

МЕТИЛЭРИТРИТОЛФОСФАТНЫЙ (НЕМЕВАЛОНАТНЫЙ) ПУТЬ БИОСИНТЕЗА ИЗОПРЕНОИДОВ

© 2005 г.

Ю. В. ЕРШОВ

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

I. Введение. II. История открытия метилэритритолфосфатного пути. III. Описание реакций метилэритритолфосфатного пути. IV. Компарментализация и взаимодействие двух путей синтеза изопреноидов. V. Медицинские аспекты наличия нескольких путей синтеза ИП. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

К изопреноидам, также называемых терпеноидами, относят соединения, углеродный скелет которых частично или полностью можно формально представить состоящим из остатков изопрена. Изопреноиды (ИП) синтезируются всеми свободноживущими организмами и образуют очень большую группу разнообразных по структуре и функциям природных соединений. Так, в изданном в 1992 г. «Словаре терпеноидов» описано около 22 тысяч ИП и родственных им веществ [41]. Формулы некоторых представителей различных классов ИП представлены на рис. 1. В клетке, пожалуй, нет такого

Принятые сокращения: ИП — изопреноиды; CDP-ME — 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритол; CDP-ME киназа — 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритолкиназа; CDP-ME синтаза — 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритол синтаза; CDP-ME2P — 2-фосфо-4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритол; CoA — коэнзим А; ЦТР — цитидин трифосфат; DMAPP — диметилаллилдифосфат; DXR — 1-D-дезоксисилулозо-5-фосфат; DXR-редуктоизомераза — 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат-синтаза; EST — экспрессируемые target последовательности; GA3P — глицеральдегид 3-фосфат; HMBPP — (E)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енил дифосфат; HMBP-синтаза — (E)-Гидрокси-3-метил-бут-2-енилдифосфат синтаза; IPP — изопентенилдифосфат; IPP/DMAPP-синтаза — (E)-Гидрокси-3-метил-бут-2-енилдифосфатредуктаза; MEcPP — 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфат; MEcPP синтаза — 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфатсинтаза; MEP — 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат (MEP-путь — биосинтез изопреноидов через MEP); tPHK — транспортные PHK; MVA — мевалоновая кислота (MVA-путь — биосинтез изопреноидов через MVA).

Адрес для корреспонденции: erшов@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 02-04-48077 и INTAS № 03-51-4077 и гранта РФФИ № 05-04-48924.

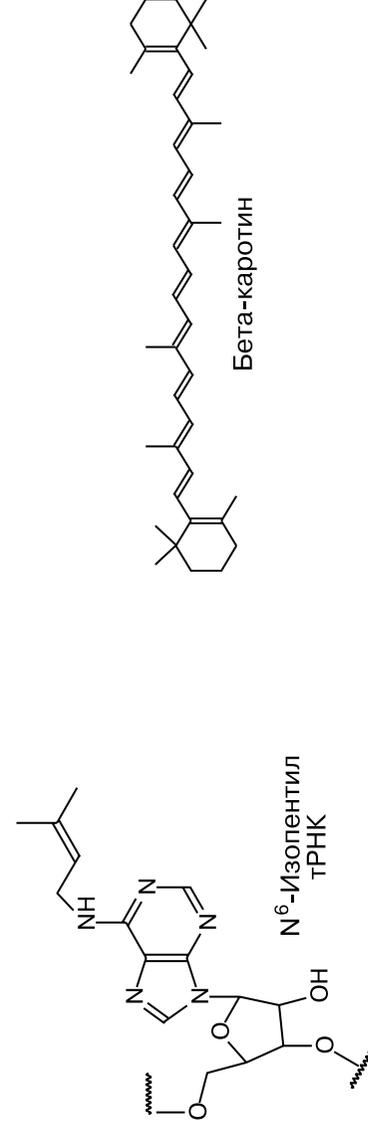
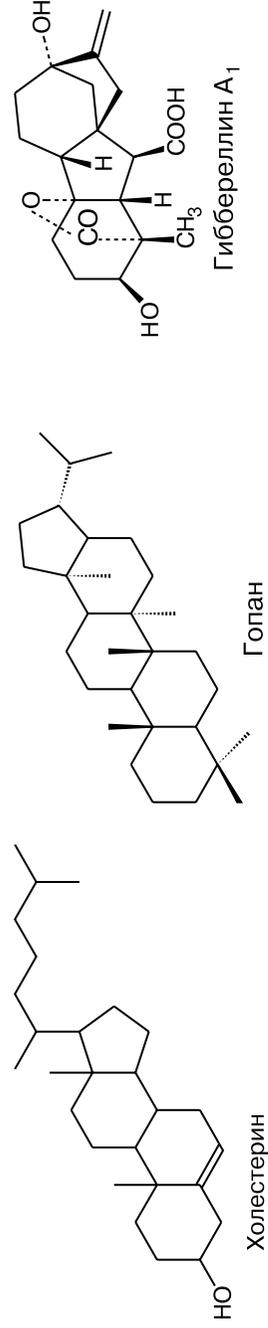
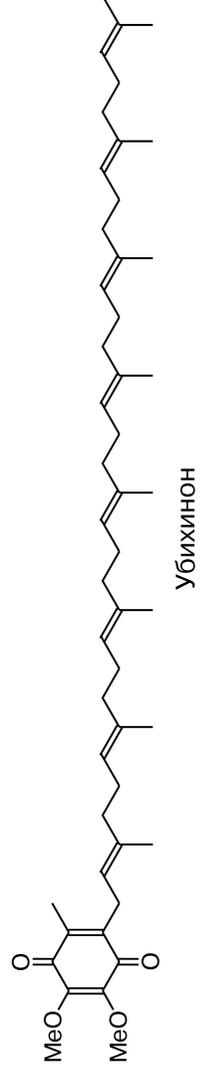
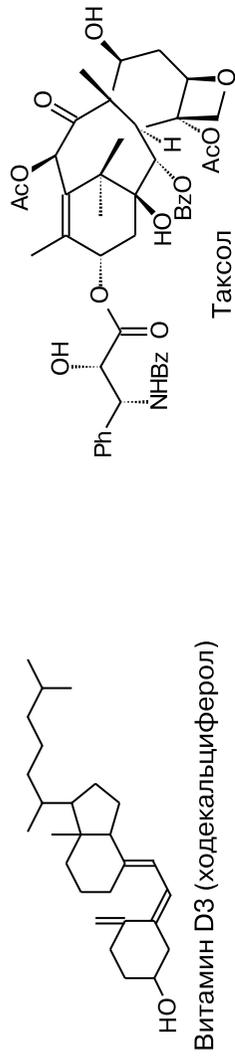
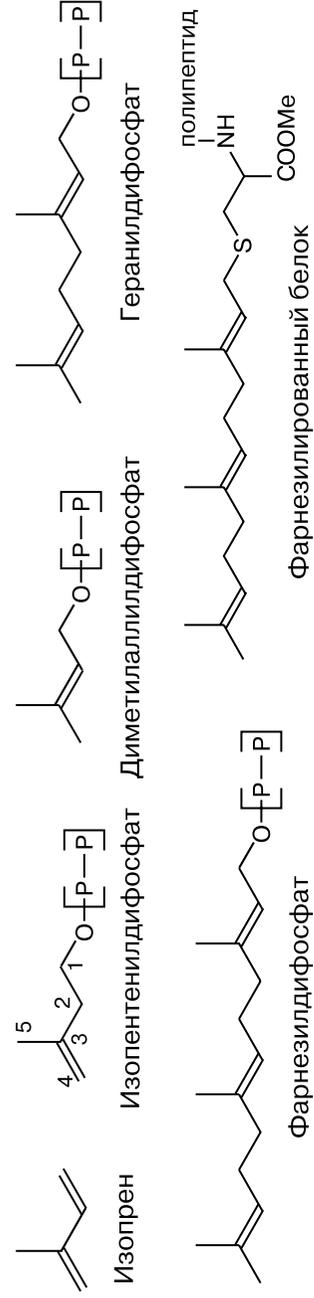


Рис. 1. Формулы представителей различных классов изопреноидов.

Сокращения: Ac – ацетил; Bz – бензоил; Ph – фенил; $\text{[P-P]} = \text{P} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix} \text{P} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix} \text{OH}$.

класса химических веществ, представители которого не участвовали бы в образовании производных с изопреноидами [7, 8]. Сравнительно долго не удавалось обнаружить подобного рода соединений для белков и нуклеиновых кислот. Однако в последние годы выяснилось, что и они не являются исключением. Установлено, что одной из модификаций, которым подвергаются тРНК, а также мононуклеотиды, является присоединение изопентенилдифосфата [87, 95]. Важную роль в процессах передачи сигнала и деления клетки играют пренилированные белки. Причем обнаружено, что на долю белков с присоединенным остатком фарнезилдифосфата или геранилгеранилдифосфата приходится до 1% всех клеточных белков [188].

Изопреноиды играют важную роль в жизнедеятельности клетки. Они участвуют в процессах трансформации энергии (убихинон, пластохинон и др.), в регуляции стабильности мембран (гопаноиды у прокариот, стероиды у эукариот), в процессах роста и развития (витамины А, D, Е, К, предшественники стероидных гормонов, фитогормоны гиббереллин и абсцизовая кислота, ювенильный гормон насекомых), при фотосинтезе (фитольный остаток хлорофилла, каротиноиды), в биосинтезе углеводов, гликолипидов и гликопротеинов (долихолфосфаты) [144, 173].

Огромное количество ИП представлено соединениями, относящимися ко вторичным метаболитам [7]. Обычно им приписывается функция регуляции взаимодействия организма с окружающей средой [33, 43]. В эту группу входят многочисленные ИП растений, привлекающие или отпугивающие животных, обеспечивающие защиту от патогенов или выживание в межвидовой конкурентной борьбе, ароматические и лекарственные вещества (например, таксол – соединение с сильной антираковой активностью), каучук и др. [7, 41, 43]. Несмотря на то, что образование этих соединений наблюдается лишь у ограниченного числа видов, их практическое значение очень велико.

На рис. 2 показаны биогенетическая связь и локализация синтеза разных классов ИП. Несмотря на большое разнообразие структур, все они синтезируются всего лишь из двух разветвленных пятиуглеродных фосфорилированных предшественников. Важно отметить, что сам изопрен в синтезе ИП не участвует, хотя по историческим причинам его название закрепилось за всем классом этих соединений. Реальными же предшественниками, называемыми иногда «изопреновыми единицами», являются изопентенилдифосфат (IPP) и диметилаллилдифосфат (DMAPP).

До недавнего времени считалось, что биосинтез этих простых предшественников осуществляется из ацетил СоА через стадию образования мевалоновой кислоты (MVA). По названию этого специфического продукта и сам путь был назван мевалонатным [144].

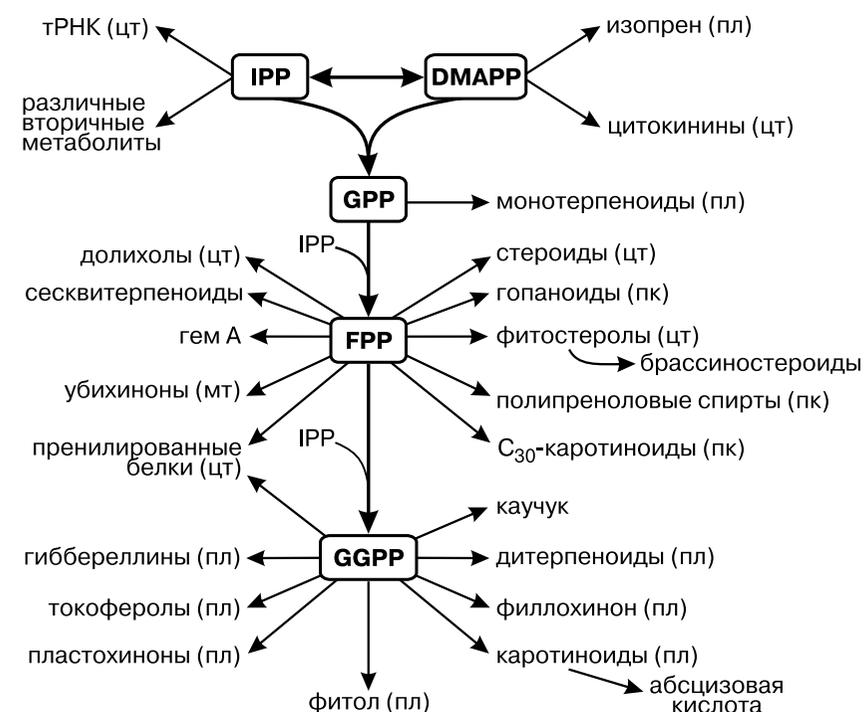


Рис. 2. Биогенез и локализация синтеза разных классов изопреноидов. Место синтеза указано в скобках (при отсутствии информации или при множественной локализации не приводится).

Сокращения: мт – митохондрии; ПК – прокариоты; пл – пластиды; цт – цитозоль; DMAPP – диметилаллилдифосфат; FPP – фарнезилдифосфат; GPP – геранилдифосфат; GGPP – геранилгеранилдифосфат; IPP – изопентенилдифосфат.

В самые последние годы, однако, неожиданно выяснилось, что начальные этапы синтеза ИП в разных таксономических группах не идентичны и существует, по крайней мере, два различных пути биосинтеза [см. обзоры 9, 49, 54, 97, 109, 110, 156, 162, 167, 168, 205]. По классическому мевалонатному пути ИП синтезируются у животных и человека, в дрожжах, археобактериях и некоторых других видах микроорганизмов, а также в цитозоле растительной клетки. В то же время у эубактерий, нескольких внутриклеточных паразитов, у зеленых водорослей и в хлоропластах растений обнаружен особый – немевалонатный – путь синтеза изопреноидов [54, 109, 110, 178], который обозначался различными терминами (путь Ромера, альтернативный путь синтеза ИП, глицеральдегидтрифосфат-пируватный путь, DXР-путь). В настоящее время наиболее часто его называют «метилэритритол-

фосфатный путь» (MEP-путь), поскольку именно метилэритритол-фосфат (или точнее 2-С-метил-Д-эритритол-4-фосфат) является первым специфическим продуктом, с которого начинается биосинтез.

За исключением высших растений и, возможно, простейших, имеющих апикопласт (например, малярийный плазмодий), только у *Listeria monocytogenes* [27] и некоторых представителей порядка *Actinomycetales* (*Streptomyces* и *Actinoplanes*), относящихся к эубактериям [11], обнаружен полный набор генов обоих путей [71, 100, 183]. В свете этого кажется понятным, почему фосмидомицин – первый и по сути пока единственный специфический ингибитор нового пути, был обнаружен именно в *Streptomyces* [96, 131]. Важно отметить, что среди микроорганизмов, синтезирующих изопреноиды только этим путем, около 50 являются патогенами (возбудители туберкулеза, чумы, тифа, сибирской язвы, холеры и др. [53, 196]).

Неожиданность открытия пути синтеза, альтернативного мевалонатному, высокая научная и практическая значимость проблемы привлекли к ней внимание специалистов из самых разных областей – биохимиков, химиков, молекулярных биологов, генетиков. Сочетание традиционных и новых методических подходов (например, геномики и протеомики) обусловило поразительно быстрый (1996–2002 годы) прогресс в изучении и расшифровке всех этапов этого сложного метаболического пути (возможно, одного из последних эволюционно консервативных).

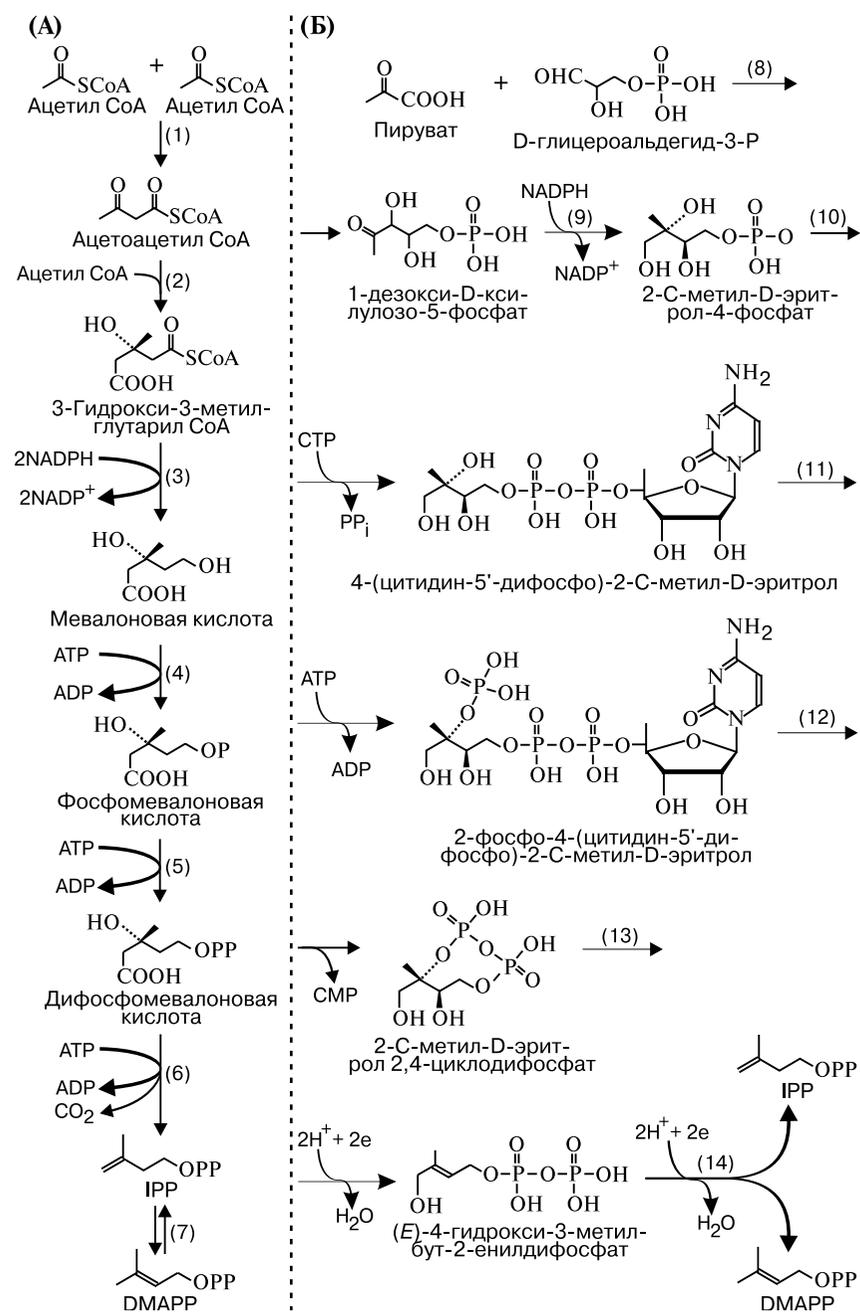
II. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ МЕТИЛЭРИТРИТОЛФОСФАТНОГО ПУТИ

На рис. 3 приведены два известных в настоящее время пути биосинтеза изопреноидов.

MVA-путь будет рассмотрен кратко – только в той степени, чтобы проиллюстрировать историю открытия альтернативного пути и подчеркнуть главные различия между ними. Схема реакций мевалонатного пути приведена на рис. 3 (А) [144].

Рис. 3. Пути биосинтеза изопреноидов. (А) – Мевалонатный, (Б) – MEP-путь.

Ферменты, катализирующие реакции: (1) – ацетил-СоА ацетилтрансфераза; (2) – 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА синтаза; (3) – 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА редуктаза; (4) – мевалонаткиназа; (5) – фосфомевалонаткиназа; (6) – дифосфомевалонатдекарбоксилаза; (7) – IPP изомераза; (8) – DXP-синтаза (1-Д-дезоксисилулозо-5-фосфат синтаза); (9) – DXP редуктоизомераза (2-С-метил-Д-эритритол 4-фосфат синтаза); (10) – MEP-цитидилтрансфераза (4-дифосфотидин-2С-метил-Д-эритритол синтаза); (11) – цитидил-метилэритритолкиназа; (12) – 2-С-метил-Д-эритритол 2,4-циклодифосфатсинтаза; (13) – HMBP-синтаза (гидрокси-3-метил-бут-2-енилдифосфат синтаза); (14) – IPP/DMAPP-синтаза ((Е)-гидрокси-3-метил-бут-2-енилдифосфат редуктаза).



Биосинтез ИП по этому пути начинается с конденсации 3-х молекул ацетил СоА с образованием 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА, который при участии NADPH-зависимой редуктазы превращается в первый специфический продукт — мевалоновую кислоту. Эту реакцию ингибирует мевинолин — специфический ингибитор MVA-пути. Последовательное присоединение в АТР-зависимых реакциях трех фосфатных групп, сопряженное на последнем этапе с декарбоксилированием, приводит к образованию изопентенилдифосфата (IPP), называемого также «активным изопреном». У животных и других организмов, использующих этот путь, вторая C_5 -молекула, необходимая для синтеза сложных изопреноидов (политерпеноидов), а именно DMAPP, образуется в реакции, катализируемой IPP-изомеразой. Последующая конденсация IPP и DMAPP дает начало всему разнообразию изопреноидов.

В течение многих лет представления о том, что биосинтез пятиуглеродных предшественников ИП у всех организмов происходит исключительно по MVA-пути, сомнений не вызывали, хотя накапливались некоторые экспериментальные факты, которые в рамки этой концепции не укладывались. Так, например, не удалось добиться заметного включения MVA в ИП хлоропластов при одновременном эффективном превращении MVA в ИП в цитозоле растительной клетки. Также не удалось обнаружить прямое включение MVA в ИП и у ряда микроорганизмов. Более того, в этих объектах не удалось даже надежно установить наличие активности или самих ферментов MVA-пути. Тем не менее этим фактам пытались найти объяснения (вроде наличия нескольких неперемешивающихся пулов IPP или плохой проницаемости мембран для интермедиатов и продуктов синтеза ИП) и ничто не могло поколебать уверенности в универсальности MVA-пути (см. ссылки в монографии Пасешниченко [7]).

Открытию второго пути синтеза ИП положили работы Ромера и соавторов (середина 80-х — начало 90-х годов [62, 169, 171]). Несколько позднее, независимо от группы Ромера, данные о существовании MEP-пути были получены в лаборатории Аригони (которые, к сожалению, не были опубликованы в реферируемых журналах) [31, 177], а также Жоу и Уайтом [216].

В группе Ромера изучалось включение и распределение метки в ИП при росте некоторых зубактерий на средах с ацетатом или глюкозой, содержащих ^{13}C -метку в различных положениях, в качестве единственного источника углерода. В этих экспериментах [62, 167, 169, 171] распределение метки в гопаноидах и/или в боковой цепи убихинона у нескольких видов *Rhodospseudomonas*, а также *Zyotomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense* и *Escherichia coli* оказалось совершенно отличным от того, которое следовало бы ожидать исходя из

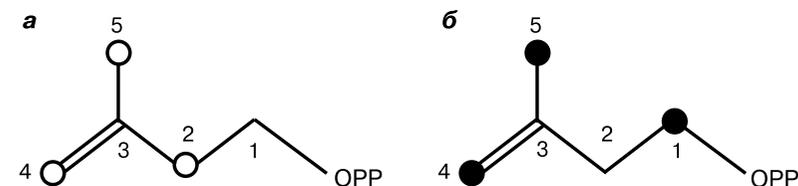


Рис. 4. Судьба C_1 -атомов глюкозы (а также C_2 -атомов ацетата) при синтезе изопентенилдифосфата по мевалонатному (а) или MEP-пути (б).

схемы с MVA (рис. 4). Изучение этого феномена и привело авторов к ниспровержению догмы MVA-пути как единственного способа синтеза ИП. Успех исследований был, в основном, обеспечен удачным выбором объектов.

Гопаноиды — группа пентациклических тритерпеноидов, широко распространенных в различных таксонах грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, а также среди цианобактерий и метанотрофов [167]. Во время как другие бактериальные ИП (убихиноны, менахиноны, бактопrenoлы) присутствуют в клетке в очень небольших количествах, синтез гопаноидов протекает очень интенсивно и у *Z. mobilis* их накапливается до 30 мг/г сухого веса. Это химически стабильные соединения, легко подвергаются выделению и очистке, что также облегчает возможности использования ^{13}C -ЯМР спектроскопии. Для успеха опытов оказалось важным и то, что в отличие от использованных ранее организмов в *Z. mobilis* и у *M. fujisawaense* метаболизм глюкозы происходит исключительно по схеме Энтнера-Дудорова. Культивирование бактерий с единственным источником углерода и энергии позволяло избегать изотопного разбавления меченого субстрата и существенно облегчало интерпретацию распределения метки в исследуемых продуктах.

В ранних опытах по изучению мевалонатного пути с использованием меченых глюкозы и ацетата, было установлено, что C_2 , C_4 и C_5 атомы IPP происходят из C_2 атома ацетата, предшественниками которого являются C_1 и C_6 атомы глюкозы при гликолизе или C_3 и C_6 при окислении глюкозы по пути Энтнера-Дудорова. Распределение ^{13}C -метки в гопаноидах *Z. mobilis* свидетельствовало о том, что источником C_3 и C_5 атомов IPP служили C_2 – C_3 или C_5 – C_6 фрагменты глюкозы. В то же время, в положения C_1 , C_2 и C_4 молекулы IPP из глюкозы включались, соответственно, C_6 , C_5 и C_4 атомы. Такое распределение метки исключало возможность прямого включения в ИП ацетил СоА, образующегося при катаболизме глюкозы.

Другими фактами, полученными в этих экспериментах, не согласующимися с существовавшими тогда представлениями, были полное

отсутствие случайного перераспределения (scrambling) изотопной метки для некоторых из соседних атомов субстрата и отсутствие прямого включения в ИП экзогенного ацетата.

В рамках концепции MVA-пути эти данные можно было объяснить, только предположив наличие новых предшественников для MVA и IPP. Однако после ряда изящных экспериментов с применением ^1H и ^{13}C -ЯМР спектроскопии Ромеру и его коллегам удалось устранить последние сомнения в наличии второго пути синтеза ИП.

Изучая включение в ИП ^{13}C -глюкозы, меченой в нескольких положениях, для всех C_3 и C_5 атомов IPP в спектре ЯМР наблюдали ^{13}C - ^{13}C расщепление с обычной константой спин-спиновой взаимодействия $^1\text{J} \sim 40 \text{ Hz}$. Это свидетельствовало о том, что они происходят из одного предшественника. Сходным образом, используя в качестве субстрата равномерно меченую глюкозу, было показано, что C_1 , C_2 и C_4 атомы молекулы IPP также происходят из одного предшественника. Между C_1 и C_2 атомами IPP проявлялись типичные дублеты с ^1J константой спин-спиновой взаимодействия, а между C_2 и C_4 — с константой, равной 3 Hz (^2J). C_1 и C_4 атомы IPP взаимодействовали между собой с константой 5 Hz (^3J) [62]. Вопрос о возможности внутримолекулярной перегруппировки в ходе биосинтеза атомов предшественника, соответствующих C_2 и C_4 IPP, был решен с помощью C_4 , C_5 -(^{13}C)-глюкозы. При этом во всех случаях наблюдали изотопное обогащение C_2 и C_4 атомов IPP. Таким образом, было доказано, что при образовании молекулы IPP, в трехуглеродный фрагмент, построенный из C_6 , C_5 и C_4 атомов глюкозы, происходит вставка двухуглеродного фрагмента. Предположения о природе этих фрагментов были сделаны на основании картины распределения метки. Происхождение C_3 атома IPP из C_2 и/или C_5 атомов глюкозы, а C_5 — из C_3 и/или C_6 , напоминает профиль мечения в жирных кислотах при использовании C^{13} -ацетил-CoA. Это позволило предположить, что двухуглеродный фрагмент является результатом тиаминзависимого декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Анализ профилей включения в ИП меченых глицеральдегид 3-фосфата (GA3P), глюкозы и эритрозы штаммами *Z. mobilis*, *M. fujiisawaense*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, а также диким типом и мутантами *E. coli*, дефектными по ферментам метаболизма триозофосфатов, показали, что трехуглеродным фрагментом-предшественником служит GA3P [171, 172].

После того, как GA3P и пируват были постулированы в качестве предшественников нового пути биосинтеза ИП [24, 31, 171, 172], наступил этап его тщательного биохимического изучения.

Еще до открытия MEP-пути у *E. coli* и *Bacillus subtilis* было обнаружено образование 1-D-дезоксисилулозы из пирувата и глицераль-

дегида в реакции, катализируемой пируватдегидрогеназой [212]. Поэтому по базам данных был предпринят поиск генов, участвующих в метаболизме GA3P, но функции которых были бы неизвестны.

Используя в качестве исходных последовательностей пируватдекарбоксилазу, E1 субъединицу пируватдегидрогеназного комплекса и транскетолазу, был обнаружен ген с высокой степенью гомологии к ним. Поскольку он находился в одном опероне с другим геном синтеза ИП (*ispA* или фарнезилтрансферазой), то авторы предположили, что кодируемые ими белки функционально связаны.

Неизвестный ген был клонирован. Оказалось, что его белковый продукт и в самом деле катализирует образование из GA3P и пирувата 1-D-дезоксисилулозо-5-фосфата (DXP) [113, 189].

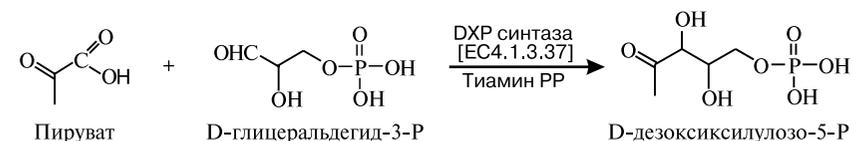
Важно подчеркнуть то, что хотя DXP не является специфичным продуктом MEP-пути, а используется клетками также и для синтеза других соединений (тиамина и пиридоксина [76, 195, 198]) рассмотрение MEP-пути традиционно начинают именно с этой реакции.

III. ОПИСАНИЕ РЕАКЦИЙ МЕТИЛЭРИТРИТОЛФОСФАТНОГО ПУТИ

Схема реакций MEP-пути — приведена на рис. 3 (Б).

ОБРАЗОВАНИЕ ДЕЗОКСИСИЛУЛОЗО-5-ФОСФАТА

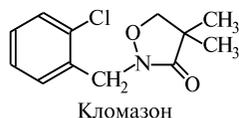
Образование DXP катализируется DXP-синтазой [EC 4.1.3.37] (синонимы — 1-D-дезоксисилулозо-5-фосфат синтаза и Dxs). Фермент кодируется геном *dxs* (у растений *cla1*). Эта реакция сходна с транскетолазной и также является тиаминзависимой.



Впервые ген DXP-синтазы был клонирован из *E. coli*. Соответствующий белок был экспрессирован в том же организме, выделен и очищен [113, 189].

DXP-синтаза из *E. coli* является гомодимером, состоящим из двух субъединиц по 65 кДа каждая и в качестве кофермента нуждается в тиаминдифосфате. Для проявления активности требуются также ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} . Фермент имел $V_{\text{max}} = 300 \text{ мкмоль/мин мг}$ и $K_m = 50 \text{ мкМ}$ (пируват) и 96 мкМ (GA3P) [30, 189]. Фторпируват ингибирует DXP-синтазу из *E. coli* с $\text{IC}_{50} = 80 \text{ мкМ}$, а из *Pseudomonas aeruginosa* с

$IC_{50} = 400$ мкМ. Предполагается, как и в случае с пируватдегидрогеназой, фторпируват ковалентно связывается с активным центром фермента [17]. Еще одним достаточно неспецифичным ингибитором DXP-синтазы является кломазон (2-(2-хлорбензил)-4,4-диметилизоксазолидин-3-он).



Этот гербицид широкого спектра действия ингибирует синтез хлорофилла и каротиноидов в хлоропластах проростков ячменя, а также выделение изопрена (образующегося по MEP-пути) листьями различных деревьев, включая дуб, тополь, платан и др. [214]. Продемонстрировано также ингибирование кломазоном синтеза brassinosteroidов в культуре хлореллы [26]. Такое действие позволило предположить, что мишенью (или одной из мишеней) его действия является один из ферментов MEP-пути. Первоначально сам кломазон рассматривался в качестве действующего агента. Однако позднее, на очищенном препарате DXP-синтазы из *Chlamydomonas* было показано, что ингибирующим действием обладает не сам гербицид, а один из продуктов его деградации — 5-оксо-кломазон. Величина I_{50} для этого производного составляла около 100 мкМ, кломазон же этот фермент не ингибировал [126].

Впоследствии DXP-синтаза была также клонирована из других микроорганизмов [25, 72, 100, 123] и растений [30, 57, 106, 112]. В случае фермента из *Arabidopsis* [57], томатов [114], а также из бактерий [72, 100, 123] суперэкспрессией DXP-синтазы была показана лимитирующая роль этого фермента при синтезе ИП. У растений найдено три изоформы DXP-синтазы, функции которых пока не совсем ясны. В растении *Medicago truncatula* из семейства бобовых идентифицированы два гена для DXP-синтазы с гомологией около 70% [204]. Ген *dxs2* экспрессируется в основном в корнях и активируется при колонизации микоризными грибами, а также в синтезирующих монотерпеноиды железистых клетках листьев. Ген *dxs1*, наоборот, экспрессируется во многих растительных тканях, но не в корнях. Таким образом, создается впечатление, что DXP-синтаза, кодируемая геном *dxs1*, принимает участие в основном метаболизме, а функцией белкового продукта гена *dxs2* является синтез вторичных метаболитов [204]. В банке экспрессируемых последовательностей (EST) *Arabidopsis* EST DXP-синтазы принадлежат к самым многочисленным [156].

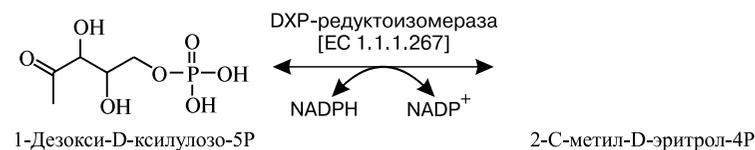
DXP-синтазы, выделенные из различных источников оказались близкими по своим свойствам, а нуклеотидная последовательность

dxs у эволюционно отдаленных видов — высококонсервативной. При этом у ферментов из *Mentha piperita* и *Arabidopsis thaliana* обнаружено наличие N-концевой пластидной сигнальной последовательности [106], а у *Arabidopsis* и томатов (*Lycopersicon esculentum*) продемонстрирована транслокация DXP-синтазы в хлоропласты [57, 114]. Альбино-фенотип некоторых мутантов *Arabidopsis* по DXP-синтазе восстанавливался при добавлении 1-D-дезоксисилулозы. Обнаружено также включение 1-D-дезоксисилулозы в различные ИП, например, в гинкголиды у *Ginkgo biloba*, ферругинол у *Salvia miltiorrhiza* [31, 177], в каротиноиды, фитол и ситостерол у *Catharanthus roseus* [24], в боковую цепь убихинона у *E. coli* [31, 146, 177].

ОБРАЗОВАНИЕ 2-С-МЕТИЛ-D-ЭРИТРИТОЛ-4-ФОСФАТА

После того когда было установлено включение 2-С-метил-D-эритритола в ИП у *E. coli* [50, 51], возникло предположение, что его фосфорилированная форма является одним из интермедиатов превращения DXP при биосинтезе ИП. Для проверки этой гипотезы Кузюма и соавторы получили ауксотрофные мутанты *E. coli*, которые росли на средах с добавкой 2-С-метил-D-эритритола или 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфата. Среди них были отобраны мутанты не способные к росту на 1-D-дезоксисилулозе. В экспериментах по комплементации оказалось, что все эти штаммы дефектны по гену с неизвестной функцией, гену *yaeM* [102, 193]. Когда выяснилось, что кодируемый этим геном белок катализирует образование 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфата (MEP), из DXP он был переименован в *dxr* (по ферменту DXP-редуктоизомеразе) [193], а впоследствии в *ispC* из-за связи с биосинтезом изопреноидов. Представляется не лишним еще раз подчеркнуть, что именно MEP является первым специфическим продуктом немевалонатного пути биосинтеза изопреноидов.

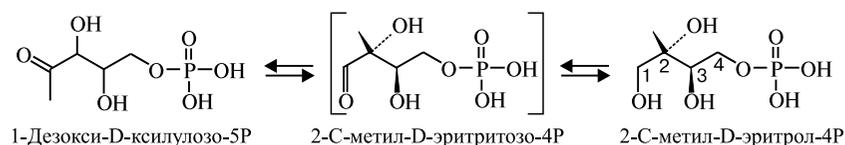
С помощью изотопномеченных соединений и последующего анализа продуктов реакции методом ЯМР-спектроскопии стереохимия этой реакции была изучена сначала в опытах *in vivo* [23, 24, 50, 51, 171], а затем и *in vitro* [145, 148]. Оказалось, что образование MEP, включая стадии восстановления и внутримолекулярной перестройки углеродного скелета, катализирует всего один фермент — DXP-редуктоизомераза (синонимы — 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат синтаза, MEP-синтаза, Dxr и IspC) [EC 1.1.1.267].



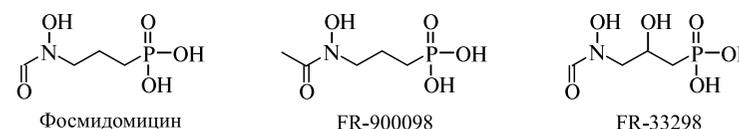
Молекулярная масса фермента из *E. coli* методом нативного электрофореза была оценена в 165 кДа, а методом гель-фильтрации в 150 кДа. При SDS-электрофорезе очищенный белок давал единственную полосу, соответствующую 42 кДа [102, 193]. Авторы сделали вывод, что DXP-редуктоизомераза представляет собой тетрамер. Однако позднее, после получения кристаллов апофермента, а также кристаллических комплексов с различными кофакторами, ингибиторами и ионами пришли к заключению, что вероятнее всего фермент существует, в том числе и в растворе, в виде гомодимера [151, 152, 190, 211].

Для проявления активности DXP-редуктоизомераза нуждается в NADPH и в двухвалентных катионах, предпочтительно Mg^{2+} или Mn^{2+} . Тиольные агенты на активность не влияют. Замена NADPH на NADH приводит к 100-кратному уменьшению выхода продукта [102, 193]. Реакция является обратимой, хотя равновесие сильно сминуто в сторону образования MEP. При введении в реакционную среду 2-С-метил-D-эритритозо-4-фосфата и соответствующей формы пиридинового динуклеотида можно получить или MEP или DXP. Для фермента из *E. coli* были получены следующие константы Михаэлиса (в зависимости от добавленного катиона — Mg^{2+} или Mn^{2+}): 73–97 мкМ для DXP, 158–294 мкМ для 2-С-метил-D-эритритозо-4-фосфата. V_{max} соответственно были 10,5 и 11,9–20,6 мкмоль/мин мг [78]. Коппши и соавторы [93] приводят равновесные кинетические константы для очищенной рекомбинантной DXP-редуктоизомеразы из *E. coli*. В их экспериментах K_M для NADPH равнялась 0,5 мкМ, а для DXP $K_M = 115$ мкМ; $K_{cat} = 116 s^{-1}$. Стадии перегруппировки и восстановления также были обратимы с K_{eq} для DXP и MEP равной 45 мкМ [93].

Хотя не удалось выделить 2-С-метил-D-эритритозо-4-фосфат в качестве промежуточного продукта, был предложен механизм 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфатсинтазной реакции, включающий внутримолекулярную перегруппировку DXP с последующим восстановлением этого альдегидного интермедиата донором электронов (NADPH) [78, 102].



Все изученные до сих пор DXP-редуктоизомеразы ингибируются фосмидомицином (3-(N-формил-N-гидроксиамино)пропилфосфоновой кислотой), обозначавшимся ранее FR-31564, и его аналогами, например, FR-900098 и FR-33289.



Фосмидомицин, первый специфический ингибитор MEP-пути, был синтезирован, а затем и выделен из *Streptomyces lavendulae* примерно за десять лет до открытия MEP-пути. В начале было обнаружено, что фосмидомицин эффективно тормозит рост большинства грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий [96, 131]. Однако после того, когда выяснилось, что у *Micrococcus luteus* он одновременно ингибирует и образование каротиноидов, и биосинтез менахинона, Шиги высказал предположение, что летальный эффект фосмидомицина как-то связан с синтезом изопреноидов [186]. Фосмидомицин в концентрации 3–6 мкг/мл полностью подавлял рост культур *E. coli*, этот эффект, однако, исчезал при добавлении в среду 0,025% 2-С-метил-D-эритритола [101, 102]. Опыты с мутантами *E. coli* K-12, дефектными по аденилатциклазе и устойчивыми к его действию показали, что фосмидомицин транспортируется в клетку через глицерол-3-фосфатный переносчик GlpT [174]. Однако его мишень оставалась неизвестной до 1998 г., когда установлено, что фосмидомицин дозозависимо ($IC_{50} = 24$ нМ) ингибирует рекомбинантную DXP-редуктоизомеразу из *E. coli* [102]. Для фермента из ячменя IC_{50} составляет 8,2 нМ [215]. Тип ингибирования был определен как конкурентный с $K_i = 9,4$ нМ [101] или смешанный (конкурентно-неконкурентный) с $K_i = 38$ нМ [215].

В начале предполагали, что ингибирующее действие фосмидомицина связано с тем, что его структура напоминает постулированную для промежуточного продукта DXP-редуктоизомеразы (2-С-метил-D-эритритозо-4-фосфат) и что он конкурирует за сайт связывания MEP [101]. Однако впоследствии этот механизм был поставлен под сомнение. При сходстве структур логично было бы ожидать, что при их транспорте через клеточную мембрану будут задействованы родственные переносчики. Но оказалось, что в переносе этих соединений в клетку участвуют, по-видимому, различные транспортеры. Так, перенос 2-С-метил-D-эритритола у *Salmonella typhimurium* идет через сорбитолфосфотрансферазную транспортную систему [197], а фосмидомицина у *E. coli* — через глицерол-3-фосфатный переносчик [174]. При кинетическом анализе в условиях равновесия фосмидомицин проявлял свойства конкурентного ингибитора относительно DXP [93]. Относительно NADPH фосмидомицин оказался неконкурентным ингибитором. В то же время по типу ингибирования дигидро-NADPH проявил себя как конкурентный относительно

NADPH и неконкурентный относительно DXP. Эти результаты можно объяснить тем, что NADPH связывается с активным центром до связывания DXP, а фосмидомицин в активном центре фермента конкурирует за связывание не с продуктом реакции, а с субстратом (т.е. с DXP) [93]. Подтверждение этого было получено при изучении кристаллического комплекса DXP-редуктоизомеразы с марганцем и фосмидомицином. В этом комплексе конформация ингибитора такова, что она может быть конформно наложена на молекулу DXP [190]. Дополнительным аргументом может также служить то наблюдение, что FR-900098, имеющий дополнительную метильную группу в том же положении, что и в молекуле DXP, связывается с ферментом сильнее и является более сильным ингибитором, чем фосмидомицин [83]. Если предположение о механизме действия фосмидомицина верно, то обнаружение взаимодействия между его фосфонатной группой и Ser186, Ser222, Asn227 и Lys228 дополняет знания об аминокислотных остатках, входящих в активный центр DXP-редуктоизомеразы [190].

В кристаллическом виде помимо комплекса с фосмидомицином недавно были получены апо-форма DXP-редуктоизомеразы из *E. coli* и из *Z. mobilis*, а также комплексы фермента из этих источников с NADPH [151, 152, 211]. Трехмерное строение DXP-редуктоизомераз оказалось весьма близким. Асимметрическая единица содержит димер, т.е. ту же форму, в которой фермент существует и в растворе. Каждый V-образный мономер состоит из трех доменов. На N-конце (примерно 150 аминокислот) находится NADPH-связывающий сайт, представляющий собой вариант типичного динуклеотид-связывающего сайта. Сайт на C-конце (аминокислоты 312–398 для фермента из *E. coli* и 300–386 для *Z. mobilis*) образован пучком из четырех спиралей. Между этими сайтами располагается центральный, или соединительный, домен. Он представлен β -складкой, образованной четырьмя и фланкированной тремя α -спиралями. Центральный домен состоит из подвижного участка (для DXP-редуктоизомеразы из *E. coli* соответственно аминокислоты 186–216), а также из каталитического участка, связывающего двухвалентные ионы (Mn^{2+} , Mg^{2+} или Co^{2+}) и субстрат [151, 152, 211]. Предполагается, что в связывании металлов у фермента из *E. coli* принимают участие высококонсервативные аминокислотные остатки Asp150, Glu152, Glu231 и Glu234 [151]. По данным же группы Кузуямы, полученным при анализе *dxr*-мутантов *E. coli*, Glu231 участвует в конверсии DXP в MEP, а в связывании этого субстрата принимают участие His153, His209 и His257 [211]. Выше уже указывалось также на возможную роль Ser186, Ser222, Asn227 и Lys228 в активном центре фермента [190]. Помимо образования большей части активного центра, центральный домен ответственен также за

димеризацию DXP-редуктоизомеразы. Наличие в асимметрической единице кристаллов нескольких конформеров свидетельствует о том, что при связывании NADPH происходят значительные конформационные изменения, обуславливающие правильную геометрию активного центра. Эта индуцируемая в ходе взаимодействия с субстратами подвижность связана с центральным (особенно в области 186–216), а также с C-концевым доменами [151, 152, 211].

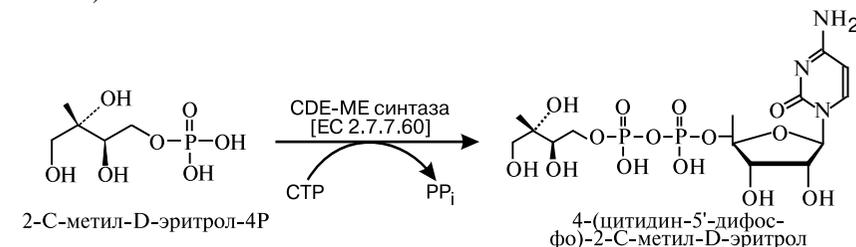
Интересные заключения о возможном механизме DXP-редуктоизомеразы удалось сделать при сравнении трехмерных структур комплексов *E. coli* фермента с фосмидомицином и с NADPH. В последнем случае NADPH можно расположить в связывающем центре таким образом, что он оказывается в непосредственной близости от молекулы субстрата и в правильной ориентации по отношению к ней. Это, в свою очередь, обеспечивает перенос протона в нужное положение альдегидного остатка DXP [196].

DXP-редуктоизомераза была первоначально выделена из *E. coli*, а затем из *Chlamidomonas*, *Arabidopsis thaliana*, *Mentha piperita*, *Synechococcus leopoliensis*, *Plasmodium falciparum* и других организмов [69, 103, 123, 193, 208]. Обнаруженная степень гомологии для ферментов из разных организмов лежит между 33,9 и 62,4% [193].

ОБРАЗОВАНИЕ

4-(ЦИТИДИН 5'-ДИФОСФО)-2-С-МЕТИЛ-D-ЭРИТРИТОЛА

Образование 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритола (CDP-ME) катализируется CDP-ME синтазой, EC 2.7.7.60 (синонимы – MEP цитидилтрансфераза, YgbP и IspD) [98, 164]. Фермент является белковым продуктом гена *ispD* (ранее называвшегося *ygbP* и *mect*).



В качестве возможного кандидата на роль одного из генов MEP-пути *ygbP* первоначально был предложен потому, что всегда встречался в геномах, имеющих гены *dxs* и *dxr*, но отсутствовал у организмов, использующих MVA-путь. Вообще, этот подход (поиск в секвенированных геномах таких неидентифицированных открытых рамок считывания,

чье присутствие коррелировало бы с наличием ортологов уже известных генов МЕР-пути, но не обнаруживавшихся при этом в организмах, синтезирующих ИП по MVA-пути) активно применялся при расшифровке немевалонатного пути. Он оказался очень плодотворным и в немалой степени способствовал быстрой расшифровке последовательности реакций и выделению соответствующих ферментов.

YgbP был быстро клонирован и очищен. При инкубации с МЕР и СТР произошло образование продукта, который методами ЯМР и масс-спектрометрии был также идентифицирован как CDP-МЕ [98, 164].

Свойства 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритолсинтаз из бактерий (*E. coli*) и растений (*A. thaliana*) оказались довольно сходными [98, 163, 164]. Они являются гомодимерами с молекулярной массой около 50 кДа. Фермент из *E. coli* содержит две одинаковые субъединицы из 236 аминокислот. При SDS-электрофорезе субъединицы идут одной полосой с кажущейся молекулярной массой около 26 кДа. Подобно другим ферментам МЕР-пути, для проявления активности фермент нуждается в двухвалентных катионах (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}). Рекombинантные CDP-МЕ синтазы специфичны к ЦТР, а другие же трифосфатнуклеотиды практически неактивны. Однако для фермента дикого типа из *E. coli* образование фосфорилированного продукта с UTP и GTP доходит до 30% от активности с СТР. При использовании АТР активность составляет 20% от максимальной [164]. Существенно отличались кинетические параметры ферментов из *E. coli* и *A. thaliana*: V_{max} равны 23 и 67 мкмоль/мин мг, K_m для СТР – 3 и 114 мкМ, K_m для МЕР – 131 и 500 мкМ, число оборотов – 9 и 26 s^{-1} , соответственно [163, 164]. Возможно это объясняется тем, что степень идентичности каталитического домена у этих ферментов составляет лишь около 30% [164]. Степень гомологии белков, выявленная при сравнении *ispD* последовательностей из разных организмов, колебалась в широких пределах. Например, между *E. coli* и *Salmonella typhi* она доходила до 91%, а между *E. coli* и *Clostridium perfringens* составляла лишь 29% [79].

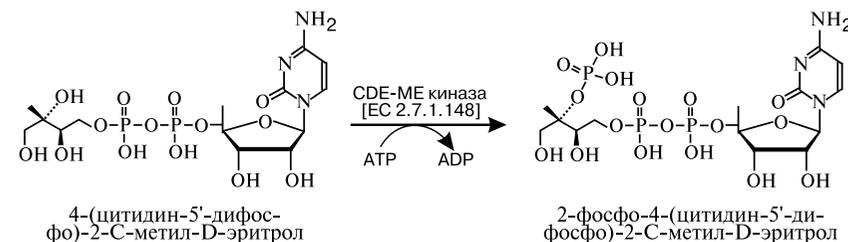
Были получены кристаллы CDP-МЕ синтазы *E. coli* в виде апофермента [88, 90], а также с СТР/ Mg^{2+} и с CDP-МЕ/ Mg^{2+} [153]. Как и в растворе фермент является гомодимером. Субъединица представляет собой единый α/β домен. За взаимодействие мономеров в основном отвечает β участок. Активный сайт образуется при взаимодействии 6 сегментов первой субъединицы и одного сегмента второй. В общей сложности в узнавании и во взаимодействии с субстратом принимают участие 22 аминокислотных остатка, из них 18 образуют водородные связи [153]. Активный центр CDP-МЕ синтазы *E. coli* характеризуется большим количеством остатков положительно

заряженных аминокислот. Некоторые из них относятся к высококонсервативным остаткам, что свидетельствует об их важной роли в каталитической активности фермента. Arg157 и Lys213 отвечают за связывание в нужной ориентации МЕР, который в этой реакции осуществляет нуклеофильную атаку. С фосфатными группами СТР, поляризуя его и облегчая атаку нуклеофилом, связываются через Mg^{2+} -мостик Arg20 и Lys27. Эти же остатки принимают участие в стабилизации отрицательно заряженного переходного комплекса, образующегося в этой реакции. Специфичность к цитидиновому остатку обеспечивается как стерическими ограничениями, так и ограничениями возможности образования водородных связей. При этом азот пиримидинового кольца образует координационную связь с Ser88, карбонильная группа – водородные связи с Ala14 и Ala15, а аминогруппа – с карбонилем Gly82. Помимо этого пиримидиновое основание вступает в стэкинг-взаимодействие с метиленовой цепью Arg85 [153].

ОБРАЗОВАНИЕ

2-ФОСФО-4-(ЦИТИДИН 5'-ДИ-ФОСФО)-2-С-МЕТИЛ-D-ЭРИТРИТОЛА

АТР-зависимое фосфорилирование по 2-гидроксильной группе CDP-МЕ с образованием 2-фосфо-4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритола (CDP-МЕ2P) катализируется ферментом 4-(цитидин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритол киназой (синонимы 4-дифосфотидил-2-С-метил-D-эритритол киназа, YchB, IspE), EC 2.7.1.148. Она кодируется геном *ispE* (другие названия, встречающиеся в литературе – *ychB* и *cmek*).



Вопрос о возможной связи гена *ychB* с синтезом ИП возник после обнаружения его участия в процессе созревания плодов томатов [107]. И действительно, во всех секвенированных к тому времени геномах организмов, использующих МЕР-путь, была обнаружена соответствующая последовательность [104, 115]. Анализ выявил наличие АТР-связывающего участка, а для ортологов из растений также хлоропластную сигнальную последовательность [104, 115, 165]. Ген *ychB* был клонирован из нескольких организмов, его белковый продукт очищен и частично охарактеризован в опытах *in vitro*.

В первой публикации, описывающей свойства YchB [104], для фермента из мяты *M. piperita* и *E. coli* была продемонстрирована АТФ-киназная активность по отношению к изопентенилмонофосфату и спиртовым аналогам IPP и DMAPP. На основании этих опытов авторы предположили, что он катализирует завершающую реакцию МЕР-пути. Однако полученные активности YchB с изопентенилмонофосфатом были очень низки — 1,4 рмоль/с мг (мята) и 178 рмоль/с мг (*E. coli*). С изопентенолом и диметилаллиловым спиртом активность была еще меньше — в 2,5–10 раз [104].

Несколько позднее другими исследователями было установлено, что YchB *E. coli* с гораздо более высокой скоростью (34 мкмоль/мин мг) осуществляет АТФ-зависимое фосфорилирование CDP-МЕ с образованием CDP-МЕ₂P [99, 115]. Синтез CDP-МЕ₂P из CDP-МЕ также был показан для фермента из томатов *L. esculentum* ($V_{\max} = 33$ мкмоль/мин мг) [115, 165]. При использовании меченого субстрата, наблюдалось включение CDP-МЕ₂P хромопластами перца *Capsicum annuum* в каротиноиды с эффективностью около 10% [115]. На основании всех этих данных, исследователи пришли к выводу, что истинная метаболическая роль *ispE* (*ychB*) — CDP-МЕ-киназная реакция.

Весьма вероятно, что у некоторых организмов CDP-МЕ киназа (*IspE*) является одним из ключевых ферментов МЕР-пути. Так, *IspE* хламидий (но не *IspE* из *E. coli*) снимает у кишечной палочки токсичное действие ДНК-связывающего белка хламидий [68]. Авторами, однако, было найдено, что это обратимое образование нуклеоида (практически нетранскрибируемой компактной формы бактериальной ДНК), регулируется не CDP-МЕ₂P, а продуктом следующей реакции пути (метилэритритолциклодифосфатом, см. ниже). Дифференцированный же эффект *ispE* генов разного происхождения был объяснен наличием у хламидиального фермента уникальных кинетических свойств [68].

Была изучена кристаллическая структура энзима из двух микроорганизмов — *E. coli* и термофильной бактерии *Thermus thermophilus* [122, 202]. Достаточно неожиданным оказалось сходство активного центра CDP-МЕ киназы с мевалонаткиназой и MVA-P киназой. Фермент имеет α/β складку, типичную для GНMP (галактозокиназа, гомосеринкиназа, мевалонаткиназа, фосфомевалонаткиназа) семейства киназ [122]. Однако, в отличие от других членов этого семейства, CDP-МЕ киназа не образует димеров. Таким образом, и в немевалонатном, и мевалонатном пути участвуют родственные киназы со сходным механизмом действия [105, 122, 202]. В то же время сайт связывания субстрата у CDP-МЕ киназы модифицирован таким образом, чтобы обеспечить связывание субстрата большей величины, чем у других членов семейства, а именно — нуклеотидного остатка [122].

Фермент специфичен к нуклеотидному остатку. Неспособность CDP-МЕ киназы фосфорилировать 4-(уридин 5'-дифосфо)-2-С-метил-D-эритритол свидетельствует о важной роли пиримидинового остатка во взаимодействии субстрата с ферментом [202].

Структура фермента из термофильной бактерии *T. thermophilus* была определена с разрешением 1,7 Å [202]. В опытах была использована апо-форма фермента, то есть фермент кристаллизовали в отсутствие субстратов. Однако, несмотря на это, обнаруженная гомология позволила авторам высказать некоторые предположения относительно структуры активного центра. Так, Asp58 и Lys83 приписано участие в связывании АТФ, а Ser95 и Asp125 — в связывании Mg²⁺. Предложенный механизм реакции включает стадию активации Asp125 остатком Lys8, после чего кислород карбоксильной группы Asp125 отнимает протон от С-2 гидроксила CDP-МЕ [202]. Впрочем, на основании того, что азот аминогруппы Lys8 находится на расстоянии 4,2 Å от ближайшего карбоксильного кислорода Asp125, этот механизм подвергается сомнению [196].

Степень гомологии фермента *T. thermophilus* с *E. coli* около 33%, с *M. tuberculosis* 35% [202]. В свою очередь, CDP-МЕ киназа *E. coli* имеет 21–38% гомологии с *M. tuberculosis* и около 90% с *Salmonella typhi* [122]. В среднем же процент гомологии равен 45–60%.

ОБРАЗОВАНИЕ

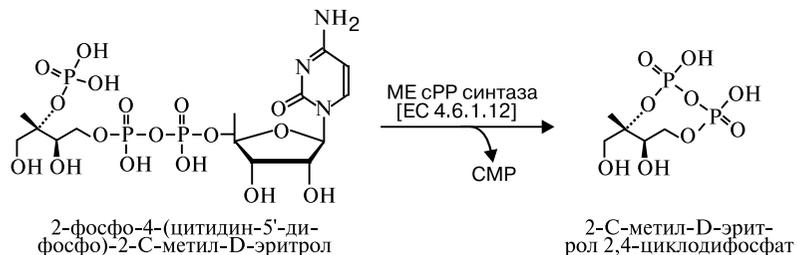
2-С-МЕТИЛ-D-ЭРИТРИТОЛ-2,4-ЦИКЛОДИФОСФАТА

2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфат (MEсPP) был первым выделенным метаболитом МЕР-пути [6, 12, 136, 138, 140]. Однако, поскольку тогда не только отсутствовала информация о конкретных реакциях МЕР-пути, но и вообще не было установлено существование альтернативного пути, то предвидеть связь MEсPP с биосинтезом ИП было трудно. В группе Д. Н. Островского в Институте биохимии им. А. Н. Баха РАН были изучены свойства открытого соединения. У ряда микроорганизмов в ответ на окислительный стресс, вызванного добавкой бензилвиологена или других редоксциклизирующих агентов, MEсPP накапливается в очень больших концентрациях (в клетках *Corynebacterium ammoniagenes* до 100 мМ) [1, 4, 12, 135, 136]. Его образование было также продемонстрировано и при тепловом шоке [5]. Поэтому первоначально MEсPP была приписана функция антистрессора [2, 3, 139, 140]. Основанием для такого предположения послужило то, что бактерии-аккумуляторы MEсPP сохраняли способность к росту в присутствии ингибирующих концентраций индукторов окислительного стресса [2]. Также оказалось, что бактерии, способные накапливать это соединение, лучше выживали внутри перитонических макрофагов мышей [3, 130].

Когда выяснилось, что МЕСРР является промежуточным метаболитом синтеза ИП [164], аккумуляцию этого соединения сочли не направленной защитной реакцией клетки от стресса (хотя полностью игнорировать возможную антистрессорную роль МЕСРР было нельзя), а следствием нарушения метаболического пути. Однако не исключено, что функции МЕСРР в клетке не ограничиваются участием в синтезе ИП и побочными реакциями защиты от действия свободных радикалов.

Совсем недавно было установлено, что у *Chlamydia trachomatis* МЕСРР вызывает высвобождение из нуклеоида (конденсированной ДНК) гистон-подобного белка Нс1. Этот процесс необходим для перехода покоящейся формы хламидий в активную внутриклеточную форму [68]. Возможная роль МЕСРР в качестве внутриклеточного регулятора обсуждалась уже в ранних работах Островского и соавторов [136, 140]. Высказывалось предположение, что это соединение, связывающее двухвалентные катионы, может участвовать в регуляции метаболизма, модулируя активность металл-зависимых ферментов [136]. В качестве другого механизма внутриклеточной регуляции посредством МЕСРР при отсутствии экспериментальных данных рассматривалась возможность его конъюгирования с какими-то токсичными соединениями [140]. В определенной степени таковым можно считать упоминавшееся выше предотвращение летального эффекта Нс1 для *E. coli* при коэкспрессии с *IspE*, приводящей в конечном итоге к накоплению МЕСРР [68].

Образование МЕСРР катализируются 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфатсинтазой (МЕСРР синтазой), кодируемой геном *ispF* (синонимы *ygbP*, *yacN* и *mecs*). Предположение относительно возможного участия *ygbB* в МЕР-пути было высказано после того, когда было обнаружено, что он находится в том же опероне, что и ген *ygbP*, кодирующий СДР-МЕ синтазу [164]. Мутации по гену *ispF* являются летальными, его слабая экспрессия ведет к нарушению формы клеток [35]. Инкубация его белкового продукта с СДР-МЕ2Р приводит к образованию МЕС-РР с одновременным отщеплением СМР [75, 192].



Фермент из *E. coli* и *Plasmodium falciparum* нуждается в двухвалентных катионах. Активное превращение СДР-МЕ2Р этими рекомбинантными белками наблюдалось в присутствии ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} , необходимости в других кофакторах не выявлено [75, 160]. Оптимум pH МЕСРР синтазы из *P. falciparum* составляет 7,0; скорость реакции – 4,3 мкмол/мин мг. Основным продуктом реакции является 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфат. В качестве минорного продукта МЕСРР синтазной реакции у *P. falciparum* был обнаружен пятичленный циклический сахар – 2-фосфо-2-С-метил-D-эритритол-3,4-циклофосфат [160]. Если же в качестве субстрата использовался СДР-МЕ, то минорным продуктом был 2-С-метил-D-эритритол-3,4-циклофосфат [75, 160]. В отсутствие фермента в щелочной среде происходит перезамыкание цикла с образованием 2-С-метил-D-эритритол-1,2-циклодифосфата [135]. Хромопласты *C. annuum* с высокой эффективностью (до 55%) включают МЕСРР в каротиноидную фракцию [59, 60, 75]. Включения в ИП 2-С-метил-D-эритритол-3,4-циклофосфата в этой системе не обнаружено [75].

МЕСРР синтаза из разных источников была получена в виде кристаллов в присутствии или отсутствие субстрата и различных ионов [89, 91, 154, 191]. Рентгеноструктурный анализ фермента из *E. coli* и *T. thermophilus* показал, что МЕСРР синтазы являются гомотримером с центральной гидрофобной областью, образующей β-призму. Три каталитических участка находятся на внешней поверхности молекулы в углублении между соседними субъединицами и образуются аминокислотами каждой из них. Субъединица МЕСРР синтазы из *E. coli* состоит из 156 аминокислотных остатков и представляет собой единый α/β домен. Ферменты обоих организмов содержат по два иона металла в активном центре. Однако, если в белке *T. thermophilus* оба иона представлены Mg^{2+} [91], то достаточно неожиданным оказалось наличие в активном центре МЕС-РР синтазы из *E. coli* одного тесно связанного иона Zn^{2+} [89, 191]. Вторым ионом в этом случае является Mn^{2+} [89] или Mg^{2+} [191]. Ион Mn^{2+} попадает в активный центр, скорее всего, будучи связанным с субстратом [89].

Установлены некоторые аминокислотные остатки, принимающие участие в каталитическом акте МЕСРР синтазы. По данным Кемпа и соавт. [79, 89], в связывании цитозина принимают участие Pro103, Ala100, Met105 и Leu106. Остаток рибозы взаимодействует с Asp56 и Gly58, а при участии молекул растворителя – также с Asp46 и Ala131. Альфа-фосфатная СДР вступает во взаимодействие с остатком Thr133. Для связывания остатка метилэритритол-2-фосфата важную роль играет высоконсервативный фрагмент из пяти аминокислот, начинающийся с His34. В связывании ионов Zn^{2+} принимают участие Asp8,

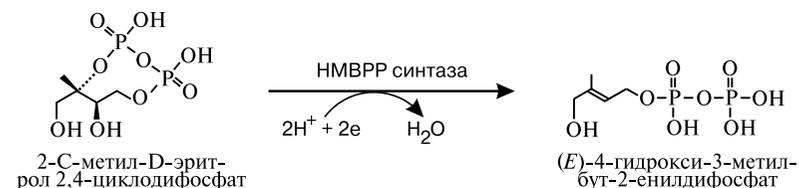
His10 и His42. Найдено, что четвертая координационная связь тетраэдрической сферы Zn^{2+} заполнена кислородом β -фосфатной группы CDP. Ион Mn^{2+} образует октаэдр, лигандами которого являются Glu135 и кислород α - и β -фосфатных групп CDP, а также 3 молекулы воды.

Оба металла (Zn^{2+} и Mn^{2+}) играют роль в правильной ориентации α - и β -фосфатных групп субстрата и в качестве льюисовских кислот участвуют в поляризации этих групп. Первым этапом реакции является, вероятно, нуклеофильная атака β -фосфатной группы 2-фосфатной группой CDP — метилэритритолфосфата. Образующееся переходное соединение с пятью координационными связями стабилизируется ионами металлов, а затем коллапсирует, высвобождая CMP и МЕС-PP [79191].

ОБРАЗОВАНИЕ

(Е)-4-ГИДРОКСИ-3-МЕТИЛ-БУТ-2-ЕНИЛ ДИФОСФАТА

Накопление МЕСРР в условиях окислительного стресса вызывается ингибированием GcpE или иначе (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилдифосфатсинтазы (НМВРР-синтазы), продукта гена *ispG* (синоним *gcpE*). Его участие в синтезе ИП было доказано с помощью делеционных мутантов *E. coli*. При этом в клетку вводили плазмиду, содержащую гены, необходимые для синтеза IPP из MVA [36]. Такой мутант сохранял жизнеспособность только при добавлении в среду культивирования мевалоновой кислоты или при введении плазмиды с *ispG* [19, 37]. Сходные эксперименты проведены и с ортологичным геном из *A. thaliana*, содержащим помимо пластидной сигнальной последовательности еще дополнительный домен, и тем не менее способным комплементировать летальную *gcpE*-мутацию у *E. coli* [147]. Аккумуляция МЕСРР и появление альбино-фенотипа (вследствие резкого уменьшения синтеза пластидных пигментов) наблюдается также при silence-мутировании вирусом TRV гена *ispG* в клетках табака [141]. При выращивании на среде с 1-D-дезоксисилулозой рекомбинантной *E. coli*, содержащей искусственный оперон с генами *ispC*, *ispD*, *ispE* и *ispF*, а также ген D-ксилулокиназы, фосфорилирующей исходный субстрат [210], происходит накопление МЕСРР. Когда в клетке экспрессировали также и *gcpE*, то образовывалось соединение, которое методами 1H - , ^{31}P - и ^{13}C -ЯМР, а также спектроскопии с использованием ядерного эффекта Оверхаузера было идентифицировано как (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилдифосфат (НМВРР). Это уточненное название 1-гидрокси-2-метил-2-(Е)-бутенил-4-дифосфата, как первоначально было назван продукт НМВРР-синтазной реакции [73].



Однако даже после обнаружения и идентификации НМВРР долгое время не удавалось продемонстрировать активность фермента в опытах *in vitro*. Прогресс был достигнут только после того, как было показано, что поглощение НМВРР-синтазы в типичной области 413–420 нм уменьшается при добавлении Ti^{3+} . Она имеет характерные спектры ЭПР и комбинационного рассеяния, т.е. содержит $[4Fe-4S]^{2+}$ кластер, а значит, является высокочувствительной к кислороду [16, 92]. Фермент из *T. thermophilus* был клонирован в *E. coli* и очищен в анаэробных условиях. Этот препарат имел коричневую окраску и в присутствии дитионита катализировал превращение МЕСРР в НМВРР с $K_m = 0,42$ мМ. Скорость реакции при 55 °С и pH 7,5 была равна 0,6 мкмоль/мин мг, что соответствует $K_{cat} = 0,4 s^{-1}$; оптимум pH фермента между 7,5 и 8,0 [92]. Помимо энзимологических исследований в этой работе было показано, что продукт НМВРР-синтазной реакции вызывает пролиферацию Vg9/V Σ d2-T-клетки (см. ниже — «Медицинские аспекты»).

Несколько позднее для фермента из *E. coli* была показана возможность реконституции Fe-S кластера и активности НМВРР-синтазы при использовании фотовосстановленного 5-диазофлавиона или флаводоксин/флаводоксинредуктазной регенерирующей системы [181]. Механизм реакции включает, вероятно, двухэлектронное восстановление, с возможным участием NADPH.

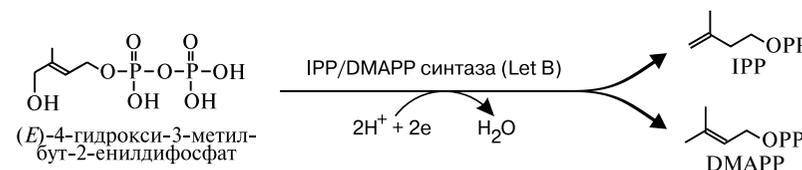
Рекомбинантная НМВРР-синтаза была также получена из *E. coli* в виде химеры с мальтозосвязывающим белком. Очищенный препарат не способен к образованию НМВРР, но его каталитическая активность восстанавливалась при добавлении грубого клеточного лизата из мутанта, дефицитного по *ispG* [166]. Авторы предположили, что это является свидетельством необходимости в НМВРР-синтазной реакции дополнительных белков (возможно, в качестве компонентов системы, обеспечивающих ее восстановительными эквивалентами). Восстановление активности также наблюдалось при использовании фотовосстановленного 10-метил-5-диаза-изоаллоксазина. Образование НМВРР протекало со скоростью, равной 1 нмоль/мин мг [166].

ОБРАЗОВАНИЕ ИЗОПЕНТЕНИЛДИФОСФАТА И ДИМЕТИЛАЛЛИЛДИФОСФАТА

Как и в случае с *ispG*, первые доказательства участия гена *lytB* (*ispH*) в немевалонатном пути синтеза ИП были получены в генетических экспериментах. Гетерологическая экспрессия гена *Synechocystis* в специально сконструированном штамме *E. coli*, содержащем плазмиду с генами каротиногенеза, приводила примерно к двукратному увеличению синтеза ликопина [45]. К такому же увеличению синтеза каротиноидов приводила и гомологичная экспрессия вместо *lytB* гена *ipi*, кодирующего у *E. coli* IPP-изомеразу. Такой же уровень синтеза наблюдался и при совместной экспрессии этих двух генов. При выращивании *knock-out* мутантов *Synechocystis PCC6803* по гену *lytB* на средах, содержащих спиртовые аналоги IPP и/или DMAPP, летальный эффект мутации подавлялся [45]. Спиртовые аналоги изопреновых единиц также поддерживали ограниченный рост условно-летальных *lytB*-мутантов *E. coli* [120]. Таким образом, хотя он и не мог осуществлять взаимопревращение IPP и DMAPP [45], действие белкового продукта *lytB* было таким, как если бы он выполнял функцию IPP-изомеразы. Эта гипотеза находила и другие косвенные подтверждения. Так, было показано, что у *E. coli* IPP-изомеразу кодирует единственный ген (*ipi*) [44, 70], но он не является незаменимым для синтеза ИП [70]. В то же время DMAPP абсолютно необходим [144]. У *Synechocystis PCC6803* и некоторых других цианобактерий не удавалось обнаружить ни гена *ipi*, ни какой-либо IPP-изомеразной активности классического типа [44, 55]. Для ряда организмов, синтезирующих ИП по MEP-пути, удалось показать присутствие гена IPP-изомеразы, не имеющего никакой гомологии с *ipi* [84].

Поначалу такое свойство *lytB* казалось довольно загадочным, так как, хотя в генетических экспериментах по комплементации его делеционной мутации (выращивание *E. coli* на среде с MVA при введении искусственного оперона ее метаболизма подобно экспериментам, описанным в разделе, посвященном *ispG*) и было показано, что *lytB* находится перед или в точке разветвления MEP-пути на синтез IPP или DMAPP [18, 157], считалось маловероятным, чтобы один и тот же фермент катализировал образование сразу двух соединений. Однако, когда рекомбинантную *E. coli*, содержащую гены *hylB*, *ispCDEFG* и *lytB* (*ispH*) выращивали на среде с ($U-^{13}C$)-1-D-дезоксисилулозой, наблюдалось образование меченых IPP или DMAPP в соотношении 5:1 [161]. Хотя полученные результаты и не исключали возможность последовательного образования этих соединений, а следовательно, и участия IPP-изомеразы, авторы сочли более вероятной модель одновременного синтеза обеих изопреновых единиц. Вскоре ими были

получены и прямые доказательства этого. В опытах *in vitro* диализованный клеточный экстракт из штамма *E. coli*, суперэкспрессора белка IspH (*LytB*), катализировал превращение НМВРР в IPP и DMAPP в соотношении 6:1 [13].



В качестве кофакторов фермент нуждается в двухвалентных ионах (Co^{2+} или, в меньшей степени, Mn^{2+}), а также в FAD или NADH. В отличие от других ферментов MEP-пути, в случае с IPP/DMAPP-синтазой, NADH давал более высокую стимуляцию, чем NADPH [13].

Одновременно другой группой авторов, получивших препарат со значительно более высокой активностью, было окончательно подтверждено, что IspH (*LytB*) является IPP/DMAPP-синтазой (синонимы – (E) – гидроксид-3-метил-бут-2-енилдифосфат редуктаза, *LytB* и *IspH*). В *E. coli* в анаэробных условиях был клонирован фермент из термофильной бактерии *Aquifex aeolicus* и благодаря его термостабильности очищен до видимой гомогенности [16]. При инкубации фермента в среде с полностью определенным составом наблюдали восстановление очищенного НМВРР с образованием IPP и DMAPP в соотношении между 4:1 и 5:1. Был определен ряд кинетических параметров IPP/DMAPP-синтазы из *A. aeolicus*. Максимальная скорость реакции при pH 7,5 и 60 °C равнялась $6,6 \pm 0,3$ мкмоль/мин мг, а $k_{cat} = 3,7 \pm 0,2$ s⁻¹. Энергия активации = 49 ± 2 кДж. Константа Михаэлиса для НМВРР составляла 590 ± 60 мкМ [16]. Наличие в спектре поглощения белка широкого максимума в области 420 нм, уменьшающегося при добавлении дитионита, характерные ЭПР и спектры комбинационного рассеяния свидетельствовали о том, что он так же, как и НМВРР-синтаза, содержит железо-серный кластер, вероятно $[4Fe-4S]^{2+}$. Очищенный препарат фермента имел коричневую окраску и, подобно НМВРР-синтазе, был очень чувствителен к кислороду: инкубация на воздухе в течении 10 минут снижала активность IPP/DMAPP-синтазы из *A. aeolicus* на 80% [16, 209].

Недооценка чувствительности фермента к кислороду долгое время тормозила его изучение, так как не удавалось наблюдать образования продуктов реакции *in vitro* при использовании очищенного рекомбинантного белка. В то же время, возможно, его низкие активности в очищенном состоянии объясняются и другими причинами. Так, в уже цитированной работе Адама и др. [16] было показано, что добавка к

лизату *E. coli* очищенного препарата IspH примерно в 4,5 раза увеличивала активность экстракта. На этом основании авторы предположили, что подобно HMBPP-синтазе, IspH для проявления максимальной активности нуждается в каких-то не идентифицированных белках, обеспечивающих необходимые для нормальной работы фермента окислительно-восстановительные условия в активном центре [16]. Позднее эти же авторы обнаружили, что при использовании фотовосстановленного 10-метил-5-диаза-изоаллоксазина очищенный рекомбинантный белок из *E. coli* катализирует образование смеси IPP и DMAPP в соотношении 6 : 1 со скоростью 0,4 мкмоль/мин мг. При использовании смеси, включающей флаводоксин, флаводоксинредуктазу и NADPH скорость реакции составляла 3 нмоль/мин мг [166].

Вообще свойства двух последних ферментов MEP-пути, HMBPP- и IPP/DMAPP-синтаз (или IspH и IspG) оказались близки. В ходе обеих реакций, скорее всего, происходит двухэлектронное восстановление, возможно, при участии различных доноров электронов — NADPH или NADH.

Функционирование и роль IPP/DMAPP-синтазы недавно были исследованы в растениях табака. При вирус-индуцированной *silence*-мутации гена *ispH* происходит накопление HMBPP, а также (E)-2-метилбут-2-ен-1,4 диола. Вследствие нарушения синтеза ИП резко снижается количество каротиноидов и хлорофилла, происходит изменение структуры хлоропластов, уменьшение их количества. Такие проростки имеют альбино-фенотип [141].

ДВА ПУТИ СИНТЕЗА ИП: MVA И MEP

При сравнении реакций MVA и MEP путей (рис. 3, А и Б) видно, что прямая энергетическая «стоимость» первого существенно выше.

Затраты MVA-пути в расчете на одну изопреновую единицу составляют: три макроэргических эквивалента (в виде ацетил CoA) при синтезе 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA и три молекулы АТФ на завершающих стадиях пути. Реакция образования MVA требует также две молекулы NADPH. Таким образом, синтез IPP или DMAPP, которые используются и для синтеза структурных компонентов клетки (т.е. в очень больших количествах), по MVA-пути является весьма энергетически затратным.

MEP-путь значительно экономичнее. В этом случае для образования молекулы IPP (или DMAPP) используется только по одной молекуле СТР, АТФ и NADPH.

Нужно, однако, оговориться, что если в заключительных реакциях MEP-пути используются дополнительные восстановительные эквиваленты (два?), то эти подсчеты для немевалонатного пути не ока-

жутся столь благоприятными. С другой стороны, многие MEP-синтезирующие виды организмов относятся к патогенам или фотосинтетикам. В обоих случаях доступность NADPH (NADH) не является лимитирующим фактором, что делает использование MEP-пути привлекательной эволюционной стратегией.

Помимо этого, важным преимуществом MEP-пути в определенных условиях может являться и то, что он, одновременно и независимо от других ферментных систем, генерирует оба необходимых предшественника для синтеза ИП.

Существенным кажется и то, что отношение *de novo* синтезируемых IPP и DMAPP (примерно 5 : 1) оказывается гораздо «правильнее настроено» для синтеза сложных ИП (где на 1 молекулу DMAPP может использоваться от одной до нескольких десятков молекул IPP), чем соотношение для системы MVA-путь/IPP-изомеразы (IPP : DMAPP = 3 : 7) [166].

Использование ряда интермедиатов для синтеза соединений отличных от IPP, является еще одной важной особенностью MEP пути. Причем, если использование DXP в синтезе витаминов В₁ (тиамина) [198] и В₆ (пиридоксина) [76, 195] можно принимать с оговорками (и выводить реакцию синтеза DXP за рамки собственно MEP-пути), то вовлечение HMBPP в образование цитокинина (зеатин рибозид 5'-фосфата) [95] или в образование у микобактерий конъюгатов с пиримидиновыми основаниями (уридином и тимидином) [63, 143] является примером, которому у мевалонатного пути нет аналогов. HMBPP является также самым мощным активатором $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов [77]. Накопление другого метаболита MEP-пути, а именно МЕСРР, которое, вероятно, является не только результатом, но и ответом на стресс (и, следовательно, предполагается его участие в антистрессорных реакциях клетки) [140], представляет собой еще одну возможную стадию этого пути, на которой его интермедиаты выводятся для участия в других метаболических реакциях. У хламидий (а возможно и у других организмов) МЕСРР служит регулятором ДНК-белковых взаимодействий, препятствуя связыванию ДНК гистон-подобным белком [68].

IV. КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДВУХ ПУТЕЙ СИНТЕЗА ИЗОПРЕНОИДОВ

Использование двух путей для биосинтеза ИП одновременно обнаружено лишь у высших растений [109] и некоторых микроорганизмов [27, 71, 100, 183]. Их функционирование в одной и той же клетке ставит вопросы о механизмах их регуляции и взаимодействии.

Особенно интригующей, вследствие отсутствия внутренних мембран, представляется ситуация у микроорганизмов, которые, к сожалению еще мало исследованы.

У патогенной бактерии *Listeria monocytogenes* функционируют оба пути, поэтому, возможно, ингибирование одного из них не сказывается на выживании этого организма [27]. У *S. griseolosporeus* MVA-путь не является жизненно необходимым [71]. Относительно биосинтеза ИП у *Streptomyces aeriovivifer* и другого актиномицета *Actinoplanes sp. A40644* известно, что на ранних стадиях роста эти организмы используют МЕР-путь, в то время как на поздних включается MVA-путь [182, 183]. Учитывая, что вторичные метаболиты обычно синтезируются при переходе в стационарную фазу, есть основания полагать, что основная роль МЕР-пути у *Streptomyces* — обеспечение первичного метаболизма, в то время как во вторичном основную роль играет MVA-путь. Информации об объемах синтеза ИП посредством каждого из путей мало. Имеются оценки продукции терпеноидного антибиотика терпентецина. В этом случае 60% необходимого IPP поставляют MVA-, а 40% — МЕР-путь [71].

Более сложная ситуация существует в растительной клетке. Как уже указывалось, в хлоропластах растений ИП синтезируются по МЕР-, а в цитозоле — по MVA-пути. Таким образом, хотя оба пути функционируют одновременно, физически они изолированы друг от друга. Из схемы на рис. 2 видно, что оба пути используются для синтеза как первичных, так и вторичных метаболитов. Однако нельзя говорить о преимущественном участии какого-либо из них в том или ином процессе метаболизма [109, 179, 180].

В годы, предшествовавшие открытию МЕР-пути, еще было мало данных о существовании физиологически значимого транспорта ИП метаболитов из цитозоля в хлоропласты или в обратном направлении [7, 8]. Однако, после обнаружения альтернативного пути, довольно быстро стали накапливаться данные, количественно и качественно характеризующие интенсивность обмена изопреновыми единицами между ИП-синтезирующими компартментами растительной клетки. Естественно, что эти характеристики в зависимости от типа клеток и их физиологического состояния варьируют в широких пределах [156]. Например, в иголках сосны отсутствует включение метки из MVA при выделении изопрена [213], который образуется из DMAPP в хлоропластах. Если учесть большие масштабы этого процесса у растений [185], следует признать полное отсутствие или незначительность поступления DMAPP/IPP в хлоропласты сосны. В то же время при анализе этого процесса у дуба, тополя, мирта, жостера и бархатных бобов выяснилось, что от 9 до 28% продуцируемого изопрена имеет

цитозольное происхождение [15, 85, 176]. Интересный пример представляют одноклеточные зеленые водоросли *Chlorophyta*. У этой группы синтез всех ИП, как цитозольных, так и пластидных, осуществляется исключительно по МЕР-пути [178]. В общем же случае, при нормальных физиологических условиях объем встречного транспорта ИП и их предшественников оценивается величиной менее 1%. [48, 54, 109]. Считается, что обмен интермедиатами двух путей обычно происходит на уровне IPP и/или фарнезилдифосфата [80, 86, 156, 177].

В опытах на проростках нескольких видов растений показано, что такой обмен недостаточен, чтобы полностью компенсировать нарушение синтеза ИП в соответствующем компартменте. Так, у *Arabidopsis thaliana* альбино-фенотип мутантов, дефектных по генам МЕР-пути, дефицит не может быть преодолен импортом предшественников ИП из цитозоля [21, 32, 57]. Также не удается восстановить синтез пигментов хлоропластов за счет цитоплазматических ИП и при обработке проростков *A. thaliana* или зеленых плодов томатов фосмидомицином [155, 158]. В свою очередь, и поток метаболитов из хлоропластов оказывается недостаточным, чтобы полностью скомпенсировать ингибирование мевинолином синтеза цитозольных ИП у томатов [159]. Однако известны случаи, когда путем импорта метаболитов другого пути небольшие нарушения практически удается исправить. Так, в ярко-желтых клетках табака (ТВУ-2) ингибирование роста фосмидомицином можно преодолеть добавкой экзогенной MVA в среду культивирования. В то же время добавка дезоксисилулозы восстанавливала нарушенное введением мевинолина ингибирование конечным продуктом ключевого фермента MVA-пути 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА редуктазы. При этом если ингибиторы обоих путей добавлены одновременно, то относительное включение MVA в пластохинон в хлоропластах усиливается [74]. У нуль-мутанта *A. thaliana* по гену DXP-синтазы добавление MVA восстанавливало на свету взаимодействие тилакоидных мембран хлоропластов, а в темноте, в этиопластах — образование проламеллярных тел и пластоглобул [127]. У *A. thaliana* установлено существование двух механизмов адаптации к нарушению синтеза ИП. Если выживание при ингибировании MVA-пути обеспечивается за счет регуляции синтеза MVA, то при ингибировании МЕР-пути фосмидомицином — за счет увеличения импорта в пластиды цитозольных ИП [158].

В клетках *Catharanthus roseus* примерно 6% (от количества включавшегося в пигменты хлоропластов) метки ^{13}C -1-дезоксидеокси-D-ксилозы обнаруживалось в цитозольных фитостеролах [24]. Также в опытах по включению меченой ^{13}C -1-дезоксидеокси-D-ксилозы наблюдали, что синтезированный в пластидах геранилдифосфат использу-

ется цитозольной фарнезилтрансферазой для синтеза фарнезилдифосфата. При этом источником третьей изопреновой единицы сесквитерпенов служит IPP цитозоля [14]. Вообще, ситуация, когда оба пути объединяют усилия в синтезе «химерных» ИП, не уникальна. Так, например, синтезируются β -ситостеролы и стигмастеролы у *Croton sublyratus*. Вклад изопреновых единиц обоих путей примерно одинаков [46]. Имеются примеры химерных ИП с локализацией в пластидах. У печеночных мхов обнаружена конденсация IPP хлоропластов и цитоплазматического фарнезилдифосфата мевалонатного происхождения с последующим включением в дитерпеноиды и в фитольную часть хлорофилла [80, 81, 86, 128, 129, 199].

Еще одним, довольно распространенным вариантом взаимодействия МЕР- и MVA-путей у растений является видоспецифичный синтез ИП, когда одни и те же или близкие ИП у родственных организмов синтезируются разными путями [87, 118].

Среди особенностей функционирования биосинтеза ИП по МЕР-пути в растениях стоит кратко обратить внимание на регуляторные аспекты, подробно описанные в обзоре Родригеса-Консепсьон и Бороната [156]. Экспрессируемые последовательности (EST) DXP- и HMBPP-синтаз составляют 2 промилле, а для IPP/DMAPP-синтазы 1 промилле от всех EST в библиотеках *A. thaliana*. В *C. roseus* ферменты МЕР-пути экспрессируются совместно [34]. Все гены МЕР-пути локализованы в ядре, поэтому все ферменты имеют пластидную сигнальную последовательность [156]. Результаты исследований говорят, что ключевыми ферментами этого пути синтеза у растений являются DXP-синтаза [58, 114, 203, 204] и, вероятно, DXP-редуктоизомераза [38, 116, 201, 203], а для микроорганизмов установлена регуляторная роль CDP-МЕ киназы (хламидии) [68] и IPP/DMAPP-синтазы (*E. coli*) [45].

В митохондриях МЕР-путь отсутствует и для биосинтеза пренильных цепей убихинонов используется цитозольный IPP [109].

В заключение этого раздела упомянем о неясной ситуации относительно количества путей биосинтеза ИП у простейших, имеющих особую органеллу, апикопласт. Считается что ее эволюционным предшественником являются пластиды. К организмам, имеющим апикопласт, относятся возбудители малярии из рода *Plasmodium* и токсоплазма (*Toxoplasma*). У малярийного плазмодия наличие МЕР-пути твердо установлено [83]. Но, исходя из того, что у этого организма происходит эффективное включение ^{14}C -мевалоната в фарнезилдифосфат, для *P. falciparum* весьма высока вероятность сосуществования МЕР- и MVA-путей [119].

V. МЕДИЦИНСКИЕ ПРОБЛЕМЫ

То, что у патогенных микроорганизмов и человека биосинтез жизненно необходимых ИП протекает совершенно различными метаболическими путями, имеет важные последствия медицинского характера. С одной стороны, это открывает дополнительные возможности для поиска новых лекарств. С другой стороны, отдельные метаболиты МЕР-пути принимают важное участие в иммунном ответе, модулируя который можно отыскать новые методы лечения таких болезней, как, например, некоторые виды рака.

Повышенный интерес к поиску ингибиторов немевалонатного пути, которые могли бы стать «новыми антибиотиками», обусловлен большим количеством использующих его патогенных микроорганизмов. Среди них и ежегодно уносящие миллионы жизней возбудители туберкулеза и малярии. По оценкам американского Национального Института аллергии и инфекционных заболеваний каждый год около 2 миллиардов человек инфицируется туберкулезом, из которых у 8 миллионов развивается активная форма, а 3 миллиона умирают (<http://www.niaid.nih.gov/factsheets/tb.htm>). Ежегодно на планете заболевает малярией около 300 миллионов человек, причем около 2 млн. с летальным исходом [117]. Большую опасность для человечества представляют и возбудители таких опасных заболеваний, как чума, сибирская язва, туляремия, холера, проказа, тиф, дифтерия, коклюш и др. К организмам, представляющим мишень для новых антибиотиков, относятся также возбудители ряда заболеваний, переносимых с пищей и водой (ботулизм, сальмонеллез и др.), язвенной болезни, ОРЗ, болезнью мочевого тракта.

Известные в настоящее время возбудители болезней человека и животных, использующих МЕР-путь, перечислены в таблице. В основном, она составлена на основе данных Эберля и Теста с соавторами [53, 196] с учетом подразделений на категории опасности, введенные Центром лечения и профилактики заболеваний при американском министерстве здравоохранения (Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention) (<http://www.bt.cdc.org/Agent/Agentlist.asp>). По этой классификации, в наиболее опасную категорию (категорию А) отнесены организмы, которые могут быть использованы в военных целях и/или обладающие такими характеристиками, как высокая инфекционность и смертность, которые могут вызывать панику среди населения и требуют специальных мероприятий со стороны общественных служб. Менее опасные организмы, которые также могут быть использованы в качестве биологического оружия, отнесены к категории Б. Возможность такого «практического применения» патогенов, естественно, придает особое значение изучению различных аспектов МЕР-пути.

Таблица.

Заболевания человека и животных, вызываемые организмами, использующих МЕР-путь биосинтеза изопреноидов
(по [53, 196], с изменениями. Пояснения см. в тексте)

Возбудитель	Заболевание
1	2
Категория А	
<i>Bacillus anthracis</i>	Сибирская язва
<i>Clostridium botulinum</i>	Ботулизм
<i>Francisella tularensis</i>	Туляремия
<i>Yersinia pestis</i>	Чума
Категория Б	
<i>Brucella melitensis</i>	Мальтийская лихорадка; бруцеллез (козы)
<i>Brucella suis</i>	Бруцеллез (свиньи)
<i>Clostridium perfringens</i>	Газовая гангрена
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Энтерогеморрагии
<i>Salmonella enterica</i>	Сальмонеллез
<i>Salmonella enteritidis</i>	Сальмонеллез
<i>Salmonella typhi</i>	Брюшной тиф
<i>Salmonella typhimurium</i>	Сальмонеллез; гастроэнтерит
<i>Burkholderia mallei</i>	Сап
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Мелиодоз (болезнь Стентона, болезнь Флетчера)
<i>Chlamydomphila caviae</i> (<i>Chlamydomphila psittaci</i>)	Орнитоз (пситтакоз, попугайная болезнь)
<i>Vibrio cholerae</i>	Холера
Другие патогены человека	
<i>Actinobacillus actinomycetecomitans</i>	Периодонтит
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Гранулоцитный эрлихиоз человека (переносится клещами)
<i>Bacteroides fragilis</i>	Условно-патогенный организм; представитель нормальной микрофлоры кишечника
<i>Bifidobacterium longum</i>	Условно-патогенный организм; представитель нормальной микрофлоры кишечника и мочеполового тракта
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Респираторные заболевания
<i>Bordetella pertussis</i>	Коклюш
<i>Burkholderia cepacia</i>	Инфекции дыхательного тракта
<i>Campylobacter jejuni</i>	Пищевой патоген, частая причина диареи
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Хламидиоз человека; лимфогранулома; трахома; инклюзивный конъюнктивит
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Бронхит и пневмония человека
<i>Clostridium difficile</i>	Колит
<i>Clostridium tetani</i>	Столбняк
<i>Cornebacterium diphteriae</i>	Дифтерия

См. окончание табл.

Окончание табл.

1	2
<i>Erlischia chaffensis</i>	Возбудитель заболевания, сходного с пятнистой лихорадкой Скалистых гор (переносится клещами)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Болезни мочевых путей; раневые инфекции
<i>Escherichia coli</i>	Условно-патогенный организм
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Мягкий шанкр
<i>Haemophilus influenzae</i>	Детские ОРЗ; бактеремия; острый бактериальный менингит
<i>Helicobacter pylori</i>	Язвенная болезнь
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Инфекции мочевого тракта
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Пневмония; инфекции мочевого тракта
<i>Leptospira interrogans</i>	Лептоспироз; асептический менингит
<i>Listeria monocytogenic</i>	Листерия; пищевые инфекции
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Респираторные инфекции
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Инфекции среднего уха; паразит слизистой оболочки кишечника
<i>Mycobacterium leprae</i>	Проказа
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Бактеремии
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Туберкулез
<i>Mycoplasma penetrans</i>	Внутриклеточный паразит человека, обычно поражает при СПИДе
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Гонорея
<i>Neisseria meningitidis</i>	Менингит
<i>Neorickettsia sennetsu</i>	Моноцитарная ангина; лихорадка sennetsu
<i>Plasmodium falciparum</i>	Малярия
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Периодонтальная болезнь
<i>Prevotella intermedia</i>	Периодонтальная болезнь
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Возбудитель госпитальных инфекций
<i>Psychrobacter sp.</i>	Менингит; бактеремии, глазные инфекции
<i>Serratia marcescens</i>	Болезни мочевых путей; муковисцидозные инфекции
<i>Shigella dysenteriae</i>	Бактериальная дизентерия
<i>Shigella flexneri</i>	Пищевые инфекции
<i>Tannerella forsythensis</i>	Периодонтальная болезнь
<i>Toxoplasma gondii</i>	Токсоплазмоз
<i>Treponema denticola</i>	Периодонтальная болезнь
<i>Treponema pallidum</i>	Сифилис
<i>Tropheryma whipplei</i>	Болезнь Уиппла
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Диарея; лихорадки
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Диарея; лихорадки; боли в животе
Патогены животных	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Плевропневмония свиней
<i>Pasteurella multocida</i>	Заболевания кроликов

ПОИСК НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ
ИНГИБИТОРОВ МЕР-ПУТИ

Принцип действия антибиотиков, в общем случае, базируется на существовании различий у человека и животных, с одной стороны, и патогенных микроорганизмов — с другой, в свойствах ферментов, связанных с жизненно важными процессами. К сожалению, не так уж много основных метаболических путей, которые бы кардинально различались у про- и эукариот. Не считая синтеза микроорганизмами клеточной стенки, пожалуй, трудно привести другие примеры, когда действие антибиотиков направлено на процессы, полностью отсутствующие у эукариот, а следовательно, обладающие меньшей вероятностью побочного действия. Наличие у человека и у многих возбудителей болезней различных путей синтеза ИП служит основой для поиска гербицидов и антибиотиков совершенно нового класса [196, 207]. В качестве таковых могут выступить и специфические ингибиторы МЕР-пути ввиду его отсутствия у человека. Успешность данного подхода была продемонстрирована при лечении малярии.

Естественным кандидатом на эту роль стал фосмидомицин, единственный в настоящее время известный специфический ингибитор немевалонатного пути, и его производные (формулы см. выше, в разделе об образовании МЕР).

Обнадеживающие результаты были получены уже в первых экспериментах. Фосмидомицин не только ингибировал штаммы *P. falciparum* с множественной лекарственной устойчивостью в опытах *in vitro*, но и показал значительный терапевтический эффект на инфицированных мышах. Как и ожидалось, его токсичность для мышей была низкой — 8 г/кг при пероральном введении и 5 г/кг при подкожном [83]. Однако, вследствие сильного отрицательного заряда молекулы фосмидомицина, его поступление в клетку является критическим этапом, приводя к снижению эффективности. Более гидрофобные соединения — производное фосмидомицина FR900098 и его дифенильные или ацилоксиалкильные эфиры — были при той же токсичности почти в 2 раза эффективнее *in vitro* и *in vivo*, чем фосмидомицин [83, 132, 150].

В клинических испытаниях в Габоне фосмидомицин при его хорошей переносимости больными показал себя весьма эффективным средством против малярии. При пероральном введении каждые 8 часов в течение 3, 4 или 5 дней 1200 мг фосмидомицина в среднем к 44-му часу исчезали паразиты в крови и прекращались приступы лихорадки. Через две недели такой эффект достигался у 60, 88 и 89% пациентов, соответственно. На 28-й день выздоравливали 7 из 9 больных (78%) [108, 125].

Вторая серия клинических испытаний по аналогичной схеме (1200 мг фосмидомицина перорально каждые 8 часов в течение 7 дней) проводилась в Таиланде. В этом случае также достигалось быстрое (в среднем к 41-му часу) временное исчезновение приступов лихорадки и паразитов из кровотока. Но полное излечение (т.е. отсутствие паразитемии и лихорадки на 28-й день) отмечено только в 22% случаев. Из побочных эффектов отмечены лишь слабые расстройства кишечника у нескольких пациентов. Показатели стандартных гематологических и биохимических анализов были в пределах нормы в течение всего периода наблюдения [108].

Несмотря на эти обнадеживающие результаты, из-за высокой вероятности возврата симптомов заболеланий было предложено использовать фосмидомицин в комбинации с другими препаратами. Для клинических испытаний был отобран клиндамицин, бактериостатик из группы линкосаминов, который применялся для лечения малярии вместе с хинином [206]. Ранее была показана синергичность действия фосмидомицина и клиндамицина или линкомицина в экспериментах *in vitro* и *in vivo* на животных [207]. Клинические испытания в Африке выявили, что для детей 7-14 лет комбинация фосмидомицин-клиндамицин (перорально 30 и 5 мг/кг соответственно; 2 раза в день в течение 5 дней) была намного эффективнее, чем при использовании индивидуальных препаратов. В этом случае сокращалось время лечения (18 часов против 25 и 71 часа, соответственно) и наблюдалось 100% излечение [29].

Несомненно, что будет продолжен поиск новых ингибиторов на базе фосмидомицина или модифицированных метаболитов МЕР-пути. Учитывая высокую стоимость подобных исследований на животных, идет поиск других экспериментальных моделей. В качестве таковых было предложено использование растений [112], планшеты с мутантом *S. typhimurium*, дефектным по гену *dxs* и способным к росту на MVA [196], высокопроизводительная скрининговая система с суррогатными (биотинилированными пептидами) лигандами для анализа ингибиторов DXP-редуктазы [67].

МОДУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

При многих инфекциях, включая туберкулез и малярию, происходит специфическая активация и пролиферация $V\gamma 9/V\sigma 2$ -Т-лимфоцитов [53]. Это одна из больших субпопуляций $V\gamma\sigma$ -Т-клеток, которые в сумме составляют до 15% всех Т-лимфоцитов крови. $V\gamma 9/V\sigma 2$ -клетки имеют две важные особенности. Во-первых, их ответ определяется только присутствием на мембране специфического для этих клеток рецептора ($V\gamma 9/V\sigma 2$ рецептора) и, таким образом, не нуждается в представлении антигена посредством системы комплемента. Во-вто-

рых, $V\gamma 9/V\sigma 2$ -Т-клетки обладают уникальной способностью активироваться рядом низкомолекулярных фосфорилированных соединений непептидной природы. Этот процесс протекает только у человека и приматов. Физиологическое его значение в настоящее время не ясно. Возможная роль этих фактов в эволюции обсуждается в обзоре Эберля и др. [53].

Идентификации таких природных фосфоантигенов предшествовало наблюдение, что человеческие $\gamma\sigma$ -Т-клетки активируются экстрактами *Mycobacterium tuberculosis*. Выделенный из этих экстрактов ИРР вызывал их пролиферацию и был признан в качестве природного активирующего лиганда [194]. Позднее из микобактерий [28, 47], а затем и из *E. coli* [61] было выделено фосфорилированное соединение – стимулятор $\gamma\sigma$ -Т-клеток с молекулярной массой равной 262 Да, которому авторы приписали структуру 3-формил-1-бутилпирофосфата. Что же касается ИРР, то в дальнейшем было установлено, что его внутриклеточная концентрация в клетках микроорганизмов в обычных условиях слишком мала, чтобы оно могло рассматриваться в качестве естественного активатора $\gamma\sigma$ -Т-клеток [82].

В этой же работе был сделан важный вывод о корреляции между наличием МЕР-пути и способностью к стимуляции $V\gamma 9/V\sigma 2$ -клеток. Оказалось, что экстракты из клеток микроорганизмов, синтезирующих ИП по МВА-пути, такой способностью не обладают [82]. При анализе мутантов *E. coli*, у которых были удалены или разорваны различные гены МЕР-пути, выяснилось, что истинным природным лигандом $V\gamma 9/V\sigma 2$ -Т-клеток скорее всего является один из продуктов поздних генов, а именно гена *ispH* (*lytB*). Так, экстракты из штамма, мутантного по этому гену, имели в 150 раз более высокую $\gamma\sigma$ -Т-стимулирующую активность, чем из дикого типа *E. coli*, а из штаммов, дефектных по *ispC* (*dxc*) или *ispG* (*gcpE*), наоборот, обладали гораздо более низкой иммуногенностью [52]. Однако, иммуностимулирующую активность *ispC* мутанта удавалось восстановить добавкой к экстракту экзогенного 2-С-метил-Д-эритритола [20]. Поскольку было известно, что ни один из ранних метаболитов МЕР-пути (DXP, МЕР, CDP-МЕ, CDP-МЕ₂P, МЕСРР) не обладает какой-либо Т-клеточно-стимулирующей активностью [10, 61, 82, 149], был сделан вывод, что за нее отвечает неизвестное в то время вещество. В результате, из экстрактов *ispH*-нокаут мутанта было выделено и очищено низкомолекулярное (молекулярная масса 262 Да) фосфорсодержащее соединение, обладавшее способностью стимулировать $V\gamma 9/V\sigma 2$ -Т-клетки примерно в 10 тысяч раз сильнее (EC_{50} около 0,1 нМ), чем ИРР. Тем самым оно стало самым мощным и специфичным из всех известных активаторов этих клеток. Методами масс- и ЯМР-спектроскопии, в частности оверхаузеровской спектроскопии, это соединение

было идентифицировано как НМВРР [77], которое, как показали последующие исследования [16, 73, 92], является нормальным метаболитом МЕР-пути. После сравнения масс-спектров НМВРР с опубликованными масс-спектрами 3-формил-1-бутилпирофосфата возникло предположение, что они принадлежат одному и тому же соединению. Об этом же говорят и некоторые отличия опубликованных ЯМР-спектров формил-1-бутилпирофосфата от ожидаемых для соединения с такой структурой [53, 77].

Показано, что среди всех лимфоцитарных клеток только $V\gamma 9/V\sigma 2$ -Т-клетки активируются НМВРР. Это приводит к секреции цитокинов и усиленной пролиферации этих клеток [52, 77]. Вследствие же цитотоксичности $V\gamma 9/V\sigma 2$ -Т для раковых клеток рассматривается возможность применения НМВРР при лечении множественной миеломы, В-миеломы неходжкинского типа и почечной карциномы [187].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение и расшифровка реакций МЕР-пути значительно расширили наши знания о синтезе большой группы жизненно важных для всех организмов соединений, какими являются ИП. Несмотря на впечатляюще быстрый прогресс в изучении этого нового метаболического пути, нам представляется, что сделаны лишь первые шаги. Какие направления исследований немевалонатного пути синтеза изопреноидов могли бы стать наиболее актуальными в ближайшее время?

В плане получения фундаментальных биохимических знаний таковыми, без сомнения, станут изучение его распространения в природе и условий функционирования в различных группах организмов, взаимодействия с МВА-путем.

Интригующим является вопрос – исчерпывается ли разнообразие синтеза ИП двумя известными путями биосинтеза. По всей вероятности, могут быть обнаружены различные модификации ставших уже каноническими схем МЕР- и МВА-путей. Получены данные о том, что при фотосинтетических условиях у цианобактерий в качестве прямых предшественников ИП могут использоваться не только ГАЗР и пируват, но и фосфорилированные сахара, являющиеся продуктами фотосинтеза и пентозофосфатного шунта. Предполагается, что в этом случае объединение классического и модифицированного МЕР-путей происходит на уровне МЕР [56, 142]. Также и при синтезе ИП по МВА-пути обнаружено участие других соединений, помимо изученных. Включение в стероиды всех без исключения атомов углеродного скелета лейцина у трипаномы *Leishmania mexicana* говорит о том, что этот процесс протекает без предварительной деградации до уровня

ацетил CoA. Ингибиторный анализ и подавление включения лейцина мевалонатом показывает, что лейцин или продукты его деградации включаются в MVA-путь на уровне 3-гидрокси-3-метил CoA [66].

Конечно же, будут продолжены исследования ферментов МЕР-пути, изучение механизмов и способов регуляции катализируемых ими реакций. Учитывая различие путей синтеза ИП у человека и патогенных микроорганизмов, мы надеемся, что полученная информация может оказать неоценимую помощь в поиске новых антибиотиков.

Успешные результаты применения фосмидомицина при лечении малярии стимулируют дальнейшие работы по поиску специфических ингибиторов МЕР-пути [170]. Разработано несколько скрининг-моделей [67, 112, 175, 196], позволяющих одновременно анализировать до десятков тысяч соединений на роль ингибиторов отдельных ферментов МЕР-пути [67]. В качестве таковых проверяются и модифицированные производные природных субстратов. Разработка методов синтеза субстратов МЕР-пути и их аналогов служит хорошей базой для таких исследований [42, 63–65, 94, 121, 200].

Повышенное внимание к поиску новых антибиотиков в последнее время связано не только с традиционной задачей борьбы с инфекционными заболеваниями, но и с появившейся недавно весьма серьезной угрозой биотерроризма.

В настоящее время, конечно, нельзя предсказать все направления, по которым пойдет углубленное изучение МЕР-пути и его прикладных аспектов, но, несомненно, нас ждет немало неожиданностей. Например, изопрену (второму по объему после метана газу биогенного происхождения из поступающих в атмосферу [185], продукту МЕР-пути) ранее приписывалось лишь участие в модулировании термотолерантности растений [184]. Недавно же было показано, что при радикал-опосредованном фотоокислении изопрена образуется спиртовой аналог МЕР. Согласно оценкам авторов, его глобальная продукция может достигать до 40 миллионов тонн в год [40]. Имея низкую летучесть, это соединение должно легко конденсироваться, в том числе неподалеку от места образования изопрена — на листьях деревьев. И легко предположить возможность поглощения клетками 2-D-метилэритритола. Этот процесс представляет своего рода биосферный salvage-путь, являясь важным источником субстрата МЕР-пути и возвращая выделенный растениями углерод.

Итак, несмотря на сложность прогнозов развития научных исследований, в одном можно быть уверенным — в ближайшие годы изучение немевалонатного пути биосинтеза изопреноидов принесет немало интересных результатов.

Автор выражает благодарность за обсуждение работы и ценные критические замечания Н. В. Соловьевой, В. А. Пасешниченко и Д. Н. Островскому.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Г. Р., Плевакова О. В., Сибельдина Л. А., Харатьян Е. Ф., Щипанова И. Н., Островский Д. Н. (1995) Биохимия, **60**, 481–487.
2. Лысак Е. И., Огрель О. Д., Харатьян Е. Ф., Щипанова И. Н., Островский Д. Н. (1995) Микробиология, **64**, 437–441.
3. Огрель О. Д., Фегединг К. В., Капрельянец А. С., Лысак Е. И., Нго Минь Шон, Сударииков А. Б., Островский Д. Н. (1996) Биохимия, **61**, 1294–1302.
4. Островский Д. Н., Досанов К. Ш., Калюк А. Н., Огрель О. Д., Сибельдина Л. А., Харатьян Е. Ф., Щипанова И. Н., Шаров А. Н. (1994) Микробиология, **63**, 431–438.
5. Островский Д. Н., Лысак Е. И., Сибельдина Л. А., Харатьян Е. Ф., Щипанова И. Н. (1994) Доклады РАН, **337**, 687–689.
6. Островский Д. Н., Огрель О. Д., Бинюков В. И., Таптыкова С. Д., Харатьян Е. Ф., Шашков А. С., Шумаев К. Б., Щипанова И. Н. (1992) Доклады РАН, **325**, 1071–1076.
7. Пасешниченко В. А. Биосинтез и биологическая активность растительных терпеноидов и стероидов. сер. Биологическая химия. **25**, ВИНИТИ, 1987, М.
8. Пасешниченко В. А. (1995) Физиология растений, **42**, 787–804.
9. Пасешниченко В. А. (1995) Биохимия, **63**, 171–182.
10. Потапов В. Д., Бикетов С. Ф., Демина Г. Р., Лысак Е. И., Титарева Г. М., Бахтеева И. В., Островский Д. Н. (2001) Прикл. Биохим. Микробиол., **37**, 274–278.
11. Фробшер М. Основы микробиологии. Мир, 1965, М.
12. Щипанова И. Н., Харатьян Е. Ф., Сибельдина Л. А., Огрель О. Д., Островский Д. Н. (1992) Биохимия, **57**, 862–872.
13. Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Grawert, T., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 12108–12113.
14. Adam, K. P., Thiel, R., Zapp, J. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **369**, 127–132.
15. Affek, H. P., Yakir, D. (2003) Plant Physiol., **131**, 1727–1736.
16. Altincicek, B., Duin, E. C., Reichenberg, A., Hedderich, R., Kollas, A. K., Hintz, M., Wagner, S., Wiesner, J., Beck, E., Jomaa, H. (2002) FEBS Lett., **532**, 437–440.
17. Altincicek, B., Hintz, M., Sanderbrand, S., Wiesner, J., Beck, E., Jomaa, H. (2000) FEMS Microbiol. Lett., **190**, 329–333.
18. Altincicek, B., Kollas, A., Eberl, M., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Hintz, M., Beck, E., Jomaa, H. (2001) FEBS Lett., **499**, 37–40.
19. Altincicek, B., Kollas, A. K., Sanderbrand, S., Wiesner, J., Hintz, M., Beck, E., Jomaa, H. (2001) J. Bacteriol., **183**, 2411–2416.
20. Altincicek, B., Moll, J., Campos, N., Foerster, G., Beck, E., Hoeffler, J. F., Grosdemange-Billiard, C., Rodriguez-Concepcion, M., Rohmer, M., Boronat, A., Eberl, M., Jomaa, H. (2001) J. Immunol., **166**, 3655–3658.
21. Araki, N., Kusumi, K., Masamoto, K., Niwa, Y., Iba, K. (2000) Physiol. Plant., **108**, 19–24.
22. Arigoni, D., Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewicz, T., Zenk, M. H., Bacher, A. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 1309–1314.
23. Arigoni, D., Giner, J.-L., Sagner, S., Wungstintaweekul, J., Zenk, M. H., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (1999) Chem. Commun., 1127–1128.
24. Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M. H. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 10600–10605.
25. Bailey, A. M., Mahapatra, S., Brennan, P. J., Crick, D. C. (2002) Glycobiology, **12**, 813–820.

26. Bajguz, A., Asami, T. (2004) *Planta*, **218**, 869–877.
27. Begley, M., Gahan, C.G., Kollas, A.K., Hintz, M., Hill, C., Jomaa, H., Eberl, M. (2004) *FEBS Lett.*, **561**, 99–104.
28. Belmont, C., Espinosa, E., Poupot, R., Peyrat, M.A., Guiraud, M., Poquet, Y., Bonneville, M., Fournie, J.J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 32079–32084.
29. Borrmann, S., Adegnik, A.A., Matsiegui, P.B., Issifou, S., Schindler, A., Mawili-Mboumba, D.P., Baranek, T., Wiesner, J., Jomaa, H., Kreamer, P.G. (2004) *J. Infect. Dis.*, **189**, 901–908.
30. Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R.A., Camara, B. (1998) *Plant Physiol.*, **117**, 1423–1431.
31. Broers, S.T.J. Ph. D. Thesis. ETH 10978, Eidgenossische Technische Hochschule, Zurich, Switzerland, 1994.
32. Budziszewski, G.J., Lewis, S.P., Glover, L.W., Reineke, J., Jones, G., Ziemnik, L.S., Lonowski, J., Nyfeler, B., Aux, G., Zhou, Q. (2001) *Genetics*, **159**, 1765–1778.
33. Bu'Lock, J.D. (1961) *Adv. Appl. Microbiol.*, **3**, 293–342.
34. Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M., St-Pierre, B. (2004) *Plant J.*, **38**, 131–141.
35. Campbell, T.L., Brown, E.D. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 5609–5618.
36. Campos, N., Rodriguez-Concepcion, M., Sauret-Gueto, S., Gallego, F., Lois, L.M., Boronat, A. (2001) *Biochem. J.*, **353**, 59–67.
37. Campos, N., Rodriguez-Concepcion, M., Seemann, M., Rohmer, M., Boronat, A. (2001) *FEBS Lett.*, **488**, 170–173.
38. Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodriguez-Concepcion, M., Ferrer, A., Boronat, A., Campos, N. (2002) *Plant Physiol.*, **129**, 1581–1591.
39. Charon, L., Hoeffler, J.F., Pale-Grosdemange, C., Lois, L.M., Campos, N., Boronat, A., Rohmer, M. (2000) *Biochem. J.*, **346**, 737–742.
40. Claey, M., Graham, B., Vas, G., Wang, W., Vermeylen, R., Pashynska, V., Cafmeyer, J., Guyon, P., Andreae, M.O., Artaxo, P., Maenhaut, W. (2004) *Science*, **303**, 1173–1176.
41. Connolly, J.D., Hill, R.A. *Dictionary of Terpenoids*. 1992, NY.: Chapman and Hall.
42. Cox, R.J., Andres-Gomez, A., Godfrey, C.R. (2003) *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 3173–3177.
43. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B., Gruissem W., Jones R., Eds.), 2000, Rockville: American Society of Plant Biologists, 1250–1268.
44. Cunningham, F.X., Jr, Gantt, E. (2000) *Plant Cell Physiol.*, **41**, 119–123.
45. Cunningham, F.X., Jr, Lafond, T.P., Gantt, E. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 5841–5848.
46. De-Eknamkul, W., Potduang, B. (2003) *Phytochemistry*, **62**, 389–398.
47. De Libero (1997) *Immunol. Today*, **18**, 22–26.
48. Disch, A., Schwender, J., Muller, C., Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. (1998) *Biochem. J.*, **333**, 381–388.
49. Dubey, V.S., Bhala, R., Luthra, R. (2003) *J. Biosci.*, **28**, 101–110.
50. Duvold, T., Bravo, J.-M., Pale-Grosdemange, C., Rohmer, M. (1997) *Tetrahedron Lett.*, **38**, 4769–4772.
51. Duvold, T., Cali, P., Bravo, J.-M., Rohmer, M. (1997) *Tetrahedron Lett.*, **38**, 6181–6184.
52. Eberl, M., Altincicek, B., Kollas, A.K., Sanderbrand, S., Bahr, U., Reichenberg, A., Beck, E., Foster, D., Wiesner, J., Hintz, M., Jomaa, H. (2002) *Immunology*, **106**, 200–211.
53. Eberl, M., Hintz, M., Reichenberg, A., Kollas, A.K., Wiesner, J., Jomaa, H. (2003) *FEBS Lett.*, **544**, 4–10.
54. Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001) *Trends Plant Sci.*, **6**, 78–84.
55. Ershov, Y., Gantt, R.R., Cunningham, F.X., Gantt, E. (2000) *FEBS Lett.*, **473**, 337–340.

56. Ershov, Y.V., Gantt, R.R., Cunningham, F.X., Jr, Gantt, E. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 5045–5051.
57. Estevez, J.M., Cantero, A., Romero, C., Kawaiide, H., Jimenez, L.F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y., Leon, P. (2000) *Plant Physiol.*, **124**, 95–104.
58. Estevez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., Leon, P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 22901–22909.
59. Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, S., Wungstintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Kis, K., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Zenk, M.H. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6302–6310.
60. Fellermeier, M., Sagner, S., Spiteller, P., Spiteller, M., Zenk, M.H. (2003) *Phytochemistry*, **64**, 199–207.
61. Feurle, J., Espinosa, E., Eckstein, S., Pont, F., Kunzmann, V., Fournie, J.J., Herderich, M., Wilhelm, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 148–154.
62. Flesh, G., Rohmer, M. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **175**, 405–411;
63. Fox, D.T., Poulter, C.D. (2002) *J. Org. Chem.*, **67**, 5009–5010.
64. Giner, J.L., Ferris, W.V., Jr. (2002) *Org. Lett.*, **4**, 1225–1226.
65. Giner, J.L., Ferris, W.V., Jr, Mullins, J.J. (2002) *J. Org. Chem.*, **67**, 4856–4859.
66. Ginger, M.L., Chance, M.L., Sadler, I.H., Goad, L.G. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 11674–11682.
67. Gottlin, E.B., Benson, R.E., Conary, S., Antonio, B., Duke, K., Payne, E.S., Ashraf, S.S., Christensen, D.J. (2003) *J. Biomol. Screen.*, **8**, 332–339.
68. Grieshaber, N.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Dooley, C.A., Hackstadt, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7451–7456.
69. Grolle, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (2000) *FEMS Microbiol. Lett.*, **191**, 131–137.
70. Hahn, F.M., Hurlburt, A.P., Poulter, C.D. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 4499–4504.
71. Hamano, Y., Dairi, T., Yamamoto, M., Kuzuyama, T., Itoh, N., Seto, H. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 808–819.
72. Harker, M., Bramley, P.M. (1999) *FEBS Lett.*, **448**, 115–119.
73. Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14837–14842.
74. Hemmerlin, A., Hoeffler, J.F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I.A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., Bach, T.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 26666–26676.
75. Herz, S., Wungstintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Lutgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M.H., Bacher, A., Rohdich, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2486–2490.
76. Hill, R.E., Himmeldirk, K., Kennedy, I.A., Pauloski, R.M., Sayer, B.G., Wolf, E., Spenser, I.D. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30426–30435.
77. Hintz, M., Reichenberg, A., Altincicek, B., Bahr, U., Gschwind, R.M., Kollas, A.K., Beck, E., Wiesner, J., Eberl, M., Jomaa, H. (2001) *FEBS Lett.*, **509**, 317–322.
78. Hoeffler, J.F., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4446–4457.
79. Hunter, W.N., Bond, C.S., Gabrielsen, M., Kemp, L.E. (2003) *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 537–542.
80. Itoh, D., Karunagoda, R.P., Fushie, T., Katoh, K., Nabeta, K. (2000) *J. Nat. Prod.*, **63**, 1090–1093.
81. Itoh, D., Kawano, K., Nabeta, K. (2003) *J. Nat. Prod.*, **66**, 332–336.
82. Jomaa, H., Feurle, J., Luhs, K., Kunzmann, V., Tony, H.P., Herderich, M., Wilhelm, M. (1999) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **25**, 371–378.
83. Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., Soldati, D., Beck, E. (1999) *Science*, **285**, 1573–1576.

84. Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y., Seto, H. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 932–937.
85. Karl, T., Fall, R., Rosenstiel, T.N., Prazeller, P., Larsen, B., Seufert, G., Lindinger, W. (2002) Planta, **215**, 894–905.
86. Karunagoda, R.P., Itoh, D., Katoh, K., Nabeta, K. (2001) Biosci. Biotechnol. Biochem., **65**, 1076–1081.
87. Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Sakakibara, H. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 14049–14054.
88. Kemp, L.E., Bond, C.S., Hunter, W.N. (2001) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., **57**, 1189–1191.
89. Kemp, L.E., Bond, C.S., Hunter, W.N. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 6591–6596.
90. Kemp, L.E., Bond, C.S., Hunter, W.N. (2003) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., **59**, 607–610.
91. Kishida, H., Wada, T., Unzai, S., Kuzuyama, T., Takagi, M., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Tame, J.R., Park, S.Y. (2003) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., **59**, 23–31.
92. Kollas, A.K., Duin, E.C., Eberl, M., Altincicek, B., Hintz, M., Reichenberg, A., Henschker, D., Henne, A., Steinbrecher, I., Ostrovsky, D.N., Hedderich, R., Beck, E., Jomaa, H., Wiesner, J. (2002) FEBS Lett., **532**, 432–436.
93. Koppisch, A.T., Fox, D.T., Blagg, B.S., Poulter, C.D. (2002) Biochemistry, **41**, 236–243.
94. Koppisch, A.T., Poulter, C.D. (2002) J. Org. Chem., **67**, 5416–5418.
95. Krall, L., Raschke, M., Zenk, M.H., Baron, C. (2002) FEBS Lett., **527**, 315–318.
96. Kuroda, Y., Okuhara, M., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. (1980) J. Antibiot., **33**, 29–35.
97. Kuzuyama, T. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem., **66**, 1619–1627.
98. Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Dairi, T., Seto, H. (2000) Tetrahedron Lett., **41**, 703–706.
99. Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Dairi, T., Seto, H. (2000) Tetrahedron Lett., **41**, 2925–2928.
100. Kuzuyama, T., Takagi, M., Takahashi, S., Seto, H. (2000) J. Bacteriol., **182**, 891–897.
101. Kuzuyama, T., Shimizu, T., Takahashi, S., Seto, H. (1998) Tetrahedron Lett., **39**, 7913–7916.
102. Kuzuyama, T., Takahashi, S., Watanabe, H., Seto, H. (1998) Tetrahedron Lett., **39**, 4509–4512.
103. Lange, B.M., Croteau, R. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **365**, 170–174.
104. Lange, B.M., Croteau, R. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 13714–13719.
105. Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 13172–13177.
106. Lange, B.M., Wildung, M.R., McCaskey, D., Croteau, R. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 2100–2104.
107. Lawrence, S.D., Cline, K., Moore, G.A. (1997) Plant Mol. Biol., **33**, 483–492.
108. Lell, B., Ruangweeraayut, R., Wiesner, J., Missinou, M.A., Schindler, A., Baranek, T., Hintz, M., Hutchinson, D., Jomaa, H., Kreamer, P.G. (2003) Antimicrob. Agents Chemother., **47**, 735–738.
109. Lichtenthaler, H.K. (1999) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **50**, 47–65.
110. Lichtenthaler, H.K. (2000) Biochem. Soc. Trans., **28**, 785–789.
111. Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997) FEBS Lett., **400**, 271–274.
112. Lichtenthaler, H.K., Zeidler, J., Schwender, J., Muller, C. (2000) Z. Naturforsch., **55C**, 305–313.
113. Lois, L.M., Campos, N., Putra, S.R., Danielsen, K., Rohmer, M., Boronat, A. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 2105–2110.
114. Lois, L.M., Rodriguez-Concepcion, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A. (2000) Plant J., **22**, 503–513.
115. Lutgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungstintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M.H., Bacher, A., Eisenreich, W. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 1062–1067.
116. Mahmoud, S.S., Croteau, R.B. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 8915–8920.
117. Martens, P., Hall, L. (2000) Emerg. Infect. Dis., **6**, 103–109.
118. Masse, G., Belt, S.T., Rowland, S.J., Rohmer, M. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 4413–4418.
119. Mbaya, B., Rigomier, D., Etorh, G.G., Karst, F., Schrevel, J. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., **173**, 849–854.
120. McAteer, S., Coulson, A., McLennan, N., Masters, M. (2001) J. Bacteriol., **183**, 7403–7407.
121. Meyer, O., Grosdemange-Billiard, C., Trüsch, D., Rohmer, M. (2003) Org. Biomol. Chem., **1**, 4367–4372.
122. Miallau, L., Alphey, M.S., Kemp, L.E., Leonard, G.A., McSweeney, S.M., Hecht, S., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F., Hunter, W.N. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 9173–9178.
123. Miller, B., Heuser, T., Zimmer, W. (1999) FEBS Lett., **460**, 485–490.
124. Miller, B., Heuser, T., Zimmer, W. (2000) FEBS Lett., **481**, 221–226.
125. Missinou, M.A., Borrmann, S., Schindler, A., Issifou, S., Adegnik, A.A., Matsiegui, P.B., Binder, R., Lell, B., Wiesner, J., Baranek, T., Jomaa, H., Kreamer, P.G. (2002) Lancet, **360**, 1941–1942.
126. Mueller, C., Schwender, J., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K. (2000) Biochem. Soc. Trans., **28**, 792–793.
127. Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S., Muranaka, T. (2002) Planta, **216**, 345–350.
128. Nabeta, K., Ishikawa, T., Kawae, T., Okuyama, H. (1995) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 681–682.
129. Nabeta, K., Kawae, T., Kikuchi, T., Saitoh, T., Okuyama, H. (1995) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 2529–2530.
130. Ogel, O.D., Fegeding, K.V., Kharatian, E.F., Sudarikov, A.B., Ostrovsky, D.N. (1996) Curr. Microbiol., **32**, 225–228.
131. Okuhara, M., Kuroda, Y., Goto, T., Okamoto, M., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. (1980) J. Antibiot., **33**, 24–28.
132. Ortmann, R., Wiesner, J., Reichenberg, A., Henschker, D., Beck, E., Jomaa, H., Schlitzner, M. (2003) Bioorg. Med. Chem. Lett., **13**, 2163–2166.
133. Ostrovsky, D., Amirov, R., Kharatian, E., Ogel, O., Stepanov, S., Sibeldina, L., Shipanova, I., Tapytkova, S. (1994) Biofactors, **4**, 151–154.
134. Ostrovsky, D., Diomina, G., Lysak, E., Matveeva, E., Ogel, O., Trutko, S. (1998) Arch. Microbiol., **171**, 69–72.
135. Ostrovsky, D., Diomina, G., Shipanova, I., Sibeldina, L., Shashkov, A. (1994) Biofactors, **4**, 155–159.
136. Ostrovsky, D., Kharatian, E., Dubrovsky, T., Ogel, O., Shipanova, I., Sibeldina, L. (1992) Biofactors, **4**, 63–68.
137. Ostrovsky, D., Kharatian, E., Lysak, E., Shipanova, I., Sibeldina, L. (1995) Biofactors, **5**, 1–4.
138. Ostrovsky, D., Kharatian, E., Malandrova, I., Shipanova, I., Sibeldina, L., Shashkov, A., Tantsirev, G. (1992) Biofactors, **3**, 261–264.
139. Ostrovsky, D., Shashkov, A., Sviridov, A. (1993) Biochem. J., **295**, 901–902.
140. Ostrovsky, D., Shipanova, I., Sibeldina, L., Shashkov, A., Kharatian, E., Malyarova, I., Tantsyrev, G. (1992) FEBS Lett., **298**, 159–161.
141. Page, J.E., Hause, G., Raschke, M., Gao, W., Schmidt, J., Zenk, M.H., Kutchan, T.M. (2004) Plant Physiol., **134**, 1401–1413.
142. Poliquin, K., Ershov, Y.V., Cunningham, F.X., Woreta, T.T., Gantt, R.R., Gantt, E. (2004) J. Bacteriol., **186**,

143. Poquet, Y., Constant, P., Halary, F., Peyrat, M.A., Gilleron, M., Davodeau, F., Bonneville, M., Fournie, J.J. (1996) *Eur. J. Immunol.*, **212**, 110–117.
144. Porter, J.W., Spurgeon, S.L. (Eds) *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. 1981, NY.: John Wiley and Sons.
145. Proteau, P.J., Woo, Y.H., Williamson, R.T., Phaosiri, C. (1999) *Org. Lett.*, **1**, 921–923.
146. Putra, S.R., Lois, L.M., Campos, N., Boronat, A., Rohmer, M. (1998) *Tetrahedron Lett.*, **39**, 23–26.
147. Querol, J., Campos, N., Imperial, S., Boronat, A., Rodriguez-Concepcion, M. (2002) *FEBS Lett.*, **514**, 343–346.
148. Radykewicz, T., Rohdich, F., Wung-sintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H., Arigoni, D. (2000) *FEBS Lett.*, **465**, 157–160.
149. Reichenberg, A., Hintz, M., Kletschek, Y., Kuhl, T., Haug, C., Engel, R., Moll, J., Ostrovskii, D.N., Jomaa, H., Eberl, M. (2003) *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **13**, 1257–1260.
150. Reichenberg, A., Wiesner, J., Weidemyer, C., Dreiseidler, E., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Beck, E., Schlitzer, M., Jomaa, H. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 833–835.
151. Reuter, K., Sanderbrand, S., Jomaa, H., Wiesner, J., Steinbrecher, I., Beck, E., Hintz, M., Klebe, G., Stubbs, M.T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 5378–5384.
152. Ricagno, S., Grolle, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., Lindqvist, Y., Schneider, G. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 37–44.
153. Richard, S.B., Bowman, M.E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A.M., Cane, D.E., Noel, J.P. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 641–647.
154. Richard, S.B., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Lillo, A.M., Tetzlaff, C.N., Cane, D.E., Noel, J.P. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 8667–8672.
155. Rodriguez-Concepcion, M., Ahumada, I., Diez-Juez, E., Sauret-Gueto, S., Lois, L.M., Gallego, F., Carretero-Paulet, L., Campos, N., Boronat, A. (2001) *Plant J.*, **27**, 213–222.
156. Rodriguez-Concepcion, M., Boronat, A. (2002) *Plant Physiol.*, **130**, 1079–1089.
157. Rodriguez-Concepcion, M., Campos, N., Lois, L.M., Maldonado, J.-F., Hoeffler, J.F., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., Boronat, A. (2000) *FEBS Lett.*, **473**, 328–332.
158. Rodriguez-Concepcion, M., Fores, O., Martinez-Garcia, J.F., Gonzalez, V., Phillips, M.A., Ferrer, A., Boronat, A. (2004) *Plant Cell.*, **16**, 144–156.
159. Rodriguez-Concepcion, M., Gruijssem, W. (1999) *Plant Physiol.*, **119**, 41–48.
160. Rohdich, F., Eisenreich, W., Wung-sintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A., Bacher, A. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3190–3197.
161. Rohdich, F., Hecht, S., Gartner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1158–1163.
162. Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 535–540.
163. Rohdich, F., Wung-sintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C.A., Hecht, S., Zenk, M.H., Bacher, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6451–6456.
164. Rohdich, F., Wung-sintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11758–11763.
165. Rohdich, F., Wung-sintaweekul, J., Luttgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Schramek, N., Zenk, M.H., Bacher, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8251–8256.
166. Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Grawert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1586–1591.
167. Rohmer, M. (1993) *Pure Appl. Chem.*, **65**, 1293–1298.
168. Rohmer, M. (1998) *Prog. Drug Res.*, **50**, 135–154.
169. Rohmer, M., Bouvier-Nave, P., Ourisson, G. (1984) *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1137–1150.
170. Rohmer, M., Grosdemange-Billiard, C., Seemann, M., Tritsch, D. (2004) *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **5**, 154–162.
171. Rohmer, M., Khani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H. (1993) *Biochem. J.*, **295**, 517–524.
172. Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2564.
173. Sacchettini, J.C., Poulter, C.D. (1997) *Science*, **277**, 1788–1789.
174. Sakamoto, I., Ichimura, K., Ohru, H. (2000) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 915–1922.
175. Sauret-Gueto, S., Ramos-Valdivia, A., Ibanez, E., Boronat, A., Rodriguez-Concepcion, M. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 408–415.
176. Schnitzler, J.P., Graus, M., Kreuzwieser, J., Heizmann, U., Rennenberg, H., Wisthaler, A., Hansel, A. (2004) *Plant Physiol.*, **135**, 152–160.
177. Schwarz, M. K., Ph. D. Thesis, Nb ETH 10951, Eidgenossische Technische Hochschule, Zurich, Switzerland, 1994.
178. Schwender, J., Gemunden, C., Lichtenthaler, H.K. (2001) *Planta*, **212**, 416–423.
179. Schwender, J., Muller, C., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K. (1999) *FEBS Lett.*, **455**, 140–144.
180. Schwender, J., Zeidler, J., Groner, R., Muller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F.W., Lichtenthaler, H.K. (1997) *FEBS Lett.*, **414**, 129–134.
181. Seemann, M., Bui, B.T., Wolff, M., Tritsch, D., Campos, N., Boronat, A., Marquet, A., Rohmer, M. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **41**, 4337–4339.
182. Seto, H., Orihara, N., Furihata, K. (1998) *Tetrahedron Lett.*, **39**, 9497–9500.
183. Seto, H., Watanabe, H., Furihata, K. (1996) *Tetrahedron Lett.*, **37**, 7979.
184. Sharkey, T.D., Chen, X., Yeh, S. (2001) *Plant Physiol.*, **125**, 2001–2006.
185. Sharkey, T.D., Yeh, S. (2001) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 407–436.
186. Shigi, Y. J. (1989) *J. Antimicrob. Chemoth.*, **24**, 131–145.
187. Sicard, H., Al Saati, T., Delsol, G., Fournie, J.J. (2001) *Mol. Med.*, **7**, 711–722.
188. Sinensky, M. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1484**, 93–106.
189. Sprenger, G.A., Schorken, U., Wiegert, T., Grolle, S., Graaf, A.A., Taylor, S.V., Begley, T.P., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12857–12862.
190. Steinbacher, S., Kaiser, J., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., Rohdich, F. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 18401–18407.
191. Steinbacher, S., Kaiser, J., Wung-sintaweekul, J., Hecht, S., Eisenreich, W., Gerhardt, S., Bacher, A., Rohdich, F. (2002) *J. Mol. Biol.*, **316**, 79–88.
192. Takagi, M., Kuzuyama, T., Kaneda, K., Dairi, T., Seto, H. (2000) *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3395–3398.
193. Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., Seto, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9879–9884.
194. Tanaka, Y., Morita, C.T., Nieves, E., Brenner, M.B., Bloom, B.R. (1995) *Nature*, **375**, 155–158.
195. Tazoe, M., Ichikawa, K., Hoshino, T. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 934–936.
196. Testa, C.A., Brown, M.J. (2003) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **4**, 248–259.

197. *Testa, C.A., Cornish, R.M., Poulter, C.D.* (2004) *J. Bacteriol.*, **186**, 473–480.
198. *Therisod, M., Fischer, J.C., Estramareix, B.* (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 374–379.
199. *Thiel, R., Adam, K.P.* (2002) *Phytochemistry*, **59**, 269–274.
200. *Urbansky, M., Davis, C.E., Surjan, J.D., Coates, R.M.* (2004) *Org. Lett.*, **6**, 135–138.
201. *Veau, B., Courtois, M., Oudin, A., Chenieux, J.C., Rideau, M., Clastre, M.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1517**, 159–163.
202. *Wada, T., Kuzuyama, T., Satoh, S., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Unzai, S., Tame, J.R., Park, S.Y.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 30022–30027.
203. *Walter, M.H., Fester, T., Strack, D.* (2000) *Plant J.*, **21**, 571–578.
204. *Walter, M.H., Hans, J., Strack, D.* (2002) *Plant J.*, **31**, 243–254.
205. *Wanke, M., Skorupinska-Tudek, K., Swiezewska, E.* (2001) *Acta Biochim. Pol.*, **48**, 663–72.
206. *Wiesner, J., Borrmann, S., Jomaa, H.* (2003) *Parasitol. Res.*, **90** (Suppl 2), S71–76.
207. *Wiesner, J., Henschker, D., Hutchinson, D.B., Beck, E., Jomaa, H.* (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2889–2894.
208. *Wiesner, J., Hintz, M., Altincicek, B., Sanderbrand, S., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H.* (2000) *Exp. Parasitol.*, **96**, 182–186.
209. *Wolff, M., Seemann, M., Tse Sum Bui, B., Frapart, Y., Tritsch, D., Garcia-Estrabot, A., Rodriguez-Concepcion, M., Boronat, A., Marquet, A., Rohmer, M.* (2003) *FEBS Lett.*, **541**, 115–120.
210. *Wungsintaweekul, J., Herz, S., Hecht, S., Eisenreich, W., Feicht, R., Rohdich, F., Bacher, A., Zenk, M.H.* (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 310–316.
211. *Yajima, S., Nonaka, T., Kuzuyama, T., Seto, H., Ohsawa, K.* (2002) *J. Biochem. (Tokio)*, **131**, 313–317.
212. *Yokota, A., Sasajima, K.* (1986) *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2517–2524.
213. *Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K.* (2001) *Planta*, **213**, 323–326.
214. *Zeidler, J., Schwender, J., Mueller, C., Lichtenthaler, H.K.* (2000) *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, 796–798.
215. *Zeidler, J.G., Schwender, J., Wiesner, J., Lichtenthaler, H.K., et al* (1998) *Z. Naturforsch.*, **53C**, 980–986.
216. *Zhou, D., White, R. H.* (1991) *Biochem. J.*, **273**, 627–634.