

5 Zusammenfassung

Der Deoxyxylulosephosphat-Biosyntheseweg (DXP-Weg) erlangt neben dem länger bekannten Acetat-Mevalonat-Weg zunehmend an Bedeutung. Dieser als Alternativer Terpenbiosyntheseweg bezeichnete Stoffwechselweg kommt in Säugetieren nicht vor. Daher stellen seine Enzyme und Intermediate ideale Zielstrukturen für innovative Antibiotika, Antimalaria-Mittel und Herbizide dar.

1.) Zur Aufklärung der Biosyntheseschritte des Deoxyxylulosephosphat-Weges ist die Darstellung von kommerziell nicht verfügbaren Intermediaten erforderlich. Für enzymatische Synthesen von Metaboliten wurden die codierenden Sequenzen der sieben *Escherichia coli*-Enzyme 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase (DXS), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Synthase (IspD), 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol Kinase (IspE), 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase (IspF), 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Reduktase (GcpE) und 1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase (LytB) sowie die D-Xylulokinase (XylB) als 1-Deoxy-D-xylulose phosphorylierendes Enzym kloniert. Die Identitäten der Sequenzen wurden durch Datenbankanalyse verifiziert. Diese Enzyme und die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase (DXR) des Alternativen Terpenbiosyntheseweges konnten durch Proteinexpression mit Hexahistidin-Fusion und Reinigung mit Metall-Chelat-Affinitätschromatographie als lösliche Proteine im Milligramm-Maßstab dargestellt werden. Die Gesamtmenge an gereinigtem Enzym aus einem Liter Kulturvolumen lag zwischen 4,0 mg für die 1-Hydroxy-2-methylbutenyl 4-diphosphat Reduktase und 36 mg für die 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reduktoisomerase. Durch den Nachweis der katalytischen Aktivitäten konnte die Identität der rekombinanten Enzyme des Deoxyxylulosephosphat-Weges bestätigt werden.

2.) Metabolite des Alternativen Terpenbiosyntheseweges konnten durch unterschiedliche Synthesemethoden in verschiedenen Markierungsmustern gewonnen werden. Pyruvat wurde unter Verwendung des *E. coli*-Stammes YYC202 dargestellt. Der Stamm besitzt die Fähigkeit, aus kommerziell zugänglicher, markierter Glucose Brenztraubensäure zu erzeugen und ins Medium auszuschcheiden. Auf diese Weise konnten $[U-^{14}C_3]$ Pyruvat und $[U-^{13}C_3]$ Pyruvat synthetisiert werden. Das uniform markierte Pyruvat wurde mit D-Glyceraldehyd 3-phosphat, der anderen C_3 -Vorstufe des Alternativen Terpenbiosyntheseweges, unter Katalyse der rekombinanten 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase umgesetzt. $[1,2-^{14}C_2]$ 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und $[1,2-^{13}C_2]$ 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat konnten mit einer Ausbeute von 78 % und 66 % dargestellt werden.

3.) Die Funktion der Isopentenylidiphosphat-Isomerase (IDI) bei der Synthese lebensnotwendiger isoprenoider Verbindungen in höheren Pflanzen ist noch ungeklärt, in Bakterien ist dieses Enzym entbehrlich. Aus einer cDNA-Bibliothek (Dr. J. Page) wurde die Isopentenylidiphosphat-Isomerase von *Cannabis sativa* durch Homologie-Klonierung isoliert. Der offene Leserahmen umfasst 810 Nukleotide und codiert für ein Protein mit 269 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht der Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus *Cannabis sativa* beträgt 30,9 kDa. Die neue Sequenz zeigt 72 % Identität mit der Isopentenylidiphosphat-Isomerase aus *Arabidopsis thaliana*, 42 % mit der humanen Isopentenylidiphosphat-Isomerase sowie 18 % mit dem Enzym aus *Escherichia coli*. Die Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Cannabis sativa* und aus *Escherichia coli* wurden mit Polyhistidin-Fusion kloniert. Die Identität der Sequenz des Enzyms aus *Escherichia coli* wurde durch Datenbankanalyse bestätigt. Durch Proteinexpression und Reinigung mit Metall-Chelat-Affinitätschromatographie konnten lösliche Isopentenylidiphosphat-Isomerasen gewonnen werden. Die Gesamtmenge an gereinigtem Protein aus einem Liter Kulturvolumen betrug 4,8 mg für das Enzym aus *Escherichia coli* und 15,0 mg für das aus *Cannabis sativa*.

4.) Obwohl unterschiedliche Expressionsvektoren und -stämme verwendet wurden, zeigten die rekombinanten Isomerasen nach Umsetzung mit Isopentenylidiphosphat in der HPLC-Analyse zunächst keine katalytische Aktivität. Daraufhin wurde die eingesetzte HPLC-Methode zur Trennung phosphorylierter Verbindungen nach McCaskill und Croteau überprüft. Das für Dimethylallyldiphosphat erfasste Signal bei 63 min sollte von einer anderen Verbindung stammen. Um diese Verbindung zu identifizieren, wurde Isopentenylidiphosphat mit Proteinfractionen aus dem *Escherichia coli*-Stamm ID16 umgesetzt. Nach HPLC-analytischer Trennung trat ein Signal bei 63 min auf, obwohl die Isopentenylidiphosphat-Isomerase in diesem Stamm deletiert war. Das Enzym, das durch Reaktion mit Isopentenylidiphosphat eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 63 min erzeugt, wurde aus dem *Escherichia coli*-Stamm ID16 über sechs Anreicherungsschritte zur Homogenität gereinigt. Durch Proteinsequenzierung konnte die Anorganische Pyrophosphatase identifiziert werden. Das Enzym dephosphoryliert Isopentenylidiphosphat zu Isopentenylmonophosphat. Das Signal bei 63 min wird nicht von Dimethylallyldiphosphat, sondern von Isopentenylmonophosphat verursacht. Die Trennung von Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat ist mit der HPLC-Methode nach McCaskill und Croteau nicht möglich. Die Isomere eluieren gemeinsam mit einer Retentionszeit von 78 min.

5.) Durch Katalyse der Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Cannabis sativa* und aus *Escherichia coli* wurde Isopentenylidiphosphat teilweise zu Dimethylallyldiphosphat isomerisiert. Die Produkte dieser Reaktion wurden durch Dephosphorylierung in ihre korrespondierenden nichtphosphorylierten Alkohole überführt und konnten nach Neuordnung der HPLC-analytischen Signale getrennt werden. Somit gelang der Nachweis der katalytischen Aktivität der rekombinanten Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Cannabis sativa* und aus

Escherichia coli. Der K_M -Wert und die Maximalgeschwindigkeit der Isopentenylidiphosphat-Isomerasen aus *Escherichia coli* betragen 23 μM und 1,44 pmol/s. Für das Enzym aus *Cannabis sativa* wurden die entsprechenden Werte mit 62 μM und 0,68 pmol/s bestimmt.

6.) Die funktionale Untersuchung einer weiteren Isopentenylidiphosphat-Isomerase wurde an *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. In diesen Pflanzen war durch Virus-vermittelte RNA-Interferenz („virus induced gene silencing“) das für die Isopentenylidiphosphat-Isomerase codierende *idi*-Gen ausgeschaltet. Neu entwickelte Blätter von Pflanzen, die mit dem Virus-Konstrukt des *idi*-Gens (Dr. J. Page) infizierten waren, zeigten ein hellgelbes bis grünes, teilweise gesprenkeltes Erscheinungsbild im Vergleich zu den gleichmäßig grünen Blättern der Kontrollpflanzen. Bei mikroskopischer Analyse der mit dem Virus-Konstrukt des *idi*-Gens infizierten Pflanzen waren im Schwammparenchym von hellgelben Blattbereichen Zellen mit geringer Chloroplastendichte zu erkennen. Die Zellen der Kontrollpflanzen zeigten zahlreiche Chloroplasten. Durch Ausschalten des *idi*-Gens wurden Gesamtchlorophylle und -carotinoide auf etwa 67 % reduziert. Die Isopentenylidiphosphat-Isomerase scheint in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen zur Synthese isoprenoider, z. B. an der Photosynthese beteiligter, Verbindungen eine funktionale Bedeutung zu haben.

Fütterungsexperimente mit ^{14}C -1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat und ^{14}C -Mevalonsäurelacton als Vorstufen der plastidären bzw. cytosolischen Terpenbiosynthese an Blätter von pigmentgestörten und Kontrollpflanzen zeigten keine unterschiedlichen prozentualen Einbauraten in Carotinoide, Chlorophylle, Xanthophylle und Sterole. Zur *in vitro* Untersuchung der Terpenbiosynthese wurden Chloroplasten aus diesen Pflanzen isoliert und am Saccharosegradienten getrennt. In Fütterungsexperimenten wurden die Plastiden mit ^{14}C -1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat bzw. ^{14}C -Isopentenylidiphosphat inkubiert. Ein Einbau der radioaktiven Markierung in Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat bzw. in längerkettige Isoprenoide wurde nicht detektiert.