

**Untersuchungen zum Alternativen Terpenbiosyntheseweg
in *Escherichia coli* und *Nicotiana benthamiana***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Maria Henriette Alpermann
geb. am 19.04.1974 in Templin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. *h.c.* M.H. Zenk
2. Prof. Dr. B. Dräger
3. Prof. Dr. P. Welzel

Halle (Saale), 27.01.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010447

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010447>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorkommen, Bedeutung und Anwendung der Terpene	2
1.2	Die Biosynthese der Terpene	5
1.2.1	Der klassische Acetat-Mevalonat-Weg	6
1.2.2	Der Alternative Terpenbiosyntheseweg	7
1.2.2.1	Das erste Intermediat – 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat	8
1.2.2.2	Das zweite Intermediat – 2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat	9
1.2.2.3	Die nächsten drei Reaktionsschritte	10
1.2.2.4	Die zwei letzten Reaktionen auf dem Weg zu IDP und DMADP	11
1.2.3	Die IDP-Isomerase in der Terpenbiosynthese	13
1.3	Der Stoffaustausch zwischen den Terpenbiosynthesewegen	14
1.4	Die Verbreitung der Terpenbiosynthesewege	16
1.5	Der Alternative Terpenbiosyntheseweg als Zielstruktur	18
1.6	Zielstellung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Bakterienstämme	21
2.1.2	Plasmide	21
2.1.3	Oligonukleotide	22
2.1.4	Pflanzliches Material	22
2.1.5	Chemikalien und Enzyme	23
2.1.6	Geräte	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Bakterien	25
2.2.2	Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion	25
2.2.3	Trennung von DNA über Agarosegele	26
2.2.4	Klonierung	26
2.2.4.1	Klonierung mit dem TOPO [®] -Vektor-System	26
2.2.4.2	Klonierung in den pHIS 8-3-Vektor	27
2.2.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	27
2.2.6	Sequenzierung von DNA	27
2.3	Methoden der Proteinchemie	28
2.3.1	Überexpression in <i>E. coli</i>	28
2.3.2	Reinigung über Affinitätschromatographie	29
2.3.3	Trennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	31

2.4 Bestimmung der Enzymaktivität	31
2.4.1 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase – DXS.....	31
2.4.2 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat-Reduktoisomerase – DXR.....	32
2.4.3 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase – IspD.....	32
2.4.4 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase – IspE.....	32
2.4.5 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase – IspF.....	32
2.4.6 Xylulokinase – XylB	33
2.4.7 GcpE und LytB.....	33
2.4.8 IDP-Isomerase	33
2.5 Synthese von Intermediaten	34
2.5.1 Gewinnung von Pyruvat.....	34
2.5.2 Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat	34
2.5.3 Synthese von Isopentenylidiphosphat	35
2.6 Untersuchungen an <i>Nicotiana benthamiana</i>	36
2.6.1 Infiltration von <i>N. benthamiana</i>	36
2.6.2 Mikroskopische Untersuchungen	37
2.6.3 Carotinoid- und Chlorophyllbestimmung	37
2.6.4 Applikation markierter Vorstufen an <i>N. benthamiana</i>	37
2.6.5 Präparation von Chloroplasten von <i>N. benthamiana</i>	38
2.7 Chromatographische Methoden	38
2.7.1 Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie	38
2.7.1.1 Papierchromatographie.....	38
2.7.1.2 Dünnschichtchromatographie.....	38
2.7.1.3 Laufmittelsysteme und Detektion	39
2.7.2 HPLC.....	40
2.7.3 Chromatographische Methoden zur Proteintrennung	41
2.7.3.1 Ionenaustauschchromatographie	41
2.7.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	42
2.7.3.3 Chromatofokussierung	42
2.8 Weitere Analysemethoden	43
2.8.1 Kernresonanz-Spektroskopie	43
2.8.2 Erfassung der radioaktiven Markierung.....	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Klonierung und Expression von Enzymen des Alternativen Terpenbiosyntheseweges	44
3.1.1 Klonierung der Enzyme des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	44
3.1.2 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase – DXS.....	45
3.1.3 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase – DXR	47
3.1.4 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase – IspD.....	49
3.1.5 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase – IspE.....	50
3.1.6 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase – IspF.....	51

3.1.7 D-Xylulokinase – XylB.....	52
3.1.8 GcpE und LytB.....	54
3.2 Synthese von Intermediaten des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	56
3.2.1 Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat.....	56
3.2.2 Gewinnung von isotoopenmarkiertem Pyruvat mit dem <i>E. coli</i> -Stamm YYC202 ...	57
3.2.2.1 Gewinnung von [U- ¹⁴ C ₃]Pyruvat.....	57
3.2.2.2 Gewinnung von [U- ¹³ C ₃]Pyruvat.....	59
3.2.3 Synthese von isotoopenmarkiertem DXP.....	60
3.2.3.1 Synthese von [1,2- ¹⁴ C ₂]DXP und [1,2- ¹³ C ₂]DXP.....	60
3.2.3.2 Synthese von [3,4,5- ¹⁴ C ₃]DXP.....	62
3.2.4 Gewinnung von [1,2- ¹⁴ C ₂]MEP.....	63
3.2.5 Gewinnung von [1,2- ¹⁴ C ₂]cMEDP.....	64
3.2.6 Synthese von Isopentenylidiphosphat.....	65
3.3 Enzymatische Charakterisierung der IDP-Isomerase aus <i>E. coli</i> und einer neuen IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i>	68
3.3.1 Klonierung und heterologe Expression der IDP-Isomerasen.....	68
3.3.1.1 IDP-Isomerase aus <i>E. coli</i>	68
3.3.1.2 IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i>	69
3.3.2 Analytischer Nachweis der Enzymaktivität von IDP-Isomerasen.....	72
3.3.2.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	72
3.3.2.2 Kultivierung des Bakterienstammes und Ammoniumsulfat-Fällung.....	72
3.3.2.3 Ionenaustauschchromatographie.....	73
3.3.2.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	74
3.3.2.5 Chromatofokussierung.....	75
3.3.2.6 Natives Proteingel und anschließendes SDS-Polyacrylamid-Gel.....	76
3.3.2.7 Übersicht über die Anreicherung.....	77
3.3.2.8 Analyse der Proteinsequenz und Identifikation des Intermediats.....	78
3.3.2.9 Neuordnung der HPLC-analytischen Signale.....	79
3.3.3 Katalytische Aktivität und enzymatische Charakterisierung.....	81
3.3.3.1 IDP-Isomerase aus <i>E. coli</i>	81
3.3.3.2 IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i>	82
3.3.3.3 Umsetzungen mit IDP-Isomerasen.....	82
3.3.3.4 K _M -Werte der IDP-Isomerasen.....	84
3.3.3.5 Gleichgewichtseinstellungen.....	86
3.4 Untersuchungen zur Funktion der IDP-Isomerase an <i>Nicotiana benthamiana</i>	88
3.4.1 Makroskopische Untersuchungen.....	88
3.4.2 Mikroskopische Untersuchungen.....	90
3.4.3 Untersuchung der Pigmentzusammensetzung.....	91
3.4.4 <i>In vivo</i> Applikation von 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und Mevalonsäurelacton.....	92

3.4.5 <i>In vitro</i> Applikation von 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und Isopentenylidiphosphat.....	96
3.4.5.1 Chloroplastentrennungen am Saccharosestufengradienten.....	96
3.4.5.2 Applikation von [3,4,5- ¹⁴ C ₃]DXP und [1- ¹⁴ C]IDP an isolierte Chloroplasten	97
4 Diskussion.....	100
4.1 Klonierung und Expression von Enzymen des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	100
4.2 Synthese von Intermediaten des Alternativen Terpenbiosyntheseweges.....	106
4.3 IDP-Isomerase aus <i>C. sativa</i> und aus <i>E. coli</i>	111
4.4 Funktion der IDP-Isomerase in <i>Nicotiana benthamiana</i>	119
5 Zusammenfassung.....	124
6 Literaturverzeichnis.....	127

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Cytidindiphosphat
CDP-ME	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol
CDP-MEP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphat
Ci	Curie
cMEDP	2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DMADP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid 5'-triphosphat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
DX	1-Deoxy-D-xylulose
DXP	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat
DXR	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase
DXS	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadeninukleotid (oxidierte Form)
FDP	Farnesyldiphosphat
FMN	Flavinmononukleotid (oxidierte Form)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Beschleunigung durch Schwerkraft
GAP	Glyceraldehyd 3-phosphat
GcpE	2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Reduktase
GDP	Geranyldiphosphat
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin

HMBDP	1-Hydroxy-2-methyl-2-(<i>E</i>)-butenyl 4-diphosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IDI	IDP/DMADP-Isomerase
IDP	Isopentenyl-diphosphat
IMP	Isopentenylmonophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase
IspF	2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LM	Laufmittel
LytB	1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase
ME	2C-Methyl-D-erythritol
MEP	2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Papierchromatographie, Papierchromatogramm
PCR	Polymerasekettenreaktion
R _f	relative Laufstrecke zur Front
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBAS	tetra- <i>n</i> -Butylammoniumhydrogensulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymmenge, die ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt)
VT	Volumenteile
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XylB	D-Xylulokinase