

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Boran Altincicek

Diplom-Biologe

Gießen, März 2002

**Identifizierung neuer Enzyme des Mevalonat-unabhängigen
Methylerythritol-4-phosphat-Stoffwechselweges zur
Isoprenoidbiosynthese**

Die vorliegende Arbeit
wurde mit Finanzierung und Auftrag der
Jomaa-Pharmaka GmbH
in der Zeit von März 1999 bis März 2002
im Labor von
Prof. Dr. Ewald Beck
im Biochemischen Institut
am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen
durchgeführt.

Prodekan:

Prof. Dr. Rainer Renkawitz

Genetisches Institut der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter:

Prof. Dr. Ewald Beck

Biochemisches Institut
Klinikum an der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Prof. Dr. Karl Forchhammer

Institut für Mikrobiologie und
Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hassan Jomaa und Herrn Prof. Dr. Ewald Beck, die die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben und Herrn Prof. Dr. Karl Forchhammer, der diese Dissertation betreut hat.

Ich danke herzlichst Herrn Dr. Jochen Wiesner für das kritische Lesen der Dissertation, Herrn Dr. Martin Hintz, Frau Ann-Kristin Kollas, Frau Silke Sanderbrand, Herrn Dr. Matthias Eberl und Herrn Dr. Jochen Wiesner für Hilfe und fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen. Für hervorragende technische Assistenz danke ich Frau Irina Steinbrecher, Frau Dajana Henschker und Frau Ursula Jost. Ich danke Frau Ann-Kristin Kollas für ihre große Hilfe bei der Isolierung des (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphates, Herrn Dr. Matthias Eberl und Frau Rosel Engel für die Ausführung der $\gamma\delta$ T-Zellaktivierungs-Experimente, Herrn Gergis Bassili für die fachmännische Blutabnahme und Frau Dr. Ute Bahr für die Ausführung der Massenspektrometrie. Herr Prof. Dr. G. M. Church (Boston) hat freundlicherweise das pKO3-Vektorsystem zur Verfügung gestellt.

Besonders danke ich allen Mitgliedern des Labors und der Jomaa-Pharmaka und meiner Familie.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Dissertation wurden in folgenden Artikeln publiziert:

1. **Altincicek, B., A. K. Kollas, M. Eberl, S. Sanderbrand, U. Bahr, A. Reichenberg, E. Beck, F. Donald, J. Wiesner, M. Hintz, and H. Jomaa.** *in press.* Accumulation of a potent $\gamma\delta$ T cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*. *Immunol.*
2. **Altincicek, B., A. K. Kollas, M. Eberl, J. Wiesner, S. Sanderbrand, M. Hintz, E. Beck, and H. Jomaa.** 2001. *LytB*, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **499**:37-40.
3. **Altincicek, B., A. K. Kollas, S. Sanderbrand, J. Wiesner, M. Hintz, E. Beck, and H. Jomaa.** 2001. GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **183**:2411-6.
4. **Altincicek, B., J. Moll, N. Campos, G. Foerster, E. Beck, J. F. Hoeffler, C. Grosdemange-Billiard, M. Rodriguez-Concepcion, M. Rohmer, A. Boronat, M. Eberl, and H. Jomaa.** 2001. Cutting edge: human $\gamma\delta$ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol.* **166**:3655-8.
5. **Hintz, M., A. Reichenberg, B. Altincicek, U. Bahr, R. M. Gschwind, A. K. Kollas, E. Beck, J. Wiesner, M. Eberl, and H. Jomaa.** 2001. Identification of (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **509**:317-22.
6. **Jomaa, H., J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Turbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, and E. Beck.** 1999. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science.* **285**:1573-6.

Zusammenfassung

Der Mevalonat (MVA)-unabhängige Methylerythritol-4-phosphat (MEP)-Stoffwechselweg zur Biosynthese von Isoprenoiden wurde erst vor wenigen Jahren in Bakterien und in den pflanzlichen Plastiden identifiziert. Da dieser für viele Organismen essentielle Stoffwechselweg im Menschen nicht vorkommt, stellen die beteiligten Enzyme geeignete Zielstrukturen für die Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe dar.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur zwei Enzyme, die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP)-Synthase (DXS) und DOXP-Reduktoisomerase (DXR) bekannt, die die ersten beiden Reaktionsschritte des MEP-Stoffwechselweges katalysieren. Mit Hilfe von bioinformatischen Ansätzen konnten verschiedene Gene identifiziert werden, die möglicherweise für noch unbekannte Enzyme des MEP-Stoffwechselweges kodieren. Um die Beteiligung dieser Gene an dem MEP-Stoffwechselweg zu beweisen, wurde ein genetischer Ansatz gewählt. Hierzu wurden zuerst genetisch veränderte *Escherichia coli*-Bakterien generiert, die in der Lage sind, Isopentenylpyrophosphat aus exogenem Mevalonat zu synthetisieren. Dazu wurde ein künstliches Operon konstruiert, das den *E. coli*-Bakterien die Expression der Hefe-Gene der MVA-Kinase (MVK), Phospho-MVA-Kinase (PMK) und der MVA-pyrophosphat-Decarboxylase (MPD) erlaubt. In diesen Bakterien konnten im MEP-Stoffwechselweg involvierte Gene deletiert werden. Dabei wurden die Gene *gcpE* und *lytB* als neue Gene des MEP-Stoffwechselweges in *E. coli* identifiziert. Zellen mit Deletionen dieser Gene konnten nur überleben, wenn das Medium mit Mevalonat supplementiert worden war oder die Zellen eine entsprechende episomale Kopie des jeweiligen Genes enthielten.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß ein bisher unbekanntes Intermediat des MEP-Stoffwechselweges zur Aktivierung von polyklonalen V γ 9V δ 2 T-Zellen des menschlichen Immunsystems verantwortlich ist. Deshalb wurden die generierten Deletionsmutanten in $\gamma\delta$ T-Zellaktivierungs-Experimente eingesetzt. Hierbei stellte sich heraus, daß *gcpE*-Gendeletionsmutanten ihr $\gamma\delta$ T-Zellaktivierungspotential fast vollständig verloren hatten, während *lytB*-Gendeletionsmutanten ein über 100-fach höheres Potential als der Wildtyp besaßen. Als $\gamma\delta$ T-Zellaktivator konnte eine Substanz isoliert werden, deren Struktur als (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMBPP) aufgeklärt wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, daß HMBPP ein neues Intermediat des MEP-Stoffwechselweges ist und das Produkt von GcpE und das Substrat von LytB darstellt.

3.9	Konstruktion des synthetischen MVA-Operon-Plasmides pSC-MVA aus <i>S. cerevisiae</i>	28
3.10	Überprüfung der Funktionalität der MVA-Operon-Plasmide	29
3.11	Konstruktion der Genaustauschplasmide	29
3.12	Konstruktion der Deletionsmutanten.....	31
3.13	Komplementations-Experimente.....	32
3.14	Herstellung niedermolekularer Zellextrakte	32
3.15	Anionenaustausch-Chromatographie der niedermolekularen Zellextrakte	33
3.16	$\gamma\delta$ T-Zellaktivierungs-Experimente.....	33
3.17	Massenspektrometrie.....	34
4	<u>Ergebnisse</u>	35
4.1	Bioinformatische Ansätze zur Identifizierung neuer Gene des MEP-Stoffwechselweges	35
4.2	Genetische Konstruktion von <i>E. coli</i> -Bakterien, die exogenes MVA zur Isoprenoidbiosynthese nutzen können.....	36
4.2.1	Konstruktion zweier MVA-Operon-Plasmide aus <i>B. burgdorferi</i>	37
4.2.2	Konstruktion eines artifiziellen MVA-Operons unter Verwendung von <i>S. cerevisiae</i> -Genen.....	39
4.3	Validierung des experimentellen Systems	42
4.4	Verifikation der Beteiligung von GcpE am MEP-Stoffwechselweg.....	43
4.5	Verifikation der Beteiligung von LytB am MEP-Stoffwechselweg.....	45
4.6	Verifikation der Beteiligung von YgbP (IspD) am MEP-Stoffwechselweg	46
4.7	Einfluß der MVA-Konzentration auf das Wachstum verschiedener Deletionsmutanten.....	47
4.8	Aktivierung menschlicher $\gamma\delta$ T-Zellen durch Intermediate des MEP-Stoffwechselweges	48
4.9	Identifizierung von HMBPP als Produkt von GcpE und putatives Substrat von LytB.....	48
5	<u>Diskussion</u>	52
6	<u>Ausblick</u>	59
	<u>Anhang</u>	60
	<u>Literatur</u>	68

Abkürzungen

A	Ampère
AACT	Acetoacetyl-CoA Thiolase (EC 2.3.1.9)
Amp	Ampicillin
AP	Auftragspuffer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bla	β-Lactamase; Ampicillinresistenzgen
bp	Basenpaare
Cam	Chloramphenicol
CTAP	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
Da	Dalton
D-GAP	D-Glyceraldehyd-3-phosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat (dATP, dGTP, dCTP und dTTP)
DOX	1-Deoxy-D-xylulose
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DTT	Dithiothreitol
DXS	DOXP-Synthase
DXR	DOXP-Reduktoisomerase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FNI	FMN/NAD(P)H-abhängige IPI
FPP	Farnesylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
HMBPP	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat
HMG-CoA	3-(S)-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGR	HMG-CoA-Reduktase (EC 1.1.1.34)
HMGS	HMG-CoA-Synthase (EC 4.1.3.5)
IPI	IPP-Isomerase (EC 5.3.3.2)
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid

k	kilo
LMW	niedermolekulare Zellextrakte; <i>low molecular weight</i>
μ	mikro
m	milli
M	molar (mol/l)
ME	2-C-Methyl-D-erythritol
ME-CDP	4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol
MEcPP	2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MPD	MVA-pyrophosphat-Decarboxylase (EC 4.1.1.33)
MVA	(<i>R</i>)-Mevalonat
MVK	MVA-Kinase (EC 2.7.1.36)
n	nano
OD _{600 nm}	Optische Dichte bei 600 nm
ori	<i>origin</i> ; Replikationsursprung
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PMK	Phospho-MVA-Kinase (EC 2.7.4.2)
PP	Pyrophosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TELT	Tris-EDTA-LiCl-Triton-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> ; Aktivitätseinheit
V	Volt
(v/v)	Volumenverhältnis
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen-Verhältnis

(w/w)	Massenverhältnis
YchB	ME-CDP-Kinase (IspE)
YgbB	MEcPP-Synthase (IspF)
YgbP	ME-CDP-Synthetase (IspD)

1. Einleitung

Isoprenoide stellen eine der umfangreichsten Gruppe natürlicher Substanzen dar. Mehr als 23.000 verschiedener Isoprenoide sind bis heute beschrieben (71), größtenteils Produkte des sekundären Pflanzenstoffwechsels. Daneben existieren verschiedene Isoprenoide, die in allen Organismen in essentiellen zellulären Vorgängen involviert sind (11, 68). Die Hauptfunktionen wichtiger Isoprenoide sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Organismus	Isoprenoide	Funktion
Eubakterien	Ubi- und Menaquinon	Elektronentransport
	Hopanoide	Membranstabilisation
	Baktoprenol	Zellwandsynthese
	Phytol und Karotinoide	Photosynthese
	Antibiotika	Wachstumsvorteil
Archaeen	Isoprenylglycerolether	Zellmembranbestandteil
Eukaryoten	Sterole	Membranstabilisation, Steroidhormone, Gallensäuren
	Ubi- und Plastoquinon	Elektronentransport
	Dolichole	Kohlenhydrattransport
	Phytole und Karotinoide	Photosynthese
	Mono-, Sesqui-, Di- und Triterpene	sekundäre Pflanzenmetabolite

Tabelle 1. Hauptfunktionen wichtiger Isoprenoide.

Die in der Ernährung des Menschen wichtigen fettlöslichen Vitamine A, D, E und K zählen auch zu den Isoprenoiden. Weiterhin ist die Proteinprenylierung mit Farnesyl- oder Geranylgeranylresten an der Wachstumsregulation tierischer Zellen beteiligt. Deshalb gelten Inhibitoren der Proteinprenylierung als vielversprechende Wirkstoffe in der Krebstherapie (26). Prenylierte Proteine, wie z. B. das Ras-Protein, sind meist in Signaltransduktionssystemen involviert.

Isoprenoide sind aus C_5 -Kohlenstoffeinheiten, dem Isopren (2-Methyl-2,3-buten, C_5H_8), aufgebaut (Abb. 1).

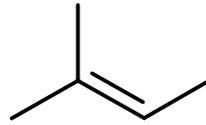


Abbildung 1. Isopren-Grundstruktur (C_5 -Einheit).

Die Synthese sämtlicher Isoprenoide wird über die Reaktion von Isopentenylpyrophosphat (IPP) mit seinem allylischen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) eingeleitet (Abb. 2). Als erstes entsteht durch Abspaltung des Pyrophosphates des DMAPP das allylische Kation. Durch Addition an die Doppelbindung des IPP und Eliminierung eines Protons entsteht das Geranylpyrophosphat (GPP). In analoger Weise kann das allylische GPP mit IPP zu Farnesylpyrophosphat (FPP) und dieses weiter zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) verlängert werden. Diese Verlängerung kann zu verschiedenen Polyprenylen weitergeführt werden (Abb. 2). Die einzelnen enzymatischen Schritte werden von spezifischen Prenyltransferasen katalysiert (83).

Neben dieser sog. Kopf-Schwanz-Addition (1'-4'-Addition) von IPP an allylische Polyprenylpyrophosphate können FPP und GGPP über die sog. Schwanz-Schwanz-Addition dimerisieren. Aus zwei Molekülen FPP entsteht dabei Squalen, das als Vorstufe für die Synthese der Sterole und der cyclischen Triterpene dient. Karotinoide können aus zwei Molekülen GGPP synthetisiert werden.

Diversität wird durch Repetitionen des Isopren-Motivs, Zyklisierungsreaktionen, Umlagerungen und weitere Oxidationen des Kohlenstoffskeletts erreicht.

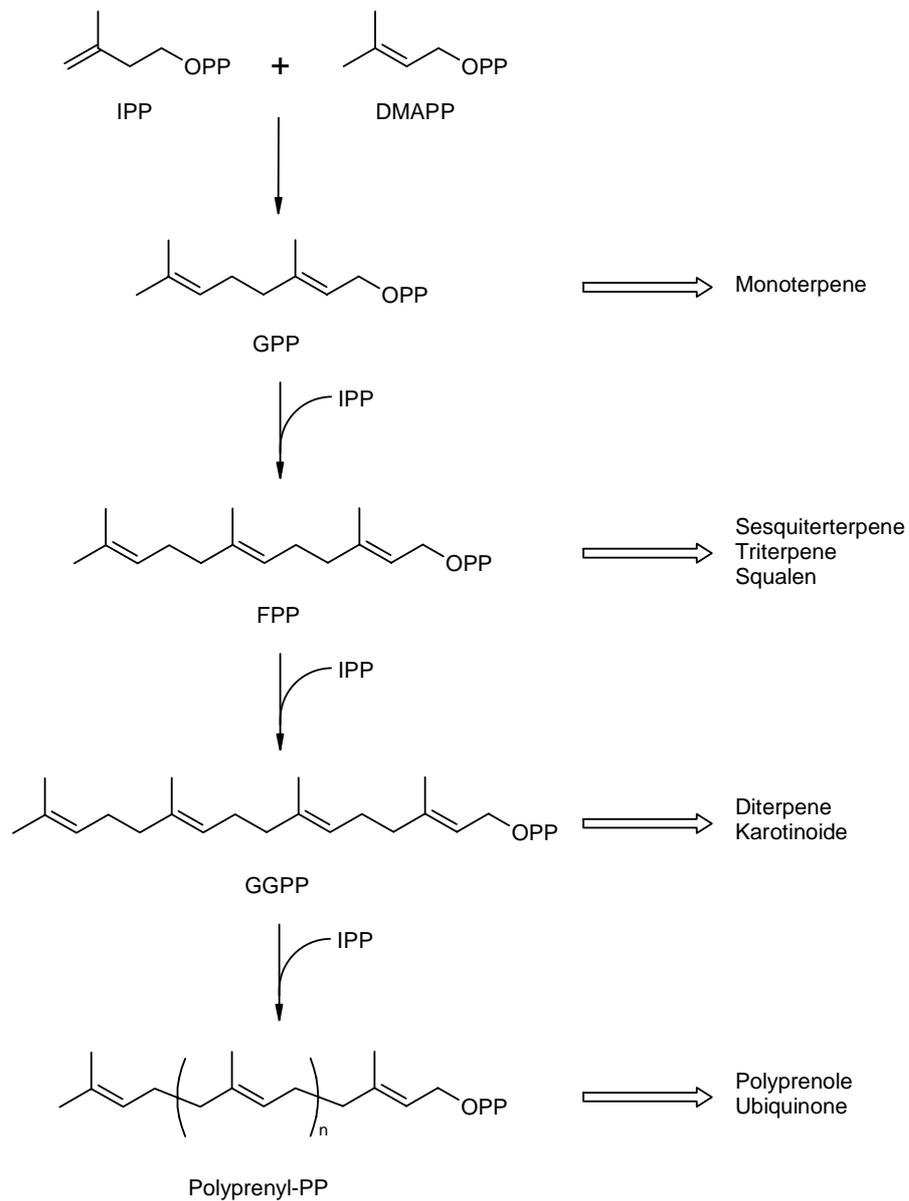


Abbildung 2. Biosynthese von längerkettigen Isoprenoïden ausgehend von IPP und DMAPP.

Die Grundbausteine aller Isoprenoïde, IPP und DMAPP, können über zwei verschiedene Biosynthesewege, den Mevalonat (MVA)- und den Methylerythritol-4-phosphat (MEP)-Stoffwechselweg, hergestellt werden.

Konrad Blochs Untersuchungen an Ratten in den vierziger Jahren ergaben, daß Isoprenoïde ausgehend von Acetat gebildet werden. Bei Ratten, die mit radioaktivem Acetat gefüttert wurden, ergab sich ein entsprechendes Isotopenmuster des isolierten Cholesterins. Weitere Untersuchungen führten zur Aufklärung des MVA-Stoffwechselweges (5, 10). Dieser Stoffwechselweg konnte bei Tieren, Hefen, Pflanzen, Archaeen und einigen Bakterien nachgewiesen werden (77, 85, 86).

Der MVA-Stoffwechselweg beginnt mit der Bildung des Acetoacetyl-CoA aus zwei Molekülen Acetyl-CoA. Diese Reaktion wird von der Acetoacetyl-CoA-Thiolase (AACT, EC 2.3.1.9) katalysiert. Durch Aldoladdition einer weiteren Einheit Acetyl-CoA, katalysiert durch die 3-(S)-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Synthase (HMGS, EC 4.1.3.5), entsteht HMG-CoA. HMG-CoA kommt im Cytosol, aber auch in Mitochondrien vor, wo es vor allem für die Ketogenese genutzt wird. Im Cytosol stellt MVA (*R*-Form) das erste Intermediat dar, das ausschließlich zur Isoprenoidbiosynthese genutzt wird. MVA wird unter Verbrauch von zwei NADPH-Molekülen aus HMG-CoA durch die HMG-CoA-Reduktase (HMGR, EC 1.1.1.34) gebildet. Dieser Schritt ist irreversibel und dient als wesentlicher Regulationspunkt der IPP-Biosynthese (26). Phosphorylierungen des MVA durch die MVA-Kinase (MVK, EC 2.7.1.36) zu Phospho-MVA (MVA-P) und weiter durch die Phospho-MVA-Kinase (PMK, EC 2.7.4.2) führen zum MVA-pyrophosphat (MVA-PP). Unter Verbrauch eines weiteren ATP-Moleküls werden schließlich die 3-Hydroxygruppe und die Carboxylgruppe eliminiert, und es entsteht IPP. Diese Reaktion wird durch die MVA-pyrophosphat-Decarboxylase (MPD, EC 4.1.1.33) katalysiert. Die IPP-Isomerase (IPI, EC 5.3.3.2) isomerisiert reversibel IPP zu DMAPP (Abb. 3).

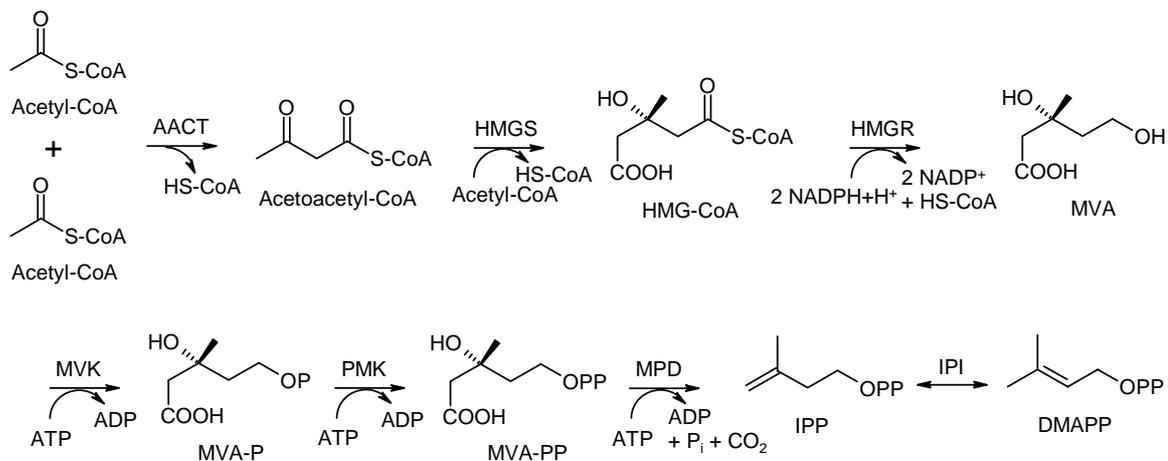


Abbildung 3. Der MVA-Stoffwechselweg zur Bildung von IPP und DMAPP. AACT, Acetoacetyl-CoA-Thiolase; HMGS, HMG-CoA-Synthase; HMGR, HMG-CoA-Reduktase; MVK, MVA-Kinase; PMK, Phospho-MVA-Kinase; MPD, MVA-pyrophosphat-Decarboxylase; IPI, IPP-Isomerase; P, Phosphat; PP Pyrophosphat.

Der MVA-Stoffwechselweg wurde als universeller Biosyntheseweg für Isoprenoide angesehen, obwohl bereits in den 50er Jahren erste kontroverse Beobachtungen gemacht wurden (68). Radioaktives Acetat konnte in Pflanzen zwar erfolgreich in Sterole eingebaut werden, aber kaum in Karotinoide oder Mono- und Diterpene. Auch wirkte Mevinolin, ein spezifischer HMG-CoA-

Reduktase-Inhibitor, nur sehr schwach auf die Chloroplastenpigmentierung, während die Sterolbiosynthese fast vollständig inhibiert werden konnte.

Erst Untersuchungen der Arbeitsgruppe von M. Rohmer und D. Arigoni konnten in den letzten Jahren einen alternativen und MVA-unabhängigen Biosyntheseweg von Isoprenoiden beweisen (3, 68, 69). Verschiedene ^{13}C -markierte Substrate, wie Glukose, Acetat, Pyruvat, Erythrose und Glycerin wurden unterschiedlichen Eubakterien als Kohlenstoffquelle angeboten und anhand der ermittelten Markierungsmuster der untersuchten Isoprenoide (Hopanoide und Ubiquinone) ein neuer Stoffwechselweg postuliert. Nach weiteren Markierungsexperimenten mit verschiedenen *Escherichia coli*-Mutanten konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß der erste Schritt die Kondensation von decarboxyliertem Pyruvat mit D-Glyceraldehyd-3-phosphat (D-GAP) zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) sein mußte (70). Auch die weitere Umlagerung von DOXP zu 2-C-Methyl-D-erythrose-4-phosphat und die Reduktion zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) wurden postuliert, bevor die beteiligten Enzyme oder diese Intermediate identifiziert wurden. Entsprechende Analogien zu dieser Reaktion fand man in der Biosynthese von verzweigt-kettigen Aminosäuren (Valin, Leucin und Isoleucin). Hierbei wird das Acetolactat (α -Acetyl- α -hydroxybutyrat) durch die Ketosäure-Reduktoisomerase (EC 1.1.1.86) umgelagert und reduziert.

Der MEP-Stoffwechselweg konnte als alternativer Stoffwechselweg zum MVA-Stoffwechselweg in vielen Eubakterien und in pflanzlichen Plastiden identifiziert werden (Tabelle 2) (11, 21, 49, 51, 68).

	MVA-Stoffwechselweg	MEP-Stoffwechselweg
Archaeobakterien	+	-
Pilze	+	-
Tiere	+	-
Pflanzen	+	+
Eubakterien	+	+

Tabelle 2. Vorkommen des MVA- und des MEP-Stoffwechselweges in verschiedenen Organismen.

Der erste Schritt des MEP-Stoffwechselweges stellt die Synthese von DOXP über eine thiaminabhängige Kondensation von decarboxyliertem Pyruvat mit D-GAP dar (Abb. 4). Diese Reaktion wird durch die DOXP-Synthase (DXS) katalysiert (1, 14, 29, 45, 50, 54, 61, 78). Da

DOXP auch als Vorstufe für die Synthese von Thiamin und Pyridoxol dient (7, 15, 20, 33, 47), stellt erst die Bildung von MEP die erste eindeutige Reaktion zur Synthese von Isoprenoiden dar. MEP wird durch Isomerisierung und Reduktion des DOXP durch das Enzym DOXP-Reduktoisomerase (DXR) gebildet (Abb. 5) (1, 14, 27, 37, 39, 42, 46, 59, 62, 65, 73, 81, 84).

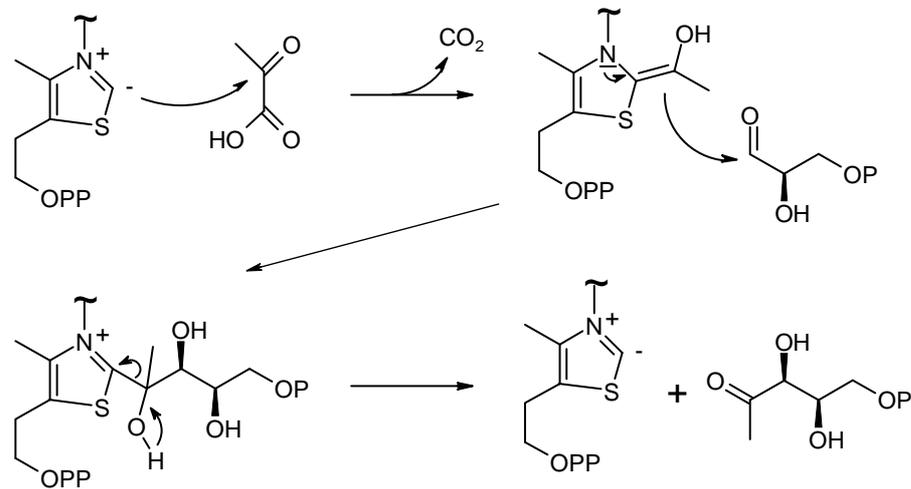


Abbildung 4. Die TPP-abhängige Reaktion der DXS zur Synthese von DOXP aus Pyruvat und D-GAP.

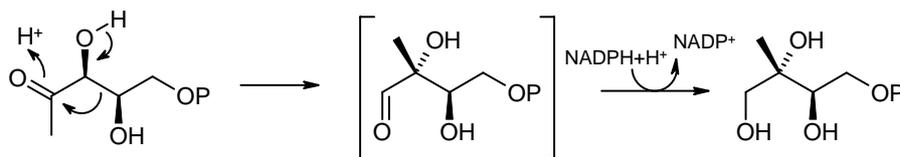


Abbildung 5. Möglicher Mechanismus der Strukturumlagerung und Reduktion des DOXP zu MEP durch die DXR.

Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich die ersten beiden Reaktionsschritte bekannt. Ausgehend vom MEP müssen in noch unbekanntem Reaktionen drei Dehydratationen, zwei Reduktionen und eine Phosphorylierung zur Synthese von IPP postuliert werden (Abb. 6).

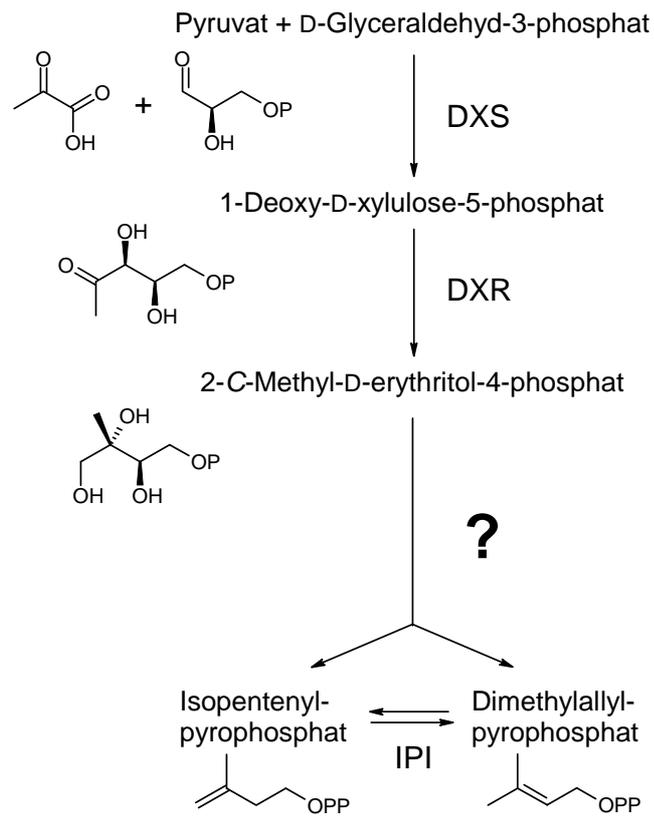


Abbildung 6. Darstellung der Biosynthese von IPP und DMAPP über den MEP-Stoffwechselweg. Die enzymatischen Reaktionen ausgehend vom MEP waren zu Beginn der Arbeit noch unbekannt.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung bisher unbekannter Enzyme des MEP-Stoffwechselweges. Es sollten mit bioinformatischen Ansätzen neue Gene des MEP-Stoffwechselweges identifiziert und deren Beteiligung an dem MEP-Stoffwechselweg in einem genetischen Ansatz demonstriert werden. Hierzu sollte ein genetisch veränderter *E. coli*-Stamm generiert werden, der IPP über exogenes MVA synthetisieren kann. In diesem Stamm sollten Deletionen der Gene des MEP-Stoffwechselweges zu MVA-abhängigem Wachstum führen, die ansonsten letal sind. Die Aufklärung der noch unbekanntenen Reaktionsschritte des MEP-Stoffwechselweges ist nicht nur von allgemeinem biochemischen Interesse, sondern liefert auch wichtige Informationen für die Entwicklung neuartiger antimikrobieller Wirkstoffe.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Zentrifugen

Kühlzentrifuge: J2-21 mit den Rotoren JA10, 14, 17 und 20, Beckman Instruments, Summerset, USA

Tischzentrifuge: Biofuge A, Heraeus, Hanau und Centrifuge 5415C, Eppendorf, Engelsdorf

Gelelektrophoresesysteme

Horizontales Minigelsystem, AGS, Heidelberg

Vertikales Minigelsystem, von Keutz, Reiskirchen

Spannungsgeber EPS 500/400, Pharmacia LBK, Freiburg

Schüttler

Diffusions-Entfärbeapparatur, Desaga, Heidelberg

Mixer 54322, Eppendorfgerätebau, Hamburg

Vortex Genie2, Scientific Industries Bohemia, New York, USA

Rührer Ikamag Ret, Ika-Werk, Staufen i.Br.

Kulturschüttler 3020, GFL, Burgwedel

Sonstige Geräte

Robocycler, Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Transilluminator, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch

Polaroidbelichtungssystem, Kodak, Rochester, USA

Ultraschall Sonoplus HD70, Bandelin, Berlin

3.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia, Freiburg

Bachem, Heidelberg

Biomol, Hamburg

Biozym, Oldendorf

Clontech, Heidelberg

Difco, Augsburg
Eppendorf, Hamburg
GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
Gibco-BRL, Eggenstein
ICN, Meckenheim
Integra, Fernwald
Invitrogen, Leek, Niederlande
Kalensee, Giessen
Macherey-Nagel, Düren
MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Merck, Darmstadt
Millipore, Eschborn
Promega, Mannheim
Qiagen, Hilden
Roche Diagnostics, Mannheim
Roth, Karlsruhe
Serva, Heidelberg
Sigma Aldrich, Taufkirchen
Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Spezielle Chemikalien

Fosmidomycin (3-(<i>N</i> -formyl- <i>N</i> -hydroxyamino)- propylphosphonat)	C. Weidemeyer, Giessen
D,L-Mevalonsäurelacton	Sigma Aldrich

3.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide wurden von der Firma Interactiva (Heidelberg) bezogen. Die Sequenzen der genutzten Oligonukleotide sind in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.

3.4 Plasmide

pQE-Vektoren

pQE-Vektoren der Firma Qiagen eignen sich für die Expression von His₆-fusionierten Proteinen in *E. coli*. Dieser Vektor besitzt ein optimiertes und IPTG-induzierbares Promotor/Operator-Element, bestehend aus dem T5-Promotor, der gut von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird, und zwei lac-Operatorsequenzen. Eine starke Transkription wird durch eine synthetische Ribosomenbindestelle (RBSII) und zwei starke transkriptionelle Terminatoren (t₀ vom Phagen Lamda und T1 vom *rrnB* Operon) erreicht. Die Replikation wird über ein colE1-ori gewährleistet, und als Selektorgen dient das *bla*-Gen, das für eine β-Lactamase kodiert.

pRIL

Dieses Plasmid der Firma Stratagene, wurde aus BL21-CodonPlusRIL-Zellen isoliert. Es kodiert für die t-RNA-Gene *argU* (für R), *ileY* (für I) und *leuW* (für L), um Gene mit seltenen Codons in *E. coli* exprimieren zu können. Das ori ist mit colE1-Vektoren kompatibel. Als Selektorgen dient ein Cam-Resistenzgen (Chloramphenicolacetyltransferase).

pKO3

Der pKO3-Vektor, zur Verfügung gestellt von G. M. Church (Boston, USA), wird für präzise und Leseraster-erhaltende Deletionsmutationen in *E. coli* genutzt (53). Dieses Plasmid besitzt ein temperatursensitives pSC101-ori, ein Cam-Resistenzgen und das *SacB*-Gen, das für die Levansucrase kodiert und in Gegenwart von über 5% Sucrose letal für *E. coli* ist.

pCR2.1-TOPO-T/A

Dieses Plasmid der Firma Invitrogen diente vor allem der Zwischenklonierung von PCR-Produkten, da 3'-Thymidinüberhänge und eine kovalent gebundene Topoisomerase vom *Vaccinia*-Virus die Verbindung des PCR-Produktes und des Plasmides ermöglichen. Dieses Plasmid besitzt einen schwachen lac-Promotor incl. *lacZα*-Fragment, das f1 ori und das pMB1 ori (vom pUC-Plasmid). Für die Selektion dient entweder das *bla*-Gen und/oder ein Kanamycinresistenzgen.

pBAD-TOPO-T/A

Dieses Plasmid der Firma Invitrogen eignet sich für die direkte Klonierung eines PCR-Produktes, das als His₆-Fusion expremiert werden kann. Er besitzt ein pMB1-ori, ein *araBAD*-Promotor/Operator-Element mit einem *rrnB*-Transkriptionsterminator und ein *bla*-Gen. Ein *araC*-Gen dient der Repression des Promotors.

3.5 Internetrecherchen und -Programme

Protein- und DNA-Datenbanken

GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

SWISSPROT und TrEMBL (www.expasy.ch)

Blast-Programme

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

www2.ebi.ac.uk/blast2

dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/protein-search.html

www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/blast_server.shtml

www.tigr.org/tdb/ebd/pfdb/pfdb.html

Alignment-Programme

genome.cs.mtu.edu/map.html

dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html

www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Operonstruktur-Analysen

bmb.med.miami.edu/ecogene/

wit.mcs.anl.gov/WIT2/

Patentrecherchen

www.delphion.com

de.espacenet.com

3.6 Allgemeine mikrobiologische Arbeiten

3.6.1 Bakterienstämme und Medien

XL1Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacI^dZΔM15 Tn10* (Tet^r))

TOP10F': *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str^r) *endA1 nupG* (F' *lacI^d Tn10* (Tet^r))

TOP10: *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str^r) *endA1 nupG*

DSM 498: ATCC 23716; Wildtyp *E. coli* K-12 Stamm

Die Bakterien wurden unter Schütteln bei 37°C in Standard-I Medium (Merck) kultiviert. Zur Herstellung von Nährböden wurden 1,5% (w/v) Agar (Difco Bacto Agar) zugegeben. Selektivmedien wurden je nach Erfordernis mit folgenden Antibiotika supplementiert:

50 bis 150 µg Ampicillin/ml

25 µg Chloramphenicol/ml

25 µg Kanamycin/ml

5 µg Tetracyclin/ml

Die Bakterien wurden zur Langzeitlagerung mit einem Glyceringehalt von 10-30% bei -70°C eingefroren (4).

3.6.2 Hefestamm und Medien

BJ1991: MAT α *ura3-52 leu2 trp1 pep4-3 prb1-1122*

Dieser *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm (40) wurde bei 30°C in YPD Medium (4) kultiviert. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen mit einem Glyceringehalt von 10-30% bei -70°C eingefroren (4).

3.7 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten

3.7.1 Lagerung der DNA

Die DNA wurde in autoklaviertem TE-Puffer bei -20°C gelagert (4).

<u>TE-Puffer:</u>	10,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	0,1	mM	EDTA

3.7.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

TELT-Methode

Diese Minipräparationsmethode (35, 87) eignet sich für die rasche Gewinnung von geringen Mengen an Plasmid-DNA. Die erhaltenen DNA-Mengen aus verschiedenen Bakterienkolonien genügen für anschließende Analysen mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Diese Methode eignet sich allerdings nur für Bakterienstämme ohne Endonukleaseaktivität (*endA1*-Genotyp), wie XL1Blue und TOP10.

1,5 ml einer dichten Bakterienkultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (20 s, 14.000 g). Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakteriensediment in 200 µl TELT-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl frische LysozymbLösung (10 mg/ml in H₂O) zugegeben, möglichst kurz darauf in einem Wasserbad 1 min bei 100°C gekocht, anschließend 5 min auf Eis abgekühlt und wieder zentrifugiert (15 min, 14.000 g).

Nach Entfernen des viskosen Sediments wurde durch Zugabe von 2 Volumen absoluten Ethanol und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur die DNA gefällt. Durch Zentrifugation wurde die DNA sedimentiert (15 min, 14.000 g), danach einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für eine halbe Stunde in 30 µl TE-Puffer mit RNaseA (1 µg/ml) gelöst. Für analytische Restriktionsanalysen wurden 2 bis 3 µl dieser DNA-Lösung eingesetzt.

<u>TELT-Puffer:</u>	50,0	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	62,5	mM	EDTA
	2,5	M	LiCl
	0,4	% (v/v)	Triton x-100

GFX™ Micro Plasmid Prep Kit

Diese Komplettausrüstung der Firma Amersham Pharmacia basiert auf zentrifugierbaren DNA-Bindesäulen mit einer Glasfibernmatrix. In relativ kurzer Zeit konnten ca. 100 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Dieser Kit wurde zur analytischen Plasmidpräparation alternativ zur TELT-Methode genutzt.

Nucleobond Kit

Diese Komplettausrüstung der Firma Macherey-Nagel basiert auf Ionenaustauschmaterial zur Bindung der DNA. Es wurde für die Gewinnung von etwa 1 mg Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers genutzt.

3.7.3 Präparation von genomischer DNA aus Bakterien

Qiagen genomic tip 20/G

Diese Komplettausrüstung der Firma Qiagen basiert auf Ionenaustauschmaterial zur Gewinnung von genomischer DNA.

Genomische DNA-Präparation für die PCR

20 µl einer dicht gewachsenen Übernachtskultur wurden mit 180 µl H₂O versetzt und 20 min gekocht. 1 bis 2 µl dieser Lösung wurden in einen 20 µl PCR Ansatz eingesetzt.

3.7.4 Präparation von genomischer DNA aus dem Hefe-Stamm BJ1991

Qiagen genomic tip 20/G

Beschreibung siehe oben.

CTAP-Methode

20 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur wurden zentrifugiert (6 min, 5.000 g). Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 100 mM EDTA (pH 8,0)) aufgenommen. Mit Hilfe von Glasperlen wurden die Hefezellen desintegriert (7× je 30 s vortexen und 30 s in Eiswasser kühlen). Die Glasperlen wurden zuvor in konz. Salpetersäure gewaschen und mehrfach in 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) equilibriert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14.000 g wurden 700 µl des Überstandes mit 700 µl einer 2%-igen CTAB- und 1 M NaCl-Lösung gemischt, so daß sich eine Endkonzentration von 1% CTAB und 0,5 M NaCl einstellte, um alle Nukleinsäuren zu fällen (4). Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurde das Präzipitat 15 s bei 14.000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl TE-Puffer mit 1 M NaCl für 10 Minuten bei RT gelöst. Hierbei lösten sich vor allem Nukleinsäuren, nicht aber die Proteine (4). Nach weiterer 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt, das Pellet 2× mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 µl TE mit 1 µg RNase gelöst. Es ergab sich eine Ausbeute von ca. 5-10 µg genomischer DNA.

3.7.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde nach den Protokollen der Hersteller durchgeführt. Für eine Restriktionsspaltung wurden 1-3U Enzym pro µg

DNA eingesetzt. Für analytische Restriktionsspaltungen wurden ca. 500 ng DNA eingesetzt. Für präparative Restriktionsspaltungen wurden etwa 2-5 µg DNA verwendet.

Typischer Ansatz eines analytischen Restriktionsverdaues

2 µl DNA-Lösung (500 ng)
1 µl Puffer
je 3U Enzym
7 µl H₂O

Typischer Ansatz eines präparativen Restriktionsverdaues

12 µl DNA-Lösung (2-5 µg)
4 µl Puffer
je 15U Enzym
24 µl H₂O

3.7.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Agarosegele (300 bp bis 10 kbp) und über Polyacrylamidgele (50 bp bis 2 kbp).

Agarosegelelektrophorese

1% (w/v) Agarose wurde im TAE-Puffer in einem Mikrowellenofen durch Erhitzen gelöst, in eine horizontale Gelapparatur überführt und mit einem Kamm für die Taschenbildung versehen. Nach vollständigem Abkühlen wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Der Restriktionsansatz wurde mit Auftragspuffer (AP) versetzt und in eine Tasche überführt. Zwei Farbstoffe (Bromphenolblau und Xylencyanol) im AP erlaubten die Elektrophorese optisch zu verfolgen. Als Längenstandard wurde zusätzlich ein DNA-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer über eine Spannung von ca. 10 V/cm Elektrodenabstand. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromid-Lösung für 30 min gefärbt. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und fotografiert.

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der PAGE wird als Matrix vernetztes Polyacrylamid genutzt. Es wurde eine vertikale Gelapparatur verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von etwa 150 V in TBE-Puffer.

<u>TAE-Puffer (pH 8,3):</u>	40,0	mM	Tris-OH
	40,0	mM	Essigsäure
	2,0	mM	EDTA

Der TAE-Puffer ist als 20× Stocklösung ansetzbar.

<u>TBE-Puffer (pH 8,3):</u>	90,0	mM	Tris-OH
	90,0	mM	Borat
	2,5	mM	EDTA

Der TBE-Puffer ist als 10× Stocklösung ansetzbar.

<u>Auftragspuffer (10×):</u>	75,0	% (v/v)	Glycerin
	0,1	mM	EDTA
	0,1	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,1	% (w/v)	Xylencyanol

<u>Färbelösung:</u>	2,0	µg/ml	Ethidiumbromid
---------------------	-----	-------	----------------

Die Färbelösung ist als 10.000× Stocklösung ansetzbar.

DNA-Längenstandard:

Der in dieser Arbeit genutzte Längenstandard wurde von R. Füllkrug (Giessen) hergestellt. Hierzu wurde pSP65-DNA in verschiedenen Reaktionsansätzen mit den Restriktionsenzymen *HindIII*, *DraI* und *HinfI* verdaut, danach in einem Verhältnis von 1:2:3 gemischt und mit einem geeigneten Volumen Auftragspuffer versetzt.

<u>40% Acrylamidlösung (29:1):</u>	38,66	% (w/v)	Monoacrylamid
	1,33	% (w/v)	Bisacrylamid

<u>6%-iges Gel für die PAGE:</u>	1,5	ml	40% Acrylamidlösung
	1,0	ml	10× TBE-Puffer
	6,5	ml	H ₂ O

Die Lösung wurde mit 10 mg kristallinem Ammoniumperoxodisulfat (APS) versetzt. Nach Lösen des APS wurden 10 µl TEMED zugegeben, kurz gemischt und in die vorbereitete Gelapparatur eingegossen.

3.7.7 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach Auftrennung eines präparativen Restriktionsansatzes durch Agarose-Gelelektrophorese wurde das relevante Fragment auf dem UV-Transilluminatortisch mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des Easy Pure Kits (Biozym) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.7.8 Ligation

Bei der Ligation wurden DNA-Fragmente mit Hilfe eines Ligations-Kits (Eppendorf) über kompatible Restriktionsschnittstellen miteinander verbunden. Es wurde ein molares Verhältnis von etwa 1:2 bis 1:4 des Vektors zum Insert bei einer Gesamt-DNA-Menge von etwa 100 bis 200 ng eingesetzt.

Bei kompatiblen Schnittstellen innerhalb eines Vektors, war es notwendig, die 5'-Enden des Vektors zu dephosphorylieren, um eine mögliche Selbstligation zu verhindern. Hierzu wurde die alkalische Dephosphatase aus Shrimps (Roche) genutzt. 1U Dephosphatase pro μg Vektor wurde nach Beendigung des Restriktionsverdaues zugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Ligation von PCR-Produkten wurde mit Hilfe des pCR-TOPO-T/A-Vektor-Kits (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers vorgenommen. Hierbei wird ausgenutzt, daß PCR-Produkte der Taq-Polymerase ein Adenosin-Überhang an den 3'-Enden besitzen. Der Vektor ist mit Thymidin-Überhängen an den 5'-Enden ausgestattet. Bei diesem Kit wird nicht die Aktivität einer Ligase genutzt, sondern einer kovalent gebundene Topoisomerase, die die Enden der DNA-Stänge verbindet.

3.7.9 Transformation von Bakterien

Für Standardtransformationen wurden kompetente *E. coli* Bakterien mit der CaCl_2 -Methode hergestellt. Hierzu wurde eine Bakterienkultur in der logarithmischen Phase bei einer OD von ca 0,2 bis 0,6 bei 600 nm abzentrifugiert und in 1/2 des Ausgangsvolumen eiskalter 30 mM CaCl_2 -Lösung vorsichtig aufgenommen. Nach einer 1-stündigen Inkubation auf Eiswasser wurden die Zellen bei 3.500 g für 5 min abzentrifugiert und in 1/50 des Ausgangsvolumen eiskalter 30 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Nach Inkubation auf Eiswasser über Nacht erreichten die Zellen ihre höchste Kompetenz.

Für einige Anwendungen wurden hochkompetente TOP10 und TOP10F' Zellen bei der Firma Invitrogen bezogen.

Für einen typischen Transformationsansatz wurden 50 bis 100 µl einer Suspension kompetenter Bakterienzellen mit 100 bis 200 ng ligierter DNA oder ca. 1 ng Plasmid-DNA in einem eisgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubation im Wasserbad bei 42°C für 60 s wurde der Transformationsansatz mit 1 ml Standard-I Medium ohne Antibiotikum versetzt und für 30 min bei 37°C oder 1 h bei 30°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 100 µl Standard-I Medium resuspendiert und auf einen Nährboden mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

3.7.10 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem Stratagene Robocycler mit beheizbarem Deckel in einem Gesamtvolumen von 20 µl ausgeführt. Für Standard-PCRs wurde die Taq-Polymerase der Firma Promega nach Angaben des Herstellers genutzt. Für Produkte, die kloniert werden sollten, wurde das Expand high-fidelity PCR System der Firma Roche genutzt, um möglichst wenige Fehler während der Amplifikationen zu erhalten. Für eine Standard-PCR wurden nach 1 min bei 94°C Denaturierung, 30 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 30 s, Primeranlagerung (*annealing*) bei 45 bis 65°C für 30 s und Polymerisierung (*extension*) bei 72°C für 30 bis 90 s (je nach Länge der zu erwartenden Fragmente) ausgeführt. Eine abschließende 7-minütige Inkubation bei 72°C sollte einen vollständigen Abschluß der Polymerisierungsreaktion gewährleisten.

Standard-PCR-Ansatz

- 2 µl 10× Taq-Puffer ohne MgCl₂
- 1,6 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonz. 2 mM)
- 1 µl 10 µM Primer 1 (Endkonz. 500 nM)
- 1 µl 10 µM Primer 2 (Endkonz. 500 nM)
- 1 µl DNA-Vorlage (1 ng Plasmid, 100 ng genomische DNA oder 10⁴ Zellen)
- 1 µl 2,5 mM dNTPs (Endkonz. je 125 µM)
- 0,2 µl Taq-Polymerase (1U)
- 12,2 µl H₂O

Zugabe von 1-5% DMSO verringert unspezifische DNA-Anlagerungen und Primer-Dimer-Bildung. 0,5 bis 1 µg/µl BSA erhöht in einigen Fällen die Ausbeute.

3.7.11 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC (Konstanz) in Auftrag gegeben.

3.7.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekulargewichte (4). Die native Konformation der Proteine wird durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken mit β -Mercaptoethanol und Anlagerung des anionischen Detergenzes Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört. Eine hohe Trennschärfe wurde durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Trennsystems erreicht. Es wurde eine Apparatur mit 0,75 mm Abstandshaltern verwendet. Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 100°C für 4 min gekocht. Die Elektrophorese wurde im Laufpuffer bei 150 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min gefärbt und anschließend entfärbt.

12,5%-iger Trenngelansatz

3,0 ml 40% Acrylamidlösung (29:1)
2,4 ml Trenngelpuffer (4×)
4,2 ml H₂O

6%-iger Sammelgelansatz

0,6 ml 40% Acrylamidlösung (29:1)
1,0 ml Sammelgelpuffer (4×)
2,4 ml H₂O

10 mg kristallines APS wurde in den Ansätzen gelöst, und zum Starten der Polymerisierungsreaktion wurde 1/1.000 Volumen TEMED zugesetzt.

40% Acrylamidlösung (29:1):

38,66	% (w/v)	Monoacrylamid
1,33	% (w/v)	Bisacrylamid

Sammelgelpuffer (4×):

0,5	M	Tris-HCl (pH 6,8)
0,4	% (w/v)	SDS

Trenngelpuffer (4×):

1,5	M	Tris-HCl (pH 8,8)
0,4	% (w/v)	SDS

<u>Auftragspuffer für Proteine (4×):</u>	125,0	mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	20,0	%	Glycerin
	10,0	% (v/v)	β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen)
	4,0	% (w/v)	SDS
	0,02	% (w/v)	Bromphenolblau

<u>Laufpuffer:</u>	25,0	mM	Tris-OH
	192,0	mM	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS

Der Laufpuffer kann ohne SDS als 10× Laufpuffer hergestellt werden. SDS kann als 10% (w/v) Lösung hergestellt werden.

<u>Färbelösung für Proteingele:</u>	40,0	%	Ethanol
	10,0	%	Essigsäure
	0,1	% (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blue R250

<u>Entfärbelösung für Proteingele:</u>	5,0	%	Ethanol
	7,5	%	Essigsäure

Protein-Längenstandard: 10 kDa Proteinleiter (10-200 kDa) von GibcoBRL

3.7.13 Analytische Proteinaufreinigung von rekombinanten Proteinen mit einer His₆-Fusion

TOP10F' oder XL1Blue (pREP4) Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für das zu exprimierende Gen transformiert und in Standard-I Medium mit 150 µg Ampicillin/ml und evtl. mit 25 µg Kanamycin/ml inkubiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte im logarithmischen Wachstum bei einer OD_{600nm} von 0,8 entweder bei 37°C für 4 Stunden oder bei 28°C über Nacht.

Zur Überprüfung der Expression der rekombinanten Proteine wurde 1 ml Kultur abzentrifugiert, in 200 µl Talon-Puffer mit 10 mM Imidazol aufgenommen und durch Ultra-Schall desintegriert (2 min mit der Mikrospritze MS73, 30% Puls/Pause-Verhältnis und 10% Amplitude). Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14.000 g und 4°C wurde der Überstand mit 10 µl Talon (Kobalt-Affinitätsmatrix) versetzt und 15 min unter Bewegung inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Talon pelletiert und vom Überstand befreit. Nach einmaligem Waschen des Talons mit 200 µl Talon-Puffer mit 10 mM Imidazol wurde das Protein mit 20 µl Talon-Puffer mit 500 mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde mit Proteinauftragspuffer versetzt und für die SDS-PAGE (3.7.12) vorbereitet.

<u>Talonpuffer:</u>	30	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100	mM	NaCl
	1	mM	β -Mercaptoethanol

3.8 Konstruktion der MVA-Operon-Plasmide aus *Borrelia burgdorferi*

Genomische DNA von *Borrelia burgdorferi* (ATCC 35210D) diente als Template für die PCR-Amplifikation des MVA-Operons. Das gesamte Operon (6.284 bp), einschließlich der Gene für die HMGS, HMGR, MVK, PMK, MPD und eine erst kürzlich beschriebene FAD/NAD(P)H-abhängige IPI (FNI), wurde mit je 500 nM der Oligonukleotide Bb-MVA-for und Bb-MVA-rev amplifiziert, in den pCR-TOPO-T/A-Vektor zwischenkloniert und durch Verdau mit *Bam*HI und *Xho*I wieder freigesetzt. Das Fragment wurde gereinigt und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den pQE31-Vektor kloniert, um das Plasmid pBb-MVA-Gesamt zu erhalten (siehe Anhang V).

Analog wurde das Plasmid pBb-MVA-kurz konstruiert (siehe Anhang V). Dieses Plasmid enthält nur einen Teil des Operons (2.771 bp), der die Gene für die MVK, PMK und MPD enthält. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden Bb-MVA-kurz-for und Bb-MVA-rev.

Verwendete Oligonukleotide:

Bb-MVA-for:	5'- <u>GGATCCTGAGGAGTATATGAGAATAGGT</u> -3'
Bb-MVA-rev:	5'- <u>CTCGAGCTAAGTCTCAATTACCTTTAGC</u> -3'
Bb-MVA-kurz-for:	5'- <u>GGATCCGAAAATAAAGTGTAAGTTCATGC</u> -3'

3.9 Konstruktion des synthetischen MVA-Operon-Plasmides pSC-MVA aus *S. cerevisiae*

Die Gene der MVK (ERG12), PMK (ERG8) und der MPD (ERG19) wurden zunächst einzeln durch PCR aus der genomischen DNA des *S. cerevisiae*-Stammes BJ1991 amplifiziert. Für die PCR-Reaktionen wurden 10:1 molare Verhältnisse der jeweiligen Primerpaare (500 nM und 50 nM) genutzt. Anschließend wurden die PCR-Produkte der Gene mit einer PCR-basierenden Methode zu einem artifiziellen Operon zusammengefügt. Dazu wurden Oligonukleotide mit überlappenden Sequenzelementen verwendet. Zusätzlich wurden über die Oligonukleotide Ribosomenbindestellen (5'-AGGAGG-3') im Abstand von acht Nukleotiden zum Startcodon der einzelnen Gene eingeführt. Die drei PCR-Produkte wurden gemischt und eine weitere Amplifikationsreaktion mit den äußeren Oligonukleotiden durchgeführt. Das so erhaltene

vollständige artifizielle Operon wurde in beiden Orientierungen in den pBAD-TOPO-T/A und den pCR-TOPO-T/A Vektor kloniert. Die Konstrukte wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert. Die Plasmidkonstruktion mit dem am besten funktionierenden MVA-Operon wurde pSC-MVA genannt (siehe Anhang VI).

Verwendete Oligonukleotide:

Mev-kin-Sc-for: 5'-TAGGAGGAATTAACCATGTCATTACCGTTCTTAACT-3'

Mev-kin-Sc-rev: 5'-TTGATCTGCCTCCTATGAAGTCCATGGTAAATT-3'

Pmev-kin-Sc-for: 5'-ACTTCATAGGAGGCAGATCAAATGTCAGAGTTGAG
AGCCTTC-3'

Pmev-kin-Sc-rev: 5'-GAGTATTACCTCCTATTTATCAAGATAAGTTTC-3'

Decarb-Sc-for: 5'-GATAAATAGGAGGTAATACTCATGACCGTTTACAC
AGCATCC-3'

Decarb-Sc-rev: 5'-TTATTCCTTTGGTAGACCAGT-3'

Überlappende Sequenzen sind fett gedruckt, Ribosomenbindestellen kursiv.

3.10 Überprüfung der Funktionalität der MVA-Operon-Plasmide

Um die Funktionalität der konstruierten MVA-Operon-Plasmide zu kontrollieren, wurden *E. coli*-Bakterien mit den zu testeten Plasmiden transformiert und auf einen Nährboden mit 200 µM Mevalonat und eine Nährboden ohne Mevalonat ausgestrichen. In die Mitte der Platten wurde ein mit 2 µl 100 mM Fosmidomycin getränktes Stück Filterpapier gelegt. Im Fall eines plasmidvermittelten funktionalen MVA-Stoffwechselweges war in Gegenwart von MVA keine Hemmhofbildung zu erwarten. Eine 1 M Mevalonat-Stammlösung wurde durch Hydrolyse von Mevalonlacton in 1 M KOH bei 37°C für 30 min hergestellt.

3.11 Konstruktion der Genaustauschplasmide

Um präzise Leseraster-erhaltende Deletionsmutanten von *E. coli* zu generieren, wurde das pKO3-Vektorsystem genutzt (53). In einem ersten Schritt wurden in zwei unabhängigen asymmetrischen PCRs die Sequenzfragmente von etwa 500 bis 600 bp Länge stromaufwärts (*upstream*) und stromabwärts (*downstream*) der zu deletierenden Sequenz amplifiziert. Das molare Verhältnis der Primerpaare war 10:1 (500 nM äußerer Primer und 50 nM innerer Primer). In einem zweiten Schritt wurden die Produkte, die durch überlappende Sequenzen hybridisieren konnten, in einer weiteren PCR mit 500 nM der äußeren Primer als Fusionsprodukt amplifiziert. Das

resultierende Produkt wurde mit Hilfe des pCR-TOPO-T/A-Kits zwischenkloniert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den pKO3-Vektor kloniert. Wildtyp *E. coli*-Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und auf Chloramphenicol-Resistenz bei 30°C selektioniert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf Anwesenheit des gewünschten Plasmides durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse überprüft.

Oligonukleotide zur Generierung des Plasmides pKO3- Δ *dxr* (siehe Anhang VII):

Dxr-N-out: 5'-TAGGATCCATTGTCGTGGAATATTACGG-3'

Dxr-N-in: 5'-CCCATCCACTAAACTTAAACACTTCATGAAACATCCAGAGTT-3'

Dxr-C-in: 5'-TGTTTAAGTTT**AGTGGATGGG**GAAAGTCGCCAGAAAAGAGGT-3'

Dxr-C-out: 5'-TAGTCGACCC**CCACACAA**CAGTTCCATTA-3'

Oligonukleotide zur Generierung des Plasmides pKO3- Δ *ygbP* (siehe Anhang VII):

YgbP-N-out: 5'-TAGGATCCTATGTGGCTACTGGGCTAAT-3'

YgbP-N-in: 5'-CCCATCCACTAAACTTAAACAAGTGGTTGCCATGTTAATTC-3'

YgbP-C-in: 5'-TGTTTAAGTTT**AGTGGATGGG**ACATAATGCGAATTGGACAC-3'

YgbP-C-out: 5'-TAGTCGACTTCCGGATTGGCTTTCAGC-3'

Oligonukleotide zur Generierung des Plasmides pKO3- Δ *gcpE* (siehe Anhang VII):

GcpE-N-out: 5'-TAGGATCCCCAGCGTCTGTGGATACTAC-3'

GcpE-N-in: 5'-CCCATCCACTAAACTTAAACATTGAATTGGAGCCTGGTTATG-3'

GcpE-C-in: 5'-TGTTTAAGTTT**AGTGGATGGG**TAATAACGTGATGGGAAGCGC-3'

GcpE-C-out: 5'-TAGTCGACAGTGAGCATAATCAGTTCAGC-3'

Oligonukleotide zur Generierung des Plasmides pKO3- Δ *lytB* (siehe Anhang VII):

LytB-N-out: 5'-TAGGATCCCCGGCCTACAGATTGCTGCG-3'

LytB-N-in: 5'-CCCATCCACTAAACTTAAACACAACAGGATCTGCATGTTACG-3'

LytB-C-in: 5'-TGTTTAAGTTT**AGTGGATGGG**CGTGAAGTCGATTAAGTCAT-3'

LytB-C-out: 5'-TAGTCGACAG**AACCACCC**ATGATCACC-3'

Restriktionserkennungssequenzen sind unterstrichen, überlappenden Bereiche, die eine 21 bp Insertion definieren fett gedruckt.

3.12 Konstruktion der Deletionsmutanten

Genaustauschexperimente wurden ähnlich wie zuvor beschrieben durchgeführt (53), mit dem Unterschied, daß die Nährböden mit 100 µM MVA supplementiert wurden. Die Genaustauschplasmide (3.11) wurden in wt *E. coli*-Zellen (pSC-MVA) transformiert und der Ansatz 1 h bei 30°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde direkt in verschiedenen Verdünnungen auf Chloramphenicol-Nährböden mit 100 µM MVA ausplattiert, die auf 42°C vorgewärmt waren. Nur Bakterienzellen, die das Plasmid durch homologe Rekombination in das Genom integriert hatten, konnten bei diesen Bedingungen wachsen, da das pKO3-Plasmid ein temperatursensitives ori besitzt. Die Frequenz der Rekombinationen lag bei 10⁻⁴ bis 10⁻⁶, verglichen mit der Kolonienanzahl, die sich bei 30°C ergab. Durch Ausplattierung eines Klonen auf eine Sucrose-Platte (NaCl-freier LB-Nährboden mit 6% Sucrose und 100 µM MVA; Inkubation bei 30°C für 24 bis 48 h) wurde auf Bakterienzellen selektioniert, die die Vektorsequenzen durch eine zweite Rekombination verloren hatten. Die Sucrose-Sensitivität wird durch das *SacB*-Gen des pKO3-Plasmides vermittelt. Bei dieser zweiten Rekombination kann wieder der Wildtyp-Genotyp oder der gewünschte Deletions-Genotyp entstehen. Die Frequenz der zweiten Rekombination lag ebenfalls bei 10⁻⁴ bis 10⁻⁶. Die Sucrose-resistenten und Chloramphenicol-sensitiven (durch Verlust der Vektorsequenzen) Kolonien wurden durch PCR auf den gewünschten Genotyp überprüft. Als Kontrolle wurden einige Chloramphenicol-resistente Kolonien analysiert.

Primerpaare zur Verifikation der DXR-Gendeletion:

DXR-con-N: 5'-TTCTCAGGACGATGTACAGAA-3'
DXR-con-C: 5'-AGCAGACAACATCACGCGTTT-3'
ecolyaemfor: 5'-GCGGATCCATGAAGCAACTCACCATTCTG-3'
ecolyaemrev: 5'-CCGGAAGCTTTCAGCTTGCGAGACGCATCA-3'

Primerpaare zur Verifikation der YgbP-Gendeletion:

YgbP-con-N: 5'-AGCTACAAACGCGAACTTA-3'
YgbP-con-C: 5'-TATAACCCTTCGCCTGAATA-3'

Primerpaare zur Verifikation der GcpE-Gendeletion:

GcpE-con-N: 5'-CTGGAGGTCAGTACTGATGCTAC-3'
GcpE-con-C: 5'-ATTTCACTGTAACCGTAGCTG-3'
ecolgcpefor: 5'-GGATCCATGCATAACCAGGCTCCAATTCAA-3'
ecolgcpev: 5'-AAGCTTTTTTTTCAACCTGCTGAACGTCAT-3'

Primerpaare zur Verifikation der *LytB*-Gendeletion:

LytB-con-N: 5'-CGATAAAACACCTTCTCGT-3'

LytB-con-C: 5'-ATTGCGGGTAGTTTTCTCAA-3'

3.13 Komplementations-Experimente

Die Deletionsmutanten wurden durch Transformation mit den entsprechenden Genen in geeigneten Expressionsplasmiden komplementiert.

Zur Komplementation verwendete Plasmide:

wt Δdxr mit dem Plasmid pQE-Ec-DXR (konstruiert von Silke Sanderbrand, Giessen);

wt $\Delta ygbP$ mit dem Plasmid pQE-Ec-YgbP (konstruiert von Jochen Wiesner, Giessen);

wt $\Delta gcpE$ mit dem Plasmid pQE-Bs-GcpE (konstruiert von Ann-Kristin Kollas, Giessen);

wt $\Delta lytB$ mit dem Plasmid pQE-*lytB*

Zur Konstruktion des pQE-*lytB*-Plasmides wurde das *lytB*-Gen durch PCR mit den Oligonukleotiden Ec-LytB-nHis-for (5'-GGATCCATGCAGATCCTGTTGGCCAAC-3') und Ec-LytB-nHis-rev (5'-AAGCTTTTAATCGACTTCACGAATATCG-3') aus der genomischen DNA von *E. coli* amplifiziert. Nach Zwischenklonierung des Produktes in den pCR-TOPO-T/A-Vektor wurde es über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in den pQE30-Vektor kloniert.

3.14 Herstellung niedermolekularer Zellextrakte

100 ml Kulturen der *E. coli*-Deletionsmutanten wt $\Delta gcpE$ und wt $\Delta lytB$ (3.12), kultiviert in Standard-I Medium mit 100 μ g Ampicillin/ml und 100 μ M MVA, wurden im logarithmischen Wachstum (OD_{600nm} bei 0,8) durch Zentrifugation geerntet (10 min, 5.000 g bei 4°C). Die Bakteriensedimente wurden in 15 ml Ammonium-Formiat-Puffer (20 mM, pH 8,0) aufgenommen und auf Eis gekühlt. Nach Aufschluß der Zellen mit Ultra-Schall (5 min mit Titanteller TT20, 30% Puls-Pause-Verhältnis und 75% Amplitude) unter Eiswasser-Kühlung wurden die löslichen Fraktionen durch Zentrifugation (20 min, 10.000 g bei 4°C) gewonnen. Die niedermolekularen Zellextrakte wurden schließlich durch Ultrafiltration der löslichen Fraktion über Centriprep-Filtrationseinheiten (Millipore, 3 kDa *cut-off*) gewonnen.

3.15 Anionenaustausch-Chromatographie der niedermolekularen Zellextrakte

Eine HR5/10-Säule (Amersham Pharmacia) wurde mit Source Q15-Material (Amersham Pharmacia) gepackt und mit einer Flußrate von 1 ml/min auf Ammonium-Formiat-Puffer (20 mM, pH 8,0) äquilibriert. Hydrophobe Bestandteile der niedermolekularen Zellextrakte wurden mit einer Isolute C18 *reversed phase* (RP)-Säule (International Sorbent Technology, Mid Glamorgan, U.K.) entfernt. Anschließend wurden die niedermolekularen Zellextrakte mit einer Peristaltik-Pumpe mit einer 1 ml/min Flußrate auf die Anionenaustauscher-Säule geladen. In einer HPLC-Anlage (Waters M626, Waters 996 PDA-Detektor, Millennium32-Software) wurden die niedermolekularen Zellextrakte mit folgendem Programm und einer Flußrate von 1 ml/min eluiert:

- 30 min 100% SAX-Puffer A
- in 30 min in einem linearen Gradienten von 100% SAX-Puffer-A und 0% SAX-Puffer-B bis zu 0% SAX-Puffer-A und 100% SAX-Puffer-B
- 10 min 100% SAX-Puffer C
- 10 min 100% SAX-Puffer A

<u>SAX-Puffer A:</u>	20	mM	Ammonium-Formiat (pH 8,0)
<u>SAX-Puffer B:</u>	500	mM	Ammonium-Formiat (pH 8,0)
<u>SAX-Puffer C:</u>	1000	mM	Ammonium-Formiat (pH nicht eingestellt)

3.16 $\gamma\delta$ T-Zellaktivierungs-Experimente

Die $\gamma\delta$ T-Zellaktivierungs-Experimente wurden von Matthias Eberl (Giessen) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2×10^5 PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) in RPMI-1640-Medium, das mit 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 100 μ g Penicillin-Streptomycin/ml, 10 U humanem Interleucin-2/ml (alle Supplemente von Life Technologies, Karlsruhe) und 10% menschlichem Serum (Bayrisches Rotes Kreuz, Augsburg) supplementiert wurde, mit LMW-Präparationen versetzt. Als Positivkontrolle dienten Ansätze mit 10 μ M IPP. Die Zellen wurden nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C und 3% CO₂ für die durchflußzytometrische Analyse geerntet und mit den monoklonalen Antikörpern (Beckman Coulter, Krefeld) anti-CD3 (PC5-konjugiert), anti-V δ 2 (FITC-konjugiert) und anti-CD69 (PE-konjugiert) markiert. Die Analyse erfolgte mit einem Epics XL-Durchflußzytometer und der Software Expo32 (Beckman Coulter).

3.17 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Ute Bahr (Frankfurt) durchgeführt. Es wurde ein *electrospray ionisation orthogonal-time-of-flight mass*-Spektrometer (ESI-o-ToF MS) (Mariner; PE Biosystems, Framingham, MA) mit einer Nano-ESI-Quelle (Protana, Odense, Dänemark) verwendet. 3 μ l der Fraktionen wurden in eine Gold-beschichtete *nanospray*-Kapillare aufgenommen. Die Analyse erfolgte bei einer Flußrate von 10-30 nl/min (Spannung 900 V, Temperatur 200°C).

4. Ergebnisse

4.1 Bioinformatische Ansätze zur Identifizierung neuer Gene des MEP-Stoffwechselweges

Tiere, Pilze und Archaeobakterien nutzen zur Isoprenoidbiosynthese ausschließlich den MVA-Stoffwechselweg, wohingegen Pflanzen den MVA-Stoffwechselweg im Cytosol, aber den MEP-Stoffwechselweg in den Plastiden für ihre Isoprenoidbiosynthese nutzen (52). Eubakterien nutzen entweder nur den MVA- oder den MEP-Stoffwechselweg, wobei letzterer offenbar weiter verbreitet ist (60). Nur in einigen Streptomyces-Arten konnten beide Wege nachgewiesen werden (74). Mycoplasmen und Rickettsien scheinen als obligat parasitäre Bakterien keinen eigenen Stoffwechselweg zur IPP- und DMAPP-Biosynthese zu besitzen. Auch konnte das Vorkommen des MEP-Stoffwechselweges im Malariaerreger *P. falciparum* gezeigt werden (37, 84). Entsprechend weisen die beiden ersten Enzyme, DXS und DXR, des MEP-Stoffwechselweges eine auffällige Verteilung in verschiedenen Organismen auf. Ihre Gene können im Genom vieler Bakterien, der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und dem Malariaerreger *P. falciparum* nachgewiesen werden. Allerdings fehlen sie im Genom von Tieren, Hefen, Archaeobakterien und einigen Eubakterien, wie z. B. Borrelien oder Staphylo- und Streptokokken, die den MVA-Stoffwechselweg zur Isoprenoidbiosynthese nutzen (11, 19, 77, 85, 86). Mit Hilfe von Genomdatenbank-Recherchen konnten zwei Gene, das *gcpE*- (6) und das *lytB*-Gen (28), identifiziert werden, die eine identische Verteilung in verschiedenen Organismen aufweisen, wie das *dxs*- und *dxr*-Gen (Tabelle 3).

Die homologen Proteine von GcpE und LytB des Protisten *P. falciparum* und der Pflanze *A. thaliana* besitzen, wie ebenfalls die DXS und DXR, aminoterminalen Sequenzen, die höchstwahrscheinlich für die Targetierung der Proteine in die Plastiden der Pflanze und in den Apikoplasten (ein Plastiden-ähnliches Organell) des Malariaerregers verantwortlich sind (Anhang I bis IV) (37, 63, 82). Dies ist auch in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die den MEP-Stoffwechselweg bei Pflanzen in den Plastiden lokalisieren (52).

Organismen	DXS	DXR	GcpE	LytB
Eubacteria				
<i>Aquifex aeolicus</i>	sp O67036	sp O66722	sp O67496	sp O67625
<i>Bacillus subtilis</i>	sp P54523	sp O31753	sp P54482	sp P54473
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	tr Q9Z6J9	tr Q9Z8J8	tr Q9Z8H0	sp Q9Z6P2
<i>C. trachomatis</i>	sp O84335	sp O84074	sp O84060	sp O84867
<i>Escherichia coli</i>	sp P77488	sp P45568	sp P27433	sp P22565
<i>Haemophilus influenzae</i>	sp P45205	sp P44055	sp P44667	sp P44976
<i>Helicobacter pylori</i>	tr Q9ZM94	tr Q9ZML6	tr Q9ZLL0	sp O25160
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	sp O07184	sp Q10798	sp O33350	sp O53458
<i>Synechocystis</i> PCC6803	sp P73067	sp Q55663	pir S77159	sp Q55643
<i>Thermotoga maritima</i>	tr Q9X291	tr Q9WZZ1	tr Q9WZZ3	sp Q9X1F7
<i>Treponema pallidum</i>	sp O83796	sp O83610	sp O83460	sp O83558
<i>Neisseria meningitidis</i>	tr Q9JW13	tr Q9JX33	tr Q9JZ40	tr Q9JR39
<i>Campylobacter jejuni</i>	tr Q9PIH8	tr Q9PMV3	tr Q9PPM1	sp P94644
<i>Deinococcus radiodurans</i>	tr Q9RUB5	tr Q9RU84	tr Q9RXC9	tr Q9RSG0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	tr Q9KGU7	tr AAG07190	tr AAG07190	tr Q9HVM7
<i>Vibrio cholerae</i>	tr Q9KTL3	tr Q9KPV8	tr Q9KTX1	pir G82293
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	—
<i>Streptococcus pyogenes</i>	—	—	—	—
<i>S. pneumoniae</i>	—	—	—	—
<i>Borrelia burgdorferi</i>	—	—	—	—
<i>Mycoplasma genitalium</i>	—	—	—	—
<i>M. pneumoniae</i>	—	—	—	—
<i>Rickettsia prowazekii</i>	—	—	—	—
Archaeobacteria				
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	—	—	—	—
<i>Aeropyrum pernix K1</i>	—	—	—	—
<i>Methanococcus jannaschii</i>	—	—	—	—
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	—	—	—	—
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	—	—	—	—
<i>Pyrococcus abyssi</i>	—	—	—	—
Eucaryota				
<i>Plasmodium falciparum</i>	sp O96694	sp O96693	gb AF323928	gb AAK12102
<i>Arabidopsis thaliana</i>	sp Q38854	sp Q9XFS9	gb BAB09833	pir T04781
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	—	—	—
<i>Drosophila melanogaster</i>	—	—	—	—
<i>Caenorhabditis elegans</i>	—	—	—	—
<i>Homo sapiens</i>	—	—	—	—

Tabelle 3. Vorkommen der Gene für DXS, DXR, GcpE und LytB in verschiedenen Organismen mit den Datenbank-Zugriffsnummern für die entsprechenden Proteine.

4.2 Genetische Konstruktion von *E. coli*-Bakterien, die exogenes MVA zur Isoprenoidbiosynthese nutzen können

Um die Beteiligung des *gcpE*- und des *lytB*-Gens am MEP-Stoffwechselweg experimentell zu beweisen, wurde ein genetischer Ansatz gewählt. Hierzu wurden verschiedene MVA-Operons konstruiert, die *E. coli*-Bakterien die Eigenschaft vermitteln sollten, Isoprenoide über den MVA-Stoffwechselweg zu synthetisieren (Abb. 7). Bei diesen Bakterien sollte es möglich sein, Gene des MEP-Stoffwechselweges zu mutieren.

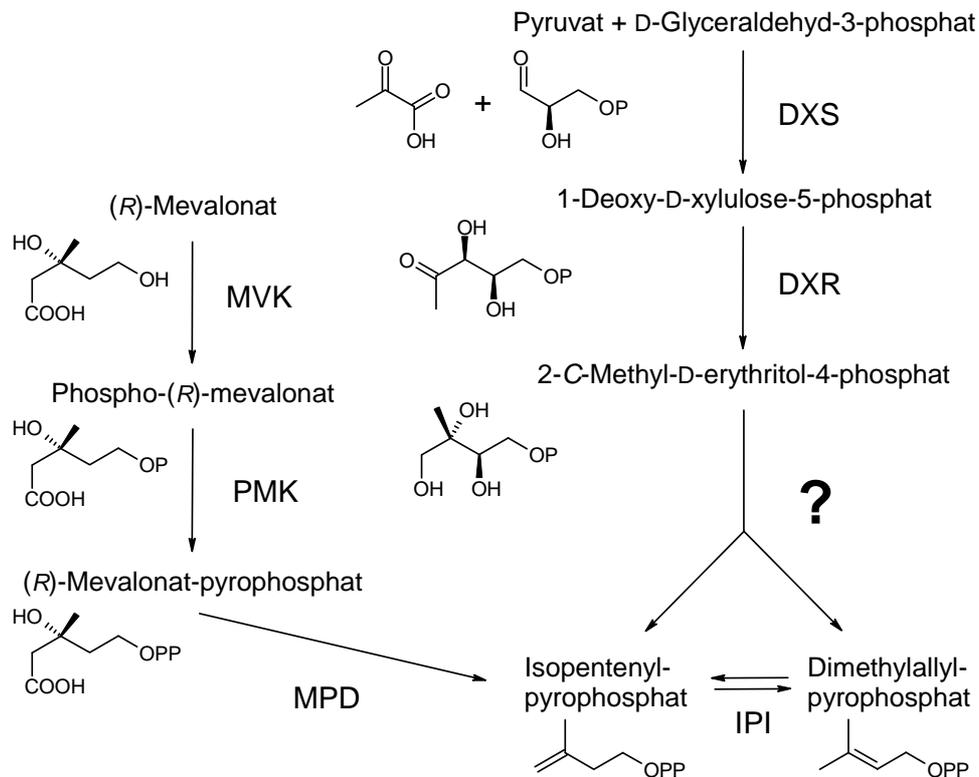


Abbildung 7. Strategie der artifiziellen Einführung eines partiellen MVA-Stoffwechselweges in *E. coli* zur molekulargenetischen Manipulation des MEP-Stoffwechselweges. Unbekannte Reaktionsschritte des MEP-Stoffwechselweges sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

4.2.1 Konstruktion zweier MVA-Operon-Plasmide aus *B. burgdorferi*

Bei *B. burgdorferi* sind alle Gene des MVA-Stoffwechselweges in einem einzelnen Operon organisiert (Abb. 8). Das Operon umfaßt die Gene der HMGS, HMGR, MVK, PMK, MPD und einer erst kürzlich beschriebenen FAD/NAD(P)H-abhängigen IPI (FNI) (38). Das gesamte Operon wurde PCR-amplifiziert, in pCR2.1-TOPO zwischenkloniert und in pQE31 subkloniert. Dadurch wurde das Plasmid pBb-MVA-Gesamt erhalten (Abb. 8, Anhang V). Es wurde erwartet, daß *E. coli*-Bakterien, die dieses Plasmid enthalten, Isoprenoide über den MVA-Stoffwechselweg herstellen können und dadurch resistent gegen Fosmidomycin sind. Fosmidomycin ist ein spezifischer Hemmstoff der DXR (37, 42). Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, da *E. coli*-Bakterien, die mit pBb-MVA-Gesamt transformiert worden waren, weiterhin sensitiv gegen Fosmidomycin waren.

Deshalb wurde ein weiteres Plasmid (pBb-MVA-kurz) konstruiert (Abb. 8, Anhang V), das nur einen Teil des Operons mit den Genen für MVK, PMK und MPD enthält. Mit Hilfe dieser Enzyme sollte *E. coli* in der Lage sein, Isoprenoide aus exogenem MVA zu synthetisieren und dadurch Resistenz gegen Fosmidomycin zu erlangen. Auch diese Annahme konnte nicht bestätigt werden.

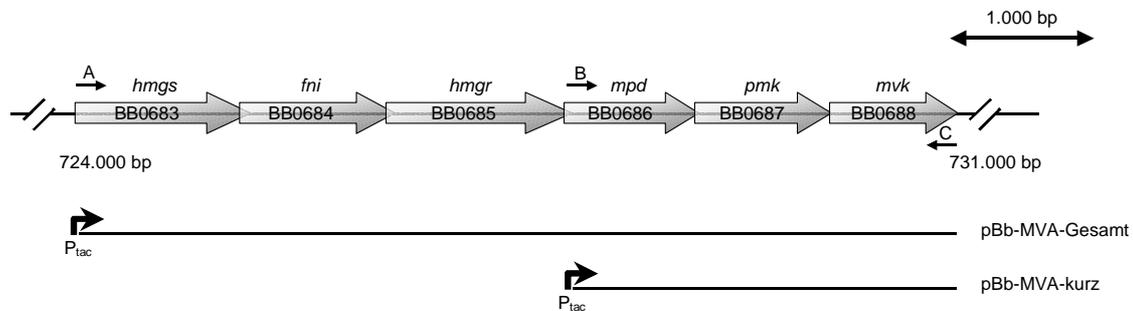


Abbildung 8. Darstellung des MVA-Operons im Genom von *B. burgdorferi*. Sämtliche Gene des MVA-Stoffwechselweges sind in einem Operon mit teilweise überlappenden kodierenden Sequenzen organisiert.

Als mögliche Erklärung für die fehlende Funktionalität der Operonplasmide pBb-MVA-Gesamt und pBb-MVA-kurz wurde angenommen, daß die *B. burgdorferi*-Gene in *E. coli* unzureichend expremiert werden. Deshalb sollte überprüft werden, ob in den transformierten Bakterien rekombinantes Protein nachweisbar ist. Durch die Klonierungsstrategie wurde erreicht, daß die jeweils ersten Gene der Operonplasmide ein Protein mit aminoterminaler His₆-Fusion kodieren. Deshalb konnte die Anwesenheit dieser Proteine durch analytische Affinitätsreinigung an einer Cobalt-Matrix überprüft werden. Dabei konnte in Extrakten aus Bakterien, die mit pBb-MVA-Gesamt transformiert worden waren, die HMGS nachgewiesen werden (Abb. 9). Dagegen war die MPD nach Transformation mit pBb-MVA-kurz nicht nachweisbar.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Expression von Genen aus *B. burgdorferi* in *E. coli* problematisch ist. Dies beruht möglicherweise auf dem hohen A/T-Gehalt (68-71%) des Genoms von *B. burgdorferi*. Allerdings konnte auch durch Co-Transformation mit pBb-MVA-kurz und dem pRIL-Plasmid keine nachweisbare Produktion von der MPD erreicht werden (Abb. 9). Das pRIL-Plasmid kodiert für t-RNAs, die die Expression A/T-reicher Gene in *E. coli* erleichtern sollen.

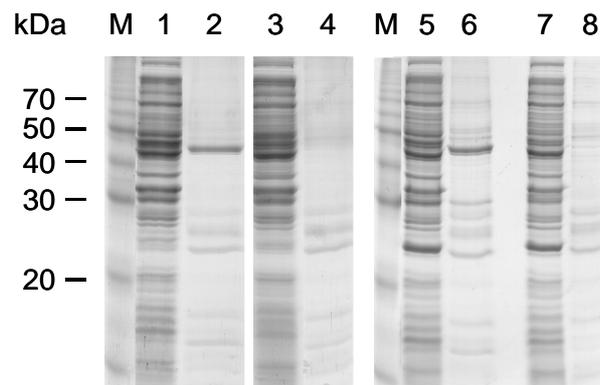


Abbildung 9. Überprüfung der Synthese von der HMGS und der MPD nach Transformation von *E. coli* mit pBb-MVA-Gesamt und pBb-MVA-kurz. In der löslichen Fraktion (Spur 1) von *E. coli*-Bakterien, die das Plasmid pBb-MVA-Gesamt enthielten, konnte die HMGS detektiert werden (Spur 2). Die elektrophoretische Mobilität des Proteins entspricht dem kalkulierten Molekulargewicht von 46 kDa. In der löslichen Fraktion (Spur 3) aus *E. coli*-Bakterien, die das Plasmid pBb-MVA-kurz enthielten, konnte die MPD nicht nachgewiesen werden (Spur 4). Das kalkulierte Molekulargewicht der MPD beträgt 28 kDa. Ein analoger Versuch nach Co-Transformation mit dem pRIL-Plasmid führte zu keinem signifikant verschiedenen Ergebnis (Spur 5-8).

4.2.2 Konstruktion eines artifiziiellen MVA-Operons unter Verwendung von *S. cerevisiae*-Genen

Da es nicht möglich war, die Gene des MVA-Stoffwechselweges aus *B. burgdorferi* funktional in *E. coli* zu exprimieren, wurden die Gene der MVK, der PMK und der MPD aus *S. cerevisiae* mit einer PCR-basierten Methode zu einem artifiziiellen Operon zusammengefügt (Abb. 10). Dabei wurde vor jedes Gen eine geeignete Ribosomenbindestelle über die verwendeten Oligonukleotide eingeführt.

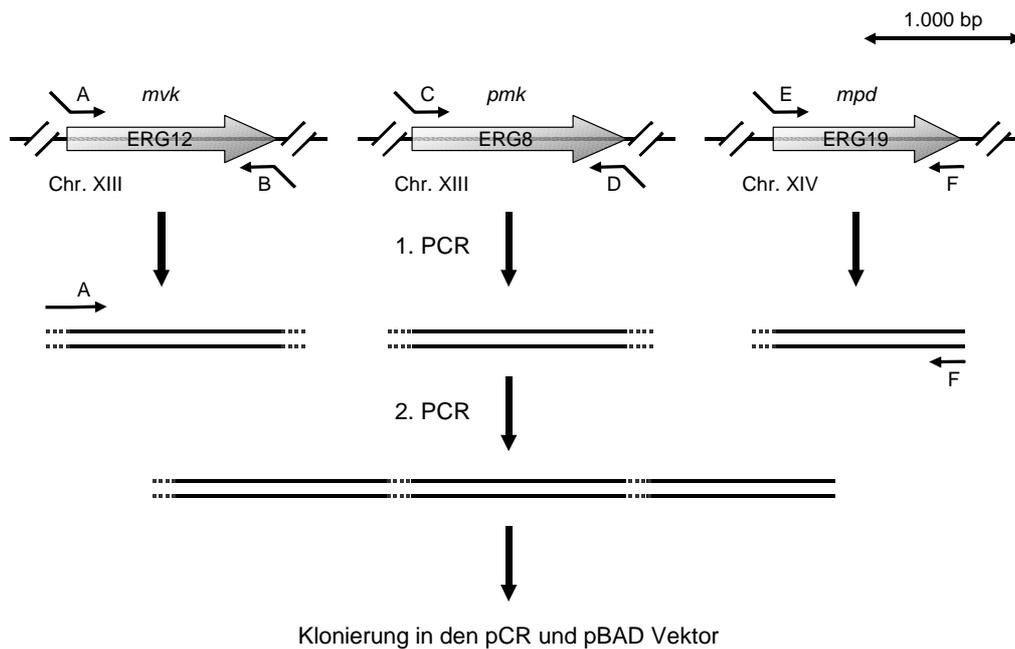


Abbildung 10. Konstruktion des artifiziellen MVA-Operons unter Verwendung von Genen aus *S. cerevisiae*. Die Gene der MVK, der PMK und der MPD wurden aus genomischer Hefe-DNA durch PCR amplifiziert. Über die Oligonukleotide (A, Mev-kin-Sc-for; B, Mev-kin-Sc-rev; C, Pmev-kin-Sc-for; D, Pmev-kin-Sc-rev; E, Decarb-Sc-for; F, Decarb-Sc-rev) wurden Ribosomenbindestellen (gepunktete Linien) eingeführt. Die Produkte der 3 PCR-Ansätze wurden durch überlappende Sequenzbereiche hybridisiert und in einem weiteren PCR-Ansatz als Fusionsprodukt amplifiziert.

Das artifizielle Operon wurde in zwei verschiedene Vektoren (pCR2.1-TOPO und pBAD-TOPO) in beiden möglichen Orientierungen kloniert. Um ihre Funktionalität zu überprüfen, wurden diese Konstrukte in *E. coli* transformiert und die Sensitivität der Bakterien gegen Fosmidomycin in Gegenwart von MVA getestet (Abb. 11).

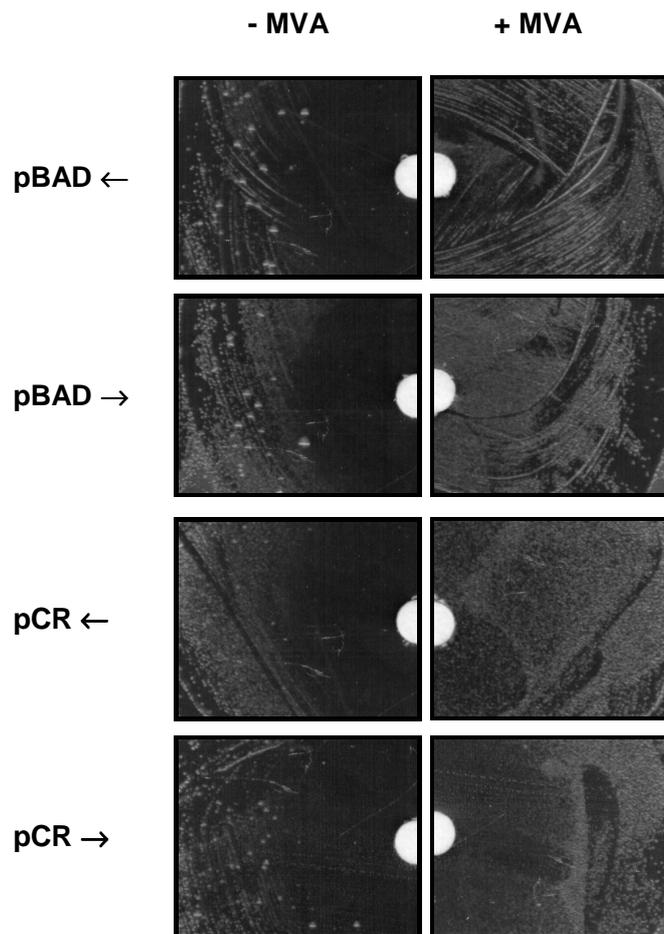


Abbildung 11. Nachweis der MVA-abhängigen Fosmidomycin-Resistenz von *E. coli*-Bakterien nach Transformation mit verschiedenen MVA-Operon-Plasmiden. Die Sensitivität gegen Fosmidomycin wurde in Abwesenheit (-MVA) und Gegenwart (+MVA) von MVA durch Hemmhofbildung getestet. Das MVA-Operon wurde in beiden Orientierungen unter der Kontrolle des Arabinose- und Lactose-Promotors untersucht. pBAD →, MVA-Operon in Richtung des Arabinose-Promotors; pBAD ←, MVA-Operon entgegen der Richtung des Arabinose-Promotors; pCR →, MVA-Operon in Richtung des Lactose-Promotors; pCR ←, MVA-Operon entgegen der Richtung des Lactose-Promotors.

Alle untersuchten Konstrukte konnten in *E. coli*-Bakterien MVA-abhängige Resistenz gegen Fosmidomycin vermitteln. Dabei wuchsen Bakterien, die das Operon unter der Kontrolle des Arabinose-Promotors (pBAD-TOPO) enthielten, besser als Bakterien, bei denen das Operon unter der Kontrolle des Lactose-Promotors (pCR2.1-TOPO) stand. Außerdem war besseres Wachstum zu beobachten, wenn das Operon in entgegengesetzter Richtung zu den Promotoren orientiert war. Die höchste Wachstumsrate wurde erreicht, wenn das Operon in entgegengesetzter Richtung zum

Promotor des pBAD-TOPO-Vektors ligiert wurde. Dieses Konstrukt (pSC-MVA, Anhang VI) wurde für Gen-Deletionsexperimente genutzt.

4.3 Validierung des experimentellen Systems

Um die Beteiligung der neu identifizierten Gene *gcpE* und *lytB* am MEP-Stoffwechselweg zu beweisen, wurden *E. coli*-Bakterien, die mit dem Plasmid pSC-MVA transformiert waren, genutzt. Im Fall einer direkten Beteiligung am MEP-Stoffwechselweg sollten diese Bakterien nach Deletion der untersuchten Gene nur in Anwesenheit von exogenem MVA überlebensfähig sein. Um die Anwendbarkeit dieser Strategie zu beweisen, wurde als erstes das *dxr*-Gen, dessen Beteiligung an dem MEP-Stoffwechselweg bekannt ist, deletiert. Die Gendeletionsexperimente wurden mit dem pKO3-Vektor-System durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einem präzisen und Leseraster-erhaltenden Austausch der targetierten Sequenz durch eine 21 bp lange Sequenz über eine zweifache homologe Rekombination (Abb. 12, A).

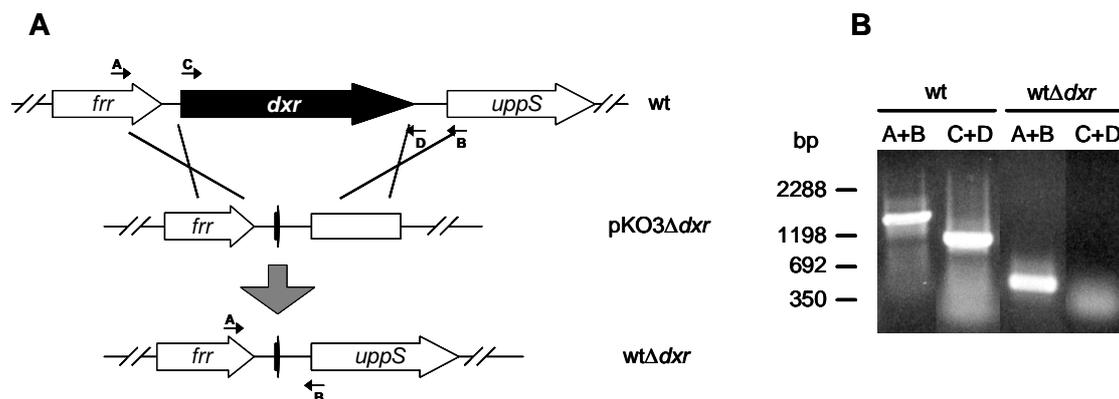


Abbildung 12. Deletion des *dxr*-Gens in *E. coli* (pSC-MVA). (A) Darstellung der *dxr*-Region des wt-Stammes und der *dxr*-Deletionsmutante wtΔ*dxr*. Die für die PCR-Analyse genutzten Oligonukleotide sind als Pfeile dargestellt. A, DXR-con-N; B, DXR-con-C; C, *ecolyaemfor*; D, *ecolyaemrev*. (B) Verifikation der *dxr*-Gendeletion durch PCR. Die Größe des PCR-Produktes der Deletionsmutante betrug mit den Oligonukleotiden A und B 450 bp und war somit, wie erwartet, 1.130 bp kürzer als das PCR-Produkt des wt-Stammes mit der Länge von 1.580 bp. Mit den Oligonukleotiden C und D konnte das *dxr*-Gen (1.197 bp) im wt-Stamm amplifiziert werden, jedoch nicht in der Deletionsmutante.

Bakterien mit der *dxr*-Gendeletion wurden durch PCR identifiziert (Abb. 12, B). Die Klone mit der gewünschten Gendeletion waren nur überlebensfähig, wenn dem Medium MVA zugegeben wurde oder die Zellen mit einer episomalen Kopie des *dxr*-Gens komplementiert wurden (Abb 14). Diese Daten demonstrieren, daß diese Methode dazu geeignet ist, neue Enzyme des MEP-Stoffwechselweges zu identifizieren.

4.4 Verifikation der Beteiligung von GcpE am MEP-Stoffwechselweg

Das *gcpE*-Gen wurde in analoger Weise wie das *dxr*-Gen deletiert (Abb. 13, A). Die Verifikation der gewünschten Deletionsmutation erfolgte durch PCR (Abb. 13, B).

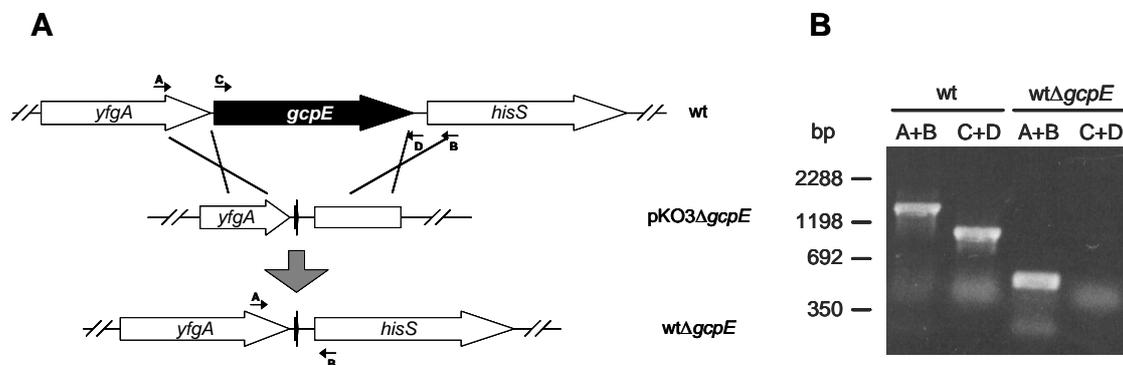


Abbildung 13. Deletion des *gcpE*-Gens in *E. coli* (pSC-MVA). **(A)** Darstellung der *gcpE*-Region des wt-Stammes und der *gcpE*-Deletionsmutante *wtΔgcpE*. Die für die PCR-Analyse genutzten Oligonukleotide sind als Pfeile dargestellt. A, GcpE-con-N; B, GcpE-con-C; C, *ecolgcpefor*; D, *ecolgcperew*. **(B)** Verifikation der *gcpE*-Gendeletion durch PCR. Die Größe des PCR-Produktes der Deletionsmutante betrug mit den Oligonukleotiden A und B 530 bp und war somit, wie erwartet, 1.070 bp kürzer als das PCR-Produkt des wt-Stammes mit der Länge von 1.600 bp. Mit den Oligonukleotiden C und D konnte das *gcpE*-Gen (1.116 bp) im wt-Stamm amplifiziert werden, jedoch nicht in der Deletionsmutante.

Die Klone mit der gewünschten Gendeletion waren nur überlebensfähig, wenn dem Medium MVA zugegeben wurde oder die Zellen mit einer episomalen Kopie des *gcpE*-Gens komplementiert wurden (Abb 14). Dies ist ein direkter Beweis, daß das *gcpE*-Gen essentiell im MEP-Stoffwechselweg involviert ist.

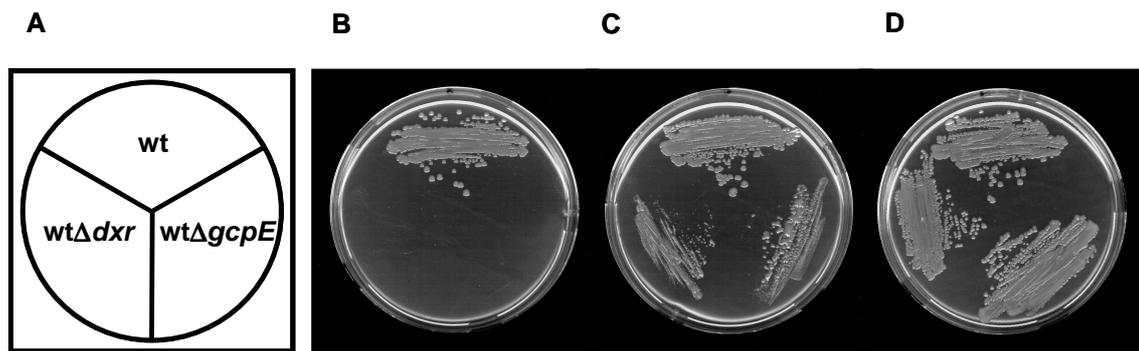


Abbildung 14. Wachstum der verschiedenen *E. coli*-Stämme (A) auf Agar-Platten ohne MVA (B), mit MVA (C) und nach Komplementation der Deletionsmutanten mit einer entsprechenden episomalen Kopie des deletierten Gens ohne MVA (D).

Im Zusammenhang mit Arbeiten zur Identifizierung neuer Metabolite des MEP-Stoffwechselweges wurde zusätzlich eine Doppel-Genmutante der Gene *dxr* und *gcpE* generiert. Hierzu wurde bei der Mutante *wtΔdxr* zusätzlich das *gcpE*-Gen deletiert. Dazu wurde dasselbe Verfahren wie zur Deletion von Genen im *wt*-Stamm genutzt. Die Verifikation des Genotyps der Sucrose-resistenten und Chloramphenicol-sensitiven Klone erfolgte durch PCR (Abb. 15).

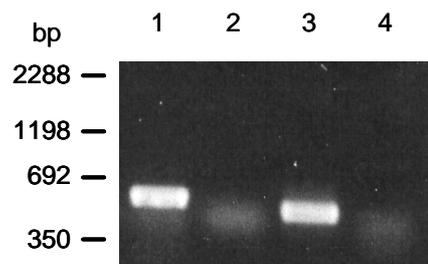


Abbildung 15. Verifikation der *dxr*- und *gcpE*-Doppel-Gendeletion durch PCR. Die Größe des PCR-Produktes der Doppel-Gendeletionsmutante *wtΔdxrΔgcpE* betrug mit den Oligonukleotiden GcpE-con-N und GcpE-con-C 530 bp (Laufspur 1) und mit den Oligonukleotiden DXR-con-N und DXR-con-C 450 bp (Laufspur 3). Die Amplifikation des *gcpE*-Gens mit den Oligonukleotiden ecolgcpEfor und ecolgcpErev (Laufspur 2) und des *dxr*-Gens mit den Oligonukleotiden ecolyaemfor und ecolyaemrev (Laufspur 4) waren nicht möglich.

4.5 Verifikation der Beteiligung von LytB am MEP-Stoffwechselweg

Das *lytB*-Gen wurde in analoger Weise wie das *dxr*- und das *gcpE*-Gen deletiert (Abb. 16, A). Die Verifikation der gewünschten Deletionsmutation erfolgte durch PCR (Abb. 16, B).

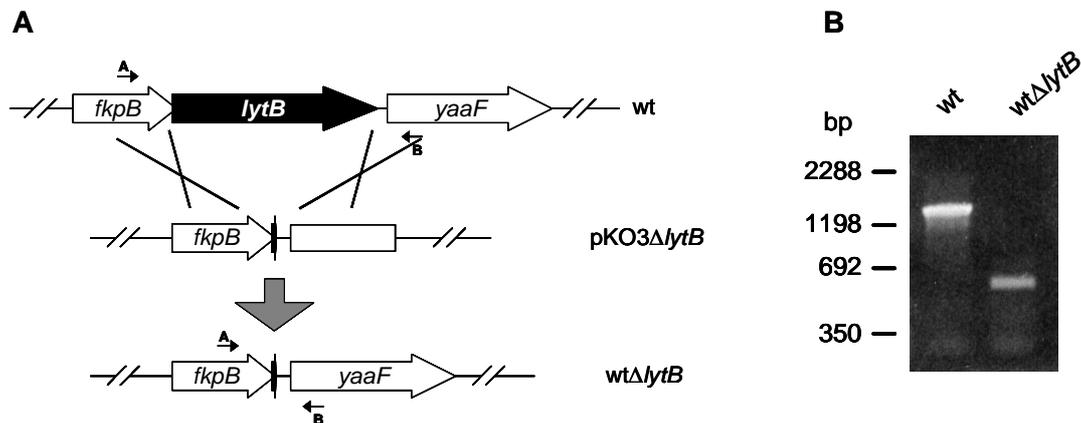


Abbildung 16. Deletion des *lytB*-Gens in *E. coli* (pSC-MVA). (A) Darstellung der *lytB*-Region des wt-Stammes und der *lytB*-Deletionsmutante *wtΔlytB*. Die für die PCR-Analyse genutzten Oligonukleotide sind als Pfeile dargestellt. A, LytB-con-N; B, LytB-con-C. (B) Verifikation der *lytB*-Gendeletion durch PCR. Die Größe des PCR-Produktes der Deletionsmutante betrug mit den Oligonukleotiden A und B ist 560 bp und war somit, wie erwartet, 880 bp kürzer als das PCR-Produkt des wt-Stammes mit der Länge von 1.440 bp.

Die Klone waren ebenfalls nur überlebensfähig, wenn dem Medium MVA zugegeben wurde oder die Zellen mit einer episomalen Kopie des *lytB*-Gens komplementiert wurden (Abb 17). Dies ist ein direkter Beweis, daß das *lytB*-Gen essentiell im MEP-Stoffwechselweg involviert ist.

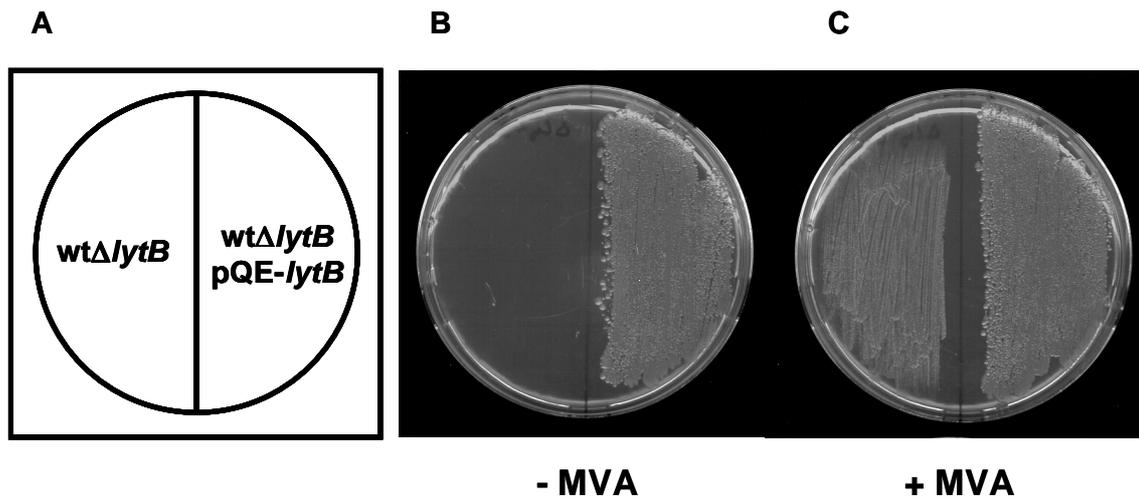


Abbildung 17. Wachstum der Deletionsmutante *wtΔlytB* und *wtΔlytB* nach Komplementation mit einer entsprechenden episomalen Kopie (A) auf Agar-Platten ohne MVA (B) und mit MVA (C).

4.6 Verifikation der Beteiligung von YgbP (IspD) am MEP-Stoffwechselweg

Die Arbeitsgruppe um A. Bacher (München) konnte demonstrieren, daß das YgbP-Protein in der Lage ist, MEP und CTP zu 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol (ME-CDP) umzuwandeln (67). Allerdings fehlte in dieser Arbeit ein direkter Beweis, daß YgbP essentiell im MEP-Stoffwechselweg involviert ist und nicht nur ein Enzym einer möglichen Abzweigung dieses Weges ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde das *ygbP*-Gen in analoger Weise wie das *dxr*-, *gcpE*- und *lytB*-Gen deletiert (Abb. 18, A).

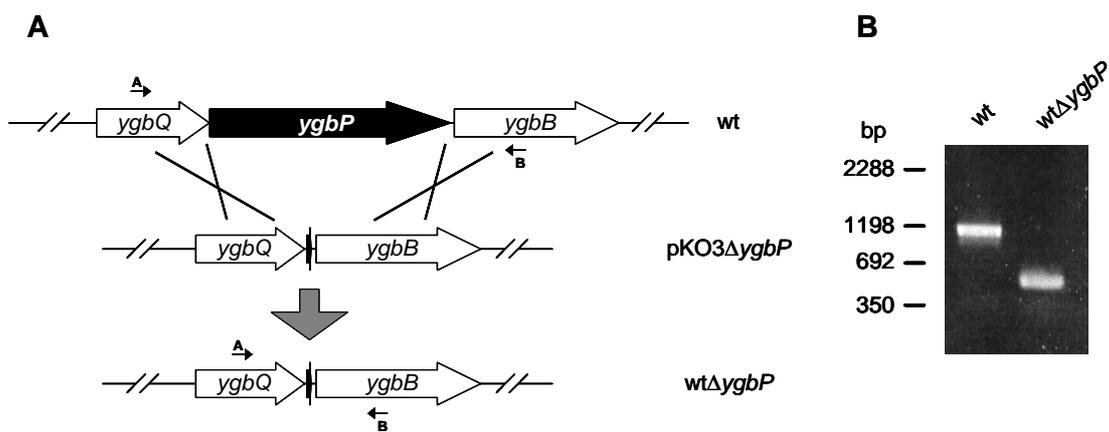


Abbildung 18. Deletion des *ygbP*-Gens in *E. coli* (pSC-MVA). (A) Darstellung der *ygbP*-Region des *wt*-Stammes und der *ygbP*-Deletionsmutante *wtΔygbP*. Die für die PCR-Analyse genutzten Oligonukleotide sind als Pfeile dargestellt. A, YgbP-con-N; B, YgbP-con-C. (B) Verifikation der *ygbP*-Gendeletion durch PCR. Die Größe des PCR-Produktes der Deletionsmutante betrug mit den

Oligonukleotiden A und B 510 bp und war somit, wie erwartet, 680 bp kürzer als das PCR-Produkt des wt-Stammes mit der Länge von 1.190 bp.

Die Bakterien mit der gewünschten *ygbP*-Gendeletion wurden durch PCR identifiziert (Abb. 18, B). Auch diese Klone waren nur überlebensfähig, wenn dem Medium MVA zugegeben wurden oder die Zellen mit einer episomalen Kopie des *ygbP*-Gens (pQE-Ec-YgbP) komplementiert wurden (Daten nicht gezeigt). Hiermit wurde bewiesen, daß das *ygbP*-Gen essentiell im MEP-Stoffwechselweg involviert ist.

4.7 Einfluß der MVA-Konzentration auf das Wachstum verschiedener Deletionsmutanten

Das Wachstum aller generierten Deletionsmutanten wurde bei verschiedenen MVA-Konzentrationen untersucht (Abb. 19). Das beste Wachstum lag bei allen Mutanten bei einer MVA-Konzentration von 100 bis 200 μM . Interessanterweise wirkte eine höhere Konzentration von 500 μM inhibitorisch auf das Wachstum. Dies könnte daran liegen, daß höhere IPP-Konzentrationen durch die nicht gegebene Regulierbarkeit des MVA-Operons den Stoffwechsel von *E. coli* stören.

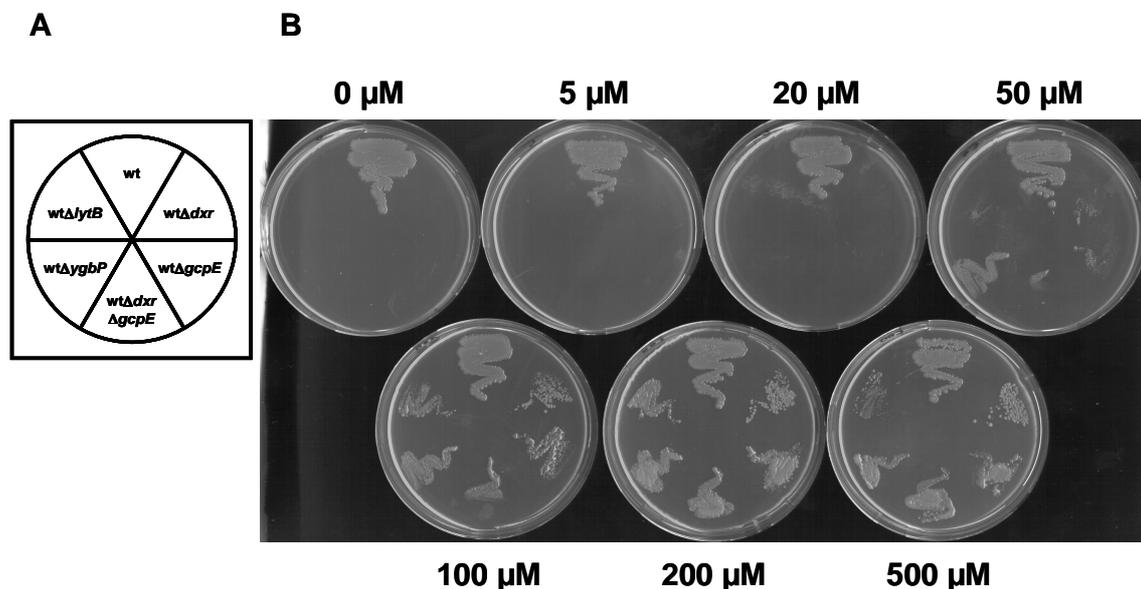


Abbildung 19. MVA-abhängiges Wachstum aller konstruierten Deletionsmutanten (A) bei unterschiedlichen MVA-Konzentrationen (B). Beste Wachstumsraten lagen bei 100 bis 200 μM MVA.

4.8 Aktivierung menschlicher $\gamma\delta$ T-Zellen durch Intermediate des MEP-Stoffwechselweges

Die bisherigen Ergebnisse demonstrieren, daß die Gene *gcpE* und *lytB* essentiell am MEP-Stoffwechselweg in *E. coli* beteiligt sind. Hinweise auf die metabolische Funktion der entsprechenden Genprodukte gehen aus diesen Daten hingegen nicht hervor.

Zur Aufklärung der enzymatischen Funktion von GcpE und LytB wurde die Tatsache ausgenutzt, daß menschliche $\gamma\delta$ T-Zellen durch ein zu dieser Zeit noch unbekanntes Intermediat des MEP-Stoffwechselweges aktiviert werden (36). Die $\gamma\delta$ T-Zellpopulation stellt einen Anteil von 0,5-5% aller menschlichen T-Lymphocyten im peripheren Blut dar. Von diesen $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren etwa 60-95% die V γ 9- und V δ 2-Kette (22, 56). Anders als die klassische MHC-abhängige Erkennung von Antigenen mit Hilfe der CD4 oder CD8 Co-Rezeptoren durch $\alpha\beta$ T-Zellen, erkennen V γ 9V δ 2 T-Zellen MHC-unabhängig kleine nichtproteinöse Phosphoantigene aus verschiedensten Organismen, wie z.B. *E. coli*, *M. tuberculosis* und *P. falciparum* (8, 17, 22, 56). Es war damit zu rechnen, daß die Biosynthese des $\gamma\delta$ T-Zellaktivators in *E. coli* durch Gendelektionen des MEP-Stoffwechselweges beeinflußt wird.

Es wurden niedermolekulare Zellextrakte der generierten Deletionsmutanten in $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierungsexperimente eingesetzt. Die niedermolekularen Zellextrakte (Zellbestandteile kleiner als 3 kDa) wurden durch Ultrafiltration der löslichen Zellfraktionen der untersuchten Bakterien gewonnen. In Vorversuchen wurden die niedermolekularen Zellextrakte der Deletionsmutanten *wt Δ dxr*, *wt Δ ygbP*, *wt Δ gcpE* und *wt Δ lytB* getestet (Daten nicht gezeigt). Die Mutanten *wt Δ dxr*, *wt Δ ygbP* und *wt Δ gcpE* konnten keine signifikante $\gamma\delta$ T-Zellaktivierung induzieren, wohingegen die *wt Δ lytB*-Mutante ein über 100-fach höheres $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierungspotential besaß als der Wildtyp. Diese Beobachtungen bestätigten die Tatsache, daß der $\gamma\delta$ T-Zellaktivator aus dem MEP-Stoffwechselweges stammt. Darüber hinaus war der Schluß möglich, daß der Aktivator durch die enzymatische Reaktion von GcpE entsteht und ein mögliches Substrat von LytB darstellt.

4.9 Identifizierung von HMBPP als Produkt von GcpE und putatives Substrat von LytB

Zur Identifizierung dieses Moleküls wurden niedermolekulare Zellextrakte der Deletionsmutanten *wt Δ gcpE* und *wt Δ lytB* in identischer Weise aufgearbeitet und durch Anionenaustausch-Chromatographie fraktioniert (Abb. 20). Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Fähigkeit, $\gamma\delta$ T-Zellen zu aktivieren, getestet.

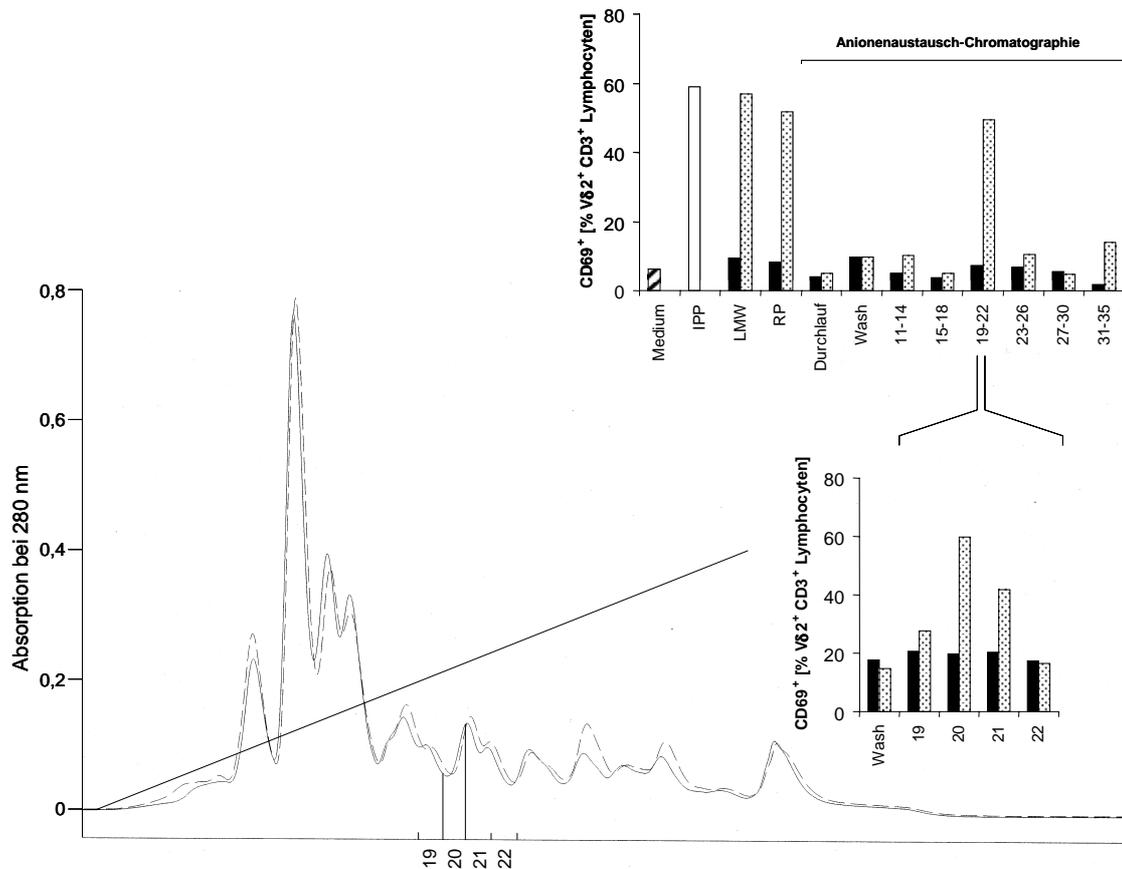


Abbildung 20. Fraktionierung der niedermolekularen Zellextrakte der Deletionsmutanten *wtΔlytB* und *wtΔgcpE* durch Anionenaustausch-Chromatographie. Nach Beseitigung hydrophober Verunreinigungen durch eine RP-Chromatographie wurden die niedermolekularen Zellextrakte durch Anionenaustausch-Chromatographie fraktioniert. Als Eluent wurde ein Ammonium-Formiat-Gradient (20-500 mM) verwendet. Das UV-Absorptionsprofil des *wtΔgcpE*-Stammes ist als gestrichelte und das des *wtΔlytB*-Stammes als durchgehende Linie dargestellt. Die $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung wurde als Expression des CD69-Oberflächenmarkers der $\gamma\delta$ T-Zellen ($V\delta 2^+ CD3^+$) gemessen. Die niedermolekularen Zellextrakte (LMW) und die RP-Durchläufe (RP) wurden in einer 1:50.000 Verdünnung und die einzelnen Fraktionen in einer 1:400.000 Verdünnung untersucht. IPP (10 μ M) diente als Positivkontrolle. Schwarze Balken, *wtΔgcpE*; graue Balken, *wtΔlytB*.

Die Fraktion Nr. 20 des *wtΔlytB*-Stammes zeigte das höchste Aktivierungspotential (Abb. 20), während in der entsprechenden Fraktion des *wtΔgcpE*-Stammes keine Aktivität nachweisbar war. Eine massenspektrometrische Analyse dieser Fraktionen zeigte deutliche Unterschiede (Abb. 21).

Ein Molekül mit dem Molekulargewicht von 278 Da (Massensignale 277,0, 396,9 und 554,9) war in der Fraktion Nr. 20 des *wtΔgcpE*-Stammes als prominentes Signal detektierbar. Dies entspricht dem Molekulargewicht von 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphat (MEcPP), einem kürzlich identifizierten Intermediat des MEP-Stoffwechselweges (32, 57, 72). Ein Molekül mit dem Molekulargewicht von 262 Da konnte in der Fraktion Nr. 20 des *wtΔlytB*-Stammes identifiziert werden (Massensignale 261,0, 380,9 und 523,0). Das entsprechende Signal fehlte in der Fraktion des *wtΔgcpE*-Stammes (Abb. 21). Verunreinigungen (Massensignale 97,0, 216,9 und 1192,2) erschienen in beiden Fraktionen in vergleichbaren Intensitäten.

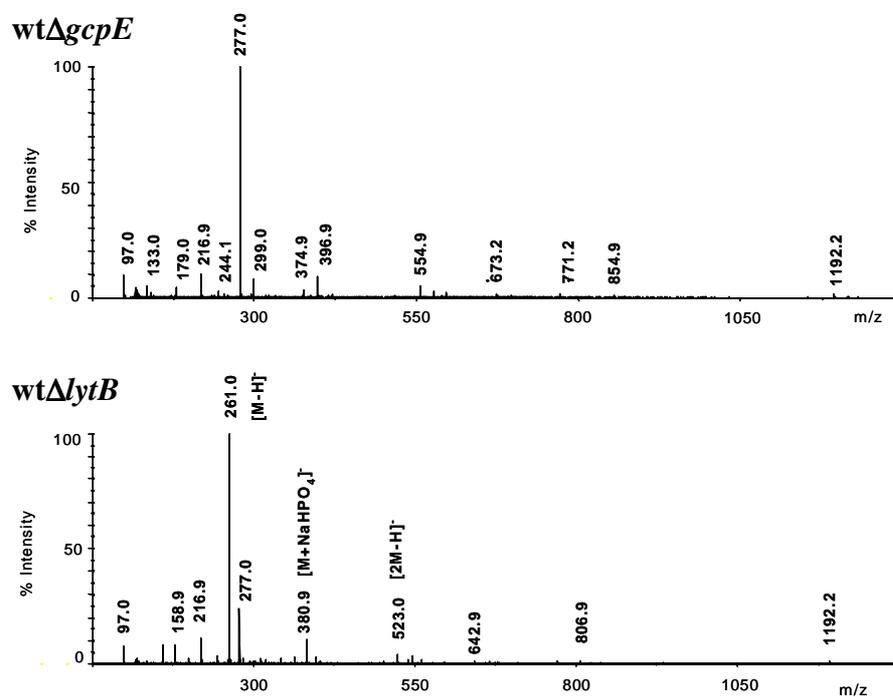


Abbildung 21. Massenspektrometrische Analyse der Fraktion Nr. 20 des *wtΔgcpE*-Stammes und des *wtΔlytB*-Stammes im Negativ-Modus. Das Massensignal 277,0 entspricht dem Molekulargewicht von MEcPP (278 Da) und das Massensignal 261,0 einem unbekanntem Intermediat (262 Da) des MEP-Stoffwechselweges mit der Eigenschaft, $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren zu können.

Die Chemische und die Analytische Abteilung der Jomaa-Pharmaka GmbH konnten in weiterführenden Untersuchungen die Struktur dieses Moleküls als (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMBPP) bestimmen (34) (Abb. 22). Hierzu wurde eine 5 Liter-Kultur des *wtΔlytB*-Stammes, die in einem Bioreaktor (Typ BiostatB; Braun, Melsungen) angezogen wurde,

aufgearbeitet. Die Isolierung der aktiven Verbindung erfolgte in analoger Weise im präparativen Maßstab, wie für den analytischen Ansatz beschrieben (34). Die Strukturaufklärung erfolgte durch Massenspektrometrie und NMR-Spektrometrie (*heteronuclear multiquantum coherence* (HMQC)-, *heteronuclear multiple bond connectivity* (HMBC)- und *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (NOESY)-Analyse) mit Hilfe synthetischer Referenz-Verbindungen (34).

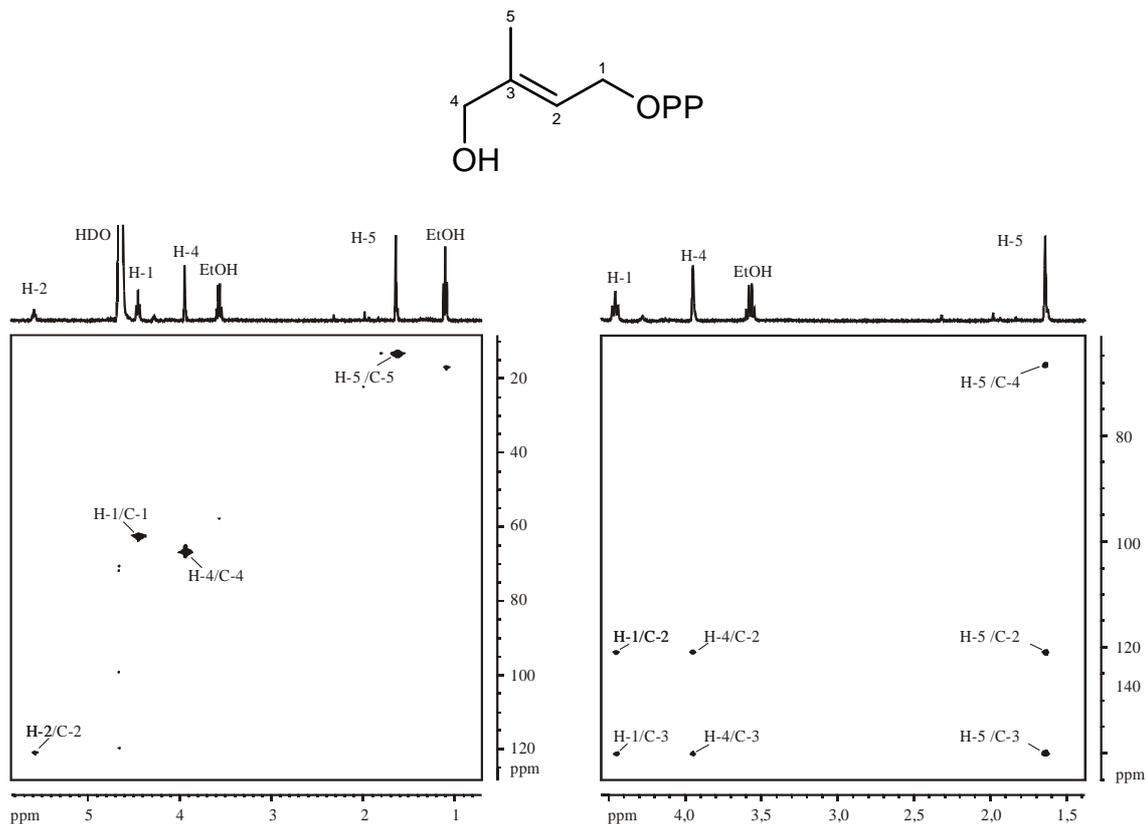


Abbildung 22. NMR-Spektren des (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphats (HMBPP). HMQC-Analyse (linkes Spektrum) zur Identifizierung der chemischen Retentionen der ¹H- und ¹³C-Signale und HMBC-Analyse (rechtes Spektrum) zur Identifizierung des quaternären Kohlenstoffs und der Bindungskopplungen über mehrere Bindungen. Als externer Standard wurde Tetramethylsilan (0,0 ppm) verwendet. Horizontale Achse, ¹H-Retentionen; vertikale Achse, ¹³C-Retentionen.

5. Diskussion

Das *gcpE*- und das *lytB*-Gen wurden mit Hilfe von bioinformatischen Ansätzen als neue Gene des MEP-Stoffwechselweges identifiziert. Sie weisen ein identisches Verteilungsmuster wie das *dxs*- und das *dxr*-Gen in verschiedenen Organismen auf. Das Verteilungsmuster der GcpE- und LytB-homologen Proteine ist ein deutlicher Hinweis auf ihre Beteiligung am MEP-Stoffwechselweg.

Das *gcpE*-Gen befindet sich in *Streptomyces coelicolor* in direkter Nachbarschaft zum *dxs*-Gen und scheint mit diesem in einem Cistron transkribiert zu werden (EMBL AL049485). Interessanterweise besitzt *S. coelicolor* ein weiteres *gcpE*-Gen mit 94,8% Identität der kodierten Proteine, das stromabwärts des *dxr*-Gens liegt und nur von einem nicht untersuchten Gen getrennt wird (EMBL AL355913). Die Existenz von Isoformen der Enzyme des MEP-Stoffwechselweges konnte bereits im Fall der DXS für *Rhodobacter capsulatus* (29) und *S. coelicolor* (14) demonstriert werden. Außerdem besitzt *Mycobacterium tuberculosis* zwei LytB-Isoformen (Anhang IV). Die Existenz von Isozymen deutet auf eine mögliche Regulation des MEP-Stoffwechselweges hin, die eine rasche Adaptation an unterschiedliche physiologische Bedingungen ermöglichen könnte.

In *E. coli* scheint ein noch nicht untersuchtes offenes Leseraster, *yfgA*, zusammen mit dem *gcpE*-Gen transkribiert zu werden. YfgA (sp P27434) ist möglicherweise ein Transkriptions-Regulator, da es ein Helix-Turn-Helix-Motiv besitzt.

Das *gcpE*-Gen wurde erstmals in *Providencia stuartii* identifiziert und zunächst als negativer Regulator der 2'-N-Acetyltransferase (sp Q52424) beschrieben (64). Da das GcpE-Protein auch in Bakterien wie *E. coli* und *H. influenzae*, die keine 2'-N-Acetyltransferase besitzen, hochkonserviert ist, wurde für *gcpE* später eine Funktion als Haushaltsgen diskutiert. Eine Punktmutation im *gcpE*-Gen von *P. stuartii* führte zu verlangsamtem Wachstum und zu einer veränderten Zell-Morphologie (Sphäroblasten) (64). Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen, daß die Inhibition des MEP-Stoffwechselweges zu einer gestörten Zellwand-Biosynthese führt (75), da das für die Zellwandsynthese essentielle Undecaprenylpyrophosphat aus dem MEP-Stoffwechselweg stammt.

Das *lytB*-Gen wird in *E. coli* in einem Operon zusammen mit dem *ribF*-Gen (Riboflavin-Kinase, sp P08391), dem *ileS*-Gen (Isoleucin-tRNA-Synthetase, sp P00956), dem *lspA*-Gen (Prolipoprotein-Signal-Peptidase, sp P00804) und dem *fkpB*-Gen (Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase, sp P22563) transkribiert (28). In früheren Arbeiten führten Temperatur-sensitive Mutationen des *lytB*-Gens zu einer Penicillin-Toleranz, die man auf einen Einfluß des LytB-Proteins auf die *stringent response* zurückführte (41). Allerdings könnte die Penicillin-Toleranz direkt auf einer gestörten Zellwandsynthese beruhen, wie sie bei Störung des MEP-Stoffwechselweges auftritt (75).

Die Murein-Hydrolase (sp Q9Z4P7) aus *Streptococcus pneumoniae* wurde auch LytB genannt (23), besitzt aber keinerlei Ähnlichkeiten zu dem in dieser Arbeit untersuchten LytB-Protein.

Kürzlich wurde ein Hinweis auf die Beteiligung des *lytB*-Gens im MEP-Stoffwechselweg in *Synechocystis spec* veröffentlicht (18), allerdings ohne direkten Beweis. Eine Insertion stromaufwärts des *lytB*-Gens führte zu verlangsamtem Wachstum und einer helleren Färbung der Zellen. Durch Supplementation mit den Alkoholen 3-Methyl-2-buten-1-ol und 3-Methyl-3-buten-1-ol, die potentiell durch Pyrophosphorylierung in der Zelle in IPP und DMAPP überführt werden können, konnte der wt-Phänotyp partiell rekonstituiert werden. Es konnte aber keine *lytB*-Mutante generiert werden.

Als weitere Gene des MEP-Stoffwechselweges wurden das *ygbP*-, *yhbB*- und *ygbB*-Gen durch eine Kombination biochemischer und bioinformatischer Ansätze von der Arbeitsgruppe um A. Bacher identifiziert. Es wurde gezeigt, daß die Enzyme YgbP, YhbB und YgbB die Bildung des MEcPP aus MEP mit ME-CDP und MEP-CDP als Intermediate katalysieren (32, 55, 67, 88). Da homologe Gene auch im Genom verschiedener Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis*, die nur den MVA-Stoffwechselweg nutzen, existieren, erschien ihre direkte Beteiligung am MEP-Stoffwechselweg anfangs nicht eindeutig (Tabelle 4).

Organismen	<i>dxs</i>	<i>dxr</i>	<i>ygbP</i>	<i>yhbB</i>	<i>ygbB</i>	<i>gcpE</i>	<i>lytB</i>	MVA
Eubacteria								
<i>Aquifex aeolicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. trachomatis</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Synechocystis</i> PCC6803	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Thermotoga maritima</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Treponema pallidum</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Deinococcus radiodurans</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>			+	+				+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			+					+
<i>Enterococcus faecalis</i>			+	+	+			+
<i>Borrelia burgdorferi</i>								+
<i>Mycoplasma genitalium</i>								
<i>M. pneumoniae</i>								
<i>Rickettsia prowazekii</i>								
Archaeobacteria								
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>								+
<i>M. thermoautotrophicum</i>								+
<i>Aeropyrum pernix K1</i>								+
<i>Methanococcus jannaschii</i>								+
<i>Pyrococcus horikoshii</i>			+					+
<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>								+
<i>Pyrococcus abyssi</i>								+
Eucaryota								
<i>Plasmodium falciparum</i>	+	+	(+)	+	+	+	+	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								+
<i>Drosophila melanogaster</i>								+
<i>Caenorhabditis elegans</i>								+
<i>Homo sapiens</i>								+

Tabelle 4. Verteilung der Gene des MEP-Stoffwechselweges in verschiedenen Organismen. MVA, Nachweis eines funktionalen MVA-Stoffwechselweges. (+), unvollständige Sequenz (MAL1_2, Datenbank des Sanger Centre).

Ein eindeutiger experimenteller Beweis für eine essentielle Beteiligung des *gcpE*-, *lytB*- und *ygbP*-Gens am MEP-Stoffwechselweg in *E. coli* konnte in dieser Arbeit erbracht werden. Bakterien mit Deletionen dieser Gene konnten nur überleben, wenn sie exogenes MVA über einen genetisch eingeführten partiellen MVA-Stoffwechselweg für die Isoprenoid-Biosynthese nutzen konnten. Ähnliche Ansätze wurden unabhängig von verschiedenen Arbeitsgruppen verfolgt und konnten ebenfalls eine essentielle Beteiligung des *ygbP*-, *yhbB*-, *ygbB*- und *gcpE*-Gens am MEP-

Stoffwechselweg (12, 13, 43, 44, 79) zeigen. Die MVA-Operons der verschiedenen Arbeitsgruppen wurden ebenfalls aus den Genen der MVK, der PMK und der MPD von teils unterschiedlichen Quellorganismen konstruiert (Abb. 23).

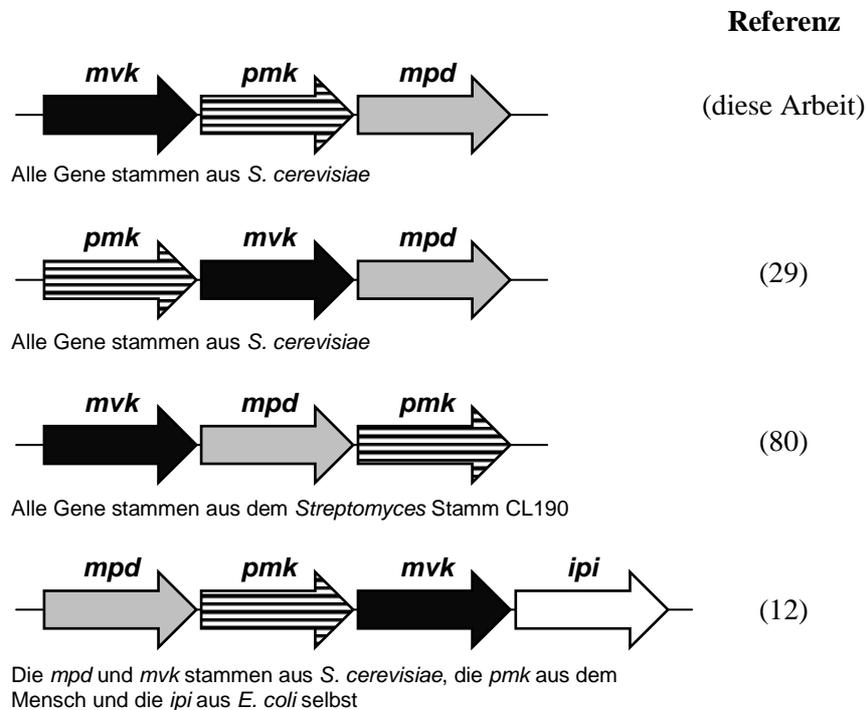


Abbildung 23. Schematische Darstellung der von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten MVA-Operons zur Untersuchung des MEP-Stoffwechselweges in *E. coli*.

Zur Klärung der metabolischen Funktion von GcpE und LytB wurde die Tatsache ausgenutzt, daß menschliche $\gamma\delta$ T-Zellen durch ein noch unbekanntes Intermediat des MEP-Stoffwechselweges aktiviert werden (22, 36, 76). Aus diesem Grund wurden niedermolekulare Zellextrakte der *gcpE*- und *lytB*-Gendelektionsmutanten in $\gamma\delta$ T-Zellaktivierungsexperimente eingesetzt. Die bisher bekannten Intermediate DOXP, MEP, ME-CDP, MEP-CDP und MEcPP des MEP-Stoffwechselweges konnten keine $\gamma\delta$ T-Zellaktivierung induzieren (2, 36, 58). In dieser Arbeit konnte durch eine vergleichende Fraktionierung der niedermolekularen Zellextrakte des *gcpE*- und *lytB*-Gendelektions-Stammes eine pyrophosphorylierte Substanz mit der Molekularmasse von 262 Da identifiziert werden, die für die $\gamma\delta$ T-Zellaktivierung verantwortlich ist. Nach präparativer Aufreinigung des $\gamma\delta$ T-Zellaktivators aus dem wt Δ *lytB*-Stamm konnte die Struktur eindeutig als (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMBPP) aufgeklärt werden (34).

Die Struktur von HMBPP ist in Übereinstimmung mit Einbaustudien mit deuteriummarkierten ME-Isotopomeren, bei denen das Isotopenmuster verschiedener Isoprene analysiert wurde (16, 24, 25). Die Struktur von HMBPP konnte auch von der Arbeitsgruppe um A. Bacher bestätigt werden

(31). Bei dem von dieser Arbeitsgruppe gewählten Ansatz führte die Überexpression der Gene der Xylulosekinase, DXS, DXR, IspD, IspE, IspF und GcpE in *E. coli* in Gegenwart von ^{13}C -markierter 1-Deoxy-D-xylulose zu einer Anreicherung von HMBPP (31).

In einer früheren Arbeit wurde bereits aus Mycobakterien ein $\gamma\delta$ T-Zellaktivator mit einer Molekularmasse von 262 Da isoliert und die Möglichkeit diskutiert, daß dieses Molekül aus dem MEP-Stoffwechselweg stammen könnte (9). Als Struktur wurde 3-Formyl-1-butyl-pyrophosphat vorgeschlagen. Es ist unklar, ob es sich bei der als 3-Formyl-1-butyl-pyrophosphat beschriebenen Substanz auch um HMBPP handelt, da die publizierten NMR-spektroskopischen Daten nicht mit dem Strukturvorschlag übereinstimmen (A. Reichenberg, Giessen, persönliche Kommunikation).

Die Reaktion von MEcPP zu HMBPP kann prinzipiell von GcpE allein katalysiert werden. Da in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, daß bestimmte Wasserstoffreste von MEcPP bis zum Endprodukt IPP und DMAPP erhalten bleiben (16, 24, 25), gibt es nur wenige plausible Reaktionsmechanismen für GcpE. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß GcpE im carboxyterminalen Teil drei hochkonservierte Cysteine besitzt (AS 270, 273 und 305) (Anlage III), wurde eine Säure/Base-katalysierte Reaktion nach dem Model der Vitamin K-Epoxyquinon-Reduktase oder eine radikalische Katalyse nach dem Model der Ribonukleotid-Reduktase postuliert (Abb. 24) (31). Hierbei müßte das Enzym über zelluläre Redox-Systeme regeneriert werden.

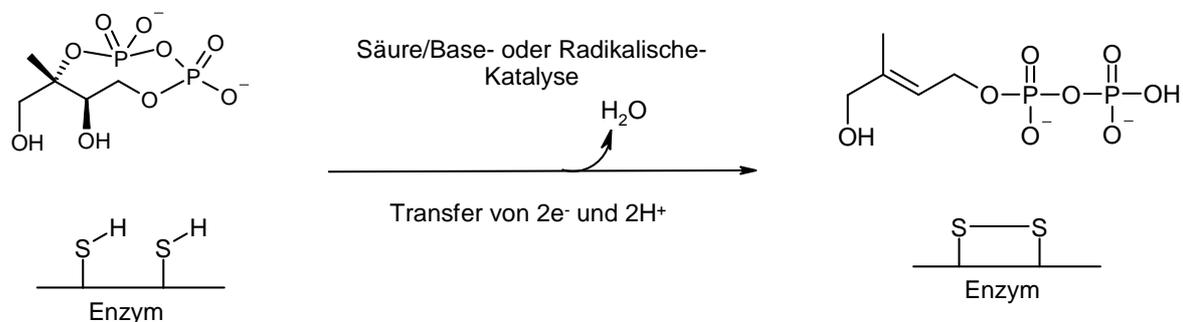


Abbildung 24. Hypothetische von GcpE katalysierte Reaktion, bei der MEcPP direkt zu HMBPP umgewandelt werden kann.

In verschiedenen Untersuchungen konnte demonstriert werden, daß sich der MEP-Stoffwechselweg zur Synthese von IPP und DMAPP aufspaltet (16, 25, 30, 66). HMBPP könnte durch das LytB-Protein sowohl zu IPP als auch zu DMAPP über einen isomeren Übergangszustand umgewandelt werden (Abb. 25).

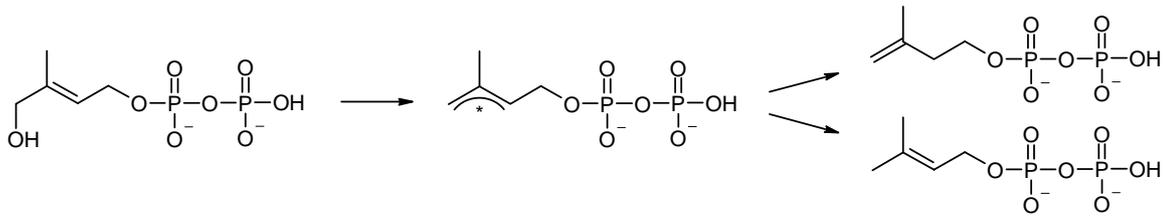


Abbildung 25. Hypothetische von LytB katalysierte Reaktion von HMBPP über einen isomeren Übergangszustand zu IPP und DMAPP. Die Reaktion bedarf eines Dehydratations- und Reduktionsschrittes. Der unbekannte Ladungszustand der delokalisierten Doppelbindung (negativer, positiver oder radikalischer Zustand) ist durch ein Stern symbolisiert.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit ergänzen sich mit weiteren in jüngster Zeit publizierten Ergebnissen zu einem weitgehend vollständigen Bild des MEP-Stoffwechselweges (Abb. 26). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß noch weitere Enzyme und Intermediate existieren.

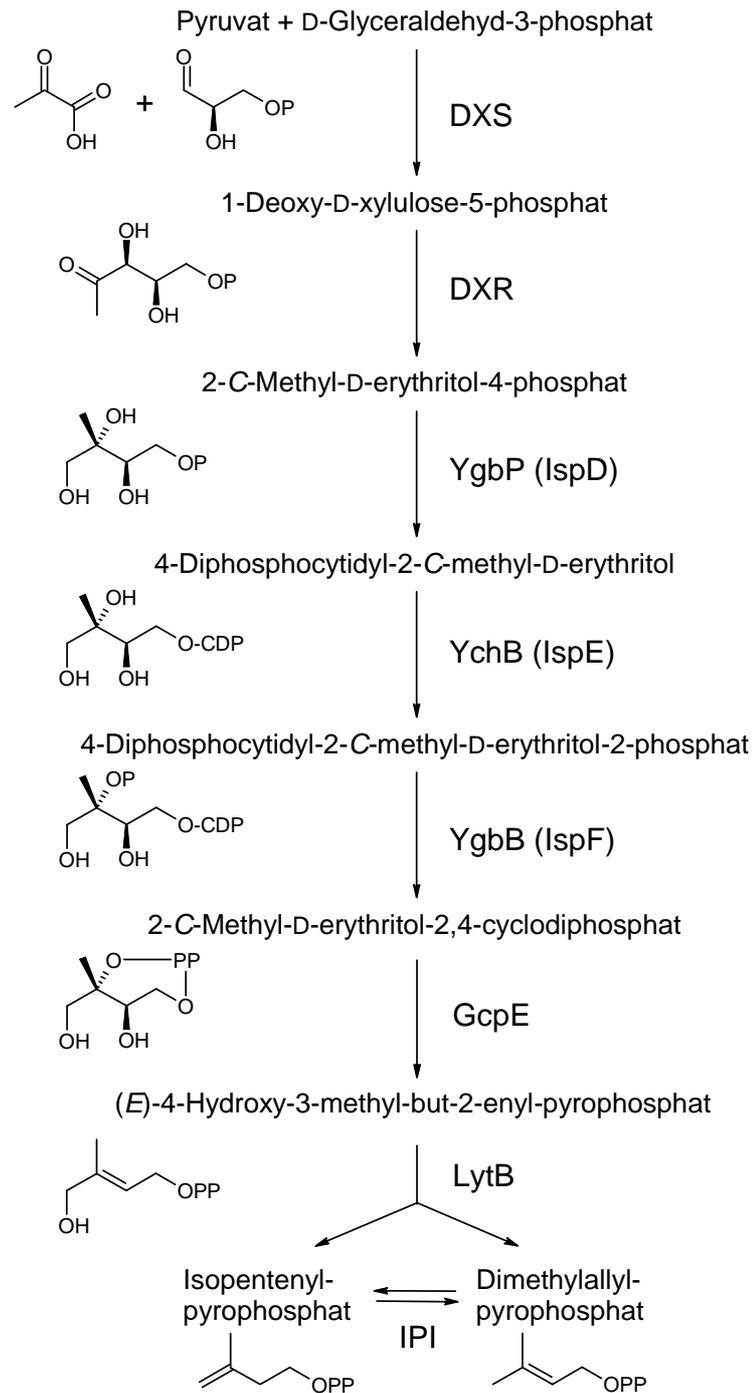


Abbildung 26. Derzeit bekannte Schritte des MEP-Stoffwechselweges in *E. coli*. Gestrichelte Linien stehen für noch nicht vollständig verstandene Reaktionen.

6. Ausblick

Nach der Identifizierung von GcpE und LytB als essentiell im MVA-unabhängigen MEP-Stoffwechselweg involvierte Enzyme mit HMBPP als Produkt von GcpE und mögliches Substrat von LytB, soll in unserer Arbeitsgruppe der katalytische Mechanismus beider Enzyme aufgeklärt werden. Dabei sind essentielle Informationen von der kristallographischen Aufklärung der Struktur der entsprechenden Enzyme zu erwarten.

Weiterhin soll die Regulation des MEP-Stoffwechselweges untersucht werden. Dies ist besonders deshalb interessant, weil DXS, GcpE und LytB in einigen Organismen in zwei Isoformen vorliegen.

Die noch wenig verstandene Proteintargetierung in das Plastiden-ähnliche Organell (Apikoplast) des Malariaerregers *P. falciparum* soll am Beispiel der Enzyme des MEP-Stoffwechselweges untersucht werden.

Zwischenzeitlich konnte die Wirksamkeit des DXR-Inhibitors Fosmidomycin zur Behandlung von akuter unkomplizierter Malaria in ersten klinischen Studien belegt werden. Konsequenterweise stellen auch die übrigen Enzyme des MEP-Stoffwechselweges attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Antibiotika, Antimalariamittel und Herbizide dar. Des weiteren könnte die Untersuchung der immunregulatorischen Eigenschaft von HMBPP über die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen Aufschluß über die Rolle des MEP-Stoffwechselweges für das Infektionsgeschehen bei verschiedenen Krankheiten geben.

Anhang

I. DXS-Alignment:

```

PFAL 1 MIFNYVFFKNFVFPVLYILLIYYINLNGMNNKNQIKTEKIYIKLNLRLSRKNSLCSKKNKIACLFDIGNDDNRNTTYGYN
PFAL 81 VNVKNDINDSLKNNYSNKLYMDKRKNINNVISTNKISGSI SNICSRNQKENEQKRKNQRCLTQCHTYNNMSHEQDKLAND
PFAL 161 NNRNNKNFNLLFINYFNLKRMKNSLLNKNDFYCKEKLKSLFKAYKKNCTFQNYSLKRKSNRDSHKLFSGEFDYTN
PFAL 241 NNALYSEKKEYITLNNNNKNNNNKNDKNNNDNDYNNNNSCNNLGERSNHYDNYGGDNNPNCNNNDKYDIGKYFKQI
ATHA 1 -----MASSAFAFFSYIITKGGSLTSDCKSTSLSSSRSLVTDLPSPCLKP--NNNSHSNRRAK
PFAL 321 NTFINIDEYKTIYGDEIYKEIYELVERNIPYERYKY-FSEDIKKSVLFDIDKYNDVEFEKAIKEEFINNGVYINNIDN

MTUB 1 -----MLQQIRCEADIQHLSQAQIRELAAEIREFLIHKVAATGGHLCPNLGVVELTTALHRVFDSP
TMAR 1 -----MLLDEIKRMSYDELLKRLAEDIRKRITFVVLKNGGHLASNLGTTELTTALYRVEDPR
AAEO 1 -----MLEKYELKDYKGFDFIKNYDYETLQKLAQEVVDYIINVTSKNGGHVCPNLGVVELTTALLRVENPP
ECOL 1 -----MSFDIAKYPTLALVDSTQELRLPKESLTKPCDELRRYLLDSVSRSSGHFASGLGTVELTTALHYVNTP
PAER 1 ---MPKTLHEIPRERPATPLDRASSPAELRRGEADLETLADELRQYLLYTVGQGGHFCAGLGVVELTTALHYVEDTP
BSUB 1 -----MDLLSIQDPSFLKNMSIDLEKLSDEIRQFLITSLSASGGHTCPNLGVVELTTALRKEFNPS
SYNE 1 -----MHISELTHPENLKGHSIRELEEVSRQIREKHQTVAISGGHFCPLGVVELTTALYSTLDDLD
ATHA 57 VCASLAEKGEYYSNRPPPLDITINYPHMKNSVKELKQLSDELRSDVIFNVSKGGHCGSSLGVVELTTALHYIENTP
PFAL 400 TYYKENILIMKKILHYFPLKLLINPESDLKKKQOYLPPLAHBLKIFLFFIYNIITGGHFSVLSSEHQLLLYIFNQP

MTUB 62 HDPILFDTHQOAYVHKMLTGRSQDFATLRKKGCSCHPSRAESEHDVWVESHASALSYADGLAKAFELTGHNRHV---
TMAR 57 EDATLWDTGHQAYTHKMLTGRDDLFFHTRTFGGLSGHVTRESPLDFGTGHAGTSLAAGLGFKARBELTGERH-V---
AAEO 68 EDVLVWDIGHQCYPWKILLTRKEQFPTRCYKCHSGLRREESLYDAFGAGHSSTLSAALGFRICDLKGEKEDYV---
ECOL 71 FDLIIVDVGHOAYPHKMLTGRDKIGCTRIRCKGHHFPPWRGSEYDVLVSGHSSTLSAGIGIAVAARKEE-KNRRT---
PAER 78 DDRLVWDVGHOAYPHKMLTGRRELMGTRCKNCHAAFPRAESEYDTEFVGHSSSTLSAALGMATAARLQK-ERKS---
BSUB 63 KDKFLVWDVGHOAYVHKMLTGRGKEFATLRCKYKCHSGLRREESLYDAFGAGHSSTLSGAMGMAAARDIKGT-DEYI-
SYNE 63 KDRVIVDVGHOAYPHKMLTGRYHDFHTLRCKDGVACMLKRSESRFDFGAGHASTLSAGIGMAAARLQKGE-DFKV---
ATHA 137 QDKILVWDVGHOAYVHKMLTGRRKMPTRCTNGLSGHTRKGESEHDCEGTGHSSTLSAGIGMAVGRDLKGE-KNNNV---
PFAL 480 YDNVIVDIGHQAYVHKMLTGRKLLFLSLRKKCHSGLNIFESLYDKFGAGHSSTLSAALGQYVEAEWQVKNRKYKNGD

MTUB 139 -----VAVVGDGALTGGMCWEA
TMAR 133 -----VVVIGDGALTSGMALEA
AAEO 145 -----IATIVGDGALTAGMAVEA
ECOL 147 -----VCVIGDGALTAGMAFEA
PAER 154 -----VAVIGDGALTAGMAFEA
BSUB 139 -----IPIIGDGALTGGMALEA
SYNE 139 -----VSTIIGDGALTGGMALEA
ATHA 213 -----VAVIGDGALTAGQAMEA
PFAL 560 IEISDNANVTNNERIFQKGIHNDNNINNNINNNNYINPSDVVGRETNVNPVNRDNDHNVKVEHAIIGDGLTGGMALEA

MTUB 156 LNNIAA-SRRPVIIVVNDNGRSY-----APT-IGGVADHLATRLQPAYEQALETGRDLVRAVPLVGGWFRFLHS
TMAR 150 LNQLKNNSK-MKHLINDN-GVSTI-----SPN-VGGIAYHLSKRTSPILYKGGKVLKVKLEKT-EIGFVEEMKY
AAEO 162 LNNAGHRPDRFIVILNDN-EMSTI-----SPN-VGATSTYLNRLISGHFVQETROKIKNFLQHFGETPLR---MKL
ECOL 164 MNHAGHRPD-MLVILNDN-EMSTI-----SEN-VGATNNHQAQLSGLKYSLSREGGKVPFSGVPPPK-EL---LKR
PAER 171 LNHASEVDAD-MLVILNDN-DMSTI-----SHN-VGGISNYLAKLISLRTYSSMRGSKVLSRLPGAW-EL---ARR
BSUB 156 LNHIGD-EKKDMIVILNDN-EMSTI-----APN-VGATHSMGRTRTAGKYQWVKDELEYLFKKIPAVGGKLAATAER
SYNE 156 LNHAGHPHTRLMVILNDN-EMSTI-----SPN-VGATSRYNKRLSSPMQFLTDNLEEQIKHLFPVFGDSITPEMER
ATHA 230 MNNAGYDSD-MIVILNDNKQVSLPTATLDGSPSP-VGATSSALSRQSNPALRELREVAKMTKQIGGPMHQLAA---K
PFAL 640 LNVISFNSK-ILLIYVNDNGOVSLPTNAVVISGNRPLGSDHCHYFVSNIEANAGDNKLSKNAKE-----

MTUB 225 VKAGIKDSISQ--LLEFDLGLKYVGPVDGHDERAWEVAIERSARFRG--APVIVHVITRKGKMGPPAEADQAEQMHSTVP
TMAR 218 LRSLKGMIOGTN--FEESLGLRYEFGFDGHNIELLEKVFKRIRDYDYSS--VHVIVTKKGGKTAABENPTK-VHSASP
AAEO 229 TEFLEGLTSP--GVLFEELGFNYIGPIDGHDIKALEDTNNVNDIK--GPVIVHVITRKGKMGKPAEBENPVK-WHGAVP
ECOL 229 TEFHIGMVVP--GTLFEELGFNYIGPIDGHDVGLITTKNMDLK--GPQVHVMTKKGRGMEPAEKDPIT-FHAVPK
PAER 236 TEFYAKGMVVP--GTLFEELGFNYIGPIDGHDLPVAVATRNMDMK--GPQVHVMTKKGGKPAEALDPIG-YHAITK
BSUB 225 VKGSLKYMVVS--GMFEEELGFNYIGPIDGHSYHELENIQYANKTK--GPVIVHVITRKGKMGKPAEDTDTIGTWEGTGP
SYNE 226 VKGGMRLVVPKVGAVIEELGFNYEFGPIDGHSLELIDTFKQAEKVP--GPVIVHVITRKGKMDLAEKQDQVGYHAQSP
ATHA 305 VDYAKGMISGTGSSFEELGLYIIGVVDGHNIDDLVAIKVNSTRTTGPVIVHVITRKGKMGYPAERAD-DKYGHVVK
PFAL 705 -----NNIFENLYDYIGVNGNNTBELFKVINNIENKLRATVHVITRKSNDINLKS-PISILHSIKK

MTUB 301 IDPATGQA---TKV-----AGPGWTATSDALIGYAKRRDIVA
TMAR 293 -----SGKP-----KMLSYSLELGHITLSRVAREDKKIVA
AAEO 304 YKVESCEI-IKKSS-----P-PTWTSVGKALVELAERDEKIVA
ECOL 304 FDPSSCCL-PKSSG-----GLPSYSKILGDWICETAARDKILMA
PAER 311 LE-APGSA-PKKTG-----G-PKYSVSVGQWLCDMAAQDARLLG
BSUB 301 YKINTGD-FVKPKA-----AAPSWSGLVSGTVORMAREDDGRIVA
SYNE 303 FNLSTCKAYPSSKP-----KPPSYSKVBAHTLTTLAKENPNIVG
ATHA 384 FDPATGRQF-KTN-----KTQSYTTYSAEALVABAEVDKDVVA
PFAL 771 NEIFFPDITLNGNIHKENKIEEEKVSSSTKYDVNKNKNKNDNSEIIKYEDMFSKETFTDIYTNEMKLYLKKDRNIF

```

```

MTUB 337 ITAAMPGPGLTAFGRFPDRLEFDVGIABQHAHTSAAGLAMGC-LHFVVAIYSTFLNRAFDQIMMDVALHKLPVTMVLDR
TMAR 322 ITAAMADGGLSIFQKEHPDRFDLGITTEQCVTFGAALGLHG-MKPVVAIYSTFLQRAYDQI IHDVALQNPVLFADR
AAEO 341 ITPAMREGSGLVBFARFPDRFDVGIABQHAHTFAAGLAAGC-LRFVVAIYSTFLQRAYDQV IHDVALQNPVLFADR
ECOL 342 ITPAMREGSGMVEFSRKFDRYFDVGIABQHAHTFAAGLAAGC-YKFTVAIYSTFLQRAYDQV IHDVALQNPVLFADR
PAER 347 ITPAMKEGSDLVAFSERYPRYFDVGIABQHAHTFAAGLAAGC-MKPVVAIYSTFLQRAYDQI IHDVALQNPVLFADR
BSUB 339 ITPAMPVGSKLEGEFAKEFPDRMFDVGIABQHAHTMAAAMAMQC-MKPFVAIYSTFLQRAYDQV VHDICRONANVFIGADR
SYNE 342 ITAAMATGTLGDKLQAKLPKQYVDVGIABQHAHTFAAGLAAGC-IRFVVAIYSTFLQRAYDQI IHDVCTQKLPVFFCADR
ATHA 422 IHAAMGGGGLNLFRFRFPTRCFDVGIAEQHAHTFAAGLAAGC-LKPFCAIYSSFMQRAYDQV VHDVLDQKPPVRFADR
PFAL 851 LSPAMLGGSGLVKISERYFNNDVGIABQHSVTFAAAMAMNKKLKIQCIIYSTFLQRAYDQI IHDNLQNPVLFKVIAGR

MTUB 416 AGITGSDGASHNEMWDL SMLGI VPGIRVAAPRATRLREELGEALDVEDGPTALRFPKGD-VGEDISALERGGVD----
TMAR 401 SGVVGDDGPTTHGCLFDINLLPVENKII SPSSPEEFVNSIYTVLKHLDGFAIRYPKESFYGEVESLLENMKEID----
AAEO 420 AGIVGDDGPTTHGCVFDLSMTRCPNIVVCAPKDEQLRDLIYTG-IYSGKPFALRYPRGAAYGVP--TEGFK-KHE----
ECOL 421 AGIVGADGPTHQCAFDSVLRCPNIVMTPSDENECROMLYTCYHYNDGFSAVRYPRGNAVGVEL-TP-LE-KLP----
PAER 426 AGIVGDDGPTTHGASEDISVLRCPNIVMTPSDEDLRLKLLTTCYLF-DGFAAVRYPRGSGPNHPI-DPDLQ-PVE----
BSUB 418 AGIVGADGPTHQCVFDLDAFMRHPNIVLMPKIDENEGQHMVHTALS YDEGPIAMRFPNGNGLGVK-MDEQLK-TIP----
SYNE 421 AGIVGADGPTHQGMVDIAVLRCPNIVLAPKDEALQQMLVTCVNYTGGAIAMRYPRNGIGVPLMEEGWE-PLF----
ATHA 501 AGIVGADGPTHGCADFVTFMACHPNIVMTPSDEADLFNMVATVAIDDRESCRYPNGIGVALPPGNKGVPE----
PFAL 931 SGIVGDDGPTHQCIYDLSMLGTENNAYLSPSSQVILKRALRFAYLKDHSVYTRIPRNMNLSDKYMKGYLNIHMKNESK

MTUB 491 -----VLAAPADGLNHDVLLVAICAFAPMAFAVAKR
TMAR 477 -----LG-WKILKRGREAAHATGTTIENEVVKIP--
AAEO 492 -----IGTWEELLEGEDCVLLAVGYYPYQALRAAEK
ECOL 494 -----IGKGLVRRRGEKLAIIINFGTLPEAAKVAES
PAER 499 -----IGKGVVRRRGGRVALLVFGVOFAEAKVAES
BSUB 492 -----IGTWEVLRPGNDAVLLTFGTTIEMATEAAEE
SYNE 496 -----IGKAEILRSCDDVLLGYGSMYPATQPAEL
ATHA 577 -----IGKGRILKECERVALLGYGSAVQSCGAAVM
PFAL 1011 NIDVNVINDDDVKYSEEVMDDNFIKSFIGKSR IIKMDNENNTNEHYSSRGDTQTKKKKVCIFNMCSMIFNVINAIKE

MTUB 522 LHNQ----GIGVIVDPRVVLVPSDG-VRELAVQ--HKLIVTIEDNGVNGCAGSAVSAALRRAEID---VPCRVDGLP
TMAR 505 -----LDVTVVNALIVKPLDTAVLKEIARD--HDLITVEBAMKIGGFGSFAQRILQEMGWGKI-V---NLGVE
AAEO 523 LYKE----GIRVGVNARFVKPMDKMLRDLANR--YDTFTVEBNTVGGFGSGVLEFFAREGIM-KR-VI---NLGVP
ECOL 525 L-----NATLVDMRFVKPLDEALVLEMAAS--HEAVTVEENALMCGGSGVNEVIMAHKRP-VP-VL---NLGLP
PAER 530 L-----DATVVDMRFVKPLDEALVRELAGS--HELLVTHEENAVMCGGAGSAVGEFLASEGLE-VP-LL---QLGLP
BSUB 523 LQKE----GLSVRVNARFVKPIDEKMMKSLKE--GLPILTHEEAVLEGGFGSSLEFAHDQGEYHTP-ID---RVGIP
SYNE 527 LHEH----GIEATVVNARFVKPLDTTELLPLAER--IGKVVTHEEGCLMGGFGSAVAEALMMDNNVL-VP-LK---RIGVP
ATHA 608 LEER----GLNVTADARFCKPLDRALVRSI LAKS--HEVLITVEEGSI--GGFGSHVQVQFDALDGLLDGK-LKWRP-VLIP
PFAL 1091 HEKEQYIISHNYSFSTVDMLELNPLDKNMDHV I KQNKHQYLLIYEINTI--GGFSTHFNNYLIENNYITKHNLYVHNYLS

MTUB 590 QEFYEHASRSEVLADGLTDQDVARRTGWVAALGTGVCASDAIPEHLD
TMAR 569 DLFVPHGGRKELLSMLGLDSEGLTKTIVLTYIKARSREGKV-----
AAEO 592 DRFIEHGKQDILRNLYGIDAEGTEKAVRDALKGRRLI-----
ECOL 589 DRFIPQCTQEMRAEGLDAAGTEAKAKAWLA-----
PAER 594 DYYVEHAKPSEM LAECGLDAAGTEKAVRQRDRQ-----
BSUB 593 DRFIEHGSVTALLEEGLTKQQVANRTRL--LMPPKTHKGIGS-----
SYNE 596 DILVDHATPEQSTVDGLTPAQVAQNIMASLFKTTETESVVPAGVS----
ATHA 679 DRVIDHGAPADQLAEAELMPSHTAATALNLIGAPREALF-----
PFAL 1170 NEPIEHASFKDQQEVVKMDKCSLVNRRKKNYLKNNPT-----

```

Ecol, sp P77488; Paer, gb AAF97240.1; Aaeo, sp O67036; Syne, sp P73067; Atha, sp Q38854; Bsub, sp P54523; Tmar, sp Q9X291; Mtub, sp O07184; Pfall, gb AAD03740.2

II. DXR-Alignment:

```

PFAL 1 MKKYIYIYFFFITITINDLVINNTSKCVS IERRKNNAYINYGIGYN----GPDNKITKSRRCRKIKLCKKDLIDIG----
ATHA 1 -----MMTLNLSLSPAESKALSFLDTSRFNPIPKLSGGFSLRRRNQGRGFKGKVKCS-VKVVQQQQPPPAWPGF

TMAR 1 -----MEERTVILGATGSIGCTOTDVIKKV---KGIRLIGISFHS-NLELAFKIVKENVKNAALTGDVEFE-
AAEO 1 -----MKGVLGSTGSVGSOTIQVYEN---FRDEIELVGLILANRAS-EKLLQQAQKIKKIKYVSYQEPKAKW
MTUB 1 -MTNSTDGRADGRLRVVLGSGTGSIGCTOALQVLTAD---NPDREEVVGLAAGGAHDTLRLRQAQTGVTNLAVADEHAQR
PFAL 73 -----AIKKPINVAIFGSGTGSIGCTNAUNI IRECNKIENVENVKALYVKN-SVNEIYEQARELLEYCLHDKSVYEE
PAER 1 -----MSRFQRI SVLGATGSIGLSITDVIQR---HEDREAFALTGFS-RLAETALCLLRHRVYAVVPEQAAAIA
ECOL 1 -----MKQITLIGSTGSIGCTIDVVRH---NEPHERVVALVAGK-NVTRVVEQCLESPRYAVMDEASAKL
BSUB 1 -----MKNICLLGATGSIGCTOTDVIIRA---HQDQQLVMSVSGFR-NIDKAVPMIEVQPKFVSVGLDLDIYHK
SYNE 1 -----MVKRISILGSGTGSIGCTOTDVIYTH---HPDAQVVGLAAGG-NVALLAQQVAERPEIATIRQAEKLED
ATHA 68 AVPEAPRQSWDGPKPISIVGSGTGSIGCTOTDVIYAE---NPKERVVALAAGS-NVTLLADQVRREKPAVAVRNESLINE

TMAR 65 -----DSSINVWKGSHSTDEMLEALKPDIITMVAVSCFSGLRAVLASLEHSKRVCLANKESLVCGGFLVKKKLKEK-
AAEO 64 TESLPEGVKYLK-----GDEGLKAIIE--ESEREMNAISCIYCKPAYEVKAGKTLLANKESILCLGETIR-----KN
MTUB 77 VGDIPYH-----GSDAATRLVEQTEADVVNNAIVCALGDRPTLAAIKTGARLALANKESLVAGGSLVLRAR---
PFAL 144 LKELVKNIKDYKPIILCGDEGMKEICSSNSIDKIVIGDSFQGLYSTMYAMNNKI IALANKESIVSAGCFLLKLLNIEK
PAER 68 IQGSLAAA-GIRTRVLFGEALCEVASAPEVDMVMAALVCAAGLPSLAAVEAGKRVLLANKESLVMGALFMQAVK-RS
ECOL 65 LKTMQQQ-GSRTEVLSGQAACDMAALEVDQVMAALVCAAGLPLTAAARAGKTLALANKESLVTCGRIFMDAVK-QS
BSUB 65 LKQMSFS---FECQIGLGEGLTEAAVMEVDIVVNALLCSVGLIPTLKAEQKKTALANKESLVTAGHIVKHEAK-RY
SYNE 66 LKAAVAELTDYQPMYVVEGEGVVEVARYGAEISVVTGIVCAGLPLTMAAIAAGKDLALANKESLVTAGAPVVLPLVE-KM
ATHA 144 LKALADL-DYKLEIIPCEQGVIEVARHPAVTVVTVIVCAGLKPVAALAEAGKDLALANKESLVTAGCPVLPPLAN-KH

TMAR 135 GTEIIPVDSEHSALFQVMEP-----EVEKVVLTASGGALRWKISKIDRARPEVDLKHVNMNGARIT
AAEO 132 RERVIPVDSEHNALFOLLSS-----VKREVKHVLTASGGPFKDKSLEELKTASVEEALRHRPWNMGAKIT
MTUB 144 PQQIVPVDSEHSALFQCLRGGTP-----DEVAKIVLTASGGPFGRWSAADLEHVTPEQAGAHPTWSMGPMNT
PFAL 224 NAKIIPVDSEHSALFQCLDNKVKLTKCLQDNFSKINNKNKIFLCSGGPFQNLTDDELKNVTSENALKKHKMKMGKKIT
PAER 146 GAVLLPIDSEHNALFQSLPR-----NYADG--LERVGVRIILLTASGGPFRETPLQOLASVTPEQACAHNWSMGRKIS
ECOL 143 KAQLIPVDSEHNALFQSLPQPIQHNLGYAD---LEONGVVISILLTASGGPFRETPLRDLATMTDQACRHPNWSMGRKIS
BSUB 141 DVPLIPVDSEHSALFQAL-----QG--EQAKNERLLITASGGSFRTKREELESVVEDALKHFNWSMGAKIT
SYNE 145 GVKLLPADSEHSALFQCL-----QG--VPEGGLRRIILLTASGGAFRLPVERLPFVTVQDALKHFNWSMGQKIT
ATHA 222 NVKLLPADSEHSALFQCL-----QG--LPEGALRRIILLTASGGAFRLWPVEKLEKVKVADALKHFNWNMGKKIT

TMAR 198 VDSATMVNKAFEVLEAMELELPEFKEIVKIHREGLVHGAVVLPDGNVKNMVSPDMDRIPISYALFVPRRVALEPFPLRT
AAEO 199 IDSATLMNKGFEMLAEHFLDFPIENKVVVHPQSFVHGILELIDNSFIMHTSQTDMKIPIMHAFVYPRK---KEYPFKK
MTUB 211 LNSASLVNKGLEVIETHLELGIPYDRIDVVVHPQSIIHSMVTFIDGSTTAQASFPDMKLPISLALGPRV---SGAAAA
PFAL 304 IDSATMMNKGLEVIETHLELDVDVYNDIEVIVHKECIIHSCVEFIDKSVISQMYYPDMQIPILYSLTVPDR---KTNLKP
PAER 218 VDSASMMNKGLEVIEACWLEDAQPSQVEVVIHPQSVIHSMDVYVDCSVTAQGNPDMRTPISYAWANPERI---DSGVSP
ECOL 220 VDSATMMNKGLEVIEARWLNASASQMEVLIHPQSVIHSMVRVQDGSVLAQLGEPDMRTPIAHTMAPNVR---NSGVKP
BSUB 208 IDSATMMNKGLEVIEARWLDIPYEQIDVVIHKECIIHSMVEFHDKSVTAQLGTPDMRVPLOYALTVPDRPLPDA--KR
SYNE 212 VDSATMMNKGLEVIEARWLEGLDYDEIDVVIHPQSVIHSLEEVQDTSVLAQLGWPDMRPLLYALSNPERI---YTDWEP
ATHA 289 IDSATLMNKGLEVIEARWLEGAEYDDIEVVIHPQSIIHSMIETQDSSVLAQLGWPDMRPLLYTMSNDRVPCSEVWTPR

TMAR 278 I-----SLSFEDPDPEKIPAFFLLKEI-KDSYALRTAFNAAEVAVAEFLKCSIRFGGHRVIEKTLLEFGQYQPRTL
AAEO 276 VSLLELSPITFEKVDTRKKAIDLAKWAGFMGGVYIPVILVGADEEAVNLFNKGIGGLDIDVILIEQALSE----VNIKD
MTUB 288 CDFHTASSWEFPLDIDVIFAVELARQACVAGGCMTAVVNAANEAAAAFLAGLIGFPAVGTIADVILHAADQWAVEPAT
PFAL 381 LLDLAQVSTLTFHKPSLEHFPCKRLAYQAGIKCNFYPTVLNAANEIANNLFLNKNKIKDFDISSISQVLESFNSQKVSNS
PAER 295 LDMFVAVGRIDFQRPDEQRFPCLRLASQAARETGSAPAMLNAAANEVAVAAPLERIRISDIAVITIEDVLRN--AVTAVES
ECOL 297 LDFCKLSALTEFAAPDYDRVCLKLAMEAFEQQAATTALNAANEITVAAPLAQQRISDTAAANLSVLEKM--DMREPQC
BSUB 286 LELWEIGSLHEFEKADFDRECLQFAFESGKIGTMTPTVLNAANEVAVAAPLAGLIPPLAIEDCKEKATR--QLLKKPS
SYNE 289 LLDLVKAGSLFREPDDHKYPCMOLAYGACRAGGAMPVILNAANEQAVAFLOEISLIDLPRIIEKTCDDLVVGGNTASPD
ATHA 369 LLDLCKLGSITFKKPDNVKYSMDLAYAACRAGGTMTGVLSAANEKAVEMTDEKISLIDLFKVVVELTCDKHRNELVTSPS

TMAR 351 DDVERIHFEAIKKAERVTEWLSSTSY-----
AAEO 351 PQSVEETLEAVEWGRQKVIERYKYAGKG-----
MTUB 368 ---VDDVLDARWARERAQRAVSGMASVAIASTAKPGAAGRHAHLERS
PFAL 461 EDLMKQILQIHSWADKATDIYNKHNS-----
PAER 373 ---LDQVLAADRRARSVAGQWLTRHAG-----
ECOL 375 ---VDDVLSVDANAREVARKEVMRLAS-----
BSUB 364 ---WRTFKKWKIPGDTSIQYSHKVVCS-----
SYNE 369 ---LETIVAADQWARRTVLENSACVATRP-----
ATHA 449 ---LEEVHYDLWAREYAAANVQLSSGARPVHA-----

```

Ecol, sp P45568; Paer, gb AAF97241.1; Aaeo, sp O66722; Syne, sp Q55663; Atha, sp Q9XF59; Bsub, sp O31753; Tmar, sp Q9WZZ1; Mtub, sp Q10798; Pfall, gb AAD03739.1

III. GcpE-Alignment:

ATHA 1 -----MATGVLPAVPSGIKI--PDSKVGFGKSMNLVRCIDVRSLSARRRVSVI--RNSNQSGDLAELQ
PFAL 1 MSYIKRLILFMLLFYSHVVIKIKLFIKISNVNIFFAEAKKN-GKKEFFLLNLIKNSQOKKTYHITKRNTINKSDFLYSL

TMAR 1 -----MRNSVKGKVVVIGGEAPVSVQSMTTKKTADVEKTVSQQIKS
AAEO 1 -----MIOQRKQIRVGNVVKIGGDAPVQSMTISKTHDVEATINQIKR
PAER 1 -----MSIHSASPIIRKSRKLVWGNVPGDAPVQSMTNRETCDVAATVVAQIRR
ECOL 1 -----MHNQAPIORRKRSTRVYGNVPIGDDAPVQSMTNRTTDDVEATVNOIKA
BSUB 1 -----MQVSEITHTKIRPKVVGPLTIGGNNEVQSMTTKTHDVEATVAEINR
MTUB 1 -----MTVGLGMPQPPAPTLPAPRATROLVWGNVGVGSDHPVSVQSMCTKTHDVTNSTLQQTAE
SYNE 1 -----MVTASLPTVPQEFDTTIRKIRKIRPVVGVAVTVGGGHPVSVQSMINEDITLDDVDSVAGIRR
ATHA 61 PASEGSP-----LLVPRQKYCESLHKTVRRKIRTVMVGNVALGSEHPRIQIMTTTDTKDTITGTVDVVR
PFAL 80 LNEEGNSSKKEYKNLKDEEKYNIQNIKKYCECTKKYKRLPITREVVHGNVKGNNKIAQTMAASCDTRVVEECVYQIRK

TMAR 41 LERACCEIVRVAVQDEEDAKAIRRTRKEQ-----EPLVADIQFDYRLAALLSIENGADKIRINPGMISRD--R-----
AAEO 46 LVEACCEIVRVAVPHKEDVEALEEIVKKS-----PMPVADIHFAPSYAFLSMEKGVHCHIRINPGNIGKEE-I-----
PAER 53 LEDACADIVRVSVPMDDAAEAFGKIKQQ-----NPLVADIHFYRIALRVAELGVDCIRINPGNIGRED-R-----
ECOL 51 LERVACADIVRVSVPTMDAAEAFKLIKQQ-----NPLVADIHFYRIALKVAEYVDCIRINPGNIGNEE-R-----
BSUB 51 LAEAGCQIVRVACPDERAANAADIKKR-----SPLVVDIHFYDKLAKALIEGGADKIRINPGNIGRRE-K-----
MTUB 60 LTAACCDIVRVACPRQEDADALAEIARHS-----QPLVADIHFQPRYIFAADAGCAAIRVNPNGNIKEFDGR-----
SYNE 62 LHEICCEIVRVVTPSMAHAKALADIKKIQOATYQAVPLVADVHHNGMKIALEVAKHVDCIRINPGLYVFEKPD-AQREG
ATHA 126 LADKADIVRVTVQGGKPADACFEIKDKIVQLNYNPLVADIHFAP-TVALRVAECFDKIRVNPNGNIFADRRAGF-ETIDY
PFAL 160 CKDLACADIVRVTVQGVQBAQASVYHIEKELSENENPLVADIHFNP-KIALMAADVFEKIRVNPNGNIVDRGKKWIDKVVY

TMAR 107 -----LKDVAALKGKGIPIRYGANVGSIKRRTSER-----KDIABESALEEVRLLKEGFFYDIIIVSVKS
AAEO 113 -----VREIVVEAKRRGVAVRIGVNSGSEKDKLEKYGYPSAEALAESARWSEKFEKWFQFTNYKIVSIKQ
PAER 120 -----VKAIVDAARERNIPIRIGVNAAGSEKDKQKRYGEPTEALLESAMRHVDHLDKLFQNFKIVSKA
ECOL 118 -----IRMVDCARDKNIPIRIGVNAAGSEKDKQEKYGEPTQALLESAMRHVDHLDRLNFDQFKIVSKA
BSUB 118 -----VEAVVKAADKGIPIRYGANVGSLEKRLKRYGYPTADGMVESALHHIKILIEDLDFHDIIVSMKA
MTUB 128 -----VGEVAKAAGAAGIPIRIGVNAAGSDKRFMEKYKATPEALVESALWEASLEBEHGFQDIKIVSKA
SYNE 141 SDQFAEIEGKIRETLEPLVIVSLRQGGKSMRIGVNHGSSERMLFTYGD-TPEGMVOSALEFKIKIESLDFRNLVSMKA
ATHA 204 TEDEYQKELQHIEQVFTPEVEKCKRYGRAMRIGTNGSSSDRIMSYYGD-SPRGMVESAFEFARICRKLVDHNFVPSMKA
PFAL 239 TKEEFDEGKLFIKEKFPVLEKCRRLNRAIRIGTNGSSSSRILSYGD-TPLGMVESAFEFSDLCIENNFYNLVPSMKA

TMAR 167 SDVLETIKANEYIAEKV-----EYPLHLGVTEAGVSETIVKSSSTAIGHLLKNIGDTRVSVLSGDFVREVIIV-----
AAEO 178 SDVLRQVNRANLIFAERT-----DVLPHLGVTEAGMGTKCIKSSVIGIGTLLYMGIGDTRVSVLTDDEPVEVET-----
PAER 185 SDVFLVAAYRLLARQI-----EOPHLGVTEAGGLRSCTVKSAVGLGMLLAEGIGDTRISLSAADPVEBTKV-----
ECOL 183 SDVFLVAEYRLLARQI-----DQPLHLGVTEAGGARSQAVKSAIGLGLLSEBGIGDTRVSVLSAADPVEBTKV-----
BSUB 183 SDVNLAEAYEKAAKAF-----DYPLHLGVTEAGTFLACTVKSAAGLGALLSKGIGNTMIRISLSADPVEBTKV-----
MTUB 193 NDPVVVAAYRLLAARC-----DYPLHLGVTEAGPAFOCTIKSAVAFGALLSRGIGDTRVSVLSADPVEBTKV-----
SYNE 220 SRVPLVAAYRLLVVRMDELGMQDYPLHLGVTEAGDGEYCRKISTAGTALLADGIGDTRVSVLTAPEKETIPVC-----
ATHA 283 SNPVMVAAYRLLVAEMYVHGDYPLHLGVTEAGEGEDCRMKSATGIGTLLQDGLGDTTRVSVLTPPEBETPCRRLANL
PFAL 318 SNAYVMQSYRLLVSKQYERNMMFPYHLHLGVTEAGGDNCRKISYLGIGSLLVDGIGDTRISLTPEDPWELETTPCKLIVEN

ATHA 363 GTKAKLQQGVAPFEKHRHYFD-----FQRRTGDLVQKEGEEVDYRNVLHRDGSVLMSISLDQLKAPELLYRSLATK
PFAL 398 LKKAIFYNENFKEDNELKNEMDTKNLLNFENYRNFNNIKKRNVEKNNVLEHEECTIGNVVTIKELEDLSLQIFKDLNLE

ATHA 437 LVV-GMPFKDLATVDSILLRELPPVDDQVARLALKRLIDVSMGVIAPLS-----EQLTKPLPN-----AMVLVNL
PFAL 478 VDSNGLKKGAKTTDMVIINDFHNTN-LGKKTVDKLMQVGINIVVQYEPHNIIEFKEMEPNNDNNNNNNNNILFYVDI

ATHA 501 KELS GGAYK--LLPEGTRLVSLRGDEP YEELEILKNIDATMILHDVPFTEDKV--SRVHAARLFEFLSENSVNFVPIHH
PFAL 557 KNIMNSSSEKNIKLSNSKGYGLILNGKEDIQTIKKIKELNRRPLF--ILLKSDNIYEHVLTTRRINELLQSLNINIPYIHY

ATHA 578 INFPTGIHRDELVIHAGTYAGLLVDGLGDGMLEAPDQDFDLRNT-----
PFAL 635 VDINSN-NYDDILVNSTLYAGSCLMDLMDGLIVNVN---DVLTNKKKIETKYDEKEEVEEGNNDIHRLLSRVALNS

TMAR 235 --GKKLLIALGIRE-GVEVIACTCGRAEIDVENMAKMEENFFHOKRUKLAVMGCIVNGIGEGKADDLGVAGLRDGAV
AAEO 246 --AYEILKSLGRRRGVEIVA CPTCGRIEVDLPKVKEQEKLSGKTPDKVAVMGCIVNNAIGEARADIGLACGRGFAW
PAER 253 --GFDILKSLHRSRGINFIA CPCSQRQNFVVKTMNEEGRLEDLVPMDVAVIGCVVNGPGEARBAHVGLTGGTPNL-
ECOL 251 --GFDILKSLRHSRGINFIA CPTCSRQEFVIGTVNAEQRLEDLITPMDVSIIGCVVNGPGEALVSLVGLVGGNKSG
BSUB 251 --AREILKSFGASNAATLIS CPTCGRIEIDVSIANEVEEYISKAPDKVAVLGCIVNGPGEARADIGIAGARGEGL
MTUB 261 --GNQVLESNLRRPSLEIVS CPCSGRQVDVYTLANEV TAGLDGIDVPLRVAVMGCIVNGPGEARADIGVASGNGKQG
SYNE 294 ---YSLQALGRKTMVEYVAC PCSGRITLFDLVEVHEREATKHTG-IDLAVMGCIVNGPGEADADYGYVKGQAGYI
ATHA 625 ---SFDLQGRMRTKTEYVSC PCSGRITLFDLQEISAEERREKTSHPG-VSLAIMGCTVNGPGEADADYGYVGGSPGKI
PFAL 711 FLTLNQLQDTRIRLFKTDYIAC PCSGRITLFDLQETTKKMKLTGHLKGVK-LAVMGCIVNGIGEMADAHFGYVGSAPKKI

TMAR 312 IFVKEE--IKERVSKFVLERLKYYNELLEEVER-----
AAEO 324 LFKKCK--PIKKVDESEMVEELKELIONMEKDGGTN-----
PAER 330 VYIDCK--PSQKLTNDNLVDEPERLIRQKAAEKAEAE--DASLIARG-----
ECOL 329 LYEDCV--RKDRDNNMDIDOLEARIRAKASQLDEARRIDVQVQEK-----
BSUB 329 LFRKCK--IVRKVPEETMVEBKKEIDILAAEEHYAKLEAKAKLKEETQKA-----
MTUB 339 LFRVEE--VIKTVPEAQIVETLIEEAMRLAAEMGEQ---DPGATPSGSPIVTVS
SYNE 370 ALYRREEIKR--VPETDGOEELINLIKADGRWVDP-----
ATHA 702 DLYVCKTVVVRGIDAMTEATDAILGLIKEHGRWVDPVADE-----
PFAL 790 DLYVCKELVERNIPEEEA CKLIELIKKHKKWKDP-----

Ecol, sp P27433; Paer, pir F83171; Aaeo, sp O67496; Syne, sp P73672; Atha, ref NP_200868.1; Bsub, sp P54482; Tmar, sp Q9WZ3; Mtub, sp O33350; Pfal, gb AAK12103.1

IV. LytB-Alignment:

```

PFAL      1 MSVTTFCSLKKTDCNKNIYISKRAFSVFLFYLFFFLFFHFFYLFCSSSFVAIIHSEKRKNIMRRKRSILQIFENSISKSGE
ATHA      1 -----MAVALQFSRLCVRPDTFVRENHLSGSGSLRRRKAHSV
PFAL     81 KCNFTKRYIITHYNIPLKIKKHDLPVSIKYFSHKPNKGHNYVTNMITQKNRSFLFFFLYLNKYFFG-----KQEQR
SYNE      1 -----MGVMNTEYQSHLIQEIRQNNYRLERGDITLAEAE
ATHA     39 CSSGDENAPSPSVVMSDFDAKVFVRKLNLRSDNYNRKGFHGKEETLKLNMREYTSDILETLKNGYTYSWGDTVKAKA
TMAR      1 -----AKIVVAKN
AAEO      1 -----MVDITAEH
BSUB      1 -----MDVIKISP
MTUB2     1 -----MAEVFVGPVAQGYASGETVLEASP
PAER      1 -----NQLKLANP
ECOL      1 -----NQLKLANP
MTUB1     1 -----MVPTVDMGIPGASVSSRSVADRPNRKRVLEASP
PFAL    154 KMNYHEEMNKINIKNDGNRKIYMPKN---DIHEEDG-DHKND-VEINQKRNEQNCKSFNDEKKNENARDPNKILYINP
SYNE     36 FGFQNGVBRVAMAYETR-QHFPGRDLWITNEIITHNPSVNRQIREMEVNFIDVVNGEKDFSGVAKGDVVLLPFAFGASVEE
ATHA    119 YGFQNGVBRVQIAYEAR-KQFPEERLWITNEIITHNPTVNRKLEDMDKIIPVEDSKQFDVVEKDDVVLLPFAFGAGVDE
TMAR      9 IGFQNGVBRVIRTVEELL---DEGKKVVDGELVHNKQVMEQLTKKGLKVSSEMTD-----GEVFWVRAGHPKDR
AAEO     10 AGFQNGVBRVLAEEESL---KESQGVVTLGPIIHNQEVNRKKNLG-VFPPSQGEFKE-----GDTVLRSHGHPPEK
BSUB      9 RGYCYGVVDAVIAKNASLDKSLPRFIYILGMIVHNKHWTDAFEEREGILTDGNSRLDILKQVD-KGTVIFTAGHVSPEV
MTUB2    26 RGFCAQVBRVETVKRVL--DVAEGPVYVRKQIIVHNTVVAELDRCAVFEEDLDEIPD-PPPP-GAVVVFSAHGVSQAV
PAER      9 RGFCAQVBRVETVNRAL--DVFQPIIYVRHEVHNKVFVDNLRQRCALFVEELDQVFN-----NVIVVFSAHGVSQAV
ECOL      9 RGFCAQVBRVETVNRAL--AIYGAPIYVRHEVHNKVFVDNLRQRCALFVEELDQVFN-----GAILVFSAHGVSQAV
MTUB1    34 RGFCAQVBRVETVERAL--QRHGPPVYVRHEVHNKRVVDTLAKAGAVFEETEQVPE-----GATVVFSAHGVAPTV
PFAL    228 RGFQNGVBRVETVEECL--KLFKPIIYVHKIIVHNDIVCKRLEKCALFVEEDLNDVDP-----GHILLVFSAHGVSQAI
SYNE    115 MQLLNDRECTIVDITCPVWVSKVWNSVEKHKRKEHTSIIHGKYNHEETITSSSFAGTYLIVLNMMAEAQKVCDYILHG----
ATHA    198 MYVLRNDRKVIQIVDITCPVWVTKVWNTVEKHKRGEYTSVIEGKYNHEETITASSFAGKYIIVKNMKEANYVCDYILGQYDYG
TMAR     77 LEELKKIFPEVVDLTCPIVSOIFKTAQRYAKER-KVIVFGKEDHPISMVLR-----CYAPA
AAEO     81 EEALRKGKIVIDATCPVYKAVHEAVCQLTRGQYFVVLVEKNEHPVICTL-----EYLRA
BSUB     88 RRIAEERGVAVIDATCPDVTRTHNLIEMKEKGYHVYITGRKGHPEPECAV-----CVAPE
MTUB2   102 RAGADERGVAVIDATCPVAKVHAAARFAARGDVTVFICGHAGHEBETECTL-----CVAPR
PAER     81 RKEAERGVAVIDATCPVTKVHMEVVYRSRGGHECVLIGHEGHPPEVETM-----EYDAN
ECOL     81 RNEAKSRDITVFDATCPVTKVHMEVARASRRGEESITIGHAGHPPEVETM-----EYDAN
MTUB1   106 HVSASERNLQVIDATCPVTKVHNEARRFARDYDILLIGHEGHEBETECTA-----EYAPD
PFAL    300 REIAKKGKIEIDATCPVTKVHVYVQMKAKENYDITLIGYKNHVEVICTY-----NEAPH
SYNE    191 --GDRQEFLLDYFANAHSAGFPDQDLVRIQVANQTTMLKSETEMIIGKLFKELLQKYGPIELNNHFSFNTICDQATQBRQ
ATHA    278 SSSTKEEEMKFKYALISGFDPDNDLVKVGIANQTTMLKGETEELGRLLETMMRKYGVENVSGHPIISFNTICDQATQBRQ
TMAR    132 IVTKVPFKLEE-----K---KVVFLSQTTSSLEEKYKFWAAIRMNEFEAEVFL-----NTICQVTVNRE
AAEO    137 CNGKI-VVETLEDIGEAL--KHE---RVGIVAQTTNEEFKVEVGEALVWKEVKVI-----NTICNATSLRQ
BSUB    144 ----IVHLVETEDVKNLDIQS-E---KLIVNTQTTMSQWVDHIMELKEKYPHVEY--H-----QEICLATQVRQ
MTUB2   158 S----TLIVQTPADVAALNLEPGT--QSYLTQTTLALDEADVDAARARFPTLGQPPS-----EDICYATQNRQ
PAER    137 SNGGAIYLVDEADVAALEVRKPE--ALHYVTQTTLSMDDTSKVIDAARAKFPQIQGPRK-----NDICYATQNRQ
ECOL    137 PEGG-MYLVESRDDVWKLTVKNEE--KLSFMTQTTLSVDDTSDVIDAARKRFPKIVGPRK-----DDICYATQNRQ
MTUB1   162 H----VQLVDGVAVDQVTVRDED--KVVWLSQTTLSVDETMETVGRARRRFPKIQDPPS-----DDICYATQNRQ
PFAL    356 ----CTHIVENVNDVKLNFLNPK--KIFYVTQTTLSMDDCALIVQKKNKFPHIETIPS-----GSIQYATQNRQ
SYNE    269 DAMFDVEEDLSLAVVIGGFNSNTHLQELAVEHGIPSVHIDSGDRIGPGRVHEHKPLGKDLVLEPWLPAKGIITVGV
ATHA    358 DAIYELVEEKIDLMVVGWNSNTHLQELSEARGIPSYWIDSEKRIGPNKIAYKLHYGELVKEENFLPKGPITIGVT
TMAR    189 REVEELSKI-CDLSIVVCGKHSNTHLQELFRASKHSKIW-----TESPDEIPADVVK-YGTVCVF
AAEO    201 ESYKRLAPE-VQVMIIGGKNSGNRRLYHISKELN-PNTYH-----TETAETQPEWFRGVKRVGIS
BSUB    206 EAVSEQAKK-ADLTIVVGDPKSNNSNRLAQVSEEIAGTKAYR-----IGDLSLKLWLVKGVNTVAVT
MTUB2   223 RALQSMVGE-CDVVLVIGSCNSNRLRELVAQRSGTPA-YL-----IDGDDIPEWLSVSTIGVT
PAER    206 DAVKELADQ-CDMVVVGSPNSNRLRELVAERMGTPA-YL-----IDGAEIQRGWFDGVRRTGIT
ECOL    205 EAVRALAEQ-AEVVLVVGSKNSNNSNRLAELVAQRMGKRA-FL-----IDDAKDIQEEWVKEVKVGV
MTUB1   227 VAVKAMAPE-CELVIVVGSRNSSNRLVEVALGAGARAHL-----VDWADDISAWLDGVTIGVT
PFAL    421 TALNKICTK-CDLTIVVGSSSSNKLVYSSQIRNVPAV-L-----LNTVHDDQQLKLVNVAIT
SYNE    349 SGASTPDKVVEEVMKKILAIKEAQPVLEIAG-----
ATHA    438 SGASTPDKVVEDALVKVFDIKR-EELLQLA-----
TMAR    248 SGTSTPNSLLENVVRKIKEMEGKRDGTI-----
AAEO    262 AGASTPDWLIIEQVKSRIQIECEGQLVSS-----
BSUB    268 AGASTPTPTKEVIRFLEQFDHE-DPSTWTEHNIPLKKILPKVKAKN-----
MTUB2   284 AGASAPPRVGVVDAIRGYASI-TVVERSIAETETV-RFGLPKQVRAQ-----
PAER    267 AGASAPEVLRGVTAQREWGAS-EEQLEGREENI-TFSMPKELRVKAL-----
ECOL    266 AGASAPDILVQNVVARLQQLGGG-EAIPLEGREENI-VFVPEKELRVDIREVD--
MTUB1   289 SCASVPEVLRGVLERLAECGYD-IVQPVTTANETL-VFALPRELRSR-----
PFAL    482 SASAPPEQETQKFNLTNPPFNITLQNFDAHENVPKWKLPKNFLHMTKEREK

```

Ecol, sp P22565; Paer, sp Q9HVM7; Aaeo, sp O67625; Syne, sp Q55643; Atha, trnew AAK68817; Bsub, sp P54473; Tmar, sp Q9X1F7; Mtub1, sp O53458; Mtub2, sp O50409; Pfal, gb AAK12102.1

V. pQE31-Konstrukte des MVA-Operons aus *B. burgdorferi*:**pBb-MVA-Gesamt:**

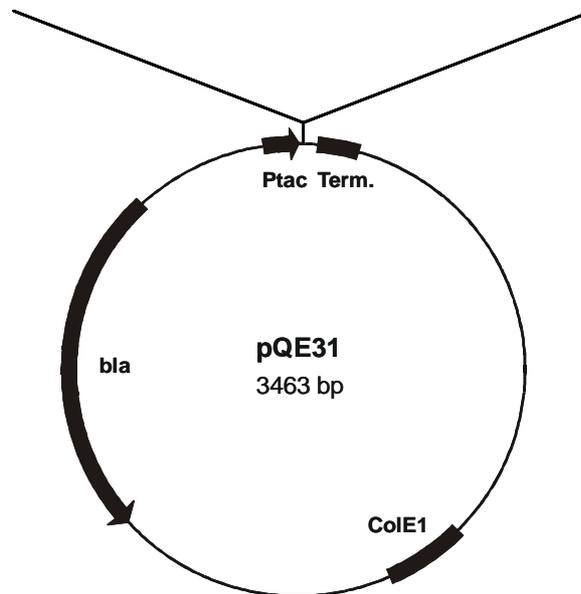
ATG AGA GGA TCT CAT CAC CAT CAC CAT CAC ACG GAT CCT ^{BamHI} **BB0683 bis BB0688** TAG CTC GAC
 M R G S H H H H H H T D P

entspricht der Sequenz gb AE000783
von 724.224 bp - 730.506 bp

pBb-MVA-kurz:

ATG AGA GGA TCT CAT CAC CAT CAC CAT CAC ACG GAT CCG ^{BamHI} **BB0686 bis BB0688** TAG CTC GAC
 M R G S H H H H H H T D P

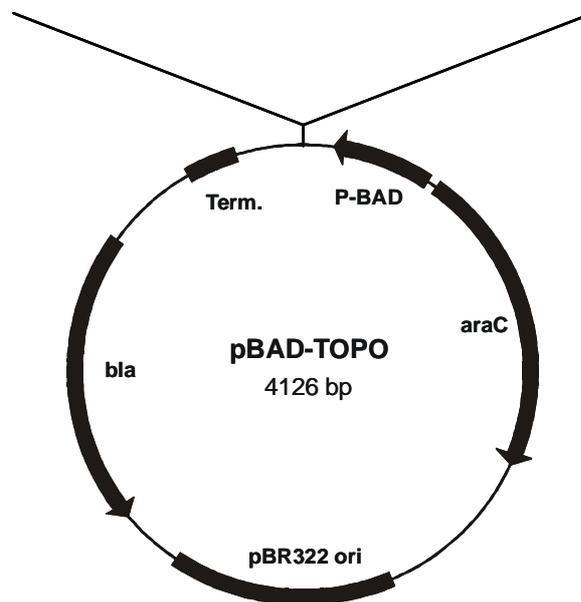
entspricht der Sequenz gb AE000783
von 727.737 bp - 730.506 bp



VI. pBAD-Konstrukt des artifiziellen MVA-Operons aus *S. cerevisiae*:**pSC-MVA:**

TAGGAGGAATTAACC-**ERG12**-TAGGAGGCAGATCAA-**ERG8**-TAGGAGGTAATACTC-**ERG19**-TAA
RBS RBS RBS

ERG12 entspricht der Sequenz gb NC_001145 von 684.466 bp - 685.797 bp, ERG8 der Sequenz gb NC_001145 von 712.315 bp - 713.670 bp und ERG19 der Sequenz gb NC_001146 von 701.892 bp - 703.082 bp



Literatur

1. **Altincicek, B., M. Hintz, S. Sanderbrand, J. Wiesner, E. Beck, and H. Jomaa.** 2000. Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **190**:329-33.
2. **Altincicek, B., J. Moll, N. Campos, G. Foerster, E. Beck, J. F. Hoeffler, C. Grosdemange-Billiard, M. Rodriguez-Concepcion, M. Rohmer, A. Boronat, M. Eberl, and H. Jomaa.** 2001. Cutting edge: human $\gamma\delta$ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol.* **166**:3655-8.
3. **Arigoni, D., S. Sagner, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher, and M. H. Zenk.** 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:10600-5.
4. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl** (eds.). 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
5. **Bach, T. J.** 1995. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants--a review. *Lipids.* **30**:191-202.
6. **Baker, J., D. B. Franklin, and J. Parker.** 1992. Sequence and characterization of the *gcpE* gene of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **73**:175-80.
7. **Begley, T. P.** 1996. The biosynthesis and degradation of thiamin (vitamin B1). *Nat Prod Rep.* **13**:177-85.
8. **Behr, C., R. Poupot, M. A. Peyrat, Y. Poquet, P. Constant, P. Dubois, M. Bonneville, and J. J. Fournie.** 1996. *Plasmodium falciparum* stimuli for human $\gamma\delta$ T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect Immun.* **64**:2892-6.
9. **Belmant, C., E. Espinosa, R. Poupot, M. A. Peyrat, M. Guiraud, Y. Poquet, M. Bonneville, and J. J. Fournie.** 1999. 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate: A novel mycobacterial metabolite-activating human $\gamma\delta$ T cells. *J Biol Chem.* **274**:32079-84.
10. **Bloch, K.** 1992. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids.* **57**:378-83.

11. **Boucher, Y., and W. F. Doolittle.** 2000. The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol.* **37**:703-16.
12. **Campos, N., M. Rodriguez-Concepcion, S. Sauret-Gueto, F. Gallego, L. M. Lois, and A. Boronat.** 2001. *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J.* **353**:59-67.
13. **Campos, N., M. Rodriguez-Concepcion, M. Seemann, M. Rohmer, and A. Boronat.** 2001. Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **488**:170-3.
14. **Cane, D. E., C. Chow, A. Lillo, and I. Kang.** 2001. Molecular cloning, expression and characterization of the first three genes in the mevalonate-independent isoprenoid pathway in *Streptomyces coelicolor*. *Bioorg Med Chem Lett.* **9**:1467-1477.
15. **Cane, D. E., S. C. Du, J. K. Robinson, Y. Hsiung, and I. D. Spenser.** 1999. Biosynthesis of vitamin B-6: Enzymatic conversion of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to pyridoxol phosphate. *J Am Chem Soc.* **121**:7722-7723.
16. **Charon, L., J. F. Hoeffler, C. Pale-Grosdemange, L. M. Lois, N. Campos, A. Boronat, and M. Rohmer.** 2000. Deuterium-labelled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J.* **346**:737-42.
17. **Constant, P., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, and J. J. Fournie.** 1994. Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science.* **264**:267-70.
18. **Cunningham, F. X., Jr., T. P. Lafond, and E. Gantt.** 2000. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Bacteriol.* **182**:5841-8.
19. **Disch, A., and M. Rohmer.** 1998. On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* **168**:201-8.
20. **Eisenreich, W., B. Menhard, P. J. Hylands, M. H. Zenk, and A. Bacher.** 1996. Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:6431-6.

21. **Eisenreich, W., F. Rohdich, and A. Bacher.** 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**:78-84.
22. **Espinosa, E., C. Belmant, H. Sicard, R. Poupot, M. Bonneville, and J. J. Fournie.** 2001. Y2K+1 state-of-the-art on non-peptide phosphoantigens, a novel category of immunostimulatory molecules. *Microbes Infect.* **3**:645-54.
23. **Garcia, P., M. P. Gonzalez, E. Garcia, R. Lopez, and J. L. Garcia.** 1999. LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation [letter]. *Mol Microbiol.* **31**:1275-7.
24. **Giner, J. L., and B. Jaun.** 1998. Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: Retention of the methyl H-atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *Tetrahedron Lett.* **39**:8021-8022.
25. **Giner, J. L., B. Jaun, and D. Arigoni.** 1998. Biosynthesis of isoprenoids in *Escherichia coli*: The fate of the 3-H and 4-H atoms of 1-deoxy-D-xylulose. *Chem Commun*:1857-1858.
26. **Goldstein, J. L., and M. S. Brown.** 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* **343**:425-30.
27. **Grolle, S., S. Bringer-Meyer, and H. Sahm.** 2000. Isolation of the *dxr* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *FEMS Microbiol Lett.* **191**:131-7.
28. **Gustafson, C. E., S. Kaul, and E. E. Ishiguro.** 1993. Identification of the *Escherichia coli lytB* gene, which is involved in penicillin tolerance and control of the stringent response. *J Bacteriol.* **175**:1203-5.
29. **Hahn, F. M., L. M. Eubanks, C. A. Testa, B. S. J. Blagg, J. A. Baker, and C. D. Poulter.** 2001. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* **183**:1-11.
30. **Hahn, F. M., A. P. Hurlburt, and C. D. Poulter.** 1999. *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol.* **181**:4499-504.
31. **Hecht, S., W. Eisenreich, P. Adam, S. Amslinger, K. Kis, A. Bacher, D. Arigoni, and F. Rohdich.** 2001. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:14837-42.
32. **Herz, S., J. Wungsintaweekul, C. A. Schuhr, S. Hecht, H. Luttmann, S. Sagner, M. Fellermeier, W. Eisenreich, M. H. Zenk, A. Bacher, and F. Rohdich.** 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 U S A.* **97**:2486-90.
33. **Hill, R. E., K. Himmeldirk, I. A. Kennedy, R. M. Pauloski, B. G. Sayer, E. Wolf, and I. D. Spenser.** 1996. The biogenetic anatomy of vitamin B6. A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **271**:30426-35.
 34. **Hintz, M., A. Reichenberg, B. Altincicek, U. Bahr, R. M. Gschwind, A. K. Kollas, E. Beck, J. Wiesner, M. Eberl, and H. Jomaa.** 2001. Identification of (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **509**:317-22.
 35. **Holmes, D. S., and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* **114**:193-197.
 36. **Jomaa, H., J. Feurle, K. Luhs, V. Kunzmann, H. P. Tony, M. Herderich, and M. Wilhelm.** 1999. V γ 9/V δ 2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **25**:371-8.
 37. **Jomaa, H., J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Turbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, and E. Beck.** 1999. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science.* **285**:1573-6.
 38. **Kaneda, K., T. Kuzuyama, M. Takagi, Y. Hayakawa, and H. Seto.** 2001. An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:932-7.
 39. **Koppisch, A. T., B. S. Blagg, and C. D. Poulter.** 2000. Synthesis of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate: the first pathway-specific intermediate in the methylerythritol phosphate route to isoprenoids. *Org Lett.* **2**:215-7.
 40. **Korec, E., J. Korcova, Z. Palkova, V. Vondrejs, V. Korinek, M. Reinis, V. V. Bichko, and I. Hlozaneck.** 1989. Expression of hepatitis B virus large envelope protein in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Biol.* **35**:315-27.
 41. **Kusser, W., and E. E. Ishiguro.** 1987. Suppression of mutations conferring penicillin tolerance by interference with the stringent control mechanism of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **169**:4396-8.

42. **Kuzuyama, T., T. Shimizu, S. Takahashi, and H. Seto.** 1998. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**:7913-6.
43. **Kuzuyama, T., M. Takagi, K. Kaneda, T. Dairi, and H. Seto.** 2000. Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **41**:703-6.
44. **Kuzuyama, T., M. Takagi, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Dairi, and H. Seto.** 2000. Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol to its 2-phospho derivative by 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase. *Tetrahedron Lett.* **41**:2925-8.
45. **Kuzuyama, T., M. Takagi, S. Takahashi, and H. Seto.** 2000. Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol.* **182**:891-7.
46. **Kuzuyama, T., S. Takahashi, M. Takagi, and H. Seto.** 2000. Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. *J Biol Chem.* **275**:19928-32.
47. **Laber, B., W. Maurer, S. Scharf, K. Stepusin, and F. S. Schmidt.** 1999. Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate by PdxA and PdxJ protein. *FEBS Lett.* **449**:45-8.
48. **Lange, B. M., and R. Croteau.** 1999. Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:13714-9.
49. **Lange, B. M., T. Rujan, W. Martin, and R. Croteau.** 2000. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:13172-13177.
50. **Lange, B. M., M. R. Wildung, D. McCaskill, and R. Croteau.** 1998. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:2100-4.
51. **Lichtenthaler, H. K.** 2000. Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem Soc Trans.* **28**:785-9.

52. **Lichtenthaler, H. K., J. Schwender, A. Disch, and M. Rohmer.** 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**:271-4.
53. **Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church.** 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol.* **179**:6228-37.
54. **Lois, L. M., N. Campos, S. R. Putra, K. Danielsen, M. Rohmer, and A. Boronat.** 1998. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:2105-10.
55. **Lüttgen, H., F. Rohdich, S. Herz, J. Wungsintaweekul, S. Hecht, C. A. Schuhr, M. Fellermeier, S. Sagner, M. H. Zenk, A. Bacher, and W. Eisenreich.** 2000. Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:1062-7.
56. **Morita, C. T., H. K. Lee, D. S. Leslie, Y. Tanaka, J. F. Bukowski, and E. Marker-Hermann.** 1999. Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by human $\gamma\delta$ T cells. *Microbes Infect.* **1**:175-86.
57. **Ostrovsky, D., G. Diomina, E. Lysak, E. Matveeva, O. Ogrel, and S. Trutko.** 1998. Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains. *Arch Microbiol.* **171**:69-72.
58. **Potapov, V. D., S. F. Biketov, G. R. Demina, E. I. Lysak, G. M. Titareva, I. V. Bakhteeva, and D. Ostrovsky.** 2001. Immunomodulatory properties of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and the search for its new derivatives. *Appl Biochem Microbiol.* **37**:238-242.
59. **Proteau, P. J., Y. H. Woo, R. T. Williamson, and C. Phaosiri.** 1999. Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate isomeroreductase. *Org Lett.* **1**:921-3.
60. **Putra, S. R., A. Disch, J. M. Bravo, and M. Rohmer.** 1998. Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gram-negative bacteria and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **164**:169-75.

61. **Querol, J., M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat, and S. Imperial.** 2001. Essential role of residue H49 for activity of *Escherichia coli* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the enzyme catalyzing the first step of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **289**:155-60.
62. **Radykewicz, T., F. Rohdich, J. Wungsintaweekul, S. Herz, K. Kis, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, and D. Arigoni.** 2000. Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS Lett.* **465**:157-60.
63. **Ralph, S. A., M. C. D'Ombrian, and G. I. McFadden.** 2001. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist Updates.* **4**:145-151.
64. **Rather, P. N., K. A. Solinsky, M. R. Paradise, and M. M. Parojcic.** 1997. *aarC*, an essential gene involved in density-dependent regulation of the 2'-N-acetyltransferase in *Providencia stuartii*. *J Bacteriol.* **179**:2267-73.
65. **Reuter, K., S. Sanderbrand, H. Jomaa, J. Wiesner, I. Steinbrecher, E. Beck, M. Hintz, G. Klebe, and M. T. Stubbs.** 2001. Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Biol Chem.* **277**:5378-84.
66. **Rodriguez-Concepcion, M., N. Campos, L. Maria Lois, C. Maldonado, J. F. Hoeffler, C. Grosdemange-Billiard, M. Rohmer, and A. Boronat.** 2000. Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **473**:328-32.
67. **Rohdich, F., J. Wungsintaweekul, M. Fellermeier, S. Sagner, S. Herz, K. Kis, W. Eisenreich, A. Bacher, and M. H. Zenk.** 1999. Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:11758-63.
68. **Rohmer, M.** 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep.* **16**:565-74.
69. **Rohmer, M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, and H. Sahn.** 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.* **295**:517-24.

70. **Rohmer, M., M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, and H. Sahn.** 1996. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J Am Chem Soc.* **118**:2564-2566.
71. **Sacchettini, J. C., and C. D. Poulter.** 1997. Creating isoprenoid diversity. *Science.* **277**:1788-9.
72. **Santos, H., P. Fareleira, C. Pedregal, J. LeGall, and A. V. Xavier.** 1991. *In vivo* ³¹P-NMR studies of *Desulfovibrio* species. Detection of a novel phosphorus-containing compound. *Eur J Biochem.* **201**:283-7.
73. **Schwender, J., C. Muller, J. Zeidler, and H. K. Lichtenthaler.** 1999. Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **455**:140-4.
74. **Seto, H., H. Watanabe, and K. Furihata.** 1996. Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioovifer*. *Tetrahedron Lett.* **37**:7979-7982.
75. **Shigi, Y.** 1989. Inhibition of bacterial isoprenoid synthesis by fosmidomycin, a phosphonic acid-containing antibiotic. *J Antimicrob Chemother.* **24**:131-45.
76. **Sicard, H., and J. J. Fournie.** 2000. Metabolic routes as targets for immunological discrimination of host and parasite. *Infect Immun.* **68**:4375-4377.
77. **Smit, A., and A. Mushegian.** 2000. Biosynthesis of Isoprenoids via Mevalonate in Archaea: The Lost Pathway. *Genome Res.* **10**:1468-1484.
78. **Sprenger, G. A., U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. de Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer, and H. Sahn.** 1997. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:12857-62.
79. **Takagi, M., T. Kuzuyama, K. Kaneda, H. Watanabe, T. Dairi, and H. Seto.** 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**:3395-8.
80. **Takagi, M., T. Kuzuyama, S. Takahashi, and H. Seto.** 2000. A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. Strain CL190. *J Bacteriol.* **182**:4153-7.
81. **Takahashi, S., T. Kuzuyama, H. Watanabe, and H. Seto.** 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 U S A.* **95**:9879-84.
82. **Vial, H. J.** 2000. Isoprenoid biosynthesis and drug targeting in the apicomplexa. *Parasitol Today.* **16**:140-141.
83. **Wang, K. C., and S. Ohnuma.** 2000. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta.* **1529**:33-48.
84. **Wiesner, J., M. Hintz, B. Altincicek, S. Sanderbrand, C. Weidemeyer, E. Beck, and H. Jomaa.** 2000. *Plasmodium falciparum*: detection of the deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase activity. *Exp Parasitol.* **96**:182-6.
85. **Wilding, E. I., J. R. Brown, A. P. Bryant, A. F. Chalker, D. J. Holmes, K. A. Ingraham, S. Iordanescu, C. Y. So, M. Rosenberg, and M. N. Gwynn.** 2000. Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J Bacteriol.* **182**:4319-27.
86. **Wilding, E. I., D. Y. Kim, A. P. Bryant, M. N. Gwynn, R. D. Lunsford, D. McDevitt, J. E. Myers, Jr., M. Rosenberg, D. Sylvester, C. V. Stauffacher, and V. W. Rodwell.** 2000. Essentiality, expression, and characterization of the class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **182**:5147-52.
87. **Wilmzig, M.** 1985. LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends Genet.* **1**:158.
88. **Wungsintaweekul, J.** 2001. Enzymes of the alternative terpenoid pathway in *Escherichia coli*. Dissertation an der Technischen Universität München.

Curriculum vitae

Boran Altincicek
Helgenwald 37
35463 Fernwald-Annerod

geboren am 15.03.73 in Butzbach

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Telefon: 0641/250255

Boran.Altincicek@jomaa.de

Ausbildung

- | | |
|-------------------------|---|
| 1985 bis 1992 | Besuch des Gymnasiums der Weidigschule Butzbach und Abschluß mit dem Abitur |
| WS 92 bis WS 97 | Biologie-Studium an der Justus-Liebig-Universität Giessen mit abschließender Diplomarbeit am Genetischen Institut |
| 26.11.97 | Erhalt des Diploms der Biologie mit Auszeichnung an der Justus-Liebig-Universität Giessen |
| März 1999 bis März 2002 | Dissertation im Labor von Prof. Dr. Ewald Beck am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen |

Berufliche Erfahrungen

- | | |
|---------------|---|
| Jan.- Apr. 95 | Tätigkeit als Hilfskraft in Labor- und Büroarbeiten in der Praxis für pränatale Diagnostik bei Dr. med. Spiegel in Butzbach |
|---------------|---|

Nov. - Dez. 95	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft ohne Abschluß bei der Betreuung von Studentenpraktika an der Justus-Liebig-Universität Giessen im Fachbereich Biologie
Okt. - Dez. 96	
Mär. - Apr. 97	
Okt. - Nov. 97	
Dez. 97 - Jan. 98	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft mit Abschluß im molekularbiologischen Labor des Genetischen Instituts
Seit September 1999	Wissenschaftlicher Angestellter bei der Jomaa Pharmaka GmbH

Sonstige Aktivitäten

Feb. 98 - Feb. 99	Ableistung des Zivildienstes als Kriegsdienstverweigerer am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen im Labor des Biochemischen Instituts
-------------------	---

Publikationen

1. **Dressel, U., D. Thormeyer, B. Altincicek, A. Paululat, M. Eggert, S. Schneider, S. P. Tenbaum, R. Renkawitz, and A. Baniahmad.** 1999. Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol.* **19**:3383-94.
2. **Jomaa, H., J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Turbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. K. Lichtenthaler, D. Soldati, and E. Beck.** 1999. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science.* **285**:1573-6.
3. **Altincicek, B., M. Hintz, S. Sanderbrand, J. Wiesner, E. Beck, and H. Jomaa.** 2000. Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **190**:329-33.
4. **Altincicek, B., S. P. Tenbaum, U. Dressel, D. Thormeyer, R. Renkawitz, and A. Baniahmad.** 2000. Interaction of the corepressor Alien with DAX-1 is abrogated

- by mutations of DAX-1 involved in adrenal hypoplasia congenita. *J Biol Chem.* **275**:7662-7.
5. **Wiesner, J., M. Hintz, B. Altincicek, S. Sanderbrand, C. Weidemeyer, E. Beck, and H. Jomaa.** 2000. *Plasmodium falciparum*: detection of the deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase activity. *Exp Parasitol.* **96**:182-6.
 6. **Altincicek, B., A. K. Kollas, M. Eberl, J. Wiesner, S. Sanderbrand, M. Hintz, E. Beck, and H. Jomaa.** 2001. *LytB*, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **499**:37-40.
 7. **Altincicek, B., A. K. Kollas, S. Sanderbrand, J. Wiesner, M. Hintz, E. Beck, and H. Jomaa.** 2001. GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **183**:2411-6.
 8. **Altincicek, B., J. Moll, N. Campos, G. Foerster, E. Beck, J. F. Hoeffler, C. Grosdemange-Billiard, M. Rodriguez-Concepcion, M. Rohmer, A. Boronat, M. Eberl, and H. Jomaa.** 2001. Cutting edge: human $\gamma\delta$ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol.* **166**:3655-8.
 9. **Hintz, M., A. Reichenberg, B. Altincicek, U. Bahr, R. M. Gschwind, A. K. Kollas, E. Beck, J. Wiesner, M. Eberl, and H. Jomaa.** 2001. Identification of (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **509**:317-22.
 10. **Reichenberg, A., J. Wiesner, C. Weidemeyer, E. Dreiseidler, S. Sanderbrand, B. Altincicek, E. Beck, M. Schlitzer, and H. Jomaa.** 2001. Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved *in vivo* antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett.* **11**:833-5.
 11. **Wiesner, J., S. Sanderbrand, B. Altincicek, E. Beck, and H. Jomaa.** 2001. Seeking new targets for antiparasitic agents. *Trends Parasitol.* **17**:7-8
 12. **Altincicek, B., A. K. Kollas, M. Eberl, S. Sanderbrand, U. Bahr, A. Reichenberg, E. Beck, F. Donald, J. Wiesner, M. Hintz, and H. Jomaa.** *in press.* Accumulation of a potent $\gamma\delta$ T cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*. *Immunol.*

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe.

Die Stellen, die aus anderen Untersuchungen dem Wortlaut oder Sinn nach übernommen wurden, sind durch entsprechende Quellenangaben gekennzeichnet.

Gießen, den 02.04.2002