

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. März 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/030654 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/10 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01) C12R 1/645 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/061471

(22) Internationales Anmeldedatum:

1. September 2008 (01.09.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2007 041 862.2

3. September 2007 (03.09.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVONIK DEGUSSA GMBH** [DE/DE]; Rellinghauser Strasse 1-11, 45128 Essen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SIEBER, Volker** [DE/DE]; Bergstr. 34, 85405 Nandlstadt (DE). **KAISER, Johannes** [DE/DE]; Im Rosendaal 27, 45721 Haltern am See (DE). **RÜHMANN, Broder** [DE/DE]; Herderstrasse 29, 45721 Haltern am See (DE). **POTGRAVE, Nicole** [DE/DE]; Fliederweg 21, 46286 Dorsten (DE). **WITTMANN, Eva-Maria** [DE/DE]; Tilsiter Weg 22, 83301 Traunreut (DE). **MARX, Achim** [DE/DE]; Im Börner 19, 63571 Gelnhausen (DE). **WINDHAB, Norbert** [DE/DE]; Ueberstr. 20, 65719 Hofheim (DE). **EWERING, Christian** [DE/DE]; An der Wilhelmshöhe 56, 37671 Höxter (DE). **KROLL, Jens** [DE/DE]; Bergstrasse 6 b, 59174 Kamen (DE). **SCHULZE GRONOVER, Christian** [DE/DE]; Gertrudenstr. 26, 48149 Münster (DE). **PRÜFER, Professor Dirk** [DE/DE]; Münzstr. 36, 48143 Münster (DE). **STEINBÜCHEL, Alexander** [DE/DE]; Rönntenthal 27, 48341 Altenberge (DE). **WURBS, David** [DE/DE]; Gemenweg 178, 48149 Münster (DE). **BACHER, Adelbert** [DE/DE]; Königsberger

Str. 74, 85748 Garching (DE). **EISENREICH, Wolfgang** [DE/DE]; Prälat-Michael-Höck Str. 27, 85354 Freising (DE). **GRÄWERT, Tobias Wilhelm** [DE/DE]; Siriusstr. 8, 85716 Unterschleißheim (DE). **ILLARINOVA, Victoria** [RU/DE]; Königsbergerstr. 74, 85748 Garching (DE). **GROLL, Michael** [DE/DE]; Türkenstr. 11, 80333 München (DE). **ROHDICH, Felix** [DE/DE]; Jenaer Str. 38, 64372 Ober-Ramstadt (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **EVONIK DEGUSSA GMBH**; Intellectual Property Management, Patente und Marken, Standort Marl, Bau 1042 / PB 15, 45764 Marl (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(54) Title: MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF ISOPRENOIDS

(54) Bezeichnung: MIKROBIOLOGISCHE HERSTELLUNG VON ISOPRENOIDEN

(57) Abstract: The present invention relates to a cell that has been genetically modified as opposed to the wild type thereof such that said cell is able to form isoprenoids enclosed in defined compartments. The invention further relates to a method for the production of a genetically modified cell, the genetically modified cell obtained using said method, a method for the production of isoprenoids, the isoprenoids obtained using said method, isolated nucleic acids, and isolated polypeptides.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zelle, welche gegenüber ihrem Wildtyp derart gentechnisch modifiziert wurde, dass sie in definierten Kompartimenten eingeschlossene Isoprenoide zu bilden vermag. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, die durch dieses Verfahren erhältliche, gentechnisch veränderte Zelle, ein Verfahren zur Herstellung von Isoprenoiden, die durch dieses Verfahren erhältlichen Isoprenoide, isolierte Nukleinsäuren sowie isolierte Polypeptide.

WO 2009/030654 A1

MIKROBIOLOGISCHE HERSTELLUNG VON ISOPRENOIDEN

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine gegenüber ihrem Wildtyp gentechnisch veränderte Zelle, ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, die durch dieses Verfahren erhältliche, gentechnisch veränderte Zelle, ein Verfahren zur Herstellung von Isoprenoiden, die durch dieses Verfahren erhältlichen Isoprenoide, isolierte Nukleinsäuren sowie isolierte Polypeptide.

Stand der Technik

Zu den Terpenoiden gehören Verbindungen, die auf Isopreneinheiten aufbauen. So gehören zu den Terpenoiden die Untergruppe der Terpene, deren Kohlenstoffatome sich immer durch 5 teilen lassen, aber auch von den Terpenen abgeleitete Verbindungen, bei denen Kohlenstoffatome später in der Biosynthese ausgeschleust werden, und deren Kohlenstoffatome sich folglich nicht durch 5 teilen lassen. Terpene bilden wichtige Merkmale zur Identifizierung von Pflanzen, da ein bestimmtes Inhaltsstoffmuster charakteristisch für eine bestimmte Pflanze ist. Es sind mehr als 40.000 Terpene bekannt, rund 8.000 davon gehören zu der Untergruppe der Terpene.

Terpene werden aus den beiden Vorstufen Isopentenyl-diphosphat (IPP = Isopentenyl-pyrophosphat) und Dimethylallyl-diphosphat (DMAPP = Dimethylallyl-pyrophosphat) gebildet, wobei die Bereitstellung dieser beiden Vorstufen über den Mevalonat-Stoffwechselweg oder über den Deoxyxylulose-Stoffwechselweg

erfolgen kann. Da die Terpenoide auf C₅-Kohlenstoffverbindungen als Untereinheiten basieren, weisen Terpenoide üblicherweise eine Anzahl von Kohlenstoffverbindungen auf, die durch fünf teilbar ist. Demzufolge werden Terpenoide in folgende Unterklassen unterteilt: Hemiterpene (C₅, wie etwa Isopren), Monoterpene (C₁₀, wie etwa Farnesyl), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀, wie etwa Taxol), Triterpene (C₃₀, wie etwa Squalen), Tetraterpene (C₄₀, wie etwa Lycopon) und Polyterpene mit mehr als 40 Kohlenstoffatomen, wie etwa Kautschuk.

Viele Terpenoide sind als Naturprodukte von hohem wirtschaftlichem Interesse, beispielsweise als Futtermitteladditive (Lycopon), in Haut- oder Haarpflegemitteln (Q10) oder als widerstandsfähige Polymere (natürlicher Gummi). So kommt beispielsweise cis-Polyisopren im Kautschuk vor, während trans-Polyisopren ein Hauptbestandteil von Guttapercha ist. Guttapercha bildet sich beim Eintrocknen des Milchsaftes der tropischen Baumart *Palaquium gutta*. Chicle, gewonnen aus dem Breiapfelbaum, stellt ein 1 : 2 Gemisch von trans- und cis-Polyisopren dar.

Die Bereitstellung der vorstehend als Naturprodukte vorkommenden Isoprenoide als Bestandteil von Futtermitteln, Haut- oder Haarpflegemitteln oder widerstandsfähigen Polymeren erfordert zum einen die Bildung der Terpenoide durch entsprechende Organismen sowie die anschließende Isolierung der durch den betroffenen Mikroorganismus gebildeten Terpenoide. In der Regel jedoch haben sowohl die Verfügbarkeit des die Terpenoide bildenden Organismus als auch das Verfahren zur Isolierung der Terpenoide einen entscheidenden Einfluss auf den Wert der Terpenoide. Da viele der vorstehend beschriebenen Terpenoide auch auf chemischem oder

biotechnologischem Weg bereitgestellt werden können, ist daher aus wirtschaftlicher Sicht stets abzuwägen, ob ein gegebenes Terpenoid vorteilhafterweise durch einen natürlichen Organismus oder aber auf chemischem oder biotechnologischem Weg hergestellt werden sollte.

Zahlreiche der vorstehend genannten Terpenoide, wie etwa auf cis-Polyisopren basierender Kautschuk, sind zu komplex, als dass sie auf chemischem Weg hergestellt werden können, oder aber ihre Herstellung auf chemischem Weg ist aus Kostengründen gegenüber der Herstellung durch natürliche Organismen nicht sinnvoll. Die Herstellung solcher komplexer Isoprenoide durch natürliche Organismen, insbesondere durch Pflanzen, ist jedoch mit dem großen Nachteil verbunden, dass die Verfügbarkeit dieser Pflanzen häufig von Faktoren abhängig ist, die durch den Hersteller nicht beeinflusst werden können, wie etwa Trockenheit sowie Parasitenbefall oder Infektionen der Pflanzen.

Beschreibung der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, die sich aus dem Stand der Technik ergebenden Nachteile im Zusammenhang mit der Herstellung von Terpenoiden, insbesondere jedoch im Zusammenhang mit komplexen Terpenoiden, wie etwa Polyisoprenen, zu überwinden.

Insbesondere lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bereitstellung von Terpenoiden anzugeben, mit dem es möglich ist, auch komplexe Terpenoide wie etwa Polyisoprene herzustellen, wobei die Wirtschaftlichkeit der

Herstellung von Terpenoide möglichst nicht von Faktoren wie etwa Klimabedingungen, Parasitenbefall oder Infektionen abhängt.

Ein weitere, der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand darin, ein Verfahren zur Bereitstellung von Terpenoiden anzugeben, mit dem es möglich ist, Terpenoide mit möglichst gleichbleibender chemischer Qualität, insbesondere mit möglichst gleichbleibender, chemischer Zusammensetzung herzustellen.

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet eine Zelle, welche gegenüber ihrem Wildtyp derart gentechnisch modifiziert wurde, dass sie in definierten Kompartimenten eingeschlossene Isoprenoide zu bilden vermag.

Völlig überraschend, dafür aber nicht minder vorteilhaft, konnte festgestellt werden, dass sich Zellen, insbesondere Bakterien- oder Hefezellen, mittels rekombinanter Verfahren derart modifizieren lassen, dass sie in definierten Kompartimenten eingeschlossene Isoprenoide zu bilden vermögen. Die rekombinante Modifizierung der Zelle führt dazu, dass Zellen, die vor der rekombinanten Modifizierung entweder keine oder kaum nachweisbare Mengen an Isoprenoiden zu bilden vermochten oder die vor der rekombinanten Modifizierung zwar Isoprenoide zu bilden vermochten, jedoch nicht in der Lage waren, diese Isoprenoide in definierten Kompartimenten in der Zelle einzuschließen, nach Durchführung der rekombinanten Modifizierung nunmehr in der Lage sind, Isoprenoide zu bilden und diese in definierten Kompartimenten der Zelle einzuschließen.

Unter dem Begriff „*Isoprenoid*“, wie er hierin verwendet wird, wird eine strukturell heterogene Gruppe von Naturstoffen verstanden, die sich biosynthetisch von den beiden C₅-Verbindungen IPP und DMAPP ableiten. Solche Isoprenoide lassen sich durch die Vervielfachung von Isopren (= 2-Methylbutadien)-Einheiten aufbauen und umfassen insbesondere die Terpenoide und die Steroide. Von dem Begriff „*Isoprenoid*“ sind jedoch auch natürliche Abbau- und Umlagerungsprodukte der eigentlichen Isoprenoide umfasst, in denen unter Umständen nicht mehr alle ursprünglichen Isopren-Einheiten direkt erkennbar sein müssen und deren Anzahl an Kohlenstoffatomen auch nicht mehr durch 5 teilbar sein muss („irregulärer Aufbau“). Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Isoprenoide sind die Terpenoide, wobei unter den Terpenoiden wiederum die Polyisopren, insbesondere Poly-cis-Isopren, Poly-trans-Isopren oder Mischungen aus Poly-cis-Isopren und Poly-trans-Isopren am meisten bevorzugte Isoprenoide sind. In diesem Zusammenhang ist es insbesondere bevorzugt, dass die vorstehend genannten Polyisoprene mehr als 55 Kohlenstoffatome, noch mehr bevorzugt mehr als 100 Kohlenstoffatome, darüber hinaus bevorzugt mehr als 1.000 Kohlenstoffatome, darüber hinaus bevorzugt mehr als 10.000 Kohlenstoffatome und am meisten bevorzugt mehr als 100.000 Kohlenstoffatome je Molekül aufweisen, wobei vorzugsweise eine Anzahl an Kohlenstoffatomen von 1.000.000, besonders bevorzugt von 500.000 Kohlenstoffatomen je Molekül nicht überschritten wird.

Unter einem „*Wildtyp*“ einer Zelle wird vorzugsweise eine Zelle bezeichnet, deren Genom in einem Zustand vorliegt, wie er natürlicherweise durch die Evolution entstanden ist. Der Begriff wird sowohl für die gesamte Zelle als auch für einzelne Gene

verwendet. Unter den Begriff „Wildtyp“ fallen daher insbesondere nicht solche Zellen bzw. solche Gene, deren Gensequenzen zumindest teilweise durch den Menschen mittels rekombinanter Verfahren verändert worden sind.

Unter dem Begriff „definierte Kompartimente einer Zelle“, wie er hierin verwendet wird, werden vorzugsweise bestimmte Organellen im Zytoplasma einer Zelle verstanden, wobei diese Organellen gegebenenfalls von einer Biomembran umgeben sein können. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle handelt es sich bei den definierten Kompartimenten um sogenannte Einschlusskörper („inclusion bodies“), die üblicherweise eine Größe in einem Bereich von 1×10^4 bis $1 \times 10^{12} \text{ \AA}^3$ (Kubik-Angström), besonders bevorzugt in einem Bereich von 1×10^5 bis $1 \times 10^{10} \text{ \AA}^3$ und am meisten bevorzugt in einem Bereich von 1×10^6 bis $1 \times 10^8 \text{ \AA}^3$ aufweisen und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als weniger elektronendichte, milchig weis erscheinende, unregelmäßig rundliche geformte Organellen im Zytoplasma erscheinen. Häufig weisen solche Einschlusskörper eine zylindrische Struktur auf.

Die erfindungsgemäßen Zellen können Prokaryonten oder Eukaryonten sein. Dabei kann es sich um Säugetierzellen (wie etwa Zellen aus dem Menschen), um pflanzliche Zellen oder um Mikroorganismen wie Hefen, Pilze oder Bakterien handeln, wobei Mikroorganismen besonders bevorzugt und Bakterien und Hefen am meisten bevorzugt sind.

Als Bakterien, Hefen oder Pilze sind insbesondere diejenigen Bakterien, Hefen oder Pilze geeignet, die bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ),

Braunschweig, Deutschland, als Bakterien-, Hefe- oder Pilz-Stämme hinterlegt sind. Erfindungsgemäß geeignete Bakterien gehören zu den Gattungen, die unter

<http://www.dsmz.de/species/bacteria.htm>

aufgeführt sind, erfindungsgemäß geeignete Hefen gehören zu denjenigen Gattungen, die unter

<http://www.dsmz.de/species/yeasts.htm>

aufgeführt sind und erfindungsgemäß geeignete Pilze sind diejenigen, die unter

<http://www.dsmz.de/species/fungi.htm>

aufgeführt sind.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Zellen sind diejenigen der Gattungen *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Escherichia*, *Zymomonas*, *Yarrowia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* und *Clostridium*, wobei *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Candida blankii*, *Candida rugosa*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Zymomonas mobilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Methylobacterium extorquens*, *Ralstonia eutropha*, insbesondere *Ralstonia eutropha* H16, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Pichia pastoris* besonders bevorzugt sind.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle ist diese in der Lage, im Vergleich zu ihrem Wildtyp mehr in den definierten Kompartimenten eingeschlossene Isoprenoide zu bilden. Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die gentechnisch veränderte Zelle derart gentechnisch verändert ist, dass sie in einem definierten Zeitintervall, vorzugsweise innerhalb von 2 Stunden, noch mehr bevorzugt innerhalb von 8 Stunden und am meisten bevorzugt innerhalb von 24 Stunden, mindestens 2mal, besonders bevorzugt mindestens 10mal, darüber hinaus bevorzugt mindestens 100mal, darüber hinaus noch mehr bevorzugt mindestens 1.000mal und am meisten bevorzugt mindestens 10.000mal mehr Isoprenoide bildet und in den definierten Kompartimenten der Zelle einschließt als der Wildtyp der Zelle. Die Zunahme der Bildung und des Einschlusses der Isoprenoide kann dabei beispielsweise dadurch bestimmt werden, dass die erfindungsgemäße Zelle und die Wildtyp-Zelle jeweils getrennt unter gleichen Bedingungen (gleiche Zelldichte, gleiches Nährmedium, gleiche Kulturbedingungen) für ein bestimmtes Zeitintervall in einem geeigneten Nährmedium kultiviert werden und anschließend die Menge an in den Einschlusskörpern enthaltenen Isoprenoiden bestimmt wird.

Die Formulierung „*dass die gentechnisch veränderte Zelle derart gentechnisch verändert ist, dass sie mehr Isoprenoide bildet und in den definierten Kompartimenten der Zelle einschließt als der Wildtyp der Zelle*“ betrifft auch den Fall, dass der Wildtyp der gentechnisch veränderten Zelle entweder überhaupt keine Isoprenoide oder keine nachweisbaren Mengen an Isoprenoiden bildet oder aber zwar Isoprenoide bildet, diese jedoch nicht in

definierten Kompartimenten, insbesondere in den vorstehend beschriebenen Einschlusskörpern einzuschließen vermag, und erst nach der gentechnischen Veränderung nachweisbare Mengen dieser Komponenten gebildet und in den definierten Kompartimenten der Zelle eingeschlossen werden können.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle ist in dieser die Expression, und mithin auch die Aktivität, mindestens eines Enzyms, welches in die Herstellung von Isoprenoiden, vorzugsweise in die Herstellung von Polyisoprenen mit der vorstehend genannten Anzahl von Kohlenstoffatomen, involviert ist, im Vergleich zum Wildtyp erhöht, wobei es sich bei diesem Enzym vorzugsweise um ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Gummi-Bindeprotein („*rubber binding protein*“), wie etwa das vom *srpp3-tk*-Gen kodierte „*small rubber binding protein*“, einem Gummi-Verlängerungsfaktor („*rubber elongation factor*“), wie etwa der vom *ref2-hb*-Gen kodierte „*rubber elongation factor*“, und einer Prenyl-Transferase handelt, wobei die Erhöhung der Aktivität einer Prenyl-Transferase besonders bevorzugt ist. Weiterhin bevorzugt ist die kombinierte Erhöhung der Aktivität einer Prenyl-Transferase und eines Gummi-Bindeproteins, einer Prenyl-Transferase und eines Gummi-Verlängerungsfaktors sowie einer Prenyl-Transferase, eines Gummi-Bindeproteins und eines Gummiverlängerungsfaktors.

Ein geeignetes Gen für ein Gummi-Bindeprotein, dessen Expression erfindungsgemäß vorzugsweise in einem Mikroorganismus gesteigert werden kann, ist beispielsweise das *srpp*-Gen aus *Hevea brasiliensis*, welches unter anderem durch Soo Kyung Oh et al. in „Isolation, Characterization, and Functional Analysis of a Novel

cDNA Clone Encoding a Small Rubber Particle Protein from *Hevea brasiliensis*", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274 (24), Seiten 17.132-17.138 (1999) beschrieben worden ist. Ein weiteres geeignetes Gen für ein Gummi-Bindeprotein ist das ghs-Gen, welches von In Jeong Kim et al. in „*A novel cDNA from Parthenium argentatum Gray enhances the rubber biosynthetic activity in vitro*“, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55 (396), Seiten 377-385 (2004), beschrieben worden ist.

Ein geeignetes Gen für ein Gummi-Verlängerungsfaktor, dessen Expression erfindungsgemäß vorzugsweise in einem Mikroorganismus gesteigert werden kann, ist beispielsweise das ref-Gen aus *Hevea brasiliensis*, welches unter anderem durch Elisabeth Goyvaerts et al. in „*Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding the Rubber Elongation Factor of Hevea brasiliensis*“, *Plant Physiology*, Vol. 97, Seiten 317-321 (1991) beschrieben worden ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere rekombinante Mikroorganismen, insbesondere rekombinante Bakterien- oder Hefezellen, in denen die Aktivität einer Prenyl-Transferase erhöht ist. In diesem Zusammenhang ist es bevorzugt, dass die erfindungsgemäße Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp gesteigerte Aktivität eines Enzyms E₁ aufweist, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert.

Der Begriff „gesteigerte Aktivität eines Enzyms“, wie er vorstehend im Zusammenhang mit dem Enzym E₁ und in den nachfolgenden Ausführungen im Zusammenhang mit den Enzymen E₂ usw. verwendet wird, ist vorzugsweise als gesteigerte intrazelluläre Aktivität zu verstehen.

Die nun folgenden Ausführungen zur Erhöhung der Enzymaktivität in Zellen gelten sowohl für die Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁ als auch für alle nachfolgend genannten Enzyme, deren Aktivität gegebenenfalls erhöht werden kann.

Grundsätzlich lässt sich eine Steigerung der enzymatischen Aktivität dadurch erzielen, dass man die Kopienzahl der Gensequenz bzw. der Gensequenzen erhöht, welche für das Enzym kodieren, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel nutzt, das für ein entsprechendes Enzym mit einer gesteigerten Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert. Erfindungsgemäß gentechnisch veränderte Zellen werden beispielsweise durch Transformation, Transduktion, Konjugation oder einer Kombination dieser Methoden mit einem Vektor erzeugt, der das gewünschte Gen, ein Allel dieses Gens oder Teile davon und einen die Expression des Gens ermöglichenden Vektor enthält. Die heterologe Expression wird insbesondere durch die erfindungsgemäß besonders bevorzugte Integration des Gens oder der Allele in das Chromosom der Zelle oder einem extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt.

Einen Überblick über die Möglichkeiten zur Erhöhung der Enzym-Aktivität in Zellen am Beispiel der Pyruvat-Carboxylase gibt DE-A-100 31 999, die hiermit als Referenz eingeführt wird und deren Offenbarungsgehalt hinsichtlich der Möglichkeiten zur Erhöhung der Enzym-Aktivität in Zellen einen Teil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung bildet.

Die Expression der vorstehend und aller nachfolgend genannten Enzyme bzw. Gene ist mit Hilfe von 1- und 2-dimensionaler

Proteingelaufentrennung und anschließender optischer Identifizierung der Proteinkonzentration mit entsprechender Auswertesoftware im Gel nachweisbar. Wenn die Erhöhung einer Enzymaktivität ausschließlich auf einer Erhöhung der Expression des entsprechenden Gens basiert, so kann die Quantifizierung der Erhöhung der Enzymaktivität in einfacher Weise durch einen Vergleich der 1- oder 2-dimensionalen Proteinauftrennungen zwischen Wildtyp und gentechnisch veränderter Zelle bestimmt werden. Eine gebräuchliche Methode zur Präparation der Proteingele bei coryneformen Bakterien und zur Identifizierung der Proteine ist die von Hermann et al. (*Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001) beschriebene Vorgehensweise. Die Proteinkonzentration kann ebenfalls durch Western-Blot-Hybridisierung mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989) und anschließender optische Auswertung mit entsprechender Software zur Konzentrationsbestimmung (Lohaus und Meyer (1989) *Biospektrum*, 5: 32-39; Lottspeich (1999), *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647) analysiert werden. Die Aktivität von DNA-bindenden Proteinen kann mittels DNA-Band-Shift-Assays (auch als Gelretardation bezeichnet) gemessen werden (Wilson et al. (2001) *Journal of Bacteriology*, 183: 2151-2155). Die Wirkung von DNA-bindenden Proteinen auf die Expression anderer Gene kann durch verschiedene gut beschriebene Methoden des Reporteragen-Assays nachgewiesen werden (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989). Die intrazellulären enzymatischen Aktivitäten können nach verschiedenen beschriebenen Methoden (Donahue et al. (2000) *Journal of*

Bacteriology 182 (19): 5624-5627; Ray et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (8): 2277-2284; Freedberg et al. (1973) *Journal of Bacteriology* 115 (3): 816-823) bestimmt werden. Sofern in den nachfolgenden Ausführungen keine konkreten Methoden zur Bestimmung der Aktivität eines bestimmten Enzyms angegeben werden, erfolgt die Bestimmung der Steigerung der Enzymaktivität und auch die Bestimmung der Verminderung einer Enzymaktivität vorzugsweise mittels der in Hermann et al., *Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001), Lohaus et al., *Biospektrum* 5 32-39 (1998), Lottspeich, *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647 (1999) und Wilson et al., *Journal of Bacteriology* 183: 2151-2155 (2001) beschriebenen Methoden.

Wird die Erhöhung der Enzymaktivität durch Mutation des endogenen Gens bewerkstelligt, so können derartige Mutationen entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie etwa durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösende Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e). Durch diese Mutationen werden gentechnisch veränderte Zellen erhalten. Besonders bevorzugte Mutanten von Enzymen sind insbesondere auch solche Enzyme, die nicht mehr oder zumindest im Vergleich zum Wildtyp-Enzym vermindert *feedback*-inhibierbar sind.

Wird die Erhöhung der Enzymaktivität durch Erhöhung der Expression eines Enzyms bewerkstelligt, so erhöht man beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die

stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression zu jedem beliebigen Zeitpunkt zu steigern. Des Weiteren können dem Enzym-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sogenannte "*Enhancer*" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Genexpression bewirken. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert, wobei eine Integration im Genom besonders bevorzugt ist. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (*Bio/Technology* 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (*Gene* 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (*Bio/Technology* 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (*Gene* 102, 93-98 (1991)), in EP-A-0 472 869, im US 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (*Bio/Technology* 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (*Journal of Bacteriology* 175, 1001-1007 (1993)), in WO-A-96/15246, bei Malumbres et al. (*Gene* 134, 15-24 (1993)), in JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58, 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Die vorstehend beschriebenen Maßnahmen führen ebenso wie die Mutationen zu gentechnisch veränderten Zellen.

Zur Erhöhung der Expression der jeweiligen Gene werden zum Beispiel episomale Plasmide eingesetzt. Als Plasmide eignen sich insbesondere solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie zum Beispiel pZ1 (Menkel et al., *Applied and Environmental Microbiology* 64: 549-554 (1989)), pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 107: 69-74 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., *Gene* 107: 69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie zum Beispiel solche, die auf pCG4 (US 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., *FEMS Microbiology Letters* 66: 119-124 (1990)) oder pAG1 (US 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise eingesetzt werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren, mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60: 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *Escherichia coli*), nicht aber in *Corynebacterium glutamicum* repliziert werden kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., *Bio/Technology* 1: 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., *Gene* 145: 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman, *Journal of Biological Chemistry* 269: 32678-84 (1994)), pCR[®]Blunt (Invitrogen, Groningen, Niederlande), pEM1 (Schrumpf et al., *Journal of Bacteriology* 173: 4510-4516)) oder pBGS8 (Spratt et al., *Gene* 41: 337-342 (1986)) in Frage. Der Plasmidvektor, der

das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *Corynebacterium glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al., *Applied and Environmental Microbiology* 60: 756-759 (1994) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 356-362 (1988), Dunican und Shivnan, *Bio/Technology* 7: 1067-1070 (1989) und Tauch et al., *FEMS Microbiology Letters* 123: 343-347 (1994) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines „cross-over“-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Bei dem Enzym E₁ handelt es sich vorzugsweise um eine Prenyl-Transferase (z.B. EC 2.5.1.29, 2.5.1.10 oder 2.5.1.1), besonders bevorzugt jedoch um eine cis-1,4-Prenyl-Transferase. Beispiele für Gene für eine Prenyl-Transferase sind beispielsweise *ggps1*, *qm*, *bts1*, *bet4*, *ram2*, *ctrE*, *ispA*, *idsA1*, *ptlB*, *fppS*, *sds*, *gds-1*, *gds*, *fdps*, *yqiD*, *fppS*, *ispAB*, *fps*, *ptlB*, *idsA*, *idsB* oder Mutanten dieser Gene, wobei *ctrE*, *ispA*, *fps* und *idsA* besonders bevorzugt sind. Die Nukleotidsequenz dieser Gene sowie weiterer geeigneter Gene für eine Prenyl-Transferase können beispielsweise der „*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*“ (KEGG-Datenbank), den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA) oder der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) entnommen werden.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle weist diese eine erhöhte Aktivität des Enzyms E₁ auf, wobei

dieses Enzym kodiert wird von einer DNA ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07,
- b) einer intronfreien Sequenz, die von einer Sequenz nach a) abgeleitet ist und das gleiche Protein oder Peptid kodiert wie die Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, wobei diese intronfreie Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- c) einer Sequenz, die ein Protein oder Peptid kodiert, das die Aminosäure-Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14 umfasst,
- d) einer Sequenz, die mit einer Sequenz nach a) bis c) zu mindestens 80%, vorzugsweise zu mindestens 85%, besonders bevorzugt zu mindestens 90%, darüber hinaus bevorzugt zu mindestens 95% und am meisten bevorzugt zu mindestens 99% identisch ist, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- e) einer Sequenz, die mit dem Gegenstrang einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-

- diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- f) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenen Derivat einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis e), wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
 - g) einer Sequenz, die der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07 innerhalb der Degeneration des genetischen Codes entspricht, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert, sowie
 - h) einer Sequenz mit neutralen Sinnmutationen der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert.

Die Sequenzen gemäß SEQ.-ID-Nr. 01 bis SEQ.-ID-Nr. 07 stammen aus dem Genom des russischen Löwenzahn und kodieren für Proteine, welche für die Terpenoid-Bildung verantwortlich sind und unter anderem eine Prenyl-Transferase-Aktivität aufweisen.

Die „Nukleotid-Identität“ und auch die später genannte „Aminosäure-Identität“ im Sinne der vorliegenden Erfindung werden mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt. Generell werden besondere Computerprogramme mit Algorithmen unter

Berücksichtigung spezieller Erfordernisse verwendet. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den zu vergleichenden Sequenzen. Computer-Programme zur Bestimmung der Identität umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, das GCG- Programmpaket, einschließlich

- GAP (Deveroy, J. et al., *Nucleic Acid Research* 12 (1984), Seite 387, Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (Wi), und
- BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. et al., *Journal of Molecular Biology* 215 (1990), Seiten 403-410. Das BLAST-Programm kann erhalten werden vom National Center For Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen (BLAST Handbuch, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al., vorstehend).

Der Fachmann ist sich bewusst, dass verschiedene Computerprogramme für die Kalkulation der Ähnlichkeit bzw. Identität zwischen zwei Nukleotid- oder Aminosäure-Sequenzen zur Verfügung stehen. So kann die prozentuale Identität zwischen zwei Aminosäure-Sequenzen z.B. durch den Needleman und Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) Algorithmus bestimmt werden, der in das GAP Programm im GCG Software-Paket (erhältlich über <http://www.gcg.com>), und zwar entweder unter Verwendung einer Blossom 62-Matrix oder einer PAM250-Matrix, einer *gap weight* von 16, 14, 12, 10, 8, 6, oder 4 und einer *length weight* von 1, 2, 3, 4, 5, oder 6. Der Fachmann wird anerkennen, dass die Verwendung unterschiedlicher Parameter zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen führen wird, dass aber die

prozentuale Identität zwischen zwei Aminosäure-Sequenzen insgesamt nicht signifikant unterschiedlich sein wird. Üblicherweise wird die Blossom 62-Matrix unter Anwendung der Voreinstellungen (*gap weight: 12, length weight: 1*) genutzt.

Eine Identität von 80 % gemäß dem vorstehenden Algorithmus bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung 80 % Identität. Das gleiche gilt für höhere Identitäten.

Das Merkmal „Sequenz, die mit dem Gegenstrang einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d), besonders bevorzugt nach Gruppe a), hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde“ gemäß Alternative e) weist auf eine Sequenz hin, die unter vorzugsweise stringenten Bedingungen mit dem Gegenstrang einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d), besonders bevorzugt nach Gruppe a), hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde. Beispielsweise können die Hybridisierungen bei 68°C in 2 × SSC oder nach dem Protokoll des Dioxygenin-Labeling-Kits der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt werden. Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind z.B. Inkubation bei 65°C über Nacht in 7 % SDS, 1 % BSA, 1 mM EDTA, 250 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) und nachfolgendes Waschen bei 65°C mit 2 × SSC; 0,1 % SDS.

Zu den Derivaten der erfindungsgemäßen isolierten DNA, welche gemäß Alternative f) durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrere Basen einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis e) erhalten werden können, gehören insbesondere solche Sequenzen, welche in dem Protein, welches sie kodieren, zu konservativen Aminosäureaustauschen, wie z.B.

dem Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure führen. Solche funktionsneutralen Mutationen werden als Sinnmutationen (*sense mutations*) bezeichnet und führen zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Polypeptids. Weiterhin ist bekannt, dass Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Polypeptids dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder dieses sogar stabilisieren können, so dass dementsprechend auch DNA-Sequenzen, bei denen am 3'-Ende oder am 5'-Ende der Sequenz mit der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07 Basen angefügt sind, von der vorliegenden Erfindung umfasst sind. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle umfasst diese Zelle eine DNA-Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07,
- b) einer intronfreien Sequenz, die von einer Sequenz nach a) abgeleitet ist und das gleiche Protein oder Peptid kodiert wie die Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, wobei diese intronfreie Sequenz vorzugsweise

- für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- c) einer Sequenz, die ein Protein oder Peptid kodiert, das die Aminosäure-Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14 umfasst,
 - d) einer Sequenz, die mit einer Sequenz nach a) bis c) zu mindestens 80%, vorzugsweise zu mindestens 85%, besonders bevorzugt zu mindestens 90%, darüber hinaus bevorzugt zu mindestens 95% und am meisten bevorzugt zu mindestens 99% identisch ist, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
 - e) einer Sequenz, die mit dem Gegenstrang einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
 - f) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenen Derivat einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis e), wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
 - g) einer Sequenz, die der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07 innerhalb der Degeneration des

genetischen Codes entspricht, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert, sowie

- h) einer Sequenz mit neutralen Sinnmutationen der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Enzym kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,

wobei diese Sequenz entweder in das Genom der Zelle integriert ist oder aber auf einem Expressionsvektor lokalisiert ist.

Neben der Steigerung der Aktivität E_1 in einer erfindungsgemäßen Zelle bzw. neben der Expression eines oder mehrere der Proteine, die durch die Gen-Sequenzen gemäß SEQ.-ID-Nr. 01 bis SEQ.-ID-Nr. 07 kodiert werden, insbesondere in einem Mikroorganismus wie etwa einer Bakterien- oder einer Hefezelle kann es erfindungsgemäß auch bevorzugt sein, die Aktivität eines oder mehrerer Enzyme zu erhöhen, welche für die Bildung der für die Isoprenoid-Bildung notwendigen C_5 -Vorläuferverbindungen verantwortlich sind.

In diesem Zusammenhang ist es gemäß einer ersten Variante der erfindungsgemäßen Zelle bevorzugt, dass diese neben der Erhöhung der Aktivität eines Enzyms, welches in die Herstellung von Isoprenoiden, vorzugsweise in die Herstellung von Polyisoprenen mit der vorstehend genannten Anzahl von Kohlenstoffatomen, involviert ist, besonders bevorzugt neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_1 , neben der Erhöhung der Aktivität des

Enzyms E_1 und eines Gummi-Verlängerungsproteins, neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_1 und eines Gummi-Bindeproteins oder neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_1 , eines Gummi-Verlängerungsfaktors und eines Gummi-Bindeproteins auch eine erhöhte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_2 bis E_6 aufweist:

- eines Enzyms E_2 , welches die Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A katalysiert;
- eines Enzyms E_3 , welches die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonat katalysiert;
- eines Enzyms E_4 , welches die Umsetzung von Mevalonat zu Mevalonat-5-phosphat katalysiert;
- eines Enzyms E_5 , welches die Umsetzung von Mevalonat-5-phosphat zu Mevalonat-5-diphosphat katalysiert;
- eines Enzyms E_6 , welches die Umsetzung von Mevalonat-5-diphosphat zu Isopentenyl-diphosphat katalysiert.

In diesem Zusammenhang erfindungsgemäß besonders bevorzugte Zellen sind diejenigen Zellen, in denen neben der Erhöhung der Aktivität eines Enzyms, welches in die Herstellung von Isoprenoiden, vorzugsweise in die Herstellung von Polyisoprenen mit der vorstehend genannten Anzahl von Kohlenstoffatomen, involviert ist, besonders bevorzugt neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_1 , neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_1 und eines Gummi-Verlängerungsproteins, neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_1 und eines Gummi-Bindeproteins oder neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_1 , eines Gummi-Verlängerungsfaktors und eines Gummi-Bindeproteins die Aktivität folgender Enzyme oder

Enzymkombinationen erhöht ist: E₂, E₃, E₄, E₅, E₆, E₁E₂, E₁E₃, E₁E₄, E₁E₅, E₂E₃, E₂E₄, E₂E₅, E₂E₆, E₃E₄, E₃E₅, E₃E₆, E₄E₅, E₄E₆, E₅E₆, E₁E₂E₃, E₁E₂E₄, E₁E₂E₅, E₁E₂E₆, E₁E₃E₄, E₁E₃E₅, E₁E₃E₆, E₁E₄E₅, E₁E₄E₆, E₁E₅E₆, E₂E₃E₄, E₂E₃E₅, E₂E₃E₆, E₂E₄E₅, E₂E₄E₆, E₂E₅E₆, E₃E₄E₅, E₃E₄E₆, E₃E₅E₆, E₄E₅E₆, E₁E₂E₃E₄, E₁E₂E₃E₅, E₁E₂E₃E₆, E₁E₂E₄E₅, E₁E₂E₄E₆, E₁E₂E₅E₆, E₁E₃E₄E₅, E₁E₃E₄E₆, E₁E₃E₅E₆, E₁E₄E₅E₆, E₂E₃E₄E₅, E₂E₃E₄E₆, E₂E₃E₅E₆, E₂E₄E₅E₆, E₃E₄E₅E₆, E₁E₂E₃E₄E₅, E₁E₂E₃E₄E₆, E₁E₂E₃E₅E₆, E₁E₂E₄E₅E₆, E₁E₃E₄E₅E₆, E₂E₃E₄E₅E₆ und E₁E₂E₃E₄E₅E₆, wobei E₁E₂E₃E₄E₅E₆ am meisten bevorzugt ist.

In diesem Zusammenhang ist es weiterhin bevorzugt, dass das Enzym

E₂ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase (EC 2.3.3.1.10),

E₃ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (EC 1.1.1.34),

E₄ eine Mevalonat-Kinase (EC 2.7.1.36),

E₅ eine Phosphomevalonat-Kinase (EC 2.7.4.1), und

E₆ eine Diphosphomevalonat-Decarboxylase (EC 4.1.1.33),

ist.

Das Enzym E₂ wird vorzugsweise von einem Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *hmgcs1*, *hmgcs2*, *hmgs*, *hcs*, *hgsA*, *pksG*, *mvaS*, *hmcM*, *mvaS.1*, *mvaS2*, *hmcS*, *mvaB*, *mvaB1* und *mvaB2* kodiert. Das Enzym E₃ wird vorzugsweise von einem Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *hmgcr*, *hmg1*, *hmg2*, *hmgA*, *hmgB*, *mvaA*, *mvaS.1*, *mvaA1* und *mvaA2* kodiert. Das Enzym E₄ wird vorzugsweise von Genen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *mvk*, *lmbP*, *mvaK1* und *yeaG* kodiert. Geeignete Gene für das Enzym E₅ sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *pmvk* und *mvaK2*. Das

Enzym E₆ wird vorzugsweise von einem Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *mvd*, *mvd1*, *mvaD* und *dmd* kodiert. Die Nukleotidsequenzen der vorstehend genannten Gene sowie weiterer Gene für die Enzyme E₂ bis E₆ können unter anderem auch der KEGG-Datenbank, der NCBI-Datenbank oder EMBL-Datenbank entnommen werden.

Im Zusammenhang mit der vorstehend beschriebenen, ersten Variante der erfindungsgemäßen Zelle, bei der die Bereitstellung des Isopentenyl-diphosphats über den Mevalonat-Stoffwechselweg erfolgt, kann es weiterhin bevorzugt sein, diejenigen Enzymaktivitäten in der Zelle zu steigern, die eine Steigerung der Acetoacetyl-Coenzym A-Bereitstellung bewirken. In diesem Zusammenhang kann es insbesondere vorteilhaft sein, die Aktivität der Acetyl-Coenzym A-C-Acetyltransferase (EC 2.3.1.9) zu erhöhen.

Beispiele für eine Zelle, in der die Aktivität eines oder mehrerer der Enzyme E₂ bis E₆ erhöht ist, können beispielsweise der US 2007/0166782 A1 entnommen werden. Die in dieser Patentanmeldung beschriebenen, rekombinanten Zellen können als Zellen eingesetzt werden, in denen zusätzlich die Aktivität eines Enzyms, welches in die Herstellung von Isoprenoiden, vorzugsweise in die Herstellung von Polyisoprenen mit der vorstehend genannten Anzahl von Kohlenstoffatomen, involviert ist, insbesondere der Aktivität des Enzyms E₁, die Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Verlängerungsproteins, die Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Bindeproteins oder die Aktivität des Enzyms E₁, eines Gummi-Verlängerungsfaktors und eines Gummi-Bindeproteins erhöht wird.

Gemäß einer anderen Variante der erfindungsgemäßen Zelle ist es bevorzugt, dass diese neben der Erhöhung der Aktivität eines Enzyms, welches in die Herstellung von Isoprenoiden, vorzugsweise in die Herstellung von Polyisoprenen mit der vorstehend genannten Anzahl von Kohlenstoffatomen, involviert ist, besonders bevorzugt neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁, neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Verlängerungsproteins, neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Bindeproteins oder neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁, eines Gummi-Verlängerungsfaktors und eines Gummi-Bindeproteins auch eine erhöhte Aktivität mindestens eines der Enzyme E₇ bis E₁₃ aufweist:

- eines Enzyms E₇, welches die Umsetzung von D-Glyceraldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₈, welches die Umsetzung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₉, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol katalysiert;
- eines Enzyms E₁₀, welches die Umsetzung von 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol zu 2-Phospho-4-(cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol katalysiert;
- eines Enzyms E₁₁, welches die Umsetzung von 2-Phospho-4-(cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol zu 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat katalysiert;

- eines Enzyms E₁₂, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₁₃, welches die Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat zu Isopentenyl-diphosphat katalysiert.

In diesem Zusammenhang erfindungsgemäß besonders bevorzugte Zellen sind diejenigen Zellen, in denen neben der Erhöhung der Aktivität eines Enzyms, welches in die Herstellung von Isoprenoiden, vorzugsweise in die Herstellung von Polyisoprenen mit der vorstehend genannten Anzahl von Kohlenstoffatomen, involviert ist, besonders bevorzugt neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁, neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Verlängerungsproteins, neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Bindeproteins oder neben der Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁, eines Gummi-Verlängerungsfaktors und eines Gummi-Bindeproteins die Aktivität folgender Enzyme oder Enzymkombinationen erhöht ist: E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₁, E₁₂, E₁₃, E₇E₈, E₇E₉, E₇E₁₀, E₇E₁₁, E₇E₁₂, E₇E₁₃, E₈E₉, E₈E₁₀, E₈E₁₁, E₈E₁₂, E₈E₁₃, E₉E₁₀, E₉E₁₁, E₉E₁₂, E₉E₁₃, E₁₀E₁₁, E₁₀E₁₂, E₁₀E₁₃, E₁₁E₁₂, E₁₁E₁₃, E₁₂E₁₃, E₇E₈E₉, E₇E₈E₁₀, E₇E₈E₁₁, E₇E₈E₁₂, E₇E₈E₁₃, E₇E₉E₁₀, E₇E₉E₁₁, E₇E₉E₁₂, E₇E₉E₁₃, E₇E₁₀E₁₁, E₇E₁₀E₁₂, E₇E₁₀E₁₃, E₇E₁₁E₁₂, E₇E₁₁E₁₃, E₇E₁₂E₁₃, E₈E₉E₁₀, E₈E₉E₁₁, E₈E₉E₁₂, E₈E₉E₁₃, E₈E₁₀E₁₁, E₈E₁₀E₁₂, E₈E₁₀E₁₃, E₈E₁₁E₁₂, E₈E₁₁E₁₃, E₈E₁₂E₁₃, E₉E₁₀E₁₁, E₉E₁₀E₁₂, E₉E₁₀E₁₃, E₉E₁₁E₁₂, E₉E₁₁E₁₃, E₉E₁₂E₁₃, E₁₀E₁₁E₁₂, E₁₀E₁₁E₁₃, E₁₀E₁₂E₁₃, E₁₁E₁₂E₁₃, E₇E₈E₉E₁₀, E₇E₈E₉E₁₁, E₇E₈E₉E₁₂, E₇E₈E₉E₁₃, E₇E₈E₁₀E₁₁, E₇E₈E₁₀E₁₂, E₇E₈E₁₀E₁₃, E₇E₈E₁₁E₁₂, E₇E₈E₁₁E₁₃, E₇E₈E₁₂E₁₃, E₇E₉E₁₀E₁₁, E₇E₉E₁₀E₁₂, E₇E₉E₁₀E₁₃, E₇E₉E₁₁E₁₂, E₇E₉E₁₁E₁₃, E₇E₉E₁₂E₁₃, E₇E₁₀E₁₁E₁₂, E₇E₁₀E₁₁E₁₃, E₇E₁₀E₁₂E₁₃, E₇E₁₁E₁₂E₁₃, E₈E₉E₁₀E₁₁, E₈E₉E₁₀E₁₂, E₈E₉E₁₀E₁₃, E₈E₉E₁₁E₁₂, E₈E₉E₁₁E₁₃, E₈E₉E₁₂E₁₃,

E₈E₁₀E₁₁E₁₂, E₈E₁₀E₁₁E₁₃, E₈E₁₀E₁₂E₁₃, E₈E₁₁E₁₂E₁₃, E₉E₁₀E₁₁E₁₂, E₉E₁₀E₁₁E₁₃,
 E₉E₁₀E₁₂E₁₃, E₉E₁₁E₁₂E₁₃, E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃, E₇E₈E₉E₁₀E₁₁, E₇E₈E₉E₁₀E₁₂,
 E₇E₈E₉E₁₀E₁₃, E₇E₈E₉E₁₁E₁₂, E₇E₈E₉E₁₁E₁₃, E₇E₈E₉E₁₂E₁₃, E₇E₈E₁₀E₁₁E₁₂,
 E₇E₈E₁₀E₁₁E₁₃, E₇E₈E₁₀E₁₂E₁₃, E₇E₈E₁₁E₁₂E₁₃ E₇E₉E₁₀E₁₁E₁₂, E₇E₉E₁₀E₁₁E₁₃,
 E₇E₉E₁₀E₁₂E₁₃, E₇E₉E₁₁E₁₂E₁₃, E₇E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃ E₈E₉E₁₀E₁₁E₁₂, E₈E₉E₁₀E₁₁E₁₃,
 E₈E₉E₁₀E₁₂E₁₃, E₉E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃, E₇E₈E₉E₁₀E₁₁E₁₂, E₇E₈E₉E₁₀E₁₁E₁₃,
 E₇E₈E₉E₁₀E₁₂E₁₃, E₇E₈E₉E₁₁E₁₂E₁₃, E₇E₈E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃, E₇E₉E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃,
 E₈E₉E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃ und E₇E₈E₉E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃, wobei E₇E₈E₉E₁₀E₁₁E₁₂E₁₃ am
 meisten bevorzugt ist.

In diesem Zusammenhang ist es weiterhin bevorzugt, dass das Enzym

- E₇ eine 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (EC 2.2.1.7),
- E₈ eine 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (EC 1.1.1.267),
- E₉ eine 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-cytidylyl-Transferase (EC 2.7.7.60),
- E₁₀ eine 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol-Kinase (EC 2.7.1.148),
- E₁₁ eine 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (EC 4.6.1.12),
- E₁₂ eine 4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat-Synthase (EC 1.17.4.3), und
- E₁₃ eine 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat-Reduktase (EC 1.17.1.2)

ist.

Das Enzym E₇ wird vorzugsweise von einem Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dxs, dxs-1, dxs-2, dxsA, dxsB oder tktB

kodiert. Das Enzym E₈ wird vorzugsweise von einem Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *ispC*, *dxr*, *yaem*, *dxr-1*, *dxr-2* und *dxrA* kodiert. Das Enzym E₉ wird vorzugsweise von Genen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *ispD*, *ygbP*, *ispF*, *ispDF*, *yacM* und *mecT* kodiert. Geeignete Gene für das Enzym E₁₀ sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *ispE*, *ychB*, *ipk*, *thrB1*, *thrB*, *yabH* und *cmeK*. Das Enzym E₁₁ wird vorzugsweise von einem Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *ispF*, *ygbB*, *ispD*, *ispDF*, *yacN*, *mecS* und *trmD* kodiert. Geeignete Gene für das Enzym E₁₂ sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *ispG*, *gcpE*, *aarC* und *yqfY*. Das Enzym E₁₃ wird vorzugsweise von einem Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *ispH*, *lytB*, *ispH-1*, *ispH-2*, *lytB1*, *lytB2* und *yqfP* kodiert. Die Nukleotidsequenzen der vorstehend genannten Gene sowie weiterer Gene für die Enzyme E₇ bis E₁₃ können unter anderem auch der KEGG-Datenbank, der NCBI-Datenbank oder EMBL-Datenbank entnommen werden.

Beispiele für eine Zelle, in der die Aktivität eines oder mehrerer der Enzyme E₇ bis E₁₃, insbesondere jedoch die Aktivität des Enzyms E₁₂, erhöht ist, können beispielsweise der US 2004/0176570 A1 entnommen werden. Auch die in dieser Patentanmeldung beschriebenen, rekombinanten Zellen können als Zellen eingesetzt werden, in denen zusätzlich die Aktivität eines Enzyms, welches in die Herstellung von Isoprenoiden, vorzugsweise in die Herstellung von Polyisoprenen mit der vorstehend genannten Anzahl von Kohlenstoffatomen, involviert ist, insbesondere der Aktivität des Enzyms E₁, die Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Verlängerungsproteins, die Aktivität des Enzyms E₁ und eines Gummi-Bindeproteins oder die Aktivität des Enzyms E₁, eines Gummi-Verlängerungsfaktors und eines Gummi-Bindeproteins erhöht wird.

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, umfassend den Verfahrensschritt der Erhöhung der Expression eines Enzyms ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Gummi-Bindeprotein („*rubber binding protein*“), einem Gummi-Verlängerungsfaktor („*rubber elongation factor*“) und einer Prenyl-Transferase in der Zelle. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieses erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das Verfahren den Verfahrensschritt der Erhöhung der Expression einer Prenyl-Transferase in der Zelle, den Verfahrensschritt der Erhöhung der Expression einer Prenyl-Transferase und eines Gummi-Bindeproteins in der Zelle, den Verfahrensschritt der Erhöhung der Expression einer Prenyl-Transferase und eines Gummi-Verlängerungsfaktors in der Zelle oder den Verfahrensschritt der Erhöhung der Expression einer Prenyl-Transferase, eines Gummi-Verlängerungsfaktors und eines Gummi-Bindeproteins in der Zelle. Darüber hinaus kann das Verfahren zusätzlich den Verfahrensschritt der Erhöhung einer oder mehrere der Aktivitäten der Enzyme E₂ bis E₆ oder E₇ bis E₁₃ umfassen. In diesem Zusammenhang ist es weiterhin bevorzugt, dass die Erhöhung der Expression der entsprechenden Enzymaktivitäten dadurch erfolgt, dass ein für ein für das entsprechende Enzym kodierendes Gen in das Genom der Zelle integriert wird oder aber in Form eines Expressionsvektors in die Zelle eingeführt wird.

Weiterhin ist es im Zusammenhang mit dem vorstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle bevorzugt, dass es sich bei der Zelle um einen Mikroorganismus, insbesondere um eine Bakterien- oder Hefezelle

handelt, wobei als Bakterien- oder Hefezellen diejenigen Zellen bevorzugt sind, die bereits eingangs im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Zelle genannt worden sind.

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet weiterhin die durch das vorstehend beschriebene Verfahren erhältliche, gentechnisch veränderte Zelle.

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet insbesondere auch ein Verfahren zur Herstellung von Isoprenoiden, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- i) in Kontakt bringen einer erfindungsgemäßen Zelle oder einer durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Zelle mit einem Kulturmedium beinhaltend mindestens eine Kohlenstoffquelle unter Bedingungen, unter denen die Zelle aus der Kohlenstoffquelle Isoprenoide zu bilden vermag, welche in definierten Kompartimenten in der Zelle eingeschossen werden;
- ii) Isolierung der in den definierten Kompartimenten eingeschlossenen Isoprenoide.

Im Schritt i) des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zunächst die erfindungsgemäßen Zellen oder die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Zellen mit einem Kulturmedium beinhaltend mindestens eine Kohlenstoffquelle unter Bedingungen in Kontakt gebracht, unter denen die Zelle aus der Kohlenstoffquelle Isoprenoide zu bilden vermag, welche in definierten Kompartimenten in der Zelle eingeschossen werden.

Die erfindungsgemäßen, gentechnisch veränderten Zellen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im *batch*-Verfahren (Satzkultivierung) oder im *fed-batch*-Verfahren (Zulaufverfahren) oder *repeated-fed-batch*-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion der Isoprenoide mit dem Nährmedium in Kontakt gebracht und somit kultiviert werden. Denkbar ist auch ein semi-kontinuierliches Verfahren, wie es in der GB-A-1009370 beschrieben wird. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel („*Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik*“ (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas („*Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*“, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "*Manual of Methods for General Bacteriology*" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Kohlenhydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Methanol, Kohlenwasserstoffe wie Methan, Aminosäuren wie L-Glutamat oder L-Valin oder organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Besonders bevorzugt ist der Einsatz von Kohlehydraten, insbesondere Monosacchariden, Oligosacchariden

oder Polysacchariden, wie dies in US 6,01,494 und US 6,136,576 beschrieben ist, von C₅-Zuckern oder von Glycerin.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe

wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen.

Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei mehr als 20°C, vorzugsweise bei mehr als 30°C, sie kann auch mehr als 40°C betragen, wobei vorteilhafterweise eine Kultivierungstemperatur von 95°C, besonders bevorzugt 90°C und am meisten bevorzugt 80°C nicht überschritten wird.

Nachdem im Verfahrensschritt i) eine ausreichende Menge an in definierten Kompartimenten eingeschlossenen Isoprenoiden gebildet worden ist bzw. nachdem eine ausreichende Menge an durch Zellteilung entstandene, auf rekombinanten Mikroorganismen basierende Biomasse erhalten worden ist, werden im Verfahrensschritt ii) die in den definierten Kompartimenten eingeschlossenen Isoprenoide isoliert. Dabei kann diese Isolierung der eingeschlossenen Isoprenoide grundsätzlich auf die Art und Weise erfolgen, in der üblicherweise auch in Einschlussköpern eingeschlossene, rekombinant hergestellte Proteine aus Mikroorganismen wie beispielsweise *E. coli* isoliert werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die Isolierung der in den definierten Kompartimenten eingeschlossenen Isoprenoide die folgenden Verfahrensschritte:

- iiia) Aufschließen der Zellen unter Erhalt eines Zelllysates, welches die definierten Kompartimente der Zelle umfasst, in denen die Isoprenoide eingeschlossen sind;

- iib) Abtrennen der definierten Kompartimente, in denen die Isoprenoide eingeschlossen sind, aus dem Zelllysate;
- iic) gegebenenfalls Reinigung der abgetrennten, definierten Kompartimente.

In Verfahrensschritt iia) werden die Zellen zunächst unter Erhalt eines Zelllysates, welches die definierten Kompartimente der Zelle, vorzugsweise die Einschlusskörper, umfasst, in denen die Isoprenoide eingeschlossen sind, aufgeschlossen. Dieses Aufschließen kann durch alle dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen, die üblicherweise zum Aufschließen von Zellen eingesetzt werden.

In Betracht kommen hier insbesondere der mechanische Zellaufschluss, wie etwa die Homogenisierung in einem Mixer mit rotierenden Messern, beispielsweise mittels eines Ultra-Turrax, ein mechanischer Aufschluss mittels des *Potter-Elvehjem*-Verfahrens, bei dem sich ein Kolben, der eng von einem stationärem Gefäß ummantelt ist, bewegt und durch die bei dieser Bewegung entstehenden Scherkräfte eine Zerstörung der Zellen bewirkt wird, ein mechanischer Aufschluss mittels eines Mörsers oder in einer Glasperlenmühle, ein mechanischer Aufschluss mittels Ultraschall oder, im Falle eines kontinuierlichen Aufschlussverfahrens, der mechanische Aufschluss beispielsweise mittels eines *Manton-Gaulin*-Homogenisators, bei dem die Zellen mit großem Druck durch ein enges Ventil gepresst werden. Vorzugsweise erfolgt der Aufschluss bei einem Einsatz eines *Manton-Gaulin*-Homogenisators bei einem Druck in einem Bereich von 1.000 bis 50.000 psi, besonders bevorzugt in einem Bereich von 10.000 bis 20.000 psi.

Neben einem mechanischen Aufschluss der Zellen kommen auch nichtmechanische Aufschlussverfahren in Betracht, wie etwa die Behandlung der Zellen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen, die Behandlung der Zellen mit hypotonischen Pufferlösungen, die Autolyse mit Toluol, die enzymatische Lyse mit Enzymen wie beispielsweise Zymolyase, die Behandlung der Zellen mit Detergenzien wie beispielsweise Triton-X-100 oder die Behandlung der Zellen mit komplexbildenden Verbindungen, wie beispielsweise mit EDTA-Lösungen. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Autolyse mit organischen Lösungsmitteln, insbesondere mit Halogenkohlenwasserstoffen wie beispielsweise Toluol. Ein solcher Einsatz organischer Lösungsmittel ist insbesondere deshalb vorteilhaft, weil dadurch nicht nur die Zellen aufgeschlossen werden können, sondern, je nach organischem Lösungsmittel, zugleich auch die definierten Kompartimente von anderen Zellbestandteilen beispielsweise durch Fällung abgetrennt werden können, so dass die Verfahrensschritte iia) und iib) zeitgleich durchgeführt werden können.

Von den vorstehend genannten Aufschlussarten sind diejenigen bevorzugt, die zu einem Aufschluss der Zellen unter Erhalt der Zellorganellen führen, wobei sich insbesondere ein mechanischer Aufschluss mittels des *Potter-Elvehjem*-Verfahrens als vorteilhaft erwiesen hat. Vorteilhaft kann es weiterhin sein, die Zellen zunächst mittels eines Ultra-Turrax aufzuschließen und den so erhaltenen Aufschluss anschließend mittels eines *Manton-Gaulin*-Homogenisators weiter aufzuschließen.

Im Verfahrensschritt iib) werden die definierten Kompartimente, vorzugsweise die Einschlusskörper, in denen die Isoprenoide eingeschlossen sind, aus dem Zellysate abgetrennt. Da diese

Einschlusskörper eine im Vergleich zu anderen Bestandteilen des Zelllysates große Dichte aufweisen, können sie beispielsweise durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation, bei der die Einschlusskörper als Pellet erhalten werden, von den übrigen Bestandteilen abgetrennt werden. Vorteilhafterweise erfolgt die Hochgeschwindigkeitszentrifugation bei einer Zentrifugalbeschleunigung in einem Bereich von 1.000 bis 20.000 × g, besonders bevorzugt in einem Bereich von 5.000 bis 15.000 × g.

Die auf diese Art und Weise abtrennten definierten Einschlusskörpern werden anschließend im Verfahrensschritt iic) gereinigt, wobei diese Reinigung insbesondere zur Abtrennung von noch in den Einschlusskörpern enthaltenen oder von auf der Oberfläche der Einschlusskörper anhaftenden Proteinen oder anderen, von den Isoprenoiden verschiedenen Verunreinigungen dient. Vorzugsweise erfolgt diese Reinigung durch das Waschen der abgetrennten definierten Kompartimente mit geeigneten Waschlösungen. Als Waschlösungen kommen insbesondere Wasser oder salzhaltige Pufferlösungen in Betracht. Vorteilhaft kann es insbesondere sein, die im Verfahrensschritt iib) abgetrennten Einschlusskörper auch mit einer enzymhaltigen Waschlösung, beispielsweise einer wässrigen Proteinase-Lösung, zu behandeln, um Proteine, welche in den Einschlusskörpern eingeschlossen und/oder an der Oberfläche der Einschlusskörper haften, zu entfernen.

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe leisten weiterhin die durch dieses Verfahren erhaltenen Isoprenoide, insbesondere jedoch die durch dieses Verfahren erhältlichen cis-

Polyisoprene, trans-Polyisoprene oder Mischungen aus cis-Polyisoprenen und trans-Polyisoprenen.

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe leistet weiterhin eine isolierte Nukleinsäure, deren Sequenz ausgewählt ist aus den folgenden Sequenzen:

- a) eine Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07,
- b) eine intronfreie Sequenz, die von einer Sequenz nach a) abgeleitet ist und das gleiche Protein oder Peptid kodiert wie die Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, wobei diese intronfreie Sequenz vorzugsweise für ein Protein kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- c) eine Sequenz, die ein Protein oder Peptid kodiert, das die Aminosäure-Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14 umfasst,
- d) eine Sequenz, die mit einer Sequenz nach a) bis c) zu mindestens 80%, vorzugsweise zu mindestens 85%, besonders bevorzugt zu mindestens 90%, darüber hinaus bevorzugt zu mindestens 95% und am meisten bevorzugt zu mindestens 99% identisch ist, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Protein kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,

- e) eine Sequenz, die mit dem Gegenstrang einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Protein kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- f) ein durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenes Derivat einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis e), wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Protein kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- g) eine Sequenz, die der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07 innerhalb der Degeneration des genetischen Codes entspricht, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Protein kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert,
- h) eine Sequenz mit neutralen Sinnmutationen der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, wobei diese Sequenz vorzugsweise für ein Protein kodiert, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert, sowie
- i) eine komplementäre Sequenz zu einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis h).

Überraschend wurde festgestellt, dass eine Überexpression eines oder mehrerer dieser Gene mit SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02,

SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07 aus dem russischen Löwenzahn in Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli*-Zellen, dazu führt, dass diese Zellen nunmehr in der Lage sind, in Einschlusskörpern eingeschlossene Isoprenoide zu bilden. Diese Gene können daher einzeln oder in Kombination miteinander eingesetzt werden, um Zellen, insbesondere Mikroorganismen gentechnisch derart zu verändern, dass diese Zellen zur gezielten Produktion von Isoprenoiden verwendet werden können.

Die Isolierung dieser Gene erfolgte dadurch, dass zunächst RNA für eine RT-PCR („Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“) aus dem Milchsaft (Latex) von *T. kok-saghyz* isoliert wurde. Unter Verwendung geeigneter Primer wurden dann die DNA-Sequenzen amplifiziert. Einzelheiten hierzu sind den Beispielen zu entnehmen.

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet weiterhin ein Vektor, vorzugsweise ein Expressionsvektor, umfassend eine DNA mit einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis h), wie vorstehend definiert. Als Vektoren kommen alle dem Fachmann bekannten Vektoren in Betracht, die üblicherweise zum Einschleusen von DNA in eine Wirtszelle eingesetzt werden. Bevorzugte Vektoren sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend Plasmide, wie etwa die *E. coli*-Plasmide pTE13, pTrc99A, pBR345 und pBR322, Viren, wie etwa Bakteriophagen, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, Masernviren und Retroviren, Cosmide oder YACs, wobei Plasmide als Vektoren am meisten bevorzugt sind.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Vektors liegt die DNA mit einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis h) unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors, welcher zur Expression des von diesen DNA-Sequenzen kodierten Polypeptids in der Zelle eines Mikroorganismus, vorzugsweise einer Bakterien-, Hefe- oder Pilzelle, besonders bevorzugt einer Bakterien der Hefezelle, geeignet ist. Beispiele für solche Promotoren sind etwa der trp-Promotor oder der tac-Promotor.

Der erfindungsgemäße Vektor sollte neben einem Promotor vorzugsweise eine Ribosomenbindungsstelle sowie einen Terminator umfassen. Dabei ist es besonders bevorzugt, dass die erfindungsgemäße DNA in eine Expressionskassette des Vektors umfassend den Promotor, die Ribosomenbindungsstelle und den Terminator eingebaut ist. Neben den vorstehend genannten strukturellen Elementen kann der Vektor des Weiteren dem Fachmann bekannte Selektionsgene umfassen.

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leisten weiterhin die Verwendung des vorstehend beschriebenen Vektors zur Transformation einer Zelle sowie die durch Transformation mit diesem Vektor erhaltene Zelle. Die Zellen, welche mit dem erfindungsgemäßen Vektor transformiert werden können, sind vorzugsweise diejenigen Zellen, die bereits eingangs als bevorzugte, erfindungsgemäße Zellen beschrieben worden sind.

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet weiterhin ein isoliertes Polypeptid, welches die Aminosäure-Sequenz mit der SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14, oder eine Aminosäuresequenz, die eine Identität von

mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 55 %, darüber hinaus bevorzugt mindestens 60 %, darüber hinaus bevorzugt mindestens 65 % und am meisten bevorzugt mindestens 70 % zur Aminosäure-Sequenz gemäß SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14 besitzt, aufweist.

Die Erfindung wird nun anhand nicht limitierender Beispiele und Abbildungen näher erläutert.

Es zeigt die Abbildung 1 die elektronenmikroskopische Aufnahme einer *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS pET23a-Zelle als Kontrolle.

Es zeigt die Abbildung 2 elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer erfindungsgemäßen *E. coli* Origami(DE3)plysS pET23a::*srpp3-tk*-Zelle, in der eine Prenyl-Transferase aus *T. kok-saghyz* überexprimiert wurde.

Es zeigt die Abbildung 3 elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer erfindungsgemäßen *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS pET23a::*hrt2-jk*-Zelle, in der die Aktivität einer cis-1,4-Prenyl-Transferase aus *Hevea brasiliensis* überexprimiert wurde.

Es zeigt die Abbildung 4 elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer erfindungsgemäßen *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS pETdUET-1::*hrt2-jk*::*srpp3-tk*-Zelle, in der die Aktivität einer cis-1,4-Prenyl-Transferase aus *Hevea brasiliensis* sowie eine Prenyl-Transferase aus *T. kok-saghyz* zusammen überexprimiert wurden.

Im Zytoplasma der Zelle, welche in den Abbildungen 2 bis 4 wiedergegeben ist, sind definierte Kompartimente zu erkennen, in denen Isoprenoide eingeschlossen sind.

Es zeigt die Abbildung 5 die Prenyl-Transferase-Aktivität der Enzyme, die von den Genen mit der SEQ.-ID-Nr. 01 und mit der SEQ.-ID-Nr. 07 kodiert werden. Gezeigt ist weiterhin die Prenyl-Transferase-Aktivität der Prenyl-Transferase aus *Hevea brasiliensis*. Die Bestimmung erfolgt in einem zellfreien Extrakt, wobei „K“ der zellfreie Rohextrakt aus Rosetta-gami B(DE3)plysSpET23a, „1“ der zellfreie Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS(pET23a::cpt1-tk), „2“ der zellfreie Extrakt aus *E. coli* Origami (DE3)pLysS (pET23a::hrt2-jk), „3“ der zellfreie Extrakt aus *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS (pEXP5CT::srpp3-tk) und „4“ eine Mischung aus zellfreiem Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS (pET23a::cpt1-tk) und zellfreiem Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS (pEXP5CT::srpp3-tk) ist.

Es zeigt die Abbildung 6 eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer erfindungsgemäßen *E. coli* HMS174(DE3) pMR07-EK; pCDFDuet-1::DXIPP-Zelle, in der die Gene cpt1-tk bis cpt4-tk und srpp1-tk bis srpp3-tk zusammen überexprimiert wurden. Der Balken entspricht 0,5 µm.

Es zeigt die Abbildung 7 eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer *E. coli* HMS174(DE3) pACYC184 ; pCDFDuet-1::DXIPP-Kontrollzelle. Der Balken entspricht 0,5 µm.

Im Zytoplasma der Zelle, welche in der Abbildung 6 wiedergegeben ist, sind definierte Kompartimente zu erkennen, in denen Isoprenoide eingeschlossen sind, wohingegen diese

Kompartimente in den Kontrollzellen der Abbildung 7 fehlen. Ein Analoges Bild ergibt sich für die Zellen analogen Konstrukte in *E. coli* Tuner(DE3), vgl. unten.

Es zeigt die Abbildung 8 die Nummerierung für NMR Messungen relevanter Kohlenstoffatome in Isopren

Es zeigt die Abbildung 9 ^{13}C -NMR-Spektren von Extrakten aus *E. coli* Tuner(DE3) pACYC184; pCDFDuet-1::DXIPP und *E. coli* Tuner(DE3) pMR07-EK; pCDFDuet-1::DXIPP

Beispiele

Isolierung der Gene mit den Sequenzen gemäß SEQ.-ID-Nr. 01 bis 07

Für die Isolierung der Gene mit den Sequenzen gemäß SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 und SEQ.-ID-Nr. 07 (nachfolgend *srpp1-tk*, *srpp2-tk* und *srpp3-tk* genannt) wurden jeweils spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer von Sequenzen einer cDNA-Bank, die mittlerweile öffentlich zugänglich ist (<http://plantta.tigr.org/>), abgeleitet (SEQ.-ID-Nr. 15 bis SEQ.-ID-Nr. 20). Für die Isolierung der Gene mit den Sequenzen gemäß SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03 und SEQ.-ID-Nr. 04 (nachfolgend *cpt1-tk*, *cpt2-tk*, *cpt3-tk* und *cpt4-tk* genannt) wurde ein degenerierter Primer (SEQ.-ID-Nr. 21) anhand einer konservierten Region von *cpts* aus anderen Organismen abgeleitet.

Zur Amplifikation der Gene wurde RNA für eine RT-PCR („Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“) aus dem Milchsaft (Latex) von *T. kok-saghyz* isoliert.

Dazu wurden 100 µl Latex in 100 µl RNA-Homogenisationspuffer (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 100 mM Tris/HCl, pH 7) gegeben, mit 800 µl TriFast® (Firma PeqLab) versetzt und nach Angaben des Herstellers verfahren. In die RT wurden 2 µg der Gesamt-RNA eingesetzt und mittels der Reversen Transkriptase „Super ScriptII“ (Firma Invitrogen) unter Verwendung der Primer srpp-TK1-3_rev (SEQ.-ID-Nr. 16, SEQ.-ID-Nr. 18 und SEQ.-ID-Nr. 20 bzw. des Primers „Adaptor-dT“ (SEQ.-ID-Nr. 22) in Einzelstrang-cDNA transkribiert. In der nachfolgenden PCR wurden die entsprechenden Vorwärts-Primer (SEQ.-ID-Nr. 15, SEQ.-ID-Nr. 17, SEQ.-ID-Nr. 19 und SEQ.-ID-Nr. 21) mit dem Primer „Adaptor“ (SEQ.-ID-Nr. 23) kombiniert, so dass für die srpp-Gene bereits volle Länge cDNAs und für die cpt-Gene cDNA-Teilfragmente erhalten wurden. Zur Vervollständigung der cpt-Sequenzen wurde mit dem „Genome Walker Universal Kit (Firma Clontech)“ mit dem Primer „cpt-revGW“ (SEQ.-ID-Nr. 24), dessen Sequenz vom cDNA-Teilfragment abgeleitet worden war, eine Verlängerung in 5' Richtung durchgeführt. Insgesamt wurden so vier verschiedene cpt-Gene erhalten, deren volle Länge cDNAs mit den spezifischen Primern (SEQ.-ID-Nr. 25 bis SEQ.-ID-Nr. 30) amplifiziert wurde.

Herstellung von Expressionsvektoren

- a) Herstellung des Expressionsvektors pEXP5CT::*srpp3-tk* (umfasst das kleine Gummi-Bindeprotein aus *Taraxacum kok-saghyz* (russischer Löwenzahn))

Die Klonierung des Gens *srpp3-tk* in den bakteriellen T7-Expressionsvektor pEXP5CT wurde zur zukünftigen Expression eines C-Terminalen 6 × His Fusionsproteins (Srpp3-tkCT 6 × His) herangezogen. Dieses Fusionsprotein sollte eine zukünftige Aufreinigung und Immunodetektion des *small rubber particle proteins* ermöglichen bzw. erleichtern. Das Prinzip des TOPO-Vektors pEXP5CT basiert auf der kovalenten Verknüpfung eines mittels *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkts mit dem linearisierten Zielvektor durch eine Vektor-gebundene Topoisomerase. Hierzu wurden das 717 bp große Fragment mit Hilfe der Oligonukleotide Srpp3_TOPO_start_5' und Srpp3_TOPO_nostop_3' (SEQ.-ID-Nr. 31 und SEQ.-ID-Nr. 32) durch PCR amplifiziert. Hierbei wurde die *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt, um 3'-A-Überhänge zu erzeugen. Der 5'-Primer generierte keine weiteren Schnittstellen und war mit dem ersten Sequenzabschnitt identisch. Der verwendete 3'-Primer entfernte stattdessen das Stopcodon (TGA), um ein vollständiges Ablesen des vektoruell codierten Hexahistidin-Fusionsproteins zu ermöglichen. Die nach der PCR erhaltenen verkürzten *srpp3-tk* -Fragmente mit einer Größe von 714 bp wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und für die weitere Verwendung aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Ligation in den Topo-Vektor pEXP5CT. Aufgrund der hohen Ligationseffizienz des Topoisomerase-Vektor-Systems konnte eine Ligationseffizienz von 90 % beobachtet werden. Von ausgewählten Kolonien, welche nach der Transformation in *E. coli* TOP10 auf LB-Ampicillin-Platten gewachsen waren, wurde Plasmid-DNA isoliert und mit den Primern TOPO_Fw und TOPO_Rev (SEQ.-ID-Nr. 33 und SEQ.-ID-Nr. 34) sequenziert. Ein positiver *E. coli* TOP10 Klon und dessen präparierte pEXP5CT::*srpp3-tk* Plasmide wurde abschließend für

weiterführende Untersuchungen eingesetzt, in verschiedene DE3-Expressionsstämme transformiert und konserviert.

- b) Herstellung des Expressionsvektors pET23a::*hrt2-jk* (umfasst die *cis*-1,4-Prenyl-Transferase aus *Hevea brasiliensis*)

Zur Herstellung des Expressionsvektors pET23a::*hrt2-jk* wurde die *codon usage* der *cis*-1,4-Prenyl-Transferase *hrt2* aus *Hevea brasiliensis* hinsichtlich einer heterologen Expression in *E. coli* am Computer optimiert und ein neues Gen (*hrt2-jk*) mit identischer Aminosäuresequenz zu *hrt2* synthetisiert (Genscript Corp., USA). Zusätzlich wurden gebräuchliche Restriktionsschnittstellen für weitergehende Klonierungen aus der optimierten Nukleotidsequenz herausgerechnet, um eine einfache Subklonierung zu ermöglichen. Als flankierende Restriktionsschnittstellen wurden *NdeI* und *EcoRI* gewählt. Die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* ermöglichten eine direkte Subklonierung in den Vektor pET23a. Das synthetische Gen *hrt2-jk* wurde in dem bakteriellen Klonierungsvektor pUC57 ausgeliefert. Ausgehend von dem Plasmid pUC57::*hrt2-jk* wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *NdeI* und *EcoRI* durchgeführt und das Strukturgen in einem Agarosegel zur weiteren Verwendung aufgereinigt. Um den Zielvektor pET23a für eine Ligation vorzubereiten, wurde auch dieser mit den Enzymen *NdeI* und *EcoRI* vollständig verdaut und in einem Agarosegel aufgereinigt. Es folgte eine Ligation von Strukturgen und Zielvektor. Positive Klone, bzw. dessen präparierte pET23a::*hrt2-jk* Plasmide wurden abschließend vollständig sequenziert, für weiterführende Untersuchungen in verschiedene Expressionstämme transformiert und konserviert.

- c) Herstellung des Expressionsvektors pET23a::*cpt1-tk* (umfasst eine *cis*-1,4-Prenyl-Transferase aus *Taraxacum kok-saghyz*)

Die Klonierung des Gens für die *cis*-1,4-Prenyltransferase *cpt1-tk* in den Vektor pET23a wurde zur Expression des Gens in das native Protein herangezogen. Ausgehend von einem bakteriellen Zwischenklonierungsvektor (pCRII-TOPO::*cpt1-tk*) mit dem Gen *cpt1-tk*, wurde der hierfür codierende Genabschnitt zur Erzeugung von geeigneten Restriktionsschnittstellen mittels Polymerasenkettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierzu wurden das 927 bp große DNA-Fragment mit Hilfe der Oligonukleotide Cpt_VspI_5' und Cpt_EcoRI_3' (SEQ.-ID-Nr. 35 und SEQ.-ID-Nr. 36) mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurde die Pfx-DNAPolymerase eingesetzt, welche eine *proof reading function* besitzt. Der 5'-Primer generierte vor dem bereits im Gen enthaltenen Startcodon die Restriktionststelle für VspI. Die Verwendung von VspI ermöglichte nach dem Verdau mit dem gleichnamigen Enzym das Vorhandensein eines kompatiblen Überhangs zu NdeI-verdauten Restriktionsstellen im Zielvektor. Der Einsatz und die Erzeugung dieser Schnittstelle wurde Notwendig, da *cpt1-tk* bereits eine NdeI-Erkennungstelle besaß. Der verwendete 3'-Primer fügte an die Genterminationssequenz (TAA) eine Restriktionsschnittstelle für EcoRI an. Die nach der PCR erhaltenen DNA-Fragmente mit einer Größe von 950 bp wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und für die weitere Verwendung aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Fragmente durch die Restriktionsenzyme VspI und EcoRI verdaut. Der Zielvektor pET23a wurde zuvor aus *E. coli*-Zellen isoliert, gereinigt und durch die Restriktionsendonukleasen NdeI und EcoRI über Nacht verdaut. Das linearisierte Vektorfragment wurde abschließend

noch über ein Agarosegel aufgereinigt und in den linearisierten Vektor pET23a ligiert. Durch die Verwendung zweier unterschiedlichen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *VspI* und *EcoRI* wurde die gewünschte Orientierung des Fragmentes im Vektor zwangsläufig sichergestellt. Nach der Ligation wurden dauerhaft kompetente *E. coli* TOP10 Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert und auf ampicillinhaltige LB-Agar-Platten ausgestrichen. Eine Überprüfung der erhaltenden Klone auf Träger des *cpt1-tk* Gens erfolgte durch eine Plasmidisolation und einem anschließendem Verdau mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRI*. Der Einsatz von *XbaI* als 5'-Kontrollschnittstelle vor dem Gen im Vektor pET23a wurde notwendig, da durch die Ligation der vektoruell verdauten Schnittstelle *NdeI* mit dem kompatiblen *VspI*-Überhang aus dem Verdau des *cpt1-tk* Inserts verlorenging. Positive Klone, bzw. dessen präparierte pET23a::*cpt1-tk* Plasmide wurden abschließend vollständig sequenziert, für weiterführende Untersuchungen in Expressionsstämme transformiert und konserviert.

- d) Herstellung des Expressionsvektors pETDuet1::*hrt2-jk*::*srpp3-tk* (umfasst eine cis-1,4-Prenyl-Transferase aus *Hevea brasiliensis* und das kleine Gummi-Bindeprotein aus *Taraxacum kok-saghyz*)

Durch die bereits bei der Klonierung von *srpp3-tk* gewählten Schnittstellen im Vektor pET23a war es möglich, das gesamte Gen in die MCS 2 subzuklonieren. Hierfür wurde das aufgereinigte Expressionsplasmid pET23a::*srpp3-tk* mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* verdaut und gereinigt. Mit den gleichnamigen Restriktionsenzymen und der identischen Prozedur wurde der Vektor pETDuet-1 behandelt und

anschließend zusammen mit dem zuvor durch Restriktion isolierten Strukturgen *srpp3-tk* unter Erhalt des Vektors pETDuet-1::*srpp3-tk* ligiert.

Durch die bereits bei der Konstruktion des Plasmids pET23a::*hrt2-jk* gewählten Schnittstellen war es auch möglich, das vollständige Gen *hrt2-jk* mitsamt ribosomaler Bindungsstelle in die multiple Klonierungsstelle 1 (MCS1) des Vektors pETDuet-1::*srpp3-tk* zu integrieren. Hierfür wurde das aufgereinigte Plasmid pET23a::*hrt2-jk* mit *XbaI* und *EcoRI* verdaut und das Genfragment gereinigt. Der mit den gleichen Restriktionsenzymen restringierte Vektor pETDuet-1::*srpp3-tk* wurde anschließend mit dem Gen *hrt2-jk* unter Erhalt des Expressionsvektors pETDuet1::*hrt2-jk*::*srpp3-tk* ligiert.

- e) *Herstellung eines Expressionsvektors pMR07-EK enthaltend eine codonoptimierte, synthetische Expressionskassette zur Expression der Gene cpt1-tk bis cpt4-tk und srpp1-tk bis srpp3-tk in E. coli*

Es wurde ein weiterer Expressionsvektor, pMR07-EK, SEQ.-ID-Nr. 37, auf Basis des low copy Vectors pACYC184 konstruiert, welches die Gene *cpt1-tk* bis *cpt4-tk* und *srpp1-tk* bis *srpp3-tk* in für die Expression in *E. coli* optimierter Form enthält. Der für die Expression dieser Gene verantwortliche Bereich ist beidseits flankiert von *manx* Sequenzen, welche eine Lambda vermittelte Integration ermöglichen. Dieser Vektor wurde bei der Fa. Geneart für die *E. coli* Codon-Usage optimiert synthetisiert.

- f) *Herstellung eines Expressionsvektors pCDFDuet-1::DXIPP zur Inkorporation von dreifach-markierter 13C-Desoxyxylulose*

Ausgehend von genomische DNA aus *E. coli* K12 wurde mit den Primern: 5'-AAAGAGCTCGAGGAGAAATTAACCATGGCTGATTGGGTAACAGGCAAAGTCA-3' und 5'-GGTTAATTTCTCCTCGTCGACTTACCAGTAATGCTCCGCT-3' die Ferredoxin-NADP Reduktase und mit den Primern 5'-GTCGACGAGGAGAAATTAACCATGGCTATCACTGGCATCTT-3' und 5'-AAAACCGCGGTCAGGCATTGAGAATTTTCGTCGAGATGCAACTCTTCAGAA A-3' Flavodoxin 1 amplifiziert. Beide Amplifikate wurden durch eine PCR fusioniert (Fusions-PCR) und anschl. mit den Restriktionsenzymen SacI und SacII verdaut. Das geschnittene Fusions Amplifikat wurde in den SacI und SacII verdauten Vektor pBScyclo (Hecht S. et al. 2001, Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98:14837-14842) ligiert. Der resultierende Vektor heisst pBSDXIPP, SEQ.-ID-Nr. 38. Dieser Vektor wurde mit den Restriktionsendonucleasen SacI und KpnI verdaut. Das resultierende Fragment wurde in den mit SacI und KpnI verdauten Vektor pCDF-Duet (Fa. Novagen) ligiert, der resultierende Vektor heisst pCDF-Duet::DXIPP.

Transformation von Zellen

Zunächst wurden kompetente *E. coli*-Zellen hergestellt. Dazu wurden die zu transformierenden *E. coli*-Stämme ausgehend von einer Vorkultur in 50 ml LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 bis 0,5 bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (Controlled environment incubator shaker, Firma New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA) angezogen und steril in 10 ml Ansätzen durch Zentrifugation bei 3.500 Upm für 10 min bei 4 °C geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl₂-

Lösung aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation wurde unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Das Pellet wurde anschließend in 0,5 bis 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Zellen bis zur Transformation, jedoch maximal 24 h, auf Eis gelagert.

Der Transfer von DNA in *E. coli* Zellen erfolgte durch Transformation der vorstehend erhaltenen, kompetenten Zellen. Je 200 µl kompetente *E. coli* Zellen wurden hierzu mit 50 - 250 µg der Expressionsvektoren gut durchmischt. Zur Adsorption der DNA an der Oberfläche wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock der Zellen für exakt 90 Sekunden bei 42 °C sowie einem kurzen Abkühlen auf Eis für 2-5 min wurde die DNA von den Zellen aufgenommen. Zur Regeneration der Zellen und zur Ausprägung der Plasmidcodierten Antibiotikaresistenz wurden dem Transformationsansatz 600 µl LB-Medium steril zugegeben und die Zellen für 60-90 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden Aliquots von 70-200 µl auf Selektivagar ausplattiert und zur Isolierung der rekombinanten Klone über Nacht bei 37 °C kultiviert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt.

Durch die vorstehend beschriebene Vorgehensweise wurden folgende rekombinante Zellen erhalten:

1. *E. coli* Origami (DE3)plysS pET23a::*srpp3-tk*
2. *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS pET23a::*hrt2-jk*
3. *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS pETdUET-1::*hrt2-jk::srpp3-tk*
4. *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS pET23a::*cpt1-tk*
5. *E. coli* Rosetta-gamiB(DE3)plysS pEXP5CT::*srpp3-tk*
6. *E. coli* HMS174(DE3) pMR07-EK; pCDFDuet-1::*DXIPP*

7. *E. coli* Tuner(DE3) pMR07-EK; pCDFDuet-1::DXIPP
8. *E. coli* HMS174(DE3) pACYC184 ; pCDFDuet-1::DXIPP
(Negativkontrolle)
9. *E. coli* Tuner(DE3) pACYC184; pCDFDuet-1::DXIPP
(Negativkontrolle)

Elektronenmikroskopische Analysen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der erzeugten rekombinanten *E. coli* Zellen hinsichtlich intrazellulär auftretender Einschlusskörper und morphologischen Veränderungen wurden diese, sofern nicht abweichend angegeben, in LB-Medium kultiviert, gewaschen und durch Zentrifugation geerntet. Eine Fixierung der Zellen erfolgte sowohl durch Behandlung/Resuspendierung mit 0,5 % (w/v) Glutaraldehyd in Sörensen-Phosphat-Puffer als auch durch 1 % (w/v) Osmiumtetroxid. Im Anschluss wurden die Präparate entwässert, in *Spurr*-Harz eingebettet und mittels eines Diamant-Schneiders in ca. 70 nm dicke Schnitte zerteilt. Die bei der Präparation durchgeführten Einbettungs- und Schneideschritte erfolgten in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Reichelt, Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Die transmissionselektronischen Aufnahmen an einem Hitachi H500 (Hitachi Ltd. Corporation, Tokio, Japan) wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 75 kV eigenständig durchgeführt.

Test zur Bestimmung der Prenyl-Transferase-Aktivität in zellfreien Rohextrakten

Um eine Aussage über die funktionelle Aktivität der Prenyltransferasen zu treffen, wurde ein auf Latexpartikel basierendes Enzymassay etabliert und durchgeführt. In diesem Enzymtest kamen zellfreie Rohextrakte der rekombinanten *E. coli*-Zellen zum Einsatz. Hierzu wurden Zellen von *E. coli* in LB-Medium, bei 37 °C in einem Rotationsschüttler (Fa. New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA) angezogen und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Den Medien wurde zudem ein geeignetes Antibiotikum zugesetzt. Zur Anzucht in Flüssigmedien wurden Erlenmeyerkolben verwendet, wobei das Volumenverhältnis von Gefäß zu Flüssigkeit 10 : 1 bis 5 : 1 betrug. Vorkulturen wurden ausgehend von einer Reinkultur auf Festmedium in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium oder Erlenmeyerkolben mit je 30 ml LB-Flüssigmedium hergestellt. Für das Animpfen der Hauptkulturen wurden gut gewachsene Vorkulturen verwendet, wobei das Inokulum für die Hauptkultur 0,1-5 % des Volumens der Vorkultur entsprach. Hierzu wurde eine Einzelkolonie von *E. coli* Zellen als Impfgut verwendet und in der Regel bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,7 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen mit 1mM IPTG für 3h bei 37°C induziert. Der Einsatz von Klettkolben erlaubte ein komfortables Überprüfen der Optischen Dichte (OD). Mit Hilfe eines Klett-Summerson-Colorimeters (Filter Nr. 54; Manostat Corporation Cat. Nr. 76-550-220, USA) wurde die OD der Kultur bei 520-580 nm verfolgt. Alternativ wurde das Zellwachstum durch Messung der OD mit einem Photometer (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Als Referenz diente

hierbei steriles Medium. Proben mit einer OD_{600nm} > 0,3 wurden mit Medium in geeigneter Weise verdünnt und erneut gemessen. Anschließend erfolgte die Zellernte. Zur Zellernte wurden jeweils bis zu 50 ml Zellsuspension in 50 ml Falcontubes aliquotiert und durch Zentrifugation für 15-30 min bei 3.500 × g und 4 °C geerntet. Aus größeren Kulturvolumina wurden die Zellen durch Zentrifugation in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge (Fa. Du Pont de Nemours, Newton, Conn., USA) bei 6.000 Upm (Rotor GS3) bei 4 °C für 20 min geerntet. Der Zellaufschluss mittels French-Press erfolgte durch dreimalige Passage einer eisgekühlten French-Press-Zelle (Fa. Amicon, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 130 MPa. Zellfreie Rohextrakte wurden durch Zentrifugation für 20 Min bei 13.000 × g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C gewonnen. Der auf diese Weise gewonnene Rohextrakt wurde bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässriger Lösung erfolgte anhand der kolorimetrischen Proteinbestimmung nach BRADFORD 1976. Die Ermittlung der Proteinkonzentration in wässriger Lösung beruht auf der Bildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes, bei dem das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Für den Test wurden 20 µl Probe mit 980 µl Bradfordreagenz (s. u.) vermischt und für 10 min. lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Ultraspec III[®] Photometer (Fa. Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) gegen den Leerwert des entsprechend eingesetzten Puffers gemessen. Als Referenz wurde eine Messung mit Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 100-900 µg Protein ml⁻¹ durchgeführt und eine Kalibrationsgerade erstellt. Befand sich die Extinktion einer Probe oberhalb des Kalibrationsbereichs, so wurde sie mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. Hierbei haben die

Pufferbestandteile in der verwendeten Konzentration keinen negativen Einfluss auf den Test.

Bradfordreagenz	
Serva Blau G	70 mg
Ethanol (96%, v/v)	50 ml
Phosphorsäure (85%, v/v)	100 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad. 1.000 ml
Die Lösung wurde vor Gebrauch filtriert.	

Durch die Bestimmung der Proteinkonzentrationen konnten für den nachfolgenden Enzymtest definierte Proteinkonzentrationen eingesetzt werden. Der hier verwendete Latex-Partikel-basierende Enzymtest dient der radiometrischen Messung der Prenyl-Transferase-Aktivität. Die ¹⁴C-IPP Monomere werden an bereits bestehende Polyisopreneinheiten der zugefügten aufgereinigten Latex-Partikel aus *T. kok-saghyz* durch eine Kondensationsreaktion sukzessive in Form einer Kettenverlängerungsreaktion angehängt. Eine sich nach der Reaktion anschließende Extraktion von sowohl kurz- als auch langkettigen Polyisoprenen erfasst das radioaktiv markierte Polyisopren. Die Radioaktivität dieser Fraktionen kann durch Szintillationszählung quantitativ bestimmt werden. Im Folgenden ist der Ansatz zur radiometrischen Bestimmung der Prenyl-Transferase-Aktivität aufgeführt. Für den Enzymtest wurden stets 20 µg Rohextrakte folgender *E. coli* Stämme verwendet: K, Kontrollansatz ohne Zugabe externer Prenyl-Transferasen, 1 20 µg zellfreies Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS (pET23a::*cpt1-tk*), 2, 20 µg zellfreier Rohextrakt aus *E. coli* Origami (DE3)pLysS (pET23a::*hrt2-jk*), 3, 20 µg zellfreier Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS (pEXP5CT::*srpp3-tk*), 4 10 µg zellfreier Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta-gami

B(DE3)plysS (pET23a::cpt1-tk) und 10 µg zellfreies Rohextrakt aus *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)plysS (pEXP5CT::srpp3-tk).

Testansatz zur radiometrischen Messung der Prenyl-Transferase-Aktivität	
Reaktionsmischung (s. u.)	100 µl
Farnesyldiphosphat 0,6 (mM)	5 µl
¹⁴ C-Isopentenylpyrophosphat 1.85 GBq mmol ⁻¹ , 1.85 MBq ml ⁻¹	6 µl
Zellfreier Rohextrakt	x µl
<i>T. kok saghyz</i> Latexpartikel (gewaschen)	20 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 200 µl

Reaktionsmischung	
Tris	100 mM
KCl	60 mM
MgCl ₂	4 mM
ZnCl ₂	10 mM
Dithiothreitol	10 mM
KF	40 mM
Desoxychelat	0,2 mM, pH 7,4

Der Reaktionsansatz wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, für 4 h bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 0,6 ml 1-Butanol extrahiert. Hierzu wurde nach Zugabe von 1-Butanol der Reaktionsansatz auf einem Vortex-Schüttler des Typs VV3 (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit passendem Reaktionsgefäß-Aufsatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur stark schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 × g. Die sich nun oben befindende 1-Butanol-Phase wurde vorsichtig ohne Beschädigung der mittleren Proteinschicht abgenommen und direkt in ein Szintillationsgefäß mit 3 ml

IRGASAFE plus Szintillationscocktail (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) überführt. Die übrige wässrige Phase und die Proteinschicht wurden 2 mal mit 0,6 ml Toluol/Hexan (Mischungsverhältnis 1 : 1) auf die gleiche Weise extrahiert. Hierbei wurden die vereinigten Toluol/Hexan Extrakte ebenfalls einem Szintillationsgefäß mit 3 ml IRGASAFE plus Szintillationscocktail zugeführt und abschließend die Zerfallsrate (Zerfälle pro Minute, DPM) in einem Szintillationszähler (LS 6500) gemessen. Das Ergebnis dieses Enzymtests ist beispielhaft für die von den Genen *hrt2-jk*, *cpt1-tk* (SEQ.-ID-Nr. 01) und *srpp3-tk* (SEQ.-ID-Nr. 07) kodierten Enzyme in der Abbildung 5 dargestellt.

Verfahren zur ¹³C-Markierung von Polyisopren in rekombinanten Escherichia coli Bakterien

Schritt 1: Einbau-Experimente mit ¹³C-markierter 1-Desoxy-D-xylulose:

Rekombinante *E. coli*-Stämme wurden in TB-Medium (100 ml) mit apropriatem Antibiotikum angezogen, und die Kulturen bei 37 °C unter Schütteln bebrütet. Die Kulturen wurden optional bei einer optischen Dichte von 0.8 (bei 600 nm, OD₆₀₀) mit 0,2 mM IPTG induziert und bei 22 °C weiter unter Schütteln bebrütet. Bei einer OD₆₀₀ von 2,3 wurden eine sterile Lösung von 1 g Lithiumlactat und 6.4 mg [3,4,5-¹³C₃]1-Desoxy-D-xylulose (0.05 mmol) in 10 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 zugesetzt, und die Kulturen weiter unter Schütteln bei 22 °C bebrütet. Nach 4 h wurden 50 ml Kulturvolumen entnommen, und die Zellen mittels Zentrifugation abgetrennt, mit 0,9 %er (v/v) Saline gewaschen und bei -20 °C gelagert. Die restlichen 50 ml wurden für mindestens weitere 10 h bei 22 °C unter Schütteln bebrütet. Bei

einer OD₆₀₀ von 10 wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und gelagert.

Schritt 2: Extraktion und Nachweis von Polyisoprenverbindungen.

Die in Schritt 1 gewonnenen Zellen werden lyophilisiert, mit 1 ml deuteriertem Methylenchlorid (CD₂Cl₂) oder anderen deuterierten apolaren Lösungsmitteln suspendiert und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln extrahiert. Anschließend wird die Probe 15 min bei 13,000 Upm zentrifugiert, und der Überstand einer ¹³C-NMR-spektroskopischen Analyse unterworfen.

Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass ¹³C NMR Signale von cis- und trans-Polyisopren unterschiedlich sind (vgl. Abbildung 8 und Tabelle 1). Insbesondere die in Fettdruck angezeigten Signallagen sind spezifisch für das Vorliegen einer cis- bzw. trans-Konfiguration.

Tabelle 1: NMR-Daten von 10 mg trans- bzw. cis-1,4-Polyisopren (Referenzprobe) gelöst in 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel. Die Messungen erfolgten bei 125 MHz an einem DRX500 Spektrometer (¹³C-NMR), bzw. Avance 500 Spektrometer (COSY, HMBC) der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland). Die Messtemperatur betrug 27 °C. Die Messparameter waren Standardwerte, die in der Brukersoftware TOPSPIN 1.1 implementiert sind.

Position	Chemische Verschiebung ¹		Korrelationen		¹³ C-NMR Vergleichsdaten ²	
	¹ H [ppm]	¹³ C [ppm]	COSY	HMBC	Cis-Polyisopren	Trans-Polyisopren
1	2.1 (2.1)	27 (27)	2	4	26.3	26.4
2	5.2 (5.2)	124 (124)	1, 5 (w)	5, 1, 4	124.8	123.9

3		134 (134)		1, 5	134.8	134.5
4	2.1 (2.0)	31 (39)		5, 1	31.8	39.3
5	1.7 (1.6)	21 (14)	1 (w)	4	22.9	15.3

¹kommerziell erhältliche Mischung von trans-Polyisopren (Hauptkomponente) und cis-Polyisopren (Minorkomponente) gemessen in CD₂Cl₂, THF-d₈ oder Aceton-d₆; in Klammern sind die Verschiebungswerte der Minorkomponente (cis-Polyisopren) angegeben. Die Signalzuordnungen wurden durch zwei-dimensionale COSY und HMQC Spektren verifiziert. Die Signalzuordnungen sind im Einklang mit früher publizierten Daten (Duch and Grant, 1970).

²gemessen in CD₂Cl₂ (Duch and Grant, 1970)

Die Kettenlänge von gebildeten Produkten kann abgeschätzt werden auf der Basis von Signalen, die aus C-Atomen am Ende der Kette hervorgerufen werden. Hier ist von Bedeutung, dass am Kettenende eine OH oder OPP an C-1 gebunden ist und das entsprechende Carbinolsignal bei etwa 60 ppm beobachtbar ist. Durch Vergleich der NMR Intensitäten des C-1 Signals der terminalen Isopreneinheit (60 ppm) mit den Signalen für C-1 aus der Kette (27 ppm) kann die Anzahl der Isopreneinheiten und somit das Molekulargewicht abgeschätzt werden.

Die Zuordnung der NMR Signale zu cis- bzw. trans-Polyisoprenverbindungen kann aufgrund von Tabelle 1 vorgenommen werden. Für die Unterscheidung der beiden Substanzklassen können insbesondere die Signale für C-4 und C-5 herangezogen werden. Durch die verwendete Markierungsstrategie kann im vorliegenden

Beispiel das Signal von C-4 als Grundlage dienen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: ^{13}C -NMR-Daten von $[1,2,4-^{13}\text{C}_3]$ trans-1,4-Polyisopren aus einem typischen Markierungsexperiment im Vergleich zu ^{13}C -NMR-Literaturdaten von cis- und trans-Polyisopren. Die in der Struktur mit gefüllten Kreisen markierten Atome stammen aus den Positionen 3-5 von $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose. Aufgrund der ^{13}C -Markierung können im ^{13}C -NMR Spektrum die entsprechenden Signale mit hoher Empfindlichkeit und Spezifität gemessen werden. Aufgrund der mehrfachen ^{13}C -Markierung werden skalare ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen im ^{13}C -NMR Spektrum beobachtet. Das Auftreten dieser Kopplungen belegt, dass die beobachteten Polyisoprene aus $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]$ 1-Desoxy-D-xylulose entstanden sind.

Position	Chemische Verschiebung ¹	Kopplungen	^{13}C -NMR Vergleichsdaten ²	
			Cis-Polyisopren	Trans-Polyisopren
	^{13}C [ppm]	Jcc [Hz]		
1	26.3 (dd)	44, 34	26.3	26.4
2	124.2 (d)	44	124.8	123.9
4	39.5 (d)	34.3	31.8	39.3

¹gemessen in Aceton-d₆

²gemessen in CD₂Cl₂ (Duch and Grant, 1970)

Die Quantifizierung von cis- bzw. trans-Polyisopren kann durch interne Standardisierung auf das ^{13}C -NMR Signal des Lösungsmittel CD₂Cl₂ vorgenommen werden.

Abbildung 9 zeigt relevante Ausschnitte aus den ^{13}C NMR Spektren der Rohextrakte von *E. coli* Tuner(DE3) pACYC184; pCDFDuet-1::DXIPP und *E. coli* Tuner(DE3) pMR07-EK; pCDFDuet-1::DXIPP.

Die ^{13}C NMR-Spektren der Extrakte zeigten eindeutige NMR Signale von ^{13}C -markierten apolaren Polyisoprenverbindungen. Es konnten drei ^{13}C -gekoppelte Signale mit hoher Intensität detektiert werden. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten waren im besten Einklang mit Vergleichsdaten zu Polyisoprenverbindungen (siehe Tabelle 1). Das in beispielsweise in Abbildung 9 beobachtete Signal bei 39.5 ppm ist spezifisch für C-4 einer trans-konfigurierten Verbindung.

Die Spektren wurden auf das Lösungsmittelsignal von CD_2Cl_2 (53.5 ppm) skaliert. Hierzu wurde das Zentralsignal des Quintetts (aufgrund der Kopplung mit zwei Deuteriumatomen in CD_2Cl_2) auf einen Integralwert von 1.0 skaliert (siehe Abbildung 2). Der Nachweis von trans- bzw. cis-Polyisopren erfolgte durch die spezifischen Signale der C-Atome 4 bei 39.5 ppm (trans), bzw. 31.9 ppm (cis). In beiden Spektren können die entsprechenden Signale detektiert werden, allerdings mit unterschiedlichen relativen Signalintensitäten, im speziellen für das Signal bei 31.9 ppm für cis-Polyisopren. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration von jeweils einer (gut separierten) Signalkomponente der jeweiligen Dubletts für die Signale von C-4 (hervorgerufen durch ^{13}C - ^{13}C Kopplung mit ^{13}C -1 der benachbarten Isopreneinheit (vgl. auch Beispiel 2). Die in Abbildung 9 dokumentierten Integralwerte dokumentierten eine Steigerung der Gesamtmenge an Polyisopren durch die Anwesenheit von Plasmid pMR07-EK. Genauer gesagt, kann eine Steigerung von 0.77 auf 0.94 (relative Integralwerte) beobachtet werden. Das entspricht einer Steigerung um 22 %.

Die beobachtete Steigerung kann insbesondere auf die gesteigerte Menge an cis-Polyisopren zurückgeführt werden, bei der der relative Integralwert von 0.06 auf 0.10 angestiegen war. Das entspricht einer Steigerung von 67 % für die cis-

Polyisoprenverbindung durch das Plasmid pACYC184. Im Falle von trans-Polyisopren stieg der Integralwert von 0.71 auf 0.84 (Steigerung um 18 %).

Patentansprüche:

1. Eine Zelle, welche gegenüber ihrem Wildtyp derart gentechnisch modifiziert wurde, dass sie in definierten Kompartimenten eingeschlossene Isoprenoide zu bilden vermag.
2. Die Zelle nach Anspruch 1, wobei die Zelle im Vergleich zu ihrem Wildtyp mehr in den definierten Kompartimenten eingeschlossene Isoprenoide zu bilden vermag.
3. Die Zelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Bakterien-Zellen und Hefe-Zellen.
4. Die Zelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Isoprenoid um ein Polyisopren handelt.
5. Die Zelle nach Anspruch 4, wobei das Polyisopren Poly-cis-Isopren, Poly-trans-Isopren oder einer Mischung aus Poly-cis-Isopren und Poly-trans-Isopren ist.
6. Zelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in der Zelle die Expression mindestens eines Enzyms, welches in die Herstellung von Polyisoprenen involviert ist, besonders bevorzugt die Expression eines Enzyms ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Gummi-Bindeprotein („*rubber binding protein*“), einem Gummi-Verlängerungsfaktor („*rubber enlongation*“)

factor") und einer Prenyl-Transferase im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist.

7. Die Zelle nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp gesteigerte Aktivität eines Enzyms E₁ aufweist, welches die Übertragung einer Isopentenyl-diphosphat-Einheit auf einen allylischen Diphosphat-Initiator katalysiert.
8. Zelle nach Anspruch 7, wobei das Enzym E₁ eine Prenyl-Transferase, vorzugsweise eine cis-1,4-Prenyl-Transferase ist.
9. Die Zelle nach Anspruch 8, wobei die Prenyl-Transferase von einer DNA kodiert wird, welche ausgewählt ist aus den folgenden Sequenzen:
 - a) eine Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07,
 - b) eine intronfreie Sequenz, die von einer Sequenz nach a) abgeleitet ist und das gleiche Protein oder Peptid kodiert wie die Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07
 - c) eine Sequenz, die ein Protein oder Peptid kodiert, das die Aminosäure-Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14 umfasst,
 - d) eine Sequenz, die mit einer Sequenz nach a) bis c) zu mindestens 80% identisch ist,

- e) eine Sequenz, die mit dem Gegenstrang einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde,
 - f) ein durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenes Derivat einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis e),
 - g) eine Sequenz, die der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07 innerhalb der Degeneration des genetischen Codes entspricht,
 - h) eine Sequenz mit neutralen Sinnmutationen der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, sowie
 - i) eine komplementäre Sequenz zu einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis h).
10. Die Zelle nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei in der Zelle zusätzlich zur Aktivität des Enzyms E₁ auch die Aktivität mindestens eines der Enzyme E₂ bis E₆ erhöht ist:
- eines Enzyms E₂, welches die Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A katalysiert;
 - eines Enzyms E₃, welches die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonat katalysiert;

- eines Enzyms E₄, welches die Umsetzung von Mevalonat zu Mevalonat-5-phosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₅, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-phosphat zu Mevalonat-5-diphosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₆, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-diphosphat zu Isopentenyl-diphosphat katalysiert.

11. Die Zelle nach Anspruch 10, wobei das Enzym

- E₂ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase (EC 2.3.3.1.10),
E₃ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (EC 1.1.1.34),
E₄ eine Mevalonat-Kinase (EC 2.7.1.36),
E₅ eine Phosphomevalonat-Kinase (EC 2.7.4.1), und
E₆ eine Diphosphomevalonat-Decarboxylase (EC 4.1.1.33),

ist.

12. Die Zelle nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei in der Zelle zusätzlich zur Aktivität des Enzyms E₁ auch die Aktivität mindestens eines der Enzyme E₇ bis E₁₃ erhöht ist:

- eines Enzyms E₇, welches die Umsetzung von D-Glyceraldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₈, welches die Umsetzung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat katalysiert;

- eines Enzyms E₉, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol katalysiert;
- eines Enzyms E₁₀, welches die Umsetzung von 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol zu 2-Phospho-4-(cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol katalysiert;
- eines Enzyms E₁₁, welches die Umsetzung von 2-Phospho-4-(cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol zu 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₁₂, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat katalysiert;
- eines Enzyms E₁₃, welches die Umsetzung von 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat zu Isopentenyl-diphosphat katalysiert.

13. Die Zelle nach Anspruch 12, wobei das Enzym

E₇ eine 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (EC 2.2.1.7),

E₈ eine 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (EC 1.1.1.267),

E₉ eine 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-cytidylyl-Transferase (EC 2.7.7.60),

E₁₀ eine 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol-Kinase (EC 2.7.1.148),

E₁₁ eine 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (EC 4.6.1.12),

E₁₂ eine 4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl-diphosphat-Synthase (EC 1.17.4.3), und

E₁₃ eine 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat-Reduktase (EC 1.17.1.2)

ist.

14. Ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, umfassend den Verfahrensschritt der Erhöhung der Expression eines Enzyms ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Gummi-Bindeprotein („*rubber binding protein*“), einem Gummi-Verlängerungsfaktor („*rubber enlongation factor*“) und einer Prenyl-Transferase in der Zelle.
15. Das Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Bakterien-Zellen und Hefe-Zellen.
16. Eine Zelle, erhältlich durch ein Verfahren nach 14 oder 15.
17. Ein Verfahren zur Herstellung von Isoprenoiden, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:
 - i) in Kontakt bringen einer Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder 16 mit einem Kulturmedium beinhaltend mindestens eine Kohlenstoffquelle unter Bedingungen, unter denen die Zelle aus der Kohlenstoffquelle Isoprenoide zu bilden vermag, welche in definierten Kompartimenten in der Zelle eingeschossen werden;
 - ii) Isolierung der in den definierten Kompartimenten eingeschlossenen Isoprenoide.

18. Das Verfahren nach Anspruch 17, wobei der Verfahrensschritt ii) folgende Verfahrensschritte umfasst;
 - iia) Aufschließen der Zellen unter Erhalt eines Zelllysates, welches die definierten Kompartimente der Zelle umfasst, in denen die Isoprenoide eingeschlossen sind;
 - iib) Abtrennen der definierten Kompartimente, in denen die Isoprenoide eingeschlossen sind, aus dem Zelllysate;
 - iic) gegebenenfalls Reinigung der abgetrennten, definierten Kompartimente.
19. Isoprenoide, erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 17 oder 18.
20. Eine isolierte Nukleinsäure, deren Sequenz ausgewählt ist aus den folgenden Sequenzen:
 - a) eine Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07,
 - b) eine intronfreie Sequenz, die von einer Sequenz nach a) abgeleitet ist und das gleiche Protein oder Peptid kodiert wie die Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07,
 - c) eine Sequenz, die ein Protein oder Peptid kodiert, das die Aminosäure-Sequenz nach SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-

- Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14 umfasst,
- d) eine Sequenz, die mit einer Sequenz nach a) bis c) zu mindestens 80% identisch ist,
 - e) eine Sequenz, die mit dem Gegenstrang einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde,
 - f) ein durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenes Derivat einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis e),
 - g) eine Sequenz, die der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07 innerhalb der Degeneration des genetischen Codes entspricht,
 - h) eine Sequenz mit neutralen Sinnmutationen der SEQ.-ID-Nr. 01, SEQ.-ID-Nr. 02, SEQ.-ID-Nr. 03, SEQ.-ID-Nr. 04, SEQ.-ID-Nr. 05, SEQ.-ID-Nr. 06 oder SEQ.-ID-Nr. 07, sowie
 - i) eine komplementäre Sequenz zu einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis h).
21. Ein isoliertes Polypeptid, welches die Aminosäure-Sequenz mit der SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14, oder eine Aminosäuresequenz, die eine Identität von mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 55 %, darüber hinaus bevorzugt mindestens 60 %, darüber hinaus bevorzugt mindestens 65 % und am meisten bevorzugt mindestens

70 % zur Aminosäure-Sequenz gemäß SEQ.-ID-Nr. 08, SEQ.-ID-Nr. 09, SEQ.-ID-Nr. 10, SEQ.-ID-Nr. 11, SEQ.-ID-Nr. 12, SEQ.-ID-Nr. 13 oder SEQ.-ID-Nr. 14 besitzt, aufweist.

Abbildung 1

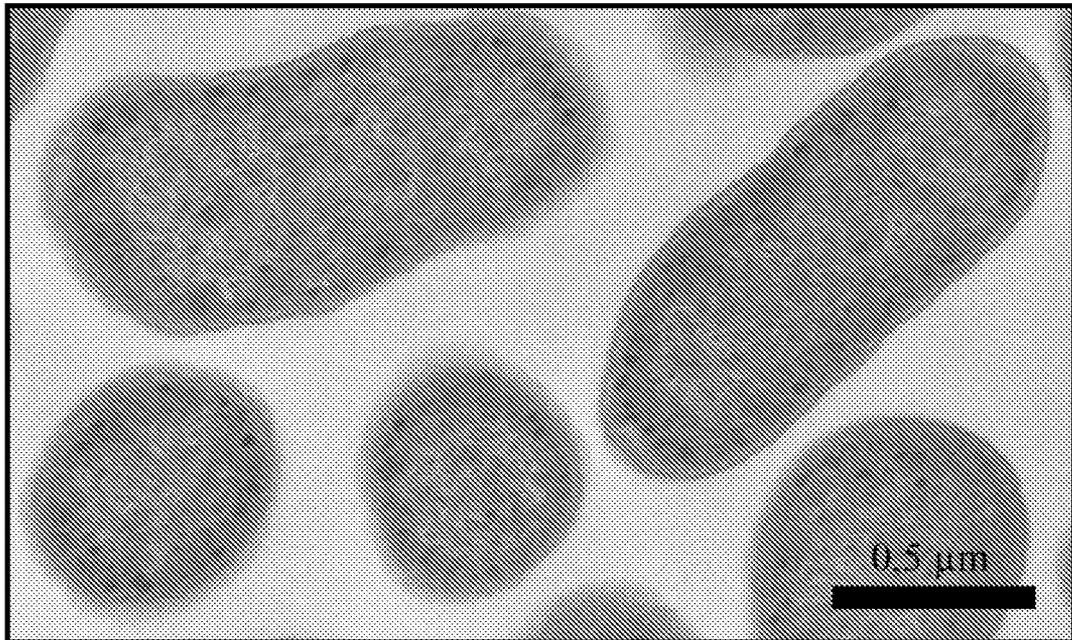


Abbildung 2

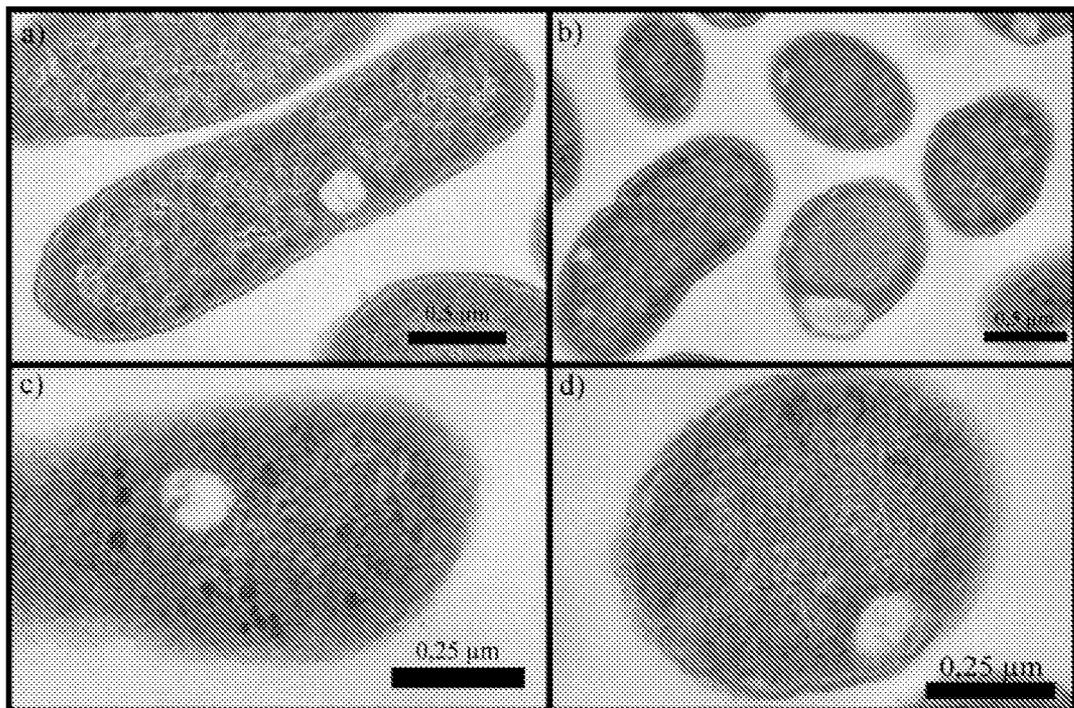


Abbildung 3

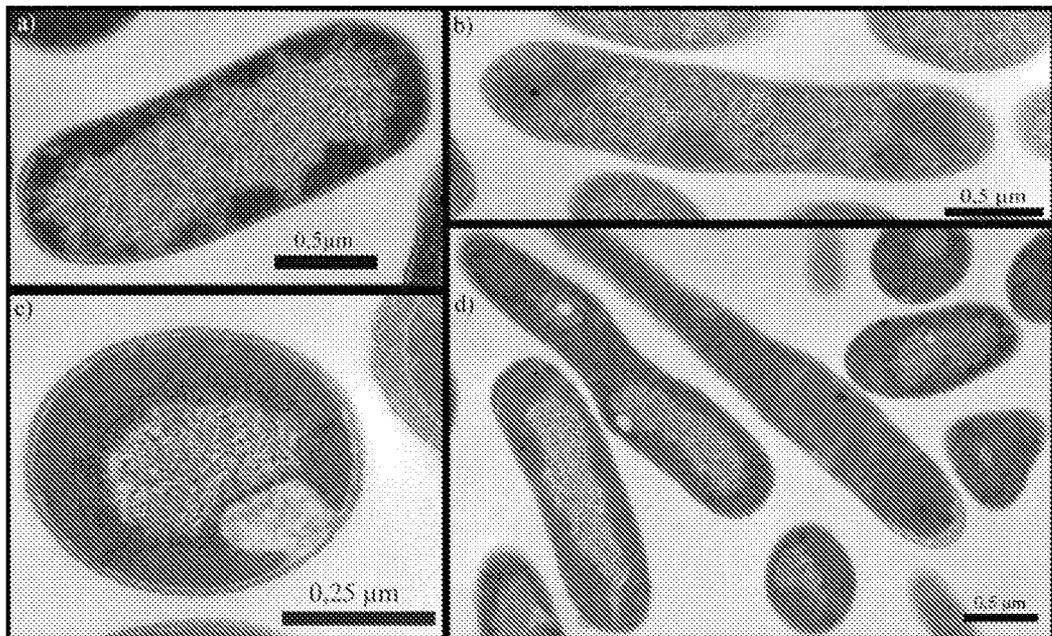


Abbildung 4

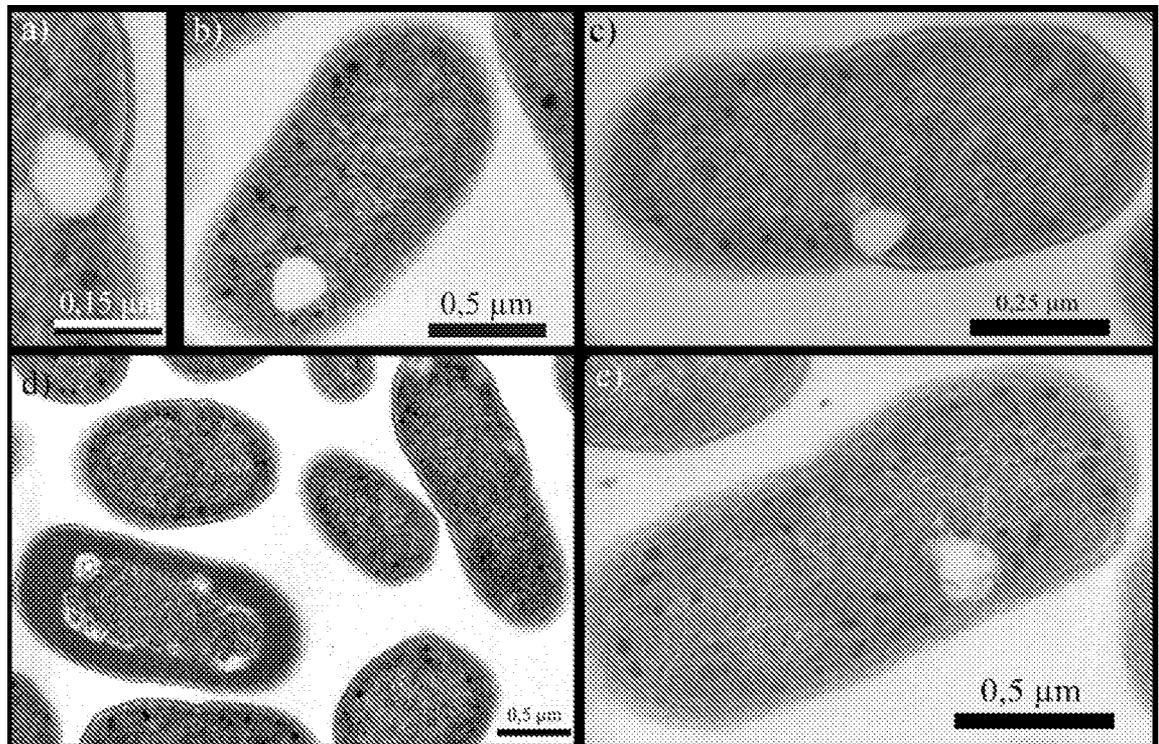


Abbildung 5

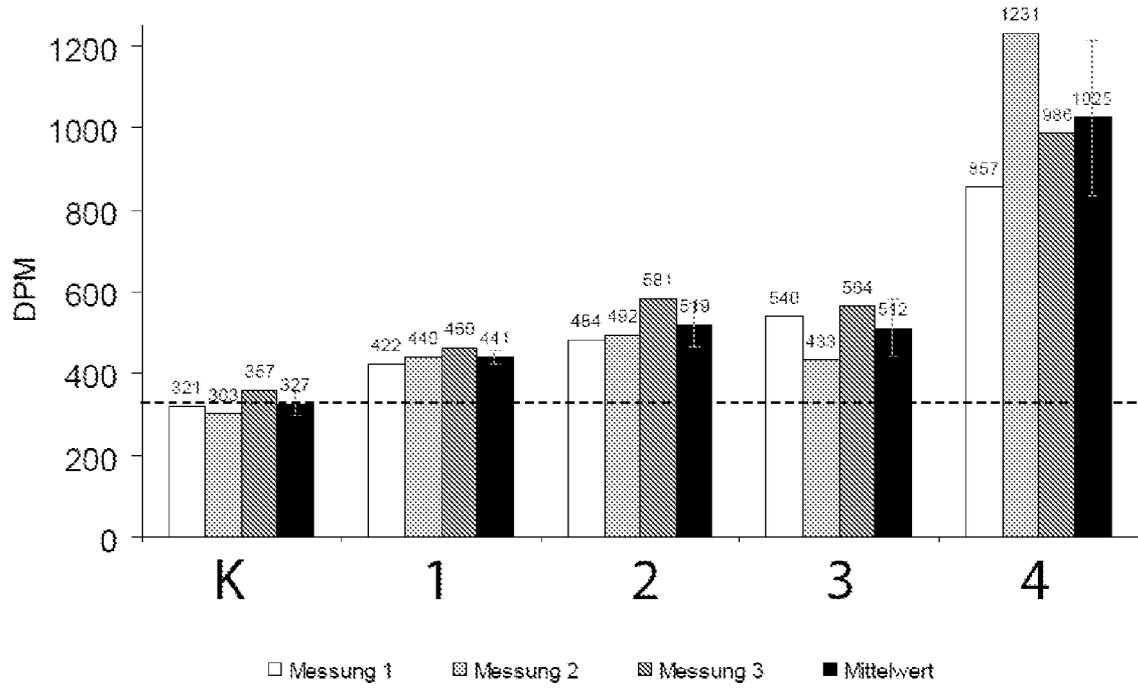


Abbildung 6



Abbildung 7

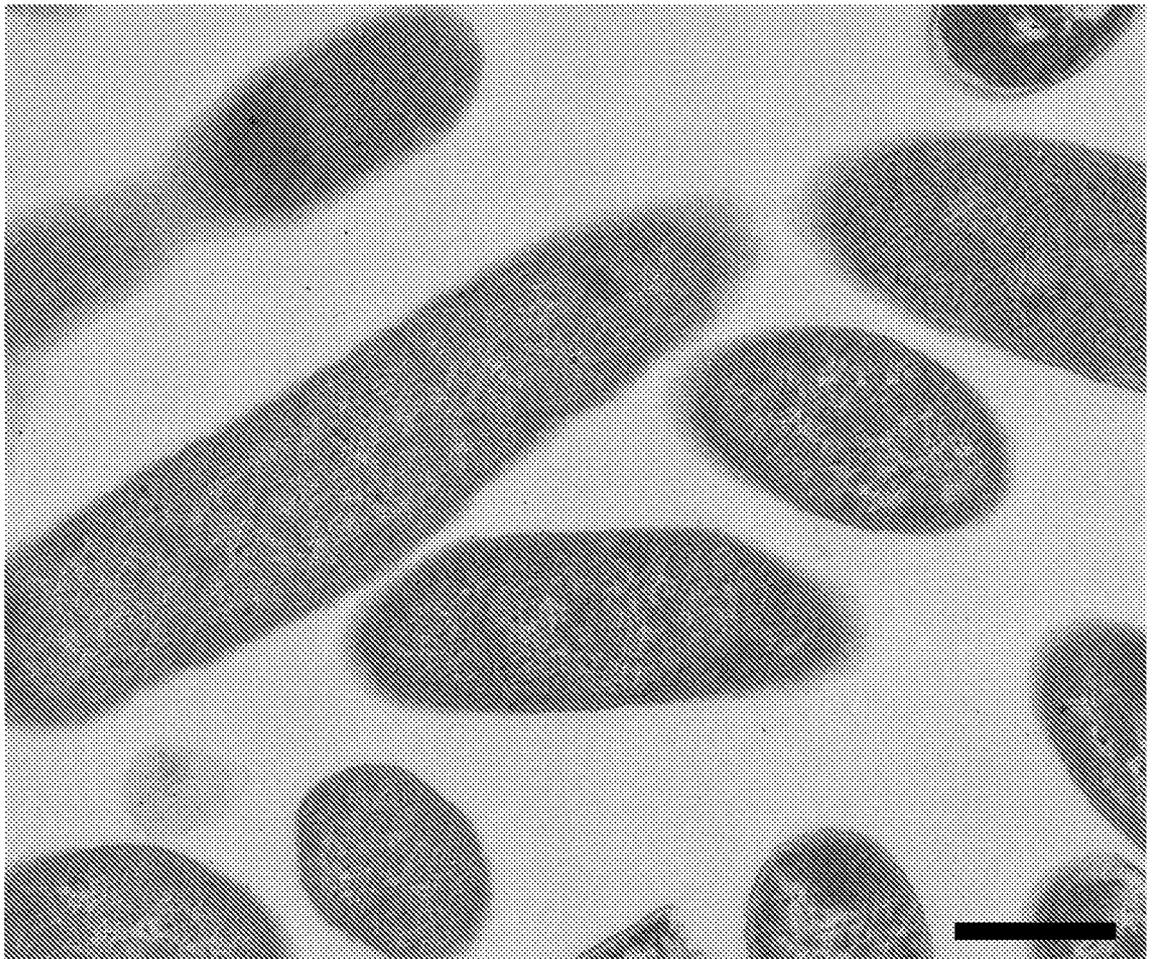


Abbildung 8

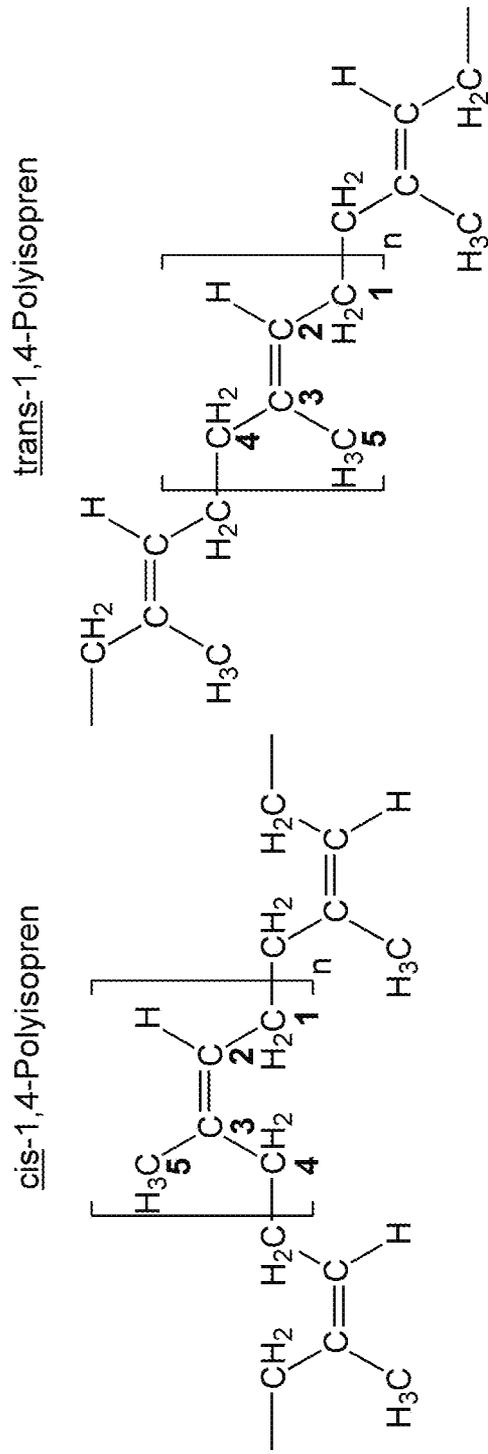
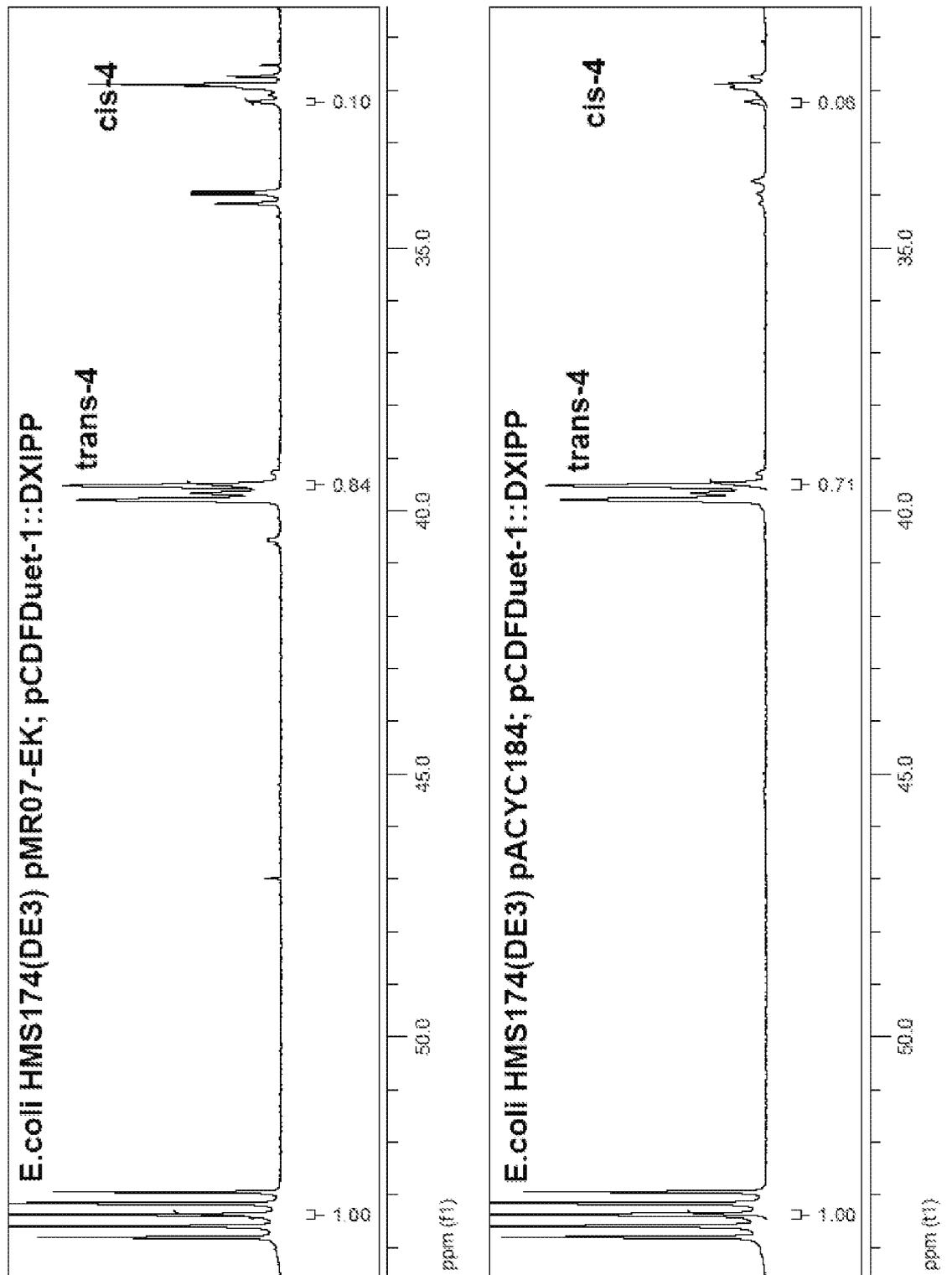


Abbildung 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/061471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/10 C12P23/00
ADD. C12R1/01 C12R1/645

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12R C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>STEINBÜCHEL ALEXANDER: "Production of rubber-like polymers by microorganisms." CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY JUN 2003, vol. 6, no. 3, June 2003 (2003-06), pages 261-270, XP002505167 ISSN: 1369-5274 das ganze Dokument, insbesondere S. 265-266 und S.267, 3. Paragraph der rechten Spalte</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	<p>1-8, 10-19</p>

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 2008

Date of mailing of the international search report

11/12/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bassias, Ioannis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/061471

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PAN Z ET AL: "CLONING, CHARACTERIZATION AND HETEROLOGOUS EXPRESSION OF CDNAS OF FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE FROM THE GUAYULE RUBBER PLANT REVEALS THAT THIS PRENYLTRANSFERASE OCCURS IN RUBBER PARTICLES" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, vol. 332, no. 1, 1 August 1996 (1996-08-01), pages 196-204, XP002907976 ISSN: 0003-9861 the whole document</p>	1-8, 10-19
X	<p>MARTIN VINCENT J J ET AL: "Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 7, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 796-802, XP002420804 ISSN: 1087-0156 the whole document</p>	1-8, 10-19
X	<p>ASAWATRERATANAKUL KASEM ET AL: "Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from Hevea brasiliensis: A key factor participating in natural rubber biosynthesis" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, vol. 270, no. 23, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 4671-4680, XP002299740 ISSN: 0014-2956 the whole document</p>	1-8, 10-19
X	<p>US 2006/225144 A1 (HALLAHAN DAVID L [US] ET AL) 5 October 2006 (2006-10-05) das ganze Dokument, insbesondere SEQ ID NO: 3</p>	20,21
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 24 March 2006 (2006-03-24), "CTOY12485.b1_I02.ab1 CTO(XYZ) dandelion Taraxacum officinale cDNA clone CTOY12485, mRNA sequence." XP002505169 retrieved from EBI accession no. EMBL:DY820564 Database accession no. DY820564 the whole document</p>	20,21

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/061471

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 24 March 2006 (2006-03-24), "CTOY16371.b1_E14.ab1 CTO(XYZ) dandelion Taraxacum officinale cDNA clone CTOY16371, mRNA sequence." XP002505170 retrieved from EBI accession no. EMBL:DY824764 Database accession no. DY824764. the whole document</p>	20, 21
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 28 June 2005 (2005-06-28), "TKN075G09_631146 Taraxacum kok-saghyz root cDNA library Taraxacum kok-saghyz cDNA clone TKN075G09 5, mRNA sequence." XP002505171 retrieved from EBI accession no. EMBL:DR401812 Database accession no. DR401812 the whole document</p>	20, 21
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 24 March 2006 (2006-03-24), "CTOY758.b1_L22.ab1 CTO(XYZ) dandelion Taraxacum officinale cDNA clone CTOY758, mRNA sequence." XP002505172 retrieved from EBI accession no. EMBL:DY832133 Database accession no. DY832133 the whole document</p>	20, 21
X	<p>DATABASE UniProt [Online] 12 June 2007 (2007-06-12), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;" XP002505173 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A5B0Z6 Database accession no. A5B0Z6 the whole document</p>	21
A	<p>US 2007/166782 A1 (KEASLING JAY [US] ET AL) 19 July 2007 (2007-07-19) cited in the application</p>	
A	<p>WO 02/083720 A (BACHER ADELBERT [DE]; ROHDICH FELIX [DE]; ADAM PETRA [DE]; AMSLINGER S) 24 October 2002 (2002-10-24) cited in the application</p>	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/061471

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOOIBROEK H ET AL: "Alternative sources of natural rubber" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 53, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 355-365, XP002505168 ISSN: 0175-7598</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>MAURY JÉRÔME ET AL: "MICROBIAL ISOPRENOID PRODUCTION: AN EXAMPLE OF GREEN CHEMISTRY THROUGH METABOLIC ENGINEERING". ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 100, 5 July 2005 (2005-07-05), pages 19-51, XP009073578 ISSN: 0724-6145</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/061471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006225144 A1	05-10-2006	US 2007199099 A1	23-08-2007
US 2007166782 A1	19-07-2007	US 2003148479 A1	07-08-2003
		US 2004005678 A1	08-01-2004
		US 2007099261 A1	03-05-2007
		US 2007077616 A1	05-04-2007
		US 2007092931 A1	26-04-2007
WO 02083720 A	24-10-2002	AU 2002254984 B2	03-07-2008
		AU 2008229760 A1	30-10-2008
		CA 2443874 A1	24-10-2002
		DE 10201458 A1	17-10-2002
		EP 1377663 A2	07-01-2004
		JP 4068971 B2	26-03-2008
		JP 2005505248 T	24-02-2005
		US 2004176570 A1	09-09-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061471

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12N9/10 C12P23/00
ADD. C12R1/01 C12R1/645

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12N C12R C12P

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

X	<p>STEINBÜCHEL ALEXANDER: "Production of rubber-like polymers by microorganisms." CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY JUN 2003, Bd. 6, Nr. 3, Juni 2003 (2003-06), Seiten 261-270, XP002505167 ISSN: 1369-5274 das ganze Dokument, insbesondere S. 265-266 und S.267, 3. Paragraph der rechten Spalte</p>	<p>1-8, 10-19</p>
---	---	-----------------------

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. November 2008

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/12/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bassias, Ioannis

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061471

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PAN Z ET AL: "CLONING, CHARACTERIZATION AND HETEROLOGOUS EXPRESSION OF CDNAS OF FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE FROM THE GUAYULE RUBBER PLANT REVEALS THAT THIS PRENYLTRANSFERASE OCCURS IN RUBBER PARTICLES"</p> <p>ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, Bd. 332, Nr. 1, 1. August 1996 (1996-08-01), Seiten 196-204, XP002907976 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument</p>	1-8, 10-19
X	<p>MARTIN VINCENT J J ET AL: "Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, Bd. 21, Nr. 7, 1. Juli 2003 (2003-07-01), Seiten 796-802, XP002420804 ISSN: 1087-0156 das ganze Dokument</p>	1-8, 10-19
X	<p>ASAWATRERATANAKUL KASEM ET AL: "Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from Hevea brasiliensis: A key factor participating in natural rubber biosynthesis"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, Bd. 270, Nr. 23, 1. Dezember 2003 (2003-12-01), Seiten 4671-4680, XP002299740 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument</p>	1-8, 10-19
X	<p>US 2006/225144 A1 (HALLAHAN DAVID L [US] ET AL) 5. Oktober 2006 (2006-10-05) das ganze Dokument, insbesondere SEQ ID NO: 3</p>	20,21
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 24. März 2006 (2006-03-24), "CTOY12485.b1_I02.ab1 CTO(XYZ) dandelion Taraxacum officinale cDNA clone CTOY12485, mRNA sequence." XP002505169 gefunden im EBI accession no. EMBL:DY820564 Database accession no. DY820564 das ganze Dokument</p>	20,21

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061471

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 24. März 2006 (2006-03-24), "CTOY16371.b1_E14.ab1 CTO(XYZ) dandelion Taraxacum officinale cDNA clone CTOY16371, mRNA sequence." XP002505170 gefunden im EBI accession no. EMBL:DY824764 Database accession no. DY824764 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	20,21
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 28. Juni 2005 (2005-06-28), "TKN075G09_631146 Taraxacum kok-saghyz root cDNA library Taraxacum kok-saghyz cDNA clone TKN075G09 5, mRNA sequence." XP002505171 gefunden im EBI accession no. EMBL:DR401812 Database accession no. DR401812 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	20,21
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 24. März 2006 (2006-03-24), "CTOY758.b1_L22.ab1 CTO(XYZ) dandelion Taraxacum officinale cDNA clone CTOY758, mRNA sequence." XP002505172 gefunden im EBI accession no. EMBL:DY832133 Database accession no. DY832133 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	20,21
X	<p>DATABASE UniProt [Online] 12. Juni 2007 (2007-06-12), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;" XP002505173 gefunden im EBI accession no. UNIPROT:A5B0Z6 Database accession no. A5B0Z6 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	21
A	<p>US 2007/166782 A1 (KEASLING JAY [US] ET AL) 19. Juli 2007 (2007-07-19) in der Anmeldung erwähnt</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>WO 02/083720 A (BACHER ADELBERT [DE]; ROHDICH FELIX [DE]; ADAM PETRA [DE]; AMSLINGER S) 24. Oktober 2002 (2002-10-24) in der Anmeldung erwähnt</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/061471

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MOOIBROEK H ET AL: "Alternative sources of natural rubber" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 53, Nr. 4, April 2000 (2000-04), Seiten 355-365, XP002505168 ISSN: 0175-7598</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>MAURY JÉRÔME ET AL: "MICROBIAL ISOPRENOID PRODUCTION: AN EXAMPLE OF GREEN CHEMISTRY THROUGH METABOLIC ENGINEERING" ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 100, 5. Juli 2005 (2005-07-05), Seiten 19-51, XP009073578 ISSN: 0724-6145</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061471

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2006225144 A1	05-10-2006	US 2007199099 A1	23-08-2007
US 2007166782 A1	19-07-2007	US 2003148479 A1	07-08-2003
		US 2004005678 A1	08-01-2004
		US 2007099261 A1	03-05-2007
		US 2007077616 A1	05-04-2007
		US 2007092931 A1	26-04-2007
WO 02083720 A	24-10-2002	AU 2002254984 B2	03-07-2008
		AU 2008229760 A1	30-10-2008
		CA 2443874 A1	24-10-2002
		DE 10201458 A1	17-10-2002
		EP 1377663 A2	07-01-2004
		JP 4068971 B2	26-03-2008
		JP 2005505248 T	24-02-2005
		US 2004176570 A1	09-09-2004