

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Nachfolgend sind die *Escherichia coli* Stämme, die zum Einsatz kamen, mit ihren jeweiligen genetischen Charakteristika aufgeführt:

*E. coli* DH5 $\alpha$ , Invitrogen                      F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR endA1*  
*recA1 hsdR17* ( $r_k^- m_k^+$ ) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

*E. coli* BL21(DE3), Invitrogen                F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^- m_B^-$ ) *gal dcm* (DE3)

Der pyruvatbildende Stamm *Escherichia coli* YYC202 wurde von Herrn Prof. Dr. H. Sahn und Herrn Prof. Dr. M. Bott, Forschungszentrum Jülich, zur Verfügung gestellt, wofür ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken möchte (Gerharz *et al.*, 2001).

Aus dem Stamm *E. coli* ID16 wurde im Rahmen der Proteinreinigung das Enzym Anorganische Pyrophosphatase isoliert. Herrn Prof. Dr. A. Böck, LMU München, der diesen Stamm zur Verfügung stellte, möchte ich dafür sehr herzlich danken.

Vom *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pSa\_RepA (Hellens *et al.*, 2000) wurden Stämme mit dem Plasmid pBINTRA6 und den pTV-Plasmiden pTV $\emptyset\emptyset$  als Leervektor, pTV Nb PDS als Positivkontrolle und pTV Nb IDI zum Ausschalten der IDP-Isomerase eingesetzt (Page *et al.*, 2004).

#### 2.1.2 Plasmide

pCR<sup>®</sup>T7/NT TOPO<sup>®</sup>, Invitrogen, ist ein 2,87 kb großer linearisierter Expressionsvektor und Bestandteil des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits. Der 3'-terminale Thymidinüberhang ermöglicht es mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente zu klonieren. Die Zyklisierung des Plasmids erfolgt durch die am Vektor kovalent gebundene Topoisomerase. Der Vektor besitzt einen T7 Promotor, eine N-terminale Polyhistidin-Region (6xHis) sowie als Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen ( $\beta$ -Lactamase).

pHIS 8-3 (Jez *et al.*, 2000) ist ein 5,5 kB großer Expressionsvektor, eine Modifikation des pET 28a Vektors. Nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *EcoR* I erfolgte die Ligation mit der T4 DNA-Ligase. Das Plasmid besitzt einen T7 Promotor, einen N-terminalen Histidin-Tag (8xHis) und zu Selektionszwecken ein Kanamycin-Resistenzgen.

### 2.1.3 Oligonukleotide

Die als Primer für Polymerasekettenreaktionen eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die Sequenzen der genspezifischen PCR-Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tab. 2:**  
Auflistung genspezifischer PCR-Primer

| Primer          | Nukleotidsequenz                   | Orientierung |
|-----------------|------------------------------------|--------------|
| dxs-5'          | 5'-ATGAGTTTTGATATTGCCAAATACC-3'    | sence        |
| dxs-3'          | 5'-TTATGCCAGCCAGGCCTT-3'           | antisence    |
| ispD-5'         | 5'-ATGGCAACCACTCATTTGGA-3'         | sence        |
| ispD-3'         | 5'-TTATGTATTCTCCTGATGGATGG-3'      | antisence    |
| ispE-5'         | 5'-ATGCGGACACAGTGGCCC-3'           | sence        |
| ispE-3'         | 5'-TTAAAGCATGGCTCTGTGCAATG-3'      | antisence    |
| ispF-5'         | 5'-ATGCGAATTGGACACGGTTT-3'         | sence        |
| ispF-3'         | 5'-TCATTTTGTTCCTTAATGAGTAG-3'      | antisence    |
| xylB-5'         | 5'-ATGTATATCGGGATAGATCTT-3'        | sence        |
| xylB-3'         | 5'-TTACGCCATTAATGGCAGAA-3'         | antisence    |
| gcpE-5'         | 5'-ATGCATAACCAGGCTCCAAT-3'         | sence        |
| gcpE-3'         | 5'-TTATTTTTCAACCTGCTGAAC-3'        | antisence    |
| lytB-5'         | 5'-ATGCAGATCCTGTTGGCCA-3'          | sence        |
| lytB-3'         | 5'-TTAATCGACTTCACGAATATC-3'        | antisence    |
| Ec idi-5'       | 5'-ATGCAAACGGAACACGTCATTTTAT-3'    | sence        |
| Ec idi-3'       | 5'-TTATTTAAGCTGGGTAAATGCAG-3'      | antisence    |
| Cs idi-5'       | 5'-TCCACCATGGGAGACTCT-3'           | sence        |
| Cs idi-3'       | 5'-TCATATCAGCAACTTCCTTAA-3'        | antisence    |
| Cs idi-5' BamH1 | 5'-CGGGATCCTCCACCATGGGAGACTCT-3'   | sence        |
| Cs idi-3' EcoR1 | 5'-GGAATTCTCATATCAGCAACTTCCTTAA-3' | antisence    |
| Cs idi-N68      | 5'-TTCTAGTGGATGAGAATGAC-3'         | sence        |
| T7 TOPO         | 5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'     | sence        |
| pHIS8-3 T7      | 5'-TAATACGACTCACTATA-3'            | sence        |
| pHIS8-3 T7rev   | 5'-CAAAAACCCCTCAAGACCC-3'          | antisence    |

### 2.1.4 Pflanzliches Material

Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* Domin (Solanaceae) wurden in einer Phytokammer des Institutes für Pflanzenbiochemie Halle durch Aussaat der Samen gezogen. Die Pflanzen wurden während der Anzucht und des Wachstums bei einer Temperatur von 22 °C 16 h beleuchtet und standen bei 20 °C für 8 h in Dunkelheit. Zum Keimen wurden die Samen in Petrischalen gelegt, die mit weichem wassergetränktem Papier ausgelegt waren. Nach 7 Tagen wurden die Keimlinge auf Erde in Töpfe mit 3 cm Durchmesser umgesetzt. Das Umpflanzen in ca. 9 x 9 cm große Töpfe erfolgte nach 3 Wochen. Die verwendete Erde bestand aus einer Mischung von 2 Teilen Sand und 3 Teilen ED73 Einheitserde.

## 2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien in der erforderlichen Reinheit wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Fluka (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Bestandteile für Kulturmedien wurden von der Firma Otto Nordwald (BD, Hamburg) eingesetzt. Die Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim) und NewEngland BioLabs (Frankfurt/Main) bezogen, sofern nicht anders angegeben. Alle wässrigen Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser der Millipore-Anlage Seralpur DELTA<sub>UF</sub> USF Seral hergestellt.

### Enzyme:

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Hexokinase – H-5625                   | Sigma (Taufkirchen) |
| Glucose 6-phosphat-Isomerase – P-5381 | Sigma (Taufkirchen) |
| Fructose 6-phosphat-Kinase – F-0137   | Sigma (Taufkirchen) |
| Aldolase – A-8811                     | Sigma (Taufkirchen) |
| Triosephosphat-Isomerase – T-2507     | Sigma (Taufkirchen) |
| Alkalische Phosphatase – P-5521       | Sigma (Taufkirchen) |
| Anorganische Pyrophosphatase – 83206  | Fluka (Taufkirchen) |
| Lysozym – L-6876                      | Sigma (Taufkirchen) |

### Antibiotika:

|                                  |                        |
|----------------------------------|------------------------|
| Ampicillin – A-9518              | Sigma (Taufkirchen)    |
| Kanamycin – K-4000               | Sigma (Taufkirchen)    |
| Tetracyclin-Hydrochlorid – 58346 | Calbiochem (Darmstadt) |
| Rifampicin – 34514               | Serva (Heidelberg)     |

### DNA Längenstandards und Nukleotide:

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| 1 kB DNA Marker – 15615   | Invitrogen (Karlsruhe) |
| 100 bp DNA Marker – 15628 | Invitrogen (Karlsruhe) |
| dNTPs – 18427             | Invitrogen (Karlsruhe) |

|  |                          |
|--|--------------------------|
| Proteinmolekulargewichtsmarker – #SM0431 | Fermentas (St. Leon-Rot) |
|--|--------------------------|

### Spezielle Chemikalien:

|             |                  |               |                       |
|-------------|------------------|---------------|-----------------------|
| ATP – 50200 | Biomol (Hamburg) | NADP – A1394  | AppliChem (Darmstadt) |
| IPTG – 2316 | Roth (Karlsruhe) | NADPH – A1395 | AppliChem (Darmstadt) |

### Substrate für enzymatische Umsetzungen:

Sofern benötigte Substrate des DXP-Weges nicht im Rahmen dieser Arbeit beschrieben worden sind, wurden sie in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Gao synthetisiert.

**Radiochemikalien:**

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| [U- <sup>14</sup> C <sub>6</sub> ]D-Glucose – CFB 96-1mCi                     | Amersham Biosciences (Freiburg)      |
| (Spezifische Aktivität 311 µCi/µmol, Gesamtaktivität 1 mCi = 37 MBq / 5 ml)   |                                      |
| [1- <sup>14</sup> C]Isopentenylpyrophosphat Ammoniumsalm – CFA 476-50µCi      | Amersham Biosciences                 |
| (Spezifische Aktivität 58 mCi/mmol, Gesamtaktivität 50 µCi = 1,85 MBq / 1 ml) |                                      |
| [ <sup>14</sup> C <sub>5</sub> ]Mevalonsäurelacton – CMM 228                  | CEA France Service Molecules Marqees |
| (Spezifische Aktivität 11,8 µCi/µmol, Gesamtaktivität 0,1 µCi / 2 ml)         |                                      |
| [U- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]D-Glucose (99 %) – CLM-1396                 | Cambridge Isotope Laboratories       |

**2.1.6 Geräte**

Folgende Geräte wurden eingesetzt, sofern sie nicht weiter im Methodenteil beschrieben sind:

**Analytische HPLC:**

Merck-Hitachi LaChrom<sup>®</sup> HPLC-System  
L-7100 Pump, L-7200 Autosampler, L-7450 Diode Array Detektor, D-7000 Interface

**Radio-HPLC:**

Merck-Hitachi LaChrom<sup>®</sup> HPLC-System  
Radio-Detektor Ramona 2000 mit Software Winnie 32, Version 2.12 Raytest (Straubenhardt)

**FPLC:**

ÄKTApurifier Chromatographiesystem Amersham Biosciences (Freiburg)  
Pump P-900, Monitor pH/Cond-900, Monitor UV-900, Fraction collector Frac-900

**Radioaktivitätsmessung:**

|  |                         |
|--|-------------------------|
| Radio-Dünnschicht-Scanner Tracemaster 20 | Berthold (Wildbach)     |
| Phosphorimager Fujifilm BAS-1500         | Raytest (Straubenhardt) |
| Flüssigszintillationszähler LS-6000TA    | Beckman (Krefeld)       |

**Zentrifugen:**

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| Tischzentrifuge 5415D, Kühlzentrifuge 5810R       | Eppendorf (Hamburg)            |
| Kühlzentrifuge SORVALL <sup>®</sup> RC-5B         | } GSA-Rotor und<br>SS 34-Rotor |
| Kühlzentrifuge SORVALL <sup>®</sup> RC-26 Plus    |                                |
| Ultrazentrifuge SORVALL <sup>®</sup> ULTRA Pro 80 | DUPONT (Bad Homburg)           |
|   | DUPONT (Bad Homburg)           |

**Schüttler:**

|  |                          |
|--|--------------------------|
| Rotationsschüttler innova 4000                               | New Brunswick Scientific |
| Überkopfschüttler, Schrägschüttler, Minischüttler (Vortexer) | (Nürtingen)              |

**Spektrometer:**

|                                   |                                 |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Spektralphotometer Ultraspec 3000 | Amersham Biosciences (Freiburg) |
| Specord 200                       | Carl Zeiss (Jena)               |

### Sonstige Geräte:

|  |  |
|--|--|
| Autoklav: Varioklav Typ 500 Dampfsterilisator      | H + P Labortechnik GmbH<br>(Oberschleißheim) |
| Lyophilisation: Gefriertrocknungsanlage Gamma 1-20 | Christ (Osterode)                            |
| Vakuum-Konzentrator (SpeedVac)                     | Bachofer (Reutlingen)                        |
| Rotationsverdampfer Rotavapor Laborota 4000        | Heidolph (Schwabach)                         |
| Ultraturrax T25                                    | JKA <sup>®</sup> -Labortechnik (Staufen)     |
| pH-Meter inoLab                                    | WTW (Weilheim)                               |
| Mikroskop: Axioskop 20                             | Carl Zeiss (Jena)                            |
| Ultraschall: Somnifer 250, Ultraschallbad 2510     | Branson (Danbury, USA)                       |
| Sterilbank HERA Safe HS 12                         | Heraeus Instruments (Hanau)                  |
| Wasserbäder, Magnetrührer, Waagen                  |  |

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Die Isolierung der genomischen DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll „Miniprep of bacterial genomic DNA“ aus „Short Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1999).

### 2.2.2 Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Segmente entwickelt (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Fallona, 1987). In Gegenwart von thermostabilen DNA-Polymerasen und Desoxynukleotiden wird die Matrize mit spezifischen, komplementären Oligonukleotidprimern zu vollständig doppelsträngiger DNA amplifiziert. Die Methode umfasst drei sich zyklisch wiederholende Einzelschritte: Hitzedenaturierung bei 94 °C, Anlagerung der Primer bei 40 - 60 °C und Synthese neuer DNA-Abschnitte bei 72 °C. Als Matrizen-DNA für die Polymerasekettenreaktion diente die aus *E. coli* isolierte genomische DNA (2.2.1). Für Negativkontrollen wurde steriles Wasser anstelle der DNA verwendet. Genspezifische Oligonukleotide (Tab. 2) und die gebräuchlichen DNA-Polymerasen *Pfu* aus *Pyrococcus furiosus* bei den Genen *dxs* und *gcpE* und *Taq* aus *Thermus aquaticus* bei allen anderen Genen kamen mit den vom Hersteller mitgelieferten Pufferlösungen zum Einsatz. Einleitend zu jeder Polymerasekettenreaktion erfolgte eine Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 °C. Es schloss sich ein 30 Zyklen umfassender Reaktionsablauf von Denaturierung für 30 s bei 94 °C, Annealing für 30 s bei 50 °C und Kettenverlängerung an.

Die Zeiten für die Kettenverlängerungen betragen bei einer Temperatur von 72 °C bei *dxs* 3 min, bei *ispD*, *ispE*, *ispF* und *idi* aus *C. sativa* 45 s und bei *xylB*, *gcpE* und *lytB* 1 min, 45 s. Die benötigte Zeit ist abhängig von der Anzahl an Basenpaaren der zu amplifizierenden Matrizen-DNA (ca. 1000 Basenpaare/min). Das PCR-Programm wurde abgeschlossen mit einer DNA-Polymerisation für 7 min bei 72 °C und der anschließenden Abkühlung auf 4 °C.

Für *idi* aus *E. coli* kam ein abgewandeltes PCR-Programm (Touch Down) zum Einsatz:

- Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 °C
- 3 Zyklen: Denaturierung – 30 s, 94 °C, Annealing – 30 s, 55 °C und Kettenverlängerung – 50 s, 72 °C
- 30 Zyklen: Denaturierung – 30 s, 94 °C, Annealing – 30 s, 50 °C und Kettenverlängerung – 50 s, 72 °C
- DNA-Polymerisation für 5 min bei 72 °C und Abkühlung auf 4 °C.

Das Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 der Firma PE Applied Biosystems (Darmstadt) wurde für die PCR-Reaktionen eingesetzt. Den mit *Pfu*-DNA-Polymerase gewonnenen DNA-Fragmenten wurde vor der TOPO<sup>®</sup> Cloning Reaktion ein 3'-A-Überhang angefügt. Die Überprüfung der DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung im Agarosegel (2.2.3). Die daraus isolierten DNA-Abschnitte standen für Klonierung (2.2.4), Transformation (2.2.5) und Sequenzierung (2.2.6) zur Verfügung.

### 2.2.3 Trennung von DNA über Agarosegele

DNA-Fragmente wurden in 1 - 1,5%igen Agarosegelen (Agarose in 1 x TAE-Puffer) aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 2001). Für eine spätere Visualisierung der DNA wurde dem Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. DNA-Proben wurden mit 0,2 VT DNA-Gelladepuffer, Sigma (Taufkirchen), versetzt. Als Längenstandard diente 1 kB DNA Marker oder 100 bp DNA Marker. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer mit 1 x TAE-Puffer (50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA) befüllten horizontalen Elektrophoreseinheit, Biometra (Göttingen), in 1 - 3 h bei einer Spannung von 80 - 110 V. Mit dem Gel Doc 1000-System, BioRad (München), konnten die gefärbten Gele dokumentiert werden.

Nach elektrophoretischer Trennung der DNA wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen (Hilden) wurden die DNA-Fragmente isoliert.

### 2.2.4 Klonierung

#### 2.2.4.1 Klonierung mit dem TOPO<sup>®</sup>-Vektor-System

Die Klonierung des PCR-Produkts in den pCR<sup>®</sup>T7/NT TOPO<sup>®</sup>-Vektor erfolgte mit dem mitgelieferten Puffer laut Angabe des Herstellers Invitrogen für 15 min bei RT. Das TOPO<sup>®</sup> Cloning System stellt eine effektive Methode zur Klonierung dar. DNA-Fragmente mit einem einfachen Desoxyadenosin am 3'-Ende werden durch Katalyse der Topoisomerase I leicht in den offenen TOPO<sup>®</sup>-Vektor mit einfachem 3'-Desoxythymidin-Überhang kloniert. Dieser Vektor enthält einen Sequenzbereich, der für sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren Histidin codiert, was eine Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins mit der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie erlaubt.

#### 2.2.4.2 Klonierung in den pHIS 8-3-Vektor

Vor der Ligation wurde der Vektor an den Schnittstellen für *BamH* I und *EcoR* I mit den Restriktionsenzymen in einer Reaktion bei 37 °C über Nacht geöffnet und anschließend mit dem MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen (Hilden), gereinigt. Das unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits, Qiagen, gereinigte PCR-Produkt wurde bei gleichen Inkubationsbedingungen mit denselben Restriktionsenzymen behandelt. Die Ligation erfolgte durch 3 Units T4 DNA-Ligase, Promega, in dem dazugehörigen Puffer für 90 min bei RT.

#### 2.2.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

Die Herstellung kompetenter Zellen der *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  und BL21(DE3) beruht auf der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970). Sie wurde nach den Protokollen von Hanahan (1983) und Hanahan *et al.* (1991) durchgeführt. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurden 2  $\mu$ l des Klonierungsprodukts zu 200  $\mu$ l kompetenten Zellen gegeben. Vom Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) wurden 200  $\mu$ l kompetente Zellen mit 2  $\mu$ l einer Plasmid-Lösung (10 ng/ $\mu$ l) versetzt. Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte durch Hitzeschock für genau 30 s bei 42 °C und sofortiger Kühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l SOC-Medium erfolgte die Inkubation für 1 h bei 37 °C. Die transformierte Bakterienkultur wurde auf LB-Agar-Medium (1,5 % Agar in LB-Medium (2.3.1) Sambrook *et al.*, 2001) ausgestrichen, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt (2.3.1). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose (Sambrook *et al.*, 2001).

Die nach der Transformation in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  erhaltenen Bakterienkolonien wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Plasmids geprüft. Als Oligonukleotide kamen T7 TOPO – Sense-Primer – und der dem jeweiligen Gen zugehörige Antisense-Primer zum Einsatz. Die PCR erfolgte mit der *Taq*-DNA-Polymerase unter Verwendung des gleichen PCR-Programms. Aus positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und im Anschluss sequenziert (2.2.6).

#### 2.2.6 Sequenzierung von DNA

Nach der Selektion positiver Klone wurden QIAprep-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) zur Gewinnung der Plasmid-DNA eingesetzt. Die Isolation aus Bakterien-Übernachtskulturen erfolgte mit den im QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit vorhandenen Puffern anhand des Herstellerprotokolls. Die erhaltene Plasmid-DNA stand zur Sequenzierung zur Verfügung. Die DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems (Darmstadt), basiert auf der Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide (Sanger *et al.*, 1977). *Taq*-DNA-Polymerase, dNTPs, je nach Base mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide und ein Primer wurden zur Amp-

lifikation der DNA eingesetzt. Der ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, wurde zum Sequenzieren verwandt. Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte kapillarelektrophoretisch. Die vier unterschiedlichen Farben wurden mit Hilfe eines Lasers detektiert. Auf Basis der Längenauftrennung ergab sich die Nukleotidsequenz. Zur Überprüfung der durch DNA-Sequenzierungen erhaltenen Sequenzen kam die Lasergene Software (DNA STAR) zum Einsatz. Anschließend erfolgte die Transformation korrekter Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) (2.2.5).

## 2.3. Methoden der Proteinchemie

### 2.3.1 Überexpression in *E. coli*

Die durch Polymerasekettenreaktion (2.2.2) gewonnenen DNA-Abschnitte von *dxs*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *xylB*, *gcpE*, *lytB* und *idi* von *E. coli* standen nach Klonierung in den pCR<sup>®</sup>T7/NT TOPO<sup>®</sup>-Vektor (2.2.4.1), Plasmidisolierung und Sequenzierung (2.2.6) für die Transformation (2.2.5) in *E. coli* BL21(DE3) zur Verfügung. Auf vergleichbarem Weg konnte der Stamm für die IDP-Isomerase aus *Cannabis sativa* gewonnen werden, jedoch erfolgte die Klonierung in den pHIS 8-3-Vektor (2.2.4.2). Der Stamm M15-pQEDXRECO für die DXP-Reduktoisomerase aus *E. coli* (mit Histidin-Fusion) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. F. Rohdich vom Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München bereitgestellt, wofür ich mich hiermit vielmals bedanke. Die Anzucht der Expressionsstämme bei 37 °C erfolgte auf Agarplatten (1,5 % Agar) bzw. als Suspensionskultur (bei 175 Umdrehungen pro Minute geschüttelt) in Luria-Bertani-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl pH 7,0; Sambrook *et al.*, 2001). Zur selektiven Kultivierung wurde die durch Plasmide vermittelte Antibiotika-Resistenz genutzt. Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium sterilfiltrierte Antibiotikallösungen zugesetzt (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, Polyvinylidenfluorid-Filter, 0,45µm, Roth).

Für die Startkultur der Proteinexpression wurde eine Bakterienkolonie in 50 ml LB-Medium gegeben, das mit 1 % Glucose und dem Antibiotikum versetzt war, und etwa 6 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 50 µg/ml Ampicillin wurde als Antibiotikum für die Expressionsstämme von DXS, IspD, IspE, IspF, XylB, GcpE, LytB und der IDP-Isomerase aus *E. coli* eingesetzt. Für den DXR-Expressionsstamm kamen 180 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin zum Einsatz. Dem Expressionsstamm für die IDP-Isomerase aus *C. sativa* wurde 50 µg/ml Kanamycin als Antibiotikum zugegeben. Die Startkultur wurde zu 950 ml vorgewärmtem antibiotikahaltigen LB-Medium gegeben und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 (Wellenlänge 600 nm) bei gleichen Bedingungen inkubiert. Durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Proteinsynthese induziert. Die Bakterienkulturen wurden 4 h bei 28 °C und 200 rpm geschüttelt. Zur Abtrennung des Mediums nach der Expression wurde für 10 min bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert.



Nach dem Zentrifugieren wurden die Bakterien in Talon-Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), der zusätzlich 750  $\mu$ g/ml Lysozym und 1 % (v/v) Tween 20 enthielt, resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch 2 x 30 s lange Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellfragmente durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g abgetrennt.

### 2.3.2 Reinigung über Affinitätschromatographie

Für die Reinigung der rekombinanten Proteine wurde Talon-Harz, BD Biosciences Clontech (Heidelberg), eingesetzt. Dieses ist ein kobalthaltiges Harz für die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Es ermöglicht die Reinigung rekombinanter Proteine mit Polyhistidin-Tag am N- oder C-Terminus. Das Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie basiert auf einer reversiblen Interaktion zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten, vor allem von Histidin und Cystein, und immobilisierten Metallionen (Porath *et al.*, 1975). Die Komplexbindungen können durch Zusatz von Imidazol gelöst und die gereinigten Proteine eluiert werden. 2 ml Talon-Harz wurden zweimal mit je 10 ml Talon-Waschpuffer versetzt und zentrifugiert (2 min, 4 °C, 700 x g). Der nach dem Aufschluss der Zellen durch Zentrifugation erhaltene Überstand wurde zum equilibrierten Talon-Harz gegeben. Zum Binden des Harzes an den His-Tag wurde für 60 min bei 4 °C und 30 rpm geschüttelt. Der durch nachfolgende Zentrifugation (5 min, 4 °C, 700 x g) gewonnene Überstand enthielt die nicht gebundenen Proteine und wurde verworfen. Das Talon-Harz wurde zweimal mit dem Waschpuffer behandelt und anschließend in 2 ml des Puffers aufgenommen. Die Suspension wurde in eine Gravitations-Einwegsäule, BD Clontech, gegeben und nach Absetzen mit 5 ml Puffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit je fünf mal einem ml Elutionspuffer – dieser ist identisch mit dem Talon-Waschpuffer, enthält aber mit 250 mM eine deutlich höhere Imidazol-Konzentration – in fünf Fraktionen gewonnen. Die das rekombinante Protein enthaltenden Fraktionen 1, 2 und 0,5 ml der Fraktion 3 wurden zu 2,5 ml vereinigt und über eine mit Lagerungspuffer äquilibrierte PD 10-Säule, Amersham Biosciences (Freiburg), von Imidazol und NaCl befreit. 3 ml umgepuffertes Protein wurde gewonnen, dessen Konzentration ermittelt (2.3.4) und mittels SDS-PAGE die Proteinreinheit bestimmt (2.3.3).

#### Lagerungspuffer

|                             |                               |  |
|-----------------------------|-------------------------------|--|
| <u>DXS</u>                  | <u>DXR, IspD, IspE,</u>       | <u>IDP-Isomerasen aus</u>                  |
| 200 mM Natriumcitrat pH 6,0 | <u>IspF, XylB, GcpE, LytB</u> | <u><i>E. coli</i> und <i>C. sativa</i></u> |
| 1 mM Dithiothreitol         | 100 mM Tris-HCl pH 7,5        | 20 mM Tris-HCl pH 7,0                      |
| 0,4 mM EDTA                 | 1 mM Dithiothreitol           | 1 mM Dithiothreitol                        |
| 20 % (v/v) Glycerol         | 10 % (v/v) Glycerol           | 1 mM Magnesiumchlorid                      |
|                             |                               | 10 % (v/v) Glycerol                        |

### 2.3.3 Trennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Aussage über die Reinheit einzelner Proteinfractionen und zur Bestimmung der Molekulargewichte fand die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) Verwendung. Die Methode basiert auf einer Vereinheitlichung der Nettoladung der zu trennenden Proteine. Durch Zugabe des Detergenz SDS vor der Auftrennung der Enzyme kommt es zur Denaturierung. Vorhandene Disulfidbrücken werden mit Hilfe von  $\beta$ -Mercaptoethanol gespalten. Durch gleichzeitiges Auftragen von Größenstandards (Proteinmolekulargewichtsmarker, Fermentas) konnte das Gel kalibriert werden.

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese stand eine vertikale Elektrophoreseeinheit mit dazugehörigen Glasplatten, Klammern, Spacern und Kämmen der Firma Biometra (Göttingen) zur Verfügung. Zur Herstellung der Gele wurde Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30 der Firma Roth (Karlsruhe) eingesetzt, eine gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1. Nach Zusammensetzung der Komponenten des Trenngels wurde die Lösung vorsichtig zwischen 2 Glasplatten gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren und Verwerfen des Isopropanols wurde der verbleibende Zwischenraum mit Sammelgel aufgefüllt. Um die zum Beladen des Gels erforderlichen Probetaschen zu erhalten, wurde sofort der Kamm in das Sammelgel eingebracht. Nach Polymerisation des Sammelgels und Entfernen des Kammes war das Gel gebrauchsfertig.

Das Gel wurde in die mit 1 x Elektrodenspuffer befüllte Elektrophoreseeinheit eingespannt. Ein 20  $\mu$ g Protein entsprechendes Volumen wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Gelladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels gegeben. Falls die zu untersuchende Proteinlösung zu verdünnt war, erfolgte durch Acetonfällung eine Aufkonzentrierung. Dazu wurde ein 20  $\mu$ g Protein entsprechendes Volumen mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt, zentrifugiert und der Rückstand in Wasser gelöst. Somit stand das Protein zur SDS-PAGE zur Verfügung. Die Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde bei einer Spannung von 100 V erreicht.

Zur Färbung und Detektion von aufgetrennten Proteinen wurde das Gel in Coomassie Brilliant Blue G 250-Färbelösung inkubiert (etwa 1 h bei 30 rpm). Durch Schwenken des Gels in Entfärbelösung (etwa 2 - 3 h bei 30 rpm) wurde überschüssiger, nicht gebundener Farbstoff entfernt und die Proteinbanden sichtbar.

| Zusammensetzung                     | Trenngel, 12 % | Sammelgel, 6 % |
|-------------------------------------|----------------|----------------|
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,0               | 2,5 ml         |                |
| 0,5 M Tris-HCl pH 6,8               |                | 1250 $\mu$ l   |
| 20 % (m/v) SDS-Lösung               | 50 $\mu$ l     | 25 $\mu$ l     |
| Wasser                              | 3,4 ml         | 3075 $\mu$ l   |
| Acrylamid/Bisacrylamid              | 4,0 ml         | 670 $\mu$ l    |
| 10 % (m/v) Ammoniumpersulfat-Lösung | 50 $\mu$ l     | 25 $\mu$ l     |
| TEMED                               | 5 $\mu$ l      | 5 $\mu$ l      |

|                              |                       |            |
|------------------------------|-----------------------|------------|
| 5 x Elektrodenpuffer         | Gelladepuffer         |            |
| 1,5 % (w/v) Tris             | Tris                  | 36,3 mg    |
| 7,2 % (w/v) Glycin           | SDS                   | 600 mg     |
| 0,5 % (w/v) SDS              | EDTA                  | 9,0 mg     |
| 1 x Elektrodenpuffer         | Bromphenolblau        | 3,0 mg     |
| 1 VT 5 x Elektrodenpuffer    | Glycerol              | 3,0 ml     |
| verdünnt mit 4 VT Wasser     | β-Mercaptoethanol     | 1,5 ml     |
|                              | Wasser                | zu 10,0 ml |
| Färbelösung                  | Entfärbelösung        |            |
| 0,1 % Coomassie Brilliant    | 30 % (v/v) Methanol   |            |
| Blue G 250 in Entfärbelösung | 10 % (v/v) Essigsäure |            |

### 2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration an Protein erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Sie beruht auf der Bindung der Proteine an den in Säure gelösten Farbstoff Coomassie Blue Brilliant G 250. Der Gehalt der Probe konnte durch Detektieren der Absorption bei 595 nm gegen eine Eichgerade, die mit Rinderserumalbumin als Standardprotein erstellt wurde, ermittelt werden.

## 2.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Eine Unit (Einheit) entspricht der Enzymmenge, die ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt.

### 2.4.1 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase – DXS

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 6 mM D-GAP und 4 mM Pyruvat mit 1,5 mM Thiamindiphosphat, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT und 0,4 mM EDTA in 200 mM Natriumcitrat-Puffer pH 6,0 in einem Gesamtvolumen von 50 µl umgesetzt. Nach Zugabe von DXS erfolgte für eine Stunde die Inkubation bei 37 °C. Die Papierchromatographie in LM1 oder LM5 fand für die Überprüfung der Reaktion Verwendung (2.7.1). Von der zu untersuchenden Lösung wurde jeweils ein Aliquot aufgetragen. Detektiert wurde mit den für DXP und Pyruvat beschriebenen Sprühreagenzien (2.7.1.3).

Alternativ konnte dem Ansatz zum Aktivitätstest 100.000 cpm (0,321 nmol) [U-<sup>14</sup>C<sub>3</sub>]Pyruvat (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) zugesetzt werden, um die Reaktion anhand der radioaktiven Markierung zu verfolgen. In LM1 oder LM5 wurden die Substanzen (je ein Aliquot) auf Papier getrennt (2.7.1) und nach Trocknen der Chromatogramme mit dem Radio-DC-Scanner oder dem Phosphorimager detektiert (2.8.2).

### **2.4.2 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat-Reduktoisomerase – DXR**

Die enzymatische Aktivität wurde durch Umsetzung von 0,3 mM DXP und 100.000 cpm [3,4,5-<sup>14</sup>C<sub>3</sub>]DXP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) mit 300 nM NADPH und 5 mM MgCl<sub>2</sub> überprüft. Als Puffer kam 100 mM Tris-HCl pH 8,0 zum Einsatz. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Nach Proteinzugabe wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Überprüfung erfolgte durch Einspritzen der 50 µl Reaktionsansatz in die HPLC (2.7.2).

Alternativ erfolgte nach Reaktionsabbruch durch zweiminütige Inkubation bei 95 °C und anschließender Kühlung des Reaktionsansatzes im Eisbad der Zusatz von 0,5 U Alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1) zur Dephosphorylierung. Die Inkubation fand für eine weitere Stunde bei 37 °C statt. Der Nachweis der dephosphorylierten Verbindungen erfolgte dünn-schichtchromatographisch auf DC1 in LM3 (Auftragen von Aliquoten), wobei zweimal entwickelt wurde (2.7.1). Detektiert wurden 1-Deoxy-D-xylulose und 2C-Methyl-D-erythritol mit dem Phosphorimager (2.8.2).

### **2.4.3 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase – IspD**

Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte durch Umsetzung von 0,2 mM MEP, 100.000 cpm [<sup>14</sup>C]MEP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) und 5 mM CTP in einem Volumen von 50 µl. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT und 100 mM Tris-HCl pH 8,0 als Puffer. Für eine Stunde wurde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss konnte das Gesamtvolumen mittels HPLC (2.7.2) analysiert werden.

### **2.4.4 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase – IspE**

Zur Überprüfung der Aktivität des Enzyms erfolgte ein Reaktionsansatz mit 0,2 mM CDP-ME, 100.000 cpm [<sup>14</sup>C]CDP-ME (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) und 5 mM ATP. Als Puffer diente 100 mM Tris-HCl pH 8,0. Das Endvolumen betrug 50 µl. Außerdem waren 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM DTT zugesetzt. Nach Zugabe von IspE erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C, bevor das Gesamtvolumen in die HPLC (2.7.2) injiziert wurde.

### **2.4.5 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase – IspF**

100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM DTT wurden mit 0,2 mM CDP-MEP, 100.000 cpm [<sup>14</sup>C]CDP-MEP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) und dem Protein für die Bestimmung der Aktivität der IspF zur Umsetzung gebracht. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Ein Aliquot der Untersuchungslösung wurde dünn-schichtchromatographisch (DC2) in LM4 getrennt (2.7.1) und mittels Phosphorimager detektiert (2.8.2).

### 2.4.6 Xylulokinase – XylB

Für den Aktivitätstest wurden 0,2 mM 1-Deoxy-D-xylulose (DX) und 100.000 cpm [<sup>14</sup>C]DX (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) zusammen mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM ATP in einem Endvolumen von 50 µl umgesetzt. Nach Enzymzusatz erfolgte für eine Stunde die Inkubation bei 37 °C. Zur Überprüfung der Umsetzung wurde ein Aliquot auf ein Papierchromatogramm aufgetragen und in LM5 entwickelt (2.7.1). Mit dem Phosphorimager konnte das Chromatogramm ausgewertet werden (2.8.2).

### 2.4.7 GcpE und LytB

Die enzymatische Aktivität wurde durch Umsetzung von 0,5 mM cMEDP und 100.000 cpm [<sup>14</sup>C]cMEDP (spezifische Aktivität 155,5 µCi/µmol) in 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM NaF und 2 mM DTT überprüft. Das Enzym GcpE bzw. beide Enzyme wurden zugesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C, bevor das Gesamtvolumen in die HPLC (2.7.2) injiziert wurde.

### 2.4.8 IDP-Isomerase

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurde 25 mM Hepes-KOH-Puffer pH 7,6 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM NaF und 2 mM DTT versetzt, das Substrat, 50.000 cpm [1-<sup>14</sup>C]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol), zugegeben und mit der IDP-Isomerase aus *E. coli* bzw. *C. sativa* in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 30 min, 1 h oder 2 h und bei 30 °C oder 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Radio-HPLC (2.7.2).

Alternativ wurde der auf der Säurelabilität des Dimethylallyldiphosphat (DMADP) beruhende Nachweis der Umsetzung von IDP zu DMADP angewandt (Jones und Porter, 1985; Ramos-Valdivia *et al.*, 1997b). [1-<sup>14</sup>C]IDP (spezifische Aktivität 58 mCi/mmol) diente als Substrat für die enzymatische Charakterisierung der IDP-Isomerasen. Bei dieser Methode erfolgte der Reaktionsabbruch der enzymatischen Umsetzung durch Zusatz von 200 µl 12 M HCl in Methanol (20 % (v/v)). Nachdem 100 µl Wasser zum Gesamtansatz gegeben wurden, erfolgte die Inkubation für 20 min bei 37 °C. Zur Erfassung des Anteils an Gesamtradioaktivität wurde ein Aliquot in Szintillatorlösung vermessen. Nach der Hydrolyse erfolgte unter Zusatz von 400 µl Chloroform und kräftigem Mischen für 10 min auf einem Vortexer die Extraktion der alkoholischen Verbindungen. Zum Trennen der organischen und der wässrigen Phase wurde bei 2 min und 13.600 rpm zentrifugiert bevor Aliquote der Phasen zur Bestimmung des radioaktiven Anteils vermessen wurden. Aus der Aktivität der organischen Phase ließ sich auf den Anteil an DMADP schließen, welcher aus der Umsetzung von IDP mit der IDP-Isomerase hervorgegangen war. In den graphischen Darstellungen der Umsetzungen mit IDP-Isomerasen wurde die Bildung des aus der Hydrolyse des DMADP hervorgegangenen 3-Methyl-2-buten-1-ol aufgetragen.

## 2.5 Synthese von Intermediaten

### 2.5.1 Gewinnung von Pyruvat

Die Anzucht des zur Pyruvatproduktion befähigten *E. coli*-Stammes YYC202 (Gerharz *et al.*, 2001) erfolgte in LB-Medium (2.3.1) bei 37 °C und 175 rpm. Zur selektiven Kultivierung wurden dem Medium 10 µg/ml Tetracyclin zugesetzt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde 1 ml dieser Kultur in 20 ml M9-Minimalmedium gegeben, welches 10 µg/ml Tetracyclin enthielt und mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat versetzt war. Die Inkubation erfolgte unter gleichen Bedingungen für 24 h.

M9-Minimalmedium setzt sich zusammen aus 33,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H<sub>2</sub>O (6,0 g/l), 20,0 mM Kaliumdihydrogenphosphat (3,0 g/l), 8,6 mM Natriumchlorid (0,5 g/l) und 7,6 mM Ammoniumchlorid (1,0 g/l). Nach dem Autoklavieren mussten 1,0 mM Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O (247 mg/l) und 0,1 mM Calciumchlorid x 2 H<sub>2</sub>O (14,7 mg/l) als sterile Lösungen zugesetzt werden. Dem M9-Medium wurden außerdem sterile Lösungen von 10 mM Glucose x H<sub>2</sub>O (1,98 g/l) und 2 mM Natriumacetat (164 mg/l) zugegeben.

Zum Animpfen von 300 ml tetracyclinhaltigem M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat wurden 10 ml der 20 ml-Kultur verwendet und unter gleichen Bedingungen für 24 h inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Resuspendierung des Bakterienrückstandes erfolgte in 2 - 4 ml 50 mM MOPS-Puffer (10,47 g/l; Sigma M-1254), dessen pH-Wert mit Kaliumhydroxid-Plätzchen auf 7,0 eingestellt war. Zum Waschen wurden 150 ml dieses Puffers eingesetzt. Abzentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm, Resuspendieren in 2 - 4 ml 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 und Waschen mit 150 ml dieses Puffers wurden dreimal wiederholt, bevor das Bakterienpellet in 2 ml 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 aufgenommen wurde. Die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm erfolgte nach Verdünnung von 100 µl Zellsuspension mit 50 mM MOPS-Puffer pH 7,0 zu 1 ml.

### 2.5.2 Synthese von D-Glyceraldehyd 3-phosphat

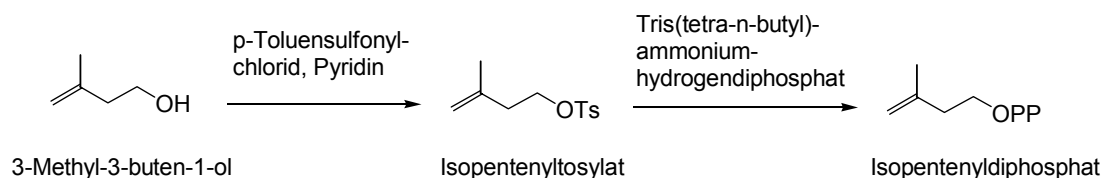
Sowohl die im Folgenden aufgeführte Synthese als auch die Synthese von Isopentenylidiphosphat (2.5.3) wurden von Herrn Dr. Gao und mir durchgeführt. An dieser Stelle danke ich ihm sehr herzlich dafür. Eine Beschreibung der jeweiligen Synthese soll einen Einblick geben.

Bei Raumtemperatur wurde Dinatrium D-Fructose 6-phosphat (1,0 g, 3,3 mmol) mit 1,6 ml Wasser befeuchtet und unter Rühren (Magnetrührer) in 132 ml Eisessig gelöst. Nach Auflösen des Salzes und Zugabe von 0,36 ml konzentrierter Schwefelsäure (18 M) wurde Bleitetraacetat (5,9 g) in zehn Anteilen über 15 min verteilt zugesetzt. Nach 2 Stunden wurde 1,6 g Oxalsäuredihydrat zugegeben und das Rühren weitere 30 min fortgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Suspension für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm. Der erhaltene Überstand wurde mit einem Rotationsverdampfer bei 30 °C und Niederdruck (20 - 25 mbar)

zu etwa 5 ml aufkonzentriert. Nach Waschen des festen Rückstandes mit dreimal 20 ml Wasser und Vereinigen von Konzentrat und Waschlösungen erfolgte unter Rühren bei 4 °C für 15 min ein Zusatz von 3,3 g Bariumacetat. Die weiße Suspension wurde zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4000 rpm) und der feste Rückstand mit zweimal 5 ml Wasser gewaschen. Nach Vereinigen der Waschlösungen mit dem durch die Zentrifugation erhaltenen Überstand erfolgte zum Aufreinigen eine Behandlung mit 60 ml Dowex 50w x 8 (Fluka, protonierte Form des Harzes). Die durch Filtrieren der Suspension erhaltene saure Lösung wurde zu etwa 3 ml aufkonzentriert und zur Bildung von D-Glyceraldehyd 3-phosphat für 18 Stunden bei 25 °C aufbewahrt. Die Einstellung des pH-Wertes der resultierenden Lösung auf 5,5 erfolgte mit 2 M Natriumhydroxid-Lösung. Bei 4 °C wurde diese Lösung auf eine Säule (1,0 x 18 cm) mit DEAE-Sephadex A-25 (Acetat-Form) gegeben, mit wenig Wasser gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0,05 M bis 0,6 M Natriumacetat pH 5,5 eluiert. Die D-GAP enthaltenen Fraktionen – mittels Papierchromatographie überprüft – wurden vereinigt und bei 30 °C und Niederdruck (20 - 25 mbar) eingengt. 0,43 g bzw. 2,5 mmol der leicht gelb gefärbten, öligen Substanz konnten gewonnen werden, was einer Ausbeute von 77 % entsprach.

### 2.5.3 Synthese von Isopentenylidiphosphat

Die Synthese von Isopentenylidiphosphat aus dem korrespondierenden Alkohol erfolgte über zwei Reaktionsschritte (Abb. 10). Der erste Schritt beinhaltet die Aktivierung des Carbinyl-Kohlenstoffatoms. Anschließend kommt es durch das diphosphorylierende Reagenz zu einer Verdrängung an der aktivierten Position.



**Abb. 10:**  
Synthese von Isopentenylidiphosphat

Unter Zuhilfenahme der in der Arbeitsgruppe von Poulter entwickelten Synthesevorschriften (Davisson *et al.*, 1985; Davisson *et al.*, 1986) konnte IDP hergestellt werden.

3-Methyl-3-buten-1-ol (43 mg, 0,5 mmol) wurden mit p-Toluensulfonylchlorid (105 mg, 0,55 mmol) und 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (73 mg, 0,6 mmol) in 2,5 ml Methylenchlorid versetzt. Das durch Extraktions- und Waschschriffe erhaltene ölige Isopentenyltosylat einer Ausbeute von 86 % konnte direkt für die Phosphorylierung verwendet werden.

Als diphosphorylierende Substanz wurde Tris(tetra-n-butylammonium)hydrogendiphosphat eingesetzt. Es stellt das entscheidende Reagenz bei der Synthese des organischen Diphosphat-esters dar. 3,25 g (3,6 mmol) dieser Substanz wurden in 3,5 ml Acetonitril gelöst, zu 3-Methyl-3-buten-1-yltosylat (288 mg, 1,2 mmol) gegeben und die erhaltene Lösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der durch Einrotieren gewonnene, undurchsichtige Rückstand wurde in 3 ml Ionenaustauschpuffer (1:49 (v/v) Isopropanol:25 mM Ammoniumcarbonat)

gelöst. Die klare, farblose Lösung konnte nach Auftragen auf eine Kationenaustauschersäule (63,5 ml Säulenvolumen) in die Ammoniumform überführt werden. Als Matrix diente Dowex 50w x 8, (Fluka, Ammoniumform des Harzes). Nach dem Equilibrieren der Säule mit 2 Säulenvolumen Ionenaustauschpuffer erfolgte mit dem gleichen Volumen die Elution der Lösung. Durch Lyophilisation des Eluenten bis zur Trockne konnte 200 mg des weißen Isopentenylidiphosphat gewonnen werden, was einer Ausbeute von 67 % entsprach.

## 2.6 Untersuchungen an *Nicotiana benthamiana*

### 2.6.1 Infiltration von *N. benthamiana*

Durch Anwendung des VIGS-Systems („virus-induced gene-silencing“) (Baulcombe, 1999) kommt es zu einem TRV-vermittelten („tobacco rattle virus“) Ausschalten eines Gens, wodurch die Ausprägung phänotypischer Merkmale des betreffenden Gens beeinflusst wird. Verwendet wurde dieses Virus in Form der zwei Plasmide pTVØØ und pBINTRA6. Der Leervektor pTVØØ basiert auf der cDNA der RNA 2 des Tobacco Rattle Virus. In pTVØØ wurde eine cDNA-Sequenz des *idi*-Gens kloniert, um das Plasmid pTV Nb IDI zu erhalten (Page *et al.*, 2004). Bei pBINTRA6 handelt es sich um den Volllänge-klon der RNA 1 des Tobacco Rattle Virus. Durch Infiltration von *N. benthamiana* Pflanzen mit pTV Nb IDI und pBINTRA6 kommt es zum Ausschalten der IDP-Isomerase. Durch das als Positivkontrolle eingesetzte Plasmid pTV Nb PDS wird die Phytoen-Desaturase (*pds*), ein essenzielles Gen der Carotinoid-Biosynthese, TRV-vermittelt ausgeschaltet (Ratcliff *et al.*, 2001). Daraufhin kommt es bei infizierten Pflanzen zum Ausbleichen der für die Photosynthese verantwortlichen Regionen und somit zur Ausbildung weißer Blätter.

*A. tumefaciens* (2.1.1) mit einem pTV-Konstrukt oder dem Plasmid pBINTRA6 wurden in LB-Medium (2.3.1) mit Selektion durch 50 µg/ml Kanamycin, 20 µg/ml Rifampicin und 5 µg/ml Tetracyclin bei 28 °C über Nacht inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 4 °C, 4000 rpm) wurden die Bakterien in Resuspensionspuffer (1 mM MES pH 5,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon) zu einer OD<sub>600</sub> = 1 aufgenommen. Die Agrobakterien standen für 2 - 4 h bei Raumtemperatur, bevor die Suspensionen, die das pBINTRA6- und das jeweilige pTV-Konstrukt enthielten, im Verhältnis von 1:1 (v/v) gemischt wurden. Mit einer sterilen 2 ml Einwegspritze der Firma Braun (Melsungen) wurde die Unterseite von zwei höheren Blättern der fünf Wochen alten Pflanzen infiziert. Die Infiltration der *N. benthamiana* Pflanzen erfolgte mit den Plasmiden pBINTRA6 und pTV Nb IDI, pTVØØ oder pTV Nb PDS als Positivkontrolle. Die mit pBINTRA6 und pTVØØ infizierten Pflanzen dienten als Kontrolle, da das pTVØØ-Konstrukt keinen zusätzlichen pflanzlichen cDNA-Abschnitt enthält. Für makro- und mikroskopische Untersuchungen, Bestimmungen des Carotinoid- und Chlorophyllgehaltes und Applikationsexperimente wurden etwa zehn Wochen alte Blätter verwendet, die charakteristische Merkmale des Virussilencing zeigten.



## 2.6.2 Mikroskopische Untersuchungen

Die zu untersuchenden *N. benthamiana* Blätter der mit pTV Nb IDI infizierten und Leervektorpflanzen wurden per Hand geschnitten. Zum Mikroskopieren wurden die Schnitte in auf einem Objektträger befindliches Wasser gegeben. Die Anfertigung von lichtmikroskopischen Aufnahmen (Vergrößerung 1:40) erfolgte mit dem Axioskop 20 mit eingebauter Kamera. Vergleichend wurde die Fluoreszenz der Objekte bei folgenden Wellenlängen betrachtet: Bandpass 546 nm, Farbteiler 580 nm, Langpass 590 nm. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Hochdrucklampe. Für die Hilfestellung von Herrn Dr. G. Hause möchte ich mich herzlich bedanken.

## 2.6.3 Carotinoid- und Chlorophyllbestimmung

Vier bis fünf Wochen nach der Infiltration der *N. benthamiana* Pflanzen wurden die Carotinoide und Chlorophylle aus den Blättern, basierend auf einer nach Fraser *et al.* (2000) modifizierten Methode (Page *et al.*, 2004), extrahiert. Als Ausgangsmaterial wurden Blätter der mit pTV Nb IDI infizierten Pflanzen und der pTVØØ-Leervektorpflanzen eingesetzt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser pulverisiert. Zur Extraktion wurden 100 - 150 mg pulverisiertes Blattmaterial mit 300 µl Methanol versetzt und für 5 min bei 4 °C mit 60 rpm auf einem Rotationsschüttler bewegt. Es wurde nach Zugabe von 300 µl Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl) für 5 min und von 800 µl Chloroform für 10 min bei gleichen Bedingungen weiter geschüttelt. Durch Zentrifugieren (5 min, 4 °C, 3000 rpm) erfolgte die Trennung der wässrigen und organischen Phasen. Die organische Phase wurde mit einem Vakuum-Konzentrator bis zur Trockne eingengt und die Pigmentrückstände für die spektralphotometrische Analyse in 500 µl Aceton aufgenommen. Ein Aliquot der resultierenden Lösung wurde mit dem Spektralphotometer bei den Wellenlängen 470 nm, 645 nm und 662 nm direkt oder nach Verdünnung vermessen. Der Gehalt an Carotinoiden und Chlorophyllen wurde, wie von Lichtenthaler (1987) beschrieben, für 100 % Aceton kalkuliert.

Der Chlorophyllgehalt von Chloroplasten wurde nach der Methode von Joyard *et al.* (1987) bestimmt. Dazu wurden 10 ml 80 % (v/v) Aceton mit 10 µl Chloroplastensuspension versetzt und zentrifugiert (10 min, 4500 x g). Die Bestimmung der Absorption des Überstandes gegen 80 % (v/v) Aceton erfolgte bei 652 nm. Die Chlorophyllkonzentration der untersuchten Chloroplastensuspension wurde mit der Formel Chlorophyll [mg/ml] =  $OD_{652} \times 26$  ermittelt.

## 2.6.4 Applikation markierter Vorstufen an *N. benthamiana*

Für Applikationsexperimente wurden die am Blattstiel abgelösten Blätter in den unteren abgetrennten Teil eines 500 µl Eppendorf-Gefäßes gestellt, das eine wässrige Lösung der markierten Vorstufe enthielt. Nach Aufnahme der Substratlösung wurde über einen Zeitraum von 8 h je 100 µl und nachfolgend über Nacht ein ausreichendes Volumen an Wasser zugegeben. Das darüber hinausgehende weitere Vorgehen ist im Ergebnisteil beschrieben.

## 2.6.5 Präparation von Chloroplasten von *N. benthamiana*

Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise zur Präparation von Chromoplasten (Fellermeier, 2000). Es wurden 3,0 g Blattgewebe (ca. 20 cm<sup>2</sup> Blattmaterial) mit 60 ml eisgekühltem Aufschlusspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, 0,4 M Saccharose) versetzt und mit einem Ultraturrax für 20 s homogenisiert. Nach Filtration des Homogenates durch Nylongaze (4 Lagen, 50 µm Maschenweite, Verseidag Techfab GmbH) wurde das Filtrat für 10 min bei 4 °C und 3076 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet zum Waschen vorsichtig in 20 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 300 µl Resuspensionspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,0, 1 mM DTE, 70 % (w/v) Saccharose). Die erhaltene Chloroplastensuspension wurde in ein Ultra-Clear-Zentrifugengefäß (11 x 60 mm, Beckman) überführt und mit je 7 ml Saccharoselösungen folgender Konzentrationen überschichtet: 62,5; 55; 47,5; 40; 35 und 30 % (w/v) Saccharose in Gradientenpuffer (50 mM Hepes-KOH pH 8,0 und 1 mM DTE). Durch Zentrifugation mit der Ultrazentrifuge Pro 80 für 1h bei 4 °C und 15.000 rpm kam es zu einer Anreicherung der Chloroplasten entsprechend ihrer Dichte an den Grenzschichten zwischen den einzelnen Saccharosekonzentrationen. Im Anschluß wurden die chloroplastenhaltigen Zwischenschichten mit einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen, mit dem fünffachen Volumen an Gradientenpuffer gewaschen und abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 3076 x g). Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren erfolgte nach Verwerfen des Überstandes die Resuspendierung des Rückstandes in maximal 100 µl Gradientenpuffer. Jede Fraktion wurde hinsichtlich des Chlorophyllgehaltes analysiert (Methode von Joyard *et al.* (1987) 2.6.3).

## 2.7 Chromatographische Methoden

### 2.7.1 Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie

Die Analyse von Enzymreaktionen als auch von Carotinoiden und Sterolen erfolgte mittels Dünnschicht- (DC) oder Papierchromatographie (PC).

#### 2.7.1.1 Papierchromatographie

Chromatographie-Papier: 2043B, 0,22 mm dick, 580 x 600 mm, Schleicher & Schüll (Dassel)

#### 2.7.1.2 Dünnschichtchromatographie

- DC1 Fertigfolie: POLYGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub>, 0,2 mm Kieselgel mit Fluoreszenz-Indikator UV<sub>254</sub>, 20 x 20 cm Macherey-Nagel (Düren)
- DC2 Fertigfolie: POLYGRAM<sup>®</sup> SIL N-HR/UV<sub>254</sub>, 0,2 mm Kieselgel N-HR/UV<sub>254</sub>, 20 x 20 cm Macherey-Nagel (Düren)
- DC3 DC-Alufolie 20 x 20 cm, Cellulose, Merck (Darmstadt)

### 2.7.1.3 Laufmittelsysteme und Detektion

Die Analytik enzymatischer Reaktionen erfolgte mit nachfolgend aufgeführten Laufmitteln:

| Laufmittelsystem |                                  | VT    | Chromatogramm |
|------------------|----------------------------------|-------|---------------|
| LM1              | 1 M Ammoniumacetat-Lösung pH 5,0 | 30,0  | PC            |
| (Schreyer und    | 95 % Ethanol, vergällt           | 70,0  |               |
| Böck, 1973)      | 0,1 M EDTA-Dinatriumsalz         | 1,0   |               |
| LM2              | tert-Butanol                     | 150,6 | PC            |
|                  | Ameisensäure                     | 39,0  |               |
|                  | Wasser                           | 60,0  |               |
| LM3              | Chloroform                       | 7,0   | DC1           |
|                  | Methanol                         | 2,0   |               |
|                  | Wasser                           | 0,2   |               |
| LM4              | Isopropanol                      | 6,0   | DC2           |
|                  | Ethylacetat                      | 1,0   |               |
|                  | Wasser                           | 3,0   |               |
| LM5              | Ethylacetat                      | 3,0   | PC            |
|                  | Essigsäure                       | 3,0   |               |
|                  | Wasser                           | 1,0   |               |

Sterole wurden mit Dichlormethan als Laufmittel (LM6) dünnschichtchromatographisch (DC1) analysiert. Für die DC-Trennung von Carotinoiden (DC1) standen Systeme aus Hexan und Diethylether im Verhältnis 6:4 (LM7) sowie aus Hexan und Toluol im Verhältnis 9:1 (LM8) zur Verfügung (Fellermeier, 2000). Carotinoide ( $\beta$ -Carotin, Phytoen), Chlorophylle und Xantophylle konnten in Hexan:Isopropanol:Wasser im Verhältnis 100:12:0,25 (LM9) dünnschichtchromatographisch (DC1) aufgetrennt werden.

Die Detektion der Banden erfolgte durch UV-Löschung bei 254 nm bzw. Fluoreszenz bei 366 nm und wenn möglich mit Sprühreagenzien. Wenn eine Referenzsubstanz aufgetragen worden war, wurde mit dieser verglichen. Die Auswertung radioaktiv markierter Substanzen auf Chromatogrammen erfolgte mittels Radio-DC-Scanner bzw. Phosphorimager (2.8.2).

#### Detektion    Sprühreagenzien

|         |  |
|---------|--|
| DXP     | Ethylendiaminsulfat (10%ige wässrige Lösung, 10 min Erhitzen bei 100 °C)   |
| Pyruvat | 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,5 g in 50 ml 2 N HCl)   |
| Sterole | Anisaldehyd-Schwefelsäure (Stahl und Kaltenbach, 1961)<br>(0,5 ml Anisaldehyd in 50 ml Essigsäure unter Zusatz von 1 ml Schwefelsäure lösen; nach dem Besprühen bei 100 - 105 °C bis zur maximalen Farbintensität der Spots erwärmen)<br>Molybdato-Phosphorsäure (10%ige gesättigte Lösung in Ethanol, nach dem Besprühen bei 100 - 120 °C erwärmen) |

## 2.7.2 HPLC

Die Ionenpaar-reversed-Phase HPLC-Methode nach McCaskill und Croteau (1993) in Abwandlung von Fellermeier (2000) erwies sich für die chromatographische Analyse von phosphorylierten Verbindungen als zweckdienliches Trennsystem. Zum Einsatz kam eine Luna C8 (2), 250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße (00G-4249-E0) als Trennsäule mit der Luna C8 (2), 4 x 3 mm, 5 µm Partikelgröße (AJ0-4290) als Vorsäule. Luna C8 (2) ist ein Material der Firma Phenomenex (Aschaffenburg), das aus sphärischem Kieselgel mit C8-Ketten an der Oberfläche besteht. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 50 µl oder 100 µl. Das Laufmittelsystem bestand aus zwei Eluenten – A: 10 mM TBAS in Wasser und B: 10 mM TBAS in 70 % (v/v) Methanol. Eine 200 mM Stocklösung von tetra-n-Butylammoniumhydrogensulfat (TBAS) pH 6,0 (eingestellt mit festem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) wurde zur Herstellung der Eluenten A und B eingesetzt. Bei einer Flussrate von 0,75 ml/min wurde die Säule mit folgendem Gradientenprogramm entwickelt:

| Zeit [min] | A [%] | B [%] |
|------------|-------|-------|
| 0          | 100   | 0     |
| 20         | 100   | 0     |
| 80         | 40    | 60    |
| 85         | 100   | 0     |
| 100        | 100   | 0     |

Zur Detektion stand der Radio-Detektor Ramona 2000, Raytest, bzw. der Diode Array Detektor L-7450 zur Verfügung. Eine zum Teil auftretende Verschiebung der Retentionszeiten von bis zu 2 min ist auf die Auslastung dieses Trennsystems zurückzuführen.

Alternativ zu diesem Radio-HPLC-Verfahren wurde ein neues Gradientensystem zur Trennung von Mono-, Di- und Triphosphat-Verbindungen entwickelt. Dadurch sollte eine Verkürzung der mit 100 min relativ langen Laufzeit erreicht werden. Für die HPLC-Anwendung wurde das Ionenpaar-Reagenz Tetrabutylammoniumphosphat (TBAP), Alltech (Unterhaching), eingesetzt. Laufmittel A setzte sich aus 0,05 M TBAP und 0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat zusammen. Mit Phosphorsäure erfolgte die pH-Wert-Einstellung auf 5,0. Dieser Anteil des Laufmittels A wurde mit 5 % (v/v) Methanol versetzt. Als Laufmittel B diente reines Methanol. Als Säule wurde eine Spermimage -80 ODS 2 (4 mm ID, Länge 10 cm, 3 µm Säulenmaterial) eingesetzt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde die Säule mit folgendem Gradientenprogramm entwickelt:

| Zeit [min] | A [%] | B [%] |
|------------|-------|-------|
| 0          | 99    | 1     |
| 20         | 30    | 70    |
| 25         | 99    | 1     |

Zur Detektion stand der Radio-Detektor Ramona 2000, Raytest, zur Verfügung.

## 2.7.3 Chromatographische Methoden zur Proteintrennung

Zur Trennung von Proteinen kam der ÄKTApurifier, Amersham Biosciences (Freiburg), mit der Software UNICORN, Version 4.0 zum Einsatz. Dieses ist ein Chromatographiesystem für die FPLC, die Fast Protein Liquid Chromatography. Die Proteintrennungen wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Erfassung von pH-Wert, Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm diente zur Detektion der Proteine.

Sofern notwendig wurden die Proben vor der Trennung über eine PD10-Säule (Fast Desalting Column HR 10/10) gegeben. Diese Gelfiltration mit Sephadex G 25 erfolgte zur Umpufferung und Entsalzung. Vor der Applikation der in Startpuffer gelösten Proteinprobe auf die Säule war eine Filtration durch 0,45 µm (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, Polyvinylidenfluorid-Filter, Roth) erforderlich. Zum Equilibrieren der eingesetzten Trennsäulen wurde vor jedem Lauf mit Elutionspuffer und anschließend mit Startpuffer gewaschen. Die Proteinproben wurden jeweils mit Hilfe einer Probenschleife auf die Säule geladen. Die zwischen den einzelnen Trennungsschritten notwendige Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen und chromatographischer Fraktionen erfolgte mittels Jumbosep<sup>™</sup> 10K, Pall (Dreieich), oder Centriprep YM-10, Millipore (Eschborn), wobei die Trenngrenze jeweils 10 kDa betrug.

### 2.7.3.1 Ionenaustauschchromatographie

Als Trennsäule fand die HiPrep<sup>™</sup> 16/10 DEAE FF, Amersham Biosciences, Verwendung (Ø 16 mm x 100 mm, 20 ml Säulenvolumen). Die Säulenmatrix ist eine mit Diethylaminoethyl-Gruppen verknüpfte Sepharose. Die Säule wurde mit einer konstanten Flussrate von 2,5 ml/min betrieben. Die nach Ammoniumsulfat-Fällung erhaltene Probe (10 - 15 ml) wurde auf die mit 100 ml Startpuffer IC (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM β-Mercaptoethanol) equilibrierte Säule geladen. Nach Waschen mit 2 Säulenvolumina erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 0 - 500 mM KCl in Startpuffer IC (Elutionspuffer IC) über 30 Säulenvolumina. Abschließend wurden weitere 5 Volumina Elutionspuffer IC über die Säule gepumpt. Gesammelt wurden Fraktionen von 12 ml.

Zur Ionenaustauschchromatographie am starken Anionenaustauscher kam die mit SOURCE 30Q gepackte XK16/20-Säule (Ø 16 mm x 130 mm) mit einem Volumen von 26 ml zum Einsatz. SOURCE 30Q, Amersham Biosciences, ist ein aus Polystyrol und Divinylbenzol zusammengesetztes, mit quarternären Ammoniumgruppen verknüpftes Kunststoffpolymer, das eine einheitliche Partikelgröße von 30 µm aufweist. Die mit Startpuffer IC über 3 Volumina equilibrierte Säule wurde mit einer konstanten Flussrate von 5 ml/min betrieben. An die Injektion der Probe (7 - 11 ml) schloss sich ein Waschschriff mit 2 Säulenvolumina an. Mit dem nachfolgend aufgeführten Stufengradienten konnten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (Elutionspuffer IC) die gebundenen Proteine über 30 Säulenvolumina von der Säule gewaschen werden, welche mit 2 Volumina nachgewaschen wurde. Die Fraktionsvolumina betragen 12 ml.

| Nummer | <u>Gradient</u>           | <u>Konzentration des Elutionspuffers</u><br>(20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM<br>β-Mercaptoethanol, 500 mM KCl) |
|--------|---------------------------|--|
|        | Länge in<br>Säulenvolumen |  |
| 1      | 12,1                      | 38,8 %   |
| 2      | 2                         | 38,8 %   |
| 3      | 0,5                       | 30 %   |
| 4      | 0,5                       | 30 %   |
| 5      | 2                         | 45 %   |
| 6      | 3                         | 45 %   |
| 7      | 0,5                       | 40 %   |
| 8      | 0,5                       | 40 %   |
| 9      | 9                         | 100 %  |
| 10     | 5                         | 100 %  |

### 2.7.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Fast-Flow-Säule HiPrep™ 16/10 Phenyl FF, Amersham Biosciences, wurde mit einer konstanten Flussrate von 2,5 ml/min eingesetzt. Die Phenylsepharose-Säule hat ein Volumen von 20 ml, 16 mm Durchmesser und 100 mm Länge. 20 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2 mM β-Mercaptoethanol mit 1 M Ammoniumsulfat über 5 Säulenvolumina dienten dem Equilibrieren der Säule. Nach dem Auftragen der Proteinprobe (8 - 10 ml) wurde mit 2 Volumina nachgewaschen. Mit dem Puffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2 mM β-Mercaptoethanol konnten die Proteine über den nachfolgenden mehrstufigen Gradienten bei Abnahme der Salzkonzentration bis auf Null und Fraktionssammlung (3 ml) eluiert werden. Mit 2 Säulenvolumina wurde die Säule nachgewaschen.

| Nummer | <u>Gradient</u>           | <u>Konzentration des Elutionspuffers</u><br>(20 mM Tris-HCl pH 7,5,<br>2 mM β-Mercaptoethanol) |
|--------|---------------------------|--|
|        | Länge in<br>Säulenvolumen |  |
| 1      | 2                         | 100 %  |
| 2      | 0                         | 19 %   |
| 3      | 1,5                       | 19 %   |
| 4      | 0                         | 3 %  |
| 5      | 1,5                       | 3 %  |
| 6      | 0                         | 0 %  |
| 7      | 2                         | 0 %  |
| 8      | 5                         | 0 %  |

### 2.7.3.3 Chromatofokussierung

Zur Chromatofokussierung wurde die Fertigsäule MONO P HR 5/5 (1 ml Säulenvolumen, Ø 5 mm x 50 mm) eingesetzt. Das MONO P-Säulenmaterial, Amersham Biosciences, besteht aus so genannten MonoBeads, hydrophilen Polymerkügelchen, die mit einem Gemisch quarternärer und tertiärer Amine substituiert sind. Als Startpuffer CF diente mit gesättigter

Iminodiessigsäure eingestellter 25 mM Bis-Tris-Puffer pH 7,1 mit 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol. 10 % (v/v) Polypuffer 74, Amersham Biosciences, mit gesättigter Iminodiessigsäure auf pH 4,0 eingestellt, und 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol fanden als Elutionspuffer CF Verwendung.

Das Equilibrieren der Säule erfolgte mit 5 Säulenvolumina Startpuffer CF bei einer Flussrate von 1 ml/min. Nachdem 1 ml 5 N NaOH-Lösung bei 0,4 ml/min über die Säule gegeben wurden, folgte bis zur pH-Wert-Konstanz (7,1) ein Ausspülen mit Startpuffer CF. Mit Elutionspuffer CF wurde bis zu einem konstanten pH-Wert von 4,0 gespült. Die Behandlung mit NaOH-Lösung und Startpuffer CF musste wiederholt werden, bevor nach weiterem Equilibrieren mit 5 Volumina Startpuffer CF die Injektion der Probe (1,5 - 2,5 ml) möglich war. Die bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min betriebene Säule wurde mit 2 Säulenvolumina nachgewaschen. Die an die Säule gebundenen Proteine konnten mittels Elutionspuffer CF durch den sich einstellenden pH-Gradienten (pH-Wert 7,1 bis pH 4,0) in der Reihenfolge ihrer isoelektrischen Punkte abgelöst werden. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug jeweils 0,5 ml. Zur Reinigung wurde mit Startpuffer CF und 1,5 N NaCl-Lösung gewaschen.

## **2.8 Weitere Analysemethoden**

### **2.8.1 Kernresonanz-Spektroskopie**

Die NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer Varian Mercury 300 aufgenommen. Frau Dr. Porzel, IPB Halle, danke ich vielmals für die Vermessung der Proben und die Hilfestellung bei der Auswertung der Resultate.

### **2.8.2 Erfassung der radioaktiven Markierung**

Die zu untersuchenden  $^{14}\text{C}$ -markierten Proben wurden zu 5 ml der Rotiszint<sup>®</sup> eco plus - Szintillatorlösung, Roth (Karlsruhe), gegeben und im Flüssigszintillationszähler LS-6000TA vermessen.

Nach der Auftrennung radioaktiv markierter Verbindungen mittels PC oder DC kam zur qualitativen und quantitativen Auswertung der getrockneten Chromatogramme der Radio-Dünnschicht-Scanner Tracemaster 20 zum Einsatz. Alternativ erfolgte die Beurteilung durch Auflage der Chromatogramme auf einen Phosphorimagerfilm (Fujifilm BAS MS 2040 Imaging Plate) für 15 - 30 h. Mit dem Phosphorimager und der dazugehörigen Software BASReader, Version 2.11a, Raytest (Straubenhardt), und Tina, Version 2.10i, Raytest, konnte ausgewertet werden.