

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München

## **Intermediate und Enzyme des alternativen Terpenbiosyntheseweges**

**Stefan Hermann Karl Hecht**

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

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Priv.-Doz. Dr. Th. Hofmann
3. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 22.01.02 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 07.05.02 angenommen.

*Für meine Eltern*

*Unser Universum wäre betrüblich unbedeutend,  
hätte es nicht jeder Generation neue Probleme zu bieten.*

*Seneca*

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von April 1999 bis Oktober 2001 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

## Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. A. Bacher danke ich besonders für die interessante Themenstellung, die herzliche Unterstützung, für die Möglichkeit meine Ideen zu verwirklichen und für das stete Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. W. Eisenreich möchte ich für die Einführung in die experimentelle NMR-Spektroskopie, die gute Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Dr. F. Rohdich danke ich für die Einführung in die Molekularbiologie, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und für die Erledigung aller Patentangelegenheiten.

Ferner gilt mein Dank:

Meinem ehemaligen Laborkollegen Dr. C. A. Schuhr für die enge und fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Terpengebiet und die zahlreichen Diskussionen über Politik, die den Laboralltag aufheiterten.

Frau I. Obersteiner für das angenehme Arbeitsklima im Labor und für die Hilfe bei den zahlreichen enzymatischen Synthesen.

Herrn F. Wendling für die professionelle Hilfe bei allen HPLC- und Computerproblemen.

C. Schwarz, H. Hofner, M. Weinhold und K. Gärtner für die vielen kleinen Hilfestellungen.

Meinen Auszubildenden Christiane und Viola für ihre Unterstützung bei den praktischen Aufgaben im Labor.

Dem „3 Mädchenlabor“ für die Versorgung mit Süßigkeiten, die Bereitstellung ihres Rechners und die lustigen Unterhaltungen.

Herrn Dr. K. Kis und Herrn Dr. J. Jauch für ihre Hilfe bei allen synthetischen Problemen.

Herrn Dr. M. Gütlich für die Unterstützung im Lipstatinprojekt und für die vielen freundschaftlichen Diskussionen.

Dr. N. Schramek, R. Mühlberger, E. Schleicher, R. Robelek für die zahlreichen Diskussionen und der erfolgreichen Klärung mancher Probleme.

Herrn Dr. K. Kammhuber (Bayrische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Abteilung Hopfen, Wolnzach) für die Bereitstellung von Hopfenpflanzen für die Isotopeinbaustudien.

Herrn Dr. J. Rainer, Dr. B. Gallasch und Herrn M. Glässner (alle Universität Bayreuth) für die Interpretation und Aufnahme von Massenspektren.

Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Terpengruppe, P. Adam, S. Amslinger, S. Bathe, Dr. W. Eisenreich, Dr. S. Herz, Dr. K. Kis, Dr. C. Krieger, T. Radykewicz, Dr. F. Rohdich, Dr. C. A. Schuhr und Dr. J. Wungsintaweeikul für zahlreiche Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima.

Frau P. Adam, Herrn Dr. W. Eisenreich, Herrn Dr. F. Rohdich, Herrn S. Bathe und meinen Eltern für die Korrektur meiner Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises für das angenehme Arbeitsklima.

Publikationsliste:

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

Steinbacher, S., Kaiser, J., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Eisenreich, W., Gerhardt, S., Bacher, A., Rohdich, F. Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate independent biosynthesis of isoprenoids, *J. Mol. Biol.*, in press.

Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2001). Studies on the non-mevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 14837-14842.

Hecht, S., Wungsintaweekul, J., Rohdich, F., Kis, K., Radykewicz, T., Schuhr, C. A., Eisenreich, W., Richter, G. and Bacher, A. (2001). Biosynthesis of terpenoids. Efficient multistep biotransformation procedures affording isotope-labelled 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate using recombinant 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase. *J. Org. Chem.*, 66, 7770-7775.

Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Amslinger, S., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Rohdich, F., Bacher, A. (2001): Enzyme-assisted preparation of isotope-labeled 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *J. Org. Chem.*, 66, 3948-3952.

Schuhr, C. A., Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Bacher, A. and 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.*, 3221-3226.

Rohdich, F., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Bacher, A. (2001). Biosynthesis of terpenoids: 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.*, 268, 3190-3197.

Wungsintaweekul, J., Herz, S., Hecht, S., Eisenreich, W., Feicht, R., Rohdich, F., Bacher, A., Zenk, M. H. (2001). Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 268, 310-316.

Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, S., Wungsintaweeikul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Kis, K., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Zenk, M. H. (2001). Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis: the role of 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate in plants. *Eur. J. Biochem.*, 268, 6302-6310.

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

Herz, S., Wungsintaweeikul, 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.

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., Schuhr, C. A., Hecht, S., Herz, S., Wungsintaweeikul, J., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. (2000). Biosynthesis of isoprenoids. A rapid method for the preparation of isotope labeled 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 9571-9574.



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Geräte</b>	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Enzymatische Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat</b>	<b>11</b>
2.3.1.1	Darstellung von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Dihydroxyacetonphosphat	11
2.3.1.2	Darstellung von [2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	12
2.3.1.3	Darstellung von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	12
2.3.1.4	Darstellung von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	13
2.3.1.5	Darstellung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	13
2.3.1.6	Darstellung von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Glucose	13
2.3.1.7	Darstellung von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , 5- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	14
2.3.1.8	Darstellung von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , 4- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	14
2.3.1.9	Darstellung von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , 3,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	14
2.3.1.10	Reinigung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	15
<b>2.3.2</b>	<b>Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose aus 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat für Einbauversuche an <i>E. coli</i></b>	<b>15</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Umsetzung von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit D-Xylulokinase aus <i>E. coli</i></b>	<b>16</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Enzymatische Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat</b>	<b>16</b>
2.3.4.1	Darstellung von [2,2'- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat	16
2.3.4.2	Darstellung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat	17
2.3.4.3	Darstellung von [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat	17
2.3.4.4	Reinigung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat	18
<b>2.3.5</b>	<b>Enzymatische Synthese von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol</b>	<b>18</b>
2.3.5.1	Darstellung von [2,2'- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol	18
2.3.5.2	Darstellung von [1,2,2',3,4- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol und [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol	18
2.3.5.3	Reinigung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol	19
<b>2.3.6</b>	<b>Enzymatische Synthese von 2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol</b>	<b>19</b>
2.3.6.1	Darstellung von [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol	19
2.3.6.2	Darstellung von [1,2,2',3,4- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol	20
2.3.6.3	Reinigung von 2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol	20
<b>2.3.7</b>	<b>Enzymatische Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat</b>	<b>20</b>
2.3.7.1	Darstellung von [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat	20
2.3.7.2	Darstellung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat	21
2.3.7.3	Darstellung von [2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat	22

2.3.7.4	Reinigung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat	22
<b>2.3.8</b>	<b>Umsetzung von [1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2-Phospho-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat mit IspF-Protein aus <i>Plasmodium falciparum</i></b>	<b>23</b>
<b>2.3.9</b>	<b>Inkorporationsversuche mit isotopmarkierter 1-Desoxy-D-xylulose</b>	<b>23</b>
2.3.9.1	Einbauversuch von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylB	23
2.3.9.2	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC	24
2.3.9.3	Einbauversuch von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispCispDispF	25
2.3.9.4	Einbauversuch von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispCispDispF unter Zugabe von Additiven	25
2.3.9.5	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-F unter Zugabe von Additiven	25
2.3.9.6	Einbauversuche mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-F pACYCgcpE	26
2.3.9.7	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-FgcpE	26
2.3.9.8	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-FgcpE unter Zugabe von Additiven	27
2.3.9.9	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-FlytB	28
2.3.9.10	Einbauversuch von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Mevalonsäure mit <i>E. coli</i> XL1-pBSpmkmdv	28
2.3.9.11	Einbauversuch von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Mevalonsäure mit <i>E. coli</i> XL1-pACYCpmkmdv	28
2.3.9.12	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose mit <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-FgcpElytB unter Zugabe von Additiven	29
2.3.9.13	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Glucose an <i>E. coli</i> pNCodxs	29
2.3.9.14	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Glucose an <i>E. coli</i> pACYCdxs	30
2.3.9.15	Einbauversuch von [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Glucose an <i>E. coli</i> pACYCdxsxylylBispC	30
<b>2.3.10</b>	<b>Inkorporationsexperiment von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Leucin an Hopfendolden</b>	<b>31</b>
<b>2.3.11</b>	<b>Einbau von <sup>18</sup>O<sub>2</sub> an Hopfendolden im Freilandversuch</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Der alternative Biosyntheseweg zu Terpenen</b>	<b>35</b>
3.1.1	Markierung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat mit stabilen und radioaktiven Isotopen	35
3.1.2	Synthese von <sup>2</sup> H- und <sup>13</sup> C-doppelmakiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	42
3.1.3	Die D-Xylulokinase katalysiert die Phosphorylierung von 1-Desoxy-D-xylulose zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat	47
3.1.4	Synthese von isotopmarkiertem 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat	49
3.1.5	Darstellung von isotopmarkiertem 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol	51
3.1.6	Das IspE-Protein katalysiert die Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat	53
3.1.7	Synthese von isotopmarkiertem 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat	56

<b>3.1.8</b>	<b>Das IspF-Protein katalysiert die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat</b>	<b>58</b>
<b>3.1.9</b>	<b>Synthese von isotopmarkiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat</b>	<b>61</b>
<b>3.1.10</b>	<b>Die enzymatische Reaktion des IspF-Proteins aus <i>Plasmodium falciparum</i></b>	<b>64</b>
<b>3.1.11</b>	<b>Die katalytischen Aktivitäten der GcpE- und LytB-Proteine</b>	<b>68</b>
3.1.11.1	Aufbau eines <i>in vivo</i> Assays zum Nachweis der Genfunktionen von <i>gcpE</i> und <i>lytB</i>	68
3.1.11.2	<i>In vivo</i> Umsetzung von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylB	69
3.1.11.3	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC	71
3.1.11.4	<i>In vivo</i> Umsetzung von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispCispDispF	74
3.1.11.5	<i>In vivo</i> Umsetzung von [3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol unter Zugabe von Additiven	75
3.1.11.6	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-F	76
3.1.11.7	<i>In vivo</i> Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose zu einem neuen Intermediat in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-F pACYCgcpE	79
3.1.11.8	Identifizierung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat	79
3.1.11.9	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-FgcpE	82
3.1.11.10	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat unter Zugabe von Additiven	82
3.1.11.11	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-FlytBgcpE unter Zugabe von Additiven	84
3.1.11.12	<i>In vivo</i> Umsetzung von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Mevalonsäure zu [4- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]IPP in <i>E. coli</i> XL1-pBSpmkmdv und <i>E. coli</i> XL1-pACYCpmkmdv	84
3.1.11.13	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose zu [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]IPP und [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]DMAPP in <i>E. coli</i> XL1-pBSXylBispC-FgcpElytB unter Zugabe von Additiven	85
<b>3.2</b>	<b>Biotechnologische Aspekte</b>	<b>92</b>
3.2.1	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Glucose zu [U- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in <i>E. coli</i> XL1-pNCodxs	92
3.2.2	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Glucose in <i>E. coli</i> XL1-pACYCdxs	93
3.2.3	<i>In vivo</i> Umsetzung von [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Glucose in <i>E. coli</i> XL1-pACYCdxsXylBispC	93
<b>3.3</b>	<b>Biosynthese terpenoider Bitterstoffe in Hopfendolden</b>	<b>95</b>
3.3.1	<sup>18</sup> O <sub>2</sub> Einbau in Hopfendolden im Freilandversuch	97
3.3.2	[U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]Leucin Einbau in Hopfendolden	101

<b>4 Diskussion</b>	<b>104</b>
<b>4.1 Der alternative Terpenbiosyntheseweg</b>	<b>104</b>
<b>4.1.1 Enzymatische Synthese von isotopmarkierten Intermediaten des alternativen Terpenbiosynthesewegs</b>	<b>104</b>
<b>4.1.2 Die enzymatischen Reaktionen der IspE- und IspF-Proteine</b>	<b>106</b>
<b>4.1.3 Die enzymatische Reaktion des IspG-Proteins</b>	<b>107</b>
<b>4.1.4 Die katalytische Aktivität des IspH-Proteins</b>	<b>112</b>
<b>4.2 Biotechnologische Aspekte</b>	<b>116</b>
<b>4.3 Biosynthese von Humulon</b>	<b>117</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
COSY	correlated spectroscopy
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
$\delta$	chemische Verschiebung
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie/ -chromatogramm
DTT	Dithiothreitol
dd	Doppeldublett
DHAP	Dihydroxyaceton-3-phosphat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
Dxr	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI	electron impact
GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GcpE	vom Gen <i>gcpE</i> codiertes Protein, IspG
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high pressure / performance liquid chromatograph
Hz	Hertz
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
LytB	vom Gen <i>lytB</i> codiertes Protein, IspH

m	Multiplett
M	molar
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert)
n. b.	nicht bestimmt
NMR	nuclear magnetic resonance / magnetische Kernresonanz
PEP	3-Phosphoenolpyruvat
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
q	Quartett
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RP	reversed phase / Umkehrphase
s	Singulett
t	Triplett
TBAS	Tetrabutylammoniumsulfat
TOCSY	total correlation spectroscopy
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	vollständig (uniformly)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
YchB	vom Gen <i>y</i> chB codiertes Protein, IspE
YgbB	vom Gen <i>y</i> gbB codiertes Protein, IspF
YgbP	vom Gen <i>y</i> gbP codiertes Protein, IspD

# 1 Einleitung

Mit mehr als 25000 bekannten Verbindungen (Sacchetti und Poulter, 1997) gehören Terpene zu einer der größten Naturstoffklassen. Die biologischen Funktionen und die Anwendungsmöglichkeiten dieser Substanzen sind sehr vielfältig. So wird die Phytolseitenkette von Chlorophyll, eines der häufigsten, natürlich vorkommenden organischen Moleküle, benötigt, um den Photorezeptor in der Membran zu verankern. Carotinoide, wie  $\beta$ -Carotin finden als Lichtschutzpigmente in Pflanzen Verwendung und haben als Antioxidantien große wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Steroide wie Cholesterin sind Bestandteile der Zellmembranen von eukaryontischen Zellen (Abbildung 1).

Die meisten Terpene stammen aus dem Pflanzenreich und werden der Klasse der Sekundärstoffe zugeordnet. Als einer der wichtigsten Vertreter ist das Diterpen Taxol zu nennen. Es wird bei der chemotherapeutischen Behandlung von Krebs verwendet (Abbildung 1).

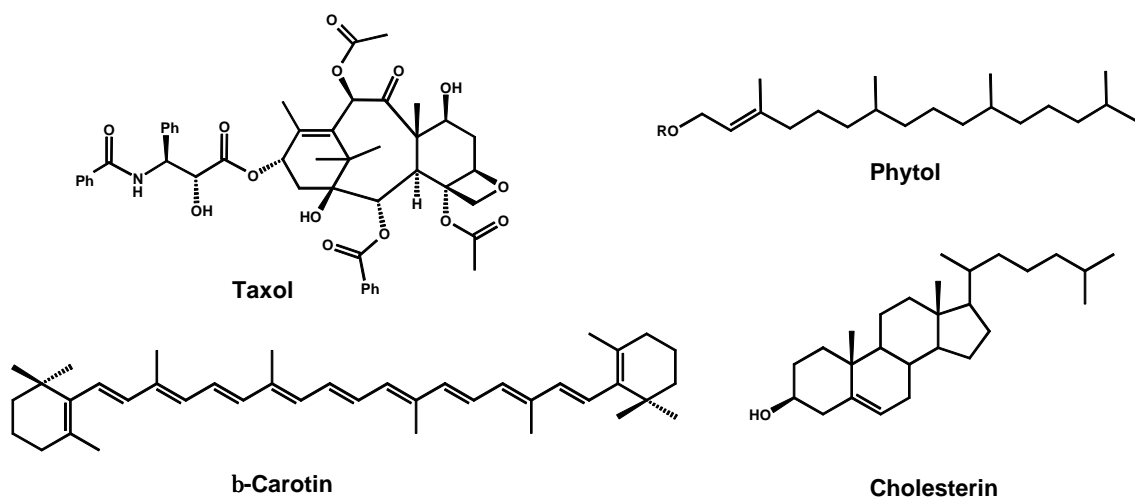


Abbildung 1: Auswahl wichtiger Vertreter von Terpenen

Eine weitere Anwendung finden Terpene in Lebensmitteln. Ein Beispiel ist Humulon, ein aus Hopfendolden stammendes Terpen, das maßgeblich für den bitteren Geschmack und die Stabilität des Bieres verantwortlich ist.

Die Biosynthese aller höheren Terpene (Review: Rohmer, 1999) erfolgt durch Kondensation von Isopentenylidiphosphat (IPP) mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zu Geranylidiphosphat. Durch mehrmalige Addition von IPP wird aus diesem zunächst Farnesylidiphosphat und anschließend Geranylgeranioldiphosphat gebildet (Abbildung 2).

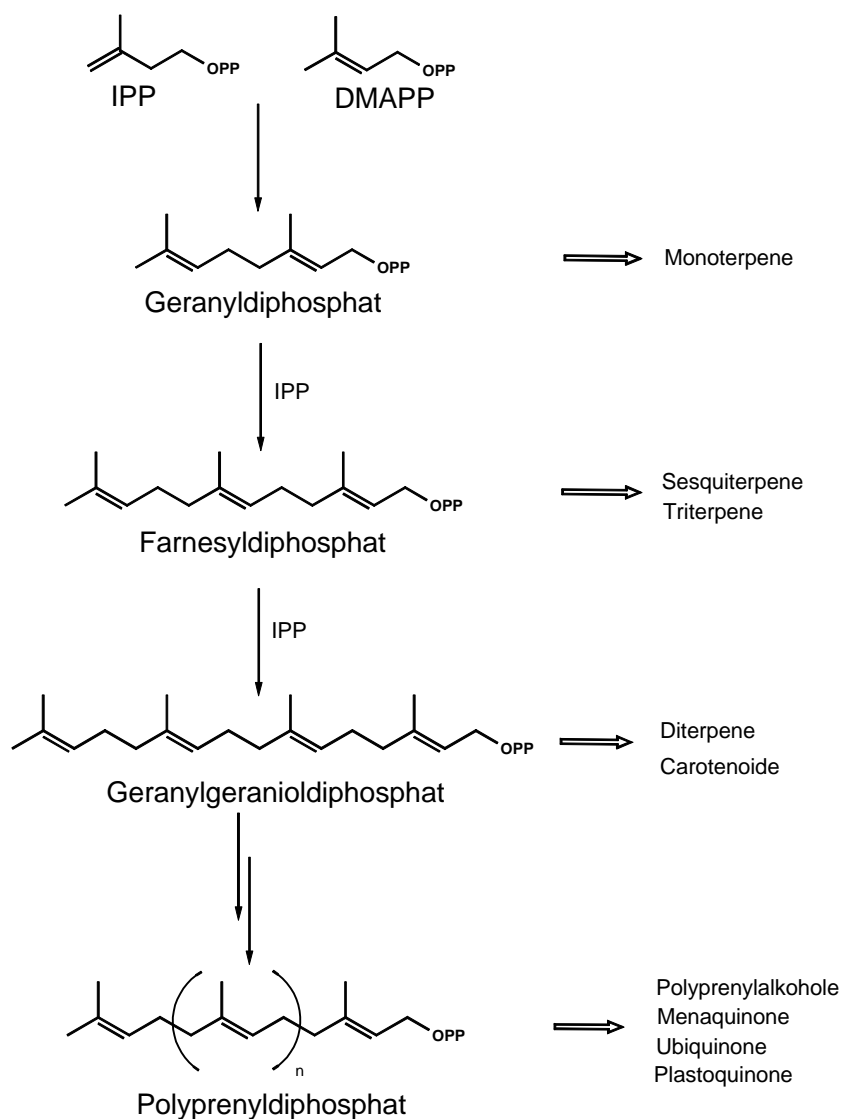


Abbildung 2: Biosynthese der höheren Isoprenoide ausgehend von DMAPP und IPP



Ausgehend von den so erzeugten Grundstrukturen (vgl. Abbildung 2) wird durch Oxidationen, Umlagerungen und Cyclisierungen die hohe Diversität von Terpenen erzielt (Review: Rohmer, 1999).

Durch Arbeiten von Bloch, Lynen und Cornforth (Spurgeon und Porter, 1981) konnte gezeigt werden, daß die Biosynthese von IPP und DMAPP (Reviews: Bloch, 1992; Bochar *et al.*, 1999; Bach, 1995) ausgehend von Acetat über Mevalonat erfolgt (Abbildung 3). Hierbei reagieren im ersten Schritt zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Aus diesem wird durch Kondensation mit einem weiteren Acetyl-CoA Molekül 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA gebildet, welches zu Mevalonsäure reduziert wird. Dieses wird im Anschluß daran über zwei Stufen pyrophosphoryliert. Im letzten Reaktionsschritt wird die verbleibende OH Gruppe phosphoryliert und unter Eliminierung der neu entstandenen Phosphatgruppe decarboxyliert, wodurch IPP entsteht. Dieses steht über eine durch die Isopentenylidiphosphat Isomerase katalysierte Reaktion im Gleichgewicht mit DMAPP (Abbildung 3).

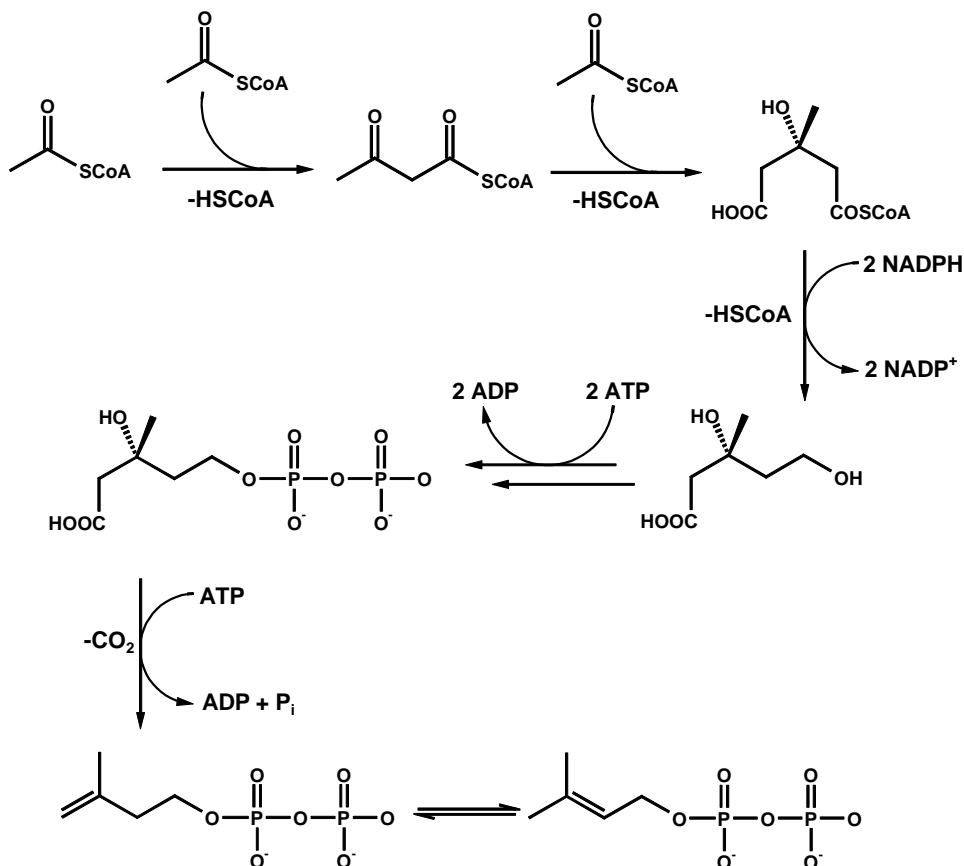


Abbildung 3: Biosyntheschema von IPP und DMAPP ausgehend von Acetyl-CoA

Über Jahrzehnte hinweg war man der Ansicht, daß IPP und DMAPP ausschließlich über den beschriebenen Biosyntheseweg (Abbildung 3) gebildet werden. Allerdings häuften sich Befunde, die dazu im Widerspruch standen. So wurde markiertes Mevalonat bzw. Acetat nicht oder nur mit sehr niedrigen Einbauraten ( $> 0.01\%$ ) in Carotine, Monoterpene und Diterpene von Pflanzen eingebaut (Banthorpe *et al.*, 1972). Da die Biosynthese dieser Sekundärstoffe in den Plastiden lokalisiert ist, wurde vermutet, daß die Zellkompartimente für die applizierten Stoffe undurchlässig sind.

Ferner konnte durch Inhibierung der Mevalonsäurebildung kein Effekt auf die Biosynthese von Chlorophyll oder Carotinoiden beobachtet werden, während die Sterolbiosynthese, die im Cytoplasma stattfindet, weitgehendst unterdrückt wurde (Reviews: Rohmer, 1999; Eisenreich *et al.*, 1998). Diese Daten deuteten darauf hin, daß es in Pflanzen zwei unabhängige, im Cytoplasma und in den Plastiden lokalisierte Biosynthesewege für IPP und DMAPP gibt. Durch Einbauversuche mit stabilisotopmarkierten Vorstufen konnten Rohmer und Arigoni (Rohmer, 1993; Schwarz 1994; Broers 1994) beweisen, 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 Terpenbiosyntheseweg bezeichnet und im folgenden näher erläutert.

Durch Einbauversuche von  $^2\text{H}$ -markierter 1-Desoxy-D-xylulose an *E. coli* konnte gezeigt werden, daß die Biosynthese von IPP und DMAPP von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ausgeht (Broers 1994), welches aus D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  gebildet wird (Abbildung 4). Diese Reaktion wird von der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase katalysiert, welche zuerst aus *E. coli* isoliert wurde (Sprenger *et al.*, 1997, Lois *et al.*, 1998).

Im nächsten Schritt erfolgt eine Gerüstumlagerung und eine NADPH abhängige Reduktion zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (Takahashi *et al.*, 1998). Diese Reaktion wird von der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (später in IspC-Protein umbenannt) katalysiert.

Der dritte bekannte Schritt ist die Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (vgl. Abbildung 4). Diese Reaktion wird von der 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase, codiert durch das *ispD* Gen, katalysiert. Hierbei erfolgt

ein Transfer eines Cytidylrestes auf 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat unter Abspaltung von Pyrophosphat (Rohdich *et al.*,1999, Kuzuyama 2000b).

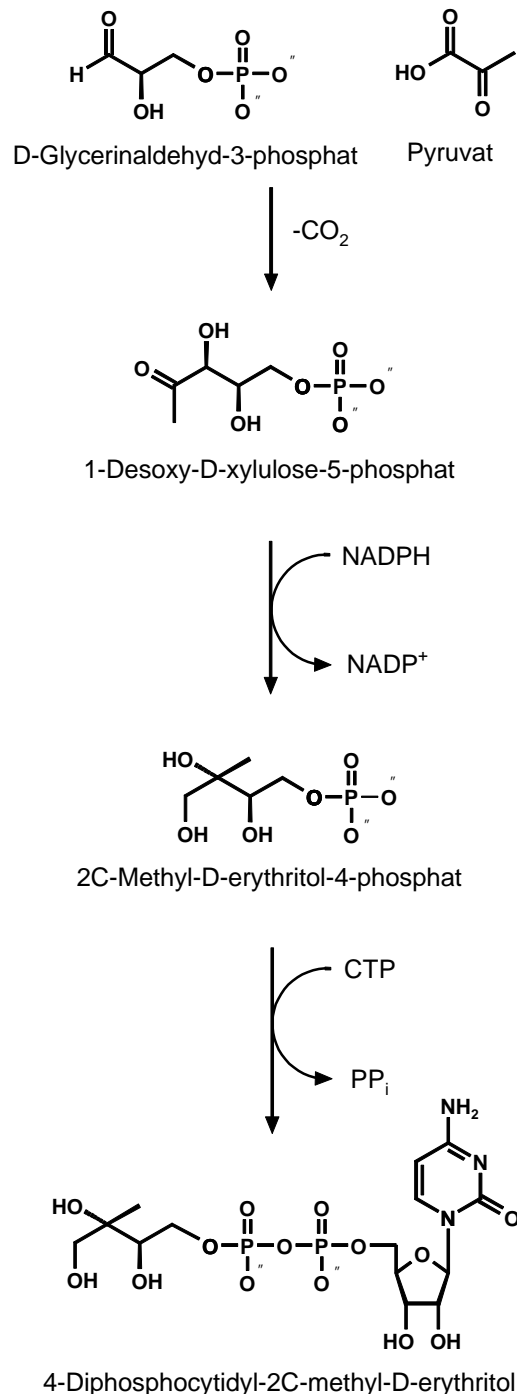


Abbildung 4: Die ersten Schritte des alternativen Terpenbiosyntheseweges

Durch Hemmung der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase konnte gezeigt werden, daß  $^{13}\text{C}$ -markiertes IPP in isolierten Drüenschuppen von Pfefferminzpflanzen angehäuft werden kann, wenn  $^{13}\text{C}$ -markiertes Pyruvat verfüttert wird (McCaskill und

Croteau, 1999). Ferner konnte DMAPP als Vorläufer von IPP ausgeschlossen werden (Arigoni *et al.*, 1999). Diese Daten belegten, daß die Endprodukte des alternativen Terpenbiosyntheseweges IPP und DMAPP sein mußten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *Materialien*

Sämtliche verwendete Chemikalien wurden bei kommerziellen Anbietern, insbesondere bei Fluka (CH), Sigma-Aldrich (D) und Merck (D) erworben.

Stabilisotopmarkierte Verbindungen stammten von Cambridge Isotope (USA), Omicron (USA) oder Isotec (USA).

Radioaktives Pyruvat wurde bei NEN (USA) gekauft.

### Verwendete Kulturmedien

Die Bestandteile der Medien wurden in deionisiertem Wasser gelöst. Die Medien wurden durch Autoklavieren (121 °C, 1.3 bar, 25 min) sterilisiert.

Die benötigten Phosphate wurden getrennt autoklaviert und zu dem erkalteten Medium gegeben.

LB-Medium (Luria Bertani): Für einen Liter LB-Medium wurden 10 g Casein Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl verwendet.

TB-Medium (Terrific Broth): Für einen Liter TB-Medium wurden 12 g Casein Hydrolysat, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, 2.31 g Kaliumdihydrogenphosphat und 12.54 g Dikaliumhydrogenphosphat verwendet.

## Verwendete Enzyme

**Tabelle 1: Verwendete Enzyme**

<i>Enzym</i>	<i>EC-Nummer</i>	<i>Quelle</i>
Hexokinase	2.7.1.1	Hefe
Glucose-6-phosphatisomerase	1.1.1.49	Hefe
Phosphofruktokinase	2.7.1.11	Kaninchenmuskel
Aldolase	4.1.2.13	Kaninchenmuskel
Triosephosphatisomerase	5.3.1.1	Kaninchenmuskel
Pyruvatkinase	2.7.1.40	Kaninchenmuskel
Acetatkinase		<i>E. coli</i>
Glucosedehydrogenase	1.1.1.47	<i>Bacillus megaterium</i>
Nucleosidmonophosphatkinase	2.7.4.4	Rinderleber
Nucleosiddiphosphatkinase	2.7.4.6	Hefe
1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase	-	<i>B. subtilis</i> (Expression in <i>E. coli</i> )
1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat- Reduktoisomerase	-	<i>E. coli</i>
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D- erythritol Synthase (IspD)	-	<i>E. coli</i>
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D- erythritol Kinase (IspE)	-	<i>E. coli</i>
2C-Methyl-D-erythritol-2,4- cyclodiphosphat Synthase (IspF)	-	<i>E. coli</i>
D-Xylulokinase	-	<i>E. coli</i>
Alkalische Phosphatase	3.1.3.1	Rindermagenschleimhaut

Die käuflichen Enzyme in Tabelle 1 stammten von Sigma, Fluka und Boehringer Mannheim. Die nicht kommerziell erhältlichen Enzyme wurden an unserem Lehrstuhl erzeugt (Wungsintaweeikul, 2001b; Herz, 2000b; Amslinger, unveröffentlicht).

## Verwendete Klone

**Tabelle 2: Verwendete Klone**

<i>Stamm</i>	<i>Exprimierte Proteine</i>
XL1-pBsXylB <sup>1</sup>	XylB aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispC <sup>1</sup>	XylB und IspC aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispCispDispF <sup>1</sup>	XylB, IspC, IspD und IspF aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispC-F <sup>1</sup>	XylB, IspC, IspD, IspE und IspF aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispC-FgcpE <sup>1</sup>	XylB, IspC, IspD, IspE, IspF und GcpE aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispC-FgcpElytB <sup>1</sup>	XylB, IspC, IspD, IspE, IspF, GcpE und LytB aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispC-FlytBgcpE <sup>1</sup>	XylB, IspC, IspD, IspE, IspF, LytB und GcpE aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispC-FlytB <sup>1</sup>	XylB, IspC, IspD, IspE, IspF und LytB aus <i>E. coli</i>
XL1-pBsXylBispC-FpACYCgcpE <sup>1</sup>	XylB, IspC, IspD, IspE, IspF und GcpE aus <i>E. coli</i>
XL1-pBspmkmkmdv <sup>1</sup>	Pmk, Mk, Mdv
XL1-pACYCpmkmkmdv <sup>1</sup>	Pmk, Mk, Mdv
XL1-pNCOdxs <sup>2</sup>	Dxs aus <i>B. subtilis</i>
XL1-pACYCdxs <sup>1</sup>	Dxs aus <i>B. subtilis</i>
XL1-pACYCdxsXylBIspC <sup>1</sup>	Dxs aus <i>B. subtilis</i> , xylB und IspC aus <i>E. coli</i>

<sup>1</sup> Kloniert von Dr. F. Rohdich

<sup>2</sup> Kloniert von S. Herz (Herz, 2000b)

## **2.2 Geräte**

### **Gefriertrocknung**

Gefriertrockner Alpha 1-4 von Christ (D) mit angeschlossener Chemie-Hybrid-Pumpe RC5 von Vacuubrand (D).

## **HPLC**

Als HPLC System wurde eine computergestützte Anlage von Knauer (Zehlendorf, Berlin, Deutschland) bestehend aus einer K-1001 Pumpe, einem UV-Detektor K-2600 sowie einem Solvent Organizer K-1500 inklusive Degasser verwendet. Weiterhin war das System mit einem Radioaktivitätsdetektor  $\beta$ -Ram von IN/US Systems bzw. Biostep (D) ausgestattet, das mit einer CaF-Zelle Durchlaufzelle (0.4 ml) verbunden war.

## **Ultraschallgerät**

Der Aufschluß von Bakterien erfolgte mit Hilfe eines Ultraschallgerätes von Branson Sonifier 250 (Branson SONIC Power). Die Leistung wurde bei einer Kontrollstellung 4 auf 90 % eingestellt.

## **Radioaktivitätsmessungen**

Radioaktivitäten gelöster oder flüssiger Verbindungen wurden mit einem Flüssig-Szintillationszähler LS 7800 von Beckman (USA) bestimmt.

## **UV / Vis-Spektroskopie**

Zur Bestimmung von Absorptionsspektren und Extinktionskoeffizienten wurde ein Ultrospec 2000 Spektrometer von Amersham Pharmacia Biotech (D) verwendet.

## **NMR-Spektroskopie**

Für die  $^1\text{H}$ -,  $^2\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Kernresonanzspektroskopie standen verschiedene Geräte von Bruker mit einer Magnetfeldstärke von 200, 360, 400 und 500 MHz zur Verfügung. Letzteres wurde vorzugsweise benutzt und lieferte bei 11.75 Tesla  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenzen von 500.13 MHz und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzfrequenzen von 125.77 MHz.



Für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurde ein  $^{13}\text{C}$ - /  $^1\text{H}$ -Dualprobenkopf verwendet. Für alle zweidimensionalen Experimente mit Detektion von Protonen wurde ein inverser  $^1\text{H}$ - /  $^{13}\text{C}$ - /  $^{15}\text{N}$ -Tripelresonanzprobenkopf benutzt. Eindimensionale Spektren wurden am rotierenden (20 Hz), mehrdimensionale Spektren dagegen am stehenden Röhrrchen gemessen. Die Proben lagen in der Regel bei 300 K in deuterierten Solvenzien gelöst (vor allem  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) in 5 mm NMR-Röhrrchen vor.

Die Spektrenaufnahme und –bearbeitung erfolgte mit einer Bruker-Standardsoftware (XWINNMR 1.3 bzw. 1D/2D-WINNMR 5.0). Die Simulation von Signalen wurde mit NMRSIM (Bruker) durchgeführt.

Bei den eindimensionalen Experimenten wurde der Datensatz mit einer Gauß-Lorentz-Funktion multipliziert (gb: 0.01-0.2, lb: –1 bis –2).

## **Direkteinlaß/Hochauflösende-Massenspektrometrie**

Die Messungen wurden an der Universität Bayreuth an einem Finnigan MAT 8500 durchgeführt. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV, als Datensystem diente ein MAT SS 300, das Injektionsvolumen betrug 0,4-0,6  $\mu\text{l}$  einer 2 %igen Probenlösung.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Enzymatische Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat**

#### **2.3.1.1 Darstellung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Dihydroxyacetonphosphat**

Eine Suspension bestehend aus 3.2 mmol (1.9 g) Dihydroxyacetonphosphat-ethylhemiacetal (Bariumsalz) und 19 ml Dowex 50WX8-Harz ( $\text{H}^+$ -Form) in 44 ml Wasser wurde 4 h bei 65 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Harz abfiltriert und mit 1 M NaOH ein pH-Wert von 8 eingestellt. Zu der erhaltenen Lösung wurden 57 mM  $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat, 150 mM Trishydrochlorid (pH=8), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2.5 mM Thiaminpyrophosphat zugegeben. Das Gesamtvolumen betrug 70 ml. Anschließend wurden 17000 U Triosephosphatisomerase und 2.5 mg (7.4 U) 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase zugesetzt und die Lösung bei 37 °C

inkubiert. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie verfolgt und war nach ca. 8 h beendet.

### 2.3.1.2 Darstellung von $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

In ein mittels Septum verschlossenes Sicherheitsgefäß, in dem 250  $\mu\text{Ci}$  (15,8  $\mu\text{mol}$ ) Pyruvat enthalten waren, wurde mit einer Spritze eine Lösung bestehend aus 4.5 mg (21  $\mu\text{mol}$ ) Dihydroxyacetonphosphat Lithiumsalz, 1.3 mM Thiaminpyrophosphat, 150 mM Trishydrochlorid (pH=8), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 5 mM DTT, gegeben. Anschließend wurden 0.5 mg (1.5 U) 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase und 250 U Triosephosphatisomerase zupipettiert. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Das erhaltene Produkt wurde entweder ohne weitere Reinigung zu den späteren Intermediaten umgesetzt oder für Einbauversuche an *E. coli* dephosphoryliert und als Rohprodukt verwendet.

Die Charakterisierung des erhaltenen Produkts erfolgte über die HPLC. Hierzu wurde ein Aliquot entnommen und mittels RP-18 Ionenpaar HPLC untersucht.

Säule: Multospher 120 RP-18 AQ, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm

Fluß: 0.75 ml/min

Eluent: 10 mM TBAS, pH = 6.0

Retentionszeiten: 10 min  $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Pyruvat; 20 min  $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

### 2.3.1.3 Darstellung von $[3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_1]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Zu einer Lösung bestehend aus 120 mM Trishydrochlorid (pH=8), 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 31 mM ATP, 1.6 mM Thiaminpyrophosphat, 5 mM  $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -, 5 mM  $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]$ -, 5 mM  $[3\text{-}^{13}\text{C}_1]$ Glucose und 30 mM  $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat in einem Volumen von 122 ml, wurden 174 U Hexokinase, 106 U Phosphoglucoseisomerase, 48 U Phosphofruktokinase, 26 U Aldolase, 284 U Triosephosphatisomerase sowie 6.2 U (2.8 mg) 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase gegeben und bei 37 °C inkubiert. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M NaOH konstant bei 8 gehalten. Die Reaktion wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie überwacht und war nach 22 h beendet.

#### 2.3.1.4 Darstellung von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Zu einer Lösung bestehend aus 2.4 g [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose (13.05 mmol), 400 mg ATP (0.6 mmol), 5.4 g Phosphoenolpyruvat Kaliumsalz (26.1 mmol), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 337 mg Thiaminpyrophosphat (0.77 mmol), 150 mM Trishydrochlorid (pH=8) in einem Volumen von 750 ml, wurden 100 U Hexokinase, 100 U Phosphoglucoseisomerase, 100 U Phosphofruktokinase, 100 U Aldolase, 400 U Triosephosphatisomerase, 300 U Pyruvatkinase und 23 U (7.5 mg) 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase gegeben und bei 37 °C inkubiert.

Der pH wurde durch Zugabe von 2 M NaOH konstant bei 8 gehalten.

Die Reaktion wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie überwacht und war nach ca. 24 h beendet.

#### 2.3.1.5 Darstellung von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Zu einer Lösung von 960 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose (5.1 mmol), 6.1 g ATP (10.2 mmol), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 337 mg Thiaminpyrophosphat (0.77 mmol), 150 mM Trishydrochlorid (pH=8), 1.14 g [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Pyruvat (10.2 mmol) in einem Volumen von 315 ml, wurden 100 U Hexokinase, 100 U Phosphoglucoseisomerase, 100 U Phosphofruktokinase, 50 U Aldolase, 400 U Triosephosphatisomerase und 12 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase gegeben und bei 37 °C inkubiert.

Der pH wurde durch Zugabe von 2 M NaOH konstant auf ca. 8 gehalten.

Die Reaktion wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie überwacht und war nach ca. 24 h beendet.

#### 2.3.1.6 Darstellung von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Glucose

Die Reaktion wurde analog zur Darstellung von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde unmarkierte Glucose anstelle von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose verwendet.

### 2.3.1.7 Darstellung von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Zu einer Lösung bestehend aus 150 mM Trishydrochlorid (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 16.6 mM [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Glucose, 0.8 mM ATP, 33.2 mM Acetylphosphat, 33.2 mM [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Pyruvat, 5 mM DTT, 1 mM Thiaminpyrophosphat wurden 35 U Hexokinase, 25 U Glucose-6-Phosphatisomerase, 100 U Phosphofruktokinase, 30 U Aldolase, 200 U Triosephosphatisomerase, 17 U Acetatkinase und 1 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase in einem Gesamtvolumen von 10 ml gegeben. Die Lösung wurde bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 M NaOH wurde der pH-Wert konstant bei 8.0 gehalten. Die Umsetzung wurde durch <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie überwacht und war nach einem Tag beendet.

### 2.3.1.8 Darstellung von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Zu einer Reaktionsmischung bestehend aus 100 mM Trishydrochlorid, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Dihydroxyacetonphosphat Lithiumsalz, 0.7 mM Thiaminpyrophosphat wurden 2 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase und 41 U Triosephosphatisomerase gegeben. Die Reaktion wurde in D<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 2.5 ml bei 37 °C durchgeführt. In Zeitintervallen von 3 min wurden 10 µl Aliquots einer Lösung aus 6.7 mg (60 µmol) [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Pyruvat in 100 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Nach 40 Minuten wurde die Umsetzung mittels <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie kontrolliert und die Reaktion durch Lyophilisation beendet.

### 2.3.1.9 Darstellung von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Zu einer Lösung aus 150 mM Trishydrochlorid (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 16.6 mM [4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]Glucose, 0.8 mM ATP, 33.2 mM Acetylphosphat, 5 mM DTT, 1 mM Thiaminpyrophosphat wurden 35 U Hexokinase, 25 U Glucose-6-phosphatisomerase, 100 U Phosphofruktokinase, 34 U Acetatkinase in einem Gesamtvolumen von 10 ml gegeben. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 37 °C inkubiert und der pH Wert durch Zugabe von 1 M NaOH konstant bei pH=8 gehalten. Nach beendeter Reaktion wurde das enthaltene Wasser durch

Lyophilisation entfernt. Der Rückstand wurde in 10 ml D<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 30 U Aldolase, 200 U Triosephosphatisomerase und 6 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase versetzt. Um einen Einwasch von Deuterium in die Methylgruppe zu vermeiden, wurden 0.3 mmol Pyruvat in 300 µl H<sub>2</sub>O gelöst und alle 3 Minuten 30 µl der Lösung zugegeben. Die Umsetzung wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie überwacht. Sobald die Reaktion beendet war, wurde das enthaltene D<sub>2</sub>O durch Lyophilisation entfernt.

#### 2.3.1.10 Reinigung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Bei Verwendung der beschriebenen Recyclingsysteme für ATP (vgl. Kap. 3.1.1, Abbildung 11) konnte eine Reinigung durch Bariumfällung erfolgen. Die Reaktionslösung wurde mit dem 5-fachen Volumen an Ethanol versetzt und 10 min bei 4 °C und 4800 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden 2 Äquivalente in Wasser gelöstes Bariumacetat zugegeben und die Lösung bei 4 °C über Nacht gelagert. 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat fällt hierbei als Bariumsalz aus und kann wie oben beschrieben abzentrifugiert werden. Der erhaltene Rückstand wurde mit gekühltem Ethanol (4 °C) gewaschen und in der ursprünglichen Menge deionisiertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit soviel Kationenaustauscher Dowex 50WX8 (H<sup>+</sup>-Form) versetzt, bis sich eine klare Lösung bildete. Das Harz wurde abfiltriert und der Durchlauf mit 1 N NaOH auf pH 4-8 eingestellt und lyophilisiert.

1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat fällt hierbei als ein durch Spuren an Ionenaustauscher schwach bräunlich gefärbtes Pulver an. Die Reinheit beträgt ca. 90 %. Die Ausbeute betrug typischerweise 50 -60 %.

#### **2.3.2 Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose aus 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat für Einbauversuche an *E. coli***

Der pH Wert der in Kap. 2.3.1.4 - 2.3.1.6 erhaltenen Reaktionsmischungen, die markiertes 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat enthielten, wurde auf pH 9.5 eingestellt und mit Magnesiumchlorid bis zu einer Gesamtkonzentration von 30 mM versetzt. Nach Zugabe von alkalischer Phosphatase (typischerweise 50 - 100 U pro mmol 1-

Desoxy-D-xylulose-5-phosphat) aus Rindermagenschleimhaut wurde die Reaktionsmischung 16 h bei 37 °C inkubiert und der pH Wert durch Zugabe von 1 M NaOH konstant bei 9.5 gehalten. Der Umsatz wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht.

Nach beendeter Reaktion wurde der pH Wert des Reaktionsgemisches mit 2 N HCl auf 7.0 eingestellt und die Lösung bei 4000 Upm, 10 min zentrifugiert. Ausgehend von markierter Glucose betrug die Gesamtausbeute der Reaktion 50 %. Die erhaltene, ungereinigte 1-Desoxy-D-xylulose konnte entweder direkt als Lösung oder nach Gefriertrocknung als Feststoff für Einbauversuche verwendet werden.

### **2.3.3 Umsetzung von [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose mit D-Xylulokinase aus *E. coli***

3 mg [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat wurde in 1 ml 150 mM Trishydrochlorid (pH=8) gelöst. Nach Zugabe von 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 40 U alkalischer Phosphatase wurde die Lösung 10 min bei 37°C inkubiert. Die quantitative Umsetzung zu [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ] 1-Desoxy-D-xylulose wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie kontrolliert. Anschließend wurde auf pH = 1 angesäuert, die denaturierten Proteine wurden bei 14000 Upm abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand durch eine 10 kDa Membran ultrafiltriert.

Zu der erhaltenen, enzymfreien Lösung wurden (bei pH = 8) 70 µg D-Xylulokinase, 1 mM Glutathion und 10 mM ATP gegeben. Nach 20 min war die Umsetzung zu [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat beendet, was mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie kontrolliert wurde.

### **2.3.4 Enzymatische Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat**

#### **2.3.4.1 Darstellung von [2,2'- $^{13}\text{C}_2$ ]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat**

Zu dem unter Kap. 2.3.1.1 beschriebenen Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C, nach beendeter Darstellung von [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat, 3.7 mmol Glucose (0.66 g), 0.5 mmol (51.5 mg)  $\text{NADP}^+$ , 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 46 U Glucosedehydrogenase und 18 U (2.6 mg) 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Reduktoisomerase zugesetzt. Die Bildung von  $[2,2\text{'-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht und war nach ca. 18 h beendet.

#### 2.3.4.2 Darstellung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat

58 ml einer Lösung bestehend aus 166 mg  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose (0.89 mmol), 200 mg  $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat (1.79 mmol), 1.6 mM Thiaminpyrophosphat, 1.02 g ATP (1.79 mmol), 6 mM  $\text{MgCl}_2$  und 150 mM Trishydrochlorid wurde durch Zugabe von 1 N NaOH auf pH=8 eingestellt. Anschließend wurden 84 U Hexokinase, 51 U Phosphofruktokinase, 34 U Aldolase, 412 U Triosephosphatisomerase und 2 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase (0.6 mg) zugegeben. Durch Zugabe von 1 N NaOH wurde der pH-Wert konstant bei 8 gehalten. Die Umsetzung wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht und war am nächsten Tag beendet.

Zu der Reaktionsmischung wurden 320 mg Glucose (1.78 mmol), 25 mg  $\text{NADP}^+$  (0.025 mmol), 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 60 U Glucosedehydrogenase und 11 U 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Synthase gegeben. Die Reaktion wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht und dauerte einen Tag.

#### 2.3.4.3 Darstellung von $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat

Zu einer Lösung bestehend aus 500 mg  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose (2.7 mmol), 50 mg ATP (0.1 mmol), 1.1 g Phosphoenolpyruvat (5.4 mmol), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, 150 mg Thiaminpyrophosphat (0.35 mmol) und 150 mM Trishydrochlorid (pH=8), in einem Gesamtvolumen von 750 ml, wurden 750 U Hexokinase, 150 U Phosphoglucoseisomerase, 50 U Phosphofruktokinase, 50 U Aldolase, 305 U Triosephosphatisomerase, 200 U Pyruvatkinase und 4 U (2.5 mg) 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase gegeben und bei 37 °C inkubiert.

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 2 M NaOH konstant auf ca. 8 gehalten.

Die Reaktion wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie überwacht und war nach 24 h beendet.

Nach beendeter Bildung von  $[3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat wurden 1 g unmarkierte Glucose (5.4 mmol), 100 mg  $\text{NADP}^+$  (0.1 mmol) sowie 20 U 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Synthase (2.9 mg) und 50 U Glucosedehydrogenase

zugegeben. Die Umsetzung wurde durch  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht und war nach weiteren 18 h abgeschlossen.

#### 2.3.4.4 Reinigung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat

Wurde das, während der Glykolyse benötigte, ATP über eines der beschriebenen Recyclingsysteme regeneriert, konnte analog zur Reinigung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat eine Bariumfällung erfolgen (vgl. Kap. 2.3.1.10). Die Ausbeute an gereinigtem 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat betrug 50 %.

Für die Präparation von sehr sauberen 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (Reinheit >95 % ) war es möglich, das erhaltene Produkt mittels Anionenaustauscher-HPLC mit 0.5 M Ameisensäure zu reinigen. Es wurden folgende Bedingungen gewählt:

Säule: Nucleosil SB-10, 250 x 16 mm; Fluß: 13 ml/min Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Refraktometers. Die Retentionszeit des gewünschten Produktes betrug 21 min. Es wurden jeweils ca. 80 mg aufgetragen. Die im Eluent enthaltene Ameisensäure wurde durch Gefriertrocknung entfernt, die Ausbeute an gereinigtem 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat betrug 40 %.

### 2.3.5 Enzymatische Synthese von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

#### 2.3.5.1 Darstellung von $[2,2\text{'-}^{13}\text{C}_2]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

Zu dem unter Kap. 2.3.4.1 beschriebenen Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C, nach beendeter Darstellung von  $[2,2\text{'-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, 3.6 mmol (2.0 g) CTP und 51 U (2.1 mg) 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase zugesetzt. Die Reaktion wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie überwacht. Die Reaktion wurde nach 15 h durch Gefriertrocknung des Ansatzes beendet.

#### 2.3.5.2 Darstellung von $[1,2,2\text{'},3,4\text{'-}^{13}\text{C}_5]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol und $[1,3,4\text{'-}^{13}\text{C}_1]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

Die Darstellung von  $[1,2,2\text{'},3,4\text{'-}^{13}\text{C}_5]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol und  $[1,3,4\text{'-}^{13}\text{C}_1]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol erfolgte mit angepaßten



Mengen analog zur Synthese von [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol.

### 2.3.5.3 Reinigung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

Die Reinigung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol konnte durch zwei HPLC Reinigungsschritte erfolgen. Im ersten Schritt wurde über eine semipräparative Nucleosil SB-10 Anionenaustauschersäule (25 cm x 2 cm) eine Vortrennung erreicht. Hierzu wurden jeweils ca. 0.5 g des lyophilisierten Rohproduktes in einer Mischung aus 100 mM Ammoniumformiat in 40 % Methanol gelöst und auf die Säule bei einem Fluß von 10 ml/min aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 270 nm. Das Produkt eluierte in einem breiten Bereich bei 15 min. Das enthaltene Methanol wurde am Rotationsverdampfer und das zurückbleibende Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Das vorgereinigte Produkt wurde in Portionen von ca. 100 mg über eine Nucleosil RP-18 Säule (25 x 2 cm) bei einem Fluß von 6 ml /min mit 10 mM Ammoniumformiat weiter aufgereinigt. 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol eluierte hierbei nach 10 min. Die Gesamtausbeute über alle Schritte lag bei ca. 60 %.

## 2.3.6 Enzymatische Synthese von 2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

### 2.3.6.1 Darstellung von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

Sobald die unter 2.3.4.3 beschriebene Bildung von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat abgeschlossen war, wurden 3.1 g CTP (5.4 mmol), und 1.1 g Phosphoenolpyruvat (5.4 mmol) zugegeben. Der pH-Wert wurde auf pH=8 eingestellt. Anschließend wurden 216 U Pyruvatkinase (1.5 mg), 21 U 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-erythritol Synthase (0.5 mg) und 270 U 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-erythritol-2-phosphat Kinase (8 mg) zugesetzt. Der pH Wert der Lösung wurde durch Zugabe von 2 N HCl konstant bei 8 gehalten. Die Umsetzung wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie überwacht und war nach 12 h beendet.

### 2.3.6.2 Darstellung von [1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

Die Darstellung von [1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol konnte mit angepaßten Mengen analog zur Synthese von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol ausgehend von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat durchgeführt werden.

### 2.3.6.3 Reinigung von 2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol konnte nicht wie 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat und 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat durch Bariumfällung gereinigt werden, da hierbei eine annähernd quantitative Zersetzung zu verschiedenen Produkten auftrat.

Eine Reinigung konnte jedoch über Ecteola Zellulose erfolgen. Hierzu wurde auf eine 50 x 4 cm große Säule ca. 40 ml der Reaktionslösung aufgetragen. Die Säule wurde bei einem Fluß von 2 ml/min mit einem linearen Gradienten von 0.15 - 0.4 M Triethylammoniumacetat (pH=6.0, Gesamtvolumen 3.5 l) entwickelt. Das Produkt konnte bei 270 nm detektiert werden und eluierte bei einem Volumen von 800-1600 ml. Die Ausbeute betrug ca. 40 %.

Allerdings coeluierte unter diesen Bedingungen ADP. Deshalb konnte diese Reinigungsprozedur nur verwendet werden, wenn eines der beschriebenen Recyclingsysteme für ATP benutzt wurde, oder die Umsetzung von einem bereits gereinigten Vorläufermolekül erfolgte.

## 2.3.7 Enzymatische Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

### 2.3.7.1 Darstellung von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Sobald die unter Kap. 2.3.4.3 beschriebene Bildung von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol abgeschlossen war, wurden 3.4 g Phosphoenolpyruvat (16.5 mmol) und 100 mg CTP (0.2 mmol) zugegeben. Durch Zugabe von 2 M NaOH wurde der pH der Lösung auf pH=8 eingestellt. Anschließend wurden 10 U

Nucleosidmonophosphatkinase, 50 U Nucleosiddiphosphatkinase, 55 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase (2.3 mg), 290 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase (8.8 mg), 6.3 U 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase (2.5 mg), 360 U Pyruvatkinase und 25 mg ATP (0.05 mmol) zugegeben. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 30 h bei 37 °C inkubiert. Die Umsetzung wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht und war nach 30 h beendet. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale belegten eine annähernd quantitative Umsetzung zu  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]2\text{C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat}$ .

#### 2.3.7.2 Darstellung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$

Eine Lösung aus 120 mM Trishydrochlorid (pH=8.0), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 g  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$  (1.09 mmol), 1.31 g ATP (2.2 mmol), 0.24 g  $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Natriumpyruvat}$  (2.17 mmol), 53 mg Thiaminpyrophosphat (0.12 mmol), 100 U Hexokinase, 60 U Phosphoglucoseisomerase, 28 U Fructose-6-phosphat-Kinase, 15 U Aldolase, 170 U Triosephosphatisomerase und 3.8 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase in einem Gesamtvolumen von 71 ml wurde 22 h bei 37 °C inkubiert. Der pH Wert der Reaktion wurde durch Zugabe von 2 N NaOH konstant auf pH=8 gehalten. Die Reaktion wurde durch  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht. Sobald die Bildung von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]1\text{-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat}$  abgeschlossen war, wurden 0.39 g unmarkierte Glucose (2.16 mmol), 30 mg  $\text{NADP}^+$  sowie 10 U 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Synthase und 27 U Glucosedehydrogenase zugegeben. Nach weiteren 20 h war die Bildung von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]2\text{C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat}$  abgeschlossen. Für die folgenden Schritte wurden 0.4 mmol DTT, 53 mg CTP (0.1 mmol), 1.25 g Phosphoenolpyruvat (6.06 mmol), 11 U Nucleosidmonophosphat Kinase, 250 U Nucleosiddiphosphat Kinase, 200 U Pyruvatkinase, 105 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase (4.2 mg), 92 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat Kinase und 1.7 U 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase addiert. Durch Zugabe von 2 N HCl wurde der pH konstant bei 8 gehalten. Nach 15 h war die Reaktion beendet und die Reaktion wurde durch Lyophilisation abgebrochen.

### 2.3.7.3 Darstellung von [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Die Reaktion wurde in einem mittels Septum verschlossenen Sicherheitsgefäß, in dem 250 µCi Pyruvat (16.8 µmol) enthalten waren, durchgeführt. Es wurde eine Lösung, bestehend aus 6.3 mg (30 µmol) Dihydroxyacetonphosphat Lithiumsalz, 1.3 mM Thiaminpyrophosphat, 150 mM Trishydrochlorid (pH=8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 21.8 mg NADPH (23 µmol), 2.4 mg ATP (4 µmol), 11.3 mg CTP (19.2 µmol), 4.0 mg Phosphoenolpyruvat (19.3 µmol), 250 U Triosephosphatisomerase und 0.3 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase (0.14 mg), 0.8 U Reduktoisomerase (0.13 mg) und 1.7 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase in einem Gesamtvolumen von 1 ml erzeugt. Über eine Spritze wurde diese Lösung zu 1.68 mg (15 µmol) [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]Pyruvat (250 µCi) gegeben und 5h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 24 U Pyruvatkinase und 4.6 U (0.14 mg) 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat Kinase und nach weiteren 1.5 h 0.3 U (0.12 mg) 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase zugegeben. Nach insgesamt 8 h wurde die Reaktion beendet und der Ansatz bei -70 °C eingefroren.

### 2.3.7.4 Reinigung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Durch Verwendung des schwachen Ionenaustauschers Ecteola Zellulose war es möglich, das erhaltene Rohprodukt in einem Schritt zu reinigen. Hierzu wurde ca. 1 g lyophilisiertes Produkt in etwas Wasser gelöst und auf eine Säule (55 x 4 cm) aufgetragen. Bei 4 °C wurde ein linearer Gradient von 0 – 0.3 M Triethylammoniumacetat (pH = 6, Gesamtvolumen 4 l) angelegt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC durch Anfärben mit Vanillin Schwefelsäure detektiert.

Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert.

Die Ausbeute lag typischerweise bei ca. 50 %.

DC: R<sub>f</sub>=0.4 (Silicagel N-HR, n-Propanol / Essigsäureethylester / Wasser: 6/1/3)

Die Reinigung von [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat erfolgte mittels HPLC (Säule: Nucleosil 5 SB, 250 mm x 7.5 mm, Flußrate: 2ml/min) mit 100 mM Ammoniumformiat in 40 % Methanol als Eluent. Das gewünschte Produkt wurde mit Hilfe eines Radiomonitors detektiert. Das in der Lösung enthaltene Methanol wurde

einrotiert und das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat wurde als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute: 12.6  $\mu\text{mol}$ , 200  $\mu\text{Ci}$ , 80 %

### 2.3.8 Umsetzung von [1,2,2',3,4- $^{13}\text{C}_5$ ]2-Phospho-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat mit IspF-Protein aus *Plasmodium falciparum*

Eine Lösung bestehend aus 130 mM Trishydrochlorid, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 300  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 7 mM DTT und ca. 2 mg [1,2,2',3,4- $^{13}\text{C}_5$ ]2-Phospho-2C-Methyl-D-erythritol-2-phosphat wurde auf pH=7 eingestellt und mit 150  $\mu\text{l}$  einer IspF-Protein Lösung über Nacht inkubiert. Die Umsetzung wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie überwacht. Es konnte eindeutig die Bildung von 2C-Methyl-2,4-cyclodiphosphat und 2-Phospho-2C-methyl-3,4-cyclomonophosphat im Verhältnis 9:1 beobachtet werden.

### 2.3.9 Inkorporationsversuche mit isotopmarkierter 1-Desoxy-D-xylulose

#### 2.3.9.1 Einbauversuch von [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylB

200 ml Luria Bertani (LB) Medium, das 36 mg Ampicillin enthielt, wurde aus einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-pBSXylB angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C angezogen und bei einer optischen Dichte von 0.6 mit 2 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurden 50 ml (ca. 0.9 mmol) einer ungereinigten [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose Lösung (pH=7.0) zugegeben. In Zeitabständen von 30 Minuten wurden 25 ml Proben entnommen und 20 Minuten bei 4800 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0.9 %igen Kochsalzlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 700  $\mu\text{l}$  einer 20 mM NaF/ $\text{D}_2\text{O}$  Lösung aufgenommen, auf Eis gekühlt und mit Ultraschall 3 x 10 sec. aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde 15 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand direkt im NMR vermessen. Bereits nach 30 Minuten konnte mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR eindeutig eine Umsetzung von [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose zu [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat beobachtet werden (vgl. Kap. 3.1.11.2). Ferner konnten noch geringe Mengen an [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Desoxy-D-xylulose identifiziert

werden. Die chemischen Verschiebungen stimmten mit den Daten in Tabelle 5 überein.

Es wurde versucht, die enthaltene Menge an [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu quantifizieren: Die aus 50 ml *E. coli* Medium erhaltenen Zellen wurden auf ca. 500 µl bestimmt. Anschließend wurden 6.8 µmol [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Pyruvat als Standard zugesetzt und die <sup>13</sup>C-Signale vergleichend integriert. Die Integration ergab, daß ca. 6 µmol [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in den Zellen vorhanden waren. Auf Grund dieser Daten konnte eine Konzentration von ca. 10 mM ermittelt werden.

Es muß betont werden, daß es sich hierbei nur um eine Abschätzung handeln soll!

#### 2.3.9.2 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispC

120 ml Luria Bertani (LB) Medium, das 22 mg Ampicillin enthielt, wurde aus einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-pBSXylBispC angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C angezogen und bei einer optischen Dichte von 0.6 mit 2 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurde ca. 1 mmol ungereinigte [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (pH=7.0) zugegeben. In Zeitabständen von 30 Minuten wurden 25 ml Proben entnommen und 20 Minuten bei 4800 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0.9 %igen Kochsalzlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 700 µl einer 20 mM NaF/D<sub>2</sub>O Lösung aufgenommen, auf Eis gekühlt und mit Ultraschall 3 x 10 sec. aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde 15 Minuten bei 15000 Upm zentrifugiert und der Überstand direkt im NMR vermessen.

Mittels HMQC und HMQC-TOCSY Experimenten (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32) konnten [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol und [1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol in einem Verhältnis von 6.6:7:1 identifiziert werden. Die NMR-Daten sind in Tabelle 10 zusammengefaßt, sie sind mit den publizierten Daten identisch (Takahashi et al., 1998; Rohdich et al., 1999).

### 2.3.9.3 Einbauversuch von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispCispDispF

100 ml Luria Bertani (LB) Medium, das 18 mg Ampicillin enthielt, wurde aus einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-pBSXylBispCispDispF angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C angezogen und bei einer optischen Dichte von 0.5 mit 2 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurde ca. 1 mmol ungereinigte [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (pH=7.0) zugegeben. In Zeitabständen von 30 Minuten wurden 25 ml Proben entnommen und 20 Minuten bei 4800 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0.9 %igen Kochsalzlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 700 µl einer 20 mM NaF/D<sub>2</sub>O Lösung aufgenommen, auf Eis gekühlt und mit Ultraschall 3 x 10 sec. aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde 15 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand direkt im NMR vermessen.

### 2.3.9.4 Einbauversuch von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispCispDispF unter Zugabe von Additiven

Der Einbauversuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde zusätzlich 10 mg (41.15 µmol) Cytidin und 5 mmol NaKHPO<sub>4</sub> (pH=7.0) zugegeben.

### 2.3.9.5 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispC-F unter Zugabe von Additiven

200 ml Luria Bertani (LB) Medium, das 36 mg Ampicillin enthielt, wurde aus einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1-pBSXylBispC-F angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C angezogen und bei einer optischen Dichte von 1.3 mit 2 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurden 30 mg (0.12 mmol) Cytidin, 300 mg (0.95 mmol) DL-α-Glycerin-3-phosphat und 10 ml eines 1 M NaKHPO<sub>4</sub> Puffers (pH=7.2) zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde ca. 1 mmol ungereinigte [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (pH=7.0) zugegeben. In Zeitabständen von 30 Minuten wurden 25 ml Proben entnommen und 20 Minuten bei 4800 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0.9 %igen Kochsalzlösung gewaschen und erneut

zentrifugiert. Die erhaltenen Zellen wurden in 700 µl einer 20 mM NaF/D<sub>2</sub>O Lösung aufgenommen, auf Eis gekühlt und mit Ultraschall 3 x 10 sec. aufgeschlossen. Die Suspension wurde 15 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand direkt im NMR vermessen.

#### 2.3.9.6 Einbauversuche mit *E. coli* XL1-pBSXylBispC-F pACYCgcpE

200 ml Terrific Broth (TB) Medium, das 36 mg Ampicillin und 5 mg Chloramphenicol enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1 angeimpft, der die Plasmide pBSXylBispC-F und pACYCgcpE trug und über Nacht bei 37 °C angezogen. Nach Zugabe von 30 mg (0.12 mmol) Cytidin, 300 mg (0.95 mmol) DL-α-Glycerin-3-phosphat und 10 ml eines 1 M NaKHPO<sub>4</sub> Puffers (pH=7.2), wurden nach 30 Minuten ca. 1 mmol ungereinigte [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (pH=7.0) oder [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose zugegeben. In Zeitabständen von 1 h wurden 25 ml Proben entnommen und 10 Minuten bei 4800 Upm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0.9 %igen Kochsalzlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 700 µl einer 20 mM NaF/D<sub>2</sub>O Lösung oder in 700 µl einer Mischung aus Methanol-d<sub>4</sub> und D<sub>2</sub>O (6:4 v/v), die 10 mM NaF enthielt, aufgenommen, auf Eis gekühlt und mit Ultraschall 3 x 10 sec. aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde 15 Minuten bei 15000 Upm zentrifugiert und der Überstand direkt im NMR vermessen. Es konnte zu ca. 10 % [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat bzw. [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat beobachtet werden (vgl. Kap. 3.1.11.7).

#### 2.3.9.7 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FgcpE

0.2 Liter Terrific Broth (TB) Medium, das 18 mg Ampicillin enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1-Blue angeimpft, der das Plasmid pBSXylBispC-FgcpE trug. Die Zellen wurden in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezogen. Bei einer optischen Dichte von 4.8-5.0 (600 nm), wurden 30 mg (0.12 mmol) Cytidin, 300 mg (0.95 mmol) DL-α-Glycerin-3-phosphat und 10 ml eines 1 M NaKHPO<sub>4</sub> Puffers



(pH=7.2) zugegeben. Nach 30 Minuten erfolgte die Zugabe von ca. 0.04 mmol ungereinigter [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (pH=7.0). In Zeitabständen von 1 h wurden 40 ml Proben entnommen und 10 Minuten bei 4800 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 700 µl einer Mischung von Methanol und D<sub>2</sub>O (6:4, v/v), die 10 mM NaF enthielt, suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert und direkt im NMR vermessen. Es konnte im Vergleich zu dem Versuch mit XL1-pBSXylBispC-F pACYCgcpE keine Steigerung der Umsatzrate beobachtet werden.

#### 2.3.9.8 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FgcpE unter Zugabe von Additiven

0.1 Liter Terrific Broth (TB) Medium, das 18 mg Ampicillin enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1-Blue angeimpft, der das Plasmid pBSXylBispC-FgcpE trug. Die Zellen wurden in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezogen. Bei einer optischen Dichte von 4.8-5.0 (600 nm), wurden 30 mg (0.1 mmol) Cytidin zugegeben. Eine Lösung in einem Gesamtvolumen von 30 ml bestehend aus 1.2 g Lithiumlactat (12.5 mmol), 6 ml ungereinigter [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (0.05 mmol) in 0.1 M Trishydrochlorid (pH = 7.5) wurde alle 10 min über 2 h zugegeben. In Zeitintervallen von 1 h wurden 25 ml Aliquots entnommen und 20 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 700 µl 20 mM NaF in D<sub>2</sub>O oder in einer Mischung von Methanol und D<sub>2</sub>O (6:4, v/v), die 10 mM NaF enthielt, suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert und direkt im NMR vermessen. Die relative Menge von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl 4-diphosphat zu 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat konnte durch Zugabe von Lithiumlactat zum Medium um ungefähr einen Faktor 2-3 gesteigert werden.

### 2.3.9.9 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FlytB

Die Durchführung des Einbauexperimentes erfolgte analog zu dem Versuch mit *E. coli* XI1pBSXylBispC-FgcpE. Es konnte neben [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat keine neue Verbindung detektiert werden.

### 2.3.9.10 Einbauversuch von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Mevalonsäure mit *E. coli* XL1-pBSpmkmdv

0.1 Liter Terrific Broth (TB) Medium, das 18 mg Ampicillin enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1-Blue angeimpft, der das Plasmid pBSpmkmdv trug. Die Zellen wurden in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezogen und bei einer optischen Dichte von 4.8 induziert. Nach 3 h werden 350 mg (1.1 mmol) DL- $\alpha$ -Glycerin-3-phosphat und 10 mg (0.07 mmol) [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Mevalonsäure zugegeben. Diese wurde aus [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Mevalonolacton durch Zugabe von 70  $\mu$ l einer 1 M NaOH Lösung erhalten. Nach 1 h wurden 40 ml entnommen und 20 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 700  $\mu$ l einer Mischung von Methanol und D<sub>2</sub>O (6:4, v/v), die 10 mM NaF enthielt, suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert und direkt im NMR vermessen.

### 2.3.9.11 Einbauversuch von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Mevalonsäure mit *E. coli* XL1-pACYCpmkmdv

Die Durchführung erfolgte analog zu dem Versuch mit *E. coli* XL1-pBSpmkmdv. Die Anzucht wurde in 100 ml Terrific Broth Medium, das 2.5 mg Chloramphenicol enthielt, durchgeführt.

### 2.3.9.12 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose mit *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FgcpElytB unter Zugabe von Additiven

0.1 Liter Luria Bertani (LB) Medium, das 18 mg Ampicillin enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1-Blue angeimpft, der das Plasmid pBSXylBispC-FgcpElytB trug. Die Zellen wurden in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezogen. Bei einer optischen Dichte von 1.3-1.7 (600 nm) wurde eine Lösung in einem Gesamtvolumen von 10 ml bestehend aus 2.4 g Lithiumlactat (25 mmol), 10 ml ungereinigter [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (0.08 mmol) (pH = 7.5) kontinuierlich über 2 h zugegeben. In Zeitintervallen von 30 min nach beendeter Zugabe wurden 25 ml Aliquots entnommen und 10 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 700 µl 20 mM NaF in D<sub>2</sub>O oder in einer Mischung von Methanol-d<sub>4</sub> und D<sub>2</sub>O (6:4, v/v), die 10 mM NaF enthielt, suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Ferner wurden 5 µl einer 50 mM Pamidronatlösung zugesetzt. Die Suspension wurde bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert und direkt im NMR vermessen (vgl. Kap. 3.1.11.13).

### 2.3.9.13 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose an *E. coli* pNCOdxs

0.1 Liter Luria Bertani (LB) Medium, das 18 mg Chloramphenicol enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1-Blue angeimpft, der das Plasmid pNCOdxs trug. Die Zellen wurden in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezogen. Bei einer optischen Dichte von 3.0 (600 nm) wurden die Zellen mit 2 mM IPTG induziert. Nach 2 h wurden 100 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose zugegeben. 1 h und 2 h nach beendeter Zugabe wurden 35 ml Aliquots entnommen und 20 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 700 µl einer Mischung von Methanol und D<sub>2</sub>O (6:4, v/v), die 10 mM NaF enthielt, suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert und direkt im NMR vermessen.

#### 2.3.9.14 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose an *E. coli* pACYCdxs

0.1 Liter Luria Bertani (LB) Medium, das 2.5 mg Chloramphenicol enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1-Blue angeimpft, der das Plasmid pACYCdxs trug. Die Zellen wurden in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezogen. Bei einer optischen Dichte von 3.0 (600 nm), wurden 5 ml 1 M NaKHPO<sub>4</sub> zugesetzt. Anschließend wurde eine Lösung in einem Gesamtvolumen von 12 ml bestehend aus 300 mg Glycerin-3-phosphat und 160 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose kontinuierlich über 2 h zugegeben. 1 h und 2 h nach beendeter Zugabe wurden 35 ml Aliquots entnommen und 20 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 700 µl einer Mischung von Methanol und D<sub>2</sub>O (6:4, v/v), die 10 mM NaF enthielt, suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert und direkt im NMR vermessen.

#### 2.3.9.15 Einbauversuch von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose an *E. coli* pACYCdxsxyIBispC

0.1 Liter Terrific Broth (TB) Medium, das 2.5 mg Chloramphenicol enthielt, wurde mit einem *E. coli* Stamm XL1-Blue angeimpft, der das Plasmid pACYCdxsispC trug. Die Zellen wurden in einer Schüttelkultur bei 37 °C über Nacht angezogen. Bei einer optischen Dichte von 19.0 (600 nm) wurde eine Lösung in einem Gesamtvolumen von 12 ml, bestehend aus 300 mg Glycerin-3-phosphat und 150 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose, kontinuierlich über 2 h zugegeben. 1 h und 2 h nach beendeter Zugabe wurden 20 ml Aliquots entnommen und 20 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer 0.9 % NaCl Lösung gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 700 µl einer Mischung von Methanol und D<sub>2</sub>O (6:4, v/v), die 10 mM NaF enthielt, suspendiert, auf Eis gekühlt und 3 x 10 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 15000 Upm 15 min zentrifugiert und direkt im NMR vermessen.

### 2.3.10 Inkorporationsexperiment von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Leucin an Hopfendolden

Für die Markierungsexperimente wurden 12 Dolden, die durchschnittlich 4-5, ca. 1.5 cm lange Zapfen besaßen, von einer Hopfenpflanze abgeschnitten. Als Sorte wurde *Humulus lupulus* L. var. *Hallertauer Taurus* verwendet, die von Dr. Kammhuber von der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (Wolnzach) zur Verfügung gestellt wurde. Die abgeschnittenen Dolden wurden mit ihren Stielen sofort in eine 0.1 %ige [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Leucin Lösung (pH=6) getaucht. Für den Versuch standen 112 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Leucin zur Verfügung. Die Dolden nahmen die komplette Lösung innerhalb von zwei Tagen auf. Danach wurden die Pflanzen drei weitere Tage mit Wasser versorgt und der Versuch nach insgesamt fünf Tagen beendet. Mit einer Rasierklinge wurden die Stiele zweimal täglich um einige Millimeter verkürzt, um eine optimale Aufnahme der Nährlösung zu gewährleisten.

Nach beendeter Zugabe wurden die Zapfen von den Stielen abgetrennt, dreimal mit je 50 ml Methylenchlorid versetzt und mittels Mörser und Pistill vorsichtig zerrieben. Die vereinigten Extrakte wurden filtriert und im verdunkelten Rundkolben am Rotationsverdampfer eingeeengt. Anschließend wurde der Rückstand in 10 ml Methylenchlorid aufgenommen, mit 52 mg o-Phenylendiamin versetzt und bei -20 °C aufbewahrt. Es bildeten sich schwach gelbe Kristalle. Das überschüssige Dichlormethan wurde abpipettiert und der Humulon/Orthophenylendiamin-Komplex in Methylenchlorid umkristallisiert.

Die erhaltene Verbindung wurde in CDCl<sub>3</sub> aufgenommen und mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie untersucht. Die erhaltenen Verschiebungen stimmten mit den publizierten (Goese *et al.*, 1999) überein.

Die relative Anreicherung für die durchgehend markierte Acylseitenkette wurde nach folgendem Formelschema bestimmt:

$$\%^{13}\text{C}_R = (\sum^{13}\text{C}_{I_S} / (\sum^{13}\text{C}_{I_S} + ^{13}\text{C}_{I_Z})) * 100$$

<sup>13</sup>C<sub>R</sub>: Relative Anreicherung an <sup>13</sup>C, in Prozent

<sup>13</sup>C<sub>I<sub>S</sub></sub>: Integralintensität des <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C gekoppelten Satelliten

<sup>13</sup>C<sub>I<sub>Z</sub></sub>: Integralintensität des Zentralsignals

Es ergab sich eine relative Anreicherung von 0.3 % (vgl. Kap. 3.3.2).

### 2.3.11 Einbau von $^{18}\text{O}_2$ an Hopfendolden im Freilandversuch

Auf einem Versuchsfeld der Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Abteilung Hopfen, in Wolnzach wurden 5 Dolden mit durchschnittlich 7 Zapfen (Länge von ca. 1 cm) ausgewählt. Die Dolden wurden von eventuell vorhandenen Blättern befreit. Mit Hilfe von Holzleim wurden der Länge nach halbierte und mit einem Loch ( $\varnothing = 4$  mm) versehene Korkstopfen um die Stiele der Dolden befestigt. Am nächsten Tag wurden die Hopfendolden im Argongegenstrom in 5 Schlenkrohre überführt und mit flüssigen Wachs sowie Silikon-Hochleistungsfett luftdicht verschlossen. Um einen Pilzbefall der Hopfendolden zu vermeiden, wurden diese mit einem Fungizid (Paral<sup>®</sup> Pilz-Frei N) besprüht. Zusätzlich wurde in das Schlenkrohr ein Silikagel Trockenkissen gegeben, um das von den Pflanzen freigesetzte Wasser zu binden (vgl. Kap. 3.3.1, Abbildung 43).

Über ein kurzes Schlauchstück wurde ein evakuierter Rundkolben mit Schlenkansatz ( $V=70$  cm<sup>3</sup>) mit dem Schlenkrohr verbunden. Der sich bildende Gesamtdruck konnte an dem Rundkolben mit Hilfe eines Manometers kontrolliert werden. Anschließend wurde das Schlenkrohr mit einem mit  $^{18}\text{O}_2$  gefüllten Luftballon verbunden.

Das Volumen des Schlenkkolbens betrug 172 cm<sup>3</sup>. Um einen möglichst natürlichen Sauerstoffgehalt zu erzeugen, wurde die benötigte Größe des evakuierten Kolbens bzw. der sich einstellende Druck nach dem Boyle-Mariotteschen Gesetz berechnet.

Für das Schlenkrohr gilt:

$$p_1: 965 \text{ mbar (Außendruck); } V_1: 172 \text{ cm}^3$$

Für den evakuierten Rundkolben gilt:

$$p_2: 90 \text{ mbar; } V_2: 69 \text{ cm}^3$$

Nach dem Verbinden der beiden Kolben ergibt sich folgender Gesamtdruck ( $p_3$ ):

$$p_3 \cdot (V_1 + V_2) = p_1 \cdot V_1 + p_2 \cdot V_2;$$

$$p_3 = (p_1 \cdot V_1 + p_2 \cdot V_2) / (V_1 + V_2)$$

Somit stellt sich ein Gesamtdruck ( $p_3$ ) von 714 mbar ein.

Dies entspricht einem Volumen von 127 cm<sup>3</sup> bei Normaldruck. Wenn man den leichten Überdruck im Luftballon vernachlässigt, wird die Differenz der Volumina ( $\approx 44$  ml <sup>18</sup>O<sub>2</sub>) in das Schlenkrohr gesaugt, was einem Gehalt von ca. 25 % <sup>18</sup>O<sub>2</sub> entspricht.

Anschließend wurden die Kolben mit Aluminiumfolie verdunkelt, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden und mit Klebeband an den Ranken befestigt. Nach zwei Wochen wurden die Dolden geerntet und aufgearbeitet.

Hierzu wurden die Zapfen von den Stielen abgetrennt, dreimal mit je 50 ml Methylenchlorid versetzt und mittels Mörser und Pistill vorsichtig zerrieben. Die vereinigten Extrakte wurden filtriert und im verdunkelten Rundkolben am Rotationsverdampfer eingeeengt. Anschließend wurde versucht, das enthaltene Humulon wie beschrieben zu kristallisieren (vgl. Kap. 2.3.10). Hierzu wurden 50 mg o-Phenylendiamin zugesetzt. Es zeigte sich allerdings, daß die enthaltene Menge an Humulon für eine Kristallisation zu gering war. Deshalb erfolgte eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC (Sharpe und Ormrod, 1991).

Als Säule wurde eine RP-18 Säule (YMC-PACK ODS-AQ, 11 µm, 40 x 250 mm) verwendet. Als Eluent wurde ein Gemisch aus Methanol/H<sub>2</sub>O/HCOOH im Verhältnis 85:17:0.25 (v:v:v) bei einem Fluß von 70 ml/min verwendet. Es wurden ca. 25 mg des ungereinigten Extraktes aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors bei 314 nm. Die Retentionszeit für Cohumulon betrug 16 und für Humulon 20 Minuten.

Die gereinigten Verbindungen wurden mittels NMR-Spektroskopie und über Direktinlaß Massenspektrometrie charakterisiert.

Für die mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie ermittelte absolute Anreicherung an <sup>18</sup>O-markiertem Humulon gilt:

$$\%^{18}\text{O}_A = \left( \frac{{}^{18}\text{O}I_C}{{}^{16}\text{O}I_C + {}^{18}\text{O}I_C} \right) * 100$$

$\%^{18}\text{O}_A$ : Absolute Anreicherung an <sup>18</sup>O, in Prozent

<sup>18</sup>O<sub>I<sub>C</sub></sub>: Integralintensität des <sup>13</sup>C-Signals, das ein <sup>18</sup>O-Atom trägt

<sup>16</sup>O<sub>I<sub>C</sub></sub>: Integralintensität des <sup>13</sup>C-Signals, das ein <sup>16</sup>O-Atom trägt

Mit Hilfe dieses Rechenschemas konnte eine absolute Anreicherung von 9 % ermittelt werden.

Für die mittels Massenspektrometrie ermittelte absolute Anreicherung an  $^{18}\text{O}$  markiertem Humulon gilt:

$$\%^{18}\text{O}_A = ((^{18}\text{O}I(M+2)^{+•} - S I(M+2)^{+•}) / (^{18}\text{O}I(M)^{+•} + ^{18}\text{O}I(M+2)^{+•})) * 100$$

$\%^{18}\text{O}_A$ : Absolute Anreicherung an  $^{18}\text{O}$ , in Prozent

$^{18}\text{O}I(M)^{+•}$ : Intensität des Molekülions der  $^{18}\text{O}$ -markierten Verbindung

$^{18}\text{O}I(M+2)^{+•}$ : Intensität des (M+2)-Ions der  $^{18}\text{O}$ -markierten Verbindung

$S I(M+2)^{+•}$ : Intensität des (M+2)-Ions der unmarkierten Referenz

Mit Hilfe dieses Rechenschemas konnte eine absolute Anreicherung von 10 % ermittelt werden.

Die über die zwei unabhängige Meßmethoden bestimmten absoluten Anreicherungen stimmten sehr gut überein (vgl. Kap. 3.3.1).



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Der alternative Biosyntheseweg zu Terpenen

#### 3.1.1 Markierung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat mit stabilen und radioaktiven Isotopen

Für die Aufklärung noch unbekannter Reaktionsschritte des alternativen Terpenbiosyntheseweges wurde in Zusammenarbeit mit C. Schuhr (Schuhr, 2001) eine enzymatische Synthese entwickelt, die eine flexible Einführung von stabilen und radioaktiven Isotopen in die bereits bekannten Intermediate erlaubt. Da die Biosynthese von IPP ausgehend von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat erfolgt, wurde insbesondere für dieses Molekül eine Markierungsstrategie benötigt. Mit Hilfe der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998) ist es möglich, Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu kondensieren (Abbildung 5).

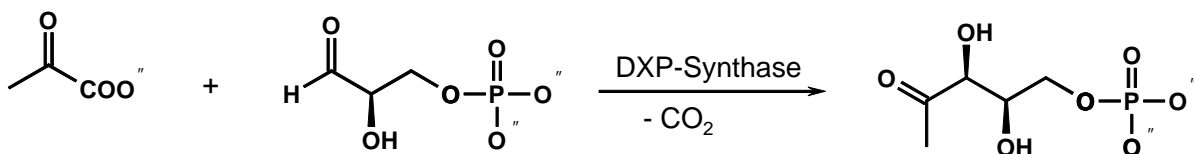


Abbildung 5: Darstellung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat

Pyruvat ist eine ideale Vorstufe, da sowohl [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]- als auch [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- und [3-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]Pyruvat erwerbbar sind. Im Gegensatz dazu ist GAP selbst in unmarkierter Form extrem teuer. Aus diesem Grund mußte für GAP eine effiziente Synthese gefunden werden.

Einen sehr einfachen Zugang für GAP stellt die von der Triosephosphatisomerase katalysierte Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) dar, welches sich sehr effizient aus dem Bariumsalz von Dihydroxyacetonphosphat-ethyl-hemiacetal gewinnen läßt (Effenberger und Straub, 1987). Hierzu wird das Acetal mit Hilfe eines Kationenaustauschers in  $H^+$ -Form gespalten (vgl. Kap. 2.3.1.1), der gleichzeitig die Bariumionen bindet und so Dihydroxyacetonphosphat freisetzt (Abbildung 6).

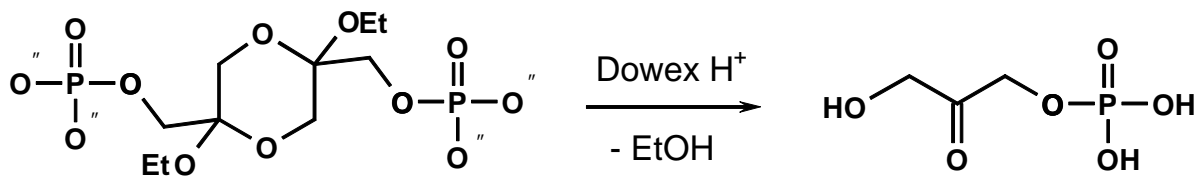


Abbildung 6: Hydrolyse von Dihydroxyacetonphosphat-ethyl-hemiacetal

Unter Verwendung des so erzeugten DHAP und  $^{13}\text{C}$ -markiertem Pyruvat war es mit Hilfe der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase und der Triosephosphatisomerase möglich, sowohl die Methyl- als auch die Carbonylgruppe (vgl. Abbildung 7) von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu markieren (vgl. Kap. 2.3.1.1). Analog dazu konnte mit  $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]$ Pyruvat radioaktives  $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat synthetisiert werden (Kap. 2.3.1.2).

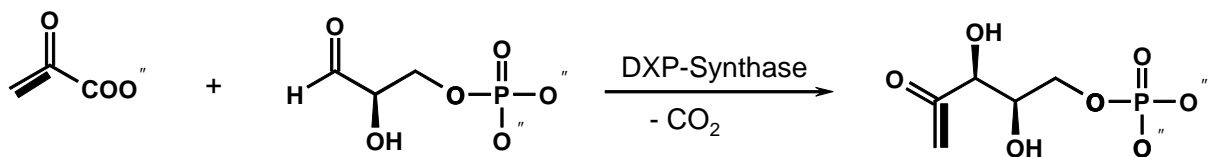


Abbildung 7: Darstellung von  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Alternativ kann D-Glycerinaldehyd-3-phosphat, als ein Intermediat der Glykolyse, auch enzymatisch ausgehend von Glucose gewonnen werden. Ein großer Vorteil hierbei ist, daß Glucose auf verschiedene Arten sowohl  $^{13}\text{C}$  als auch  $^2\text{H}$  markiert erwerbbar ist. Da die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase bei der Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (vgl. Abbildung 7)  $\text{CO}_2$  aus Pyruvat abspaltet, handelt es sich hierbei um eine irreversible Reaktion. Aus diesem Grund ist es möglich, GAP ständig aus dem Gleichgewicht zu entfernen und somit die Produktbildung zu forcieren (Abbildung 8).

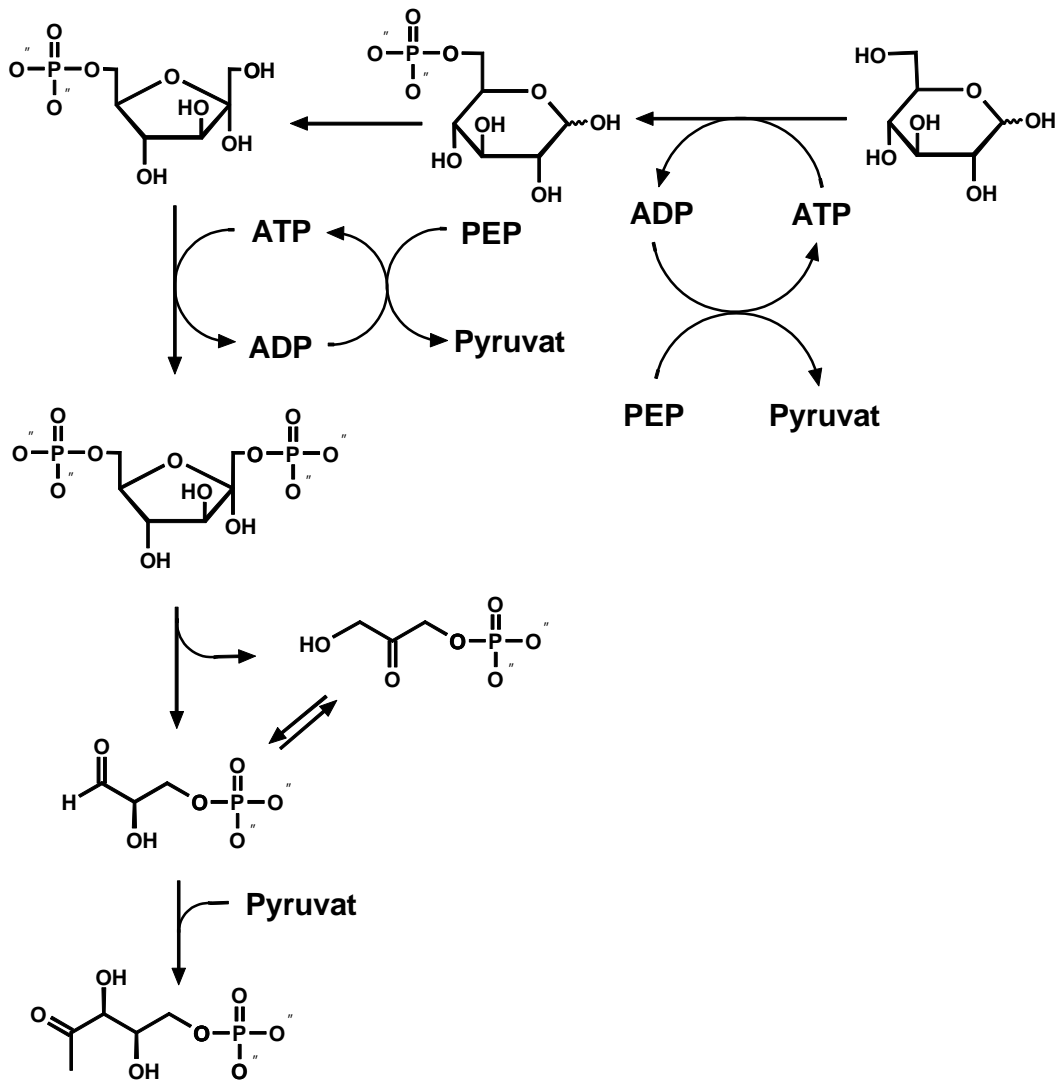


Abbildung 8: Enzymatische Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ausgehend von Glucose und Pyruvat

Durch Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose und unmarkiertem Pyruvat können somit die Positionen 3, 4 und 5 von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat  $^{13}\text{C}$ -markiert werden.

Analog dazu ist es unter Verwendung von  $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat,  $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glucose und stöchiometrischen Mengen ATP möglich,  $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu erzeugen (vgl. Abbildung 9). Der große Vorteil der  $^{13}\text{C}$ -Markierung ist, daß es möglich ist, die Reaktion „online“ zu beobachten. Dazu wurde ein Aliquot aus dem Reaktionsansatz entnommen, mit etwa 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  versetzt und direkt im NMR vermessen. In Abbildung 9 sind die bei der Synthese von  $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]$ 1-Desoxy-D-

xylulose-5-phosphat ausgehend aus  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und  $[2,3-^{13}C_2]$ Pyruvat erhaltenen  $^{13}C$ -NMR Spektren dargestellt.

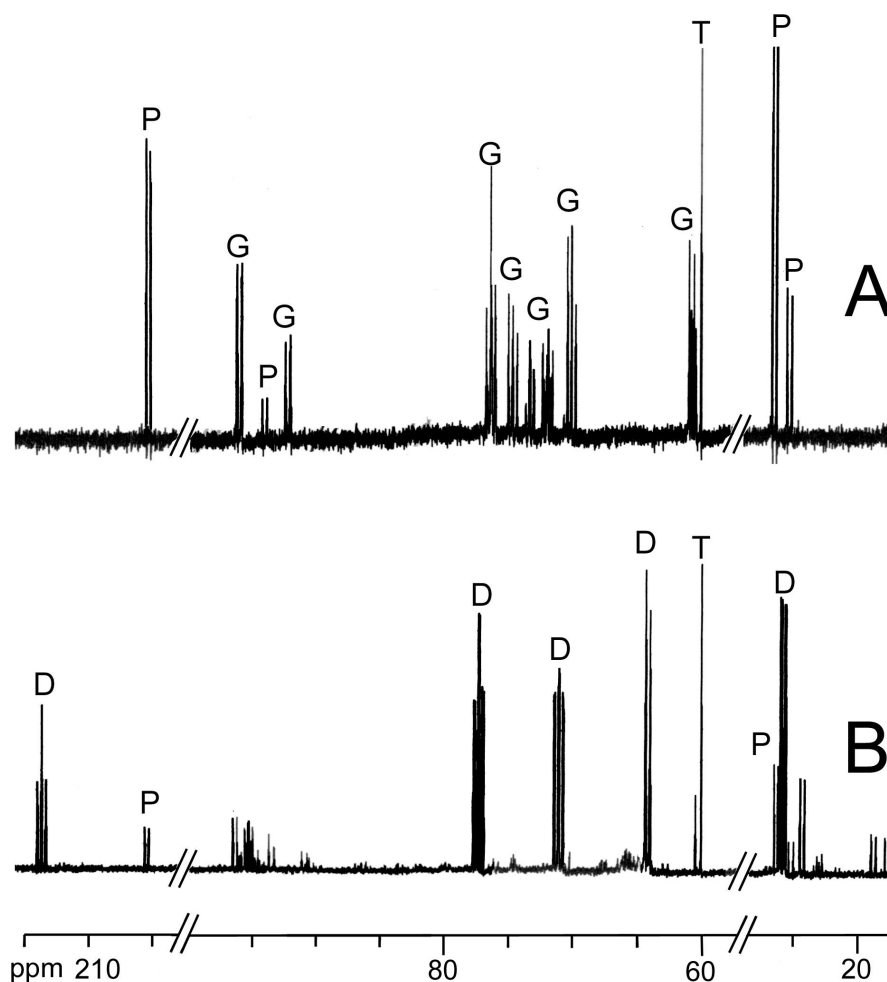


Abbildung 9: Ausschnitt des  $^{13}C$ -NMR Spektrums eines Reaktionsgemisches von  $[U-^{13}C_6]$ Glucose und  $[2,3-^{13}C_2]$ Pyruvat vor der Zugabe der Enzyme (A). B:  $[U-^{13}C_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat, 20 h nach Beginn der Reaktion. G und P deuten die von der Glucose und dem Pyruvat stammenden Signale an. D: 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat; T: Trishydrochlorid

Im oberen Teil (A) ist das Ausgangsgemisch, bestehend aus  $[2,3-^{13}C_2]$ Pyruvat (P) und  $\alpha,\beta$ - $[U-^{13}C_6]$ Glucose (G) zu erkennen. Dieses konnte, wie aus Abbildung 9 B ersichtlich ist, unter den üblichen Reaktionsbedingungen (vgl. Kap. 2.3.1.5) fast quantitativ zu  $[U-^{13}C_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (D) umgewandelt werden.

Die dargestellten Reaktionen wurden alle im „Eintopf“-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurden alle Edukte und Cofaktoren bei pH = 8 vorgelegt. Nach Zugabe der

benötigten Enzyme konnte die Reaktion mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie überwacht werden.

Wie man in Abbildung 10 erkennen kann, treten bei komplett  $^{13}\text{C}$ -markiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat neben den durch die Phosphatgruppe bedingten  $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$ - zusätzlich  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen auf. Die Folge hiervon sind komplexe Aufspaltungsmuster der einzelnen Signale, die in Abbildung 10 detailliert erläutert sind.

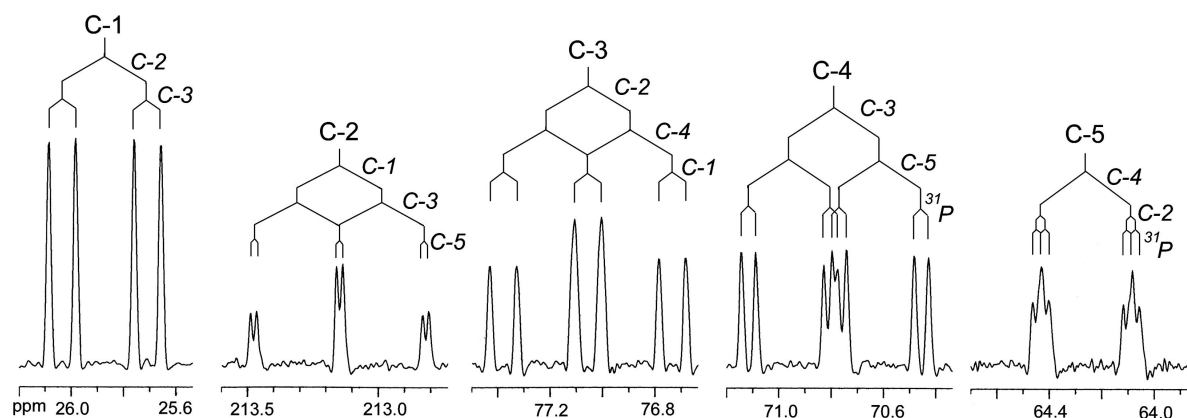


Abbildung 10: Kopplungsmuster der  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Über die zwei beschriebenen Verfahren (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 8) konnten ausgehend von Glucose oder DHAP und Pyruvat unterschiedliche Isotopomere synthetisiert werden. In Tabelle 3 ist eine Übersicht der erzeugten Verbindungen dargestellt.

**Tabelle 3: Darstellung verschiedener Isotopomere von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat**

DHAP	Glucose	Pyruvat	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
	Unmarkiert	$[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$	$[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$
Unmarkiert		$[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$	$[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$
	$[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$	Unmarkiert	$[3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3]$
	$[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$	$[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$	$[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$
	$[1\text{-}^{13}\text{C}_1], [2\text{-}^{13}\text{C}_1], [3\text{-}^{13}\text{C}_1]$	Unmarkiert	$[3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_1]$
Unmarkiert		$[2\text{-}^{14}\text{C}_1]$	$[2\text{-}^{14}\text{C}]$

Die Charakterisierung der stabilisotop markierten Verbindungen erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. Die erhaltenen Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen der einzelnen Isotopomere sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

**Tabelle 4: NMR Daten von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat**

Position	Chemische Verschiebung (ppm)			Kopplungskonstanten		
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>31</sup> P	J <sub>CH</sub>	J <sub>PC</sub>	J <sub>CC</sub>
1	2.4	25.9		128.6 <sup>a,c</sup>		41.2 (C2) <sup>a,c</sup> , 12.8 (C3) <sup>c</sup>
2		213.1				41.2 (C1) <sup>a,c</sup> , 41.3 (C3) <sup>c</sup>
3	4.6	77.0		144.2 <sup>b</sup>		41.3 (C2) <sup>b,c</sup> , 39.6 (C4) <sup>b,c</sup> , 12.8 (C1) <sup>c</sup>
4	4.4	70.7		145.3 <sup>b</sup>	7.2	39.8 (C3) <sup>b,c</sup> , 43.6 (C5) <sup>b,c</sup>
5	4.0	64.3		145.2 <sup>b</sup>	4.7	43.6 (C4) <sup>b,c</sup>
P			7.0		7.2, 4.7	

<sup>a</sup> Beobachtet mit [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

<sup>b</sup> Beobachtet mit [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

<sup>c</sup> Beobachtet mit [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Als ein Problem bei der enzymatischen Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat stellte sich die stöchiometrische Bildung von ADP aus ATP während der Glykolyse dar (vgl. Abbildung 8). Da ADP und 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat auf Grund der Phosphatgruppen negativ geladen sind, konnte die Reinigung des gewünschten Produktes nicht durch Bariumfällung erfolgen. Deswegen mußte die Bildung von ADP während der Reaktion vermieden werden. Dies gelang mit Hilfe der Regeneration von ATP durch die Pyruvatkinase, welche ADP und Phosphoenolpyruvat zu ATP umsetzt (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 8).

Das hierbei freigesetzte Pyruvat fungiert gleichzeitig als Substrat für die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase und wird somit quantitativ verbraucht. Allerdings war die Verwendung dieses Recyclingsystems nur möglich, wenn weder die Methyl- noch

die Carbonylgruppe von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat markiert werden sollten, da es sonst zu einer Verdünnung mit unmarkiertem Pyruvat gekommen wäre.

Alternativ zum Recyclingsystem mit Phosphoenolpyruvat konnte ATP aus Acetylphosphat und ADP durch die Acetatkinase gewonnen werden (Abbildung 11).

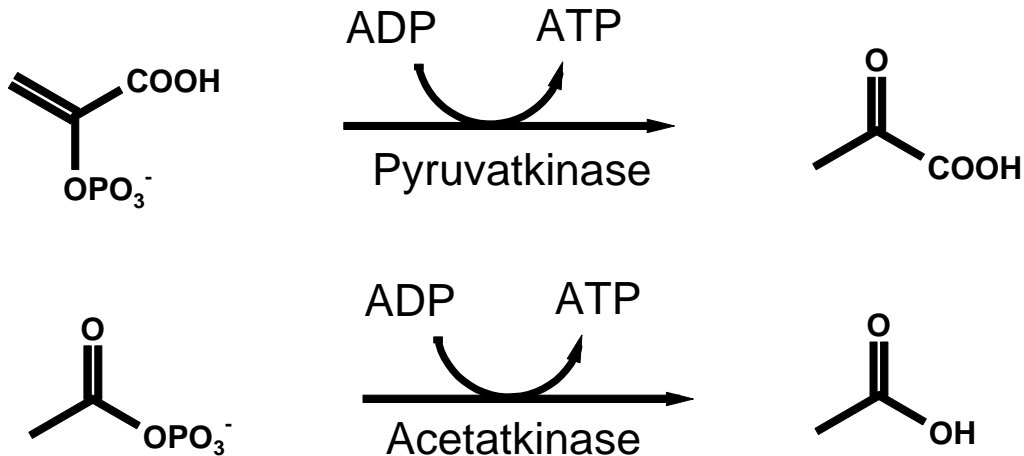


Abbildung 11: Recyclingsysteme für ATP

Ein Nachteil dieser Reaktion ist die geringe Stabilität von Acetylphosphat. Dieses kann zu Acetat und freiem Phosphat hydrolysieren, was eine Verwendung für größere Umsetzungen auf Grund der langen Reaktionszeiten (bis zu 24 h) erschwert. Deshalb wurde dieses System nur für kleinere Ansätze (vgl. Kap. 2.3.1.7 - 2.3.1.9) mit kürzeren Reaktionsdauern (bis zu 2 h) verwendet.

Das erzeugte 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (vgl. Tabelle 3) wurde entweder ohne Reinigung für weitere Umsetzungen zu den späteren Intermediaten eingesetzt oder konnte unter Verwendung der beschriebenen Recyclingsysteme durch Bariumfällung isoliert werden. Die Ausbeute an gereinigtem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat betrug typischerweise 50 %.

Ein Vorteil der enzymatischen Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ist die gute Skalierbarkeit der Reaktion. So war es sowohl möglich, radioaktives 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu erzeugen, als auch die Darstellung von stabilisotopmarkierten Verbindungen im Millimolmaßstab durchzuführen.

Durch die enzymatische Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat konnten somit unterschiedlichste <sup>13</sup>C- und <sup>14</sup>C-markierte Isotopomere (vgl. Tabelle 3) ausgehend von käuflichen Edukten erzeugt werden (vgl. Kap. 2.3.1.1 - 2.3.1.6).

### 3.1.2 Synthese von $^2\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -doppelmarkiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Für mechanistische Untersuchungen über die Biosynthese von Terpenen ist die Einführung von Deuteriummarkierungen von großem Interesse (Arigoni *et al.*, 1999). Allerdings kann während der Biosynthese von Sekundärstoffen ein kompletter oder auch nur teilweiser Verlust der Deuteriummarkierung erfolgen. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, neben einer  $^2\text{H}$ - gleichzeitig eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung einzuführen, die als interner Standard verwendet werden kann. Es ist dadurch möglich, einen eventuellen partiellen Austausch der Markierung exakt zu quantifizieren. Deshalb wurde versucht, 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat sowohl mit  $^2\text{H}$ - als auch mit  $^{13}\text{C}$ -Isotopen zu markieren.

Da 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat gebildet wird, ist es möglich, ausgehend von einfach markierten Edukten ein doppelmarkiertes Produkt zu erzeugen. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung kann hierbei sehr einfach über  $^{13}\text{C}$ -markiertes Pyruvat erfolgen (vgl. Abbildung 7), während für die Einführung einer Deuteriummarkierung verschiedene Möglichkeiten (Abbildung 12) existieren.



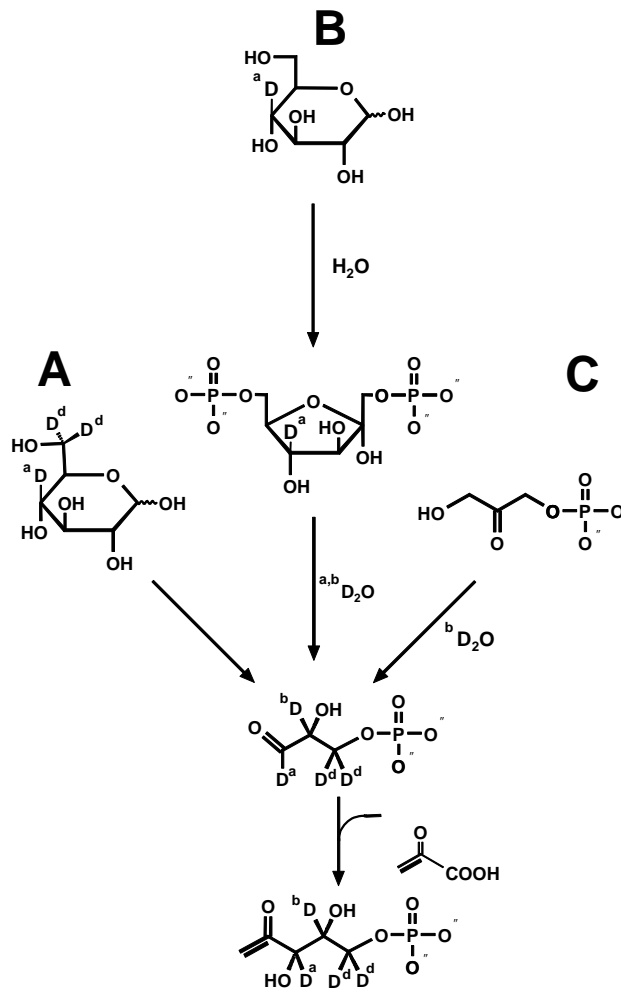


Abbildung 12: Verschiedene Markierungsstrategien (Weg A, B und C) für die Darstellung von sowohl <sup>13</sup>C- als auch <sup>2</sup>H- markiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat.

So war es möglich, [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ausgehend von [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Pyruvat und DHAP in D<sub>2</sub>O zu erzeugen. Die Einführung von Deuteriumatomen erfolgte hierbei mit Hilfe der Triosephosphatisomerase, die bei der Isomerisierung von DHAP zu D-Glycerinaldehyd-3-phosphat zwingend an Position 2 ein Deuteriumatom einführt, was zu einer Markierung an Position 4 in 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat führt (vgl. Abbildung 12, Weg C).

Ferner kann [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ausgehend von [4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]Glucose dargestellt werden. Bei der Synthese dieses Isotopomers wurde zunächst [4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]Fructose-1,6-bisphosphat erzeugt (vgl. Abbildung 12, Weg B). Um zu vermeiden, daß die Glucose-6-phosphatisomerase bei der Isomerisierung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat an Position 1 ein Deuteriumatom einführt, muß die Reaktion bis zu Fructose-1,6-bisphosphat in H<sub>2</sub>O durchgeführt werden. Da die von der Fructose-6-phosphat Kinase katalysierte Reaktion

irreversibel ist, kann die Reaktionssequenz an dieser Stelle unterbrochen und das enthaltene Wasser durch Gefriertrocknung entfernt werden. Die weitere Umsetzung zu D-Glycerinaldehyd-3-phosphat erfolgte in  $D_2O$ , wodurch über die Aldolase ein Deuteriumatom an Position 3 von DHAP eingeführt wird. Durch die von der Triosephosphatisomerase katalysierten Reaktion wird die Position 1 von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat mit der Position 3 von DHAP äquivalent (Abbildung 13).

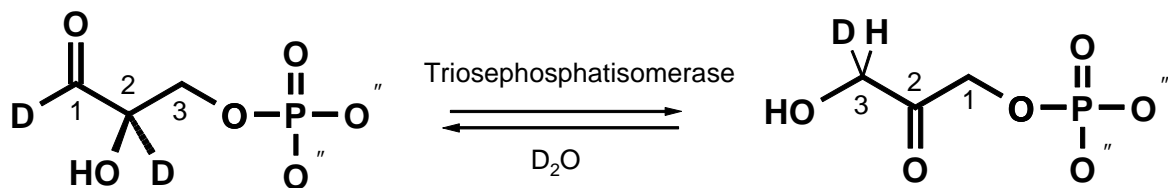


Abbildung 13: Die von der Triosephosphatisomerase katalysierte Isomerisierung von Dihydroxyacetonphosphat zu D-Glycerinaldehyd-3-phosphat

Das aus der  $[4-^2H_1]$ Glucose stammende Deuterium befindet sich in Position 1 von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (vgl. Abbildung 12, Weg B). Wie bereits bei der Darstellung von  $[1,2-^{13}C_2, 4-^2H_1]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat beschrieben, führt die Triosephosphatisomerase ein Deuteriumatom aus  $D_2O$  an Position 2 von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (vgl. Abbildung 13) ein, wodurch bei Verwendung von  $[2,3-^{13}C_2]$ Pyruvat mit Hilfe der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase  $[1,2-^{13}C_2, 3,4-^2H_2]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat entsteht (vgl. Abbildung 12, Weg B).

Auf Grund der Acidität der Protonen der Methylgruppe von Pyruvat, erfolgt in  $D_2O$  ein teilweiser Austausch der Methylprotonen gegen Deuteriumatome. Dies konnte bis auf eine Deuteriumanreicherung von ca. 30 % unterdrückt werden, indem in  $H_2O$  gelöstes Pyruvat tropfenweise zugegeben und die eingesetzte Menge an 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase stark erhöht wurde (vgl. Kap. 2.3.1.9).

Ausgehend von  $^2H$ -markierter Glucose und  $[2,3-^{13}C_2]$ Pyruvat wurde mit  $[1,2-^{13}C_2, 5-^2H_2]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ein drittes, doppelmarkiertes Isotopomer dargestellt. Dieses konnte ausgehend von  $[6,6-^2H_2]$ Glucose und  $[2,3-^{13}C_2]$ Pyruvat über Weg A (vgl. Abbildung 12) synthetisiert werden (vgl. Kap. 2.3.1.7). Ein Molekül Glucose wird dabei durch die von den Glykolyseenzymen katalysierten Reaktionen zu zwei Molekülen D-Glycerinaldehyd-3-phosphat abgebaut. Da die verwendete Glucose nur an Position 6 markiert ist, sollte bei Verwendung von  $[2,3-^{13}C_2]$ Pyruvat

ein Isotopomerengemisch bestehend aus  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5,5-^2\text{H}_2]$  und  $[1,2-^{13}\text{C}_2]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu jeweils 50 % entstehen. Es zeigte sich jedoch, daß neben diesen beiden Isotopomeren mit  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5-^2\text{H}_1]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ein drittes Isotopomer entstand. Durch Integration der  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale von Kohlenstoff 4 (vgl. Abbildung 14 C) konnte ein molares Verhältnis von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ - zu  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5,5-^2\text{H}_2]$ - zu  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5-^2\text{H}_1]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat von 1:0.3:0.7 ermittelt werden. Durch welche Reaktionen  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5-^2\text{H}_1]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat entstanden war, konnte nicht geklärt werden. Eine nur teilweise Deuteriummarkierung des Eduktes konnte jedoch mittels NMR-Spektroskopie ausgeschlossen werden.

Die Umsetzung zu den verschiedenen, mit Deuterium und  $^{13}\text{C}$ -markierten 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Isotopomeren erfolgte unter Generierung von ATP durch Acetylphosphat mit Hilfe der Acetatkinase. Da hierbei, wie bereits beschrieben (Kap. 3.1.1, Abbildung 11) nur freies Acetat entsteht, konnte die Reinigung der erhaltenen Verbindungen sehr einfach durch Bariumfällung erfolgen.

In Abbildung 14 sind Ausschnitte aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von auf diesem Weg gereinigtem  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -,  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 4-^2\text{H}_1]$ - und des Gemisches aus  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -,  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5,5-^2\text{H}_2]$ -,  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5-^2\text{H}_1]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat dargestellt. In der oberen Zeile (A) sind die unmarkierten Kohlenstoffe 3, 4 und 5 von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gezeigt. Da die Methyl- und Carbonylgruppe  $^{13}\text{C}$ -markiert sind, zeigen die Signale 3 und 5 Kohlenstoffkopplungen. Ferner werden die Signale der Kohlenstoffe 4 und 5 durch Phosphorkopplungen aufgespalten (vgl. Abbildung 14 A). Weiterhin konnten zwei intensive Signale bei 25.9 und 213.1 ppm detektiert werden, die zu den  $^{13}\text{C}$  markierten Kohlenstoffen gehören.

In der mittleren Zeile (B) ist das Spektrum von  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 4-^2\text{H}_1]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat dargestellt. Auf Grund der Markierung mit Deuterium (ca. 84 %) an Position 4 ist das entsprechende Kohlenstoffsignal weitgehendst kollabiert, weswegen lediglich ein Restsignal zu erkennen ist, das zu der nicht deuterierten Spezies gehört (vgl. Abbildung 14 B) . Auf Grund des Schwerisotopshifts ( $\beta$ -Shift) sind die Signale der Kohlenstoffe 3 und 5 um 56 bzw. 74 ppb zu höherem Feld verschoben.

In der untersten Zeile ist das Spektrum des Isotopomerengemisches aus  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -,  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5,5-^2\text{H}_2]$ - und  $[1,2-^{13}\text{C}_2, 5-^2\text{H}_1]1$ -Desoxy-D-xylulose-5-phosphat dargestellt (vgl. Abbildung 14 C). Das Kohlenstoffsignal 5 ist auf Grund der teilweisen

Markierung mit Deuterium verkleinert. Das Signal von Kohlenstoff 4 erfährt je nach Markierungsgrad einen unterschiedlich großen Schwerisotopshift. So ist ein Dublett (Signal 4<sub>a</sub>) zu erkennen, das zu der nicht deuteriummarkierten Spezies gehört. Ferner ist ein weiteres Dublett (Signal 4<sub>b</sub>) vorhanden, das zu der einfach markierten Verbindung gehört und einen Schwerisotopshift von 60 ppb zu höherem Feld erfährt. Die dritte Komponente trägt an Kohlenstoff 5 zwei Deuteriumatome, was zu einem doppelten Schwerisotopshift (120 ppb) führt. Dies ist an Signal 4<sub>c</sub> erkennbar.

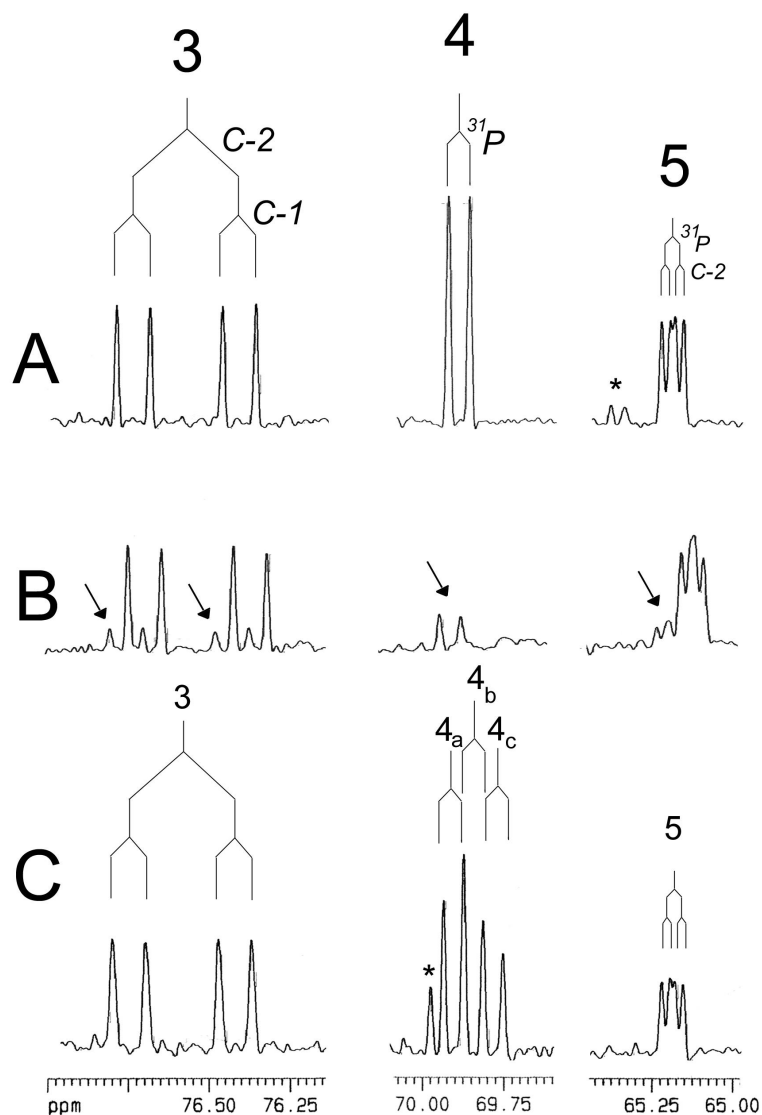


Abbildung 14: Ausschnitt aus den <sup>13</sup>C-NMR Spektren von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (A), von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (B) und eines Isotopomengemisches aus [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-, [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 5-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>] und [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (C). Die mit einem Pfeil markierten Signale stammen von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat. Bei den mit einem Sternchen versehenen Signalen handelt es sich um Verunreinigungen.

### 3.1.3 Die D-Xylulokinase katalysiert die Phosphorylierung von 1-Desoxy-D-xylulose zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Aufgrund von erfolgreichen Fütterungsexperimenten mit 1-Desoxy-D-xylulose wurde vermutet (Broers, 1994, Giner *et al.*, 1998a), daß bestimmte Organismen 1-Desoxy-D-xylulose zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat phosphorylieren können.

In unserer Arbeitsgruppe gelang es, diese Phosphorylierungsaktivität aus *E. coli* Wildtyp Zellen anzureichern und das codierende Gen zu klonieren (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001a). Bei der Sequenzierung dieses Gens stellte sich heraus, daß es sich um das *xylB* Gen handelt, welches die D-Xylulosekinase codiert.

Bei der Charakterisierung des gereinigten, rekombinanten Enzyms stellte sich die Frage, welche der drei Hydroxygruppen (vgl. Abbildung 16) von 1-Desoxy-D-xylulose phosphoryliert wird (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001a).

Um diese Frage zu beantworten, wurde zuerst [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat synthetisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Abbildung 15 B). Nach Entfernung der Proteine wurde die erhaltene [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose anschließend mit gereinigter, rekombinanter D-Xylulokinase unter den entsprechenden Bedingungen (vgl. Kap. 2.3.3) inkubiert und das gebildete Produkt mittels <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie untersucht. In Abbildung 15 sind die <sup>13</sup>C-NMR Spektren von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose (Abbildung 15 B) und dem in der Reaktion gebildeten Produkt (Abbildung 15 A) dargestellt.

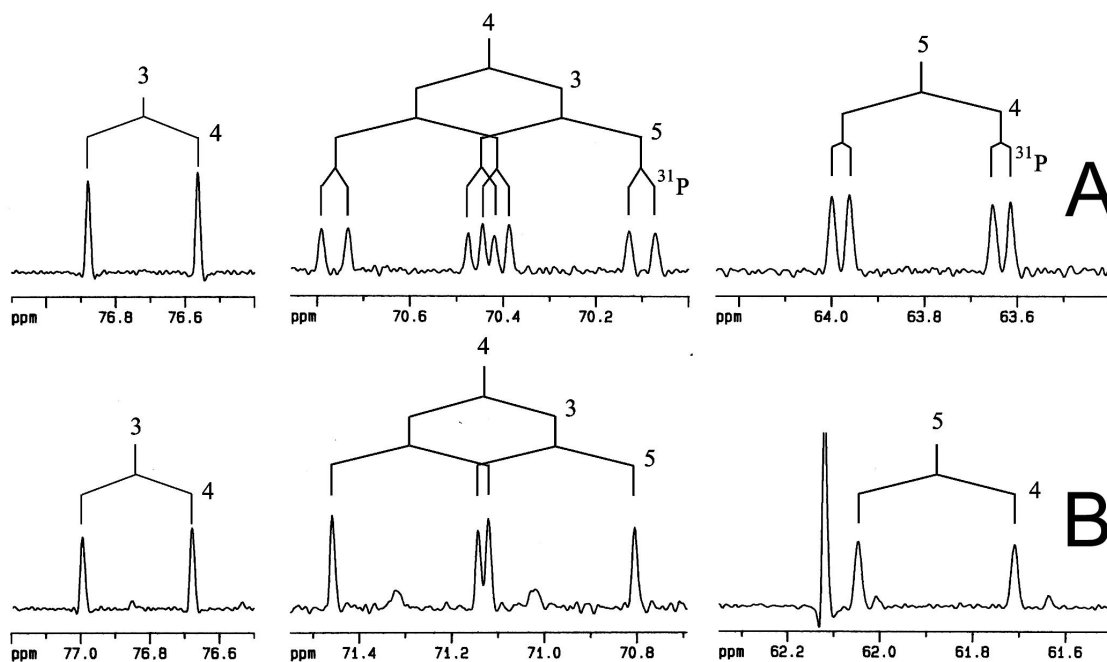


Abbildung 15: Ausschnitte aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose (B) vor der Inkubation mit D-Xylulokinase und von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (A) nach beendeter Reaktion.

Wie man in Abbildung 15 und in Tabelle 5 gut erkennen kann, zeigen die Kohlenstoffsignale 4 und 5 eine zusätzliche Kopplung, die durch die eingeführte Phosphatgruppe an Position 5 entsteht. Bei einer Phosphorylierung an einer anderen OH-Gruppe müßte Kohlenstoff 3 eine  $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$  Kopplung zeigen. Ferner stimmen sowohl die im  $^{13}\text{C}$ -NMR erhaltenen chemischen Verschiebungen als auch die Kopplungskonstanten mit denen von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat überein (vgl. Kap. 3.1.1, Tabelle 4).

Diese Daten belegen eindeutig, daß die D-Xylulokinase 1-Desoxy-D-xylulose an Position 5 phosphoryliert (vgl. Abbildung 16).

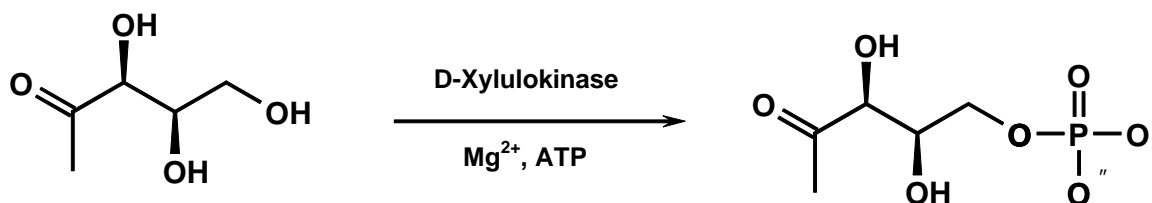


Abbildung 16: Phosphorylierung von 1-Desoxy-D-xylulose zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat durch die D-Xylulokinase

**Tabelle 5:  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose und  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat**

$[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose			$[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat		
Position	Chemische Verschiebung (ppm)	Kopplungskonstanten (Hz)	Chemische Verschiebung (ppm)	Kopplungskonstanten (Hz)	
		$J_{\text{CC}}$		$J_{\text{CC}}$	$J_{\text{CP}}$
3	76.8 (d)	39.6	76.7 (d)	39.6	
4	71.1 (dd)	39.6, 42.5	70.4 (ddd)	39.8, 43.6	7.2
5	61.9 (d)	42.2	63.8 (dd)	43.6	4.7

Die Multiplizitäten der  $^1\text{H}$  entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale sind in Klammern angegeben.

### 3.1.4 Synthese von isotopmarkiertem 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat

Der nächste Schritt bei der Biosynthese von IPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg besteht in einer reduktiven Gerüstumlagerung (Arigoni *et al.*, 1997), die durch eine Reduktoisomerase (Takahasi *et al.*, 1998) katalysiert wird (Abbildung 17).

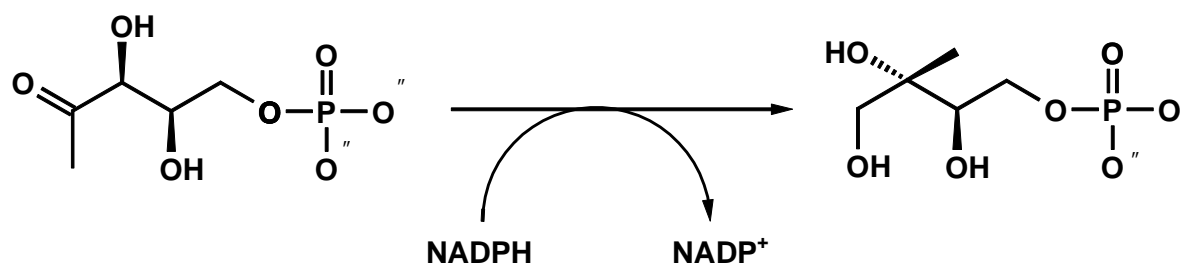


Abbildung 17: Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat aus 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Bei der reduktiven Gerüstumlagerung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat wird NADPH verbraucht (vgl. Abbildung 17). Dieses kann sehr effizient aus Glucose mit Hilfe der Glucosedehydrogenase (Radykewicz *et al.*, 2000) wiedergewonnen werden (Abbildung 18).

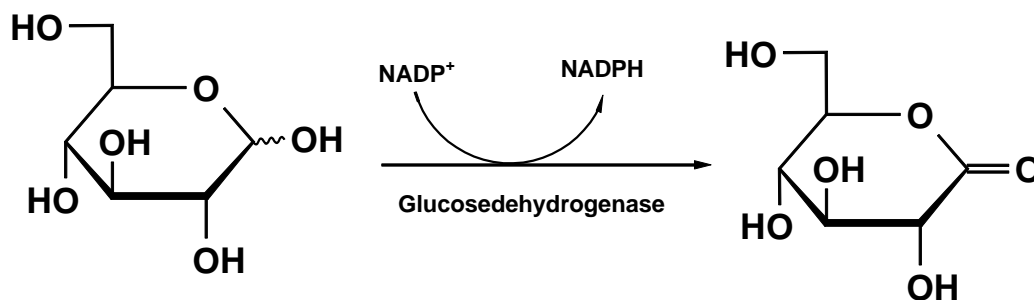


Abbildung 18: Recyclingsystem für NADPH

Auf diese Art war es möglich, die benötigte Menge an NADPH zu minimieren. Bei der Darstellung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat ausgehend von markierter Glucose mußte darauf geachtet werden, daß zuerst die Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat vollständig beendet ist, um eine Verdünnung mit unmarkierter Glucose durch das Recyclingsystem zu vermeiden. Ferner mußte das für die Glykolyse verwendete ATP bzw. PEP in stöchiometrischen Mengen zugesetzt werden, da es dann bei der Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat vollständig verbraucht wird. Damit stand es bei der nun ungewollten Bildung von Glucose-6-phosphat durch die Hexokinase als Substrat nicht mehr zur Verfügung, wodurch es möglich ist, diese Nebenreaktion zu unterdrücken.

Ausgehend von ungereinigtem, entsprechend isotopmarkiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat wurde über das oben beschriebene Verfahren [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-, [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>] und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat erzeugt (vgl. Kap. 2.3.4).

Die so synthetisierten Isotopomere konnten ohne Aufreinigung zu den nächsten Intermediaten der Terpenbiosynthese umgesetzt werden.

Für spezielle Anwendungen, wie z. B. Enzymkinetiken, wurde gereinigtes 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat benötigt. Die Reinigung konnte, wenn die beschriebenen Recyclingsysteme für ATP und NADPH verwendet wurden, durch eine Bariumfällung erfolgen. Die Ausbeute betrug in diesen Fällen typischerweise 50 %. Alternativ dazu konnte eine Reinigung mittels Anionenaustauscher-HPLC erfolgen (vgl. Kap. 2.3.4.4). Hierbei wurde eine Ausbeute von ca. 40 % erreicht.



### 3.1.5 Darstellung von isotopmarkiertem 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol

Ein weiteres, bereits bekanntes Intermediat der Biosynthese von IPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg war 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. Dieses sollte für die Strukturaufklärung unbekannter Intermediate ebenfalls mit Isotopen markiert werden. Seine Darstellung erfolgte mit Hilfe des IspD-Enzyms ausgehend von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat und CTP (Abbildung 19) in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  Ionen (Rohdich *et al.*, 1999; Kuzuyama *et al.*, 2000b).

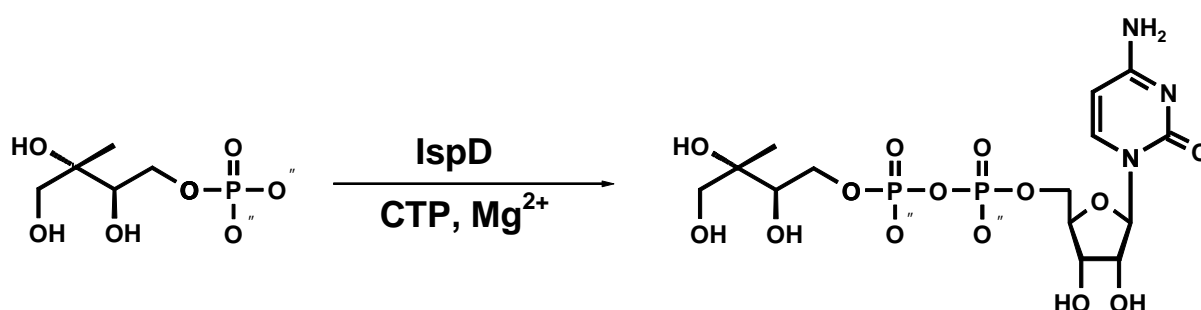


Abbildung 19: Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol ausgehend von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat

Die Einführung von Isotopen erfolgte in Fortsetzung der beschriebenen Strategie ausgehend von Glucose, DHAP und Pyruvat. Für die Aufklärung der nächsten, vom IspE-Protein (Lüttgen *et al.*, 2000) katalysierten Reaktion wurden insbesondere [1,2,2-Methyl,3,4- $^{13}C_5$ ]-, [2,2-Methyl- $^{13}C_2$ ]- sowie [1,3,4- $^{13}C_1$ ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol als Substrate benötigt (vgl. Kap. 2.3.5.1 und 2.3.5.2). In Abbildung 20 sind Ausschnitte aus den  $^{13}C$ -NMR Spektren der erzeugten Verbindungen dargestellt.

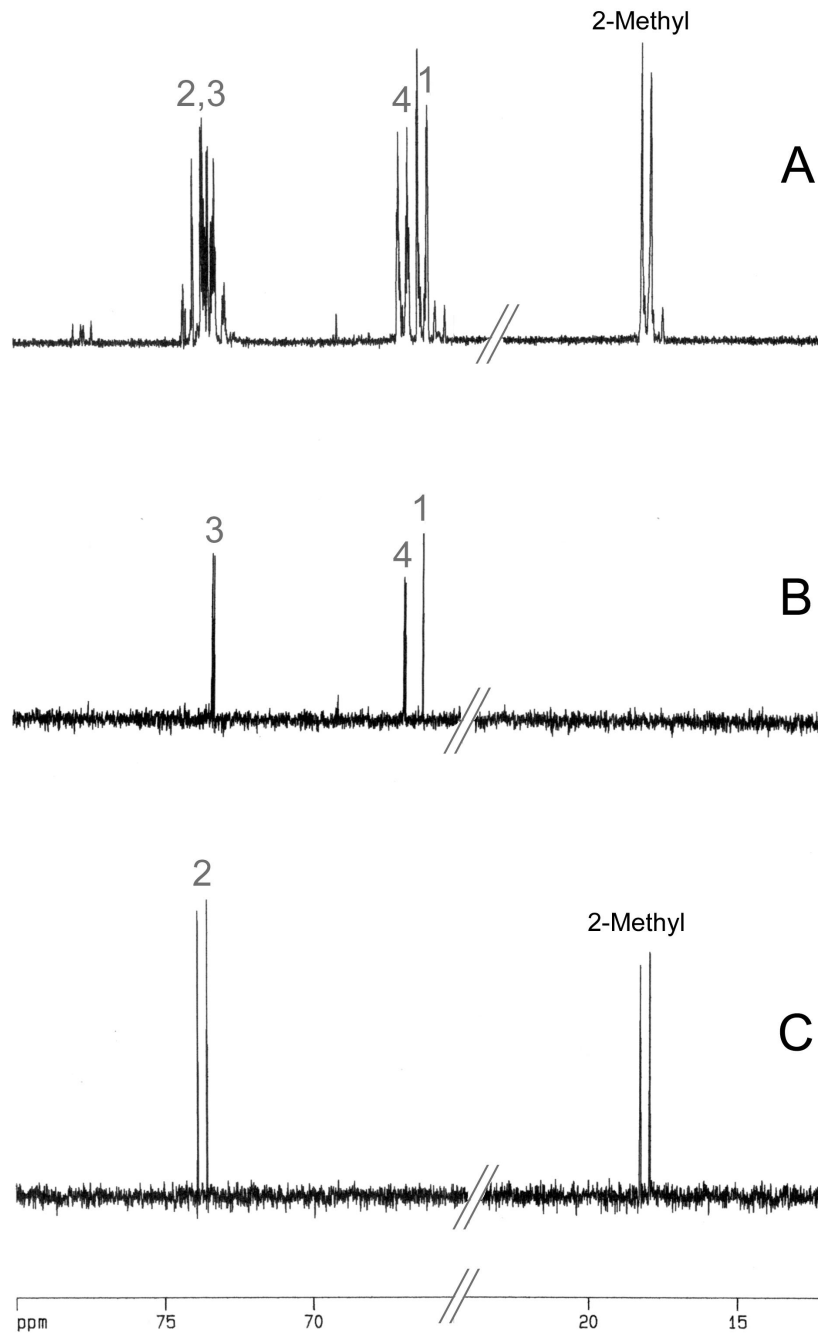


Abbildung 20: Ausschnitt aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren von  $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]$ - (A),  $[\text{1,3,4-}^{13}\text{C}_1]$ - (B) und  $[\text{2,2-}^{13}\text{C}_2]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (C). Die Zahlen deuten den jeweiligen markierten Kohlenstoff an.

Die Umsetzung konnte mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie verfolgt werden. Die Reinigung der Produkte erfolgte durch HPLC. Die Gesamtausbeute betrug ca. 60 %. Die NMR Daten waren mit den publizierten Daten identisch (Rohdich *et al.*, 1999; Rohdich *et al.*, 2000b).

### 3.1.6 Das IspE-Protein katalysiert die Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat

Durch vergleichende Genomuntersuchungen konnte in unserer Arbeitsgruppe *ychB* (später in *ispE* umbenannt) als ein essentielles Gen für die Bildung von IPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg identifiziert werden (Lüttgen *et al.*, 2000). Hierzu wurden die Genome von komplett sequenzierten Organismen, die ausschließlich den alternativen Weg benutzen, miteinander verglichen. Anschließend wurden die Sequenzen, die in allen diesen Lebewesen vorkamen, mit den Genomen von Organismen verglichen, die den Mevalonatweg benutzen. Die Gene, die in allen existierten, wurden eliminiert. Als Treffermenge blieben so nur die Gene übrig, die für die Bildung von IPP bzw. DMAPP benötigt werden. Diese wurden in *E. coli* überexprimiert, gereinigt und charakterisiert.

So konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß bei Inkubation von radioaktivem 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol mit ATP, MgCl<sub>2</sub> und dem IspE-Protein, einer mutmaßlichen Kinase, eine neue Verbindung entsteht (Lüttgen *et al.*, 2000).

Um die Struktur dieses neuen Intermediates aufzuklären, wurden deshalb jeweils [1,2,2-Methyl,3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-, [2,2-Methyl-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- sowie [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol mit gereinigtem IspE-Protein in Gegenwart von ATP und MgCl<sub>2</sub> umgesetzt und gereinigt. Die erhaltenen Verbindungen wurden mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie, insbesondere durch HMQC, HMQC-TOCSY und HMBC Spektren charakterisiert (Tabelle 6).

Im Vergleich zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol bleiben die meisten Signale und Korrelationen weitgehendst unverändert (Lüttgen *et al.*, 2000; Kuzuyama *et al.*, 2000a). Allerdings erfährt Kohlenstoff 2 einen Tieffeldshift von ca. 8 ppm. Im <sup>31</sup>P-NMR ist ein zusätzliches Signal bei 0.49 ppm zu erkennen, das im typischen Bereich von Monophosphaten liegt. Dieses Signal zeigt zwei <sup>13</sup>C-<sup>31</sup>P-Kopplungen mit 7.6 und 1.7 Hz (Tabelle 6) zu C-2 und der Methylgruppe. Diese Daten belegen, daß die Phosphatgruppe an Position 2 sein muß, da für die zwei weiteren möglichen Positionen (C-1 und C-4) keine Phosphorkopplung (<sup>4</sup>J<sub>PC</sub>) zur Methylgruppe auftreten dürfte.

**Tabelle 6: NMR-Daten von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat**

Chemische Verschiebung (ppm)				Kopplungskonstanten (Hz)			
Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$	$J_{\text{HH}}$	$J_{\text{PC}}$	$J_{\text{PP}}$	$J_{\text{CC}}$
1	3.58 (m,1)	65.78			3.8 <sup>a</sup> (P-2)		39.8 <sup>c</sup> (2)
1*	3.64 (m,1)						
2		81.91			7.4 <sup>b</sup> (P-2)		38.9 <sup>b</sup> (2-Methyl)
2-Methyl	1.26 (s,3)	17.92			1.9 <sup>b</sup> (P-2)		38.9 <sup>b</sup> (2)
3	3.81 (m,1)	73.96			7.3 <sup>a</sup> (P-2, P-4)		n. b.
4	3.89 (m,1)	67.16			5.7 <sup>a</sup> (P-4)		42.9 <sup>c</sup> (3)
4*	4.19 (m,1)						
1'	5.87 (d,1)	90.21		4.4			
2'	4.21 (t,1)	75.24		4.9			
3'	4.25 (t,1)	70.22		4.9			
4'	4.17 (m,1)	83.85					
5'	4.09 (ddd,1)	65.49		12.2, 5.4			
5'*	4.17 (m,1)						
Cyt-2		156.50					
Cyt-4		165.49					
Cyt-5	6.07 (d,1)	97.35		7.6			
Cyt-6	7.92 (d,1)	143.03		7.6			
P(2)			0.49		1.7 <sup>b</sup> (2-Methyl), 7.6 <sup>b</sup> (2)		
P(4)			-7.28			20.8	
P(5')			-8.00			20.8	

<sup>a</sup>Aus dem Spektrum von [1,3,4- $^{13}\text{C}_1$ ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat

<sup>b</sup>Aus dem Spektrum von [2,2-Methyl- $^{13}\text{C}_2$ ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat

<sup>c</sup>Aus dem Spektrum von [1,2,2-Methyl,3,4- $^{13}\text{C}_5$ ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat

\* bezeichnet das zweite diastereotopie H-Atom der jeweiligen Position

Mit den gezeigten Daten konnte eindeutig belegt werden, daß das IspE-Protein 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol an Position 2 zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat phosphoryliert (Abbildung 21).

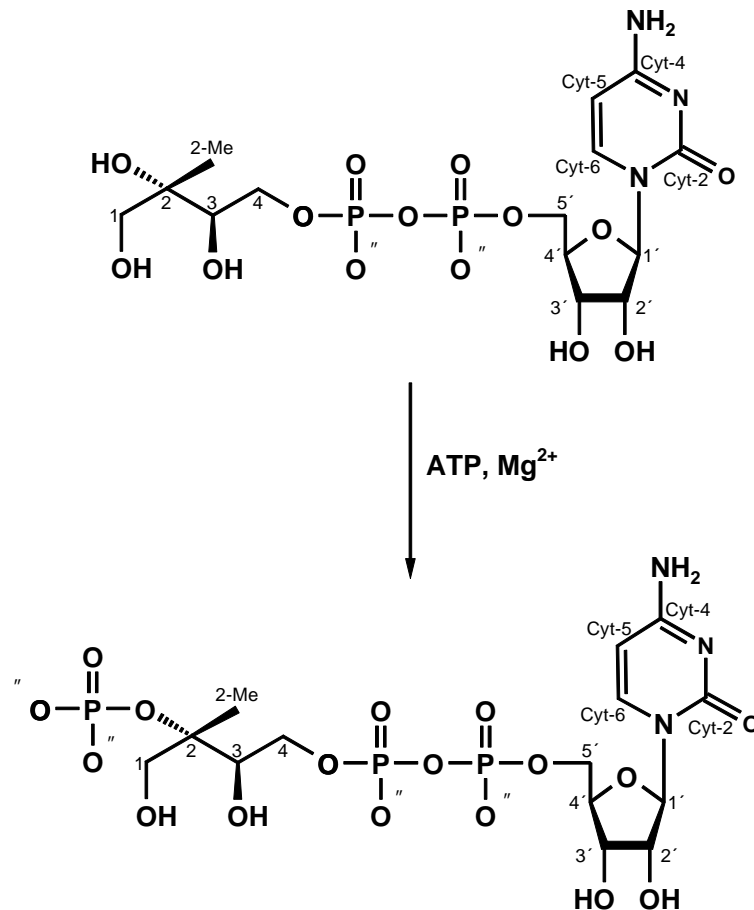


Abbildung 21: Phosphorylierung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol zu 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat durch das IspE-Protein

### 3.1.7 Synthese von isotopmarkiertem 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat

Die Darstellung von isotopmarkiertem 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat konnte ausgehend von ungereinigtem 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat erfolgen. Das für die vom IspE-Protein katalysierte Reaktion (Abbildung 21) benötigte ATP konnte mit Hilfe von PEP und der Pyruvatkinase (Abbildung 11) regeneriert werden. Deshalb wurden stöchiometrischen Mengen an CTP und PEP zur Reaktionslösung zugegeben. Erfolgte die Synthese ausgehend von DHAP, mußten außerdem katalytische Mengen an ATP zugesetzt werden. Wurde 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat ausgehend von Glucose erzeugt, konnte darauf verzichtet werden (vgl. Kap. 2.3.6).

Die Bildung des Enzymproduktes konnte mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie verfolgt werden. In Abbildung 22 ist der zeitliche Verlauf der Produktbildung am Beispiel der Synthese von  $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat wiedergegeben. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren wurden am ungereinigten Rohextrakt gemessen. Wie man gut erkennen kann, ist die Umsetzung von  $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphat zu  $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat annähernd quantitativ.

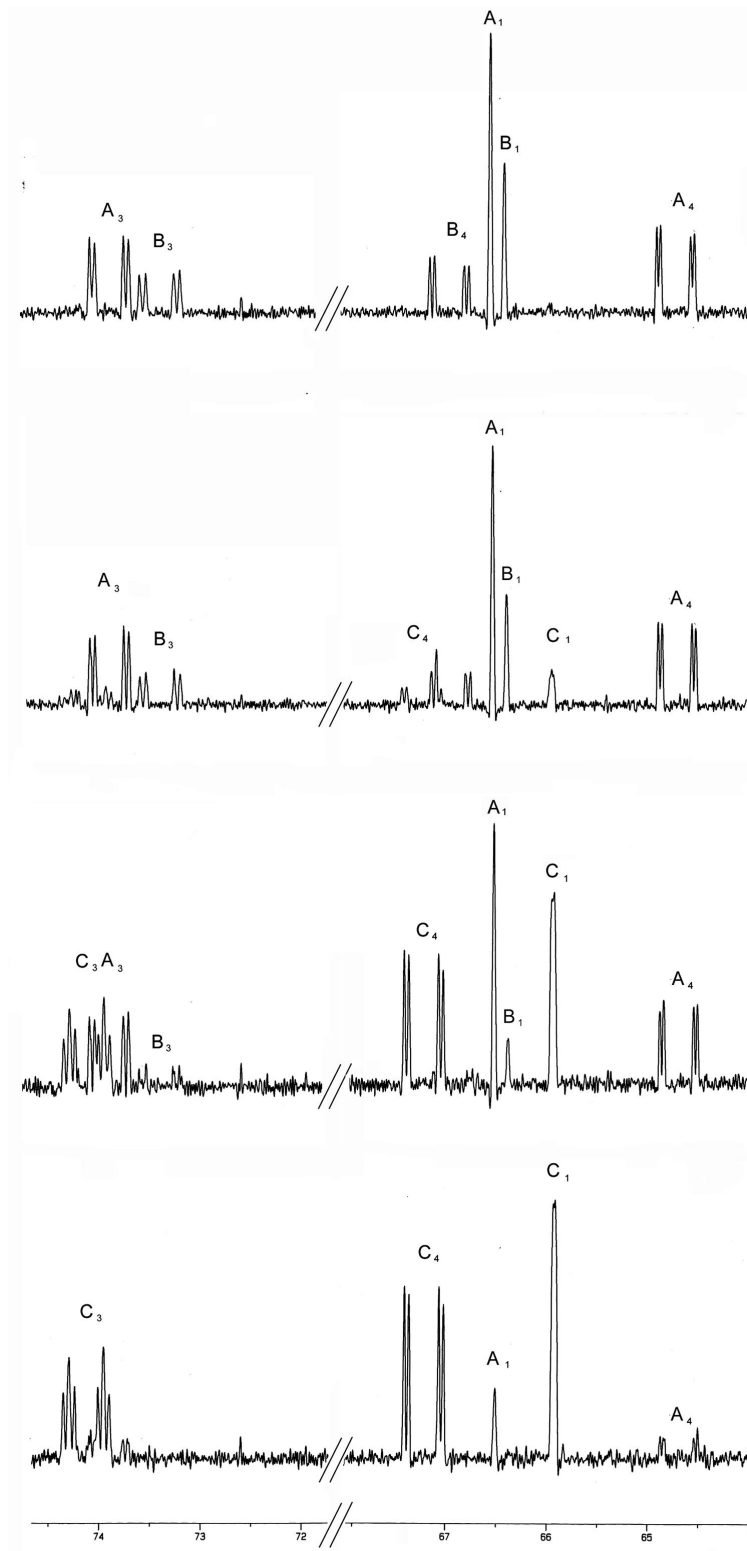


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Synthese von  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat. Spektrenfolge von oben nach unten: Kurz nach Beginn der Reaktion bis zur beendeten Umsetzung. A: 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat; B: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol; C: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat. Die Indizes geben den jeweiligen Kohlenstoff an.

Es wurde versucht, das erhaltene Produkt über Ecteola Cellulose mit Triethylammoniumacetat als Eluent (Nilsson und Sjunesson, 1961) zu reinigen. Allerdings zeigte sich, daß unter den Bedingungen ADP coeluierte. So war eine Reinigung nur möglich, wenn eines der beschriebenen Recyclingsysteme (Abbildung 11) für ATP verwendet wurde (vgl. Kap. 2.3.6.1 und 2.3.6.3). Es wurde versucht, das Produkt durch Bariumfällung zu erhalten. Hierbei trat allerdings eine annähernd quantitative Zersetzung des gewünschten Produktes auf.

[1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat konnte in gereinigter Form nur erhalten werden, wenn die Synthese ausgehend von sauberen [1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol erfolgte.

### 3.1.8 Das IspF-Protein katalysiert die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Neben dem bereits beschriebenen IspE-Protein wurde in unserer Arbeitsgruppe mit *ygbB*, später in *ispF* umbenannt, ein weiteres Gen des alternativen Terpenbiosyntheseweges entdeckt (Herz *et al.*, 2000a). Das von diesem Gen codierte Enzym war in der Lage, 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat zu einer neuen Verbindung umzusetzen, die nicht mehr UV-aktiv war. Eine Strukturaufklärung mittels NMR Spektroskopie zeigte, daß die Signale der 2C-Methyl-D-erythritol Einheit weitgehend unverändert sind (vgl. Tabelle 6 und Tabelle 7).

Weiterhin sind sämtliche Signale verschwunden, die dem Cytidin-Teil des Edukts zuzuordnen sind. Im <sup>31</sup>P-NMR kann man ein Diphosphat mit einer 23.6 Hz großen <sup>31</sup>P-<sup>31</sup>P Kopplung bei einer chemischen Verschiebung von -7.7 und -11.7 ppm erkennen.

Ferner zeigt eines der beiden Phosphoratome eine 5.3 Hz große Kopplung zur Methylgruppe, während das andere mit 1.1 bzw. 1.7 Hz mit C-4 und C-3 koppelt. Diese Daten zeigen, daß es sich um ein cyclisches Pyrophosphat handeln muß, bei dem das 2C-Methyl-D-erythritol Grundgerüst weitgehendst unverändert geblieben ist. Die NMR-Daten waren mit der bereits bekannten Struktur von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (Abbildung 23) identisch (Ostrovsky *et al.*, 1992; Ostrovsky *et al.* 1992b; Ostrovsky *et al.*, 1998, Turner *et al.*, 1992).



Tabelle 7: NMR-Daten von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Chemische Verschiebung (ppm)				Kopplungskonstanten (Hz)			
Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$	$J_{\text{HH}}$	$J_{\text{PC}}$	$J_{\text{PP}}$	$J_{\text{CC}}$
1	3.51 (d, 1)	66.95		12.2 (1 <sup>*</sup> )			41.8 <sup>a,b</sup> (2)
1 <sup>*</sup>	3.66 (d, 1)			12.2 (1)			
2		83.87			8.4 (P-2) <sup>b</sup>		39.8 (2-Me) <sup>a,b</sup>
2-Me	1.31 (s, 3)	16.30			5.3 (P-2) <sup>b</sup>		39.8 (2) <sup>a,b</sup>
3	4.01 (m, 1)	68.42		n. b.			46.0 (2) <sup>b</sup>
4	4.02 (m, 1)	65.72		n. b.	6.6 (P-4) <sup>c</sup>		42.7 (3) <sup>b</sup>
4 <sup>*</sup>	4.07 (m, 1)			n. b.			
P-4			-7.65			23.6 (P-2)	
P-2			-11.66		8.5 (2) <sup>b</sup> , 5.3 (2-Me) <sup>b</sup>	23.6 (P-4)	

\* bezeichnet das tieffeldverschobene H-Atom der jeweiligen Position

<sup>a</sup> gemessen an [U- $^{13}\text{C}_5$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

<sup>b</sup> gemessen an [2,2-Methyl- $^{13}\text{C}_2$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

<sup>c</sup> gemessen an [1,3,4- $^{13}\text{C}_1$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

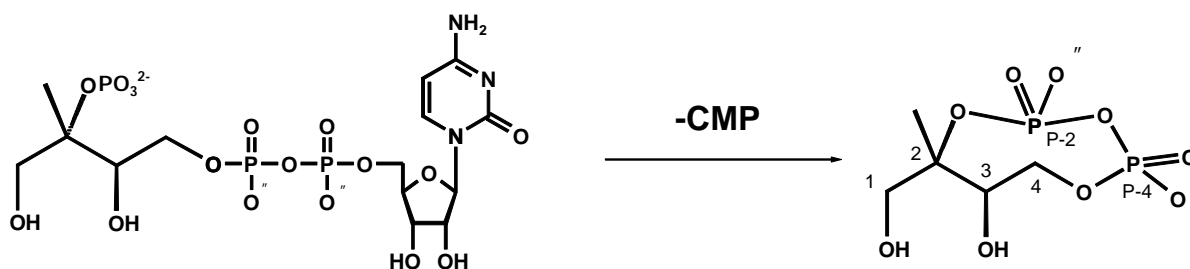


Abbildung 23: Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat durch das IspF-Protein

Interessanterweise war diese Verbindung bereits von Ostrovsky (Ostrovsky *et al.*, 1992; Ostrovsky *et al.* 1992b; Ostrovsky *et al.*, 1998) beschrieben worden. Dieser konnte sie in oxidativ gestreßten Bakterien nachweisen und vermutete deshalb, daß es sich um einen Anti-Stressfaktor handelt.

Neben der Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat aus 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat konnte eine weitere Aktivität des IspF-Proteins nachgewiesen werden. So ist dieses auch in der Lage, 4-

Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol umzusetzen. Eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie (Tabelle 8) zeigte, daß bei der Reaktion ebenfalls CMP abgespalten wird.

**Tabelle 8: NMR-Daten von 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat.**

Chemische Verschiebung (ppm)				Kopplungskonstanten (Hz)	
Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$	$J_{\text{HH}}$	$J_{\text{PC}}$
1	3.38 (d,1)	65.64		12.0 (1)	
1*	3.47 (d,1)			12.0 (1)	
2		73.02			6.5
2-Me	1.09 (s,3)	17.73			
3	4.15 (m,1)	77.61			1.7
4	4.18 (m,1)	64.96			1.1
4*	4.34 (ddd,1)			11.2 (4), 3.8, 7.2 (3)	
P-4			21.67 (s)		

\* bezeichnet das zweite diastereotopie H-Atom der jeweiligen Position

Im  $^{31}\text{P}$ -NMR ist nur ein Signal bei 21.67 ppm zu erkennen. Dieser Bereich ist typisch für ein 5 gliedriges cyclisches Monophosphat. Die  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen der 2C-Methyl-D-erythritol Einheit sind dagegen weitgehend unverändert (vgl. Tabelle 6). Ferner zeigen die Signale der Kohlenstoffe 3 und 4 Phosphorkopplungen mit 1.7 bzw. 1.1 Hz, während das Signal von Kohlenstoff 2 eine  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ -Kopplung von 6.5 Hz besitzt. Diese Daten belegen 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat als Produkt der Umsetzung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol mittels IspF-Protein (Abbildung 24).

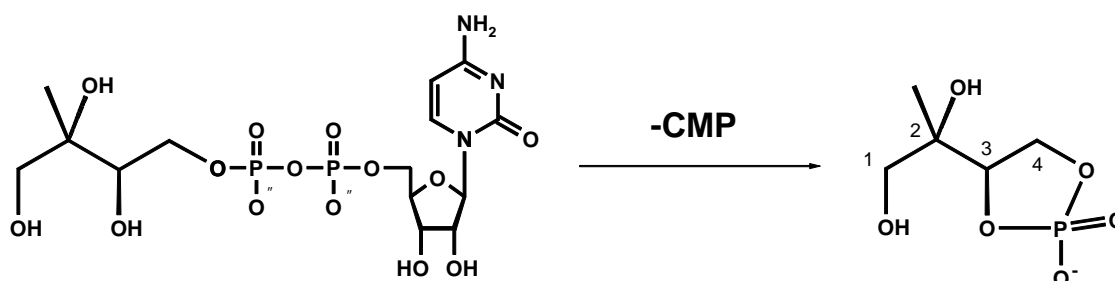


Abbildung 24: Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat

Bei dieser Verbindung handelt es sich nicht um ein Zerfallsprodukt oder ein Aufarbeitungsartefakt, was durch  $^{31}\text{P}$ -NMR Analytik am Reaktionsansatz gezeigt werden konnte. Dennoch handelt es sich *nicht* um ein Intermediat bei der Biosynthese von IPP (vgl. Kap. 4.1.2).

### 3.1.9 Synthese von isotopmarkiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Nach der Identifizierung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat als Intermediat des Biosyntheseweges von IPP wurde in Fortsetzung der bekannten Strategie dieses durch enzymatische Synthese mit Isotopen markiert.

Für die Darstellung von stabilisotopmarkierter Materialien im Millimolmaßstab mußte, um die Reinigung zu erleichtern, die Bildung von negativ geladenen Nebenprodukten vermieden werden. Bei der Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol wird CTP benötigt. Dieses wird in Form von CMP bei der vom IspF-Protein katalysierten Reaktion wieder freigesetzt und fällt somit in stöchiometrischen Mengen an. Allerdings ist es mit Hilfe der Nucleosidmono- und Nucleosiddiphosphatkinase möglich, CTP aus CMP zu regenerieren. Es steht somit wiederum als Substrat für die vom IspD-Protein katalysierten Reaktion zu Verfügung und wird nur noch in katalytischen Mengen benötigt (Abbildung 26).

Durch Verwendung der beschriebenen Recyclingsysteme für ATP, CTP und NADPH war es möglich, die Bildung von ionischen Nebenprodukten weitgehend zu vermeiden. Dadurch konnte die Darstellung von isotopmarkiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat ausgehend von Glucose als sogenanntes „Eintopf“-Verfahren, ohne Reinigung eines Zwischenprodukts durchgeführt werden. Die einzelnen Teilschritte konnten mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie überwacht werden. Die Zugabe der jeweils benötigten Enzyme erfolgte erst, wenn eine quantitative Umsetzung zu dem Zwischenprodukt der Reaktionsfolge beobachtet wurde (vgl. Kap. 2.3.7). Die Ausbeute von isotopmarkiertem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat lag bei ca. 50 %.

In Abbildung 25 sind Ausschnitte aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren der Umsetzung von  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat dargestellt. Wie man gut erkennen kann, erfolgt eine nahezu quantitative Bildung des gewünschten Produktes.

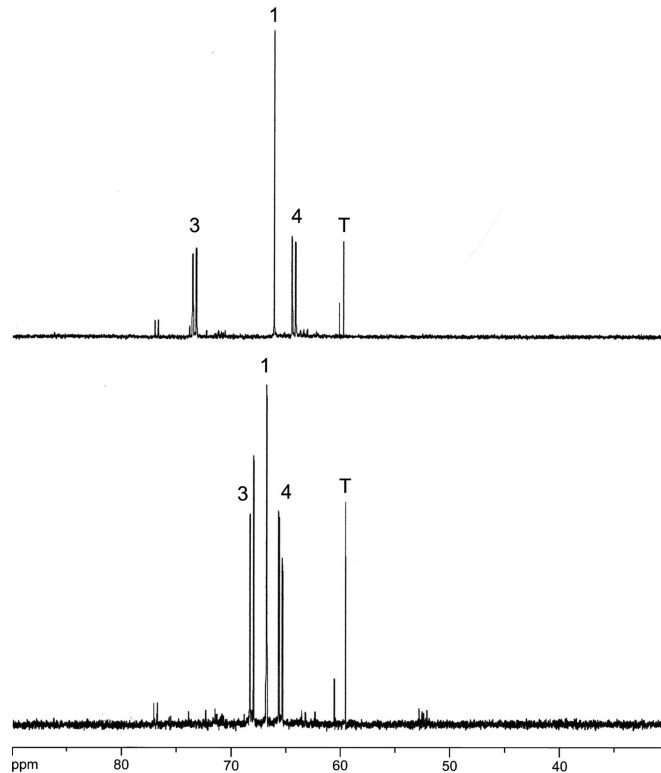


Abbildung 25: Ausschnitt aus den erhaltenen  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren der Umsetzung von  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat. Im oberen Teil ist das Spektrum des Ausgangsgemisches zu Beginn der Reaktion dargestellt. Im unteren Spektrum ist das Reaktionsprodukt zu erkennen. Die Zahlen deuten die jeweiligen Kohlenstoffe an. T: Trishydrochlorid

Das erhaltene Endprodukt konnte mit Hilfe des schwachen Ionenaustauschers Ecteola Zellulose mit Triethylammoniumacetat als Eluent gereinigt werden (vgl. Kap. 2.3.7.4).

Für die Synthese von radioaktivem  $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat wurde auf die beschriebene Regenerierung des Cosubstrates verzichtet. Die Reinigung wurde mittels HPLC durchgeführt. Die Detektion erfolgte hierbei mit Hilfe eines Radiodetektors (vgl. Kap. 2.3.7.4).

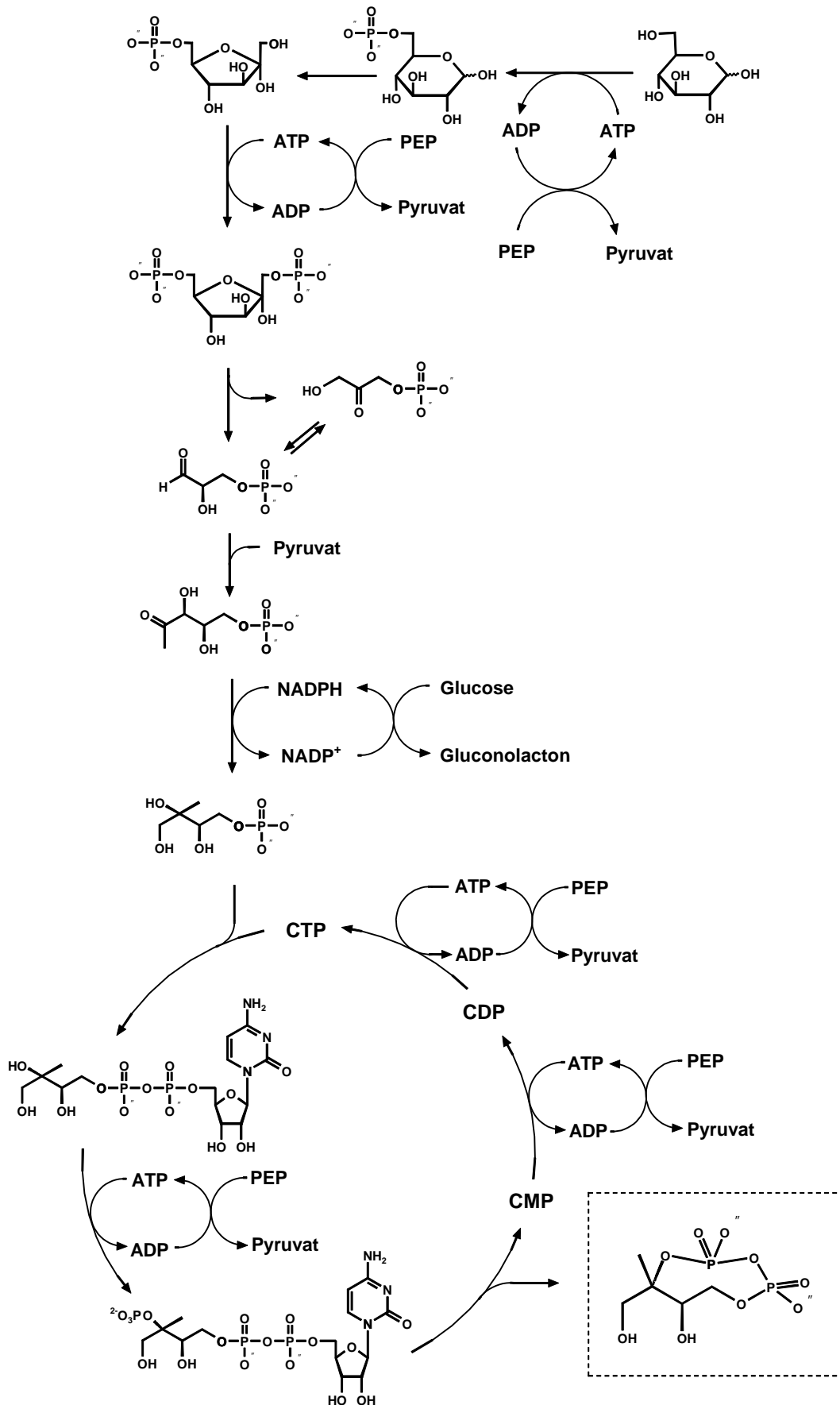


Abbildung 26: Enzymatische Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat ausgehend von Glucose

### 3.1.10 Die enzymatische Reaktion des IspF-Proteins aus *Plasmodium falciparum*

In unserer Arbeitsgruppe wurde die mutmaßliche katalytische Domäne eines Proteins aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, das Homologien mit dem IspF-Protein aus *E. coli* besitzt, überexprimiert, gereinigt und charakterisiert (Rohdich *et al.*, 2001).

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität wurde dieses in Gegenwart von Magnesiumchlorid bei pH 7.0 mit [1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat inkubiert und die Reaktionsmischung mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Interessanterweise konnten zwei unterschiedliche Produkte nachgewiesen werden. Die entstandene Hauptkomponente wurde als [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat identifiziert (Abbildung 27), die auch das Enzymprodukt des *E. coli* Homologs ist (vgl. Kap. 3.1.8 und Herz *et al.*, 2000a).

Im <sup>31</sup>P-NMR der Nebenkomponente sind zwei Signale bei 21.9 und 3.4 ppm zu erkennen (Tabelle 9). Die chemische Verschiebung bei 3.4 ppm ist typisch für ein Monophosphat, während das Signal bei 21.9 ppm charakteristisch für ein cyclisches Phosphat ist, das in einem 5-gliedrigen Ring gebunden ist. Das Signal bei 21.9 ppm ist durch eine Kohlenstoffkopplung mit 6.2 Hz zu einem Dublett aufgespalten. Das Signal bei 3.4 ppm ist stark verbreitert, es konnten allerdings keine Kohlenstoffkopplungen aufgelöst werden.

Das C-2 Signal ist im Vergleich zu 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (Takahashi *et al.*, 1998) durch die direkte Bindung einer Phosphatgruppe zu tieferem Feld verschoben und ist mit 78.8 ppm sehr ähnlich zu der Verschiebung bei 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (81.9 ppm). Die Kohlenstoffsignale 3 und 4 sind durch die Beteiligung am 5-Ring ebenfalls zu tieferem Feld verschoben. Die chemischen Verschiebungen bei 77.6 und 65.0 ppm stimmen sehr gut mit den entsprechenden Signalen bei 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat überein (vgl. Kap. 3.1.8, Tabelle 8). Die Aufspaltungsmuster der <sup>13</sup>C-Signale von C-2 und C-3 sind in Abbildung 28 dargestellt. Wie man Tabelle 9 entnehmen kann, zeigt das C-2 Signal zwei <sup>31</sup>P-<sup>13</sup>C-Kopplungen mit 6.4 und 6.2 Hz, während das C-3 Signal eine <sup>31</sup>P-<sup>13</sup>C-Kopplung von 8.8 Hz besitzt.

Es ist offensichtlich, daß C-2 sowohl mit dem <sup>31</sup>P aus dem cyclischen Phosphat als auch mit dem <sup>31</sup>P aus der Phosphatgruppe koppelt. Für die Kohlenstoffe 1, 2' und 4

sind keine Phosphorkopplungen zu beobachten. Ein Vergleich mit den Kopplungsmustern für 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat belegt, daß es sich bei der Verbindung um 2-Phospho-2C-methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat handeln muß (Abbildung 27).

Mit Hilfe der ermittelten Kopplungskonstanten konnten die Kopplungsmuster durch numerische Simulationsmethoden analysiert und unter Verwendung der Kopplungskonstanten aus Tabelle 9 die Signale A in Abbildung 28 erhalten werden. Wie man erkennen kann, stimmen die simulierten Signale mit dem gemessenen Spektrum (Signale B) sehr gut überein.

**Tabelle 9: NMR Daten von [1,2,2',3,4-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2-Phospho-2C-methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat**

<i>Chemische Verschiebung (ppm)</i>			<i>Kopplungskonstanten (Hz)</i>	
<i>Position</i>	<sup>13</sup> C	<sup>31</sup> P	<i>J<sub>PC</sub></i>	<i>J<sub>CC</sub></i>
C-1	65.7 (d)			40 (C-2)
C-2	78.8 (dddddd)		6.4 (P-4), 6.4 (P-2)	39.4 (C-2'), 46.0 (C-3), 40.0 (C-2)
C-2'	16.1 (d)			39.8 (C-2)
C-3	76.2 (ddd)		8.8 (P-2)	34.9 (C-4), 46.4 (C-2)
C-4	65.2 (d)			34.7 (C-3)
P-4		21.9	6.2	
P-2		3.4	n. b.	

Das relative Verhältnis von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 2-Phospho-2C-methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat wurde durch Integration der <sup>13</sup>C-NMR Signale auf 9:1 bestimmt.

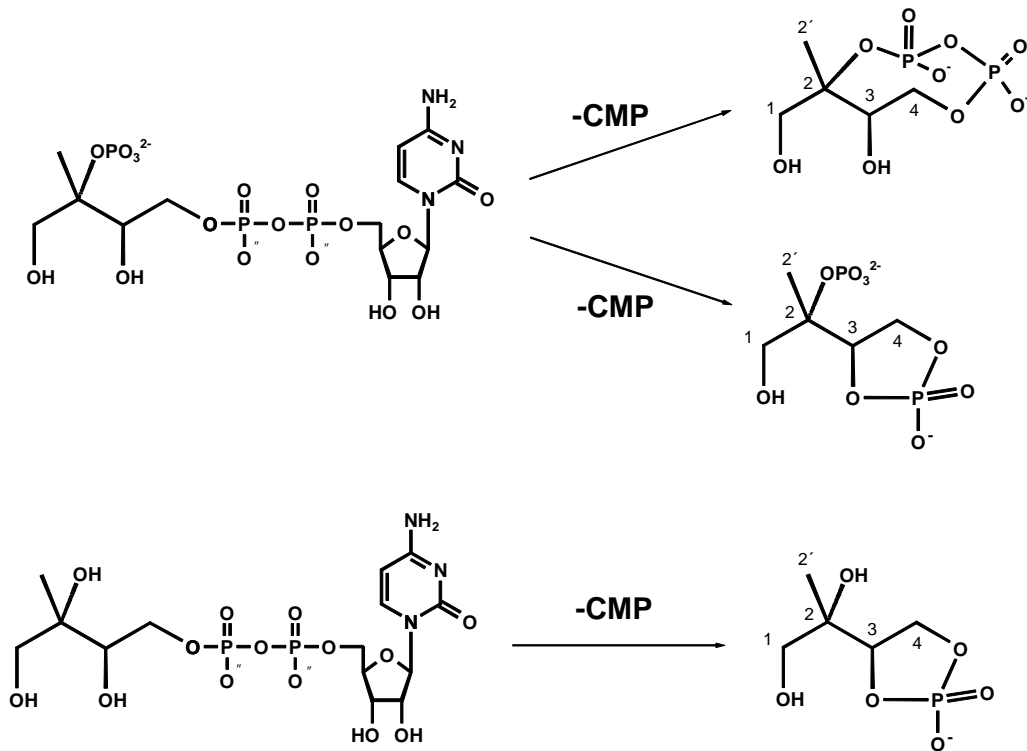


Abbildung 27: Die vom IspF-Protein aus *Plasmodium falciparum* katalysierten Reaktionen

Neben der katalytischen Aktivität mit 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat als Substrat konnte ebenfalls eine enzymatische Umsetzung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol beobachtet werden (Abbildung 27). Die NMR-Daten des gebildeten Enzymproduktes stimmten mit den Daten für 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat (vgl. Kap. 3.1.8, Tabelle 8) überein, das auch durch das *E. coli* Ortholog in einer Nebenreaktion gebildet wird (vgl. Kap. 3.1.8).



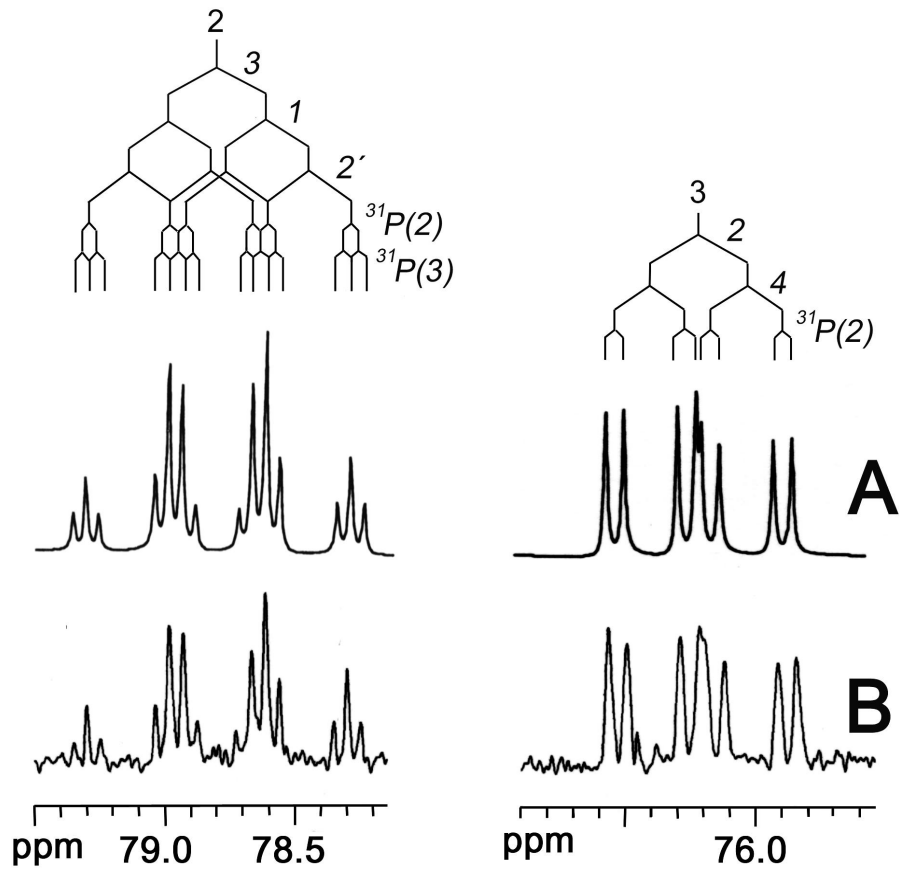


Abbildung 28: Die  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale mit den entsprechenden Kopplungsmustern der Kohlenstoffe 2 und 3 von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 2-Phospho-2C-methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat (A: simuliert, B: beobachtet)

### 3.1.11 Die katalytischen Aktivitäten der GcpE- und LytB-Proteine

#### 3.1.11.1 Aufbau eines *in vivo* Assays zum Nachweis der Genfunktionen von *gcpE* und *lytB*

Die folgenden Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. Felix Rohdich durchgeführt, der die gentechnisch veränderten Bakterienstämme herstellte. Eine Aufstellung aller hierbei verwendeten Klone ist in Tabelle 2 (Kap. 2.3) wiedergegeben.

Vergleichende Genomuntersuchungen (Adam *et al.*, 2000) wiesen darauf hin, daß die Gene *gcpE* und *lytB* (benannt nach dem *E. coli* Ortholog) für die Biosynthese von IPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg benötigt werden. Bestätigt wurde diese Vermutung durch chromosomale Knock-out Mutanten bei *Synechocystis sp.* und *E. coli* (Cunningham *et al.*, 2000, Campos *et al.*, 2001b).

An unserem Lehrstuhl wurde versucht, eine *in vitro* Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat unter anderem mittels rekombinanten GcpE- und LytB-Proteinen zu einem neuen Intermediat zu erreichen. Allerdings konnte keine Bildung einer neuen Verbindung beobachtet werden. Als mögliche Ursachen hierfür wären z. B. geringe Stabilitäten der beteiligten Proteine oder sehr seltene Cofaktoren denkbar. Durch Einbauversuche mit deuterierter 1-Desoxy-D-xylulose an *E. coli* Wild-Typ Stämmen war bekannt (Broers, 1994, Giner *et al.*, 1998a), daß diese mit spezifischen Inkorporationsraten von bis zu 90 % sehr effizient in Ubichinon eingebaut wird. Ferner wurde gezeigt (vgl. Kap. 3.1.3), daß die D-Xylulokinase sehr effizient 1-Desoxy-D-xylulose zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat phosphoryliert (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001a). Diese Verbindung wird nicht von *E. coli* aufgenommen.

Ausgehend von diesen Tatsachen wurde unter Verwendung von rekombinanten *E. coli* Stämmen versucht, den alternativen Terpenbiosyntheseweg *in vivo* zu verfolgen. Dazu wurde exogene 1-Desoxy-D-xylulose *in vivo* in bekannte bzw. noch unbekannte Intermediate des alternativen Terpenbiosyntheseweges endogen umgewandelt. Dadurch ist es möglich, die Schwierigkeiten bei den oben genannten *in vitro*

Umsetzungen durch das Vorhandensein von endogenen Cofaktoren und der besseren Stabilität beteiligter Proteine zu umgehen.

Für den Aufbau dieses *in vivo* Systems mußten mehrere Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Die Geschwindigkeit der Phosphorylierung von 1-Desoxy-D-xylulose zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat muß höher sein als die des Abbaus durch andere Stoffwechsellzyme. Dies sollte bei Verwendung eines Expressionsklons, der die D-Xylulokinase überexprimiert, erfüllt sein .
2. Die Aufnahme von 1-Desoxy-D-xylulose muß schneller erfolgen, als die ebenfalls mögliche Umsetzungen von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu Thiamin, Pyridoxal und zu Intermediaten des alternativen Terpenbiosynthesewegs.
3. Die Stoffmenge der entstehenden Intermediate muß so hoch sein, daß sie bei Verwendung von  $^{13}\text{C}$  markierten Verbindungen mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie noch detektierbar sind.

Nur wenn die oben genannten Voraussetzungen erfüllt sind, ist es möglich, eine intrazelluläre Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose in Intermediate des alternativen Terpenbiosyntheseweges mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie zu verfolgen.

### 3.1.11.2 *In vivo* Umsetzung von $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose zu $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in *E.coli* XL1-pBSXylB

Für die Einbauversuche wurde der *E. coli* Stamm XL1-pBSXylB verwendet, der das für die D-Xylulokinase codierende *xylB* Gen auf dem Blueskript SK II<sup>r</sup> Vektor enthält. Die Expression des Proteins wird durch den in diesem Stamm vorhandenen Lac-Repressor unterdrückt. Dieser kann durch Zugabe von IPTG inhibiert werden. Deshalb wurde zwei Stunden vor der Zugabe von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose mit IPTG induziert, um das zu exprimierende Protein in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen (vgl. Kap. 2.3.9.1). Die hierzu benötigte, markierte 1-Desoxy-D-xylulose wurde mittels alkalischer Phosphatase aus 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gewonnen und ins Medium gegeben (vgl. Kap. 2.3.2). Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 50 ml Kulturmedium entnommen, die enthaltenen Zellen abzentrifugiert und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgeschlämmt, die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen und die

Zellbestandteile abzentrifugiert (vgl. Kap. 2.3.9.1). Der erhaltene zellfreie Extrakt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt im NMR vermessen. Bereits nach wenigen Pulsen konnte eindeutig  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 29). Ferner waren geringe Mengen an  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose identifizierbar. Sowohl die chemischen Verschiebungen als auch die Kopplungskonstanten waren mit den in Tabelle 5 (Kap. 3.1.3) gezeigten Daten identisch.

Bereits 30 min nach Zugabe von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose war die Bildung von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in den *E. coli* Zellen nachweisbar. Nach ca. 3 h wurde die höchste Konzentration gemessen.

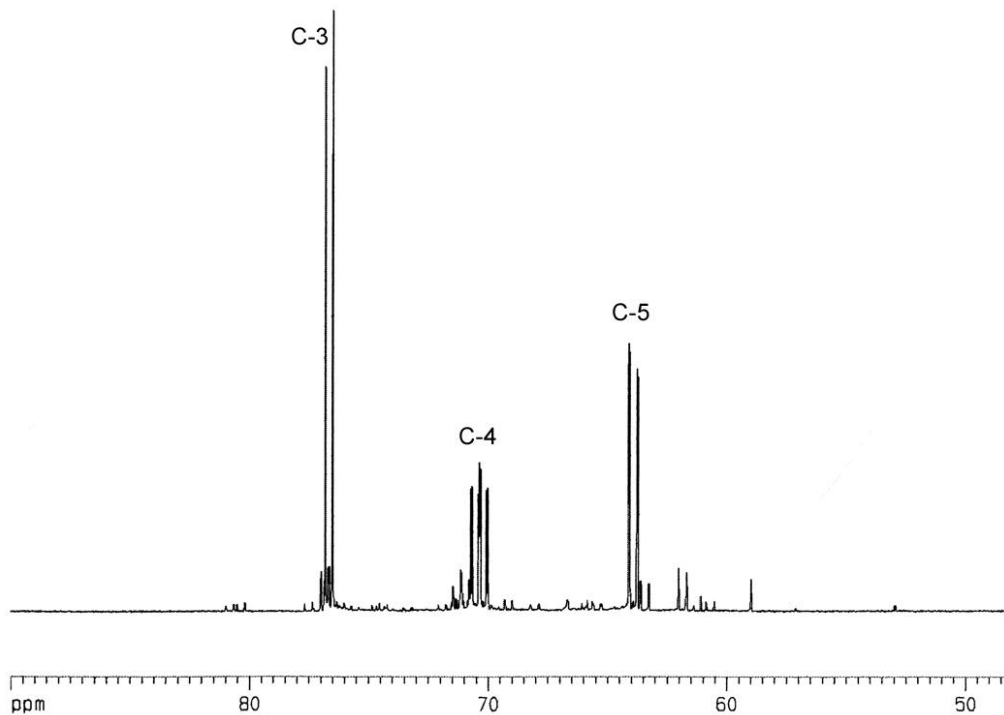


Abbildung 29: Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum des Zellextraktes aus XL1-pBSXylB Zellen 3 h nach Verfütterung von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose. Die mit Zahlen versehenen Signale deuten die jeweiligen Kohlenstoffe von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat an.

Um die Konzentration des gebildeten Produktes abzuschätzen, wurde  $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat als Standard zugegeben. Anschließend wurden die Signale von Pyruvat und dem Produkt im  $^{13}\text{C}$ -NMR integriert, wobei sich eine Konzentration von ca. 10 mM ergab. Es muß betont werden, daß es sich hierbei nur um eine Abschätzung handelt. Die Quantifizierung ist in Kap. 2.3.9.1 ausführlich beschrieben.

In Abbildung 30 ist das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines so hergestellten Zellextraktes aus *E. coli* XL1-pBSXylB dargestellt. Wie man leicht erkennen kann, ist  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]1\text{-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat}$  eine der am häufigsten vorkommenden Komponenten.

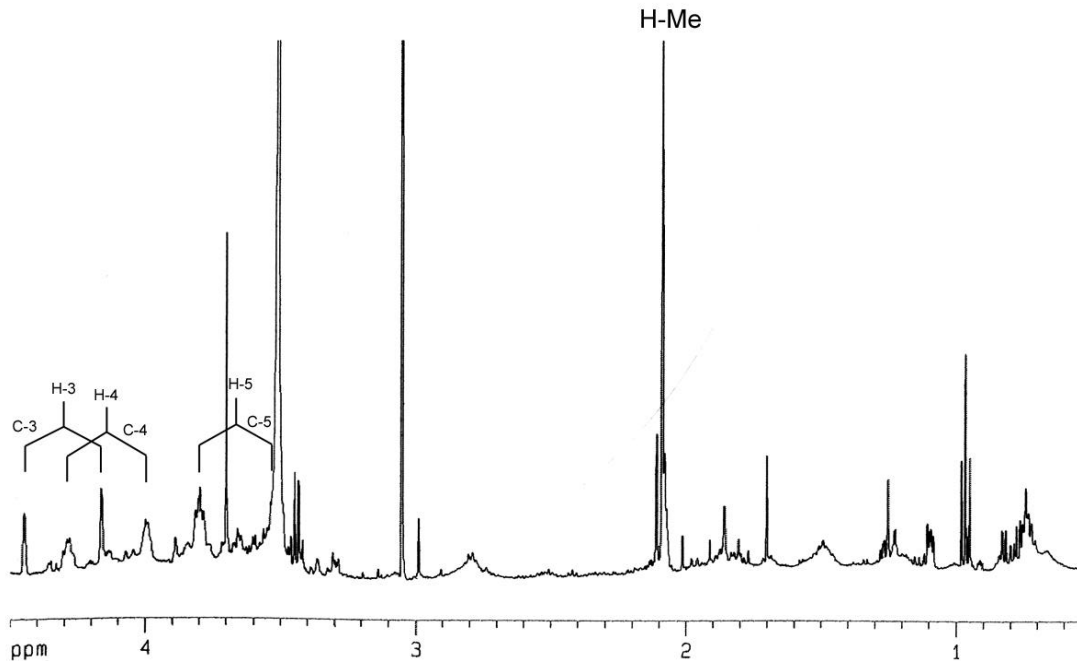


Abbildung 30: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Zellextraktes aus XL1-pBSXylB Zellen nach Verfütterung von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]1\text{-Desoxy-D-xylulose}$ . Die Signale der Protonen der Kohlenstoffe 3, 4 und 5 sind auf Grund der  $^{13}\text{C}$ -Markierung von  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]1\text{-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat}$  zu großen Dubletts aufgespalten, während das Signal der Methylprotonen (H-Me) als Singulett erscheint.

### 3.1.11.3 *In vivo* Umsetzung von $[U-^{13}\text{C}_5]1\text{-Desoxy-D-xylulose}$ zu $[U-^{13}\text{C}_5]2\text{-Methyl-D-erythritol-4-phosphat}$ in *E. coli* XL1-pBSXylBispC

Um neue Intermediate der Biosynthese von IPP aufzuklären, wurden zunächst alle bekannten Proteine des alternativen Terpenbiosyntheseweges schrittweise in *E. coli* überexprimiert und ihre Funktionen durch Einbauversuche mit isotopmarkierter 1-Desoxy-D-xylulose kontrolliert. Anschließend war geplant, die beiden Proteine GcpE und LytB, deren Funktionen noch unbekannt waren, zusätzlich zu den bereits charakterisierten Proteinen zu exprimieren, und somit ihre katalytischen Aktivitäten zu bestimmen.

Deshalb wurde, nachdem die Umsetzung zu  $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]1\text{-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat}$  erfolgreich war, ein *E. coli* Klon verwendet, der neben der D-Xylulokinase

das für den nächsten Schritt benötigte IspC-Protein (früher Dxr) überexprimierte. Um die entstehenden Produkte auch über 2D-NMR Experimente untersuchen zu können, wurde komplett  $^{13}\text{C}$ -markierte 1-Desoxy-D-xylulose zur Fütterung verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.3.9.2 beschrieben. Der Aufschluß der Zellen wurde, um eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen zu vermeiden, in 20 mM NaF/D<sub>2</sub>O durchgeführt.

In Abbildung 31 und Abbildung 32 sind Ausschnitte (vgl. Kap. 2.3.9.2) aus den erhaltenen HMQC bzw. HMQC-TOCSY Spektren des Zellextraktes aus *E. coli* XL1-pBSXylBispC abgebildet.

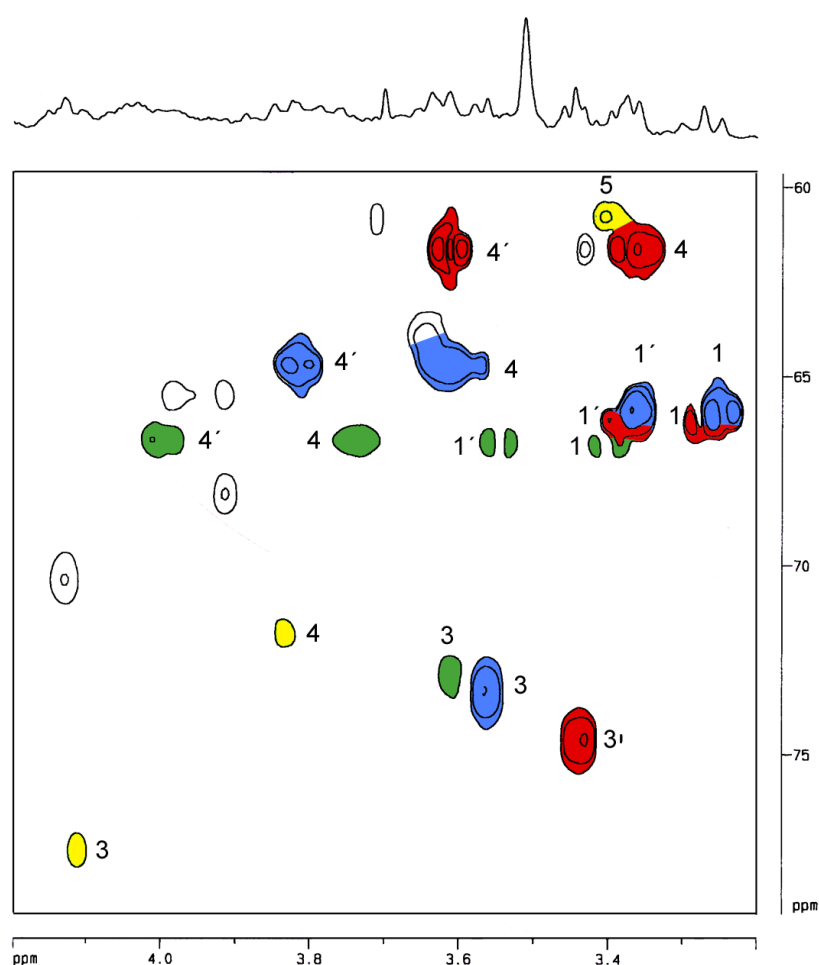


Abbildung 31: Ausschnitt aus dem HMQC-Spektrum des erhaltenen Zellextraktes aus *E. coli* XL1-pBSXylBispC 3 h nach Zugabe von [U- $^{13}\text{C}_5$ ]1-Desoxy-D-xylulose. Die Signale folgender Moleküle konnten identifiziert werden: [1,2,2',3,4- $^{13}\text{C}_5$ ]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (grün), [U- $^{13}\text{C}_5$ ]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (blau), [U- $^{13}\text{C}_5$ ]2C-Methyl-D-erythritol (rot) und [U- $^{13}\text{C}_5$ ]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (gelb).

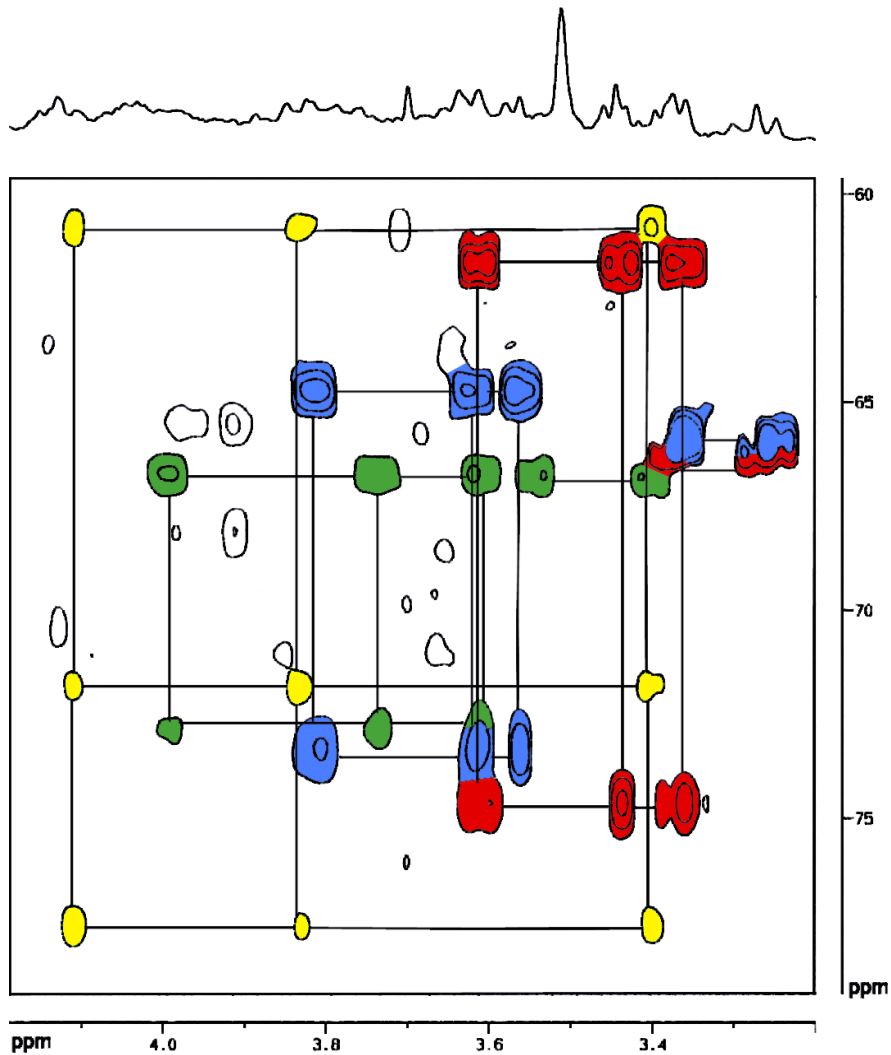


Abbildung 32: Ausschnitt aus dem HMQC-TOCSY-Spektrum des erhaltenen Zellextraktes aus *E. coli* XL1-pBSXylBispC 3 h nach Zugabe von  $[U-^{13}C_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose. Die Signale folgender Moleküle konnten identifiziert werden:  $[1,2,2',3,4-^{13}C_5]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (grün),  $[U-^{13}C_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (blau),  $[U-^{13}C_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol (rot) und  $[U-^{13}C_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (gelb).

Neben  $[U-^{13}C_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat war eindeutig  $[U-^{13}C_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol als häufigste Komponente zu erkennen, das wahrscheinlich durch Phosphatasen aus dem ersten gebildet worden war. Ferner konnte  $[1,2,2',3,4-^{13}C_5]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol als weiterer Inhaltsstoff identifiziert werden. Das molare Verhältnis der einzelnen Komponenten betrug 1:1.1:0.15. In sehr geringer Konzentration war  $[U-^{13}C_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat vorhanden.

Die NMR-Daten der häufigsten Komponenten sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Sie stimmen mit den publizierten Daten überein (Takahashi *et al.*, 1998, Rohdich *et al.*, 1999; Rohdich *et al.*, 2000b).

**Tabelle 10: NMR-Daten der häufigsten  $^{13}\text{C}$ -markierten Verbindungen im Zellextrakt von *E. coli* XL1-pBSXylBispC nach Fütterung mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose**

Position	Chemische Verschiebung (ppm)						
	1	1'	2	2-Methyl	3	4	4'
<i>[U-<math>^{13}\text{C}_5</math>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat</i>							
$^{13}\text{C}$	66.1		n.b.	18.1	73.4	64.8	
$^1\text{H}$	3.25	3.36		0.93	3.56	3.62	3.81
<i>[U-<math>^{13}\text{C}_5</math>]2C-Methyl-D-erythritol</i>							
$^{13}\text{C}$	66.6		n.b.	18.0	74.6	61.6	
$^1\text{H}$	3.26	3.34		0.9	3.44	3.36	3.61
<i>[1,2,2',3,4-<math>^{13}\text{C}_5</math>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol</i>							
$^{13}\text{C}$	66.8		n.b.	18.0	73.0	66.7	
$^1\text{H}$	3.4	3.55		0.9	3.6	3.74	4.00

#### 3.1.11.4 *In vivo* Umsetzung von $[\text{3,4,5-}^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose zu $[\text{1,3,4-}^{13}\text{C}_3]$ 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol in *E. coli* XL1-pBSXylBispCispDispF

Die *E. coli* Gene *ispD* und *ispF* befinden sich zusammen auf einem Minioperon (Rohdich *et al.*, 1999) und sind transkriptionell gekoppelt. Aus diesem Grund wurden sie gemeinsam in den bestehenden pBSXylBispC Vektor kloniert. Die Zugabe von  $[\text{3,4,5-}^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose und die Aufarbeitung erfolgte, wie in Kap. 2.3.9.3 beschrieben.

Da die von der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase katalysierte Reaktion (Takahashi *et al.*, 1998) eine Umlagerung im Kohlenstoffgerüst bewirkt, sind bei Verwendung von  $[\text{3,4,5-}^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose in den Folgeprodukten die Positionen 1, 3 und 4  $^{13}\text{C}$ -markiert (Abbildung 33).



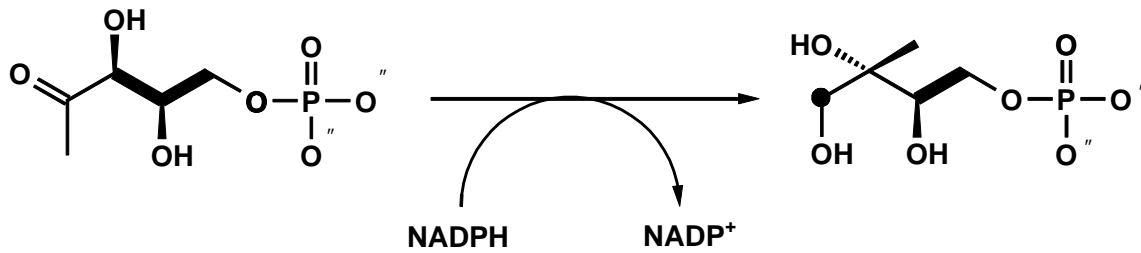


Abbildung 33: Bildung von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat aus [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat

Eine NMR-Analyse der Zellinhaltsstoffe von *E. coli* XL1-pBSXylBispCispDispF zeigte ein sehr ähnliches Produktspektrum wie beim XL1-pBSXylBispC Klon. Das molare Verhältnis von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol zu [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol konnte nur auf ein Verhältnis von 1:0.6:0.9 verbessert werden.

Eine mögliche Ursache könnte eine limitierend wirkende Menge an intrazellulären CTP sein. Die Konzentrationen an CMP in *E. coli* liegt bei ca. 126 µmol/g Trockenzellen (Neidhardt, F.C. 1996b) und sollte somit niedriger sein, als die gebildete Menge an [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, wodurch eine quantitative Umsetzung zu [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol nicht mehr möglich ist.

### 3.1.11.5 *In vivo* Umsetzung von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose zu [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol unter Zugabe von Additiven

Wie beschrieben, verlief die Umsetzung von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose zu [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol nur mit einer relativ niedrigen Ausbeute. Deshalb wurde versucht, die Umsatzrate durch gezielte Zugabe von Additiven ins Medium zu erhöhen. Da es für Cytidin einen aktiven Transporter in *E. coli* gibt (Neidhardt, 1996a), erschien diese Verbindung ideal geeignet. Deshalb wurde das Experiment unter Zugabe von Cytidin wiederholt (vgl. Kap. 2.3.9.4). Zusätzlich wurde, um den Klon mit ausreichend anorganischem Phosphat zu versorgen, Natriumhydrogenphosphat ins Medium gegeben (vgl. Kap. 2.3.9.4). Dadurch war es möglich, das molare Verhältnis von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-

erythritol-4-phosphat zu  $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]2\text{C-Methyl-D-erythritol}$  zu  $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]4\text{-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol}$  auf 1:3.4:4.2 zu steigern.

Wie in Kap. 3.1.8 beschrieben, vermag das IspF-Protein *in vitro* als Nebenaktivität 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol zu 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat umzusetzen. Obwohl das IspF-Protein überexprimiert war, konnte diese Nebenreaktion *in vivo* nicht beobachtet werden, was in Kap. 4.1.2 diskutiert wird.

Allerdings entstand unter diesen Bedingungen immer noch sehr viel  $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]2\text{C-Methyl-D-erythritol}$ , wahrscheinlich durch die Aktivität von unspezifischen Phosphatasen. Möglicherweise war bei den bisherigen Einbauversuchen nicht nur die Menge an Cytidin, sondern auch die vorhandene Konzentration an Phosphorylierungsmitteln wie ATP limitierend. Deshalb wurde nach einer passenden „Phosphatquelle“ gesucht. Besonders gut geeignet erschien Glycerin-3-phosphat, da *E. coli* für dieses Molekül einen aktiven Transporter besitzt (Neidhart, 1996c). Ferner ist es ein Produkt im zentralen Stoffwechsel und damit für Bakterien gut verwendbar. Die genannten Stoffe sollten eine Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat bei einem Klon, der zusätzlich das IspE Protein exprimiert, forcieren (Kap. 3.1.11.6).

#### 3.1.11.6 *In vivo* Umsetzung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]1\text{-Desoxy-D-xylulose}$ zu $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$ in *E. coli* XL1-pBSXylBispC-F

Neben Glycerin-3-phosphat wurde zu der *E. coli* pBSXylBispC-F Kultur noch anorganisches Phosphat und Cytidin gegeben (vgl. Kap. 2.3.9.5). Bereits 30 min nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]1\text{-Desoxy-D-xylulose}$  konnte eine quantitative Umsetzung zu  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  beobachtet werden. Nach 3 h war die Konzentration (ca. 30 mM) in den Zellen am höchsten, während  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]2\text{C-Methyl-D-erythritol}$  nicht mehr nachweisbar war. Interessanterweise konnte bereits Ostrovsky (Ostrovsky *et al.*, 1992a; Ostrovsky *et al.*, 1992b) in oxidativ gestreßten Bakterien eine Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat bis zu einer Konzentration von 50 mM beobachten. In Abbildung 34 ist ein Ausschnitt des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des erhaltenen Rohextraktes der Umsetzung von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]1\text{-Desoxy-D-xylulose}$  mit *E. coli* pBSXylBispC-F dargestellt. Wie man gut am Signal der Methylgruppe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  erkennen kann, handelt es sich hierbei um die häufigste Verbindung.

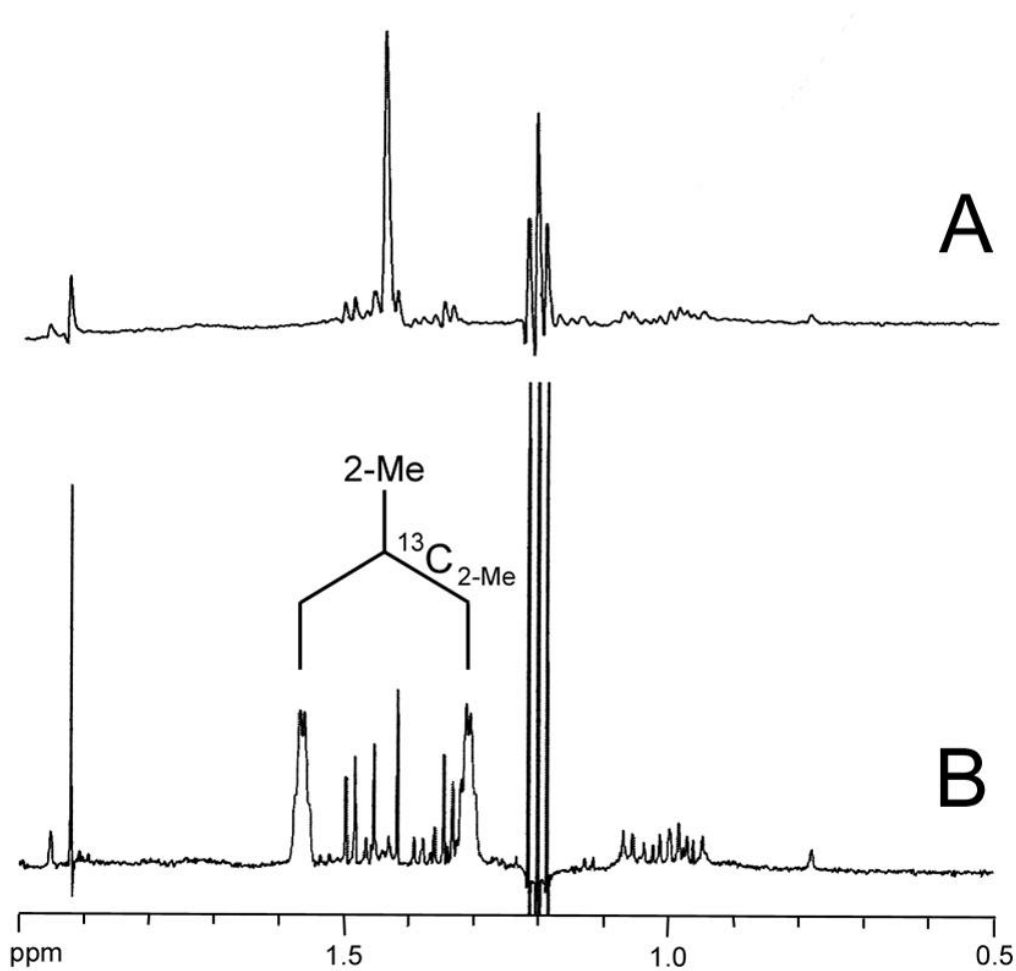


Abbildung 34: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Rohextraktes aus X11-pBSxyIBispC-F 3 h nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose. Das obere Spektrum wurde mit  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung (A), das untere ohne  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung (B) gemessen. Im unteren Spektrum sind die  $^1\text{H}$ -Signale der Methylgruppe von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat auf Grund der  $^{13}\text{C}$ -Kopplung zu einem großen Dublett aufgespalten.

Es muß betont werden, daß für die Spektren direkt der Rohextrakt, ohne Reinigung, gemessen wurde. Wie man leicht erkennen kann, sind die Signale von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat sowohl im  $^1\text{H}$  als auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abbildung 35) dominierend. Somit handelt es sich um die häufigste Verbindung im *E. coli* Rohextrakt.

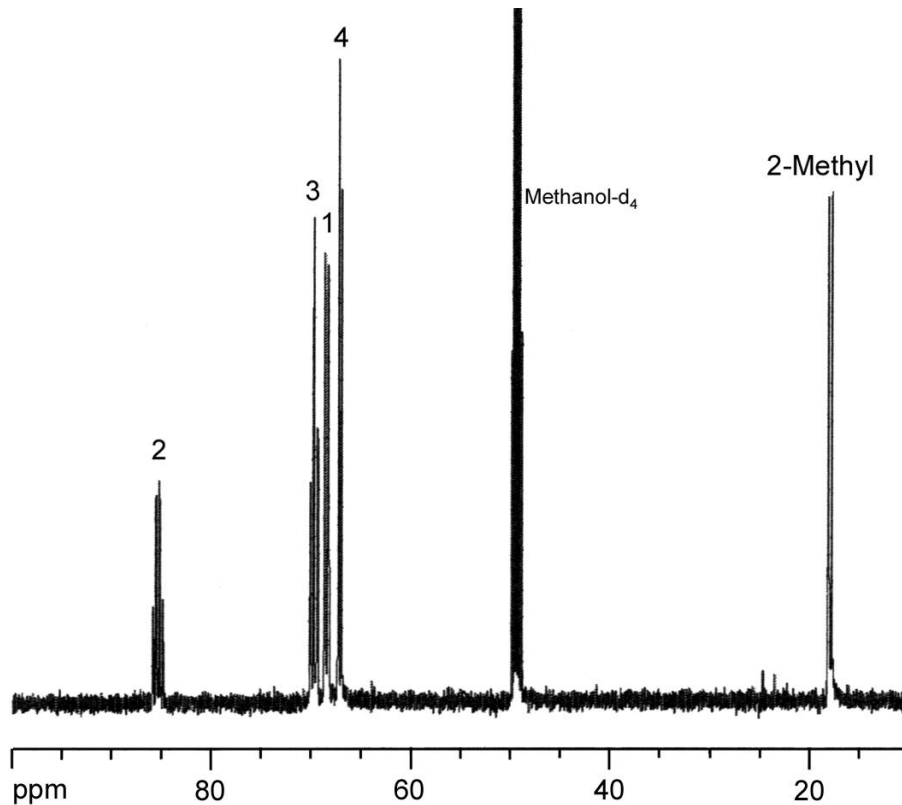


Abbildung 35: Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum des Rohextraktes aus X11-pBSxylBispC-F 3 h nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose. Die Zahlen deuten die jeweiligen Kohlenstoffatome von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat an.

Es wäre denkbar gewesen, daß neben 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat durch Wildtyp Aktivität ein neues Intermediat in meßbaren Mengen entsteht. Es konnte jedoch kein unbekannter Metabolit des Terpenbiosyntheseweges beobachtet werden. Allerdings waren mit *gcpE* und *lytB* noch zwei weitere Gene bekannt (Adam *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001b), die für die Bildung von IPP benötigt werden. Diese wurden einzeln auf das zum Blueskript SK II Vektor orthogonale pACYC184 Plasmid (Chang und Cohen, 1978) kloniert. Um die biologische Funktion der GcpE und LytB Proteine zu bestimmen, wurde jeweils eines der beiden pACYC184 Konstrukte zusammen mit dem pBSxylBispC-F Konstrukt in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

### 3.1.11.7 *In vivo* Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose zu einem neuen Intermediat in *E. coli* XL1-pBSXylBispC-F pACYCgcpE

Die Durchführung des Inkorporationsexperimentes in *E. coli* XL1-pBSXylBispC-F pACYCgcpE erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Versuchen mit [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose und [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose als Ausgangsmaterial (vgl. Kap. 2.3.9.6). Erfreulicherweise konnte zu ca. 10 % (bezogen auf die Menge an 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat) eine neue Verbindung detektiert werden. Die Strukturaufklärung des neuen Produktes erfolgte mittels NMR-Spektroskopie.

### 3.1.11.8 Identifizierung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat

Im <sup>1</sup>H entkoppelten <sup>13</sup>C-NMR Spektrum des aufgeschlossenen Rohextraktes konnten fünf <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C gekoppelte Signale identifiziert werden, die eindeutig zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zugeordnet wurden (Herz *et al.*, 2000a; Takagi *et al.*, 2000). Ferner sind fünf weitere gekoppelte Signale bei einer chemischen Verschiebung von 14.7, 64.5, 68.6, 122.7 und 139.5 ppm zu erkennen, die zu einem bislang unbekanntem Metabolit gehörten (vgl. Tabelle 11).

Die chemischen Verschiebungen bei 139.5 und 122.7 ppm deuten auf eine Doppelbindung hin. Ferner spiegelt das Signal bei 14.7 ppm eine Methylgruppe wider, während die Signale bei 64.5 und 68.6 ppm in einem typischen Bereich für Kohlenstoffe sind, an denen jeweils ein Sauerstoff gebunden ist. Die drei Signale, die zu sp<sup>3</sup>-hybridisierten Kohlenstoffatomen gehören (14.7, 64.5 und 68.5 ppm), zeigen jeweils eine <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Kopplung von 40-50 Hz (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu weist das Signal bei 122.7 ppm zwei <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Kopplungen mit 74 und 50 Hz auf, während das Signal bei 141.5 ppm <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C Kopplungen mit drei Nachbarn (Kopplungskonstanten: 74, 43 und 43 Hz) zeigt. Sowohl die chemische Verschiebung der einzelnen Signale als auch die dazu gehörenden Kopplungsmuster belegen ein 2-Methyl-2-butenyl-Kohlenstoffgrundgerüst.

Durch HMQC und HMQC-TOCSY Experimente konnten sowohl die chemischen Verschiebungen der zu der Struktur gehörenden Protonen als auch die entsprechenden <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H Spinsysteme bestimmt werden (Tabelle 12). So korreliert das Signal bei 122.7 ppm im <sup>13</sup>C-NMR mit einem <sup>1</sup>H-NMR Signal bei 5.6 ppm. Sowohl die Verschiebung im <sup>13</sup>C- als auch im <sup>1</sup>H-NMR sind typisch für Doppelbindungen. Im

Gegensatz dazu zeigt das Signal bei 139.5 ppm keine Korrelation zu einem Proton, so daß der zweite Kohlenstoff der Doppelbindung quartär sein muß. Ferner koppelt das Signal bei 5.6 ppm mit dem  $^1\text{H}$ -Signal bei 4.5 ppm. Die Signale bei 64.5 und 68.6 ppm korrelieren mit  $^1\text{H}$ -Signalen bei 4.5 und 3.9 ppm, während das Methylsignal bei 14.5 ppm mit einem  $^1\text{H}$ -Signal bei 1.5 ppm korreliert. Sowohl die  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  Kopplungsmuster als auch die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Korrelationen (HMBC, HMQC, HMQC-TOCSY Experimente, Tabelle 12) belegen ein 1,4-Dihydroxy-2-methyl-2-butenyl Gerüst.

Wenn man von  $[3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose ausgeht, kann man drei Signale bei 64.5, 68.6 und 122.7 ppm beobachten, die zu den Positionen 4, 1 und 3 des neuen Produkts gehören. Der Grund hierfür ist die Umlagerung (Takahashi *et al.*, 1998) des Kohlenstoffgrundgerüsts durch die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase (vgl. Kap. 3.1.11.4, Abbildung 33). Diese Daten bestätigen zusätzlich, daß die neue Verbindung aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat gebildet wurde und es sich somit um ein Intermediat der Biosynthese von IPP handelt.

Die  $^{13}\text{C}$ -Signale der Kohlenstoffe 3 und 4 bei 122.7 und 64.5 ppm zeigen  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  Kopplungen von 8.0 und 5.5 Hz. Diese Kopplungen belegen, daß es sich bei der Verbindung um ein Phosphat oder Pyrophosphat handeln muß. Das Phosphatmotiv muß sich ferner an Position 4 befinden (Abbildung 36).

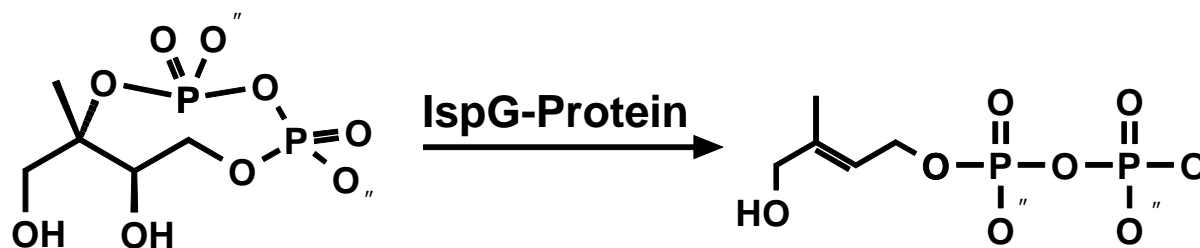


Abbildung 36: Die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion

Dieses Ergebnis wird durch das  $^1\text{H}$  entkoppelte  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (vgl. Tabelle 11) der neuen Verbindung bestätigt. Dieses zeigt ein Dublett bei  $-9.2$  ppm ( $^{31}\text{P}$ - $^{31}\text{P}$  Kopplungskonstante 20.9 Hz) und ein dupliziertes Doppeldublett bei  $-10.6$  ppm ( $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$  Kopplungskonstanten 5.8 und 7.4 Hz,  $^{31}\text{P}$ - $^{31}\text{P}$  Kopplungskonstante 20.9 Hz). Ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung ist das Signal bei  $-10.6$  ppm verbreitert, während das Signal bei  $-9.2$  ppm unverändert bleibt. Das Signal bei  $-9.2$  ppm zeigt keine Kopplung zu

Protonen und ist somit endständig. Sowohl die chemische Verschiebung als auch die Kopplungsmuster belegen die Struktur eines Pyrophosphates an Position 4.

Die dargestellten NMR-Daten belegen 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat als Struktur des neuen Intermediates (Abbildung 36).

**Tabelle 11: NMR Daten von 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat**

Position	Chemische Verschiebung (ppm)			Kopplungskonstanten (Hz)		
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>31</sup> P	J <sub>PC</sub>	J <sub>PP</sub>	J <sub>CC</sub>
1	3.91	68.6 <sup>a,b</sup>				43.0 <sup>b</sup> , 5.5 <sup>a</sup> , 3.5 <sup>a</sup>
2		139.5 <sup>a,b</sup>				74.3 <sup>b</sup> , 43.3 <sup>b</sup> , 43.3 <sup>b</sup>
2-Methyl	1.51	14.7 <sup>b</sup>				42.2 <sup>b</sup> , 4.0 <sup>b</sup> , 4.0 <sup>b</sup>
3	5.57	122.7 <sup>b</sup>		8.0 <sup>a</sup>		73.9 <sup>b</sup> , 49.8 <sup>a</sup> , 4.0 <sup>a</sup>
4	4.46	64.5 <sup>a,b</sup>		5.5 <sup>a</sup>		49.3 <sup>a</sup> , 5.5 <sup>a</sup>
P <sub>β</sub>			-9.2		20.9	
P <sub>α</sub>			-10.6	5.8 <sup>a</sup> , 7.4 <sup>a</sup>	20.9	

<sup>a</sup> Beobachtet bei [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat

<sup>b</sup> Beobachtet bei [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat

**Tabelle 12: Korrelationsmuster von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat und von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphat**

NMR Korrelationsmuster			
Position	HMQC	HMQC-TOCSY	HMBC
1	1 <sup>a,b</sup>	1 <sup>a,b</sup>	2-Methyl <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup>
2			
2-Methyl	2-Methyl <sup>b</sup>	2-Methyl <sup>b</sup>	
3	3 <sup>a,b</sup>	3 <sup>a,b</sup> , 4 <sup>a,b</sup>	2-Methyl <sup>a</sup> , 1 <sup>a</sup>
4	4 <sup>a,b</sup>	4 <sup>a,b</sup> , 3 <sup>a,b</sup>	

<sup>a</sup> Beobachtet bei [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat

<sup>b</sup> Beobachtet bei [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat

Die Konfiguration der Doppelbindung wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Vergleich mit synthetischem Material als E bestimmt (Amslinger *et al.*, in Vorbereitung).

### 3.1.11.9 *In vivo* Umsetzung von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose zu [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat in *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FgcpE

Ein möglicher Grund für die relativ geringe Umsatzrate (ca. 10 %, bezogen auf 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat) könnte eine zu geringe Konzentration an GcpE-Protein gewesen sein, da die Kopienzahl und der davon abhängige Expressionslevel an Genprodukt des Vektors pACYC184 im Vergleich zu pBlueskript SkII niedriger ist. Deshalb wurde das Experiment mit einem *E. coli* Klon wiederholt (vgl. Kap. 2.3.9.7), bei dem alle Gene auf dem Blueskript Vektor liegen. Allerdings konnte auch in diesem Fall keine Steigerung der Umsatzrate beobachtet werden.

Bei der Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat muß eine Reduktion unter Übertragung von zwei Elektronen stattfinden. Es ist vorstellbar, daß *E. coli* auf Grund der hohen Konzentration an 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat nicht in der Lage ist, genügend Reduktionsäquivalente zu mobilisieren. Allerdings könnte es dann möglich sein, durch gezielte Zugabe von biochemisch leicht oxidierbaren Stoffen wie Lactat, Succinat oder Malat die Limitierung zu überwinden und somit eine ausreichende Konzentration an Reduktionsäquivalenten zu erzeugen.

### 3.1.11.10 *In vivo* Umsetzung von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose zu [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat unter Zugabe von Additiven

Um diese Theorie zu untermauern, wurden zusätzlich verschiedene, biochemisch leicht oxidierbare Stoffe in das Medium gegeben. Es stellte sich heraus, daß sowohl mit Malat, Succinat als auch mit Lactat eine Steigerung der gebildeten Menge an 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat erreicht werden konnte. Die Umsatzrate stieg bei Verwendung von Lactat von 10 auf ca. 50 % (bezogen auf 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat).

In Abbildung 37 ist das erhaltene Spektrum bei Zugabe von Lactat gezeigt.



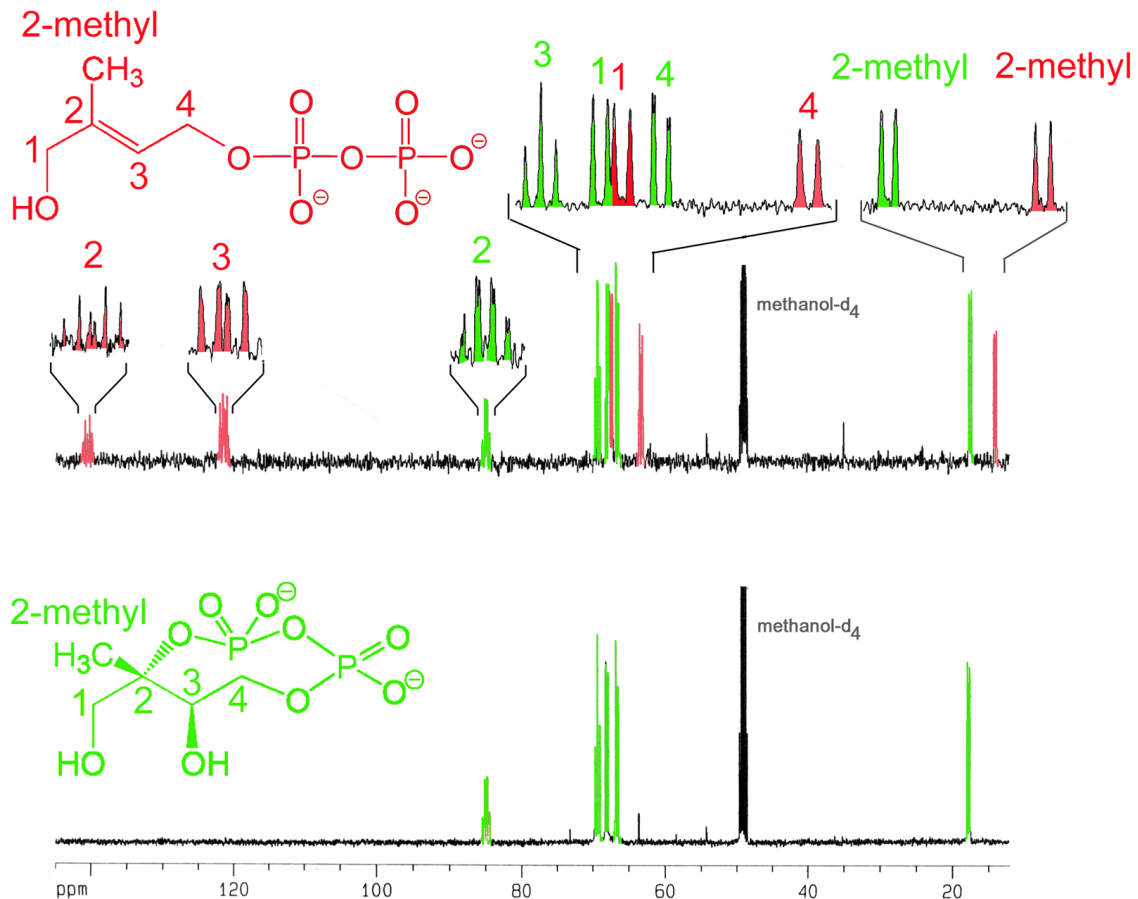


Abbildung 37: Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum des Zellextraktes aus XL1-pBSXylBispC-FgcpE nach Zugabe von [U- $^{13}\text{C}_5$ ]1-Desoxy-D-xylulose. Die grünen Signale stammen von [U- $^{13}\text{C}_5$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, während die roten Signale zu 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat gehören.

In einem Kontrollexperiment wurde anstelle des *gcpE*-Gens das *lytB*-Gen sowohl auf den pACYC184 als auch auf den Blueskript SK II Vektor kloniert. Die Durchführung der Verfütterungsexperimente erfolgte analog (vgl. Kap. 2.3.9.9). In beiden Fällen konnte keine Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu einem neuen Produkt beobachtet werden. Diese Daten belegen, daß das GcpE-Protein 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2E-methyl-2-butenyl-4-diphosphat umsetzt.

### 3.1.11.11 *In vivo* Umsetzung von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose in *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FlytBgcpE unter Zugabe von Additiven

Für die Bildung von IPP und DMAPP muß reduktiv Wasser eliminiert werden. Es ist wahrscheinlich, daß diese Reaktion von einem einzigen Enzym katalysiert wird. Durch vergleichende Genomuntersuchungen und chromosomalen Knock-out Mutanten war bekannt (Kap. 3.1.11.6), daß neben dem *gcpE*-Gen das *lytB*-Gen essentiell für die Bildung von IPP und DMAPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg ist. Aus diesem Grund wurde zusätzlich das *lytB*-Gen auf den Blueskript SK II Vektor kloniert. Die Anzucht des *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FlytBgcpE Klons erfolgte wie in Kap. 2.3.9.8 beschrieben. Neben [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose wurde wiederum Lactat ins Medium gegeben.

Allerdings konnte auf diese Art weder markiertes IPP noch DMAPP erhalten werden. Es konnte lediglich die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat beobachtet werden. Auch die Variation der Kulturbedingungen und die Zugabe verschiedener Metallionen und biochemisch leicht oxidierbarer Verbindungen führten nicht zu einer detektierbaren Konzentration an IPP und DMAPP. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, daß die von den Prenyltransferasen katalysierte Bildung zu höheren Isoprenoiden so schnell verläuft, daß keine meßbare Konzentration an IPP erhalten wird.

### 3.1.11.12 *In vivo* Umsetzung von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Mevalonsäure zu [4-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]IPP in *E. coli* XL1-pBSpmkmdv und *E. coli* XL1-pACYCpmkmdv

Die Genkonstrukte pBSpmkmdv bzw. pACYCpmkmdv (Rohdich, unveröffentlichte Daten) kodieren die Enzyme für die Bildung von IPP aus Mevalonat. Durch Verfütterung von <sup>13</sup>C-markiertem Mevalonat an die *E. coli* Klone XL1-pACYCpmkmdv und XL1-pBSpmkmdv wurde geprüft, ob es mit Hilfe dieser Konstrukte möglich ist, <sup>13</sup>C-markiertes IPP zu erzeugen (vgl. Kap. 3.1.11.12).

Interessanterweise konnte bei Verwendung dieser Bakterienstämme [4-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]IPP gebildet werden. Ein doppelmarkiertes IPP war nicht zu erwarten, da die Säurefunktion durch Decarboxylierung (vgl. Abbildung 3, Kap. 1) verloren wird. Durch HMQC, HMQC-TOCSY und HMBC Spektren konnte belegt werden, daß es sich bei

der gebildeten Substanz tatsächlich um IPP handelte. Die Strukturaufklärung von IPP ist in Kapitel 3.1.11.13 beschrieben. Dieses Ergebnis zeigte, daß die Prenyltransferasen nicht der Grund für die geringe Bildung von IPP sein können.

### 3.1.11.13 *In vivo* Umsetzung von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose zu [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]IPP und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]DMAPP in *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FgcpElytB unter Zugabe von Additiven

Zu diesem Zeitpunkt wurde an unserem Lehrstuhl gezeigt (Adam, unveröffentlicht), daß Zellextrakte aus *E. coli* XL1-pACYCgcpElytB in der Lage waren, *in vitro* radioaktives 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu IPP umzusetzen. Im Gegensatz dazu erfolgte eine *in vitro* Reaktion mit Zellextrakten aus *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FlytBgcpE nur zu einem sehr geringen Maß. Möglicherweise ist die Abfolge der Transkription der Gene auf dem Vektor entscheidend. Aus diesem Grund wurde für das nächste Einbauexperiment der *E. coli* Klon XL1-pBSXylBispC-FgcpElytB verwendet, bei dem die Transkriptionsabfolge von *gcpE* und *lytB* vertauscht war.

Durch Verwendung dieses Klons war es auch *in vivo* möglich, neben [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat, drei neue Metabolite in detektierbaren Mengen zu erzeugen (vgl. Abbildung 38 C). Die Strukturaufklärung erfolgte mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie.

So konnten im <sup>1</sup>H- entkoppelten <sup>13</sup>C-NMR Spektrum fünf intensive Signale detektiert werden, die [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zugeordnet wurden (vgl. Abbildung 38). Ferner waren fünf weitere <sup>13</sup>C-gekoppelte Signale mit schwacher Intensität vorhanden, die zu [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat gehören (vgl. Kap. 3.1.11.8).

Weiterhin waren fünf <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C gekoppelte Signale bei einer Verschiebung von 21.6 (Dublett), 37.8 (Triplett), 64.1 (Dublett), 111.6 (Dublett) und 143.3 ppm (dupliziertes Triplett) zu erkennen (Metabolit A, vgl. Abbildung 38 C, Signale in rot), die von Signalen bei 21.1 (Dublett), 39.6 (Triplett), 59.3 (Dublett), 111.8 (Dublett) und 143.2 ppm (dupliziertes Triplett) begleitet wurden (Metabolit B, vgl. Abbildung 38 C, mit einem Stern markierte Signale).

Mit schwacher Intensität konnten fünf  $^{13}\text{C}$  markierte Signale, die zu dem Metabolit C gehören, bei einer Verschiebung von 17.1 (Dublett), 24.9 (Dublett), 62.7 (Dublett), 199.6 (dupliziertes Dublett) und 139.4 (Multipllett) detektiert werden (vgl. Abbildung 38 C, Signale in gelb).

Im  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum des Reaktionsgemisches waren neben den Signalen von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, durch  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ -Kopplungen verbreiterte Signale im typischen Bereich für organische Pyrophosphate (-6 bis -13 ppm,  $^{31}\text{P}$ - $^{31}\text{P}$  Kopplung, 20 Hz) zu erkennen.

Metabolit A (Isopentenylidiphosphat):

Die Signale bei 111.6 und 143.3 ppm sind im typischen Bereich für Doppelbindungen, während die Signale bei 64.1, 37.8 und 21.6 ppm von aliphatischen Kohlenstoffen stammen, von denen ein Kohlenstoff (Signal bei 64.1 ppm) eine OH oder OR (R = unbekannt) Gruppe trägt.

Zusätzliche Information über die Struktur von Metabolit A kann man aus den  $^{13}\text{C}$ -Kopplungsmuster entnehmen. So sind drei  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale (21.6, 64.1 und 111.6 ppm) durch jeweils einen  $^{13}\text{C}$ -markierten Nachbarn zu Dubletts aufgespalten, während das Signal bei 37.8 ppm durch Kopplungen mit zwei  $^{13}\text{C}$ -markierten Nachbarn zu einem Triplet aufspaltet. Das Signal bei 143.3 ppm ist auf Grund einer großen (71 Hz) und zwei kleineren Kopplungen (jeweils 41 Hz) zu einem duplizierten Triplet aufgespalten, so daß der dazugehörige Kohlenstoff drei Nachbarn besitzen muß. Diese Daten zeigen, daß Metabolit A ein Isopentenylderivat ist.

Die 71 Hz große Kopplung ist typisch für  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  Kopplungen bei Doppelbindungen. Die gleiche Kopplung ist bei dem Dublett bei 111.6 ppm zu erkennen. Somit muß das Signal bei 111.6 ppm zu einer Exomethylenfunktion gehören. Da das Signal bei 143.3 ppm zwei weitere, jeweils 41 Hz große Kopplungen zeigt, muß der dazugehörige Kohlenstoff der Verzweigungspunkt der Struktur sein.

Durch HMQC und HMQC-TOCSY Experimente konnten sowohl die  $^1\text{H}$ -Verschiebungen als auch die  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  und die  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Spinsysteme untersucht werden. So korreliert das  $^{13}\text{C}$ -NMR Signal bei 111.6 ppm zu einem  $^1\text{H}$  Signal bei 4.73 ppm, während das Signal bei 143.3 ppm keine  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Korrelation zeigt, da es ein quartärer Kohlenstoff ist. Die Signale bei 64.1, 37.8 und 21.6 ppm zeigen  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Korrelationen zu den  $^1\text{H}$  Signalen bei 4.73, 2.31 und 1.68 ppm (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 14). Durch HMQC-TOCSY Experimente konnte gezeigt werden, daß die Protonensignale

bei 2.31 und 4.00 ppm miteinander koppeln, während die Signale bei 4.73 und 1.68 ppm Singulets sind. Auf Grund der gezeigten Daten muß Metabolit A ein Isopentenylderivat mit einem einfach gebundenen Sauerstoff sein. Zusammen mit den  $^{31}\text{P}$  Daten sollte die Verbindung Isopentenyldiphosphat sein. Um dies zu beweisen, wurden die  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  Verschiebungen einer authentischen IPP Probe im gleichen Lösungsmittelgemisch bestimmt. Es zeigte sich, daß die Verschiebungen identisch mit denen für Metabolit A waren. Dadurch war bewiesen, daß es sich bei Metabolit A um  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{IPP}$  handelt.

Metabolit B (Isopentenol):

Sowohl die chemischen Verschiebungen als auch die Kopplungsmuster von Metabolit B und Metabolit A (IPP) sind annähernd identisch (vgl. Abbildung 38 C, mit einem Stern markierte Signale). Der größte Unterschied zwischen den NMR-Daten von Metabolit B und IPP ist ein Dublett bei 59.3 ppm, welches im Vergleich zu dem C-1 Signal von IPP einen Hochfeldshift von 4.9 ppm erfährt. Der Grund hierfür ist, daß an Position 1 keine Phosphat- oder Pyrophosphat-Gruppe gebunden ist. Somit handelt es sich bei Metabolit B um  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Isopentenol}$ , das durch Pyrophosphatasen und Phosphatasen aus IPP gebildet wird.

Metabolit C (Dimethylallyldiphosphat):

Auf Grund der  $^{13}\text{C}$  Kopplungsmuster (drei Dubletts, ein Doppeldublett, ein Multiplett) muß es sich bei Metabolit C um ein Dimethylallylderivat handeln. Die chemischen Verschiebungen, die für das Doppeldublett (119.6 ppm) und das Multiplett (139.4 ppm) erhalten wurden, belegen, daß die Doppelbindung zwischen Kohlenstoff C-2 (2 Kopplungen mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Nachbarn) und C-3 (3 Kopplungen mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Nachbarn) sein muß.

Durch HMQC und HMQC-TOCSY Experimente wurden sowohl die  $^1\text{H}$  Verschiebungen als auch die  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  und die  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Spinsysteme untersucht. So konnten im HMQC-TOCSY zwei Singulets bei einer Verschiebung von 1.75 und 1.71 ppm detektiert werden. Ferner koppelten die Signale bei 5.43 und 4.45 ppm miteinander. Die chemischen Verschiebungen und die Kopplungsmuster bestätigten, daß es sich bei Metabolit C um ein Dimethylallylderivat handelt. Zusammen mit den  $^{31}\text{P}$  Daten ergab sich Dimethylallyldiphosphat als Struktur (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 14). Um dies zu beweisen, wurden die  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  Verschiebungen einer

authentischen DMAPP Probe im gleichen Lösungsmittelgemisch bestimmt. Es zeigte sich, daß die Verschiebungen identisch waren. Somit konnte Metabolit C als [U- $^{13}\text{C}_5$ ]DMAPP identifiziert werden.

Die erhaltenen Verschiebungen und Korrelationen von IPP und DMAPP sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 zusammengefaßt.

**Tabelle 13: NMR-Daten von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat**

Position	Chemische Verschiebung (ppm)		Kopplungskonstanten (Hz)				
<i>Isopentenylidiphosphat</i>							
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$	$J_{\text{HH}}$	$J_{\text{PC}}$	$J_{\text{PP}}$	$J_{\text{CC}}^{\text{a}}$
1	4.0 (d)	64.1 (d, b)		6.6	4.9		34.3
2	2.31	37.8 (t)		6.7	8.0		40, 40
3		143.3 (dt)					71.4, 41.1, 41.5
4	4.73	111.6 (d)					70.7
5	1.68	21.6 (d)					41.5
P			-7.8			n. b.	
P			-11.9			19.5	
<i>Dimethylallyldiphosphat</i>							
1	4.45	62.7		6.6			47
2	5.43	119.6		7.2			75, 48
3		139.4					n. b.
4	1.75	24.9					42
5	1.71	17.1					41
P			-9.1			21.7	
P			-6.4			21.5	

<sup>a</sup> beobachtet mit [U- $^{13}\text{C}_5$ ]IPP bzw. [U- $^{13}\text{C}_5$ ]DMAPP

**Tabelle 14: NMR-Korrelationsmuster von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]Isopentenylidiphosphat und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]Dimethylallyldiphosphat**

<i>NMR-Korrelationsmuster</i>		
<i>Position</i>	<i>HMQC</i>	<i>HMQC-TOCSY</i>
<i>Isopentenylidiphosphat</i>		
1	1	1,2
2	2	2,1
3		
4	4	4
5	5	5
<i>Dimethylallyldiphosphat</i>		
1	1	1,2
2	2	2,1
3		
4	4	4
5	5	5

In Abbildung 38 sind die <sup>13</sup>C-NMR Spektren der aufgeschlossenen Zellen nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose bei Verwendung der *E. coli* Klone XL1-pBSXylBispC-FlytB (Abbildung 38A), XL1-pBSXylBispC-FgcpE (Abbildung 38B) und XL1-pBSXylBispC-FgcpElytB (Abbildung 38C) dargestellt. Wie man erkennen kann, ist im ersten Fall außer [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (A, Signale in grün) keine weitere <sup>13</sup>C-markierte Verbindung vorhanden. Befindet sich anstelle des *lytB*-Gens das *gcpE*-Gen auf dem Vektor wird neben [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zusätzlich [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat (Abbildung 38 B, Signale in blau) gebildet. Wird zu dem *gcpE*-Gen noch das *lytB*-Gen mit auf den Vektor kloniert, kann man neben [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat eine Bildung von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]IPP (Signale in rot) und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]DMAPP (Signale in gelb) beobachten (vgl. Abbildung 38 C).

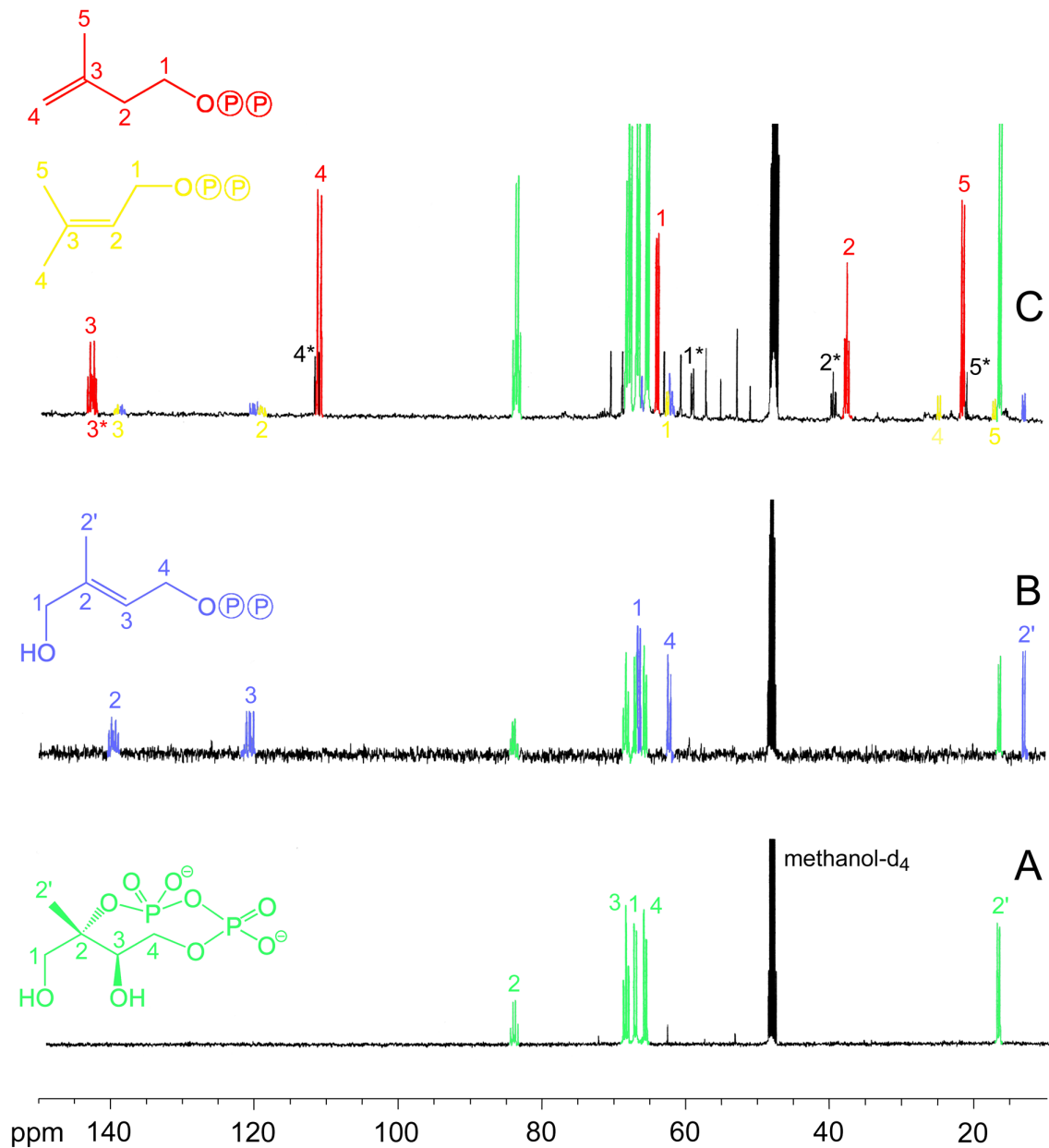


Abbildung 38: Ausschnitt aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren verschiedener *E. coli* Zellextrakte nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose. A: XL1-pBSXylBispC-FlytB; B: XL1-pBSXylBispC-FgcpE; C: XL1-pBSXylBispC-FgcpElytB. In der unteren Zeile (A) sind die Signale von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (A, Signale in grün) zu erkennen. Das mittlere Spektrum (B) zeigt ein Gemisch von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 1-Hydroxy-2C-Methyl-2E-butenyl-4-diphosphat (Signale in blau, B). Im oberen Spektrum (C) ist ein Gemisch aus  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat,  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ 1-Hydroxy-2C-Methyl-2E-butenyl-4-diphosphat,  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ IPP (Signale in rot) und  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ DMAPP (Signale in gelb) identifizierbar. Die mit einem Stern markierten Signale gehören zu  $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ Isopentenol.



Eine vergleichende Integration der  $^{13}\text{C}$ -Signale von IPP und DMAPP ergab, daß die Häufigkeit von DMAPP ca. 14 % von IPP beträgt.

Durch Verwendung des *E. coli* XL1-pBSXylBispC-FgcpelytB Klons konnte die letzte fehlende Reaktion bei der Bildung von IPP und DMAPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg geklärt werden (vgl. Abbildung 39). Die Reaktion wird vom LytB- (nun in IspH umbenannt) Protein katalysiert.

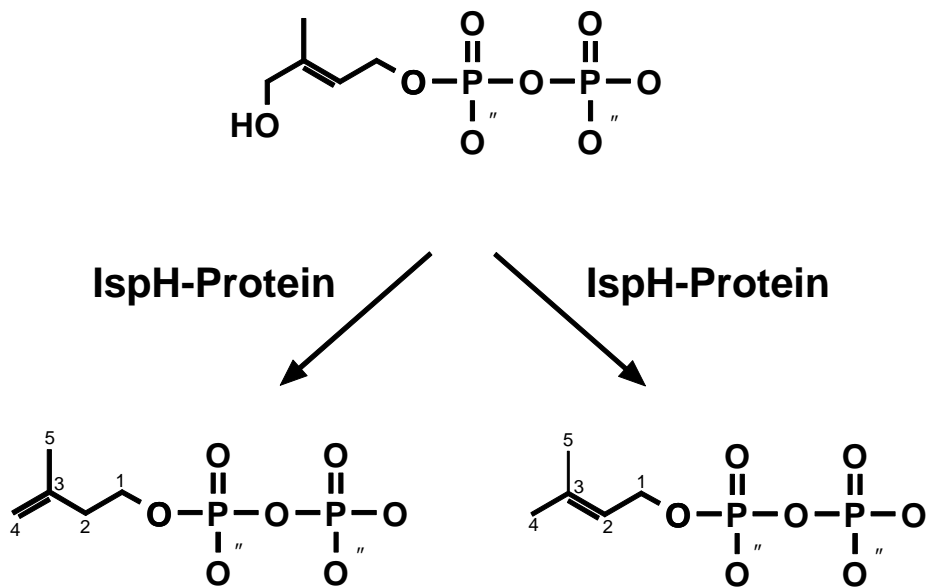


Abbildung 39: Enzymatische Bildung von IPP und DMAPP

## 3.2 Biotechnologische Aspekte

### 3.2.1 *In vivo* Umsetzung von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose zu [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in *E. coli* XL1-pNCOdxs

Wie in Kap. 3.1.11.2 gezeigt wurde, konnte mit Hilfe der D-Xylulokinase eine *in vivo* Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat beobachtet werden. Ausgehend von diesem Ergebnis stellte sich die Frage, ob es auch möglich ist, eine *in vivo* Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat zu erreichen. Diese Reaktion wird von der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase katalysiert (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1997). Sowohl Pyruvat als auch D-Glycerinaldehyd-3-phosphat sind Intermediate der Glykolyse. Bei Zugabe von <sup>13</sup>C-markierter Glucose ins Medium, sollte diese vorwiegend über die Glykolyse abgebaut werden.

Für die Einbauversuche wurde ein *E. coli* Klon verwendet, der die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase aus *B. subtilis* überexprimierte (Herz, 2000b). Das Gen befand sich auf dem pNCO113 Vektor, bei dem es sich um einen highcopy-, highexpression Vektor handelt. Auf Grund der hohen Expression der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase sollte bei Zugabe von <sup>13</sup>C-markierter Glucose zum Medium somit <sup>13</sup>C-markiertes 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gebildet werden.

Es zeigte sich, daß eine Stunde nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose zu dem XL1-pNCOdxs Klon nur geringe Mengen an unterschiedlich <sup>13</sup>C-markierten Isotopomeren von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat vorhanden waren (vgl. Kap. 2.3.9.13). Interessanterweise lag 1-Desoxy-D-xylulose in den Zellen zu einem weitaus höheren Anteil vor. Als Hauptkomponente konnte <sup>13</sup>C-markiertes Acetat neben einer Vielzahl unbekannter <sup>13</sup>C-markierter Verbindungen identifiziert werden.

Diese Daten belegen, daß es prinzipiell möglich ist, eine Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Glucose zu beobachten. Ferner zeigen sie, daß der Abbau von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat über 1-Desoxy-D-xylulose erfolgt.

### 3.2.2 *In vivo* Umsetzung von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose in *E. coli* XL1-pACYCdxs

Nachdem es möglich war, 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat in detektierbaren Mengen von Glucose ausgehend zu erzeugen, wurde die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase auf den pACYC184 Vektor kloniert. Dieser Vektor besitzt den Vorteil, daß er zu vielen anderen Vektoren, wie den pNCO113 oder den Blueskript SK II Vektor, orthogonal ist und deshalb mit einem weiteren Vektor kombinierbar ist. Es handelt sich hierbei um einen lowcopy, lowexpression Vektor, so daß die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase nur relativ gering überexprimiert wird. Um eine Dephosphorylierung und somit einen weiteren Abbau des gebildeten Produktes zu unterdrücken, wurde zusätzlich Glycerin-3-phosphat und anorganisches Phosphat ins Medium gegeben. Außerdem erfolgte die Zugabe von Glycerin-3-phosphat und Glucose kontinuierlich über zwei Stunden (vgl. Kap. 2.3.9.14).

Es zeigte sich, daß bei Verwendung des XL1-pACYCdxs Klons nur geringe Mengen an 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat und 1-Desoxy-D-xylulose gebildet wurden. Allerdings konnte als eine der Hauptkomponenten <sup>13</sup>C-markiertes 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat identifiziert werden, obwohl die für die Reaktion benötigten IspC-, IspD-, IspE- und IspF-Proteine nicht überexprimiert waren.

### 3.2.3 *In vivo* Umsetzung von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose in *E. coli* XL1-pACYCdxsXylBispC

Um den Abbau von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 1-Desoxy-D-xylulose durch Phosphatasen noch weiter zu unterdrücken, wurde zusätzlich auf den pACYC184 Vektor das *xylB*- und das *ispC*-Gen kloniert. Die von dem *xylB*-Gen codierte D-Xylulokinase katalysiert hierbei die Umkehrreaktion, während die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Reduktoisomerase für die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat benötigt wird.

Die Zugabe von Glucose und Glycerin-3-phosphat erfolgte wie oben beschrieben. Zusätzlich wurde noch Cytidin ins Medium gegeben, um eine mögliche Limitierung an CTP (vgl. Kap. 3.1.11.5) zu vermeiden. Nach einer und zwei Stunden nach

beendeter Glucosezugabe wurde jeweils ein Teil der Zellen wie beschrieben aufgearbeitet und der erhaltene Zellextrakt direkt im NMR vermessen (vgl. Kap. 2.3.9.15).

In Abbildung 40 ist das nach 2 h erhaltene  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum abgebildet.

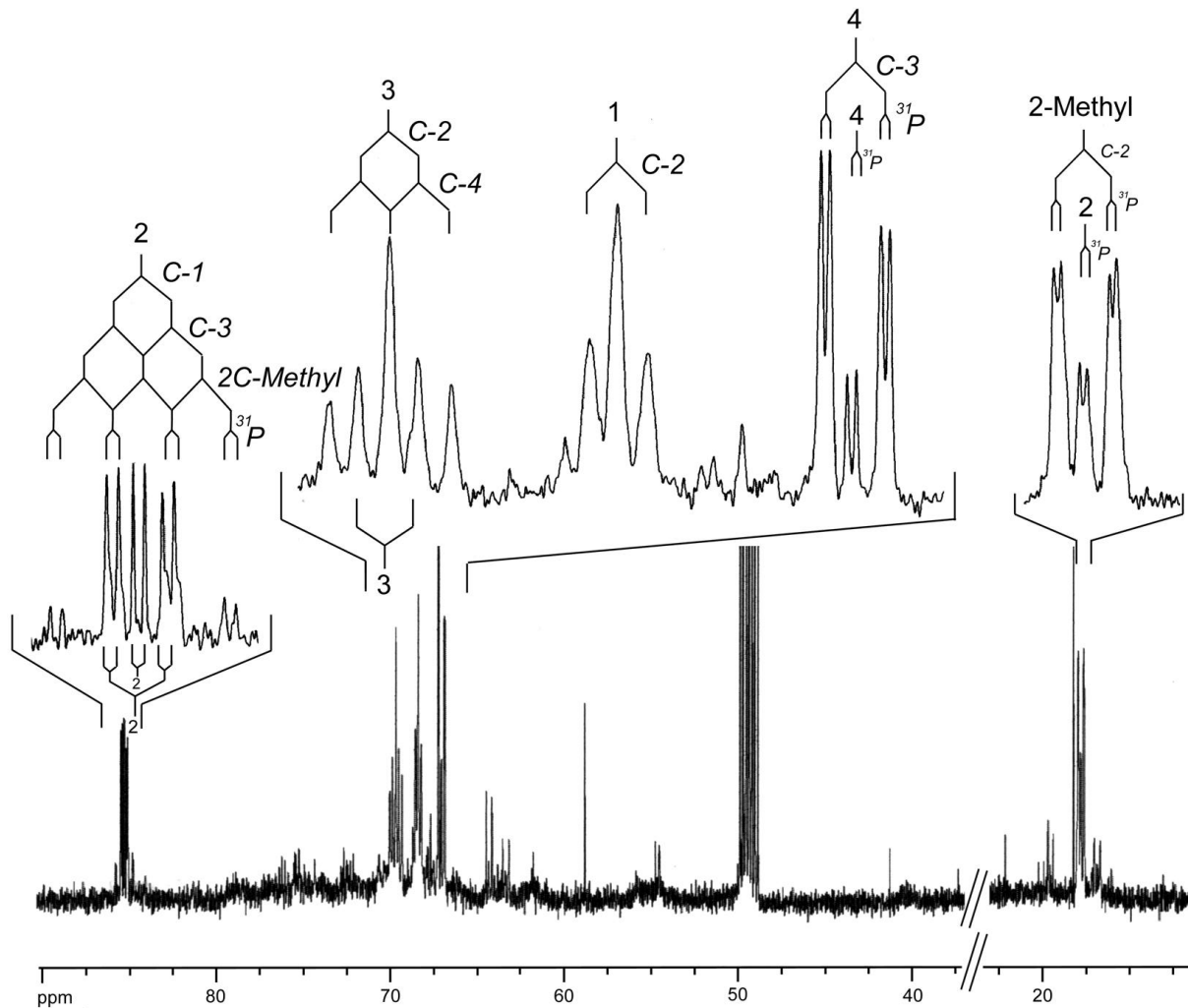


Abbildung 40: Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum des Zellextraktes von XL1-pACYCdxsxyI BispC 2 h nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ . Es sind verschiedene Isotomere von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu erkennen. Die Zahlen kennzeichnen die entsprechenden Kohlenstoffe. Die unterschiedlichen Aufspaltungsmuster entstehen durch die einzelnen Isotomere.

Wie man gut erkennen kann, ist 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat die dominierende Verbindung. Für die Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat aus 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat werden die IspD-, IspE- und IspF-Proteine benötigt. Möglicherweise induziert die Überexpression der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase eine erhöhte Bildung der IspD-, IspE- und IspF-

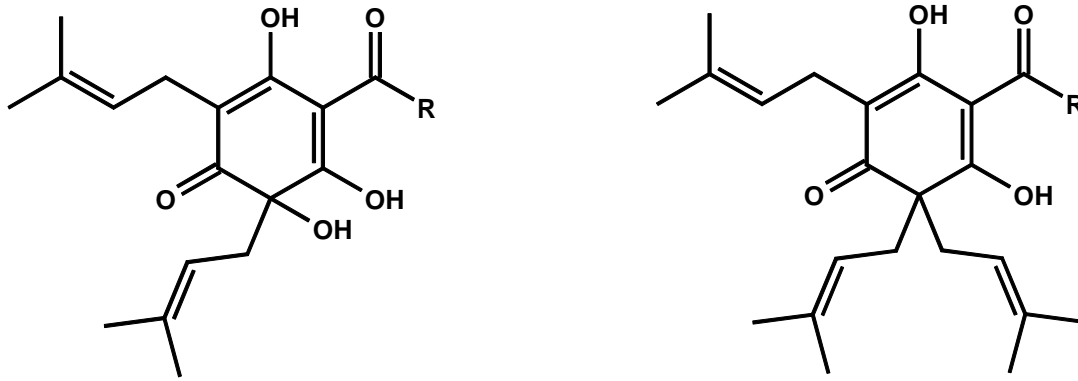
Proteine durch *E. coli*. Diese Daten zeigen, daß für eine effiziente Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat auf die Expression dieser Proteine verzichtet werden kann.

Wie man in Abbildung 40 erkennen kann, entstehen eine Vielzahl unterschiedlicher Isotopomere. So ist eine Stunde nach beendeter Zugabe [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-markiertes 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat die dominierende Spezies, während nach zwei Stunden viele weitere Isotopomere zu erkennen sind. Somit wird nach einer Stunde das gebildete Produkt direkt aus Glucose gewonnen, während nach zwei Stunden bereits eine Vielzahl verschiedenster Stoffwechselwege durchlaufen wurden.

### **3.3 Biosynthese terpenoider Bitterstoffe in Hopfendolden**

Zur Untersuchung der Biosynthese komplexer Terpene, die aus den gemeinsamen Vorläufern IPP und DMAPP gebildet werden, sind *in vivo* Untersuchungen ein effizienter Zugang. Auch hierbei können stabilisotop markierte Verbindung wie <sup>18</sup>O<sub>2</sub> verwendet werden. Auf diese Art wurde die Biosynthese von Humulon, eines aus Hopfendolden stammenden Terpens untersucht.

Schon in Babylonien wurden Hopfendolden zum Schutz des Bieres gegen Schimmelbefall verwendet. Diese Verwendung der Hopfendolden wurde im zehnten Jahrhundert in Europa wiederentdeckt (Robins *et al.*, 1985). Heutzutage finden Hopfendolden als Geschmacksträger Verwendung. So sind neben den ätherischen Ölen die  $\alpha$ -Bittersäuren Humulon, Cohumulon und Adhumulon sowie die  $\beta$ -Bittersäuren Lupulon, Adlupulon und Colupulon für den typischen bitteren Geschmack des Bieres verantwortlich (Zuurbier *et al.*, 1998). In Abbildung 41 sind die Strukturformeln der wichtigsten Bittersäuren dargestellt.



**Humulon**       $R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

**Adhumulon**     $R = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

**Cohumulon**     $R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$

**Lupulon**       $R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

**Adlupulon**     $R = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

**Colupulon**     $R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Abbildung 41: Strukturformeln der Hopfenbittersäuren

Die Bittersäuren gehören zur Klasse der Phloroglucinderivate, die mit terpenoiden Seitenketten und einer Acyleinheit substituiert sind. Humulon ist hierbei mit einem Gehalt von bis zu 20 % einer der Hauptbestandteile der Hopfendolden<sup>1</sup>.

Der Hopfen (*Humulus lupulus*) gehört zur Gattung der Cannabinaceae. Die für die Bierherstellung benötigten Bittersäuren sind in den Drüsenhaaren der weiblichen Blüten angereichert. Deshalb werden in Hopfenkulturen nur die weiblichen Pflanzen angebaut und vegetativ vermehrt.

Durch Einbauversuche mit [ $U\text{-}^{13}\text{C}_6$ ]Glucose (Goese *et al.*, 1999) war bekannt, daß die Biosynthese der Isoprenseitenketten nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg erfolgt, während der aromatische Molekülteil über eine Polyketidvorstufe gebildet wird (Drawert und Beier, 1976b; Drawert und Beier, 1976c).

Bei Applikation von radioaktivem Leucin konnte ein niedriger Einbau in Lupulon und Desoxyhumulon erhalten werden (Drawert und Beier, 1976a). Ferner konnte radioaktiv markierte Isovaleriansäure detektiert werden. Auf Grund dessen wurde postuliert, daß Leucin zu 3-Methylbutyryl-CoA abgebaut wird und in dieser Form als Vorstufe der Acylseitenkette dient (Drawert und Beier, 1976a; Goese *et al.*, 1999).

<sup>1</sup> Dr.K. Kammhuber, Landesansalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, persönliche Mitteilung

Ferner wurde postuliert, daß die Biosynthese von Humulon aus Desoxyhumulon durch Oxidation des aromatischen Molekülteils (vgl. Abbildung 42) gebildet wird (Fung *et al.*, 1997).

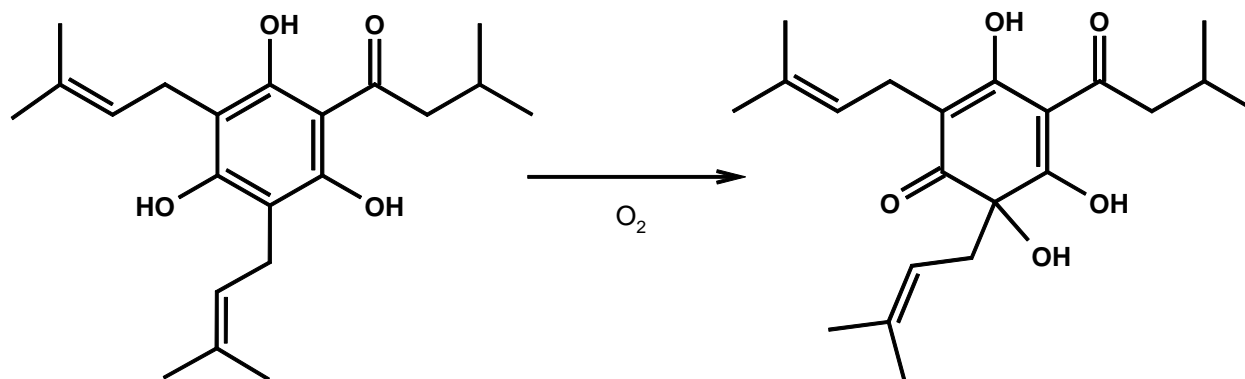


Abbildung 42: Biosynthese von Humulon durch Oxidation von Desoxyhumulon

### 3.3.1 $^{18}O_2$ Einbau in Hopfendolden im Freilandversuch

Um die Biosynthese der Hydroxygruppe von Humulon an Position 6 zu untersuchen, mußte ein *in vivo* System entwickelt werden, mit dem es möglich ist, in einem Freilandversuch einen  $^{18}O_2$ -Einbau an Hopfenpflanzen durchzuführen. Die Inkorporationsexperimente wurden auf einem Versuchsfeld der Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Abteilung Hopfen in Wolnzach durchgeführt. Als Hopfensorte stand *Humulus lupulus* L. var. *Hallertauer Magnum* zur Verfügung. Im Argongegenstrom wurde jeweils eine Hopfendolde mit 5-6 Zapfen in ein Schlenkrohr mit Olive eingeführt. Dieses wurde anschließend mit einem Korkstopfen, Schliffett und Wachs luftdicht verschlossen (vgl. Abbildung 43). Um einen Pilzbefall der Hopfendolden während des Versuches zu vermeiden, wurden diese vorher mit Paral<sup>®</sup> Pilzfrei N besprüht. Über den Schlenkansatz wurde über einen zweiten, evakuierten Kolben ein Druck von ca. 700 mbar im Schlenkrohr erzeugt (vgl. Kap. 2.3.11).

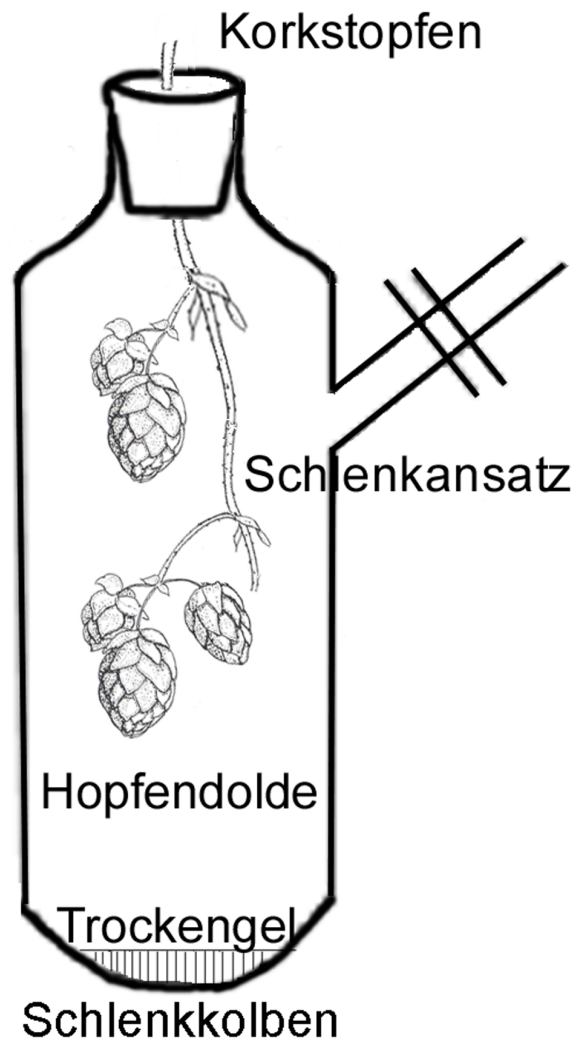


Abbildung 43: Schemadarstellung des *in vivo*  $^{18}\text{O}_2$  Einbauversuchs an Hopfendolden

Mit einem Manometer konnte an dem zweiten Kolben geprüft werden, ob das Schlenkrohr vakuumdicht verschlossen ist, da sich in beiden Glasgefäßen der gleiche Druck einstellen muß. Mit Hilfe des erzeugten Unterdrucks wurde aus einem mit  $^{18}\text{O}_2$  gefüllten Luftballon die benötigte Menge an schwerem Sauerstoff in das Schlenkrohr gesaugt. Über das Volumen des zweiten, evakuierten Rundkolbens kann somit die Stoffmenge an  $^{18}\text{O}_2$  eingestellt werden. Um eine möglichst naturgetreue Atmosphäre zu erzeugen, wurde die Kolbengröße so gewählt, daß sich ein  $^{18}\text{O}_2$ -Gehalt von ungefähr 20 % (v:v) ergab.

Der Kolben wurde mit Aluminiumfolie weitgehendst abgedunkelt, um eine zu starke Erwärmung der Hopfendolden in dem geschlossenen System zu vermeiden. Da



Hopfendolden unter diesen Bedingungen große Mengen Wasser freisetzen, wurde vorher in das Schlenkrohr ein Trockenkissen (Silicagel) gelegt, um das abgesonderte Wasser zumindest teilweise zu binden.

Nach 14 Tagen wurden die Hopfendolden geerntet und aufgearbeitet. Die Reinigung von Humulon und Cohumulon (vgl. Abbildung 44) erfolgte mittels HPLC. Die erhaltenen Verbindungen wurden sowohl NMR-spektroskopisch als auch über Direkteinlaß-Massenspektrometrie untersucht.

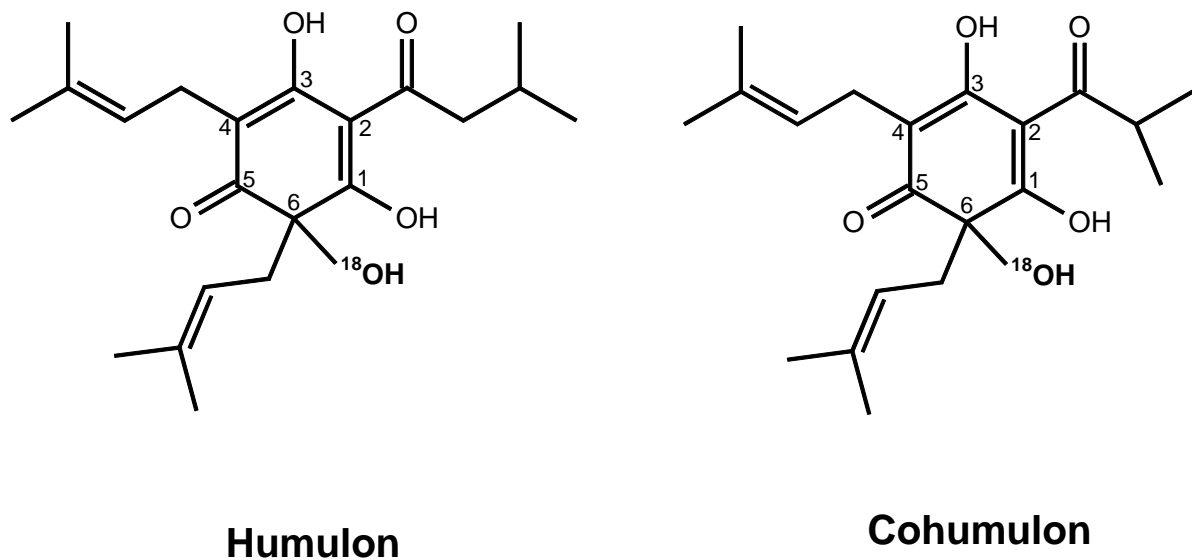


Abbildung 44:  $^{18}\text{O}$ -markiertes Humulon bzw. Cohumulon

Da  $^{18}\text{O}$  einen Kernspin Null besitzt, kann das Isotop durch NMR-Spektroskopie nicht direkt bestimmt werden. Allerdings tritt im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ein Schwerisotopshift auf, der für Alkohole in einer Größenordnung von ca. 17-35 ppb (Risley and van Etten, 1990) liegt. In Abbildung 45 sind die  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale der Kohlenstoffatome 6 von Humulon und Cohumulon abgebildet. Mit einer Verschiebung von 21 ppb zu hohem Feld ist neben den intensiven Signalen, die zu den Kohlenstoffen 6 von unmarkierten Humulon bzw. Cohumulon gehören, jeweils ein zweites, kleineres Satellitensignal gut zu erkennen, welches zu den  $^{18}\text{O}$  markierten Verbindungen gehört.

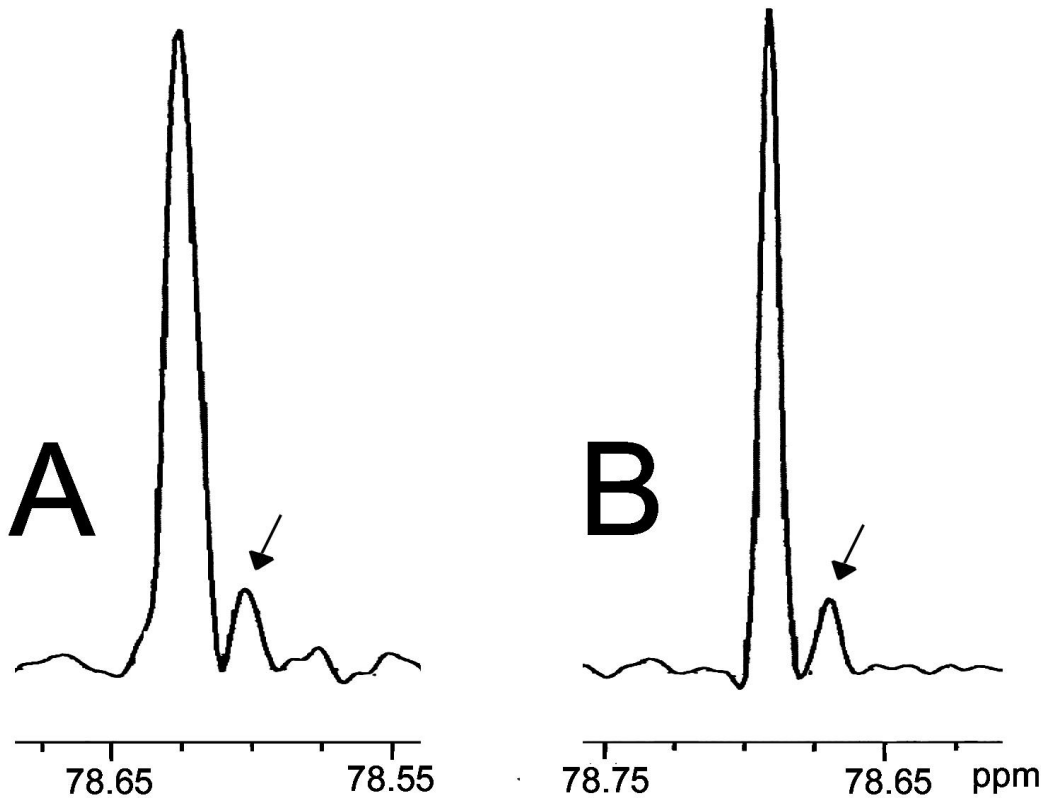


Abbildung 45: Ausschnitt aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren von  $^{18}\text{O}$ -markiertem Humulon (A) bzw. Cohumulon (B). Die intensiven Signale stammen von den Kohlenstoffen 6 der unmarkierten Verbindungen. Die zu hohem Feld verschobenen und mit einem Pfeil markierten Signale deuten die jeweilige  $^{18}\text{O}$ -markierte Spezies an.

Eine Integration der  $^{13}\text{C}$ -Signale ergibt bei beiden Verbindungen eine absolute  $^{18}\text{O}$ -Anreicherung von 9 %. Humulon und Cohumulon unterscheiden sich nur in der Acylseitenkette (vgl. Abbildung 44) und es ist anzunehmen, daß die Biosynthese der Phloroglucineinheit gleich verläuft. Sowohl die Größe des Schwerisotopshifts als auch die Einbaurrate ist bei beiden Verbindungen identisch. Dies zeigt, daß es sich bei den Satellitensignalen um  $^{18}\text{O}$ -markiertes Humulon bzw. Cohumulon und nicht um eine Verunreinigung handelt. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch die Auswertung der aufgenommenen Massenspektren (vgl. Kap. 2.3.11) untermauert. Eine Integration des  $(M+2)^+$  Ions unter Berücksichtigung der natürlichen Isotopverteilung ergibt eine absolute  $^{18}\text{O}$ -Anreicherung von 10 %.

Aus diesen Daten läßt sich schließen, daß der Sauerstoff der Hydroxygruppe des Kohlenstoffs 6 aus molekularem Sauerstoff und nicht aus Wasser stammt.

### 3.3.2 [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Leucin Einbau in Hopfendolden

Um die Hypothese zu beweisen, daß die Biosynthese der Acylseitenkette auch katabolisch aus Leucin unter Erhalt des Kohlenstoffgerüsts erfolgen kann, wurde [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Leucin an Hopfendolden verfüttert. Als Hopfensorte wurde *Humulus lupulus* L. var. *Hallertaurer Taurus* verwendet, die sich durch einen sehr hohen Humulongehalt von bis zu 20 % in der Trockenmasse auszeichnet<sup>2</sup>. Die Pflanzen wurden von der Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Abteilung Hopfen in Wolnzach, zur Verfügung gestellt. Es wurden 12 Hopfendolden mit durchschnittlich 5-6 Zapfen mit einer 0.1 %igen [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Leucin Lösung inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Zapfen geerntet, das enthaltene Humulon extrahiert und als Komplex mit o-Phenylendiamin kristallisiert.

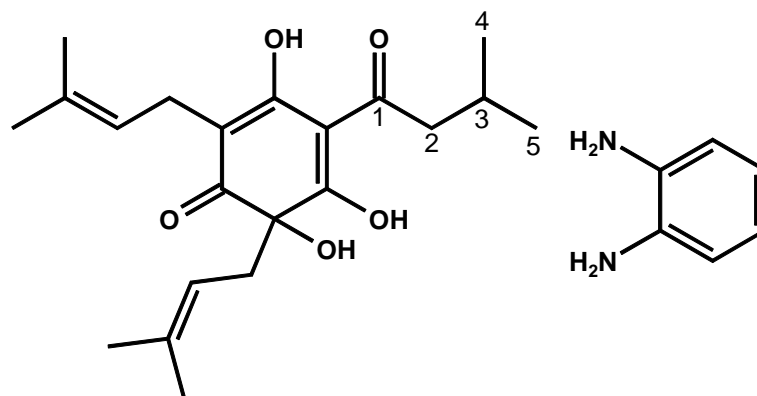


Abbildung 46: Humulon als o-Phenylendiamin Komplex

Das so gereinigte Humulon wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie untersucht. In Abbildung 47 sind die Signale der Methylkohlenstoffe aus dem erhaltenen <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Humulon dargestellt.

<sup>2</sup> Dr. K. Kammhuber, Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, persönliche Mitteilung.

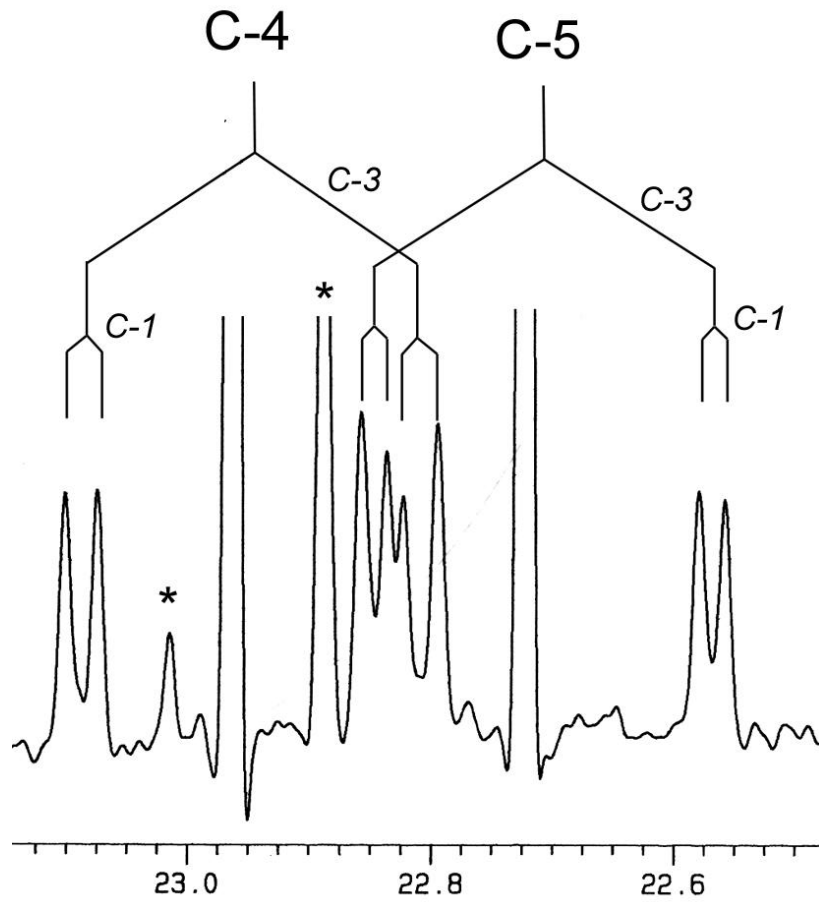


Abbildung 47: Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Humulon als o-Phenyldiaminkomplex aus dem Einbauversuch mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Leucin}$ . Die mit einem Stern markierten Signale stammen von einer Verunreinigung.

Die Signale der Methylkohlenstoffe 4 und 5 (vgl. Abbildung 46 und Abbildung 47) weisen sowohl eine Kopplung mit ihren direkten Nachbarn als auch jeweils eine Fernkopplung zu dem Carbonylkohlenstoff (C-1) auf. Diese werden auch bei dem Signal von Kohlenstoff 1 (vgl. Tabelle 15) beobachtet. Ferner zeigt das Signal dieses Kohlenstoffes eine 42.0 Hz große Kopplung zu C-2. Bei dem Signal von Kohlenstoff 2 kann man zwei Kopplungen (32.5 und 42.6 Hz) zu den direkten Nachbarn erkennen, eine Fernkopplung konnte nicht detektiert werden. Auf Grund der beobachteten  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  Kopplungen muß die Acylseitenketten als durchgehender Block markiert sein.

Die chemischen Verschiebungen und  $^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten der markierten Acylseitenkette sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

**Tabelle 15:  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten der Acylseitenkette von Humulon als o-Phenylendiaminkomplex**

<i>Position</i>	<i>Chemische Verschiebung (ppm)</i>	<i>Kopplungskonstanten (Hz)</i>
1	199.8	42.0 (C-2), 3.1 (C-4), 3.1 (C-5)
2	46.5	32.5 (C-3), 42.6 (C-1)
3	26.3	n. b.
4	23.0	35.0 (C-3), 3.4 (C-1)
5	22.7	35.1 (C-3), 2.7 (C-1)

Die relative Anreicherung der markierten Spezies beträgt ca. 0.3 %. Ein möglicher Grund für die geringe Anreicherung könnte sein, daß zu dem Zeitpunkt des Versuches bereits viel Humulon in den Pflanzen vorhanden war.

Es wurde versucht, analog zu dem  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Leucin}$  Einbauexperiment, isotopmarkiertes 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat an abgeschnittene Hopfendolden zu verfüttern. Allerdings konnte kein markiertes Humulon erhalten werden. Wahrscheinlich ist eine Inkorporation auf Grund der negativen Ladung durch die Phosphatgruppen nicht möglich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der alternative Terpenbiosyntheseweg

#### 4.1.1 Enzymatische Synthese von isotopmarkierten Intermediaten des alternativen Terpenbiosynthesewegs

Um die Funktionen der an der alternativen Terpenbiosynthese beteiligten Proteine aufzuklären, wurden  $^{13}\text{C}$ -markierte Intermediate verwendet. Zur Einführung von Isotopen, wurde eine enzymatische Synthese entwickelt, die eine flexible Markierung aller, bereits bekannter Intermediate erlaubte. Da die Biosynthese von IPP ausgehend von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat erfolgt, wurde insbesondere für dieses Molekül eine flexible Markierungsstrategie ausgearbeitet.

Die Synthese erfolgte ausgehend von Glucose oder Dihydroxyacetonphosphat und Pyruvat, ohne Reinigung eines Zwischenproduktes. Dies war möglich, da bei Verwendung der beschriebenen Verfahren die Intermediate der Glykolyse nur in sehr niedrigen Konzentrationen entstanden und deshalb nicht inhibierend wirkten. Ferner war die treibende Kraft dieser Reaktionssequenz die irreversible Abspaltung von  $\text{CO}_2$  aus Pyruvat bei der Bildung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat, wodurch die Produktbildung forciert wurde.

Sowohl für 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (z. B. Blagg und Poulter, 1999) als auch für 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (Kis *et al.*, 2000) waren verschiedene chemische Synthesen publiziert. Allerdings sind die beschriebenen Verfahren sehr aufwendig, und sie sind nicht für eine flexible Markierung mit unterschiedlichen Isotopen geeignet. Neben der chemischen Darstellung war auch eine enzymatische Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ausgehend von Fructose-1,6-diphosphat beschrieben (Taylor *et al.*, 1998). Allerdings ist Fructose-1,6-diphosphat

für die Einführung von Isotopen ungeeignet, da sie in markierter Form nur schwer zugänglich ist.

Für die Erzeugung von größeren Mengen  $^{13}\text{C}$ -markierter Verbindungen war vor allem die Vermeidung von negativ geladenen organischen Phosphaten bzw. Pyrophosphaten und die damit erleichterte Reinigung entscheidend. Dadurch war es z. B. möglich, 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat durch Bariumfällung zu erhalten. Die Produkte der IspC-, IspD-, IspE- und IspF-Proteine konnten bei Verwendung der Recyclingsysteme mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden (vgl. Kap. 3.1.1-3.1.9). Die Bildung von ungewollten organischen Phosphaten bzw. Pyrophosphaten wurde verhindert, indem ATP über Phosphoenolpyruvat oder Acetylphosphat regeneriert wurde. Ein Recycling von NADPH erfolgte mit Hilfe der Glucosedehydrogenase aus Glucose.

Auf Grund der beschriebenen Recyclingverfahren konnte die Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat ausgehend von Glucose über elf Reaktionsschritte, ohne Reinigung eines Zwischenprodukts durchgeführt werden. Die Gesamtausbeute an markiertem Produkt betrug ca. 50 %.

Die Verwendung von sowohl  $^2\text{H}$ - als auch  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorstufen ist besonders für die Aufklärung von Reaktionsmechanismen entscheidend. Bei der Biosynthese von höheren Terpenen kann ein teilweiser oder vollständiger Verlust der Deuteriummarkierung erfolgen. Mit Hilfe  $^{13}\text{C}$ - und  $^2\text{H}$ -doppelmarkierter Vorstufen kann der Austausch der Deuteriummarkierung exakt quantifiziert werden, da die  $^{13}\text{C}$ -Markierung hierbei als interner Standard dient (Arigoni *et al.*, 1999). Durch Inkorporationsexperimente an *E. coli* und *Eucalyptus globulus* (Schwarz 1994; Rieder *et al.*, 2000) wurde gezeigt, daß 1-Desoxy-D-xylulose sowohl von Bakterien als auch von Pflanzen effektiv aufgenommen und in Terpene eingebaut wird. Um die Biosynthese von vielen verschiedenen Terpenen untersuchen zu können, ist eine Doppelmarkierung für diese Verbindung wünschenswert.

Doppelmarkierte 1-Desoxy-D-xylulose kann sehr leicht durch Phosphatasen aus  $^{13}\text{C}$ - und  $^2\text{H}$ - markiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gewonnen werden. Die Darstellung von doppelmarkiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat erfolgte enzymatisch aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat. Hierbei wurde die Doppelmarkierung ausgehend von jeweils einfach  $^{13}\text{C}$ - oder  $^2\text{H}$ -markierten Substraten erzeugt. Da D-Glycerinaldehyd-3-phosphat ein Intermediat der Glykolyse ist, kann es ausgehend von Glucose gewonnen werden. Ein großer Vorteil hierbei ist,

daß unterschiedlich deuterierte Glucose käuflich ist. Alternativ dazu können Teile der Glykolyse in D<sub>2</sub>O durchgeführt werden, wodurch mit Hilfe der Aldolase oder der Triosephosphatisomerase Deuteriumatome eingeführt werden (vgl. Kap. 3.1.2).

Eine Markierung mit <sup>13</sup>C Isotopen ist sehr einfach über Pyruvat möglich. Theoretisch ist es auch denkbar, von <sup>13</sup>C markierter Glucose auszugehen und die Reaktion in D<sub>2</sub>O durchzuführen.

Die Kombination der beschriebenen Verfahren führt zu einer Vielzahl verschiedenster, doppelmarkierter Isotopomere, die alle über die gleichen Syntheseroute erzeugt werden können (vgl. Kap. 3.1.2).

#### 4.1.2 Die enzymatischen Reaktionen der IspE- und IspF-Proteine

Die von den IspE- und IspF-Proteinen katalysierten Reaktionen führen zu keiner Veränderung des 2C-Methyl-D-erythritol Kohlenstoffgerüsts. Durch Einbau an isolierte Chromoplasten konnte bewiesen werden, daß es sich bei diesen Verbindungen um echte Intermediate der Biosynthese von Terpenen handelt. Es konnte gezeigt werden (Lüttgen *et al.*, 2000), daß ein Einbau von <sup>14</sup>C-markierten 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat in Carotinoide erfolgt.

Der Beweis für eine essentielle Beteiligung des IspE-Proteins an der Biosynthese von IPP wurde wiederholt durch chromosomale Knock-out Mutanten geführt (Kuzuyama *et al.*, 2000b; Brötz *et al.*, 2000, Campos *et al.*, 2001a).

Außerdem ist das IspF-Protein in der Lage 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat umzusetzen. Eine Beteiligung des IspF-Proteins bei der Bildung von IPP konnte ebenfalls durch Knock-out Mutanten belegt werden (Brötz *et al.*, 2000).

Das IspF-Protein weist katalytische Aktivitäten mit verschiedenen Substraten auf (vgl. Kap. 3.1.8). So setzt es 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol zu 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat um. Allerdings handelt es sich hierbei um eine artifizielle Reaktion, da <sup>14</sup>C-markiertes 2C-Methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat nicht von isolierten Chromoplasten aufgenommen und umgesetzt werden konnte (Herz *et al.*, 2000a). Ferner wurde bei Verwendung eines *E. coli* Klons, der das IspF-Protein überexprimiert hatte, *in vivo* keine Bildung dieses Nebenproduktes beobachtet, obwohl 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol in hohen Konzentrationen in den Zellen vorhanden war. Möglicherweise ist das gereinigte



Protein nicht perfekt gefaltet, wodurch diese Nebenreaktion möglich ist. Für diese Vermutung spricht auch die Tatsache, daß das IspF-Protein aus Plasmodium zusätzlich mit 2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol eine ähnliche Nebenreaktion unter Bildung von 2-Phospho-2C-methyl-D-erythritol-3,4-cyclomonophosphat aufweist (vgl. Kap. 3.1.10).

Die eigentliche, vom IspF-Protein katalysierte Reaktion, ist die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat. So wird es *in vivo* bei Applikation von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose an einen *E. coli* Klon gebildet, der nur die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase, die 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Synthase und die D-Xylulokinase überexprimiert hat (vgl. Kap. 3.2.3). Die für die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat benötigten IspD-, IspE- und IspF- Proteine waren nicht überexprimiert.

Die einzige Gemeinsamkeit der unterschiedlichen Aktivitäten des IspF-Proteins ist die Abspaltung von CMP aus verschiedenen Substraten. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die treibende Kraft bei den einzelnen Reaktionen, die auch bei nicht optimaler Faltung des Proteins möglich ist.

Das eigentliche Ziel der von den IspD, IspE und IspF-Proteinen katalysierten Reaktionssequenz ist somit die Aktivierung der ehemaligen Hydroxygruppe an Position 2 des 2C-Methyl-D-erythritol-Grundgerüsts, für die vom IspG-Protein (früher als GcpE-Protein bezeichnet) katalysierte Reaktion.

#### 4.1.3 Die enzymatische Reaktion des IspG-Proteins

Es war bekannt, daß 1-Desoxy-D-xylulose mit spezifischen Einbauraten von 90 % von *E. coli* in Ubichinon eingebaut wird (Broers, 1994, Giner *et al.*, 1998a). Die Ursache hierfür ist die von der D-Xylulokinase katalysierte Phosphorylierung zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (Wungsintaweeikul *et al.*, 2001a). Ausgehend von diesen Daten war es möglich, durch Verwendung eines *E. coli* Klons, der die D-Xylulokinase überexprimiert hatte, 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat *in vivo* zu erzeugen. Die Aufnahme und Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose erfolgte hierbei so schnell, daß bereits nach 30 Minuten große Mengen des gebildeten Produkts in den Zellen angestaut werden konnten (vgl. Kap. 3.1.11.2). Der Grund für die rasche Aufnahme könnte ein aktiver Transport über einen Zuckershuttle sein.

Analog dazu wurde versucht, sowohl 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat als auch 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat an *E. coli* zu verfüttern. Allerdings konnte keine Aufnahme dieser Verbindungen beobachtet werden. Wahrscheinlich gibt es hierfür keinen aktiven Transporter. Eine passive Aufnahme kann auf Grund der negativen Ladung der Phosphatgruppen ebenfalls nicht erfolgen.

Durch die hohe Empfindlichkeit und Selektivität mit der  $^{13}\text{C}$ -markierte Verbindungen mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie detektiert werden können, war es möglich, die Reaktion „online“ zu verfolgen, ohne daß mögliche Intermediate durch eine Aufreinigung verlorengehen oder dabei modifiziert werden. Auf diese Art wurden Engpässe in der Reaktionssequenz erkannt und durch gezielte Zugabe von Additiven ins Medium diesen entgegengewirkt. So konnte die Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol durch Zugabe von Cytidin forciert werden. Die Bildung von unerwünschten Dephosphorylierungsprodukten wurde durch Zugabe von Glycerin-3-phosphat weitgehendst unterdrückt. Dadurch war es möglich, 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in sehr hohen Konzentrationen in den Zellen zu erzeugen (vgl. Kap. 3.1.11.3 - 3.1.11.6).

Nachdem es möglich war, 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in großen Mengen in den Zellen zu erzeugen, wurden in den bestehenden Vektor die Gene *lytB* (*ispH*) und *gcpE* (*ispG*) kloniert. Diese wurden durch Genomvergleich erhalten und es war bekannt, daß sie essentiell für die Biosynthese von IPP sind (Adam *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001b; Cunningham *et al.*, 2000).

Wurde nur das *lytB*-Gen mit auf den bestehenden Vektor genommen, entstand keine neue Verbindung. Sobald der Vektor jedoch anstelle des *lytB* Gens das *gcpE* Gen enthielt, konnte durch NMR-Spektroskopie 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat als letztes Intermediat bei der Biosynthese von IPP detektiert werden (vgl. Kap. 3.1.11.7 - 3.1.11.10). Diese Daten belegen, daß für die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat das IspG Enzym benötigt wird.

Mit Hilfe von chromosomalen *lytB* Gen Knock-out Mutanten wurde inzwischen unabhängig 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat aus *E. coli* isoliert (Hintz *et al.*, 2001).

Die beschriebene Verbindung ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Naturstoff isoliert worden. Allerdings konnte aus *Ornithogalum montanum* das strukturell

verwandte 1-*O*-*b*-D-Glucosid von 1,4-Dihydroxy-2-methyl-2-(*E*)-buten isoliert werden (Nicoletti, M. *et al.*, 1992).

In den Gendatenbanken sind keine zum *ispG* Gen homologen Sequenzen vorhanden. Bei Vergleich der IspG-Proteine aus verschiedenen Organismen ist es auffällig, daß 3 Cysteine streng konserviert sind (Abbildung 48).

<i>Arabidopsis thaliana</i>	: KT--EYVSCPS <sup>C</sup> CGRTLFDLQ <sup>E</sup> ISAEI <sup>R</sup> EKTS <sup>H</sup> LP-GV <sup>S</sup> TA <sup>I</sup> MG <sup>C</sup> IVNGPGE <sup>M</sup> AD <sup>A</sup> DFG
<i>Synechocystis</i> sp.	: KTMVEYVACPS <sup>C</sup> CGRTLFDLQ <sup>E</sup> EDVLHEV <sup>R</sup> EATK <sup>H</sup> LT-GLD <sup>I</sup> AVMG <sup>C</sup> IVNGPGE <sup>M</sup> AD <sup>A</sup> DY <sup>G</sup>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	: SVTVEYVSCPS <sup>C</sup> CGRTLFDLLAVSQR <sup>I</sup> RERTQ <sup>H</sup> LPGLK <sup>I</sup> AVMG <sup>C</sup> IVNGPGE <sup>M</sup> AD <sup>A</sup> DFG
<i>Plasmodium falciparum</i>	: KT--DYIACPS <sup>C</sup> CGRTLFDLQ <sup>E</sup> ETTK <sup>I</sup> MKLTG <sup>H</sup> LK-GV <sup>K</sup> I <sup>A</sup> VMG <sup>C</sup> IVNGI <sup>G</sup> EMAD <sup>A</sup> H <sup>F</sup> G
<i>Helicobacter pylori</i>	: KEGINW <sup>I</sup> ISCP <sup>T</sup> CGRIE <sup>A</sup> NLVDM <sup>A</sup> IKV <sup>E</sup> KRL <sup>S</sup> HIK <sup>T</sup> PLD <sup>I</sup> SVMG <sup>C</sup> VVNAL <sup>G</sup> EAKHAD <sup>M</sup> A
<i>Campylobacter jejuni</i>	: KSGVNI <sup>I</sup> ISCP <sup>T</sup> CGRIQ <sup>S</sup> DL <sup>L</sup> SAIK <sup>I</sup> VE <sup>E</sup> KTK <sup>H</sup> IKE <sup>P</sup> LN <sup>I</sup> SVMG <sup>C</sup> VVNAL <sup>G</sup> EAKGAD <sup>V</sup> A
<i>Haemophilus influenzae</i>	: SRGINFIACPT <sup>C</sup> SRQ <sup>E</sup> FDV <sup>I</sup> GTVNAL <sup>E</sup> QR <sup>L</sup> EDI <sup>I</sup> TPMD <sup>V</sup> SI <sup>I</sup> GC <sup>V</sup> VNGPGEALV <sup>S</sup> DL <sup>G</sup>
<i>Pasteurella multocida</i>	: SRGINFIACPT <sup>C</sup> SRQ <sup>E</sup> FDV <sup>I</sup> GTVNAL <sup>E</sup> QR <sup>L</sup> EDI <sup>I</sup> TPMD <sup>V</sup> SI <sup>I</sup> GC <sup>V</sup> VNGPGEALV <sup>S</sup> DL <sup>G</sup>
<i>Escherichia coli</i>	: SRGINFIACPT <sup>C</sup> SRQ <sup>E</sup> FDV <sup>I</sup> GTVNAL <sup>E</sup> QR <sup>L</sup> EDI <sup>I</sup> TPMD <sup>V</sup> SI <sup>I</sup> GC <sup>V</sup> VNGPGEALV <sup>S</sup> TL <sup>G</sup>
<i>Vibrio cholerae</i>	: SRGINFIACPS <sup>C</sup> SRQ <sup>E</sup> FDV <sup>I</sup> GTVNAL <sup>E</sup> QR <sup>L</sup> EDV <sup>L</sup> TPMD <sup>V</sup> SI <sup>I</sup> GC <sup>V</sup> VNGPGEA <sup>E</sup> VSH <sup>L</sup> G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	: SRGINFIACPS <sup>C</sup> SRQ <sup>N</sup> FDV <sup>I</sup> VKTMNE <sup>L</sup> EGRL <sup>E</sup> DLLV <sup>P</sup> MD <sup>V</sup> AVI <sup>I</sup> GC <sup>V</sup> VNGPGEA <sup>K</sup> E <sup>A</sup> H <sup>V</sup> G
<i>Buchnera</i> sp.	: ARGINFIACPT <sup>C</sup> SRQ <sup>E</sup> FDV <sup>I</sup> INTVNQ <sup>L</sup> EKN <sup>L</sup> EDI <sup>S</sup> TPID <sup>V</sup> SI <sup>I</sup> GC <sup>V</sup> VNGI <sup>G</sup> ESK <sup>I</sup> AT <sup>L</sup> G
<i>Caulobacter crescentus</i>	: HRGVNI <sup>I</sup> ACPS <sup>C</sup> ARQ <sup>G</sup> FN <sup>V</sup> IKTVEAL <sup>E</sup> ER <sup>L</sup> AH <sup>I</sup> STPMS <sup>L</sup> SI <sup>I</sup> GC <sup>V</sup> VNGPGEALM <sup>T</sup> D <sup>I</sup> G
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	: PRSLEIVSCPS <sup>C</sup> CGRAQ <sup>V</sup> DVY <sup>T</sup> LANE <sup>V</sup> TAG <sup>L</sup> DGLD <sup>V</sup> PLR <sup>V</sup> AVMG <sup>C</sup> VVN <sup>G</sup> PGEARE <sup>A</sup> D <sup>L</sup> G
<i>Streptomyces coelicolor</i>	: QRGLEIVSCPS <sup>C</sup> CGRAQ <sup>V</sup> DVY <sup>K</sup> LAAE <sup>V</sup> TAG <sup>L</sup> EGME <sup>V</sup> PLR <sup>V</sup> AVMG <sup>C</sup> VVN <sup>G</sup> PGEARE <sup>A</sup> D <sup>L</sup> G
<i>Aquifex aeolicus</i>	: RRGVEIVACPT <sup>C</sup> CGRIE <sup>V</sup> DL <sup>I</sup> PKV <sup>V</sup> KEV <sup>Q</sup> EK <sup>L</sup> SGV <sup>K</sup> TPL <sup>K</sup> VAVMG <sup>C</sup> VVN <sup>A</sup> I <sup>G</sup> EARE <sup>A</sup> D <sup>I</sup> G
<i>Bacillus subtilis</i>	: SNAATL <sup>I</sup> ISCP <sup>T</sup> CGRIE <sup>I</sup> DL <sup>I</sup> SIANE <sup>V</sup> EY <sup>I</sup> SKI <sup>K</sup> API <sup>K</sup> VAV <sup>L</sup> GC <sup>A</sup> VNGPGEARE <sup>A</sup> D <sup>I</sup> G
<i>Thermotoga maritima</i>	: E-GVEV <sup>I</sup> ACPT <sup>C</sup> CGRAE <sup>I</sup> DVEN <sup>M</sup> AKM <sup>I</sup> EEN <sup>F</sup> FHV <sup>Q</sup> KRL <sup>K</sup> I <sup>A</sup> VMG <sup>C</sup> VVN <sup>G</sup> I <sup>G</sup> E <sup>G</sup> KD <sup>A</sup> D <sup>L</sup> G
<i>Treponema pallidum</i>	: AGGVRL <sup>V</sup> SC <sup>P</sup> RCGR <sup>I</sup> GF <sup>D</sup> VHAF <sup>V</sup> RRW <sup>Q</sup> KE <sup>L</sup> FL <sup>S</sup> LK <sup>K</sup> D <sup>I</sup> T <sup>V</sup> AVMG <sup>C</sup> VVN <sup>G</sup> PGE <sup>G</sup> KH <sup>A</sup> D <sup>L</sup> G

Abbildung 48: Die hochkonservierte Aminosäureregion des IspG-Proteins aus verschiedenen Organismen. Identische Aminosäuren sind in grün, ähnliche Aminosäuren in gelb dargestellt. Es sind nur die Aminosäuren, die in mindestens 11 von 19 der Sequenzen konserviert sind, farbig dargestellt. Die konservierten Cysteine (Aminosäurereste 269, 272 und 304 im *E. coli* Protein) sind in rot dargestellt.

Es könnte sich hierbei um eine Metallbindungsstelle z. B. für Eisen oder Zink handeln. Allerdings gibt es hierfür bisher keine experimentellen Hinweise.

Aus Einbauversuchen mit deuteriummarkierter 1-Desoxy-D-xylulose (Giner *et al.*, 1998a; Giner *et al.*, 1998) und deuteriummarkiertem 2C-Methyl-D-erythritol (Charon *et al.*, 2000) war bekannt, daß alle Wasserstoffatome des 2C-Methyl-D-erythritol

Grundgerüsten erhalten bleiben müssen. Unter Berücksichtigung dieser Daten sollen im folgenden zwei mögliche Reaktionsmechanismen diskutiert werden<sup>3</sup>.

In Abbildung 49 ist ein möglicher ionischer Mechanismus dargestellt.

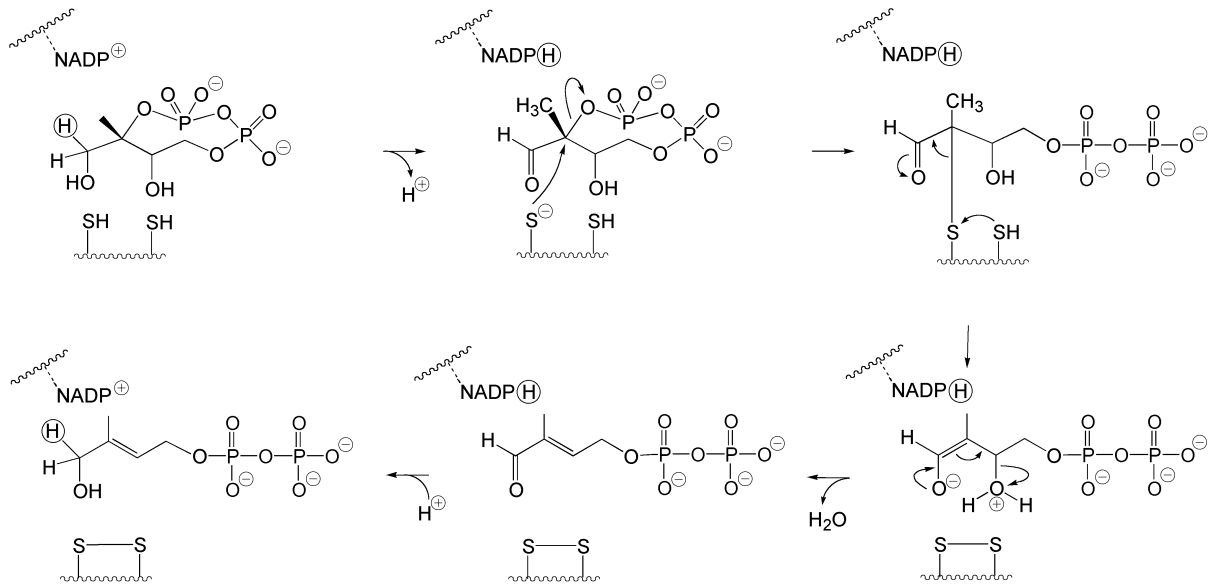


Abbildung 49: Postulierter ionischer Mechanismus für die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Dieser Mechanismus ist an die von der Vitamin K Epoxychinon Reduktase katalysierten Reaktion (vgl. Abbildung 51) angelehnt (Silverman und Nandi, 1988). Im ersten Schritt wird die Hydroxygruppe an Position 1 zum entsprechenden Aldehyd oxidiert. Für diese Reaktion könnte  $\text{NADP}^+$  als Cofaktor dienen. Nach der nucleophilen Substitution der Pyrophosphatgruppe durch ein Thiolat-Ion erfolgt gleichzeitig die Bildung des Disulfids und eines Enolat-Iones. Die Entstehung dieses stabilen Intermediates könnte die treibende Kraft für die Reaktion sein. Nach einer anschließenden  $\beta$ -Eliminierung von Wasser erfolgt die Reduktion der Aldehydgruppe. Hierbei muß das gleiche Proton, das im ersten Schritt entfernt wurde, wieder übertragen werden.

Alternativ dazu wäre auch ein radikalischer Mechanismus in Anlehnung an die von der Ribonukleotid Reduktase katalysierten Reaktion denkbar (Licht *et al.*, 1999). In Abbildung 50 ist das entsprechende Reaktionsschema dargestellt.

<sup>3</sup> Prof. Arigoni, ETH Zürich, persönliche Mitteilung

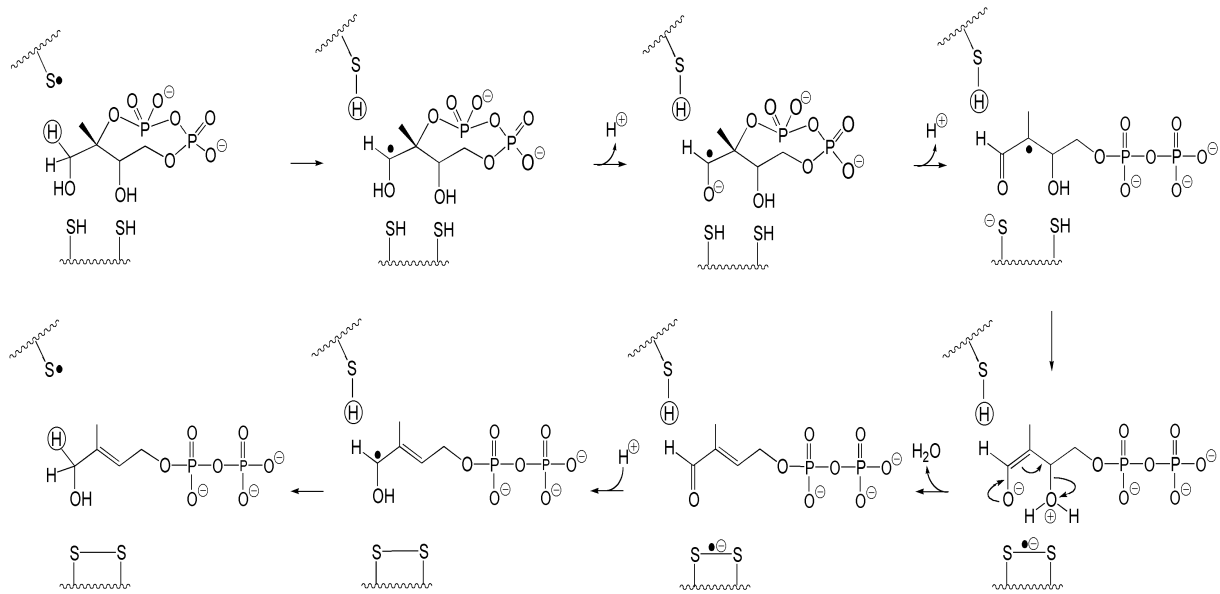


Abbildung 50: Postulierter radikalischer Mechanismus für die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Hierbei erfolgt die radikalische Abstraktion eines Wasserstoffatoms in Position 1. Es wäre denkbar, daß dazu das dritte konservierte Cystein benötigt wird. Das so entfernte Wasserstoffradikal muß im letzten Reaktionsschritt wieder übertragen werden (Abbildung 50).

Beide diskutierte Mechanismen haben die Bildung eines Disulfides gemeinsam. Für die Erhaltung der katalytischen Aktivität muß es zwingend wieder zu den entsprechenden Thiolen reduziert werden. Auf welche Weise dies erfolgt, ist bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt.

Insgesamt ist die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion sehr ausgefallen und es existieren nur wenige vergleichbare biochemische Beispiele, wie die Biosynthese von Vitamin K (Silverman und Nandi, 1988). Hierbei erfolgt ebenfalls eine Reduktion zur Doppelbindung unter Übertragung von zwei Elektronen (Abbildung 51).

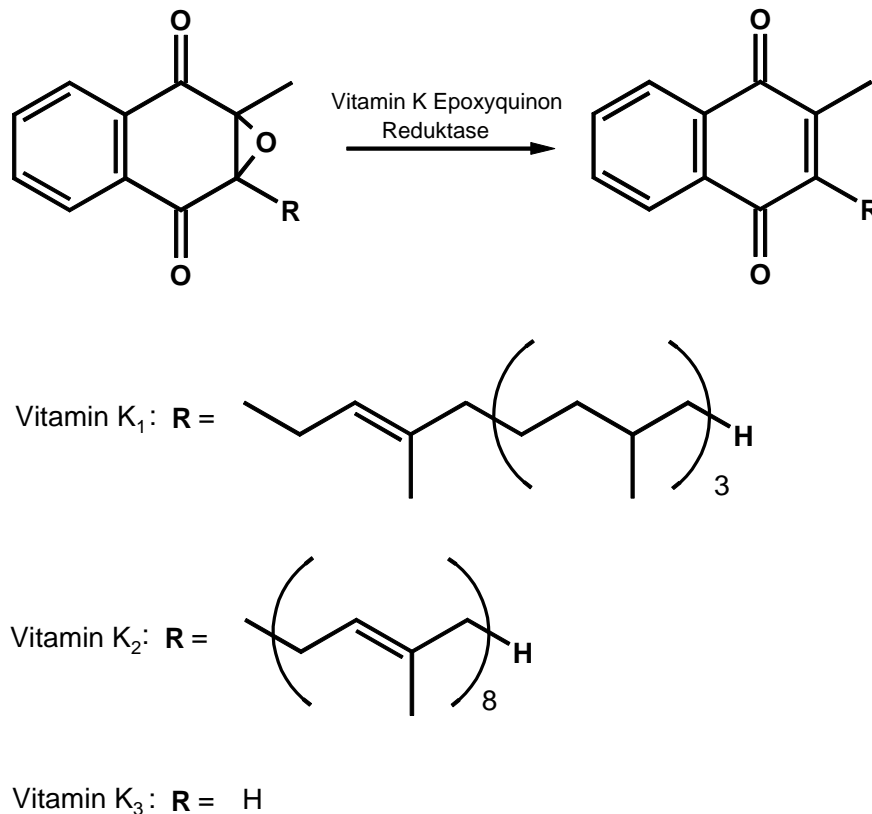


Abbildung 51: Die von der Epoxychinon Reduktase katalysierte Bildung von Vitamin K

#### 4.1.4 Die katalytische Aktivität des IspH-Proteins

Nachdem bewiesen war, daß für die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat das IspG Protein benötigt wurde, wurde in Fortsetzung der bekannten Strategie die vom LytB-Protein (nun in IspH umbenannt) katalysierte Reaktion geklärt. Auf diese Weise konnte ausgehend von komplett markierter 1-Desoxy-D-xylulose vollmarkiertes IPP und DMAPP erzeugt werden. Eine Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyldiphosphat wurde nur noch in geringen Mengen beobachtet (vgl. Kap. 3.1.11.13).

Es zeigte sich, daß die Transkriptionsabfolge der Gene eine Rolle spielt. So war für die Reaktion essentiell, daß zuerst das *gcpE*-Gen und dann das *lytB*-Gen von *E. coli* exprimiert wurde. Erfolgte die Transkription in umgekehrter Reihenfolge, konnte nur

1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyldiphosphat beobachtet werden. Möglicherweise könnte es sich bei den zwei Proteinen um ein Heterooligomer handeln.

Als zusätzliche Schwierigkeit erwies sich, das gebildetes IPP sehr schnell zu höheren Isoprenoiden umgesetzt wird. So wurde 30 Minuten nach Zugabe von 1-Desoxy-D-xylulose die Bildung von IPP beobachtet, während nach 3 h kein IPP mehr detektiert werden konnte. Möglicherweise wird die Expression von Prenyltransferasen aus dem genomischen Hintergrund erhöht. Ferner ist auch denkbar, daß auf Grund eines Mangels an Reduktionsäquivalenten nicht mehr genügend IPP nachgebildet werden kann.

Für die Bildung von Terpenen wird neben IPP auch DMAPP benötigt. Da eine IPP/DMAPP Isomerase in *E. coli* vorhanden, aber nicht essentiell ist, muß bei der vom LytB-Protein katalysierten Reaktion auch DMAPP gebildet werden. Da DMAPP nur als „Startereinheit“ benötigt wird (vgl. Kap. 1, Abbildung 2) ist die gebildete Menge mit ca. 14 % (bezogen auf IPP) deutlich niedriger als die von IPP.

Für die Bildung von IPP und DMAPP muß formal aus 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat reaktiv Wasser eliminiert werden. Es ist denkbar, daß zuerst eine Protonierung der OH-Funktion und eine Wassereliminierung erfolgt. Das hierbei gebildete Carbokation ist durch die Doppelbindung resonanzstabilisiert. Im Anschluß daran kann es möglicherweise durch NADPH zu IPP bzw. DMAPP reduziert werden (vgl. Abbildung 52).

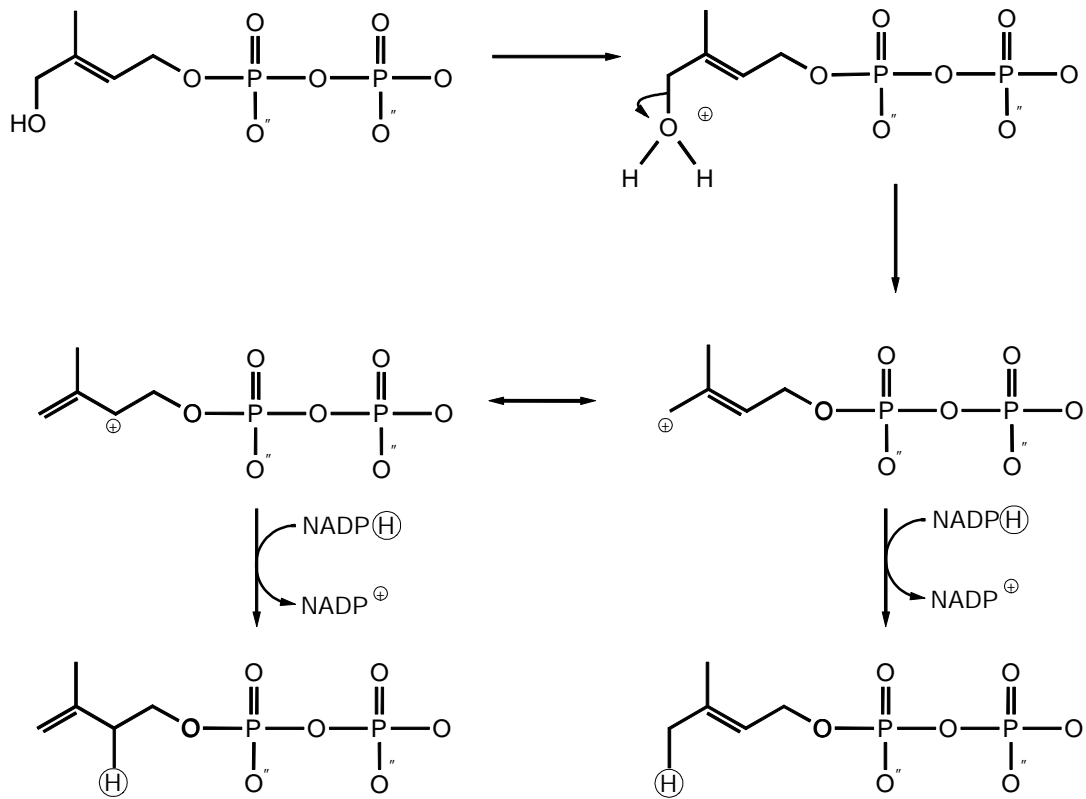


Abbildung 52: Postulierter ionischer Mechanismus für die Bildung von IPP und DMAPP aus 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat

Mit der Aufklärung der vom LytB Protein katalysierten Reaktion konnte somit die Biosynthese von IPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg vollständig geklärt werden. Es ergibt sich abschließend folgendes Schema: (Abbildung 53).



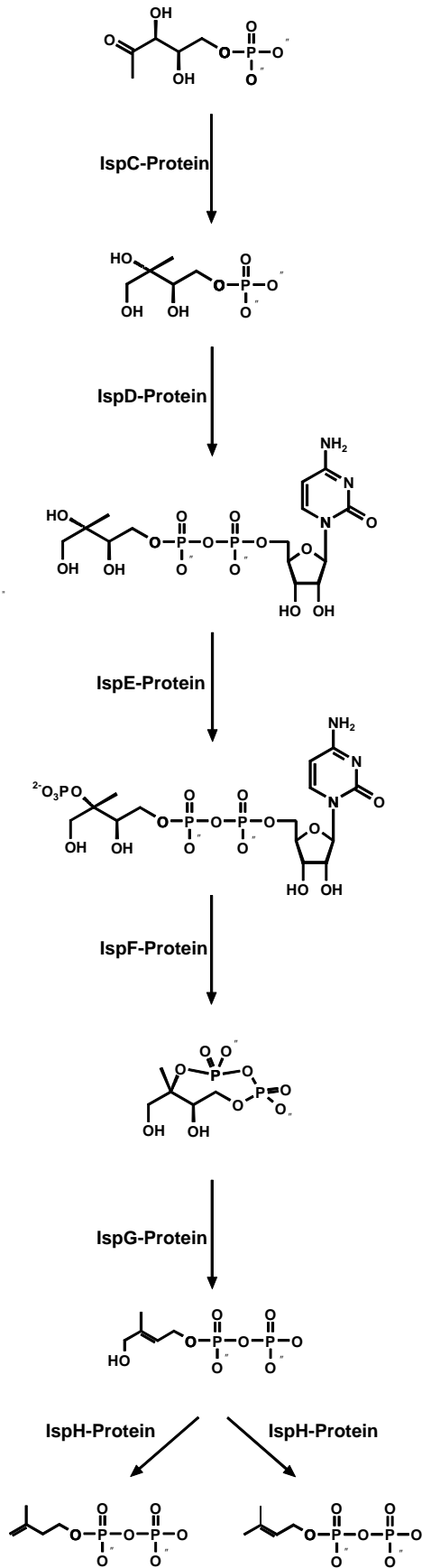


Abbildung 53: Die Biosynthese von IPP und DMAPP nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg

## 4.2 Biotechnologische Aspekte

Viele Terpene finden Anwendung als Wirkstoffe, Werkstoffe oder Rohstoffe. So wird z. B. das Monoterpen Eucalyptol als Aromastoff verwendet, während das Diterpen Taxol als Cytostatikum (Abbildung 54) eingesetzt wird.

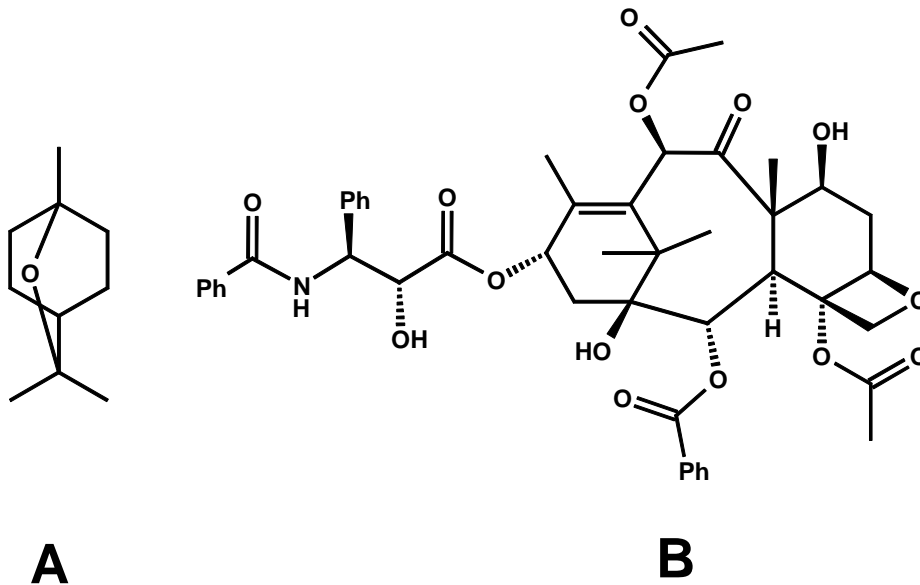


Abbildung 54: Strukturformeln von Eucalyptol (1,8-Cineol, A) und Taxol (B)

Da die Biosynthese aller Terpene ausgehend von DMAPP und IPP erfolgt, ist eine Voraussetzung für eine effiziente biotechnologische Produktion dieser Substanzen eine ausreichende Bildung der Vorstufen ausgehend von billigen Edukten. Durch Verfütterung von  $^{13}\text{C}$ -markierter 1-Desoxy-D-xylulose an einen *E. coli* Klon, der die Proteine XylB, IspC, IspD, IspE, IspF, IspG und IspH überexprimiert hatte, konnte gezeigt werden, daß große Mengen an IPP gebildet werden (vgl. Kap. 3.1.11.13). Der Vorteil hierbei ist, daß der Einstieg in die Terpenbiosynthese völlig unabhängig vom zentralen Stoffwechsel erfolgt. Prinzipiell ist es möglich, 1-Desoxy-D-xylulose sowohl chemisch (Blagg und Poulter, 1999) als auch enzymatisch (Taylor *et al.*, 1998) zu synthetisieren. Allerdings ist wahrscheinlich für eine biotechnologische Produktion die Darstellung von 1-Desoxy-D-xylulose relativ teuer.

Aus diesem Grund wurde versucht, 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat ausgehend von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose zu erzeugen. Glucose ist im Gegensatz zu 1-Desoxy-D-xylulose in großer Menge verfügbar und sehr billig. Es zeigte sich, daß bei Verwendung eines *E. coli* Klons, der die Proteine Dxs, XylB und IspC überexprimiert

hatte, hohe Konzentrationen an 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat gebildet werden (vgl. Kap. 3.2.3). Diese Daten belegen, daß für eine biotechnologische Produktion die chromosomale Expression der IspD-, IspE- und IspF-Proteine vom Wild-Typ Hintergrund ausreichend ist. Der limitierende Schritt ist die vom IspG-Protein katalysierte Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat. So konnte *in vivo* keine komplette Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat bzw. IPP erreicht werden. Aus den genannten Gründen muß für eine mögliche biotechnologische Anwendung vor allem die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion optimiert werden. Durch Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markierten Verbindungen war es möglich, die enzymatische Umsetzung der gefütterten Verbindungen „online“ mittels NMR-Spektroskopie zu verfolgen und Engpässe zu erkennen. Prinzipiell wäre es denkbar, das beschriebene System auch auf andere biotechnologische Prozesse zu übertragen. Falls es bei diesen Prozessen zu einer Anstauung eines Intermediates oder einer unerwünschten Nebenreaktion kommt, könnte dies so erkannt und gezielt gesteuert werden. Voraussetzung hierbei ist die Verfügbarkeit einer geeigneten  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorstufe.

### **4.3 Biosynthese von Humulon**

Durch Applikation von  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose konnte gezeigt werden (Goese *et al.*, 1999), daß die Biosynthese der Isoprenseitenketten von Humulon nach dem alternativen Terpenbiosyntheseweg erfolgt, während der aromatische Ring aus Acetateinheiten über die Polyketidbiosynthese gebildet wird. Um den Ursprung der verbleibenden Sauerstoffatome in Humulon zu untersuchen, wurde in einem Freilandversuch ein  $^{18}\text{O}_2$ -Einbauversuch an Hopfenpflanzen unternommen. Da diese eine Höhe von ca. 3 m erreichen, war es unmöglich, einen *in vivo* Versuch an der ganzen Pflanze zu unternehmen. Deshalb wurden einzelne Hopfendolden in jeweils ein Schlenkrohr überführt. Um eine möglichst natürliche Atmosphäre zu erzeugen, wurde ein  $^{18}\text{O}_2$ -Gehalt von ca. 25 % gewählt. Es zeigte sich, daß ein Einbau zu ca. 9 % spezifisch an Position 6 (vgl. Abbildung 44) in Humulon erfolgt. Alle anderen Positionen, an denen sich ein Sauerstoff befindet, waren nicht  $^{18}\text{O}$ -markiert. Der Grund hierfür ist, daß nur der Sauerstoff an Position 6 aus elementarem Sauerstoff stammt, während die übrigen Sauerstoffatome über Wasser eingeführt werden.

Dadurch ist bewiesen, daß die Biosynthese durch eine Oxidation erfolgt, wahrscheinlich ausgehend von Desoxyhumulon (vgl. Kap. 3.3.1).

Diese Daten stimmen gut mit dem postulierten Bildungsweg und den dazugehörigen *in vitro* Versuchen überein (Fung *et al.*, 1997).

Über die weitere Biosynthese von Humulon war durch Applikation von radioaktivem Leucin bekannt, daß ein Einbau in die Acylseitenkette erfolgen kann (Drawert und Bayer, 1976a). Allerdings konnte nicht bewiesen werden, ob das Kohlenstoffgerüst von Leucin als kompletter Block erhalten bleibt.

Durch einen Einbauversuch mit  $[U-^{13}C_6]$ Leucin konnte mittels  $^{13}C$ -NMR Spektroskopie gezeigt werden, daß das Kohlenstoffgerüst erhalten bleibt, da die Acylseitenkette in Humulon durchgehend markiert war (vgl. Kap. 3.3.2). Würde ein weiterer Abbau erfolgen, müßten verschiedene Isotopomere auftreten. Wahrscheinlich erfolgt eine Umwandlung von Leucin zu 3-Methyl-butyryl-CoA (Abbildung 55).

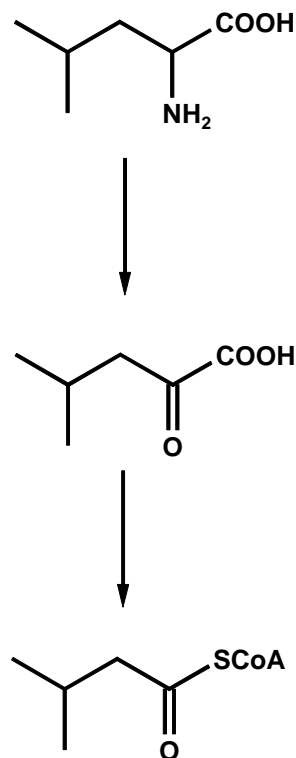


Abbildung 55: Schema zum Abbau von Leucin zu 3-Methyl-butyryl-CoA

Die Biosynthese von Humulon könnte somit durch Kondensation von 3-Methyl-butyryl-CoA mit drei Malonyl-CoA-Einheiten erfolgen. Die so entstehende lineare Vorstufe könnte durch eine Chalcon-Synthase zu Phloroisovalerophenon cyclisiert

werden (Goese *et al.*, 1999). Durch elektrophile Substitution mit DMAPP könnte so Desoxyhumulon entstehen, welches zu Humulon oxidiert wird (Abbildung 56).

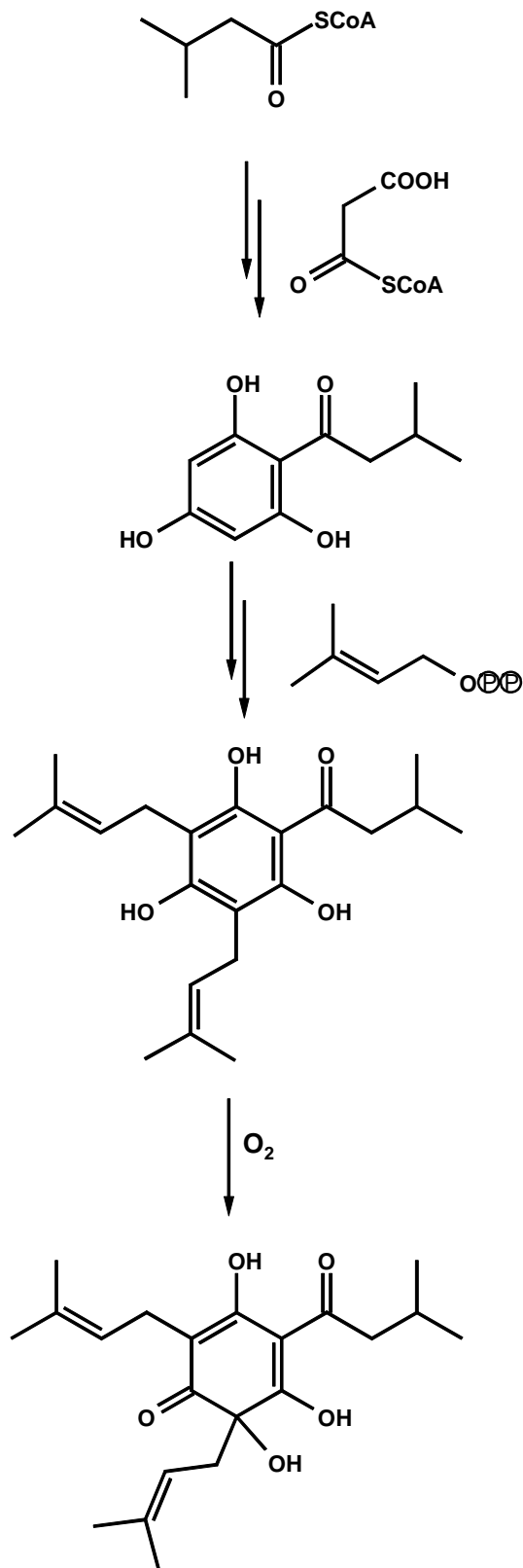


Abbildung 56: Mögliches Biosyntheschema für die Bildung von Humulon

## 5 Zusammenfassung

Über Jahrzehnte wurde angenommen, daß die Biosynthese der universellen Terpenvorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) ausschließlich über Mevalonat erfolgt. Auf Grund von Einbauversuchen mit isotopmarkierten Verbindungen konnte in den Arbeitsgruppen von Arigoni und Rohmer erst vor kurzem gezeigt werden, daß es einen alternativen Terpenbiosyntheseweg von IPP und DMAPP ausgehend von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von isotopmarkierten Verbindungen und NMR-Spektroskopie noch unbekannte enzymatische Teilschritte in diesem Biosyntheseweg geklärt.

Durch Verwendung von isotopmarkierter Glucose bzw. Dihydroxyacetonphosphat und Pyruvat wurde eine flexible enzymatische Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat entwickelt, die sowohl die Darstellung von radioaktiven als auch  $^{13}\text{C}$ -markierten und  $^{13}\text{C}$ - und  $^2\text{H}$ - doppelmarkierten Isotopomeren erlaubte. Diese wurden enzymatisch, unter Verwendung diverser Regenerierungsschritte für die benötigten Cofaktoren, zu 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und dessen Vorstufen umgesetzt (vgl. Abbildung 57). Die isotopmarkierten Verbindungen wurden mit einer Gesamtausbeute von ca. 50 % erhalten.

Mit Hilfe der so erzeugten, isotopmarkierten Intermediate wurden verschiedene enzymatische Reaktionen aufgeklärt. Es zeigte sich, daß das IspE-Protein für die Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat aus 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol benötigt wird, während das IspF-Protein die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat aus 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat katalysiert (vgl. Abbildung 57). Ferner wurde mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ -markierter 1-Desoxy-D-xylulose gezeigt, daß die D-Xylulokinase diese Verbindung *in vitro* zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat phosphoryliert.

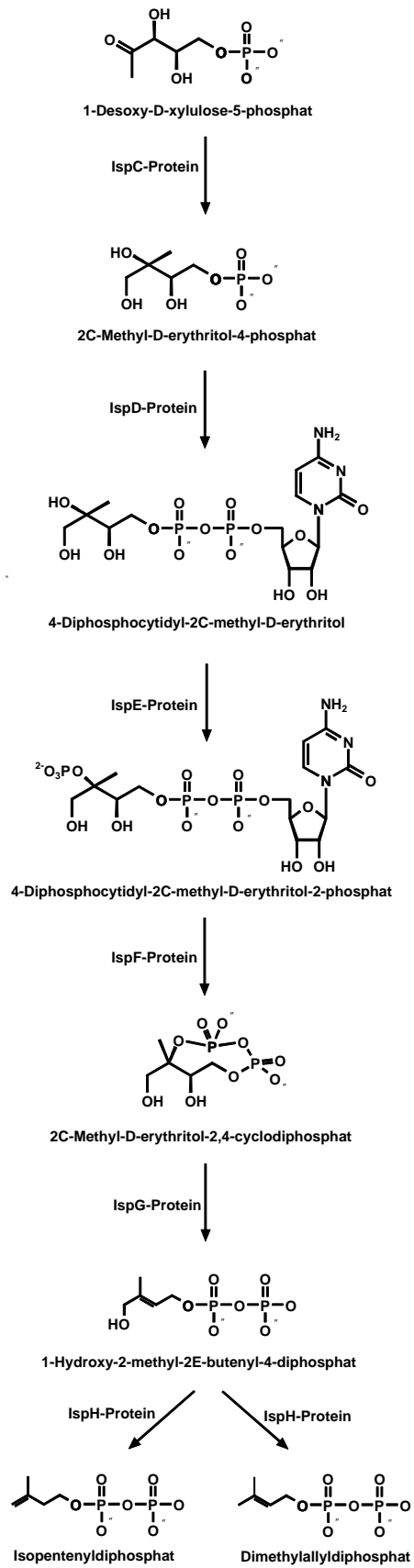


Abbildung 57: Der alternative Terpenbiosyntheseweg

Durch Einbauversuche mit  $^{13}\text{C}$ -markierter 1-Desoxy-D-xylulose an verschiedenen, rekombinanten *E. coli* Klonen, die neben der D-Xylulokinase die IspC-, IspD-, IspE- und IspF-Proteine des alternativen Terpenbiosynthesewegs überexprimierten, wurde der komplette bekannte Stoffwechselweg in den Zellen verfolgt und *in vivo* 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat erzeugt (vgl. Abbildung 57). Bei Verwendung eines *E. coli* Klons, der neben den IspC-, IspD-, IspE- und IspF-Proteinen zusätzlich das IspG-Protein überexprimierte, wurde 1-Hydroxy-2-methyl-2E-butenyl-4-diphosphat als ein neues Intermediat des alternativen Terpenbiosyntheseweges erhalten und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert. Mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli* Klons, der zusätzlich das IspH-Protein überexprimierte, wurde aus  $^{13}\text{C}$ -markierter 1-Desoxy-D-xylulose  $^{13}\text{C}$ -markiertes IPP und DMAPP erzeugt. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde die Beteiligung der IspG- und IspH- Proteine am alternativen Terpenbiosyntheseweg und ihre katalytische Funktion bewiesen (vgl. Abbildung 57).

Durch Einbauversuche mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$  wurde mit Hilfe eines *E. coli* Klons, der die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase überexprimierte, *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -markiertes 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat erhalten. Erfolgt die Inkorporations-experimente mit einem *E. coli* Klon, der neben der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase zusätzlich die D-Xylulokinase und die 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat Synthase überexprimierte, wurde *in vivo* ausgehend von  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$   $^{13}\text{C}$ -markiertes 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat gebildet, obwohl die hierfür benötigten IspD-, IspE- und IspF- Proteine nicht überexprimiert waren (vgl. Abbildung 57). Somit wurde gezeigt, daß für eine effiziente Bildung der IPP Vorstufe 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in *E. coli* die chromosomale Expression der IspD-, IspE- und IspF- Proteine ausreichend ist. Für eine mögliche biotechnologische Produktion von Terpenen ist eine hohe Produktion der Vorstufen IPP und DMAPP essentiell. Die Einbauversuche mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$  zeigten, daß für eine effiziente Bildung der IPP und DMAPP Vorstufe 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat auf eine Überexpression der IspD-, IspE- und IspF- Proteine in *E. coli* verzichtet werden kann.

Die Biosynthese des aus Hopfendolden stammenden Terpens Humulon wurde durch einen Einbauversuch mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Leucin}$  untersucht. Es zeigte sich, daß die Acylseitenkette von Humulon katabolisch aus Leucin gebildet werden kann. Ferner wurde durch einen *in vivo*  $^{18}\text{O}_2$ -Einbauversuch bewiesen, daß Humulon durch Oxidation von Desoxyhumulon entsteht.



## 6 Literaturverzeichnis

Adam, P., Eisenreich, W., Fellermeier, M., Hecht, S., Rohdich, F., Schuhr, C. A., Wungsintaweekul, J., Zenk, M. H. und Bacher, A. (2000) Deutsche Patentanmeldung Nr. 10027821.3.

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.

Arigoni, D., Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewicz, T., Zenk, M. H., Bacher, A. (1999) Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1309-1314.

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.

Blagg, B. S. J., Poulter, C. D. (1999) Synthesis of 1-Desoxy-D-xylulose and 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphate. *J. Org. Chem.* **64**, 1508-1511.

Bloch, K. (1992) Sterol molecule: structure, biosynthesis and function, *Steroids* **57**, 378-382.

Bochar, D., Friesen, A., Stauffacher, C. B. und Rodwell, V. W. (1999) Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. In *Comprehensive Natural Product Chemistry* **2**, 15-44.

Broers, S. T. J. (1994) Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*, Dissertation Nr. 10978, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz.

Brötz, H., Ehlert, K., Freiberg, C., Spaltmann, F., Wieland, B., Labischinski, H. (2000) Neue essentielle bakterielle Gene und ihre Proteine. Deutsche Patentanmeldung DE 199 16 176 (12.10.2000)

Campos, N., Rodriguez-Concepcion, M., Sauret-Güeto, S., Gallego, F. Lois, L.-M., Boronat, A. (2001a) *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for genetic analysis of the 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem. J.*, **353**, 59-67.

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

Chang, A. C. Y. and Cohen, S. N. (1978), *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156

Charon, L., Hoeffler, J.-F., Pale-Grosdemange, C., Lois, L.-M., Campos, N., Boronat, A., Rohmer, M. (2000) Deuterium-labelled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem. J.* **346**, 737-742.

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

Drawert, F., Beier, J. (1976a) Biosynthesis of hop bitter compounds. Part 7. Amino acids are the precursors of the acyl side chain of hop bitter compounds, *Phytochemistry* **15**, 1693-1694.

Drawert, F., Beier, J. (1976b) Biosynthesis of hop bitter compounds. Part 6. On the biogenesis of the six-membered ring of hop bitter compounds, *Phytochemistry* **15**, 1691-1692.

Drawert, F., Beier, J. (1976c) Biosynthesis of hop bitter compounds. Part 8. Monoprenylated acylphloroglucins, *Phytochemistry* **15**, 1695-1696.

Effenberger, F., Straub, A. (1987) A novel convenient preparation of dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions. *Tetrahedron Lett.* **28**, 1641-1644.

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**, R221-R233.

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

Fung, S.-Y., Zurbier, K. W. M., Paniego, N. B., Scheffer, J. J. C., Verpoorte, R. (1997), Conversion of deoxyhumulone into the hop  $\alpha$ -acid humulone. *Phytochemistry* **44**, 1047-1053.

Giner, J.-L., Jaun, B., Arigoni, D. (1998a) Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: the fate of 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **17**, 1857-1858.

Giner, J.-L., Jaun, B. (1998b) Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: retention of the methyl H-atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *Tetrahedron Lett.* **39**, 8021-8022.

Goese, M., Kammhuber, K., Bacher, A., Zenk, M. H., Eisenreich, W. (1999) Biosynthesis of bitter acids in hops. *Eur. J. Biochem.* **263**, 447-454.

Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A., Rohdich, F. (2000a) 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.

Herz, S. (2000b), Expression von Genen der Riboflavin- und Terpenbiosynthese und Charakterisierung der entsprechenden Proteine, Dissertation, TU-München.

Hintz, M., Reichenberg, A., Altincicek, B., Bahr, U., Gschwind, R. M., Kollas, A.-K., Beck, E., Wiesner, J., Eberl, M., Jomaa, H. (2001), Identification of (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human  $\gamma\delta$  T cells in *Escherichia coli*, *FEBS Letters*, *in press*. (*published online*)

Kis, K., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. (2000) An efficient preparation of 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphoric acid and its derivatives *J. Org. Chem.* **65**, 587-592.

Kuzuyama, T., Shimizu, T., Takahashi, S., 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.

Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T., Seto, H. (2000a) Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase. *Tetrahedron Lett.* **41**, 2925-2928.

Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Dairi, T., Seto, H. (2000b) Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **41**, 703-706.

Licht, S., Stubbe, J. (1999) in *Comprehensive Natural Product Chemistry*, ed. Poulter, C. D. (Pergamon, Oxford), Vol. 5, 163-203.

Lois, L. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K., Rohmer, M. and 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.

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.

McCaskill, D., Croteau, R. (1999) Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Tetrahedron Lett.* **40**, 653-656.

Neidhardt, F. C., (1996a), *Escherichia Coli and Salmonella*, S. 585-590, ASM Press, Washington DC.

Neidhardt, F. C., (1996b), *Escherichia Coli and Salmonella*, S. 15, ASM Press, Washington DC.

Neidhardt, F. C., (1996c), *Escherichia Coli and Salmonella*, S. 1358, ASM Press, Washington DC.

Nicoletti, M., Tomassini, L., Foddai, S. (1992), A new hemiterpene glucoside from *Ornithogalum montanum*, *Planta Med.* **58**, 472.

Nilsson, R., Sjunesson, M. (1961) Separation of nucleotides on Ecteola Cellulose. *Acta Chemica Scandinavica* **15**, 1017-1020.

Ostrovsky, D., Shipanova, I., Sibeldina, L., Shashkov, A., Kharatian, E., Malyarova, I., Tantsyrev, G. (1992) A new cyclopyrophosphate as a bacterial antistressor? *FEBS Letters* **298**, 159-161.

Ostrovsky, D., Kharatian, E., Dubrovsky, T., Ogrel, O., Shipanova, I. and Sibeldina, L. (1992b) The ability of bacteria to synthesize a new cyclopyrophosphate correlates with their tolerance to redox-cycling drugs: on a crossroad of chemotherapy, environmental toxicology and immunobiochemical problems. *Biofactors* **4**, 63-68.

Ostrovsky, D., Diomina, G., Lysak, E., Matveeva, E., Ogrel, O., Trutko, S. (1998) Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains. *Arch. Microbiol.* **171**, 69-72.

Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H., Arigoni, D. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS Letters* **465**, 157-160.

Rieder, C., Jaun, B., Arigoni, D., (2000). On the early steps of cineol biosynthesis in *Eucalyptus globulus*. *Helv. Chim. Acta* **83**, 2505-2513.

Risley, J. M. and van Etten, R. L. (1990) Properties and chemical application of <sup>18</sup>O isotope shifts in <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *NMR Basic Principles and Progress* **22**, Springer Verlag, Berlin.

Robins, R. J., Furze, J. M., Rhodes, M. J. C. (1984),  $\alpha$ -acid degradation by suspension culture cells of *Humulus Lupulus*, *Phytochemistry* **24**, 709-714.

Rohdich, F., Wungsintaweekul, 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., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk, M. H., and 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., Schuhr, C. A., Hecht, S., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. (2000 b), Biosynthesis of isoprenoids. A rapid method for the preparation of isotope-labeled 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 9571-9574.

Rohdich, F., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A. and Bacher, A. (2001), Biosynthesis of terpenoids 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem* **268**, 3190-3197.

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

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

Schuhr, C. A. (2001) Wirkstoffe und Targets - die Biosynthese des Lipaseinhibitors Lipstatin und der alternative Isoprenoid-Biogeneseweg. Dissertation TU-München.

Schwarz, M. K. (1994) Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. Dissertation Nr. 10951, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz.

Sharpe, F. R. and Ormrod, I. H. L. (1991) Fast isomerisation of humulone by photoreaction: preparation of an HPLC standard, *J. Inst. Brew.* **97**, 33-37.

Silverman, R. B. and Nandi, D. L. (1988) Reduced thioredoxin: a possible physiological cofactor for vitamin K epoxide reductase. Further support for an active site disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 1248-1254.

Spurgeon, S. L. and Porter, J. W., Biosynthesis of isoprenoid compounds (1981), eds. Porter, J. W. and Spurgeon, S. L., Wiley, New York, **1**, 5-38.

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

Takagi, M., Kuzuyama, T., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T., Seto, H. (2000) Studies on the nonmevalonate pathway: formation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-methyl-D-erythritol. *Tetrahedron Letters* **41**, 3395-3398.

Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., Seto, H. (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9879-9884.

Taylor, S. V., Vu, L. D., Begley, T. P., Schörken, U., Grolle, S., Sprenger, G. A., Bringer-Meyer, S., Sahm (1998), Chemical and enzymic synthesis of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate. *J. Org. Chem.*, **63**, 2375-2377.

Turner, D., Santos, H., Fareleira, P., Pacheco, I., LeGall, Z., Xavier, A. V. (1992) Structure determination of a novel cyclic phosphocompound isolated from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biochem J.* **285**, 387-390.



Wungsintaweeikul, J., Herz, S., Hecht, S., Eisenreich, W., Feicht, R., Rohdich, F., Bacher, A., Zenk, M. H. (2001a) Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 310-316.

Wungsintaweeikul, J. (2001b) Enzymes of the alternativ terpenoid pathway in *Escherichia coli*, Dissertation TU-München.

Zuurbier, K. W. M., Fung, S.-Y., Scheffer, J. C., Verpoorte, R., (1998), *in-vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus Lupulus*, *Phytochemistry* **49**, 2315-2322.