

**Charakterisierung  
der  
1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-  
Synthase (IspG-Protein)**

**Ferdinand Zepeck**

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

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher  
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 20.02.06 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.05.06 angenommen.

---

*Gott sei dank, dass der Spaß nicht totzukriegen ist  
auf dieser so sehr mürrischen Welt!*

(Willhelm Raabe)

---

*Für meine Eltern Bärbel und Roland,  
meine Freundin Christina und mich*

---

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von mir selbstständig in der Zeit vom Oktober 2002 bis Oktober 2005 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie durchgeführt.

---

## Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. A. Bacher danke ich für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung während meiner Promotion. Ferner danke ich ihm, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Lehrstuhl zu promovieren.

Herrn Dr. W. Eisenreich ist für seine Hilfe in allen Fragen der NMR-Spektroskopie gedankt sowie für die vielen Diskussionen über wissenschaftliche Probleme.

Herrn Dr. F. Rohdich danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Molekularbiologie und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. D. Arigoni von der ETH Zürich danke ich für die vielen Telefonate und Emails insbesondere über den Mechanismus der vom IspG-Protein katalysierten Reaktion.

Für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und die fruchtbaren Diskussionen bedanke ich mich sowohl bei den aktiven also auch bei den ehemaligen Mitgliedern der Terpengruppe: Dr. Petra Adam, Dr. Sabine Amslinger, Dr. Wolfgang Eisenreich, Tobias Gräwert, Dr. Stefan Hecht, Dr. Johannes Kaiser, Dr. Cornelia Krieger, Ralf Laupitz, Susan Lauwn, Matthias Lee, Dr. Tanja Radykewicz und Dr. Felix Rohdich.

Insbesondere Herrn Ralf Laupitz danke ich für die vielen Diskussionen über komplexe wissenschaftliche Themen, wie der Schrödinger-Gleichung. Diese und andere Redebeiträge waren sehr erheiternd und unvergessen.

Für die freundliche Aufnahme in das Labor 52224 zu Beginn meiner Tätigkeit bedanke ich mich insbesondere bei meinen ersten Laborkollegen Dr. Stefan Hecht, Dr. Tanja Radykewicz, Ingrid Obersteiner und Christoph Grassberger.

Herrn Fritz Wendling danke ich für die kompetente und schnellen Hilfe zur Behebung aller HPLC und Computerproblemen.

---

Herrn Richard Feicht danke ich für die Hilfe bei der Proteinreinigung sowie bei Fragen zum anaeroben Arbeiten. Für das ein oder andere Feierabendbier sei Ihm auch herzlichst gedankt!

Herrn Dr. Nicholas Schramek sei für die Berechnungen der Kinetiken und für interessante (und auch sehr lustige) Diskussionen gedankt.

Für die Mithilfe bei meinen Projekten danke ich Christine Schwarz, Katrin Gärtner, Ingrid Obersteiner, Astrid König, meinen Praktikanten, Auszubildenden und insbesondere Viola Trentinaglia.

Dr. Werner Römisch, Dr. Lilla Margl und Silke Marsch danke ich für die hilfreichen Diskussionen und lustigen Unterhaltungen.

Für die Korrektur meiner Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Felix Rohdich, Dr. Wolfgang Eisenreich, Dr. Stefan Hecht und Christina Junge.

Allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls für Organische Chemie und Biochemie danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.

Meiner Freundin Chris danke ich dafür, dass sie immer da ist!

---

## Publikationsliste, der schon vorab veröffentlichten Teile dieser Dissertation

Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Gräwert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A. und Arigoni, D. (2003). "The Desoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein." Proc. Natl. Acad. Sci. **100**(4): 1586-1591.

Gräwert, T., Kaiser, J., Zepeck, F., Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Schramek, N., Schleicher, E., Weber, S., Haslbeck, M., Buchner, J., Rieder, C., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. und Rohdich, F. (2004). "IspH Protein of *Escherichia coli*: Studies on Iron-Sulfur Cluster Implementation and Catalysis." J. Am. Chem. Soc. **126**: 12847-12855.

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

Zepeck, F., Gräwert, T., Kaiser, J., Schramek, N., Eisenreich, W., Bacher, A. und F. Rohdich (2005). "Biosynthesis of isoprenoids. Purification and properties of IspG protein from *Escherichia coli*." J. Org. Chem. **70**(23). 9168-9174.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>TERPENBIOSYNTHESE</b>	<b>1</b>
1.1.1	DER MEVALONATWEG	3
1.1.2	DER DESOXYXYLULOSEPHOSPHATWEG	4
<b>1.2</b>	<b>VERTEILUNG DER BEIDEN ISOPRENOIDBIOSYNTHESEWEGE IN DER NATUR</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>DIE 1-HYDROXY-2-METHYL-2(E)-BUTENYL-4-DIPHOSPHAT-SYNTHESE (ISP-G-PROTEIN)</b>	<b>7</b>
<b>1.4</b>	<b>EISEN-SCHWEFEL CLUSTER</b>	<b>9</b>
<b>1.5</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>13</b>
2.1.1	CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND PUFFER	13
2.1.2	KULTURMEDIEN	16
2.1.3	ENZYME	17
2.1.4	KLONE	18
2.1.5	GERÄTE	19
<b>2.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>22</b>
2.2.1	NMR-SPEKTROSKOPIE	22
2.2.2	MASSENSPEKTROSKOPIE	23
2.2.3	SEQUENZANALYSE	23
2.2.4	ENZYMATISCHE HERSTELLUNG VON 2C-METHYL-D-ERYTHRIOL-2,4-CYCLODIPHOSPHAT	23
2.2.5	HPLC	25
2.2.6	IN VIVO SUPPLEMENTIERUNGSVERSUCHE	28
2.2.7	ENZYMMASSAYS ZUR BESTIMMUNG DER ISP-G AKTIVITÄT VERSCHIEDENER ZELLEXTRAKTE	28
2.2.8	INDUZIERTER ANZUCHTEN	30
2.2.9	AEROBE REINIGUNGEN VON PROTEINEN	31
2.2.10	ANAEROBE REINIGUNG VON PROTEINEN	33
2.2.11	AKTIVITÄTSBESTIMMUNGEN MIT GEREINIGTEM PROTEIN	34
2.2.12	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG ÜBER NMR MIT ANAEROB GEREINIGTEM ISP-G-PROTEIN	37
2.2.13	EISEN- UND SCHWEFELBESTIMMUNG VON REKOMBINANTEM ISP-G-PROTEIN	37



---

<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u></b>	<b>39</b>
3.1	IN VITRO-ASSAYS MIT ZELLEXTRAKTEN	39
3.2	IN VIVO UNTERSUCHUNGEN ZUM ELEKTRONENFLUSS DER VOM ISPG-PROTEIN KATALYSIERTEN REAKTION	40
3.3	IN VITRO ASSAYS MIT AEROB GEREINIGTEM ISPG PROTEIN	43
3.3.1	REINIGUNG VON REKOMBINANTEM ISPG-PROTEIN	43
3.3.2	AKTIVITÄTSTESTS MIT REKOMBINANTEM ISPG-PROTEIN	44
3.4	ETABLIERUNG ANAEROBER TECHNIKEN INNERHALB EINER GLOVE BOX	50
3.5	CHARAKTERISIERUNG DES MPB-ISPG-PROTEINS	51
3.5.1	ANAEROBE REINIGUNG DES ISPG-PROTEINS	52
3.5.2	AKTIVIERUNG DES ISPG-PROTEINS DURCH FLAVODOXIN UND FLAVODOXIN-(NADP <sup>+</sup> )-REDUKTASE	54
3.5.3	ABHÄNGIGKEIT DER ISPG-PROTEIN-PROETIN AKTIVITÄT VON ELEKTRONENDONATOREN	56
3.5.4	ABHÄNGIGKEIT DER ISPG-AKTIVITÄTEN VOM ZWEIWERDIGEN METALLIONEN	57
3.5.5	pH-ABHÄNGIGKEIT DES ISPG-AKTIVITÄT	58
3.5.6	KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN AM ISPG-PROTEIN	58
3.5.7	DIE CYSTEINE 270, 273 UND 306 IM ISPG-PROTEIN ALS LIGANDEN DES EISEN-SCHWEFEL-CLUSTERS	61
3.5.8	DETEKTION DER ISPG-REAKTION MITTELS NMR-SPEKTROSKOPIE	61
3.5.9	VERGLEICH DER AKTIVITÄTEN VERSCHIEDENER ISPG-PROTEINE	64
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER VOM ISPG-PROTEIN KATALYSIERTEN REAKTION	67
3.6.1	NMR UNTERSUCHUNGEN VON [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2,3-EPOXY-4-HYDROXY-3-METHYL-BUTYLDIPHOSPHAT	67
3.6.2	ENZYMMASSAYS MIT [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2,3-EPOXY-4-HYDROXY-3-METHYL-BUTYLDIPHOSPHAT ALS MÖGLICHES INTERMEDIAT DER ISPG-REAKTION	70
<b>4</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u></b>	<b>82</b>
4.1	ZUSAMMENFASSUNG	82
4.2	AUSBLICK	83
<b>5</b>	<b><u>LITERATURANGABEN</u></b>	<b>85</b>

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Chl	Chloramphenicol
COSY	correlated spectroscopy
CDP	Cytidindiphosphat
Ci	Curie
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
$\delta$	chemische Verschiebung
d	Dublett
dd	Doppeldublett
dest.	destilliert
DHAP	Dihydroxyaceton-3-phosphat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	decays per minutes (Zerfälle pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
Dxp	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinucleotid
FldA	Flavodoxin
FldR	Flavodoxin-(NAPD <sup>+</sup> )-Reduktase
FMN	Flavinmononucleotid
FPLC	fast proteine liquid chromatography
GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
<i>gcpE</i>	veraltet: Gen, welches für das IspG-Protein codiert
h	hour (Stunden)

---

HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	high performance / pressure liquid chromatography
Hz	Hertz
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IspC	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methylerythritol-Kinase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase
IspG	1-Hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-diphosphat-Synthase
IspH	1-Hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-diphosphat-Reduktase
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
Kan	Kanamycin
LB	Luria broth
m	Multipllett
M	molar
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorbition Ionisation-Time Of Flight
MBP	Maltosebindeprotein
min	Minute
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	1,4-Dihydronicotinamidadenindinucleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid-2'-phosphat
NADPH	1,4-Dihydronicotinamidadenindinucleotid-2'-phosphat
n. b.	nicht bestimmt
NMR	nuclear magnetic resonance
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyarcylamidgelelektrophorese
PEP	3-Phosphoenolpyruvat
ppb	parts per billion (1 : 10 <sup>-9</sup> )
ppm	parts per million (1 : 10 <sup>-6</sup> )
q	Quartett
R <sub>t</sub>	retention time (Retentionszeit)

---

---

RP	reversed phase (Umkehrphase)
s	Singulett
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
t	Triplett
Tet	Tetracyclin
TB	terrific broth
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethyldiamin
U	uniformly (vollständig)
U	unit (Enzymaktivität; Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt)
u. N.	unter der Nachweisgrenze
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	ultravioletter Bereich elektromagnetischer Strahlung
V	Volt
VIS	visible (sichtbarer Bereich elektromagnetischer Strahlung)
W	Watt
XylB	D-Xylulosekinase

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Isoprenoidbiosynthesewege in der Natur .....	6
Tabelle 2: Vorkommen der Isoprenoidbiosynthesegene in Humanpathogenen Mikroorganismen (Rohdich <i>et al.</i> 2005).....	7
Tabelle 3: Mögliche Fe/S-Cluster mit drei hochkonservierten Cysteinen in der Primärstruktur des Proteins und deren Vorkommen .....	11
Tabelle 4: Verwendete Antibiotika .....	16
Tabelle 5: Verwendete Enzyme .....	17
Tabelle 6: Verwendete Klone.....	19
Tabelle 7: $^{13}\text{C}$ -NMR Parameter von $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]^{\text{a}}$ -, $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]^{\text{b}}$ - und $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]^{\text{c}}$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat.....	24
Tabelle 8: Gradientensystem für eine Multospher 120 RP 18-AQ-3 Säule.....	26
Tabelle 9: Retentionszeit für die angegebenen Verbindungen bei der Verwendung einer Multospher 120 RP 18-AQ-3 Säule .....	27
Tabelle 10: Gradientensystem für eine Luna C5 5 $\mu$ 100A Säule.....	27
Tabelle 11: Retentionszeit für die angegebenen Verbindungen bei der Verwendung einer Luna C5 5 $\mu$ 100A Säule .....	27
Tabelle 12: Verwendete Proteinmarker.....	33
Tabelle 13: Spezifische Aktivitäten von rekombinantem IspG-Protein aus <i>E. coli</i> XL1-pAcycispG Zellextrakten unter verschiedenen Bedingungen .....	40
Tabelle 14: Die %tenuale Bildung von hydroxy aus dx aus verschiedene <i>E. coli</i> Stämmen..	42
Tabelle 15: $^{13}\text{C}$ -NMR Parameter für $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]^{\text{a}}$ - und $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]^{\text{b}}$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-diphosphat .....	48
Tabelle 16: Einfluss der Koexpression des <i>isc</i> -Operons codierten Proteine und Zusatz von rekombinantem FldA und FldR im anaeroben Assay auf die <i>in vitro</i> Aktivität von rekombinantem IspG-Protein .....	52
Tabelle 17: Reinigungsprotokoll von IspG-Protein aus <i>E. coli</i> .....	53
Tabelle 18: Relative spezifische Aktivität des IspG-Proteins in Abhängigkeit von verschiedene Elektronendonatoren .....	56
Tabelle 19: Relative IspG-Protein-Aktivität in Abhängigkeit zweiwertiger Metallionen. ....	57
Tabelle 20: Zusammenfassung der kinetischen Parameter des IspG-Proteins, über verschiedene Methoden ermittelt .....	60

---

Tabelle 21: Katalytische Aktivitäten, Eisen- und Schwefelgehalt der IspG-Cys-Punktmutanten-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein .....	61
Tabelle 22: Zusammenfassung aller in der Literatur beschriebenen Enzymaktivitäten (umgerechnet in $k_{cat}$ -Werte) verschiedener IspG-Proteine .....	65
Tabelle 23: $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR Parameter für $[1,2-^{13}\text{C}_2]2,3$ -Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat .....	70
Tabelle 24: Konkurrenzexperiment für die IspG-Reaktion mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]2,3$ -Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat und $[2,2'-^{13}\text{C}_2]2\text{C}$ -Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat.....	79

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einige Beispiele für biologisch bedeutende Terpene.....	1
Abbildung 2: Die Biosynthese der höheren Terpene ausgehend von IPP und DMAPP.....	2
Abbildung 3: Biosynthese von IPP und DMAPP ausgehend von Acetyl-CoA.....	3
Abbildung 4: Der Desoxyxylulosephosphatweg für die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP).....	5
Abbildung 5: Die hochkonservierte Aminosäureregion des IspG-Proteins aus verschiedenen Organismen.....	8
Abbildung 6: Vorgeschlagener Mechanismus für die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion in Analogie zur Vitamin K-Epoxychinon-Reduktase.....	8
Abbildung 7: Vorgeschlagener Mechanismus für die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion in Analogie zur Ribonukleotid-Reduktase.....	9
Abbildung 8: Beispiel für Fe/S-Cluster mit 3 hochkonservierten Cysteinen in der Primärstruktur des Proteins.....	10
Abbildung 9: Die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion.....	39
Abbildung 10: SDS-PAGE der aeroben IspG-Protein Reinigung.....	43
Abbildung 11: UV/VIS Spektrum von aerob gereinigtem IspG-Protein.....	44
Abbildung 12: Chromatogramm der enzymatischen Assays von [2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat inkubiert mit dem IspG Protein.....	45
Abbildung 13: Western Blot Analyse von Zellextrakten aus <i>E. coli</i> XL1 SK6600 Wildtyp Zellen (A) und <i>E. coli</i> XL1 SK6600ispG::neo <sup>R</sup> Zellen (B), entwickelt mit Hasen Antiserum gegen IspG Protein.....	46
Abbildung 14: NMR-Signale von [2,2'- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-und [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat. * Signal einer Verunreinigung.....	48
Abbildung 15: Vorgeschlagener Mechanismus für die durch das IspG Protein katalysierte Reaktion von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (5) zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat (6).....	49
Abbildung 16: Anaerobe Reinigung von MPB-IspG-Protein aus XL1-pMALispG-pACYCisc über eine Amylose-Säule;.....	52
Abbildung 17: UV/VIS Spektrum von anaerob gereinigtem IspG-Protein (6.8 mg/ml; 80 µM);.....	53

---

Abbildung 18: Relative IspG-Protein Aktivität in Abhängigkeit von Flavodoxin-(NADP <sup>+</sup> )-Reduktase (Fpr) (A) und Flavodoxin (FldA) (B).....	55
Abbildung 19: Elektronenflussdiagramm bei der durch das IspG-Protein katalysierten Reaktion .....	56
Abbildung 20: Die relative IspG-Protein-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Werte.....	58
Abbildung 21: Lineweaver-Burk-Darstellung der spezifischen IspG-Protein Raten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration,.....	59
Abbildung 22: Abnahme der NADPH-Konzentration während der IspG-Reaktion und Bestimmung der kinetischen Parameter von MPB-IspG-Proteins mit Hilfe des Biokin Programms (Kuzmic (1996))......	60
Abbildung 23: NMR-Assay mit IspG-Protein mit [2,2'- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]- bzw. [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat als Substrat. ....	63
Abbildung 24: Vorgeschlagerener Mechanismus für die durch das IspG Protein katalysierte Reaktion von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (5) zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat (6).....	67
Abbildung 25: [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat .....	68
Abbildung 26: <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat (Rote Signale).....	68
Abbildung 27: <sup>13</sup> C-NMR Spektrum von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat.....	69
Abbildung 28: Hypothetischer Verlauf der IspG-Reaktion ausgehend von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat .....	70
Abbildung 29: (A) <sup>13</sup> C-NMR Spektrum der Isomerisierung von [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat zu [3,4- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat katalysiert durch das IspG Protein aus <i>E. coli</i> XL1 pBSxispC-GfldAfpZellextrakt; (B) <sup>13</sup> C-NMR Spektrum von [1,3,4- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat.....	72
Abbildung 30: Titrationsexperiment zur IspG-Reaktion mit [2,2'- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat .....	73

---



---

Abbildung 31: Ausschnitt aus den $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erhalten aus enzymatischen Umsetzungen von A: $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat und B: $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit Hilfe des IspG-Proteins und photoreduziertem Deazaflavin. ....	75
Abbildung 32: Mögliches Reaktionsschema für die Bildung von $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-diphosphat ausgehend von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat.....	76
Abbildung 33: Ausschnitt aus dem $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Konkurrenzexperimentes mit gereinigtem IspG-Protein (vgl. 2.2.7.3) .....	78
Abbildung 34: Elektronenflussdiagramm bei der durch das IspG-Protein katalysierten Reaktion .....	83

# 1 Einleitung

## 1.1 Terpenbiosynthese

Terpene bilden eine der größten Naturstoffklassen mit über 30000 bekannten Verbindungen und übernehmen viele wichtige biologische Funktionen (Sacchettini und Poulter (1997)). Zu den Terpenen zählen z.B. Hormone, Vitamine, Pigmente und Lichtrezeptoren. Abbildung 1 zeigt eine kleine Auswahl wichtiger Terpene. Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen, sowie die Vorstufe von Steroidhormonen. Der Alkohol Phytol stellt die hydrophobe Seitenkette des grünen Blattfarbstoffes Chlorophyll dar (Alberts *et al.* (2004)).  $\beta$ -Carotin ist der orangefarbene Farbstoff des Eidotters, der Karotte und der Butter (Sharp (1990)), und ein Lichtrezeptor in grünen Pflanzen und vielen Bakterien, die Photosynthese betreiben (Wolfe (1993)). Taxol, ein giftiges Diterpen aus der pazifischen Eibe, wurde in den letzten Jahren zu einem der häufigsten Cytostatika für die Behandlung von malignen Tumoren (Skeel (1999)). Menachinon kommt bei Bakterien in den Zellmembranen vor und ist wichtig für den Elektronentransport. Beim Menschen ist es notwendig für die Blutgerinnung (Vitamin K) (Voet und Voet (1995)).

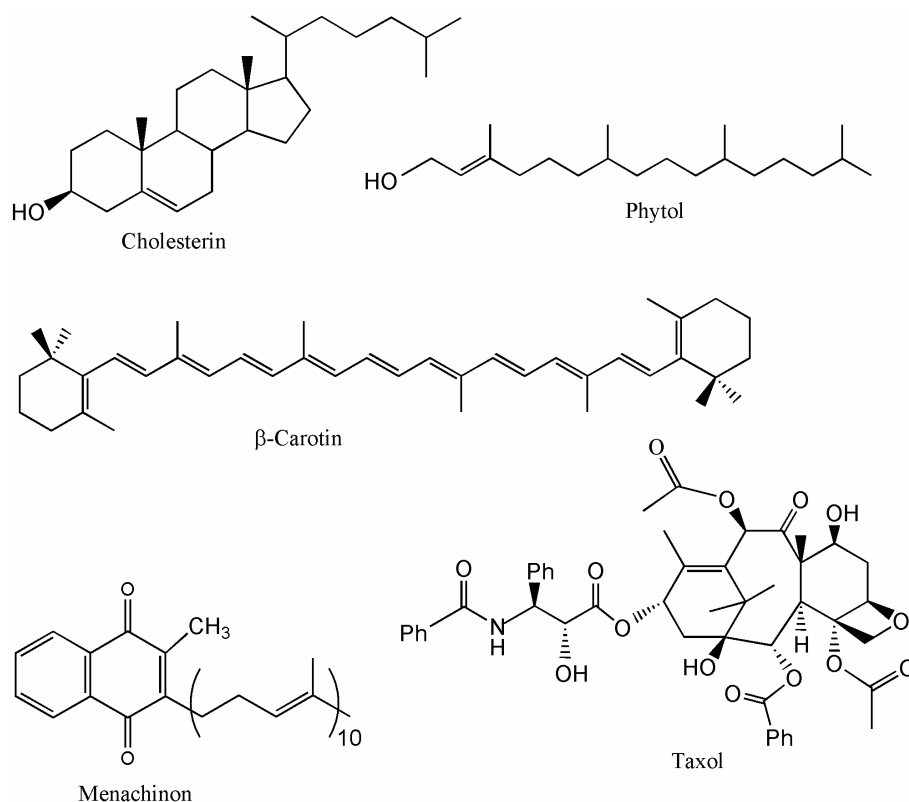
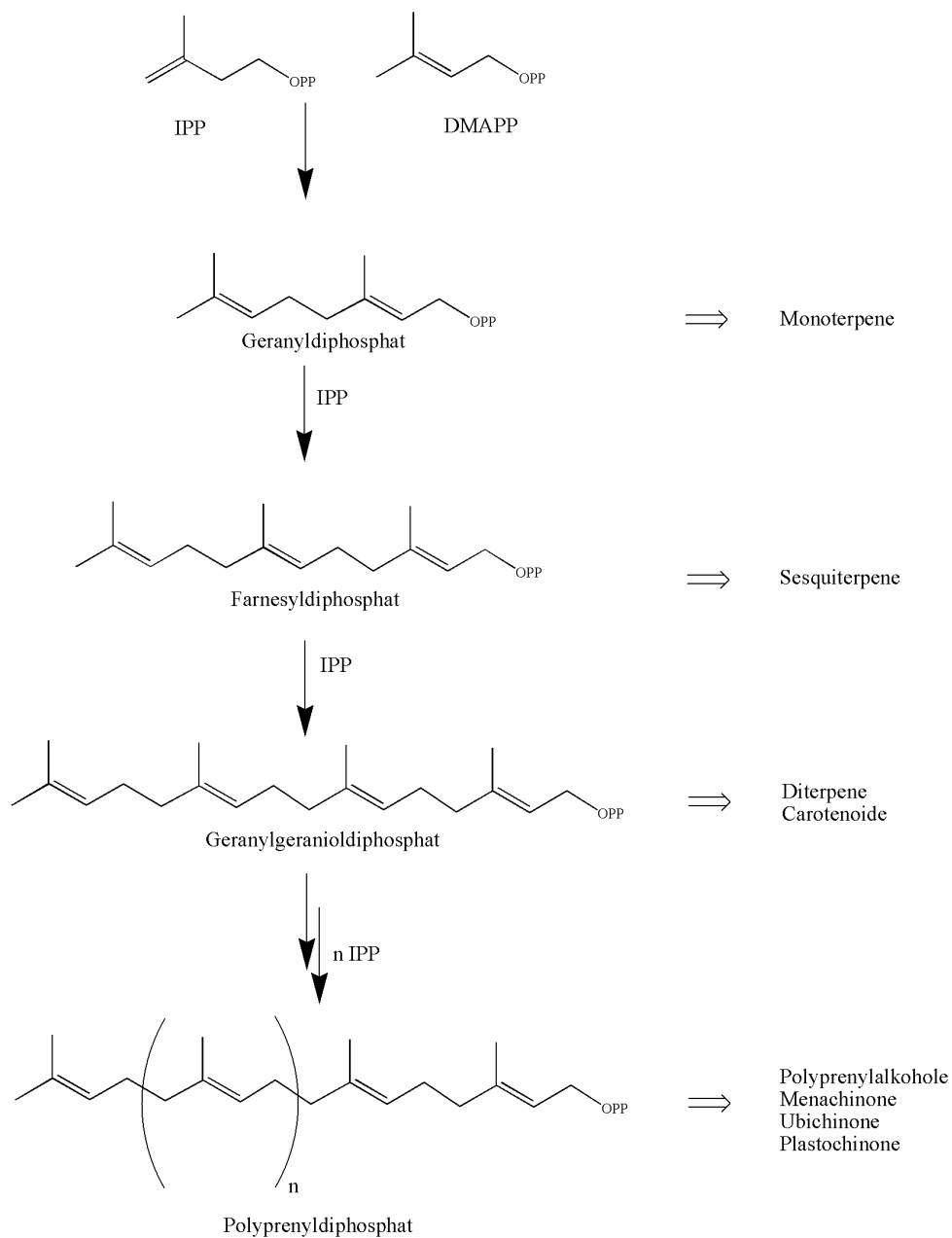


Abbildung 1: Einige Beispiele für biologisch bedeutende Terpene

Trotz der großen strukturellen Vielfalt der Terpene, beginnt ihre Biosynthese durch die Kondensation von Isopentenylidiphosphat (IPP) mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zu Geranyldiphosphat. Durch mehrmalige Addition von IPP wird aus Geranyldiphosphat zunächst Farnesyldiphosphat und anschließend Geranylgeranioldiphosphat gebildet (Abbildung 2). Ausgehend von diesem Grundgerüst wird durch Oxidationen, Umlagerungen und Cyclisierungen die große Vielfalt an Terpenen gebildet (Guo *et al.* (1994); Michal (1999); vgl. auch (Rohmer (1999))).



**Abbildung 2: Die Biosynthese der höheren Terpene ausgehend von IPP und DMAPP**

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Biosynthese der Terpenvorstufen IPP und DMAPP über Mevalonat erfolgt. Eine nähere Betrachtung dieses Weges erfolgt in Abschnitt 1.1.1. Es häuften sich aber Befunde, welche im Widerspruch dazu stehen. Zum einem konnte markiertes Mevalonat bzw. Acetat nicht oder nur mit sehr geringen Einbauraten in Carotine, Monoterpene und Diterpene eingebaut werden (Banthorpe *et al.* (1972)). Zum anderen hatte die Inhibierung der Mevalonsäurebildung keinen Effekt auf die Biosynthese von Chlorophyll und Carotinoiden, obwohl die Sterolbiosynthese unterdrückt werden konnte (Bach und Lichtenthaler (1982); Bach und Lichtenthaler (1983); Döll *et al.* (1984)). Durch Einbauversuche konnten Rohmer und Arigoni unabhängig voneinander zeigen, dass es einen zweiten Biosyntheseweg für IPP und DMAPP geben muss (Rohmer *et al.* (1993); Broers (1994); Schwarz (1994)). Dieser alternative Terpenisoprenoidweg, oder auch Desoxyxylulosephosphatweg genannt, ist in Abschnitt 1.1.2 erläutert.

### 1.1.1 Der Mevalonatweg

Die Aufklärung dieses Weges geht zurück auf die Arbeiten von Bloch, Lynen und Comforth (Spurgeon und Porter (1981)). Ausgehend von zwei Acetyl-CoA bildet sich durch eine Claisen-Kondensation und eine Aldoladdition aus einem weiteren Acetyl-CoA Molekül 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA. Dieses wird unter Verwendung von zwei Molekülen NADPH zu Mevalonsäure reduziert (vgl. Abbildung 3).

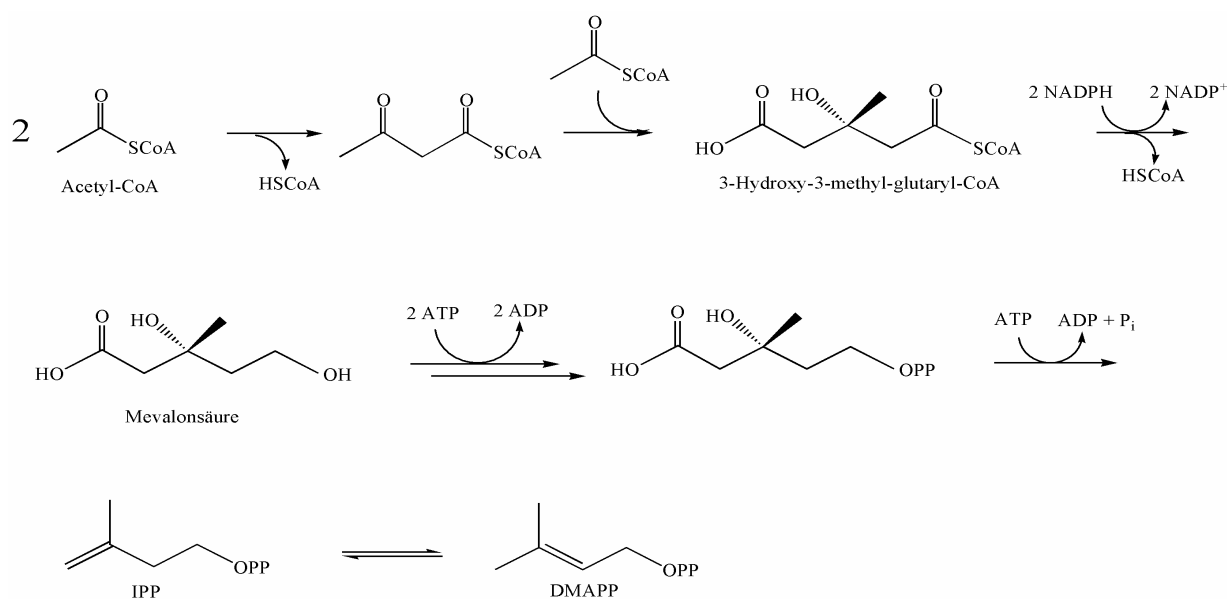


Abbildung 3: Biosynthese von IPP und DMAPP ausgehend von Acetyl-CoA

Die 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase, die diese Reaktion katalysiert, ist ein Angriffspunkt vieler Medikamente zur Regulierung des Cholesterinspiegels (Stancu und Sima (2001)). Die Mevalonsäure wird anschließend mit ATP zum Diphosphat überführt, aus dem dann unter weiterem ATP-Verbrauch und CO<sub>2</sub>-Abspaltung Isopentenylidiphosphat (IPP) entsteht. Das IPP steht im Gleichgewicht mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Diese Reaktion wird von der IPP-Isomerase katalysiert, von der zwei verschiedene Typen, IdiI und IdiII, isoliert wurden (Poulter und Rilling (1981); Koyama und Ogura (1999); Kaneda *et al.* (2001)). Im Gegensatz zum Desoxyxylulosephosphatweg ist das Vorhandensein einer IPP-Isomerase beim Mevalonatweg essentiell. Eine Zusammenstellung über das Vorkommen beider IPP-Isomerasen liefert Laupitz *et al.* (2004).

### 1.1.2 Der Desoxyxylulosephosphatweg

Der Desoxyxylulosephosphatweg (vgl. Abbildung 4) beginnt mit der Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat und liefert unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (**1**), katalysiert durch das Dxs Protein (Sprenger *et al.* (1997); Lois *et al.* (1998)). 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat stellt auch eine Vorstufe für die Biosynthese von Thiamin und Pyridoxal dar (White (1978); David *et al.* (1981); Hill *et al.* (1989)). In einem zweiten Schritt katalysiert das IspC-Protein die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat (**2**) aus 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (**1**) (Takahashi *et al.* (1998)). Bei dieser Reaktion wird zunächst über eine Aldolreaktion ein verzweigtes Kohlenstoffgerüst gebildet, welches anschließend in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat (**2**) reduziert wird (Koppisch *et al.* (2002)). Durch die Übertragung einer Phosphocytidyl-Gruppe entsteht 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**3**). Dieser Schritt wird durch das IspD-Protein (Rohdich *et al.* (1999)) katalysiert. Durch eine ATP-abhängige Phosphorylierung der 2-OH-Gruppe durch das IspE-Protein (Lüttgen *et al.* (2000)) wird im Folgenden 2-Phospho-4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (**4**) gebildet. Im Anschluss wird unter Abspaltung von CMP das cyclische 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**5**) gebildet. Diese Reaktion wird durch das IspF-Protein (Herz *et al.* (2000); Takagi *et al.* (2000)) katalysiert. Die dadurch bedingte Aktivierung der 2-OH-Gruppe ermöglicht anschließend die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (**6**) katalysierte durch das IspG-Protein (Hecht *et al.* (2001)). Der letzte Schritt des Desoxyxylulosephosphatweges ist die simultane Reduktion von 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-

butenyl-4-diphosphat zu IPP (7) und DMAPP (8) katalysiert durch das IspH-Protein (Rohdich *et al.* (2002)).

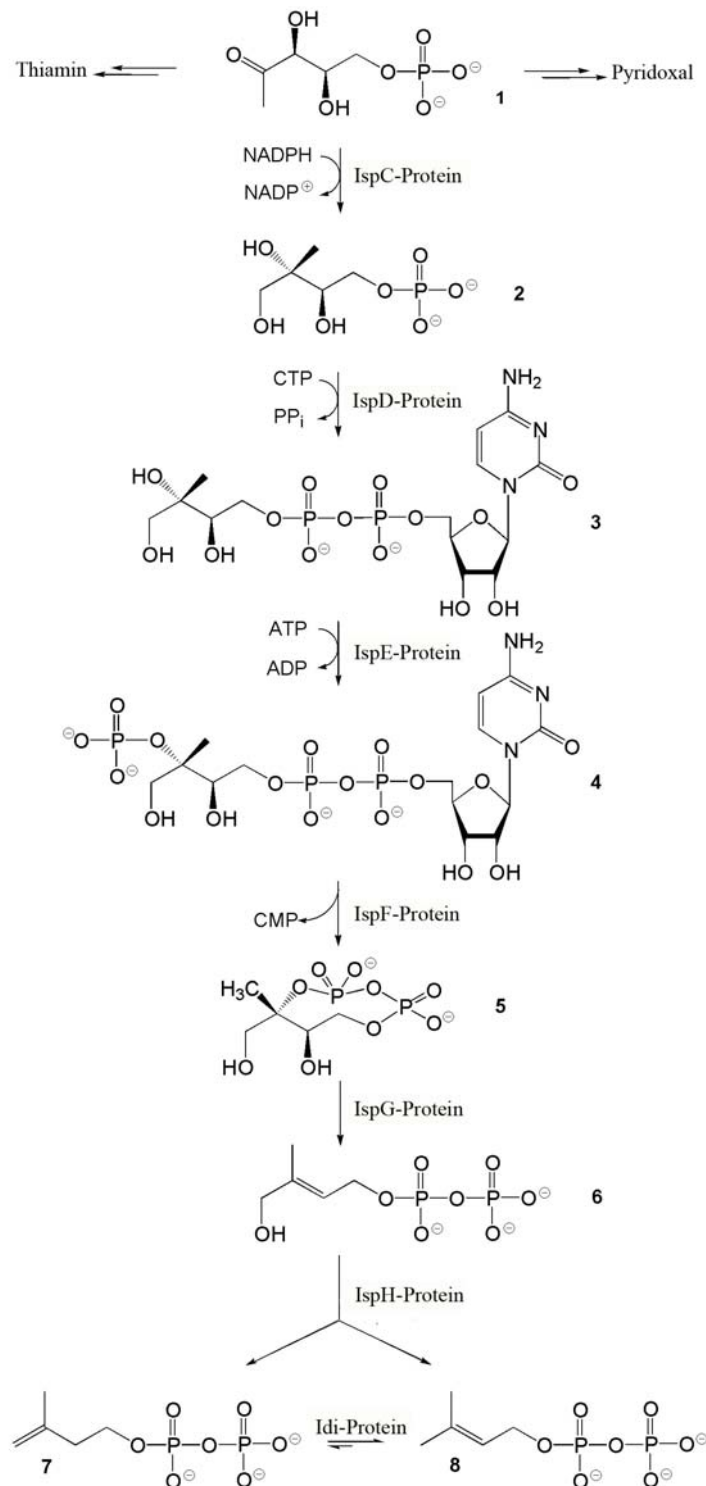


Abbildung 4: Der Desoxyxylulosephosphatweg für die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)

Die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Synthase (IspG-Protein) wird in Abschnitt 1.3 näher beschrieben.

## 1.2 Verteilung der beiden Isoprenoidbiosynthesewege in der Natur

Die grobe Verteilung der beiden Biosynthesewege für die Terpenvorstufen IPP und DMAPP ist in Tabelle 1 dargestellt (Eisenreich *et al.* (2001)).

Organismen	Mevalonatweg		Desoxyxylulosephosphatweg
Tiere	+		-
Protozoen	+	oder	+
Pflanzen	+ (Cytosol)	und	+ (Plastiden)
Algen	+	und / oder	+
Pilze	+		-
Archaea	+		-
Bakterien	+	und / oder	+

**Tabelle 1: Isoprenoidbiosynthesewege in der Natur**

Da eine Vielzahl für den Menschen pathogene Mikroorganismen IPP und DMAPP über den DXP-Weg synthetisieren, eignet sich dieser Weg u. a. für die Entwicklung neuer Antibiotika. Auch der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* benützt diesen Weg zur Synthese von Terpenen (Jomaa *et al.* (1999); Rohdich *et al.* (2001)) und ist es somit möglich an Hand dieses Biosyntheseweges Antimalariamittel zu entwickeln. Fosmidomycin inhibiert das IspC Protein (vgl. 1.1.2) und es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit *Plasmodium vinckei* infiziert wurden durch Applikation dieser Substanz wieder geheilt werden können (Jomaa *et al.* (1999)).

Mikroorganismus	DXP	MEV	IPP Isomerase	Krankheit
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	Typ II	Wundinfektion
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	-	-	Meningitis
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	+	-	Typ I	Diphtherie
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	Typ I	Listeriose
<i>Bacillus anthracis</i>	+	-	Typ II	Milzbrand

<i>Mikroorganismus</i>	<i>DXP</i>	<i>MEV</i>	<i>IPP Isomerase</i>	<i>Krankheit</i>
<i>Clostridium tetani</i>	+	-	-	Tetanus
<i>Escherichia coli</i>	+	-	Typ I	Darmkatarrh
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	Typ I	Typhus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	-	Typ I	Tuberkulose
<i>Helicobacter pylori</i>	+	-	-	Magengeschwür

**Tabelle 2: Vorkommen der Isoprenoidbiosynthesegene in Humanpathogenen Mikroorganismen (Rohdich *et al.* (2005))**

In Tabelle 2 sind einige humanpathogene Mikroorganismen mit den durch sie hervorgerufenen Krankheiten aufgelistet. Hierbei steht die Abkürzung DXP für die Expression der Gene des Desoxyxylulosephosphatweges, die Abkürzung MEV steht für die Expression der Gene des Mevalonatweges. Außerdem ist angegeben, welchen Typ der IPP-Isomerase die Mikroorganismen besitzen (Rohdich *et al.* (2005)).

### ***1.3 Die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase (IspG-Protein)***

Die Reaktion vom 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zum 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat konnte durch *in vivo*-Einbauversuch an rekombinanten *E. coli* Stämmen dem IspG-Protein zugeschrieben werden (Hecht *et al.* (2001)). Abbildung 5 zeigt die hochkonservierte Aminosäureregion der 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase verschiedener Organismen. Hierbei ist klar zu erkennen, dass die Aminosäuresequenz drei hochkonservierte Cysteine besitzt. Somit liegt der Schluss nahe, dass diese Cysteine für die Katalyse-Funktion essentiell sind.

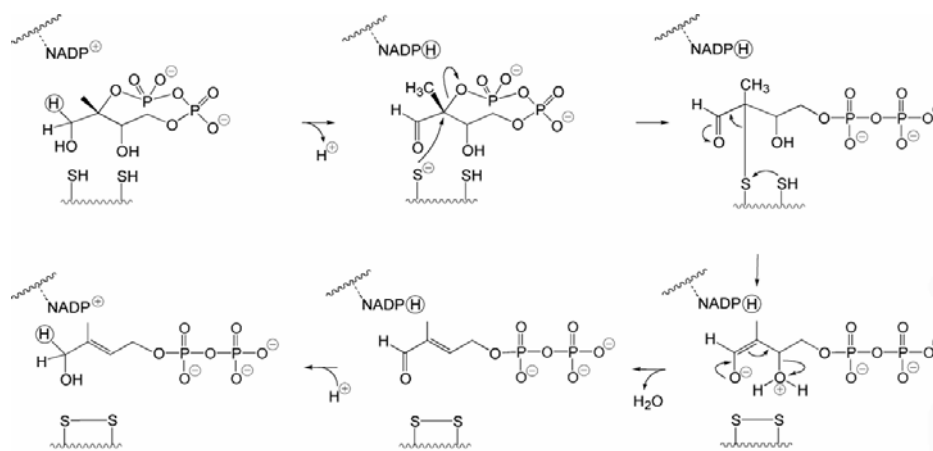
In Hecht *et al.* (2001) wurden zwei mögliche Mechanismen für diese mechanistisch komplexe Reaktion vorgeschlagen (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7). Beide benötigen für die Katalyse mindestens zwei Cysteinreste. Der Mechanismus in Abbildung 6 zeigt einen Reaktionsverlauf, der dem der Vitamin K-Epoxychinon-Reduktase ähnelt. Die Biosynthese von Vitamin K ist, wie die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion, eine biochemisch ausgefallene Reaktion (Silverman und Nandi (1988)). Unter Übertragung zweier Elektronen erfolgt hierbei ebenfalls eine Reduktion zur Doppelbindung.



<i>Arabidopsis thaliana</i>	: KT--EYVSCFSCGRTLFDFLQEI SAEIREKTS HLP-GVSI AIMGCVVNGPGE MADADFG
<i>Synechocystis</i> sp.	: KTMVEYVACFSCGRTLFENLEDV LHEVREATKH LT-GLDI AVMGCVVNGPGE MADADYG
<i>Chlamydia trachomatis</i>	: SVTV EYVSCFPCGGR TLFDFLLAVSQRIRERTQH LPGG LKIAVMGCVVNGPGE MADADFG
<i>Plasmodium falciparum</i>	: KT--DYIACFSCGRTLFENIQETT KKTIMKLTGH LK-GVKI AVMGCVVNGI GEMADAHFG
<i>Helicobacter pylori</i>	: KEGINWISCFPTCGRI EANLVDMAIKVEKR ILSHK TPLDISVMGCVVNAI GEAKHADMA
<i>Campylobacter jejuni</i>	: KSGVNIISCFPTCGRI QSDLLS AIKIVEEKT KHT-EP LNISVMGCVVNAI GEAKGADVA
<i>Haemophilus influenzae</i>	: SRGINFIACPTCSRQEF DVI GTVNALEQRLED IITPMDVSI IGCVVNGPGEALVSDLG
<i>Pasteurella multocida</i>	: SRGINFIACPTCSRQEF DVI GTVNALEQRLED IITPMDVSI IGCVVNGPGEALVSDLG
<i>Escherichia coli</i>	: SRGINFIACPTCSRQEF DVI GTVNALEQRLED IITPMDVSI IGCVVNGPGEALVSTLG
<i>Vibrio cholerae</i>	: SRGINFIACFSCSRQEF DVI GTVNALEQRLED VLT PMDVSI IGCVVNGPGEAEVSHLG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	: SRGINFIACFSCSRQEF DVVKT MNELEGRLED L LVPMDVA VI GCVVNGPGEAKEAHVG
<i>Buchnera</i> sp.	: ARGINFIACPTCSRQEF DVINTVNQLEKNLED ISTPIDVSI IGCVVNGI GESKIATLG
<i>Caulobacter crescentus</i>	: HRGVNIIACFSCARQENVIKTVEALEERLAH ISTPMSLSI IGCVVNGPGEALMTDVG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	: PRSLEIVSCFSCGRAQVDVYTLANEV TAGLDGLDVPLRVAVMGCVVNGPGEAREADLG
<i>Streptomyces coelicolor</i>	: QRGLEIVSCFSCGRAQVDVYKLAEEV TAGLEGMEVPLRVAVMGCVVNGPGEAREADLG
<i>Aquifex aeolicus</i>	: RRGV EIVACFPTCGRI EVDLPKV VKEVQEKLSGVK TPLKVAVMGCVVNAI GEAREADIG
<i>Bacillus subtilis</i>	: SNAATLISCFPTCGRI EIDLISIANEVEEY I SKIKAPIKVAV I GCAVNGPGEAREADIG
<i>Thermotoga maritima</i>	: E-GVEVIACFPTCGRAEIDVENMAKMI EENFFHVQKRLKI AVMGCVVNGI GEGKDADLG
<i>Treponema pallidum</i>	: AGGVRLVSCPRCGRI GF DVHAFVRRWQKELFSLKKDITVAVMGCVVNGPGE GKHADLG

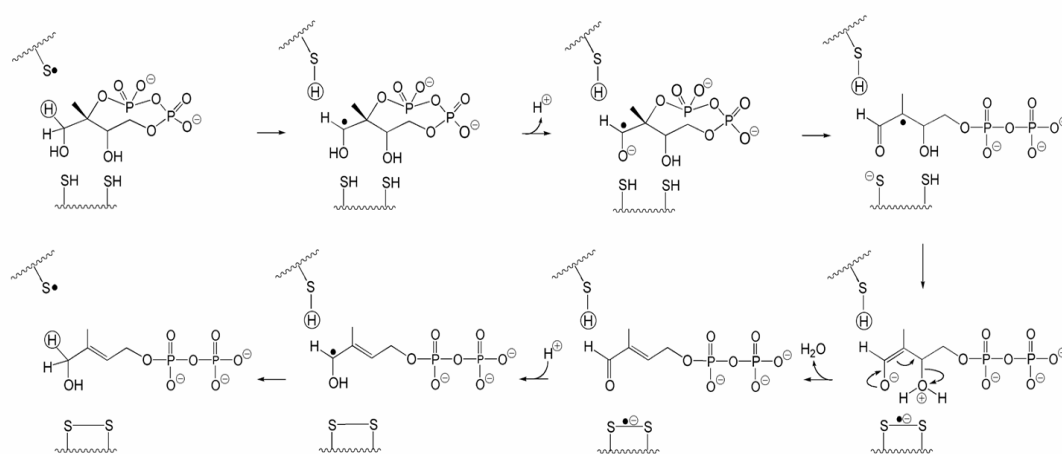
**Abbildung 5: Die hochkonservierte Aminosäureregion des IspG-Proteins aus verschiedenen Organismen. Identische Aminosäuren sind grün, ähnliche gelb dargestellt. Es sind nur die Aminosäuren, die in mindestens 11 von 19 der Sequenzen konserviert sind, farbig dargestellt. Die konservierten Cysteine (Aminosäurereste 270, 273 und 306 im *E. coli* Protein) sind rot dargestellt.**

Im Folgenden werden diese zwei für IspG-Protein möglichen Reaktionsmechanismen diskutiert. Unter Abgabe eines Hydrid-Ions von Position 1 an dem möglichen Cofaktor NADP<sup>+</sup> wird die Hydroxyl-Gruppe zum Aldehyd oxidiert. Die Diphosphatgruppe wird an Position 2 durch den nukleophilen Angriff eines Thiolat-Ions abgespalten. Hieraus bilden sich gleichzeitig ein Disulfid und ein Enolat-Ion. Die  $\beta$ -Eliminierung von Wasser liefert das 1-Oxo-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Das Hydrid-Ion, welches im ersten Schritt an NADPH abgegeben wurde, wird wieder auf Position 1 übertragen, um die Aldehydgruppe zu reduzieren (Hecht (2002)).



**Abbildung 6: Vorgeschlagener Mechanismus für die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion in Analogie zur Vitamin K-Epoxychinon-Reduktase**

Eine Alternative zu dem eben vorgestellten ionischen Mechanismus wäre ein radikalischer Mechanismus, welcher der Ribonukleotid-Reduktase ähnlich ist (Licht und Stubbe (1999)). Hierbei wird das dritte hochkonservierte Cystein benötigt (vgl. Abbildung 6). Das dritte Cystein liegt als Radikal vor und entfernt aus dem 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat eines der H-Atome an Position 1 radikalisch und bildet eine SH Gruppe. Die Umwandlung des Radikals und die dadurch bedingte Wasserabspaltung führt auch zur Bildung von 1-Oxo-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat, welches unter Verwendung des entfernten Wasserstoffradikals wieder reduziert wird.



**Abbildung 7: Vorgeschlagener Mechanismus für die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion in Analogie zur Ribonukleotid-Reduktase.**

Die drei hochkonservierten Cysteine könnten aber auch einen Eisen/Schwefel-Cluster koordinieren. Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des IspG-Proteins mit einer Ferredoxin- und Aconitase-Signatur besteht. Beide Enzyme besitzen einen [4Fe-4S]Cluster (Wolff *et al.* (2002)). Da die Klasse der Eisen/Schwefel-Cluster enthaltenden Proteine sehr groß ist, wird auf diese und die für das IspG-Protein relevant erscheinenden Eisen/Schwefel-Cluster in Abschnitt 1.4 separat eingegangen.

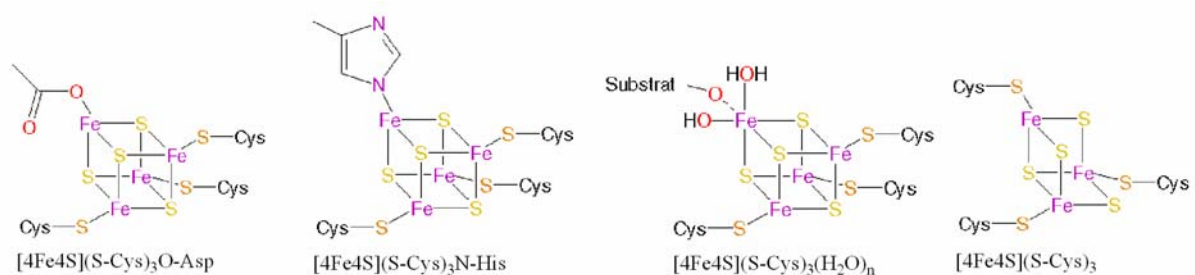
### 1.4 Eisen/Schwefel-Cluster

Eisen/Schwefel-Proteine waren wahrscheinlich einer der ersten Katalysatoren, mit denen die Natur arbeitete (Huber und Wächtershäuser (1998)). Sie sind in vielen biochemischen

Elektronübertragungsreaktionen, wie Photosynthese,  $N_2$ -Fixierung und Atmung beteiligt (Kaim und Schwederski (2004)). Sie können aber auch reine Strukturfunktionen besitzen und Reaktionen katalysieren, bei denen keine Elektronenübertragung stattfindet (Kaim und Schwederski (2004)). Die Fe/S-Proteine besitzen alle einen Eisenkern, der meist über Cysteinliganden koordiniert ist. Die einfachsten Fe/S-Proteine sind Rubredoxine. Diese besitzen ein Eisenatom, welches durch 4 Cysteinliganden koordiniert wird. Fe/S-Proteine mit [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- und [4Fe-4S]-Clustern besitzen zusätzlich noch freien säure-labilen Schwefel. Die Metallatome sind meistens tetraedrisch von vier Schwefelliganden umgeben (Kaim und Schwederski (2004)).

Die Vorhersage der Art des Fe/S-Cluster an Hand der Aminosäuresequenz ist nur schwer möglich, es gibt aber eigene repräsentative Beispiele (Kaim und Schwederski (2004)). Darunter befinden sich unter anderem die 2[4Fe-4S] Ferredoxine, welche folgendes Muster besitzen:  $(CXXCXXCXXXCP)_2$ . Wobei C für Cystein, X für eine beliebige Aminosäure und P für Prolin steht. Hierbei muss beachtet werden, dass bei anderen Proteinen die Abstände zwischen den Cysteinen variieren können und dass das Prolin und/oder das vierte Cystein nicht immer obligatorisch sind (Cammack (1992)).

In Abbildung 8 sind die bekannten Fe/S-Cluster, welche durch drei Cysteinreste koordiniert werden, gezeigt. Sowohl [4Fe-4S]-Cluster als auch [3Fe-4S]-Cluster sind möglich. Im Falle eines [4Fe-4S]-Clusters wird das vierte Eisenatom durch eine weitere Aminosäure (Asp oder His) oder durch Wasser bzw. das Substrat koordiniert.



**Abbildung 8: Beispiel für Fe/S-Cluster mit 3 hochkonservierten Cysteinen in der Primärstruktur des Proteins**

In Tabelle 3 sind die Fe/S-Cluster aus Abbildung 8 mit ihren Oxidationszuständen sowie Beispielenzymen aufgelistet, folgenden werden deren Katalyse-Funktionen näher beschrieben.

<i>Fe/S Cluster</i>	<i>Oxidations-Zustände</i>	<i>Beispielenzyme</i>	<i>Referenz</i>
[4Fe4S](S-Cys) <sub>3</sub> O-Asp	[4Fe4S] <sup>+</sup> ; [4Fe4S] <sup>2+</sup>	Bakterielle Ferredoxine	Promise (2005)
[4Fe4S](S-Cys) <sub>3</sub> N-His	[4Fe4S] <sup>+</sup> ; [4Fe4S] <sup>2+</sup>	Ni-Fe-Hydrogenasen, Fe-Hydrogenasen	Promise (2005)
[4Fe4S](S-Cys) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	[4Fe4S] <sup>+</sup> ; [4Fe4S] <sup>2+</sup> ; [4Fe4S] <sup>3+</sup>	Aconitase, Ferredoxine, HiPIP	Promise (2005), Kaim & Schwederski (2004)
[3Fe4S](S-Cys) <sub>3</sub>	[3Fe4S] <sup>2-</sup> ; [3Fe4S] <sup>0</sup> ; [3Fe4S] <sup>+</sup>	Aconitase, Bakterielle Ferredoxine, Ni-Fe- Hydrogenasen	Promise (2005)

**Tabelle 3: Mögliche Fe/S-Cluster mit drei hochkonservierten Cysteinen in der Primärstruktur des Proteins und deren Vorkommen**

Thioredoxin, welches Ribonukleotiddiphosphate zu ihren Desoxyanalogen reduziert, wird von dem bakteriellen Ferredoxin wieder regeneriert (Lehninger (1985)). Nickel-Eisen- und Eisen-Hydrogenasen sind Enzyme, welche die Oxidation oder Produktion von Wasserstoff mit Hilfe einer Reihe von Elektronenacceptoren und -donatoren katalysieren (Cammack (1992)). Die Aconitase katalysiert die Isomerisierung der Zitronensäure zur *iso*-Zitronensäure über *cis*-Aconitsäure als Zwischenstufe. Im Gleichgewicht sind alle drei Säuren vorhanden (Lehninger (1985)) Die Aconitase reguliert außerdem den Eisengehalt in der Zelle (vgl. Alberts *et al.* (2004) und Cammack (1992)). Von [4Fe-4S]-Clustern sind zwei verschiedene Typen bekannt. Zum einem der Ferredoxintyp, welcher zwischen [4Fe-4S]<sup>2+</sup> und [4Fe-4S]<sup>+</sup> pendelt. Dieser ist z.B. bei der N<sub>2</sub>-Fixierung aus der Luft beteiligt (Lehninger (1985)). Im Photosystem I von Pflanzen konnten drei Ferredoxintyp Fe/S-Cluster identifiziert werden. Diese transportieren die Elektronen vom Chlorophyll auf Ferredoxin und schließlich auf NADP<sup>+</sup>. Diese Fe/S-Zentren besitzen ein sehr negatives Potential (bis -705 mV) (Cammack (1992)). Der andere Typ wird von den so genannten *High Potential Iron Sulfur Proteins* (HiPIP) repräsentiert, welche im Gegensatz zu allen anderen Fe/S-Proteinen ein positives Elektronenpotential besitzen (bis 450 mV). Der Oxidationszustand der HiPIPs variiert zwischen [4Fe-4S]<sup>2+</sup> und [4Fe-4S]<sup>3+</sup> (Cammack (1992); Kaim und Schwederski (2004)). In der bakteriellen Photosynthese sind

Fe/S-Cluster vom HiPIP-Typ beim Elektronentransport beteiligt. Genauere Funktionen sind noch nicht bekannt (vgl. Cammack (1992) und (Dilg (2001))).

### **1.5 Ziel der Arbeit**

Zu Beginn der Dissertation waren die Einzelschritte des alternativen Terpenisoprenoidbiosyntheseweges *in vivo* bekannt (Rohdich *et al.* (2002)). Auch die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat aus 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat war durch *in vivo* Einbauversuche aufgeklärt. Das vom *ispG* Gen kodierte Protein 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat Synthase vollzieht den komplizierten Übergang vom cyclischen Diphosphat zum 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (Hecht *et al.* (2001)). Es war damals schon bekannt, dass eine Reinigung von IspG-Protein (His<sub>6</sub>-Tag) zu inaktivem und unlöslichem Protein führt (unveröffentlichte Ergebnisse am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie).

Das Ziel dieser Arbeit ist es die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Synthase löslich und in aktiver Form *in vitro* rekombinant zu exprimieren und zu reinigen. Daran schließt sich die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften des IspG-Proteins und die Untersuchung des Mechanismus der katalysierten Reaktion an.

Außerdem soll eine *in vitro* Synthese für <sup>13</sup>C- und / oder <sup>2</sup>H-markiertes 1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat entwickelt werden

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden bei kommerziellen Anbietern, insbesondere Fluka (Neu-Ulm), Sigma-Aldrich (Steinheim), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Biomol (Hamburg) gekauft.

##### 2.1.1.1 Stabilisotop-Verbindungen:

D <sub>2</sub> O (99,9 atom-% <sup>2</sup> H)	ISOTEC Inc. Sigma-Aldrich (Steinheim)
CDCl <sub>3</sub> (99,8 atom-% <sup>2</sup> H)	Cortec (Paris, Frankreich)
[U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]D-Glucose	Omicron (South Bend, Indiana, USA)
Na[2,3- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]pyruvat	Eurisotop (Saint Aubin, Frankreich)
Na[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]acetat	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)

##### 2.1.1.2 Radioaktive Verbindung:

Na[2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]pyruvat	PerkinElmer LifeScience, Inc. (Boston, USA)
---	---

##### 2.1.1.3 Reagenzien und Puffer:

Alle Puffer wurden in destilliertem Wasser angefertigt, sterilfiltriert und entgast. Die anaeroben Puffer für die Glove Box wurden zusätzlich 30 min gekocht und unter einer Ar Atmosphäre (Reinheit 4.6, Air Liquide, Düsseldorf) abgekühlt.

#### Analytische HPLC

Eluent A	10 mM TBAS (pH 6.0)
Eluent B	10 mM TBAS (pH 6.0)
	70 % Methanol

### **Präparative HPLC**

Eluent 100 mM HCOONH<sub>4</sub>  
40 % Methanol

### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Bradford Reagenz 0.1 g Coomassie Brilliant Blau R-250  
10 mL Ethanol  
25 mL 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Lösung  
mit destilliertem Wasser auf 250 mL aufgefüllt und  
filtriert. Die Kalibrierkurve wurde mit BSA  
erstellt.

### **Proteinreinigung über eine Amylose Säule**

Säulenmaterial Amylose (Pharmacia, Freiburg)  
V = 60 mL  
Auftragspuffer 0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0)  
0.5 M NaCl  
Elutionspuffer 0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0)  
0.5 M NaCl  
10 mM Maltose  
Dialysepuffer 0.1 M TRIS/HCl

### **Proteinreinigung über eine Ni-Chelating Sepharose Säule**

Säulenmaterial Ni-Chelating Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg)  
V = 30 mL  
Auftragspuffer 0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0)  
0.5M NaCl  
10 mM Imidazol  
Elutionspuffer 0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0)  
0.5M NaCl  
0.5 M Imidazol  
Dialysepuffer 0.1 M TRIS/HCl

**Saline**

Saline 0.9 % (w/v) NaCl in dest. Wasser

**SDS-PAGE**

Trenngel (8 %) 2 mL Acrylamid-Lösung  
2.5 mL Trennpuffer  
5.5 mL destilliertem Wasser  
50 µL 10 % APS  
5 µL TEMED

Sammelgel (4 %) 0.5 ml Acrylamid-Lösung  
2.5 mL Sammelpuffer  
2 mL destilliertem Wasser  
50 µL 10 % APS  
5 µL TEMED

Acrylamid-Lösung 149 g Acrylamid  
6 g N,N'-Methylenbisacrylamid  
auf 500 mL mit entgastem destilliertem Wasser  
auffüllen

Trennpuffer 1,5 M TRIS/HCl (pH 8.3)  
0.4 % SDS

Sammelpuffer 0.5 M TRIS/HCl (pH 6.8)  
0.2 % SDS

Elektrophoresepuffer 25 mM TRIS/HCl (pH 8.3)  
192 mM Glycin  
0.1 % SDS

Färbelösung 2.5 g Coomassie Brilliant Blau R-250  
454 mL Methanol  
454 mL Wasser  
92 mL Eisessig

Entfärber 1 50 % Methanol  
10 % Eisessig  
40 % Wasser

Entfärber 2 30 % Methanol



10 % Eisessig

60 % Wasser

### 2.1.2 Kulturmedien

LB- Medium (Luria Bertani)

10 g Casein Hydrolysat

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

wurden in einem Liter Wasser gelöst.

TB-Medium (Terrific Broth)

12 g Casein Hydrolysat

24 g Hefeextrakt

4 mL Glycerin

2.31 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

12.54 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

wurden in einem Liter 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. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben. In Tabelle 4 sind die verwendeten Antibiotika, deren Massenkonzentration und deren Einsatzplasmid aufgelistet.

<i>Antibiotika</i>	<i>Massenkonzentration</i>	<i>Plasmid</i>	<i>Referenz, Quelle</i>
Ampicilin (amp)	180 mg/L	pMAL, pQE30, pNCO113	New England Biolabs GmbH (Schwalbach), Qiagen GmbH (Hilden), Stüber <i>et al.</i> (1990)
Chloramphenicol (chl)	25 mg/L	pACYC184	New England Biolabs GmbH (Schwalbach)
Kanamycin (kan)	50 mg/L	pREB4	Zamenhof und Villarejo (1972)
Tetracyclin (tet)	20 mg/L	XL-1 blue	Bullock (1987)

**Tabelle 4: Verwendete Antibiotika**

### 2.1.3 Enzyme

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgelistet.

<i>Enzym</i>	<i>EC- Nummer</i>	<i>Organismus</i>	<i>Quelle, Referenz</i>
HisC-Flavodoxin	1.19.6.1	<i>E. coli</i>	Rohdich <i>et al.</i> (2003)
HisC-Flavodoxin(NAPD+)reduktase	1.18.1.2	<i>E. coli</i>	Rohdich <i>et al.</i> (2003)
IspG-Protein	-	<i>E. coli</i>	Diese Doktorarbeit
IspG-Protein C270S	-	<i>E. coli</i>	Diese Doktorarbeit
IspG-Protein C273S	-	<i>E. coli</i>	Diese Doktorarbeit
IspG-Protein C306S	-	<i>E. coli</i>	Diese Doktorarbeit
Hexokinase	2.7.1.1	Hefe	Sigma-Aldrich
Glucose-6-phosphatisomerase	1.1.1.49	<i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich
Phosphofruktokinase	2.7.1.11	<i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, S.Hecht
Aldolase	4.1.2.13	<i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, S.Hecht
Triosephosphatisomerase	5.3.1.1	<i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, S.Hecht
Pyruvatkinase	2.7.1.40	<i>E. coli</i>	Fluka
Glucosedehydrogenase	1.1.1.47	<i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, S.Hecht
1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase	2.2.1.7	<i>B. subtilis</i>	Wungsintaweeikul (2001)
2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase	1.1.1.267	<i>E. coli</i>	Wungsintaweeikul (2001)
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase	2.7.7.60	<i>E. coli</i>	Herz (2000)
2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase	4.6.1.12	<i>E. coli</i>	Herz (2000)

**Tabelle 5: Verwendete Enzyme**

Die aufgeführten käuflich erwerbbaeren Enzyme wurden entweder bei kommerziellen Anbietern, wie Fluka (Neu-Ulm) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) erworben. Die nicht käuflich erwerbbaeren Enzyme wurden an unserem Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie hergestellt.

### 2.1.4 Klone

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Klone aufgelistet. Die Klone sind zum Teil noch nach alter Nomenklatur benannt. Das Gen *ispG* würde anfänglich mit *gcpE* bezeichnet.

<i>Klon</i>	<i>Expremierte(s) Enzym(e)</i>	<i>Bezugsquelle</i>
XL1-pACYCgcpE	IspG aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1-SK6600ispG::neo <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> Stamm mit chromosomaler <i>ispG</i> Knock-out Mutante	Rohdich <i>et al.</i> (2003)
XL1-pMALgcpE	IspG-Protein aus <i>E. coli</i>	Rohdich <i>et al.</i> (2003) / T. Gräwert
XL1-pMALispG-pACYCisc	IspG-Protein und die Proteine des <i>isc</i> -Operons aus <i>E. coli</i>	T. Gräwert
XL1-pNCOispG HisC	His <sub>6</sub> -IspG aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1-pNCOispG HisC-pACYCisc	His <sub>6</sub> -IspG und die Proteine des <i>isc</i> -Operons aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1-pBSscyclo	XylB, Dxs, IspC, IspD, IspE, IspF aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1-pACYCfprfldA-pBSscyclogcpE	XylB, Dxs, IspC, IspD, IspE, IspF, IspG, FldR und FldA, aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1pBSxispC-GfldAfpr	XylB, Dxs, IspC, IspD, IspE, IspF, IspG, FldR und FldA, aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1-pQE30fpr	His <sub>6</sub> -FldR aus <i>E. coli</i>	Rohdich <i>et al.</i> (2003)
M15-pREB-pQE30fpr	His <sub>6</sub> -FldR aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1-pQE30fldA	His <sub>6</sub> -FldA aus <i>E. coli</i>	Rohdich <i>et al.</i> (2003)
XL1-pACYCfldAfpr	FldA und FldR aus <i>E. coli</i>	F. Rohdich
XL1-pMALispGC306S-pACYCiscS	IspG-ProteinC306S und <i>isc</i> -Operon aus <i>E. coli</i>	J. Kaiser / T. Gräwert
XL1-pMALispGC273S-pACYCiscS	IspG-ProteinC273S und <i>isc</i> -Operon aus <i>E. coli</i>	J. Kaiser / T. Gräwert

<i>Klon</i>	<i>Exprimierte(s) Enzym(e)</i>	<i>Bezugsquelle</i>
XL1-pMALispGC270S- pACYCiscS	IspG-ProteinC273S und <i>isc</i> - Operon aus <i>E. coli</i>	J. Kaiser / T. Gräwert
XL1-Blue	Wildtyp <i>E. coli</i>	Bullock (1987)
XL1-SK6600	Wildtyp <i>E. coli</i>	Hamilton <i>et al.</i> (1989)

**Tabelle 6: Verwendete Klone**

## 2.1.5 Geräte

### **Autoklav:**

Sanoklav (Wolf, Bad Überkingen – Hausen)

### **Flüssigszintillationszähler:**

Beckman LS 7800 (Fullerton, USA)

### **FPLC-Anlagen:**

LKB-GP 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

### **Glove Box 1:**

Selbstgebaut mit den Maßen 160 cm x 80 cm x 116 cm (Prof. Simon). Vakuumpumpe Speedivak (Edwards Hochvakuum GmbH, Frankfurt/Main). Betrieben mit Formiergas (95% N<sub>2</sub> und 5% H<sub>2</sub>, Air Liquide, Düsseldorf) und Pt-Katalysatoren (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA).

### **Glove Box 2:**

Model B (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) mit O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> Analysator (Model 10, Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) und Vakuumpumpe (Modelnr. 1023-101Q, Gast, Benton Harbor, USA). Betrieben mit Formiergas (95% N<sub>2</sub> und 5% H<sub>2</sub>, Air Liquide, Düsseldorf) und Pt-Katalysatoren (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA). Ausgestattet mit einer Kühlanlage, besteht aus zwei Lamellenkühlern (Opel Corsa Ölkühler), einem Axiallüfter (Edm-papst, Muldingen) und einem Titan 4000 Kühler (Aqua Medic, Bissendorf).

**HPLC:**

Autosampler: Midas cool (Spark Holland, AJ Emmen, Holland),

AS-100 (Biorad, München)

Pumpe: KNAUER WellChrom Maxi-Star K-1000 V1400 Version 0296 (Knauer, Berlin)

Säulen: Luna C5 5  $\mu\text{m}$  250 x 4.60 mm (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg),

Multospher 120 RP 18 AQ-5 3 x 250 mm (CS GmbH, Langerwehe),

Nucleosil 10 SB, (CS GmbH, Langerwehe)

Detektor: Radioaktivitätsdetektor  $\beta$ -RAM ( $\beta$ -RAM Flow-Through System Model 2, Biostep GmbH, Jahnsdorf), ausgestattet mit einer YtSi-Feststoffzelle (400  $\mu\text{L}$  Zellvolumen)

Auswertung: ChromGate Version 2.5.5 (Knauer GmbH, Berlin),

ScintFlowSA Version 1.2.5 (Biostep GmbH, Jahnsdorf)

**Kühlzentrifugen:**

Sorval RC 5B mit den Rotoren GS-3 und SS-34 (Du Pont Instruments, Bad Homburg)

Multi-Funktions-Zentrifuge BR4i mit den Rotoren S40 und AB 2.14 (Jouan, Unterhaching)

**Lyophylle:**

Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 mit Anlagensteuerung LDC-1M (Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz)

**NMR:**

FT-NMR Spektrometer DRX 500 (Bruker, Karlsruhe), Aspect Station;

FT-NMR Spektrometer AM 360 (Bruker, Karlsruhe), Array processor, Aspect 3000 Computer

Bezug: Externe Trimethylsilylpropansulfonsäure

Auswertung: XWINNMR 1.3 und 1D/2D-WINNMR 5.0 Software (Bruker, Karlsruhe)

**pH-Meter:**

E 605 mit Standard-Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)

**Photodokumentation:**

Video Copy Processor P68E (Mitsubishi, Ratingen)

**Photometer:**

UV-VIS-Spektralphotometer Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Quarzküvetten (Helma, Mühlheim/Ruhr)

**Piccolo:**

Fraktionssammler GradiFrac (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Schlauchpumpe Pump P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Mischer Mixer 5 mPa (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Schreiber Rec102 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Photometer Optical Unit UV-1/Control Unit UV-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

**Schüttelinkubator:**

Certomat HK (B. Braun International, Melsungen)

**SDS-PAGE Apparatur:**

Mighty Small SE 250 (Hoefer Scientific Instr., San Francisco, USA)  
Spannungsquelle: Poxer Pac 1000 (BioRad, München)

**Thermoblock:**

Teche DRI-Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Wertheim)

**Tischzentrifuge:**

Micro Fuge Lite (Beckman, Fullerton, USA)

**Ultraschallgerät:**

Sonifer 250 (Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut, USA)

**Waagen:**

SCALTEC SBA 32, max. 120 g, d = 0.0001 (Sartorius AG, Göttingen)  
SCALTEC SBA 52, max. 2200 g, d = 0.01 (Sartorius AG, Göttingen)

**Zellaufschluß**

„Ultraschallfinger“ Branson Sonifier 250 (Danbury, USA)

French Press Basic Z Model (Cell Disruption Equipment, Constant Systems Ltd, Warwick, UK) mit Haake Kühler C40/F6 (Thermo, Karlsruhe)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 NMR-Spektroskopie

Die meist wässrigen Proben wurden mit 5 % D<sub>2</sub>O gemischt und in ein 5 mm NMR Röhren gefüllt. Feste Proben wurden gleich in geeignetem deuteriertem Lösungsmittel (D<sub>2</sub>O, CDCl<sub>3</sub>) gelöst und ins NMR Röhren gefüllt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen, vor allem Mn<sup>2+</sup>, wurde im Überschuß Na<sub>2</sub>-EDTA hinzugefügt, um die Metallionen zu komplexieren. Als Interner Standard wurden 240 nmol Na[1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]acetat zugegeben.

Die Messungen verliefen in der Regel bei 17°C. Eindimensionale Spektren wurden am rotierenden (20 Hz) und mehrdimensionale Spektren am stehenden Röhren gemessen. Zur Aufnahme der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Kernresonanzspektren standen verschiedene Geräte von Bruker mit einer Magnetfeldstärke von 360 und 500 MHz zur Verfügung. Das 500 MHz Gerät wurde vorzugsweise benutzt und lieferte bei 11.75 Tesla <sup>1</sup>H-Resonanzfrequenzen von 500.13 MHz und <sup>13</sup>C-Resonanzfrequenzen von 125.77 MHz. Für die eindimensionalen Spektren wurde ein <sup>13</sup>C- / <sup>1</sup>H-Dualprobenkopf und für zweidimensionale Spektren ein <sup>13</sup>C- / <sup>1</sup>H- / <sup>15</sup>N-Tripelresonanzprobenkopf verwendet. Die Parametersätze zur Messung von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren waren wie folgt: Senderfrequenz 500.13 MHz; 32 K Datensatz; 45° Pulswinkel (4 µs); spektrale Breite 5.5 Hz. Bei der Messung von wässrigen Proben wurde die Unterdrückung des Wassersignals bei 4.75 ppm durch eine Vorsättigung bei der niedrigsten möglichen Energiestufe erreicht. Die Parametersätze zur Messung von <sup>13</sup>C-NMR-Spektren waren wie folgt: Senderfrequenz 125.77 MHz; 32 K Datensatz; 30° Pulswinkel (3 µs); spektrale Breite 5.5 Hz. Die zusammengesetzte Pulssequenz WALTZ sorgte dabei für eine <sup>1</sup>H-Entkopplung. Vor der Fourier-Transformation wurden die Daten auf 265000 mit Nullen aufgefüllt („zero-filling“) und mit einer Gauss-Lorentz-Funktion mit den Parametern gb (0.01 – 0.4) und lb (-1 bis -5) multipliziert. Vor der Integration der Signale erfolgte eine Korrektur der Phase und der Basislinie der Spektren.

### 2.2.2 Massenspektroskopie

Die Massenspektren von gereinigten Proteinen wurden von Herrn Krause am Lehrstuhl für Biotechnologie der TU München mit einem Biflex III MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen.

### 2.2.3 Sequenzanalyse

N-terminale Peptidsequenzen wurden von Herrn Dr. Köhler am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU München durch ein Pulsed-Liquid Mode PE Biosystem Model 492 (Perkin-Elmer, Boston, USA) bestimmt.

### 2.2.4 Enzymatische Herstellung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

#### 2.2.4.1 Stabilisotopmarkiertes 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

[1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-, [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat wurden analog der Vorschrift von Schuhr und Hecht *et. al.* (2001) hergestellt.

Die Synthese von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]- und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat erfolgte unter Verwendung von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose zu [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat, beziehungsweise unter Verwendung von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose und Na[2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]pyruvat zu [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat. Hierfür wurden 200 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose (1.1 mmol), 1.3 g ATP (2,2 mmol), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 53 mg Thiaminpyrophosphat (0.12 mmol), 150 mM TRIS/HCl und 200 mg Natriumpyruvat (bzw. [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Natriumpyruvat) (2.2 mmol) in 71 mL destilliertem Wasser gelöst. Vor Zugabe der Enzyme wurde der pH-Wert mit 2 M NaOH auf 8.0 eingestellt. 100 U Hexokinase, 60 U Phosphoglucoseisomerase, 28 U Phosphofruktokinase, 15 U Aldolase, 170 U Triosephosphat-Isomerase und 3.8 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase wurden hinzugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsende wurde mittels <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie festgestellt. Nach Abschluss der Reaktion wurden 390 mg unmarkierter Glucose (2.2 mmol), 30 mg NADP<sup>+</sup>, 10 U 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase und



27 U Glucosedehydrogenase zugegeben. Nach Abschluss dieser Reaktion (ca. 12 h) wurden 53 mg CTP (0.1 mmol), 1.25 g Phosphoenolpyruvat (6.06 mmol), 200 U Pyruvatkinase, 105 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase, 92 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase und 1.7 U 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat Synthase zugegeben. Die Reaktion war nach 15 h beendet. Anschließend wurden die Enzyme über eine Amicon (Pharmacia, Freiburg) mit einer 3 kDa Membran (Pall GmbH, Dreieich) abgetrennt.

Die Reinigung erfolgt über eine alkoholische Ba<sup>2+</sup>-Fällung. Hierfür wurden 0.1 m Ba(acetat)<sub>2</sub> zugegeben und die anorganischen Ba-phosphate abgetrennt. Anschließend wurde die 5-fache Menge an Ethanol und weiteres Ba(acetat)<sub>2</sub> zugegeben. Innerhalb von 12 h fiel das organische Ba<sup>2+</sup>-Salz bei 4 °C. Mit einem Kationenaustauscher DOWEX 50 WX8 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Form) wurden die Ba<sup>2+</sup>-Ionen entfernt. Nach Lyophilisation konnte das fertige Produkt erhalten werden.

Bei der Herstellung von [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat wurde ausgehend von 400 mg Dihydroxyacetonphosphat Li-Salz (2.2 mmol), 200 mg [2,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Natriumpyruvat (2.2 mmol) und 170 U Triosephosphatisomerase in 71 mL 150 mM TRIS/HCl (pH 8.0) [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat hergestellt. Nach Abschluss dieser Reaktion verlief die Synthese von [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat weiter wie oben beschrieben.

In Tabelle 7 sind die chemischen Verschiebungen von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]- und [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat aufgeführt.

Position	Chemische Verschiebung ( $\delta/ppm$ )	Kopplungskonstante (J/Hz)	
		J <sub>PC</sub>	J <sub>CC</sub>
	<sup>13</sup> C	J <sub>PC</sub>	J <sub>CC</sub>
1	66.9 <sup>a, c</sup>	4.2 <sup>a, c</sup>	42.0 <sup>c</sup>
2	83.9 <sup>b, c</sup>	5.5 <sup>b, c</sup>	42.7 <sup>c</sup> , 42.0 <sup>c</sup> , 39.8 <sup>b, c</sup>
2'	16.4 <sup>b, c</sup>	8.6 <sup>b, c</sup>	39.8 <sup>b, c</sup>
3	68.2 <sup>a, c</sup>	-	42.7 <sup>a, c</sup> , 42.7 <sup>c</sup>
4	65.6 <sup>a, c</sup>	6.4 <sup>a, c</sup>	42.7 <sup>a, c</sup>

**Tabelle 7:** <sup>13</sup>C-NMR Parametre von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]<sup>a</sup>-, [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]<sup>b</sup>- und [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]<sup>c</sup>2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

#### 2.2.4.2 [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

In 1 mL wurden 6.3 mg (30 µmol) Dihydroxyacetonphosphat Li-Salz, 1.3 mM Thiaminpyrophosphat, 150 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 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, 0.3 U 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, 0.8 U 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-Synthase und 1.7 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase gegeben. Diese Lösung wurde mit einer Spritze vorsichtig in ein mit Septum verschlossenes Sicherheitsgefäß gespritzt. Im Sicherheitsgefäß befanden sich 1.68 mg Na[2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]pyruvat (15 µmol, 250 µCi). Nach einer Inkubation von 5 h bei 37 °C wurden 24 U Pyruvatkinase und 4.6 U 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase und nach weiteren 1.5 h 0.3 U 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase zugegeben. Die Detektion der radioaktivmarkierten Verbindungen erfolgte online über einen Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 7800, Fullerton, USA). Nach 8 h wurde die Reaktion beendet und die Enzyme abgetrennt. Die Reinigung erfolgte über HPLC (vgl. 2.2.5.1).

### 2.2.5 HPLC

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

Die Reinigung von radioaktiv markiertem [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat erfolgte über eine Anionenaustauscher-Säule (Nucleosil 5 SB, 250 mm x 7.5 mm) mit 100 mM Ammoniumformiat in 40 % Methanol als Eluenten. Die Flußrate betrug 5 mL/min. Das gewünschte Produkt hatte ein Retentionsvolumen von 86 mL. Nachdem das in der Lösung enthaltene Methanol durch Einrotieren entfernt worden war, konnte [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat durch Gefriertrocknung als weißes Pulver erhalten werden. Ausbeute: 12.6 µmol, 200 µCi, 80 %.

#### 2.2.5.2 *IspG*-Aktivitätstests

Zur Detektion der Intermediate des Desoxyxylulosephosphat Weges wurde eine RP-Ionenpaar HPLC (van Beek *et al.* (1999), McCskill und Croteau (1993)) verwendet.

Die IspG-Aktivitätstests wurden auf zwei unterschiedlichen Säulen (Multospher 120 RP 18-AQ-3 Säule und Luna C5 5 $\mu$  100Å Säule) analysiert. Bei beiden Methoden wurde Eluent A (10 mM TBAS (pH 6.0)) und Eluent B (10 mM TBAS (pH 6.0) 70% Methanol) verwendet. Vor der HPLC Analytik wurden die Proben durch Zentrifugatin in Nanoseps (100 kDa, Pall GmbH, Dreieich) von den Proteinen befreit.

Die Detektion der radioaktivmarkierten Verbindungen erfolgte online über einen Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 7800, Fullerton, USA).

Die Berechnung der spezifischen Aktivität der untersuchten rekombinanten IspG-Proteine erfolgte über den aus dem Chromatogramm erhaltenen Umsatz  $w(\text{Reaktion})$  in Prozent. Bei der Verwendung von Zellextrakten wurde die Menge an gebildeten IPP und DMAPP zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des IspG-Proteins mit einbezogen.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{n \text{ ([2-}^{14}\text{C}_1\text{]2C - Methyl - D - erythritol - 2,4 - cyclodiphosphat) * } w(\text{Reaktion})}{m(\text{Protein}) * t \text{ (Inkubation)}}$$

Das Gradientensystem für die Multospher 120 RP 18-AQ-3 Säule (CS GmbH, Langerwehe) ist in Tabelle 8 angegeben.

<i>t / min</i>	<i>Eluent A in %</i>	<i>Eluent B in %</i>
0	85	15
10	75	25
20	65	35
30	38	62
35	25	75
40	25	75
45	85	15
55	85	15

**Tabelle 8: Gradientensystem für eine Multospher 120 RP 18-AQ-3 Säule**

Die Retentionszeiten der detektierten Verbindungen sind in Tabelle 9 angegeben.

---

<i>Verbindung(en)</i>	<i>Retentionszeit / min</i>
[2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat	19
[2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]1-Hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-diphosphat	24
[3- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]Isopentenylidiphosphat (IPP)/ [3- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)	36

**Tabelle 9: Retentionszeit für die angegeben Verbindungen bei der Verwendung einer Multospher 120 RP 18-AQ-3 Säule**

Das Gradientensystem für die zweite Säule, eine Luna C5 5 $\mu$  100Å Säule (Phenomenex Ltd, Aschaffenburg) ist in Tabelle 10 wiedergegeben.

<i>t / min</i>	<i>Eluent A</i>	<i>Eluent B</i>
0	95	5
10	95	5
12	70	30
25	50	50
35	30	70
40	20	80
50	90	10
55	95	5

**Tabelle 10: Gradientensystem für eine Luna C5 5 $\mu$  100A Säule**

Die Retentionszeiten der detektierten Verbindungen sind in Tabelle 11 angegeben.

<i>Verbindung(en)</i>	<i>Retentionszeit / min</i>
[2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat	18
[2- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]1-Hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-diphosphat	23
[3- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]Isopentenylidiphosphat (IPP)/ [3- <sup>14</sup> C <sub>1</sub> ]Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)	35

**Tabelle 11: Retentionszeit für die angegeben Verbindungen bei der Verwendung einer Luna C5 5 $\mu$  100A Säule**

### **2.2.6 *In vivo*-Supplementierungsversuche**

Die jeweiligen *E. coli* Stämme (XL1-pBSxispC-F, XL1-pBSxispC-G, XL1-pBSxispC-G-pACYCiscSfdx, XL1-pBSxispC-GfldAfpr-pACYCiscSfdx, XL1-pBSxispC-Gfdxfpr und XL1-pBSxispC-Gfdxfpr-pACYCiscSfdx) wurden über Nacht in 100 mL LB Medium angezogen. Nachdem die Zellsuspension eine OD<sub>600</sub> nm von größer 2 besaß, wurden die Zellen mit einer „Fütterungslösung“ supplementiert. Die „Fütterungslösung“ bestand aus 100 mg [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose, 1 g Li-lactat und 2 mL 1 M TRIS/HCl (pH 8). Vor Zugabe wird auf ein Endvolumen von 24 mL verdünnt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die Zugabe erfolgt direkt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Nachdem die Zellen mit Saline gewaschen wurden, wurden sie in 400 µL 0.5 M NaF in D<sub>2</sub>O, 300 µL Deuteromethanol und 10 µL Na[1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]acetat (20 mg/mL) resuspendiert. Mit Hilfe des Branson Sonifier 250 Ultraschallfingers (Power 4, Zyklus 70%) wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend die Membranbestandteile abzentrifugiert. Die Auswertung des Zellextraktüberstandes erfolgt über <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie.

### **2.2.7 Enzymassays zur Bestimmung der IspG Aktivität verschiedener Zellextrakte**

#### *2.2.7.1 Präparation der Zellextrakte*

Die verschiedenen Klone wurden über Nacht in LB-Medium angezogen. Je nach verwendetem Plasmid wurde das zu verwendende Antibiotikum ins Medium gegeben (vgl. Tabelle 4). Die Zellen wurden am nächsten Morgen durch Zentrifugation (5000 Upm, 20 min) geerntet, mit Saline gewaschen und ein zweites Mal zentrifugiert. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Für einen Assay wurden 0.1 bis 0.5 g Zellen in 800 µL Puffer (100 mM TRIS/HCl pH 8 oder 50 mM Phosphat pH 7) unter Zusatz von DTT (2mM) resuspendiert und mit einem Ultraschallfinger (Power 4, Zyklus 70 %) aufgeschlossen. Die Zellen wurden dabei auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die aufgeschlossene Zellmasse bei 13000 Upm für 15 min zentrifugiert. Der Zellextraktüberstand wurde weiterverwendet.

Bei den anaeroben Aufschlüssen wurden die Zellen in einer Glove Box mit anaerober Saline gewaschen und zentrifugiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit demselben Ultraschallfinger. Die

Zellen befanden sich jedoch in einem gekühlten Exikator, der während des Aufschlusses mit Argon gespült wurde. Nach Zentrifugation innerhalb der Glove Box konnte der Zellextraktüberstand verwendet werden.

Bei der Verwendung von Zellextrakten wurde sowohl Pamidronat (Aredia<sup>®</sup>, Novartis, Basel) als auch NaF zu den Assays gegeben. Pamidronat hemmt die Farnesyldiphosphate-Synthase, somit konnte es verhindert werden, dass das unter Umständen gebildete [3-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]IPP und [3-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]DMAPP zu höheren Terpenen reagieren (Dunford *et al.* (2001); Adam (2002)). NaF wurde hinzu gegeben, um Dephosphorylierung zu vermeiden.

### 2.2.7.2 Bestimmung der IspG-Protein Aktivität

In ein Gesamtvolumen von 200 µL wurden 100 bis 150 µL Zellextraktüberstand gegeben. Hierzu kamen 40 µmol/L [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (15.8 µCi/mol). Zur Charakterisierung des IspG-Proteins wurden verschiedene Cofaktoren wie 1 mM NAD(P)H, 20 mM FAD/FMN und 20 mM SAM sowie zweiwertige Metallionen (1 mM, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) getestet. Die Mischungen wurden zwischen 30 min und 4 h (z. B. bei *E. coli* Wildtypzellextrakt) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µL 3 M TCA gestoppt und mittels 5 µL 3 M NaOH wieder neutralisiert. Anschließend wurde der Umsatz über HPLC Analytik ermittelt (vgl. 2.2.5.2)

### 2.2.7.3 Studien über einen möglichen Mechanismus der von IspG katalysierten Reaktion

Hierfür wurde der Zellextraktüberstand von des *E. coli* Klons XL1-pBSxispC-GfldAfp verwendet. Die Präparation des Zellextraktes erfolgte anaerob wie unter 2.2.7.1 beschrieben. Der gesamte Test verlief anaerob in Glove Box. 1 mM [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]- bzw. [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat wurden als Substrat getestet. [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat wurde separat oder zusammen mit [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat getestet. Die Konzentrationen des [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat beim Titrationsversuch waren 0, 2.5, 5.1, 10.1 und 20.3 mM. Das Gesamtvolumen entsprach 600 µL. Zusätzlich zu dem

Zellextraktüberstand (100  $\mu$ L, Gesamtprotein 1,3 mg) enthielt der Assay noch rekombinantes anaerob gereinigtes His<sub>6</sub>-Flavodoxin, His<sub>6</sub>-Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase (vgl. 2.2.10.2) sowie 1 mM NADPH.

Diese Versuche wurden auch mit 10-Methyl-5-deaza-isoalloxazin (Deazaflavin) durchgeführt. Das Deazaflavin, wie es nachfolgend genannt wird, wurde von Prof. Andrée Marquet (Universität Paris) zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden 100  $\mu$ L Zellextraktüberstand, 1 mM DTT, 5 mM Deazaflavin und 1 mM [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat und/oder [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in einem Gesamtvolumen von 600  $\mu$ L verwendet. Die Reaktion wurde durch Bestrahlung (1h) mit einer Hg-Dampf Lampe (OSRAM) durchgeführt. Die Testmischung befand sich dabei in anaeroben Quarzküvetten, welche auf Eis gekühlt worden sind.

Bei der Verwendung von anaerob gereinigtem IspG-Protein wurden 0.4 mg IspG-Protein, 2 mg His<sub>6</sub>-Flavodoxin, 1 mg His<sub>6</sub>-Flavodoxin(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM NADPH und 100 mM TRIS/HCl (pH 8) eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 4h 5 min bei 37°C. Die Konzentration an [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat war 5 mM und die von [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat war 3 mM.

### 2.2.8 Induzierte Anzuchten

Je nach verwendetem Plasmid wurde eine Vorkultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (vgl. 2.1.2) angesetzt. Die Klone, welche zusätzlich den *isc*-Operon überexprimierten, wurden in TB-Medium mit 5 mg Eisenammoniumcitrat und 1 mM Cystein und dem entsprechenden Antibiotikum angezogen.

Für die Vorkultur wurden mit Hilfe einer Impföse Zellen aus einer Dauerkultur entnommen und diese wurden in 200 mL Medium gegeben. Die Vorkultur wurde in einen Schüttler bei 37 °C über Nacht bebrütet.

Die Hauptkultur, meist 2 – 4 L desselben Mediums wie das der Vorkultur, wurde durch Überimpfen der Vorkultur im Verhältnis 1:20 bis 1:50 (V/V) hergestellt. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messen der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) bei 600 nm kontrolliert. Als Referenz diente unbewachsenes Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.5 bis 0.7 wurde in

Form einer Stammlösung IPTG bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Die Zellen wurden dann für weitere 5 h bei 37 °C in einem Schüttler bebrütet.

Nach Abschluss der Expressionszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 Upm, 30 min, 4 °C) geerntet. Bis zu diesem Punkt war die Behandlung von aeroben und anaeroben Enzymen gleich. Die Weiterverarbeitung der aeroben Zellen erfolgte durch Waschen mit Saline und anschließender erneuter Zentrifugation bei 5000 Upm für 30 min (4 °C). Danach wurden die Zellen bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Zellen für die anaerobe Isolierung der Proteine wurden in die Glove Box 1 eingeschleust und dort mit anaerober Saline gewaschen. Die zweite Zentrifugation erfolgte in gasdichten SS34 Zentrifugationsgefäßen außerhalb der Glove Box (5000 Upm, 30 min, 4 °C). Diese Zellen wurden dann in den gasdichten Gefäßen bei -20 °C aufbewahrt.

## **2.2.9 Aerobe Reinigungen von Proteinen**

### *2.2.9.1 Amylose Säule*

Die Reinigung des IspG-Proteins erfolgte über eine Affiniätschromatographie. Hierzu wurde eine Amylose Säule (Pharmacia, Freiburg, V = 60 mL) gepackt und mit Auftragspuffer (0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl) äquilibriert.

Die pMAL Zellen wurden in Auftragspuffer unter Zusatz von DNaseI (Roche, Penzberg) und PefaBlock (Roche, Penzberg) resuspendiert. Die Zellen wurden durch eine French Press bei 8 °C und einem Druck von 1.8 kbar aufgeschlossen. Um die festen Membranbestandteile zu entfernen, wurde die aufgeschlossene Zellmasse bei 13000 Upm für 30 min (4 °C) zentrifugiert.

Die Isolierung des MBP Proteins erfolgte mittels einer Piccoloanlage. Hierfür wurde der gewonnene Zellextraktüberstand auf die Säule aufgetragen (Flussrate 1 mL/min) und anschließend wurde die Säule mit Auftragspuffer so lange mit einer Flussrate von 2 mL/min gewaschen, bis der Schreiberausschlag des Photometers (280 nm) wieder zum Ausgangswert abfiel. Dies waren meist 3 - 5 Säulenvolumen.

Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 10 mM Maltose in 100 mM TRIS/HCl (pH 8.0) und 0.5 M NaCl über 180 mL bei einer Flussrate von 2 mL/min. Der Reinigungsverlauf wurde online über ein Photometer bei 280 nm kontrolliert und nach Abschluss der Reinigung über SDS-PAGE überprüft (vgl. 2.2.9.4).



Die vereinigten Proteinfractionen wurden über Nacht gegen 100 mM TRIS/HCl (pH 8.0) bei 4 °C dialysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über die Methode nach Bradford (1976) ( vgl. hierzu 2.2.9.3.).

Das IspG-Protein eluierte nach einem Retentionsvolumen von 32 mL (18 % Maltose) als farblose Lösung von der Amylosesäule.

### *2.2.9.2 Superdex*

Die kombinierten rekombinanten IspG-Protein Fraktionen aus der Amylose Säule wurden über eine Ultrafiltration (30 kDa, 5000 Upm, 20 min) ankonzentriert. Anschließend wurden sie auf eine Superdex 200 26/60 Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Die Säule wurde mit 25 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 100 mM KCl entwickelt. Das Retentionsvolumen des IspG-Proteins betrug 57 mL. Die Proteinlösung wurde portionsweise bei -80 °C gelagert.

### *2.2.9.3 Proteinbestimmung nach Bradford*

Hierfür wurden 50 µL der Probelösung mit 950 µL Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption bei 578 nm gemessen. Als Referenz diente 50 µL Wasser in 950 µL Bradford-Reagenz. Die Konzentration des Proteins konnte dann über eine Kalibrierkurve, welche mit der gleichen Bradford-Reagenz und BSA hergestellt worden ist, ermittelt werden.

### *2.2.9.4 SDS – PAGE*

Zur Veranschaulichung der Expression des rekombinanten Proteins im Zellverband und der Überprüfung des Reinheitsgrades des isolierten Proteins wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Das Trenngel (8%) wurde präpariert, indem es noch flüssig zwischen eine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Platte und eine Glasplatte blasenfrei gegossen wurde. Um eine möglichst glatte Oberfläche zu erhalten, wurde es mit einer Isopropanol/Wasser Mischung (1/2) überschichtet. Nachdem das Acrylamid auspolymerisierte, könnte diese Mischung verworfen werden. Das Sammelgel wurde nun gegossen. Nach weiteren 15 min war das Gel zur Weiterverwendung bereit und konnte in die Elektrophoreseapparatur eingebaut werden. Danach wurde der Auftragskamm

entfernt. Zwischenzeitlich wurden die Proteinproben vorbereitet. Hiefür wurden jeweils 10 µL Zelleextraktüberstand und Säulendurchlauf mit 40 µL SDS Aufschlusspuffer vermischt, jeweils 40 µL der Fraktionen, welche anhand des Schreiber ausdrucks in Frage kamen, wurden mit 10 µL SDS-Auftragspuffer vermischt. Eine Spatelspitze des Pellets wurde in 400 µL SDS-Auftragspuffer resuspendiert. Alle Proben wurden bei 100 °C zum Sieden gebracht. Nach 1 min Zentrifugation bei 10000 Upm wurden jeweils 10 µL der Proben auf das Gel aufgetragen, nur von dem Pelletüberstand und dem Proteinmarker (vgl. Tabelle 12) wurde 4 µL verwendet.

Die Elektrophorese wurde bei 25 mA pro Gel durchgeführt. Anschließend wurde es für 30 min in die Färbelösung gelegt. Entfärbt wurde es für 30 min in Entfärber 1 und konnte dann über Nacht in Entfärber 2 restlos entfärbt werden. Das auf diese Weise erhaltene Proteingel wurde photographisch dokumentiert.

<i>Protein - Marker</i>	<i>Bandengröße (kg / mol)</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Protein-Marker 1	66; 45; 30; 20; 13	Laboreigene Mischung verschiedener käuflich erwerbbarer Proteine
Protein-Marker 2	66; 45; 36; 29; 24; 20.1; 14.2	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

**Tabelle 12: Verwendete Proteinmarker**

## **2.2.10 Anaerobe Reinigung von Proteinen**

### *2.2.10.1 Amylose Säule*

Die anaerobe Reinigung des MBP Proteins erfolgte in Glove Box 2 mit derselben Säule über eine FPLC Anlage. Diese wurde in der Glove Box mit anaerobem Auftragspuffer (0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0, 0.5 M NaCl)) mit mindestens 5 Säulenvolumen gespült. Dies geschah am Tag vor der eigentlichen Reinigung, so dass die Säule sich über Nacht in einer Formiergasatmosphäre befand.

Die Zellen wurden in der Glove Box mit anaerobem Auftragspuffer, DNaseI und PefaBlock resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über die gleiche French Press. Der Eingang der French Press, sowie das Auffanggefäß (Gasdichte GS3 Zentrifugenbecher) wurden während der gesamten Prozedur mit Argon gespült. Die Zentrifugation erfolgte bei 11000 Upm für 60

min (4 °C). Das MPB-Protein wurde wie unter 2.2.9.1 erläutert isoliert. Die Dialyse geschah in einem gasdichten Dreihalskolben gegen anaeroben Dialysepuffer außerhalb der Glove Box bei 4 °C. Die Proteinlösung wurde portionsweise in gasdichten Fläschchen bei -80°C gelagert.

### *2.2.10.2 Ni-Chelating-Sepharose*

Die His-getaggtten Proteine (His<sub>6</sub>-Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase aus M15-pQE30fpr bzw. XL1-pQE30fpr Zellen und His<sub>6</sub>-Flavodoxin aus XL1-pQE30fldA Zellen) wurden über eine Ni-Chelating-Sepharose FF-Säule an einer FPLC Anlage in Glove Box 2 isoliert. Das Säulenvolumen war 30 mL. Die Säule wurde einen Tag vor der eigentlichen Reinigung mit anaerobem Auftragspuffer (0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0), 0.5M NaCl, 10 mM Imidazol) gespült. Der Zellaufschluss geschah auf die gleiche Weise wie unter 2.2.10.1 beschrieben. Die Zellen wurden jedoch in dem Auftragspuffer für Ni-Chelating-Sepharose Säulen resuspendiert. Der Zellextraktüberstand wurde mit einem Fluss von 2 mL/min auf die Säule aufgetragen. Der nicht bindende Anteil wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min entfernt. Nachdem die Extinktion sich wieder auf dem Ursprungswert befand, wurde ein linearer Gradient von 10 mM Imidazol bis 500 mM Imidazol innerhalb von 120 mL gefahren. Anschließend wurde die Proteinlösung anaerob gegen 100 mM TRIS/HCl (pH 8.0) bei 4 °C über Nacht dilaysiert. Die Reinigung wurde über den Schreiber online überwacht und mittels SDS-PAGE kontrolliert (vgl. 2.2.9.4).

## **2.2.11 Aktivitätsbestimmungen mit gereinigtem Protein**

Alle Aktivitätsbestimmungen, außer der in Abschnitt 2.2.11.1.1 beschrieben ist, wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

### *2.2.11.1 Enzymatische Aktivitätsbestimmung*

#### ***2.2.11.1.1 Radioaktiv mit aerob gereinigtem IspG-Protein***

Die Assays enthielten in einem Volumen von 200 µL 50 mM TRIS/HCl (pH 8), 1 mM DTT, 20 mM NaF, 1 mM NADH, 200 µM FMN, 1 mM FeCl<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>S, 0.5 mM

Natriumpamidronat (Aredia<sup>®</sup>, Novartis, Basel), 40  $\mu\text{M}$  [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (23  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ), 180  $\mu\text{g}$  rekombinantes IspG-Protein und/oder Zellextraktüberstand der *E. coli ispG* Knock-out Mutante (3 mg Gesamtprotein). Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C wurden die Proben auf Eis gestellt und die Reaktion mit 5  $\mu\text{L}$  3 M TCA gestoppt. Die Lösung wurde mittels 5  $\mu\text{L}$  3 M NaOH wieder neutralisiert und zentrifugiert (10000 Upm, 30 min). Durch eine zweite Zentrifugation (Nanosep 100 kDa, 10000 Upm, 30 min) konnten lösliche Proteine abgetrennt werden. Der Umsatz wurde über HPLC bestimmt (vgl. Tabelle 8).

#### ***2.2.11.1.2 Aktivitätsbestimmung mittels radioaktivem Substrat mit anaerob gereinigtem IspG-Protein***

Das gereinigte rekombinante IspG-Protein wurde in einer molaren Konzentration von 1.4  $\mu\text{M}$  (68  $\mu\text{g}$ ) in 200  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen eingesetzt. Standardassays enthielten 100 mM TRIS/HCl (pH 9.0), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 4 mM NADPH, 12  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-Flavodoxin, 40  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und 1 mM [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (0.83  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ). Zur Erlangung der optimalen Bedingungen wurde immer einer der Cofaktoren bzw. Hilfsenzyme variiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion auf Eis mit 5  $\mu\text{L}$  3 M TCA gestoppt. Vor Zentrifugation (Nanosep, 10000 Upm, 10 min) wurde die Lösung mittels 5  $\mu\text{L}$  3 M NaOH wieder neutralisiert. Der Umsatz wurde über HPLC bestimmt (vgl. Tabelle 10).

#### ***2.2.11.1.3 Photometrische Aktivitätsbestimmung mit anaerob gereinigtem IspG-Protein***

Photometer Assays wurden in einer OS Quarzküvette (Helma, Mühlheim/Ruhr) mit einem Durchmesser von 0.2 cm durchgeführt. Die Assays enthielten 100 mM TRIS/HCl (pH 9), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM NADPH, 12  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-Flavodoxin, 40  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und 0.1 mM [2, 2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat sowie 68  $\mu\text{g}$  rekombinantes IspG-Protein. Als Referenz diente die gleiche Assaymischung ohne Substrat. Die Abnahme der Absorption bei 340 nm wurde aufgenommen. Dies entspricht dem Verbrauch an NADPH.

#### ***2.2.11.1.4 Aktivitätsbestimmung über NMR mit anaerob gereinigtem IspG-Protein***

Die NMR Assays enthielten in 600  $\mu\text{L}$  100 mM TRIS/HCl (pH 9.0), 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 4 mM NADPH, 12  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-Flavodoxin, 40  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und 1 mM [2, 2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- oder [1, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und 1.4  $\mu\text{M}$  rekombinantes IspG-Protein. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion auf Eis mit 15  $\mu\text{L}$  3 M TCA gestoppt. Vor Zentrifugation (Nanosep, 10000 Upm, 10 min) wurde die Lösung mittels 15  $\mu\text{L}$  3 M NaOH wieder neutralisiert. Der Umsatz wurde über NMR bestimmt (vgl. 2.2.1).

#### ***2.2.11.2 Aktivitätsbestimmung mit photoreduziertem Deazaflavin***

##### ***2.2.11.2.1 Aktivitätsbestimmung mittels radioaktivem Substrat mit aerob gereinigtem IspG-Protein***

Die Assays enthielten 50 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 1 mM  $\text{FeCl}_3$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ , 5 mM Deazaflavin in DMSO, 1 mM DTT, 180  $\mu\text{g}$  rekombinantes IspG-Protein und 40  $\mu\text{M}$  [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (23  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$ . Nach einer Bestrahlung von 60 min durch eine Hg-Dampf Lampe (Osram) wurde die Reaktion mit 5  $\mu\text{L}$  gestoppt und durch 5  $\mu\text{L}$  NaOH neutralisiert. Während der Bestrahlung wurde die Probe auf Eis gelagert. Der Umsatz wurde über HPLC bestimmt (vgl. Tabelle 10).

##### ***2.2.11.2.2 Aktivitätsbestimmung mittels radioaktivem Substrat mit anaerob gereinigtem IspG-Protein***

Assays enthielten 100 mM TRIS/HCl (pH 9.0), 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 5 mM Deazaflavin in DMSO, 1 mM DTT, 1.4  $\mu\text{M}$  rekombinantes IspG-Protein und 1 mM [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (0.83  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$ . Nach einer Bestrahlung von 15 min durch eine Hg-Dampf Lampe (Osram) wurde die Reaktion auf Eis mit 5  $\mu\text{L}$  gestoppt und durch 5  $\mu\text{L}$  NaOH neutralisiert. Während der Bestrahlung wurde die Probe auf Eis gelagert. Der Umsatz wurde über HPLC bestimmt (vgl. Tabelle 10).

### **2.2.11.2.3 Aktivitätsbestimmung über NMR mit aerob gereinigtem IspG-Protein**

Die Reaktionsansätze enthielten 50 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 1 mM FeCl<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>S, 5 mM Deazaflavin in DMSO, 100 µM 1 mM [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- oder [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, 5 mM DTT und 1.8 mg rekombinantes IspG-Protein in einem Gesamtvolumen von 3 mL. Die Proben wurden auf Eis für 2 h mit einer Hg-Dampfampe (Osram) bestrahlt. Nach Abschluss der Bestrahlung wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µL TCA (30 %, m/vol) abgebrochen und durch Zugabe von 300 µL 1 M NaOH neutralisiert. Eine Spatelspitze DOWEX 50 WX8 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Form) wurde zugefügt und anschließend abzentrifugiert (5000 Upm, 30 min). Der Überstand aus vier parallelen Ansätzen wurde auf eine DOWEX 1 x 8 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Form) Säule (400 µL) aufgetragen. Die Säule wurde mit 25 mL Wasser gewaschen und das Produkt wurde mit 1 mL 2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> eluiert.

### **2.2.12 Aktivitätsbestimmung über NMR mit anaerob gereinigtem IspG-Protein**

In einem Volumen von 600 µL waren 100 mM TRIS/HCl (pH 9), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM Deazaflavin in DMSO, 1 mM DTT, 1,4 µM rekombinantes IspG-Protein und 1 mM [2, 2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- oder [1, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat enthalten. Nach einer Bestrahlung von 30 min durch eine Hg-Dampf Lampe (Osram) wurde die Reaktion mit 15 µL gestoppt und durch 15 µL NaOH neutralisiert. Während der Bestrahlung wurde die Probe auf Eis gelagert. Der Umsatz wurde über NMR bestimmt (vgl. 2.2.1).

### **2.2.13 Eisen- und Schwefelbestimmung von rekombinantem IspG-Protein**

Die Bestimmung von Fe<sup>2+</sup>-Ionen erfolgte nach der Methode von Brumby und Massey (1967). Hierfür wurden folgende Lösungen verwendet:

20 % TCA-Lösung

1 mg/mL 1,10 Phenanthrolinhydrochloridlösung

60 mM Ascorbinsäure

1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

gesättigte NH<sub>4</sub>Ac-Lösung

100 mM TRIS/HCl

1 mM FeCl<sub>3</sub> in 5% TCA-Lösung

Mit der 1 mmolaren FeCl<sub>3</sub> in 5 % TCA-Lösung wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Die Bestimmung erfolgte durch Bildung des Fe(II)-Phenanthrolinkomplexes („Ferroin“). Der Ferroin-Komplex zeigte eine Absorption bei 510 nm. Anhand der Geraden konnte die Menge an Fe<sup>2+</sup>-Ionen in einer Proteinlösung bestimmt werden. Mit Hilfe der Proteinkonzentration konnte das molare Verhältnis berechnet werden.

Die Bestimmung von säurelabilem Schwefel erfolgte durch Bildung von Methyleneblau nach einer Methode von Brumby *et al.* (1965). Folgende Lösung wurde zur Erstellung einer Kalibrierkurve benötigt:

1 % Zn(Ac)<sub>2</sub>-Lösung

12 % NaOH-Lösung

0.1 % N,N-Dimethyl-p-phenylendiammoniumchlorid in 5.5 M HCl-Lösung

23 mM FeCl<sub>3</sub> in 1.2 M HCl-Lösung

0.2 mM Na<sub>2</sub>S-Lösung. Die genaue Konzentration wurde über eine iodometrische Titration bestimmt.

Die Bildung von Methyleneblau wurde über die Absorption bei 670 nm bestimmt. Anhand der Geraden konnte die Menge an S<sup>2-</sup>-Ionen in einer Proteinlösung bestimmt werden. Mit Hilfe der Proteinkonzentration konnte das molare Verhältnis berechnet werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 *In vitro*-Assays mit Zellextrakten

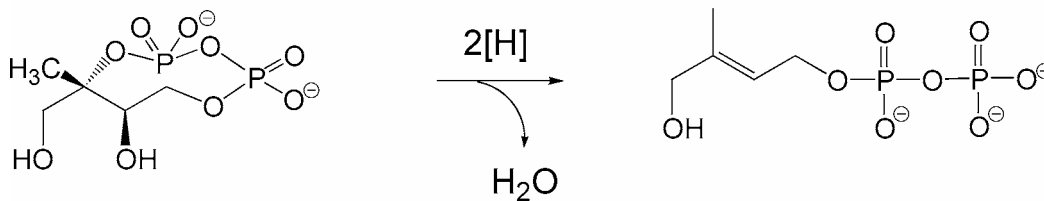


Abbildung 9: Die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion

In Abbildung 9 ist die Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat angegeben. Diese Reaktion wird vom IspG-Protein katalysiert. Das IspG-Protein wurde in verschiedenen Zellextrakten untersucht. Zum einem wurden Zellextrakte aus *E. coli* XL1-pACYCispG Zellen verwendet. Dieser exprimiert das *ispG* Gen, durch das low-copy Plasmid pACYC (Chang und Cohen). Außerdem wurden *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet, welche den Wildtyp darstellen. Die Zellextrakte wurden aerob wie unter 2.2.7.1 präpariert und über HPLC analysiert (vgl. 2.2.5.2, Tabelle 8).

Der Zellextrakt aus *E. coli* XL1-Blue Zellen hatte eine spezifische Aktivität von 2 pmol/(mg min). Der Umsatz von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat durch Zellextrakte aus *E. coli* XL1-pACYCispG, welcher das Gen *ispG* überexprimierten, lag bei einem Maximum von 6 pmol/(mg min). Tabelle 13 zeigt eine Reihe von unterschiedlichen getestet Bedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von zweiwertigen Metallionen sowie einem Elektronendonator abhängig ist. Die höchsten Aktivitäten wurden mit Mn<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> als Metallocofaktor gefunden. Der Elektronendonator war in diesen Fällen NADH. Zn<sup>2+</sup> führte zu einer geringeren Ausbeute an 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Hierbei sollte aber bedacht werden, dass Zinkionen für Phosphatasen essentiell sind und diese im Zellextrakt die Ausbeute an 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat durch Dephosphorylierung verringern können. Das dabei entstehende 1,4-Dihydroxy-2-methyl-2-(*E*)-buten kann durch die hier verwendete Ionenpaarchromatographie nicht mehr detektiert werden.



<i>Assay</i>	<i>Spezifische Aktivität in pmol / (min mg)</i>	<i>Relative Aktivität in %</i>	<i>Bedingungen</i>
1	5.89	100	Mn <sup>2+</sup> ; NADH
2	5.84	99.1	Co <sup>2+</sup> ; FMN; NADH
3	5.60	95.1	Co <sup>2+</sup> ; Mg <sup>2+</sup> ; Mn <sup>2+</sup> ; FMN; NADH
4	5.21	88.5	Co <sup>2+</sup> ; NADH
5	5.00	84.9	Mn <sup>2+</sup> ; FMN
6	4.98	84.6	Mn <sup>2+</sup> ; FMN; NADH
7	4.65	78.9	Mg <sup>2+</sup> ; FMN; NADH
8	4.54	77.1	Mg <sup>2+</sup> ; NADH
9	4.54	77.1	Co <sup>2+</sup> ; NADH
10	3.61	61.3	Mg <sup>2+</sup> ; FMN

**Tabelle 13: Spezifische Aktivitäten von rekombinantem IspG-Protein aus *E. coli* XL1-pAcycispG Zellextrakten unter verschiedenen Bedingungen**

Interessant sind auch die Werte von Assay 5 (Mn<sup>2+</sup>; FMN) und 10 (Mg<sup>2+</sup>; FMN). Hier konnte noch eine relative Aktivität von 84.9 % bzw. 61.3 % erzielt werden, obwohl kein Elektronendonator in Form von NAD(P)H zugegeben wurde. Wahrscheinlich reichten die reduktiven Bedingungen im *E. coli* Zellextrakt oder vorhandenes FMN aus, um diese geringen Substratkonzentration (60 µM) umzusetzen.

Die Ergebnisse bestätigten, dass das *ispG* Gen für die Bildung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat notwendig ist, wie auch schon von Hecht *et al.* (2001) gezeigt werden konnte.

### **3.2 *In vivo*-Untersuchungen zum Elektronenfluss der vom IspG-Protein katalysierten Reaktion**

Um ein besseres Verständnis des Elektronenflusses bei der vom IspG-Protein katalysierten Reaktion zu bekommen, wurden *in vivo*-Untersuchungen mit [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose unternommen (vgl. 2.2.6). Die verwendeten *E. coli* Stämme enthielten zusätzlich zu den Genen des alternativen Terpenisoprenoidwegs (*ispC*, *ispD*, *ispE*, *ispF* und *ispG*), Gene, welche für Elektronentransponder Protein (Abkürzungen in der Plasmidbezeichnung: fdx –

Ferredoxin, fldA – Flavodoxin und fpr – Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase) codieren. Außerdem war die Coexpression des *xylB* Gens (x in der Plasmidbezeichnung) notwendig, um die *in vivo*-Umwandlung von exogen zugeführte [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose in [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu gewährleisten (Wungsintaweeikul *et al.* (2001)). Drei Stämme (XL1-pBSxispC-GfldAfpr-pAcyciscSfdx, XL1-pBSxispC-Gfdxfpr-pAcyciscSfdx und XL1-pBSxispC-G-pAcyciscSfdx) enthielten außerdem die Gene des *isc*-Operons. Die Proteine, welche vom *isc*-Operon codiert werden, sind an dem molekularen Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt (Zheng *et al.* (1998)). Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Gene auf den jeweiligen Plasmiden.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide in den *in vivo*-Untersuchungen

In Tabelle 14 sind die verwendeten *E. coli* Stämme und das bei Einbauversuchen mit [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Desoxy-D-xylulose entstandene %-Verhältnis von [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat zu [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat aufgelistet.

<i>E. coli</i> Stamm	%-Verhältnis von $[U-^{13}C_5]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-diphosphat zu $[U-^{13}C_5]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat
XL1-pBSxispC-F	0
XL1-pBSxispC-G	10,6%
XL1-pBSxispC-G-pAcyciscSfdx	n. b.
XL1-pBS-xispC-GfldAfpr	40,2%
XL1-pBSxispC-GfldAfpr-pAcyciscSfdx	n. b.
XL1-pBSxispC-Gfdxfpr	14,1%
XL1-pBSxispC-Gfdxfpr-pAcyciscSfdx	33,2%

**Tabelle 14:** Die %-Bildung von  $[U-^{13}C_5]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat aus exogen zugeführtem  $[U-^{13}C_5]$ 1-Desoxy-D-xylulose aus verschiedene *E. coli* Stämmen

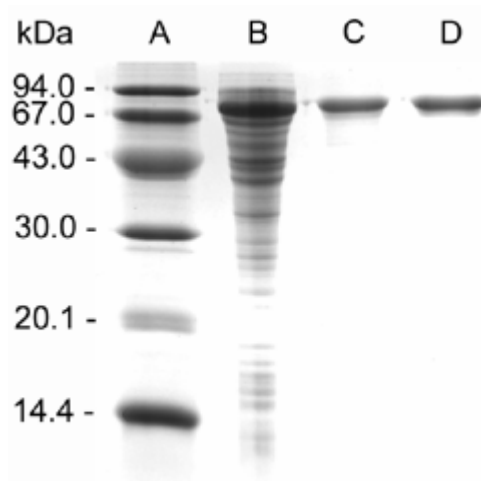
Einen Hinweis darauf, dass das IspG-Protein einen Eisen-Schwefel-Cluster besitzt, gibt der Vergleich der letzten beiden *E. coli* Stämme aufgelistet in Tabelle 14 (XL1-pBSxispC-Gfdxfpr und XL1-pBSxispC-Gfdxfpr-pAcyciscSfdx). Hierbei zeigt sich eine Verdopplung der gebildeten  $[U-^{13}C_5]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat Menge bei zusätzlicher Expression der Gene des *isc*-Operons.

Außerdem ist in Tabelle 14 zu erkennen, dass die Menge an gebildetem  $[U-^{13}C_5]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat durch die Coexpression von Genen, welche für Elektronentransponderproteine codieren, höher ist im Vergleich zu *E. coli* Stämmen, in denen diese Gene nicht überexprimiert werden (XL1-pBSxispC-G), hat der *E. coli* Stamm, welcher zusätzlich noch die Gene für die Proteine Flavodoxin und Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-reduktase exprimiert (XL1-pBS-xispC-GfldAfpr) eine vierfach erhöhte Aktivität. Dies spricht dafür, dass die Elektronenübertragung vom NADPH nicht direkt auf das IspG-Protein erfolgt, sondern über Flavodoxin und Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase. Die Coexpression des Gens für Ferredoxin anstelle von Flavodoxin brachte immerhin auch eine Verbesserung der Aktivität um den Faktor 1.4, was darauf schließen lässt, dass Ferredoxin anstelle von Flavodoxin als Elektronentransponder fungieren kann. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Tatsache, dass Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase sowohl Flavodoxin als auch Ferredoxin als Enzymsubstrat für Elektronenübertragungen akzeptiert (Bianchi *et al.* (1993)).

### 3.3 *In vitro* Assays mit aerob gereinigtem IspG Protein

#### 3.3.1 Reinigung von rekombinantem IspG-Protein

Wie unter 1.5 angegeben, führte die Reinigung aus XL1-pQE30ispG-Zellen zu unlöslichem IspG-Proteinen (unveröffentlichte Ergebnisse am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie). Das pQE30-Konstrukt stellt einen Überexpressionsstamm dar, welcher das IspG-Protein mit einem His-Tag (6 Histidine am N-Terminus) exprimiert. Hierbei wurde nur unlösliches Protein erhalten. Dies führt zur Herstellung eines Fusionsproteins aus IspG und dem Maltose Binde Protein. Der MBP-Tag besitzt die Eigenschaft unlösliche Proteine in Lösung zu halten und außerdem eignet er sich zur Reinigung des Konstruktes über Affinitätschromatographie an einer Amylose-Säule (Schein (1989)). Für die Reinigung des IspG-Proteins wurden *E. coli* BL21-pMALgcpE Zellen angezogen. Die Zellen wurden wie unter 2.2.9 aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand auf eine Amylosesäule aufgetragen (vgl. 2.2.9.1). Nach dem Waschvorgang mit 0.1 M TRIS/HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl wurde mittels eines linearen Gradienten (0 – 10 mM Maltose im Waschpuffer) das gebundene IspG-Protein eluiert (Retentionsvolumen 32 mL, 18 % Maltose). Das rekombinante IspG-Protein wurde über eine Ultrafiltration ankonzentriert und über eine Gelfiltration mit einer Superdex 200 26/60 Säule (25 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 100 mM KCl) gereinigt. Das Retentionsvolumen betrug bei dieser Säule 57 mL.



**Abbildung 11: SDS-PAGE der aeroben IspG-Protein Reinigung**  
Spur A, Molekulargewichtsmarker; Spur B, Zellextrakt von rekombinanten *E. coli* Zellen, welche IspG-Protein überexpressieren; Spur C, rekombinantes IspG-Protein nach der Amylosesäule; Spur D, rekombinantes IspG-Protein nach der Gelfiltration über eine Superdex G200 Säule

In Abbildung 11 ist das SDS-PAGE der Reinigungen dokumentiert. Die erhaltene Bande zwischen 67.0 und 94.0 kDa stimmt gut mit der aus der Aminosäuresequenz berechneten Masse von 83624 Da überein.

Wie unter 1.4 angegeben, könnte es sich bei dem IspG-Protein um ein Protein mit einem Fe/S-Cluster handeln. Die Lösung des gereinigten Proteins war farblos. Fe/S-Proteine sind hingegen immer gefärbt (Cammack (1992)). Abbildung 12 zeigt, dass von aerob gereinigtem IspG-Protein erhaltene Absorptionsspektrum im UV/Vis-Bereich. Trotz der farblosen IspG-Proteinlösung besitzt das UV/VIS-Spektrum des IspG-Proteins bei ca. 415 nm eine Schulter. Dies spricht dafür, dass es sich doch um einen Eisen-Schwefel-Protein handelt, (Külzer *et al.* (1998); Duin *et al.* (1997); Nakamaru-Ogiso *et al.* (2002); Johnson *et al.* (1982)) was die Vorhersage aus der Primärstruktur bestätigt (vgl. 1.3).

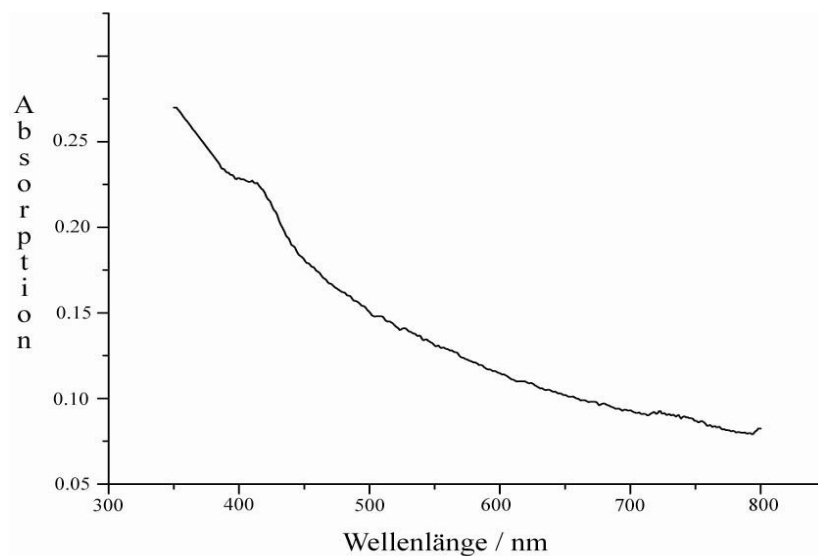
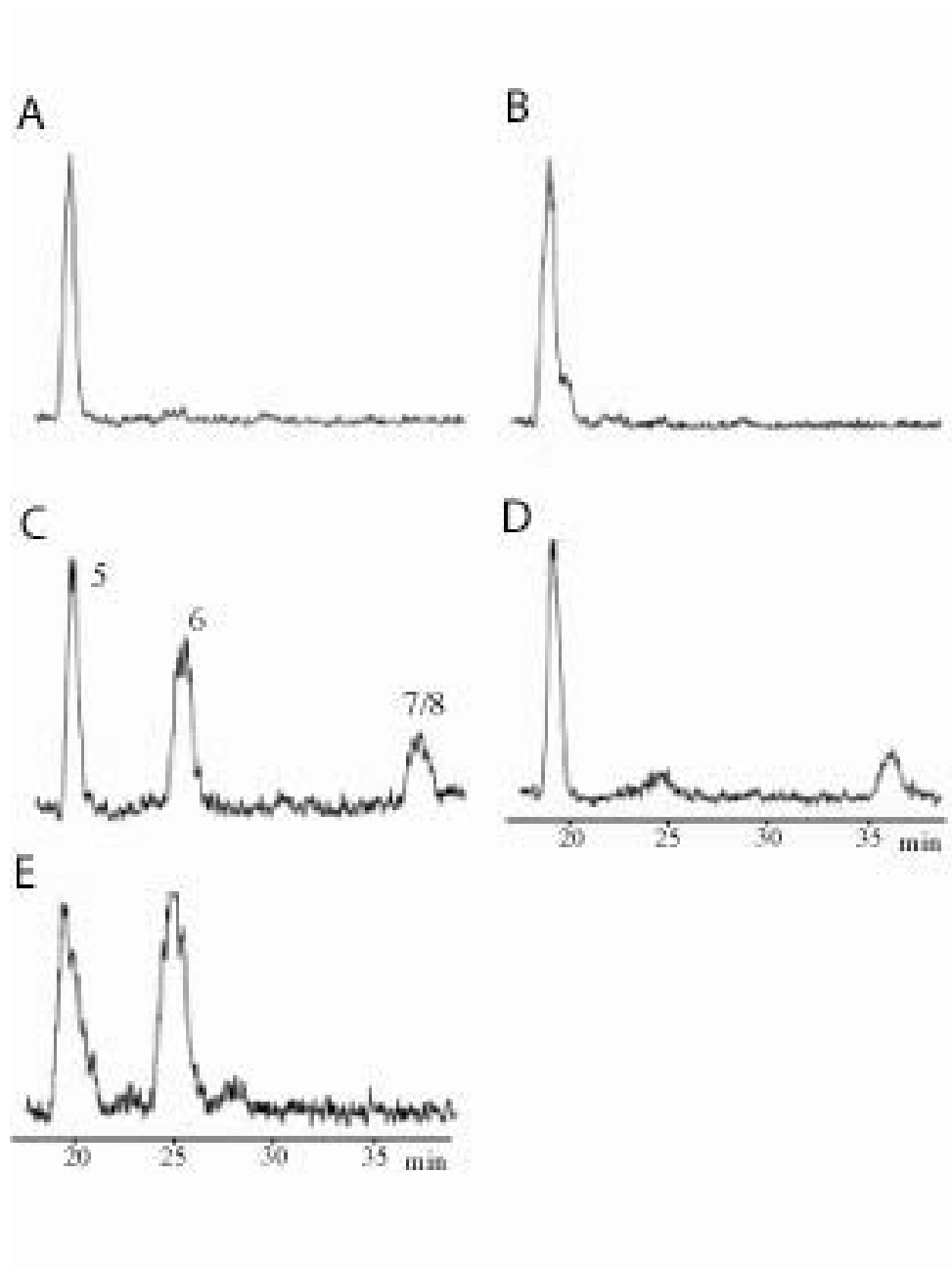


Abbildung 12: UV/VIS Spektrum von aerob gereinigtem IspG-Protein

### 3.3.2 Aktivitätstests mit rekombinantem IspG-Protein

In Abbildung 13 sind verschiedene Assay mit rekombinantem aerob gereinigtem IspG-Protein (A, C und E), einem Wildtyp *E. coli* Zellextrakt (D) und dem Zellextrakt einer *ispG Knock-out* Mutante (B) gezeigt. Die Bestimmung erfolgt über HPLC mittels eines Flüssigszintillationsdetektors (vgl. 2.2.5.2).



**Abbildung 13:** Chromatogramm der enzymatischen Assays von [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat inkubiert mit dem IspG-Protein.

Alle aeroben Assaymischungen (A-D) enthielten 50 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 20 mM NaF, 1 mM NADPH, 200 µM FMN, 1 mM FeCl<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>S, 0.5 mM Pamidronat und 40 µM [[2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

**A:** 180 µg rekombinantes IspG-Protein nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C.

**B:** 3 mg Zellextrakt aus XL1 *E. coli* SK6600ispG::neoR Zellen nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C.

**C:** 3 mg Zellextrakt aus XL1 *E. coli* SK6600ispG::neoR Zellen und 180 µg rekombinantes IspG Protein nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C.

**D:** 3 mg Zellextrakt aus XL1 *E. coli* SK6600 Wildtyp Zellen nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C.

**E:** 180 µg rekombinantes IspG Protein aktiviert durch photoreduziertem Deazaflavin nach 1 h Bestrahlung in anaeroben Quarzküvetten

Die Retentionszeit betrug für [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (5) 19 min, für [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat (6) 24 min und für [3-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]Isopentenylidiphosphat (IPP) (7) sowie für [3-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) (8) 36 min.

Unter diesen Bedingungen, d.h. bei Verwendung von Zellextrakten, bildeten sich auch die Produkte des IspH-Proteins. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität des IspG-Proteins wurde dann die Menge an entstandenem [3-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]IPP und [3-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>] DMAPP miteinbezogen werden. Die Nachweisgrenze der mit dieser Methode bestimmbaren spezifischen Aktivität für das IspG-Protein lag bei 1 pmol/(mg min).

Wie in Spur A in Abbildung 13 gezeigt führte die Inkubation von [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat durch aerob gereinigtes IspG-Protein zu keinen detektierbaren Umsatz. Somit lag die spezifische Aktivität lag bei kleiner als 1 pmol/(mg min).

Für das IspH-Protein konnte gezeigt werden, dass die relativ geringe Aktivität nach der Reinigung durch Zusatz von Zellextrakt aus *E. coli* XL1-Wildtyp Zellen um den Faktor 4.5 erhöht werden konnte (Adam (2002)). Der hier verwendete Zellextrakt war eine chromosomale *ispG*-Knock-out *E. coli* Mutante (*E. coli* XL1 SK6600*ispG*::neo<sup>R</sup>). Durch eine Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass in diese Zellen kein *ispG* Gen expremiert wird (vgl. Abbildung 14, Rohdich *et al.* (2003)). Wie in B in Abbildung 13 zu sehen ist, konnte auch kein Umsatz detektiert werden.



**Abbildung 14: Western Blot Analyse von Zellextrakten aus *E. coli* XL1 SK6600 Wildtyp Zellen (A) und *E. coli* XL1 SK6600*ispG*::neo<sup>R</sup> Zellen (B), entwickelt mit Hasen Antiserum gegen IspG Protein.**

Wurde dagegen der Zellextrakt aus der *E. coli* Mutante mit rekombinantem IspG-Protein zusammen inkubiert, konnte unter optimalen Bedingungen eine spezifische Aktivität von 90

pmol/(mg min) erreicht werden (C in Abbildung 13). Dies stellt eine Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 45, gegenüber der von Zellextrakten aus *E. coli* XL1-SK6600 Wildtyp und um mindestens den Faktor 15 gegenüber dem Zellextrakt aus *E. coli* XL1pAcycgcpE Zellen dar (vgl. Tabelle 13). Das bedeutet, dass das gereinigte IspG-Protein aktivierende Komponenten benötigt. Die im Zellextrakt der chromosomalen *ispG* Knock-out-Mutante vorhanden sind. Bei diesen Komponenten könnte es sich sowohl um niedermolekulare Verbindungen als auch um Proteine, wie Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase (vgl. 3.2), handeln. Der Zellextrakt aus *E. coli* XL1-SK6600, welcher dem Wild-Typ der Mutante entspricht, zeigt eine geringe spezifische Aktivität, die dem Wild-Typ Hintergrund entspricht (D in Abbildung 13).

Mit artifizierlicher Elektronenüberträger wie photoaktiviertes 10-Methyl-5-deaza-isoalloxazin (fortlaufend Deazaflavin genannt) können Eisen-Schwefel-Proteine wie z.B. die Biotin-Synthase aktiviert werden (Méjean *et al.* (1995)). Deshalb wurden im Folgenden Versuche unternommen, gereinigtes IspG-Protein auf die gleiche Art und Weise zu aktivieren.

Die Assays mit photoreduziertem Deazaflavin wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, da die Elektronen vom Deazaflavin ansonsten auf den Sauerstoff übertragen werden. Dithiothreitol (DTT) diente als Elektronendonatoren. In Spur E der Abbildung 13 ist das HPLC Chromatogramm der Umsetzung von [2-<sup>14</sup>C<sub>1</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat mit photoaktiviertem Deazaflavin zu sehen. Hierbei wurde eine spezifische Aktivität von 1 nmol/(mg min) gemessen.

Zeitgleich zu den hier dargestellten Erkenntnissen konnte auch die Gruppe um Rohmer das IspG-Protein mit photoreduziertem Deazaflavin aktivieren und kamen zu dem Schluss, dass das IspG-Protein einen Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe besitzt (Seemann *et al.* (2002)).

Die durch das IspG-Protein katalysierte Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat konnte auch NMR-spektroskopisch verfolgt werden (vgl. 2.2.11.2.3). Als Substrate wurde hierfür [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- bzw. [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat verwendet. Abbildung 15 zeigt einen Ausschnitt bei dieser Reaktion erhaltenen NMR-Spektren. In Tabelle 15 sind die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten für [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- und [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat angegeben.



Position	Chemische Verschiebung ( $\delta$ /ppm)	Kopplungskonstante (J/Hz)	
		$J_{PC}$	$J_{CC}$
	$^{13}C$		
1	66.5 <sup>a</sup>	-	5.3 <sup>a</sup> , 3.2 <sup>a</sup>
2	139.3 <sup>b</sup>	-	42.2 <sup>b</sup>
2'	13.2 <sup>b</sup>	-	42.2 <sup>b</sup>
3	120.7 <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>	49.8 <sup>a</sup> , 3.2 <sup>a</sup>
4	62.0 <sup>a</sup>	5.3 <sup>a</sup>	49.8 <sup>a</sup> , 5.3 <sup>a</sup>

Tabelle 15:  $^{13}C$ -NMR-Parameter für [1,3,4- $^{13}C_3$ ]<sup>a</sup>- und [2,2'- $^{13}C_2$ ]<sup>b</sup>1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat

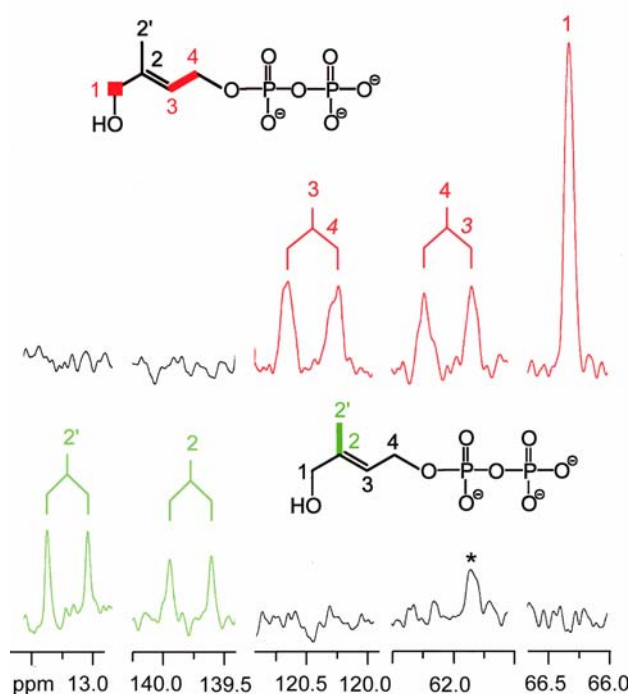


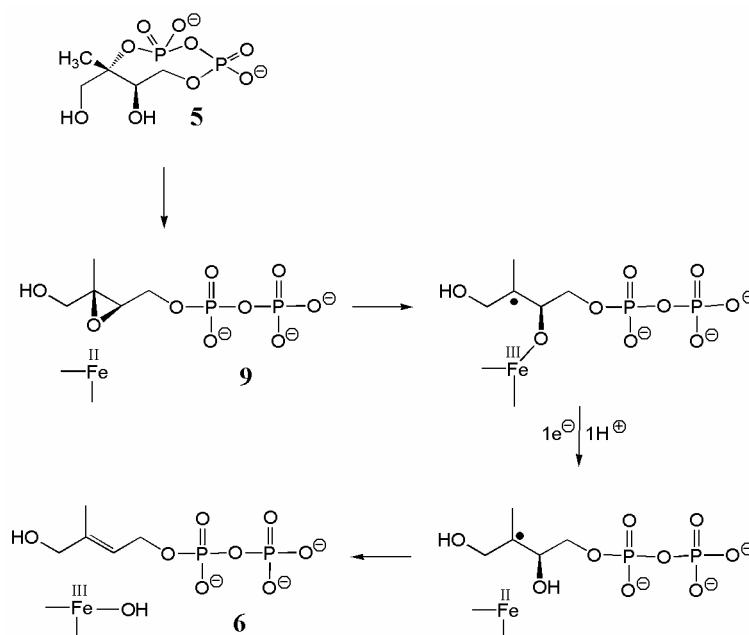
Abbildung 15: NMR-Signale von [2,2'- $^{13}C_2$ ]-und [1,3,4- $^{13}C_3$ ]1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat. \* Signal einer Verunreinigung

Seemann *et al.* (2002) konnte zu dem zeigen, dass das IspG-Protein nicht nur mit photoreduziertem Deazaflavin, sondern auch mit einer Mischung aus Flavodoxin, Flavodoxin-(NADPH)-reduktase und NADPH, mit jedoch geringerer Aktivität, aktiviert werden kann. Diese Gruppe rekonstituierte den Eisen-Schwefel-Cluster im IspG-Protein auf artifizielle Art und Weise, nachdem das Protein gereinigt worden war. Die Rekonstitution erfolgt unter reduzierenden Bedingungen (DTT) mit Hilfe von  $FeCl_3$  und  $Na_2S$ . Seemann *et al.* (2002)

postulierten einen  $[4\text{Fe-4S}]^{+/2+}$  Cluster. Durch die Rekonstitution gibt es aber keine Gewissheit, ob dieser Cluster in nativem Protein vorherrscht. Die Aktivierung mit den Elektronenübertragungsproteinen Flavodoxin, Flavodoxin-( $\text{NADP}^+$ )-Reduktase sowie NADPH konnte zu diesem Zeitpunkt mit aerob gereinigtem IspG-Protein nicht bestätigt werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist ein Mechanismus des IspG-Proteins in Analogie zur Vitamin K Epoxykinon Reduktase und der anaeroben Ribonukleotid Reduktase (vgl. 1.3), wie sie von Hecht *et al.* (2001) vorgeschlagen wurde, eher unwahrscheinlich. Letztere braucht als Radikalinitiator S-Adenosylmethionin (SAM). Es konnten aber bisher im Rahmen dieser Arbeit und anderer Gruppen keine experimentellen Nachweise für eine Erhöhung der IspG-Aktivität in Anwesenheit von SAM gefunden werden.

In Abbildung 16 wird deswegen ein neuer Mechanismus für die vom IspG-Protein katalysierte Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat vorgeschlagen.



**Abbildung 16: Vorgeschlagener Mechanismus für die durch das IspG-Protein katalysierte Reaktion von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**5**) zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (**6**)**

Die Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3 des cyclischen Diphosphates (**5**) bewirkt nach Abgabe eines Protons an eine freie Säuregruppe (Asp oder Glu) eine Isomerisierung zum 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat (Nr. **9** in Abbildung 16). Da Eisen-Schwefel-Cluster

immer nur ein Elektron übertragen, erfolgt die Übertragung der zwei Elektronen aus einer geeigneten Quelle (z. B. Deazaflavin) schrittweise. (Itoh *et al.* (1989)) konnten zeigen, dass synthetische  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster Epoxide zu ihren korrespondierenden Alkenen reduzieren können. Bei der vom IspG-Protein katalysierten Reaktion übernimmt das Epoxid die Rolle des Substrates für den reduktiven Prozess. Unter Berücksichtigung eines alternativen Vorschlags (Seemann *et al.* (2002)) lässt sich die Richtigkeit des hier beschriebenen Mechanismus weiterhin dadurch belegen, dass die Geometrie des Epoxid-Intermediates (gekennzeichnet durch die zwei chiralen Zentren im cyclischen Diphosphat) mit der des Produktes übereinstimmt, was die ausschließliche Bildung des (*E*) Isomers zur Folge hat.

Die Gruppe um Jomaa hat das IspG-Protein aus *Thermus thermophilus* anaerob isoliert und charakterisiert (Kollas *et al.* (2002)). Hierbei konnte eine spezifische Aktivität von 0.6  $\mu\text{mol}/(\text{mg min})$  unter Einsatz von Dithionit als Elektronenquelle erzielt werden. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete aerob gereinigte IspG-Protein, das mit Deazaflavin aktiv war, lieferte unter den von Jomaa beschriebenen Bedingungen keine messbare Aktivität (vgl 3.5.9).

### **3.4 Etablierung anaerober Techniken innerhalb einer Glove Box**

Am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie war bis zu diesem Zeitpunkt keine anaerobe Glove Box vorhanden, somit wurde um anaerob arbeiten zu können und Proteine anaerob zu reinigen, Glove Box in Betrieb genommen.

Die Glove Box stand für Proteinreinigungen und der Durchführung von Assays zur Verfügung. Im Laufe der Zeit wurde festgestellt, dass die Reinigung von Proteinen in der Glove Box eine Kühlung benötigt, da die Temperaturen innerhalb der Box zeitweise über 30°C stiegen. Eine zweite Glove Box von Coy Lab, welche hauptsächlich zur Proteinreinigung verwendet wurde, wurde mit einem Kühlsystem, bestehend aus einem externen Aqua Medic Titan 4000, einer Schlauchpumpe, zwei internen Opel Cora Öllamellenkühlern und einem internen Ventilator ausgestattet. Hierdurch war es möglich, die Temperatur zeitweise auf unter 20 °C zu halten. Die erste Box wurde weiterhin benutzt, um Enzymassays durchzuführen.

Durch die Etablierung der anaeroben Technik ergaben sich auch bei anderen Projekten neue Erkenntnisse. Zum einen ermöglichte es die anaerobe Reinigung von His<sub>6</sub>-Flavodoxin, und His<sub>6</sub>-Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase, wodurch sich neue Erkenntnisse ergaben. Gräwert *et*

*al.* (2004) konnte IspH aus *E. coli* in aktiver Form isolieren und hatte mit anaerob gereinigten Hilfsenzymen eine um den Faktor 200 höhere Aktivität als von Rohdich *et al.* (2003) beschrieben. Dabei spielte aber auch eine große Rolle, dass Gräwert *et al.* (2004) die Gene des *isc*-Operons coexprimiert wurden. Die Gene des *isc*-Operons sind wie bereits erwähnt maßgeblich an der molekularen Konstruktion von Eisen-Schwefel Clustern beteiligt (Zheng *et al.* (1998)). Zum anderen konnte Laupitz *et al.* (2004) zeigen, dass das IdiII-Protein, welches ein Gleichgewicht zwischen IPP und DMAPP einstellt, unter aeroben Bedingungen NADPH in nicht stöchiometrischen Konzentrationen benötigt, wohingegen unter anaeroben Bedingungen keine NADPH erforderlich ist (Laupitz *et al.* (2004)).

### **3.5 Charakterisierung des MPB-IspG-Proteins**

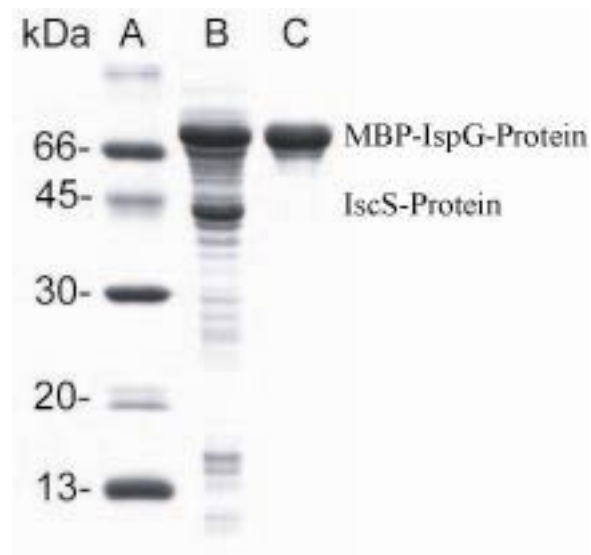
Ähnlich wie für das IspH-Protein bereits gezeigt wurde (Gräwert *et al.* (2004)), konnte auch das IspG-Protein durch die Koexpression des *isc*-Operons aktiviert werden. In Tabelle 16 sind die spezifischen Aktivitäten der Zellextrakte aus drei verschiedenen *E. coli* Klonen (XL1-Blue, XL1-pMALispG und XL1-pMALispG-pACYCisc) aufgelistet. Der *E. coli* XL1-Blue Stamm dient als Vergleich und repräsentiert die Wildtyp-Hintergrund-Aktivität des IspG-Proteins. Der *E. coli* XL1-pMALispG Stamm exprimiert das IspG-Protein als Maltosefusionsprotein über. Der *E. coli* XL1-pMALispG-pACYCisc Stamm besitzt zusätzlich noch die Gene des *isc*-Operons auf dem low-expressions Vektor pACYC. Diese Versuche wurden anaerob in der Glove Box durchgeführt. Beim Vergleich der Zellextrakte erhalten aus den *E. coli* Klonen XL1-pMALispG und XL1-pMALispG-pACYCisc ist zu erkennen, dass die Coexpression der Gene des *isc*-Operons zu einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 4 (ohne Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase im Assay) bzw. um den Faktor 7 (Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase im Assay) führt. Beim Vergleich zum *E. coli* Wildtyp (XL1-Blue) Zellextrakt erhöhten sich die Faktoren zu 33 (getestet ohne Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase im Assay) bzw. 62 (getestet mit Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase im Assay). Diese Befunde deuten darauf hin, dass der Eisen-Schwefel-Cluster im IspG-Protein besser assembliert werden konnte.

<i>E. coli</i> Klon	<i>FldA</i> <i>FldR</i>	und	Spezifische Aktivität ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
Wildtyp	-		0.25
	+		0.5
XL1-pMALispG	-		2.1
	+		4.5
XL1-pMALispG-pACYCisc	-		8.2
	+		31

**Tabelle 16: Einfluss der Koexpression des *isc*-Operons codierten Proteine und Zusatz von rekombinantem FldA (Flavodoxin) und FldR (Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase) im anaeroben Assay auf die *in vitro* Aktivität von rekombinantem IspG-Protein**

### 3.5.1 Anaerobe Reinigung des IspG-Proteins

Das MBP-IspG-Protein wurde anaerob über eine Amylose-Säule (62 mL) mit einem linearen Gradienten von 0 – 10 mM Maltose isoliert (2.2.10.1). Eine exemplarische Reinigung ist in Abbildung 17 dargestellt. Im Zellextrakt (Spur B) erkennt man sowohl die Bande für das MBP-IspG-Protein als auch bei ungefähr 45 kDa die Bande für das IscS-Protein, eines der Proteine des *isc*-Operons.



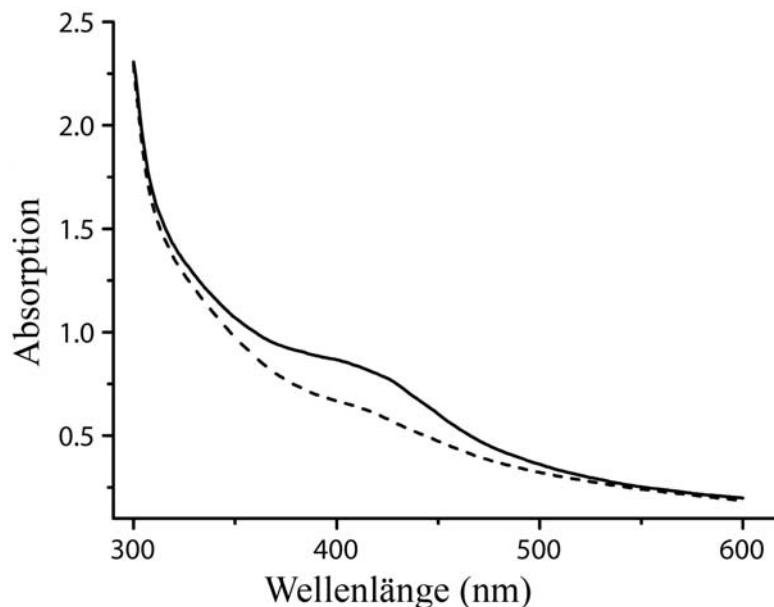
**Abbildung 17: Anaerobe Reinigung von MPB-IspG-Protein aus XL1-pMALispG-pACYCisc über eine Amylose-Säule;  
A: Molekulargewichtsmarker; B: Zellextrakt; C: Gepoolte IspG-Protein Fraktionen**

In Tabelle 17 ist das entsprechende Reinigungsprotokoll angegeben. Durch die Reinigung konnten 70 % der Gesamtaktivität des Zellextraktes erhalten werden. Der Reinigungsfaktor betrug 2.4.

<i>Fraktion</i>	<i>Gesamt-Protein</i>	<i>Spezifische Aktivität</i>	<i>Gesamt-Aktivität</i>	<i>Ausbeute</i>	<i>Reinigungs-faktor</i>
	(mg)	(nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	(nmol min <sup>-1</sup> )	(%)	
Zellextrakt	1083	31	33573	100	1
Amylose-Säule FF	313	74	22162	70	2.4

**Tabelle 17: Reinigungsprotokoll von MBP-IspG-Protein aus *E. coli***

Das IspG-Protein hatte eine leicht bräunliche Farbe, mit einem Absorptionsmaximum bei 410 nm. In Abbildung 18 ist das UV/VIS Spektrum des anaerob gereinigten IspG-Proteins dargestellt. Die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum des anaerob gereinigten Proteins. Im Vergleich zum aerob gereinigten Protein ist die Schulter bei 410 nm deutlicher zuerkennen (vgl. Abbildung 11). Die gestrichelte Linie ergab sich, nachdem das Protein über Nacht O<sub>2</sub> ausgesetzt worden war. Das oxidierte IspG-Protein war inaktiv (spezifische Aktivität < 1 pmol/(mg\*min)).



**Abbildung 18: UV/VIS Spektrum von anaerob gereinigtem IspG-Protein (6.8 mg/ml; 80 µM); Durchgezogene Linie: Anaerobes Protein; gestrichelte Linie: Protein nach O<sub>2</sub>-Exposition**

Die Schulter bei 410 nm, wie schon unter 3.3.1 erläutert, entspricht einem [4Fe-4S] Cluster (Johnson *et al.* (1982); Duin *et al.* (1997); Külzer *et al.* (1998); Nakamaru-Ogiso *et al.* (2002)). Die Eisenanalyse des IspG-Proteins nach Brumby und Massay (1967) lieferte 2.4 Fe pro Enzymuntereinheit und die Schwefelbestimmung lieferte 4.4 S<sup>2-</sup> (nach der Methode von Brumby *et al.* (1965)). Dies deutet auf einen [3Fe-4S] Cluster hin. Die Gruppe um Prof. Rohmer aus Frankreich konnte mit Mössbauer-Spektroskopie zeigen, dass das IspG-Protein einen [4Fe-4S]-Cluster besitzt (Seemann *et al.* (2005)).

Eine MALDI-TOF Analyse lieferte eine Masse von 83941 Da (vgl. 2.2.2). Die berechnete Masse der MBP-IspG-Protein Aminosäuresequenz ergibt 83624 Da. Daraus ergibt sich eine Diskrepanz von 317 Da. Aufgrund der Fe<sup>2+</sup> und S<sup>2-</sup> Bestimmung (vgl. Tabelle 21), sowie der 3 hochkonservierten Cysteine, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen [3Fe-4S]-Cluster handelt. Ist dies der Fall, addiert sich die errechnete Masse vom MBP-IspG-Protein zu 83920. Dies stimmt mit dem gemessenen Wert gut überein.

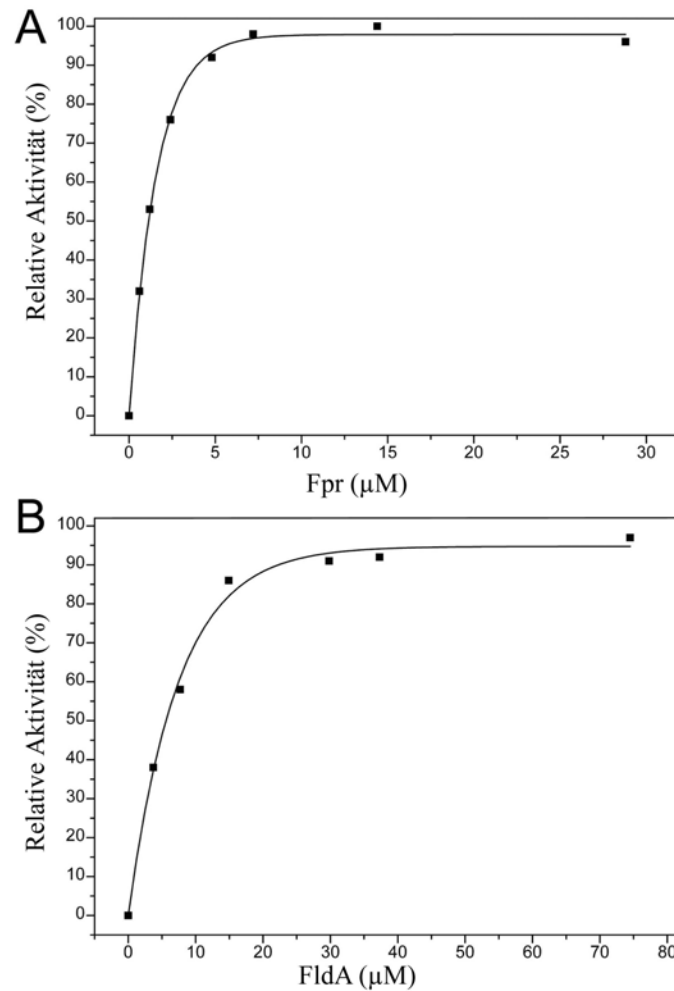
Ein partieller Edman Abbau (vgl. 2.2.3) des MBP-IspG-Proteins lieferte die Sequenz MKIEEGKLV. Dies entspricht der Aminosäuresequenz des N-Terminus des Maltose-Binde-Proteins.

### **3.5.2 Aktivierung des IspG-Proteins durch Flavodoxin und Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase**

Unter 3.2 konnte der positive Einfluss der Elektronen-übertragungsproteine Flavodoxin (FldA) und Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase (FldR bzw. Fpr) *in vivo* bereits gezeigt werden. Dies konnte nun auch für das gereinigte IspG-Protein *in vitro* detailliert untersucht werden. Hierbei wurde die Enzymaktivitäten mittels des unter 2.2.11.1.2 beschriebenen Assay bestimmt. Die Konzentrationen von Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase wurden im Bereich von 0 – 80 µM bzw. 0 – 30 µM variiert (vgl. Abbildung 19).

Hierbei zeigte sich, dass die höchste spezifische Aktivität von 74 nmol/(mg\*min) erzielt wurden, wenn 40 µM Flavodoxin, 12 µM Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase im Assay vorhanden waren. Dies entspricht einem 10-fachen molaren Überschuss an Flavodoxin bzw. einem 3-fachen an Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase gegenüber der Konzentration an IspG-Protein. Da beim IspH-Protein in etwa die gleichen Konzentrationen an Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase notwendig sind, um Maximalaktivitäten zu erhalten (Gräwert *et al.* (2004)), scheint es so, dass nicht das molare Verhältnis ausschlaggebend ist,

sondern die absolute Konzentrationen an diesen Elektronenübertragungsproteinen. Im Vergleich hierzu wurde mit der photoreduzierten Aktivierung des IspG-Proteins durch Deazaflavin eine etwas geringere Aktivität von 45 nmol/(mg\*min) gemessen.



**Abbildung 19: Relative IspG-Protein Aktivität in Abhängigkeit von Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase (Fpr) (A) und Flavodoxin (FldA) (B)**

Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse führt zu einem allgemeinem Reaktionsschema des Elektronenflusses ausgehend von NADPH über das Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase, Flavodoxin und 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Synthase auf 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (Abbildung 20).



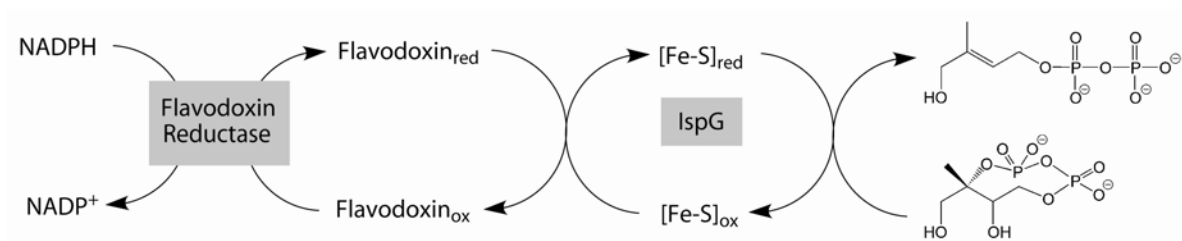


Abbildung 20: Elektronenflussdiagramm bei der durch das IspG-Protein katalysierten Reaktion

### 3.5.3 Abhängigkeit der IspG-Protein Aktivität von Elektronendonatoren

Die IspG-Protein Aktivitäten wurden in Anwesenheit von verschiedenen Elektronendonatoren als Cofaktoren gemäß dem unter 2.2.11.1.2 beschriebenen Assay-System getestet. In Tabelle 18 sind die hierbei erhaltenen relativen spezifischen Aktivitäten zusammengefasst. Hierbei ist zu erkennen, dass das IspG-Protein keine weiteren Cofaktoren benötigt. Die Regeneration des Fe/S-Clusters erfolgt über die Elektronenübertragungsproteine Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase. Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase benötigt NADPH als Elektronendonator. Da SAM keine Aktivitätssteigerung bewirkt, kann der Mechanismus in Analogie zur anaeroben Ribonukleotide-Reduktase (vgl. 1.3) ausgeschlossen werden.

<i>Cofaktor(en)</i>	<i>Relative Spezifische Aktivität in %</i>
NADPH	100
NADPH, SAM	100
NADH, SAM	98,2
NADH	94,7
NADPH, FAD	91,2
NADH, FAD	80,7
NADPH, FMN	80,7
NADH, FMN	57,8
SAM	< 0,02 % (Nachweisgrenze)

Tabelle 18: Relative spezifische Aktivität des IspG-Proteins in Abhängigkeit von verschiedene Elektronendonatoren

### 3.5.4 Abhängigkeit der IspG-Aktivitäten von zweiwertigen Metallionen

Die IspG-Protein Aktivitäten wurden in Anwesenheit von verschiedenen zweiwertigen Metallionen (1 mM) gemäß dem unter 2.2.11.1.2 beschriebenen Assay-System getestet. Hierbei konnte bestätigt werden, dass zweiwertige Metallionen aktivitätssteigernd auf das IspG-Protein wirken. Die höchste Aktivität wurde durch  $Mn^{2+}$ -Ionen erhalten. Dies wurde auch schon mit Zellextrakten aus rekombinanten Stämmen beobachtet (vgl. Tabelle 13). Die Aktivität konnte im Vergleich zu einem Assay ohne  $Mn^{2+}$  um den Faktor 2 gesteigert werden. Andere zweiwertige Metallionen führten auch zu einer Steigerung der Aktivität (vgl. Tabelle 19).

<i>Metallion</i>	<i>EDTA</i>	<i>Relative Aktivität(%)</i>
$Mn^{2+}$	-	100
$Fe^{2+}$	-	89
$Mg^{2+}$	-	75
$Co^{2+}$	-	71
$Ni^{2+}$	-	70
$Ca^{2+}$	-	57
$Zn^{2+}$	-	2
-	-	51
-	+	< 1
$Mn^{2+,a}$	+	25

**Tabelle 19: Relative IspG-Protein-Aktivität in Abhängigkeit zweiwertiger Metallionen. Die Konzentrationen der Metallionen war 1 mM und 10 mM EDTA, <sup>a</sup>) 15 mM  $Mn^{2+}$**

Nur  $Zn^{2+}$  reduzierte die Aktivität auf 2 % verglichen mit der Aktivität unter Zugabe von  $Mn^{2+}$ . Die Aktivität konnte unter Zugabe von EDTA auf < 1% verringert werden. Durch Zugabe von  $Mn^{2+}$  im Überschuss konnte die Aktivität wieder auf  $\frac{1}{4}$  der ursprünglichen Aktivität erhöht werden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Zugabe von EDTA ein für die Aktivität des IspG-Proteins wichtiges zweiwertiges Metall komplexiert wird. Durch die

Zugabe von  $Mn^{2+}$  im Überschuss gegenüber EDTA kann die relative Aktivität wieder auf 25 % hergestellt werden. Der Eisen-Schwefel-Cluster wird durch das EDTA nicht zerstört.

### 3.5.5 pH-Abhängigkeit der IspG-Protein Aktivität

Die pH-Abhängigkeit des IspG-Proteins wurde mit einer Puffermischung im pH Bereich von 6 bis 11 bestimmt. Die IspG-Protein Aktivitäten wurden in Anwesenheit des Puffersystem bestehend aus 50 mM TRIS/HCl, 50 mM Glycin, 20 Na-phosphat, 50 mM Na-acetat gemäß dem unter 2.2.11.1.2 beschriebenen Assay-System getestet. In Abbildung 20 ist die relative IspG-Protein Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Werte aufgetragen. Hierbei zeigte sich, dass die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von ca. 9 liegt.

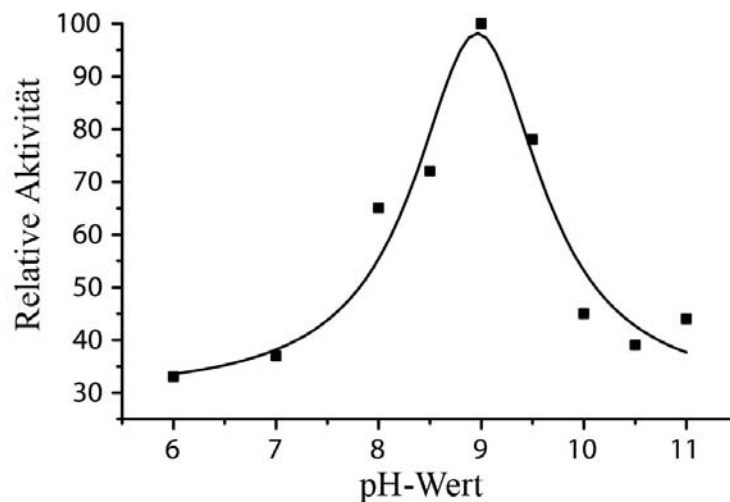
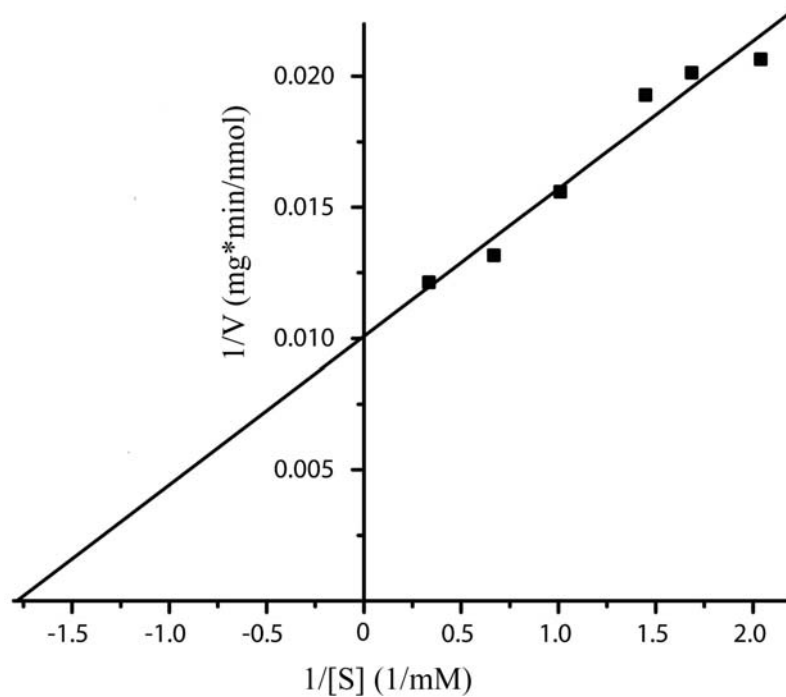


Abbildung 21: Die relative IspG-Protein-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Werte

### 3.5.6 Kinetische Untersuchungen am IspG-Protein

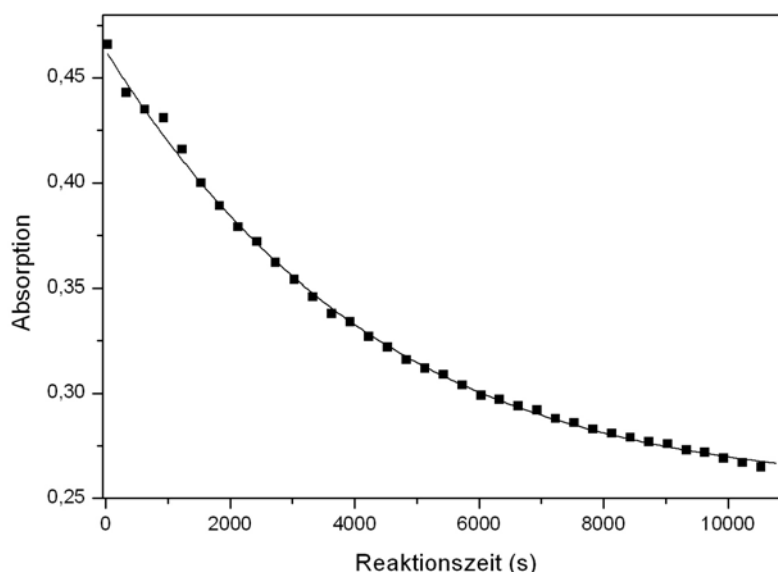
Die kinetischen Parameter  $k_{cat}$ ,  $v_{max}$  und  $K_m$  des IspG-Proteins wurden durch zwei verschiedene Testmethoden bestimmt. Zum einem wurde der radiochemischen Assay in Abhängigkeit von verschiedenen Substratkonzentration, im Bereich von 0.5 mM bis 3 mM, durchgeführt (vgl. 2.2.11.1.2) Die reziproke Darstellung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit von der reziproke Substratkonzentration ist in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22: Linweaver-Burk-Darstellung der spezifischen IspG-Protein Raten in Abhängigkeit der Substratkonzentration**

$V_{\max}$  wurde hierbei zu  $0.1 \mu\text{mol}/(\text{mg min})$  bestimmt und der  $K_m$ -Wert lag bei  $560 \mu\text{M}$ . Der  $k_{\text{cat}}$  Wert berechnet sich somit zu  $0.14 \text{ s}^{-1}$  bestimmt aus der Linweaver Burk Darstellung.

Die zweite Methode war die photometrisch Bestimmung der zeitliche Abnahme der NADPH Konzentration mit anschließender Auswertung über das Biokin Programm (Kuzmic (1996)). Man vergleiche hierzu den unter 2.2.11.1.3 beschriebenen Assay. Die zeitliche Abnahme der Absorption (Quadrate) sowie die berechnete Kurve (Linie) zeigt Abbildung 23. Die hieraus berechneten Werte für  $K_m$  ( $700 \mu\text{M}$ ) und  $k_{\text{cat}}$  ( $0.22 \text{ s}^{-1}$ ) stehen in guter Übereinstimmung mit den Werten aus der Linweaver-Burk Darstellung. Mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie wurde die vollständige Umwandlung des  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  zu  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]1\text{-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$  des photometrischen Testes bestätigt.



**Abbildung 23: Abnahme der NADPH-Konzentration während der IspG-Reaktion und Bestimmung der kinetischen Parameter des IspG-Proteins mit Hilfe des Biokin Programms (Kuzmic (1996)).**

Eine Zusammenstellung der  $K_m$ - und der  $k_{cat}$ -Werte aus den verschiedenen Assays zeigt Tabelle 20. Die Werte aus dem radiochemischen „Deazaflavin-Assays“ (vgl. 2.2.11.2.2) und dem „NMR-Assay“ (vgl. 2.2.11.1.4) wurden unter *initial rate* Bedingungen bestimmt.  $K_m$ -Werte wurden für diese Assays nicht bestimmt. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung bei allen verwendeten Assay-Methoden.

<i>Methode</i>	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
Radiochemischer Assay mit FldA, FldR und NADPH	560	0.14
mit photoreduziertem Deazaflavin	n.b.	0.06
Photometrischer Assay	700	0.22
NMR Assay mit (FldA, FldR und NADPH)	n.b.	0.14
mit photoreduziertem Deazaflavin	n.b.	0.09

**Tabelle 20: Zusammenfassung der kinetischen Parameter des IspG-Proteins, über verschiedene Methoden ermittelt**

### 3.5.7 Die Cysteine 270, 273 und 306 im IspG-Protein als Liganden des Eisen-Schwefel-Clusters

Um zu untersuchen ob die drei hochkonservierten Cysteine 270, 273 und 306 im IspG-Protein (vgl. Abbildung 5) Liganden für den Eisen-Schwefel-Cluster darstellen, wurden die drei entsprechenden Punktmutanten hergestellt (Kaiser (2005), Gräwert (unveröffentlicht)). Die jeweiligen IspG-Punktmutantenproteine wurden, aus den entsprechenden Klonen (XL1-pMALispGC270S-pACYCiscS, XL1-pMALispGC273S-pACYCiscS und XL1-pMALispGC273S-pACYCiscS) wie das nicht punktmutierte Wildtyp Isp-G-Protein wie unter 2.2.10.1 beschrieben, isoliert. Anschließend wurden die enzymatischen Aktivitäten dieser Proteine bestimmt (vgl. 2.2.11.1.2). In Tabelle 21 sind die spezifischen Enzymaktivitäten zusammen mit den jeweiligen Eisen- und Schwefelgehalten der 4 verschiedenen IspG-Proteine zusammengefasst.

Der Eisengehalt der mutierten Proteine lag nur noch bei maximal 6 % im Vergleich zu Wildtyp-Protein und der Sulfidgehalt bei maximal 23 %. Die katalytische Aktivität der mit einer Punktmutation versehenen IspG-Proteine fiel unter die Nachweisgrenze ( $< 1 \text{ pmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ). Dies zeigt, dass die drei hochkonservierten Cysteine als Liganden für den Eisen-Schwefel-Cluster fungieren und für die Aktivität des IspG-Proteins essentiell sind.

<i>Mutation</i>	<i>Eisengehalt</i>	<i>Schwefelgehalt</i>	<i>Katalytische Aktivität</i>	
	(mol/mol)	(mol/mol)	(nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	%
Keine	2.4	4.4	74	100
C270S	0.13	0.6	<0.001	<0.0014
C273S	0.14	0.7	<0.001	<0.0014
C306S	0.07	1	<0.001	<0.0014

**Tabelle 21: Katalytische Aktivitäten, Eisen- und Schwefelgehalt der IspG-Cys-Punktmutanten-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein**

### 3.5.8 Detektion der IspG-Reaktion mittels NMR-Spektroskopie

Die spezifischen Aktivitäten des IspG-Proteins wurden auch mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie untersucht. Hierbei wurden die unterschiedlich markierten Substrate [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- und [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat verwendet. In

Abbildung 24 sind die jeweiligen NMR-Spektren der Umwandlung von  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (C und D) dargestellt. A und B zeigt die Umsetzung von  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Hierbei konnte eine spezifische Aktivität von  $0,1 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  unter Verwendung von Flavodoxin, Flavodoxin-( $\text{NADP}^+$ )-Reduktase und NADPH als Elektronentransponder (vgl. 2.2.12), bestimmt werden (*initial rate* Bedingungen).

Bei der Verwendung von photoreduziertem Deazaflavin als Elektronentransponder in einem NMR-Assay (vgl. 2.2.11.1.4) konnte unter *initial rate* Bedingungen eine spezifische Aktivität von  $64 \text{ nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  erzielt werden.

Wie auch schon beim radiochemischen Assay beobachtet (vgl. 3.5.2), ist die Effizienz der Elektronenübertragung durch Flavodoxin, Flavodoxin-( $\text{NADP}^+$ )-Reduktase besser als mit photoreduziertem Deazaflavin. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das System aus Flavodoxin und Flavodoxin-( $\text{NADP}^+$ )-Reduktase auch tatsächlich unter physiologischen Bedingungen als Regenerationssystem des Eisen-Schwefel-Cluster im IspG-Protein fungiert.

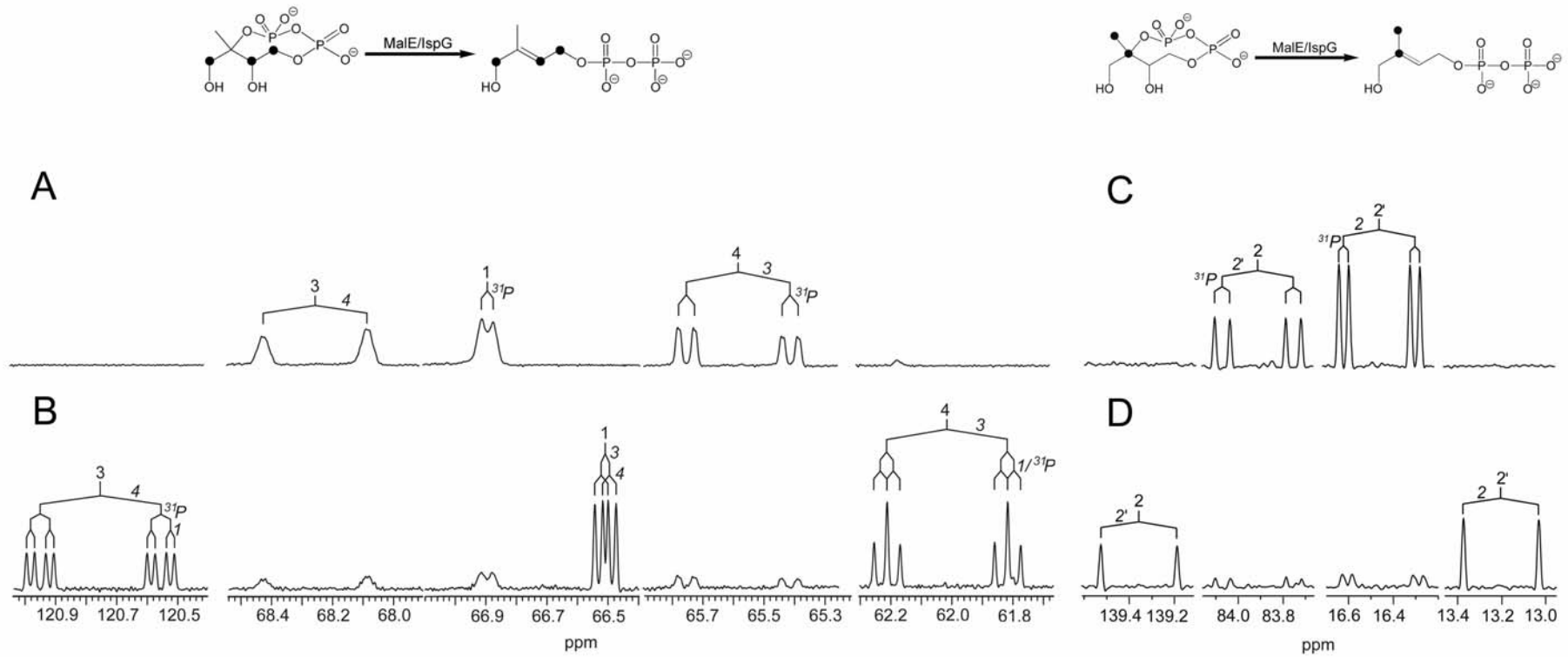


Abbildung 24: NMR-Assay mit IspG-Protein mit [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- bzw. [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat als Substrat.

(A) Ausschnitt aus dem NMR Spektrum von [1,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat vor und (B) nach beendeter Inkubation; (C) Ausschnitt aus dem NMR Spektrum von [2,2'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat vor und (D) nach beendeter Inkubation



### 3.5.9 Vergleich der Aktivitäten verschiedener IspG-Proteine

In Tabelle 22 sind alle zum jetzigen Zeitpunkt in der Literatur beschriebenen Enzymaktivitäten von IspG-Proteinen verschiedenen Ursprungs zusammengefasst. Rohmer und Mitarbeiter reinigten sowohl rekombinantes IspG-Protein unter aeroben Bedingungen sowohl aus *E. coli* als auch aus *A. thaliana*. (Seemann *et al.* (2002); Seemann *et al.* (2005)). Beide IspG-Proteine waren zunächst inaktiv, konnten aber durch Behandlung mit FeCl<sub>3</sub> und Na<sub>2</sub>S unter reduzierenden Bedingungen (DTT) aktiviert werden, sodass diese mit photoreduziertem Deazaflavin, und im Fall des *E. coli* Proteins zusätzlich auch mit Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-reduktase und NADPH, enzymatisch aktiv waren (Seemann *et al.* (2002); Seemann *et al.* (2005)).

Das hier untersuchte IspG-Fusionsprotein hat eine Gesamtmasse von ca. 84 kDa mit einer N-terminalen MBP- und einer C-terminalen IspG-Domäne (vgl. 3.5 und Abbildung 17). Die bakteriellen IspG-Proteine in anderen Studien (Kollas *et al.* (2002); Seemann *et al.* (2002)) hatten eine molare Masse im Bereich von 43-44 kDa und das pflanzliche IspG-Protein eine Masse von ca. 80 kDa (Seemann *et al.* (2005)). Um die spezifischen Aktivitäten besser vergleichen zu können, wurden diese in die entsprechenden Turn-over numbers ( $k_{cat}$ -Werte) umgerechnet, die von den molaren Massen unabhängige sind.

Im Vergleich zur Studie der Gruppe um Prof. Rohmer in der das *E. coli* IspG-Protein zu nächst durch eine künstliche Rekonstitution aktiviert werden musste (siehe oben), benötigte das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete IspG-Protein keine aktivierende Behandlungen und wies eine um den Faktor 100 höhere Aktivität auf (vgl. Tabelle 22). Die mit photoreduziertem Deazaflavin bestimmte Aktivität des IspG-Proteins aus *A. thaliana* (Seemann *et al.* (2005)) nach Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters liegt im Bereich der in dieser Arbeit unter gleichen Bedingungen bestimmten Aktivität für das *E. coli* IspG-Protein (vgl. Tabelle 22).

Ergebnisse und Diskussion

Organismus	Rekombinantes Enzym	Molare Masse (kg/mol)	Isolation	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )			$K_m$ ( $\mu M$ )	Eisen pro Untereinheit (Mol/Mol)	Referenz
				FldR/FldA <sup>a</sup>	DAF <sup>b</sup>	DT <sup>c</sup>			
<i>E. coli</i>	MBP Fusion	84	Aerob	0.0001 <sup>d</sup>	0.0014	n.b.	n. b.	n.b.	Diese Doktorarbeit
		84	Anaerob <sup>e</sup>	0.14-0.22	0.06	$< 1.4 \times 10^{-6}$	560 bzw. 700	2.4	Diese Doktorarbeit
	Histidin-Tag	43	Aerob	u.N.	u.N.	n.b.	n. b.	n.b.	Seemann <i>et al.</i> (2002)
			Rekonstituiert <sup>f</sup>	0.0014 <sup>f</sup>	0.021 <sup>f</sup>	n.b.	n. b.	4.4	Seemann <i>et al.</i> (2002)
<i>T. thermophilus</i>	Histidin-Tag	44	Anaerob	n.b.	n.b.	0.4	420	n.b.	Kollas <i>et al.</i> (2002)
<i>A. thaliana</i>	Histidin-Tag	80	Aerob	u.N.	u.N.	n.b.	n. b.	n.b.	Seemann <i>et al.</i> (2005)
		80	Rekonstituiert	u.N.	0.21	n.b.	n. b.	4.6	Seemann <i>et al.</i> (2005)

Tabelle 22: Zusammenfassung aller in der Literatur beschriebenen Enzymaktivitäten (umgerechnet in  $k_{cat}$ -Werte) verschiedener IspG-Proteine

<sup>a</sup>getestet mit rekombinanten Flavodoxin (FldA) und Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase (FldR) sowie NADPH als Elektronendonoren

<sup>b</sup>getestet mit photoreduziertem Deazaflavin (DAF) als Elektronendonator

<sup>c</sup>getestet mit Dithionit (DT) als Elektronendonator at 55 °C

<sup>d</sup>getestet mit dem Zellextrakt einer chromosomalen *E. coli ispG*-Knockout-Mutante zusammen mit FeCl<sub>3</sub> und Na<sub>2</sub>S (ohne rekombinantes FldA und FldR)

<sup>e</sup>von einem *E. coli* Klon, der den *isc* Operon übererexprimiert

<sup>f</sup>rekonstituiert mit Na<sub>2</sub>S, FeCl<sub>3</sub> unter reduzierenden Bedingungen (DTT) vor dem Assay

Die Gruppe von Dr. Jomaa untersuchten das IspG-Protein aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* (Kollas *et al.* (2002)). Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert wurde zu  $0.4 \text{ s}^{-1}$  bestimmt, der somit ca. 2-3 höher ist als die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten  $k_{\text{cat}}$ -Werte (vgl. Tabelle 22). Kollas *et al.* (2002) benutzten für die Regeneration des Eisen-Schwefel-Clusters Na-dithionit anstelle von photoreduziertem Deazaflavin bzw. Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und NADPH. Für das im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchte IspG-Protein konnte allerdings keine Aktivität mit Na-dithionit als Reduktionsmittel bestimmt werden (Nachweisgrenze  $< 1.4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ), was darauf hin deutet, dass sich das *E. coli* Protein in seinen biochemischen Eigenschaften vom thermophilen Ortholog unterscheidet. Hierbei sollte beachtet werden, dass die Aktivität des IspG-Proteins aus *Thermus thermophilus* bei 55 °C bestimmt wurde, wohingegen das hier untersuchte IspG-Protein aus *E. coli* bei 37 °C untersucht wurde. Bei einer Inkubation des hier untersuchten IspG-Proteins mit Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und Nadithionit konnte hingegen eine vergleichbare spezifische Aktivität, wie mit NADPH als Elektronendonator, erzielt werden. Kollas *et al.* (2002) bestimmten einen  $K_{\text{m}}$ -Wert von 420  $\mu\text{M}$  für das IspG-Protein aus *Thermus thermophilus*. Dieser  $K_{\text{m}}$ -Wert liegt im ähnlichen Bereich wie im Rahmen dieser Arbeit für das *E. coli* Protein bestimmt worden ist (vgl. Tabelle 22). Der  $K_{\text{m}}$ -Wert wurde für das IspG-Protein aus *E. coli* zum einen über den radiochemischen Assay (vgl. 2.2.11.1.2) zu 560  $\mu\text{M}$  und zum anderen über den photometrischen Assay (vgl. 2.2.11.1.3) zu 700  $\mu\text{M}$  bestimmt (vgl. Tabelle 22).

Das unter aeroben Bedingungen gereinigte IspG-Protein, konnte sowohl durch Zugabe von Zellextrakt einer *E. coli ispG Knock-out* Mutante als auch mit photoreduziertem Deazaflavin aktiviert werden (vgl. 3.3.2). Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert mit photoreduziertem Deazaflavin wurde für das aerob gereinigte IspG-Protein zu  $0.0014 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert für das anaerob gereinigte Protein, welches aus einem Stamm isoliert wurde, der zusätzlich den *isc*-Operon coexprimiert, wurde mit  $0.06 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 43. Bei der Verwendung des physiologischen Systems, im Falle des aerob gereinigten Proteins der Zellextrakt aus einer *E. coli ispG Knock-out* Mutante und im Falle des anaerob gereinigten Proteins Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-reduktase und NADPH, konnte eine Steigerung um den Faktor 1400 bzw. 2200 erzielt werden (vgl. Tabelle 22).

### 3.6 Untersuchungen zum Mechanismus der vom IspG-Protein katalysierten Reaktion

Zur experimentellen Bestätigung des in Abbildung 25 vorgeschlagenen Mechanismus wurde von Herrn Dr. C. Rieder und Prof. D. Arigoni von der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich das 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat (Nr. 9 in Abbildung 25) in  $^{13}\text{C}$ -markierter Form (Rieder (2003)) synthetisiert. Das erhaltene  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat wurde zuerst NMR-spektroskopisch untersucht und anschließend unter verschiedenen Bedingungen mit IspG-Protein aus *E. coli* inkubiert.

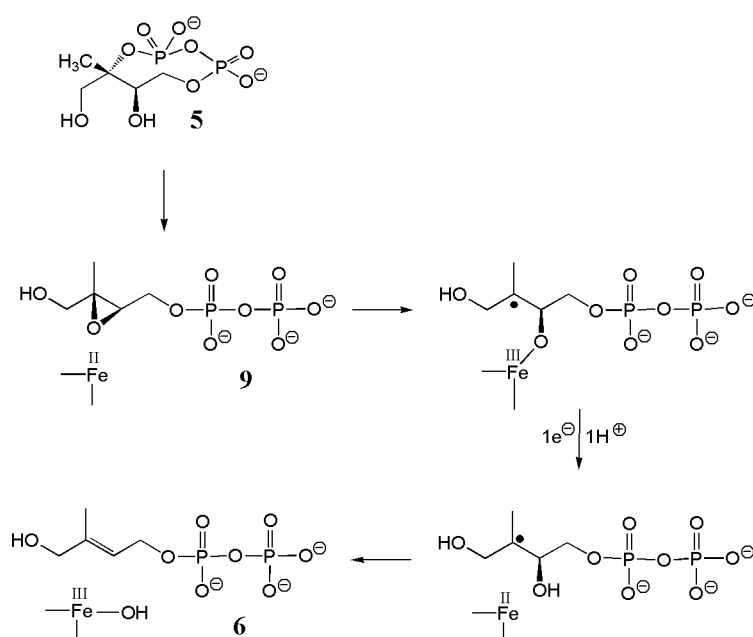


Abbildung 25: Vorgeschlagener Mechanismus für die durch das IspG Protein katalysierte Reaktion von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (5) zu 1-Hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphat (6)

#### 3.6.1 NMR Untersuchungen von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat

In Abbildung 26 ist das markierte 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat gezeigt. Die Punkte an C-Atom 1 und 2 symbolisieren die  $^{13}\text{C}$  markierten C-Atome. Durch eindimensionale und zweidimensionale  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie (COSY, HMQC und HMBC) wurde die Struktur von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat bestätigt und die chemischen Verschiebungen zugeordnet (vgl. Tabelle 23).

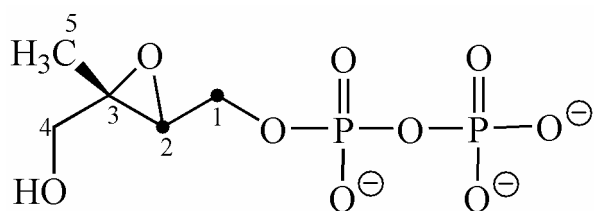


Abbildung 26: [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butylidiphosphat

Abbildung 27 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butylidiphosphat.

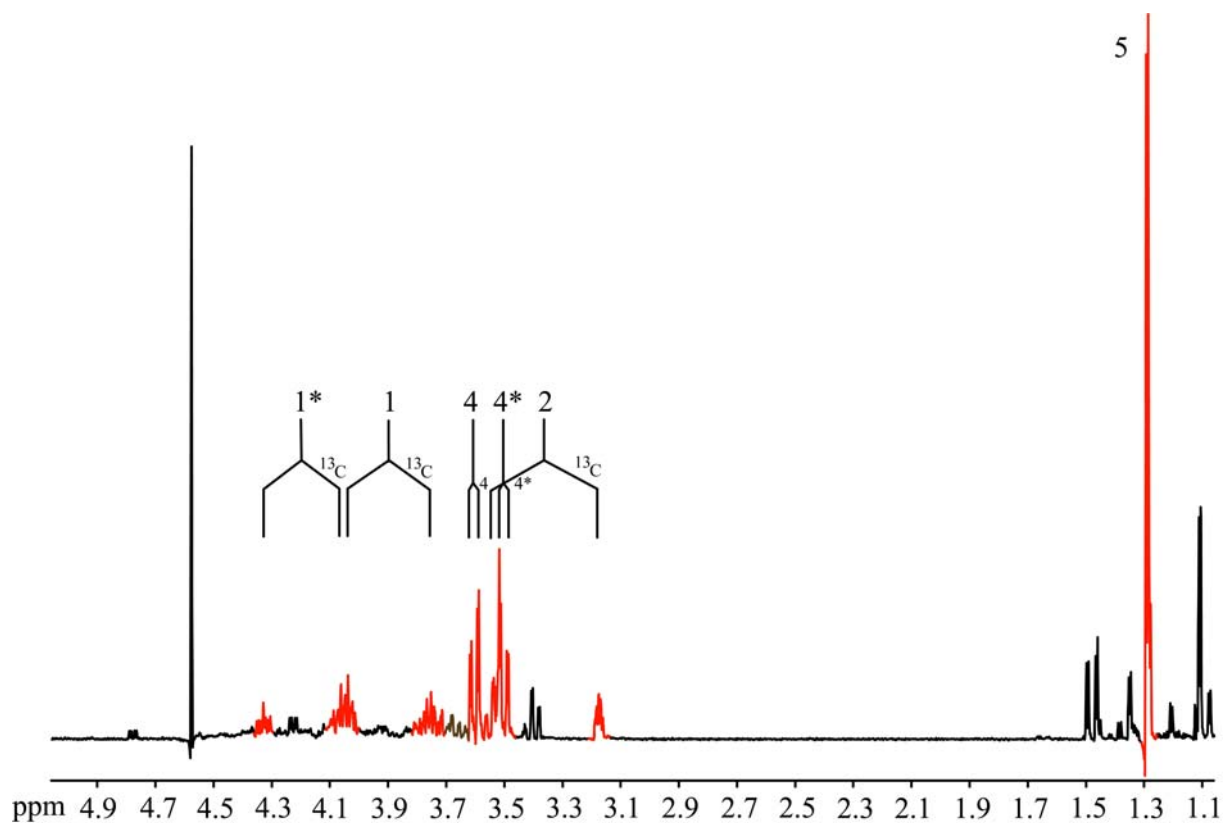
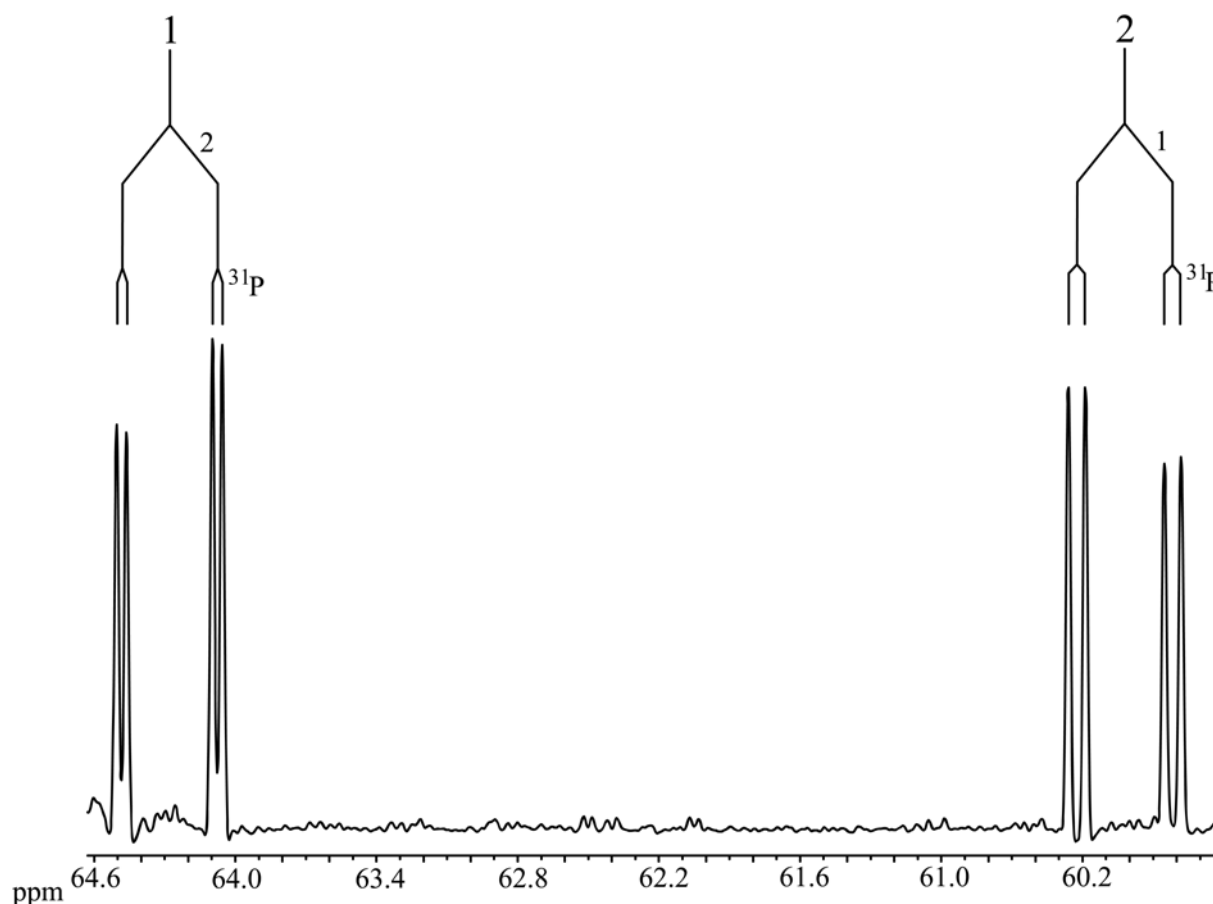


Abbildung 27:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butylidiphosphat (Rote Signale)

In Abbildung 26 ist die Methylgruppe (C-Atom 5) bei 1.28 ppm zu erkennen. Diese koppelt mit dem  $^{13}\text{C}$ -Atom 2 über 3 Bindungen ( $^3J_{\text{CH}} = 3.3 \text{ Hz}$ ). Die Signalgruppen bei 3.62 und 3.72 ppm sind den diastereomeren H-Atomen an C-Atom 4 zuzuordnen. Die  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen ist zu erkennen. Das H-Atom von C-Atom 2 liegt bei 3.41 ppm und zeigt eine große  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplung sowie nicht aufgelöste  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen zu den beiden

diastereomeren H-Atomen von C-Atom 1. Die Signale der beiden diastereomeren H-Atome an C-Atom 1 liegen bei 4.04 bzw. 4.34 ppm und werden durch jeweils eine große  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , und zwei nicht aufgelöste  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Kopplungen aufgespalten. Die  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  Kopplungen sind weder beim Signal von H-3 noch von H-4/4\* aufgelöst.

Abbildung 28 zeigt einen Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums von  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl-diphosphat}$ . Aufgrund von  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ -Kopplungen erscheinen beide  $^{13}\text{C}$ -Atome als Doppeldoublets.



**Abbildung 28:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl-diphosphat}$

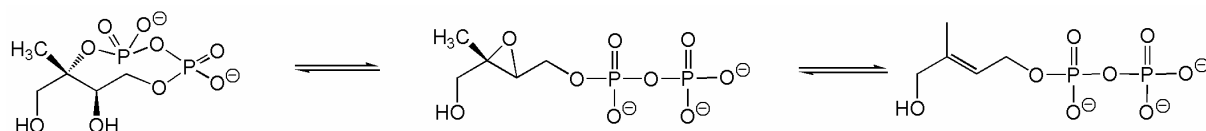
Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten von  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl-diphosphat}$  sind für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie in Tabelle 23 zusammengefasst.

Position	$\delta (^1H)$ in ppm	$\delta (^{13}C)$ in ppm	$J_{HH}$ in Hz	$J_{CH}$ in Hz	$J_{CC}$ in Hz	$J_{PC}$ in Hz
1	4.04	64.3	11.7; 7.7; 3.7	145.7	51.2	5.2
1*	4.34	-	11.7; 6.6; 2.4	149.4	-	-
2	3.41	60.0	7.7; 6.6; 2.7	176.2	51.2	9.0
3	-	n. b.	-	-	n. b.	n. b.
4	3.72	65.6	12.6	2.8	n. b.	n. b.
4*	3.62	-	12.6	2.8	-	-
5	1.28	13.3	n. b.	3.3	n. b.	n. b.

**Tabelle 23:**  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR Parameter für [1,2- $^{13}C_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat.  
\* kennzeichnet das zweite diastereotope H-Atom

Im wässrigen Milieu ist [1,2- $^{13}C_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat nur begrenzt stabil und kann zu 2,3-Diolen hydrolysieren. Ferner finden wahrscheinlich auch intramolekular Isomerisierungs und Cyclisierungsreaktionen mit der HO-Gruppe an C-4 und der Diphosphat-Gruppe an C-1 statt. Neben den Hauptsignalen finden sich in den NMR-Spektren eine Vielzahl an Signalen, die nicht näher zugeordnet wurden. Für die Durchführung der Assays war die Stabilität ausreichend.

### 3.6.2 Enzymassays mit [1,2- $^{13}C_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat als möglichem Intermediat der IspG-Reaktion



**Abbildung 29:** Hypothetischer Verlauf der IspG-Reaktion ausgehend von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

In Abbildung 29 ist der hypothetische Verlauf der IspG-Reaktion über 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat als Intermediat dargestellt. Für den experimentellen Beweis dieser Hypothese wurde  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat mit Zellextrakt aus *E. coli* XL1-pBSxispC-GfldAfpZellen (vgl. 3.2) in Gegenwart von rekombinantem Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und NADPH unter anaeroben Bedingungen inkubiert (vgl. 2.2.7.3). Der hier verwendete Zellextrakt zeigte bei den *in vivo*-Supplementierungsversuchen die höchste Aktivität für das IspG-Protein (vgl. Tabelle 14).

Nach Auswertung der NMR-Spektren konnte festgestellt werden, dass das markierte Epoxid zum markiertem cyclischen Diphosphat isomerisiert wird, aber nicht zum  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat reduziert wird. In Abbildung 30 sind zwei <sup>13</sup>C-NMR-Spektren dargestellt. In Spur A ist das Spektrum zu sehen, welches nach der Inkubation von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat mit Zellextrakt aus *E. coli* XL1-pBSxispC-GfldAfpZellen erhalten wurde. Spur B zeigt zum Vergleich ein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von  $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat. Beim Vergleich der beiden Spektren ist die Übereinstimmung der beiden Signale von C-Atom 3 und 4 zu erkennen, das Signal von C-Atom 1 fehlt bei der Spur A, da dieses im  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat nicht markiert ist. Diese Isomerisierung zu  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat konnte hingegen nicht beobachtet werden, wenn das Epoxid mit Zellextrakt, das kein rekombinantes IspG-Protein enthielt, inkubiert wurde, was darauf hin deutet, dass diese Isomerisierung durch das IspG-Protein katalysiert wird.

Bei Verwendung von  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in einem Kontrollassay konnte unter den gleichen Bedingungen die Bildung von  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat beobachtet werden. Dies bedeutet, dass das rekombinante IspG-Protein in aktiver Form vorlag.



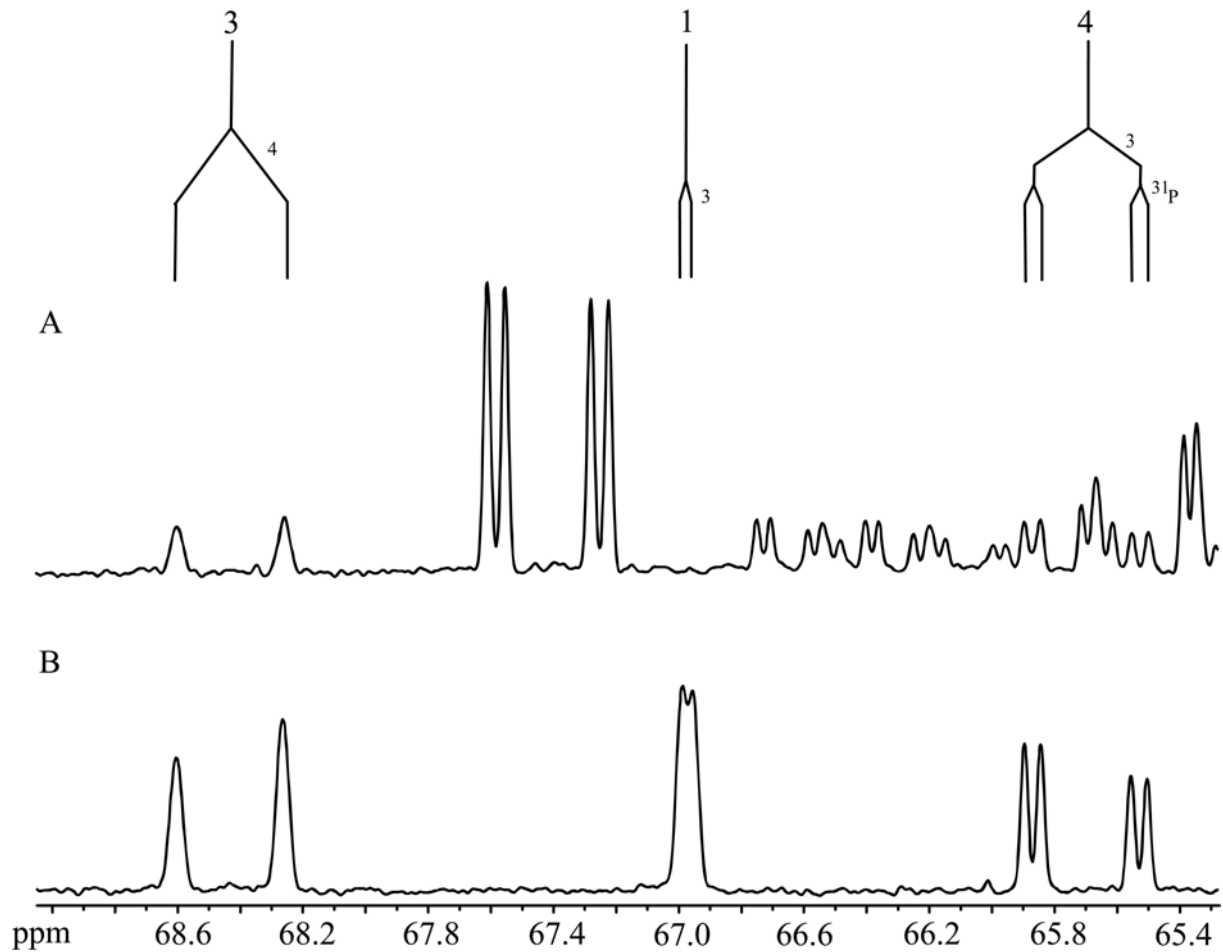
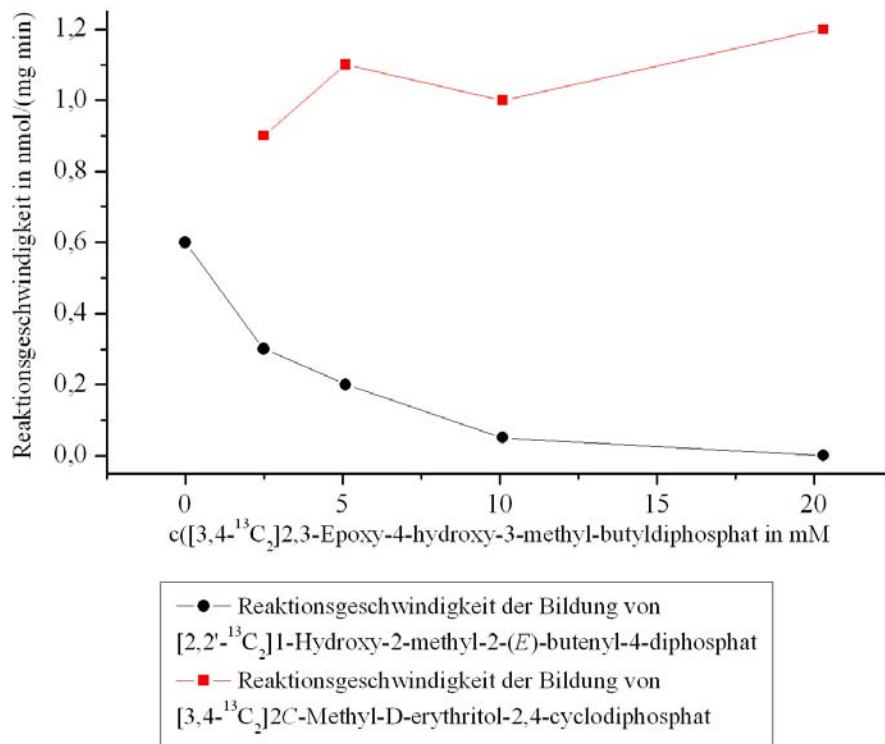


Abbildung 30: (A)  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Isomerisierung von  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat zu  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat katalysiert durch das im Zellextrakt aus *E. coli* XL1-pBSxispC-GfldA<sub>fp</sub>r vorhandene IspG-Protein; (B)  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat

Durch Zutitration von  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat zu  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat im Assay konnte die Bildung von  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat unterdrückt werden. Hierbei wurde bei gleich bleibender  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Konzentration (5.2 mM) die Konzentration an  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat schrittweise von 0 auf 20,3 mM erhöht (vgl. 2.2.7.3). Die spezifischen Aktivitäten des IspG-Proteins in Bezug auf gebildetes  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat und  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat sind in Abbildung 31 wiedergegeben.



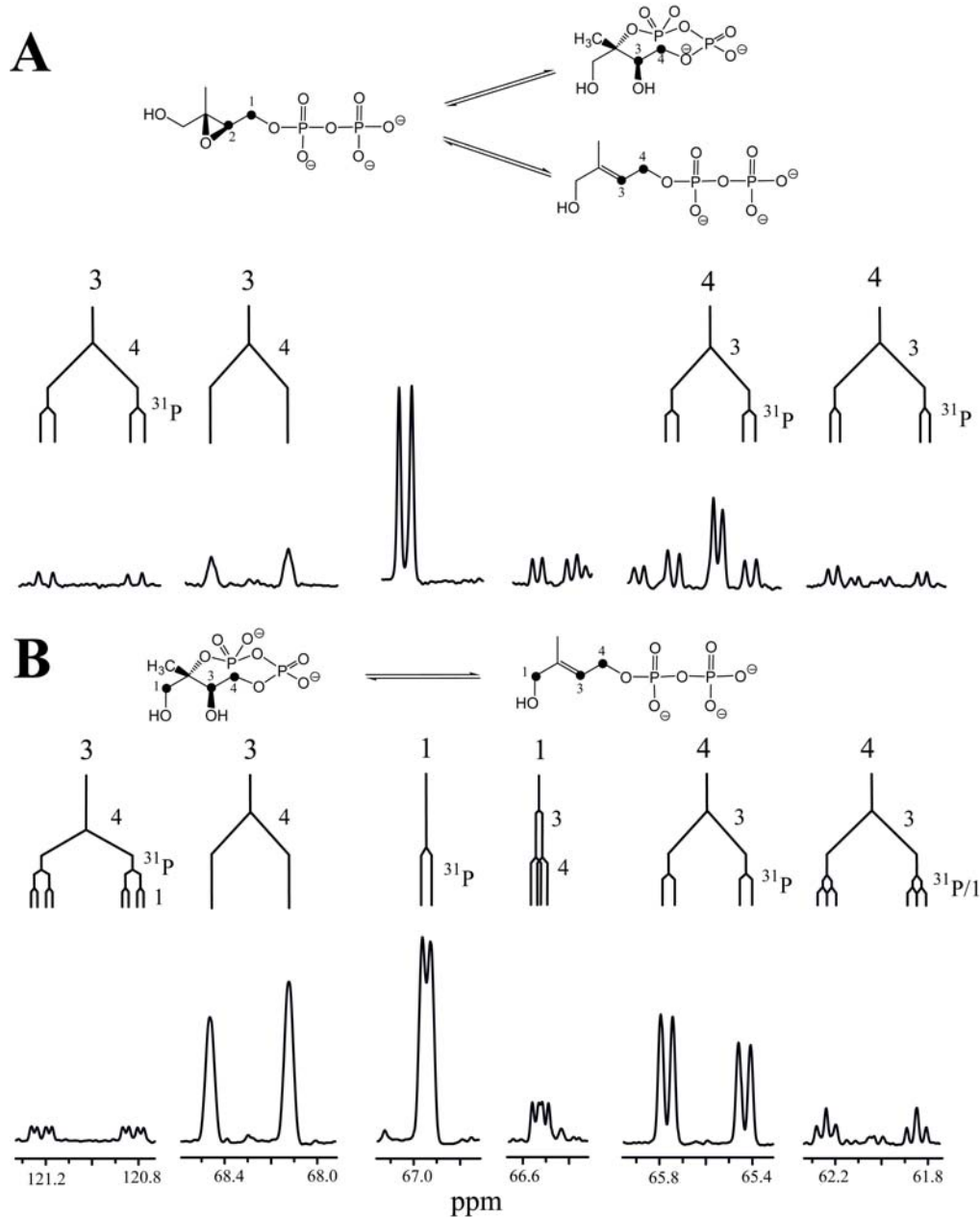
**Abbildung 31: Titrationsexperiment zur IspG-Reaktion mit  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat**

Aus Abbildung 30 ist ersichtlich, dass die Isomerisierungsgeschwindigkeit (■, Abbildung 31) im Konzentrationsbereich von 2.5 mM bis 20.3 mM nahezu konstant bleibt, was auf eine Sättigungssituation hinweisen könnte. In Experiment 2 (2.5 mM  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat) beträgt die Umwandlung von  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat, im Vergleich zu Experiment 1, in dem nur das cyclische Diphosphat eingesetzt wurde, immer noch 50 %. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Experiment das IspG-Protein nicht vollständig mit  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat gesättigt sein kann. Bei ansteigender Konzentration an  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat wird immer weniger  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat in  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat umgewandelt (●, Abbildung 31), bis die Umsatzrate unter die Nachweisgrenze. In Experiment 5 ist das IspG-Protein vollständig mit  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat gesättigt.  $[1,2\text{-}$

$^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat scheint somit vom IspG-Protein besser als das eigentliche Substrat [2,2'- $^{13}\text{C}_2$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat gebunden zu werden. Diese Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass das IspG-Protein in dem Zellextrakt in zwei verschiedenen Formen vorliegt. Eine Form, welche [2,2'- $^{13}\text{C}_2$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat umsetzt und eine zweite, welche nur Isomerase-Aktivität besitzt. Diese könnte mit einer „imperfekten Form“ vom des Proteins identisch sein (Arigoni (2004a)), welcher der Eisen-Schwefel Cluster fehlt.

Bei Verwendung von photoreduziertem Deazaflavin (vgl. 2.2.7.3) wurde sowohl die Isomerisierung von [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat in [3,4- $^{13}\text{C}_2$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat beobachtet, als auch die Umwandlung des ersteren in [3,4- $^{13}\text{C}_2$ ]1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Abbildung 32 zeigt die unter diesen Bedingungen entstandenen Produkte ausgehend von [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat (A). Als Kontrolle diente ein Versuch mit [1,3,4- $^{13}\text{C}_3$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (B). Beim Vergleich der Spektren A und B erkennt man bei beiden Experimenten die Signale des entstandenen [3,4- $^{13}\text{C}_2$ ]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Die Doppelbindung erscheint als Doppeldublett bei 121.0 ppm und das C-Atom 4 auch als Doppeldublett bei 62.0 ppm. Im Spektrum von [1,3,4- $^{13}\text{C}_3$ ]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat (B) sind sowohl C-3 als auch C-4 durch ein weiteres Dublett aufgespalten (Kopplung zu C-1 Atom). Wie bereits erwähnt (vgl. Abbildung 30 und den Text dazu) besitzt [1,3,4- $^{13}\text{C}_3$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat eine zusätzlichen Markierung am C-Atom 1.

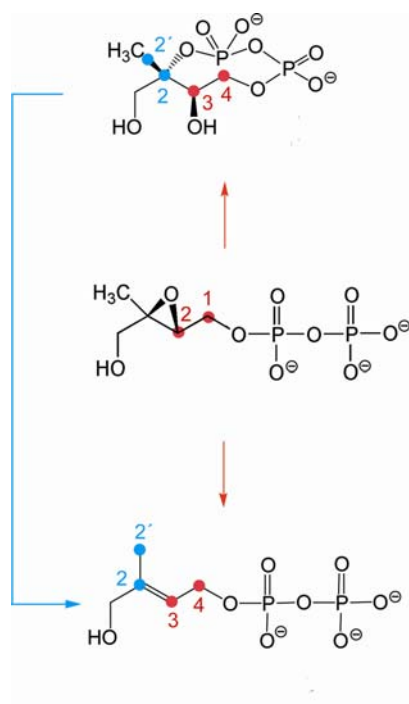
Beim Bestrahlungsexperiment von [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat mit photoreduziertem Deazaflavin in Anwesenheit von IspG-Protein konnte weder die Bildung von [3,4- $^{13}\text{C}_2$ ]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat noch die zu [3,4- $^{13}\text{C}_2$ ]1-Hydroxy-2-methyl-2(*E*)-butenyl-4-diphosphat beobachtet werden. Dieses Kontrollexperiment zeigt, dass [1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat nur in Gegenwart von IspG-Protein sowohl zum Substrat als auch zum Produkt der IspG-Reaktion umgesetzt wird.



**Abbildung 32:** Ausschnitt aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren, aus mit Hilfe des IspG-Proteins und photoreduziertem Deazaflavin erhaltenen enzymatischen Umsetzungen von A:  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl diphosphat und B:  $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat.

Die Ergebnisse aus dem „Deazaflavin-Assay“ deuten daraufhin, dass unter diesen Bedingungen zwei Formen des IspG-Proteins vorliegen. Die so genannte „imperfekte“ Form isomerisiert  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl diphosphat zum cyclischen Diphosphat und die „perfekte“ Form reduziert es zum  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat. Diese Form des IspG-Proteins kann aber nur Elektronen von

photoreduziertem Deazaflavin aufnehmen, nicht aber von Flavodoxin und Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und NADPH. Da die Reaktionsgeschwindigkeit mit photoreduziertem Deazaflavin als Elektronendonator im Vergleich zu der Reaktionsgeschwindigkeit mit Flavodoxin und Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und NADPH höher ist, könnte man aber auch folgern, dass ein und dieselbe Form des IspG-Proteins 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat in 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat isomerisieren kann, aber nicht zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat reduzieren kann. In diesem Fall könnte das entstandene 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat anschließend über eine andere Zwischenstufe zum 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat reduziert werden. Abbildung 33 zeigt ein mögliches Reaktionsschema, das sowohl die Bildung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat ausgehend von 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat (Rote Pfeile) zeigt, als auch einen anderen, unbekanntem Weg, ausgehend von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (Blauer Pfeil).



**Abbildung 33: Mögliches Reaktionsschema für die Bildung von [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat ausgehend von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat**

Wie unter 2.2.7.3 beschrieben, wurden auch Experimente mit  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat unter Verwendung von anaerob gereinigtem IspG-Protein durchgeführt unter Verwendung von Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und NADPH als Elektronenlieferer. In Tabelle 24 sind drei Assays zusammengefasst (Kompetitionsexperiment). Assay A enthielt sowohl  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat als auch  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, Assay B hingegen nur  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat und Assay C nur  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat. Abbildung 34 zeigt die Ausschnitte der dazugehörigen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren.

In den Spektrenausschnitten A und B der Abbildung 34 sind die entstandenen Signale sowohl von  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat als auch von  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat ausgehend von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat zu erkennen. Hierbei sind die Signale bei 121.0 ppm (C-3 (H), Doppelbindung) und 62.2 ppm (C-4 (H)) dem  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat zu zuordnen. Die Signale des  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat erscheinen bei 68.4 ppm (C-3 (C)) und 67.8 ppm (C-4 (C)). Somit konnte gezeigt werden, dass das IspG-Protein unter Verwendung von Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und NADPH als Elektronendonatoren  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat sowohl zum Produkt der IspG-Reaktion reduzieren als auch zum Substrat isomerisieren kann.

In den Spektrenausschnitten A und C sind auch die Signale von  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat zu erkennen, welches aus  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat entstanden ist. Die Doppelbindung erscheint hier als Dublett bei 39.5 ppm (C-2 (H)) und die Methylgruppe auch als Dublett bei 13.2 ppm (C-2' (H)).

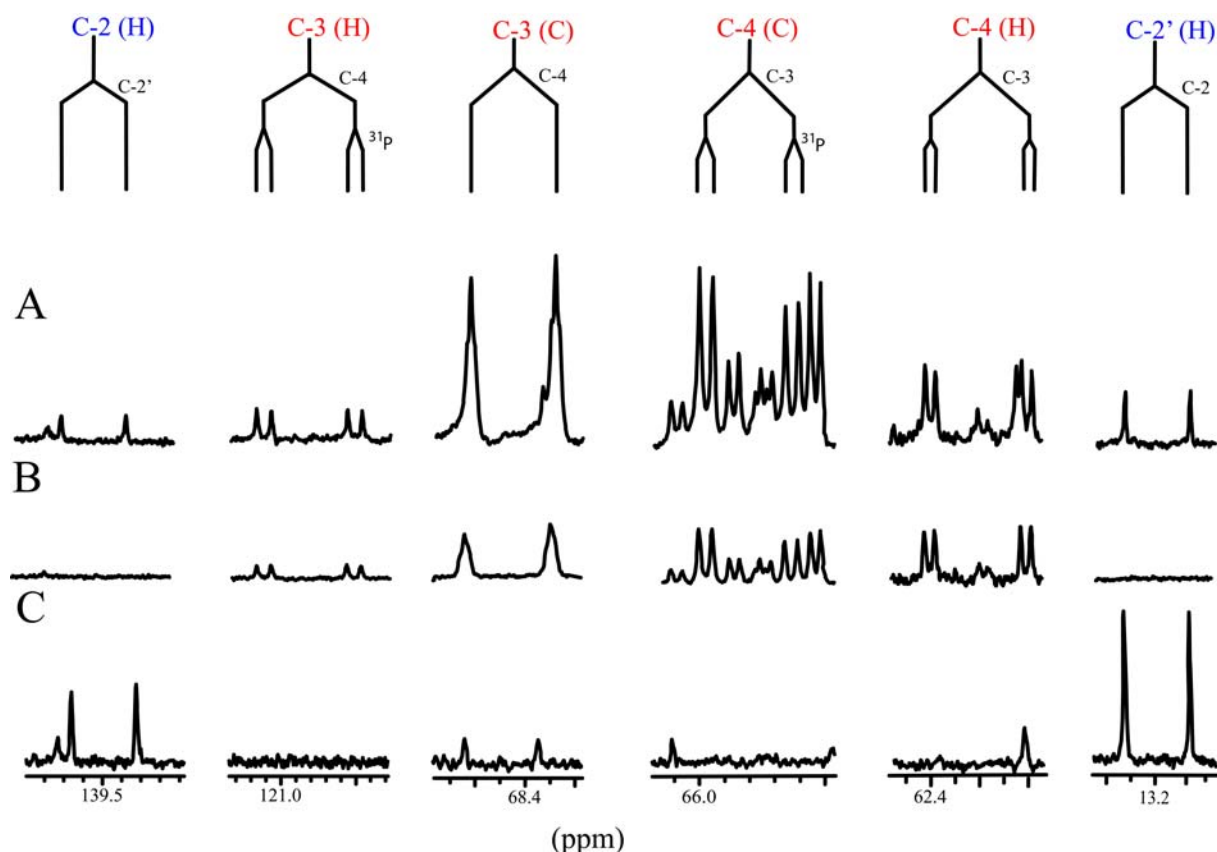


Abbildung 34: Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Konkurrenzexperimentes mit gereinigtem IspG-Protein (vgl. 2.2.7.3)

A: NMR-Signale (nach Inkubation) von  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat und  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat entstanden aus  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat sowie von  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat entstanden aus  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat; B: NMR-Signale (nach Inkubation) von  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat und  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat entstanden aus  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat; C: NMR-Signale (nach Inkubation) von  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat entstanden aus  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat; Der Buchstabe H kennzeichnet die Signale von  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat; Der Buchstabe C kennzeichnet die Signale von  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat; Rot und Blau kennzeichnen verschiedene mögliche Reaktionsverläufe, vergleiche hierzu Abbildung 33

In Tabelle 24 sind sowohl die Stoffmengen der Ausgangsverbindungen und Produkte als auch der prozentuale Umsatz des Konkurrenzexperimentes aufgelistet.

In Assay B sind unter diesen Bedingungen  $2.3 \mu\text{mol}$   $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat und  $0.59 \mu\text{mol}$   $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphat entstanden. Dies entspricht einem prozentualen Umsatz von 34.8 bzw. 9.1 %. Die

Isomerisierungsgeschwindigkeit des IspG-Proteins ist somit um das 6-fache schneller als die Reduktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur auf die Umwandlung von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyl-diphosphat}$ , in das Produkt der IspG-Reaktion.

<i>Assay</i>	<i>Substrat(e)</i>	<i>n/μmol</i>	<i>Produkt(e)</i>	<i>n/μmol</i>	<i>Umsatz</i>
A	$[1,2-^{13}\text{C}_2]2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyl-diphosphat}$	5.8	$[3,4-^{13}\text{C}_2]2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$	2.0	35.0 %
			$[3,4-^{13}\text{C}_2]1\text{-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat}$	0.52	9.1 %
	$[2,2'-^{13}\text{C}_2]2\text{C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat}$	3.5	$[2,2'-^{13}\text{C}_2]1\text{-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat}$	0.25	7.2 %
B	$[1,2-^{13}\text{C}_2]2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyl-diphosphat}$	6.5	$[3,4-^{13}\text{C}_2]2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$	2.3	34.8 %
			$[3,4-^{13}\text{C}_2]1\text{-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$	0.59	9.1 %
C	$[2,2'-^{13}\text{C}_2]2\text{C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat}$	3.1	$[2,2'-^{13}\text{C}_2]1\text{-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$	0.78	25.3 %

**Tabelle 24: Konkurrenzexperiment für die IspG-Reaktion mit  $[1,2-^{13}\text{C}_2]2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat}$  und  $[2,2'-^{13}\text{C}_2]2\text{C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat}$**



Beim Vergleich von Assay A und B ist zu erkennen, dass der prozentualer Umsatz (35.0 bzw. 9.1 % in Assay A) unabhängig von der Anwesenheit von zusätzlichem eingesetztem  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  ist. Vergleicht man hingegen die Assaymischungen A und C, sieht man, dass die Bildung von  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat}$  aus  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  bei der Anwesenheit von  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyldiphosphat}$  um  $1/3$  auf  $0.25 \mu\text{mol}$  verringert wird. Interessanterweise bindet somit  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl-diphosphat}$  besser an das IspG-Protein als  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  (Arigoni (2004b)), wie das schon beim Titrationsexperiment beobachtet worden ist (vgl. Abbildung 31).

Die Bildung von  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$  aus  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  (Assay C) ist um den Faktor 1.3 schneller als die Bildung von  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$  aus  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyl-diphosphat}$ . Falls das cyclische Diphosphat ein Vorläufer des Epoxids ist, sollte eigentlich dieses mit einer höheren Rate umgesetzt werden. Darüber hinaus konnte die Bildung von  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl-diphosphat}$  aus  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$  nicht beobachtet werden. Mit diesen Ergebnisse konnte somit nicht belegt werden, dass  $2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl-diphosphat}$  Intermediat der IspG-Reaktion ist (Arigoni (2004b)).

In Assay A ergibt sich im Laufe der Inkubation ein unterschiedliches Markierungsmuster im  $2\text{C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat}$ . Die  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Markierung wird verbraucht und die  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Markierung entsteht aus  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutyl-diphosphat}$ . Daraus ergibt sich eine Intensitätenverteilung nach der Reaktion von 1.62 zu 1 für die  $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]$ - und die  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Markierung. Falls die Reaktion ausgehend von  $2,3\text{-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyl-diphosphat}$  zu  $1\text{-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$  über das cyclische Diphosphat erfolgt wäre, wären nur  $0.072 \mu\text{mol}$   $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat}$  neben  $0.25 \mu\text{mol}$   $[2,2'\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$  entstanden. Diese Menge an  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat}$  entspricht aber nur 14 % der Gesamtmenge an tatsächlich

---

gebildetem  $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat. D.h., der größere Teil des Produktes ist nicht über das cyclische Diphosphat entstanden, sondern direkt aus  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat (Arigoni (2004b)). Dies bedeutet, dass IspG-Protein 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat direkt zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat reduzieren kann, ob die Reaktion ausgehend von 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zum 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat tatsächlich über das 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat verläuft, konnte hingegen nicht abschließend geklärt werden.

Die Berechnungen der Gruppe um Prof. Zenk (Brandt *et al.* (2004)) weisen darauf hin, dass das O-protonierte 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat um  $27.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  instabiler ist als das von ihnen vorgeschlagene Carbokation des 2*C*-Methyl-D-erythritol-4-diphosphat. Nach deren hypothetischen Mechanismus entsteht dieses Carbokation aus 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, nachdem ein  $\text{H}^+$ -Ion von einem protonierten Arginin-Rest übertragen worden ist. Nach den Berechnungen dieser Gruppe nimmt das von ihnen vorgeschlagene Carbokation leichter 2 Elektronen auf als das entsprechende O-protonierte 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat. Berechnungen von Prof. Jaun haben ergeben, dass 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat um  $11 \text{ kcal mol}^{-1}$  instabiler ist als das 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, und somit der Übergang 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat zu 2*C*-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat für praktische Aspekte irreversibel ist (Arigoni (2004b)). In diesem Zusammenhang sei auf die Trisoeposphat-Isomerase hingewiesen. Die Triosephosphat-Isomerase katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat. Hierbei wird ein Proton von Glycerin-3-phosphat abgespalten und es bildet sich das entsprechende Enol. Dieser Intermedärzustand ist um  $14,1 \text{ kcal mol}^{-1}$  instabiler als Glycerinaldehyd-3-phosphat. Die notwendig Stabilisierungsenergie wird von der Triosephosphat-Isomerase geliefert (Amyes *et al.* (2001)).

---

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Zusammenfassung

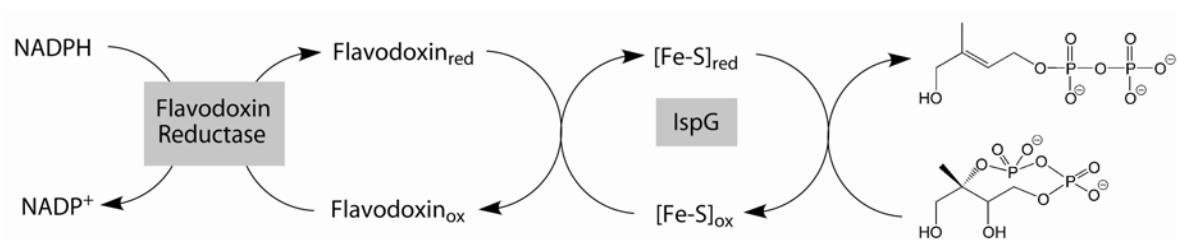
Anfang 1990 entdeckten Arigoni und Rohmer unabhängig voneinander durch Einbauexperimente mit stabilisotopmarkierten Verbindungen einen bis dahin unbekanntem alternativen Biosyntheseweg für Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat. Zu Beginn dieser Arbeit waren die einzelnen Schritte des Desoxyxylulosephosphatweges schon bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der vorletzte Schritt dieses Biosyntheseweges, die Umwandlung von 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat, untersucht. Diese Reaktion wird von der 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase (IspG-Protein) katalysiert.

Hierfür wurde ein rekombinantes IspG-Protein aus *E. coli* untersucht. Das anfänglich unter aeroben Bedingungen isolierte IspG-Protein war inaktiv, konnte aber durch Zugabe eines Zellextrakt aus Zellen einer *ispG*-Knock-out Mutante bzw. photoreduziertem Deazaflavin (unter anaeroben Bedingungen) aktiviert werden. Diese Tatsache zusammen mit einer UV/Vis-Absorption typisch für Eisen-Schwefel-Proteine, führte zu dem Schluss, dass das IspG-Protein einen sauerstoffempfindlichen Eisen-Schwefel-Cluster besitzt.

Daraufhin wurde das IspG-Protein anaerob in aktiver Form isoliert und proteinchemisch charakterisiert. Hierbei konnte die spezifische Aktivität des IspG-Proteins sowohl mit photoreduziertem Deazaflavin als auch mit den Elektronenübertragungsproteinen Flavodoxin, Flavodoxin-(NADP<sup>+</sup>)-Reduktase und NADPH als Reduktionsmittel mit  $\geq 45 \text{ nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  bestimmt werden. Das IspG-Protein benötigte  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen als Metallocofaktor und hat ein pH-Optimum von 9. Die Michaelis-Menten-Konstante wurde mit  $700 \mu\text{M}$  und die *turn over number* mit  $0.22 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Der Eisengehalt betrug 2.4 Fe und der Schwefelgehalt 4.4 S<sup>2-</sup> pro IspG-Einheit. Dies unterstützte die Identifizierung eines Eisen-Schwefel-Clusters.

In Abbildung 35 ist der nun bekannte Elektronenfluss vom NADPH auf das Substrat 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat für die vom IspG-Protein katalysierte Reaktion dargestellt.



**Abbildung 35: Elektronenflussdiagramm bei der durch das IspG-Protein katalysierten Reaktion**

Der Mechanismus der vom IspG-Protein katalysierten Reaktion wurde zum einen mit Hilfe von Zellextrakten, welche das *ispG* Gen überexprimieren, und zum anderen mit Hilfe von anaerob gereinigtem IspG-Protein untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das möglich Intermediat 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat postuliert, welches in <sup>13</sup>C-markierter Form synthetisiert wurde. Ausgehend von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat entsteht bei der IspG-Reaktion sowohl [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat als auch [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat. Die erhaltenen Ergebnisse stützen sonst die Theorie, dass das 2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methyl-butyldiphosphat ein Intermediat der vom IspG-Protein katalysierten Reaktion ist.

## 4.2 Ausblick

Da es sich beim IspG-Protein um ein Eisen-Schwefel-Protein handelt, bieten sich Experimente zur ESR-Spektroskopie an, um die Art des Cluster auf zu klären. Diese Methode könnte auch zur Klärung des Mechanismus beitragen. Auch die Aufklärung der 3D-Struktur würde in diesem Zusammenhang weitere Einblicke gestatten. In beiden Fällen wird das IspG-Protein in hoch angereicherter Form benötigt, die Voraussetzungen dafür wurden durch die vorliegende Arbeit geschaffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 unterschiedliche Assaymethoden entwickelt. Die radiochemische Methode kann aufgrund der hohen Sensitivität für die Bestimmung sehr geringer Aktivitäten verwendet werden. Dies ist vorteilhaft bei der Untersuchung von IspG-Proteinen aus anderen Organismen als *E. coli*, wo sehr niedrige Aktivitäten zu erwarten sind. Der entwickelte NMR-Assay hat hingegen die größte Selektivität. Im Gegensatz zum radiochemischen Assay ist die Sensitivität beim NMR-Assay niedriger, kann aber durch die

Verwendung von markierten Substanzen erhöht werden. Der NMR-Assay dient zur Verifizierung der über den radiochemischen Assay ermittelten Ergebnisse. Der photometrische Assay hat die geringste Selektivität. Er kann jedoch als Grundlage für einen *High Throughput Screen* dienen. Da viele Organismen wie z.B. *Arabidopsis thaliana*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Plasmodium falciparum* im Gegensatz zum Menschen IspG-Proteine besitzen (vgl. 1.2 Verteilung der beiden Isoprenoidbiosynthesewege in der Natur), können mit Hilfe eines *High Throughput Screen* neue Herbizide, Antibiotika und / oder Antimalariamittel gefunden und entwickelt werden.

Darüber hinaus kann nun aufgrund der durch diese Arbeit gewonnen Erkenntnisse 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat ausgehend von käuflich erwerbbarer Glucose und Pyruvat in jeder Markierung enzymatisch hergestellt werden.

---

## 5 Literaturangaben

Adam, P. (2002). *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu Terpenbiosynthese und Stoffwechselnetzwerken. Fakultät für Chemie. Garching, Technische Universität München.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2004). Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Amyes, T. L., O'Donoghue, A. C. und Richard, J. P. (2001). "Contribution of Phosphate Intrinsic Binding Energy to the Enzymatic Rate Acceleration for Triosephosphate Isomerase." J. Am. Chem. Soc. **123**: 11325-11326.

Arigoni, D. (2004a). Epo & IspG. Eisenreich, W.: Email Kommunikation.

Arigoni, D. (2004b). Kompetitonsexperiment IspG. Bacher, A., Eisenreich, W. and Rohdich, F.: E. mail Kommunikation.

Bach, T. J. und Lichtenthaler, H. K. (1982). Inhibition of mevalonate biosynthesis and of plant growth by the fungal metabolite mevinolin Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids. Wintermanns, J. F. G. and Kuiper, P. J. C. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press.

Bach, T. J. und Lichtenthaler, H. K. (1983). "Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation." Physiol. Plant **59**(1): 50-60.

Banthorpe, D. V., Charwood, B. V. und Francis, M. J. O. (1972). "The biosynthesis of monoterpenes." Chem. Rev. **72**: 115-155.

Bianchi, V., Reichard, P., Eliasson, R., Pontis, E., Krook, M., Jörnvall, H. und Haggard-Ljungquist, E. "*Escherichia coli* Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktase: Activation of *E. coli* Anaerobic Ribonucleotide Reduction, Cloning of the Gene (*fpr*), and Overexpression of the protein." (1993). J. Bacteriol. **175**: 1590 - 1595.

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

Brandt, W., Desso, M. A., Fulhorst, M., Gao, W., Zenk, M. H. und Wessjohann, L. A. (2004). "A Proposed Mechansim for the Reductive Ring Opening of the Cyclodiphosphate MEcPP, a Crucial Transformation in the New DXP/MEP Pathway to Isoprenoids Based on the Modeling Studies and Feeding Experiments." ChemBioChem **5**: 311-323.

Broers, S. T. J. (1994). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coil*. Zürich, ETH Zürich.

Brumby, P. E. und Massey, V. (1967). "Determination of Nonheme Iron, Total Iron, and Copper." Methods Enzymol. **10**( 463-474).

Brumby, P. E., Miller, R. W. und Massey, V. (1965). "The Content and Possible Catalytic Significance of Labile Sulfide in Some Metalloflavoproteins." J. Biol. Chem. **240**: 2222-2228.

Bullock, W. O. (1987). "XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." BioTechniques **5**: 376-379.

Cammack, R. (1992). "Iron-sulfur clusters in enzymes: themes and variations." Advances in Inorganic Chemistry **38**: 281-322.

David, S., Estramareix, B., Fischer, J. C. und Therisod, M. (1981). "1-Deoxy-D-threo-2-pentulose: the precursor of the five-carbon chain of the thiazole of thiamine." J. Am. Chem. Soc. **103**(24): 7341-7342.

Dilg, A. W. E. (2001). Struktur und Dynamik natürlicher, mutierter und entfalteter Eisen-Schwefel-Proteine (HiPIP) untersucht mit fünf spektroskopischen Methoden. Fakultät für Physik. Garching, Technische Universität München.

Döll, M., Schindler, S., Lichtenthaler, H. K. und Bach, T. J. (1984). Differential inhibition by mevlinol of prenyl lipid accumulation in cell suspension cultures of *Silybum marianum* Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids. Siegenthaler, P. A. and Eichenberger, W. Amsterdam, Elsevier Science Publication. **9**: 277-280.

Duin, E. C., Lafferty, M. E., Crouse, B. R., Allen, R. M., Sanyal, I., Flint, D. H. und Johnson, M. K. (1997). "[2Fe-2S] to [4Fe-4S] Cluster Conversion in *Escherichia coli* Biotin Synthase." Biochemistry **36**: 11811-11820.

Dunford, J. E., Thompson, K., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Hahn, F. M., Poulter, C. D., Ebetino, F. H. und Rogers, M. J. (2001). "Structure-Acticity Relationship for Inhibition of Farnesyl Diphosphate Synthase *in Vitro* and Inhibition of Bone Resorption *in Vivo* by Nitrogen-containing Bisphosphonates." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **296**(2): 235-242.

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

Gräwert, T. (unveröffentlicht). IspH-Protein aus *Escherichia coli* und IspDF-Protein aus *Campylobacter jejuni*: Untersuchung und Charakterisierung. Fakultät für Chemie. Garching, Technische Universität München.

Gräwert, T., Kaiser, J., Zepeck, F., Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Schramek, N., Schleicher, E., Weber, S., Haslbeck, M., Buchner, J., Rieder, C., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. und Rohdich, F. (2004). "IspH Protein of *Escherichia coli*: Studies on Iron-Sulfur Cluster Implementation and Catalysis." J. Am. Chem. Soc. **126**: 12847-12855.

Guo, Z., Severson, R. F. und Wagner, G. J. (1994). "Biosynthesis of the diterpene *cis*-Abienol in Cell-Free Extracts of tobacco trichomes." Archives of biochemistry and biophysicy **308**: 103-108.

Hamilton, C. M., Aldea, M., Wasburn, B. K., Babiizke, P. und Kusher, S. R. (1989). "New method for generating deletons and gene replacments in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **171**(9): 4617 - 4622.

Hecht, S. (2002). Intermediate und Enzyme des alternativen Terpenbiosyntheseweges. Fakultät für Chemie. Garching, Technische Universität München.

Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D. und 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.

Herz, S. (2000). Expression von Genen der Riboflavin- und Terpenbiosynthese und Charakterisierung der entsprechenden Proteine. Fakultät für Chemie. Garching, Technische Universität München.

Herz, S., Wungsintaweeikul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. und 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. **97**: 2486-2490.

Hill, R. E., Sayer, B. G. und Spenser, J. D. (1989). "Biosynthesis of vitamin B<sub>6</sub>: incorporation of D-1-deoxyxylulose." J. Am. Chem. Soc. **111**: 1916-1917.

Huber, C. und Wächtershäuser, G. (1998). "Peptides by Activation of Amino Acids with CO on (Ni,Fe)S Surfaces: Implications for the Origin of Life." Science **281**: 670-672.

Itoh, T., Nagano, T., Sato, M. und Hirobe, M. (1989). "Deoxygenation of oxiran compounds to olefins by  $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SC}_6\text{H}_5)_4]^{2-}$  in the presence of  $\text{NaBH}_4$ ." Tetrahedron Lett. **30**(46): 6387-6388.

Johnson, M. K., Robinson, A. E. und Thomson, A. J. (1982). Low-Temperature Magnetic Circular Dichroism Studies of Iron-Sulfur Proteins. Iron-Sulfur Proteins. Spiro, T. G. New York, John Wiley & Sons, In. **4**: 367-406.

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

Kaim, W. und Schwederski, B. (2004). Bioanorganische Chemie. Stuttgart, Teubner.

Kaiser, J. (2005). Untersuchungen an Enzymen der Terpenbiosynthese. Fakultät für Chemie. Garching, Technische Universität München.

Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y. und Seto, H. (2001). "An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces sp.* strain CL190." Proc. Natl. Acad. Sci. **98**: 932-937.

Kollas, A.-K., Duin, E. C., Eberl, M., Altincicek, B., Hintz, M., Reichenberg, A., Henschker, D., Henne, A., Steinbrecher, I., Ostrovsky, D. N., Hedderich, R., Beck, E., Jomaa, H. und Wiesner, J. (2002). "Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis." FEBS Letters **532**: 432-436.



Koppisch, A. T., Fox, D. T., Blagg, B. S. J. und Poulter, C. D. (2002). "*E. coli* MEP synthase: steady-state kinetic analysis and substrate binding." Biochemistry **41**: 236-243.

Koyama, T. und Ogura, K., Eds. (1999). Isopentenyl diphosphate, isomerase and prenyltransferases. Comprehensive Natural Product Chemistry Oxford, Pergamon.

Külzer, R., Pils, T., Kappl, R., Hüttermann, J. und Knappe, J. (1998). "Reconstitution and Characterization of Polynuclear Iron-Sulfur Cluster in Pyruvate Formate-lyase-activating Enzyme." J. Biol. Chem. **273**(9): 4897-4903.

Kuzmic, P. (1996). "Program DYNAFIT for the analysis of enzym kinetic data: application to HIV proteinase." Anal. Biochem. **237**: 260-273.

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

Lehninger, A. L. (1985). Grundkurs Biochemie. New York, Walter de Gruyter.

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

Lois, L. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K. und Rohmer, M. (1998). "Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coil* encoding a transketolase-like enzyme that catalyze the synthesis of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, a common precursor to isoprenoid, thiamin and pyridoxal biosynthesis." Proc. Natl. Acad. Sci. **95**: 2105-2110.

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

McCskill, D. und Croteau, R. (1993). "Procedures for the isolation and quantification of the intermediates of the mevalonic acid pathway." Anal. Biochem.(215): 142-149.

Méjean, A., Bui, B. T. S., Florentin, D., Ploux, O., Izumi, Y. und Marquet, A. (1995). "Highly purified biotin synthase can transform dethiobiotin into biotin in the absence of any other protein, in the presence of photoreduced deazaflavin." Biochem. Biophys. Res. Commun. **217**(3): 1231-1237.

Michal, G. (1999). Biochemical Pathways. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

Nakamaru-Ogiso, E., Yano, T., Ohnishi, T. und Yagi, T. (2002). "Characterization of the Iron-Sulfur Cluster Coordinated by a Cystein Cluster Motif (CXXCXXXCX<sub>27</sub>C) in the Nqo3 Subunit in the Proton-translocating NADH-Quinone Oxidoreductase (NDH-1) of *Thermus thermophilus* HB-8." J. Biol. Chem. **277**(3): 1680-1688.

Poulter, C. D. und Rilling, H., Eds. (1981). Conversion of farnesyl pyrophosphate to squalene Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. New York, Wiley.

Promise. (2005, 03.02.1999). "Iron-sulphur proteins by Fe-S centre type." Metalloproteins Retrieved 02.08.2005, 2005, from <http://metallo.scripps.edu/promise/FESMAIN.html>.

Rieder, C. (2003). Synthese von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>](*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylpyrophosphat und [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]2,3-Epoxy-4-hydroxy-3-methylbutylpyrophosphat. Zürich, ETH Zürich.

Rohdich, F., Bacher, A. und Eisenreich, W. (2005). "Isoprenoid biosynthetic pathways as anti-infective drug targets." Biochem. Soc. Trans. **33**(4): 785-791.

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

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

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

Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Gräwert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A. und Arigoni, D. (2003). "The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein." Proc. Natl. Acad. Sci. **100**(4): 1586-1591.

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

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

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

Schein, C. H. (1989). "Production of soluble recombinant proteins in bacteria." Biotechnology **7**(11): 1141-1149.

Schwarz, M. K. (1994). Terpen-biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. Zürich, ETH Zürich.

Seemann, M., Bui, B. T. S., Wolff, M., Tritsch, D., Campos, N., Boronat, A., Marquet, A. und Rohmer, M. (2002). "Isoprenoid Biosynthesis through the Methylerythritol Pathway: The (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphate Synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] Protein." Angew. Chem. Int. Ed. **41**(22): 4337-4339.

Seemann, M., Wegner, P., V., S., Bui, B. T. S., Wolff, M., Marquet, A., Trautwein, A. und Rohmer, M. (2005). "Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: The (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate Synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] Protein " J. Biol. Inorg. Chem. **10**: 131-137.

Sharp, D. W. A. (1990). The Penguin Dictionary of Chemistry. Harmondsworth, Penguin Books Ltd.

Silverman, R. B. und 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.

Skeel, R. T. (1999). Handbook of chemotherapy. Baltimore, Williams and Wilkins.

Sprenger, G. A., Schörten, U., Wiegert, T., Grolle, S., De Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S. und Salm, H. (1997). "Identification of a thiamin-dependent 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. **94**: 12857-12862.

Spurgeon, S. L. und Porter, J. W. (1981). Conversion of acetyl-conenzym A to isopentenyl pyrophosphate. Biosynthesis of isoprenoid compounds. Porter, J. W. and Spurgeon, S. L. New York, Wiley. **1**.

Stancu, C. und Sima, A. (2001). "Statins: mechanism of action and effects." J. Cell Mol. Med. **5**: 378-387.

Stüber, D., Matile, H. und Garotta, G. (1990). System for a high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis. Immunological Methods IV. Lefkovits, L. and Pernis, P. New York, Academic. **IV**: 121-152.

Takagi, M., Kuzuyama, T., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T. und 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-C-methyl-D-erythritol." Tetrahedron Lett. **41**(3395-3398).

Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H. und 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. **95**(9879-9884).

van Beek, E., Pietermann, E., Cohen, L., Löwik, C. und Papapoulos, S. (1999). "Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing biphosphonates." Biochem. Biophys. Research. Commun.(264): 108-111.

Voet, D. und Voet, J. G. (1995). Biochemistry. New York, John Wiley & Sons, Inc. .

White, R. H. (1978). "Stable isotope studies on the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*." Biochemistry **17**(18): 3833-3840.

Wolfe, S. L. (1993). Molecular and cellular Biology. Belmont, Wadsworth, Inc.

Wolff, M., Seemann, M., Grosdemange-Billiard, C., Tritsch, D., Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A. und Rohmer, M. (2002). "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*." Tetrahedron Lett. **43**: 2555-2559.

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

Zamenhof, P. J. und Villarejo, M. (1972). "Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting  $\alpha$ -complementation of  $\beta$ -galactosidase fragments *in vivo*." J. Bacteriol. **110**: 171-178.

Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. und Dean, D. R. (1998). "Assembly of Iron-Sulfur Clusters." J. Biol. Chem. **273**(22): 13264-13272.