bezeichnet und im Folgenden näher erläutert.

Das erste Intermediat dieses Weges ist 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (**11**). Diese wird aus D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**10**) und Pyruvat (**9**) unter Decarboxylierung gebildet (Abb. 4). Diese Reaktion wird von der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (Dxs) katalysiert, welche erstmals aus *E. coli* isoliert wurde (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998). Bei **11** handelt es sich auch um eine Vorstufe für Thiamin und Pyridoxal (White, 1978; Hill *et al.*, 1989).

Die nächste Reaktion besteht aus einer Gerüstumlagerung und einer NADPH-abhängigen Reduktion zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**) (Takahashi *et al.*,

1998). Die Katalyse dieser Umsetzung wird durch die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (IspC) vollzogen. Dieses Enzym gehört zur Familie der sogenannten Klasse B Dehydrogenasen, welche stereospezifisch das H_{Si} des NADPH bei der Reduktion übertragen (Adam, 2002).

Der dritte Schritt besteht in der Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**13**). Diese Cytidilierung wird durch die 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase (IspD) in Gegenwart von CTP unter gleichzeitiger Eliminierung anorganischen Diphosphats katalysiert (Rohdich *et al.*, 1999).

Der folgende Schritt ist eine Phosphorylierung. Dabei wird **13** in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase (IspE) zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) umgesetzt (Lüttgen *et al.*, 2000). Im fünften, durch die 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (IspF) katalysierten Schritt, erfolgt die Umwandlung von **14** zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**). Dabei wird Cytosinmonophosphat eliminiert (Herz *et al.*, 2000).

Der nächste Schritt des Mevalonat-unabhängigen Weges wird durch die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Synthase (IspG) katalysiert. Es erfolgt dabei eine Umwandlung von **15** in 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (**16**) (Hecht *et al.*, 2001) Im letzten Stoffwechselschritt wird **16** in **1** und **2** umgewandelt. Diese Reaktion (Abb. 4) katalysiert die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase (IspH) (Rohdich *et al.*, 2002).

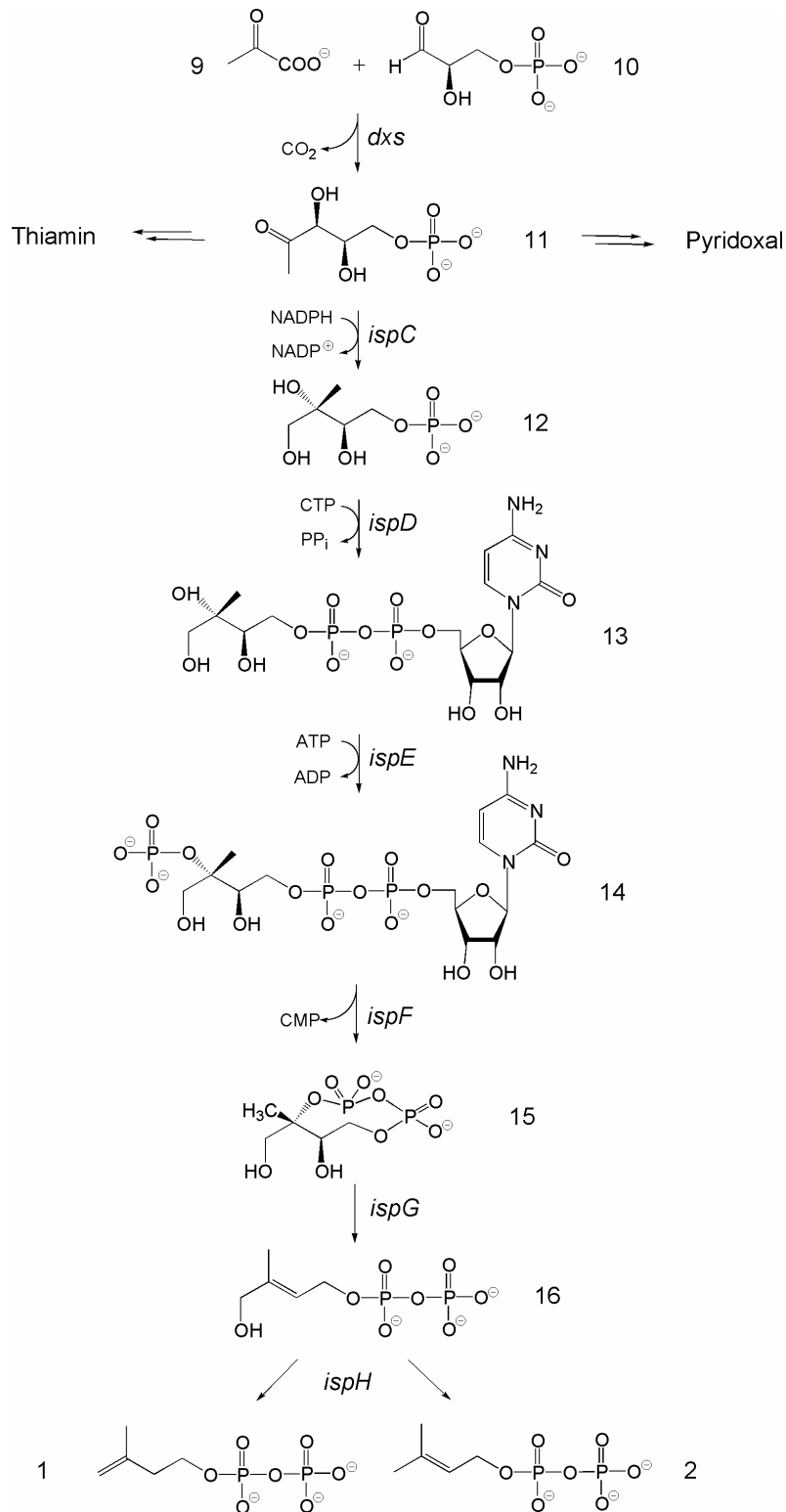


Abbildung 4: Der Mevalonat-unabhängige Weg.

1, IPP. **2**, DMAPP. **9**, Pyruvat. **10**, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat. **11**, 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat. **12**, 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat. **13**, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. **14**, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat. **15**, 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat. **16**, 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat.

1.2 Wirtschaftliche Bedeutung des IspH-Proteins

1.2.1 Medizinische Anwendungsmöglichkeiten

Malaria fordert Jahr für Jahr vor allem in weniger entwickelten Ländern einen hohen Tribut. Aber auch in der westlichen Welt ist diese uns heute nur noch als Tropenkrankheit bekannte Infektion wieder auf dem Vormarsch. So wurden von der WHO in den neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts Fälle von Malariaerkrankungen im Süden Spaniens so wie im Baltikum registriert. Weltweit fallen dieser Krankheit jährlich eine bis drei Millionen Menschen anheim, die Zahl der jährlichen Neuinfektionen wird auf mehrere 100 Millionen geschätzt (Hoffman *et al.*, 2002). Bei 7 Milliarden Menschen wäre das etwa ein Zwanzigstel der gesamten Weltbevölkerung. Da Malaria prinzipiell durch kostspielige Chemotherapie geheilt werden kann, nimmt diese Krankheit in der Rangliste der vermeidbaren Todesursachen einen der vorderen Plätze ein. Rauchen, die häufigste vermeidbare Todesursache, fordert im Vergleich dazu jährlich knapp fünf Millionen Opfer (Schroeder *et al.*, 2004), wenngleich hauptsächlich in der ersten und nicht in der dritten Welt.

Trotz der gravierenden Auswirkungen der Malaria auf ganze Landstriche wurden neue Maßnahmen zur Bekämpfung und Prävention dieses Leidens in den letzten Jahrzehnten nur zögerlich vorangetrieben. Gleichzeitig entwickelten sich mit zunehmender Geschwindigkeit Resistenzen gegen vorhandene Chemotherapeutika (Morlais *et al.*, 2003). Auch die Eindämmung der Malariaüberträger bleibt zunehmend erfolglos. Der in tropischen Breiten für die Verbreitung verantwortliche Überträger *Anopheles* sp. ist mittlerweile gegen eine Vielzahl von Insektiziden resistent (Rosenthal, 2003).

Für die Malariaparasiten ist der Mevalonat-unabhängige Weg zur Terpenbiosynthese essentiell und wurde bereits als Ansatzstelle für die Chemotherapie ausgemacht (Wiesner *et al.*, 2003; Missinou *et al.*, 2002). Das in den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts entdeckte Fosmidomycin wirkt als Antibiotikum, (Kuemmerle *et al.*, 1985). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es das vom *ispC* Gen codierte Enzym inhibiert (Kuzuyama *et al.*, 1998). In vorklinischen Studien konnte dieses Antibiotikum Mäuse kurieren, die mit dem Erreger *Plasmodium vinckei* infiziert waren (Jomaa *et al.*, 1999). In jüngeren klinischen

Studien konnte eine erfolgreiche Behandlung infizierter Menschen erreicht werden (Lell *et al.*, 2003). Bemerkenswerter Weise hat dieses Antibiotikum das Potential, Infektionen von *Plasmodium* Stämmen zu heilen, die gegen andere Therapeutika resistent sind. Um den Erfolg der Behandlung zu erhöhen, ist die Kombination mit einem zweiten Malariaantibiotikum, dem Wirkstoff Clindamycin, angeraten (Wiesner *et al.*, 2003). Wie in allen Säugerzellen wird auch in humanen Zellen ausschließlich der Mevalonatweg zur Synthese der Isoprenoidvorstufen **1** und **2** verwendet; es existieren in diesen somit keine Enzyme aus dem Mevalonat-unabhängigen Weg. Deswegen werden gegen diese Enzyme gerichtete Medikamente mit einiger Wahrscheinlichkeit nicht den Metabolismus des Wirtes beeinträchtigen. Der Mevalonat-unabhängige Weg kann also einige neue Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Malariamedikamente bieten.

Tuberkulose (TBC) fordert ähnlich wie Malaria viele Opfer in Entwicklungsländern. Jährlich sterben etwa eine Million Menschen an der von *Mycobacterium tuberculosis* verursachten Atemwegsinfektion. Resistenzen gegen verfügbare Medikamente breiten sich mit dramatischer Geschwindigkeit aus (Wade *et al.*, 2004). Ein anderer Mikroorganismus aus derselben Gattung, der Lepraerreger *Mycobacterium leprae*, besitzt interessanter Weise alle Gene des Mevalonat-unabhängigen Weges. Da sich *M. leprae* nach heutigem Kenntnisstand erst relativ kürzlich zu einem obligatorisch intrazellulärem Parasiten entwickelte und sich dabei von etwa der Hälfte aller für Mycobacterien typischen Gene trennte, zeigt dieses Beispiel die essentielle Bedeutung des Mevalonat-unabhängigen Weges für die Synthese der Isoprenoidvorstufen (Laupitz *et al.*, 2004).

Ein offensichtlich orthologes Enzym zu IspH aus *M. tuberculosis* zeigt wie auch das orthologe Enzym aus *P. falciparum* große Ähnlichkeit zu dem aus *E. coli* (Abb. 5). Man kann deswegen annehmen, dass IspH ein mögliches neues Target für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Tuberkulose darstellt.

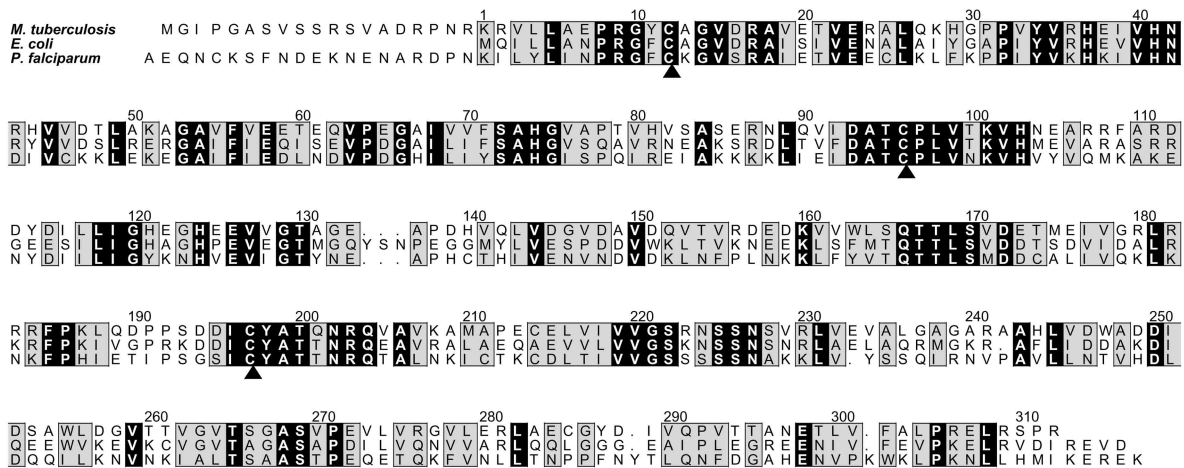


Abbildung 5: Alignment orthologer IspH-Proteine.

schwarz hinterlegte AS: identisch. grau hinterlegte AS: ähnlich.
 schwarze Pfeile: hochkonservierte Cysteine.

1.2.2 Angriffspunkt für neue Herbizide

Der Mevalonat-unabhängige Weg hat auch in grünen Pflanzen (Plantae) eine große Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass essentielle Bestandteile des Light-Harvesting-Komplexes aus Isoprenoiden aufgebaut werden, die aus dem oben genannten Stoffwechselweg stammen (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Schwender *et al.*, 1997; Arigoni *et al.*, 1997). Auch zum Schutz vor UV-Strahlung nötige Zellbestandteile sind aus solchen Isoprenoiden aufgebaut. Homozygote *Arabidopsis thaliana* Mutanten, denen die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase fehlt, konnten nicht in ausreichendem Umfang Carotinoide und Chlorophylle herstellen, um normal zu wachsen (Mandel *et al.*, 1996).

Das Wachstum wurde ebenso durch den IspC-Inhibitor Fosmidomycin gehemmt (Zeidler *et al.*, 1998; Fellermeier *et al.*, 1999; Lichtenthaler *et al.*, 2000). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass alle Enzyme des Mevalonat-unabhängigen Weges einschließlich IspH viel versprechende Ansatzstellen für die Entwicklung neuer Herbizide darstellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das IspH-Protein für ein normales Wachstum von *A. thaliana* unentbehrlich ist (Page *et al.*, 2004). Ein Vorteil von Herbiziden, die an diesem Stoffwechselweg ansetzen,

wäre, dass sie für Lebewesen denen dieser Weg fehlt (z.B. Säugetieren) mit hoher Wahrscheinlichkeit ungefährlicher als heutzutage verwendete Herbizide (beispielsweise DDT) sind.

1.3 Das bifunktionelle IspDF aus *Campylobacter jejuni*

Bei *Campylobacter jejuni* handelt es sich um ein gramnegatives, spiralförmiges Bakterium aus der Gruppe der ϵ -Proteobacteria, das nahe verwandt zu *Helicobacter pylori*, *Wolinella succinogenes* und *Vibrio cholerae* ist (Daikoku *et al.*, 1990, Gabrielsen *et al.*, 2004).

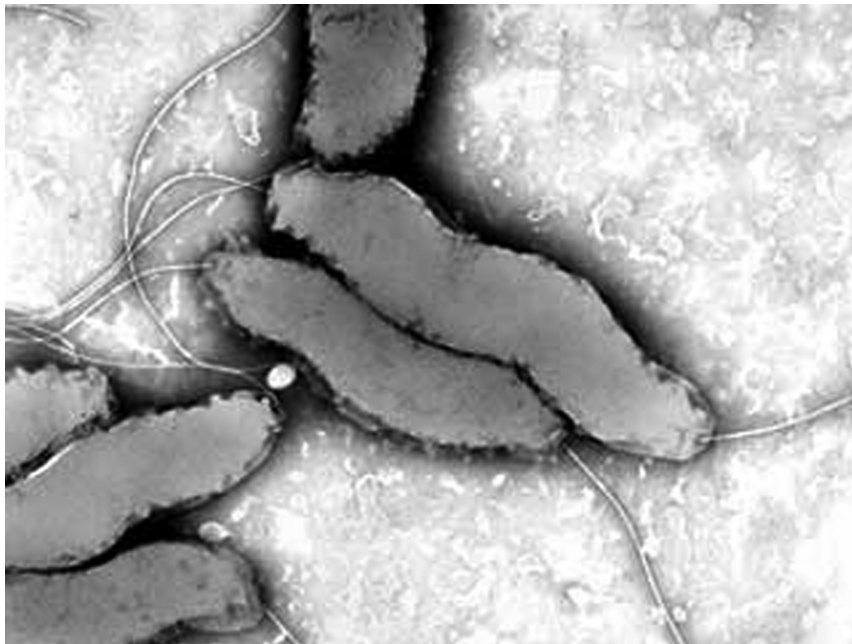


Abbildung 6: Bipolar begeißelte *C.jejuni*-Zellen im REM.

Der Habitus von *C. jejuni* ist insofern bemerkenswert, als dass an beiden Zellpolen Geißeln zu finden sind (Abb. 6).

Campylobacter jejuni ist ein pathogener Erreger, der in entwickelten Ländern im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen und Lähmungserscheinungen eine immer größere Rolle spielt. Die zunehmende Resistenz krankmachender Bakterien

gegen althergebrachte Antibiotika gewinnt auch im Falle von *C. jejuni* an Bedeutung, da eine Campylobacteriose wenigstens zu einer schweren Gastroenteritis führt.

C. jejuni ist noch vor *Salmonella typhi* in den entwickelten Ländern die häufigste Ursache für Lebensmittelvergiftungen und den damit verbundenen infektiösen Durchfallerkrankungen (Skirrow, 1990). Allerdings ist *C. jejuni*, im Gegensatz zu *S. typhi*, in der Bevölkerung noch kaum bekannt. Am häufigsten erkranken Kinder und junge Erwachsene an Campylobacteriose. In Entwicklungsländern sind Infektionen selten, da die meisten Kleinkinder bereits im Alter von zwei Jahren immun sind (Skirrow, 1991).

Ein Großteil der Campylobacteriosen (85-95 %) wird von *C. jejuni* verursacht. Für den kleineren Anteil sind *C. coli* und andere *Campylobacter* Spezies verantwortlich (Phillips, 1995).

Im Gegensatz zur Salmonellose, für die eine Infektion mit 100000 bis 10 Millionen Erregern nötig ist, genügen lediglich 500 Keime von *C. jejuni* um eine Campylobacteriose auszulösen. Deren klinisches Bild ist dem der Salmonellose ähnlich. Zwei bis fünf Tage nach der Infektion treten Fieber und Übelkeit sowie Bauch- und Kopfschmerzen auf. Meistens klingen diese Beschwerden im Verlauf von zehn Tagen wieder ab (Seidel *et al.*, 1992). Das Infektionsrisiko kann durch die Einnahme von Protonenpumpenhemmern, welche die Produktion von Magensäure drosseln, um den Faktor zehn erhöht werden (Neal *et al.*, 1996). Da Eisen für die Bildung des *C. jejuni*-Toxins benötigt wird, steigert auch die Einnahme von Eisen die Virulenz von *C. jejuni*.

C. jejuni wird weiterhin mit dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) in Verbindung gebracht. GBS stellt nach dem fast völligen Verschwinden von Kinderlähmung (Poliomyelitis) in Europa und Nordamerika die häufigste Ursache für generalisierte Lähmung dar. Dabei ist ein Zusammenhang mit Magen-Darm- bzw. Atemwegserkrankungen wahrscheinlich. Bei Betroffenen, die über eine derartige Infektion berichten, wurde als häufigster Erreger *C. jejuni* identifiziert. Auch wenn statistisch nur ein bis zwei von 100000 Personen an GBS erkranken, verursacht dieses aufgrund der aufwändigen Therapie immense Kosten im Gesundheitswesen. Die Mortalität liegt bei sechs Prozent (Buzby *et al.*, 1997).

Die häufigsten Quellen für Infektionen sind rohe Kuhmilch und Geflügel. In vielen Vogelarten gehört *C. jejuni* zur normalen Darmflora und ist auch in Rindern,

Schweinen und einigen Haustieren nachzuweisen, ohne dass er für diese pathogen ist. Auch Gewässer und speziell Badeseen kommen als Infektionsquelle in Betracht (Loewenherz-Luning *et al.*, 1996).

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten IspDF-Protein aus *C. jejuni* handelt es sich um bifunktionelles Enzym, das sowohl die IspD- wie auch die IspF-Reaktion katalysiert. Obwohl bifunktionelle Enzyme eher die Ausnahme sind, wurden bereits häufiger *ispD*- und *ispF*-Gene in einem Cluster beschrieben. Ein derartiger Cluster spielte bei der Aufklärung des mevalonatunabhängigen Wegs eine Rolle (Rohdich *et al.*, 1999, Herz *et al.*, 2000). Wie auch *Helicobacter pylori*, ein Magen-Ulcus verursachender Keim, der in der letzten Zeit in den Focus der öffentlichen Aufmerksamkeit gerückt ist, gehört *C. jejuni* zur Gattung der ϵ -Proteobacterien.

Für die Medikamententwicklung sind bifunktionelle Enzyme besonders interessant. Sie erlauben die Etablierung verschiedener „High Throughput Screens“ für zwei Ansatzstellen möglicher Antibiotika, für die nur eine Proteinpräparation benötigt wird.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Für das IspH-Protein aus *E. coli* soll ein System für *in vitro*-Enzymassays entwickelt werden. Dazu müssen zunächst Bedingungen für quantitativ ausreichende Synthese löslichen, aktiven IspH-Proteins gefunden werden. Es soll soweit wie möglich eine biochemische wie auch physikalische Charakterisierung des Enzyms erfolgen. In einem nächsten Schritt kann versucht werden, die gewonnenen Erkenntnisse zur Etablierung von High-Throughput-Screening Verfahren zu nutzen.

Das IspDF-Protein aus *C. jejuni* soll rekombinant in *E. coli* synthetisiert und anschließend aufgereinigt werden. Im weiteren Verlauf kann eine biochemische Charakterisierung des Enzyms erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Acrylamidgelelektrophorese	Kammer und Gießstand für SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Agarosegelelektrophorese	Kammer und Gelträger (Appligene, Heidelberg)
Analysenfeinwaage	1602 MP, Sartorius (Göttingen)
Autoklav	Sanoklav (Wolf, Geislingen)
Elektroporator	Gene Pulser mit Pulse Controller (Biorad, München)
Eppendorf-Zentrifuge	A14 (Jouan, Unterhaching)
Fermenter	BioFlo3000 (New Brunswick Scientific, Edison NJ USA)
FPLC-Anlage	Controller LCC-501 Plus, Pump P-500, Conductivity Monitor, Fraction Collector LKB-FRAC-100, Monitor UV-M/1 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
French Press	Cell Disruption Equipment Basic Z Model (Constant Systems LTD, Warwick, GB)
MALDI-TOF Spektrometer	Biflex-II (Bruker Daltonik, Bremen)
Heizblock	TECHNE DRI-Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)
Kühlzentrifugen	Sorvall RC2B, RC5B und RC5B Plus mit den Rotoren GS3, GSA und SS34 (Dupont Instruments, Bad Homburg) Z 230 H (Hermle, Gosheim)
NMR-Spektrometer	DXR 500 AVANCE (Bruker Instruments, Karlsruhe)
Photometer	Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
pH-Meter	E603 mit Standard-Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)
Schütteltisch	IKA-Vibrax-VXR (Goeddecke, Ingolstadt)
Schüttelinkubator	Lab Shaker und Certomat MO (B. Braun, Melsungen)

Thermocycler	GeneAmp PCR-System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA)
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250 (Branson SONIC Power Company, Danbury, USA)
UV-Leuchttisch	312 nm (Bachhofer, Reutlingen)
Vakuumpumpe	MZ 2C (VAKUUBRAND GmbH&Co./Wertheim) zum Filtrieren und Entgasen der Eluenten für die Säulenchromatographien
Vakuumzentrifuge	Roto-Vac 3 (Biotech-Fischer, Reiskirchen)
Videodokumentation	(Fröbel Labortechnik, Wasserburg)

2.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
DNase I	Boehringer
Lysozym	Boehringer
Proteinase K	Sigma
RNase A	Serva
Taq DNA-Polymerase	Finnzymes
T4-Ligase	Gibco-BRL

Restriktionsendonukleasen:

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	New England Biolabs
<i>Pst</i> I	New England Biolabs
<i>Sal</i> I	New England Biolabs
<i>Xba</i> I	New England Biolabs

2.1.3 Kultur-Medien

Kulturmedien werden gegebenenfalls mit Antibiotikum versetzt.

LB(Luria Bertani)-Medium	10 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
auf	1 l	H ₂ O
autoklavieren		

Medium	Vorschrift
--------	------------

TB(Terrific Broth)-Medium	12 g	Caseinhydrolysat
	24 g	Hefeextrakt
	2,3 g	KH ₂ PO ₄
	12,5 g	K ₂ HPO ₄
	4 ml	Glycerin
auf	1 l	H ₂ O
pH-Wert auf 7,2		
autoklavieren		

SOC-Medium	20 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	20 mM	Glucose
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	2,5 mM	KCl
auf	1 l	H ₂ O
autoklavieren		

Glycerin-Medium	70 %	LB-Medium
	30 %	Glycerin
	autoklavieren	

2.1.4 Puffer und Lösungen

Lösung bzw. Puffer	Vorschrift	Bezugsquelle
Ligase-Puffer	250 mM 50 mM 50 mM 5 mM 25 µg/ml pH 7,5 bei 25°C	Tris-HCl, pH 7,6 MgCl ₂ DTT ATP BSA
PCR-Puffer 10x	15 mM 500 mM 100 mM 1 %	MgCl ₂ KCl Tris-HCl, pH 8,8 Triton X-100
Probenpuffer für DNA-Gele	50 % (V/V) 0,25 % (G/V) 0,25 % (G/V) in TE-Puffer	Glycerin Xylencyanol Bromphenolblau
STET-Puffer	8 % 5 % 50 mM 50 mM	Saccharose TritonX-100 EDTA Tris-HCl, pH 8,0
Proteinauflöspuffer	50 mM 0,1 mg/ml 30 µl/ml	Tris-HCl, pH 8,0 DNase I PMSF-Lösung

Puffer für Ni-chelating-sepharose:

PufferA (Laden, Waschen, Equilibrieren)	500 mM	NaCl
	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	20 mM	Imidazol
	0,2 % (G/V)	NaN ₃
PufferB (Eluieren)	500 mM	NaCl
	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	500 mM	Imidazol
	0,02 % (G/V)	NaN ₃
Saline	0,9% (G/V)	NaCl, autoklaviert
TAE-Puffer 50x	2 M	Tris-Ac, pH 8,2
	0,1 M	EDTA
TE-Puffer 10x	100 mM	Tris-HCl, pH 8,2
	10 mM	Na ₂ EDTA

Puffer für Restriktion von DNA mit Restriktionsendonucleasen:

NEB1	10 mM	Tris-HCl, pH 7,0
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
NEB2	50 mM	NaCl,
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,0
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
NEB3	100 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,9
	1 mM	DTT

NEB4	50 mM	Kaliumacetat
	20 mM	Tris-Ac, pH 7,9
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT

Lösungen und Puffer für Proteingelektrophorese:

Acrylamidlösung	38,9 % (G/V)	Acrylamid
	1,2 % (G/V)	Bisacrylamid
Ammoniumperoxodisulfat- lösung (APS)	10 % (G/V)	
Coomassie- Färbelösung	0,25 % (G/V)	Coomassie-Blue R-250
	45 % (V/V)	Methanol
	9 % (V/V)	Eisessig
Elektrophoresepuffer	25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	192 mM	Glycin
	0,1 % (G/V)	SDS
Entfärber I	50 % (V/V)	Methanol
	10 % (V/V)	Eisessig
Entfärber II	30 % (V/V)	Methanol
	10 % (V/V)	Eisessig
Sammelgelpuffer	0,25 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,2 % (G/V)	SDS

SDS-Probenpuffer	30 %	Glycerin
	10 %	Saccharose
	5 %	SDS
	3 %	2-Mercaptoethanol
	0,02 %	Bromphenolblau
	60 mM	Tris-HCl, pH 6,8

Trenngel-Puffer	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4 % (G/V)	SDS
15%iges SDS-Trenngel	3,75 ml	Acrylamid
	3,75 ml	H ₂ O
	2,5 ml	Trenngelpuffer
	50 µl	APS
	5 µl	Temed

4%iges SDS-Sammelgel	2,5 ml	Sammelgelpuffer
	2 ml	H ₂ O
	0,5 ml	Acrylamid
	50 µl	APS
	5 µl	Temed

Lösungen und Puffer für Proteinanalytik:

Bradford-Reagenz	25 mg	Serva blue G
	in 11,7 ml	Ethanol gelöst
	25 ml	H ₃ PO ₄ 85 %
	auf 250 ml	H ₂ O auffüllen, über Nacht rühren, filtrieren und bei 4°C lagern

DNA-Leiter mit folgenden Banden	12 kb, 10 kb, 9 kb, 8 kb, 7 kb,	Stratagene
	6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb,	
	1500 bp, 1000 bp, 750 bp,	
	500 bp, 250 bp	

Proteinmarker mit Banden	66 kDa,	45 kDa,	36 kDa,	Sigma
folgender Molekulargewichte	29 kDa,	24 kDa,	20,1 kDa	
	14,2 kDa			

2.1.5 *Escherichia coli* Stämme

Die verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (tet^r)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
SK6600	<i>F, ara⁻, Δ(lac-proAB), rpsL, F80, lacZΔM15 (r⁺, m⁺)</i>	Hamilton <i>et al.</i> , 1989
BL21(DE3)	<i>F, ompT, hsdS_B, (r_B⁻, m_B⁻), gal, dcm (DE3)</i>	Studier <i>et al.</i> , 1991

2.1.6 Plasmide

Plasmide bzw. Vektoren, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind in Tabelle 2. aufgeführt.

Tabelle 2. Verwendete Plasmide und Vektoren.

Plasmid	relevante Charakteristik	Referenz oder Quelle
pACYC184	Low copy Klonierungsvektor	New England Biolabs, Beverly, MA
pQE30	High copy Expressionsvektor	Qiagen, Hilden
pMAK705	Low copy Vektor mit temperatur-sensitivem Replicon	Hamilton <i>et al.</i> , 1989
pMAKkana	Erzeugung einer chromosomalen <i>ispH</i> -Mutante	Diese Arbeit
pACYCiscS-fdx	Expression des <i>isc</i> -Operons	Diese Arbeit
pACYCpmkmdpmd	Expression des Mevalonat-Clusters	Hecht, 2002
pQEispH	Expression von <i>ispH</i> als N-terminales (His) ₆ -Fusionskonstrukt	Diese Arbeit
pQEispH C12S “ C96S “ C197S “ Q166T T167Q	Expression von <i>ispH</i> als N-terminales (His) ₆ -Fusionskonstrukt mit AS-Austausch	Diese Arbeit

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 zusammengestellt:

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide. Mutierte DNA-Bereiche sind unterstrichen, mutierte AS **fett** dargestellt.

Bezeichnung	5'-Sequenz-3'
iscSBamHIvo	CAGGTTGGATCCGAGAGAGAAATTAACCATGTACGGAGTTTATAGAGC
fdxSallhi	CCAGTAGTCGACTTAATGCTCACGCGCATGG
lytBvo	TGGAGGGGATCCATGCAGATCCTGTTGGCC
lytBhi	AAAGGATCCTCATTAATCGACTTCACG
lytBBamHI	GAAGGGCTGGATCCACACCTG
lytBKpNI	GGTGCGGGTACCAGTGGCACAGCG
lytBvocheck	GTCTACCCGCAACAACGG
lytBhichcheck	GCCATTCCCGATTGCGCCG
Kanrev	TTCAGTGACAACGTCGAGC
kansense	CGCTTCCTCGTGCTTTACG
lytBC12SFw	Basensequenz: CG CGT GGT TTT <u>TCT</u> GCC GGG GTA GAC C AS-Sequenz: R G F S (C) A G V D
lytBC12SRev	Basensequenz: GT CTA CCC CGG <u>CAG</u> AAA AAC CAC GCG Inv.-Kompl. Sequenz: CG CGT GGT TTT <u>TCT</u> GCC GGG GTA GAC AS-Sequenz: R G F S (C) A G V D
lytBC96SFw	Basensequenz: C GAC GCC ACC <u>TCT</u> CCG CTG GTG ACC AS-Sequenz: A T S (C) P L V T
lytBC96SRev	Basensequenz: G GTC ACC AGC <u>GGA</u> <u>GAG</u> GTG GCG TCG Inv.-Kompl. Sequenz: C GAC GCC ACC <u>TCT</u> CCG CTG GTG ACC AS-Sequenz: A T S (C) P L V T
lytBC197SFw	Basensequenz: CGC AAA GAT GAC ATC <u>TCT</u> TAC GCC ACG AS-Sequenz: R K D D I S (C) Y A T
lytBC197SRev	Basensequenz: CGT GGC GTA <u>AGA</u> GAT GTC ATC TTT GCG Inv.-Kompl. Sequenz: CGC AAA GAT GAC ATC <u>TCT</u> TAC GCC ACG AS-Sequenz: R K D D I S (C) Y A T
lytBQ166T/ T167QFw	Basensequenz: CC TTT ATG ACC <u>ACC</u> <u>CAG</u> ACG CTG TCG G AS-Sequenz: F M T T (Q) Q (T) T V S
lytBQ166T/ T167QRev	Basensequenz: C CGA CAG CGT <u>CTG</u> <u>GGT</u> GGT CAT AAA GG Inv.-Kompl. Sequenz: CC TTT ATG ACC <u>ACC</u> <u>CAG</u> ACG CTG TCG G AS-Sequenz: F M T T (Q) Q (T) T V S

2.1.8 Chemikalien

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

Synthese der Substrate für IspD, IspF, und IspH

Die Synthesen von [1-³H]1-Hydroxy-2-methyl-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (**16**, 4,2 mCi μmol^{-1}), [1,3,4-¹³C₃]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**) und [1,3,4-¹³C₃]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) wurden von Dr. Stefan Hecht durchgeführt. Unmarkiertes **16** wurde von Dr. Sabine Amslinger synthetisiert. Die Synthese von [3,4-¹³C₂]**16** wurde von Dr. Christian Rieder durchgeführt. Alle Synthesen (Hecht *et al.*, 2002) erfolgten am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Stammhaltung

Stämme von *Escherichia coli* wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bei 4 °C gehalten und bei Bedarf überimpft. Nach der Überprüfung eines Klons wurde dieser als Dauerkultur gelagert. Für Dauerkulturen wurden 2 ml Übernachtskultur durch fünfminütige Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen pro Minute (U/min) pelletiert und in 1 ml 30 %igem Glycerin-LB-Medium resuspendiert. In diesem Medium wurden die Zellen bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.2 Induzierte Anzucht von Expressionsklonen

Bakterienkulturen von *E. coli* wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Es wurden LB- oder TB-Medium (2.1.3) mit den jeweils benötigten Antibiotika verwendet. Die Anzuchten der Bakterienkulturen erfolgten für Expressionstests in etwa 20 ml, für Großanzuchten in 2 l Erlenmeyerkolben. Zunächst wurde eine Übernachtskultur (5-100 ml) mit Zellen, welche aus einer Einzelkolonie stammten, angeimpft. Die Hauptkultur wurde 1:50 (V/V) mit der Übernachtskultur angeimpft. Das Wachstum der Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD_{600}) bei 600 nm gegen unbewachsenes Medium als Nullwert verfolgt.

Expressionsstämme wurden bis zu einer OD_{600} von 0,7 angezogen, und dann die Expression des Zielproteins mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 2 mM induziert. Es erfolgte anschließend eine fünfstündige Inkubation.

Für Anzuchten von XL1-pQE30ispH-pACYCiscS-fdx (Tab. 1/2) fand Terrific-Broth-Medium, pH 7,2 mit 180 mg/l Ampicillin und 25 mg/l Chloramphenicol Verwendung. Um vollständige Assemblierung des Eisen-Schwefel-Zentrums zu gewährleisten, wurden 8 mg/l Eisenammoniumcitrat und 156 mg/l Cystein sterilfiltriert zugegeben.

Nach der induzierten Anzucht wurden die Bakterienzellen mittels Zentrifugation (5000 U/min, 20 min, bei 4 °C) geerntet, mit 250 ml 0,9 %iger anaerober Saline (10 ml pro Gramm nasse Zellen) resuspendiert, erneut zentrifugiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.3 Minipräparation

Die Minipräparation nach Holmes und Quigley, 1981 mit Schnellisolierung durch Hitzeschock ist eine material- und kostensparende Methode, hauptsächlich zur analytischen Plasmidisolierung. Es ist üblich, diese Methode nach einer Transformation einzusetzen, um zu überprüfen, ob transformierte Zellen Plasmid mit Insert enthalten.

Dazu wurden Zellen einer LB-Agar Platte vorsichtig mit einem Mikrospatel abgeschabt und in 300 ml STET-Puffer (2.1.4) mit 0,5 ml RNaseA vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozymlösung wurde die Suspension 30 s bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 90 Sekunden auf 100 °C erhitzt. Eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 13000 U/min führte zum Pelletieren von Proteinen und Zellfragmenten, während die DNA im Überstand verblieb. Die DNA wurde durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bildete sich ein DNA-Pellet, das mit 200 µl -20 °C kaltem, 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl Aqua bidestillata aufgenommen wurde.

Das im STET-Puffer gelöste EDTA komplexierte zweiwertige Kationen der Zellwand und destabilisierte diese dadurch. Lysozym katalysierte den enzymatischen Abbau des Mureins in der Zellwand. Das nichtionische Detergenz Triton X-100 führte zur Auflösung der Plasmamembran. Der Hitzeschock bedingte das Aufplatzen der periplasmatischen Membran.

2.2.1.4 Plasmid-DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmiden fand das „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ (Peqlab, Erlangen) Verwendung. Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurden in

10 ml Übernachtskultur mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Die durchgeführte Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Unter Einhaltung des Herstellerprotokolls konnte auf diese Weise 25 µg Plasmid-DNA in 50 µl Wasser isoliert werden.

2.2.1.5 Isolierung genomischer bakterieller DNA

Zur Isolation mit „E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit“ (Peqlab, Erlangen) wurden 3 ml Übernachtskultur des betreffenden Stammes eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Dabei wurden verunreinigende RNA mit RNaseA und Proteine mit ProteinaseK abgedaut. Durch Elution in 70 °C warmes Aqua bidest. konnten 30 µg genomischer DNA erhalten werden.

2.2.1.6 DNA-Reinigung

Zur DNA-Reinigung mit dem „E.Z.N.A. Cycle Pure Kit“ (Peqlab) war der DNA-haltige Ansatz in 4 bis 5 Volumen CP-Puffer aufzunehmen und in ein Zentrifugensäulchen zu geben. Durch einen einminütigen Zentrifugationsschritt bei 10000 g passierte die DNA-haltige Lösung die Membran, wobei die DNA zurückgehalten wurde. Die folgenden Arbeitsgänge wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde mittels Zentrifugation in 30 µl Aqua bidestillata eluiert.

2.2.1.7 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Präparative Verdau mit Restriktionsendonucleasen wurden über drei Stunden bei 37 °C durchgeführt, analytische Verdau über eine Stunde. Die Zusammensetzung eines Doppelverdau ist in Tabelle 4 dargestellt.

Viele der von New England Biolabs bezogenen Endonucleasen benötigten bovines Serumalbumin, um ihre volle Aktivität zu erreichen, bzw. um das Auftreten von Sternaktivität zu vermeiden.

Tabelle 4. Standardansatz für präparativen Verdau mit 2 Restriktionsendonukleasen

Substanz	Volumen (µl)
DNA	15
BSA (10x)	7
Reaktions-Puffer (10x)	7
Enzym 1	3
Enzym 2	3
Aqua bidest.	35
Ansatz	70

BSA wurde generell zugegeben.

2.2.1.8 DNA-Verknüpfung durch T4-Ligase (Ligation)

Die Ligation ist die Neukombination von Genabschnitten, die bezüglich ihrer Sequenz an den Enden kompatibel sind. Bei einer Ligation können entweder DNA-Fragmente mit glatten Enden oder mit überlappenden Enden, wenn diese komplementär zueinander sind, verbunden werden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Phosphodiesterbildung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe unter ATP-Verbrauch inter- oder intramolekular. Im Gegensatz zu einer Ligation von DNA mit glatten Enden erfolgt bei kohäsiven Enden vor der kovalenten Bindung Wasserstoffbrückenbindung der komplementären Basen. Dies bedeutet, dass die Ligation glatter DNA-Enden weniger spezifisch ist als die Ligation kohäsiver Enden.

Zur Ligation wurden Vektor und Insert in einem molarem Verhältnis von 1 : 1 bis 1 : 3 eingesetzt. Dabei waren die Längen der Genfragmente ausschlaggebend. Sind Vektor und Insert in etwa gleichgroß, so verwendet man ein Verhältnis von 1 : 1.

Die Ligation wurde bei einer Temperatur von 4 °C über Nacht durchgeführt. Dabei war gewährleistet, dass weder ATP noch die Ligase durch zugeführte Energie unbrauchbar wurden. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenstellung an Reagenzien, die für eine Ligation nötig sind.

Tabelle 5. allgemeiner Ligationsansatz

Substanz	Volumen [μ l]
Insert	zusammen
Vektor	
Aqua bidest.	3,5
T4-Ligase-Puffer (5x)	2
T4-Ligase	0,5
Ansatz	10

2.2.1.9 Transformation

2.2.1.9.1 Herstellung elektrokompeter Zellen

Elektrisch kompetente Zellen sind Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und in Medium von hohem ohmschem Widerstand resuspendiert sind (Dower *et al.*, 1988).

10 ml LB-Medium wurden als Übernachtskultur mit einer Impföse angeimpft und bei 37 °C bebrütet. 5 ml davon dienten zur Inokulation einer 500 ml Hauptkultur in LB-Medium. Die Kultur wuchs bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatte. Die Kultur wurde in einem sterilen GS3 Zentrifugenbecher für 20 Minuten auf Eis gekühlt. Es folgte eine zwanzigminütige Zentrifugation im vorgekühlten Rotor bei 4000 U/min und 4 °C. Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert und mit gleichen Parametern erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, das erste Mal mit 500 ml, das zweite Mal mit 20 ml 10 %igem Glycerin. Nach abschließender Zentrifugation wurde das Pellet in 2-3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, à 90 μ l in kältebeständige Gefäße aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Zellkonzentration betrug $1-3 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml.

2.2.1.9.2 Elektroporation

Die Elektroporation ist ein Verfahren, um DNA in elektrisch kompetente Zellen zu transformieren (Dower *et al.*, 1988). Dazu setzt man eine Mischung aus kompetenten Zellen und Vektor einem starken elektrischen Feld aus (Tab. 6).

Zellen, die einen starken elektrischen Puls erhalten, sind durch die kurzzeitige Bildung von Poren in den Membranen gekennzeichnet. Die DNA beschreibt eine kurze beschleunigte Bewegung in Richtung Pluspol. Treffen beide Ereignisse so zusammen, dass die DNA die Pore einer Zelle trifft und ihre Vorwärtsbewegung innerhalb der Zelle beendet, ist das Ergebnis eine mit Vektor transformierte Zelle. Zur Transformation fanden Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite Verwendung. Es wurden 40 µl kompetente Zellen und 1 µl Vektor geeigneter Konzentration verwendet.

2.2.1.10 Vervielfältigung von Genen durch Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR (Mullis, 1990) ist heute eine essentielle Methode zur DNA-Vervielfältigung. Dieser Vorgang geschieht mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*). Diese wird bei einer Temperatur von 94 °C, welche im ersten Schritt zur Trennung der DNA in Einzelstränge nötig ist, nicht beschädigt. Im nächsten Schritt wird der PCR-Ansatz auf 50 °C abgekühlt. Diese Temperatur wird als Annealing-(Anlagerungs-) Temperatur bezeichnet, da es den Primern, kurzen DNA-Sequenzen, die zur DNA-Vorlage wenigstens teilweise komplementär sind, jetzt möglich ist, sich an die DNA anzulagern. Die Primer werden so gewählt, dass sie kurz vor bzw. nach dem Gen von Interesse zum Matrizenstrang komplementär sind. Es folgt eine Erwärmung auf 72 °C, um der *Taq*-Polymerase die Möglichkeit zu geben, in ihrem thermischen Optimum DNA zu synthetisieren. Bei einer Temperatur von 72 °C kann die *Taq*-Polymerase DNA von 1000 Basenpaaren (bp) Länge pro Minute neu synthetisieren. Sie verlängert die an den Matrizenstrang angelagerten Primer zu einem zu diesem Einzelstrang komplementären Strang mit Hilfe der in der Reaktionsmischung (siehe Tabelle 4) vorhandenen Desoxiribonucleosidtriphosphate (dNTPs). Lässt man das Temperaturprogramm 25-

30 mal zyklisch ablaufen, erreicht man eine bis zu $2,6 \times 10^8$ -fache Vervielfältigung der DNA-Vorlage.

In Tabelle 6 sind die für die PCR benötigten Reagenzien mit entsprechender Volumenangabe gezeigt.

Dieser Ansatz kann bei Bedarf variiert werden. Ist beispielsweise die Anreicherung an Ziel-DNA zu gering, so kann man die Menge an eingesetzten Primern und DNA-Vorlage erhöhen.

Tabelle 6. Standard PCR-Ansatz

Substanz	Volumen (μl)
Aqua bidest.	83
10x-Puffer	10
dNTPs	2
Primer 1	1
Primer 2	1
<i>Taq</i> -Polymerase	1
DNA	2
Ansatz	100

Allgemeines PCR-Temperaturschema:

95 °C	3-5 min	
95 °C	X s	20-30 Zyklen
50 °C	Y s	
72 °C	Z s	
72 °C	10 min	
4 °C	→ ∞	

X, Y, und Z wurden in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments variiert. Um das etwa 1000 bp großes *ispH* beinhaltende DNA-Fragment (Abb. 10, 3.1.1) zu amplifizieren, wurden X und Y zu je 45 s, Z zu 60 s gewählt.

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden nach Sanger *et al.*, 1977 im Didesoxy-Verfahren auf ihre Basensequenz hin überprüft (GATC Biotech, Konstanz, Deutschland). Dazu fanden vier Reaktionsansätze für Sequenzierungs-PCRs mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden Verwendung. In jedem der Ansätze war ein anderes 3'-Desoxynukleotid durch das entsprechende 2',3'-Didesoxynukleotid ersetzt. Da der Einbau eines Didesoxynukleotids zum PCR-Abbruch führte, entstanden in jedem Reaktionsansatz unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die mit dem gleichen Nukleotid enden. Durch anschließende, hochauflösende Gelelektrophorese konnte die Sequenz des Ursprungsfragments ermittelt werden.

2.2.1.11 *In vitro*-Mutagenese durch PCR

Musste ein Gen nur an einer oder an wenigen Stellen mutiert werden, so konnte dies mit so genannten Mismatch-Primern durchgeführt werden. Am 3'-Ende bzw. am 5'-Ende des zu mutierenden Gens fanden die normalen, zur Klonierung benutzten Primer Verwendung. Häufig soll die Gensequenz in einer bis drei Basen geändert werden. Dadurch wird der Austausch von einer Aminosäure im translatierten Protein erreicht. Es wurden zwei Mutagenese-Primer benötigt, einer für PCR vom 3'-Ende, der andere für PCR vom 5'-Ende. Die Mutagenese-Primer waren so zu wählen, dass die aus beiden PCRs resultierenden DNA-Fragmente zusammen die volle Länge des originalen Gens ergaben, jedoch im Bereich der eingeführten Mutation einen überlappenden Bereich von 10 bis 20 bp hatten. Diese beiden DNA-Fragmente dienten in einer weiteren PCR mit den Klonierungsprimern als Template. Die hierbei amplifizierte DNA-Sequenz entsprach dem ursprünglichen Gen mit einer neu eingeführten Mutation.

2.2.1.12 Erzeugen einer chromosomalen *ispH(lytB)*-Mutante

Eine chromosomale *ispH*-Mutante war zum *in vivo* Test von IspH Proteinen mit Änderung in der Aminosäuresequenz von Nöten, da die enzymatische Aktivität von geändertem IspH sonst durch Wildtyp-IspH verfälscht worden wäre.

Die Methode von Hamilton *et al.*, 1989 nutzt zur Erzeugung chromosomaler Knock-out-Mutanten das Plasmid pMAK705 (Tab. 2) mit thermosensitivem Replicon im *E. coli* Stamm SK6600 (Tab.1). Es erfolgte dabei ein Austausch des Zielgens (*ispH*) gegen ein für Kanamycin(Neomycin)resistenz kodierendes Gen. Dazu musste das Kanamycinresistenzgen von DNA-Abschnitten flankiert werden, die zu den das chromosomale *ispH* Gen flankierenden DNA-Abschnitten homolog sind (Abb. 26, 3.1.8). Dazu wurden die Primer lytBBamHI und lytBKpNI (Tab. 3) verwendet.

Das Kanamycinresistenzgen mit flankierenden Abschnitten wurde in das Plasmid pMAK705 ligiert. Dadurch entstand das Plasmid pMAKkana (Tab. 2). Das Plasmid enthält ein Chloramphenicolresistenzgen und konnte wegen seines thermosensitiven Replicons nur bei 30 °C und kälter repliziert werden. Bakterien, denen pMAKkana transformiert wurde, konnten nur durch Cointegration von pMAKkana in ihr Chromosom bei 42 °C in chloramphenicolhaltigem Medium wachsen. Für diese Cointegratbildung war crossing-over der homologen DNA-Abschnitte nötig. Die erfolgreiche Cointegratbildung wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer lytBvocheck, lytBhichcheck, Kanrev und kansense (Tab. 3, Abb. 26, 3.1.8) bestätigt. Durch geeignete Wachstumsbedingungen (<30 °C) verließ das Plasmid das Chromosom wieder, wobei *ispH*-Gen und Kanamycinresistenzgen getauscht wurden. Dieser Vorgang erfolgte wie die Cointegratbildung durch crossing-over. Somit wurde durch Insertion die chromosomale *ispH*-knock-out Mutante SK6600*ispH::kana* erzeugt, die das *ispH*-Gen auf dem Plasmid pMAKispH trug. In weiteren Arbeitsschritten musste pMAKispH aus der Mutante entfernt werden. Dazu musste der Mutante über Transformation des den Mevalonatcluster enthaltenden Plasmids pACYCpmkmdpmd (Tab. 2) eine alternative Methode zur Biosynthese von **1** und **2** gegeben werden, da eine *E. coli ispH*-Mangelmutante letal ist.

2.2.1.13 In-vivo-Wachstumskinetik

Hierbei wurden mutierte Proteine (gewollte Änderung in der Aminosäuresequenz durch PCR-Mutagenese) indirekt durch die Wachstumsgeschwindigkeit der sie produzierenden Expressionsstämme auf ihre Aktivität getestet. Die Chromosomale *ispH*-Mutante *E. coli* SK6600*ispH::Kana-pACYCpmkmdpmd* verfügt nicht über IspH-

Wildtypaktivität und kann ohne Zugabe von **6** nicht überleben. Sie ist somit gut geeignet, mutierte Proteine *in vivo* auf enzymatische Aktivität zu überprüfen.

Nach Transformation in die chromosomale *ispH*-Mutante und anschließender Vereinzelnung von Klonen wurden in der Testreihe die Translationsprodukte der Plasmide pQE30ispHC197S, pQE30ispHQ166TT167Q, pQE30ispHWT (positive Referenz) und pQE30 (negative Referenz) *in vivo* auf Aktivität überprüft. Dazu wuchsen Vorkulturen aller Stämme bei 37 °C in LB-Medium mit 180 mg/l Ampicillin und 2 mM Mevalonat unter Schütteln. Für die Wachstumskinetik wurden für jeden Stamm sowohl 100 ml entsprechendes Medium mit Mevalonat als auch ohne Mevalonat 1:200 angeimpft. Stündliche Turgiditätsmessungen der Bakterienmedien im Photometer bei 600 nm ermöglichen es, das Wachstum zu verfolgen. Die Wachstumskinetik wurde über einen Zeitraum von 12 h aufgenommen.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

Anaerobe Arbeitsgänge wurden in einer selbstgebauten Glovebox oder in einem Exsikkator durchgeführt.

2.2.2.1 Ultraschallaufschluß

Zur Gewinnung des löslichen Anteils zellulärer Proteine von Expressionsklonen transformierter *E. coli* Zellen wurden Ultraschallaufschlüsse der Zellen durchgeführt. Dazu wurde pro 1 g feuchte Zellmasse je 10 ml Proteinaufschlußpuffer (2.1.4) zugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen dreimal 10 s mit "gepulstem" Energiestoß und 60 % Leistung des Ultraschallfingers (2.1.1) beschallt. Nach jeder Beschallung wurden die Zellen 5 min auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden anschließend 30 min bei 17000 U/min und 4 °C abzentrifugiert. Der so erhaltene, abdekantierte Überstand aus Zellextrakt wurde der weiteren Verwendung zugeführt.

2.2.2.2 French Press Aufschluss

In einer French Press (Constant Systems LTD, Warwick, GB) wurden die aufzuschließenden Zellen in einer Kammer durch großen Druck im Bereich von 1,7-1,9 kbar zum Platzen gebracht. Die resuspendierten Zellen (10-200 ml) wurden in den Einfüllstutzen der French Press gegeben, und ein Auffanggefäß unter ihren Auslauf gestellt. Um *E. coli* aufzuschließen, wurde ein Druck von 1,8 kbar gewählt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend wie unter 2.2.2.1 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.2.3 Nickel-Affinitätschromatographie

Zur Herstellung des Zielproteins wurde das dafür kodierende Gen im geeigneten Leserahmen in das Plasmid pQE30 von Qiagen kloniert und in *E. coli* transformiert. Zwischen Startcodon und Multiple-Cloning-Site befindet sich eine für sechs Histidin Aminosäuren kodierende Region. Im exprimierten Protein bezeichnet man diese Histidinreste als His₆-Taq. An die Multiple-Cloning-Site schließen sich Stopcodons an. Bei der Expression eines pQE30-Konstrukts entstehen Proteine mit N-terminalem His₆-Taq. Dieser bewirkt eine im Vergleich zu nicht mit einem His₆-Taq versehenen Proteinen eine erhöhte Affinität des Zielproteins an eine Nickelmatrix. Zum Auftragen des Rohextrakts aus *Escherichia coli* verwendet man einen Puffer mit einer an das Zielprotein angepassten geringen Konzentration an Imidazol. Imidazol besitzt eine höhere Affinität zur Nickelmatrix als Histidinreste und eignet sich deswegen zur Elution von His₆-Taq-Proteinen. Um unspezifische, das heißt auf nicht-His₆-Taq-Histidinresten beruhende Anlagerung von nicht-Ziel-Proteinen zu vermeiden, wird dem Auftragspuffer wenig (10-20 mM Imidazol) zugesetzt. Die optimale Menge muss für jedes Zielprotein ermittelt werden und führt zur Steigerung der Reinheit des Zielproteins nach der Elution.

Mit Ni²⁺-Chelating-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) wurden das Protein His₆-IspH sowie die mutierten His₆-IspH-Proteine C12S, C96S und C197S zu 95% bis 99% Reinheit hoch angereichert. Dies geschah unter anaeroben Bedingungen. In Puffer A (2.1.4) für Ni²⁺-Säule resuspendierte Zellen einer entsprechenden induzierten Anzucht wurden unter Argon wie unter 2.2.2.2

beschrieben in einer Frech Press aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 11000 U/min und 4 °C für 60 min in gasdichten Zentrifugenbechern konnte ein Rohextrakt gewonnen werden. Dieser wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die an eine FPLC-Anlage (2.1.1) angeschlossene Nickelsäule (Volumen 15 ml) aufgetragen. Waschen der Säule erfolgte mit Puffer A bei 2 ml/min bis eine Basislinie erreicht wurde. Das Zielprotein konnte durch einen linearen Gradienten von 20-500 mM Imidazol in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 in einem Volumen von 100 ml eluiert werden. Durchfluß und Eluat wurden bei 280 nm auf Proteingehalt überprüft. Es wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt. Eine Vereinigung der Hauptfraktionen erfolgte nach Kontrolle mittels denaturierender SDS-PAGE wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Abtrennung von NaCl und Imidazol wurde durch anaerobe Dialyse gegen 2 l 100 mM Tris/HCl pH 8,0 über Nacht bei 4 °C erreicht.

2.2.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt des Rohextraktes wurde nach einer Variante der Methode von Bradford (Bradford 1976; Read *et al.* 1981; Compton *et al.* 1985) bestimmt.

Die konzentrierten Proben wurden zunächst mit Bradfordpuffer verdünnt. Für den Testansatz wurden als Dreifachbestimmung 50 µl verdünnte Probe mit je 950 µl Bradfordfarbstoffreagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde bei 578 nm gegen einen Leerwert aus 50 µl Bradfordpuffer und 950 µl Farbstoffreagenz die Extinktion bestimmt.

Die Ergebnisse wurden mittels einer mit Rinderserumalbumin als Standard erhaltenen Kalibriergeraden in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

2.2.2.5 Aufnahme von UV/Vis-Spektren

Proteinlösungen wurden von 250 bis 800 nm im Photometer (Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) vermessen. Dazu wurde eine Proteinlösung in eine mit Methanol gereinigte Quarzküvette pipettiert und in das Photometer gestellt. Die Messung erfolgt computergestützt. Zuvor wurde mit einer weiteren gereinigten Quarzküvette, die bis auf das zu untersuchende Protein

die gleichen Bestandteile wie die Küvette mit der Proteinlösung enthält, ein Nullabgleich durchgeführt.

2.2.2.6 Bestimmung des Eisengehalts von IspH

Die Methode von Brumby und Massey (1967) beruht auf dem Nachweis eines farbigen Komplexes von 1,10-Phenanthrolin mit zweiwertigem Eisen. Durch Ausfällen löslicher Proteine mit Trichloressigsäure wird gebundenes Nicht-Häm-Eisen freigesetzt. Dieses liegt mit Masse als zwei- oder dreiwertiges Eisen in Lösung vor und wird durch Ascorbinsäure vollständig zu zweiwertigem Eisen reduziert. Zugabe von 1,10-Phenanthrolin führt zur Bildung eines rosanen Komplexes, der bei 510 nm im Photometer nachgewiesen wird.

2.2.2.7 HPLC-gestützter IspH-Assay

Dieser Assay wurde als Schnelltest (beispielsweise zur Überprüfung einer Proteinreinigung) etabliert. Er konnte entweder mit dem natürlich vorkommenden Elektronentransportsystem Flavodoxin/Flavodoxinreduktase (Fpr/FldA) (A) oder mit dem synthetisch hergestellten Elektronencarrier 10-Methyl-5-desaza-isoalloxazin (Desazaflavin, DAF) (B) durchgeführt werden.

Der optimierte Reaktionsansatz A enthält:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
30 mM NaF
2,3 μ M [1-³H]**16**
40 μ M FldA
12 μ M Fpr
4,3 pM IspH
ad 160 μ l H₂O

Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von NADPH in einer Endkonzentration von 2 mM. Der Reaktionsansatz wurde zügig in einen auf 37 °C vorgewärmten Heizblock gegeben und dort für 10 min inkubiert. Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 5 µl 3 M Trichloressigsäure. Im Ansatz enthaltene Proteine fielen dadurch aus und konnten mittels Zentrifugation bei 13000 U/min und 4 °C für 5 min in einer Tischzentrifuge von der wässrigen Phase abgetrennt werden.

Der optimierte Reaktionsansatz B enthielt:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
7,5 mM DTT
2,3 µM [1-³H]**16**
1,4 mM DAF (in DMSO gelöst)
1 pM IspH
ad 160 µl H₂O

Die Reaktion lief nur während Bestrahlung mit einer 100 W Quecksilberdampf Lampe (Osram, Augsburg, Deutschland) in 15 cm Entfernung zum Reaktionsansatz ab. Da diese Lampe eine sehr große Hitze entwickelte, musste der Ansatz über die 30 min dauernde Inkubation auf Eis gekühlt werden.

Die Reaktion wurde durch Ausschalten der Quecksilberdampf Lampe beendet.

Im Ansatz enthaltene Proteine fielen durch Zugabe von 5 µl 3M Trichloressigsäure aus.

Zur Analyse der Assays mittels HPLC erfolgte eine Neutralisation des Assay-Ansatzes mit 3 M NaOH und das Entfernen eventuell verbliebener Proteinbestandteile durch Ultrafiltration über eine 100 kDa Nanosep Membran. Dazu war ein erneuter Zentrifugenschritt wie oben beschrieben von Nöten.

Ein 50 µl Aliquot des aufbereiteten Ansatzes wurde über reversed-phase Ionenpaarhochdruckchromatographie analysiert. Die hierfür verwendete Luna C8-Säule (5 µm, 4.6 × 250 mm) wurde von Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) bezogen. Nach Auftragen des Analyts erfolgte Waschen mit 10 ml 3,5 % (V/V) Methanol in 10 mM Tetra-n-butylammoniumphosphate, pH 6,0.

Die Elution von Substrat (**16**) und den Produkten (**1/2**) konnte durch sukzessives Anlegen von Gradienten von 3,5-21 % (V/V) Methanol (2 ml), 21-35 % (V/V)

Methanol (13 ml) und 35-49 % (V/V) Methanol (10 ml) in 10 mM Tetra-n-butylammoniumphosphate, pH 6,0 erreicht werden.

Die Flussrate für das Waschen und die Elution betrug 1 ml/min. Die Elution wurde rechnergestützt mit Scintillationsanalyse (Beta-RAM, Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) in Echtzeit verfolgt.

Zur Vorinkubation von IspH-Protein mit Dithionit bzw. mit Desazaflavin und DTT unter Starklicht wurden Dithionit und Desazaflavin im 10-fachen molaren Überschuss im Vergleich zu IspH eingesetzt.

2.2.2.8 NMR-gestützter IspH-Assay

Im NMR-Spektrum einer vor Erreichen des Vollumsatzes abgestoppten IspH-Reaktion mit $[3,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{16}$ als Substrat sollten sowohl $[3,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{16}$ als auch $[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$ und $[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{2}$ zu erkennen sein.

Dieser Assay wurde mit (A) den natürlich vorkommenden Elektronencarriern FldA / Fpr aus *E. coli*, sowie separat davon mit (B) dem künstlichen Elektronenshuttle Desazaflavin durchgeführt.

Der optimierte Reaktionsansatz A enthielt:

40	mM	Tris/HCl, pH 8,0
30	mM	NaF
2	mM	$[3,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{16}$
40	μM	FldA
12	μM	Fpr
2	μM	IspH
ad 500	μl	H ₂ O

Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von NADPH in einer Endkonzentration von 4 mM. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C je nach Aktivität 0,5 h bis 1 h im Heizblock inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Sauerstoff beendet.

Der optimierte Reaktionsansatz B enthielt:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
7,5 mM DTT
2 mM [3,4-¹³C₂]**16**
1,4 mM DAF (in DMSO gelöst)
0,5 µM IspH
ad 500 µl H₂O

Die Reaktion lief nur während Bestrahlung mit einer 100 W Quecksilberdampflampe (Osram, Augsburg, Deutschland) in 15 cm Entfernung zum Reaktionsansatz ab. Da diese Lampe eine sehr große Hitze entwickelte, musste der Ansatz über die 30 min dauernde Inkubation auf Eis gekühlt werden.

Die Reaktion wurde durch Ausschalten der Quecksilberdampflampe beendet.

Zur Auswertung in einem DXR 500 AVANCE Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) wurde den Ansätzen aus A und B D₂O in einer Konzentration von 10 % (V/V) zugegeben (2.2.3.5).

2.2.2.9 Photometrisch gestützter IspH-Assay

Mit diesem Assay sollte der Reaktionsverlauf der IspH-Katalyse über die Zeit am Photometer verfolgt werden.

Der optimierte Reaktionsansatz enthielt:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
30 mM NaF
90 µM **16**
40 µM FldA
12 µM Fpr
0,16 µM IspH
ad 450 µl H₂O

Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von NADPH in einer Endkonzentration von 200 μM . Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 37 °C im Photometer über einen Zeitraum von 1 h. Dabei wurde die Abnahme von NADPH bei 340 nm verfolgt. Da das Photometer nicht in der Glovebox stand, musste die den Reaktionsansatz enthaltende Quarzküvette gasdicht verslossen und umgehend nach NADPH-Zugabe in das Photometer gegeben werden.

Die Auswertung des Assays erfolgte rechnergestützt mit dem Programm DynaFit (Kuzmic 1996).

2.2.2.10 Untersuchungen zur Chemie der IspH-Reaktion

In der von IspH katalysierten Reaktion entstanden aus **1** und **2** aus **16** in einem gewissen Verhältnis. Durch unter 2.2.2.8 dargelegte NMR-Assays, zum einen mit dem FldA/Fpr System, zum anderen mit Desazaflavin als Elektronenshuttle, sollte jeweils das Verhältnis der Aufspaltung in **1** und **2** bestimmt werden. Dazu wurden Ansätze wie unter 2.2.2.8 beschrieben durchgeführt.

Mittels NMR-Spektroskopie konnte der Einbau eines Deuteriumatoms an Position C2 von **1** vom Einbau eines leichten Wasserstoffs unterschieden werden.

Folgender Ansatz fand für Deuterium-Einbauversuche Verwendung:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
26,3 mM NaF
1,7 mM [3,4-¹³C₂]**16**
40 μM FldA
12 μM Fpr
0,41 μM IspH
3,6 mM NADPH
ad 2,9 ml H₂O bzw. 10 % H₂O, 90 % D₂O

Die Inkubation erfolgte für 10 h bei 37 °C.

Im Anschluß wurde D₂O durch Lyophilisieren entfernt, der Rückstand in 600 µl H₂O aufgenommen und nach Leyes *et al.*, 1999 mit Idi-I-Protein behandelt.

2.2.2.11 Assay zur Bestimmung der IspD-Aktivität

IspD-Assays wurden mit ¹³C-markiertem Substrat durchgeführt und konnten wie unter 2.2.3.5 beschrieben im NMR-Spektrometer ausgewertet werden.

Der Reaktionsansatz enthielt:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
7,7 mM CTP
7,7 mM [1,3,4-¹³C₃]12
0,42 µM IspDF
60 µl D₂O
ad 600 µl H₂O

Der Assay wurde durch Zugabe eines zweiwertigen Metallkations in einer Endkonzentration von 10 mM gestartet.

Termination der Reaktion erfolgte durch komplexieren der eingesetzten Metallionen durch 20 mM EDTA. Von dem beendeten Assay wurde ohne weitere Aufbereitung ein NMR-Spektrum aufgenommen und daraus die Umsatzrate und spezifische Enzymaktivität errechnet.

2.2.2.12 Assay zur Bestimmung der IspF-Aktivität

IspF-Assays wurden mit ¹³C-markiertem Substrat durchgeführt und konnten wie unter 2.2.3.5 beschrieben im NMR-Spektrometer ausgewertet werden.

Der Reaktionsansatz enthielt:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
7,7 mM [1,3,4-¹³C₃]**14**
0,42 μM IspDF
60 μl D₂O
ad 600 μl H₂O

Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines zweiwertigen Metallions in einer Endkonzentration von 10 mM. Nach Beendigung des Assays durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM wurde zur Bestimmung des Umsatzes ein NMR-Spektrum aufgenommen.

2.2.2.13 Assay zur *in vitro* Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat in 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat

Die Umwandlung von [1,3,4-¹³C₃]**12** in [1,3,4-¹³C₃]**15** wurde von IspDF aus *C. jejuni* und IspE aus *E. coli* katalysiert. Der Reaktionsansatz enthielt neben dem Substrat und Cosubstrat (CTP) der IspD-Reaktion auch das Cosubstrat (ATP) der IspE-Reaktion:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0
7,7 mM CTP
3 mM ATP
7,7 mM [1,3,4-¹³C₃]**12**
0,42 μM IspDF
0,1 μM IspE
60 μl D₂O
ad 600 μl H₂O

Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Mg²⁺ in einer Endkonzentration von 10 mM. Nach Beendigung des Assays durch Zugabe von EDTA in einer

Endkonzentration von 20 mM wurde zur Bestimmung des Umsatzes ein NMR-Spektrum aufgenommen.

2.2.3 Physikalische Methoden

Anaerobe Arbeiten wurden in einer selbstgebauten Glovebox durchgeführt.

2.2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur präparativen oder analytischen Trennung von DNA-Fragmenten angewandt, zur Überprüfung von DNA-Isolierungen, PCR-Ansätzen, Restriktionsansätzen und zur Kontrolle der Reinheit einer DNA-Lösung. Die dazu verwendete Matrix ist ein 0,8 bis 3 %iges Agarosegel in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (2.1.4), pH 8,2. Die entsprechende Menge Agarose wird bei 100 °C in TAE-Puffer gelöst. Ist die Lösung auf 60 °C abgekühlt, gießt man sie in eine Formvorlage für Gele. Das erstarrte Gel wird mit der Formvorlage in eine mit TAE-Puffer, pH 8,2 gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Eine Spannungsquelle liefert eine Gleichspannung im Bereich von 100 bis 150 V. Die Stromstärke liegt abhängig von der Ionenstärke des Laufpuffers bei 60 bis 200 mA. DNA bewegt sich im elektrischen Feld auf die Anode zu, da die Phosphate des DNA-Rückgrats unter den Elektrophoresebedingungen negativ geladen sind. In freier Lösung ist die Wanderungsgeschwindigkeit unabhängig von dem Molekulargewicht. Durch die Porengröße der Agarosematrix werden größere DNA-Moleküle stärker zurückgehalten als kleine. Diese Tatsache beruht zum einen auf dem Ogston-Siebeffekt, nach dem DNA eine globuläre Form annimmt und von Poren geringerer Größe zurückgehalten wird, zum anderen auf der Reptationstheorie. Diese besagt, dass DNA-Moleküle, deren globuläre Form für Poren zu groß ist, sich der Länge nach im elektrischen Feld ausrichten und sich durch die Matrix schrauben (Lottspeich, 1998). Wird neben den Proben ein Standard mit Banden bekannter Größe aufgetragen, so kann aus deren Laufstrecken eine Eichgerade erstellt werden, aus welcher man anhand der Laufstrecke der DNA-Fragmente ihre Länge ablesen kann. Nach fünfzehnminütigem Anfärben mit der interkalierenden Substanz

Ethidiumbromid, ist die DNA unter UV-Licht sichtbar. Eine einzelne Bande muss dazu wenigstens 10 ng DNA enthalten.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Um eine Aussage über die Größe eines denaturierten, monomeren Proteins treffen zu können, wird eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Man kocht die zu untersuchende Probe 10 min bei 100 °C mit SDS-haltigem Probenauftragspuffer auf. Dadurch verlieren Proteine ihre native Konformation, sie denaturieren. Das Natriumdodecylsulfat lagert sich an die Proteinoberfläche und überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Das im Auftragspuffer vorhandene β -Mercaptoethanol reduziert Schwefelbrücken. Die mit SDS beladenen Proteine bewegen sich im elektrischen Feld zur Anode und werden dabei abhängig von ihrer Größe von der Polyacrylamid-Matrix zurückgehalten. Es wird ein diskontinuierliches System aus Sammelgel und Trenngel verwendet. Gereinigte Proteinfractionen und Rohextrakt werden mit Auftragspuffer geeignet verdünnt. Maximal 15 μ l finden in den Geltaschen Platz. Die Elektrophorese wird für eine Stunde mit 25 mA je Gel betrieben. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wird das Gel eine halbe Stunde mit Coomassie-Brillantblau gefärbt und anschließend in Entfärbelösung I und danach in Entfärbelösung II (2.1.4) entfärbt. Ein Proteinstandard gibt Aufschluss über die Größe der Probenbanden.

2.2.3.3 2D-Elektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese ist die Methode zur Auftrennung komplexer Proteingemische mit dem besten Auflösungsvermögen. Nach Görg *et al.*, 2000 werden Proteingemische zuerst in der ersten Dimension nach den isoelektrischen Punkten (pI) getrennt. Für diesen IEF, isoelektrische Fokussierung genannten Vorgang verwendet man heute einen immobilisierten pH-Gradienten, IPG. In der zweiten Dimension erfolgt eine Auftrennung nach Proteingröße durch SDS-Polyacrylamid-Gradientenelektrophorese. Proteinproben werden zur Identifikation

ausgeschnitten und nach Schäfer *et al.*, 2001 verdaut. Die Massenbestimmung erfolgt durch MALDI-TOF Massenspektrometrie. Dazu werden die Proben mit Zip-Tips (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll behandelt. Die Identifikation der erhaltenen Peptide erfolgt mit einem Biflex-II MALDI-TOF Spektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland). Die Datenanalyse wird mit dem MASCOT Software Server (Matrix Science, London, UK) durchgeführt.

2.2.3.4 ESR-Spektroskopie

Proteinproben wurden in ESR Suprasil Quartz Röhrchen mit 3 mm Innendurchmesser überführt und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. ESR-Spektren von IspH-Protein wurden am Institut für Experimentalphysik der FU Berlin aufgenommen.

2.2.3.5 NMR-Spektroskopie

NMR-Proben wurden in 0,6 ml 10 % D₂O, 90 % H₂O gelöst. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden bei 17 °C mit einem Bruker Avance DRX 500 Spektrometer aufgenommen. Bei einer Magnetfeldstärke von 11,75 T betrug die ¹H-NMR-Frequenz 500,13 MHz und die ¹³C-NMR-Frequenz 125,76 MHz. Die NMR-Proben wurden im mit 20 Hz rotierenden Röhrchen mit einem ¹³C/¹H-Dualprobenkopf gemessen. Die Spektrenprozessierung und die Auswertung erfolgten mit Bruker 1D-WINNMR 5.0 Software. Die erhaltenen Spektren wurden mit einer Gauß-Lorentz-Funktion (gb:0,01 bis 0,2; lb: -1 bis -2) Fourier-transformiert.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Stand der Forschung bezüglich der Funktion von IspH-Protein

Durch vergleichende Genomuntersuchungen (Rohdich *et al.*, 2001a) war bekannt, dass *ispG* (*gcpE*) und *ispH* (*lytB*) im Desoxyxylulosephosphatweg zur Biosynthese der Isoprenoidvorstufen Isopentenylpyrophosphat (IPP, **1**) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **2**) eine Rolle spielen (Tab. 7).

Tabelle 7: Ausstattung verschiedener Mikroorganismen mit Genen des Mevalonat bzw. Mevalonat-unabhängigen Weges zur Synthese von **1** und **2**.

Organismus	Mevalonat-unabhängiger Weg							Mevalonat Weg						
	<i>dxs</i>	<i>ispC</i>	<i>ispD</i>	<i>ispE</i>	<i>ispF</i>	<i>ispG</i>	<i>ispH</i>	<i>hmgs</i>	<i>hmgr</i>	<i>mk</i>	<i>pmk</i>	<i>dpmd</i>	<i>idil</i>	<i>idill</i>
Eubakterien														
<i>Aquifex aeolicus</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+							+
<i>Buchnera</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Chlamydia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Deinococcus radiodurans</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+						+	
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+	+						+	
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Synechocystis</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+							+
<i>Thermotoga maritima</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Trepomema pallidum</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	+	+	+	+		+					
<i>Xylella fastidiosa</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Borrelia burgdorferi</i>								+	+	+	+	+		+
Archaea														
<i>Aeropyrum pernix</i>								+	+	+				+
<i>Archeoglobus fulgidus</i>								+	+	+				+
<i>Halobacterium</i> sp.								+	+	+				+
<i>M. thermoautotrophicum</i>								+	+	+				+
<i>Methanococcus jannaschii</i>								+	+	+				+
<i>Pyrococcus abyssii</i>								+	+	+				+
<i>Pyrococcus horikoshii</i>			+					+	+	+				+
<i>Thermoplasma acidophilum</i>								+	+	+				+
Eukaryonten														
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Caenorhabditis elegans</i>								+	+	+	+	+	+	+
<i>Drosophila melanogaster</i>								+	+	+	+	+	+	+
<i>Homo sapiens</i>								+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								+	+	+	+	+	+	+

Mittels chromosomaler *ispH* knock-out-Mutanten konnte zum einen in Wachstumsexperimenten mit *Synechocystis* sp. gezeigt werden, dass *ispH* in Organismen, die **1** und **2** ausschließlich über den Desoxyxylulosephosphatweg erzeugen, essentiell ist (Cunningham *et al.*, 2000). Zum anderen konnte der Nachweis erbracht werden, dass sich ohne das Vorhandensein von IspH-Genprodukt 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP, **16**), das Substrat der IspH-Reaktion, im *ispH*-defizienten Organismus akkumuliert (Altincicek *et al.*, 2001). Die Funktion von IspH, die in der Reduktion von **16** zu **1** und **2** besteht (Abb. 7), konnte anschließend durch *in vivo*-Einbauexperimente (Rohdich *et al.*, 2001b) nachgewiesen werden. Dazu wurde [U-¹³C₅]1-Desoxy-D-xylulose einem *xyIB* und *ispCDEFGH* exprimierenden *E. coli*-Stamm gefüttert und [U-¹³C₅]**1** bzw. [U-¹³C₅]**2** aus diesen Bakterienzellen isoliert.

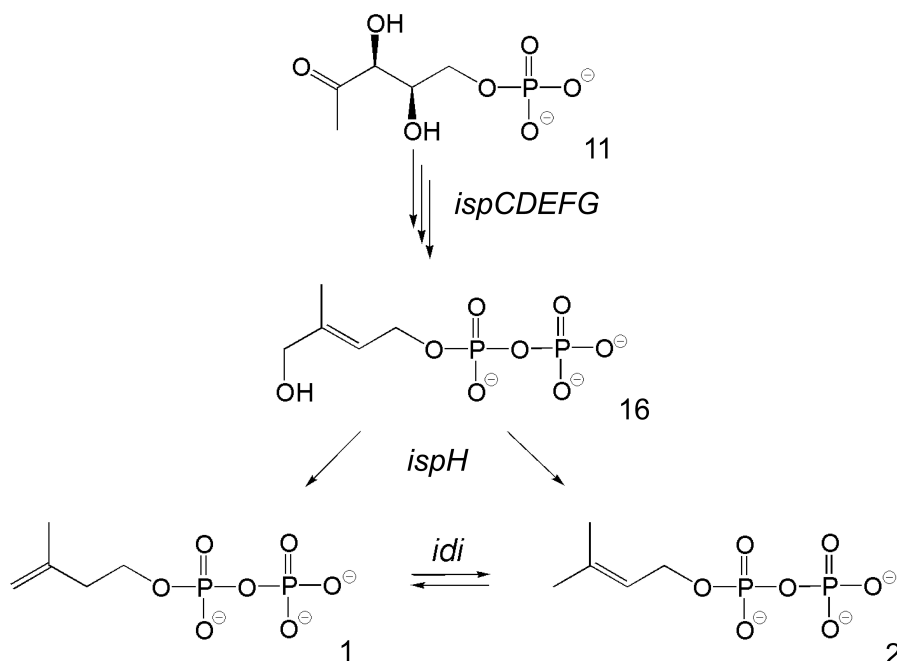


Abbildung 7: Die IspH-Reaktion im Kontext.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun rekombinantes IspH-Protein aus *E. coli* hergestellt werden, um dessen Funktion auch *in vitro* zu überprüfen.

Bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit war es nicht möglich, das *ispH* Gen als N-terminales His-tag-Fusionsprotein (His₆-IspH) löslich und in aktiver Form zu exprimieren. Der Rohextrakt eines *ispH* exprimierenden *E. coli*-Stamms enthielt neben der Gesamtheit an löslichen Zellproteinen bestenfalls Spuren löslichen His₆-IspH-Proteins. Im Gegensatz dazu fand sich in der Pelletfraktion der unlöslichen Zellproteine eine große Menge an His₆-IspH (Rohdich *et al.*, 2001b). Es konnte also angenommen werden, dass die Expression des rekombinanten *ispH* Gens an sich möglich war. Die Biosynthese löslichen Zielproteins in *E. coli* ist die schnellste und einfachste Methode, zu untersuchende Proteine in ausreichender Menge für affinitätschromatographische Reinigung und nachfolgende Anwendungen bereitzustellen. Dies wurde auch im Rahmen dieser Arbeit mit IspH aus *E. coli* versucht.

Es war jedoch möglich, IspH-Protein als Fusionsprotein mit dem vom Gen *malE* codierten Maltosebindprotein (MBP) als Maltosebindprotein-IspH (MBP-IspH) löslich in einer Konzentration von 5 mg/ml herzustellen und je Anreicherung über Amylose-Affinitätschromatographie 30 mg gereinigtes MBP-IspH aus 4 l Kulturvolumen zu erhalten (Rohdich *et al.*, 2003). Wie auch beim His₆-IspH befand sich der für die Anreicherung nötige Anhang am N-Terminus. Die Anreicherung von MBP-IspH sowie die anschließenden Protein-Assays zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden zunächst unter aeroben Bedingungen durchgeführt (Adam *et al.*, 2002). Die gemessene spezifische Aktivität von 2 nmol*mg⁻¹*min⁻¹ erschien im Vergleich zu den IspH vorgeschalteten Enzymen sehr niedrig. Deren spezifische Aktivitäten liegen, vom IspG-Protein abgesehen, in einem Bereich von 5-30 μmol*mg⁻¹*min⁻¹ (Rohdich *et al.*, 2001a).

Da aus der Literatur bekannt war, dass es sich bei IspH um ein sauerstoffempfindliches Protein handelt (Wolff *et al.*, 2003), wurden für die vorliegende Arbeit diejenigen Arbeitsschritte, bei denen IspH dem Luftsauerstoff ausgesetzt hätte werden können, anaerob durchgeführt. Dafür fand eine mit Formiergas befüllte selbstgebaute Glovebox bzw. ein Exsikkator ab der Zellernte Verwendung (2.2.1.2). Die Anzucht von Bakterienzellen wurde aufgrund des reduzierenden Milieus in *E. coli* (Neidhardt *et al.*, 1996) unter Luftsauerstoff durchgeführt. Mit anaerob angereichertem MBP-IspH ließ sich die spezifische Aktivität in anaerob durchgeführten IspH-HPLC-Assays (2.2.2.7) gegenüber aeroben

Bedingungen bereits auf $20 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ verzehnfachen (unveröffentlichte Daten).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von IspH-Proteinen aus über 500 in der NCBI-Datenbank annotierten Mikroorganismen zeigte, dass drei Cysteinreste absolut konserviert sind (Abb. 8).

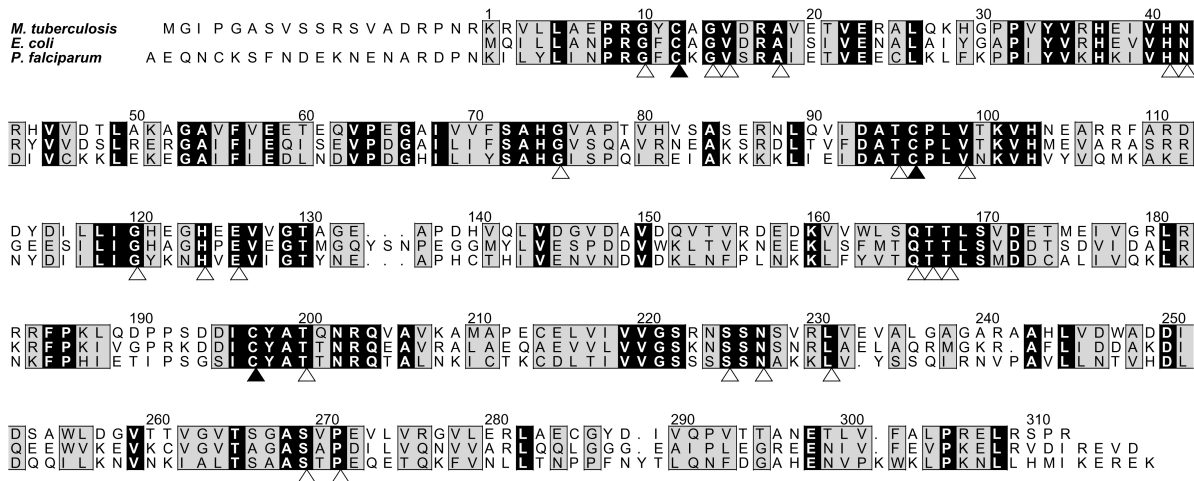


Abbildung 8: Alingment von IspH-Proteinen aus *M. tuberculosis*, *E. coli* und *P. falciparum*.

Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. Schwarze Pfeile markieren absolut konservierte Cysteine. Weiße Pfeile markieren in 20 Organismen konservierte Aminosäuren.

Nach Beinert *et al.*, 1997 sind Cysteine in Eisen-Schwefel-Proteinen Liganden für Eisen-Schwefel-Cluster. Nun wurde in Betracht gezogen, dass es sich bei dem IspH-Protein um ein eben solches Protein handle. Um die erreichte spezifische Aktivität von $20 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ weiter zu erhöhen, konnten nun Anstrengungen unternommen werden, um bei der Expression von *ispH* die Bedingungen *in vivo* für ein mögliches entstehendes Eisen-Schwefel-Protein zu optimieren.

Auf dem Chromosom von *E. coli* sind nach heutigen Schätzungen etwa 50 Eisen-Schwefel-Proteine kodiert (Tokumoto *et al.*, 2001). Diese sind sowohl an Redox-Reaktionen, wie auch an Vorgängen, bei denen keine Elektronenübertragung stattfindet, beteiligt (Beinert *et al.*, 1997). Aus den entsprechenden Apoproteinen entstehen erst durch den korrekten Zusammen- und Einbau von Eisen-Schwefel-Zentren funktionsfähige Holoproteine. Dies wird von einer aus mehreren Proteinen bestehenden komplexen biochemischen Maschinerie geleistet. *E. coli* stehen zu

diesem Zeck wenigstens zwei verschiedene so genannte Eisen-Schwefel-Pipelines zur Verfügung. Die dafür jeweils kodierenden Gene sind zum einen im *isc*-Operon (Abb. 9), zum anderen im *suf*-Operon zusammengefasst (Takahashi et al., 2002).

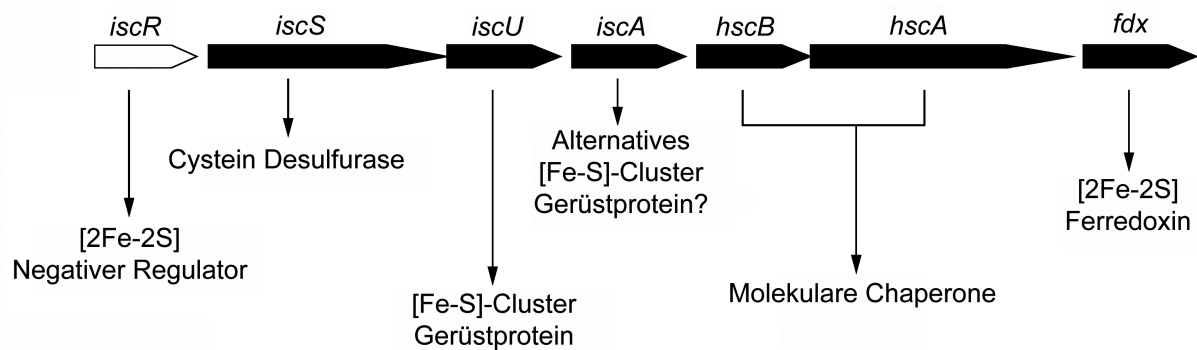


Abbildung 9: Das *isc*-Operon aus *E. coli*.

Zwar sind Homologe von Teilen des *isc*-Operons in allen Organismen zu finden, das komplette Operon existiert jedoch lediglich in Mitochondrien sowie α -, β -, und γ -Protobakterien. Orthologe Gene des *suf*-Operons sind ebenso weit verbreitet und können in Bakterien, Archaea und Plastiden angetroffen werden (Mühlenhoff *et al.*, 2000). Ob der Redundanz der Eisen-Schwefel-Pipelines kann *E. coli* die Deletion eines der Operons überleben. Im Gegensatz dazu sind die Orthologen der Gene des *isc*-Operons für Hefen essentiell, da sie nur diese eine Eisen-Schwefel-Pipeline besitzen (Mühlenhoff *et al.*, 2000).

Oben genannte Überlegungen und Erkenntnisse wurden zunächst mittels MBP-IspH in die Praxis übertragen. Die Hochanreicherung mit Maltosebindeprotein über eine Amylosesäule funktionierte gut (s.o.), auch war in reduzierender Atmosphäre eine Aktivität von $300 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ messbar (unveröffentlichte Daten). Nach der Anreicherung von MBP-IspH war die Abspaltung von MBP durch tryptischen Verdau nur bei gleichzeitiger Fragmentierung von IspH zu erreichen. Deswegen mussten nachfolgende Untersuchungen am MBP-IspH-Fusionsprotein durchgeführt werden. Das MBP-IspH-Fusionsprotein hatte allerdings einen entscheidenden Nachteil: Das Maltosebindeprotein war mit 43 kDa größer als das IspH-Monomer (36 kDa) und lediglich durch einen Spacer von 6 Aminosäuren von diesem getrennt. Dieser Umstand könnte zu einer sterisch bedingten, abnormalen Tertiärstruktur von IspH

geführt haben. Zwar führte die Fusion von IspH mit MBP zu löslicher Expression. Die größtenteils unlösliche Expression von His₆-IspH kann allerdings, wie weiter unten erörtert wird, nicht auf den His₆-Taq zurückgeführt werden. Da das Maltosebindeprotein nicht abgespalten werden konnte, und weiterhin angenommen werden musste, dass der His₆-Taq Faltung und Funktion von IspH weniger stark beeinflusste als MBP, war dem um Größenordnungen kleineren His₆-Taq der Vorzug zu geben.

3.1.1 Klonierung von *ispH*

Wie unter 3.1 erwähnt, wird in *E. coli* der Zusammenbau funktionaler Eisen-Schwefel-Cluster unter anderem von auf dem *isc*-Operon codierten Enzymen (Abb. 9) katalysiert (Takahashi *et al.*, 2002). Die neu entworfene Strategie zur Gewinnung funktionalen His₆-IspH-Proteins sah nun vor, einen *E. coli*-Stamm zur Überexpression sowohl rekombinanten *ispH* Gens als auch des rekombinanten *isc*-Operons zu klonieren.

Auf dem Chromosom von *E. coli* befindet sich ein offener Leserahmen, der das *ispH* Gen enthält (Abb. 10). Etwa 10 Basenpaare (Bp) vor dem Startcodon befindet sich die Shine-Dalgarno-Sequenz TGGAGG (RBS = ribosomale Bindestelle in Abb. 10), die transkribiert als Erkennungssequenz für die Anlagerung des Ribosoms dient. Der Bereich des *E. coli* Chromosoms in Leserichtung nach dem *ispH* Gen weist eine Besonderheit auf: Dort befindet sich, wie in Abbildung 10 zu sehen, ist ein ρ -unabhängiger Terminator. Nach der Transkription kann diese palindromische RNA-Sequenz durch Basenpaarung eine Haarnadelstruktur ausbilden, was dazu führt, dass sich das Ribosom in dieser Region von der zu translatierenden mRNA trennt.

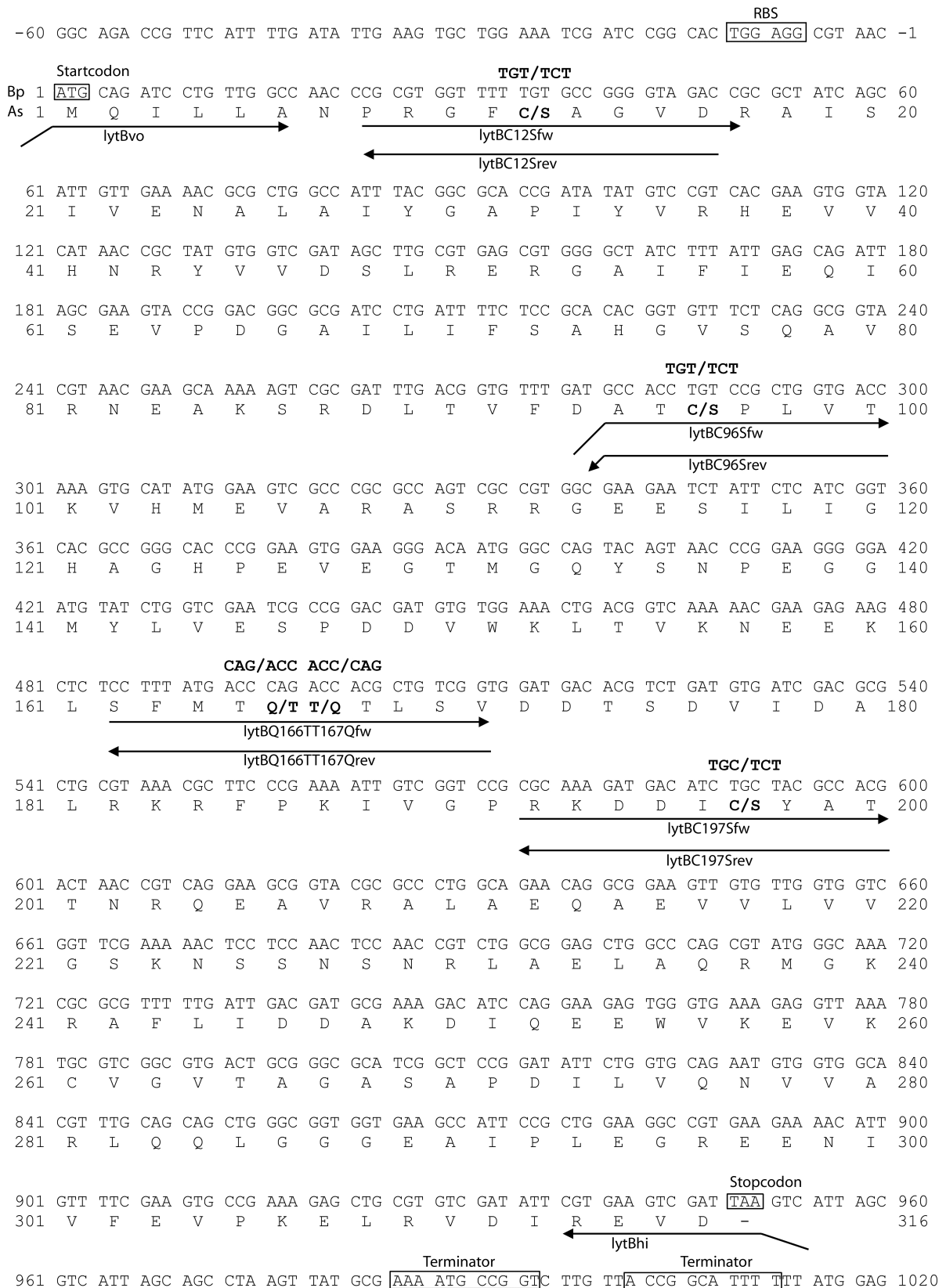


Abbildung 10: Gen-/AS-Sequenz von *ispH*/IspH.

Pfeile markieren Bindestellen für Klonierungs-/Mutagenese-Primer. Originale/ausgetauschte Tripletts bzw. AS sind **fett** dargestellt. RBS: Ribosomale Bindestelle. Terminator: ρ -unabhängiger Terminator

Für die am Anfang dieses Kapitels angeführte Coexpression von *ispH* und dem *isc*-Operon mussten einem Expressionsstamm (*E. coli* XL1-blue) Vektoren (Plasmide), welche die zu exprimierenden Gene enthielten, transformiert werden. Das *isc*-Operon wurde in das Plasmidkonstrukt pACYCiscS-fdx (3.1) kloniert und stand somit zur Transformation zur Verfügung. Das *ispH*-Gen wurde in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden) kloniert. Dieser Vektor enthält ein T5-Promotor/lac-Operon Expressionssystem, eine für His₆-tag, sowie eine für β -Lactamase codierende Basensequenz.

Mit Hilfe einer PCR (2.2.1.10) konnte aus genomischer DNA (2.2.1.5) des Bakterienstamms *E. coli* XL1-blue (Tab. 1) unter Verwendung der Primer *lytBvo* und *lytBhi* (Tab. 3) ein 1003 bp langes DNA-Fragment vervielfältigt werden, welches das *ispH*-Gen enthielt. In Leserichtung (5'-3') vor dem *ispH*-Gen befand sich ein 12 bp langer Überhang und nach dem Gen ein 40 bp langer Überhang (Abb. 10). Diese Überhänge beinhalteten die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI (5'-Überhang) und *Pst*I (3'-Überhang). Das DNA-Fragment und das Plasmid pQE30 (Abb. 11) wurden einem Doppelverdau (2.2.1.7) mit diesen Restriktionsendonukleasen unterzogen, um an den Enden von DNA-Fragment und Plasmid komplementäre Enden zu erhalten.

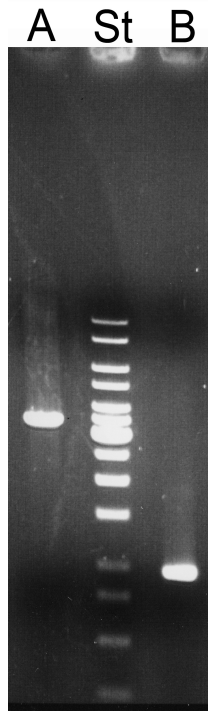


Abbildung 11: Klonierung von *ispH* aus *E. coli*.

Spur A: pQE30 verdaut mit *Bam*HI und *Pst*I. Spur B: *ispH* enthaltendes DNA-Fragment verdaut mit *Bam*HI und *Pst*I. St: DNA-Längenstandard.

Durch die Ligation (2.2.1.8) von Fragment (Insert) und Vektor entstand das 4418 Bp große Plasmid pQE30*ispH*. Ein Aliquot (1µl) des Ligationsansatzes wurde zur Transformation (2.2.1.9) in 40 µl kompetente XL1-blue Zellen (Tab. 5) verwendet. Da nur ein extrem geringer Anteil der Zellen in der Transformation ein Plasmid erhielt und damit gegen Ampicillin resistent wurde, mussten nach einstündiger Regeneration der transformierten Zellen in 1ml SOC-Medium die Transformanten selektioniert werden. Dies geschah wie unter 2.2.1.1 beschrieben durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf ampicillinhaltige Agarplatte und anschließende Inkubation bei 37°C über Nacht. Es wuchsen etwa 100 monoklonale Einzelkolonien an. Von 18 der etwa 100 so erhaltenen Klone XL1-pQE30*ispH* wurde Plasmid-DNA durch Minipräparation (2.2.1.3) isoliert. Im weiteren Verlauf wurde zunächst untersucht, ob in der Ligation Inserts in Vektoren eingefügt wurden, und ob die aus der Ligation resultierenden Plasmide die erwartete Größe aufwiesen. Die Ligationseffizienz konnte durch Größenvergleich der isolierten Plasmide pQE30*ispH*1-18 mit dem ursprünglichem Plasmid pQE30 als Referenz in einer Agarosegelelektrophorese (2.2.3.1) abgeschätzt werden (Abb. 12).

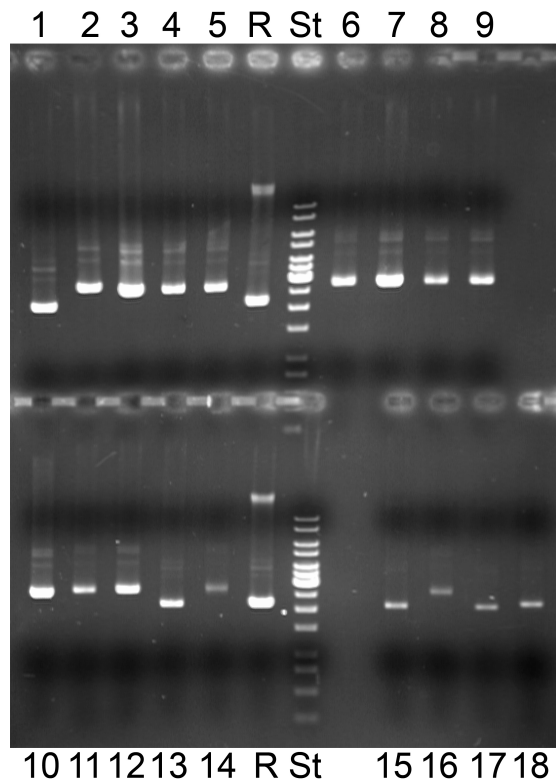


Abbildung 12: Agarosegel der Minipräparation von pQE30ispH1-18.

St: DNA-Längenstandard. R: Referenzplasmid pQE30. 1-18: Minipräparationen pQE30ispH1-18.

13 der 18 überprüften Plasmide zeigten in der Agarose-Gelelektrophorese eine größere DNA-Länge als die eingesetzte Referenz (Abb. 12), was auf den Einbau eines Inserts in der Ligation hindeutet. Somit errechnete sich die Ligationseffizienz zu 72%.

Nun musste die DNA-Sequenz der eingefügten Inserts bestimmt werden. Dies geschah wie unter 2.2.1.10 beschrieben bei GATC Biotech, Konstanz. Durch die Sequenzierung, der wie unter 2.2.1.4 beschrieben isolierten Plasmid-DNA der Konstrukte pQEispH2-12,14,16, war sowohl eine Kontrolle der PCR, wie auch der Ligation möglich. Hierdurch konnte bestätigt werden, dass alle 13 Plasmide Inserts von erwarteter Größe enthielten. Jedoch war nur die Basensequenz des Inserts im Isolat pQE30ispH4 fehlerfrei.

Das im Punkt 3.1 erwähnte *isc*-Operon wurde, abgesehen von dem am 3'-Ende des Gen-Clusters liegenden Regulator-Gen *iscR* und dem am 5'-Ende liegenden Gen *yfhJ*, mittels der Primer *iscSBamHI*vo und *fdxSall*hi (Abb. 13, Tab. 3) in einer PCR

(2.2.1.10) vervielfältigt und in den Vektor pACYC184 kloniert, wobei das bereits auf unter 3.1 erwähnte Plasmidkonstrukt pACYCiscS-fdx (Tab. 2) entstand.

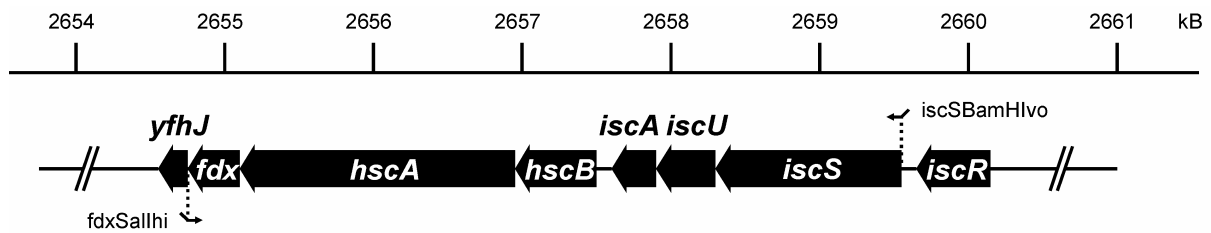


Abbildung 13: Ausschnitt aus dem *E. coli* Chromosom im Bereich des *isc*-Operons.

Dieses Plasmidkonstrukt wurde mit dem oben genannten Expressionsvektor pQE30ispH4 in den Expressionsstamm *E. coli* XL1-blue cotransformiert (2.2.1.9). Auf dem Plasmid pACYC184 (Tab. 2) sind Gene, die für Resistenzen gegen Tetracyclin und Chloramphenicol codieren enthalten. Da das *isc*-Operon in das Tetracyclinresistenz-Gen von pACYC184 kloniert worden war (Gräwert *et al.*, 2004), verfügte das erhaltene Plasmid pACYCiscS-fdx nach wie vor über ein Chloramphenicolresistenz-Gen. Somit waren Transformanten, die sowohl pQE30ispH als auch pACYCiscS-fdx aufgenommen hatten, resistent gegen Ampicillin und Chloramphenicol, und konnten somit auf Resistenz gegen diese beiden Antibiotika selektiert werden. Dazu wurde auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Bei der Cotransformation zweier Plasmide ist die Transformationseffizienz üblicherweise geringer als bei der Transformation eines Plasmids. So wuchsen lediglich 20 Klone XL1-pQE30ispH-pACYCiscS-fdx zu Einzelkolonien heran. Nach 30 h Inkubation waren diese Kolonien noch relativ klein. Das langsame Wachstum wurde auf die Anwesenheit des Plasmids pACYCiscS-fdx mit zwölf Kilobasen (kB) Größe zurückgeführt.

Von den drei größten Einzelkolonien wurden nun Übernacht-Kulturen, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, angeimpft, um zum einen Dauerkulturen herzustellen, sowie zum anderen Expressionstests und Aktivitätstests durchzuführen. Ähnlich wie die Kolonien auf der Agarplatte, wuchsen die Flüssigkulturen sehr langsam an und mussten nicht über eine, sondern über zwei Nächte bei 37°C inkubiert werden. Die Anzuchten für Expressionstests sowie die Expressionstests wurden, wie unter 2.2.1.2 erläutert, ausgeführt. Nach Ultraschallaufschluss (2.2.2.1) und anschließender SDS-

PAGE (2.2.3.2; Abb. 14) ließ sich der Anteil von His₆-IspH-Protein am löslichen Gesamtprotein der XL1-pQE30ispH-pACYCiscS-fdx Klone 1-3 abschätzen.

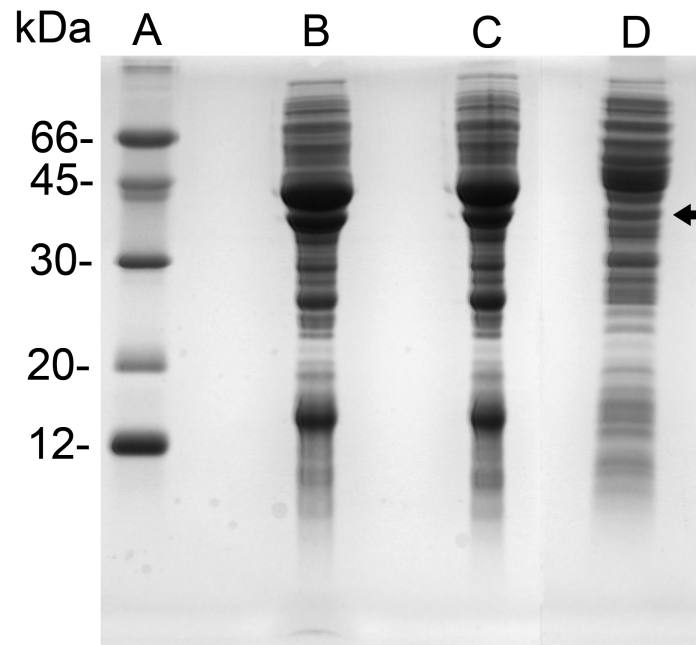


Abbildung 14: Expressionstests mit XL1-pQE30ispH-pACYCiscS-fdx1-3.

Spur A: SDS-Größenstandard. Spur B-D: Rohextrakte der Klone XL1-pQE30ispH-pACYCiscS-fdx1-3. Pfeil: His₆-IspH-Bande.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Rohextrakt von Klon 3 annähernd kein His₆-IspH-Protein enthielt und sich auch in seinem Bandenmuster stark von den nahezu identisch aussehenden Gelspuren der Rohextrakte 1 und 2 unterschied. Aufgrund der beobachteten ähnlichen Expressionsleistung der Klone 1 und 2, konnte noch keine Entscheidung gefällt werden, welcher Klon im Weiteren verwendet werden sollte. Deshalb musste die enzymatische Aktivität der Rohextrakte 1 und 2 wie unter 2.2.2.7 dargestellt ermittelt werden. Da der Rohextrakt des Klons 1 die Umsetzung von **16** in **1** und **2** mit einer spezifischen Aktivität von 24,3 nmol*mg⁻¹*min⁻¹ katalysierte, der Rohextrakt des Klons 2 aber mit einer spezifischen Aktivität von 32,2 nmol*mg⁻¹*min⁻¹, wurde der letztere Klon für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Analog erfolgte die Herstellung der Expressionsstämme XL1-pQE30ispHC12S-pACYCiscS-fdx, XL1-pQE30ispHC96S-pACYCiscS-fdx, XL1-pQE30ispHC197S-pACYCiscS-fdx und XL1-pQE30ispHQ166TT167Q-pACYCiscS-fdx. Diese Stämme

exprimierten mutierte Varianten des *ispH* Gens. Hierfür wurden Mismatch-PCRs angewandt, um DNA-Fragmente mit mutierten *ispH*-Sequenzen zu erhalten. Die Mutationen C12S, C96S und C197S sollten zu einem Austausch von Cystein zu Serin, die Mutation Q166TT167Q zu einem Austausch von Threonin zu Glutamin bzw. umgekehrt führen. Die Zahl gibt die Position in der Aminosäuresequenz des entstandenen Proteins an. Die Mismatch-Primer und die Mutationen in der Aminosäuresequenz sind in Abbildung 10 dargestellt. Der Erfolg der PCR-Mutagenese konnte durch DNA-Sequenzierung der mutierten *ispH* Gene nach Sanger, 1977 bestätigt werden.

3.1.2 Herstellung rekombinanten IspH-Proteins

Wie unter 3.1 erwähnt, handelt es sich bei IspH, also auch bei rekombinantem His₆-IspH-Protein, um ein sauerstoffsensitives Protein, das in seinem aktiven Zentrum einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Bei *E. coli* handelt es sich um ein fakultativ aerobes Bakterium (Schlegel *et al.*, 1992), dessen Zelllumen reduzierende Bedingungen aufweist (Neidhardt *et al.*, 1996). Zur Biosynthese der Isoprenoide **1** und **2** bedient es sich des Mevalonat-unabhängigen Wegs, in dem die letzten beiden Reaktionsschritte von den sauerstoffempfindlichen Enzymen IspG und IspH katalysiert werden (Rohdich *et al.*, 2003). Es war also ohne weiteres möglich, rekombinantes *ispH*-Gen in *E. coli* wie im Punkt 2.2.1.2 beschrieben unter aeroben Bedingungen überzuexprimieren.

Zur Kultivierung von XL1-pQE30ispH-pACYCiscS-fdx (Tab. 1/2) mit dem Ziel der Überexpression von *ispH* wurde Terrific-Broth (TB)-Medium eingesetzt (2.1.3, 2.2.1.2). Nach Takahashi *et al.*, 2002 ist die Ausbeute an Eisen-Schwefel-Clusterhaltigen Proteinen bei der Verwendung von TB-Medium in einer induzierten Anzucht gegenüber der Verwendung von LB-(Luria-Bertani)-Medium (2.1.3) etwa um 50% erhöht. Diese Steigerung der Ausbeute an aktivem IspH-Protein ließ sich durch Zugabe von Eisen-Ammonium-Citrat als Eisenquelle und Cystein als Schwefelquelle ins Medium noch weiter erhöhen. Wie unter 2.2.1.2 beschrieben, wurde die Anzucht nach Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM 5 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Durch diese Maßnahmen wurde das Wachstum der Zellen sowie die Produktion löslichen Zielproteins optimiert. Wie schon die Anzucht erfolgte die

unter 2.2.1.2 erläuterte Zellernte unter aeroben Bedingungen. Das bei der Zellernte erhaltene Pellet bestand aus nassen Zellen, die reine Zellmasse machte ca. 10 % aus, die übrigen 90 % entfielen auf sauerstoffhaltiges TB-Medium. Wegen des folgenden Zellaufschlusses und der damit verbundenen Freisetzung von His₆-IspH-Protein aus dem reduzierenden Milieu des Bakterienlumens, wurden die *E. coli* Zellen mit 250 ml Saline unter anaeroben Bedingungen gewaschen. Dieser Waschvorgang führte zu einer Abtrennung von Sauerstoff und von *E. coli* ins Medium sezernierter Stoffwechselprodukte. Nach dem Waschen wurden etwa 24 g grünbraune Zellen aus 4 l TB-Medium erhalten. Im Gegensatz dazu weisen *E. coli* XL1-blue Zellen (Tab. 1), die kein Gen überexprimieren, eine gelbbraune Färbung auf. Die grünbraune Farbe der erhaltenen Zellen deutete bereits auf die Anwesenheit einer großen Menge an Eisen-Schwefel-Cluster-haltigem Protein hin. Bei der Anzucht der Expressionsstämme XL1-pQE30ispHC12S-pACYCiscS-fdx, XL1-pQE30ispHC96S-pACYCiscS-fdx, XL1-pQE30ispHC197S-pACYCiscS-fdx bzw. XL1-pQE30ispHQ166TT167Q-pACYCiscS-fdx (Tab. 1/2), die mutierte *ispH* Gene exprimieren sollten (3.1.2), wurden nur 3, 3,5 bzw. 5 g Zellen aus 4 l TB-Medium gewonnen. Der Stamm XL1-pQE30ispHQ166TT167Q-pACYCiscS-fdx ließ sich unter den beschriebenen Bedingungen nicht kultivieren (siehe 3.1.8).

3.1.3 Affinitätschromatographische Reinigung von His₆-IspH-Protein

Um Sauerstoffkontakt des Zielproteins zu unterbinden, wurde unter streng anaeroben Bedingungen gearbeitet. Aufgrund der Klonierung von *ispH* aus *E. coli* in das Expressions-Plasmid pQE30 erfolgte die Biosynthese des Zielproteins als rekombinantes His₆-IspH, also als IspH-Protein mit N-terminalem His₆-tag. Das Zielprotein sollte nun über Säulenaффinitätschromatographie mit Ni-Sepharose High-Performance als stationärer Phase hoch angereichert werden (2.2.2.3).

Zunächst wurden dazu aus 24 g Zellen XL1-pQE30ispH-pACYCiscS-fdx (Tab. 1/2), wie unter 2.2.2.2 beschrieben, 250 ml Rohextrakt hergestellt. Mittels Bradford-Assay (2.2.2.4) ließ sich die Proteinkonzentration zu 11,9 mg/ml bestimmen. Der Rohextrakt hatte eine intensive braungrüne Farbe und wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die blaue Nickelsäule (15 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Die Anreicherung

erfolgte wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Unmittelbar nach Beginn der Auftragung war im oberen Bereich der Nickelsäule eine größer werdende braune bis schwarze Bande zu erkennen. Nach der Auftragung des Rohextrakts machte diese Bande gut die Hälfte des Säulenvolumens aus. Sowohl die Farbe des Rohextrakts als auch die an das Säulenmaterial gebundenen Bande wurden auf die Anwesenheit von Zielprotein zurückgeführt. Die während der Auftragung gesammelte Fraktion der nicht an das Säulenmaterial bindenden Proteine (im Weiteren als Durchlauf oder DL bezeichnet) hatte nicht die braungrüne Farbe des Rohextrakts sondern war gelblich gefärbt. Diese Fraktion machte 300 ml bei einer Proteinkonzentration von 9,2 mg/ml aus. Bei der Elution des an die Säule gebundenen Proteins wurden 19 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 10,5 mg/ml erhalten, welche NaCl und Imidazol, Bestandteile der unter 2.1.4 aufgeführten Chromatographiepuffer, enthielt. Gegenüber dem auf die Nickelsäule aufgetragenem Rohextrakt ergab die Reinigung eine elffache Anreicherung des Zielproteins (Tab. 8). Die Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten wird weiter unten ausführlich erläutert.

Tabelle 8: Anreicherung von His₆-IspH über Affinitätschromatographie an Nickel-Sepharose.

Fraktion	Gesamtprotein (mg)	Spez. Aktivität (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Gesamtaktivität (μmol min ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicherungs- faktor
Rohextrakt	2980	62	185	100	1
Ni ²⁺ -chelating Sepharose HP	200	700	140	75	11
Durchlauf	2750	7,3	20	11	-

In der Elutionsfraktion enthaltene Salze wurden durch Dialyse (Körnung des Dialyseschlauchs: 12 kDa) gegen 2 l 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 über Nacht entfernt. Das Dialysat wurde zur Lagerung à 1 ml aliquotiert und in gasdichten Behältnissen bei -80 °C eingefroren.

Mit denaturierender SDS-PAGE (2.2.3.2) konnte die Proteinzusammensetzung von Rohextrakt, Durchlauf und dialysierter Elutionsfraktion in Abhängigkeit der monomeren Proteingrößen visualisiert werden (Abb. 15).

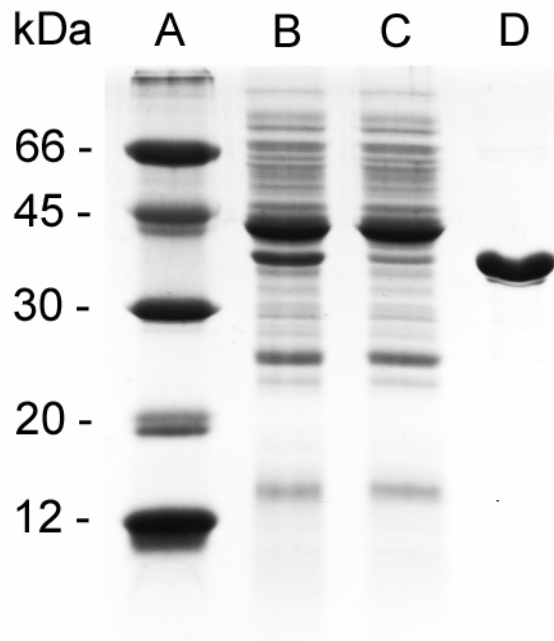


Abbildung 15: SDS-Gel der Anreicherung von His₆-IspH.

Spur A: SDS-Größenstandard. Spur B: Rohextrakt von XL1-pQEIspH-pACYCiscS-fdx. Spur C: Durchlauf. Spur D: hoch angereichertes His₆-IspH.

Das Zielprotein hatte eine errechnete Molmasse von 36,173 kDa und erschien in der SDS-PAGE bei ungefähr 37 kDa. Bei einer Proteinkonzentration von 10,5 mg/ml His₆-IspH betrug die molare Konzentration der Elutionsfraktion 290 µM. Die Reinheit des hoch angereicherten Proteins betrug mindestens 95 %. Da in der Durchlauf fraktion noch Zielprotein zu erkennen war, war die Bindung des Zielproteins an die stationäre Phase nicht vollständig. Auffallend sind die Proteinbanden bei 44, 27 bzw. 14 kDa Größe im Rohextrakt und in der Durchlauf fraktion. Diese Proteinbanden waren auch in den Rohextrakten anderer XL1-blue Stämme (Tab. 1) vorhanden, denen das Plasmidkonstrukt pACYCiscS-fdx (Tab. 2) transformiert worden war. Hierauf wird im folgenden Kapitel 3.1.4 näher eingegangen.

Die mutierten IspH-Proteine C12S, C96S bzw. C197S ließen sich auf die gleiche Weise wie oben beschrieben in Konzentrationen von 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml bzw. 1,1 mg/ml hoch anreichern.

3.1.4 Detektion von Proteinen des *isc*-Operons mittels 2D-Gelelektrophorese

Wie unter 3.1.3 dargelegt, zeigten Rohextrakte von das *isc*-Operon überexprimierenden Bakterienstämmen in SDS-PAGEs generell drei unterschiedlich intensive Proteinbanden bei 44, 27 bzw. 14 kDa. Bei Stämmen, die das *isc*-Operon nicht überexprimierten, waren diese Banden hingegen nicht sichtbar.

Die Proteine des *isc*-Operons, welche mittels pACYCiscS-fdx (Tab. 2) *in vivo* hergestellt wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Molekulargewicht und isoelektrische Punkte auf dem *isc*-Operon codierter Proteine.

Protein	Molekulargewicht [kDa]	Isoelektrischer Punkt
IscS	46	6.04
IscU	14	4.82
IscA	12	4.75
HscB	20	5.05
HscA	65	5.05
Fdx	12	4.50

Da in der SDS-PAGE lediglich eine eindimensionale Trennung der Proteine in Abhängigkeit von der Molmasse erfolgt, liegen die Banden von ähnlich großen Proteinen übereinander und werden als eine Bande wahrgenommen. Um zu überprüfen, ob und welche Gene des *isc*-Operons überexprimiert wurden, wurden deshalb die entsprechenden Rohextrakte aus Zellen, die das *isc*-Operon überexprimierten, einer 2D-Gelelektrophorese unterworfen.

In der unter 2.2.3.3 genau erläuterten 2D-Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung des zu untersuchenden Proteingemischs in zwei Dimensionen: Zunächst ordnen sich die Proteine durch isoelektrische Fokussierung in Abhängigkeit ihres pI-Wertes in der ersten Trennrichtung an. Danach werden sie senkrecht dazu, abhängig von ihrer Molekularmasse, in der zweiten Dimension aufgetrennt.

Neben dem Rohextrakt aus XL1-pQEispH-pACYCiscS-fdx (Tab. 1/2) wurde ein Rohextrakt aus XL1-pACYC184 (Tab. 1/2) als Referenz untersucht (Abb. 16)

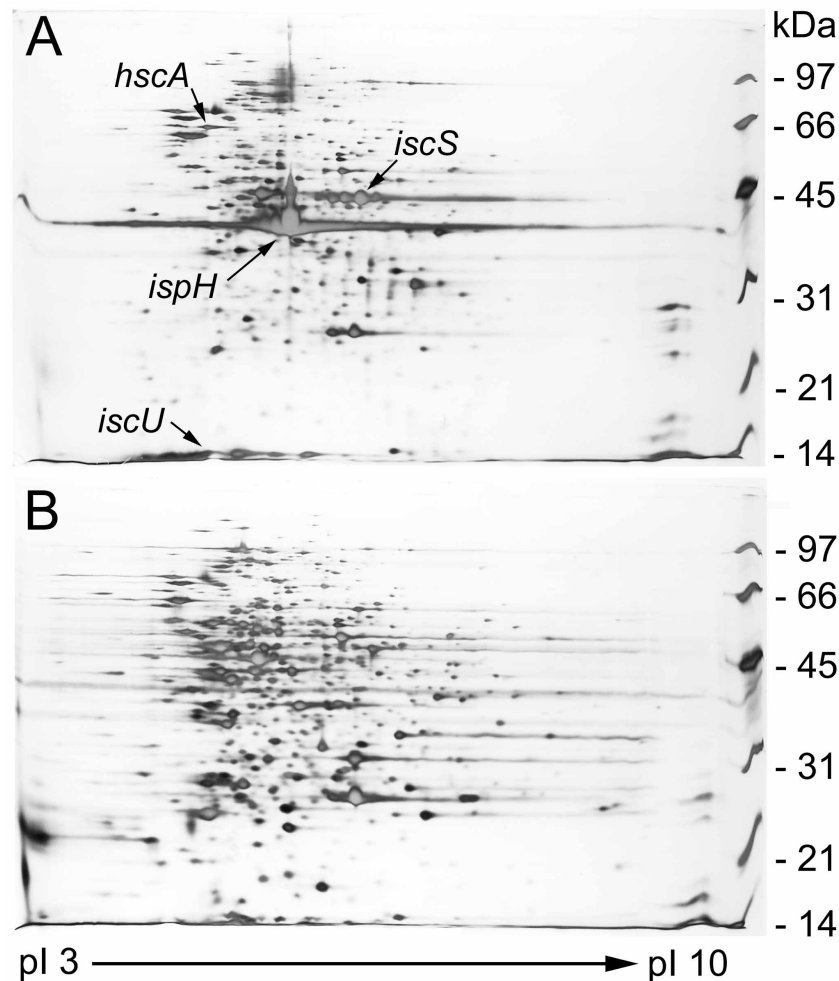


Abbildung 16: 2D-Gele von Rohextrakten aus XL1-pQEispH-pACYCiscS-fdx (A) und XL1-pACYC184 (B).

Durch Vergleich des Gels mit den Proteinen aus XL1-pQEispH-pACYCiscS-fdx (Abb. 16, A) und dem Referenzgel (B) fielen vier zusätzliche Proteinspots auf, die im Referenzgel nicht sichtbar waren und nach Molmasse und isoelektrischem Punkt gut drei Proteinen des *isc*-Operons und dem His₆-IspH-Protein zugeordnet werden konnten (vgl. Tab. 9). Diese konnten durch „spot picking“ und anschließender massenspektrometrischer Analyse (2.2.3.3) als IscS, IscU, hscA und His₆-IspH identifiziert werden. Im Vergleich zum Referenzstamm waren die für diese Proteine codierenden Gene somit deutlich überexprimiert.

Nachdem das zur Überexpression von *ispH* dienende Plasmid (Tab. 2) mit dem *isc*-Operon cotransformiert worden war, konnten die betreffenden Zellen His₆-IspH

löslich in für umfangreiche *in vitro*-Untersuchungen benötigter Quantität herstellen. Dies lag mit hoher Wahrscheinlichkeit an dem korrekten Zusammenbau des Eisen-Schwefel-Zentrums, der offensichtlich zu richtiger Faltung des Zielproteins führte. Natürlich befindet sich das *isc*-Operon auch auf dem Chromosom des verwendeten *E. coli*-Expressionsstamms (Tab. 1). Um jedoch das aktive Zentrum des durch die Überexpression von *ispH* entstehenden Proteins richtig zusammen zu bauen, musste auch das *isc*-Operon überexprimiert werden, da die Kapazität der auf dem *isc*-Operon codierten Proteine durch die große Menge an His₆-IspH-Protein überstiegen wurde.

An dieser Stelle muss die Rolle der im Gen *iscS* kodierten Desulfurase hervorgehoben werden. Diese katalysiert die Freisetzung von Schwefel aus Cystein, wobei Alanin und IscS-gebundenes Persulfid entstehen (Tokumoto *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass es sich bei Persulfid um die für folgende Schritte aktivierte Form von Schwefel handelt. Dieser wird von den Proteinen IscU und IscA bei gleichzeitiger Synthese eines Eisen-Schwefel-Clusters auf das damit zu komplettierende Apoprotein übertragen.

Nun lässt sich auch die unter 3.1 erwähnte lösliche Biosynthese aktiven MBP-IspHs erklären: Wegen des großen MBP-Anhangs musste je Proteinmonomer weniger Eisen-Schwefel-Zentrum synthetisiert werden. Dies konnte zumindest zu einem gewissen Grad von den sowieso auf dem Chromosom kodierten Proteinen für Zusammenbau von Eisen-Schwefel-Clustern geleistet werden. Des Weiteren ist Folgendes denkbar: Bei der Herstellung von MBP-IspH wurde zunächst das Maltosebindeprotein synthetisiert und faltete sich ordnungsgemäß. Die Anwesenheit von MBP könnte bei der nun folgenden Expression von *ispH* die korrekte Faltung des entstehenden His₆-IspH unabhängig vom ausreichenden Vorhandensein richtig zusammengebauter Eisen-Schwefel-Zentren positiv beeinflusst haben.

3.1.5 UV-Vis-spektroskopische Untersuchung des IspH-Proteins

Schon bei der Zellernte des *E. coli*-Stammes, der *ispH* und das *isc*-Operon überexprimierte, fiel auf, dass die Zellen einen grünen Farbstich hatten. Dies deutete auf die Anwesenheit eines grünen Proteins hin. Bei der Hochanreicherung über

Nickel-Affinitätschromatographie wurden intensiv grünbraun gefärbte Hauptfraktionen erhalten (3.1.3). Wie auf dem SDS-Gel (Abb. 15) zu erkennen ist, bestanden die Peakfraktionen zu ca. 99 % aus Zielprotein und wiesen somit eine sehr hohe Reinheit auf. Folglich konnte man ausschließen, dass die grünbraune Färbung, welche nach verschiedenen Literaturstellen (Rohdich *et al.*, 2003; Wolff *et al.*, 2003) für Eisen-Schwefel-Proteine charakteristisch ist, durch verunreinigende Proteine zustande kam.

Um die Existenz eines Eisen-Schwefel-Clusters zu bestätigen, wurden mit hoch angereicherten His₆-IspH-Proben zum einen chemische Eisenbestimmung (2.2.2.6) durchgeführt, zum anderen UV-Vis-Spektren aufgenommen (2.2.2.5). Eine im UV-Vis-Spektrum erhöhte Absorption im Bereich von 400 nm deutet auf die Gegenwart eines Eisen-Schwefel-Clusters hin (Ollagnier *et al.*, 1999). Die Quantifizierung der Eisenmenge pro Monomer gibt zudem einen Hinweis auf die Stöchiometrie des möglichen Eisen-Schwefel-Zentrums.

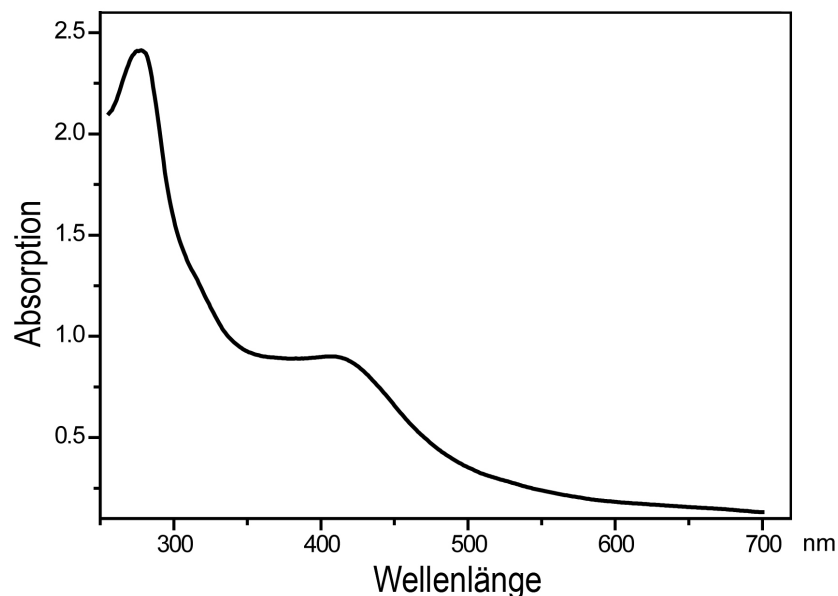


Abbildung 9: UV-Vis-Spektrum des His₆-IspH-Proteins.

Das UV-Vis-Spektrum des His₆-IspH-Proteins zeigte eine Schulter bei 320 nm und ein lokales Maximum bei 410 nm mit einer Absorption von etwa 0,9. Aus der eingesetzten Proteinkonzentration von 2,8 mg/ml (76 μ M an Monomer) errechnete sich hieraus unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen-Gesetzes ein molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{410} von $11800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Das Verhältnis der Absorption bei 410

nm zur Absorption bei 280 nm (E_{410}/E_{280}) errechnete sich zu 0,38. Diese Werte stimmen mit den entsprechenden Werten bekannter Eisen-Schwefel-Proteine überein (Ollagnier *et al.*, 1999).

Der Eisengehalt des His₆-IspH-Proteins wurde nach Brumby und Massey (2.2.2.6) bestimmt. Die hoch angereicherte His₆-IspH-Probe enthielt demnach rechnerisch 2,6 Eisenatome je Proteinuntereinheit. Der Eisengehalt der mutierten His₆-IspH-Proteine lag dagegen deutlich niedriger zwischen 0,6 und 1,4 Eisenatomen je Monomer (Tabelle 11, 3.1.7.3).

3.1.6 ESR-Spektroskopische Untersuchung des IspH-Proteins

Am Institut für Experimental Physik der FU Berlin wurden X-Band ESR-spektroskopische Untersuchungen mit His₆-IspH-Protein durchgeführt. Die Proteinprobe (150 µl, 10,5 mg/ml) ergab bei 5,5 K ein gepulstes ESR-Signal (Signalamplitude χ'' als Funktion des Magnetfelds B_0), dessen Scheitelpunkt etwa bei 345 mT mit einer Breite von etwa 10 mT (Abb. 17, Spur A). Außer eines vom ESR-Resonator herrührenden Hintergrundsignals, welches für weitergehende Spektrenanalysen subtrahiert wurde, konnten innerhalb der aufgenommenen Bandbreite von 280 bis 400 mT keine weiteren ESR-Signale beobachtet werden. Um einen Vergleich mit publizierten ESR-Spektren von proteingebundenen Eisen-Schwefel-Clustern zu ermöglichen, wurde die erste Ableitung von Spur A (Signalamplitude $d\chi''/dB_0$ als Funktion des Magnetfelds B_0) in Abbildung 17 integriert (Spur B).

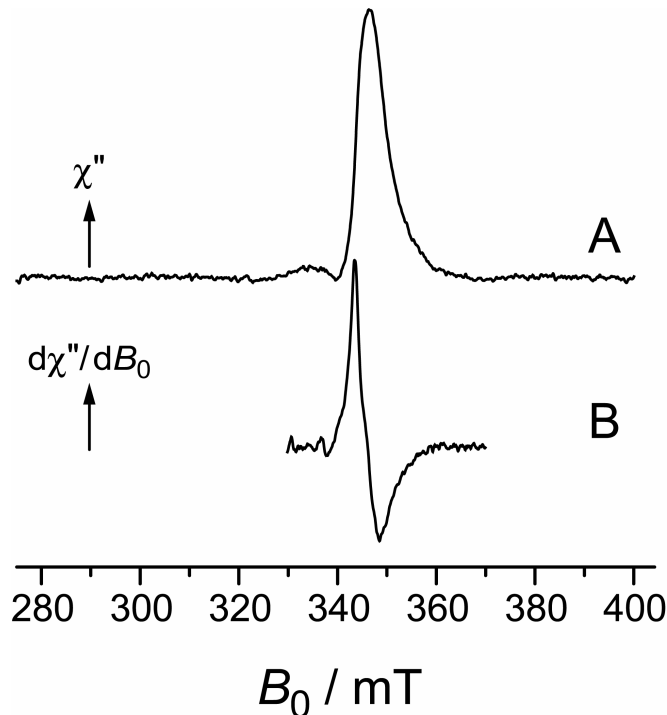


Abbildung 17: ESR-Spektrum des His₆-IspH-Proteins.

Das Spektrum hatte einen X-Achsenmittelpunkt bei 346,1 mT und war im Verhältnis zu einer anisotropischen g -Matrix deutlich asymmetrisch. Es bestand aus einem schmalen Maximum bei 343,5 mT und einem breiteren Maximum bei 348,6 mT. Die in einer least-squares Näherung erhaltenen g -Hauptwerte zeigen Achsensymmetrie der g -Matrix: $g_{\parallel} = 2,032(3)$, $g_{\perp} = 2,003(3)$. Diese Werte weisen einen [3Fe-4S]⁺-Cluster aus.

In der chemischen Eisenbestimmung (2.2.2.6) wurden 2,6 nmol Eisen je nmol Proteinmonomer gefunden. Der im ESR-Spektrum (Abb. 17) identifizierte [3Fe-4S]⁺-Cluster würde jedoch 3 nmol Eisen je nmol Proteinmonomer bedingen. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass lediglich 87 % (2,6/3) des His₆-IspH-Proteins trotz Überexpression des *isc*-Operons einen Fe-S-Cluster erhielten, und die restlichen 13 % als Apoprotein verblieben.

Es gibt allerdings Fe-S-Cluster, die aufgrund ihres Elektronenspins von $S=0$ mittels ESR-Spektroskopie nicht detektiert werden können. Wie aus Abbildung 18 zu ersehen ist, handelt es sich dabei um den [2Fe-2S]²⁺- und den [4Fe-4S]²⁺-Cluster.

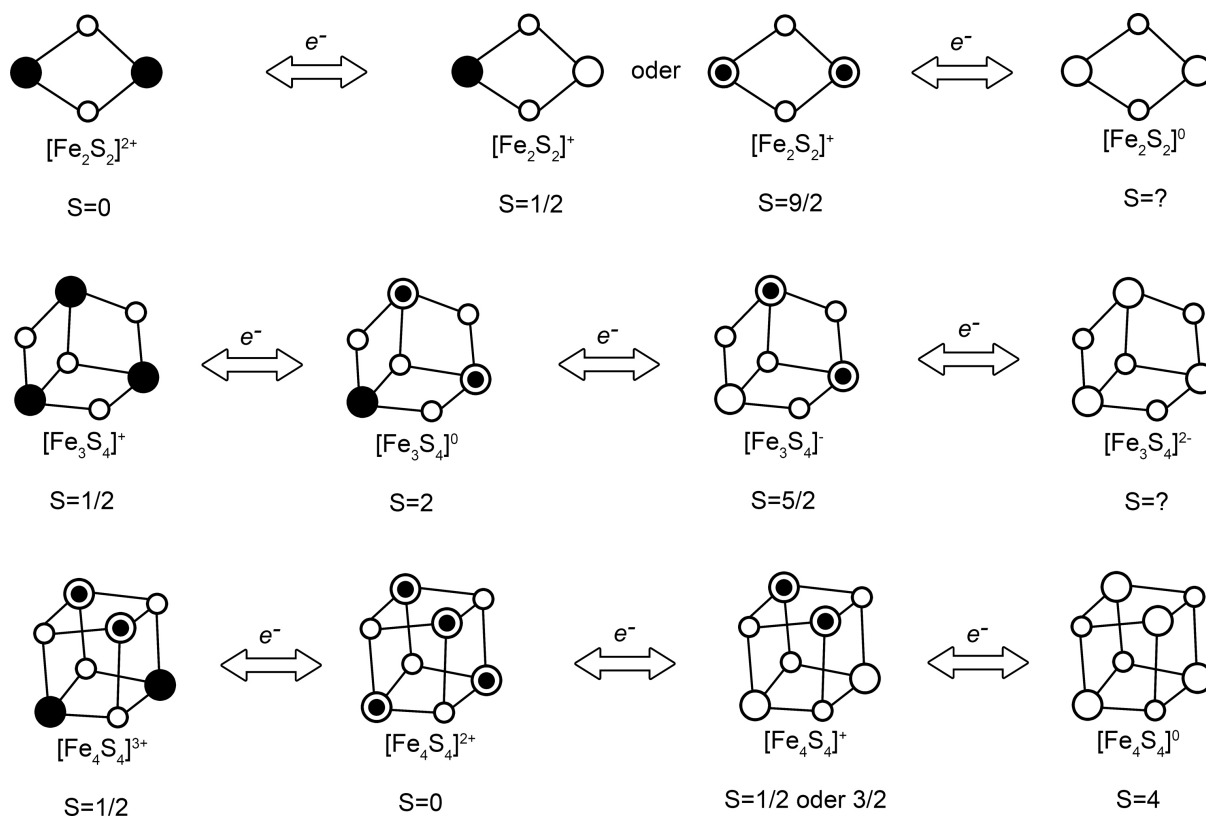


Abbildung 18: Geometrien und Ladungen verschiedener Fe-S-Cluster.

kleine Kreise: S^{2-} . große leere Kreise: Fe^{2+} . große halbvolle Kreise: $\text{Fe}^{2.5+}$. große volle Kreise: Fe^{3+} . S: Spinzustand der über einen Cluster delokalisierten Elektronen (nach Johnson, 1998).

Es ist also denkbar, dass sich in der spektroskopierten Proteinlösung IspH-Proteine mit $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Cluster und IspH-Proteine mit $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster befanden. Auch ist es rechnerisch möglich, mit einer Mischung von $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster- und $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Cluster-haltigem IspH-Protein sowie Apoprotein auf die gemessenen 2,6 nmol Eisen je nmol Proteinmonomer zu kommen. Zwar können diese Möglichkeiten durch ESR-Spektroskopie nicht ausgeschlossen werden, sie sind aber sehr unwahrscheinlich. In IspH-Proteinen aus über 500 Mikroorganismen sind genau drei Cysteinreste konserviert (vgl. 3.1). Zur Koordination eines $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Clusters werden genau drei Cysteine benötigt, zur Koordination von $[\text{2Fe-2S}]$ - und $[\text{4Fe-4S}]$ -Clustern aber vier (Kiley *et al.*, 2003).

3.1.7 *In vitro*-Assays zur biochemischen Charakterisierung von IspH

Wie eingangs (3.1) erwähnt, handelt es sich bei der IspH-Katalyse um eine Redox-Reaktion. Dabei wird das Substrat der Reaktion, 1-Hydroxy-2-methyl-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP, **16**) gleichzeitig zu Isopentenylpyrophosphat (IPP, **1**) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, **2**) reduziert (Abb. 19). Die Produkte **1** und **2** dieser Reaktion stehen etwa im Verhältnis 6:1 zueinander (Tab. 15).

Die Elektronen des Reduktionsmittels NADPH können nicht unmittelbar über IspH auf **16** übertragen werden. Vielmehr ist die Gegenwart der Elektronencarrier Flavodoxin (FldA) und Flavodoxin-NADPH-Reduktase (Fpr) nötig, um den in Abbildung 24, 3.1.7.7 dargestellten Elektronenfluss zu gewährleisten.

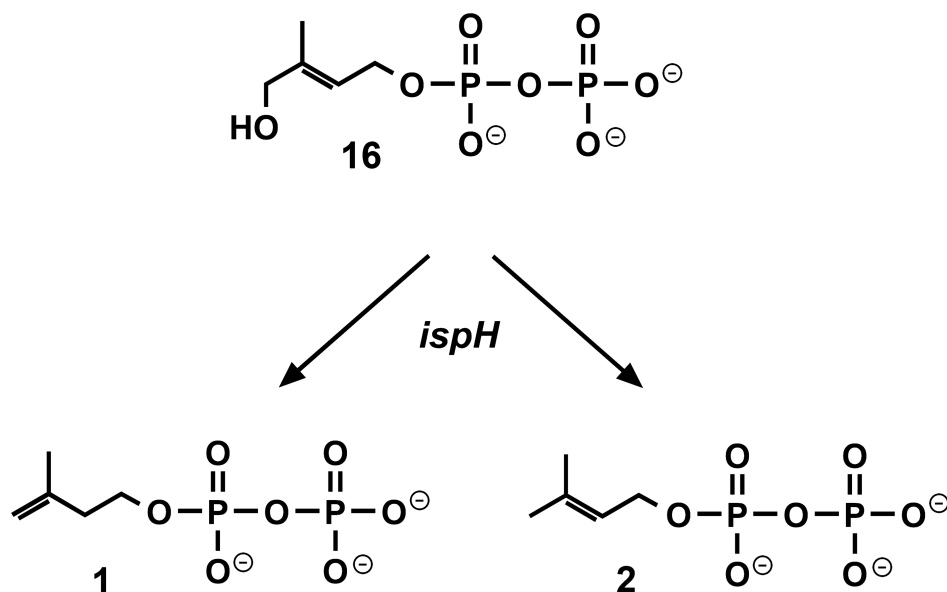


Abbildung 19: Die IspH-Reaktion.

3.1.7.1 HPLC-gestützter IspH-Assay

Der HPLC-gestützte IspH-Assay (im Weiteren als HPLC-Assay bezeichnet) wurde als Schnelltest (beispielsweise zur Überprüfung einer Protein-Reinigung) etabliert. Er

bietet die Möglichkeit, in relativ kurzer Zeit die Auswirkung z.B. von niedermolekularen Substanzen auf die Aktivität von His₆-IspH zu untersuchen. Der HPLC-Assay wurde wie unter 2.2.2.7 beschrieben durchgeführt. Die Auswertung des Assays beruht auf der lichtabhängigen Detektion des eingesetzten radioaktiven Substrats [³H]**16** und der entstandenen radioaktiven Produkte [³H]**1** und [³H]**2**. Abbildung 20 zeigt Chromatogramme mit A 0% und B 70% Umsatz von **16** zu **1** und **2**. Aus B ließ sich die spezifische Aktivität von His₆-IspH zu 700 nmol*mg⁻¹*min⁻¹ berechnen.

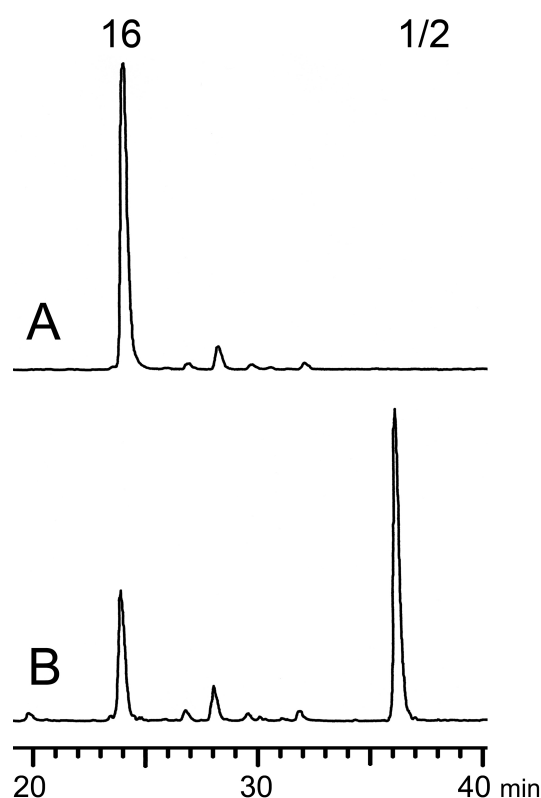


Abbildung 20: HPLC-Chromatogramme. A: 0 % Umsatz. B: 70 % Umsatz.

Über die verwendete Luna C5 Chromatographiesäule (Phenomenex, Aschaffenburg) war eine saubere Trennung von Substrat und Produkten (Abb. 20) möglich. Allerdings eluierten das enzymatisch gebildete **1** und das in weitaus geringerem Umfang gebildete **2** (Tab. 15) mit gleicher Retentionszeit. **16** eluierte nach 24 min, **1** und **2** gemeinsam nach 36 min.

Der HPLC-Assay ließ sich in relativ kurzer Zeit durchführen und auswerten. Er wurde unter Verwendung radioaktiven Substrats (2.1.8) durchgeführt. Aufgrund der hohen

Sensitivität bei der Detektion radioaktiven Materials war es möglich, entstandene Produkte auch noch in sehr geringen Konzentrationen nachzuweisen. Deswegen ließen sich die niedrigen Aktivitäten der IspH-Mutanten-Proteine (vgl. 3.1.7.5) nur im HPLC-Assay nachweisen. Im Photometer-bzw. NMR-Assay (vgl. 3.1.7.6 bzw. 3.1.7.7) wären deren Aktivitäten nicht messbar gewesen.

3.1.7.2 Optimierung des Elektronenflusses bei der IspH-Reaktion

Mit dem HPLC-Assay konnte die jeweils optimale Konzentration der physiologischen Elektronencarrier Flavodoxin (FldA) und Flavodoxin-reduktase (Fpr) ermittelt werden. Sie wurden standardmäßig zur Elektronenübertragung von NADPH auf His₆-IspH/HMBPP verwendet. Die für diese beiden Proteine codierenden Gene stammten aus *E. coli* und wurden auch in selbigem Modellorganismus überexprimiert. Um von jeweils beiden Proteinen die optimale Konzentration im unter 2.2.2.7 beschriebenen HPLC-Assay zu ermitteln, wurden die eingesetzten Mengen der Elektronencarrier FldA und Fpr variiert (FldA: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 240 und 280 µg; Fpr: 0, 4, 8, 16, 24, 32, 48 und 60 µg). Die erhaltenen Titrationskurven sind in Abbildung 21 A für Fpr und in Abbildung 21 B für FldA dargestellt.

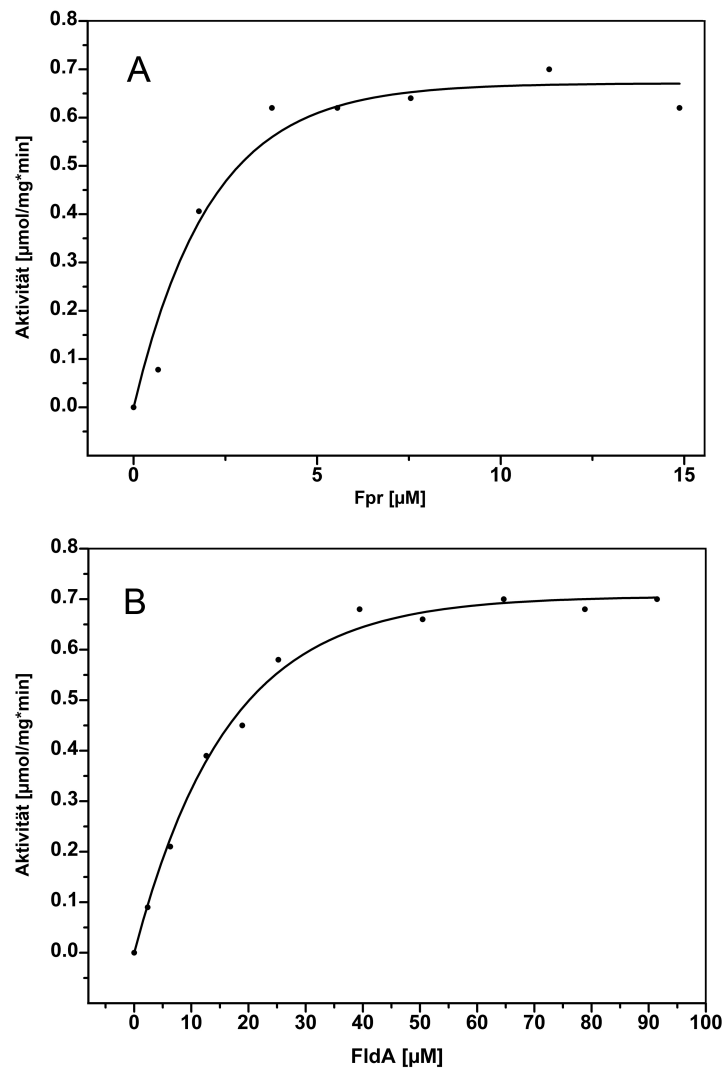


Abbildung 21: Titrationsexperimente mit Elektronen-shuttlen.

Diagramm A: Titration von Fpr. Diagramm B: Titration von FldA.

Die für maximalen Elektronenfluss optimale Konzentrationen an Fpr und FldA wurden zu 12 μM bzw. 40 μM bestimmt und kamen auch in den unter 2.2.2.8 bzw. 2.2.2.9 beschriebenen NMR- bzw. photometrischen IspH-Assays zum Einsatz.

Ferner wurde untersucht, ob Ferredoxin (Fdx) aus Spinat anstelle von FldA aus *E. coli* und ebenso Ferredoxin-Reduktase (Fpr) aus Spinat anstelle von Fpr aus *E. coli* verwendet werden kann (Tab. 10).

Des Weiteren erfolgte die Überprüfung der spezifischen IspH-Aktivität unter Verwendung von NADH als Reduktionsmittel und in Anwesenheit von Natriumfluorid (NaF). Der Einfluss verschiedener Elektronencarrier, des alternativen Cosubstrats NADH und von NaF auf die Aktivität von His₆-IspH-Protein ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Einfluss verschiedener Elektronencarrier / Cosubstrate / Supplemente auf die IspH-Reaktion.

Elektronencarrier / Cosubstrat / Supplement								Relative Aktivität (%)
IspH	FldA ^a	Fdx ^b	Fpr ^c	Fpr ^d	NADPH	NADH	NaF	
+	+	-	+	-	+	-	+	100
+	+	-	+	-	-	+	+	70
+	+	-	-	+	+	-	+	75
+	-	+	+	-	+	-	+	4,4
+	-	+	-	+	+	-	+	4,5
+	+	-	+	-	+	-	-	55
+	+	-	-	-	+	-	+	<0,0015
+	-	-	+	-	+	-	+	<0,0015

Detektionsgrenze: 0,0015 % rel. Aktivität

^a40 µM rekombinantes Flavodoxin aus *E. coli*

^b4 µM Ferredoxin aus Spinat

^c12 µM rekombinante Flavodoxin-Reduktase aus *E. coli*

^d0,8 µM Ferredoxin-Reduktase aus Spinat

Im Vergleich zum unter 2.2.2.7 aufgeführten Standard-HPLC-Assay mit FldA und Fpr aus *E. coli*, sowie mit NADPH als Reduktionsmittel und in Gegenwart von NaF führten Änderungen am Reaktionsansatz durchweg zu einer Abnahme der spezifischen IspH-Aktivität:

Aus obiger Tabelle ist zu ersehen, dass His₆-IspH unter Verwendung des Cosubstrats NADH 70 % der Aktivität im Vergleich zu NADPH hatte. Das Fehlen von NaF im Reaktionsansatz erniedrigte die Aktivität von IspH um nahezu 50%. Des Weiteren wurde erwiesen, dass Elektronencarrier aus artfremden Spezies, beispielsweise Spinat ebenso für die IspH-Reaktion eingesetzt werden konnten. Der Austausch des Elektronencarriers FldA aus *E. coli* gegen Fdx aus Spinat führte im Vergleich der jeweils entsprechenden Konzentrationen nur zu einer geringen Aktivitätsabnahme. Fpr aus Spinat führte in 15-fach niedrigerer Konzentration als Fpr aus *E. coli* immer noch zu 75 % der Aktivität unter Standardbedingungen.

Im Gegensatz zu vielen enzymkatalysierten Reaktionen funktioniert die IspH-Reaktion sowohl mit NADPH als auch mit NADH als Reduktionsmittel (Berg *et al.*,

2002). Das ist insofern nicht verwunderlich, als dass IspH die zur Reduktion von **16** zu **1** und **2** erforderlichen Elektronen nicht direkt vom Reduktionsmittel sondern über die Elektronencarrier erhält (Abbildung 24, 3.1.7.7). Diese funktionieren mit beiden Elektronendonoren, wenngleich mit NADPH als Cosubstrat um das Doppelte höhere spezifische Aktivitäten erreicht werden konnten (Tab. 10). Ohne die Zugabe von Fpr sowie FldA konnte IspH die Reduktion von **16** zu **1** und **2** nicht katalysieren. Auch die Gegenwart von einem der beiden Elektronencarrier allein reichte nicht aus, um Elektronen auf das Substrat zu übertragen (Tab. 10).

Erwähnenswert scheint auch die aktivitätssteigernde Auswirkung von Natriumfluorid auf IspH, da diese etwa 180 % gegenüber einer Referenz beträgt (Tab. 10). Da die Zugabe von Natriumchlorid in gleicher Konzentration keinen Effekt zeigte, kann angenommen werden, dass Natrium für die IspH-Reaktion keine Rolle spielt. Ursprünglich wurde NaF als Phosphatase-Inhibitor eingesetzt (Adam *et al.*, 2002), was früher bei der Verwendung von IspH-haltigen Zellextrakten nötig war, da diese eben auch Phosphatasen enthielten. Diese hätten **16** wie auch **1** und **2** zu einem gewissen Grad dephosphoryliert. Als His₆-IspH später hochangereichert vorlag, wurde NaF zunächst quasi versehentlich, danach wissentlich als Bestandteil des Assays beibehalten.

3.1.7.3 pH-Wert- und Metallionen-Abhängigkeit des IspH-Proteins

Das His₆-IspH-Protein wurde bei pH-Werten von 6,5-10 in 0,5er Schritten auf sein pH-Wert-Optimum hin untersucht. Dazu fand der unter 2.2.2.7 aufgeführte Reaktionsansatz Verwendung, lediglich der verwendete Tris-Puffer wurde auf den zu überprüfenden pH-Wert eingestellt. Das pH-Wert-Optimum der IspH-Reaktion lag bei 8,0.

Dieser ermittelte optimale pH-Wert im schwach basischen Bereich stellte insofern keine Überraschung dar, als dass einige IspH vorgeschaltete Enzyme ein ähnliches pH-Optimum aufweisen (Lüttgen *et al.*, 2000, Zepeck *et al.*, 2005).

Mit den soweit optimierten Assay-Bedingungen (3.1.7.2) wurde im Weiteren der Effekt von zweiwertigen Metallionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht. Hierzu wurden die Metallionen Ca²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ und Zn²⁺ in einer Endkonzentration von 10 µM dem Reaktionsansatz zugegeben und die

enzymatische Aktivität von His₆-IspH-Protein wie unter 2.2.2.7 beschrieben ermittelt. Die Auswertung dieser Assays erfolgte gegen eine Referenz ohne Metallionen.

Tabelle 11: Einfluß von Metallionen auf His₆-IspH-Protein.

Metallion (10 µM)	Relative Aktivität (%)
kein	100
Ca ²⁺	90
Mg ²⁺	80
Ni ²⁺	52
Mn ²⁺	41
Co ²⁺	32
Fe ²⁺	15
Zn ²⁺	<0,0015
Zn ²⁺ (1:10)	25

Detektionsgrenze: 0,0015 % rel.Aktivität

Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, führte die Zugabe zweiwertiger Metallionen durchweg zur Abnahme der Enzymaktivität. Ca²⁺- und Mg²⁺-ionen wirkten sich nur wenig störend aus, zweiwertiges Eisen dagegen brachte die Reaktion fast völlig zum Erliegen.

Besonders drastisch fiel die Abnahme der spezifischen Aktivität mit Zn²⁺-Ionen aus. Bei einer Zn²⁺-Konzentration von 10 µM war eine nahezu (Detektionsgrenze) komplette Inhibierung zu beobachten, bei 1 µM Konzentration lediglich ein Umsatz von 25 % gegenüber der Referenz ohne Metallionen. Zwar kann man von einer gewissen Inhibierung der Reaktion sprechen, doch musste der Hemmstoff im Bezug auf die Michaelis-Menten-Konstante von 30 µM (3.1.7.7) in relativ hoher Konzentration eingesetzt werden und bewirkte selbst dann keine vollständige Inhibierung der Enzymreaktion. Sollte Zink einen ähnlichen Effekt auf IspH aus *Arabidopsis thaliana* oder aus *Plasmodium falciparum* haben, wäre bei einer Verwendung als Herbizid oder Antibiotikum mit rascher Resistenzbildung zu rechnen.

3.1.7.4 Vergleich verschiedener IspH-Assays

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene His₆-IspH-Protein zeigte nicht nur unter Verwendung der natürlichen Elektronencarrier FldA und Fpr enzymatische Aktivität, auch der künstliche Elektronencarrier 10-Methyl-5-desaza-isoalloxazin (Desazaflavin, DAF) konnte in Gegenwart von Dithiothreitol und Starklicht im unter 2.2.2.7 dargestellten Reaktionsansatz Elektronen auf His₆-IspH-Protein/HMBPP übertragen und somit zur Aktivität von IspH-Protein beitragen. Unter diesen Bedingungen war His₆-IspH-Protein etwa fünfmal aktiver als mit NADPH/Fpr/FldA.

Nach Jomaa (Altincicek *et al.*, 2002) war es ferner möglich, bei IspH-Protein aus dem thermophilen Organismus *A. aeolicus* mit dem Reduktionsmittel Dithionit enzymatische Aktivität nachzuweisen.

Außerdem wurde His₆-IspH-Protein vor Aktivitätstests mit dem FldA/Fpr-System nach 2.2.2.7 vorbehandelt. Dies geschah zum einen mit Desazaflavin und Starklicht, zum anderen mit Dithionit, um zu klären, ob His₆-IspH-Protein auf die eine oder andere Weise vor Beginn des Assays im Hinblick auf eine Aktivitätssteigerung reduziert werden kann.

In Tabelle 12 sind enzymatische Aktivitäten verschiedener IspH-Präparationen bei unterschiedlichen Bedingungen sowie deren Eisengehalt und E₄₁₀/E₂₈₀-Verhältnis aufgeführt.

Tabelle 12: Aktivität, Eisengehalt und E₄₁₀/E₂₈₀-Verhältnis verschiedener IspH-Präparationen.

Rekombinantes Enzym	Spezifische Aktivität (nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹)			Eisen je Monomer (nmol/nmol)	E ₄₁₀ /E ₂₈₀
	Fpr/FldA ^a	DAF ^b	DT ^c		
MBP-IspH ^d	3	400	n.d.	0,3	0,12
His ₆ -IspH Rohmer ^e	2	11	n.d.	0,8	0,14
His ₆ -IspH Rohmer rekon. ^f	44	30	n.d.	5,0	0,53
His ₆ -IspH Bacher ^g	700	3400	<0,01 37 °C	2,6	0,38
His ₆ -IspH Bacher photo. ^h	<0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
His ₆ -IspH Bacher Dithio. ⁱ	<0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
His ₆ -IspH Jomaa ^j	n.d.	n.d.	6600 60 °C	n.d.	n.d.

Detektionsgrenze: 0,01 nmol*min⁻¹*mg⁻¹

^aMit Flavodoxin (FldA) und Flavodoxinreduktase (Fpr) als Elektronendonoren

^bMit photoreduziertem Desazaflavin (DAF) als Elektronendonor

^cMit Dithionit (DT) als Elektronendonor

^daerob gereinigt; Molekulargewicht 77,715 kDa (Adam *et al.*, 2002)

^eaerob gereinigt; Molekulargewicht 36,591 kDa (Wolff *et al.*, 2003)

^faerob rekonstituiert mit Na₂S, FeCl₃ und Dithiothreitol (Wolff *et al.*, 2003)

^ganaerob gereinigt; Molekulargewicht 36,173 kDa

^hanaerob mit photoreduziertem Desazaflavin

ⁱanaerob mit Dithionit vorinkubiert

^jIspH aus *A. aeolicus*, anaerob gereinigt (Altincicek *et al.*, 2002)

Die höchste enzymatische Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe von Jomaa mit IspH-Protein aus *A. aeolicus* und dem Elektronendonor Dithionit erreicht (Altincicek *et al.*, 2002). Das orthologe Enzym aus *E. coli* zeigte unter den gleichen Assaybedingungen (lediglich die Temperatur wurde auf 37 °C geändert) keine Aktivität. Ebenso war photoreduziertes bzw. mit Dithionit vorinkubiertes His₆-IspH-Protein aus *E. coli* im Assay mit den natürlichen Elektronencarriern FldA und Fpr nicht aktiv.

Das in der Arbeitsgruppe von Rohmer aerob gereinigte und anschließend mit Natriumsulfid und Eisen-III-Chlorid rekonstituierte Enzym (Wolff *et al.*, 2003) enthielt knapp doppelt so viel Eisen je Monomer wie das Protein aus der vorliegenden Arbeit,

war aber um den Faktor 20 (NADPH/Fpr/FldA) bzw. 100 (DAF) weniger aktiv als das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Protein.

Im direkten Vergleich des physiologischen (FldA/Fpr als Elektronenshuttles) mit dem artifiziellen (Bestrahlung, Desazaflavin als Elektronendonator) Assay fällt auf, dass IspH in letzterem eine etwa fünffach höhere Aktivität zeigt. Es konnte gezeigt werden, dass dies nicht an einer Aktivierung des IspH-Enzyms an sich liegen konnte. Mit Desazaflavin allein bestrahltes Enzym wies keine Aktivität auf.

Ebenso führte eine vor dem Assay durchgeführte Reduzierung des IspH-Proteins durch Inkubation mit Dithionit zu einem Totalverlust der enzymatischen Aktivität.

Die verschiedenen IspH-Assays mit NADPH als Cosubstrat wurden nicht von ungefähr durch NADPH-Zugabe statt durch Zugabe des eigentlichen Substrats **16** gestartet. In der im letzteren Fall entstandenen Mischung ohne **16** waren die gelben bis orangen Hilfsproteine Fpr bzw. FldA nicht stabil und fielen aus. Eventuell fiel auch IspH aus. Dieses wurde jedoch in geringeren Mengen als die Hilfsproteine eingesetzt, so dass in erster Linie gelb-oranges Präzipitat zu sehen war. Dazu wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Durch das Cosubstrat und Reduktionsmittel NADPH wird ein „Elektronendruck“ aufgebaut, der mangels Substrat nicht über Fpr, FldA und IspH auf **16** übertragen werden konnte und zu Instabilitäten der beteiligten Enzyme führte. Diese Hypothese wird durch den Befund untermauert, dass es nicht möglich war, IspH entweder durch Bestrahlung zusammen mit Desazaflavin oder durch Inkubation mit Dithionit in eine reduzierte, aktive Form zu überführen. Die Konsequenz aus diesen Überlegungen wäre, dass es von IspH nicht wie bei anderen Proteinen eine stabile oxidierte und eine stabile reduzierte Form gibt, sondern dass die Reduktion von **16** durch schnelle Elektronenübertragung erreicht wird.

Interessant bleibt die Frage, warum IspH aus *E. coli* im Gegensatz zum orthologen Enzym aus *A. aeolicus* (einem mesophilen Organismus) nicht allein in Gegenwart von Dithionit und Substrat (Altincicek *et al.*, 2002) enzymatische Aktivität aufweist. Möglicherweise ist zur Reduktion von HMBPP durch IspH und Dithionit die im letzteren Fall angewendete Temperatur von 60 °C nötig. Da IspH aus *E. coli* bei einer derart hohen Temperatur denaturiert, war eine Überprüfung nicht möglich.

3.1.7.5 Untersuchung von IspH-Mutantenproteinen

In den orthologen IspH-Proteinen aus 20 Organismen sind 24 hoch konservierte Aminosäuren zu finden (schwarze Pfeile in Abbildung 8, 3.1). Drei dieser Aminosäuren sind Cysteine, die als Liganden für ein Eisen-Schwefel-Zentrum in Frage kommen (Bertini *et al.*, 1995, Kiley *et al.*, 2003). Um dieser Frage nachzugehen, wurden wie unter 2.2.1.10 erläutert Mutantenproteine erzeugt, in denen je eines der Cysteine C12S, C96S und C197S (Nummerierung bezogen auf das IspH-Protein aus *E. coli*) durch ein Serin ausgetauscht ist (Abb. 10, 3.1.1). Serin wurde gewählt, da diese Aminosäure Cystein sehr ähnlich ist. Beides sind polare Aminosäuren mit beinahe identischer Valenzstruktur. Lediglich die Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins ist im Serin gegen eine Hydroxyl-Gruppe ausgetauscht. Aufgrund der Hydroxyl- statt Sulfhydryl-Gruppe kann Serin nicht als Ligand von Eisen-Schwefel-Clustern fungieren.

Des Weiteren wurde das mutierte Protein Q166T167Q erzeugt, in dem das in Position 166 befindliche Glutamin mit dem Threonin in Position 167 getauscht wurde (Abb. 10, 3.1.1). Q166 und T167 befinden sich im nicht mutierten IspH-Protein ebenfalls in einem hochkonservierten Bereich (Abb. 8, 3.1). Die Herstellung der zum Bereitstellen der mutierten Proteine benötigten Expressionsstämme ist unter 2.2.1.10 und 3.1.1 beschrieben, die Hochanreicherung der mutierten Proteine unter 3.1.3. Bereits bei der Erzeugung der Mutanten auf DNA-Ebene traten Schwierigkeiten auf. So mussten ungewöhnlich viele Klonierungen einschließlich der PCR-Mutagenesen durchgeführt werden, um Expressionsstämme für die entsprechend mutierten IspH-Proteine zu erhalten (Abb. 10). Ein Grund hierfür konnte nicht gefunden werden. Kompetente Zellen, die mit einem Plasmid transformiert wurden, in das ein mutiertes *ispH*-Gen kloniert worden war, wuchsen extrem langsam (3.1.2). Die mutierten Proteine lagen in Konzentrationen von 0,7 (C96S), 0,8 (C12S) bzw. 1,1 (C197S) mg/ml vor (3.1.3). Aufgrund der zu erwartenden extrem geringen Aktivität wurden sie in maximal möglicher Konzentration in den unter 2.2.2.7 beschriebenen Reaktionsansatz gegeben. Somit ergaben sich Proteinkonzentrationen im Reaktionsansatz von 12, 14 bzw. 19 μ M. Von allen drei mutierten Proteinen wurde der Eisengehalt nach 2.2.2.6 bestimmt.

Tabelle 13: Aktivität und Eisengehalt mutierter His₆-IspH-Proteine.

Mutation	Eisengehalt	katalytische Aktivität	
		(nmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹)	%
keine	2,6	700	100
C12S	0,6	<0,01	<0,0014
C96S	0,9	<0,01	<0,0014
C197S	1,4	0,1	0,014

Detektionsgrenze: 0,01 nmol*min⁻¹*mg⁻¹

In den zur Aktivitätsbestimmung durchgeführten HPLC-Assays zeigten diese Proteinmutanten so gut wie keine Aktivität. Die katalytische Aktivität der Proteinmutanten C12S bzw. C96S lagen, sofern überhaupt vorhanden, unter der Detektionsgrenze von 0,01 nmol*min⁻¹*mg⁻¹. Unter der Annahme, dass zwar Produkt entstanden ist, dies aber in so geringem Umfang geschah, dass es durch die Detektionsgrenze nicht mehr nachzuweisen war, errechnet sich eine um mindestens den Faktor 70000 erniedrigte Aktivität. Die Aktivität der Proteinmutante C197S wurde zu 0,1 nmol*min⁻¹*mg⁻¹ ermittelt.

In vitro-Untersuchungen an den mutierten IspH-Proteinen ergaben stark reduzierte Eisengehalte (Tab 13). Die C197S-Mutante, welche den höchsten Eisengehalt der mutierten IspH-Proteine aufwies, enthielt lediglich 1,4 nmol Eisen je nmol Proteinmonomer. Im Vergleich zu 2,6 nmol Eisen je Proteinmonomer des unmutierten IspHs ist dies nur gut die Hälfte. Somit kann geschlossen werden, dass jedes der drei hoch konservierten Cysteine zur Koordination des [3Fe-4S]⁺-Cluster (3.1 und 3.1.6) unerlässlich ist.

3.1.7.6 NMR-gestützter IspH-Assay

Der NMR-gestützte IspH-Assay, im weiteren als NMR-Assay bezeichnet, wurde angewendet, um das eingesetzte Substrat der IspH-Reaktion (Abb. 22), [3,4-¹³C₂]1-Hydroxy-2-methyl-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (**16**), und vor allem die Produkte dieser

Reaktion, [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Isopentenylpyrophosphat (**1**) und [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Dimethylallylpyrophosphat (**2**) eindeutig zu identifizieren.

Dieser Assay wurde, wie unter 2.2.2.8 beschrieben, mit den natürlich vorkommenden Elektronencarriern FldA und Fpr aus *E. coli*, sowie separat davon mit dem künstlichen Elektronenshuttle Desazaflavin durchgeführt.

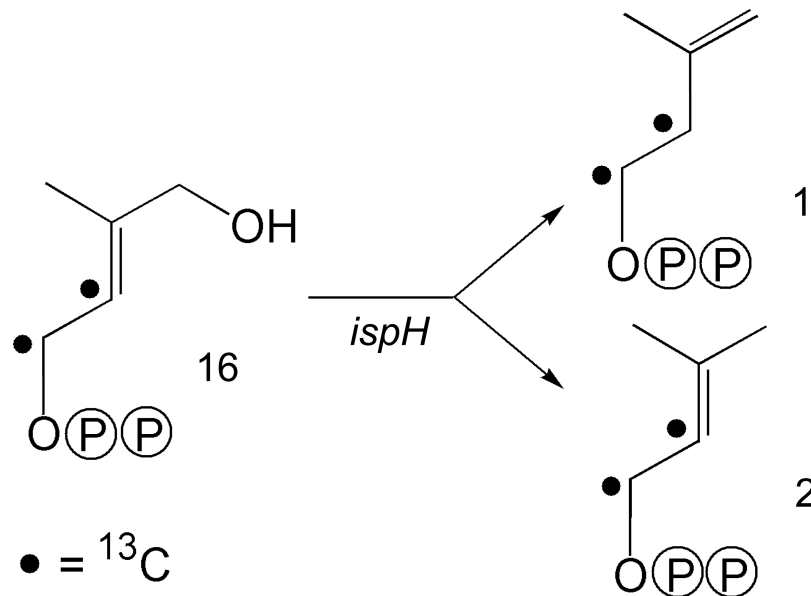


Abbildung 22: IspH-Reaktion mit ^{13}C -markiertem Substrat.

Der NMR-Assay bot als einziger Enzymassay die Möglichkeit, in der IspH-Reaktion entstandenes **2** zu identifizieren und zu quantifizieren (Abb. 23). Dies war mittels des HPLC-Assays nicht möglich, da **1** und **2** hierbei die gleiche Retentionszeit besaßen (vgl. 3.1.7.1). Der unter 2.2.2.9 beschriebene photometrische IspH-Assay konnte dies ebenso nicht leisten, da hier lediglich die NADPH-Abnahme verfolgt werden konnte.

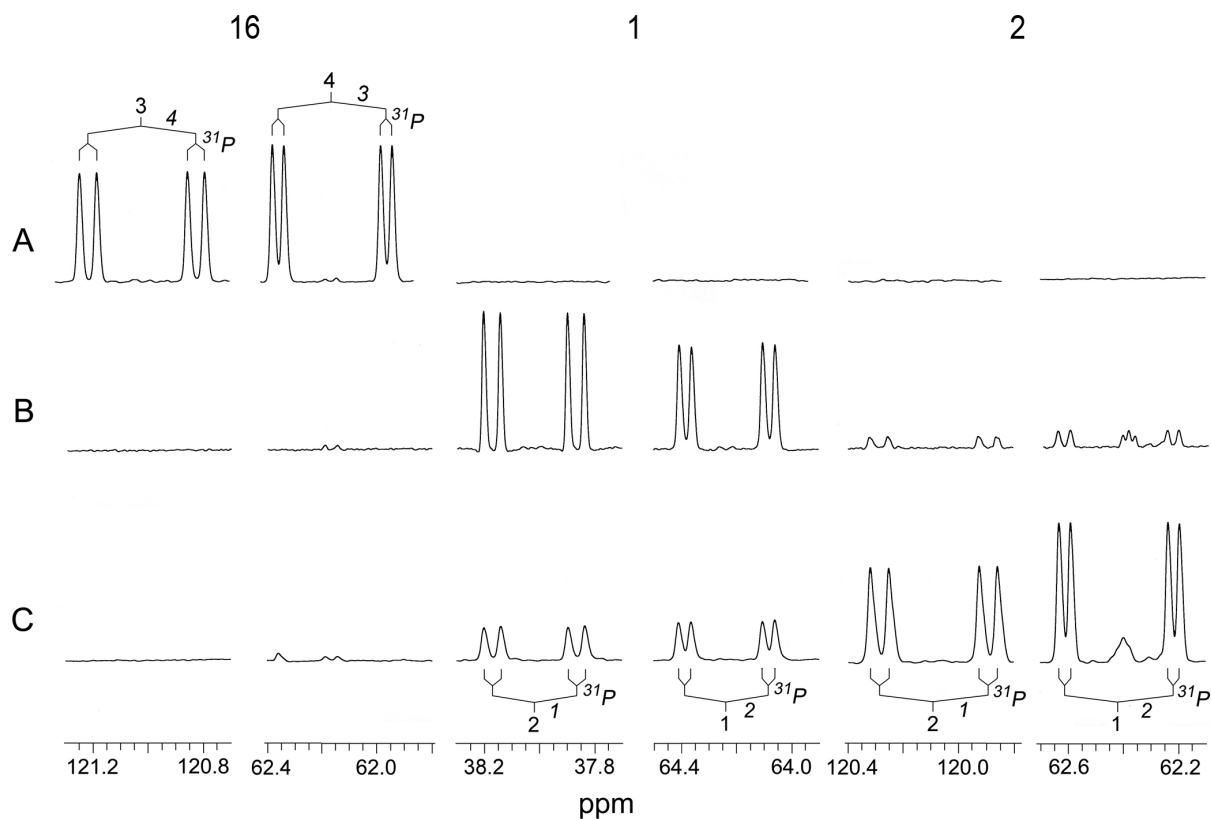


Abbildung 23: NMR-Spektren von $[3,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{16}$, $[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$ bzw. $[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{2}$.

Zeile A: Vor IspH-Reaktion. Zeile B: Nach IspH-Reaktion (Vollumsatz). Zeile C: Nach Behandlung der Reaktionsprodukte aus B mit Idi-I-Protein.

In Abbildung 23 A ist ein NMR-Spektrum des IspH-Substrats $[3,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{16}$ vor der Reaktion dargestellt. Abbildung 16 B zeigt ein NMR-Spektrum nach vollständiger Umsetzung des Substrats zu $[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$ und $[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{2}$. Anhand der erhaltenen Dupletts ist deutlich zu erkennen, dass etwa sechsmal soviel $\mathbf{1}$ wie $\mathbf{2}$ gebildet wurde (vgl. 3.1.9). Um sicherzustellen, dass es sich bei den relativ kleinen DMAPP-Dupletts auch um diese handelte, wurde der Ansatz aus 16 B nach Aufnahme des Spektrums mit Idi-I-Protein behandelt (Leyes *et al.*, 1999). Dieses Protein stellte das thermodynamische Gleichgewicht zwischen $\mathbf{1}$ und $\mathbf{2}$ im Verhältnis von 1:3 ein, indem es beide Verbindungen ineinander umwandelt. Das nach der Idi-I-Reaktion aufgenommene Spektrum ist in Abbildung 16 C dargestellt und belegt, dass es sich bei den Dupletts bei 120 ppm und 62 ppm aus 16 B tatsächlich um $\mathbf{2}$ handelt.

Die aus den NMR-Spektren ermittelten chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten von $\mathbf{16}$, $\mathbf{1}$ bzw. $\mathbf{2}$ sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: NMR-Daten von [3,4-¹³C₂]**16**, [1,2-¹³C₂]**1** bzw. [1,2-¹³C₂]**2**.

Position	Chemische Verschiebung [ppm]	Kopplungskonstanten J _{PC} [Hz]	Kopplungskonstanten J _{CC} [Hz]
16-3	121,0	8,0	49,6
16-4	62,2	5,3	49,6
1-1	64,2	5,7	38,3
1-2	38,0	7,7	38,3
2-1	62,4	5,3	49,8
2-2	120,1	8,0	49,8

Mit Hilfe des NMR-Assays konnte eine Aktivität von 0,66 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ des His₆-IspH-Proteins unter Verwendung von FldA und Fpr als Elektronencarrier erreicht werden. Der NMR-Assay musste mit einer Substratkonzentration von wenigstens 1 mM durchgeführt werden (2.2.2.8). Nur so war gewährleistet, dass neben **1** auch das in geringerer Konzentration entstehende **2** im NMR-Spektrum zu identifizieren war. Mit dem künstlich hergestellten Elektronencarrier Desazaflavin ließ sich eine Aktivität von 3,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ erzielen.

3.1.7.7 Photometrischer IspH-Assay

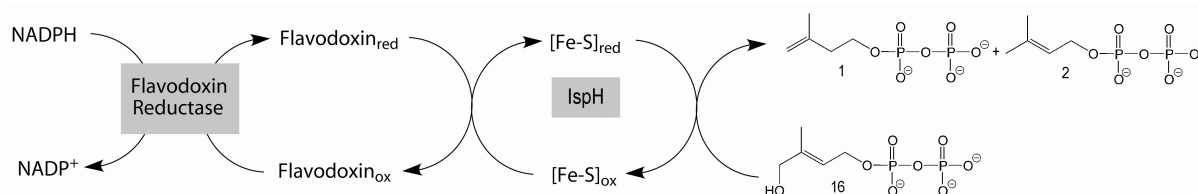


Abbildung 24: Elektronenübertragung von NADPH auf **16** mittels Fpr, FldA und IspH.

Im photometrischen IspH-Assay (Photometer-Assay) wurde die durch His₆-IspH-Aktivität bedingte Abnahme des Cosubstrats NADPH bei 340 nm über die Zeit verfolgt (2.2.2.9). Dieser Assay erlaubte die genaue Beobachtung des Reaktionsverlaufs. Im Gegensatz dazu wurden alle anderen Assays als Endpunktbestimmung durchgeführt. Nach diversen Optimierungen konnte der Photometer-Assay über eine Stunde stabil gefahren werden. So war das eingesetzte Verhältnis von Substrat zu Cosubstrat (3.1.7.2), wie auch der Reaktionsstart durch NADPH-Zugabe notwendig, um ein Ausfallen der Elektronencarrier zu verhindern. Aus der NADPH-Abnahme über die Zeit ließ sich eine Aktivität des His₆-IspH-Proteins von 0,55 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ errechnen.

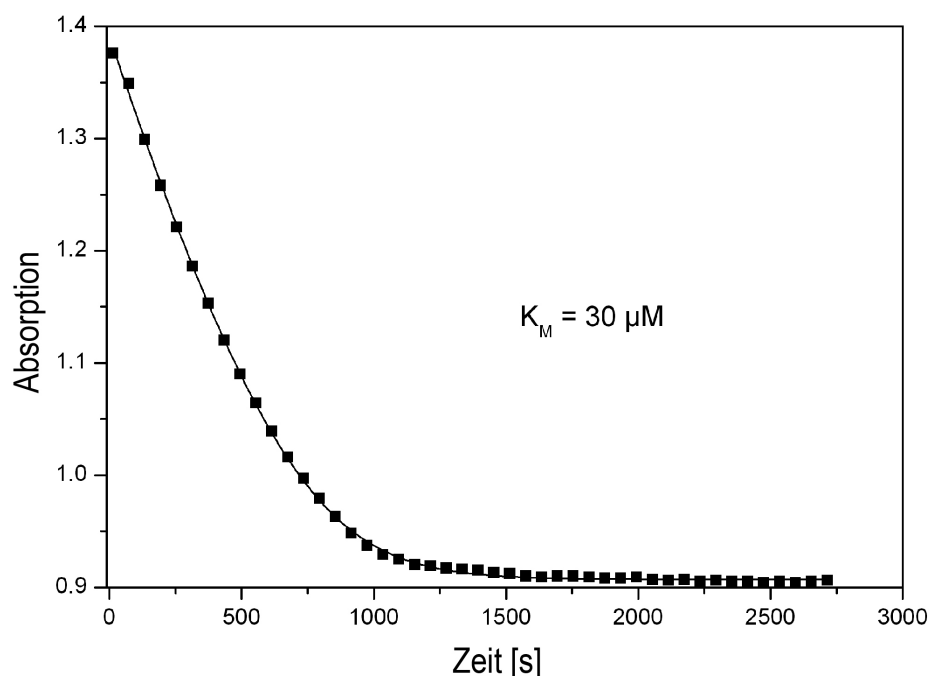


Abbildung 25: Photometrisch verfolgte NADPH-Abnahme während der IspH-Reaktion gegen die Zeit.

Da die NADPH-Abnahme über zwölf Minuten linear verlief, und sich anschließend relativ schnell der single-turn-over-Zustand einstellte, konnte mit Hilfe des Programms DynaFit (Kuzmic, 1996) rechnergestützt die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) zu 30 μM bestimmt werden. Die am Ende der Reaktion verbrauchte Menge an NADPH entsprach der eingesetzten Menge an Substrat. Dadurch war belegt, dass NADPH ausschließlich durch die Reduktion von **16** verbraucht wird, und es möglich ist, den Verlauf der IspH-Reaktion anhand des NADPH-Verbrauchs zu verfolgen.

3.1.8 Komplementationsstudie mit der *E. coli ispH*-knock-out-Mutante

In den unter 3.1.7.5 beschriebenen *in vitro*-Assays mit den mutierten His₆-IspH-Proteinen C12S, C96S und C197S konnten nur sehr geringe spezifische Aktivitäten von höchstens 0,1 nmol*min⁻¹*mg⁻¹ gemessen werden. Das mutierte Protein Q166TT167Q konnte nicht angereichert werden, da die Zellen, die es synthetisieren sollten, sich nicht kultivieren ließen (3.1.2).

Unter Verwendung einer *ispH*-defizienten Mutante sollte nun geklärt werden, ob es sich bei den Mutationen C197S und Q166TT167Q um letale Mutationen handelte. Hierzu wurden die entsprechenden mutierten Proteine *in vivo* indirekt durch die beobachtete Wachstumsgeschwindigkeit der diese Proteine produzierenden Zellen auf ihre Aktivität getestet. Als *E. coli*-Stamm wurde hier eine chromosomale *ispH*-knock-out-Mutante *E. coli* SK6600*ispH*::KanapACYCpmkmdpmd (Tab. 1/2) verwendet, die keine IspH-Wildtypaktivität besitzt, da sie über kein intaktes *ispH* Gen und somit auch über kein intaktes IspH-Protein verfügt. Das chromosomale *ispH* Gen dieses Stamms wurde, wie unter 2.2.1.12 beschrieben, durch Insertion einer Neomycinkassette (Abb. 26) zerstört.

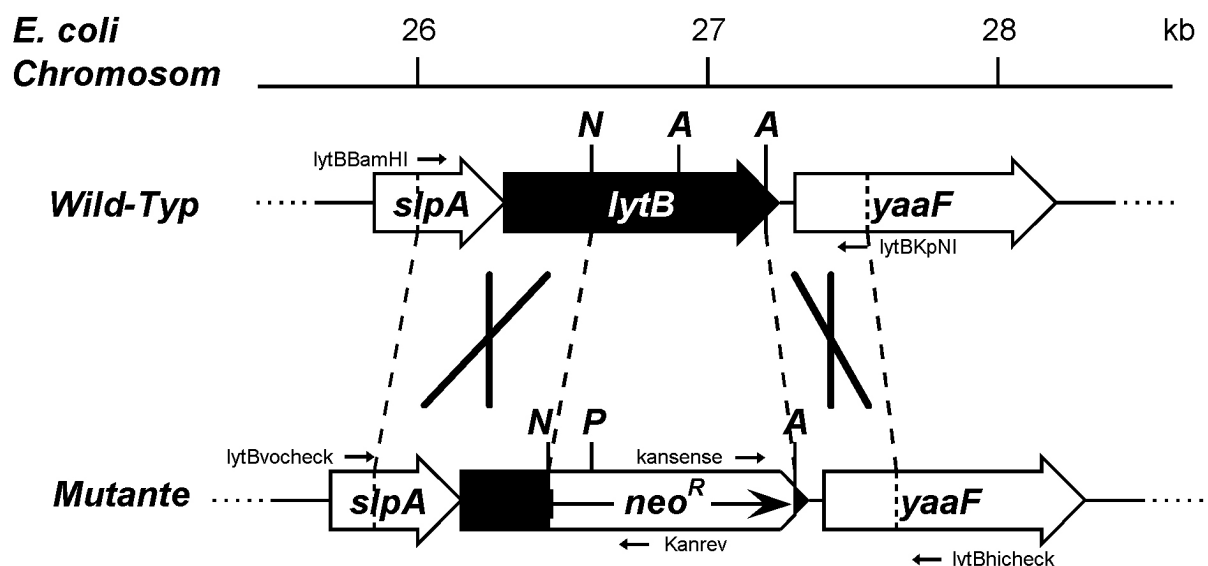


Abbildung 26: Herstellung der chromosomalen *ispH*-Mutantante mittels crossing-over.

Die so erhaltene *ispH*-knock-out-Mutante konnte nur aufgrund des im Plasmid pACYCpmkmdpmd (Tab. 2) enthaltenen Mevalonat-Gen-Clusters (Abb. 27) und Zugabe von **6** ins Kulturmedium proliferieren. Über den Mevalonat-Gen-Cluster wird von **6** ausgehend **1** synthetisiert. Letzteres wird von in *E. coli* vorhandenem Idi-I-Protein zu **2** isomerisiert. Die *ispH*-knock-out-Mutante ist somit geeignet, mutierte IspH-Proteine *in vivo* auf das Vorhandensein enzymatischer Aktivität zu überprüfen, indem eine mögliche Komplementation des defekten *ispH* Gens durch Wachstumstests detektiert wird.

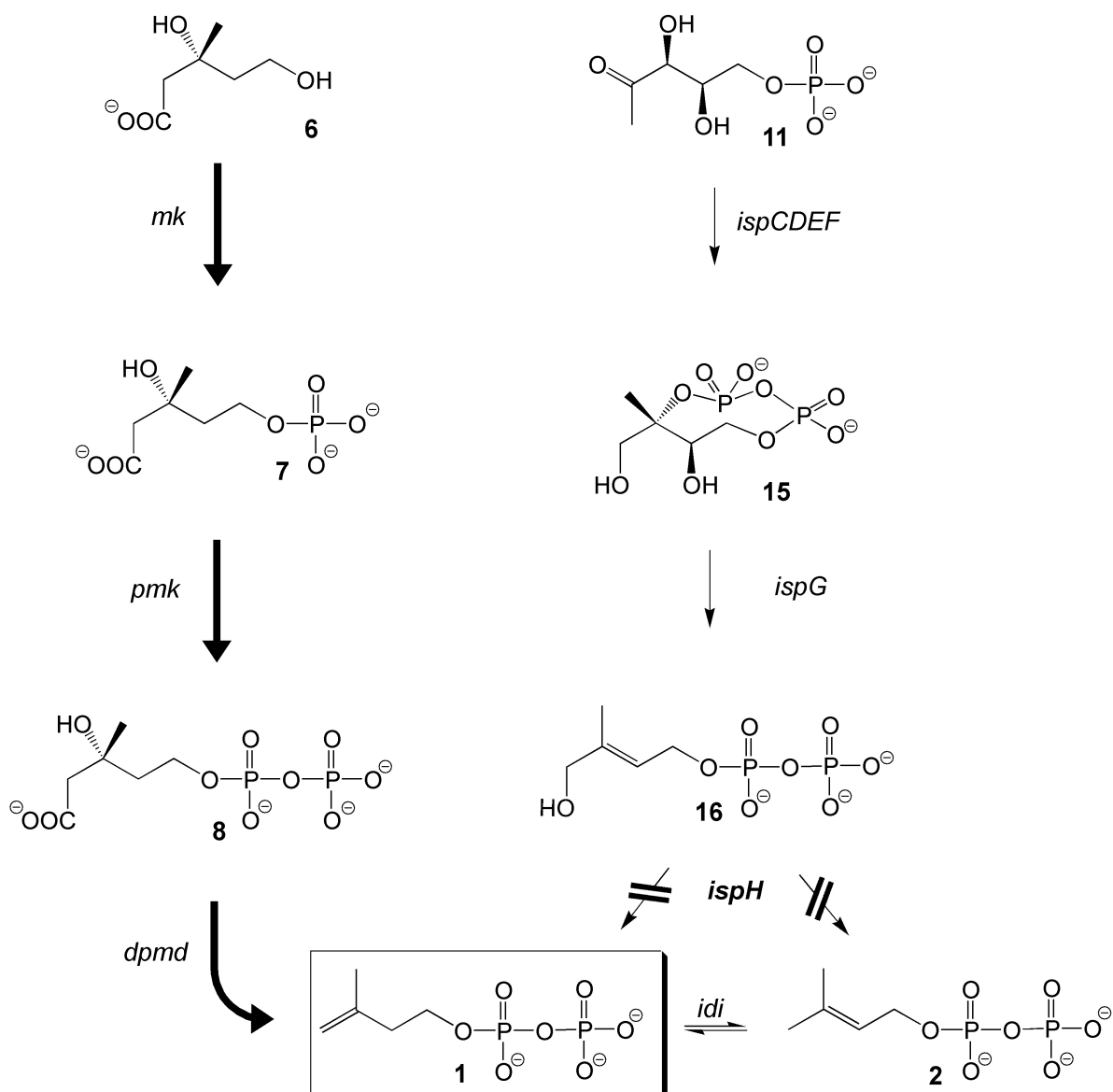


Abbildung 27: Biosynthese von **1** bzw. **2** über den Mevalonat-Gen-Cluster bei gleichzeitigem Blockieren des DXP-Wegs wegen defektem *ispH* Gen.

Nach Transformation (2.2.1.9) in die chromosomale *ispH*-knock-out-Mutante und anschließender Vereinzlung von Klonen wurden in Testreihen die Translationsprodukte der in Tabelle 2 aufgelisteten Plasmide pQE30ispHC197S, pQE30ispHQ166TT167Q, pQE30ispHWT (positive Referenz) und leerem pQE30 Vektor (negative Referenz) wie unter 2.2.1.13 beschrieben auf enzymatische Aktivität überprüft. Dazu wurden Wachstumskinetiken über einen Zeitraum von 12 Stunden aufgenommen (Abb. 28).

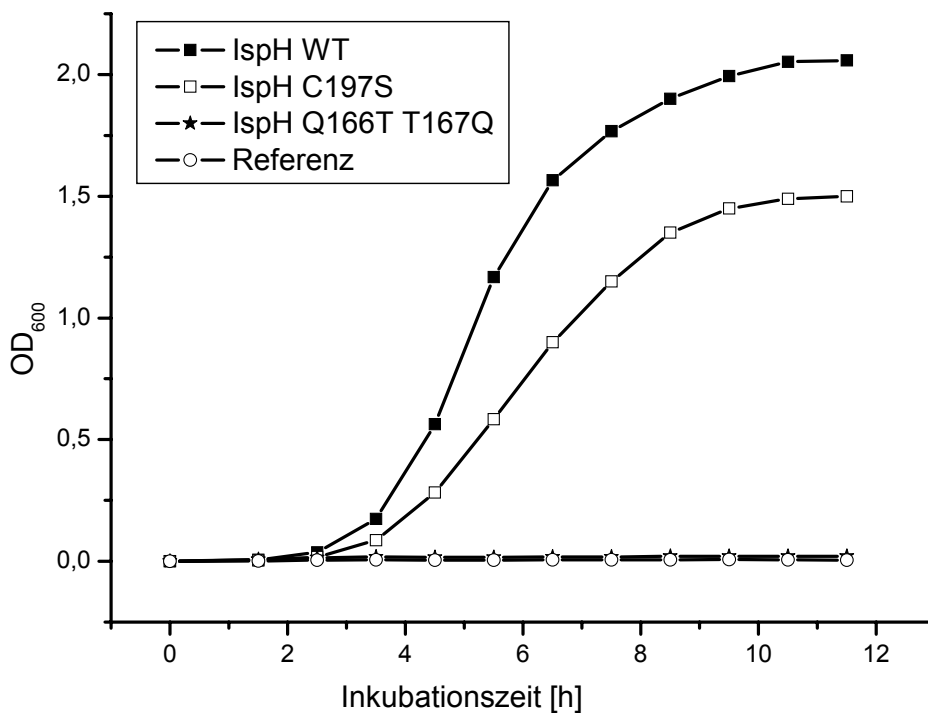


Abbildung 28: Wachstumskinetik verschiedener IspH-Expressions-Stämme mit chromosomalem *ispH*-Gendefekt-Hintergrund.

In dem Medium mit 2 mM Mevalonat war bei allen Mutantenstämme in etwa gleiches Wachstum erkennbar (Daten identisch zur Kurve mit schwarzen Vierecken aus Abb. 28). In Kulturmedium ohne Mevalonat dagegen wuchs die durch pQE30ispHWT komplementierte chromosomale *ispH*-Mutante am schnellsten. Die pQE30ispH C197S enthaltende Mutante zeigte im Vergleich zur Wildtypferenz eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit. Die chromosomale *ispH*-Mutante mit pQE30ispH Q166TT167Q bzw. mit leerem pQE30 Plasmid wuchs dagegen nur unter Zugabe von **6** (Abb. 28).

Erstaunlicherweise ist die C197S Mutation nicht letal, der entsprechende Expressionsstamm wächst nur um etwa 30 % langsamer als der Referenzstamm. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass *in vitro* eine um den Faktor 7000 geringere spezifische Aktivität von C197S-Protein im Vergleich zu His₆-IspH-Protein gemessen wurde (3.1.7.5). Somit kann *E. coli* offensichtlich mit kaum aktivem IspH-Protein überleben. Eine andere Möglichkeit ist, dass *E. coli* das defekte IspH-Protein auch ohne das Cystein in Position 197 zumindest kurzzeitig mit einem funktionalen Eisen-Schwefel-Cluster versehen kann.

Die doppelte Mutation Q166TT167Q war für den entsprechenden Stamm absolut letal. Die Aminosäuren Glutamin 166 und Threonin 167, welche in der oben genannten Mutation in ihrer Reihenfolge vertauscht wurden, liegen in einem hoch konservierten Bereich (Abb. 8, 3.1). Das nächste Cystein liegt immerhin 30 Aminosäuren von diesem Bereich entfernt. Die Aminosäuren in Position 166 und 167 haben somit wahrscheinlich keine Auswirkung auf die Koordination und Funktion des Eisen-Schwefel-Zentrums, sondern eher auf die Raumstruktur von IspH. Auch eine Bedeutung für die Substratbindung oder die Katalyse an sich ist denkbar.

3.1.9 Chemie der IspH-Reaktion

Wie für das IspG-Protein (Zepeck *et al.*, 2005) kann für die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase (IspH-Protein) ein radikalischer Mechanismus mit Involvierung eines Fe-S-Zentrums postuliert werden (Abbildung 29):

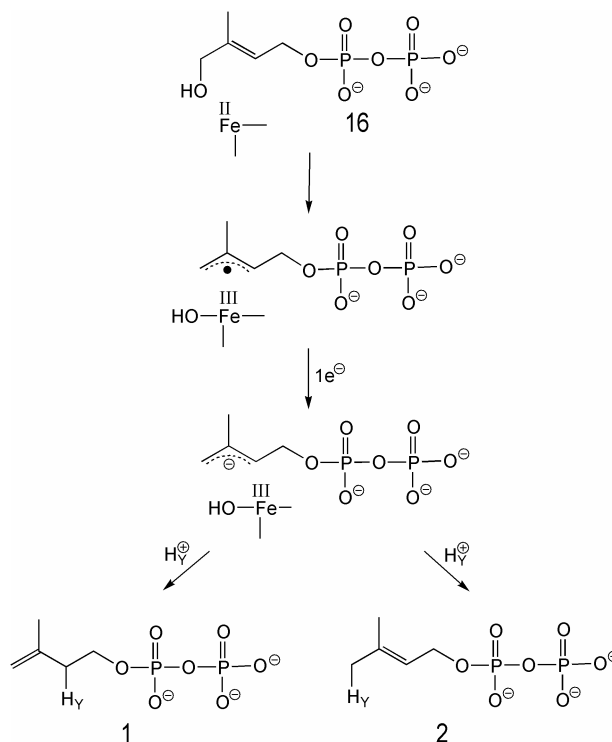


Abbildung 29: Hypothetischer Mechanismus der IspH Reaktion.

1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat (**16**) wird über ein radikalisches Allyl-Zwischenprodukt in IPP (**1**) und DMAPP (**2**) umgewandelt. Ein Eisenatom des Eisen-Schwefel-Zentrums bindet die abgespaltene Hydroxylgruppe und ändert dadurch seinen Oxidationszustand von +II zu +III. Das radikalische Allyl-Zwischenprodukt wird dann durch eine Enelektronenübertragung in **1** und **2** umgewandelt (Rohdich *et al.*, 2003).

In der von IspH katalysierten Reaktion entstehen **1** und **2** aus **16** in einem bestimmten Verhältnis. Durch NMR-Assays (2.2.2.8), zum einen mit dem natürlichen FldA/Fpr-System, zum anderen mit künstlich synthetisiertem 10-Methyl-5-desaza-isoalloxazin (Desazaflavin, DAF) als Elektronenshuttle, sollte jeweils das Verhältnis der Aufspaltung in **1** und **2** bestimmt werden. Dazu wurden Enzymreaktionen, wie unter 2.2.2.8 beschrieben, durchgeführt. Die beiden Produkte entstanden dabei im Verhältnis von 4,5:1 bei Verwendung von Desazaflavin, bzw. im Verhältnis von 6,3:1 bei Verwendung von FldA und Fpr als Elektronenshuttles. In Tabelle 15 sind Verhältnisse der bei der IspH-Reaktion entstandenen Produkte **1** und **2** aufgelistet.

Tabelle 15: Verhältnisse der in der IspH-Reaktion gebildeten Produkte **1** bzw. **2**.

Aufspaltungsverhältnis 1:2	Referenz
4-5:1	Altincicek <i>et al.</i> , 2002
5:1	Rohdich <i>et al.</i> , 2002
~6:1	Adam <i>et al.</i> , 2002
4-6:1	Wolff <i>et al.</i> , 2003
4,5 ^a und 6,3 ^b :1	Diese Arbeit

^abestimmt mit Desazaflavin als Elektronenshuttle

^bbestimmt mit FldA/Fpr als Elektronenshuttle

Der NMR-Assay erlaubte es, das Substrat der IspH-Reaktion sowie die gebildeten Produkte anhand ihrer ¹³C-Markierung zu identifizieren. Nur in diesen Assays war es möglich, das neben **1** in weitaus geringem Umfang entstandene **2** zu quantifizieren. Auf diese Weise konnte eine Diskrepanz der Verhältnisse von **1** zu **2** in Abhängigkeit des eingesetzten Elektronen-Carrier-Systems ermittelt werden. Das Verhältnis betrug *in vivo* und bei Verwendung der physiologischen Elektronen-Shuttles ca. 6:1 (Adam *et al.*, 2002, diese Arbeit). Dass das Verhältnis mit 4,5:1 von **1** zu **2** bei Einsatz von Desazaflavin davon abwich, überrascht nicht. Schließlich handelt es sich bei der Elektronenübertragung mittels Desazaflavin um ein künstlich etabliertes System.

Durch die IspH-Reaktion wird ein H-Atom in Position C-2 des entstehenden IPPs eingebaut. In der Literatur lassen sich Hinweise darauf finden, dass dieser Einbau spezifisch in der H_{Si}-Position des neu gebildeten IPPs erfolgt (Rieder *et al.*, 2000, Neundorf *et al.*, 2003, Hoeffler *et al.*, 2002, Eisenreich *et al.*, 2004). Dieser Sachverhalt sollte durch zwei Experimente abgesichert werden:

Zunächst sollte durch die IspH-Reaktion ein Deuteriumatom in Position C-2 von **1** eingebaut werden. Im Anschluss erfolgte Behandlung des entstandenen [2-²H₁]**1** mit Idil-Protein. Von diesem war bekannt, dass es spezifisch den H_{Re}-Liganden der C-2 Position von **1** entfernt (Leyes *et al.*, 1999).

Für die Deuterium-Einbauversuche mussten zunächst eine Referenz-IspH-Reaktion (A) in H₂O und eine Mess-IspH-Reaktion (B) in 10 % H₂O, 90 % D₂O wie unter 2.2.2.10 beschrieben durchgeführt werden.

Nach der Inkubation wurde sowohl vom Referenzansatz (A) als auch vom Messansatz (B) ein ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen (Abb. 30). Die Verwendung des ^{13}C markierten Substrats $[3,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{16}$ resultierte in einer Erhöhung der Messsensitivität. In den ^{13}C -NMR-Spektren der Referenzprobe (A) und der deuterierten Probe (B) waren nur die ^{13}C -markierten Atome des Substrats und der Produkte NMR-spektrometrisch zu erkennen.

Tabelle 16: ^{13}C -NMR-Daten von $[1,2-^{13}\text{C}_2,2-^2\text{H}_1]\mathbf{1}$ und $[1,2-^{13}\text{C}_2,2-^2\text{H}_1]\mathbf{2}$.

Position	Chemische Verschiebung [ppm]	Kopplungs-konstante [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.

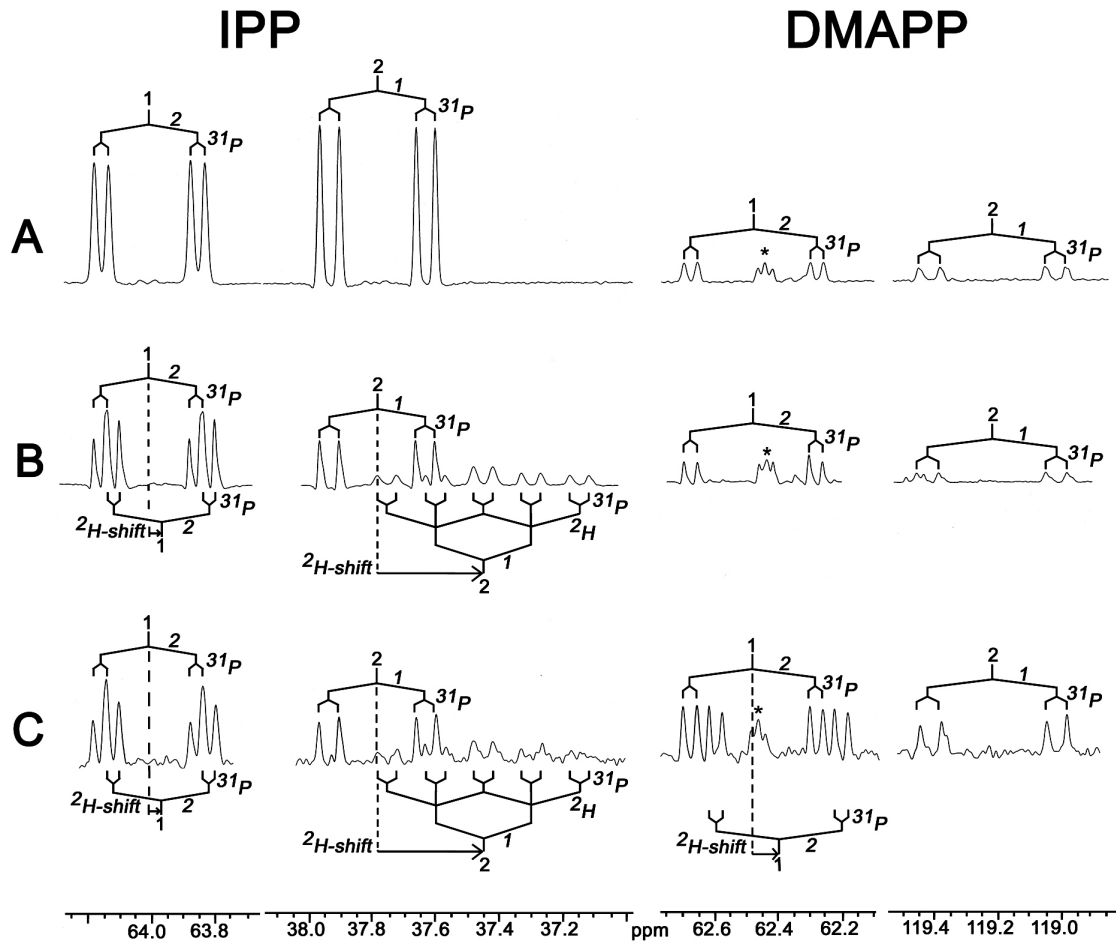


Abbildung 30: ^{13}C -NMR-Spektren von **1** und **2** nach IspH-Reaktion.

Spur A: Im Lösungsmittel H_2O ; Spur B: Im Lösungsmittel D_2O ; Spur C: in einer Reaktionsmischung (Lösungsmittel H_2O) mit (S)-[1,2- $^{13}\text{C}_2$, 2- $^2\text{H}_1$]**1** und Idi-I Protein; Die Kopplungsmuster und ^2H -Isotop-shifts sind angezeigt. *, Signal hervorgerufen durch eine Verunreinigung.

Über ihre bekannten ^{13}C - ^{13}C -Kopplungskonstanten konnten die spektroskopierten Moleküle genau identifiziert werden (Tab. 16). Des Weiteren konnte der Grad einer zusätzlichen Deuteriummarkierung aus den relativen Intensitäten der isotop-geshifteten ^{13}C -Signale quantitativ bestimmt werden. Ein Vergleich der dem IPP zugeordneten Signale (A und B, Abbildung 18) zeigte, zusammen mit den Werten aus Tabelle 16, dass Deuterium aus dem Lösungsmittel in Position C-2 von **1** eingebaut wurde. Die relativen Intensitäten der geshifteten gegenüber den nichtgeschifteten Signalen ließen den Grad der Deuterierung von **1** zu 60 % errechnen.

Die absolute Konfiguration des in Ansatz B gebildeten deuterierten IPPs ließ sich durch Inkubation mit Idi-I-Protein untersuchen. Dazu wurde Ansatz B durch

Lyophilisieren das D₂O-haltige Lösungsmittel entfernt, und das Lyophilisat in H₂O aufgenommen.

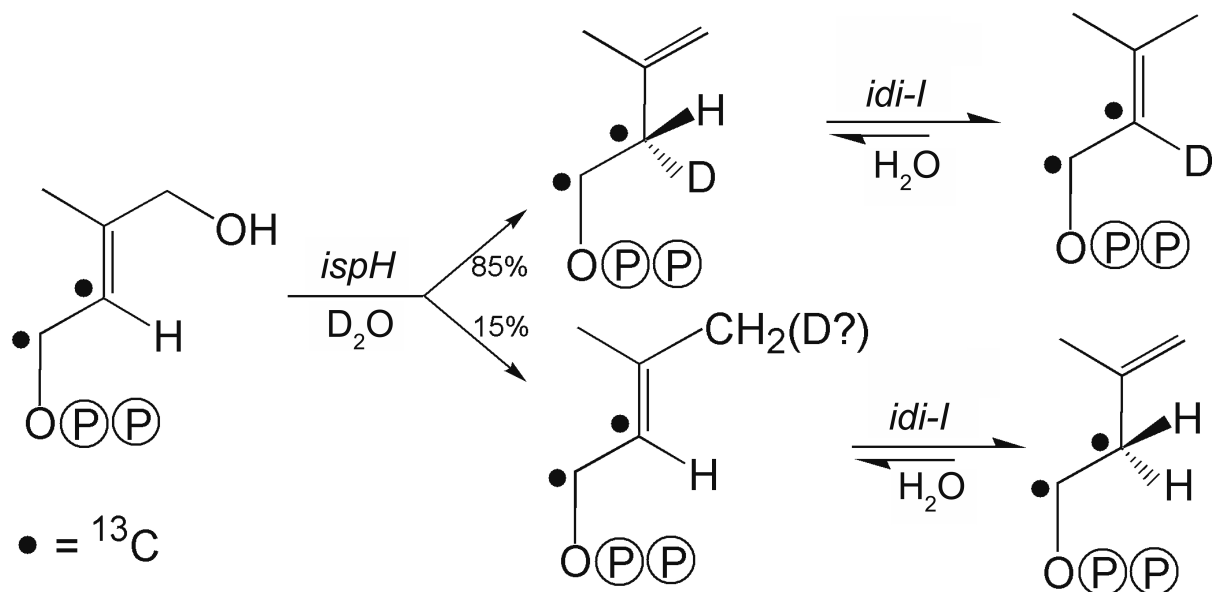


Abbildung 31: Schema des stereochemischen Verlaufs der von den Proteinen IspH und Idi-I katalysierten Reaktionen.

Die gefüllten Kreise symbolisieren die ¹³C-Markierung von [3,4-¹³C₂]-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat und der in der IspH- und Idi-I-Reaktion gebildeten Produkte.

Durch Zugabe der Typ I Isomerase (Idi-I Protein) stellt sich der Gleichgewichtszustand (1:3) zwischen **1** und **2** ein (Abb. 31). Der Beginn dieser Isomerisierung ist in Spur C, Abbildung 30 dargestellt. Im Vergleich mit Spur B konnte eine Abnahme der relativen Intensitäten der Signale von **1** zugunsten einer Zunahme der Intensitäten der Signale des undeuterten **2** beobachtet werden. Dieser Umstand deutete auf die Bildung Deuterium-freier Moleküle aus der Deuterium-freien Komponente der **1**-Vorstufe hin. Außerdem waren in Spur C neue Hochfeld-verschobene Signale für das Kohlenstoffatom C-1 von **2** zu detektieren. Die entsprechenden Werte der chemischen Verschiebungen (Tab. 16) waren mit den Werten für in Position C-2 deuterierten DMAPPs identisch.

Im Deuterium-Einbauversuch wurde im zu 90 % deuterierten Lösungsmittel durch IspH-Protein bei 60 % der entstehenden Moleküle von **1** in Position C-2 ein Deuteriumatom angefügt (Abb. 30). Somit war erwiesen, dass das in Position C-2 angefügte Wasserstoffatom aus dem Lösungsmittel und nicht aus NADPH stammt

(Abb. 31). Die Diskrepanz zwischen dem Anteil deuterierter Moleküle von **1** (60 %) und dem Deuterierungsgrad des Lösungsmittels (90 %) deutet auf eine sechsfache Benachteiligung des Deuteriumeinbaus zugunsten des Einbaus eines Protons hin. Die Ursache kann in einer begrenzten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Lösungsmittelmoleküle, in einem kinetischen Isotopeneffekt oder in einer Kombination beider Möglichkeiten liegen (Laupitz *et al.*, 2004). Dennoch belegte das Experiment, dass der letzte Schritt der IspH-Reaktion in einer Löschung eines Protons durch das anionische Intermediat besteht (Abb. 31). Ein ähnlicher Deuteriumeinbau aus dem Lösungsmittel wurde für Position C-1 des Substrats in dem zu **2** führenden Ast der IspH-Reaktion erwartet. Dieser potentielle Deuteriumeinbau ist aber aufgrund der Entfernung der Position C-4 in **2** (C-1 in **16**) zur nächstgelegenen ^{13}C -Markierung (Position C-2) ^{13}C -NMR-spektroskopisch nicht detektierbar (Laupitz *et al.*, 2004). Das in der IspH-Reaktion in Position C-2 von **1** angefügte Deuterium wurde durch die Idi-I-Reaktion nicht entfernt (Abb. 31). Da bekannt war, dass Idi-I-Protein spezifisch das in H_{Re} -Konfiguration der C-2 Position von **1** befindliche Wasserstoffatom entfernt (Leyes *et al.*, 1999), war hiermit erwiesen, dass IspH spezifisch einen H_{Si} -Liganden in Position C-2 von **1** einfügt.

3.2 Untersuchung des rekombinanten IspDF-Proteins aus *Campylobacter jejuni*

Mittels Datenbankrecherche fand sich ein offener Leserahmen aus *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), der für ein mutmaßliches bifunktionelles IspDF-Fusionsprotein codiert (Rohdich *et al.*, 1999). Das Expressionsprodukt dieses hypothetischen *ispDF* Gens zeigt eine größere Ähnlichkeit zu IspF als zu IspD aus *E. coli* (Abb. 32).

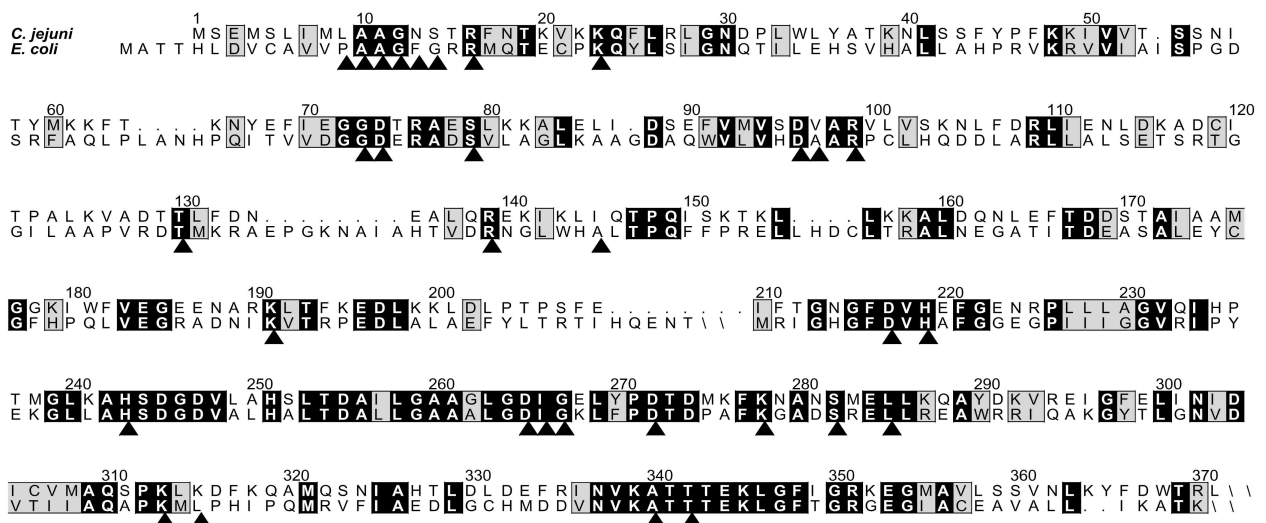


Abbildung 32: Alignment von IspDF aus *C. jejuni* und IspD/IspF aus *E. coli*.

Grau hinterlegte AS: ähnliche AS. schwarz hinterlegte AS: identische AS. Schwarze Pfeile markieren an der Substratbindung beteiligte AS bei IspD und IspF aus *E. coli*.

Die IspD-Domäne von IspDF aus *C. jejuni* beginnt am N-Terminus und reicht etwa bis zur Aminosäureposition 209 (Abb. 32). Sie besitzt 24 % Sequenzidentität und 40 % Sequenzähnlichkeit zu *E. coli* IspD. 13 der 18 Aminosäuren, die bei *E. coli* IspD an der Substratbindung beteiligt sind, sind bei der IspD-Domäne des IspDF-Proteins aus *C. jejuni* konserviert (Kemp *et al.*, 2002, Kemp *et al.*, 2003, Steinbacher *et al.*, 2002). Die IspF-Domäne von IspDF aus *C. jejuni* reicht etwa von Aminosäureposition 210 bis zum C-Terminus (Abb. 32). Die ähnlichen Aminosäuren zwischen der IspF-Domäne von IspDF aus *C. jejuni* und IspF aus *E. coli* machen 63 % des Proteins aus, die identischen Aminosäuren machen 49 % der Domäne aus. 13 der 14 an der

Substratbindung beteiligten Aminosäuren sind konserviert zu *E. coli* IspF (Kemp *et al.*, 2002, Kemp *et al.*, 2003, Steinbacher *et al.*, 2002).

In Abbildung 33 ist ein phylogenetischer Stammbaum in Abhängigkeit der Sequenzähnlichkeit von *ispD* und *ispF* Genen dargestellt.

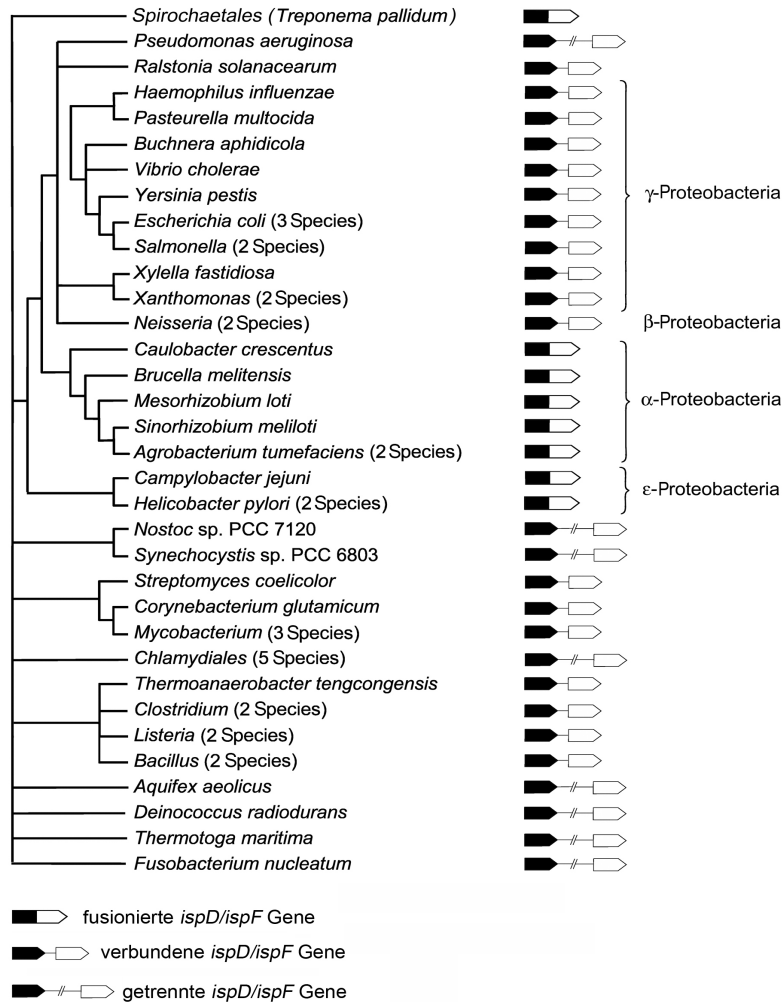


Abbildung. 33: Phylogenetischer Stammbaum in Abhängigkeit der Sequenzen von *ispD* und *ispF* Genen.

Aus diesem Stammbaum ist zu entnehmen, dass alle untersuchten Vertreter der α - und ϵ -Proteobakterien (somit auch *C. jejuni*), aber auch die phylogenetisch entfernt stehenden Spirochaeten, bifunktionelle IspDF-Proteine besitzen.

Die Überexpression des *ispDF* Gens (Abb. 34) erfolgte in einem T_7 -System mit *lac* Operator (Gabrielsen *et al.*, 2004). Dazu wurde das betreffende Gen wie unter 2.2.1.8 beschrieben in das pET15b Plasmid kloniert. Dabei wurde dem *ispDF* Gen

stromaufwärts ein synthetisches DNA-Fragment vorangestellt, welches für die Aminosäuresequenz MGSS(H)₆SSGLVPRGSH codiert.

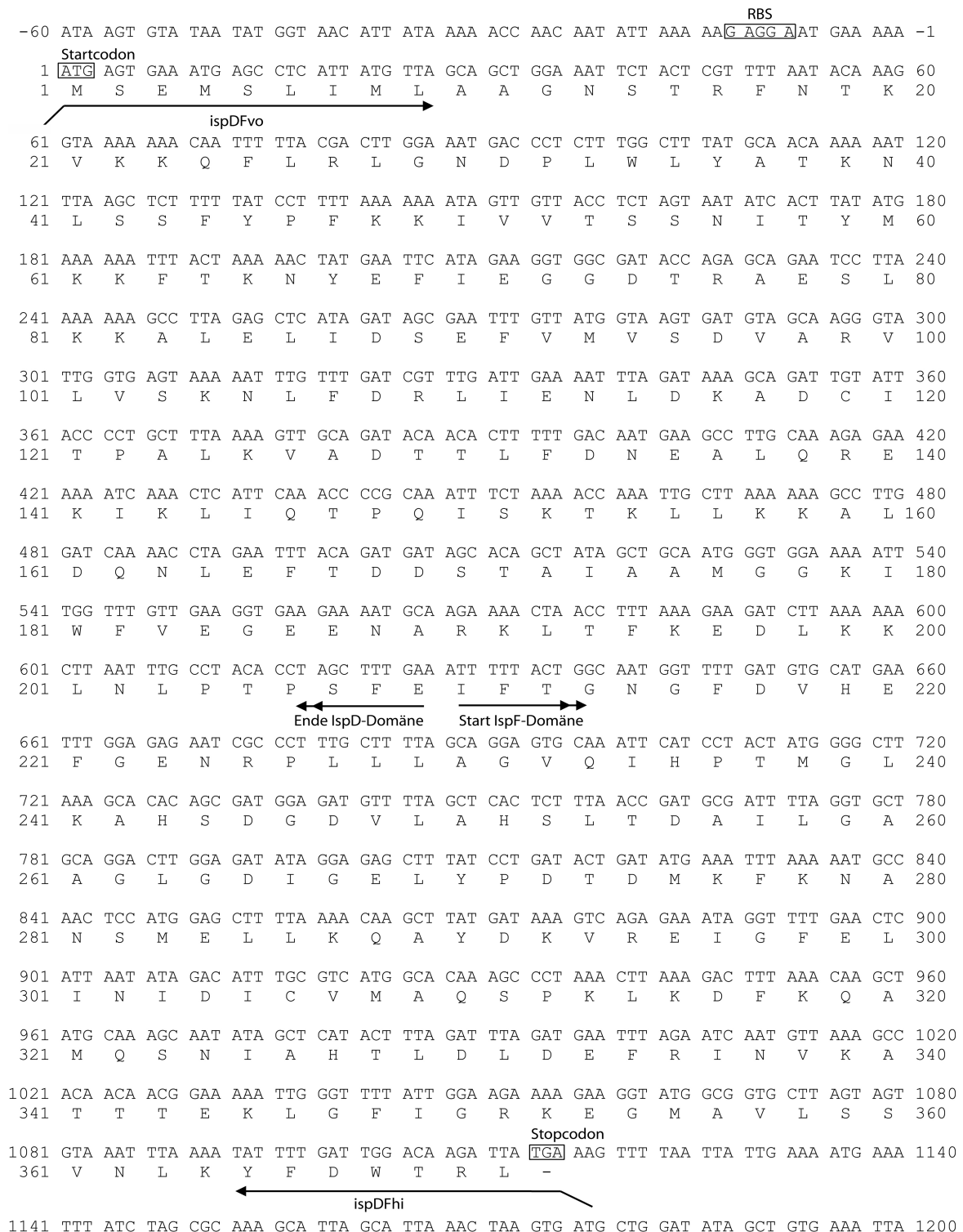


Abbildung 34: Gen- u. AS-Sequenz von *ispDF/lspDF* aus *C. jejuni*.

Pfeile markieren Bindestellen zur Klonierung verwendeter Primer, Doppelpfeile Start bzw. Ende einer Domäne. RBS: Ribosomale Bindestelle.

Anschließend erfolgte Transformation (2.2.1.9) des erhaltenen Konstrukts pET15bispDF (Tab. 2) in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) (Tab. 1). Die so erhaltenen Zellen BL21(DE3)-pET15bispDF (Tab. 1/2) produzierten nach Induktion (2.2.1.2) ein IspDF-Fusionsprotein mit N-terminalem His₆-Taq. Rohextrakte dieser Zellen enthielten eine Expressionsbande von etwa 44 kDa Größe (Abb. 35, Spur B). Die errechnete Molmasse des erhaltenen IspDF-Proteins betrug 43,871 kDa.

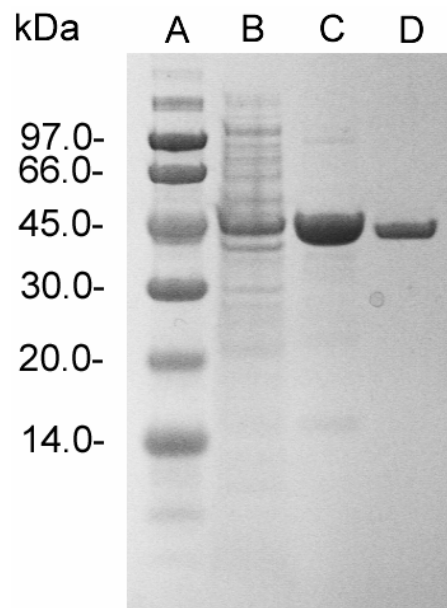


Abbildung 35: SDS-PAGE der Proteinreinigung von IspDF aus *C. jejuni*.

Spur A: SDS-Größenstandard. Spur B: Rohextrakt aus BL21(DE3)-pET15bispDF. Spur C: His₆-IspDF-Protein nach Nickel-Affinitätschromatographie. Spur D: IspDF nach Protease-Behandlung und Anionenaustauscherchromatographie auf SepharoseQ (Gabrielsen *et al.*, 2004).

Das rekombinante His₆-IspDF-Protein wurde wie unter 2.2.2.3 beschrieben mit Nickel-Affinitätschromatographie hoch angereichert (Abb. 35, Spur C). Die Aminosäuresequenz MGSS(H)₆SSGLVPR wurde anschließend proteolytisch mit Thrombin abgespalten. Darauf erfolgte Aufreinigung über Anionenaustauschchromatographie auf SepharoseQ (Gabrielsen *et al.*, 2004). Nach der Proteolyse war das IspDF-Protein nur noch etwa 42 kDa groß (Abb. 35, Spur D). Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (2.2.3.3) konnte eine molekulare Größe von 41,87 kDa ermittelt werden. Die errechnete Masse betrug im Vergleich dazu 41,971 kDa. Edman-Abbau (Berg *et al.*, 2002) ergab die N-terminale Aminosäuresequenz GSHMSEMSLIMLAAGNSTRFNTKVK. Dem N-terminus des Wildtyp-IspDF-Proteins

standen nun folglich die Aminosäuren GSH voran, sie sind ein Überbleibsel des His₆-TaqS (vgl. Abb. 34).

3.2.1 Charakterisierung der IspD-Domäne von IspDF aus *Campylobacter jejuni*

Die Bestimmung der spezifischen IspD-Aktivität erfolgte in unter 2.2.2.11 beschriebenen NMR-Assays. Dazu wurde ¹³C-markiertes Substrat [1,3,4-¹³C₃]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**) eingesetzt, und die Menge an entstandenem [1,3,4-¹³C₃]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**13**) im NMR-Spektrum quantifiziert (Abb. 36). Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten von **12** und **13** sind in Tabelle 17 dargestellt.

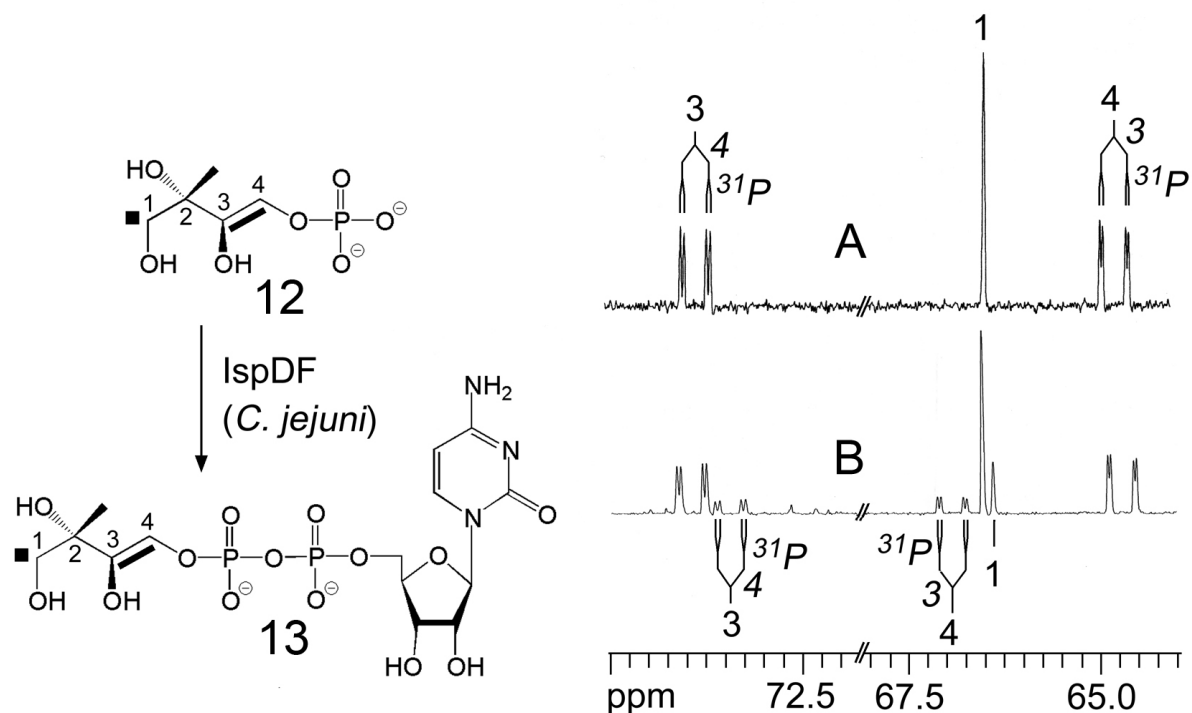


Abbildung 36: NMR-Spektren vor (A) und nach (B) Ablauf der IspD-Reaktion sowie schematisierte Umwandlung von [1,3,4-¹³C₃]**12** in [1,3,4-¹³C₃]**13** (¹³C-Markierung durch schwarze Balken dargestellt).

Substrat (A) und Produkt (B) der IspD-Reaktion konnten mittels der ¹³C-NMR-Signale (Abb. 36) und der bereits bekannten (Hecht *et al.*, 2002) ¹³C¹³C-

Kopplungskonstanten im NMR-Spektrum zuverlässig identifiziert werden. Außer **13** entstanden keine weiteren Produkte.

Der Rohextrakt von BL21(DE3)-pET15bispDF Zellen katalysierte die IspD-Reaktion mit einer spezifischen Aktivität von $3,9 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Das IspDF-Protein erreichte nach Anreicherung über Anionenaustauschchromatographie eine spezifische Aktivität von $18,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Tabelle 17: NMR-Daten von $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**12**) und $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**13**).

Position	Chemische Verschiebung [ppm]	Kopplungskonstanten J_{PC} [Hz]	Kopplungskonstanten J_{CC} [Hz]
12-1	66,5	-	-
12-3	73,8	6,5	42,5
12-4	64,7	4,4	42,5
13-1	66,3	-	-
13-3	73,5	7,3	42,5
13-4	67,0	5,7	42,5

3.2.1.1 pH-Wert- und Metallionen-Abhängigkeit der IspD-Domäne

Zur Bestimmung der pH-Wert-Abhängigkeit der IspD-Domäne von IspDF aus *C. jejuni* wurden Enzym-Assays wie unter 2.2.2.11 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde in Abwandlung davon zum Einstellen des pH-Werts im Bereich von 4,0 bis 8,0 in 0,5er Schritten eine Mischung aus 50 mM Citrat und 100 mM Tris eingesetzt, um pH-Werte unter 7,5 stabil halten zu können. Der pH-Wert wurde entweder mit HCl oder NaOH eingestellt. Als zweiwertiges Kation wurde Magnesium verwendet.

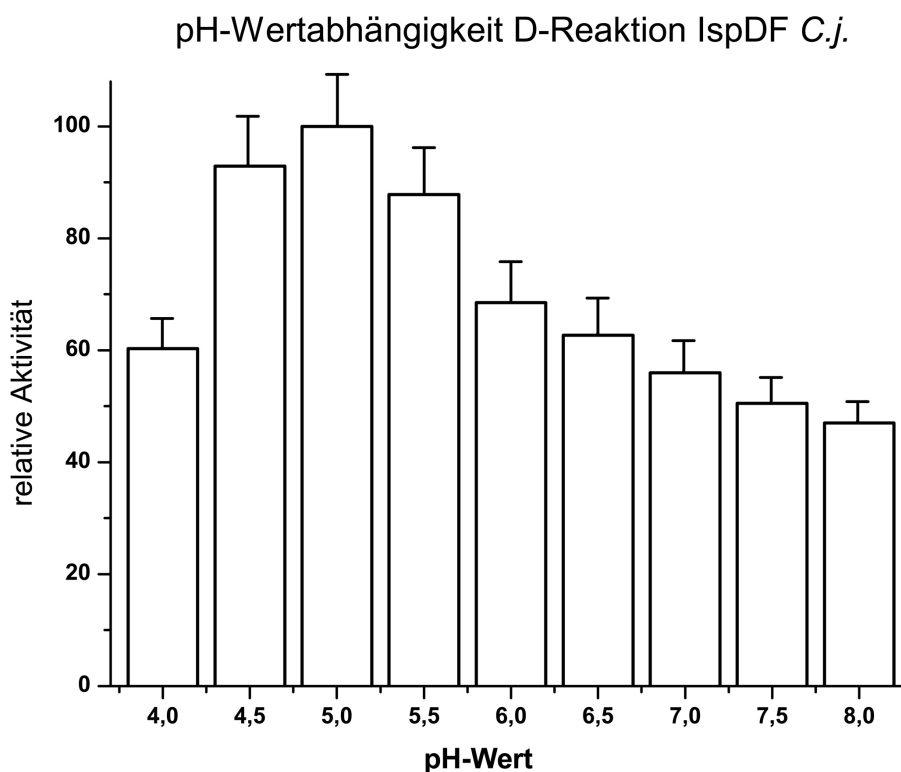


Abbildung 37: pH-Wert-Abhängigkeit der von IspDF aus *C. jejuni* katalysierten IspD-Reaktion.

Die IspD-Reaktion lief beim einem pH-Wert von 5,0 am schnellsten mit einer spezifischen Aktivität von $15,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ab (Abb. 37). Bereits um eine pH-Einheit ins Saure verschoben zeigte das Enzym nur noch eine am Optimum gemessene relative Aktivität von 60 %. Bei einer Verschiebung des pH-Werts ins Basische wurde eine derartige Erniedrigung der Aktivität erst nach zwei pH-Einheiten erreicht. Ein pH-Wert von 8,0 führte zu einer Herabsetzung der relativen Aktivität auf etwa 47 % (Abb. 37).

Der Test der Metallionen-Abhängigkeit der IspD-Domäne von IspDF aus *C. jejuni* wurde mit unter 2.2.2.11 erläuterten IspD-Enzym-Assays durchgeführt. Getestet wurden die zweiwertigen Kationen Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} . Diese wurden jeweils den Assays in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Die Enzym-Assays wurden bei dem oben ermittelten pH-Wert-Optimum von 5,0 durchgeführt.

Tabelle 18: Metallionen-Abhängigkeit der von IspDF aus *C. jejuni* katalysierten IspD-Reaktion.

Metallion	relative Aktivität [%]
Zn ²⁺	100
Mn ²⁺	96
Ni ²⁺	90
Cu ²⁺	90
Fe ²⁺	87
Ca ²⁺	86
Co ²⁺	84
Mg ²⁺	82
EDTA	<5

Detektionsgrenze: 5 % relative Aktivität

Es fällt auf, dass alle untersuchten Metallionen zu einer Aktivierung der IspD-Domäne von IspDF führten. Die höchste Aktivität ließ sich dabei unter Verwendung von Zinkionen erreichen (Tab. 18). Die gemessenen Aktivitäten lagen dabei alle in der gleichen Größenordnung von ungefähr 15-18,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (100 % rel. Aktivität = 18,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ spezifische Aktivität). Zugabe von zweiwertigen Magnesiumionen führte zur geringsten enzymatischen Aktivität, diese lag aber immer noch bei 82 % im Vergleich zu der mit Zinkionen. Um in der Enzymlösung eventuell schon vorhandene zweiwertige Metallionen zu komplexieren, wurde einer Referenzprobe EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM zugesetzt. Diese Referenzprobe zeigte keinerlei enzymatische Aktivität. Daraus kann gefolgert werden, dass es sich bei der von IspDF aus *C. jejuni* katalysierten IspD-Reaktion um eine Metallionen-abhängige Reaktion handelt.

3.2.1.2 Kinetische Untersuchungen an der IspD-Domäne von IspDF aus *Campylobacter jejuni*

Für kinetische Untersuchungen fand der unter 2.2.2.11 geschilderte IspD-Assay Verwendung. Dieser wurde in Anwesenheit von 10 mM Zn^{2+} bei einem pH-Wert von 5,0 durchgeführt. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) bezüglich des Substrats $[1,3,4-^{13}C_3]$ **12** wurde dieses in einer Konzentration von 10,9 mM, und das Cosubstrat CTP im Überschuss dazu eingesetzt. Um K_M bezüglich des Cosubstrats in einem separaten Ansatz zu ermitteln, wurde CTP in einer Endkonzentration von 4 mM und $[1,3,4-^{13}C_3]$ **12** im Überschuss dazu eingesetzt. In beiden Fällen erfolgte Start der Reaktion durch Zugabe von $ZnCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C im NMR-Röhrchen. 30 NMR-Spektren wurden jeweils acht Minuten lang aufgenommen. Die Michaelis-Menten-Konstante ließ sich unter zu Hilfenahme des Programms DynaFit (Kuzmic 1996) für das Substrat $[1,3,4-^{13}C_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu 20 μ M und für das Cosubstrat CTP zu 3 μ M bestimmen.

3.2.2 Charakterisierung der IspF-Domäne von IspDF aus *Campylobacter jejuni*

Die Bestimmung der spezifischen IspF-Aktivität erfolgte in unter 2.2.2.12 beschriebenen NMR-Assays. Dazu wurde ^{13}C -markiertes Substrat $[1,3,4-^{13}C_3]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) eingesetzt, und die Menge an entstandenem $[1,3,4-^{13}C_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**) mittels NMR-Spektroskopie quantifiziert (Abb. 38). Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten von **14** und **15** sind in Tabelle 19 dargestellt. Für die IspF-Reaktion wurde kein Cosubstrat benötigt (2.2.2.12). Die Umsetzung von **14** in das entsprechende zyklische Diphosphat $[1,3,4-^{13}C_3]$ **15** erfolgte unter Abspaltung von CMP.

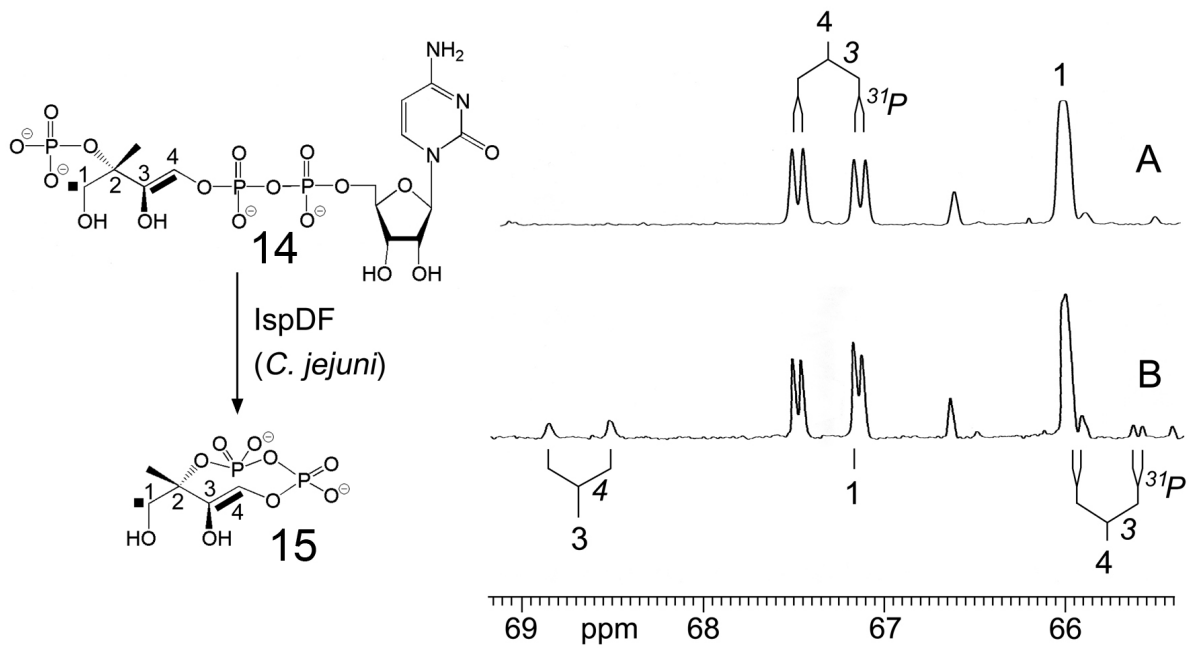


Abbildung 38: NMR-Spektren vor (A) und nach (B) Ablauf der IspF-Reaktion sowie schematisierte Umwandlung von $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{14}$ in $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{15}$ (^{13}C -Markierung durch schwarze Balken dargestellt).

Die chemischen Verschiebungen sowie die $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten stimmten mit den veröffentlichten Werten (Hecht *et al.*, 2002) gut überein (Tab. 19). Wie auch bei der IspD-Reaktion war bei der IspF-Reaktion kein Nebenprodukt im NMR-Spektrum zu erkennen (Abb. 38). Im Gegensatz dazu katalysieren IspF-Enzyme aus *E. coli* und *P. falciparum* eine Nebenreaktion, welche zur Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat führt (Rohdich *et al.*, 1999, Herz *et al.*, 2000).

Tabelle 19: NMR-Daten von [1,3,4-¹³C₃]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (**14**) und [1,3,4-¹³C₃]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**15**).

Position	Chemische Verschiebung [ppm]	Kopplungskonstanten J _{PC} [Hz]	Kopplungskonstanten J _{CC} [Hz]
14-1	65,8	3,8	-
14-3	74,0	7,3	42,9
14-4	67,2	5,7	42,9
15-1	65,8	4,2	-
15-3	68,7	-	42,6
15-4	65,7	6,4	42,6

Der Rohextrakt von BL21(DE3)-pET15bispDF Zellen (Tab. 1/2) katalysierte die IspF-Reaktion mit einer spezifischen Aktivität von 0,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Das IspDF-Protein erreichte nach Anreicherung über Anionenaustauschchromatographie in der IspF-Reaktion eine spezifische Aktivität von 6,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

3.2.2.1 pH-Wert- und Metallionen-Abhängigkeit der IspF-Domäne

Zur Bestimmung der pH-Wert-Abhängigkeit der IspF-Domäne von IspDF aus *C. jejuni* wurden Enzym-Assays wie unter 2.2.2.12 beschrieben durchgeführt. Zum Einstellen des pH-Werts im Bereich von 5,5 bis 9,0 in 0,5er Schritten wurde eine Mischung aus 50 mM Citrat und 100 mM Tris eingesetzt (vgl. 3.2.1.1). Der pH-Wert wurde entweder mit HCl oder NaOH eingestellt. Als zweiwertiges Kation wurde Magnesium verwendet.

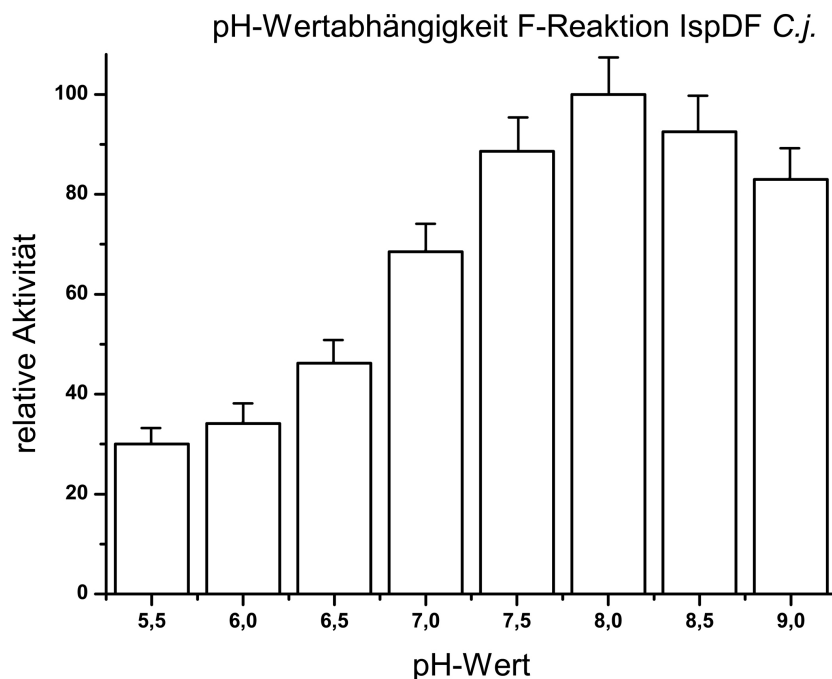


Abbildung 39: pH-Wert-Abhängigkeit der von IspDF aus *C. jejuni* katalysierten IspF-Reaktion.

Das pH-Wert-Optimum der von IspDF katalysierten IspF-Reaktion lag bei 8,0. Bei diesem pH-Wert wurde die Reaktion mit einer spezifischen Aktivität von $6,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ katalysiert. Ähnlich wie bei der IspD-Reaktion, führte eine Verschiebung des pH-Werts ins Basische zu einer langsamen Abnahme der relativen Aktivität (Abb. 39). Eine entsprechende Verschiebung des pH-Werts ins Saure führte zu einer stärkeren Abnahme der relativen Aktivität. Bei einem pH-Wert von 5,5 zeigte die IspF-Domäne nur noch eine relative Aktivität von 30 %.

Der Test der Metallionen-Abhängigkeit der IspF-Domäne von IspDF aus *C. jejuni* wurde mit unter 2.2.2.12 erläuterten IspF-Enzym-Assays durchgeführt. Getestet wurden die zweiwertigen Kationen Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} . Diese wurden den Assays jeweils in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Die Enzym-Assays wurden bei dem oben ermittelten pH-Wert Optimum von 8,0 durchgeführt.

Wie die IspD-Domäne zeigte auch die IspF-Domäne nur in Gegenwart zweiwertiger Metallionen enzymatische Aktivität. In einer Referenzprobe, in der durch 20 mM EDTA-Konzentration keine zweiwertigen Metallionen in Lösung waren, konnte IspDF

die Reaktion von **14** zu **15** nicht katalysieren (Tab. 20). Somit war klar, dass die von IspDF aus *C. jejuni* katalysierte IspF-Reaktion ebenso wie die IspD-Reaktion als Metallionen-abhängige Reaktion anzusehen ist.

Tabelle 20: Metallionen-Abhängigkeit der von IspDF aus *C. jejuni* katalysierten IspF-Reaktion.

Metallion	relative. Aktivität
Ca ²⁺	100
Mg ²⁺	94
Zn ²⁺	77
Co ²⁺	76
Mn ²⁺	64
Fe ²⁺	54
Cu ²⁺	<5
Ni ²⁺	<5
EDTA	<5

Detektionsgrenze: 5 % relative Aktivität

Im Gegensatz zur IspD-Domäne konnte die IspF-Domäne von IspDF in Gegenwart von Kupfer-bzw. Nickelkationen die entsprechende Reaktion nur sehr langsam mit relativen Aktivitäten von 5 % katalysieren (Tab. 20). Des Weiteren fällt auf, dass Kalzium- bzw. Magnesiumionen zu hohen Aktivitäten (100 % und 94 % rel. Aktivität, wobei 100 % rel. Aktivität einer spezifischen Aktivität von 6,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ entsprechen) führten, und zweiwertige Eisen- und Manganionen relative Aktivitäten von 50-60 % ergaben.

3.2.2.2 Kinetische Untersuchungen an der IspF-Domäne von IspDF aus *Campylobacter jejuni*

Da die IspF-Reaktion kein Cosubstrat benötigt, musste nur ein kinetischer NMR-Assay in Anlehnung an den unter 2.2.2.12 beschriebenen IspF-Assay durchgeführt werden, um die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für [1,3,4-¹³C₃]**14** zu bestimmen.

Dies geschah in Anwesenheit von 10 mM CaCl₂ bei einem pH-Wert von 8,0. Das Substrat [1,3,4-¹³C₃]**14** wurde in einer Konzentration von 20 μM eingesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von CaCl₂ in einer Endkonzentration von 10 mM. Die Inkubation wurde für 4 h bei 37 °C im NMR-Röhrchen spektroskopisch verfolgt. So konnten 30 NMR-Spektren jeweils 8 min lang aufgenommen werden. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M ließ sich unter Zuhilfenahme des Programms DynaFit (Kuzmic, 1996) für [1,3,4-¹³C₃]**14** zu 19 μM bestimmen. Sie lag damit nahe bei dem K_M-Wert für das Substrat [1,3,4-¹³C₃]**12** der IspD-Domäne von 20 μM.

3.2.3 Eigenschaften der IspD- und IspF-Domäne von IspDF aus *Campylobacter jejuni* im Vergleich

Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten der IspD- und IspF-Domäne fällt auf, dass die IspD-Reaktion mit 18,5 μmol*min⁻¹*mg⁻¹ etwa dreimal so schnell wie die IspF-Reaktion mit 6,6 μmol*min⁻¹*mg⁻¹ katalysiert wird (Tab. 21). Die ermittelten K_M-Werte für die jeweiligen Substrate liegen mit 20 μM (IspD-Reaktion) und 19 μM (IspF-Reaktion) deutlich näher zusammen (Tab. 21).

Tabelle 21: Kinetische Parameter der IspD- / IspF-Domäne aus *C. jejuni*.

Kinetischer Parameter	IspD Domäne	IspF Domäne
Spezifische Aktivität (μmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹)	19	7
Wechselzahl (s ⁻¹ pro Untereinheit)	13	5
K _m (μM) für CTP	3	–
K _m (μM) für 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat	20	–
K _m (μM) für 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat	–	19

Generell lässt sich sagen, dass die beiden Domänen des bifunktionellen Enzyms bei unterschiedlichen Bedingungen ihr jeweiliges Aktivitäts-Optimum besitzen. So ist die spezifische IspD-Aktivität mit pH 5,0 im leicht sauren am größten, die IspF-Aktivität bei pH 8,0. Ähnlich verhält es sich mit der Metallionen-Abhängigkeit: Für beide Enzym-Domänen ist die Gegenwart zweiwertiger Metallionen essentiell. Die IspD-Reaktion konnte mit allen getesteten Ionen hohe Umsatzraten erreichen. Die größte Aktivität wurde für Zn^{2+} gefunden, Zugabe von Mg^{2+} zeigte mit knapp 85 % die niedrigste Aktivität (Tab. 18). Im Gegensatz dazu war die IspF-Domäne bezüglich der zweiwertigen Metallionen selektiver. Anwesenheit von Cu^{2+} und Ni^{2+} führte nur zu geringer Aktivität. Die größten Umsatzraten wurden für Ca^{2+} und Mg^{2+} gemessen (Tab. 20).

3.2.4. Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat in 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit IspDF aus *C. jejuni* und IspE aus *E. coli*

Unter Verwendung des im Kapitel 2.2.2.13 beschriebenen Enzym-Assays sollte ermittelt werden, ob mit Hilfe des IspDF-Proteins aus *C. jejuni* die Umwandlung von **12** in **15** in ein und demselben Reaktionsansatz möglich ist. Prinzipiell ist dazu die Enzymaktivität der Proteine IspD, IspE und IspF nötig. Im konkreten Fall wurden IspDF aus *C. jejuni*, welches ja sowohl die IspD- wie auch die IspF-Reaktion katalysiert (3.2.1, 3.2.2), und IspE aus *E. coli* (Lüttgen *et al.*, 2000) für dieses Experiment verwendet. Vor und nach der mit ^{13}C -markiertem Substrat durchgeführten Reaktionen wurden NMR-Spektren aufgenommen (Abb. 40).

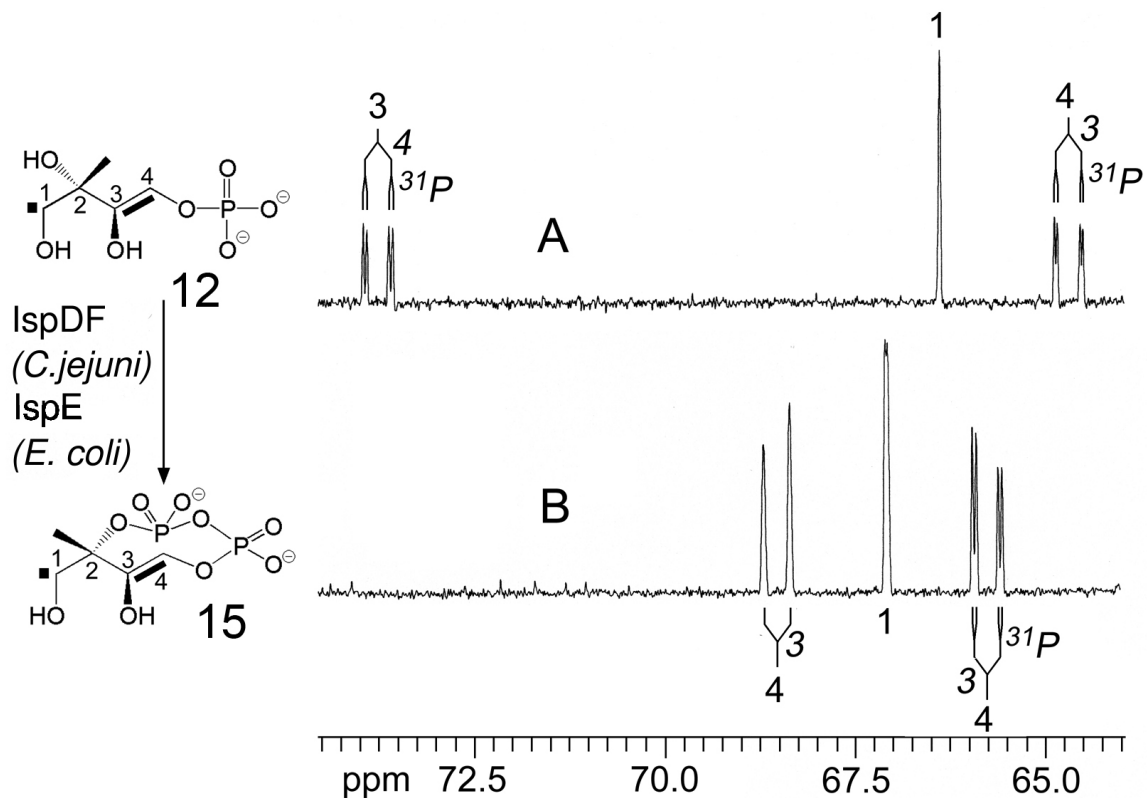


Abbildung 40: NMR-Spektren vor (A) und nach (B) Ablauf der IspDEF-Reaktionen sowie schematisierte Umwandlung von $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{12}$ in $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{15}$ (^{13}C -Markierung durch schwarze Balken dargestellt).

Das nach Beendigung der Enzymreaktionen aufgenommene NMR-Spektrum zeigt ausschließlich $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{15}$, was bedeutet, dass $\mathbf{12}$ mithilfe von IspDF und IspE direkt in $\mathbf{15}$ *in vitro* umgewandelt werden kann. Die Zwischenstufen der aufeinander folgenden IspDEF-Reaktionen, $\mathbf{13}$ und $\mathbf{14}$, akkumulierten nicht, und keine dieser drei Reaktionen führte zur Bildung eines Nebenprodukts. Das nicht direkt aufeinander folgende Reaktionen im Desoxyxylulosephosphat-Weg katalysierende IspDF-Protein aus *C. jejuni* kann also durch das IspE-Protein eines anderen Organismus (*E. coli*), welches die dazwischen liegende Reaktion (Abb. 40) katalysiert, so komplettiert werden, dass alle drei Reaktionen hintereinander *in vitro* ablaufen und zum gewünschten Produkt führen.

3.2.5 Vergleich der IspD- und IspF-Domäne des IspDF-Proteins aus *C. jejuni* mit orthologen Enzymen

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der IspD- bzw. IspF-Domäne des IspDF-Proteins aus *C. jejuni* mit denen von IspD- und IspF-Proteinen anderer Organismen ist in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Enzymaktivitäten der IspD- / IspF-Proteine aus verschiedenen Organismen.

Organismus	Spezifische Aktivität von IspD ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Spezifische Aktivität von IspF ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Referenz
<i>C. jejuni</i>	19	7	Diese Arbeit
<i>E. coli</i>	23	2.5	Schuhr <i>et al.</i> , 2001
<i>A. thaliana</i>	67	n.d.	Rohdich <i>et al.</i> , 2000
<i>P. falciparum</i>	n.d.	4	Rohdich <i>et al.</i> , 2001

IspDF aus *C. jejuni* katalysiert die IspD-Reaktion durchweg langsamer als die orthologen Enzyme aus *E. coli* bzw. *A. thaliana*. Der Unterschied bei der spezifischen Aktivität zum IspD-Protein aus *E. coli* ist relativ gering (83 % der Aktivität), zum IspD-Protein aus *A. thaliana* ist er mit nur 28 % der Aktivität recht deutlich.

Die spezifische Aktivität der IspF-Domäne ist generell höher als die der orthologen Enzyme, z.B. ist sie um den Faktor drei größer als die des IspF-Proteins aus *E. coli*.

4. Zusammenfassung

Der terminale Reaktionsschritt der Mevalonat-unabhängigen Biosynthese von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), den beiden Isoprenoidvorstufen, wird durch das Enzym 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase (IspH-Protein) katalysiert, welches auf dem *ispH* Gen codiert ist.

Zu Beginn dieser Arbeit konnte IspH-Protein aus *Escherichia coli* lediglich als rekombinantes Fusionsprotein mit Maltosebinde-Protein in aktiver Form hergestellt werden. Die *in vivo*-Synthese rekombinanten IspH-Proteins mit His₆-Taq (His₆-IspH) war zwar möglich, lieferte aber zum Großteil unlösliches, inaktives Enzym. Dies hatte zur Konsequenz, dass mit affinitätschromatographisch angereichertem His₆-IspH-Protein zwar dessen Funktion *in vitro* aufgeklärt werden, eine umfassende Charakterisierung des Proteins jedoch nicht erfolgen konnte.

Bei der 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase handelt es sich um ein Enzym, das in seinem aktiven Zentrum einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Wie einige andere Eisen-Schwefel-Proteine verhält sich auch IspH extrem sauerstoffsensitiv, bereits kurzzeitige Exposition am Luftsauerstoff führt zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Coexpression des *ispH* Gens zusammen mit dem *isc* Gencluster die *in vivo*-Synthese löslichen His₆-IspH-Proteins gesichert werden. Durch Affinitätschromatographische Anreicherung unter anaeroben Bedingungen wurde einem Verlust der enzymatischen Aktivität aufgrund von Sauerstoffkontakt vorgebeugt. Auf diese Weise war der Grundstein sowohl für eine biochemische wie auch für eine physikalische Charakterisierung des Enzyms gelegt.

Unter Zuhilfenahme von chemischer Eisenbestimmung und ESR-Spektroskopie ließ sich das Eisen-Schwefel-Zentrum des IspH-Proteins als [3Fe-4S]⁺-Cluster identifizieren. Die Stöchiometrie der IspH-Katalyse konnte insofern aufgeklärt werden, als dass IspH-Protein einen aus dem Lösungsmittel stammenden H_{Si}-Liganden in Position C-2 von IPP einfügt, und dass IPP und DMAPP etwa im Verhältnis von 6:1 entstehen. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für das Substrat der IspH-Reaktion wurde zu 30 μM bestimmt.

Das bifunktionelle IspDF-Protein des pathogenen Erregers *Campylobacter jejuni* katalysiert sowohl die Cytidilierung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol in Gegenwart von CTP (IspD-Reaktion), wie auch die Cyclisierung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat unter Eliminierung von CMP (IspF-Reaktion).

Bei der biochemischen Charakterisierung dieses bifunktionellen Enzyms stellte sich heraus, dass seine beiden Domänen unter durchaus verschiedenen Bedingungen ihre jeweils höchste spezifische Aktivität aufweisen. So liegt das pH-Wert-Optimum der IspD-Domäne bei 8,0, das der IspF-Domäne jedoch bei 5,0. Zwar weisen beide Protein-Domänen ähnliche K_M -Werte von 20 μM (IspD-Domäne) und 19 μM (IspF-Domäne) für ihre jeweiligen Substrate auf und benötigen zweiwertige Metallionen für enzymatische Aktivität, jedoch ist diese bei der IspD-Domäne in Gegenwart von Zn^{2+} , bei der IspF-Domäne in Gegenwart von Ca^{2+} am höchsten.

4.1 Ausblick

Die Enzyme IspH bzw. IspDF katalysieren Reaktionen im Desoxyxylulosephosphat-Weg zur Synthese der Isoprenoidvorstufen IPP und DMAPP. Da dieser Stoffwechselweg in vielen pathogenen Mikroorganismen, nicht aber im Menschen, abläuft, stellen diese Enzyme neue Targets für die Entwicklung neuartiger Antiinfektiva dar.

Durch die biochemische Charakterisierung beider Proteine wurde die Grundlage für die Entwicklung von High-Throughput-Screening Verfahren geschaffen.

Im Falle von IspH ist für strukturbasiertes Wirkstoffdesign die Aufklärung der dreidimensionalen Raumstruktur des Proteins notwendig. Zum Verständnis des Reaktionsmechanismus bedarf es weiterer ESR- und röntgenkristallographischer Untersuchungen.

5 Literaturverzeichnis

A

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.

Adam, P. (2002) *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu Terpenbiosynthesen und Stoffwechselnetzwerken.

Altincicek, B., Kollas, A.K., Sanderband, S., Hintz, M., Beck, E., Jomaa, H. (2001). *LytB*, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **499**, 37-40.

Altincicek, B., Duin, E.C., Reichenberg, A., Hedderich, R., Kollas, A.K., Hintz, M., Wagner, S., Wiesner, J., Beck, E., Jomaa, H. (2002). LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* **532**, 437-440.

Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10600-10605.

B

Bach, T. J. (1995). Some aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. A review. *Lipids* **30**, 191-202.

- Banthorpe, D. V., Charlwood, B. V., Francis, M. J. O. (1972). The biosynthesis of monoterpenes. *Chem. Rev.* **72**, 115-155.
- Beinert, H., Holm, R. H., Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-659.
- Berg, J. M. (2002). Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.
- Bertini, I., Ciurli, S., Luchinat, C. (1995). The electronic structure of FeS centers in proteins and models. A contribution to the understanding of their electron transfer properties. *Structure and Bonding* **83**, 1-53.
- Bloch, K. (1992). Sterol molecule: structure, biosynthesis and function, *Steroids* **57**, 378-382.
- Bochar, D., Friesen, A., Stauffacher, C. B., Rodwell, V. W. (1999). Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. *Comprehensive Natural Product Chemistry* **2**, 15-44.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
- Broers, S. T. J. (1994). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. Dissertation Nr. 10978, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz.
- Brumby, P. E., Massey, V. (1967). Determination of nonheme iron, total iron and copper. *Methods Enzymol.* **10**, 463-474.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-378.

Buzby, J. C., Roberts, T. (1997). Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales* **50**, 57-66.

C

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

Compton, S. J., Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* **151**, 369-374.

Cunningham, F. X. Jr., Lafond, T. P. T., Gantt, E. J. (2000). Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**, 5841-5848.

D

Daikoku, T., Kawaguchi, M., Takama, K., Suzuki, S. (1990). Partial purification and characterization of the enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* **58**, 2414-2419.

Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.

E

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. *Chem. Biol.* **5**, 221-233.

Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001). The deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* **6**, 78-84.

Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 1401-1426.

F

Fellermeier, M., Kis, K., Sagner, S., Maier, U., Bacher, A., Zenk, M. H. (1999). Cell-free conversion of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate and 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate into β -carotene in higher plants and its inhibition by fosmidomycin. *Tetrahedron Lett.* **40**, 2743-2746.

G

Gabrielsen, M., Rohdich, F., Eisenreich, W., Gräwert, T., Hecht, S., Bacher, A., Hunter, W. N. (2004). Biosynthesis of isoprenoids-A bifunctional IspDF protein from *Campylobacter jejuni*. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3028-3035.

Gräwert, T., Kaiser, J., Zepeck, F., Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Schramek, N., Schleicher, E., Weber, S., Haslbeck, M., Buchner, J., Rieder, C., Arigoni, D., Bacher A., Eisenreich, W., Rohdich, F. (2004). IspH protein of *Escherichia coli*: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 12847-12855.

Görg, A., Obermaier, C., Boguth, C., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053.

H

- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B., Babitzke, P., Kushner, S. (1989). New Method for Generating Deletions and Gene Replacements in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **171**, 4617-4622.
- Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2001). Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14837-14842.
- Hecht, S., (2002). Intermediate und Enzyme des alternativen Terpenbiosyntheseweges.
- Hecht, S., Amslinger, S., Jauch, J., Kis, K., Trentinaglia, V., Adam, P., Eisenreich, W., Bacher, A., Rohdich, F. (2002). Studies on the non-mevalonate isoprenoid biosynthetic pathway. Simple methods for preparation of isotope-labeled (E)-1-hydroxy-2-methylbut-2-enyl 4-diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **43**, 8929-8933.
- Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A., Rohdich, F. (2000). Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2486-2490.
- Hill, R. E., Sayer, B. G., Spenser, I. D. (1989). Biosynthesis of vitamin B₆: incorporation of D-1-deoxyxylulose. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1916-1917.
- 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. *Biochemical Journal* **366**, 573-583.

Hoffman, S. L., Subramanian, G. M., Collins, F. H. Venter, J. G. (2002). Plasmodium, human, and Anopheles genomics and malaria. *Nature* **415**, 702-709.

Holmes, D. S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193.

J

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

K

Kemp, L. E., Bond, C. S., Hunter, W. N. (2002). Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: an essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6591-6596.

Kemp, L. E., Bond, C. S., Hunter, W. N. (2003). Structure of a tetragonal crystal form of *Escherichia coli* 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase. *Acta Crystallographica, Section D* **59**, 607-610.

Kiley, P. J., Beinert, H. (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current opinion in microbiology* **6**, 181-185.

Kuemmerle, H. P., Murakawa, T., Sakamoto, H., Sato, N., Konishi, T., De Santis, F. (1985). Fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. Part II. 1. Human pharmacokinetics 2. Preliminary early phase IIa clinical studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **23**, 521-528.

Kuzmic, P. (1996). Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Analytical biochemistry* **237**, 260-273.

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

L

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

Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Zepeck, F., Kaiser, J., Richter, G., Schramek, N., Steinbacher, S., Huber, R., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F. (2004). Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2658-2669.

Lell, B., Ruangwearayut, R., Wiesner, J., Missinou, M. A., Schindler, A., Baranek, T., Hintz, M., Hutchinson, D., Jomaa, H., Kremsner, P. G. (2003). Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 735-758.

Leyes, A. E., Baker, J. A., Hahn, F. M., Dale, P. C. (1999). Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: stereochemistry of the reaction catalyzed by isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *Chemical Communications* **8**, 717-718.

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.

- Lichtenthaler, H. K., Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C. (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. *Z. Naturforsch.* **55**, 305-313.
- Loewenherz-Luning, K., Heitmann, M., Hildebrandt, G. (1996). Survey about the occurrence of *Campylobacter jejuni* in food of animal origin. *Fleischwirtschaft* **76**, 958-61.
- Lois, L. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K., Rohmer, M., Boronat, A. (1998). Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyses the synthesis of D-1-deoxyxylulose-5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12857-12862.
- Lottspeich, F. (1998). Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A., Eisenreich, W. (2000). Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1062-1067.

M

- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., Leon, P. (1996). CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* **9**, 649-658.
- Missinou, M. A., Borrmann, S., Schindler, A., Issifou, S., Adegnik, A. A., Matsiegui, P-B., Binder, R., Lell, B., Wiesner, J., Baranek, T., Jomaa, H., Kremsner, P. G. (2002). Fosmidomycin for malaria. *Lancet* **360**, 1941-1942.

Morlais, I., Mori, A., Schneider, J. R., Severson, D. W. (2003). A targeted approach to the identification of candidate genes determining susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. *Mol. Gen. Genom.* **269**, 753-764.

Mühlenhoff, U., Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics* **1459**, 370-382.

Mullis, K. B. (1990). Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft*.

N

Neal, K. R., Scott, H. M., Slack, R. C., Logan, R. F. (1996). Omeprazole as a risk factor for campylobacter gastroenteritis: case-control study. *British Medical Journal* **312**, 414-415.

Neidhardt, F. C. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*.

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.

O

Ollagnier, S., Mulliez, E., Schmidt, P. P., Eliasson, R., Gaillard, J., Deronzier, C., Bergman, T., Graslund, A., Reichard, P., Fontecave, M. (1997). Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 24216-24223.

P

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

Phillips, C. A. (1995). Incidence, epidemiology and prevention of foodborne *Campylobacter* species. *Trends in Food Science & Technology* **6**, 83-87.

R

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.

Rieder, C., Jaun, B., Arigoni, D. (2000). On the early steps of cineol biosynthesis in *Eucalyptus globulus*. *Helvetica Chimica Acta* **83**, 2504-2513.

Rohdich, F., Wungsintaweeikul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1999). Cytidine 5-triphosphate-dependant biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11758-11763.

Rohdich, F., Wungsintaweeikul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk, M. H., Bacher, A. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6451-6456.

Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001a). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 535-540.

Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001b). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1158-1163.

Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1158-1163.

Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Gräwert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. (2003). The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1586-1591.

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

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

Rosenthal, P-J. (2003). Antimalarial drug discovery: Old and new approaches. *J. Exp. Biol.* **206**, 3735-3744.

S

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

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Schäfer, H., Nau, K., Sickmann, A., Erdmann, R., Meyer, H. E. (2001). Identification of peroxisomal membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**, 2955-2968.
- Schlegel, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. *Thieme Verlag*.
- Schroeder, S. A. (2004). Tobacco Control in the Wake of the 1998 Master Settlement Agreement. *N. Engl. J. Med.* **350**, 293-301.
- Schuhr, C. A., Hecht, S., Klaus, K., Eisenreich, W., Wungsintaweeikul, J., Bacher, A., Rohdich, F. (2001). Studies on the non-mevalonate pathway - preparation and properties of isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Eur. J. Org. Chem.* **17**, 3221-3226.
- Schwarz, M., Arigoni, D. (1999). Ginkgolide biosynthesis. *Comprehensive natural product chemistry* **2**, 367-399.
- Schwender, J., Zeidler, J., Groner, R., Müller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F. W., Lichtenthaler, H. K. (1997). Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* **414**, 129-134.
- Seidel, G., Kiesevalter, J. (1992). Bakterielle Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen. Akademie Verlag **3**.
- Skirrow, M. B. (1990). Campylobacter. *Lancet* **336**, 921-923.
- Skirrow, M. B. (1991). Epidemiology of Campylobacter enteritis. *International Journal of Food Microbiology* **12**, 9-16.

Sprenger, G. A., Schorken, U., Wiegert, T., Grolle, S., de Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12857-12862.

Spurgeon, S. L., Porter, J. W. (1981). Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* 1, 1-46.

Steinbacher, S., Kaiser, J., Wungsintaweeikul, J., Hecht, S., Eisenreich, W., Gerhardt, S., Bacher, A., Rohdich, F. (2002). Structure of 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate Synthase Involved in Mevalonate-independent Biosynthesis of Isoprenoids. *Journal of Molecular Biology* **316**, 79-88.

Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology* **219**, 37-44.

T

Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., Seto, H. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9879-9884.

Takahashi, Y., Tokumoto, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277**, 28380-28383.

Tokumoto, U., Takahashi, Y. (2001). Genetic analysis of the isc operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem.* **130**, 63-71.

W

Wade, M. M., Zhang, Y. (2004). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Biosci.* **9**, 975-994.

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

Wiesner, J., Borrmann, S., Jomaa, H. (2003). Fosmidomycin for the treatment of malaria. *Parasitol. Res.* **90**, 71-76.

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

Z

Zamenhof, P. J., Villarejo, M. (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase fragments in vivo. *Journal of Bacteriology* **110**, 171-8.

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

Zepeck, F., Gräwert, T., Kaiser, J., Schramek, N., Eisenreich, W., Bacher, A., Rohdich, F. (2005). Biosynthesis of Isoprenoids. Purification and Properties of IspG Protein from *Escherichia coli*. *J Org Chem.* **70**, 9168-9174.

