

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Februar 2010 (25.02.2010)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/020494 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/52 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/059281
- (22) Internationales Anmeldedatum:
20. Juli 2009 (20.07.2009)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2008 041 299.6
18. August 2008 (18.08.2008) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVONIK DEGUSSA GMBH** [DE/DE]; Relinghauser Straße 1-11, 45128 Essen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KAISER, Johannes** [DE/DE]; Lazarus-Schwendi-Str. 9c, 79238 Ehrenkirchen-Kirchhofen (DE). **KROLL, Jens** [DE/DE]; Bergstraße 6 b, 59174 Kamen (DE). **EWERING, Christian** [DE/DE]; An der Wilhelmshöhe 56, 37671 Hötter (DE). **STEINBÜCHEL, Alexander** [DE/DE]; Rönntenthal 27, 48341 Altenberge (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

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

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

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)



WO 2010/020494 A1

(54) Title: NOVEL, UNIVERSALLY APPLICABLE ADDITION SYSTEM

(54) Bezeichnung: NEUARTIGES, UNIVERSELL EINSETZBARES ADDICTION-SYSTEM

(57) Abstract: The object of the invention is a genetically altered cell comprising at least a modified activity of an enzyme that is present in wild types such that said cell tends to form an amount of isopentenyl diphosphate that is less compared to the wild type of the cell, characterized in that the cell has at least an increased enzyme activity that is not present in the wild type, said increased activity resulting in the tendency of the cell to form an increased amount of isopentenyl diphosphate.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist eine gentechnisch veränderte Zelle, die mindestens eine geänderte Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme aufweist, so dass diese Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp reduzierte Menge an Isopentenyl diphosphat zu bilden vermag, dadurch gekennzeichnet, dass diese Zelle mindestens eine gesteigerte, im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität aufweist, durch die diese Zelle eine erhöhte Menge an Isopentenyl diphosphat zu bilden vermag.

Neuartiges, universell einsetzbares addiction-System

Gebiet der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist eine gentechnisch veränderte Zelle, die mindestens eine geänderte Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme aufweist, so dass diese Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp reduzierte Menge an Isopentenylidiphosphat zu bilden vermag, dadurch gekennzeichnet, dass diese Zelle mindestens eine gesteigerte, im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität aufweist, durch die diese Zelle eine erhöhte Menge an Isopentenylidiphosphat zu bilden vermag.

Stand der Technik

Bekannte addiction-Systeme

Addiction-Systeme werden z. B. immer dann eingesetzt, wenn in Zellen ein oder mehrere Produkte hergestellt werden sollen, für die es nötig ist, dass eine oder mehrere DNAs (wie z. B. ein Gen, eine cDNA) stabil in der produzierenden Zelle aufrechterhalten werden muss, ohne dass man einen externen Selektionsdruck in Form von z. B. Antibiotika ausüben muss.

Bekannte *addiction-Systeme* zur stabilen Aufrechterhaltung von Fremd-DNA in Zellen stellen z. B. das pTF-FC2 System, das Doc-Toxin, Phd Antidote, das ColE3 System und weitere dar. Eine Übersicht über weitere bekannte bakterielle *addiction-Systeme* sind beispielsweise Urszula Zielenkiewicz and Piotr Cegowski, 2001. Mechanisms of plasmid stable

maintenance with special focus on plasmid addiction systems. Acta Biochimica Polonica. 48, 1003-1023 zu entnehmen.

Allen bekannten *addiction*-Systemen ist gemein, dass es sich um katabole, toxin-antitoxin- oder Operator Repressor Titrations („ORT“; siehe Cranenburg et al. 2001, *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration)- Systeme handelt. Diese Systeme haben die Eigenschaft, sich aufgrund des nachlassenden Selektionsdrucks (z. B. Metabolisierung bzw. Spaltung der Antibiotika, Bindung des Toxins durch das Antidot) im Verlauf einer Kultivierung aus dem System wieder heraus zu selektieren, da sie gegenüber stoffwechselaktiveren Zellen benachteiligt sind, die einen niedrigeren metabolischen Aufwand und somit weniger Energie aufwenden müssen. Dies führt schnell dazu, dass sich nur noch die Zellen durchsetzen und vermehren werden, die gar kein Plasmid mit den gewünschten Eigenschaften enthalten. Bei dem pTF-FC2 proteic poison-antidote plasmid addiction system (pas) wird die Plasmidstabilität durch drei Gene (*pasA*, *pasB*, *pasC*) gewährleistet, die auf dem Plasmid lokalisiert sind, wobei das eine Gen für ein Toxin, das zweite Gen für das Antidot und ein weiteres für einen Enhancer kodiert. Dieses System ermöglicht jedoch lediglich eine 3fache Stabilisierung des Plasmids (Smith AS, Rawlings DE, 1997. The poison-antidote stability system of the broad-host-range *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid pTF-FC2. Mol Microbiol. Dec;26(5):961-70).

Das *addiction*-System auf Basis des Doc-Toxins des Bakteriophagen P1 beruht darauf, dass das Phd-Protein direkt an das Doc-Protein bindet und somit dessen Toxizität inaktiviert (Gazit E, Sauer RT, 1999. The Doc toxin and Phd

antidote proteins of the bacteriophage P1 plasmid addiction system form a heterotrimeric complex. J Biol Chem. 1999 Jun 11; 274(24):16813-8). Da aber bei diesen Systemen sowohl die Gene für die Toxine, als auch für die Antidote auf ein und demselben Plasmid kodiert vorliegen, ist eine effiziente Stabilisierung desselben schwierig, da ein Verlust des Plasmids eigentlich einen Vorteil für die Zelle darstellt.

Ein kataboles *addiction*-System ist in 'Voss and Steinbüchel' beschrieben (Application of a KDPG-aldolase gene-dependent addiction system for enhanced production of cyanophycin in *Ralstonia eutropha* strain H16. Metab Eng. 2006 Jan;8(1):66-78). Der Mechanismus der Plasmidstabilisierung beruht hier auf einer katabolen Verwertung des zugefütterten Natrium-Gluconats durch Einbringen einer singulären plasmidkodierten Kopie des KDPG-Aldolase-Gens (*eda*). Wobei Na-Gluconat in der Kultivierung die einzige Kohlenstoffquelle darstellt. Da der eingesetzte Mikroorganismus jedoch chemolithoautotroph wachsen kann, das heißt mit Kohlendioxid als einziger Kohlenstoffquelle alle Zellbestandteile zu synthetisieren vermag, und zudem RecA-positiv ist, kann es in diesem System zu Mutationen während einer Langzeitkultivierung, zum Ausdünnen des Plasmids und somit letztendlich zum Verlust des klonierten Gens führen.

Isopentenylidiphosphat (Isopentenylpyrophosphat, kurz IPP) ist ein essentieller Metabolit, der in biologischen Systemen auf verschiedenen Wegen synthetisiert werden kann. Oft findet eine Umwandlung des IPPs zu Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), beispielsweise über eine

IPP-Isomerase statt; dadurch können DMAPP und IPP, beides Isoprenoide, gemeinsam im Gleichgewicht vorliegen.

MEP-Weg

Figur 1 zeigt den ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat IPP bereitstellenden Methylerythritolphosphat-Stoffwechselweg (MEP-Weg, auch DOXP-Weg, Mevalonat unabhängiger oder Rohmer-Weg genannt) auf. Dieser Weg ist in Eubakterien, Prokaryoten und einigen einzelligen Algen, beispielsweise *Chlamydomonas reinhardtii* und in Protisten wie z. B. *Plasmodium falciparum* (KEGGG-Datenbank, *Acta Biochim Pol.* Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. Wanke et al. 2001) oder *Theileria annulata*, *Theileria parva* beschrieben worden. Auch wird in den Chloroplasten höherer Pflanzen der MEP-Weg zur Bildung von IPP genutzt. Hieraus wird für die Photosynthese notwendiges Phytol, Plastochinone oder Carotenoide synthetisiert.

MVA Weg

Der zumeist in höheren Organismen wie Hefen, Säugern, und Eukaryoten und einigen Prokaryonten vorkommende Mevalonat-Weg (MVA-Weg) setzt über mehrere Stufen zwei Moleküle Acetyl-CoenzymA zu IPP um; Figur 2 zeigt alle Zwischenschritte und involvierte Enzyme auf.

Alternative MVA Weg

Ein alternativer MVA Weg wurde beschrieben in Grochowski et al. *Methanocaldococcus jannaschii uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl*

diphosphate J Bacteriol. 2006 May;188(9):3192-8. Ab dem Mevalonat-5-Phosphat (vgl. Figur 2) wird über eine Monophosphomevalonat-Decarboxylase Isopentenylmonophosphat erhalten, welches wiederum durch eine Isopentenylphosphat-Kinase zu Isopentenyldiphosphat umgesetzt wird.

Bekannte IPP defiziente Stämme und Komplimentierung

Aus der Literatur sind Bakterienstämme mit defekter IPP Synthese bekannt, so z. B. aus McAteer, S., A. Coulson, N.F. McLennan, M. Masters 2001. The *lytB* gene of *Escherichia coli* is essential and specifies a product needed for isoprenoid biosynthesis. J.Bacteriol. 183:7403-7407 und aus Franci X et al. 2000. Evidence of a Role for *LytB* in the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. J.Bacteriol.182: 5841-5848.

Im „The Coli Genetic Stock Center“ der Yale Universität der *E. coli* Stamm CGSC#:8074 hinterlegt, der eine Deletion im *lytB*-Gen trägt. In dem Stamm liegt ein Hybridplasmid (pBADL) vor, welches eine Kopie des *lytB* bzw. *ispH*-Gens enthält. Bei nicht induziertem Promotor (Arabinose-Induktion) ist dieser Stamm aufgrund IPP-Synthese-Mangels nicht lebensfähig. Die endogene Mutation wird somit durch Expression des plasmoidal vorliegenden *lytB*-Gens komplementiert. Somit wird hier lediglich exakt dieselbe Enzymaktivität, die zuvor reduziert wurde, durch eine exogene Bereitstellung wieder erhöht.

Bekannter Transfer von kompletten MEP oder MVA Wegen in andere Wirte, die nicht IPP defizient sind

US2007166782 Keasling Jay D. et. al. 2007 beschreibt eine Methode, zusätzliches IPP in der Zelle durch Einbringen von

Genen des MVA-Weges bzw. des gesamten MVA-Weges bereitzustellen. Die modifizierten Zellen sind selber bereits in der Lage, IPP über alternative Routen zu synthetisieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein alternatives *addiction*-System bereitzustellen, mit dem die Stabilität einer exogenen Nukleinsäure in einer Zelle erhöht wird.

Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die im Folgenden beschriebene gentechnisch veränderte Zelle, die mindestens eine geänderte Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme aufweist, so dass diese Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp reduzierte Menge an Isopentenylidiphosphat zu bilden vermag, dadurch gekennzeichnet, dass diese Zelle mindestens eine gesteigerte, im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität aufweist, durch die diese Zelle eine erhöhte Menge an Isopentenylidiphosphat zu bilden vermag, einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet. Bevorzugt weist erfindungsgemäße Zelle mindestens zwei, weiter bevorzugt mindestens drei, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens vier und am meisten bevorzugt mindestens fünf gesteigerte, im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivitäten auf.

Eine für mindestens eine im Wildtyp nicht vorhandene, die reduzierte Menge an Isopentenylidiphosphat erhöhende und gesteigerte Enzymaktivität kodierende Nukleinsäure vermag ohne Selektionsdruck stabil in der gentechnisch veränderten Zelle zu verweilen und wird weiterhin in die nächste Generation übertragen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher eine gentechnisch veränderte Zelle, Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle und Nukleinsäuren.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist die Tatsache, dass das erfindungsgemäße *addiction*-System nicht auf einem plasmidbasierten Toxin-Antitoxin-System, einem katabolen *addiction* System oder einem ORT-System basiert.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass das erfindungsgemäße *addiction*-System ohne Resistenzmarker auskommt.

Noch ein weiterer Vorteil ist, dass mit der hier vorliegenden Erfindung ein eingangs erwähnter, aufgrund von RecA-Positivität verursachter Verlust des Hybridplasmids unterbunden ist.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass das *addiction*-System auf Stoffwechselwegen basiert, die Isopentenylidiphosphat (Isopentenylpyrophosphat, kurz IPP), synthetisieren: IPP ist z. B. als Vorstufe von Isoprenen ein interessanter Metabolit, und mit der vorliegenden Erfindung kann zusätzlich in einer gegebenen Zelle die Kohlenstoffquelle zur IPP-Synthese geändert bzw. vorgegeben werden.

Noch ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass es zur verstärkten Synthese von IPP und somit zur verstärkten Bildung von Terpenoiden kommen kann.

Insbesondere können erfindungsgemäße Zellen hergestellt werden, die veränderte Mengen an Isoprenoiden und Terpenoiden (wie beispielsweise Steroide, Flavonoide, Gummistoffe oder Carotenoide), Monoterpenen, Sesquiterpenen, Diterpenen, Triterpenen, Polyterpenen, Cyclischen Monoterpenen, Cyclischen Sesquiterpenen,

Cyclischen Diterpenen, Cyclischen Triterpenen oder auch Hormonen, Fetten, Ölen oder Vitaminen aufweisen, oder deren Gehalt an löslichen Zuckern, wie z. B. Glucose, Fructose und Saccharose, sowie an Stärke verändert ist. Derartige Zellen können wiederum vorteilhafte Ausgangsstoffe für weitere Verwendungen sein. Beispielsweise können diese Zellen zur heterologen Expression weiterer Gene mit dem Ziel der verstärkten Synthese von benötigten Substanzen dienen. So können etwa zusätzlich DNA-Sequenzen eingeführt und aufgrund des *addiction*-Systems stabil ohne Selektionsdruck (wie z. B. durch Antibiotikazugabe) in der erfindungsgemäßen Zelle aufrechterhalten werden, die die Enzyme zur Synthese von gewünschten Substanzen kodieren. Auf diese Weise kann das gegebenenfalls verstärkt gebildete IPP zur Synthese von z. B. Polyketiden, Aromastoffen, Kautschuk, Alkaloiden, Isoprenoiden, Polyisoprenoiden und zur verstärkten posttranslationalen Modifikation von Proteinen (prenylierte Proteine) oder Prenylierung von Olefinen etc genutzt werden.

Wildtyp

Unter einem „*Wildtyp*“ einer Zelle wird vorzugsweise eine Zelle bezeichnet, deren Genom in einem Zustand vorliegt, wie er natürlicherweise durch die Evolution entstanden ist. Der Begriff wird sowohl für die gesamte Zelle als auch für einzelne Gene verwendet. Unter den Begriff „*Wildtyp*“ fallen daher insbesondere nicht solche Zellen bzw. solche Gene, deren Gensequenzen zumindest teilweise durch den Menschen mittels rekombinanter Verfahren verändert worden sind. Die erfindungsgemäßen Zellen können Prokaryonten oder Eukaryonten sein. Dabei kann es sich um Säugetierzellen

(wie etwa Zellen aus dem Menschen), um pflanzliche Zellen oder um Mikroorganismen wie Hefen, Pilze oder Bakterien handeln.

Enzymaktivität und Aktivität von Enzymen so wie deren Änderung

Unter der Formulierung „*geänderte Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme*“ sind sowohl Erhöhung als auch Erniedrigung einer Aktivität eines Enzyms, welches in der Wildtyp-Zelle beliebig nachweisbar ist, zu verstehen.

Unter der Formulierung „*eine gesteigerte, im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität*“ ist zu verstehen, dass der Wildtyp der gentechnisch veränderten Zelle entweder keine oder keine mit unten aufgeführten Methoden nachweisbare Enzymaktivität aufweist, und diese nicht vorhandene Enzymaktivität nach der gentechnischen Veränderung gesteigert und somit erst erzeugt und nachweisbar wird. Unter „*geänderte Aktivität eines Enzyms oder gesteigerte Enzymaktivität*“, wie vorstehend erwähnt und nachfolgenden im Zusammenhang mit den Enzymen E₁ bis E₁₃ verwendet, ist vorzugsweise geänderte oder gesteigerte intrazelluläre Aktivität zu verstehen.

Die nun folgenden Ausführungen zum „*Ändern, Erhöhen, Erniedrigen und Steigern einer Aktivität eines Enzyms oder einer Enzymaktivität*“ gelten für alle in diesem Text genannten Enzyme und Enzymaktivitäten, deren Aktivität gegebenenfalls geändert, erhöht, erniedrigt oder gesteigert werden kann.

Die intrazellulären enzymatischen Aktivitäten können nach verschiedenen beschriebenen Methoden (Donahue et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (19): 5624-5627; Ray et al.

(2000) *Journal of Bacteriology* 182 (8): 2277-2284;
Freedberg et al. (1973) *Journal of Bacteriology* 115 (3):
816-823) bestimmt werden.

Die Aktivität einer 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate-
Reductoisomerase (EC 1.1.1.267) wird bevorzugt bestimmt,
wie in Takahashi et al. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-
erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate
pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S*
A. 1998 Aug 18; 95(17):9879-84 beschrieben.

Die Aktivität einer 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-
Cytidylyltransferase (EC 2.7.7.60) wird bevorzugt bestimmt,
wie in Rohdich et al. Cytidine 5-triphosphate-dependent
biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia*
coli catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-
methylerythritol, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11758-
11763 beschrieben.

Die Aktivität einer 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-
Erythritol-Kinase (EC 2.7.1.148) wird bevorzugt bestimmt,
wie in Bernal et al. A spectrophotometric assay for the
determination of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol
kinase activity. *Anal Biochem.* 2005 May 15;340(2):245-51
beschrieben.

Die Aktivität einer 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-
Cyclodiphosphat-Synthase (EC 4.6.1.12) wird bevorzugt
bestimmt, wie in Herz et al. Biosynthesis of terpenoids:
YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-
erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-
cyclodiphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar
14;97(6):2486-90 beschrieben.

Die Aktivität einer E₅ eine 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-en-1-yl-Diphosphat-Synthase (EC 1.17.4.3) wird bevorzugt bestimmt, wie in Hecht et al. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18; 98(26):14837-42 beschrieben.

Die Aktivität einer 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reductase (EC 1.17.1.2) wird bevorzugt bestimmt, wie in Altincicek et al. LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. FEBS Lett. 2002 Dec 18; 532(3):437-40 beschrieben.

Die Aktivität einer Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase (EC 2.3.3.1.10) wird bevorzugt bestimmt, wie in Sirinupong et al. Molecular cloning of a new cDNA and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from Hevea brasiliensis. Planta. 2005 Jun;221(4):502-12. Epub 2005 Mar 3 beschrieben.

Die Aktivität einer Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (EC 1.1.1.34) wird bevorzugt bestimmt, wie in Hedl et al. Enterococcus faecalis acetoacetyl-coenzyme A thiolase/3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, a dual-function protein of isopentenyl diphosphate biosynthesis. J Bacteriol. 2002 Apr; 184(8):2116-22 beschrieben.

Die Aktivität einer Mevalonat-Kinase (EC 2.7.1.36) wird bevorzugt bestimmt, wie in Hedl et al. Enterococcus faecalis mevalonate kinase. Protein Sci. 2004 Mar;13(3):687-93. Epub 2004 Feb 6 beschrieben.

Die Aktivität einer Phosphomevalonat-Kinase (EC 2.7.4.1) wird bevorzugt bestimmt, wie in Tzeng et al. The multiple activities of polyphosphate kinase of Escherichia coli and

their subunit structure determined by radiation target analysis. J Biol Chem. 2000 Feb 11;275(6):3977-83.beschrieben.

Die Aktivität einer Diphosphomevalonat-Decarboxylase (EC 4.1.1.33) wird bevorzugt bestimmt, wie in Lindberg et al. On the mechanism of formation of isopentenylpyrophosphate. Biochemistry 1 (1962), pp. 182-188 beschrieben.

Die Aktivität einer Isopentenylphosphat-Kinase wird bevorzugt bestimmt, wie in Lange and Croteau Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminalenzymatic step (1999) beschrieben.

Die Aktivität einer Isopentenyldiphosphat-delta-Isomerase (EC:5.3.3.2) wird bevorzugt bestimmt, wie in Laupitz et al. Biochemical characterization of Bacillus subtilis type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. European Journal of Biochemistry (2004), 271(13), 2658-2669. beschrieben

Da die Aktivität von Enzymen in einer Zelle mit der Menge an Enzym korreliert, kann für ein gegebenes Enzym der Expressionslevel als Maß für die Aktivität herangezogen werden. Die Expression der vorstehend und aller nachfolgend genannten Enzyme ist mit Hilfe von 1- und 2-dimensionaler Proteingelaufftrennung und anschließender optischer Identifizierung der Proteinkonzentration mit entsprechender Auswertesoftware im Gel nachweisbar. Wenn die Erhöhung einer Enzymaktivität ausschließlich auf einer Erhöhung der Expression des entsprechenden Gens basiert, so kann die Quantifizierung der Erhöhung der Enzymaktivität in einfacher Weise durch einen Vergleich der 1- oder 2-

dimensionalen Proteinauftrennungen zwischen Wildtyp und gentechnisch veränderter Zelle bestimmt werden. Eine gebräuchliche Methode zur Präparation der Proteingele bei z. B. Bakterien und zur Identifizierung der Proteine ist die von Hermann et al. (*Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001)) beschriebene Vorgehensweise. Die Proteinkonzentration kann ebenfalls durch Western-Blot-Hybridisierung mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989) und anschließender optische Auswertung mit entsprechender Software zur Konzentrationsbestimmung (Lohaus und Meyer (1989) *Biospektrum*, 5: 32-39; Lottspeich (1999), *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647) analysiert werden.

Sofern in den vorangegangenen oder nachfolgenden Ausführungen keine konkreten Methoden zur Bestimmung der Aktivität eines bestimmten Enzyms angegeben werden, erfolgt die Bestimmung der Steigerung der Enzymaktivität und auch die Bestimmung der Verminderung einer Enzymaktivität vorzugsweise mittels der in Hermann et al., *Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001), Lohaus et al., *Biospektrum* 5 32-39 (1998), Lottspeich, *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647 (1999) und Wilson et al., *Journal of Bacteriology* 183: 2151-2155 (2001) beschriebenen Methoden.

Grundsätzlich lässt sich eine Steigerung der enzymatischen Aktivität dadurch erzielen, dass man die Kopienzahl der Gensequenz bzw. der Gensequenzen erhöht, welche für das Enzym kodieren, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel nutzt, das für ein entsprechendes Enzym mit einer gesteigerten Aktivität kodiert und gegebenenfalls

diese Maßnahmen kombiniert. Erfindungsgemäß gentechnisch veränderte Zellen werden beispielsweise durch Transformation, Transduktion, Konjugation oder einer Kombination dieser Methoden mit einem Vektor erzeugt, der das gewünschte Gen, ein Allel dieses Gens oder Teile davon und einen die Expression des Gens ermöglichenden Vektor enthält. Die heterologe Expression wird insbesondere durch die erfindungsgemäß besonders bevorzugte Integration des Gens oder der Allele in das Chromosom der Zelle oder einem extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt.

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

Wird die Erhöhung der Enzymaktivität durch Erhöhung der Expression eines Enzyms bewerkstelligt, so erhöht man beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression zu jedem beliebigen Zeitpunkt zu steigern. Des Weiteren können dem Enzym-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sogenannte "Enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Genexpression bewirken. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die

Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert, wobei eine Integration im Genom besonders bevorzugt ist. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (*Bio/Technology* 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (*Gene* 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (*Bio/Technology* 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (*Gene* 102, 93-98 (1991)), in EP-A-0 472 869, im US 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (*Bio/Technology* 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (*Journal of Bacteriology* 175, 1001-1007 (1993)), in WO-A-96/15246, bei Malumbres et al. (*Gene* 134, 15-24 (1993)), in JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58, 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Zur Erhöhung der Expression der jeweiligen Gene werden zum Beispiel episomale Plasmide eingesetzt. Als Plasmide eignen sich beispielsweise solche, die in Bakterien repliziert werden können. Bevorzugt werden solche Plasmide eingesetzt, die eine Shuttle-Funktion aufweisen, d. h. potenziell in mehreren Organismen repliziert werden können.

Wird die Änderung der Enzymaktivität durch Mutation des endogenen Gens bewerkstelligt, so können derartige Mutationen entweder nach klassischen Methoden ungerichtet

erzeugt werden, wie etwa durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösende Chemikalien (wie z.B. salpetrige Säure, MNNG/*N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin, Natriumnitrit), oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e). Durch diese Mutationen werden gentechnisch veränderte Zellen erhalten. Hierdurch können beispielsweise auch Enzymaktivitäten generiert werden, die im Vergleich zur Wildtyp-Enzymaktivität vermindert oder vermehrt *feedback*-inhibierbar sind.

Zur Erniedrigung einer Enzymaktivität in einer Zelle sind dem Fachmann verschiedene Techniken, wie beispielsweise gerichteter *Knockout*, Gendeletionen, Zufallsmutagenese oder Verwendung von spezifischen Inhibitoren geläufig. Es können auch induzierbare bzw. konditionale *Knockout*-Systeme generiert werden, wie z. B. in McAteer et al. (*J Bacteriol.* 2001 Dec; 183(24):7403-7) beschrieben. Ein ebenfalls einsetzbares und mittlerweile verbreitetes Mittel zur Herabregulierung von Genen ist der Einsatz von *antisense*-Nukleinsäuren wie beispielsweise siRNAs (*small interfering RNAs*). Weitere Beispiele für *antisense*-Nukleinsäuren verwendende Systeme kann der Fachmann z. B. bei Zaratiequi et al. (*Cell.* 2007 Feb 23;128(4):763-76), Scherr et al. (*Cell Cycle.* 2007 Feb 1;6(4):444-9) und Sahu et al. (*Curr Pharm Biotechnol.* 2007 Oct;8(5):291-304) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie nachschlagen.

„Durch Änderung mindestens einer Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp reduzierte Menge an Isopentenylidiphosphat“

Gemäß oben beschriebener Ausführungsform bildet erfindungsgemäße Zelle in dem Fall, dass keine im Wildtyp nicht vorhandenen Enzymaktivität erhöht wurde, *durch Änderung mindestens einer Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp reduzierte Menge an Isopentenylidiphosphat*. Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die gentechnisch veränderte Zelle derart gentechnisch verändert ist, dass sie in einem definierten Zeitintervall, vorzugsweise innerhalb von 2 Stunden, noch mehr bevorzugt innerhalb von 8 Stunden und am meisten bevorzugt innerhalb von 24 Stunden, höchstens die Hälfte, besonders bevorzugt höchstens ein Zehntel, darüber hinaus bevorzugt höchstens ein hundertstel, darüber hinaus noch mehr bevorzugt höchstens ein Tausendstel und am meisten bevorzugt höchstens gar kein nachweisbares IPP verglichen zu dem Wildtyp der Zelle bildet, in dem Fall, dass keine im Wildtyp nicht vorhandenen Enzymaktivität erhöht wurde. Die Abnahme der Bildung des IPPs kann dabei beispielsweise dadurch bestimmt werden, dass die erfindungsgemäße Zelle, bei der keine im Wildtyp nicht vorhandenen Enzymaktivität erhöht wurde, und die Wildtyp-Zelle jeweils getrennt unter gleichen Bedingungen (gleiche Zelldichte, gleiches Nährmedium, gleiche Kulturbedingungen) für ein bestimmtes Zeitintervall in einem geeigneten Nährmedium kultiviert werden und anschließend die Menge an IPP bestimmt wird.

„Erhöhung der reduzierten Menge an Isopentenylidiphosphat durch Steigerung mindestens einer im Wildtyp nicht vorhandenen Enzymaktivität“

Des Weiteren *erhöht* gemäß oben beschriebener Ausführungsform erfindungsgemäße Zelle durch Änderung mindestens einer Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp *reduzierte Menge an Isopentenylidiphosphat durch Steigerung mindestens einer im Wildtyp nicht vorhandenen Enzymaktivität.*

Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die gentechnisch veränderte Zelle derart gentechnisch verändert ist, dass sie in einem definierten Zeitintervall, vorzugsweise innerhalb von 2 Stunden, noch mehr bevorzugt innerhalb von 8 Stunden und am meisten bevorzugt innerhalb von 24 Stunden, mindestens ein Tausendstel, besonders bevorzugt mindestens ein Hundertstel, darüber hinaus bevorzugt mindestens ein Zehntel, darüber hinaus noch mehr bevorzugt mindestens genauso viel und am meisten bevorzugt mindestens 10 mal mehr IPP bildet als der Wildtyp der Zelle. Die Zunahme der Bildung des IPPs kann dabei beispielsweise dadurch bestimmt werden, dass die erfindungsgemäße Zelle und die Wildtyp-Zelle jeweils getrennt unter gleichen Bedingungen (gleiche Zelldichte, gleiches Nährmedium, gleiche Kulturbedingungen) für ein bestimmtes Zeitintervall in einem geeigneten Nährmedium kultiviert werden und anschließend die Menge an IPP bestimmt wird.

Ersetzen der IPP Synthese durch MEP gegen IPP Synthese durch MVA

Gemäß einer ersten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle ist diese dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁, welches die Umsetzung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat katalysiert,

ein Enzym E₂, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und Cytidintriphosphat zu 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert,

ein Enzym E₃, welches die Umsetzung von 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol und ATP zu 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert,

ein Enzym E₄, welches die Umsetzung von 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat katalysiert,

ein Enzym E₅, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat zu (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat katalysiert und

ein Enzym E₆, welches die Umsetzung von (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat zu IPP und/oder DMAPP katalysiert

und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein, bevorzugt mindestens zwei, weiter bevorzugt mindestens drei, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens vier und am meisten bevorzugt mindestens fünf Enzyme ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₇, welches die Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A katalysiert,

ein Enzym E₈, welches die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonat katalysiert,

ein Enzym E₉, welches die Umsetzung von Mevalonat zu Mevalonat-5-Phosphat katalysiert,

ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und

ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenylidiphosphat katalysiert.

Im Rahmen der gesamten Erfindung ist bevorzugt, dass für mindestens eines der Enzyme E₁ bis E₁₁ zutrifft, besonders bevorzugt, dass für jedes Enzym E₁ bis E₁₁ zutrifft, dass E₁ eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate-Reductoisomerase (EC 1.1.1.267),

E₂ eine 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Cytidylyltransferase (EC 2.7.7.60),

E₃ eine 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase (EC 2.7.1.148),

E₄ eine 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat-Synthase (EC 4.6.1.12),

E₅ eine 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-en-1-yl-Diphosphat-Synthase (EC 1.17.4.3),

E₆ eine 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reductase (EC 1.17.1.2),

E₇ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase (EC 2.3.3.1.10),

E₈ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (EC 1.1.1.34),

E₉ eine Mevalonat-Kinase (EC 2.7.1.36),

E₁₀ eine Phosphomevalonat-Kinase (EC 2.7.4.1),

E₁₁ eine Diphosphomevalonat-Decarboxylase (EC 4.1.1.33),

In dieser ersten Ausführungsform erfindungsgemäßer Zelle ist ganz besonders bevorzugt mindestens eines, bevorzugt mindestens zwei, weiter bevorzugt mindestens drei, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens vier, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens fünf und am meisten bevorzugt mindestens sechs der Enzyme:

- E₆ Genprodukt des *ispH*,
- E₇ Genprodukt des *mvaS* aus *Staphylococcus aureus*,
- E₈ Genprodukt des *mvaA* aus *Lactobacillus lactis* oder aus *Staphylococcus aureus*,
- E₉ Genprodukt des *mvaK1* aus *Staphylococcus aureus*,
- E₁₀ Genprodukt des *mvaK2* aus *Staphylococcus aureus* und
- E₁₁ Genprodukt des *mvaD* aus *Staphylococcus aureus*.

In dieser Ausführungsform erfindungsgemäßer Zelle ist am meisten bevorzugt:

- E₆ Genprodukt des *ispH*
- E₇ Genprodukt des *mvaS* aus *Staphylococcus aureus*,
- E₈ Genprodukt des *mvaA* aus *Lactobacillus lactis* und aus *Staphylococcus aureus*,
- E₉ Genprodukt des *mvaK1* aus *Staphylococcus aureus*,
- E₁₀ Genprodukt des *mvaK2* aus *Staphylococcus aureus* und
- E₁₁ Genprodukt des *mvaD* aus *Staphylococcus aureus*.

Weiterhin ist es im Zusammenhang mit dem vorstehend beschriebenen Ausführungsform der gentechnisch veränderten Zelle bevorzugt, dass es sich bei der Zelle um einen nur über den MEP-Weg zur IPP-Synthese befähigten Mikroorganismus, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Eubakterien,
Plastiden von Apicomplexa
und Plastiden höherer Pflanzen
handelt.

Unter den Eubakterien sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Lactobacillus, Lactococcus, Escherichia, Staphylococcus, Ralstonia, Bacillus, Corynebacterium, Xanthomonas, Pseudomonas, Streptococcus, Peptostreptococcus, Leuconostoc, Alcanivorax, Agrobacterium, Bifidobacterium, Borellia, Burkholderia, Clostridium, Enterococcus, Fusobacterium, Gluconobacter, Gordonia, Helicobacter, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Porphyromonas, Propionibacterium, Rhizobium, Rhodococcus, Salmonella, Zymomonas, Vibrio, Myxococcus, Chromobacterium, Nitrosomonas, Nitrobacter, Paracoccus, Thiobacillus, Desulfovibrio, Streptomyces, Acinetobacter, Comamonas, Escherichia coli, Lactococcus lactis, Lactobacillus brevis, S aureus Ralstonia eutropha, Ralstonia solanacearum, Ralstonia metallidurans, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus anthracis, Bacillus licheniformes, Bacillus thuringiensis, Corynebacterium glutamicum, Xanthomonas campestris, Pseudomonas putida, Pseudomonas oleovorans, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluoreszens, Streptococcus salivarius, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Peptostreptococcus sp., Leuconostoc mesenteroides (subsp. dextranicum), Azotobacter vinelandii, Azotobacter chroococcum, Alcanivorax borkumensis, Agrobacterium tumefaciens, Bifidobacterium longum, Borellia burgdorferi, Burkholderia pseudomallei, Clostridium acetobutylicum, Clostridium propionicum, Clostridium pasteurianum, Enterococcus faecalis, Fusobacterium nucleatum, Gluconobacter oxydans, Gordonia westfalica, Gordonia polyisoprenivorans, Helicobacter pylori, Micrococcus luteus, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Nocardia farcinica, Porphyromonas gingivalis,

Propionibacterium freudenreichii, Rhizobium leguminosarum, Rhodococcus opacus, Salmonella enterica, Salmonella typhimurium, Zymomonas mobilis, Vibrio fisheri, Vibrio cholerae, Myxococcus sp., Chromobacterium violaceum, Nitrosomonas europaea, Nitrobacter winogradskyi, Paracoccus denitrificans Thiobacillus ferrooxidans, Desulfovibrio desulfuricans, Streptomyces coelicolor, Streptomyces albulus, Acinetobacter borkumensis und Comamonas testosteroni.

Ebenso bevorzugte Vertreter von Eubakterien sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend alle einen obligat oder fakultativ phototrophen Stoffwechsel besitzenden Proteobakterien, besonders bevorzugt sind hier *Rhodospirillum, Rhodobacter, Allochromatium, Chromatium, Synechococcus, Rhodospirillum rubrum, Rhodobacter sphaeroides, Allochromatium vinosum, Chromatium okenii, Synechococcus sp..*

Unter den *Apicomplexa* sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Plasmodium,
Paramecium,
Tetrahymena,
Chlamydomonas reinhardtii
Theileria annulata,
Theileria parva

Ersetzen der IPP Synthese durch MVA gegen IPP Synthese durch MEP

Gemäß einer zweiten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle ist diese dadurch gekennzeichnet,

dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₇, welches die Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A katalysiert, ein Enzym E₈, welches die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonat katalysiert, ein Enzym E₉, welches die Umsetzung von Mevalonat zu Mevalonat-5-Phosphat katalysiert, ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenylidiphosphat katalysiert und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein, bevorzugt mindestens zwei, weiter bevorzugt mindestens drei, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens vier, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens fünf und am meisten bevorzugt mindestens sechs Enzyme ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁, welches die Umsetzung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat katalysiert, ein Enzym E₂, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und Cytidintriphosphat zu 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert, ein Enzym E₃, welches die Umsetzung von 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol und ATP zu 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert, ein Enzym E₄, welches die Umsetzung von 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat katalysiert,

ein Enzym E₅, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat zu (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat katalysiert und ein Enzym E₆, welches die Umsetzung von (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat zu IPP und/oder DMAPP katalysiert.

In dieser zweiten Ausführungsform erfindungsgemäßer Zelle ist ganz besonders bevorzugt mindestens eines, bevorzugt mindestens zwei, weiter bevorzugt mindestens drei, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens vier, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens fünf, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens sechs und am meisten bevorzugt mindestens sieben der Enzyme:

E₁₀ Genprodukt des *mvaK1*,
E₁ Genprodukt des *ispC*,
E₂ Genprodukt des *ispD*,
E₃ Genprodukt des *ispE*,
E₄ Genprodukt des *ispF*,
E₅ Genprodukt des *ispG* und
E₆ Genprodukt des *ispH*.

In dieser Ausführungsform erfindungsgemäßer Zelle ist am meisten bevorzugt:

E₁₀ Genprodukt des *mvaK1*,
E₁ Genprodukt des *ispC*,
E₂ Genprodukt des *ispD*,
E₃ Genprodukt des *ispE*,
E₄ Genprodukt des *ispF*,
E₅ Genprodukt des *ispG* und
E₆ Genprodukt des *ispH*.

Weiterhin ist es im Zusammenhang mit der vorstehend beschriebenen zweiten Ausführungsform der gentechnisch veränderten Zelle bevorzugt, dass es sich bei der Zelle um einen nur über den MVA-Weg zur IPP-Synthese befähigten Mikroorganismus, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Hefen,
Pilze,
handelt.

Unter den Pilzen sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Absidia
Agaricus
Ajellomyces
Arthroderma
Acremonium
Aspergillus
Disporotrichum
Geosmithia
Mortierella
Paecilomyces
Penicillium
Rhizopus
Trichoderma
Talaromyces
Thielavia.

Unter den Hefen sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Candida
Pichia

Saccharomyces
Arxula
Klyveromyces
Yarrowia
Hansenula
Brettanomyces

Ersetzen der IPP Synthese durch „MVA alternativ“ gegen IPP Synthese durch „MVA“

Gemäß einer dritten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle ist diese dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁₂, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Isopentenylmonophosphat katalysiert und ein Enzym E₁₃, welches die Umsetzung von Isopentenylmonophosphat zu Isopentenyldiphosphat katalysiert,

und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenyldiphosphat katalysiert.

Dabei ist es bevorzugt, dass für mindestens eines der Enzyme E₁₂ oder E₁₃ zutrifft, besonders bevorzugt, dass für jedes Enzym E₁₂ und E₁₃ zutrifft, dass

E₁₂ eine Monophosphomevalonat-Decarboxylase,

E₁₃ eine Isopentenylphosphat-Kinase

ist.

In dieser dritten Ausführungsform erfindungsgemäßer Zelle ist ganz besonders bevorzugt mindestens eines, bevorzugt beide der Enzyme:

E₁₀ Genprodukt des *mvaK2* aus *Staphylococcus aureus* und

E₁₁ Genprodukt des *mvaD* aus *Staphylococcus aureus*.

Weiterhin ist es im Zusammenhang mit dieser dritten Ausführungsform der gentechnisch veränderten Zelle bevorzugt, dass es sich bei der Zelle um einen Mikroorganismus handelt, ausgewählt aus der Gruppe der Archaeen.

Bevorzugt handelt es sich bei dem Archaeon um einen ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Methanocaldococcus janaschii

Methanothermobacter thermoautotrophicum

Archaeoglobus fulgidus, *Pyrococcus furiosus*

Methanosarcina mazei

Sulfolobus solfataricus

Aeropyrum pernix

Ersetzen der IPP Synthese durch „MVA“ gegen IPP Synthese durch „MVA alternativ“

Gemäß einer vierten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zelle ist diese dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenylidiphosphat katalysiert,

und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁₂, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Isopentenylmonophosphat katalysiert und ein Enzym E₁₃, welches die Umsetzung von Isopentenylmonophosphat zu Isopentenyldiphosphat katalysiert.

Dabei ist es bevorzugt, dass für mindestens eines der Enzyme E₁₂ oder E₁₃ zutrifft, besonders bevorzugt, dass für jedes Enzym E₁₂ und E₁₃ zutrifft, dass E₁₂ eine Monophosphomevalonat-Decarboxylase, E₁₃ eine Isopentenylphosphat-Kinase ist.

In dieser vierten Ausführungsform erfindungsgemäßer Zelle ist besonders bevorzugt mindestens eines, bevorzugt beide der Enzyme:

E₁₂ eine Monophosphomevalonat-Decarboxylase, die sich aus *Methanocaldococcus janaschii* isolieren läßt,

E₁₃ Genprodukt ausgewählt aus der Gruppe:

MJ0044 aus *Methanocaldococcus janaschii*,

MTH47 aus *Methanothermobacter thermoautotrophicum*,

AF2288 aus *Archaeoglobus fulgidus*,

PF1636 aus *Pyrococcus furiosus*,

MM1763 aus *Mathanosarcina mazei*,

SSO0064 aus *Sulfolobus solfataricus* und

APE1768 aus *Aeropyrum pernix*,

wobei MJ0044 aus *Methanocaldococcus janaschii* ganz besonders bevorzugt ist

Weiterhin ist es im Zusammenhang mit dieser vierten Ausführungsform der gentechnisch veränderten Zelle bevorzugt, dass es sich bei der Zelle um einen Mikroorganismus handelt wie für die oben genannte, zweite Ausführungsform der gentechnisch veränderten Zelle beschrieben, einschließlich der dargelegten Bevorzugungen

Für alle vier oben genannten Ausführungsformen erfindungsgemäßer Zelle kann es des Weiteren von Vorteil sein, wenn die Zelle mindestens eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp geänderte, bevorzugt eine erhöhte Aktivität eines Enzymes E₁₄, welches die Umsetzung von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat katalysiert, aufweist.

Es ist bevorzugt, dass E₁₄ Isopentenylidiphosphat-delta-Isomerase (EC:5.3.3.2) ist.

Besonders bevorzugt ist E₁₄, Genprodukt eines Isopentenylidiphosphat-delta-Isomerase-Genes, welches sich isolieren lässt aus einer Zelle ausgehlt aus der Gruppe umfassend:

Adonis aestivalis var. *palaestina*

Adonis aestivalis var. *palaestina*

Adonis aestivalis var. *palaestina*

Adonis aestivalis var. *palaestina*

Aeropyrum pernix

Agrobacterium rhizogenes

Agromyces mediolanus

Anabaena sp. (strain PCC 7120)

Anabaena variabilis (strain ATCC 29413 / PCC 7937)

Anabaena variabilis (strain ATCC 29413 / PCC 7937)

Anaeromyxobacter sp. (strain Fw109-5)
Arabidopsis thaliana
Arabidopsis thaliana
Arabidopsis thaliana
Arabidopsis thaliana
Archaeoglobus fulgidus
Arthrobacter aurescens (strain TC1)
Aspergillus fumigatus
Aspergillus niger
Azoarcus sp. (strain EbN1)
Azoarcus sp. (strain EbN1)
Azotobacter vinelandii AvOP
Bacillus amyloliquefaciens FZB42
Bacillus anthracis
Bacillus cereus (strain ATCC 10987)
Bacillus cereus (strain ATCC 14579 / DSM 31)
Bacillus cereus (strain ZK / E33L)
Bacillus cereus G9241
Bacillus cereus subsp. *cytotoxis* NVH 391-98
Bacillus coagulans 36D1
Bacillus licheniformis (strain DSM 13 / ATCC 14580)
Bacillus sp. NRRL B-14911
Bacillus sp. SG-1
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus subtilis
Bacillus thuringiensis serovar *israelensis* ATCC 35646
Bacillus thuringiensis subsp. *konkukian*
Bdellovibrio bacteriovorus
Bombyx mori
Borrelia burgdorferi
Borrelia garinii

Bos taurus
Brassica oleracea var. *botrytis*
Brevibacterium linens
Burkholderia multivorans ATCC 17616
Caldivirga maquilingensis IC-167
Caldivirga maquilingensis IC-167
Camptotheca acuminata
Camptotheca acuminata
Camptotheca acuminata
Candidatus Nitrosopumilus maritimus SCM1
Capsicum annuum
Catharanthus roseus
Cenarchaeum symbiosum
Chlamydomonas reinhardtii
Chlorobium chlorochromatii (strain CaD3)
Chlorobium ferrooxidans DSM 13031
Chlorobium limicola DSM 245
Chlorobium phaeobacteroides (strain DSM 266)
Chlorobium phaeobacteroides BS1
Chlorobium tepidum
Chloroflexus aggregans DSM 9485
Cinchona robusta
Citrobacter freundii
Citrus sp.
Clarkia breweri
Clarkia breweri
Clarkia xantiana
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (strain NCPPB 382)
Claviceps purpurea
Claviceps sp.
Clostridium beijerinckii NCIMB 8052

Corynebacterium diphtheriae
Corynebacterium efficiens
Corynebacterium glutamicum
Crocospaera watsonii
Cucurbita sp.
Cyanothece sp. CCY 0110
Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406 / NCIMB 9469)
Deinococcus geothermalis (strain DSM 11300)
Deinococcus radiodurans
Desulfotomaculum reducens MI-1
Dichelobacter nodosus (strain VCS1703A)
Dinoroseobacter shibae DFL 12
Enterobacter sp. 638
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium DO
Erwinia carotovora subsp. *atroseptica*
Escherichia coli
Escherichia coli (strain K12)
Escherichia coli (strain UTI89 / UPEC)
Escherichia coli B
Escherichia coli E24377A
Escherichia coli HS
Escherichia coli O157:H7
Escherichia coli O6
Escherichia coli O6:K15:H31 (strain 536 / UPEC)
Escherichia vulneris
Flavobacteria bacterium BBFL7
Flavobacterium johnsoniae UW101
Flavobacterium psychrophilum (strain JIP02/86 / ATCC 49511)
Frankia alni (strain ACN14a)
Frankia sp. (strain CcI3)
Frankia sp. EAN1pec

Gallus gallus
gamma proteobacterium HTCC2207
Gramella forsetii (strain KT0803)
Guillardia theta
Haematococcus pluvialis
Haematococcus pluvialis
Haematococcus pluvialis
Haloarcula marismortui
Halobacterium salinarium
Halobacterium salinarium
Haloquadratum walsbyi (strain DSM 16790)
Haloquadratum walsbyi (strain DSM 16790)
Halorhodospira halophila (strain DSM 244 / SL1)
Halorubrum lacusprofundi ATCC 49239
Halorubrum lacusprofundi ATCC 49239
Herpetosiphon aurantiacus ATCC 23779
Hevea brasiliensis
Homo sapiens
Homo sapiens
Homo sapiens
Hyperthermus butylicus (strain DSM 5456 / JCM 9403)
Hyphomicrobium zavarzinii
Ignicoccus hospitalis KIN4/I
Janibacter sp. HTCC2649
Kineococcus radiotolerans SRS30216
Kitasatospora griseola
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (strain ATCC 11842 / DSM 20081)
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus reuteri 100-23
Lactobacillus reuteri F275
Lactobacillus sakei subsp. sakei (strain 23K)

Lactobacillus salivarius subsp. *salivarius* (strain UCC118)
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* (strain MG1363)
Lactococcus lactis subsp. *lactis*
Lactuca sativa
Lactuca sativa
Legionella pneumophila subsp. *pneumophila* (strain Philadelphia 1 / ATCC 33152 / DSM 7513)
Leifsonia xyli subsp. *xyli*
Leishmania braziliensis
Leishmania infantum
Leishmania major strain Friedlin
Listeria innocua
Listeria monocytogenes
Listeria monocytogenes serotype 4b (strain F2365)
Listeria monocytogenes str. 1/2a F6854
Listeria monocytogenes str. 4b H7858
Listeria welshimeri serovar 6b (strain ATCC 35897 / DSM 20650 / SLCC5334)
Lycopersicon esculentum
Lyngbya sp. PCC 8106
Macaca fascicularis
marine actinobacterium PHSC20C1
Mesocricetus auratus
Mesocricetus auratus
Metallosphaera sedula DSM 5348
Methanobacterium thermoautotrophicum
Methanobrevibacter smithii (strain PS / ATCC 35061 / DSM 861)
Methanococcoides burtonii (strain DSM 6242)
Methanococcus aeolicus (strain Nankai-3 / ATCC BAA-1280)
Methanococcus jannaschii
Methanococcus maripaludis

Methanococcus maripaludis (strain C5 / ATCC BAA-1333)
Methanococcus maripaludis (strain C7 / ATCC BAA-1331)
Methanococcus vannielii SB (strain SB / ATCC 35089 / DSM 1224)
Methanocorpusculum labreanum (strain ATCC 43576 / DSM 4855 / Z)
Methanoculleus marisnigri (strain ATCC 35101 / DSM 1498 / JR1)
Methanopyrus kandleri
Methanoregula boonei (strain 6A8)
Methanosaeta thermophila (strain DSM 6194 / PT)
Methanosarcina acetivorans
Methanosarcina barkeri (strain Fusaro / DSM 804)
Methanosarcina mazei
Methanosphaera stadtmanae (strain DSM 3091)
Methanospirillum hungatei (strain JF-1 / DSM 864)
Methanothermobacter thermautotrophicus
Microscilla marina ATCC 23134
Microscilla marina ATCC 23134
Moorella thermoacetica (strain ATCC 39073)
Morinda citrifolia
Mus musculus
Mus musculus
Mycobacterium avium (strain 104)
Mycobacterium bovis
Mycobacterium bovis (strain BCG / Paris 1173P2)
Mycobacterium gilvum PYR-GCK
Mycobacterium gilvum PYR-GCK
Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)
Mycobacterium sp. (strain JLS)
Mycobacterium sp. (strain KMS)
Mycobacterium sp. (strain MCS)

Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)
Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)
Mycoplasma laidlawii
Myxococcus xanthus (strain DK 1622)
Narcissus pseudonarcissus
Natronomonas pharaonis (strain DSM 2160 / ATCC 35678)
Natronomonas pharaonis (strain DSM 2160 / ATCC 35678)
Natronomonas pharaonis (strain DSM 2160 / ATCC 35678)
Natronorubrum sp. Tenzan-10
Nicotiana benthamiana
Nicotiana langsdorffii x *Nicotiana sanderae*
Nicotiana tabacum
Nocardia farcinica
Nocardia farcinica
Nodularia spumigena CCY 9414
Nodularia spumigena CCY 9414
Oceanobacillus iheyensis
Oryza sativa
Paracoccus zeaxanthinifaciens
Parvularcula bermudensis HTCC2503
Pelodictyon luteolum (strain DSM 273)
Pelodictyon phaeoclathratiforme BU-1
Phaffia rhodozyma
Phaffia rhodozyma
Photobacterium profundum
Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii*
Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii*
Pichia stipitis
Picrophilus torridus
Pinus radiata
Pongo pygmaeus

Propionibacterium acnes
Prosthecochloris aestuarii DSM 271
Prosthecochloris vibrioformis DSM 265
Pseudomonas entomophila (strain L48)
Pyrobaculum aerophilum
Pyrobaculum arsenaticum (strain DSM 13514 / JCM 11321)
Pyrobaculum calidifontis (strain JCM 11548 / VA1)
Pyrobaculum islandicum (strain DSM 4184 / JCM 9189)
Pyrococcus abyssi
Pyrococcus furiosus
Pyrococcus horikoshii
Pyrococcus kodakaraensis
Rattus norvegicus
Rattus norvegicus
Rhizobium etli (strain CFN 42 / ATCC 51251)
Rhizobium loti
Rhodobacter capsulatus
Rhodobacter sphaeroides (strain ATCC 17023 / 2.4.1 / NCIB 8253 / DSM 158)
Rhodobacter sphaeroides (strain ATCC 17025 / ATH 2.4.3)
Rhodobacter sphaeroides (strain ATCC 17029 / ATH 2.4.9)
Rhodococcus sp. (strain RHA1)
Ricinus communis
Rickettsia bellii (strain RML369-C)
Rickettsia conorii
Rickettsia felis
Rickettsia prowazekii
Rickettsia typhi
Roseiflexus castenholzii DSM 13941
Roseiflexus sp. (strain RS-1)
Roseobacter denitrificans (strain ATCC 33942 / OCh 114)
Rubrobacter xylanophilus (strain DSM 9941 / NBRC 16129)

Saccharomyces cerevisiae
Saccharomyces cerevisiae
Saccharopolyspora erythraea (strain NRRL 23338)
Saccharopolyspora erythraea (strain NRRL 23338)
Salinibacter ruber (strain DSM 13855)
Salinispora arenicola CNS205
Salinispora arenicola CNS205
Salinispora tropica CNB-440
Salmonella choleraesuis
Salmonella paratyphi-a
Salmonella typhi
Salmonella typhimurium
Salvia officinalis
Schizosaccharomyces pombe
Schizosaccharomyces pombe
Serratia proteamaculans 568
Shigella boydii serotype 4 (strain Sb227)
Shigella dysenteriae serotype 1 (strain Sd197)
Shigella flexneri
Shigella sonnei (strain Ss046)
Silicibacter pomeroyi
Staphylococcus aureus
Staphylococcus aureus (strain bovine RF122)
Staphylococcus aureus (strain COL)
Staphylococcus aureus (strain MRSA252)
Staphylococcus aureus (strain MSSA476)
Staphylococcus aureus (strain Mu50 / ATCC 700699)
Staphylococcus aureus (strain MW2)
Staphylococcus aureus (strain N315)
Staphylococcus aureus (strain USA300)
Staphylococcus epidermidis (strain ATCC 12228)
Staphylococcus epidermidis (strain ATCC 35984 / RP62A)

Staphylococcus haemolyticus (strain JCSC1435)
Staphylococcus saprophyticus subsp. *saprophyticus* (strain ATCC 15305 / DSM 20229)
Staphylothermus marinus (strain ATCC 43588 / DSM 3639 / F1)
Stevia rebaudiana
Stigmatella aurantiaca DW4/3-1
Streptococcus agalactiae 18RS21
Streptococcus agalactiae serotype Ia
Streptococcus gordonii str. Challis substr. CH1
Streptococcus mutans
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6)
Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466)
Streptococcus pneumoniae SP11-BS70
Streptococcus pneumoniae SP14-BS69
Streptococcus pneumoniae SP18-BS74
Streptococcus pneumoniae SP19-BS75
Streptococcus pneumoniae SP23-BS72
Streptococcus pneumoniae SP3-BS71
Streptococcus pneumoniae SP6-BS73
Streptococcus pneumoniae SP6-BS73
Streptococcus pneumoniae SP9-BS68
Streptococcus pyogenes serotype M1
Streptococcus pyogenes serotype M12 (strain MGAS2096)
Streptococcus pyogenes serotype M12 (strain MGAS9429)
Streptococcus pyogenes serotype M18
Streptococcus pyogenes serotype M2 (strain MGAS10270)
Streptococcus pyogenes serotype M28
Streptococcus pyogenes serotype M3
Streptococcus pyogenes serotype M4 (strain MGAS10750)
Streptococcus pyogenes serotype M5 (strain Manfredo)

Streptococcus pyogenes serotype M6
Streptococcus sanguinis (strain SK36)
Streptococcus suis 89/1591
Streptomyces avermitilis
Streptomyces coelicolor
Streptomyces sp. (strain CL190)
Sulfolobus acidocaldarius
Sulfolobus shibatae
Sulfolobus shibatae
Sulfolobus shibatae
Sulfolobus solfataricus
Sulfolobus tokodaii
Sus scrofa
Symbiobacterium thermophilum
Synechococcus elongatus
Synechococcus sp. (strain ATCC 27144 / PCC 6301 / SAUG 1402/1)
Synechococcus sp. (strain JA-2-3B'a(2-13))
Synechococcus sp. (strain JA-3-3Ab)
Synechococcus sp. (strain PCC 7942)
Synechocystis sp.
Synechocystis sp. (strain PCC 6803)
Syntrophomonas wolfei subsp. *wolfei* (strain Goettingen)
Tagetes erecta
Thermococcus kodakaraensis
Thermofilum pendens (strain Hrk 5)
Thermoplasma acidophilum
Thermoplasma volcanium
Thermosinus carboxydivorans Nor1
Thermus thermophilus
Thermus thermophilus (strain HB27 / ATCC BAA-163 / DSM 7039)

Thermus thermophilus (strain HB27 / ATCC BAA-163 / DSM 7039)

Thiomicrospira crunogena (strain XCL-2)

Trichodesmium erythraeum (strain IMS101)

Trypanosoma brucei

Trypanosoma cruzi

Uncultured methanogenic archaeon RC-I

Vibrio fischeri (strain ATCC 700601 / ES114)

Vibrio harveyi HY01

Vibrio parahaemolyticus

Vibrio parahaemolyticus AQ3810

Vibrio sp. Ex25

Xanthobacter sp. (strain Py2)

Zea mays

Weitere Gene zur Expression

Es ist dem Fachmann geläufig, dass ein *addiction*-System generell dazu genutzt werden kann, um ein oder mehrere weitere Fremdgene stabil in einer Zelle zu erhalten, und somit die Genprodukte der Fremdgene produziert werden können, so wie es beispielsweise in einem Expressionssystem geschieht.

Gegenstand der Erfindung ist somit ebenfalls eine vorstehend beschriebene gentechnisch veränderte Zelle, die mindestens ein zusätzliches Fremdgen exprimiert.

Die Genprodukte der Fremdgene können wiederum von der erfindungsgemäßen Zelle genutzt werden, weitere Substanzen zu erzeugen.

Beispiele für zusätzliche Fremdgene sind: Mitglieder des PHA-Synthese Gen Clusters (z. B. *phaC*, *phaA*, *phaB*-Cluster aus z. B. *R. eutropha*, *P. oleovorans*, *P. aeruginosa*,

Thiocapsa pfennigii), Synthesegene für Polythioester und abgeleitete Sequenzen zur Erzeugung eines „künstlichen Stoffwechselweges“ zur mikrobiellen Polythioestersynthese (z. B. eine Butyratkinase [Buk; EC 2.7.2.7] aus *Clostridium acetobutylicum*, eine Phosphotransbutyrylase [Ptb; EC 2.3.1.19] aus *Clostridium acetobutylicum*, und PHA-Synthase Gene (*phaE* und *phaC*) aus z. B. *Chromatium vinosum* oder *Thiocapsa pfennigii* und abgeleitete Sequenzen, vgl. Lütke-Eversloh et al. [2000] in Nature Materials: Biosynthesis of novel thermoplastic polythioesters by engineered *Escherichia coli*, sowie Liu und Steinbüchel 2000 in Applied and Environmental Microbiology: A Novel Genetically Engineered Pathway for Synthesis of Poly(Hydroxyalkanoic Acids) in *Escherichia coli*.), Mitglieder des Alginate-Synthese-Gen-Clusters und abgeleitete Sequenzen (z. B. das Alginate Biosynthese Gen *algX* aus z. B. *Pseudomonas aeruginosa* PA01. und Enzyme gelsistet in: A. Becker et al. [1998]: Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical /genetic perspective), Xanthan-Biosynthese-Gene und abgeleitete Sequenzen sowie Gene für die Produktion weiterer Polysaccharide (z. B. Glycosyltransferase-Gene), Cyanophycin-Synthese Gene und abgeleitete Sequenzen (z. B. *cphA*; *cphA1*; *cphA2* aus z. B. *Synechocystis* PCC6208, *Anabaena variabilis* sp. ATCC 29413 *Cyanothece* sp. ATCC 51142; Cyanobakterien; *Acinetobacter calcoaceticus*; Gene kodierend für Insulin (z. B. *ins* aus z. B. *homo sapiens*; Wachsestersynthasen und abgeleitete Sequenzen (z. B. Wachs estersynthase/Acyl-CoA:diacylglycerol Acyltransferase *ws/dgat* aus z. B. *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 oder *Mycobacterium smegmatis* vgl. R. Kalscheuer und Steinbüchel, 2003 in J Biol Chem.), Gene zur sowohl template-basierten als auch template-unabhängigen Synthese für Polyaminosäuren

und abgeleitete Sequenzen, Gene zur Polylactat-Synthese und abgeleitete Sequenzen, Gene zur Methylcitronensäure Synthese und abgeleitete Sequenzen (z. B. *prpC* aus z. B. *P. putida* KT2440, *R. eutropha* H16 oder *Aspergillus niger* und in WO2007101866 gelistete).

Verfahren zur Herstellung der Zellen

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, umfassend die Verfahrensschritte A) Erniedrigung der Aktivität mindestens eines der bereits im Wildtyp vorhandenen Enzyme E₁ bis E₆ und B) Steigerung mindestens einer bevorzugt mindestens zwei, weiter bevorzugt mindestens drei, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens vier und am meisten bevorzugt mindestens fünf der nicht im Wildtyp vorhandenen Enzymaktivitäten von E₇ bis E₁₁.

Die Steigerung der Enzymaktivitäten wird durch Einbringen mindestens einer exogenen Nukleinsäure in die Zelle erreicht; diese exogene Nukleinsäure vermag ohne Selektionsdruck stabil in der gentechnisch veränderten Zelle zu verweilen und wird weiterhin in die nächste Generation übertragen.

In diesem Zusammenhang ist es bevorzugt, dass diese exogene Nukleinsäure in das Genom der Zelle integriert wird oder aber in Form eines Expressionsvektors in die Zelle eingeführt wird.

In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle ist bevorzugt:

- E₆ Genprodukt des *ispH*
E₇ Genprodukt des *mvaS* aus *Staphylococcus aureus*,
E₈ Genprodukt des *mvaA* aus *Lactobacillus lactis* und aus *Staphylococcus aureus*,
E₉ Genprodukt des *mvaK1* aus *Staphylococcus aureus*,
E₁₀ Genprodukt des *mvaK2* aus *Staphylococcus aureus* und
E₁₁ Genprodukt des *mvaD* aus *Staphylococcus aureus*.

Weiterhin ist es im Zusammenhang mit der vorstehend beschriebenen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt, dass es sich bei der Zelle um einen nur über den MEP-Weg zur IPP-Synthese befähigten Mikroorganismus, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Eubakterien,
Plastiden von Apicomplexa
und Plastiden höherer Pflanzen
handelt.

Unter den Eubakterien sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Lactobacillus, Lactococcus, Escherichia, Staphylococcus, Ralstonia, Bacillus, Corynebacterium, Xanthomonas, Pseudomonas, Streptococcus, Peptostreptococcus, Leuconostoc, Alcanivorax, Agrobacterium, Bifidobacterium, Borellia, Burkholderia, Clostridium, Enterococcus, Fusobacterium, Gluconobacter, Gordonia, Helicobacter, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Porphyromonas, Propionibacterium, Rhizobium, Rhodococcus, Salmonella, Zymomonas, Vibrio, Myxococcus, Chromobacterium, Nitrosomonas, Nitrobacter, Paracoccus, Thiobacillus, Desulfovibrio, Streptomyces, Acinetobacter, Comamonas,

Escherichia coli, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *S aureus* *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia metallidurans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformes*, *Bacillus thuringiensis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluoreszens*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus sp.*, *Leuconostoc mesenteroides* (subsp. *dextranicum*), *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Alcanivorax borkumensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bifidobacterium longum*, *Borellia burgdorferi*, *Burkholderia pseudomallei*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gluconobacter oxydans*, *Gordonia westfalica*, *Gordonia polyisoprenivorans*, *Helicobacter pylori*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia farcinica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhodococcus opacus*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Zymomonas mobilis*, *Vibrio fisheri*, *Vibrio cholerae*, *Myxococcus sp.*, *Chromobacterium violaceum*, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Paracoccus denitrificans* *Thiobacillus ferrooxidans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces albulus*, *Acinetobacter borkumensis* und *Comamonas testosteroni*.

Ebenso bevorzugte Vertreter von Eubakterien sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend alle einen obligat oder fakultativ phototrophen Stoffwechsel besitzenden Proteobakterien, besonders bevorzugt sind hier *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Allochromatium*, *Chromatium*, *Synechococcus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Allochromatium vinosum*, *Chromatium okenii*, *Synechococcus sp.*

Unter den *Apicomplexa* sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Plasmodium,
Paramecium,
Tetrahymena,
Chlamydomonas reinhardtii
Theileria annulata,
Theileria parva

Verfahren zur Herstellung delta mvaK1::ispC-H

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, umfassend die Verfahrensschritte A) Erniedrigung der Aktivität mindestens eines der bereits im Wildtyp vorhandenen Enzyme E₇ bis E₁₁ und B) Steigerung mindestens einer bevorzugt mindestens zwei, weiter bevorzugt mindestens drei, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens vier, darüber hinaus weiter bevorzugt mindestens fünf und am meisten bevorzugt mindestens sechs der nicht im Wildtyp vorhandenen Enzymaktivitäten von E₁ bis E₆.

Die Steigerung der Enzymaktivitäten wird durch Einbringen mindestens einer exogenen Nukleinsäure in die Zelle erreicht; diese exogene Nukleinsäure vermag ohne

Selektionsdruck stabil in der gentechnisch veränderten Zelle zu verweilen und wird weiterhin in die nächste Generation übertragen.

In diesem Zusammenhang ist es bevorzugt, dass diese exogene Nukleinsäure in das Genom der Zelle integriert wird oder aber in Form eines Expressionsvektors in die Zelle eingeführt wird.

In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle ist bevorzugt:

- E₁₀ Genprodukt des *mvaK1*,
- E₁ Genprodukt des *ispC*,
- E₂ Genprodukt des *ispD*,
- E₃ Genprodukt des *ispE*,
- E₄ Genprodukt des *ispF*,
- E₅ Genprodukt des *ispG* und
- E₆ Genprodukt des *ispH*.

Weiterhin ist es im Zusammenhang mit dem vorstehend beschriebenen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt, dass es sich bei der Zelle um einen nur über den MVA-Weg zur IPP-Synthese befähigten Mikroorganismus, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Hefen,
Pilze,
handelt.

Unter den Pilzen sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Absidia
Agaricus

Ajellomyces
Arthroderma
Acremonium
Aspergillus
Disporotrichum
Geosmithia
Mortierella
Paecilomyces
Penicillium
Rhizopus
Trichoderma
Talaromyces
Thielavia.

Unter den Hefen sind insbesondere diejenigen Zellen bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Candida
Pichia
Sacharomyces
Arxula
Klyveromyces
Yarrowia
Hansenula
Brettanomyces

Zellen, die durch Verfahren hergestellt wurden

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgaben leistet weiterhin die durch die vorstehend beschriebenen Verfahren erhältlichen, gentechnisch veränderten Zellen.

Relevantes Plasmid

Einen Beitrag zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe leistet weiterhin eine isolierte Nukleinsäure pCOLADuet-1::MVA1-5 mit der Sequenz nach SEQ ID NO: 3.

Verfahren zu Herstellung von Produkten mit erfindungsgemäßen Zellen

Wie eingangs beschrieben werden *addiction*-Systeme in biotechnologischen Produktionsprozessen eingesetzt; die gentechnische Manipulation der das *addiction*-System aufweisenden Zelle ist daher in diesem Zusammenhang zwangsläufig mit der Herstellung von gewünschten Produkten verbunden. In Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist als Produkt jede Substanz zu verstehen, die von erfindungsgemäßer Zelle aufgrund der gentechnischen Veränderung im Vergleich zu ihrem Wildtyp vermehrt synthetisiert wird. Dies können daher beispielsweise Zwischenprodukte der IPP-Stoffwechselwege, Genprodukte der Fremdgene, aber auch durch die Genprodukte der Fremdgene synthetisierten Substanzen sein, wie z. B. das unten beschriebene Cyanophycin.

Erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung von Produkten umfasst den Verfahrensschritt des in Kontakt Bringens einer erfindungsgemäßen Zelle mit einem Nährmedium beinhalten eine Kohlenstoffquelle unter Bedingungen, unter denen Produkt gebildet wird, sowie gegebenenfalls Aufreinigung des Produktes aus der Kultur.

Die erfindungsgemäßen, gentechnisch veränderten Zellen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed-batch-Verfahren

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

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

Als Kohlenstoffquelle können Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Methanol, Kohlenwasserstoffe wie Methan, Aminosäuren wie L-Glutamat oder L-Valin oder organische Säuren wie z. B. Essigsäure sowie Kohlendioxid bei chemolitho-autotroph wachsenden Mikroorganismen zum Beispiel *Ralstonia eutropha* bzw. photo-autotroph wachsenden Mikroorganismen wie zum Beispiel *Rhodobacter sphaeroides*, verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Weiter bevorzugt ist der Einsatz von Komplexmediumbestandteilen aus Resten von

Agrargütererzeugnissen. Besonders bevorzugt ist der Einsatz von Kohlehydraten, insbesondere Monosaccharide, Oligosaccharide oder Polysaccharide, wie dies in US 6,01,494 und US 6,136,576 beschrieben ist, von C5-Zuckern oder von Glycerin.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat bzw. N_2 bei stickstofffixierenden Mikroorganismen z. B. *Rhizobium leguminosarum* oder auch Cyanobakterien verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

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

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure

oder Schwefelsäure bzw. Kohlensäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester oder Pflanzenöl eingesetzt werden. Weitere geläufige Methoden der Prozesskontrolle und Schaumkontrollsysteme für Fermentationsprozesse können in einschlägiger Literatur nachgelesen werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von (weiteren) Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie z. B. Luft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20 °C bis 45 °C und vorzugsweise bei 25 °C bis 40 °C. Insbesondere bei der Verwendung von Zellen, welche Glycerin als Substrat umwandeln können, kann es bevorzugt sein, als Zellen solche Zellen einzusetzen, die in der US 6,803,218 beschrieben werden. In diesem Fall können die Zellen bei Temperaturen im Bereich von 40 bis 100 °C kultiviert werden.

Die Zellen können, falls das Produkt nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen, und das Produkt nach bekannten Aufreinigungsverfahren aus dem Lysat gewonnen werden. Die Zellen können beispielsweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Die Aufreinigung des Produktes kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie

beispielsweise Tangentialfiltration, Fällung, Destillation, Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie, Affinitätschromatographie, hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese.

Produkte aus Verfahren mit erfindungsgemäßen Zellen

Ebenfalls Bestandteil der Erfindung sind Produkte, hergestellt mit dem vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Produkten. Bevorzugt ist das Produkt ausgewählt aus der Gruppe umfassend

Isoprenoide und Terpenoide (wie beispielsweise Steroide, Flavonoide, Gummistoffe oder Carotenoide), Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene, Triterpene, Polyterpene, Cyclische Monoterpene, Cyclische Sesquiterpene, Cyclische Diterpene, Cyclische Triterpene oder auch Hormone, Fette, Öle oder Vitamine und das Genprodukt des Fremdgens.

In den nachfolgend aufgeführten Beispielen wird die vorliegende Erfindung beispielhaft beschrieben, ohne dass die Erfindung, deren Anwendungsbreite sich aus der gesamten Beschreibung und den Ansprüchen ergibt, auf die in den Beispielen genannten Ausführungsformen beschränkt sein soll.

Folgende Figuren sind Bestandteil der Offenbarung:

Figur 1: Der MEP-Weg

Figur 2: Der MVA-Weg

Figur 3: Kultivierung von *E. coli* HMS174(DE3) pColaDuet-1::MVA1-5 und *E. coli* HMS174(DE3) Δ ispH Ω FRT/Amp/FRT pCOLADuet-1::MVA1-5 in LB-Medium.

Figur 4: Plasmidkarte pCOLADuet-1::MVA1-5::cphA

Figur 5: Fremdgenexpression

Beispiele:

Herstellung des pCOLADuet-1::MVA1-5

Für die DNA-Manipulationen wurden Standardtechniken benutzt wie sie in Sambrook, J. et al. (1989), "Molecular Cloning: a laboratory manual", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, angegeben sind. Die für Klonierungen genutzten Enzyme stammen von New England Biolabs, Ipswich, MA, und wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

Zur Herstellung des pCOLADuet-1::MVA1-5, SEQ ID NO: 3, wurden zunächst zwei Plasmide, pCOLADuet-1::MVA-top, SEQ ID NO: 1, und pCOLADuet-1::MVA-bottom, SEQ ID NO: 2, durch die Firma BioBasic Inc., Ontario, Canada, künstlich synthetisiert.

Beide Plasmide wurden mit KpnI / MfeI, verdaut; das erhaltene 2103 Basenpaar große Fragment aus pCOLADuet-1::MVA-bottom wurde in das 8321 Basenpaar große Fragment aus pCOLADuet-1::MVA-top unter Erhalt von pCOLADuet-1::MVA1-5 ligiert.

Die Sequenz des Vektors wurde durch Sequenzierung bei der Firma GATC Biotech, Konstanz, Schweiz, überprüft.

Transformation von pColaDuet-1::MVA1-5 in E. coli

Die Transformation des pCOLADuet-1::MVA1-5 (KmR) Hybridplasmids in *E. coli* HMS174 (DE3) fand gleichzeitig mit einer Transformation des PLasmides pRed/ET (TcR) (Fa.Genebridges) statt. Die Selektion erfolgte auf entsprechenden LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml Endkonzentration) und Tetrazyklin (12,5 µg/ml Endkonzentration) als Selektionsmarker für eine positive Selektierung.

Die Kultivierung bei erfolgte bei 30°C, da sonst Plasmidverlust und Induktion des Hybridplasmids pRed/ET zu befürchten war. Der so generierte Stamm wird im folgenden als „*E. coli* HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5“ bezeichnet.

Herstellung der ispH-Mutante von E. coli HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5

Die Amplifizierung der FRT/Amp/FRT Selektionskassette (Fa.Genebridges) zur Erhaltung homologer 5`und 3` DNA Sequenzen des *ispH*-Gens wurde mittels AccuPrimePfx Polymerase (Invitrogen) und zweistufiger PCR (Denaturierung bei 95 °C für 15 sec.; Elongation 68 °C für 2 Minuten). (Primersequenzen: *ispH_integr_fw*: 5`-
atgcagatcctggttgccaacccgcgtgggtttttgtgccgggtagaccgaattaacc
tcactaaagggcggc-3`) (*ispH_integr_rev*: 5`-
ttcacgaatatcgacacgcagctctttcggcacttcgaaaacaatgtttttaatacgac
tcactatagggctc-3`) durchgeführt. Das Fragment (ca. 1,8 kbp) wurde mittels Agarosegel isoliert (Gel Extraktions Kit Fa.Qiagen). 400 µg wurden für die Red/Et vermittelte Integration mittels Elektroporation nach den Herstellerangaben der Fa. Genebridges nach *E. coli*

HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5 transformiert und weiterbehandelt.

Der so generierte Stamm wird im folgenden als „*E. coli* HMS174 (DE3) Δ *ispH* Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet-1::MVA1-5“ bezeichnet.

Der Kontrollversuch wurde mit *E. coli* HMS174 (DE3) ohne pCOLADuet-1::MVA1-5 durchgeführt. Eine Selektion der erhaltenen Klone wurde für den Ansatz mit MVA1-5 auf Kanamycin (Km)/ Ampicillin (Amp) LB-Platten und für die Kontrolle ohne MVA1-5 auf Amp LB-Platten ausplattiert. Die Kontrolle zeigte keine vitalen Kolonien, welche bei einer nicht letalen Integration der FRT/Amp/FRT Integration in das *ispH*-Gen entstanden sein müssten.

Der Stamm *E. coli* HMS174 (DE3) Δ *ispH* Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet-1::MVA1-5 zeigte ca. 320 Kolonien bildende Einheiten (*cfu*) bei gleicher ausplattierter Menge an Zellen aus dem Regenerationsansatz. Es folgten zahlreiche Versuche die belegten, dass die Ampicillinresistenz genomisch korrekt integriert wurde und dauerhaft erhalten blieb.

Vektorstabilität ohne Antibiotikum in ispH-Mutante

Die stabilisierende Wirkung in *E. coli* HMS174 (DE3) Δ *ispH* Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet-1::MVA1-5 gegenüber dem Stamm *E. coli* HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5 konnte festgestellt werden: *E. coli* HMS174 (DE3) Δ *ispH* Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet-1::MVA1-5 wies keinen quantifizierbarer Plasmidverlust auf, *E. coli* HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5 hingegen wies einen Plasmidverlust über 24h von 20% auf,.

Figur 3 zeigt Zellwachstum der rekombinanten Zellen. Das Zellwachstum wurde als Trübungsmessung über ein Klett Summerson Colorimeter (Filter Nr. 54; Manostat Corporation Cat. Nr. 76-550-220, USA) bei 520nm ermittelt. Das Wachstums-Monitoring wurde in relativen Klett-Units (KU) gegen unbeimpftes Medium verfolgt.

Die verwendeten rekombinanten Stämme von *E. coli* wurden mit 1 % einer 12stündigen Vorkultur (LB-Medium mit entspr. Antibiotika: Rifampizin für *E. coli* HMS174 (DE3) + Kanamycin für pColaDuet-1 und gegebenenfalls Ampicillin für genomisches Insertionsfragment) angeimpft und in einem 4-fach Schikane Klett-Kolben (250 ml Gesamtvolumen mit 100ml LB-Medium) bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte aus dem Schikane-Klett-Kolben direkt mit einem Klett Summerson Colorimeter. Zur Bestimmung des Plasmidverlustes wurden die Zellen mit steriler Saline (NaCl 0,9 % in H₂O) einheitlich verdünnt und in gleichen Volumina auf LB und LB-Selektionsplatten (mit 50µg Kanamycin) ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 24 h erfolgte die Auszählung der Koloniebildenden Einheiten (cfu) hinsichtlich der aufgetretenen Koloniezahlen.

| Mittelwert cfu auf LB-Platten, 10 ⁻⁵ Verdünnung, | Ohne Antibiotikum normiert auf 100 | Mit Kanamycin | PlasmidVerlust in % |
|---|---|------------------|------------------------|
| <i>E. coli</i> HMS174 | 100 | 78 | 22 |

| | | | |
|---|-----|----|---|
| (DE3) pColaDuet- 1::MVA1-5 | | | |
| <i>E. coli</i> HMS174 (DE3) Δ ispH Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet- 1::MVA1-5 | 100 | 99 | 1 |

*Herstellung eines addiction-System Plasmides mit
zusätzlichem Fremdgen: pColaDuet-1::MVA1-5::cphA*

Es wurde als beispielhaftes Fremdgene die T7 Cyanophycin-
Synthetase (cphA6308C595S) Transkriptionseinheit in das
Plasmid pCOLADuet-1::MVA1-5 *funktional einkloniert*

Ausgehend von einem gereinigtem template Plasmid,

pET23a::cphA6308C5956S, umfassend eine DNA kodierend für
die Cyanophycinsynthetase mit *NCBI accession number:*

AAF43647, enthaltend eine Aminosäure-Modifikation [C595S],

wurde mittels des 5'Primers „pET23aXhoIT7_fw“ (5'-

AACTCGAGATTAATACGACTCACTATAGG-3') und des 3'Primers „T7-

Terminator“ 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' eine *cphA6308C595S*

Transkriptionseinheit (T7 Promoter-RBS-cphA) mittels des

folgenden PCR-Programms in einem Thermocycler (Modell

Primus96 advanced, Fa. Peqlab, Erlangen, Deutschland)

amplifiziert. Der Einsatz des 5'Primers ermöglichte das

Hinzufügen einer 3' XhoI Schnittstelle. Eine 5' XhoI

Schnittstelle befand sich bereits Stromabwärts des *cphA* Gen

welches zuvor mittels *NdeI/XhoI* in den Vektor pET23a

kloniert wurde.

Der Ansatz enthält:

10 µl Primer 5', 10 µl Primer 3', 10 µl dNTP-MIX (je 2,5 mM), 10 µl 10fach Pfx-Amplifikationspuffer (Fa. Invitrogen), 2,5 µl MgSO₄ (50 mM), 10 µl (2 ng) Template DNA (pET23a::cphA6308), 0,5 µl Platinum® Pfx-DNA-Polymerase (Fa. Invitrogen), ad 100 µl H₂O bidest.

PCR-Programm:

- | | | |
|--|-------|-------|
| 1.) Denaturierung: | 2 min | 94 °C |
| 2.) Denaturierung: | 15 s | 94 °C |
| 3.) Annealing | 30 s | 55 °C |
| 4.) Elongation | 3 min | 68 °C |
| 5.) 32fache Wiederholung der Schritte 1.) -4.) | | |
| 6.) finale Elongation | 5 min | 68 °C |

Das PCR-Produkt wurde mittels GeneClean Kit der Firma Qiagen (QIAquick Gel Extraktion Kit) nach beiliegender Gebrauchsanweisung gereinigt. Anschließend wurde das gereinigte PCR-Produkt mittels Restriktionsenzym XhoI (Fa. Fermentas) nach beiliegender Gebrauchsanweisung für 12h bei 37 °C verdaut und das Enzym bei 80 °C für 15 min inaktiviert. Für die Ligation wurde dieses Verdaute Fragment folgendermaßen in den durch XhoI verdaut und linearisierten Zielvektor pCOLADuet-1::MVA1-5 ligiert. Entsprechend der Gleichung von DUGAICZYK et al. (1975) kann die einzusetzende Konzentration des Vektors (j) im Ligationsansatz berechnet werden, bei der die theoretische Anfangsgeschwindigkeit von bimolekularer Verknüpfungsreaktion und intramolekularer Zyklisierung gleich groß ist. $j \text{ (ng/ml)} = 51,1 \times Mr - 0,5 \times 1.000$ Basierend auf dieser Konzentrationsberechnung wurde das zu ligierende DNA-Fragment mit dem 2-4fachen molaren Überschuss an vektorieller DNA ligiert. Der Ligationsansatz

bestand aus den zu ligierenden DNA-Spezies und des mitgelieferten Ligase-Puffers in einer Endkonzentration von 1 x. pro µg DNA wurde für die Ligation kohäsiver Enden 1 U eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 14,5 °C in einem Peltier-Thermoblock (Firma HLC). Diese Temperatur stellt somit einen Kompromiss zwischen Stabilität und ausreichender Aktivität des Enzyms dar. Abschließend wurden der Ligationsansatz in *E. coli* TOP10 transformiert und die auf LB-Kanamycin Platten erhaltenen Klone überprüft (37 °C Inkubation ÜN). Durch eine Plasmidisolation (Fast Plasmid Mini-Kit; Fa. Eppendorf) einiger Klone und einem *Xho*I-Verdau wurden vermeintlich positive Klone selektiert. Eine abschließende Sequenzierung mit dem pCOLADuet-1 spezifischen T7-Terminator Sequenzierprimer (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') bestätigte die erfolgreiche Ligation von *cphA*6308C595S. Das so erhaltene Plasmid wurde pCOLADuet-1::MVA1-5::*cphA* bezeichnet und ist in Figur 4 dargestellt.

Transformation von pColaDuet-1::MVA1-5::cphA in E. coli

Das Plasmid wurde in den Stamm *E. coli* HMS174 (DE3) transformiert. Dieser rekombinante Stamm war die Ausgangsbasis für den folgenden *ispH* knockout und wird im folgenden als „*E. coli* HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5::*cphA*“ bezeichnet.

Herstellung der ispH-Mutante von E. coli HMS174 (DE3)

pColaDuet-1::MVA1-5::cphA

Es wurde analog der Herstellung der *ispH*-Mutante von *E. coli* HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5 verfahren.

Der so generierte Stamm wird im Folgenden als „*E. coli* HMS174 (DE3) $\Delta ispH$ Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet-1::MVA1-5::cphA“ bezeichnet.

Expression eines weiteren Fremdgens

Die Expression des Fremdgens ist durch die Synthese von Cyanophycin festzustellen. Diese ist eindeutig an Hand der weißen Färbung von exprimierenden Bakterien auszumachen. Figur 5 zeigt weiße, opake Bakterienkolonien von *E. coli* HMS174 (DE3) $\Delta ispH$ Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet-1::MVA1-5::cphA. Cyanophycin ist daher ein Beispiel für ein durch das Genprodukt eines Fremdgens synthetisierte Substanz.

Vektorstabilität mit Expression eines weiteren Fremdgens

Die verwendeten rekombinanten Stämme von *E. coli* (*E. coli* HMS174 (DE3) pColaDuet-1::MVA1-5::cphA und *E. coli* HMS174 (DE3) $\Delta ispH$ Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet-1::MVA1-5::cphA) wurden mit 1 % einer 12stündigen Vorkultur (LB-Medium mit entspr. Antibiotika: Rifampizin für *E. coli* HMS174(DE3) + Kanamycin für pColaDuet-1 und gegebenenfalls Ampicillin für genomisches Insertionsfragment) inokuliert und in einem 4fach Schikane Klett-Kolben (250 ml Gesamtvolumen mit 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika) bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte aus dem Schikane-Klett-Kolben direkt mit einem Klett Summerson Colorimeter. Zur Bestimmung des Plasmidverlustes wurden die Zellen mit steriler Saline (NaCl 0,9 % in H₂O) einheitlich verdünnt und in gleichen Volumina auf LB und LB-Selektionsplatten (mit 50 µg Kanamycin) ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 16 h erfolgte die Auszählung

der Kolonie-bildenden Einheiten (*cfu*) hinsichtlich der aufgetretenen Koloniezahlen.

Die hier angeführte Tabelle zeigt Mittelwerte der vergleichenden, quantitativen Bestimmung des Plasmidverlusts nach 70 h in LB-Medium ohne Antibiotika:

| Mittelwert <i>cfu</i> auf LB- Platten, 10^{-5} Verdünnung, | Ohne Antibiotikum normiert auf 100 | Mit Kanamycin | PlasmidVerlust in % |
|---|---|------------------|------------------------|
| <i>E. coli</i> HMS174 (DE3) pColaDuet- 1::MVA1- 5::cphA | 100 | 64 | 36 |
| <i>E. coli</i> HMS174 (DE3) Δ ispH Ω FRT/Amp/FRT pColaDuet- 1::MVA1- 5::cphA | 100 | 100 | 0 |

Hieraus geht hervor, dass über einen Zeitraum von 72 Stunden bis zu 35 % Plasmidverlust ohne Einsatz des *addiction*-Systems auftreten.

Ansprüche:

1. Eine gentechnisch veränderte Zelle, die mindestens eine geänderte Aktivität der im Wildtyp vorhandenen Enzyme aufweist, so dass diese Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp reduzierte Menge an Isopentenylidiphosphat zu bilden vermag, dadurch gekennzeichnet, dass diese Zelle mindestens eine gesteigerte, im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität aufweist, durch die diese Zelle eine erhöhte Menge an Isopentenylidiphosphat zu bilden vermag.

2. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁, welches die Umsetzung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat katalysiert,

ein Enzym E₂, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und Cytidintriphosphat zu 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert,

ein Enzym E₃, welches die Umsetzung von 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol und ATP zu 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert,

ein Enzym E₄, welches die Umsetzung von 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat katalysiert,

ein Enzym E₅, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat zu (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat katalysiert und

ein Enzym E₆, welches die Umsetzung von (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat zu IPP und/oder DMAPP katalysiert

und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₇, welches die Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A katalysiert,

ein Enzym E₈, welches die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonat katalysiert,

ein Enzym E₉, welches die Umsetzung von Mevalonat zu Mevalonat-5-Phosphat katalysiert,

ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und

ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenylidiphosphat katalysiert.

3. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₇, welches die Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A katalysiert,
ein Enzym E₈, welches die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonat katalysiert,
ein Enzym E₉, welches die Umsetzung von Mevalonat zu Mevalonat-5-Phosphat katalysiert,
ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und
ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenylidiphosphat katalysiert

und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

Ein Enzym E₁, welches die Umsetzung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat katalysiert,
ein Enzym E₂, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat und Cytidintriphosphat zu 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert,
ein Enzym E₃, welches die Umsetzung von 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol und ATP zu 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol katalysiert,
ein Enzym E₄, welches die Umsetzung von 2-Phospho-4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-

Erythritol zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat katalysiert,
ein Enzym E₅, welches die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat zu (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat katalysiert und
ein Enzym E₆, welches die Umsetzung von (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyldiphosphat zu IPP und/oder DMAPP katalysiert

4. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

ein Enzym E₁₂, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Isopentenylmonophosphat katalysiert und
ein Enzym E₁₃, welches die Umsetzung von Isopentenylmonophosphat zu Isopentenyldiphosphat katalysiert,

und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und
ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenyldiphosphat katalysiert.

5. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der im Wildtyp vorhandenen Enzyme ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend:

ein Enzym E₁₀, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Mevalonat-5-Diphosphat katalysiert und

ein Enzym E₁₁, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Diphosphat zu Isopentenylidiphosphat katalysiert,

und die im Wildtyp nicht vorhandene Enzymaktivität hervorgerufen wird durch mindestens ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

ein Enzym E₁₂, welches die Umsetzung von Mevalonat-5-Phosphat zu Isopentenylmonophosphat katalysiert und

ein Enzym E₁₃, welches die Umsetzung von Isopentenylmonophosphat zu Isopentenylidiphosphat katalysiert.

6. Eine Zelle gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass für mindestens eines der Enzyme E₁ bis E₁₃ zutrifft, dass

E₁ eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate-Reductoisomerase (EC 1.1.1.267),

E₂ eine 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Cytidylyltransferase (EC 2.7.7.60),

E₃ eine 4-(Cytidin-5'-Diphospho)-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase (EC 2.7.1.148),

- E₄ eine 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat-Synthase (EC 4.6.1.12),
E₅ eine 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-en-1-yl-Diphosphat-Synthase (EC 1.17.4.3),
E₆ eine 4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reductase (EC 1.17.1.2),

E₇ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase (EC 2.3.3.1.10),
E₈ eine Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (EC 1.1.1.34),
E₉ eine Mevalonat-Kinase (EC 2.7.1.36),
E₁₀ eine Phosphomevalonat-Kinase (EC 2.7.4.1),
E₁₁ eine Diphosphomevalonat-Decarboxylase (EC 4.1.1.33),
E₁₂ eine Monophosphomevalonat-Decarboxylase und
E₁₃ eine Isopentenylphosphat-Kinase

ist.

7. Eine Zelle gemäß Anspruch 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der Enzyme ist:

- E₆ Genprodukt des *ispH*,
E₇ Genprodukt des *mvaS* aus *Staphylococcus aureus*,
E₈ Genprodukt des *mvaA* aus *Lactobacillus lactis* oder aus *Staphylococcus aureus*,
E₉ Genprodukt des *mvaK1* aus *Staphylococcus aureus*,
E₁₀ Genprodukt des *mvaK2* aus *Staphylococcus aureus* und
E₁₁ Genprodukt des *mvaD* aus *Staphylococcus aureus*.

8. Eine Zelle gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um einen nur über den MEP-Weg zur IPP-Synthese befähigten Mikroorganismus handelt.
9. Eine Zelle gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der Enzyme ist:
- E₁₀ Genprodukt des *mvaK1*,
 - E₁ Genprodukt des *ispC*,
 - E₂ Genprodukt des *ispD*,
 - E₃ Genprodukt des *ispE*,
 - E₄ Genprodukt des *ispF*,
 - E₅ Genprodukt des *ispG* und
 - E₆ Genprodukt des *ispH*.
10. Eine Zelle gemäß mindestens einem der Ansprüche 1, 3, 5 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um einen nur über den MVA-Weg zur IPP-Synthese befähigten Mikroorganismus handelt.
11. Eine Zelle gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle mindestens eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp geänderte?) Aktivität eines Enzyms E₁₄, welches die Umsetzung von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat katalysiert, aufweist.
12. Eine Zelle gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle mindestens ein zusätzliches Fremdgen expremiert.

13. Ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, umfassend die Verfahrensschritte:

A) Erniedrigung der Aktivität mindestens eines der bereits im Wildtyp vorhandenen Enzyme

E₁ bis E₆

und

B) Steigerung mindestens einer der nicht im Wildtyp vorhandenen Enzymaktivitäten von

E₇ bis E₁₁.

14. Ein Verfahren zur Herstellung einer gentechnisch veränderten Zelle, umfassend die Verfahrensschritte:

A) Erniedrigung der Aktivität mindestens eines der bereits im Wildtyp vorhandenen Enzyme

E₇ bis E₁₁.

und

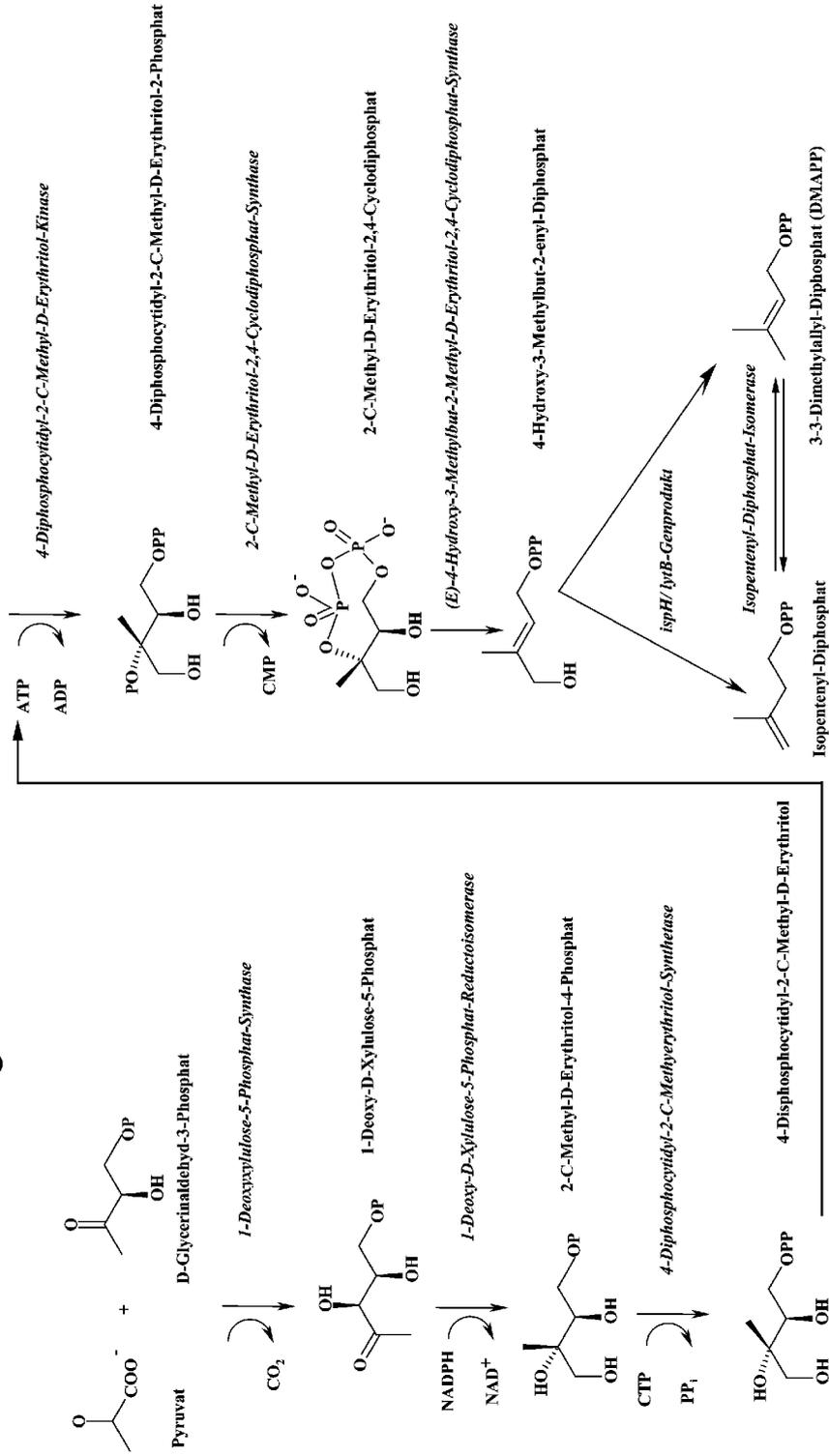
B) Steigerung mindestens einer der nicht im Wildtyp vorhandenen Enzymaktivitäten von

E₁ bis E₆

15. Eine Zelle, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14.

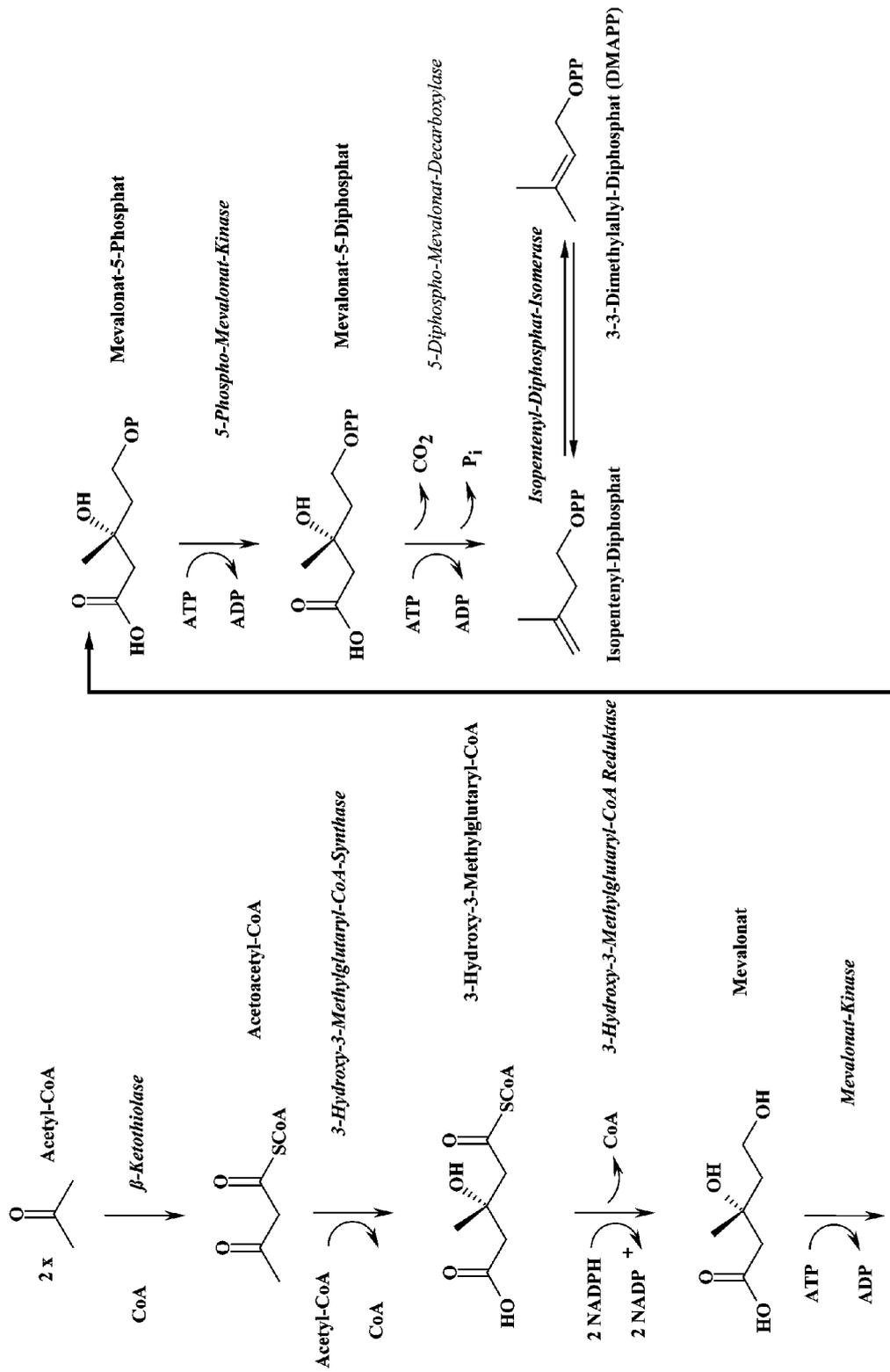
16. Eine isolierte Nukleinsäure pCOLADuet-1::MVA1-5 mit der Sequenz nach SEQ ID NO: 3.
17. Verfahren zur Herstellung von Produkten umfassend den Verfahrensschritt des in Kontakt Bringens einer Zelle gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12 und 15 mit einem Nährmedium beinhalten eine Kohlenstoffquelle unter Bedingungen, unter denen Produkt gebildet wird, sowie gegebenenfalls Aufreinigung des Produktes aus der Kultur.
18. Produkt erhalten nach einem Verfahren gemäß Anspruch 17.

MEP-Stoffwechselweg

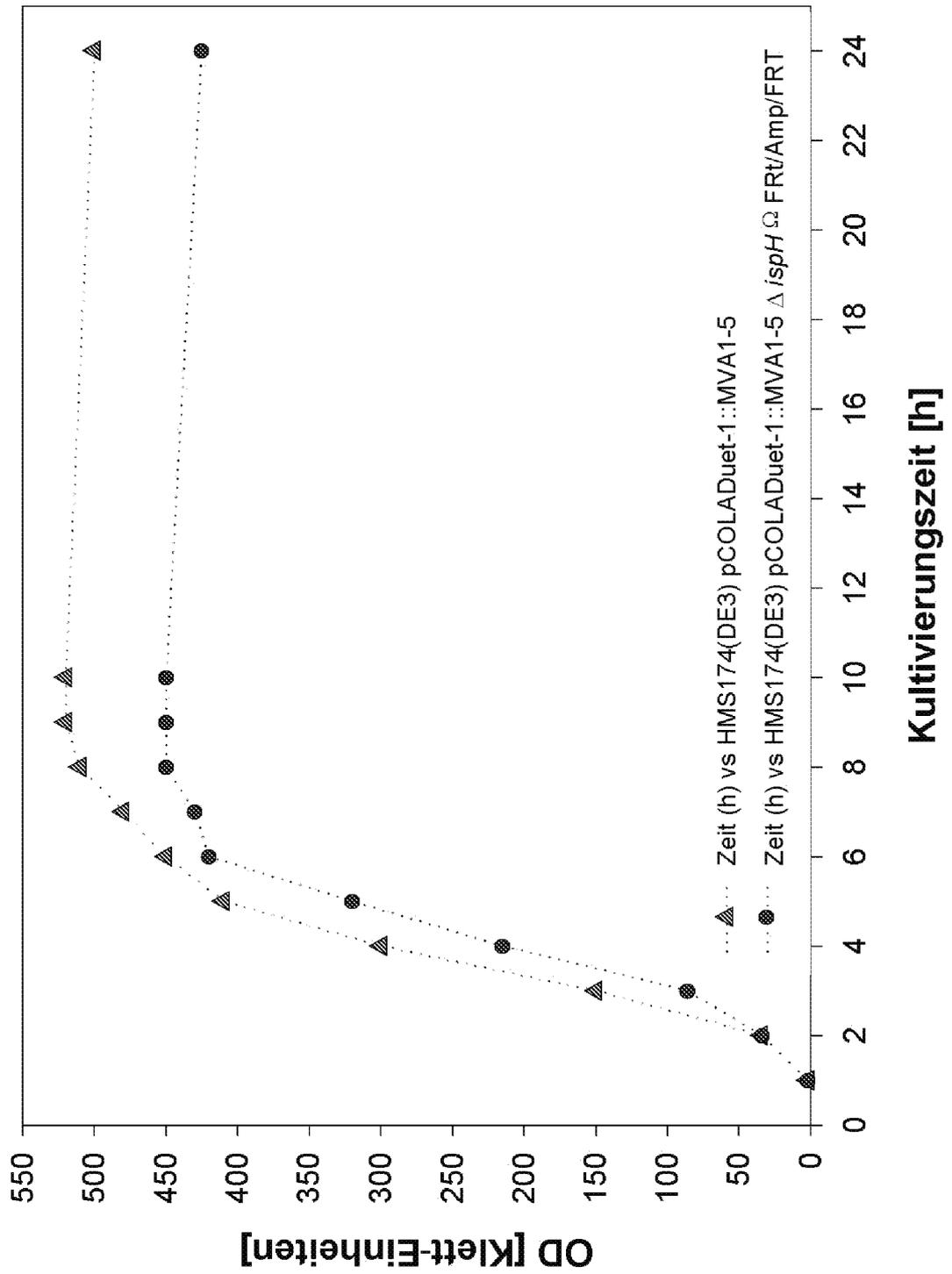


Figur 1

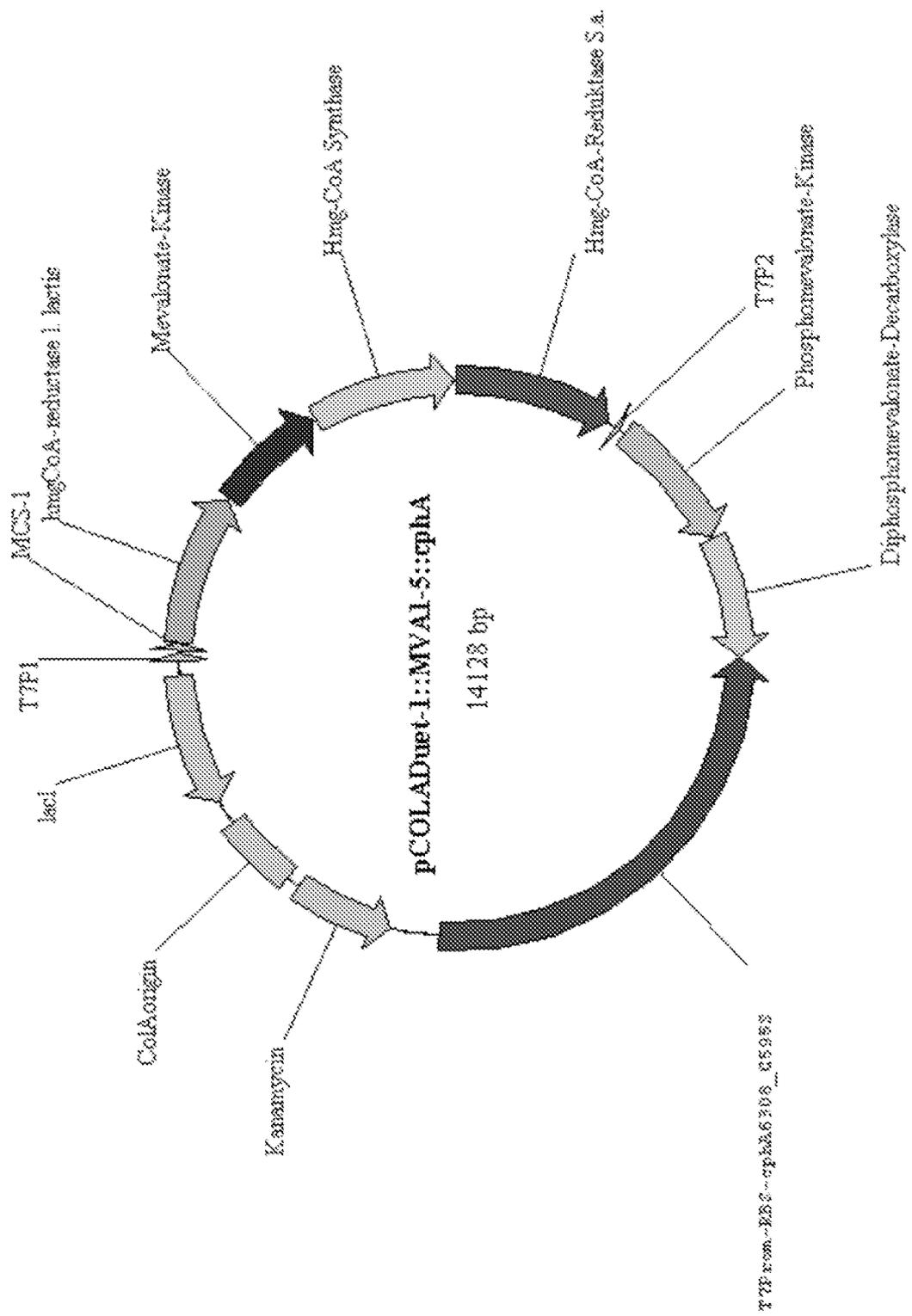
MVA-Stoffwechselweg



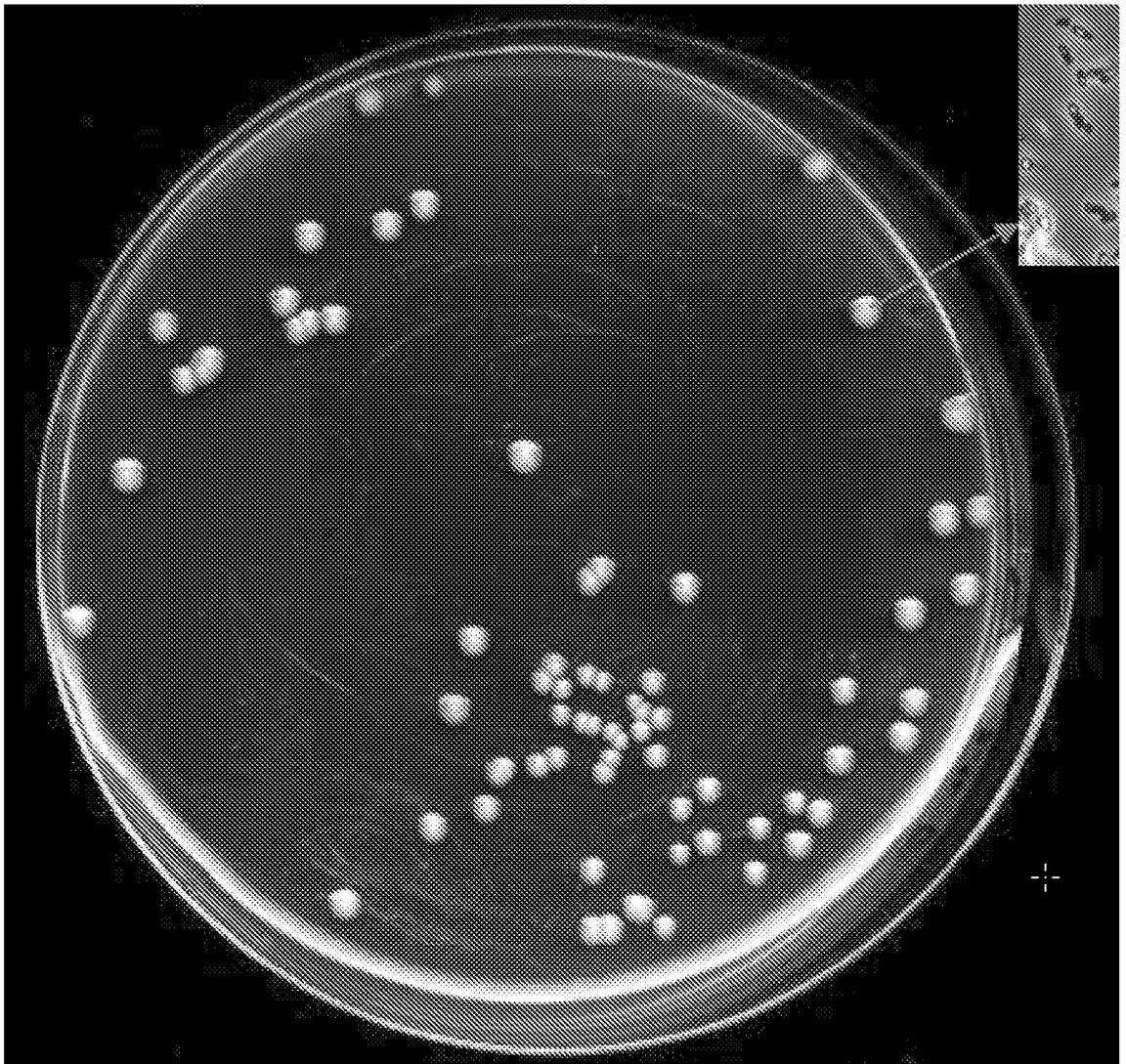
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/059281A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/52

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | US 2003/148479 A1 (KEASLING JAY [US] ET AL KEASLING JAY [US] ET AL) 7 August 2003 (2003-08-07) examples 1,2 ----- -/-- | 1-15,17, 18 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

Date of the actual completion of the international search

18 September 2009

Date of mailing of the international search report

29/09/2009

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Offermann, Stefanie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/059281

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>CAMPOS N ET AL: "ESCHERICHIA COLI ENGINEERED TO SYNTHESIZE ISOPENTENYL DIPHOSPHATE AND DIMETHYLALLYL DIPHOSPHATE FROM MEVALONATE: A NOVEL SYSTEM FOR THE GENETIC ANALYSIS OF THE 2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 4-PHOSPHATE PATHWAY FOR ISOPRENOID BIOSYNTHESIS" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 353, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 59-67, XP001030977 ISSN: 0264-6021 page 62, right-hand column - page 66, left-hand column; figure 1; table 2</p> | 1-15,17, 18 |
| X | <p>CORDIER H ET AL: "Heterologous expression in saccharomyces cerevisiae of an arabidopsis thaliana cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER, DORDRECHT, NL, vol. 39, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 953-967, XP002969280 ISSN: 0167-4412 page 954, left-hand column page 956, right-hand column</p> | 1-15,17, 18 |
| X | <p>PITERA ET AL: "Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in Escherichia coli" METABOLIC ENGINEERING, ACADEMIC PRESS, US, vol. 9, no. 2, 16 February 2007 (2007-02-16), pages 193-207, XP005888126 ISSN: 1096-7176</p> | 18 |
| Y | <p>the whole document</p> | 1-15,17 |
| X | <p>WO 2007/093962 A (FIRMENICH & CIE [CH]; CLARK ANTHONY [FR]; MAURY JEROME [DK]; ASADOLLAH) 23 August 2007 (2007-08-23) the whole document</p> | 18 |
| Y | | 1-15,17 |
| T | <p>KROLL J ET AL: "Establishment of a novel anabolism-based addiction system with an artificially introduced mevalonate pathway: Complete stabilization of plasmids as universal application in white biotechnology" METABOLIC ENGINEERING, ACADEMIC PRESS, US, vol. 11, no. 3, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 168-177, XP026034668 ISSN: 1096-7176 [retrieved on 2009-02-05] the whole document</p> | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|---|
| International application No PCT/EP2009/059281 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | |
|--|------------------|-------------------------|------------------|------------|
| US 2003148479 | A1 | 07-08-2003 | US 2004005678 A1 | 08-01-2004 |
| | | | US 2007166782 A1 | 19-07-2007 |
| | | | US 2007099261 A1 | 03-05-2007 |
| | | | US 2007077616 A1 | 05-04-2007 |
| | | | US 2007092931 A1 | 26-04-2007 |
| | | | | |
| WO 2007093962 | A | 23-08-2007 | CN 101384719 A | 11-03-2009 |
| | | | EP 1987147 A2 | 05-11-2008 |
| | | | US 2009155874 A1 | 18-06-2009 |
| | | | | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/059281

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N15/52

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N

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

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

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | US 2003/148479 A1 (KEASLING JAY [US] ET AL KEASLING JAY [US] ET AL) 7. August 2003 (2003-08-07) Beispiele 1,2 ----- -/-- | 1-15,17, 18 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|---|--|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absenddatum des internationalen Recherchenberichts |
| 18. September 2009 | 29/09/2009 |

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

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | <p>CAMPOS N ET AL: "ESCHERICHIA COLI ENGINEERED TO SYNTHESIZE ISOPENTENYL DIPHOSPHATE AND DIMETHYLALLYL DIPHOSPHATE FROM MEVALONATE: A NOVEL SYSTEM FOR THE GENETIC ANALYSIS OF THE 2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 4-PHOSPHATE PATHWAY FOR ISOPRENOID BIOSYNTHESIS" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, Bd. 353, Nr. 1, 1. Januar 2000 (2000-01-01), Seiten 59-67, XP001030977 ISSN: 0264-6021 Seite 62, rechte Spalte - Seite 66, linke Spalte; Abbildung 1; Tabelle 2</p> | 1-15,17, 18 |
| X | <p>CORDIER H ET AL: "Heterologous expression in saccharomyces cerevisiae of an arabidopsis thaliana cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER, DORDRECHT, NL, Bd. 39, 1. März 1999 (1999-03-01), Seiten 953-967, XP002969280 ISSN: 0167-4412 Seite 954, linke Spalte Seite 956, rechte Spalte</p> | 1-15,17, 18 |
| X | <p>PITERA ET AL: "Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in Escherichia coli" METABOLIC ENGINEERING, ACADEMIC PRESS, US, Bd. 9, Nr. 2, 16. Februar 2007 (2007-02-16), Seiten 193-207, XP005888126 ISSN: 1096-7176</p> | 18 |
| Y | das ganze Dokument | 1-15,17 |
| X | <p>WO 2007/093962 A (FIRMENICH & CIE [CH]; CLARK ANTHONY [FR]; MAURY JEROME [DK]; ASADOLLAH) 23. August 2007 (2007-08-23) das ganze Dokument</p> | 18 |
| Y | das ganze Dokument | 1-15,17 |
| T | <p>KROLL J ET AL: "Establishment of a novel anabolism-based addiction system with an artificially introduced mevalonate pathway: Complete stabilization of plasmids as universal application in white biotechnology" METABOLIC ENGINEERING, ACADEMIC PRESS, US, Bd. 11, Nr. 3, 1. Mai 2009 (2009-05-01), Seiten 168-177, XP026034668 ISSN: 1096-7176 [gefunden am 2009-02-05] das ganze Dokument</p> | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/059281

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|--|--|
| US 2003148479 A1 | 07-08-2003 | US 2004005678 A1 US 2007166782 A1 US 2007099261 A1 US 2007077616 A1 US 2007092931 A1 | 08-01-2004 19-07-2007 03-05-2007 05-04-2007 26-04-2007 |
| WO 2007093962 A | 23-08-2007 | CN 101384719 A EP 1987147 A2 US 2009155874 A1 | 11-03-2009 05-11-2008 18-06-2009 |