



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7106

**Biochemische Charakterisierung  
der Isoprensynthase aus der  
Graupappel  
(*Populus x canescens* (Ait.) Sm.)  
und ihre Expression in  
*Arabidopsis thaliana* L.**

**A. Bachl**

**Institut für Meteorologie und Klimaforschung**

**April 2005**



Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7106

**Biochemische Charakterisierung  
der Isoprensynthese aus der Graupappel  
(*Populus x canescens* (Ait.) Sm.)  
und ihre Expression in *Arabidopsis thaliana* L.**

Anette Bachl

Institut für Meteorologie und Klimaforschung

von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
2005

Die vorliegende Arbeit wurde sowohl als elektronische Dissertation  
der Universität zu Köln (<http://www.ub.uni-koeln.de/ediss/>)  
sowie als Wissenschaftlicher Bericht des Forschungszentrums Karlsruhe  
mit der Berichtsnummer FZKA 7106 veröffentlicht  
(<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA7106.pdf>)

Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-071069

**Biochemische Charakterisierung der Isoprensynthese aus der  
Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.) Sm.)  
und ihre Expression in *Arabidopsis thaliana* L.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

ANETTE BACHL

aus Traunstein

2005

Berichterstatter:

Prof. Dr. U.I. Flügge

Prof. Dr. R. Kraemer

PD Dr. J.-P. Schnitzler

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2005

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die native ISPS aus der Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.) Sm.) und verschiedene heterolog in *Escherichia coli* exprimierte Derivate, mit C-terminalem bzw. N-terminalem His-Tag sowie unmarkiert, biochemisch charakterisiert. Die ISPS zeigte ein Temperaturoptimum von 40°C, ein breites pH-Optimum von pH 7 - 8,5 und einen apparenten  $K_m$ -Wert im millimolaren Bereich. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Enzymkinetik einen sigmoiden Verlauf aufwies, der auf eine positive Kooperativität des Enzyms hinweist. Die N-terminale Markierung der ISPS hat eine Verschiebung des pH-Optimums weiter in den alkalischen Bereich zur Folge, während die C-terminal markierte ISPS im Vergleich zum N-terminal markierten Enzym eine geringere Aktivität besaß. Durch die vergleichsweise hohe Affinität zum Substrat fiel jedoch der Unterschied bei geringen Substratkonzentrationen weniger stark aus. Das Temperaturoptimum ist bei C-terminaler Markierung um ca. 5-10°C erhöht, die Aktivierungsenergie um 50 %. Alle übrigen Eigenschaften blieben weitgehend konstant.

Zur Transformation von Pflanzen wurden zwei *ispS*-Genderivate hergestellt. Dazu wurde das *ispS*-Gen aus einer cDNA-Bank der Graupappel mit zwei unterschiedlichen Epitopen markiert, um das resultierende Protein besser nachweisen und aufreinigen zu können. Es wurde jeweils am C-terminalen Ende der ISPS ein Epitop angehängt, das HA-Epitop, ein Nonapeptid (YPYDVPDYA) und ein His-Tag, bestehend aus sechs aneinander gereihten Histidinen.

Die Funktionsfähigkeit der beiden ISPS-Derivate wurde durch heterologe Expression in *E. coli* überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass das HA-Epitop zu einem völligen Verlust der Enzymaktivität der ISPS führte. Das Derivat mit His-Tag zeigte dagegen etwa 20 % der Aktivität der unverändert in Bakterien exprimierten ISPS.

Mit dem funktionsfähigen ISPS-Derivat mit His-Tag wurde *Arabidopsis thaliana* L. transformiert. Als Transformationsvektor wurde der binäre Vektor pBinAR verwendet, der einen 35S-Promotor und eine Kanamycin-Resistenz enthält. Die Übertragung auf die Pflanze erfolgte über *Agrobacterium tumefaciens*.

Es konnten 40 positive Linien über die Kanamycin-Resistenz selektiert werden, vier davon stammten aus einer ersten Transformation und konnten bereits geselbsteet werden, die 36 aus einer späteren Transformation stammenden Linien lagen heterozygot vor.

Die stabile Insertion des *ispS*-Gens in das Genom von *A. thaliana* konnte für alle 40 Linien über PCR verifiziert werden. Die Genexpression konnte in 38 der 40 *A. thaliana*-Linien auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Eine erhöhte Isoprenemission konnte für fünf der 40 Linien gemessen werden, für die auch die Höhe der Genexpression über quantitative RT-PCR ermittelt wurde. Zwei der fünf Linien zeigten gleichzeitig zur erhöhten Isoprenemission eine erhöhte Genexpression. Als Grund für die geringe Erhöhung der Isoprenemission wird ein Substratmangel für die ISPS in *A. thaliana* vermutet, zu dem eine geringere Aktivität des Enzyms durch die C-terminale Markierung hinzukommt.



## **Biochemical Characterisation of Isoprene Synthase from Poplar (*Populus x canescens* (Ait.) Sm.) and its Expression in *Arabidopsis thaliana* L.**

It is known that a lot of plant species emit high amounts of isoprene, especially during high temperature periods. The physiological impact of isoprene biosynthesis and emission is currently still unknown. An enhanced heat tolerance as well as an antioxidant action of isoprene is mainly discussed. One of the main goals of this work was therefore to produce transgenic plants differing from the corresponding wildtype in their ability to synthesize and emit isoprene. Therefore, the isoprene synthase (*ispS*) gene from poplar (*Populus x canescens*), which was isolated by MILLER ET AL. (2001) was used to transform *Arabidopsis thaliana* L., which is not a significant isoprene emitter. Prior to transformation the original DNA-sequence was extended by two different epitops, a nonapeptide HA epitope and six triplets for histidine resulting in a C-terminal His-tag, in order to get a labelled enzyme, which can be detected and cleaned up more easily afterwards. For proving the efficiency of the resulting proteins, the core enzymes without the transit peptide needed for the import of the protein, which is encoded in the nucleus, into the chloroplasts were expressed heterologous in *E. coli*. The HA epitope resulted in a complete loss of enzyme activity, while the His-tag led to a decreased enzyme activity of about 20 %.

For the *Agrobacterium* mediated transformation of *A. thaliana* the *ispS* with the C-terminal His-tag was used and cloned into the binary vector pBinAR under the control of a 35S promoter. 40 transgenic lines, which were selected by kanamycine resistance, have been achieved. The stable integration of *ispS* was confirmed on DNA- as well as on RNA level. The expression of *ispS* was proved in 38 of the 40 lines by PCR from cDNA. Furthermore the emission of the transgenic lines was studied by measuring whole plants for several hours. Five of the 40 lines showed significant higher isoprene emission rates being more than 2,5 fold higher than in the measured non emitting *A. thaliana* plants. Two of the five new isoprene emitting plants showed coevally to the higher emission rates also a higher gene expression rate for the *ispS*, which was measured by quantitative RT PCR.

In addition, native isoprene synthase (ISPS) from poplar as well as different derivates from it were characterised biochemically. The native enzyme and the unlabelled heterologous in *E. coli* expressed ISPS acted very similar. Isoprene synthase has a  $K_m$  in the range of millimolar, a temperature optimum of 40 degrees and a broad pH-optimum of 7 to 8.5. Integration of an N-terminal His-tag led to a shifted pH-optimum to the alkaline side while the

C-terminal His-tag had more influence. As indicated by the *in vivo*-expression analysis in *E. coli*, this manipulation led to a decrease in enzyme activity. The C-terminal his-tag also resulted in a higher temperature optimum and a higher activating energy.

---

1	Einleitung	1
1.1	Isoprenemission von Pflanzen und ihre Bedeutung für die Atmosphärenchemie	1
1.2	Plastidäre Isoprenoidbiosynthese – Der MEP-Stoffwechsel	2
1.3	Isoprensynthese – Das Schlüsselenzym der Isoprenbiosynthese	7
1.4	Physiologische Funktion der Isoprenbildung bei Pflanzen	8
1.5	Ziele der Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Herkunft und Anzucht der verwendeten Organismen	11
2.1.1	Verwendete Bakterienstämme und ihre Kultivierung	11
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	11
2.1.1.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.1.2	Verwendetes Pflanzenmaterial und dessen Anzucht	12
2.1.2.1	Anzucht von <i>Populus x canescens</i> (Ait.)Sm.	12
2.1.2.2	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	13
2.1.3	Verwendete Vektoren und deren Eigenschaften	13
2.1.3.1	Klonierungsvektoren (pCRII-Topo; pCR2.1-Topo, pBlueScriptII SK)	13
2.1.3.2	Expressionsvektoren (pGS72, pQE30, pQE50, pQE60)	14
2.1.3.3	Transformationsvektoren (pBinAR, pMP90)	14
2.2	Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1	Präparation von Nukleinsäuren	15
2.2.1.1	Plasmidpräparation	15
2.2.1.2	DNA-Extraktion aus <i>A. thaliana</i>	18
2.2.1.3	RNA-Extraktion aus Blättern und Protoplasten von <i>A. thaliana</i>	18
2.2.1.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	19
2.2.1.5	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	19
2.2.2	Polymeraseketten-Reaktion zur DNA-Amplifikation	20
2.2.2.1	Primerdesign	20
2.2.2.2	Reaktionsansätze und Temperaturprogramme	22

---

2.2.3	Klonierung und Umklonierung	23
2.2.3.1	TOPO TA Cloning Kit	23
2.2.3.2	Restriktion	24
2.2.3.3	Reinigung und Ligation der DNA	25
2.2.4	Transformation von Bakterien	25
2.2.4.1	Chemische Behandlung von <i>E. coli</i> TG1 mit CaCl <sub>2</sub> und Transformation	25
2.2.4.2	Elektroporation und Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	26
2.2.4.3	Selektion transgener Klone	26
2.2.5	DNA-Sequenzierung	27
2.2.5.1	„Cycle sequencing“ mit Farbstoff-markierten Terminatoren	27
2.2.5.2	Kapillarelektrophorese und Analyse der Sequenzdaten	29
2.2.6	Transformation von <i>A. thaliana</i>	29
2.2.6.1	„Floral Dip“-Technik	29
2.2.6.2	Selektion transgener <i>A. thaliana</i> -Linien	30
2.2.7	Herstellung und Transformation von Protoplasten aus <i>A. thaliana</i> -Blättern	33
2.2.7.1	Herstellen von Protoplasten aus <i>A. thaliana</i> -Blättern	32
2.2.7.2	Transiente Transformation der Protoplasten	33
2.2.8	Quantitative PCR mit reverser Transkriptase	33
2.2.8.1	Umschreiben der mRNA in cDNA mit reverser Transkriptase	33
2.2.8.2	Quantitative PCR mit SYBR Green	34
2.3	Proteinbiochemische Methoden	36
2.3.1	Herstellung von Proteinextrakten	36
2.3.1.1	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	36
2.3.1.2	Reinigung His-Tag-markierter Isoprensynthase über Affinitätschromatographie	36
2.3.1.3	Zellaufschluss von Blättern	37
2.3.1.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.3.2	Messung der Isoprensynthaseaktivität	38

---

2.3.2.1	Synthese von DMADP	38
2.3.2.2	Standardenzymtest der Isoprensynthase	40
2.3.2.3	Nachweis von Isopren über gaschromatographische „head space“ Analyse	40
2.3.2.4	Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Isoprensynthase mittels Gelfiltration über Superdex 200 HR 10/30	42
2.3.3	Bestimmung des DMADP-Gehalts in Blättern von <i>A. thaliana</i>	43
2.4	Versuchsaufbau zur Messung der Isoprenemission von transgenen <i>E. coli</i> - Kulturen und <i>A. thaliana</i>	46
2.4.1	<i>In vivo</i> Nachweis der Isoprenbildung transgener <i>E. coli</i>	46
2.4.2	Messung der Isopren- und Monoterpenemission von <i>A. thaliana</i>	46
2.4.2.1	Küvettenaufbau	46
2.4.2.2	Quantifizierung der Isopren- und Monoterpenemission von <i>A. thaliana</i> am GC-MS	48
2.5	Verwendete Kits und Bioreagenzien	49
2.6	Verwendete Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Herstellen von Derivaten des <i>ispS</i> -Gens	53
3.1.1	Markierung der vollständigen ISPS mit einem C-terminalen HA-Epitop	54
3.1.2	Markierung der vollständigen ISPS mit einem C-terminalen His-Tag	55
3.2	Funktionsnachweis der rekombinanten <i>ispS</i> -Derivate	57
3.2.1	Klonierung des funktionellen Gens der ISPS in Expressionsvektoren	57
3.2.2	<i>In vivo</i> -Nachweis von Isopren aus transgenen <i>E. coli</i> -Kulturen	58
3.3	Vergleich der biochemischen Eigenschaften rekombinanter und nativer ISPS	60
3.3.1	Zeitabhängigkeit der Enzymaktivität heterolog exprimierter ISPS	60
3.3.2	Substratabhängigkeit	62
3.3.3	pH-Abhängigkeit	67
3.3.4	Temperaturabhängigkeit	69
3.3.5	Natives Molekulargewicht der ISPS	72
3.3.6	Zusammenfassende Tabelle der biochemischen Eigenschaften	73

---

3.4	Transformation von <i>A. thaliana</i>	74
3.4.1	Nachweis der erfolgreichen Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
3.4.2	Selektion transgener <i>A. thaliana</i> -Linien über Kanamycinresistenz	76
3.4.3	Genomischer Nachweis der Insertion des Resistenz- und des <i>ispS</i> -Gens	77
3.4.3.1	Nachweis über PCR	78
3.4.3.2	Überprüfung der in <i>A. thaliana</i> inserierten Gensequenz der <i>ispS</i>	79
3.4.4	Nachweis der Genexpression der <i>ispS</i> und der Isoprenemission transgener <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	81
3.4.4.1	Qualitativer Nachweis der <i>ispS</i> -mRNA über PCR	82
3.4.4.2	Nachweis der Isoprenemission transgener <i>A. thaliana</i> -Linien	82
3.4.4.3	Bestimmung der mRNA-Kopien der <i>ispS</i> in transgenen Linien	86
3.4.5	Nachweis der ISPS-Aktivität in Blattextrakten transgener <i>A. thaliana</i> -Linien	89
3.4.6	Transiente Genexpression der <i>ispS</i> in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten	89
3.4.7	Der DMADP-Gehalt von <i>A. thaliana</i> -Blättern	91
4	Diskussion	93
4.1	MEP-Stoffwechsel und DMADP-Gehalt als Voraussetzung zur Expression des <i>ispS</i> -Gens in <i>A. thaliana</i>	93
4.2	Funktionsfähigkeit des <i>ispS</i> -Genkonstruktes	97
4.3	Höhe der Expression des <i>ispS</i> -Gens in <i>A. thaliana</i>	99
4.4	Biochemische Eigenschaften der Isoprensynthase und ihrer Derivate	100
4.5	Ausblick	103

5	Literaturverzeichnis	107
6	Anhang	119
6.1	Verzeichnis der Abbildungen	119
6.2	Verzeichnis der Tabellen	120
6.3	Abkürzungsverzeichnis	120





# 1 Einleitung

## 1.1 Isoprenemission von Pflanzen und ihre Bedeutung für die Atmosphärenchemie

Organismen tauschen eine Vielzahl von Gasen mit der Atmosphäre aus. Neben den Hauptkomponenten  $\text{CO}_2$  und Wasserdampf sind dies Tausende von Spurengasen, die von Organismen in die Atmosphäre abgegeben werden. Isopren gehört zu diesen biogenen flüchtigen Kohlenwasserstoffen (BVOC, biogenic volatile organic compounds). Zusammen mit anthropogen emittierten chemischen Substanzen spielen die BVOC eine große Rolle in der Atmosphärenchemie. Aufgrund ihrer Reaktivität unterliegen diese Verbindungen in der Atmosphäre einer Vielzahl von Reaktionen, insbesondere im Sonnenlicht (ATKINSON 1990). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Reaktionen mit Sauerstoffverbindungen wie Ozon, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale (THOMPSON 1992). In Verbindung mit Stickoxiden tragen VOC (volatile organic compounds) zur Bildung von Ozon bei, was vor allem in urbanen Gebieten mit erhöhter Stickoxid-Emission zu erhöhten Ozonkonzentrationen führen kann. Diese Reaktion kommt dann zustande, wenn die troposphärische NO-Konzentration 30-50 pptv übersteigt (HARLEY ET AL. 1999). Die Kohlenwasserstoffe reagieren mit Hydroxylradikalen, die aus der Photodissoziation des Ozons in der Troposphäre stammen, und mit Sauerstoff zu Alkylperoxyradikalen, die unter normalen Umständen mit Wasser zu Alkoholen reduziert werden, wobei wieder Hydroxylradikale entstehen. Bei hohen NO-Konzentrationen reagieren die Alkylperoxyradikale jedoch stattdessen mit NO und oxidieren dieses zu  $\text{NO}_2$ . Das  $\text{NO}_2$  reagiert unter Sonneneinstrahlung mit Sauerstoff und bildet Ozon (MA & VAN WEELE 2000). Die BVOC spielen dabei eine entscheidende Rolle, da sie einen hohen Anteil an ungesättigten Bindungen aufweisen und deshalb leichter reagieren als Kohlenwasserstoffe anthropogenen Ursprungs (CHAMEIDES ET AL. 1988). Global gesehen übertrifft die Emission aus biogenen Quellen die von Menschen verursachte Emission flüchtiger Kohlenwasserstoffe um ein Vielfaches (GUENTHER ET AL. 1995, STEINBRECHER & ZIEGLER 1997). Gegenwärtige Schätzungen (FALL 1999) gehen von mehreren Tausend Verbindungen aus, die in die Atmosphäre abgegeben werden. Die mengenmäßig bedeutendsten Verbindungen dabei sind Methan, Isopren und Monoterpene. Weitere Verbindungen, die in großen Mengen in die Atmosphäre abgegeben werden, sind höhere Isoprenoide, wie Sesquiterpene, des Weiteren Alkohole, Aldehyde, Ketone, Furane und Dimethylsulfid. Momentane mit einer sehr großen Unsicherheit behaftete globale Schätzungen gehen von einer jährlichen Emission von Methan und Isopren von jeweils 175-503 Mt C pro Jahr (GUENTHER ET AL. 1995) sowie von 127-480 Mt C pro Jahr an

Monoterpenen aus. Die Menge der oxygenierten Verbindungen wird auf etwa die gleiche Größenordnung geschätzt. Isopren hat damit einen nicht unbedeutenden Anteil an der Gesamtemission. Durch die Konkurrenz mit Methan um Hydroxylradikale erhöht sich zusätzlich zur Ozonbildung mit Stickoxiden die Verweildauer dieses zur globalen Erwärmung beitragenden Gases in der Atmosphäre. Außerdem wird ein Großteil der Deposition von organischen Säuren (O'BRIEN ET AL. 1995) und des Säuregehalts im Regen in ländlichen Regionen den organischen Säuren zugeschrieben, die bei der Oxidation von BVOC, insbesondere von Isopren, entstanden sind (KEENE ET AL. 1983, ANDREAE ET AL. 1988).

Der Großteil der BVOC wird von Landpflanzen emittiert (KESSELMEIER UND STAUDT 1999). Eine Ausnahme davon ist die biogene Emission von Methan, welches mikrobiellen Ursprungs ist und im Wesentlichen Feuchtgebieten und Ozeanen entstammt (FALL 1999). Dass Isopren von Pflanzen emittiert wird, wurde in den fünfziger Jahren durch Sanadze entdeckt (SANADZE 1957), was 1970 von RASMUSSEN bestätigt wurde. Seither konnten bei verschiedensten Organismengruppen quer durch die belebte Welt, wie zum Beispiel bei Farnen (TINGEY ET AL. 1987) und Moosen (HANSON ET AL. 1999), Isoprenemissionen unterschiedlichster Intensität festgestellt werden. Die bedeutendsten Isopren emittierenden Arten sind jedoch unter den Bäumen zu finden. Sie gehören dabei den unterschiedlichsten Familien an, wobei innerhalb einer Familie oder Gattung Isoprenemitter und Nichtemitter auftreten können (HARLEY ET AL. 1998, KESSELMEIER & STAUDT 1999, FALL 1999). Als bedeutende mitteleuropäische Isoprenemitter sind Vertreter der *Fagaceen* (Buchengewächse), vor allem der Gattung *Quercus* (Eiche) zu nennen, und ebenso unter den *Salicaceen* (Weidengewächse) die Gattungen *Populus* (Pappel) und *Salix* (Weide). Außerdem zählen zu den Isoprenemittern die Familie *Arecaceae* (Pappelgewächse), die Familie *Hamamelidaceae* (Zaubernussgewächse) mit der Gattung *Liquidamber* (Amberbaum), die *Platanaceae* (Platanengewächse) mit der Gattung *Platanus* (Platane) und die *Myrtaceae* (Myrtengewächse), zu denen z. B. die Gattung *Eucalyptus* gehört.

Die ebenfalls zu der Gruppe der Isoprenoide gehörenden Monoterpene werden im wesentlichen von Koniferen und einigen anderen Baumarten, wie z.B. Eichen und Citrusgewächsen, sowie von vielen krautigen Pflanzen z.B. aus der Familie der Lippenblütler (*Lamiaceae*) freigesetzt (FALL 1999).

## 1.2 Plastidäre Isoprenoidbiosynthese – Der MEP-Stoffwechsel

Isopren gehört zur Gruppe der Terpene oder Isoprenoide, die sich alle aus dem C<sub>5</sub>-Grundgerüst des Isopentenyl-diphosphat [IDP] beziehungsweise seines Isomers Dimethylallyl-diphosphat [DMADP] zusammensetzen. Über Kondensation dieser C<sub>5</sub>-Körper

entstehen Mono-(C<sub>10</sub>), Sesqui-(C<sub>15</sub>), Di-(C<sub>20</sub>), Tri-(C<sub>30</sub>) und Tetraterpene(C<sub>40</sub>). Terpene, die aus mehr als 40 Kohlenstoffatomen bestehen, werden als Polyterpene bezeichnet. Isopren besteht aus nur einem C<sub>5</sub>-Körper und wird als Hemiterpen bezeichnet. Bisher sind ca. 22000 zur Stoffgruppe der Isoprenoide gehörende Verbindungen bekannt (MCGARVEY & CROTEAU 1995). Sie spielen eine Rolle als Elektronenüberträger (Chinone), Photosynthesepigmente (Carotinoide, Phytolrest des Chlorophyll), Membranbausteine (Cholesterin), Phytohormone (Gibberelline), Phytoalexine (Capsidiol) und Lockstoffe (Linalool).

Die Vorläufersubstanz IDP und ihr Isomer DMADP können über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege gebildet werden. Neben dem seit mehreren Jahrzehnten bekannten Acetat-Mevalonat-Stoffwechsel, der in Tieren und Hefen nachgewiesen wurde und bei dem die Synthese des IDP über Acetyl-CoA und Mevalonat erfolgt, wurde 1993 ein neuer Mevalonat-unabhängiger Stoffwechselweg in Eubakterien entdeckt (ROHMER ET AL. 1993), der 1996 auch in Algen (SCHWENDER ET AL. 1996) und 1997 in höheren Pflanzen (LICHTENTHALER ET AL. 1997) nachgewiesen wurde. Dieser Isoprenoidbiosyntheseweg wurde nach dem dabei entstehenden Zwischenprodukt 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat als MEP-Stoffwechsel benannt. Inzwischen weiß man, dass manche Organismen, wie Tiere, Pilze und Archebakterien, ausschließlich den klassischen Acetat-Mevalonat-Stoffwechsel besitzen (LANGE ET AL. 2000) und andere, wie Algen und viele Eubakterien, nur den MEP-Stoffwechsel (DISCH ET AL. 1998A), während Pflanzen über beide Wege verfügen, jedoch örtlich getrennt (LICHTENTHALER ET AL. 1997, LICHTENTHALER 1998): Der Acetat-Mevalonat-Stoffwechsel findet ausschließlich im Cytosol statt, der MEP-Stoffwechsel im Chloroplast und in Chromoplasten (FELLERMEIER ET AL. 2003). ADAM & ZAPP (1998) vermuten jedoch einen Austausch des Produktes IDP zwischen Cytosol und Plastid. LORETO ET AL. (2004) kommen dagegen zu dem Ergebnis, dass keine Verbindung zwischen den beiden Stoffwechselwegen besteht.

So werden über den cytosolischen Acetat-Mevalonat-Weg nach ADAM & ZAPP (1998) und BOHLMANN ET AL. (1998) Sesquiterpene und die doppelt so großen Triterpene gebildet, außerdem Sterole (DISCH ET AL. 1998B). Die Hemiterpene, Mono- (ADAM & ZAPP 1998), Di- (BOHLMANN ET AL. 1998) und Tetraterpene (ARIGONI ET AL. 1997) entstehen dagegen im Chloroplast. Da Isopren als Hemiterpen im Chloroplast gebildet wird, ist der für diesen Zusammenhang interessante Stoffwechselweg zur Synthese von IDP und DMADP der MEP-Stoffwechselweg.

In diesem Stoffwechsel wird zuerst über eine Decarboxylierungsreaktion aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat [GAP] Deoxy-D-xylulose-5-phosphat [DOXP] gebildet. Das GAP stammt direkt aus dem im Chloroplast ablaufenden Calvin-Zyklus. Die Herkunft des Pyruvat ist unklar, neuere Untersuchungen (ROSENSTIEL ET AL. 2004) gehen aber davon aus, dass ein großer Teil davon cytosolischen Ursprungs ist und als Phosphoenolpyruvat [PEP] über

einen PEP-Translokator (FLÜGGE 1999) in den Chloroplast importiert wird. Nach dem ersten Zwischenprodukt DOXP wird der MEP-Stoffwechsel auch oft als DOXP-Pfad bezeichnet. Die Reaktion wird durch die Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase [DXS] katalysiert. Die erste Gensequenz, die damit in Zusammenhang steht, wurde 1996 von MANDEL ET AL. aus *Arabidopsis thaliana* L. kloniert, ohne damals die genauere Funktion als Transketolase des im Chloroplast lokalisierten Enzyms, das als CLA1 bezeichnet wurde, zu erkennen. Doch eine Zerstörung der Gensequenz resultierte in einem Albino-Phenotyp. Später wurde die Ähnlichkeit der Gensequenz mit Sequenzen festgestellt, die von LANGE ET AL. 1998, BOUVIER ET AL. 1998 und ESTEVEZ ET AL. 2001 ebenfalls aus höheren Pflanzen kloniert wurden und deren Transkripte eine eindeutige DXS-Aktivität zeigten. In *E. coli* wurde das Gen für die DXS 1997 von SPRENGER ET AL. und 1998 von LOIS ET AL. identifiziert, in *Chlamydomonas* 1999 von SCHWENDER ET AL., in *Synechococcus* ebenfalls 1999 von MILLER ET AL. und in *Streptomyces* 2000 von KUZUYAMA ET AL..

Im nächsten Schritt wird unter NADPH-Aufwand DOXP nach Isomerisierung zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat [MEP] reduziert, was bereits 1996 von ROHMER ET AL. vermutet wurde und 1997 von DUVOLD ET AL. bestätigt werden konnte. Das dabei beteiligte Enzym wird als Deoxyxylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase [DXR] bezeichnet, die 1999 von SCHWENDER ET AL. aus *A. thaliana* kloniert und charakterisiert wurde, ebenso wie von LANGE & CROTEAU aus *Mentha x piperita* L. (1999), von TAKAHASHI ET AL. (1998) aus *E. coli* und von MILLER ET AL. (2000) aus *Synechococcus leopoliensis*. Dies ist der Schritt im Stoffwechsel, der durch Fosmidomycin, ein Strukturanalogon zu MEP, spezifisch gehemmt werden kann (SCHWENDER ET AL. 1999, KUZUYAMA ET AL. 1998).

MEP wird anschließend zusammen mit Cytidyl-triphosphat [CTP] unter Abspaltung von zwei Phosphaten zu 4-(Cytidin 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol [CDP-ME] umgesetzt. Als CDP-ME-Synthase [CMS] fungiert ein Protein, das zuerst in *E. coli* identifiziert und als YgbP bezeichnet wurde (ROHDICH ET AL. 1999, KUZUYAMA ET AL. 2000), später auch in *Arabidopsis thaliana* L. (ROHDICH ET AL. 2000A).

CDP-ME wird weiter unter ATP-Aufwand zu seinem 2-Phosphat [CDP-ME2P] phosphoryliert. Als dafür verantwortliche CDP-ME-Kinase [CMK] konnte das Protein YchB aus *E. coli* identifiziert werden (LÜTTGEN ET AL. 2000, ROHDICH ET AL. 2000B), von dem zuvor vermutet wurde, dass es Isopentenyl-monophosphat [IMP] zu Isopentenyl-diphosphat [IDP] phosphoryliert (LANGE & CROTEAU 1999).

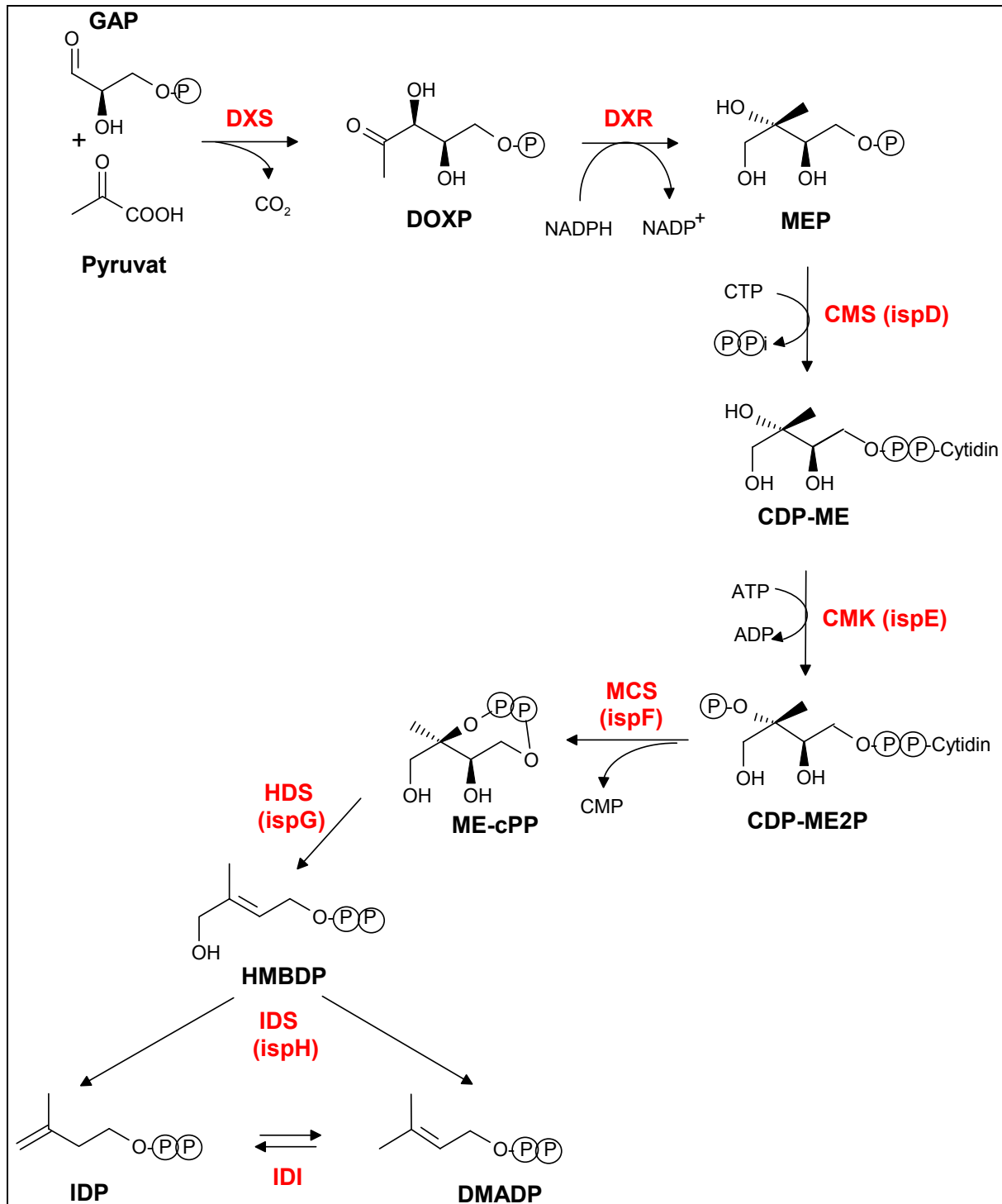
CDP-ME2P wird schließlich zu 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat [ME-cPP] umgesetzt. Als ME-cPP-Synthase wurde in *E. coli* ein Protein identifiziert, das von dem Gen *ygbB* codiert wird (HERZ ET AL. 2000) und dessen Struktur und Funktion 2002 von RICHARD ET AL. aufgeklärt werden konnte. Die Gene der für die an diesen drei aufeinander folgenden

Schritten beteiligten Enzyme werden mittlerweile als ispD, ispE und ispF bezeichnet (EISENREICH ET AL. 2001, RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT 2002) und die entsprechenden Enzyme als IspD, IspE und IspF.

Die beiden letzten Schritte des MEP-Stoffwechselweges wurden erst nach Beginn dieser Arbeit, in den Jahren 2001 und 2002 erforscht. HECHT ET AL. konnten 2001 feststellen, dass das durch das Gen *gcpE* (*ispG*) codierte Protein den nächsten Schritt, die Umwandlung von ME-cPP in 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat [HMBDP], katalysiert. Es wird als HD-Synthase bezeichnet.

Für die Katalyse des abschließenden Schrittes, der Umwandlung des HMBDP in Isopentenyl-diphosphat [IDP] und Dimethylallyl-diphosphat [DMADP] im Verhältnis 5:1 konnte von ROHDICH ET AL. (2002) und von ADAM ET AL. (2002) das Enzym LytB verantwortlich gemacht werden, das als IDP/DMADP-Synthase [IDS] bezeichnet wird.

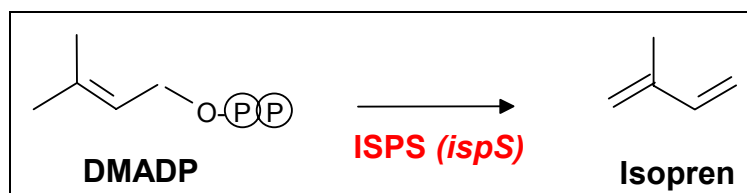
DMADP stellt die Ausgangsverbindungen für die Isoprenbiosynthese dar. Darüber hinaus dient es zusammen mit IDP als Ausgangsverbindung für die Bildung von längerkettigen Isoprenoiden im Chloroplast. Über Kopf-Schwanzkondensation wird durch eine Prenyltransferase die C<sub>10</sub>-Verbindung Geranyldiphosphat [GDP] gebildet, welches die Ausgangsverbindung für die Biosynthese der sehr großen Stoffgruppe der Monoterpene bildet. Verantwortlich dafür sind Monoterpensynthasen, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften alle sehr ähnlich sind (ALONSO & CROTEAU 1993). Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind z.B. Limonensynthase (ALONSO ET AL. 1992), Pinensynthase (LEWINSOHN ET AL. 1992) und Myrcensynthase (FISCHBACH ET AL. 2001). Über weitere Kondensationsschritte von GDP aus erfolgt die Biosynthese der Grundgerüste von Diterpenen, die z. B. aus Geranylgeranyl-diphosphat [GGDP] gebildet werden, bis hin zu den Carotinoiden (C<sub>40</sub>) und letztendlich zum Polyisopren Kautschuk.



**Abb. 1.1: Der MEP-Stoffwechselweg der Isoprenoid-Biosynthese.** Über die dargestellten enzymatisch katalysierten Reaktionsschritte wird im Chloroplasten höherer Pflanzen DMADP aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat gewonnen. DMADP dient als Ausgangssubstanz für die Biosynthese sämtlicher Isoprenoide. Abkürzungen: **GAP** Glycerinaldehyd-3-phosphat, **DOXP** Deoxy-D-xylulose-5phosphat, **MEP** 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, **CDP-ME** 4-(Cytidin 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol, **CDP-ME2P** 4-(Cytidin 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol-2-Phosphat, **ME-cPP** 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat, **HMBDP** 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat, **DXS** Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase, **DXR** Deoxyxylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, **CMS** CDP-ME-Synthase, **CMK** CDP-ME-Kinase, **MCS** ME-cPP-Synthase, **HDS** HMBDP-Synthase, **IDS** IDP/DMADP-Synthase, **IDI** IDP/DMADP-Isomerase.

### 1.3 Isoprensynthese – Das Schlüsselenzym der Isoprenbiosynthese

Dimethylallyl-diphosphat (DMADP) ist die Ausgangsverbindung für die Bildung von Isopren. Die Bildung von Isopren aus DMADP kann rein durch chemischen Zerfall erfolgen, bei dem die beiden Phosphat-Reste abgespalten werden und sich eine Doppelbindung ausbildet.



**Abb. 1.2: Die Reaktion der Isoprensynthese [ISPS].** Sie katalysiert enzymatisch die Umwandlung von DMADP in Isopren unter Abspaltung von zwei Phosphatresten und Bildung einer Doppelbindung.

Gefördert wird diese chemische Reaktion in Anwesenheit von Säure, was ursprünglich als einziger Grund für die Freisetzung von Isopren aus Chloroplasten vermutet wurde (SANADZE 1990). 1991 wurde jedoch in *Populus deltoides* (Bartr. ex Marsh.) ein Enzym nachgewiesen (SILVER & FALL), das diese Reaktion katalysiert und als Isoprensynthase [ISPS] benannt wurde. Sie wurde in den folgenden Jahren in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen und charakterisiert (KUZMA & FALL 1993, SILVER & FALL 1995, SCHNITZLER ET AL. 1996 und LEHNING ET AL. 1999). Bereits 1979 konnte die Isoprenbiosynthese in Chloroplasten der Pappel lokalisiert werden (MGALOBISHVILI ET AL.). Gleiches konnten WILDERMUTH & FALL (1998) für die ISPS der Weide *Salix discolor* feststellen. Darüber hinaus vermuten WILDERMUTH & FALL, dass die ISPS im Chloroplast sowohl an die Thylakoidmembran gebunden als auch ungebunden in gelöster Form im Stroma vorkommt. Für die aus Pflanzenextrakten isolierten ISPS beschreiben alle Autoren ähnliche biochemische Eigenschaften, ein pH-Optimum im alkalischen Bereich, das Benötigen von  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  als Cofaktor und einen relativ hohen apparenten  $K_m$ -Wert für DMADP im millimolaren Bereich. Die erste Isolierung der DNA-Sequenz einer ISPS gelang MILLER ET AL. (2001) aus der Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.)Sm.). Eine biochemische Charakterisierung des daraus resultierenden Enzyms wurde bis jetzt noch nicht durchgeführt.

Die Isolierung des Gens zeigt seine Eingruppierung in die Multigenfamilie der Terpensynthasen (MILLER 2001) und weist dort die höchste Homologie zur Untergruppe *Tps-b* (BOHLMANN ET AL. 1998) auf, welche auch die Gene von Monoterpensynthasen aus dicotylen Pflanzen umfasst. MILLER (2001) konnte feststellen, dass das Isoprensynthasegen eine hohe Ähnlichkeit mit den bekannten Monoterpensynthasen aufweist und ebenso das

potentielle DDXXD-Mg<sup>2+</sup>-Bindungsmotiv (BOHLMANN ET AL. 1998) und das RR-Motiv im Anschluss an die Transitpeptidsequenz besitzt. Diese beiden Motive sind auch bei nahezu allen im Genom von *Arabidopsis thaliana* enthaltenen putativen Terpensynthasen (AUBOURG ET AL. 2002) vorhanden.

## 1.4 Physiologische Funktion der Isoprenbildung bei Pflanzen

Die Isoprenemission wird durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren beeinflusst, wobei schon sehr früh gezeigt werden konnte (SANADZE 1957, SANADZE & KALANDADZE 1966, SANADZE & KURSANOV 1966, TINGEY ET AL. 1979, MONSON & FALL 1989, SHARKEY & LORETO 1993), dass auf der kurzfristigen Skala von Sekunden bis Minuten Temperatur und Lichtintensität die wesentlichen Kontrollfaktoren darstellen, während längerfristige entwicklungsphysiologische und prädisponierende Einflüsse wie z.B. Nährstoffversorgung (MONSON ET AL. 1994, ROSENSTIEL ET AL. 2004) oder erhöhtes atmosphärisches CO<sub>2</sub> (TOGNETTI ET AL. 1998, SHARKEY ET AL. 1991A, 1991B, ROSENSTIEL ET AL. 2002) sich auf die Höhe der ISPS-Aktivität auswirken und Einfluss auf die basale Emissionskapazität nehmen können. Sehr früh wurde deutlich, dass die Isoprenbiosynthese eng an die Photosynthese gekoppelt ist. Fütterungsversuche mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> zeigten, dass innerhalb von wenigen Minuten ca. 80 % des emittierten Isoprens mit <sup>13</sup>C markiert wurde (SANADZE ET AL. 1972; SCHNITZLER ET AL. 2004A). Der hierdurch verursachte Verlust an assimiliertem Kohlenstoff liegt bei Temperaturen von 25-35°C in der Größenordnung von ca. 0,5-2 % (TINGEY ET AL. 1979, MONSON & FALL 1989, LORETO & SHARKEY 1990), kann aber bei höheren Temperaturen bis ca. 45°C, unter welchen die Photosynthese stark eingeschränkt ist, auf 20-24 % (SHARKEY & LORETO 1993, PÊNUELAS & LLUSIA 2003) ansteigen.

Obwohl es also einen nicht unbedeutenden Verlust von Kohlenstoff bedeutet, emittieren verschiedenste Arten Isopren, ohne dass dafür ein phylogenetischer Zusammenhang besteht. Deshalb stellt sich die Frage, welchen Nutzen die Pflanzen daraus ziehen. Bereits 1993 stellten SHARKEY & LORETO fest, dass die Isoprenbildung und -emission ab einer Temperatur von 30°C sprunghaft ansteigt. 1995 postulierten SHARKEY & SINGSAAS und 1997 SINGSAAS ET AL., dass Isopren in der Lage ist, den Photosyntheseapparat im Blatt bei hohen Blatttemperaturen vor Schädigungen zu schützen. Während LOGAN & MONSON (1999) und LOGAN ET AL. (2000) dieser Vermutung aufgrund ihrer Ergebnisse bei Begasungsexperimenten widersprachen, wurde sie von SINGSAAS & SHARKEY im Jahre 2000 bekräftigt, als sie beobachteten, dass sich der Photosyntheseapparat von nicht Isopren emittierenden Pflanzen, die, während sie kurzen Hitzeperioden ausgesetzt waren, extern mit Isopren begast wurden, schneller erholte als der von Vergleichspflanzen ohne Begasung.



Zusätzlich wurden Isopren emittierende Pflanzen während eines solchen Hitzeschocks mit Fosmidomycin begast, das als Struktur analogon zu DOXP den plastidären MEP-Stoffwechsel spezifisch hemmt (SCHWENDER ET AL. 1999, KUZUYAMA ET AL. 1998), mit dem Ergebnis, dass sich dabei der Photosyntheseapparat schlechter erholte, als bei Vergleichspflanzen ohne Begasung (SHARKEY ET AL. 2001). Worauf dieser Schutz des Photosyntheseapparates beruht, ist jedoch noch nicht geklärt. Dafür stehen momentan unterschiedliche Erklärungsansätze im Raum. SHARKEY & YEH (2001) vermuten ebenso wie SINGSAAS ET AL. (1997) durch die Einlagerung des lipophilen Isoprens in die Membran eine Erhöhung der Membranfluidität, während LORETO ET AL. (2001), LORETO & VELIKOVA (2001) und AFFEK & YAKIR (2002) davon ausgehen, dass das Isopren als Radikalfänger die Denaturierung der Membranlipide, verursacht durch oxidativen Stress, verhindert oder abschwächt. Außerdem könnte die Emission von Isoprenoiden ein Ventil für überschüssige Reduktionsäquivalente darstellen, die durch eine erhöhte Photosyntheseaktivität bei erhöhtem Lichtangebot anfallen (PÊNUELAS & LLUSIA 2003). Eine eindeutige Klärung der Bedeutung der Isoprenemission für die Pflanze steht jedoch noch aus.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, der Aufklärung der Funktion der Isoprenemission von Pflanzen ein Stück näher zu kommen. Die grundlegende Idee hierzu war, Pflanzen derselben Art zur Verfügung zu haben, die sich lediglich darin unterscheiden, Isopren emittieren zu können oder nicht, um diese unter Stressbedingungen vergleichen zu können. Deshalb sollte eine ursprünglich nicht Isopren emittierende Art mit dem Isoprensynthasegen (*ispS*), das von MILLER ET AL. (2001) aus der Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.)Sm.) isoliert werden konnte, transformiert und damit zur Isoprenbildung und -emission befähigt werden.

Eine Aufgabe in der vorliegenden Arbeit war es daher, einen binären Vektor herzustellen, der das Gen der ISPS aus der Pappel enthält und zur Transformation von Pflanzen verwendet werden kann.

Zusätzlich sollte die heterolog exprimierte ISPS so markiert werden, dass sie leicht nachzuweisen und aufzureinigen ist und bei Expression in einer Pflanze, die bereits eine ISPS besitzt, oder bei Überexpression des Gens in der Mutterpflanze Pappel selbst von der ursprünglichen ISPS unterschieden werden kann. Dazu eignet sich der Einbau der Sequenz eines Epitops am Ende der codierenden Region für die ISPS, vor dem Polyadenylierungssignal.

Nach der Veränderung des Gens sollte es in einem einfacheren und schneller zu transformierenden System, als es die Pflanze darstellt, auf seine Funktionsfähigkeit hin

überprüft werden. Hierzu eignet sich das Bakterium *Escherichia coli*, in dem die ISPS heterolog exprimiert werden kann. Für diesen funktionellen Nachweis musste eine für Bakterien geeignete Form des markierten Gens ohne Sequenz für das Transitpeptid, das in der Pflanze das Eindringen in den Chloroplast ermöglicht, im Bakterium aber überflüssig ist und womöglich nur stört, und ohne Polyadenylierungssignal, das es in Bakterien nicht gibt, bereitgestellt werden.

Nach erfolgreichem Funktionstest in Bakterien sollte im Rahmen dieser Arbeit das veränderte Enzym im Vergleich zur unveränderten ISPS biochemisch charakterisiert werden.

Schließlich sollte *Arabidopsis thaliana* L. mit dem Isoprensynthasegen-Derivat stabil transformiert werden.

*A. thaliana* gehört zu den Brassicaceen und stellt aufgrund ihres mittlerweile vollständig bekannten Genoms, ihrer schnellen Kultivierbarkeit und leichten Transformierbarkeit eines der wichtigsten Modellsysteme für pflanzenphysiologische und molekularbiologische Untersuchungen dar. Wie alle krautigen Pflanzen emittiert *A. thaliana* kein oder eine nur an der Nachweisgrenze liegende Menge Isopren. Jedoch ist *A. thaliana* in der Lage, geringe Mengen an Monoterpenen aus Blättern, Wurzeln und Blüten zu emittieren. Bioinformatische Untersuchungen des *A. thaliana*-Genoms zeigten überraschender Weise das Vorhandensein von 32 Genen (AUBOURG ET AL. 2002), welche der Multigenfamilie der Terpensynthasen *Tps-a* bis *Tps-c* und *Tps-e* und *-f* zugeordnet werden konnten. Mittlerweile konnten von diesen putativen Genen vier isoliert und in ihrer Funktion aufgeklärt werden (SUN ET AL. 1994, YAMAGUCHI ET AL. 1998, BOHLMANN ET AL. 2000, FÄLDT ET AL. 2003, CHEN ET AL. 2004).

Homologievergleiche des isolierten *ispS*-Gens aus der Graupappel (*Populus x canescens*) mit den bekannten Gensequenzen der *Tps*-Genfamilie aus *A. thaliana* ergaben zudem keinen Hinweis auf das Vorhandensein einer Isoprensynthase.

Somit stellt *A. thaliana* eine ideale Versuchspflanze dar, die von sich aus kein Isopren emittiert und deshalb im Vergleich mit transgenen Isopren emittierenden Linien in Zukunft für Studien zur Aufklärung der blattinternen physiologischen Funktion von Isopren genutzt werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Herkunft und Anzucht der verwendeten Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl mit Pflanzen als auch mit Bakterien gearbeitet, die im Folgenden kurz beschrieben werden. Hinzu kommen noch verwendete Vektoren, die als bakterielle Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA) auch in diesem Kapitel behandelt werden.

#### 2.1.1 Verwendete Bakterienstämme und ihre Kultivierung

Es wurden zwei verschiedene Bakterienarten verwendet, zum einen *Escherichia coli*, die der Aufbewahrung und Vermehrung von DNA-Fragmenten diente und der heterologen Expression der *ispS*-Derivate und zum anderen *Agrobacterium tumefaciens*, das zur Übertragung von DNA auf *Arabidopsis thaliana* (L.) benutzt wurde. Beide Arten wurden auf bzw. in Luria-Bertani-Medium (LB) angezogen. Zur Lagerung der Kulturen wurde je 1 ml frischer Flüssigkultur mit 1 ml Glycerin vermischt und auf -80°C tiefgefroren. Bei Bedarf wurden die Bakterien mit 13 Strichen auf LB-Platten (ggf. unter Antibiotikaselektion) ausgestrichen und davon eine Kolonie verwendet.

LB-Medium nach SAMBROOK ET AL. (1989): 10g Pepton aus Casein  
 10g NaCl  
 5g Hefeextrakt  
 (15g Agar-Agar)  
 1l Wasser bidest., autoklavieren

##### 2.1.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Alle *E. coli*-Stämme wurden für 16 Stunden bei 37°C kultiviert, Flüssigkulturen im Rotationsschüttler (Certomat BS-T, Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen, Deutschland) bei ca. 120 Upm (Umdrehungen pro Minute).

10F': F' {*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74*  
*recA1 deoR araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*  
 (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande)

TG1: *supE hsdΔ5 thi*Δ(*lac-proAB*) F'[*traD36 proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> *lacZ*ΔM15]  
 (Prof. Dr. C. Elmerich, Institut Pasteur, Paris)

XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lac<sup>q</sup>ZΔM15*  
Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]<sup>c</sup>  
(Prof. Dr. Rüdiger Hell, Institut für Pflanzenwissenschaften, Heidelberg)

### 2.1.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* wurde für mindestens 40 Stunden bei höchstens 28°C angezogen, Flüssigkulturen ebenfalls im Rotationsschüttler bei 120 Upm. Dem Medium wurde zusätzlich Rifampicin zugesetzt, da dieser Stamm eine interchromosomale Resistenz dagegen besitzt, und außerdem Gentamicin, da der Stamm ein Helferplasmid mit dieser Resistenz trägt (HELLENS ET AL. 2000).

C58C1 pMP90: Stamm C58C1, T-DNA<sup>-</sup>, *vir*<sup>+</sup> der Nopalingruppe, *rif*<sup>r</sup>,  
enthält Helferplasmid pMP90, *gen*<sup>r</sup>  
(Prof. Dr. Rüdiger Hell, Institut für Pflanzenwissenschaften, Heidelberg)

## 2.1.2 Verwendetes Pflanzenmaterial und dessen Anzucht

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Pflanzenarten verwendet. Aus der Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.)Sm.), aus der das Isoprensynthase-Gen (*ispS*) erstmalig isoliert wurde (MILLER ET AL. 2001), wurde die native Isoprensynthase (ISPS) zu deren Charakterisierung isoliert. *Arabidopsis thaliana* L. (Gemeine Ackerschmalwand) wurde, als nicht Isopren emittierende Art, mit der cDNA der *ispS* der Graupappel transformiert.

### 2.1.2.1 Anzucht von *Populus x canescens* (Ait.)Sm.

Die für proteinbiochemische Untersuchungen als Vergleich benötigte native ISPS wurde aus Blättern der Graupappel gewonnen. Die Pappeln wurden von Herrn Professor Dr. Heinz Rennenberg vom Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg zur Verfügung gestellt und im Gewächshaus des Instituts für Meteorologie und Klimaforschung (IMK-IFU) in Garmisch-Partenkirchen auf einem Substratgemisch aus 25 % Anzuchterde, 25 % Quarzsand und 50 % Perlit kultiviert und wöchentlich gegossen. Die Düngung erfolgte jeweils im Frühjahr mit Osmocote Langzeitdünger gemäß Herstellerangaben.

### 2.1.2.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* L.

Zur Transformation wurde *Arabidopsis thaliana* L. des Ökotyps Columbia-0 angezogen. Dazu wurde als Substrat Tonerde (acht Teile mit je einem Teil Sand (0,1-1,2 mm Korngröße) und Vermiculit vermischt) verwendet. Darauf wurden die Wild-Typ-Samen ausgebracht und für vier Tage bei 4°C stratifiziert. Danach wurden sie in kleinen Gewächshäuschen bei 19-21°C einer photosynthetischen Photonenflussdichte (PPFD) von ca. 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden ausgesetzt. Sie wurden regelmäßig einmal pro Woche mit handelsüblichem Blumendünger nach Herstellerangaben gedüngt und nach ca. 4 Wochen jeweils 1 bis 2 Pflanzen pro Topf pikiert. Bereits aufkommende Infloreszenzen wurden abgeschnitten, um kräftigere Rosetten und die Ausbildung mehrerer Triebe gleichzeitig zu fördern. Nach weiteren 2 bis 3 Wochen konnten die Pflanzen mit ca. 2 bis 6 cm langen Infloreszenzen zur Transformation verwendet werden.

### 2.1.3 Verwendete Vektoren und deren Eigenschaften

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vektoren zu drei unterschiedlichen Zwecken verwendet. Zur reinen Aufbewahrung und Vermehrung von Gensequenzen eignen sich Klonierungsvektoren, die vom Bakterium bei jeder Teilung vervielfältigt und an die Tochterzellen weitergegeben werden. Sollte das Gen hingegen abgelesen und ein Genprodukt produziert werden, wurden Expressionsvektoren verwendet. Die Infektion der *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte über einen binären Transformationsvektor.

#### 2.1.3.1 Klonierungsvektoren (pCRII-Topo; pCR2.1-Topo, pBlueScriptII SK)

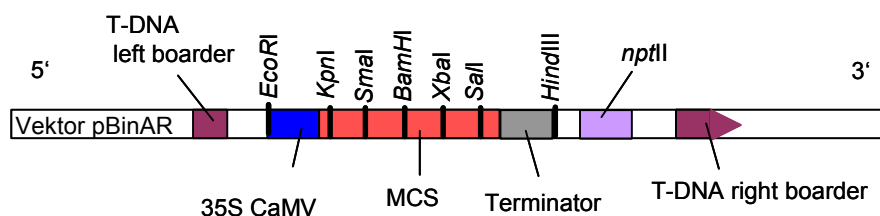
Zur Einklonierung von DNA-Fragmenten, die über PCR (polymerase chain reaction) gewonnen wurden, wurden die Vektoren pCR2.1 und pCRII der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Beide wurden als Topo-Vektoren verwendet, die in linearisierter Form vorliegen und an den beiden überhängenden 3'-Thymidinen mit einer Topoisomerase gekoppelt sind. Dies ermöglicht eine einfache Ligation des mit überhängenden 3'-Deoxyadenosinen versehenen PCR-Fragments. Beide Vektoren sind 3,9 kBp groß und besitzen sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen und ein *lac*-Operon, das durch Einklonierung eines PCR-Fragmentes unterbrochen wird und nicht mehr funktionell exprimiert werden kann. Zur Umklonierung der Gensequenzen, meist um für weitere Klonierungsschritte besser geeignete Schnittstellen zu gewinnen, wurde auch der Vektor pBluescriptII SK (pBS) verwendet, mit einer Größe von 2,9 kBp und einem Ampicillin-Resistenzgen.

### 2.1.3.2 Expressionsvektoren (pGS72, pQE30, pQE50, pQE60)

Zur Expression von Genen wurde die entsprechende cDNA in die Vektoren pQE30, 50 und 60 der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) umkloniert. Sie besitzen ein ColE1 Replicon, ein Ampicillin-Resistenzgen und sind 3,4 kBp groß. pQE 30 und 60 haben zusätzlich eine Sequenz, die für sechs aufeinanderfolgende Histidine (His-Tag) codiert, pQE30 unmittelbar vor der multiplen Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) (N-terminales Ende des Proteins), pQE60 direkt im Anschluss daran (C-terminales Ende des Proteins). Ein weiterer Expressionsvektor ist pGS72 (SELVARAJ & IYER 1985), der 13 kBp groß ist und ein Tetracyclin-Resistenzgen besitzt.

### 2.1.3.3 Transformationsvektoren (pBinAR, pMP90)

Der Transformationsvektor pBinAR (Abb. 2.1) ist ein binärer Vektor von 12,5 kBp, der mit Hilfe eines Helferplasmids (pMP90) DNA auf Pflanzen überträgt. Es wird der Teil des Vektors (T-DNA) übertragen, der sich zwischen der sogenannten „left“ und „right border“ des Vektors befindet. Bei pBinAR befindet sich dort ein pflanzliches Kanamycin-Resistenzgen und im Anschluss an einen 35S-Promotor eine MCS, in die das Gen, das auf die Pflanze übertragen werden soll, inkloniert wird. Das Helfer-Plasmid pMP90 trägt neben einem Gentamicin-Resistenzgen die zum Transfer der T-DNA notwendigen *vir*-Gene.



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Transformationsvektors pBinAR.** Dargestellt ist der Ausschnitt der T-DNA zwischen „left“ und „right border“, der bei Infektion auf die Pflanze mit der „right border“ voran übertragen wird. 35S CaMV: Promotor, MCS: Multiple Cloning Site, *nptII*: Kanamycinresistenz

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden alle Materialien und Lösungen für 20 Minuten bei 1,2 bar und 120°C in einem Dampfsterilisator (Vapoclav Typ 500, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland) autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklavierbar sind, wurden mit Hilfe von Spritzenfiltern (0,22 µm, Zellulosemischester, Fa. Roth, Karlsruhe,

Deutschland) sterilfiltriert. Außerdem wurde nur doppelt ionisiertes Wasser aus der Millipore-Anlage (Milli-Q Water System, Millipore S.A., Bredford, USA) verwendet.

## 2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

Je nach Art von Nukleinsäure, Organismus und erforderlichem Reinheitsgrad wurden unterschiedliche Präparationsmethoden angewendet.

### 2.2.1.1 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte überwiegend nach der Methode von BIRNBOIM & DOLY (1979) („Minipräparation“). Dabei wurden 1,5 ml einer 5 ml-Übernacht-Kultur der Plasmid tragenden Bakterien 2 Minuten bei 22000 x *g* zentrifugiert (Tischzentrifuge Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 100 µl BD1-Lösung resuspendiert, die Zellen wurden während der anschließenden 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur osmotisch und enzymatisch aufgeschlossen. Durch Zugabe von 200 µl BD2 und eine weitere Inkubation von 5 Minuten auf Eis erfolgte ein alkalischer Zellaufschluss. Die daraus resultierenden Zellbruchstücke und die freigewordenen Salze fielen nach der Zugabe von 150 µl BD3 nach mehrmaligem Invertieren und weiteren 5 Minuten auf Eis aus und konnten dann bei 22000 x *g* für 10 min sedimentiert werden. Um Proteine und Detergenz aus dem Überstand zu entfernen, wurde er in ein neues Reaktionsgefäß mit gleicher Menge vorgelegtem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) überführt, mehrmals invertiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 22000 x *g* wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 2 Teilen 100 % Ethanol für 20 min auf Eis die darin enthaltene DNA gefällt und durch eine anschließende 20-minütige Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment wurde dann mit 70 % Ethanol 5 min bei 22000 x *g* gewaschen und nach Abnahme der Überstandes im Rotationsexsikkator (Eppendorf Concentrator 5301, Köln, Deutschland) 5 min bei 30°C getrocknet. Schließlich konnte die gewonnene Plasmid-DNA in 20-50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert werden.

<b><u>Puffer:</u></b>	<b>BD1:</b>	50 mM	Glukose	
		25 mM	Tris-HCl	pH 8
		10 mM	EDTA	
		4 mg ml <sup>-1</sup>	Lysozym	

<b>BD2:</b>	200 mM	NaOH	
	1 %	SDS	
<b>BD3:</b>	3 M	NaCH <sub>3</sub> COO	pH 5
10x <b>TE:</b>	10 mM	Tris-HCl	pH 8
	1 mM	EDTA	

Eine größere Menge von Plasmid-DNA in höherer Konzentration, wie sie für die Transformation von *A. tumefaciens* benötigt wird, wurde über eine so genannte „Midi- oder Maxi-Präparation“ gewonnen, die nach dem gleichen Prinzip wie die Minipräparation erfolgte, jedoch in einem größeren Maßstab. Es wurde dazu ein Ausgangsvolumen von 50 oder 100 ml Bakteriensuspension verwendet. Die Bakterien wurden in einer Kühlzentrifuge (Model J2-21 Centrifuge; Beckman, München, Deutschland) sedimentiert, dann in 2 ml BD1 resuspendiert, mit 4 ml BD2 vollständig aufgeschlossen und mit 3 ml BD3 und anschließender Zentrifugation die Zellfragmente entfernt. Gleich im Anschluss wurde mit einem Volumenteil Isopropanol 15 min auf Eis gefällt und 15 min bei 10000 x *g* zentrifugiert und das Sediment in 1 ml TE-Puffer aufgenommen, um das Volumen zu reduzieren und im gewohnten Maßstab fortfahren zu können. Zusätzlich wurde im Anschluss noch ein Hundertstel Volumenteil RNase A zugesetzt und 15 min bei 37°C inkubiert, bevor mit der Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Reinigung fortgefahren wurde. Im Anschluss daran erfolgte noch ein weiterer Reinigungsschritt mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Danach wurde wie bei der „Minipräparation“ fortgefahren.

Zur Gewinnung besonders reiner Plasmid-DNA, wie sie zur Sequenzierung erforderlich ist, wurde der „Plasmid Mini Purification Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Dabei wurden 1,5 ml einer 5 ml-Übernachtskultur 2 min bei 22000 x *g* zentrifugiert. Die Bakterien wurden dann in 300 µl Puffer 1 resuspendiert, durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 lysiert und mit 300 µl gekühltem Puffer 3 neutralisiert. Nach mehrfachem Invertieren und Zentrifugation für 10 Minuten bei 22000 x *g* wurde der Überstand auf ein Qiagen Tip 20 Säulchen, das zuvor mit 1 ml Puffer QBT equilibriert wurde, aufgetragen. Anschließend wurde das Säulchen mit 4 mal 1 ml Puffer QC gewaschen. Zum Eluieren des Plasmids wurden 800 µl Puffer QF aufgetragen. Die Fällung erfolgte mit 560 µl (0,7 des Volumens) Isopropanol. Gewaschen wurde zweimal mit 70 % Ethanol. Das Sediment wurde luftgetrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert.



Für den Vektor pQE, der in geringerer Kopienzahl vorliegt, wurde das Protokoll leicht abgewandelt: Es wurden auf das Bakterien-Sediment von 1,5 ml Kultur noch einmal 1,5 ml Kultur gegeben und zentrifugiert, um ein größeres Sediment zu erhalten. Dafür wurden dann jeweils 600 µl der Puffer 1, 2 und 3 verwendet. Um das Volumen anschließend wieder zu reduzieren, wurde mit Isopropanol gefällt, 30 min bei 22000 x g zentrifugiert und das Sediment in geringem Volumen TE-Puffer aufgenommen. Zum Auftragen auf das Säulchen wurde der Ansatz dann auf 1 ml aufgefüllt.

<b><u>Puffer:</u></b>	<b>1:</b>	50 mM	Tris-HCl	pH 8
		10 mM	EDTA	
		100 µg ml <sup>-1</sup>	RNase A	
	<b>2:</b>	200 mM	NaOH	
		1 %	SDS	
	<b>3:</b>	3 M	KCH <sub>3</sub> COO	pH 5,5
	<b>QBT:</b>	750 mM	NaCl	
		50 mM	MOPS	pH 7
		15 %	Triton X 100	
		15 %	Isopropanol	
	<b>QC:</b>	1 M	NaCl	
		50 mM	MOPS	pH 7
		15 %	Isopropanol	
	<b>QF:</b>	1,25 M	NaCl	
		50 mM	Tris HCl	pH 8,5
		15 %	Isopropanol	

Für eine schnellere Gewinnung ebenfalls sehr reiner Plasmid-DNA ohne RNA-Verunreinigungen, wie sie für die Verwendung bei der quantitativen RT-PCR benötigt wird, wurde der „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Dabei wurde das Bakteriensediment wie bei der Plasmidpräparation nach BIRNBOIM & DOLY 1979 zuerst enzymatisch, dann alkalisch aufgeschlossen (Puffer P1 und P2) und schließlich mit Puffer N3 neutralisiert. Die ausgefallenen Salze und Proteine wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend auf eine „spin column“, ein kleines Säulchen, das in der Tischzentrifuge zentrifugiert werden kann, aufgetragen. Die vom Säulchen festgehaltene

DNA wurde dann mit Puffer PE gewaschen und anschließend mit 50 µl bidestilliertem Wasser eluiert.

### 2.2.1.2 DNA-Extraktion aus *A. thaliana*

Zur Extraktion von DNA aus *A. thaliana* wurden 50-100 mg Blattmaterial in einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß schock gefroren und anschließend mit einer 1 ml-Pipettenspitze, deren Öffnung geschmolzen und in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß zum Pistill geformt wurde, gemörsert. Auf das gefrorene Blattpulver wurden dann 200 µl CTAB-Puffer pipettiert, der zuvor mit 2 % β-Mercaptoethanol (v/v) versetzt und auf 65°C erwärmt worden war. Die Proben wurden 5 bis 60 min bei 65°C inkubiert. Die Abtrennung der hydrophoben Substanzen erfolgte über eine Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (24:1). Nach Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die DNA mit 2,5 Volumen (500 µl) Ethanol und 5 % (35 µl) Acetat für 20 min bei 20°C gefällt. Die DNA wurde bei 22000 x g für 20 min sedimentiert und bei einer weiteren Zentrifugation für 5 min mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Trocknung erfolgte im Rotationsexsikkator. Danach wurde die in ¼ TE-Puffer aufgenommene DNA durch einen 30minütigen RNase-Verdau (20 µg ml<sup>-1</sup>) bei 37°C von RNA gereinigt und schließlich bei -20°C aufbewahrt.

<b><u>Puffer:</u></b>	<b>2x CTAB:</b>	100 mM	Tris-HCl	pH 8
		2 %	CTAB	
		1,4 M	NaCl	
		1 %	PVP 40	
		20 mM	EDTA	

### 2.2.1.3 RNA-Extraktion aus Blättern und Protoplasten von *A. thaliana*

Für die Extraktion von RNA aus Blättern von *A. thaliana* wurde der „RNeasy Plant Mini Kit“ der Firma Qiagen verwendet. 50-100 mg Blattmaterial wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben gemörsert. Anschließend wurden zum Zellaufschluss 450 µl Puffer RLT mit 5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und die Proben für 1-3 min bei 56°C inkubiert. Das Lysat wurde dann auf eine „Qiashredder spin column“ pipettiert und bei 14000 x g für 2 min zentrifugiert, wodurch alle noch vorhandenen größeren Blattfragmente aufgeschlossen wurden und die Zellrückstände sedimentiert wurden. Der Durchfluss wurde dann ohne das Sediment aufzuwirbeln abgenommen und in einem neuen 2 ml-Gefäß mit 0,5 Volumen 100 % Ethanol versetzt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde das Gemisch auf eine „RNeasy mini spin column“ aufgetragen und ca. 15 Sekunden bei 14000 x g zentrifugiert. Die RNA

blieb an der Säule haften. Sie wurde anschließend mit 700 µl Puffer RW1 und zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils für ca. 15 Sekunden bei 14000 x g, beim letzten Schritt wurde 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Flüssigkeitsreste von der Säule vollständig zu entfernen. Die RNA wurde anschließend mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Zur Extraktion von RNA aus Protoplasten von *A. thaliana* wurde ebenfalls der oben beschriebene Kit verwendet, die Protoplasten wurden schonend abzentrifugiert (50 x g), der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt und 450 µl Puffer RLT mit 5 µl β-Mercaptoethanol hinzu pipettiert. Das Lysat wurde dann auf eine „Qiashredder spin column“ gegeben und es wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

#### 2.2.1.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der gewonnenen Nukleinsäuren wurden 4 µl der Probe mit 396 µl Wasser verdünnt und die Extinktion am Lambda 2 UV/VIS-Spektralphotometer (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) in einer Quarzküvette (Roth) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Über die optische Dichte bei 260 nm kann dann mit Hilfe eines Absorptionskoeffizienten die Konzentration bestimmt werden. Der Absorptionskoeffizient ist für die unterschiedlichen Nukleinsäuren verschieden, er beträgt nach SAMBROOK ET AL. (1989) für einzelsträngige DNA 0,033, für doppelsträngige DNA 0,05 und für RNA 0,04. Die Nukleinsäuremenge errechnet sich somit folgendermaßen:

$$\text{ss-DNA } (\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}) = \text{OD}_{260} \cdot 0,033 \cdot 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

$$\text{ds-DNA } (\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}) = \text{OD}_{260} \cdot 0,05 \cdot 100$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}) = \text{OD}_{260} \cdot 0,04 \cdot 100$$

Ein Maß für die Reinheit der Probe gibt das Verhältnis von  $\text{OD}_{260}$  zu  $\text{OD}_{280}$ . Es sollte im Bereich von 1,6 bis 2,0 liegen. Ein Wert unter 1,6 deutet auf Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen hin.

#### 2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Größe von Nukleinsäure-Fragmenten wurden die Proben über Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde je nach Größe der zu erwartenden Fragmente ein 0,5-1 %iges Agarosegel gegossen. In 80 ml TAE-Puffer wurde dazu die entsprechende Menge Ultra Pure Agarose in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden 4 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg ml<sup>-1</sup>) zugegeben und das Gel in einen 11 x 15 cm großen

Schlitten gegossen, in den ein oder bei Bedarf zwei Kämme mit je 16 Zähnen gesteckt wurden. Nach einer Polymerisationszeit von etwa einer halben Stunde konnte das Gel in die Gelkammer transferiert werden, die ebenfalls mit TAE-Puffer gefüllt wurde, bis das Gel vollständig bedeckt war. Dann wurden die Kämme herausgezogen und die Proben wurden mit 1/5 Probenpuffer vermischt in die entstandenen 20 µl-Geltaschen pipettiert. Zum Größenvergleich wurde eine Tasche mit einem passenden Längenstandard (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) befüllt. Die Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente geschah dann durch Anlegen einer Spannung von 120 V (Elektrophoresis Power Supply PS3002, Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland). Da sich das unter UV-Licht sichtbare positiv geladene Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren einlagert, konnte nach etwa einer Stunde das Ergebnis unter UV-Licht begutachtet und fotografiert (Intas, Göttingen, Deutschland) werden.

**Puffer:**

Probenpuffer:	1,4 mg Bromphenolblau
	1 ml Tris/HCl (10mM, pH8)
	1 ml Glycerin

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer: 2 M Tris  
50 mM EDTA  
mit Eisessig auf pH 8 einstellen

## 2.2.2 Polymeraseketten-Reaktion zur DNA-Amplifikation

Zur gezielten Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen wurden PCR-Reaktionen am Personal Cycler oder am TRIO-Thermoblock mit TRIO Heated Lid (beide Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

### 2.2.2.1 Primerdesign

Die synthetisierten (Roth) Anfangs- und Endstücke der Genregion, die vervielfältigt werden sollte, die sogenannten Oligonukleotide oder Primer, wurden so ausgewählt, dass sie am 3'-Ende möglichst Guanin- und Cytosin-reich und nicht länger als 35 Bp sind. Am 5'-Ende wurde bei Bedarf die Sequenz einer passenden Schnittstelle angefügt, um so die PCR-Fragmente in einen geeigneten Vektor einklonieren oder Genfragmente miteinander ligieren zu können. Die Sequenz eines Epitops wurde ebenfalls jeweils am 5'-Ende des entsprechenden Primers vor der Schnittstelle angefügt.

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
1	ispS-hind-rev-3	gaagcttgcaactcaaaataagaaaa tgatataataatcttc	Ende des poly-A-Signals des <i>ispS</i> -Gens aus der Pappel mit <i>Hind</i> III-Schnittstelle
2	Kpn-Iso-FOR	aggtagcagagagagaaaaatcct gctgcag	Anfang des <i>ispS</i> -Gens aus der Pappel mit <i>Kpn</i> I-Schnittstelle
3	leader-nco-rev-NEU	gaccgtctggccatggtttctgttctgt gaagctg	Ende der codierenden Sequenz für das Transitpeptid der ISPS aus der Pappel mit <i>Nco</i> I-Schnittstelle
4	IS Bakt-Pst-REV	catatgtattgttctctgcagacgaca acatgg	Ende des <i>ispS</i> -Gens ohne Poly-Adenylierungs-Signal mit <i>Pst</i> I-Schnittstelle
5	HA-IspS-rev-bam	atggatccttacgcatagtcagggac atcgtaggtagtctctcaaggtag aataggctctg	Ende des A-Teils des <i>ispS</i> -Gens (vor Poly-Ad.-Signal), mit HA-Epitop, Stop-Codon und <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
6	for-IspS-bgC	taaagatctcaggtttccatgtgtcgt ctgc	Anfang des Poly-Adenylierungs-Signals des <i>ispS</i> -Gens mit <i>Bgl</i> II-Schnittstelle
7	LEADER_Nco_REV	gaccgtctggccatggtttctgttctgt g	Ende der codierenden Sequenz für das Transitpeptid der ISPS aus der Pappel mit <i>Nco</i> I-Schnittstelle
8	IS.Bakt-BamHI-FOR	gaaacagaaacaggatccagacg gtctgcc	Anfang des <i>ispS</i> -Gens ohne codierende Sequenz für das Transitpeptid, mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
9	IspS-Kpn-REV	attgttggtaccgacgacaacatgg aaaacctg	Ende des <i>ispS</i> -Gens ohne Poly-Adenylierungs-Signal, mit <i>Kpn</i> I-Schnittstelle
10	IS_Spe_for	gactagtgagagagagaaaaatcctg ctgc	Anfang des <i>ispS</i> -Gens aus der Pappel mit <i>Spe</i> I-Schnittstelle
11	IS leader_Bgl_rev	ggcagaagatctggcttctg	Ende der codierenden Sequenz für das Transitpeptid der ISPS aus der Pappel mit <i>Bgl</i> II-Schnittstelle
12	nptII-for	attcgctatgactggcac	Forward-Primer zum Nachweis des Kanamycin-Resistenzgens <i>nptII</i>
13	nptII-rev	acaagaccggcttccatcc	Reverse-Primer zum Nachweis des Kanamycin-Resistenzgens <i>nptII</i>
14	PolyA_Bam_His_for	gtcaggatcccatcaccatcaccatc actaaaagtaacaggtttccatgttg	Anfang des Polyadenylierungs-Signals mit angefügtem His-Tag und <i>Bam</i> HI-Schnittstelle

**Tab 2.1: Auflistung der synthetisierten Oligonukleotide.** Sie wurden für die Klonierung der Teilsequenzen des *ispS*-Gens und zum Nachweis der Transgenität von transformierten Agrobakterien und von *A. thaliana*-Linien verwendet.

Zusätzlich zu diesen Primern (Tab. 2.1) wurden zur Sequenzierung und zum Nachweis der Gensequenz der *ispS* in transgenen Organismen Primer aus der Arbeit von MILLER (2001) verwendet (Tab. 2.2).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
is_Anfang	Gagagagagaaaatcctgctgcag
is_Ende	Ccatccacaatacaggagggtac
is_sequ1	Gactctgctgaactgatagataatgtcc
is_sequ2	Tagagagctaggaagcagagcttc
is_sequ3	Gatcttcgagacatcaagggtg
is_sequ4	Tgcgatgcaatggaagctcaatg
is_sequ5	Gagcagtagcatgaaggctag
is_for_spez	Tttgcctactttgccgtggtcaaac
is_rev_spez	Tcctcagaatgcctttgtacgcatg
pQE_for	Caaatccagatggagtctgagg
pQE_rev	Agcggataacaatttcacacag

**Tab 2.2: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide aus der Arbeit von MILLER (2001).** Sie wurden zur Sequenzierung und zum Nachweis der *ispS* verwendet.

### 2.2.2.2 Reaktionsansätze und Temperaturprogramme

Für die PCR wurden je nach Fragestellung verschiedene DNA-Polymerasen verwendet: Der „Advantage 2 Polymerase Mix“ der Firma Clontech (Heidelberg, Deutschland) kann durch die Mischung zweier Polymerasen laut Hersteller deutlich längere Fragmente sehr genau amplifizieren. Daneben wurde die ebenfalls sehr genau arbeitende Platinium-Taq-Polymerase von Invitrogen für lange Stücke verwendet. Diese Enzyme wurden immer dann verwendet, wenn das PCR-Produkt kloniert und exprimiert werden sollte. Im Standard-PCR-Ansatz zur Überprüfung der Transgenität von Bakterien oder Pflanzen wurde die Taq-Polymerase von Invitrogen eingesetzt. Für die Taq-Polymerasen galt folgender 50 µl-Reaktionsansatz:

38,5µl	H <sub>2</sub> O
5µl	Puffer
2µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1µl	dNTP-Mix (10 mM)
1µl	forward Primer (50 pmol µl <sup>-1</sup> )
1µl	reverse Primer (50 pmol µl <sup>-1</sup> )
0,5µl	Taq-Polymerase
1µl	Template-DNA (ca. 1 ng)

Da im 10fach-Puffer des „Advantage 2“-Kits bereits die entsprechende Menge  $MgCl_2$  enthalten ist, wurden hier die 2  $\mu l$  durch Wasser ersetzt. Zum Pipettieren der Ansätze wurden autoklavierte Spitzen, 0,2 ml-Gefäße und bidestilliertes Wasser benutzt.

Es wurde folgendes Standard-Temperaturprogramm verwendet:

- |                             |       |                    |                          |
|-----------------------------|-------|--------------------|--------------------------|
| (1) Einmalige Denaturierung | 30 s  | 95°C               |                          |
| (2) Denaturierung           | 30 s  | 94°C               |                          |
| (3) Annealing               | 1 min | 58°C               |                          |
| (4) Elongation              | 1 min | 72°C               | 36 x Rücksprung auf (2)  |
| (5) Kühlung                 |       | unbegrenzt bei 4°C | bis zur Weiterverwendung |

Durch Herabsetzen der Annealing-Temperatur konnte das Anlagern der Primer weniger spezifisch gehalten werden, bzw. durch Heraufsetzen der Temperatur die Spezifität erhöht werden. Bei längeren Fragmenten (>1kbp) wurde die Polymerisationszeit heraufgesetzt, bei sehr kleinen Stücken konnte sie etwas verringert werden. Um das Ergebnis zu überprüfen, wurden bis zu 8  $\mu l$  des PCR-Ansatzes mit 2  $\mu l$  Probenpuffer auf ein Agarosegel (2.2.1.5) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

### 2.2.3 Klonierung und Umklonierung

Zur Konservierung und weiteren Verwendung der PCR-Fragmente mussten diese in Vektoren inkloniert und gegebenenfalls in andere Vektoren weiter umkloniert werden.

#### 2.2.3.1 TOPO TA Cloning Kit

Da die durch PCR mit Taq-Polymerasen gewonnenen DNA-Fragmente am 3'-Ende ein überhängendes Adenosin besitzen, erfolgte die erste Ligation immer mit dem Vektor pCRII oder pCR2.1, der am 3'-Ende jeweils ein überhängendes Thymidin besitzt. Bei den für diese Arbeit verwendeten „TOPO“-Kits (Invitrogen) ist mit diesen überhängenden Enden eine Topoisomerase assoziiert, die das PCR-Produkt mit dem Vektor verbindet. Es wurden zur Ligation 2  $\mu l$  des PCR-Produkts mit 2  $\mu l$  Wasser, 1  $\mu l$  Salzlösung und 1  $\mu l$  Vektor für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2  $\mu l$  dieses Ansatzes zu den bereits kompetenten „One Shot“ *E. coli* 10F' auf Eis pipettiert. Nach ca. 30 Minuten erfolgte für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Anschließend konnten die Zellen für eine Stunde in 250  $\mu l$  SOC-Medium (Invitrogen) bei 37°C regenerieren und wurden dann auf LB-Platten ausgestrichen (je 25  $\mu l$  und 250  $\mu l$ ), die 100  $\mu g ml^{-1}$  Ampicillin und je 32  $\mu g ml^{-1}$  X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -galaktopyranosid) und IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die

Zugabe des Antibiotikums, dessen Resistenz-Gen auf dem Vektor liegt, können nur Bakterien zu einer Kolonie heranwachsen, die den Vektor aufgenommen haben. Die Zugabe von X-Gal und IPTG diente der Blau-Weiß-Selektion der Bakterienkolonien. Durch IPTG wird die Expression des plastidären *lacZ*-Fragments induziert, wodurch  $\beta$ -Galaktosidase gebildet wird, ein Enzym, das X-Gal zu dem Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo umsetzt, der zu einer Blaufärbung der Kolonien führt. Da der Polylinker der pCR-Vektoren innerhalb dieses Fragments liegt, wird bei erfolgreichem Einbau eines Inserts dieses Fragment zerstört und es wird keine  $\beta$ -Galaktosidase produziert, die positiven Kolonien bleiben also weiß.

### 2.2.3.2 Restriktion

Zur Umklonierung eines Fragments in einen anderen Vektor mussten beide Vektoren, der ursprüngliche Donorvektor und der Empfängervektor, mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dazu ist es nötig, dass beide Vektoren identische Schnittstellen in der gewünschten Orientierung besitzen. Die Restriktionsansätze sahen folgendermaßen aus:

	Donorvektor	Empfängervektor
30 $\mu$ l	Wasser	Wasser
4 $\mu$ l	passender 10x Enzym-Puffer	passender 10x Enzym-Puffer
1 $\mu$ l	Enzym1	Enzym1
1 $\mu$ l	Enzym2	Enzym2
4 $\mu$ l	DNA (ca. 1 $\mu$ g)	DNA 1:10 verd.

**Tab. 2.3: Restriktionsansätze zur Umklonierung eines DNA-Fragments in einen anderen Vektor.** Der Empfänger-Vektor wurde in geringerer Konzentration eingesetzt als der Donorvektor.

Die Ansätze wurden für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Je 9  $\mu$ l dieser Ansätze wurden vor der Inkubation jeweils mit 1  $\mu$ l RNase versetzt. Die Ansätze mit RNase wurden anschließend zur Überprüfung auf ein Gel aufgetragen.

Als geeigneter Puffer für die Restriktionsansätze wurde ein Puffer ausgewählt, bei dem die beiden verwendeten Restriktionsenzyme die gleiche möglichst hohe Aktivität besitzen. War das nicht möglich, wurde von dem Enzym mit der geringeren Aktivität entsprechend mehr eingesetzt. Günstig war es, wenn der Donorvektor durch eines der gewählten Enzyme noch einmal geschnitten wurde, so dass eine Ligation des Inserts mit dem Donorvektor nicht mehr möglich oder äußerst unwahrscheinlich war.



### 2.2.3.3 Reinigung und Ligation der DNA

Die Ansätze, die zur Ligation weiterverwendet wurden, mussten von den Restriktionsenzymen gereinigt werden. Dazu wurden die Proben mit je 200 µl Wasser verdünnt und eine Phenol/Chloroform-Reinigung durchgeführt: Den Proben wurden 0,5 Volumenteile Phenol und 0,5 Volumenteile Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, dann zentrifugiert (15 min bei 22000 x g) und die obere, wässrige Phase abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und anschließend noch zweimal auf die selbe Weise mit 1 Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol behandelt. Beim letzten Schritt wurden beide Ansätze (Donor- und Empfängervektor) vereinigt. Zum Fällen der DNA wurden 2 Volumenteile Ethanol (100 %) und 1 % NaAcetat (5 M) zugegeben, die Probe 20 Minuten gekühlt und weitere 20 Minuten bei 22000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend im Rotationsexsikkator getrocknet. Dann wurde die DNA in 3 µl Wasser resuspendiert, es wurden je 1 µl Ligase-Puffer und Ligase zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.2.4 Transformation von Bakterien

Die so entstandenen Vektor-Insert-Konstrukte wurden anschließend wieder in Bakterien kloniert.

Neben den oben erwähnten „One Shot“-Zellen, die bereits kompetent bei Invitrogen zu kaufen sind, wurden auch der besser wachsende *E. coli*-Stamm TG1 und das zur Transformation von *A. thaliana* benötigte *A. tumefaciens* transformiert. Diese Stämme mussten dazu zuerst kompetent, also für Plasmid-DNA durchlässig, gemacht werden.

#### 2.2.4.1 Chemische Behandlung von *E. coli* TG1 mit CaCl<sub>2</sub> und Transformation

Der *E. coli*-Stamm TG1 wurde über einen CaCl<sub>2</sub>-Schock kompetent gemacht (SAMBROOK ET AL. 1989). Es wurden 5-10 ml Übernachtskultur in LB bei 37°C und 120 Upm angezogen. Von dieser wurde 1 ml auf 100 ml mit frischem Medium aufgefüllt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3-0,5 weiter bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien für eine halbe Stunde auf Eis gestellt und von da an immer auf 4°C gehalten. Das im Kühlschrank gelagerte 50 mM CaCl<sub>2</sub> wurde ebenfalls auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden 10 Minuten in der Kühlzentrifuge (J2-21, Beckman, Rotor JA 14) bei 3000 x g und 4°C schonend ohne Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 25-30 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert und anschließend in nur 1 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. So konnten die nun kompetenten Zellen maximal 24 Stunden eisgekühlt im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zur

Transformation wurden 100  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension mit 2-10  $\mu\text{l}$  des gewünschten Plasmids versetzt und für eine halbe bis eine Stunde auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 40 Sekunden im Wasserbad bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und nach Zugabe von 1 ml LB eine Stunde bei 37°C inkubiert, bevor sie auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht inkubiert wurden.

#### 2.2.4.2 Elektroporation und Transformation von *A. tumefaciens*

Im Gegensatz dazu wurden *A. tumefaciens*-Zellen mittels Elektroporation transformiert. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde eine 5-10 ml Vorkultur in LB-Medium angesetzt, dem Rifampicin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) und Gentamicin (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) zugesetzt wurde. Eine Anzuchttemperatur von 28°C wurde nicht überschritten, damit die Transferfunktion der Bakterien nicht verloren ging. Die Vorkultur wurde auf 150-500 ml verdünnt (LB mit Antibiotika) und dann weiter bis zu einer  $\text{OD}_{550}$  von 0,5-0,6 inkubiert. Von da an wurde konsequent auf Eis gearbeitet. Die Bakterien wurden schonend abzentrifugiert (20 min bei 5-3000  $\times g$ ), der Überstand abgegossen und das Sediment zuerst zweimal in 200 ml bidestilliertem Wasser vorsichtig resuspendiert und für 10 min abzentrifugiert (5-3000  $\times g$ ), dann zweimal in 50 ml und noch zweimal in 1 ml gewaschen. Nach diesen Waschschrritten wurden die Bakterien in gerade so viel bidest. Wasser aufgenommen, dass es eine zähflüssige Suspension ergab. Davon wurden 50  $\mu\text{l}$  mit 0,5 bis 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (ca. 1 ng) vermischt und dann schräg in eine vorgekühlte „Gene-Pulser“-Küvette (BIO-RAD, Hercules, Kalifornien) pipettiert, ohne dass Luftblasen entstanden. Die Elektroporation erfolgte am Gene Pulser II (BIO-RAD) bei einer Einstellung von 25  $\mu\text{F}$ , 400  $\Omega$  und 2,5 kV für 0,2 cm breite Küvetten oder von 25  $\mu\text{F}$ , 400  $\Omega$  und 1,2 kV für 0,1 cm breite Küvetten. Das Gerät war ausgestattet mit einem „Puls Controller Plus“ und einem „Capacitance Extender Plus“. Nach der Entladung des Kondensators über die Küvette wurde so schnell wie möglich 1 ml SOC-Medium zu den Bakterien zugegeben und diese bei 28°C für 1-2 Stunden inkubiert. Anhand der Zeitkonstante konnte am Gerät abgelesen werden, ob sich der Kondensator lange genug entladen hatte. Sie sollte mindestens einen Wert von 9,6 ms haben.

#### 2.2.4.3 Selektion transgener Klone

Nach der Erholungsphase bei der jeweiligen Wachstumstemperatur der Bakterien wurde die komplette Bakteriensuspension von 1000  $\mu\text{l}$  in unterschiedlichen Mengen (30-300  $\mu\text{l}$ ) auf LB-Platten ausgestrichen. Die LB-Platten enthielten zur Selektion der transformierten Klone die entsprechenden Antibiotika, deren Resistenz-Gene sich auf dem jeweiligen Vektor befanden, in folgenden Konzentrationen (Tab. 2.4):

Ampicillin für pQE	50 $\mu\text{g ml}^{-1}$
für pCR	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Kanamycin	25 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Rifampicin	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Tetracyclin	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Gentamicin	25 $\mu\text{g ml}^{-1}$

**Tab. 2.4: Bakterienselektion über Antibiotika.** Konzentration der Antibiotika im Medium, die nötig ist, um nicht transformierte Bakterien abzutöten. Transformierte Bakterien können durch Erhalten des jeweiligen Resistenzgens zu Kolonien heranwachsen.

Bei *A. tumefaciens* kamen noch zusätzlich die Antibiotika für den Stamm und das Helferplasmid hinzu, die sicher stellten, dass es sich um den richtigen Stamm handelte und dieser das Helferplasmid nicht verloren hatte. Wurde ein Vektor verwendet, der ein *lacZ*-Gen im Polylinker besitzt, konnte zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion erfolgen (siehe 2.2.3.1).

Zur Kontrolle, ob das richtige Insert eingebaut wurde, wurden jeweils 24 Kolonien von der Platte gepickt und in 5 ml-Flüssigkulturen angezogen. Davon wurden Plasmidpräparationen (2.2.1.1) durchgeführt und von 2  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Plasmid-DNA das Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten und die Länge auf einem 0,8 %igen Agarosegel (2.2.1.5) überprüft.

## 2.2.5 DNA-Sequenzierung

Fiel die visuelle Kontrolle über Gelelektrophorese positiv aus, konnte das Insert auf seine genaue Sequenz hin überprüft werden. Dies geschah über das von SANGER ET AL. (1977) entwickelte Kettenabbruchverfahren mit Farbstoff-markierten Terminatoren.

### 2.2.5.1 „Cycle sequencing“ mit Farbstoff-markierten Terminatoren

Die dafür nötige Sequenzreaktion gleicht einer PCR, bei der pro Ansatz jedoch nur ein Primer verwendet wird, für die pCR-Vektoren jeweils M13 forward oder M13 reverse, die ca. 90 Bp vor bzw. nach dem Insertbereich binden. Die Synthese der DNA-Stränge erfolgt dadurch nicht exponentiell, sondern linear. Neben den gewöhnlichen Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden mit einem auf Rhodamin basierenden Fluoreszenzfarbstoff markierte dNTPs zugegeben, die statistisch an jeder Stelle mindestens einmal eingebaut werden und durch die fehlende Hydroxylgruppe für einen Kettenabbruch sorgen. So entstehen DNA-Ketten von jeder Länge, die jeweils am Ende den der letzten

Base entsprechenden Farbstoff besitzen. Für die Sequenzreaktion wurde der Sequenzierungskit „Big Dye Terminator Cycle Sequencing RR“-Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) folgendermaßen verwendet:

1	µl	Plasmid-DNA (200-500 ng)
3,5	µl	Forward od. Reverse Primer (5 µg ml <sup>-1</sup> )
4	µl	Terminator-Mix
11,5	µl	H <sub>2</sub> O

Die Sequenzreaktion erfolgte in einem Biometra Thermoblock nach diesem Programm:

(1) Einmalige Denaturierung	1 min	96°C
(2) Denaturierung	30 s	96°C
(3) Annealing	15 s	50°C
(4) Elongation	4 min	60°C 25 x Rücksprung auf (2)
(5) Kühlung	unbegrenzt bei 4°C	bis zur Weiterverwendung

Mit Hilfe eines Primers entstehen DNA-Ketten, deren Sequenz bis zu etwa 500 Basen Länge auswertbar ist. Ist ein Insert länger, müssen Primer verwendet werden, die innerhalb der bekannten Sequenz des Inserts liegen. Aus der Arbeit von MILLER (2001) waren bereits Sequenzierprimer für die *ispS* vorhanden (*is\_sequ1* bis *is\_sequ5*, *is\_Anfang* und *is\_Ende*, *is\_for\_spez* und *is\_rev\_spez*). Für die Sequenzierung in pQE-Vektoren wurden die ebenfalls bereits in der Arbeit von MILLER (2001) verwendeten Primer *pQE\_for* und *pQE\_rev* benutzt (Tab. 2.2).

Die erhaltene DNA musste vor der Auftrennung über Kapillar-Gelelektrophorese von den nicht gebundenen Nukleotiden und der Taq-Polymerase gereinigt werden. Dazu wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt: Zum Ansatz wurden 80 µl Wasser, 10 µl NaAcetat (3 M, pH 5) und 250 µl 100 % Ethanol zugegeben und vermischt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis und 20 Minuten Zentrifugation bei 22000 x *g* wurde der Überstand abgenommen und die sedimentierte DNA mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde fünf Minuten im Rotationsexsikkator getrocknet und anschließend in 25 µl Template Supression Reagent (Applied Biosystems) resuspendiert und in sterile 0,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und mit einem speziellen Septum (Applied Biosystems) verschlossen. In einem Thermoblock wurden die Proben für 2 Minuten bei 96°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt.

### 2.2.5.2 Kapillarelektrophorese und Analyse der Sequenzdaten

Die Sequenzierung erfolgte am Sequencer ABI PRISM™ 310 von Applied Biosystems. Dabei wurden die unterschiedlich langen DNA-Fragmente ihrer Größe nach über eine mit Gel (Performance Optimized Polymer 6) gefüllte Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt. Die angelegte Spannung betrug 12 kV und es floss ein Strom von 5 µA. Die DNA-Fragmente passierten nach 30 cm ein Fenster in der Kapillare, hinter dem sich ein Laser befindet, der die Fluoreszenz-markierten Basen anregte, so dass sie Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittierten, je nachdem, um welche der vier möglichen Basen es sich handelte. Diese Lichtblitze wurden über das Softwareprogramm ABI PRISM™ Collection 1.0.4 (Applied Biosystems) detektiert und über das Programm Sequencing Analysis 3.0 (Applied Biosystems) ausgewertet. Um Lesefehler zu vermeiden, wurden von Sequenzen, bei denen es auf die exakte Basenfolge ankam, immer auch der Gegenstrang komplett sequenziert. Die Übersetzung der Basensequenzen in Proteinsequenzen und die Erstellung von Restriktionskarten erfolgte über das Programm Strider 1.2. Recherchen in Sequenzdatenbanken wurden auf der Internetseite von EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) mit der jeweils aktuellen Version der Programme durchgeführt, Homologievergleiche über WU-Blast oder Fasta, Alignments über ClustalW.

### 2.2.6 Transformation von *A. thaliana*

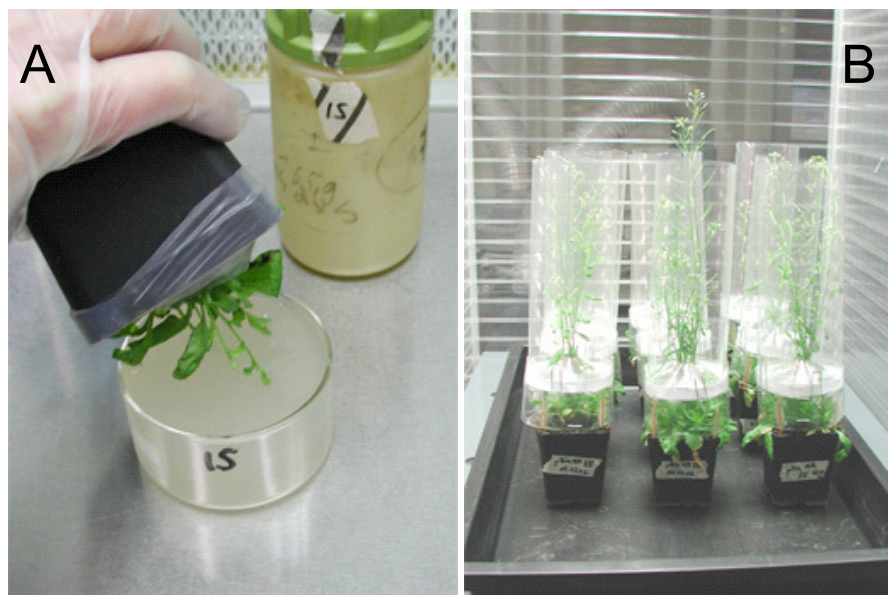
Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte nach CLOUGH & BENT (1998) über die sogenannte „Floral Dip“-Technik, bei der DNA von Agrobakterien auf die generativen Organe der Pflanze durch Infektion übertragen wird. Dies geschah durch Eintauchen des Blütenstandes in eine Agrobaktériensuspension. Die von diesen Pflanzen erhaltenen Samen wurden dann über eine Antibiotikum-Resistenz auf ihre Transgenität hin untersucht.

#### 2.2.6.1 „Floral Dip“-Technik

Es wurde eine 5 ml Vorkultur eines transformierten Einzelklons von *A. tumefaciens* C58C1 angezogen, der neben dem Helferplasmid pMP90 den binären Vektor pBinAR mit der zu übertragenden T-DNA enthielt. Das LB-Medium enthielt entsprechend die Antibiotika Rifampicin, Gentamicin und Kanamycin in den erforderlichen Mengen (2.2.4.3). Die Vorkultur wurde mit 300 ml LB-Medium mit Antibiotika verdünnt und weiter bei 28°C und 120 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 inkubiert. Dann wurden die Bakterien bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 5500 Upm ohne Bremse abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Sediment wurde vorsichtig in 10 ml Infiltrationsmedium (0,1 % (v/v) Silwet L-77,

5 % Saccharose) resuspendiert und anschließend mit diesem Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,8 eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde in ein flaches Becherglas gegeben und darin wurden die ca. 6 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen mit den eben geöffneten Blüten eingetaucht (Abb. 2.2A). Eventuell bereits vorhandene Schoten wurden vorher entfernt und die Erde wurde mit Parafilm abgedeckt, um eine Kontamination mit dem Medium zu vermeiden. Nach dem Eintauchen wurden die Pflanzen über Nacht abgedeckt. Es wurden pro Transformation 5-10 Pflanzen verwendet.

Um die Samen auffangen zu können, wurde jede einzelne Pflanze mit einer aus Folie, Papier und Klebeband angefertigten Auffangvorrichtung versehen (Abb. 2.2B). Nach der Samenreife wurde mit einer langen Glaspipette nachgeholfen, so dass sich alle Samen aus den Schoten lösten und in den Auffangbehälter fielen. Der obere Teil der Behälter ließ sich abnehmen, die Pflanze konnte abgeschnitten werden und die Samen aus der unteren Schale entnommen werden. Sie wurden anschließend für mindestens eine Woche im Exsikkator gelagert.



**Abb. 2.2: Transformation und Absamen von *A. thaliana*.** **A:** Eintauchen der *A. thaliana*-Pflanze in die Agrobakteriensuspension („Floral Dip“), **B:** Die Pflanzen wurden nach der Transformation zum Absamen mit einer Auffangvorrichtung für die Samen versehen.

Die Agrobakteriensuspension sowie alle damit kontaminierten Gefäße und Schalen wurden nach der Transformation zweimal für 40 Minuten bei 120°C autoklaviert. Die Pflanzen wurden nach dem Absamen einmal autoklaviert.

#### 2.2.6.2 Selektion transgener *A. thaliana*-Linien

Die Selektion der transgenen Linien erfolgte über die mit der *ispS* gleichzeitig übertragene Kanamycin-Resistenz. Dazu wurden die Samen der getauchten Pflanzen auf sterilen MS-

Platten (1x Murashige und Skoog mit Vitaminen (Sigma Nr. 5519), 1 % (w/v) Saccharose und 1 % (w/v) Phytagar) ausgebracht, die  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin enthielten. Um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen so gut wie möglich zu vermeiden, wurden die Samen zuerst desinfiziert. Dazu wurden sie in Aliquots (je 2-3 Spatelspitzen) in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße abgefüllt und 1 ml 70 % Ethanol dazugegeben. Nach 2-minütigem Schwenken und 30 Sekunden Zentrifugation bei  $3000 \times g$  wurde der Alkohol abgegossen und 1 ml 30 % Danklorix, das mit 2-3 Tropfen Triton X 100 pro 50 ml versetzt war, dazugegeben. Nach 5 Minuten Schwenken wurden die Samen wieder abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Anschließend wurde 4 Mal mit bidestilliertem sterilen Wasser gewaschen. Dazu wurden die Samen jedesmal mit 1 ml Wasser gemischt und anschließend wieder abzentrifugiert. Am Ende wurde etwas Wasser auf den Samen belassen und diese zum Stratifizieren für 4 Tage in den Kühlschrank gestellt. Danach konnten sie auf den frischen MS-Platten verteilt werden. Dazu wurden auf jede Probe  $750 \mu\text{l}$  0,1 % (w/v) Agarose (steril, mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin) pipettiert und die Samensuspension auf die Platten aufgetropft, wobei auf einer Seite der Platte etwas Platz frei gelassen wurde. Anschließend wurden die Samen zur Keimung im Kulturraum bei  $20^\circ\text{C}$  einer PPFD von ca.  $200 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ausgesetzt. Für einen Tag wurden die Platten plan ausgelegt, bis die Tropfen eingetrocknet waren, dann wurden sie leicht schräg gestellt, so dass das Kondenswasser, das sich in den Petrischalen bildete, auf die Seite abfließen konnte, auf der keine Samen aufgetragen wurden und nicht die Keimlinge unter Wasser setzte. Nach 1-2 Wochen waren die transgenen Keimlinge deutlich zu erkennen, da das Antibiotikum auf sie keine Wirkung zeigte: Sie waren deutlich grün, bildeten bereits Primärblätter aus und hatten deutlich längere und mehrfach verzweigte Wurzeln (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Selektion der transgenen Linien von *A. thaliana*.** Die Selektion fand auf Kanamycin-haltigem MS-Medium ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) statt. Die abgebildeten Keimlinge waren ca. 2 Wochen alt.

Die so selektierten positiven Pflanzen wurden aus dem Agar mit einem Spatel ausgestochen und in einem Gefäß mit Leitungswasser von Agar-Resten befreit. Dann wurden die Keimlinge auf gut gewässertes Substrat (2.1.2.2) gelegt und mit der Spritzflasche unter Wasser gesetzt, so dass die Wurzeln beim Versickern des Wassers in das Substrat schonend eingebettet wurden. Die Transgenität konnte nach weiteren 2-4 Wochen, wenn genügend Blattmaterial zur DNA- und RNA-Isolierung zur Verfügung stand, über PCR verifiziert werden.

## **2.2.7 Herstellung und Transformation von Protoplasten aus *A. thaliana*-Blättern**

Eine schnellere Möglichkeit, ein Gen heterolog in pflanzlichen Zellen zu exprimieren, ist die vorübergehende Transformation pflanzlicher Protoplasten mit Plasmid-DNA, die das entsprechende Gen unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors enthält. Protoplasten sind pflanzliche Zellen ohne Zellwand. Diese erhält man durch einen Verdau der Zellwand mit Enzymen. Eine transiente Transformation dieser Zellen erfolgte durch eine chemische Behandlung mit Polyethylen-Glycol (leicht verändert nach ABEL & THEOLOGIS 1994, DOELLING & PIKKARD 1993, DOELLING ET AL. 1993).

### **2.2.7.1 Herstellen von Protoplasten aus *A. thaliana*-Blättern**

Um Protoplasten von *A. thaliana* zu gewinnen, wurden 2-5 g Blätter von 4 bis 6 Wochen alten Pflanzen geerntet und in Petrischalen mit der Blattunterseite nach unten der Länge nach in etwa einen Millimeter breite Streifen geschnitten und sofort mit 9-18 ml MMC-Puffer (10 mM MES, pH 5,8; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 500 mM Mannit) bedeckt. Nach 1-3 Stunden wurden pro 9 ml MMC-Puffer je 0,5 ml Cellulase-Lösung (100 mg  $\text{ml}^{-1}$  Cellulase „Onozuka R-10“, 400 mM Saccharose) und Macerozyme-Lösung (100 mg  $\text{ml}^{-1}$  Macerozyme, 400 mM Saccharose) zugegeben und über Nacht im Dunkeln bei 30°C zum Zellwandverdau inkubiert. Durch leichtes Schwenken fallen dann die Protoplasten aus dem anverdauten Zellwandgerüst heraus. Um sie von den Zellwandbruchstücken zu separieren, wurden die Ansätze durch Nylonnetze mit einer Maschenweite von 200, 100 und 40  $\mu\text{m}$  filtriert. Danach wurden sie bei 50 x g für 10 Minuten schonend abzentrifugiert und anschließend zwei Mal mit zwei Drittel 0,5 M Mannit und einem Drittel 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  gewaschen und dann in 0,5 M Mannit resuspendiert. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen. Die Konzentration der intakten Protoplasten wurde anschließend unter dem Mikroskop in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt. Zur Vitalitätsbestimmung wurde ein Tropfen der Protoplastensuspension mit 0,1%iger (w/v) Fluoresceindiaceetat-Lösung versetzt und am konfokalen Laserrastermikroskop (confocal Laser Scanning Microscope, cLSM) LSM 510 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) ausgewertet.



### 2.2.7.2 Transiente Transformation der Protoplasten

Die Protoplasten wurden schonend abzentrifugiert und in der gewünschten Menge MaMg-Puffer (400 mM Mannit; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM MES-KOH, pH 5,6) resuspendiert. Die optimale Dichte zur Transformation beträgt  $5 \times 10^6$  Protoplasten pro ml. Pro Ansatz wurden 500 µl der Suspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und etwa 50 µg Plasmid-DNA und zügig 500 µl PEG-CMS-Puffer (400 mM Mannit; 100 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 40 % PEG 4000; pH 8) zugegeben. Die Protoplasten wurden durch vorsichtiges Schütteln mit dem Plasmid gemischt und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde in 5-minütigen Abständen das Volumen der Ansätze 4 Mal mit W5-Puffer (154 mM NaCl; 125 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 5 mM Glucose; 1,5 mM MES-KOH, pH 5,6) verdoppelt und anschließend die Protoplasten abzentrifugiert (50 x g, 5 min) und in 2 ml 400 mM Mannit und 0,5 ml W5-Puffer resuspendiert, wieder abzentrifugiert und schließlich in 3 ml K3-Medium (400 mM Saccharose; 4,4 g l<sup>-1</sup> MS-Salze + Gamborg Vitamine (Sigma M0404); 250 mg l<sup>-1</sup> Xylose; 460 mg l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 25 µg l<sup>-1</sup> Chloramphenicol) aufgenommen. Die Falcon-Röhrchen wurden liegend bei 20°C mit einer PPFD von 200 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> belichtet und nach 16 Stunden geerntet, um die Genexpression zu bestimmen bzw. nach 40 Stunden, um die Enzymaktivität der ISPS zu messen.

### 2.2.8 Quantitative PCR mit reverser Transkriptase

Zur Quantifizierung der Genexpression der *ispS* in transformierten *A. thaliana*-Linien und -Protoplasten wurde die Technik der quantitativen PCR mit reverser Transkriptase angewendet.

#### 2.2.8.1 Umschreiben der mRNA in cDNA mit reverser Transkriptase

In einem ersten Schritt wurde die mRNA, die Teil der isolierten Gesamt-RNA ist, mit Hilfe von reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer wurde dabei Oligo(dT), ein Oligonukleotid aus Deoxythymidin-Nukleotiden, eingesetzt, das an das 3'-Poly-Adenosin-Ende bindet, das jede pflanzliche mRNA besitzt. Auf diese Weise wird zu jeder mRNA der komplementäre cDNA-Strang gebildet. Es wurde für die RNA-Proben, die miteinander verglichen werden sollten, am Photometer die Konzentration der Gesamt-RNA bestimmt, um dann im cDNA-Ansatz die etwa gleichen Mengen an Gesamt-RNA (im Bereich 1-5 µg) einzusetzen. Für einen 20 µl-Ansatz wurden im ersten Schritt der cDNA-Synthese die den gewählten µg entsprechenden µl jeder Probe auf 11 µl mit RNase-freiem Wasser ergänzt und jeweils 1 µl Oligo(dT) zugegeben. Im Thermoblock wurden diese Ansätze für 5 bis 10 Minuten auf 70°C erhitzt und dann sofort für 3 Minuten auf Eis gekühlt, um eventuell

vorhandene Sekundärstrukturen der RNA aufzuheben, so dass der Primer optimal binden kann. Anschließend wurde ein Mix aus 4 µl 5-fach Puffer, 1 µl dNTPs, 2 µl DTT, 0,5 µl RNase-Inhibitor und 0,5 µl SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) den Ansätzen zugegeben und diese im Thermoblock für 50 Minuten bei 42°C und schließlich für 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Um bei der anschließenden quantitativen PCR genügend Parallelen ansetzen zu können, wurde der Ansatz der cDNA-Synthese meist verdoppelt.

### 2.2.8.2 Quantitative PCR mit SYBR Green

Die gewonnene cDNA wurde dann in die quantitative PCR mit SYBR Green eingesetzt (MORRISON ET AL. 1998). Als Primer dienten hier zwei ausgewählte Oligonukleotide, die ein ca. 100 – 200 Bp großes Stück des Gens einschlossen, dessen mRNA-Kopienzahl (umgeschrieben in cDNA) ermittelt werden sollte. Zur Eichung diente ein Plasmid, das die entsprechende Sequenz inkloniert hatte und dessen Konzentration am Photometer bestimmt wurde. Mit Hilfe des mittleren Basengewichts und der Anzahl der Basen von Vektor und Insert konnte über die Molmasse die Anzahl der Plasmide bestimmt werden (Gl. 2.1).

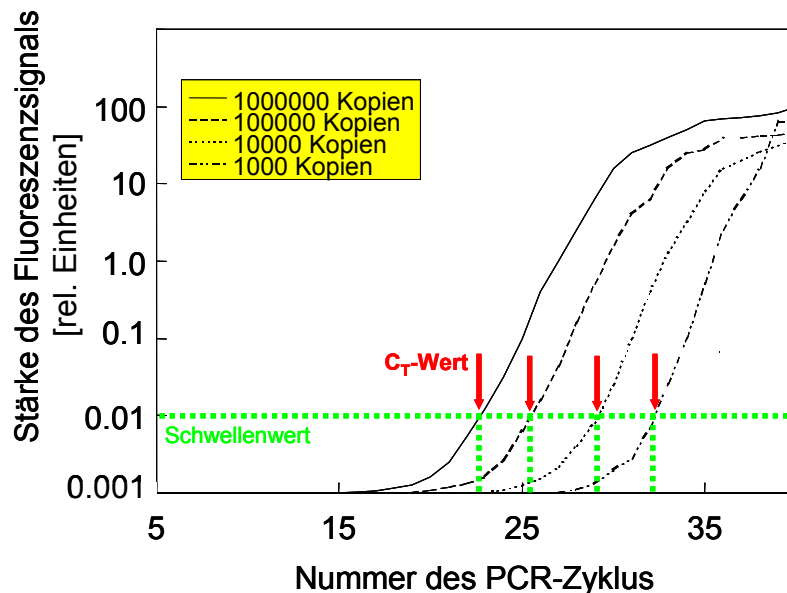
$$\text{Anzahl der Plasmide/ml} = \frac{6,023 \cdot 10^{23} (\text{mol}^{-1}) \cdot \text{Konzentration des Plasmids} (\mu\text{g ml}^{-1})}{\text{Anzahl der Basen des Plasmids} \cdot 308,95 (\text{durchschnittl. Basengewicht}) (\text{g mol}^{-1})} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Die Anzahl der Plasmide wurde dann auf  $10^8$  pro 5 µl eingestellt und über eine Verdünnungsreihe 1:10-Verdünnungen bis  $10^2$  Plasmide pro 5 µl hergestellt, die als Standard in drei Parallelen in die quantitative PCR eingesetzt wurden, um eine Eichgerade zu generieren. Zusätzlich wurden noch drei Ansätze „no template control“ (ohne DNA) und drei Ansätze „no amplification control“ (ohne Primer) gemessen. Die Ansätze mit den zu messenden Proben wurden ebenfalls in drei Parallelen wie die Ansätze mit den Eichlösungen nach folgendem Schema in 96 Well-Platten (Optical Reaction Plate, Applied Biosystems) pipettiert:

- 12,5 µl SYBR Green
- 7,5 µl Primer Mix (720 µl H<sub>2</sub>O + je 15 µl Forward und Reverse Primer [50 pmol µl<sup>-1</sup>])
- 5,0 µl cDNA oder Eichlösung

Anschließend wurden die Platten mit „Optical Adhesive Covers“ (Applied Biosystems) verschlossen und mit Hilfe des „GeneAmp 5700 Sequence Detection Systems“ (Applied Biosystems) gemessen. Dabei läuft eine normale PCR-Reaktion ab. Durch die Anwesenheit des SYBR Green-Farbstoffes, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und dabei ein Fluoreszenzsignal abgibt, kann ein Lichtsignal detektiert werden, dessen Intensität der

Menge an doppelsträngiger DNA entspricht. Mit der exponentiellen Zunahme der DNA von PCR-Zyklus zu PCR-Zyklus nimmt dieses Lichtsignal ebenso exponentiell mit jedem Zyklus zu, bis eine Sättigung eintritt, wenn keine Primer mehr vorhanden sind. Diese Sättigungskurve wird von jeder Probe aufgezeichnet. Zur Auswertung wird ein Schwellenwert festgesetzt, d.h. eine Lichtsignalstärke, bei der sich alle Proben in der exponentiellen Phase befinden. Diese Lichtsignalstärke wird bei jeder Probe nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen ( $C_T$ -Wert) erreicht, je nachdem, wie viele Kopien zu Beginn vorhanden waren (Abb. 2.4). Anhand der  $C_T$ -Werte der Eichlösungen wurde über das Software Programm GeneAmp 5700 SDS 1.3 (Applied Biosystems) eine Eichgerade erstellt, bei der den eingesetzten Kopienzahlen die ermittelten  $C_T$ -Werte gegenübergestellt werden. Über diese Eichgerade wurde dann die in den Proben vorhandene Ausgangsmenge des detektierten Gens anhand des  $C_T$ -Wertes ermittelt.



**Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Ermittlung des  $C_T$ -Wertes:** Der Schwellenwert für die Signalstärke wurde zum Beispiel bei 0,01 festgelegt. Diese Signalstärke wurde für die Eichprobe mit 1000000 Kopien (—) nach 22 PCR-Zyklen erreicht, für die Eichprobe mit 1000 Kopien (— . . —) nach 32 PCR-Zyklen ( $C_T$ -Wert). Aus den  $C_T$ -Werten der Eichproben ( $n = 3$ ) konnte eine Eichgerade erstellt werden. Anhand des  $C_T$ -Wertes einer gemessenen Probe ( $n = 3$ ) konnte dann auf die Kopienzahl in der Probe geschlossen werden.

Um die in den einzelnen Proben ermittelten Expressionsraten des Gens von Interesse miteinander vergleichen zu können, müssen diese normalisiert werden. Deshalb wurde für jede Probe zusätzlich zur Expression der *ispS* auch die eines sogenannten „housekeeping genes“ gemessen, ein Gen, das in immer gleichem Maße exprimiert wird und das als Bezugsgröße verwendet werden kann. Für *A. thaliana* wurde dafür das Gen für das Actin 2

(ACT2) (EMBL-Nr.: ATU 41998) verwendet. Die dafür benötigten Primer wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Flügge, Botanisches Institut der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

#### 2.3.1.1 Zellaufschluss von *E. coli*

Die über Expressionsvektoren (pQE 30, 50 und 60) Proteine produzierenden *E. coli*-Zellen wurden nach einer Wachstumszeit von 16 Stunden bei 37°C in 5 ml-Vorkultur mit Antibiotikum und weiteren 3-4 Stunden in 100 ml LB ohne Antibiotikum über eine hydraulische Hochdruckpresse (French Pressure Cell Press, SLM Instruments Inc., Urbana, USA) aufgeschlossen. Dazu wurden die Bakterien vom Medium bei 2000 x *g* für 20 Minuten abzentrifugiert, das Sediment gewogen und die erhaltenen 0,5 bis 1 g Zellmasse in 5 ml Lysis-Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 5 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und eisgekühlt. Zum Zellaufschluss wurden die 5 ml zwei Mal mit einem Druck von 1000 bar durch die „French Press“ gequetscht. Dabei wurde immer auf Eis gearbeitet. Das Lysat wurde nach der zweiten Pressung für 20 Minuten bei 25000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, und der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde weiterverwendet oder zur späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.3.1.2 Reinigung His-Tag-markierter Isoprensynthase über Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Histidin-markierten Proteine erfolgte über Affinitätschromatographie. Dazu wurde der Kit QIAexpress Type IV der Firma Qiagen verwendet. Das Proteinlysate (2.3.1.1) wurde, wenn es gefroren war, nach dem Auftauen auf Eis zuerst noch einmal zentrifugiert, um denaturierte Proteine abzutrennen. Vier ml des Lysats wurden dann mit einem ml Ni-NTA-Agarose-Suspension vermischt und eine Stunde auf Eis inkubiert, wobei von Zeit zu Zeit geschwenkt wurde, damit die gesamte Oberfläche der Agarosekügelchen für die im Lysat schwimmenden Proteine zugänglich war und sich über die Histidine Ni-NTA-Proteinkomplexe bilden konnten. Anschließend wurde aus dem Gemisch eine Säule gegossen (1ml-Säule, Qiagen). Nachdem sich die Agarose luftblasenfrei abgesetzt hatte, wurde der noch verschlossene Ablauf der Säule geöffnet, so dass der Überstand durchsickern konnte. Anschließend wurde die Säule zwei Mal mit 4 ml Waschpuffer (50 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 5 mM β-Mercaptoethanol) gespült und mit vier Mal 0,5 ml Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 5 mM β-Mercaptoethanol) wurden dann die gebundenen Histidin-markierten Proteine von der Säule gelöst. Es wurde darauf geachtet, dass das Säulenbett nie ganz trocken fiel.

Um die gereinigten Proteine in den für Enzymtests benötigten ISB-Puffer (LEHNING ET AL. (1999): 0,05 M Tris-HCl, pH 8,5; 0,02 M MgCl<sub>2</sub>; 5 % (v/v) Glycerin; 2 mM DTT) zu überführen, wurden sie über Gelfiltrationssäulen (PD 10, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), die mit Sephadex G-25M gepackt waren, umgepuffert. Die Säulen wurden mit 25 ml des gewünschten Puffers equilibriert, dann wurden die 2 ml Eluat aus der Proteinreinigung auf die Säule gegeben und anschließend mit 3,5 ml des gewünschten Puffers eluiert.

### 2.3.1.3 Zellaufschluss von Blättern

Der Zellaufschluss von Blättern erfolgte nach dem in der Arbeitsgruppe für Pappel etablierten Verfahren (MAYRHOFER unveröffentlicht), jedoch mit geringerer Blattmenge. Hierzu wurden 50 mg frisches Blattmaterial unter Stickstoff gemörsernt und in 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 % (v/v) Glycerin; 0,1 % Tween 80; 20 mM DTT), dem zuvor 50 mg PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) zugegeben worden war, aufgenommen. Die Ansätze wurden 15 Minuten auf Eis gerührt und dann bei 25000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand von 0,5 ml wurde über NAP-5 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) in den für Enzymtests benötigten Puffer ISB-Puffer (s. 2.3.1.2) umgepuffert. Dazu wurden die Säulchen mit ISB equilibriert, dann 0,5 ml Lysat aufgetragen und mit 1 ml ISB eluiert.

### 2.3.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach BRADFORD (1976). Sie beruht auf der Komplexbildung von Proteinmolekülen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, die eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm zur Folge hat. Die Absorptionsänderung ist bei Werten bis 0,6 proportional zur Proteinmenge. Die Intensität der Färbung hängt jedoch von der Art des Proteins ab. Da als Kalibrierstandard BSA verwendet wurde, sind die Proteinkonzentrationen als BSA-Äquivalente zu verstehen. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe eines Plattenphotometers (Spectra Image, SLT, Crailsheim, Deutschland) und einer Mikrottestplatte aus Quarzglas (Hellma, Müllheim, Deutschland) mit 8 mal 12 300 µl-Näpfcchen durchgeführt. Je 10 µl der zu messenden Lösungen wurden in drei Parallelen in die Näpfcchen pipettiert und je 300 µl Coomassie-Lösung (0,01 % (w/v) CBB G-250 in 5 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) 85 %ige o-Phosphorsäure;

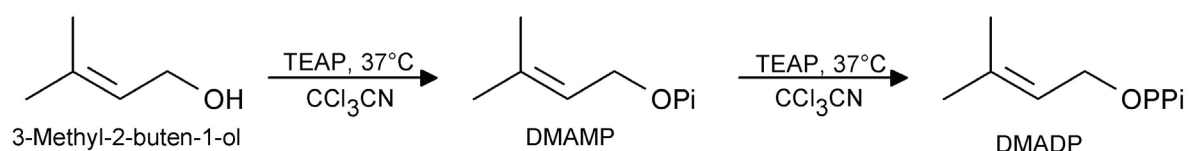
85 % H<sub>2</sub>O bidest.; zweifach filtriert) zugegeben. Nach 10 Minuten wurde dann die Extinktion bei 592 nm gemessen. Als Nullwert wurden 10 µl bidestilliertes Wasser mit 300 µl Coomassie-Lösung gemessen. Für jede Messung wurde eine Standard-Kurve erstellt, für die BSA-Lösungen der Konzentrationen 25, 50, 75 und 100 µg ml<sup>-1</sup> eingesetzt wurden. Es wurden auch hiervon je 10 µl in drei Parallelen gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve konnte dann die Proteinkonzentration in den Proben berechnet werden.

### 2.3.2 Messung der Isoprensynthaseaktivität

Die Messung der ISPS-Aktivität erfolgte anhand der produzierten Isoprenmenge, die über Gaschromatographie bestimmt wurde. Dazu wurde die Isoprenproduktion des isolierten Enzyms in einem einfachen Enzymtest bestimmt.

#### 2.3.2.1 Synthese von DMADP

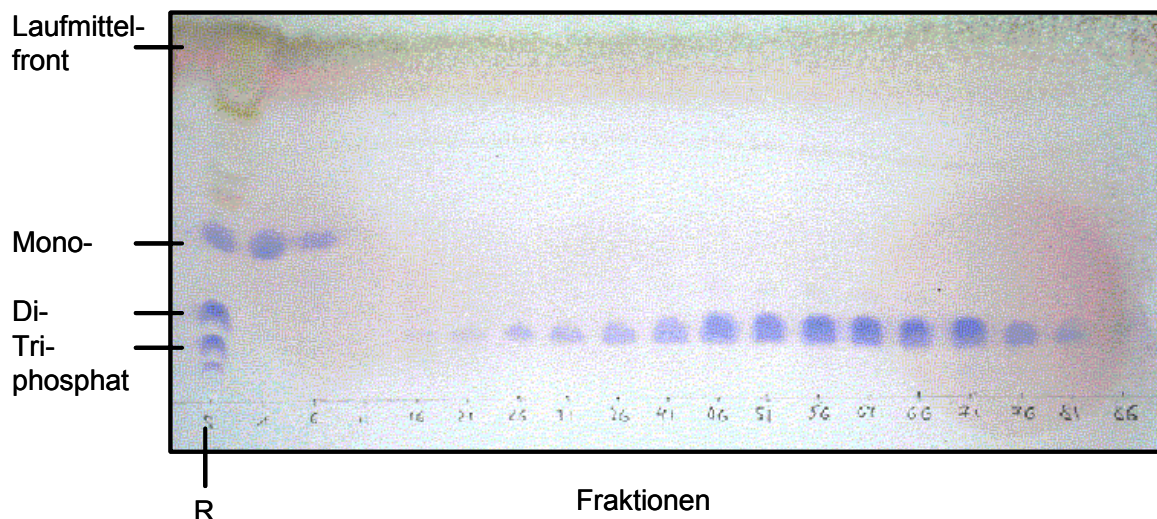
Für den *in vitro*-Aktivitätstest der ISPS war DMADP (Dimethylallyl-diphosphat) als Substrat nötig, das selbst hergestellt wurde. Die Synthese erfolgte nach der von KELLER & THOMPSON 1993 veröffentlichten Methode. Sämtliche Reaktions- und Reinigungsschritte wurden in silanisierten Gefäßen durchgeführt, die hierzu mit einer 20 %igen (v/v) Lösung von Dichlordimethylsilan in Pentan behandelt worden waren. Vor der eigentlichen Synthese wurde zuerst eine Lösung von bis-(Triethylamino)orthosphosphat (TEAP) in Acetonitril hergestellt. Dafür wurden eine Lösung von 5 ml 85 %iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in 18,8 ml Acetonitril und eine Lösung von 22 ml Triethylamin in 20 ml Acetonitril vorsichtig in einem 100 ml-Rundkolben zusammengegeben. Für die eigentliche Synthese des DMADP wurden 360 µl 3-Methyl-2-buten-1-ol in einem 50 ml Rundkolben vorgelegt und langsam zuerst 9 ml Trichloracetonitril und anschließend 9 ml TEAP zugegeben. Dann wurde der Ansatz bei 37°C gerührt, während in 5minütigen Abständen noch zweimal 9 ml TEAP zugegeben wurde und am Ende noch 5 Minuten weiter inkubiert wurde.



**Abb. 2.5:** Reaktionsschema der Synthese von DMADP aus 3-Methyl-2-buten-1-ol (nach BRÜGGEMANN 2002).

Da bei dieser Reaktion (Abb. 2.5) nicht nur Dimethylallyldiphosphat, sondern auch –mono- und –triphosphat entsteht, wurde der Ansatz im Anschluss über eine Kieselgelsäule (3,5 cm x 50 cm, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) aufgetrennt. Das Packbett

bestand aus 400 ml Kieselgel, das zuvor mit 300 ml einer 12:5:1 (v:v:v) Mischung von Isopropanol, 25 %igem Ammoniak und Wasser (Laufmittel) aufgeschlemmt worden war. Die Säule wurde unten mit Glaswolle und Quarzsand gestopft, am oberen Ende bildete eine einen Zentimeter dicke Quarzsandschicht den Abschluss. Es befand sich kein Laufmittelüberstand darüber, als der Reaktionsansatz aufgetragen wurde. Zur Eluierung der Phosphate wurden anschließend ca. drei Liter Laufmittel bei einer Flussrate von ca. 10 ml min<sup>-1</sup> in mehreren Portionen auf die Säule gegeben. Die ersten 800 ml des Durchflusses wurden verworfen, der Rest wurde in Fraktionen von 12 ml in Reagenzgläsern aufgefangen. Um zu testen, in welchen Fraktionen sich das gewünschte Diphosphat befindet, wurde ein Aliquot jeder fünften Fraktion auf eine mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatte (60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen und über Dünnschichtchromatografie aufgetrennt (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6: Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung von DMADP:** Es wurden je 30 µl jeder fünften Fraktion aus der Flash-Chromatographie auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Als Standard wurden 15 µl des Reaktionsansatzes zur DMADP-Synthese aufgetragen (R). Die Chromatographie mit TCL-Laufmittel dauerte 2 Stunden. Die Phosphate wurden anschließend durch Blaufärbung mit Anisaldehyd-Reagenz nachgewiesen. Zur Gewinnung von DMADP wurden schließlich die Fraktionen 25 bis 85 verwendet.

Das Laufmittel hierfür bestand aus den gleichen Komponenten wie das Laufmittel der Säule, jedoch im Verhältnis 6:3:1 (v:v:v). Die Phosphate wurden auf den getrockneten Platten durch Aufsprühen eines *p*-Anisaldehyd-Reagenz (90 % (v/v) Ethanol; 5 % (v/v) konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5 % (v/v) *p*-Anisaldehyd, in dieser Reihenfolge zusammengegeben!), das mit einem Föhn eingetrocknet wurde, sichtbar gemacht. Zusätzlich zu den Fraktionen war ein Aliquot des zu trennenden Reaktionsansatzes aufgetragen worden, an dem die Laufweite der verschiedenen Phosphate abgelesen werden konnte. Die ersten etwa zehn Fraktionen enthielten das schneller laufende Monophosphat, die Fraktionen 25 bis 85 das gewünschte

Diphosphat, danach wurde noch das langsam laufende Triphosphat eluiert. Die Fraktionen 25 bis 85 wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer (VV2000, Heidolph, Schwabach, Deutschland) reduziert auf ein geringes Volumen, das anschließend gefriergetrocknet (Gefrier Trocknung Alpha I-5, Christ, Osterode, Deutschland), aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert wurde.

### 2.3.2.2 Standardenzymtest der Isoprensynthase

Zum Funktionsnachweis der Enzymderivate der ISPS wurde ein *in vitro*- Standardenzymtest angewendet, der zur Charakterisierung der ISPS und ihrer Derivate in den verschiedenen Parametern abgewandelt wurde (nach LEHNING 1999).

Dazu wurden maximal 88 µl Proteinextrakt (umgepuffert in ISB (2.3.1.2)) mit 10 µl 0,1 M DMADP (in ISB) und 2 µl 2 M MgCl<sub>2</sub> in 2 ml-Probenfläschchen (Supelco, Deisenhofen, Deutschland) zu 100 µl Gesamtansatz zusammenpipettiert. Wenn weniger als 88 µl Proteinextrakt eingesetzt wurde, wurde der Rest durch ISB ersetzt. Die enzymatische Reaktion wurde immer durch den Zusatz von DMADP gestartet, und die Probenfläschchen wurden anschließend sofort mit einem Aluminiumklemmdeckel mit Teflonseptum (Supelco, Deisenhofen, Deutschland) gasdicht verschlossen und im Wasserbad für eine Stunde bei 40°C inkubiert. Zur biochemischen Charakterisierung der ISPS wurde jeweils einer der Parameter wie Temperatur, pH-Wert oder DMADP-Konzentration variiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz mit einer 250 µl gasdichten Spritze (Hamilton, Reno, NV, USA), mit der durch das Septum durchgestochen wurde, abgesaugt und das Gefäß mit einer weiteren Spritze mit bidestilliertem Wasser nachgespült, um die Reaktion zu stoppen. Das entstandene leicht flüchtige Isopren konnte dann gaschromatographisch über „head space“ Analyse detektiert und quantifiziert werden.

### 2.3.2.3 Nachweis von Isopren über gaschromatographische „head space“ Analyse

Der Nachweis und die Quantifizierung des Isoprens, das bei den oben beschriebenen Enzymtests gebildet wurde, erfolgte am Gaschromatographen (GC) vom Typ Varian Star 3400 (Varian, Darmstadt) über einen Flammenionisationsdetektor (FID) (nach LEHNING 1999). Das Gerät war mit einem Multi-Purpose-Autosampler (MPS, Gerstel, Mühlheim, Deutschland) mit Probenteller für 100 Proben und einem Kaltaufgabesystem (KAS 3, Gerstel) ausgestattet. Zur Trennung der Gaskomponenten waren zwei Säulen hintereinander geschaltet: Säule 1 mit 25 m Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KCl, Durchmesser 0,53 mm, Filmdicke 10 µm und Säule 2 mit 25 m CP-SIL 13CB, Durchmesser 0,53 mm, Filmdicke 2 µm (Chrompack, Frankfurt, Deutschland). Von jeder Probe wurden standardmäßig durch den MPS 0,5 ml zur Analyse



entnommen und auf das mit flüssigem Stickstoff auf  $-100^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte, mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gefüllte Adsorptionsröhrchen des KAS aufgegeben. Dort wurden alle in der Probe enthaltenen Substanzen, deren Siedepunkt über  $-100^{\circ}\text{C}$  liegt, konzentriert und dann durch rasches Aufheizen auf  $240^{\circ}\text{C}$  mit einer Heizrate von  $10^{\circ}\text{C}$  pro Minute wieder desorbiert, so dass die Substanzen konzentriert auf die  $140^{\circ}\text{C}$  warme Trennsäule gelangten. Die Temperatur der Trennsäule wurde für 30 Sekunden gehalten, dann mit einer Heizrate von  $6^{\circ}\text{C}$  pro Minute auf  $200^{\circ}\text{C}$  erhöht und anschließend für 2 Minuten gehalten. Die Flussrate des Trägergases Wasserstoff betrug  $4 \text{ ml min}^{-1}$ . Die Detektion der so getrennten Substanzen erfolgte durch Flammenionisation in einem Flammenionisationsdetektor (FID) bei  $250^{\circ}\text{C}$ . Der Gasfluss im FID betrug  $30 \text{ ml pro Minute}$  für Stickstoff und Wasserstoff (beide 5.0, Messer Griesheim, Krefeld, Deutschland) und  $300 \text{ ml pro Minute}$  für die synthetische Luft (Messer Griesheim).

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über das Softwareprogramm Apex (Autochrome Inc., Milford, USA). Zur Quantifizierung des Isoprens wurden vor jeder Messreihe sechs Probengefäße mit Isoprenstandard ( $9,43 \text{ ppm}$ , entspricht  $684 \text{ pmol}$  Isopren pro Probengefäß bei einem Probengefäßvolumen von  $1,922 \text{ ml}$ ) gemessen, anhand deren Chromatogramme die Retentionszeit für Isopren abgelesen werden konnte. Die Fläche des Signals ist außerdem proportional zur Menge an Isopren, die injiziert wurde. So konnte anhand der gemessenen Standards die Stoffmenge ermittelt werden, die einer Flächeneinheit entspricht. Die Isoprenmenge der gemessenen Proben konnte dann durch Multiplikation dieses Wertes mit den gemessenen Flächeneinheiten ermittelt werden. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der ISPS in  $\text{nkat}$  ( $\text{nmol s}^{-1}$ ) musste dieser Wert ins Verhältnis zur Inkubationszeit gesetzt werden. Um die Menge des gesamten gebildeten Isoprens pro Probengefäß zu erhalten, wurde mit dem Verhältnis von Gesamtvolumen des Probengefäßes mit Spritzenvolumen zum injizierten Teilvolumen multipliziert (Gl. 2.2).

$$z \text{ (nkat)} = (\text{nmol s}^{-1}) \frac{S_{\text{ISO}} \cdot FE_{\text{ISO}}}{FE_{\text{S}} \cdot T} \cdot \frac{V_{\text{g}}}{V_{\text{i}}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$S_{\text{ISO}}$	=	Stoffmenge Isopren des eingesetzten Prüfgasgemisches (nmol)
$FE_{\text{S}}$	=	Flächeneinheit von $S_{\text{ISO}}$
$FE_{\text{ISO}}$	=	Flächeneinheit der Probe nach Abzug des Blindwerts
$T$	=	Inkubationszeit des Tests (s)
$V_{\text{i}}$	=	Injektionsvolumen (ml)
$V_{\text{g}}$	=	Gesamtvolumen bei aufgezogener Injektionsspritze (ml)
$z$	=	spezifische Aktivität (nkat)

Das Ergebnis wurde auf die eingesetzte Proteinmenge im Test bezogen.

### 2.3.2.4 Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Isoprensynthase mittels Gelfiltration über Superdex 200 HR 10/30

Zur Ermittlung des nativen Molekulargewichts wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Bei dieser Methode wurden die Proteine durch die unterschiedliche Verteilung zwischen Gelmaterial und Fließmittel aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße der Größe nach eluiert. Die dafür eingesetzte FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) setzte sich zusammen aus einem Gradientenprogrammierer (LCC-500), zwei Peristaltikpumpen (P-500) und einem Fraktionssammler (FRAC-100), außerdem aus den bei 4°C gekühlten Komponenten Injektor, Gradientenmischer (MV-7), Superdex 200-Säule (HR/ 10/30, Amersham Pharmacia Biotech) und UV-Detektor (Monitor UV-M). Pufferbehälter und Fraktionssammler wurden mit Eis gekühlt. Die Säule hatte einen Trennbereich von 10 bis 600 kDa für globuläre Proteine. Sie wurde mit 50 ml Elutionspuffer (50 mM Tris, pH 8; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl; 5 % Glycerin; 2 mM DTT) äquilibriert, dann wurden 200 µl Probe aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,4 ml pro Minute chromatographiert. Das Eluat wurde in 400 µl-Fraktionen aufgefangen und anschließend die ISPS-Aktivität der Fraktionen bestimmt.

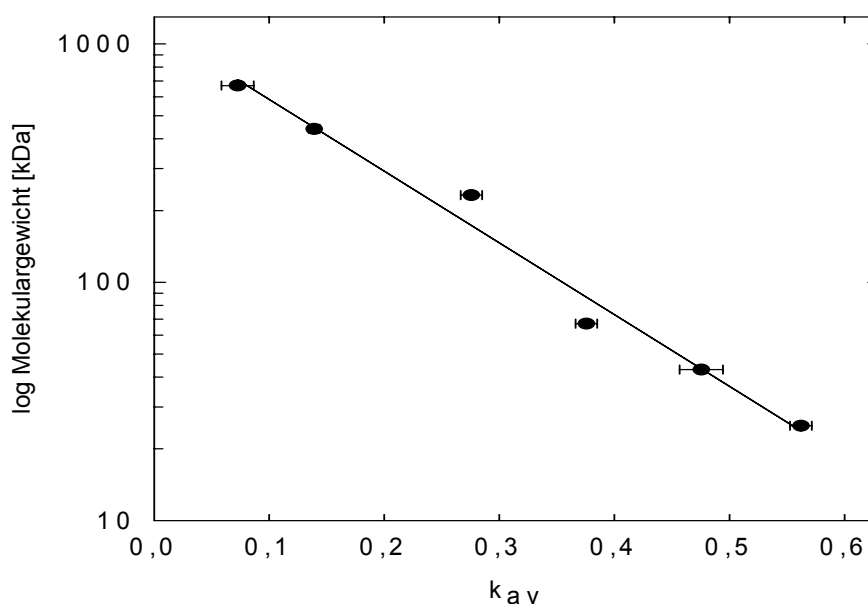
Zur Eichung der Trennsäule wurden zuerst Standardproteine (Amersham Pharmacia Biotech) bekannter Größe filtriert: Chymotrypsinogen A (25 kDa; 2 mg ml<sup>-1</sup>), Ovalbumin (43 kDa; 2 mg ml<sup>-1</sup>), BSA (67 kDa, 2 mg ml<sup>-1</sup>), Katalase (232 kDa, 2,5 mg ml<sup>-1</sup>), Ferritin ( 440 kDa, 0,7 mg ml<sup>-1</sup>) und Thyroglobulin (669 kDa, 3 mg ml<sup>-1</sup>). Es wurden je 200 µl der Lösungen unter analogen Bedingungen chromatographiert und bei 280 nm detektiert. Über die erhaltenen Elutionsvolumina der verschiedenen Eichproteine konnte dann über folgende Formel (Gl. 2.3) der jeweilige Verteilungskoeffizient ( $k_{av}$ -Wert) berechnet werden und eine Eichgerade erstellt werden (Abb. 2.7):

$$k_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

$v_e$ = Elutionsvolumen des Eichproteins

$v_o$ = Ausschlussvolumen der Säule

$v_t$ = Gesamtvolumen der Säule



**Abb. 2.7: Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration.** Kalibrierung der Trennsäule mit Molekulargewichtsstandards bei einer Flussrate von  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ . Die Eichgerade wurde aus den als  $k_{av}$ -Werte dargestellten Elutionsvolumina der Eichproteine erstellt. Der Regressionskoeffizient ( $r^2$ ) der linearen Regression beträgt 0,98. Über diese Eichgerade konnte das native Molekulargewicht der ISPS und das ihrer Derivate ermittelt werden.

Das Ausschlussvolumen der Säule wurde mit Blue Dextran (Amersham Pharmacia Biotech) auf 8,86 ml bestimmt, das Gesamtvolumen der Säule von 23,88 ml wurde über den Radius und die Höhe des Gelbettes berechnet.

### 2.3.3 Bestimmung des DMADP-Gehalts in Blättern von *A. thaliana*

Die Bestimmung des DMADP-Gehalts in Blättern wurde nach der von BRÜGGEMANN (2002) entwickelten Methode durchgeführt, bei der man sich die Säurelabilität des DMADP zu nutze macht. Bei sinkendem pH-Wert und steigenden Temperaturen nimmt die Tendenz zur Abspaltung der Phosphatgruppe aufgrund des Allylsystems zu. Das dadurch entstehende Isopren geht wegen seines niedrigen Siedepunktes sofort in die Gasphase über, wodurch das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Isoprens verschoben wird.

Für die Bestimmung des DMADP-Gehalts in Blattproben wurden diese frisch geerntet sofort in Stickstoff gefroren, gemörsert und anschließend gefriergetrocknet. Von dem lyophilisierten Blattpulver wurden dann 5 mal jeweils ca. 10 mg in ein 2 ml-GC-Gläschen (Supelco) eingewogen, wobei das genaue Gewicht notiert wurde, und nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  8,95 %iger *o*-Phosphorsäure wurden diese gasdicht mit einem Deckel mit Teflonseptum (Supelco) verschlossen und vorsichtig geschüttelt. Nach anschließender Inkubation der Ansätze für 60 min bei  $70^\circ\text{C}$  und Abkühlen für 3 Minuten auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von

100 µl 9,2 normaler NaOH, mit einer gasdichten Spritze durch das Septum hindurch, gestoppt und das entstandene Isopren am GC quantifiziert (2.3.2.3).

Da jedoch niemals eine hundertprozentige Hydrolyse erfolgt, bei der ein Mol DMADP in ein Mol Isopren umgesetzt wird, wurde eine Eichreihe mit festen DMADP-Konzentrationen erstellt, um zu ermitteln, wie hoch die Wiederfindungsrate ist, d.h. wieviel Prozent des eingesetzten DMADP als Isopren nachgewiesen werden kann. Dazu wurden in 5 Parallelen je 10 µl von DMADP-Stammlösungen der Konzentrationen 0, 25, 50, 100, 250 und 500 µM in 2 ml-GC-Reaktionsgefäßen vorgelegt und wie die Blattproben behandelt. Die erhaltene Menge an Isopren wurde dann gegen die eingesetzte Menge DMADP aufgetragen (Abb. 2.8). Die Wiederfindungsrate kann an der Steigung der linearen Regression abgelesen werden: Eine hundertprozentige Hydrolyse entspräche einer Steigung von 1, die hier gefundene Steigung von gerundet 0,2 entspricht einer Hydrolyse von 20,6 %. Da das Blattmaterial einen Einfluss auf die chemische Reaktion haben kann, wurden außerdem Ansätze für eine weitere Eichreihe mit zusätzlich ca. 10 mg Blattpulver gemessen, um diesen Effekt zu berücksichtigen. Da das Blattpulver an sich jedoch auch DMADP enthält, wurden die Werte auf folgende Weise korrigiert:

Zuerst wurden die Ansätze mit Blattproben ohne DMADP-Zugabe (Blindwert) normiert auf je 10 mg Blattpulver (Gl. 2.4).

$$FE_{0, \text{norm}} = \frac{FE_0 \cdot 10 \text{ mg}}{EW_0} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Dann wurden mit diesen Flächeneinheiten, die dem im Blattpulver enthaltenen DMADP entsprechen, die Proben mit Blattpulver und DMADP entsprechend ihrer Einwaage korrigiert, um nur den Effekt, den das Blattpulver an sich auf die chemische Reaktion hat, zu ermitteln (Gl. 2.5).

$$FE_{\text{korr}} = FE_{\text{Probe}} - \frac{FE_{0, \text{norm}} \cdot EW}{10 \text{ mg}} + \overline{FE_{0, \text{norm}}} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

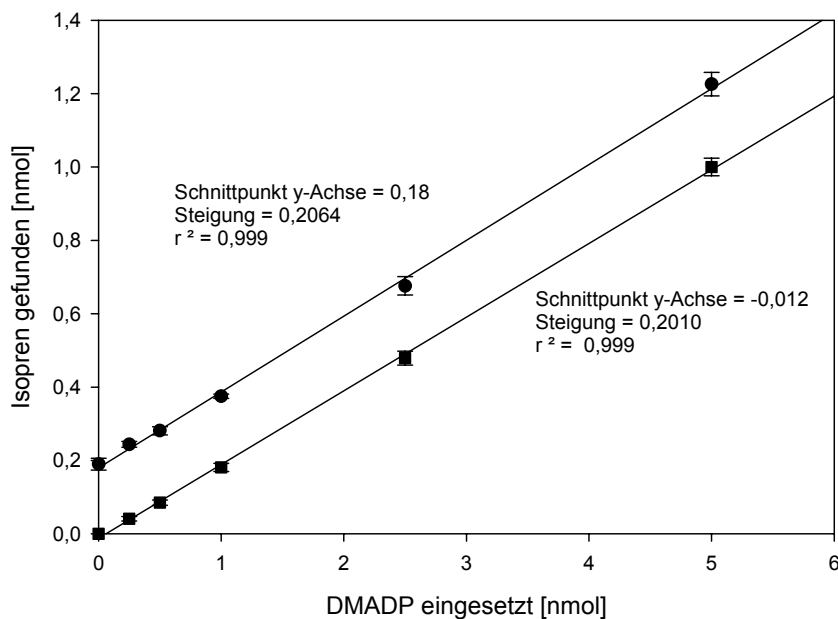
$FE_0$	=	Flächeneinheiten des Blindwerts ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
$EW_0$	=	Einwaage des Blindwerts (mg)
$FE_{0, \text{norm}}$	=	Flächeneinheit des Blindwerts, auf 20 mg Einwaage normiert ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
$FE_{\text{Probe}}$	=	Flächeneinheiten der Probe mit DMADP ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
$\overline{FE_{0, \text{norm}}}$	=	Mittelwert der Flächeneinheiten der Blindwerte ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
$EW$	=	Einwaage der Probe mit DMADP (mg)
$FE_{\text{korr}}$	=	Flächeneinheiten der Probe, normiert auf 20 mg Einwaage, korrigiert mit dem Mittelwert der Blindwerte ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )

Die so korrigierten Flächeneinheiten wurden dann mit folgender Formel (Gl. 2.6) in Isoprenmengen umgerechnet:

$$n_{\text{iso}} = \frac{C_{\text{Std}} \cdot V_{\text{Vial}} \cdot FE_{\text{korr}}}{V_{\text{mol}} \cdot FE_{\text{Std}}} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

$n_{\text{iso}}$	= gebildete Isoprenmenge (nmol)
$C_{\text{Std}}$	= Konzentration des Isoprenstandards (ppmv)
$V_{\text{Vial}}$	= durchschnittliches Volumen eines GC-Reaktionsgefäßes (ml)
$V_{\text{mol}}$	= Molvolumen eines idealen Gases unter Standardbedingungen ( $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
$FE_{\text{Std}}$	= Flächeneinheiten des analysierten Isoprenstandards ( $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ )

Die Flächeneinheiten der Kontrollen ohne Blattmaterial wurden auf 10 mg normiert unkorrigiert in die Gleichung eingesetzt. Die so erhaltenen Isoprenmengen wurden dann gegen die eingesetzte DMADP-Menge aufgetragen. Die Steigung der linearen Regression betrug für die Proben ohne Blattmaterial 20,1 %, für die Proben mit Blattmaterial 20,6 %, die beiden Geraden liegen praktisch parallel. Das bedeutet, *A. thaliana*-Blattmaterial hat keinen Einfluss auf die Hydrolyse, bei Zugabe von Blattmaterial ergibt sich keine Einbuße in der Effizienz der Hydrolyse, sie beträgt 100 % im Vergleich zur Hydrolyse ohne Blattmaterial.



**Abb. 2.8: Kalibrationsgeraden der sauren Hydrolyse von DMADP in ■ Abwesenheit und in ● Anwesenheit von Blattmaterial.** Die lineare Regression ergab für die Kontrollen ohne Blattmaterial  $y = 0,201x - 0,012$  und für die Proben mit Blattmaterial  $y = 0,2064x + 0,18$  ( $n = 5 \pm \text{SD}$ ).

Mit Hilfe der Geradengleichung und den x- und y-Werten konnte außerdem die durchschnittliche Wiederfindungsrate der einzelnen Proben mit bestimmter DMADP-Zugabe ermittelt werden. Im Bereich  $<25$  nmol liegt sie etwas höher als die errechneten 20,6 %.

Zur Ermittlung des Gehaltes an DMADP in Blattproben wurden die gemessenen Flächeneinheiten in Isoprenmengen umgerechnet (Gl. 2.6), und dieser Wert als 20,6 % des tatsächlich vorhandenen DMADP genommen.

## **2.4 Versuchsaufbau zur Messung der Isoprenemission von transgenen *E. coli*-Kulturen und *A. thaliana***

### **2.4.1 *In vivo* Nachweis der Isoprenbildung transgener *E. coli*-Kulturen**

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der *ispS*-Gene derivate wurden diese heterolog in *E. coli* mit Hilfe des Expressionsvektors pQE exprimiert und die Isoprenbildung der transgenen Bakterien gemessen und mit der Isoprenbildung transgener Bakterien verglichen, die die unveränderte *ispS* aus der Pappel exprimiert hatten (MILLER 2001). Dazu wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme mit entsprechenden Antibiotika angesetzt, von denen am nächsten Tag je drei Mal 250 µl in ein 2 ml-GC-Probengefäß pipettiert wurden und je 750 µl frisches LB-Medium zugegeben wurde. Gasdicht verschlossen (s.2.3.2.3) wurden die Proben für 6 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler bei 120 Upm inkubiert, dann wurden die Bakterien abgesaugt, 1:10 verdünnt und ihre optische Dichte bei 600 nm gemessen. Das produzierte Isopren wurde dann am GC gemessen (2.3.2.3) und auf OD<sub>600</sub>=1 normiert. Es wurden zusätzlich Proben angesetzt, bei denen dem frischen LB-Medium 32 µg ml<sup>-1</sup> IPTG zugesetzt wurden, um die Expressionsrate zu steigern. Außerdem wurden zusätzlich Bakterien verwendet, die bereits mit dem Gen (EMBL-Nr.: Y18874) für die DXS (Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase) im Expressionsvektor pGS72 transformiert waren (MILLER ET AL. 2000), dem limitierenden Eingangsenzym des MEP-Stoffwechsels, und dadurch mehr Substrat für die ISPS zur Verfügung stellten.

### **2.4.2 Messung der Isopren- und Monoterpenemission von *A. thaliana***

#### **2.4.2.1 Küvettenaufbau**

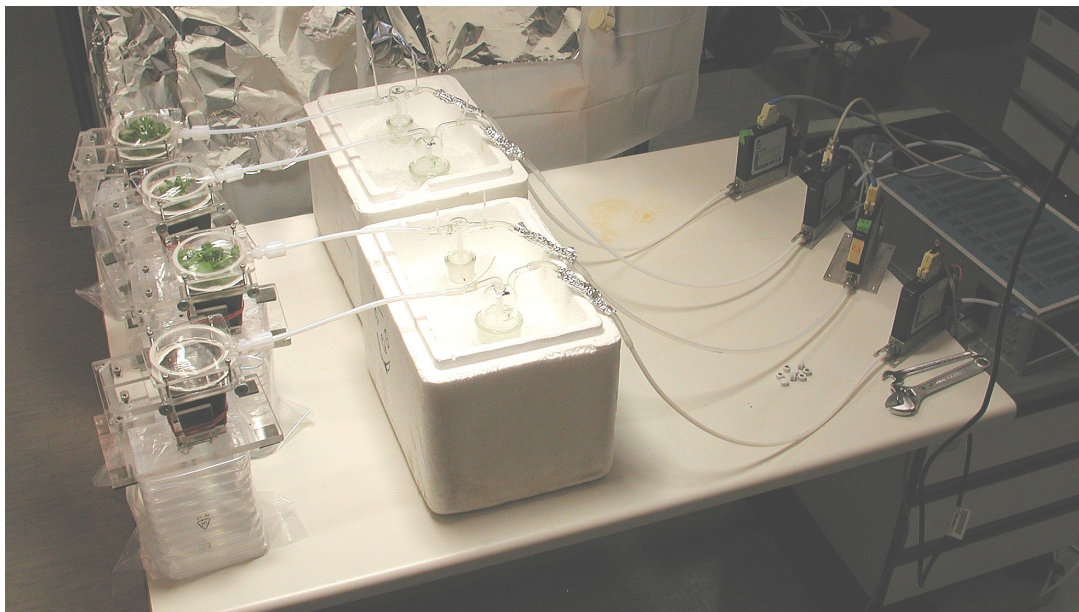
Um die Isoprenemission einer ganzen *A. thaliana*-Pflanze über mehrere Stunden messen zu können, wurden dafür geeignete Küvetten konstruiert, deren Gasraum kontinuierlich abgesaugt und über GC-MS-Röhrchen geleitet wurde, die das enthaltene Isopren absorbierten (2.4.2.2). Ähnliche Küvetten wurden auch von TOCQUIN & PÉRILLEUX (2004) konstruiert. Die Küvetten (Abb. 2.9) bestanden aus einer Halterung, in der ein 7 x 7 x 9 cm großer Pflanzcontainer mit einem Gummiband fixiert werden konnte. An der Oberkante des Containers schlossen zwei Plexiglasplatten das Substrat von der Blattrosette ab. Zum

Einspannen einer Pflanze konnten diese scherenartig auseinandergeklappt und anschließend mit zwei durchgehenden Schrauben wieder fixiert werden. In der Mitte befand sich eine kleine Aussparung für die Pflanze, deren Position nach vorne und hinten bzw. links und rechts durch Stellschrauben leicht verschoben werden konnte, falls sich die Pflanze nicht genau in der Mitte des Containers befand. Auf diese Plexiglasplatten wurde über die Pflanze ein Plexiglaszylinder mit einer weiteren Plexiglasscheibe gestülpt und mit vier Schrauben befestigt. Als Dichtmaterial wurde eine Teflonpaste (Roth) verwendet. Der Zylinder hatte eine Öffnung mit einem Gewinde, die über eine Swagelockdichtung mit einem Schlauch (beides aus Teflon) verbunden war, über den der Gasraum im Zylinder kontinuierlich abgesaugt werden konnte.



**Abb. 2.9:** Messküvette für die Bestimmung der Isoprenemission einer *A. thaliana*-Pflanze.

Dazu wurde eine Pumpe angeschlossen und über einen Massenflussregler (Mass Flow Controller, MFC) ein kontinuierlicher Gasfluss von 100 ml pro Minute eingestellt. Zwischen Küvette und MFC befanden sich die Sammelröhrchen (s. 2.4.2.2), vor die noch eine Kältefalle geschaltet war, um den Wassergehalt der Küvettenausgangsluft vor dem Durchleiten durch das Sammelröhrchen zu reduzieren. Ein zu hoher Wassergehalt der Röhrchen würde bei der anschließenden Messung der Sammelröhrchen am GC-MS stören. In der Kältefalle wurde die Luft über eine mit Eis gekühlte Waschflasche geleitet (Abb. 2.10).



**Abb. 2.10: Messaufbau zur Ermittlung der Isoprenabgabe von *A. thaliana*-Pflanzen.**

Die Küvettenausgangsluft wurde über einen Zeitraum von 4 bis 7 Stunden gesammelt. Die Pflanzen wurden dabei einer photosynthetischen Photonenflussdichte (PPFD) von ca.  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt. Parallel zu den Pflanzen wurde jeweils eine Küvette mit eingespanntem Pflanzcontainer ohne Pflanze nur mit Substrat, das ebenso gut durchfeuchtet war wie das der Pflanzen, gemessen und die dabei detektierte Menge an Isopren später bei der Auswertung als Hintergrundsignal abgezogen.

#### **2.4.2.2 Quantifizierung der Isopren- und Monoterpenemission von *A. thaliana* am GC-MS**

Für die Messung der Isoprenemission von *A. thaliana* wurde der Gasraum über der Pflanze für mehrere Stunden kontinuierlich abgesaugt und über Adsorberröhrchen geleitet, die das eventuell enthaltene Isopren aufnahmen und für einen längeren Zeitraum hielten, so dass es konzentriert in dem Röhrchen vorlag. Die Glasröhrchen waren mit Aktivkohlekügelchen in drei verschiedenen Größen, Carbotrap C (60 mg), Carbotrap (60 mg) und Carbopack X (90 mg) (Supelco) gefüllt und zur Lagerung im Kühlschrank mit Teflondichtungen (Swagelok, Solon, USA) verschlossen. Die Röhrchen wurden vor Gebrauch für 30 Minuten bei  $330^\circ\text{C}$  und einem Heliumfluss von 60 ml pro Minute konditioniert, dann wurde über einen Zeitraum von 4 bis 7 Stunden mit einer Flussrate von  $100 \text{ ml min}^{-1}$  gesammelt (2.4.2.1) und schließlich an einem Gaschromatographen, der mit FID und Massenspektrometer ausgestattet ist (GC-MS, ATD 400, Autosystem XL GC, Turbo Mass MS Spectrometer, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland), analysiert (SCHNITZLER ET AL. 2004B). Dabei erfolgte das Desorbieren des Isoprens vom Sammelröhrchen für 10 Minuten bei einem Heliumfluss von 60 ml pro Minute und  $280^\circ\text{C}$ . Durch eine Kältefalle von  $5^\circ\text{C}$  wurde es anschließend fokussiert. Im nächsten



Schritt wurde es bei 280°C und einem Fluss von 2 ml Helium pro Minute innerhalb von 20 Minuten auf die Trennsäule übertragen. Isopren, als Komponente mit niedrigem Siedepunkt, wurde über eine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KCl-Säule (Filmdicke 10 µm, Durchmesser 0,53 mm, Länge 30 m) abgetrennt und nur am FID analysiert. Das Trennprogramm bestand aus Aufheizen von 15 auf 50°C mit einer Heizrate von 10°C pro Minute und von 50 auf 200°C mit 5°C pro Minute. Die Temperatur von 200°C wurde dann für 21 Minuten gehalten, und das Isopren wurde am FID detektiert. Die Signale wurden mit der Software TurboMass 4.01 (PE Applied Biosystems) ausgewertet. Die Kalibrierung erfolgte über käuflich erwerbliche Isoprenstandards (Messer Griesheim). Die Monoterpene wurden über Massenspektrometrie detektiert. Dazu wurde der Gasstrom nach 5 min nicht mehr auf die Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säule geleitet, sondern über ein Vierwege-Ventil umgeleitet und zur Auftrennung auf eine C1-Säule (RTX-1701, Filmdicke 1 µm, innerer Durchmesser 0,25 mm, Länge 30 m) geleitet. Die Standards hierfür wurden über eine Diffusionstechnik (weiterentwickelt nach STEINBRECHER ET AL. 1994) gewonnen.

## 2.5 Verwendete Kits und Bioreagenzien

<i>A. thaliana</i> Columbia-0	Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA
Advantage 2 Polymerase-Mix	BD CLONTECH, Heidelberg, Deutschland
BigDye RR Terminator Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Cellulase „Onozuka R-10“	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DNA-Längenstand. 1kBp, 100Bp	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP	Gibco/Invitrogen
Ligase mit Puffer	Gibco/Invitrogen
Lysozym	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Macerozyme	Serva Elektrophoresis GmbH
Oligo-dT	Gibco/Invitrogen
Oligonukleotide	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
QIAexpress Type IV Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme mit Puffer	Gibco/Invitrogen MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reverse Transkriptase	Gibco/Invitrogen
RNase A	Boehringer

RNeasy Kit	Qiagen
Silwet L-77	Lehle Seeds
SYBR® Green PCR Master Mix	PE Applied Biosystems
Taq-Polymerase und Platinium Taq-Polymerase mit Puffer	Gibco/Invitrogen
TOPO TA Cloning	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOPO-Vektoren	Invitrogen
Vektor pBluescript	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vektoren pQE30, 50, 60	Qiagen

## 2.6 Verwendete Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien

Ampicillin	Boehringer
Anzuchterde Floradur	Floragard Vertriebs GmbH für Gartenbau, Oldenburg, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Serva Elektrophoresis GmbH
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva Elektrophoresis GmbH
Danklorix	Colgate-Palmolive, Hamburg, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Eisessig p.A.	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fluorescein-diacetat	Serva Elektrophoresis GmbH
Gentamicin	Sigma-Aldrich
Imidazol	Fluka Chemie AG
IPTG	Gibco/Invitrogen
Kanamycin, plant cell culture tested	Sigma-Aldrich
MS (Murashige und Skoog) mit Vitaminen Nr. 5519	Sigma-Aldrich
Natriumlauryl-Sulfat (SDS)	Fluka Chemie AG
Nylonnetze	Klein & Wieler OHG, Königswinter, Deutschland
Osmocote Langzeitdünger	Scotts Cetaflor GmbH & Co. KG, Ingelheim, Deutschland
Perlit	Kynol Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Phytagar	Gibco/Invitrogen
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich
Polyvinylpyrrolidon (PVPP)	Fluka Chemie AG
Quarzsand	Biersack Baustoffhandel, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland
Tetracyclin-Hydrochlorid	Boehringer
Tonerde	Ökohum GmbH, Herbertingen, Deutschland
TOPO-Vektoren	Invitrogen

Ultra Pure Agarose	Gibco/Invitrogen
Vermiculit	Kynol Europa GmbH

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

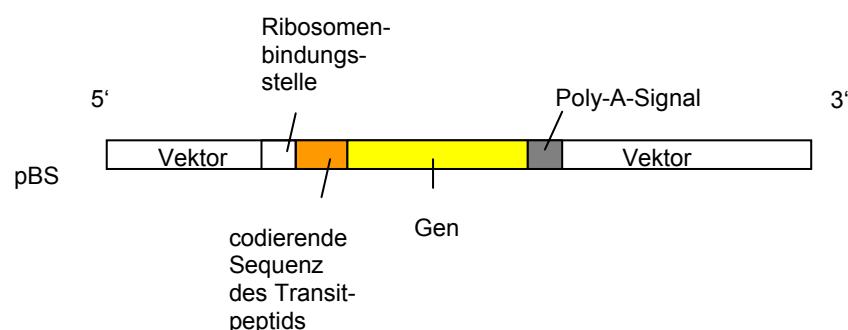


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellen von Derivaten des *ispS*-Gens

Ein Ziel der Arbeit war es, an das Isoprensynthaseprotein (ISPS) aus der Graupappel ein Epitop aus mehreren Aminosäuren anzufügen, welches die spätere Wiederfindung des Proteins durch spezifische, gegen das Epitop gerichtete Antikörper ermöglichen sollte. Zudem erlaubt diese Modifikation des Proteins seine schnelle Reinigung aus einem Proteingemisch mittels Affinitätschromatographie. Erste Versuche zur Markierung der ISPS wurden mit dem HA-Epitop durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Nonapeptid (YPYDVPDYA), dessen Nukleotidsequenz am 3'-codierenden Ende des Isoprensynthasegens (*ispS*) über molekularbiologische Methoden eingefügt wurde. Die Funktionsüberprüfung des heterolog in *E. coli* exprimierten Proteins ergab jedoch, dass diese Modifikation zu einem völligen Verlust der ISPS-Aktivität führte (Daten nicht gezeigt). Eine Alternative zu dieser Markierung stellte das Anfügen eines so genannten His-Tags, bestehend aus sechs aufeinander folgenden Histidinen (HHHHHH), dar. Von diesem kürzeren und weniger spezifischen Epitop erhoffte man sich einen geringeren Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Enzyms.

Das aus der Pappel isolierte *ispS*-Gen lag im Vektor pBS als cDNA vor und besteht aus drei Teilen (MILLER ET AL. 2001). Die ersten ca. 200 Basenpaare codieren ein Transitpeptid, der etwa 1650 Basenpaare große Mittelteil beinhaltet die Kernsequenz für das funktionelle Enzym, die eigentliche ISPS, daran schließt ein so genanntes Poly-Adenylierungs-Signal (Poly-A-Signal) an, das das Anhängen eines Poly-Adenosin-Endes an die mRNA bewirkt, jedoch nicht in Protein übersetzt wird (Abb. 3.1).

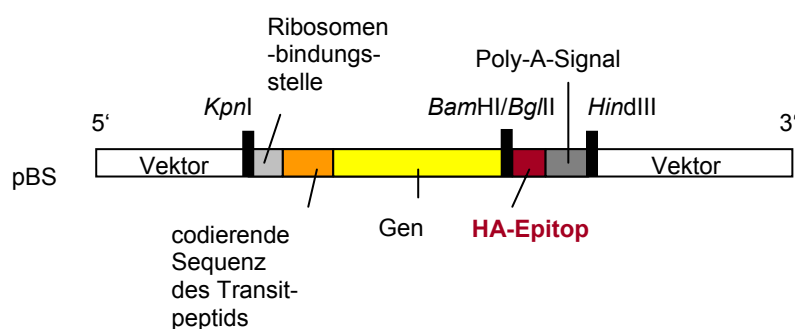


**Abb. 3.1: Schematischer Aufbau des *ispS*-Gens aus *Populus x canescens*.** Farblich dargestellt sind die zum Verständnis der Herstellung der Genderivate wichtigen Teilsequenzen, die codierende Sequenz für das Transitpeptid, die als eigentliches „Gen“ bezeichnete codierende Sequenz für das funktionelle Enzym und das Polyadenylierungssignal, das nicht translatiert wird. Das Gen wurde von MILLER (2001) aus der cDNA-Bank von *Populus x canescens* isoliert.

Zum Anfügen eines Epitops ist der Anfang des *ispS*-Gens wenig geeignet, da sich dort die Sequenz für das Transitpeptid befindet. Die ISPS ist kerncodiert, das Enzym wirkt aber im Chloroplasten. Das N-terminale Transitpeptid ist entscheidend für den Transport in den Chloroplasten, wo es abgespalten wird. Es ist nicht ganz sicher, wo genau das Protein durchgeschnitten wird und wo die Grenzen der codierenden Region im Gen sind. N-terminale Deletionen bei den verwandten Terpensynthasen lassen lediglich vermuten, dass das Transitpeptid vor einem konservierten RR-Motiv endet (BOHLMANN ET AL. 1998). Deshalb ist die Wahrscheinlichkeit zu groß, dass ein Epitop, das zwischen Transitpeptid und funktioneller ISPS eingefügt würde, bei der Prozessierung zerstört oder mit abgeschnitten würde. Daher musste auf Nukleinsäure-Ebene zwischen die codierende Region für die ISPS und das Poly-A-Signal das Epitop an das C-terminale Ende des Eiweißkörpers angehängt werden.

### 3.1.1 Markierung der vollständigen ISPS mit einem C-terminalen HA-Epitop

Zur Markierung der vollständigen ISPS mit einem C-terminalen HA-Epitop war es nötig, das Gen in zwei Teilen zu klonieren. Der erste Teil ist die codierende Region für das Transitpeptid mit Ribosomenbindungsstelle und für die ISPS, der zweite Teil besteht aus Epitop und Poly-A-Signal. Über PCR konnten diese beiden Teile mit entsprechend ausgewählten Oligonukleotiden (s. 2.2.2.1, Nr. 2/5 und Nr. 6/1) und dem aus der Pappel isolierten Gen als Template vervielfältigt werden. Der Anfangs-Primer des zweiten Teils beinhaltete zusätzlich zu der dem Gen komplementären Basenfolge die Sequenz für das Epitop. Außerdem besaß jedes Oligonukleotid eine ausgewählte Schnittstelle, die das spätere Umklonieren und Zusammenfügen der beiden Teile ermöglichte.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung des *ispS*-Genderivates mit HA-Epitop.** Die schwarzen Balken zeigen die eingefügten Schnittstellen an, die zur Ligation der in zwei Teilen klonierten Sequenz im Vektor pBS nötig waren. Rot dargestellt ist die neu eingefügte Sequenz, die für das HA-Epitop codiert.

Nach der PCR wurden die Produkte zunächst in den Vektor pCRII ligiert und dieser in *E. coli* 10F' kloniert. Die durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit und Vollständigkeit hin überprüften Teilsequenzen wurden schließlich nacheinander über mehrere Umklonierungsschritte im Vektor pBS zusammengefügt.

### 3.1.2 Markierung der vollständigen ISPS mit einem C-terminalen His-Tag

Die vollständige *ispS* mit codierender Sequenz für einen His-Tag wurde in drei Teilen kloniert, da in einem ersten Schritt die Überprüfung der Funktionsfähigkeit in *E. coli* vorgezogen wurde, wozu ein Expressionsvektor, der bereits einen His-Tag im Anschluss an die MCS enthielt, genutzt werden konnte und die *ispS*-Gensequenz ohne Sequenz für das Transitpeptid und ohne Poly-A-Signal davor eingefügt werden konnte. Dieser Mittelteil lag bereits aus einer anderen Arbeit (ZIMMER nicht publiziert) im Vektor pCRII mit passenden Schnittstellen vor, so dass er über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pQE60 vor den His-Tag inkloniert werden konnte. Anschließend wurde das vollständige *ispS*-Gen, wie es für die Transformation von *A. thaliana* benötigt wurde, zusammengesetzt. Es bestand aus der Kern-*ispS*, die in *E. coli* auf ihre Funktionalität überprüft wurde, der Anfangssequenz, bestehend aus Ribosomenbindungsstelle und codierender Sequenz für das Transitpeptid und dem Poly-A-Signal mit davor eingefügtem His-Tag. Diese beiden Teile, Anfangssequenz und Poly-A-Signal mit His-Tag, wurden mit passenden Primern (s. 2.2.2.1: Nr. 2/3 und Nr. 14/1), denen die erforderlichen Schnittstellen angefügt wurden (*Kpn*I/*Nco*I und *Bam*HI/*Hind*III), über PCR hergestellt und zuerst in den Vektor pCRII kloniert. Nach der Sequenzanalyse wurden die Einzelteile im Vektor pBS zusammengefügt (Abb. 3.3).

```

KpnI           is_Anfang (1 → 29)
GGTACCGAGAGAGAGAAAATCCTGCTGCAGTTTCCATTACTAGAGGCATGGCAACTGAATTATTGT 60
GCTTGCACCGTCCAATCTCACTGACACACAAACTGTTTCAGAAATCCCTTACCTAAAGTCA 120
TCCAGGCCACTCCCTTAACTTTGAAACTCAGATGTTCTGTAAGCACAGAGAACGTCAGCT 180
TCACAGAAACAGAAACCATGGCCAGACGGTCTGCCAATTATGAACCAAATAGCTGGGATT 240
ATGATTTTTTGGCTGTCTTCAGACACTGACGAATCGATTGAAGTATACAAAGACAAGGCCA 300
AAAAGCTGGAGGCTGAGGTGAGAAGAGAGATTAACAATGAAAAGGCAGAGTTTTTTGACTC 360
is_sequ1 (356 → 384)
TGCTTGAACTGATAGATAATGTCCAAAGGTTAGGATTGGGTTACCGTTTCGAGAGTGACA 420
TAAGGAGAGCCCTCGACAGATTTGTTTCTTCAGGAGGATTTGATGGTGTTACAAAAACTA 480
is_sequ5 (478 ← 498)
GCCTTCATGCTACTGCTCTTAGCTTCAGGCTTCTCAGGCAGCATGGCTTTGAGGTCTCTC 540
AAGAAGCGTTCAGTGGATTCAAGGATCAAAATGGCAATTTCTTGAAAACCTTAAGGAGG 600

```

```

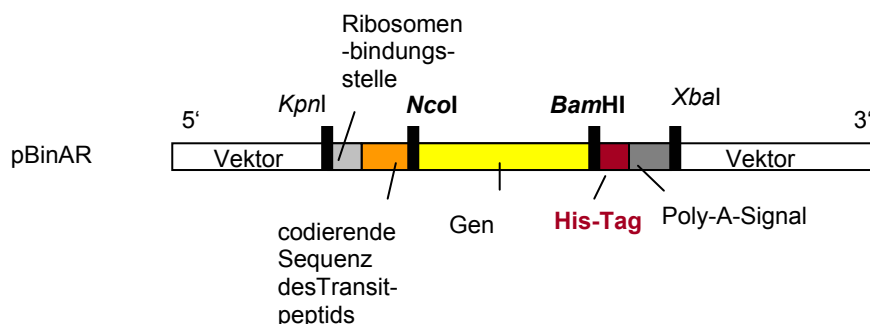
ACACCAAGGCAATACTAAGCCTATATGAAGCTTCATTTCTTGCATTAGAAGGAGAAAATA 660
TCTTGGATGAGGCCAGGGTGTGTTGCAATATCACATCTAAAAGAGCTCAGCGAAGAAAAGA 720
TTGGAAAAGAGCTGGCCGAACAGGTGAATCATG CATTGGAGCTTCCATTGCATCGCAGGA 780
CGCAAAGACTAGAAGCTGTTTGGAGTATTGAAGCATACCGTAAAAAGGAAGATGCAAATC 840
AAGTACTGCTAGAACTTGCCTATATTGGACTACAACATGATTCAATCAGTATACCAAAGAG 900
is_sequ3 (900 → 922)
ATCTTCGCGAGACATCAAGGTGGTGGAGGCGAGTGGGTCTTGCAACAAAGTTGCATTTTG 960
CTAGAGACAGGTTAATTGAAAGCTTTTACTGGGCAGTTGGAGTTGCGTTTGAACCTCAAT 1020
ACAGTGATTGCCGTAATTCAGTAGCAAAAATGTTTTCATTTGTAACAATCATTGATGATA 1080
TCTATGATGTTTATGGTACTCTGGATGAGCTGGAGCTATTTACAGATGCTGTTGAGAGAT 1140
GGGTGTTAACGCCATCAATGATCTTCCGGATTATAT GAAGCTCTGCTTCCTAGCTCTCT 1200
is_sequ2 (1178 ← 1201)
ACAACACTATCAATGAGATAGCTTATGACAATCTGAAGGACAAGGGGAAAACATTCTTC 1260
CATACTAACAAAAGCGTGGGCAGATTTATGCAATGCATTCCTACAAGAAGCAAAAATGGC 1320
TGTACAATAAGTCCATACCAACATTTGATGACTATTTCCGAAATGCATGGAAATCATCCT 1380
CAGGGCCTCTTCAACTAATTT TTTGCCTACTTTGCCGTGGTTCAAAACATCAAGAAAGAGG 1440
is_for_spez. (1401 → 1427)
AAATTGAAAACTTACAAAAGTATCATGATATCATCAGTAGGCCTTCCACATCTTTTCGTC 1500
TTTGCAACGACCTGGCTTCAGCATCGGCTGAGATAGCGAGAGGTGAAACTGCGAATTCGG 1560
TATCCTGCTA CATGCGTACAAAAGGCATTTCTGAGGAACTTGCTACTGAATCCGTAATGA 1620
is_rev_spez. (1571 ← 1597)
ATTTGATCGACGAAACCTGAAAAAGATGAACAAAGAAAAGCTTGGTGGCTCTTTGTTTG 1680
CAAAACCTTTTGTGCGAAACAGCTATTAACCTTGCACGGCAATCCCATTCACATTATCATA 1740
ACGGAGATGCGCATACTTCACCAGACGAGCTAAC TAGGAAACGTGTCCTGTCAGTAATCA 1800
CAGAGCCTATTCTACCCTTTGAGAGA GGATCCCATCACCATCACCATCACTAAAAGTAAC 1860
BamHI His-Tag
AGGTTTTCCATGTTGTCGCTGCAAGAACAAATAACATATGCTGCGTAGAAAATTAAGCC 1920
ATGTAATAGGCTTTAACTCCATGTCCGGCGGAGTTTTTGCAGCAGCAAG TACCCTCCTG 1980
is_Ende
(1970 ← 1992)
TATGTGGATGGAGAGTATTGTATATTTTCAATTCAGATTACAAGGAAGATTATATATCCA 2040
HindIII
TTTTCTTATTTTGAGTGC AAGCTT

```

**Abb. 3.3: Nukleotidsequenz der mit His-Tag markierten *ispS*.** Hellblau markiert sind zusätzlich eingefügte Sequenzen, blau markiert sind absichtlich veränderte Sequenzabschnitte, rot markiert sind einzelne Nukleotide, die vermutlich durch Ungenauigkeiten der Taq-Polymerase bei der PCR gegenüber der ursprünglichen Sequenz verändert sind, und grün markiert sind Sequenzabschnitte, an die die bezeichneten Oligonukleotide binden. Die Oligonukleotide wurden zur Sequenzierung der Teilsequenzen verwendet und dienten später dem Nachweis der Sequenz in transgenen Organismen.



Die so zusammengefügte drei Teilsequenzen wurden als Ganzes in den binären Vektor pBinAR vor den Promotor 35S-CaMV einkloniert (siehe Abb. 3.4) (Schnittstellen: *KpnI/XbaI*), der dann über Agrobakterien vermittelt der Transformation von *A. thaliana* diene.



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung des *ispS*-Genderivates mit His-Tag.** Die schwarzen Balken zeigen die eingefügten Schnittstellen an, die zum Zusammensetzen der in drei Teilen klonierten Sequenz im Vektor pBinAR nötig waren. Rot dargestellt ist die neu eingefügte Sequenz, die sechs Histidine codiert.

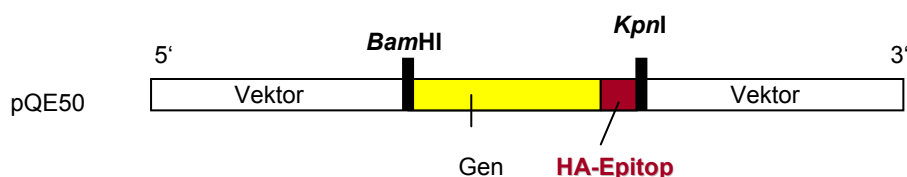
## 3.2 Funktionsnachweis der rekombinanten *ispS*-Derivate

Durch die Veränderung in der Gensequenz kann es sein, dass das *ispS*-Gen nicht mehr translatiert werden kann oder seine Proteinstruktur so verändert wurde, dass das Enzym nicht mehr oder nur eingeschränkt funktionsfähig ist. Bevor das Gen auf die Pflanze übertragen und dort exprimiert wurde, wurde deshalb die Funktionalität des Gens durch heterologe Expression in *E. coli* überprüft.

### 3.2.1 Klonierung des funktionellen Gens der ISPS in Expressionsvektoren

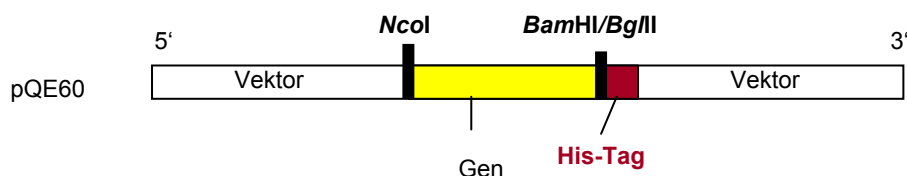
Da es in Bakterien keine Zellkompartimentierung wie in höheren Pflanzen gibt und damit auch kein Transport von Proteinen zwischen Kompartimenten wie Kern und Chloroplast stattfindet, gibt es auch keine Transitpeptide und deren Abspaltung. Außerdem enthalten bakterielle Gene kein Poly-A-Signal, weshalb nur das Kern-*ispS*-Gen mit Epitop in Bakterien exprimiert wurde. Dafür wurde im Falle der *ispS* mit HA-Epitop nur dieser mittlere Teil von dem zu überprüfenden *ispS*-Genderivat über PCR hergestellt. Dabei diente das Genderivat als Template und es wurden die Primer Nr. 8 und Nr. 4 (Tab. 2.1) verwendet, die genau am Beginn der codierenden Region für die ISPS und am Ende des Epitops ansetzten, so dass nur das Kern-*ispS*-Gen mit HA-Epitop vervielfältigt wurde. Dieses PCR-Produkt wurde

wiederum in den Vektor pCRII kloniert und sequenziert und anschließend umklontiert in den Expressionsvektor pQE50 und *E. coli* TG1 mit diesem Plasmid transformiert (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5: Schematische Darstellung des *ispS*-Genderivates mit HA-Epitop im Expressionsvektor pQE50.** Einkloniert wurde nur die Teilsequenz, die für den funktionellen Teil des Enzyms codierend ist (gelb) mit der angehängten Sequenz für das HA-Epitop (rot).

Im Falle der *ispS* mit His-Tag erfolgte die Überprüfung in *E. coli* vor der Herstellung der kompletten Transformationskassette, die zur Transformation von Pflanzen verwendet werden kann. Da die Sequenz des Kernenzym bereits aus einer anderen Arbeit (ZIMMER nicht publiziert) im Vektor pCRII auf ihre Richtigkeit hin überprüft vorlag, wurde diese umklontiert in den Expressionsvektor pQE60, der direkt im Anschluss an die MCS einen aus sechs Codons für Histidin bestehenden His-Tag beinhaltet (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Schematische Darstellung des *ispS*-Genderivates mit His-Tag im Expressionsvektor pQE60.** Einkloniert wurde nur die Teilsequenz, die für den funktionellen Teil des Enzyms codierend ist (gelb). Die für sechs Histidine codierende Sequenz (rot) befand sich bereits in diesem Expressionsvektor.

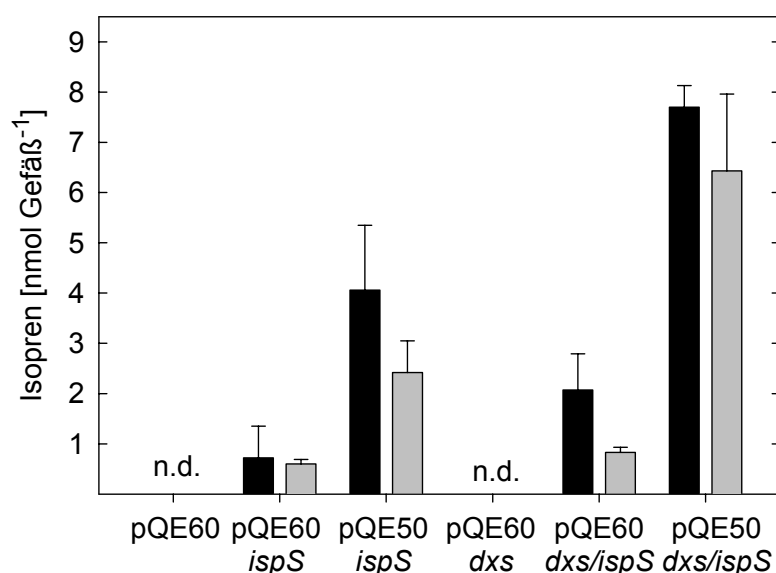
Mit diesem Vektor mit Insert wurde dann ebenfalls *E. coli* TG1 transformiert und das Protein rekombinant exprimiert.

### 3.2.2 *In vivo*-Nachweis von Isopren aus transgenen *E. coli*-Kulturen

Der Funktionstest der Genderivate in *E. coli* wurde wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt. Das Anfügen des HA-Epitops an das C-terminale Ende des ISPS-Proteins hatte zur Folge, dass auch bei transgenen Bakterien keine Isoprenbildung gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Transformierte *E. coli*-Kulturen mit *ispS*, die C-terminal mit einem His-Tag

versehen ist, wiesen dagegen eine deutliche Isoprenemission auf (Abb. 3.7). Verglichen mit unmarkierter *ispS* im Vektor pQE50 war die in die Gasphase abgegebene Menge an Isopren aber um 80% reduziert. Durch Coexpression der Deoxyxylulose-5-phosphat Synthase (DXS) aus dem Cyanobakterium *Synechococcus leopoliensis* (MILLER ET AL. 1999), die als begrenzender Faktor ein Ankurbeln des MEP- Stoffwechsels und damit eine Erhöhung des Substrates zur Folge hat, konnte die Isoprenemission in beiden Fällen etwa verdoppelt werden.

Die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) zur Transkriptions-Induktion war nicht wirksam und führte zu keiner gesteigerten Isoprenemission. Es war sogar ein gegenteiliger Effekt zu beobachten.



**Abb. 3.7: Isoprenemission von transgenen *E. coli* TG1-Kulturen.** Getestet wurden in LB-Medium Kulturen, die nur den Vektor pQE60 (mit His-Tag) enthielten, solche, die den Vektor mit His-Tag mit inseriertem *ispS*-Gen (pQE60 *ispS*) enthielten und Kulturen, die den Expressionsvektor pQE50 (ohne His-Tag) mit inserierter *ispS* (pQE50 *ispS*) enthielten. Diese Kulturen wurden auch unter Coexpression der *dxs* im Vektor pGS72 getestet (pQE60 *dxs/ispS* und pQE50 *dxs/ispS*). Außerdem wurden alle Kulturen auch unter Zugabe von IPTG (32  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) getestet. ■ -IPTG; □ +IPTG; n = 3  $\pm$  SD.

Das *ispS*-Gendervat mit His-Tag wurde auf Grund dieser Ergebnisse dann zur Transformation von *A. thaliana* verwendet.

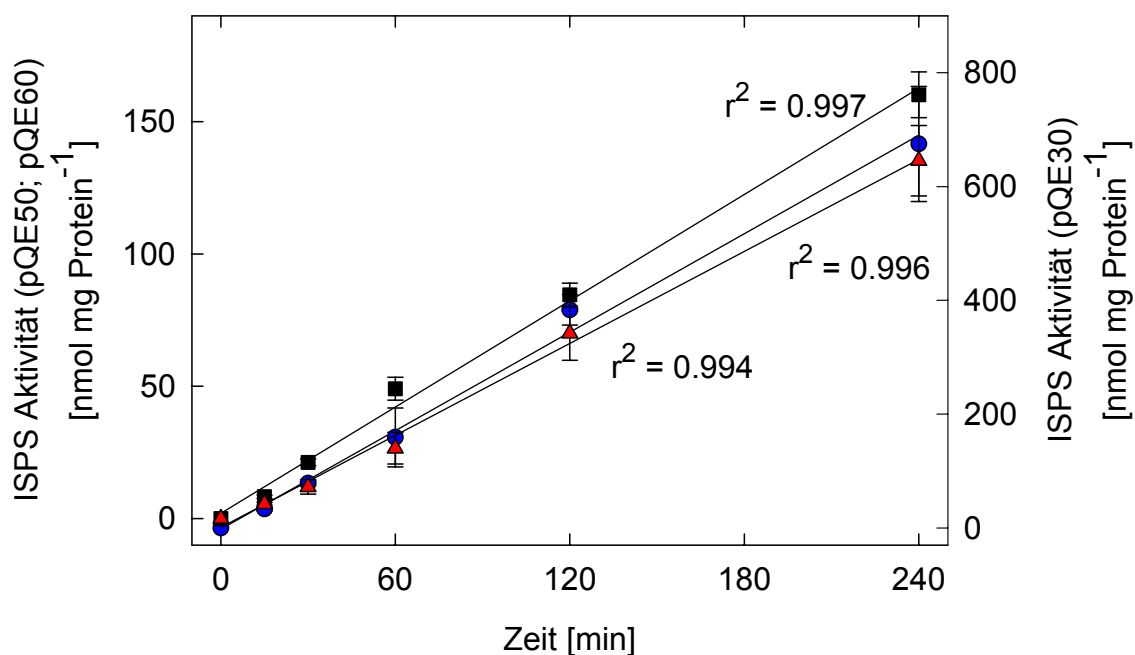
### 3.3 Vergleich der biochemischen Eigenschaften rekombinanter und nativer ISPS

Ziel dieser Arbeit war es außerdem, neben der biochemischen Charakterisierung der nativen ISPS zu untersuchen, in wieweit die Modifikation der ISPS durch das Anfügen eines His-Tags zu Veränderungen der biochemischen Eigenschaften führen kann. Erste Hinweise für eine mögliche Beeinflussung zeigten sich bei der Bestimmung der *in vivo* Emission von Isopren bei den transgenen *E. coli*-Linien (Abb. 3.7). Deshalb wurde das in *E. coli* TG1 exprimierte ISPS-Derivat mit His-Tag noch biochemisch charakterisiert, ebenso wie die unmarkierte ISPS bzw. eine am N-terminalen Ende mit einer His-Tag versehene ISPS (MILLER 2001). Die unmarkierte ISPS wurde durch Expression im Vektor pQE50 in *E. coli* TG1 gewonnen, die N-terminal markierte ISPS durch Expression im Vektor pQE30, der vor der MCS eine His-Tag besitzt. Dieses Derivat konnte dadurch auch über Ni-NTA-Säulchen aus dem Proteinextrakt gereinigt werden (2.3.1.2), während die unmarkierte ISPS nur ungereinigt gemessen werden konnte. Zusätzlich wurde auch die native ISPS charakterisiert, die aus Pappelblättern gewonnen wurde (2.3.1.3). Die ISPS-Derivate werden im Folgenden nach den Vektoren benannt, in denen sie exprimiert wurden, die aus der Pappel extrahierte Isoprensynthase als native ISPS oder Wildtyp (WT) ISPS.

Alle dargestellten Versuche wurden unabhängig 3 bis 4 Mal mit jeweils 3 Parallelansätzen wiederholt.

#### 3.3.1 Zeitabhängigkeit der Enzymaktivität heterolog exprimierter ISPS

Um die Stabilität der ISPS und ihrer verschiedenen Derivate zu bestimmen, wurde unter Substrat sättigenden Bedingungen die zeitliche Bildung von Isopren verfolgt. Hierbei zeigte sich, dass über den Beobachtungszeitraum die gebildete Menge an Isopren linear zunahm und es zu keiner Verringerung der Enzymaktivität durch Substratmangel oder Degeneration des Enzyms kam.



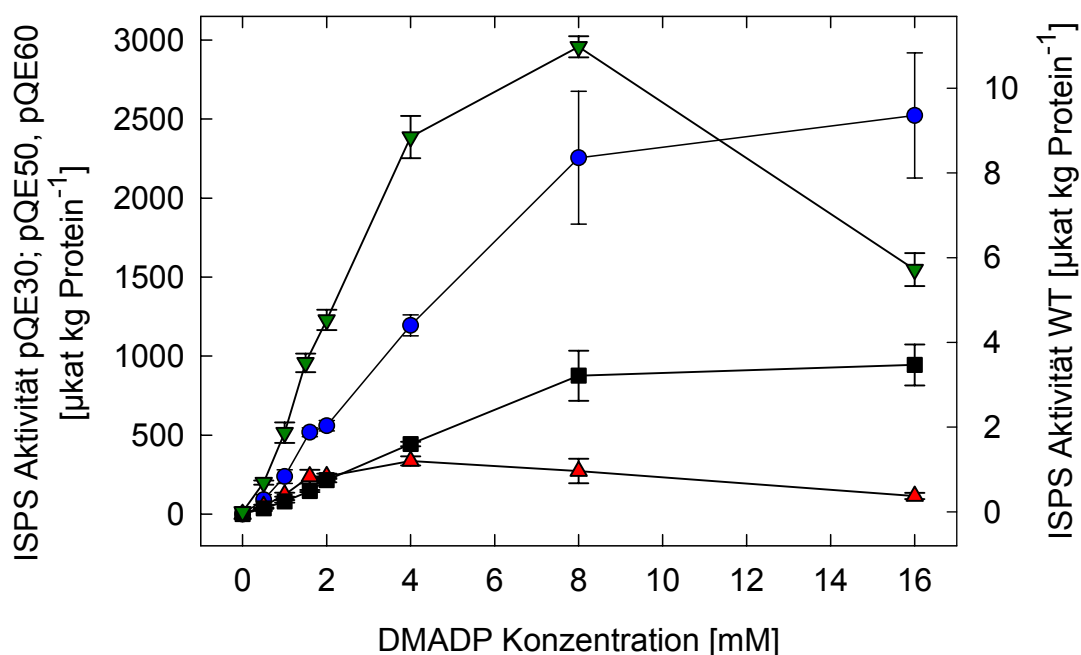
**Abb. 3.8: Zeitabhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch ■ unmarkierte, ● N-terminal markierte und ▲ C-terminal markierte ISPS.** Die Enzyme wurden nach heterologer Expression in den Vektoren pQE50, 30 und 60 in *E. coli* TG1 durch Aufschluss der Bakterien gewonnen. Die beiden markierten Varianten wurden gereinigt über Ni-NTA-Säulchen, die unmarkierte ISPS wurde im Bakterienrohextrakt verwendet. Die Proteinextrakte wurden in Standardenzymtests (2.3.2.2) eingesetzt, die bei 40°C und variierender Inkubationszeit von 0, 15, 30, 60, 120 und 240 min durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich bis zu einer Inkubationsdauer von 240 min ein linearer Zusammenhang. ( $n = 3 \pm \text{SD}$ )

Die unmarkiert in pQE50 exprimierte ISPS konnte nicht über Ni-NTA aufgereinigt werden wie die His-markierten Enzyme aus pQE30 bzw. 60. Deshalb lag sie im Gesamtgemisch aller Proteine vor, von dem sie nur einen geringen Teil ausmachte, so dass ihre auf die Proteinmenge bezogene ISPS-Aktivität unter den Werten der gereinigten Enzyme lag. Der Vergleich der ISPS-Aktivität der His-markierten Enzyme zeigt hier, dass die Aktivität der C-terminal markierten ISPS, gemessen als Isoprenemission pro mg gereinigtem Protein, bei etwa einem Viertel bis einem Fünftel der Aktivität der N-terminal markierten ISPS lag (siehe Abb. 3.8).

Für alle weiteren Versuche der Charakterisierung wurde eine Zeitdauer von 60 Minuten angewandt.

### 3.3.2 Substratabhängigkeit

Zur weiteren Charakterisierung der Enzyme wurde die Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratmenge bestimmt. Dazu wurde die Isoprenmenge bestimmt, die pro Milligramm eingesetzter ISPS innerhalb einer Stunde bei 40°C bei unterschiedlicher DMADP-Konzentration gebildet wurde. Die eingesetzten Substratmengen betragen 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,6 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM und 16 mM im Test.

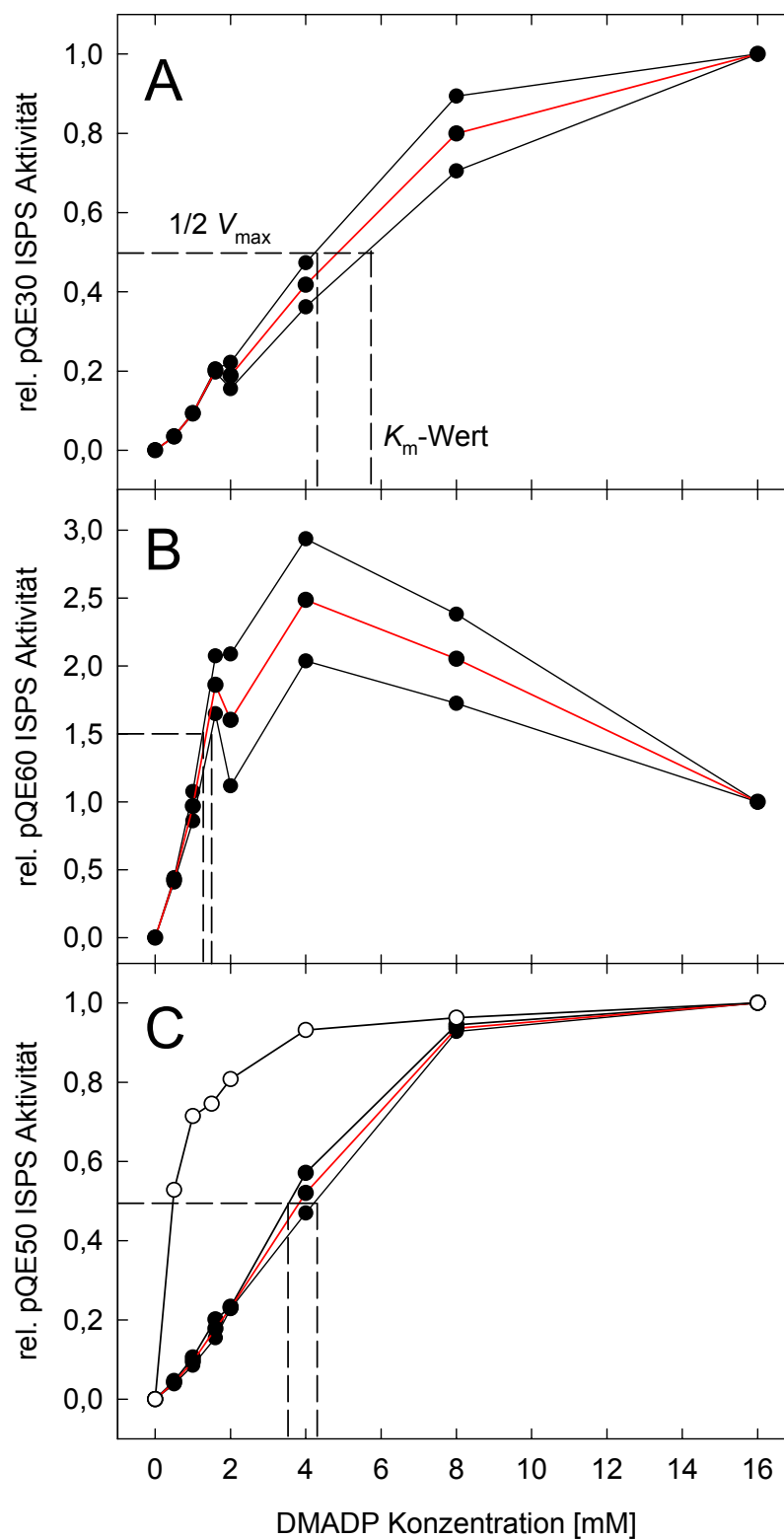


**Abb. 3.9:** Substratabhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch ▼ native, ■ unmarkierte, ● N-terminal markierte und ▲ C-terminal markierte ISPS. Das native Enzym wurde aus Pappelblattextrakt gewonnen und im Rohextrakt verwendet. Die übrigen Enzyme wurden nach heterologer Expression in den Vektoren pQE50, 30 und 60 in *E. coli* durch Aufschluss der Bakterien gewonnen. Die beiden markierten Varianten wurden gereinigt über Ni-NTA-Säulchen, die unmarkierte ISPS wurde im Bakterienrohextrakt verwendet. Die Proteinextrakte wurden in Standardenzymtests (2.3.2.2) eingesetzt, die bei 40°C für eine Stunde mit variierender Substratmenge von 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,6 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM und 16 mM DMADP durchgeführt wurden. Bei allen ISPS-Varianten trat eine Substratsättigung ein. ( $n = 3 \pm SD$ )

Bei allen vier getesteten Enzymen trat eine Substratsättigung ein, bei der ISPS mit C-terminalem His-Tag (pQE60) ergab sich ab einer Konzentration von 4 mM DMADP bereits eine Sättigung bzw. sogar eine leichte Substrathemmung. Bei der nativen ISPS ist eine eindeutige Substrathemmung bei der höchsten eingesetzten DMADP-Konzentration von 16 mM zu erkennen (Abb. 3.9). Im Bereich von 0 bis 2 mM DMADP folgen die Kurven nicht wie erwartet einer „klassischen“ *Michaelis-Menten* Sättigungskurve, sondern verlaufen leicht

sigmoid, was in der normierten Darstellung (Abb. 3.10) noch besser zu erkennen ist. Bei dieser Darstellung wurde die jeweilige ISPS-Aktivität bei der höchsten Substratkonzentration (16 mM) auf den Wert 1 normiert und die restlichen Werte entsprechend umgerechnet, um einen direkten Vergleich der einzelnen ISPS-Derivate zu ermöglichen. Die beiden markierten ISPS-Derivate zeigten zudem einen auffälligen Einbruch der Aktivität bei einer Konzentration von 2 mM DMADP. Die am C-terminalen Ende markierte Form zeigt im Gegensatz zu den beiden anderen Formen die höchste Aktivität bei 4 mM und nicht bei den maximal eingesetzten 16 mM. In dieser Darstellung ist die Substrathemmung eindeutig zu erkennen.

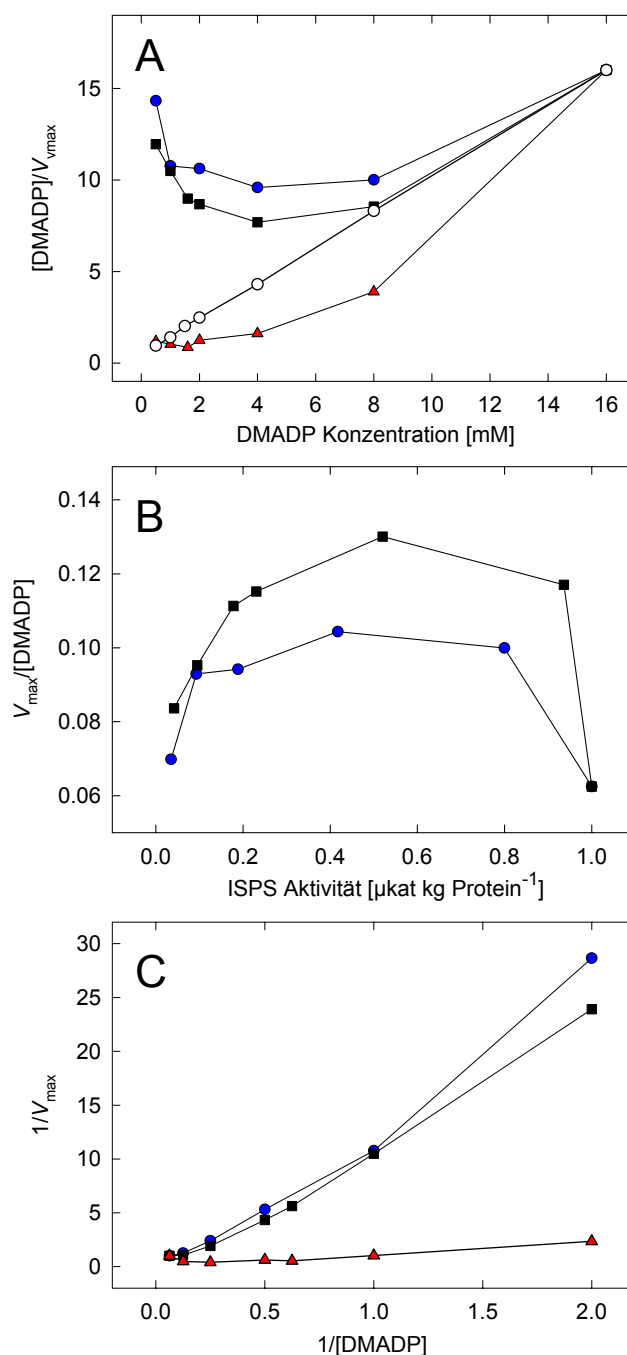
Die apparenten  $K_m$ -Werte wurden aus den Sättigungskurven bestimmt (Abb. 3.10), wobei als  $v_{max}$  die höchste Aktivität genommen wurde. Die  $K_m$ -Werte konnten graphisch abgeleitet werden als Substratkonzentrationen bei halbmaximaler Geschwindigkeit. Die jeweils aus dem Mittel aller durchgeführten Versuchen zur Substratabhängigkeit ermittelten apparenten  $K_m$ -Werte lagen für alle ISPS-Derivate im millimolaren Bereich (siehe Tab. 3.1), wobei die C-terminal markierte ISPS (pQE60) mit  $1,20 \pm 0,29$  mM den niedrigsten und die unmarkierte heterolog exprimierte ISPS (pQE50) mit  $3,68 \pm 0,43$  mM den höchsten Wert aufwies.



**Abb. 3.10: Normierte Darstellung der Substratsättigungskurven und Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von (A) N-terminal markierter, (B) C-terminal markierter und (C) unmarkierter ISPS.** Normiert wurde auf den Wert bei der höchsten eingesetzten Substratmenge von 16 mM. Abgebildet wurden je zwei von vier Messungen (—) und deren Mittelwert (—). In (C) wurde zusätzlich die Substratsättigungskurve der ISPS aus der Stieleiche (*Quercus robur* L.) (O) (aus LEHNING ET AL. 1999) abgebildet. Der  $K_m$ -Wert wurde graphisch bestimmt bei halbmaximaler Geschwindigkeit.



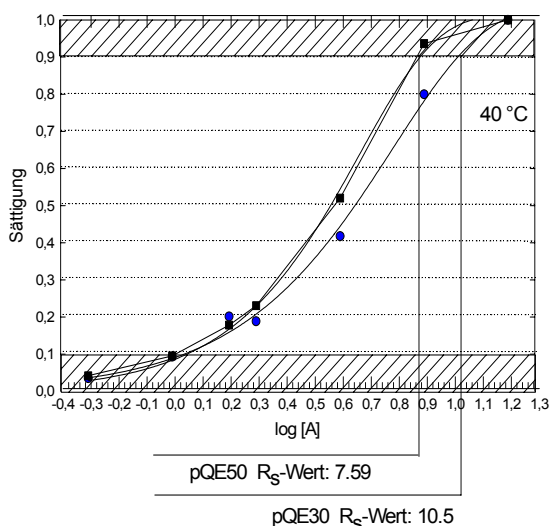
Zum Vergleich des Kurvenverlaufs wurde zur unmarkierten ISPS (pQE50) eine aus der Stieleiche isolierte ISPS abgebildet (aus LEHNING ET AL. 1999), die im Gegensatz dazu einen hyperbolischen Kurvenverlauf nach der klassischen *Michaelis-Menten*-Kinetik zeigte. Anhand dieser Abbildung war bereits zu sehen, dass für die Derivate der ursprünglich aus der Pappel stammenden ISPS diese Kinetik nicht zuzutreffen scheint.



**Abb. 3.11: Versuch der linearisierten Darstellung der Substratabhängigkeit nach (A) Hanes, (B) Scatchard und (C) Michaelis-Menten.** Dargestellt ist zum Vergleich ein Beispiel der linearisierten Darstellung der Substratabhängigkeit der ISPS aus Stieleiche (○) (aus LEHNING ET AL. 1999) und einige Beispiele des Versuchs der linearisierten Darstellung der Substratabhängigkeit von ■ unmarkierter, ● N-terminal markierter und ▲ C-terminal markierter ISPS aus Pappel.

Bei dem Versuch der linearisierten Darstellung (Abb. 3.11) nach *Hanes*, *Scatchard* und *Michaelis-Menten* (siehe BISSWANGER 1994) wurde deutlich, dass bei der ISPS der Graupappel und ihrer Derivate keine *Michaelis-Menten*-Kinetik vorlag, da eine Linearisierung auf diese Art und Weise nicht möglich war. Zum Vergleich wurden wieder die Ergebnisse der ISPS aus der Stieleiche (LEHNING ET AL.1999) im *Hanes*-Plot dargestellt, die hier eine eindeutige Gerade ergaben.

Der „U“-förmige Verlauf der Substratabhängigkeit in der Darstellung nach *Hanes* (Abb. 3.11A) sowie die „Glockenkurve“ in der Darstellung nach *Scatchard* (Abb. 3.11B) sind Zeichen für ein positiv kooperatives Verhalten des Enzyms, das eine höhere Affinität zum Substrat entwickelt, wenn bereits ein Substrat-Molekül gebunden ist, wie es zum Beispiel beim Hämoglobin der Fall ist (siehe BISSWANGER 1984, BISSWANGER 1994). Ein Maß dieser Kooperativität ist der  $R_S$ -Wert (Abb. 3.12), der über das Auftragen des Logarithmus der Substratkonzentration gegen die Sättigung des Enzyms in Prozent bestimmt werden kann (BISSWANGER 1994). Er ergibt sich aus dem Verhältnis der Substratkonzentration bei 90% zur Substratkonzentration bei 10% Sättigung. Bei einem normalen nicht kooperativen Verhalten ergibt dieses Verhältnis immer 81, bei positiv kooperativem Verhalten nimmt die Steilheit der Kurve zu und der  $R_S$ -Wert ab. Je kleiner er wird, umso stärker ist die Kooperativität.

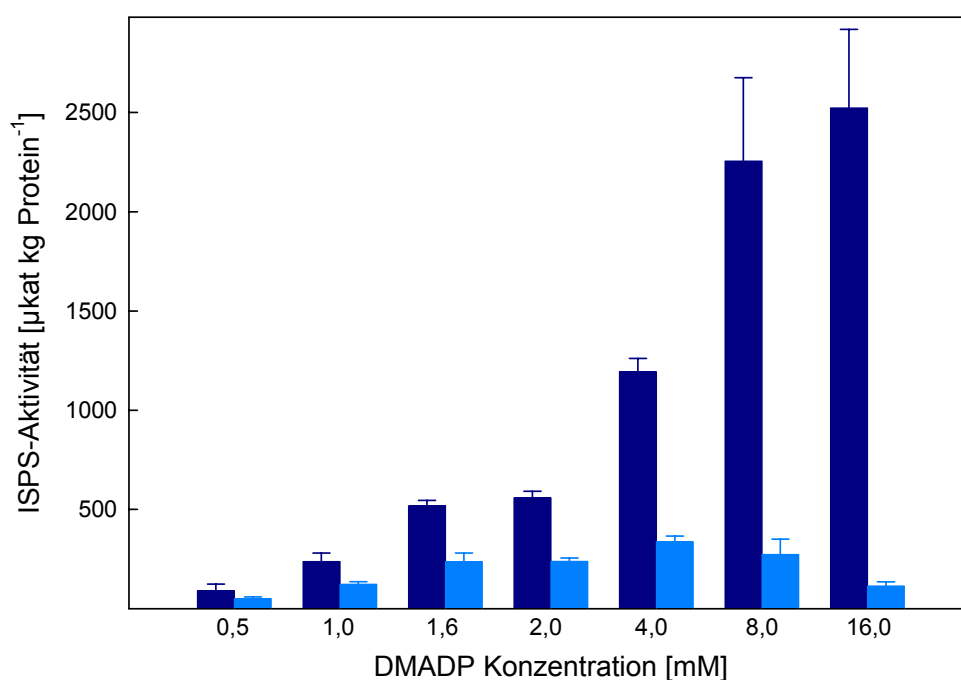


**Abb. 3.12: Bestimmung des  $R_S$ -wertes am Beispiel der ■ unmarkierten und der ● N-terminal markierten ISPS.** Er wurde aus dem Verhältnis der Substratkonzentration bei 90% zur Substratkonzentration bei 10% Sättigung berechnet.

Der  $R_S$ -Wert der in Bakterien exprimierten Derivate in pQE30 und pQE50 lag im Bereich von 7,6 bis 10,5. Somit deuten diese Werte ebenfalls auf eine positive Kooperativität der ISPS

hin. Für die ISPS aus pQE60 war diese Art der Darstellung nicht möglich, da das Enzym einen Rückgang der Enzymaktivität bei höheren DMADP Konzentrationen aufwies.

Zudem ist anhand der Substratabhängigkeitskurven zu erkennen, dass der Unterschied in der Enzymaktivität der beiden markierten ISPS-Derivate je nach Substratkonzentration sehr unterschiedlich ausfällt. Je höher die DMADP-Konzentration ist, umso höher ist die AktivitätseinbuÙe der C-terminal markierten ISPS im Vergleich zur N-terminal markierten. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 3.13 noch einmal für jede gemessene Substratkonzentration veranschaulicht.

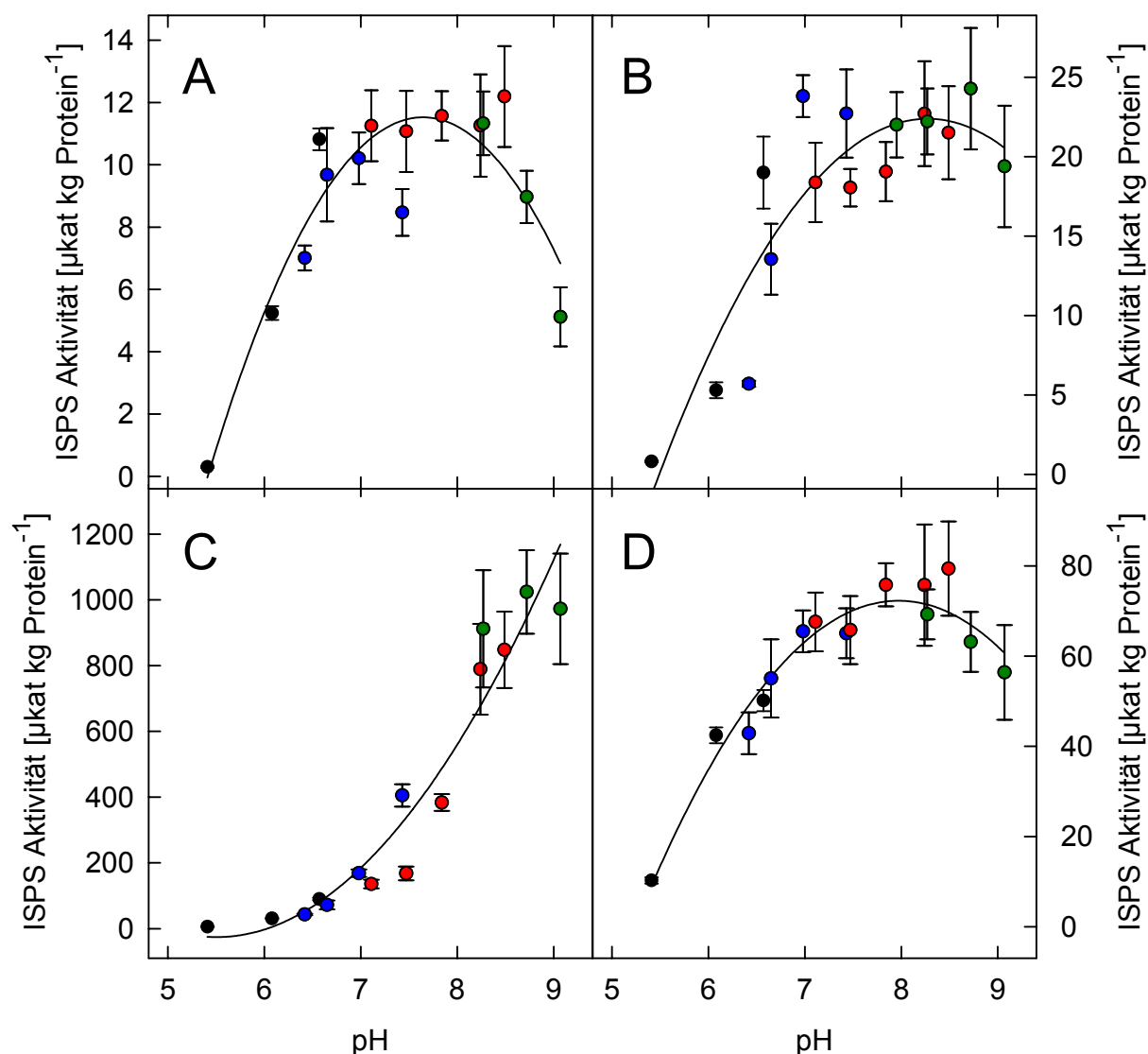


**Abb. 3.13: Unterschied in der ISPS-Aktivität von N-terminal und C-terminal markierter ISPS bei unterschiedlicher Substratkonzentration.** Der Unterschied zwischen N-terminal (■) markierter und C-terminal (▒) markierter ISPS ist im niedrigen Konzentrationsbereich des DMADP (0,5-2,0 mM) vergleichsweise gering. Erst ab 4,0 mM und höher wird er immer deutlicher.

### 3.3.3 pH-Abhängigkeit

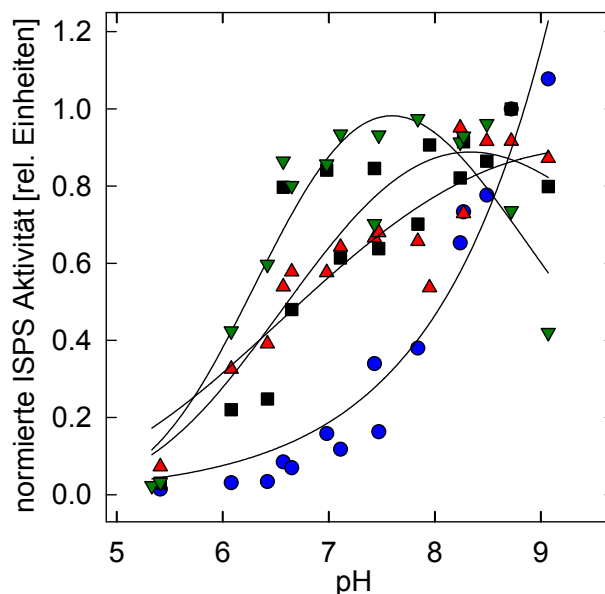
Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der enzymatischen Isoprenbildung wurden die Enzymansätze mit verschiedenen Puffern angesetzt (MES-, MOPS-, Tris- und CHES-Puffer), um so einen pH-Bereich von 5,4 bis 9,2 abdecken zu können. Die zur Transformation von *A. thaliana* verwendete ISPS (pQE60) zeigte ebenso wie die native ISPS und die unmarkiert in Bakterien exprimierte ISPS (pQE50) ein relativ breites pH-Optimum im Bereich zwischen etwa pH 7 bis pH 8,5. Die zur Aufreinigung am N-terminalen Ende markierte ISPS (pQE30)

hatte dagegen ein weiter in den alkalischen Bereich verschobenes pH-Optimum, das evtl. bei pH 9 noch gar nicht erreicht war, da innerhalb des Messbereiches noch keine Abnahme der Aktivität zu verzeichnen war (Abb. 3.14A-D).



**Abb. 3.14:** pH-Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch (A) native, (B) unmarkierte, (C) N-terminal markierte und (D) C-terminal markierte ISPS. Das native Enzym wurde aus Pappelblattextrakt gewonnen und im Rohextrakt verwendet. Die übrigen Enzyme wurden nach heterologer Expression in den Vektoren pQE50, 30 und 60 in *E. coli* durch Aufschluss der Bakterien gewonnen. Die beiden markierten Varianten wurden gereinigt über Ni-NTA-Säulchen, die unmarkierte ISPS wurde im Bakterienrohextrakt verwendet. Die Proteinextrakte wurden in Standardenzymtests (2.3.2.2) eingesetzt ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ), die bei  $40^\circ\text{C}$  für eine Stunde mit variierendem pH-Wert durchgeführt wurden. Dabei wurde mit ● MES-Puffer der pH-Bereich zwischen 5,4 und 6,6, mit ● MOPS-Puffer der pH-Bereich zwischen 6,4 und 7,4, mit ● Tris-Puffer das pH-Intervall von 7,1 bis 8,8 und mit ● CHES-Puffer das pH-Intervall von 8,3 bis 9,2 überlappend abgedeckt.

Um den Kurvenverlauf besser vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse wieder normiert auf den Wert der höchsten Aktivität der ISPS aus dem Pappelblatt-Extrakt (WT) und in Abbildung 3.15 dargestellt.



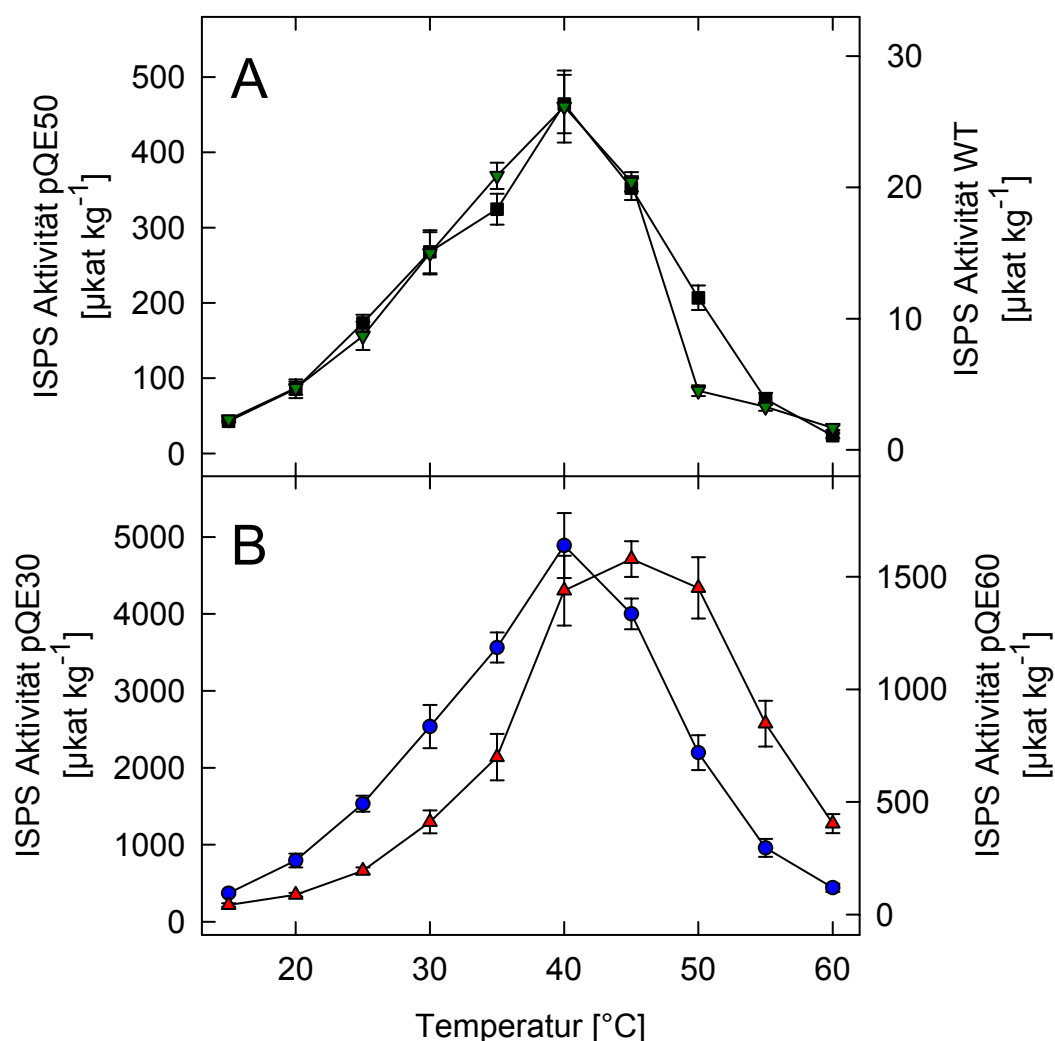
**Abb. 3.15: Normierte Darstellung der pH-Abhängigkeit der ISPS-Derivate.** Dargestellt sind die Werte von ▼ nativer, ■ unmarkierter, ● N-terminal markierter und ▲ C-terminal markierter ISPS, normiert auf den Wert der höchsten Aktivität der nativen ISPS.

Deutlich war bei diesem direkten Vergleich zu erkennen, dass die native ISPS aus dem Pappelblatt-Extrakt gegenüber den übrigen Derivaten ein etwas niedrigeres pH-Optimum bei pH 7,5 hat, während das Optimum der ISPS in pQE50 und pQE60 mehr bei pH 8 bis 8,5 lag und das der N-terminal markierten ISPS (pQE30) sich deutlich weiter in den alkalischen Bereich verschoben hatte.

### 3.3.4 Temperaturabhängigkeit

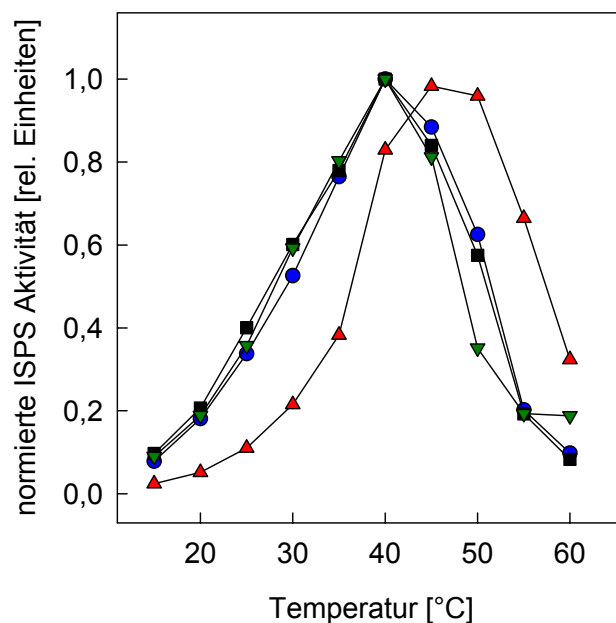
Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der ISPS und ISPS-Derivate wurde über einen Temperaturbereich von 15°C bis 60°C untersucht. Für die native ISPS, die unverändert in Bakterien exprimiert wurde und die am N-terminalen Ende markierte ISPS ergaben sich über diesen Temperaturbereich symmetrische Optimumskurven mit einer maximalen Enzymaktivität bei jeweils 40°C. Bei der maximalen Temperatur von 60°C konnte nahezu keine Isoprenbildung mehr gemessen werden. Im Falle der C-terminal markierten ISPS, wie sie auch zur Transformation der *A. thaliana*-Linien verwendet wurde, war ein deutlich

verschobenes Temperaturoptimum zu erkennen. Es lag um ca. 5-10°C höher bei etwa 45-50°C, bei 60°C war noch eine deutliche Isoprenbildung messbar.



**Abb. 3.16:** Temperatur-Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch (A) ▼ native und ■ unmarkierte ISPS und (B) ● N-terminal markierte und ▲ C-terminal markierte ISPS. Das native Enzym wurde aus Pappelblattextrakt gewonnen und im Rohextrakt verwendet. Die übrigen Enzyme wurden nach heterologer Expression in den Vektoren pQE50, 30 und 60 in *E. coli* durch Aufschluss der Bakterien gewonnen. Die beiden markierten Varianten wurden gereinigt über Ni-NTA-Säulchen, die unmarkierte ISPS wurde im Bakterienrohextrakt verwendet. Die Proteinextrakte wurden in Standardzymtests (2.3.2.2) eingesetzt ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ), die für eine Stunde bei unterschiedlicher Temperatur zwischen 15 und 60°C durchgeführt wurden.

Die Normierung der getesteten Enzymaktivitäten (Abb. 3.17) zeigt deutlich die identischen Temperaturabhängigkeiten der nativen, der unmarkierten und der N-terminal markierten ISPS sowie das um ca. 5-10°C verschobene Temperaturoptimum der C-terminal markierten ISPS.

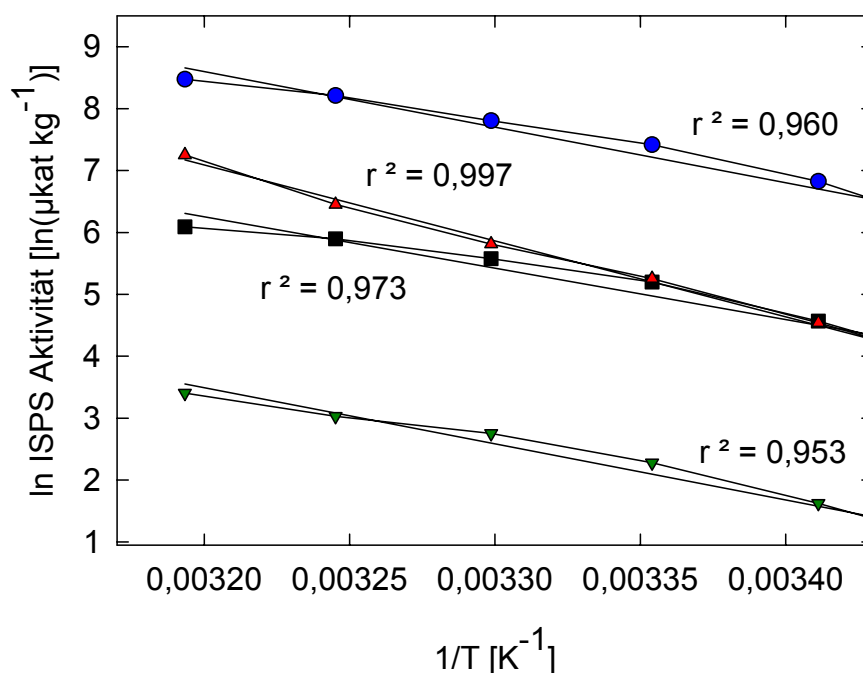


**Abb. 3.17: Normierte Darstellung der Temperatur-Abhängigkeit der ISPS-Derivate.** Dargestellt sind die Werte von ▼ nativer, ■ unmarkierter, ● N-terminal markierter und ▲ C-terminal markierter ISPS, normiert auf den Wert der höchsten Aktivität der nativen ISPS.

Um auf die Aktivierungsenergien, die bei den einzelnen Enzym-Derivaten zur Bildung von Isopren nötig sind, schließen zu können, wurde durch die nach *Arrhenius* linearisierten Werte des ansteigenden Kurvenastes jeweils eine Regressionsgerade gelegt (Abb. 3.18). Die Steigung dieser Regressionsgerade gibt zusammen mit der Gaskonstante die Aktivierungsenergie nach folgendem Zusammenhang (Gl. 3.1) an:

$$-E_a = m (\text{Steigung}) R(\text{Gaskonstante}) \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Da die Gaskonstante in allen Fällen gleich bleibt (allgem. Gaskonstante = 8,3144), muss sich eine Änderung der Aktivierungsenergie in einer Änderung der Steigung abzeichnen. Dies war bei der zur Transformation der Pflanzen verwendeten ISPS der Fall. Die Aktivierungsenergie hat sich um etwa 50 % von 69 kJ mol<sup>-1</sup> bei der nativen ISPS auf 102 kJ mol<sup>-1</sup> bei der C-terminal markierten ISPS erhöht (siehe auch Tabelle 3.1).

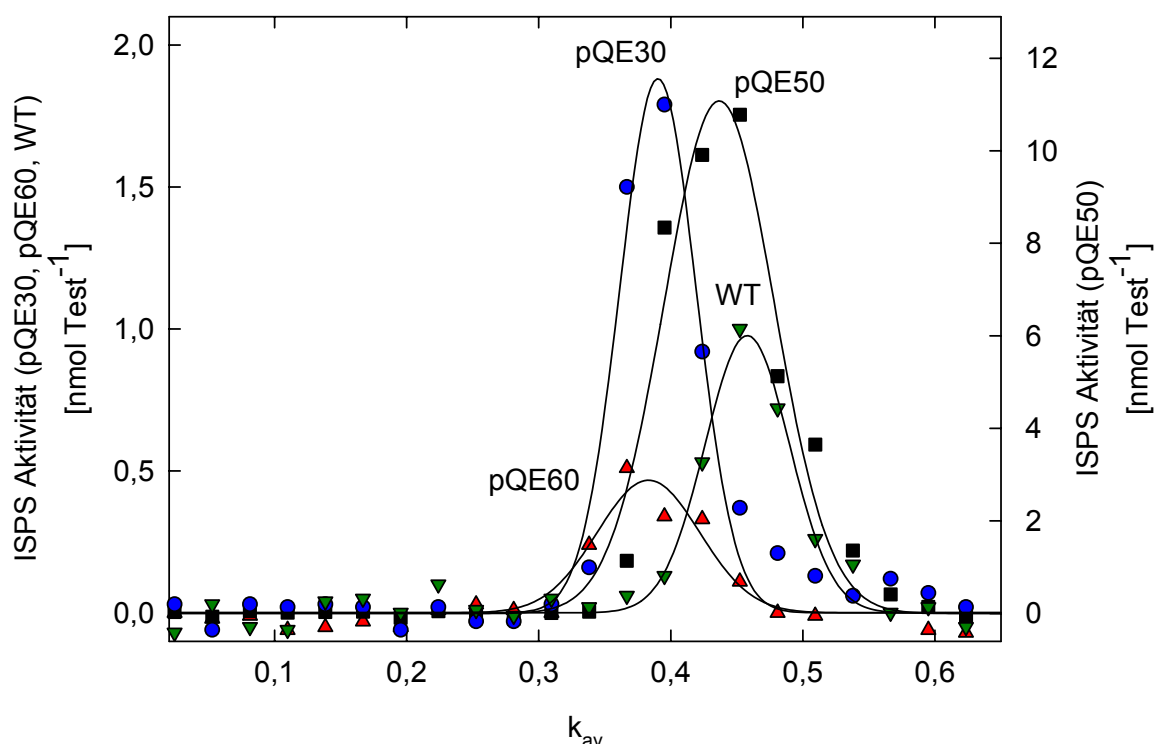


**Abb. 3.18: Bestimmung der Aktivierungsenergie der ▼ nativen, ■ unmarkierten, ● N-terminal markierten und ▲ C-terminal markierten ISPS.** Dargestellt ist je ein Beispiel. Durch die nach *Arrhenius* linearisierten Werte des ansteigenden Astes der Temperatur-Abhängigkeits-Kurve wurde eine Regressionsgerade gelegt. Über die Steigung konnte die Aktivierungsenergie nach Formel 3.1 errechnet werden. Die Aktivierungsenergie  $E_a$  für die native ISPS beträgt hier  $69,08 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $b(0)= 32,841$ ;  $b(1)= -8308,88$ ), für die unmarkierte ISPS  $75,32 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $b(0)= 32,474$ ;  $b(1)= -9057,52$ ), für die N-terminal markierte ISPS  $74,65 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $b(0)= 33,333$ ;  $b(1)= -8979,605$ ) und für die C-terminal markierte ISPS  $102,08 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $b(0)= 46,380$ ;  $b(1)= -12277,742$ ).

### 3.3.5 Natives Molekulargewicht der ISPS

Das native Molekulargewicht der ISPS aus Pappelblattextrakt und das der in Bakterien exprimierten Derivate wurde über Gelfiltration (2.3.2.4) bestimmt. Anhand der Eichgerade konnte über den Verteilungskoeffizienten ( $k_{av}$ -Wert) der einzelnen Enzyme (Abb. 3.19) auf deren Molekulargewicht geschlossen werden.





**Abb. 3.19: Bestimmung des Molekulargewichts der** ▼ **nativen, ■ unmarkierten, ● N-terminal markierten und ▲ C-terminal markierten ISPS.** Die Aktivität der bei der Gelfiltration eluierten Fraktionen wurde direkt in Form der Isoprenproduktion in Abhängigkeit vom Verteilungskoeffizienten (Gl. 2.2) aufgetragen. Anhand der Eichgerade (2.3.2.5) konnte aus dem  $k_{av}$ -Wert das Molekulargewicht ermittelt werden.

Das Molekulargewicht der nativen ISPS beträgt demnach  $51,8 \pm 4,5$  kDa, ähnlich wie das der unverändert in Bakterien exprimierte ISPS, das bei  $53,2 \pm 4,5$  kDa liegt. Die beiden markierten Derivate, sowohl das N- als auch das C-terminal markierte, haben ein etwas höheres Molekulargewicht von  $77,9 \pm 13,3$  kDa und  $67,8 \pm 13,3$  kDa (siehe Tab. 3.1). Diese Werte zeigten klar, dass die ISPS in den Extrakten als monomeres Enzymprotein vorlag, da das aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht bei 62 kDa liegt.

### 3.3.6 Zusammenfassende Tabelle der biochemischen Eigenschaften

Zusammenfassend sind noch einmal die Ergebnisse aller zur Charakterisierung der ISPS und ihrer Derivate durchgeführten Versuche gemittelt dargestellt (Tab. 3.1). Die native ISPS und die unmarkiert heterolog exprimierte ISPS zeigten sehr ähnliche Eigenschaften. Die N-terminal markierte heterolog exprimierte ISPS unterscheidet sich davon nur in einem erhöhten pH-Optimum. Die zur Transformation von *A. thaliana* verwendete ISPS mit dem

C-terminalen His-Tag zeigte ein um 5-10°C nach oben verschobenes Temperatur-Optimum, eine um etwa 50 % erhöhte Aktivierungsenergie und einen niedrigeren apparenten  $K_m$ -Wert.

	<b>ISPS aus Pappelblatt-extrakt</b>	<b>Unmarkierte ISPS (in pQE50)</b>	<b>ISPS mit N-terminaler His-Tag (in pQE30)</b>	<b>ISPS mit C-terminaler His-Tag (in pQE60)</b>
<b>pH-Optimum (n = 2 ± SD)</b>	breites Optimum bei 7,0–8,5	breites Optimum bei 7,0–8,5	Anstieg auf pH 9,0	breites Optimum bei 7,0–8,5
<b>Temperatur-optimum (n = 2 ± SD)</b>	40 °C; Aktivität messbar bis 55°C	40 °C; Aktivität messbar bis 55°C	40°C, Aktivität messbar bis 55°C	45-50°C; Aktivität messbar bis 60°C
<b>Aktivierungsenergie <math>E_a</math> (kJ/mol) (n = 2 ± SD)</b>	67,53 ± 2,20	68,30 ± 9,93	71,59 ± 4,33	103,47 ± 1,96
<b>Apparente Michaelis konstante (<math>K_m</math>) (n = 4 ± SD)</b>	2,45 ± 0,1 mM	3,68 ± 0,43 mM	3,1 ± 2,06 mM	1,20 ± 0,29 mM
<b>Molekulargewicht <math>M_r</math> (kDa) (n = 3 ± SD)</b>	51,8 ± 4,5	53,2 ± 4,5	77,9 ± 13,3	67,8 ± 13,3

Tab. 3.1: Zusammenfassende Tabelle der Eigenschaften der verschiedenen ISPS-Derivate.

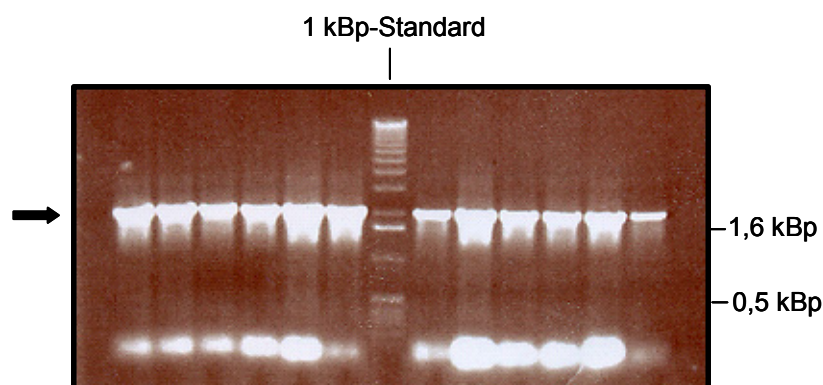
### 3.4 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Im ersten wurden an drei Tagen innerhalb von zwei Wochen jeweils 5-7 Pflanzen mit dem Vektor pBinAR mit *ispS*-Gen (3.1.2.) transformiert und parallel ebenso viele Pflanzen nur mit dem leeren Vektor, um Kontrollpflanzen zu erhalten. Da sich nach eingehenden Untersuchungen herausstellte, dass vier Linien mit *ispS* (K1-K4) und eine Kontrollpflanze (K-) eindeutig transgen waren (3.4.2-3.4.4), die Linien K1 bis K4 jedoch nicht messbar Isopren emittierten, wurde eine weitere Transformation von sechs Pflanzen durchgeführt, um zu versuchen, eine Linie zu erhalten, die signifikante Mengen an Isopren emittiert, oder gegebenenfalls mit einer ausreichenden Anzahl von Linien das bisherige Ergebnis, dass auch transgene Pflanzen kein Isopren produzieren, zu verifizieren. Bei dieser zweiten Transformation war die Ausbeute an positiven Linien sehr viel höher, und es konnten insgesamt mit den bereits

vorhandenen vier Linien (K1-K4) 40 Linien (K1-K40) untersucht werden, wobei es sich bei den Linien K1-K4 immer um die zweite Filialgeneration handelt, bei K5-K40 konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch erst auf die erste Filialgeneration zurückgegriffen werden.

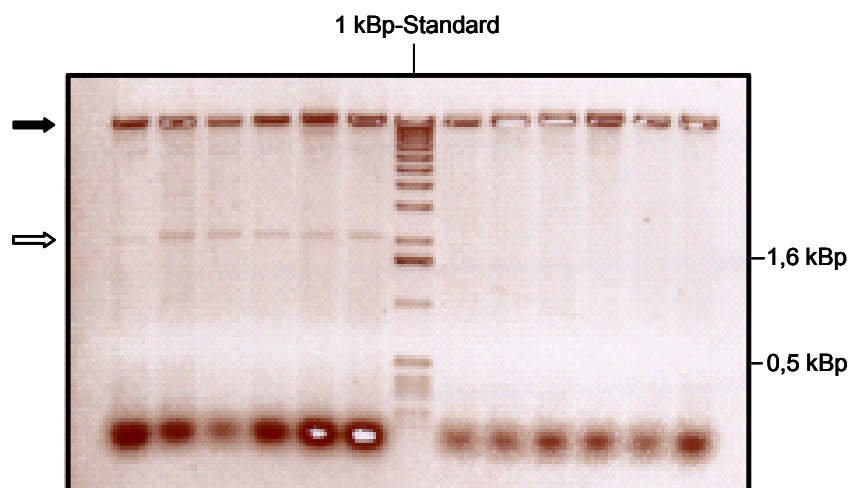
### 3.4.1 Nachweis der erfolgreichen Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte über Elektroporation, einmal mit dem Vektor pBinAR mit *ispS*-Gen (pBinARIS) und einmal mit dem bloßen Vektor (pBinAR) (2.2.4.2). Zur Überprüfung, ob die Transformation der Agrobakterien mit pBinARIS erfolgreich war, wurde von zwölf Kolonien die Plasmid-DNA gewonnen (2.2.1.1) und über PCR mit den Primern Kpn-Iso-FOR und *ispS*-hind-rev-3 die Anwesenheit des *ispS*-Gens bestätigt. Alle zwölf Kolonien waren positiv und konnten zur Transformation weiterverwendet werden (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20: Nachweis der erfolgreichen Transformation von *A. tumefaciens* mit dem Vektor pBinARIS.** Nachweis über PCR mit den Primern Kpn-Iso-FOR (2) und *ispS*-hind-rev-3 (1). Gelelektrophoretische Analyse des ca. 2 KBp großen PCR-Produkts (➡). Zur Größenbestimmung wurde ein 1 kBp-Standard aufgetragen.

Von den *A. tumefaciens*-Kulturen mit pBinAR und pBinARIS, die letztendlich zum „Floral Dip“ (2.2.6.1) verwendet wurden, wurde vor der Resuspendierung in Infiltrationsmedium ein Aliquot abgenommen und daraus wiederum die Plasmid-DNA gewonnen und nach Restriktion mit den Enzymen *KpnI* und *XbaI*, deren Schnittstellen sich in der MCS des Vektors vor und hinter dem Insert befinden, auf dem Gel überprüft.

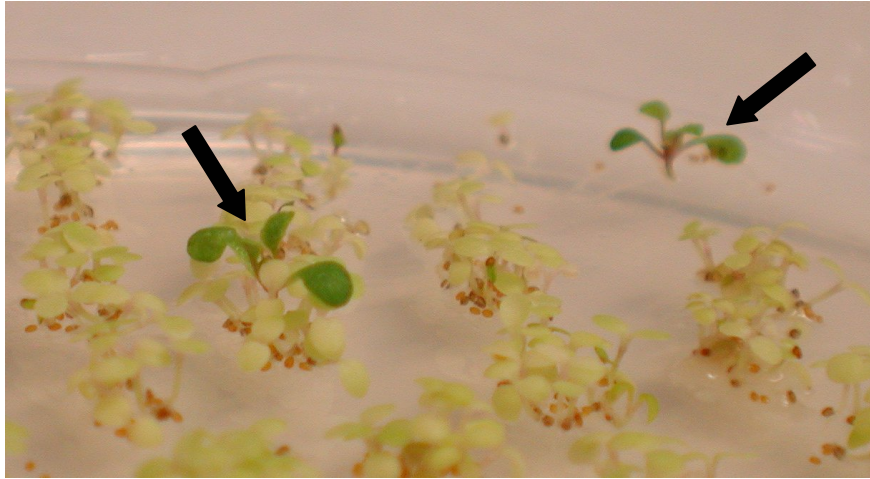


**Abb. 3.21: Nachweis der Transgenität der zur Transformation von *A. thaliana* verwendeten *A. tumefaciens*-Kulturen.** Der Nachweis erfolgte durch Restriktionsanalyse der aus den zur Transformation verwendeten *A. tumefaciens*-Kulturen gewonnenen Plasmide pBinARIS (links) und pBinAR (rechts). Es wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XbaI* geschnitten, wodurch das ca. 2 kBp große Insert *ispS* (⇌) aus dem 12,5 kBp großen Vektor pBinAR (→) herausgeschnitten wurde bzw. der Vektor pBinAR linearisiert wurde. Abgebildet ist die gelelektrophoretische Analyse. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein 1 kBp-Standard aufgetragen.

Bei der Elektrophorese blieb der 12,5 kBp große Vektor oben in der Geltasche hängen, das Insert (*ispS*-Gen) mit gut 2 kBp wanderte an die entsprechende Stelle. Im linken Teil des Gels sind die zur Transformation verwendeten pBinARIS zu sehen, im rechten Teil die verwendeten pBinAR (Abb. 3.21).

### 3.4.2 Selektion transgener *A. thaliana*-Linien über Kanamycinresistenz

Die Samen der in *A. tumefaciens*-Suspension getauchten Pflanzen wurden über die mit der T-DNA-Region des binären Vektors übertragene Kanamycinresistenz auf ihre Transgenität hin überprüft: Sie wurden auf Kanamycin-haltigem MS-Medium ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) zum Keimen gebracht, auf dem sich nur Keimlinge durchsetzen konnten, die das mit dem binären Vektor übertragene Resistenzgen *nptII* besitzen, also transgen sind (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Selektion transgener *A. thaliana*-Linien auf Kanamycin-haltigem MS-Medium.** Die abgebildeten Keimlinge sind ca. 2 Wochen alt. Die beiden mit Pfeilen markierten positiven Keimlinge zeigen deutlich grüne Blätter und haben bereits Primärblätter gebildet.

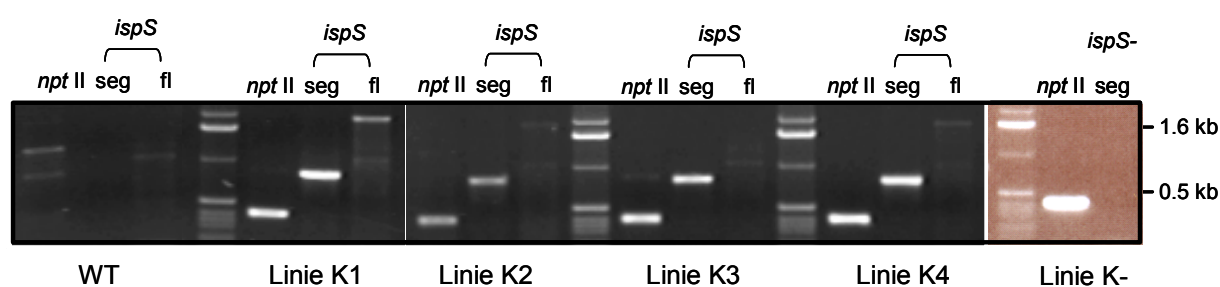
Die Ausbeute der zuerst durchgeführten Transformationen war sehr gering. Es konnten nur vier transgene Linien (K1-K4) aus den Transformationen mit pBinARIS und eine (K-) aus den Transformationen mit pBinAR isoliert werden, die dann zur genaueren Untersuchung verwendet wurden. Wie sich später herausstellte, enthielten zwar alle auf Kanamycin-haltigem Medium positiv selektierten Linien aus der Transformation mit pBinARIS auch wirklich das *ispS*-Gen, doch bei keiner konnte eine Isoprenemission festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde die Transformation mit pBinARIS wiederholt. Bei dieser zweiten Transformation lag die Ausbeute an positiven Linien sehr viel höher. 36 Pflanzen (K5-K40) davon wurden für weitere Untersuchungen verwendet, so dass insgesamt 40 Linien, die der Selektion auf Kanamycin zu Folge auch das *ispS*-Gen enthalten mussten, weiter untersucht wurden. Bei den Linien K5-K40 wurden die F1-Pflanzen zur weiteren Untersuchung verwendet, die noch zur Rückkreuzung benötigt wurden.

### 3.4.3 Genomischer Nachweis der Insertion des Resistenz- und des *ispS*-Gens

Die stabile Integration des Kanamycinresistenzgens (*nptII*) und des *ispS*-Gens der Graupappel in das Genom von *A. thaliana* wurde über PCR nachgewiesen, bei der die aus den Blättern von *A. thaliana* gewonnene DNA (2.2.1.2) als Template diente.

### 3.4.3.1 Nachweis über PCR

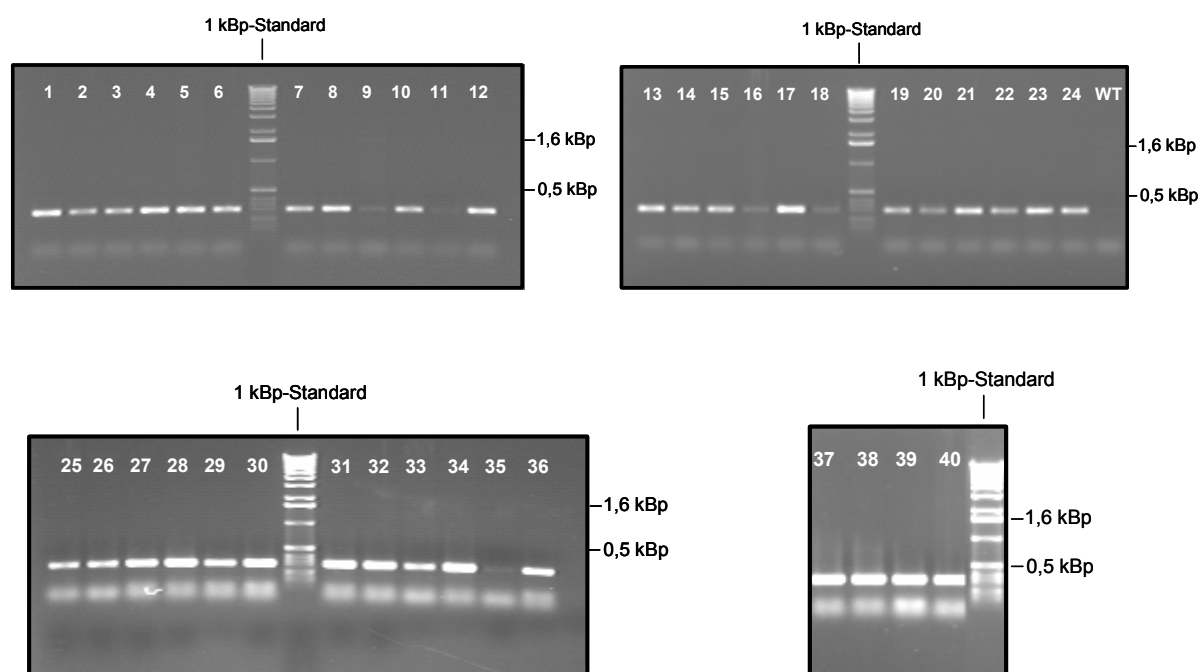
Für die ersten vier Linien wurde der Nachweis mit drei verschiedenen Primerpaaren geführt: *nptII*-for und *nptII*-rev zum Nachweis der Kanamycinresistenz, *is\_sequ1* und *is\_sequ2* sowie *is\_Anfang* und *is\_Ende* zum Nachweis des *ispS*-Gens. Durch die Kombination von *is\_sequ1* und *is\_sequ2* konnte ein internes Fragment der *ispS* mit einer Länge von ca. 850 Bp amplifiziert werden. Der Einsatz der Oligonukleotide *is\_Anfang* und *is\_Ende* erlaubte den Nachweis der kompletten Sequenz einschließlich des Transitpeptids. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden auf dem Gel überprüft und als *nptII*, *ispS*-seg (Segment des *ispS*-Gens) und *ispS*-fl (Full-Length-Klon des *ispS*-Gens) bezeichnet.



**Abb. 3.23: Nachweis der Insertion des *ispS*-Gens bzw. des *nptII*-Gens in das Genom der *A. thaliana*-Linien K1-K4 und K-.** Über PCR wurde eine ca. 300 Bp große Teilsequenz des *nptII*-Gens (*nptII*), eine 845 Bp große Teilsequenz des *ispS*-Gens (*ispS*-seg) und der Full-Length-Klon der *ispS* (*ispS*-fl) (1946 Bp) aus der DNA der Pflanzen vervielfältigt. Zur Kontrolle wurde die PCR auch mit der Wildtyp(WT)-DNA durchgeführt. Das Ergebnis der PCR wurde über Gelelektrophorese analysiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein 1 kBp-Standard aufgetragen.

Das *nptII*-Gen konnte so in der genomischen DNA von allen vier Linien und in K- nachgewiesen werden. Die Existenz des *ispS*-Gens der Graupappel konnte in den Linien K1 bis K4 bestätigt werden und fehlte erwartungsgemäß in der Linie K-, die nur mit dem bloßen Vektor pBinAR transformiert wurde. *ispS*-fl ist jedoch in Linie K3 nicht erkennbar, was zu der Annahme führen könnte, dass es hier nur unvollständig übertragen wurde. Die Übertragungsrichtung des in den binären Vektor eingefügten Inserts war jedoch so festgelegt, dass zuerst das *nptII*-Gen und im Anschluss daran das *ispS*-Gen gegen die Leserichtung übertragen wurde (Abb. 2.1). Da das *nptII*-Gen und ein Teil des *ispS*-Gens durch PCR nachgewiesen werden konnten, wäre es nur möglich, dass der Anfang des *ispS*-Gens oder der 35S-Promotor nicht übertragen wurde. Wäre das der Fall, hätte dies zur Folge, dass die Überprüfung der Genexpression negativ ausfallen würde, da der Promotor für das Umschreiben von DNA in mRNA nötig ist. Dies wurde in einem nächsten Schritt überprüft (3.4.4). Die PCR wurde zur Kontrolle auch mit DNA aus einer Wildtyp-Pflanze durchgeführt. Hierbei sind keine Banden in den entsprechenden Längen zu erkennen.

Die in der zweiten Transformation gewonnenen zusätzlichen 36 Linien (K5-K40) wurden nur noch mit dem Primerpaar *is\_for\_spez* und *is\_rev\_spez*, das später auch zur Überprüfung auf Ebene der mRNA und zur quantitativen PCR verwendet wurde, überprüft. Mit Hilfe dieses Primerpaares konnte wiederum ein internes 171 Bp großes Fragment der *ispS* amplifiziert werden. Zur Kontrolle wurde auch von den bereits überprüften Linien K1 bis K4 und vom Wildtyp eine PCR durchgeführt. Die Fragmente wurden wieder auf einem Agarosegel überprüft (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Nachweis der Insertion des *ispS*-Gens in das Genom der *A. thaliana*-Linien K1-K40.** Über PCR wurde mit den Primern *is\_for\_spez* und *is\_rev\_spez* eine 171 Bp große Teilsequenz des *ispS*-Gens aus der DNA der Pflanzen vervielfältigt. Zur Kontrolle wurde die PCR auch mit der Wildtyp(WT)-DNA durchgeführt. Das Ergebnis der PCR wurde über Gelelektrophorese analysiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein 1 kbp-Standard aufgetragen.

Alle 40 Linien lieferten ein positives Ergebnis, bei der Wildtyp-Pflanze (WT) war keine Bande der entsprechenden Größe zu erkennen.

### 3.4.3.2 Überprüfung der in *A. thaliana* inserierten Gensequenz der *ispS*

Um sicher zu stellen, dass bei der Übertragung des Pappelgens in das Genom von *A. thaliana* keine Fehler aufgetreten sind, wurde das Full Length-Fragment aus der Linie K1, das mit Hilfe der Oligonukleotide *is\_Anfang* und *is\_Ende* über PCR amplifiziert worden war

(3.4.3.1), in den Vektor pCRII kloniert und sequenziert. Die ermittelte Nukleotidsequenz wurde unter Zuhilfenahme des Programms DNA-Strider (Version 1.2) in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und mit der Sequenz des ursprünglichen Proteins aus der Pappel sowie mit der Sequenz des Proteins, wie es in den Bakterien exprimiert wurde, verglichen. Dabei ergab sich, dass das Gen vollständig und ohne den Verlust einzelner Basen, die zum Verlust des offenen Leserasters hätten führen können, übertragen wurde. Auch eine Deletion ganzer Basensequenzen oder eine Inversion von Teilsequenzen durch Schlaufenbildung wäre evtl. bei der Übertragung durch *A. tumefaciens* vorstellbar gewesen. Dies war jedoch ebenso wenig der Fall. Die farbig hinterlegten Aminosäuren markieren Bereiche, in denen es auf DNA-Ebene zum Austausch einzelner Nukleotide, vermutlich durch Ungenauigkeiten der Taq-Polymerase bei der PCR, gekommen ist. Grau sind diejenigen Änderungen in der Aminosäuresequenz hinterlegt, die bereits bei der heterologen Expression in *E. coli* vorhanden waren. Blau sind diejenigen Basenaustausche markiert, die bei der PCR zur Rückklonierung aus *A. thaliana* entstanden sind und deshalb in den transformierten Pflanzen nicht enthalten sind.



```

IS_Bakt      -----MARRSANY 60
IS_Linie1    MATELLCLHRPISLTHKLFNRNLPKVIQATPLTLKLRCSVSTENVSFTEETMARRSANY 60
IS_Pappel    MATELLCLHRPISLTHKLFNRNLPKVIQATPLTLKLRCSVSTENVSFTEETMARRSANY 60
*****
IS_Bakt      EPNSWDYDFLLSSDTDESIEVYKDKAKKLEAEVRREINNEKAEFLTLELIDNVQRLGLG 120
IS_Linie1    EPNSWDYDFLLSSDTDESIEVYKDKAKKLEAEVRREINNEKAEFLTLELIDNVQRLGLG 120
IS_Pappel    EPNSWDYDFLLSSDTDESIEVYKDKAKKLEAEVRREINNEKAEFLTLELIDNVQRLGLG 120
*****
IS_Bakt      YRFESDIRRALDRFVSSGGFDGVTKTSLHATALSFRLLRQHGFEVSQEAFSGFKDQNGNF 180
IS_Linie1    YRFESDIRRALDRFVSSGGFDGVTKTSLHATALSFRLLRQHGFEVSQEAFSGFKDQNGNF 180
IS_Pappel    YRFESDIRRALDRFVSSGGFDGVTKTSLHATALSFRLLRQHGFEVSQEAFSGFKDQNGNF 180
*****
IS_Bakt      LENLKEDTKAILSLYEASFLALEGENILDEARVFAISHLKELSEEKIGKELAEQVNHAE 240
IS_Linie1    LENLKEDTKAILSLYEASFLALEGENILDEARVFAISHLKELSEEKIGKELAEQVNHAE 240
IS_Pappel    LENLKEDTKAILSLYEASFLALEGENILDEARVFAISHLKELSEEKIGKELAEQVNHAE 240
*****
IS_Bakt      LPLHRRTQRLEAVWSIEAYRKKEDANQVLELAILDYNMIQSVYQRDLRETSRWRRVGL 300
IS_Linie1    LPLHRRTQRLEAVWSIEAYRKKEDANQVLELAILDYNMIQSVYQRDLRETSRWRRVGL 300
IS_Pappel    LPLHRRTQRLEAVWSIEAYRKKEDANQVLELAILDYNMIQSVYQRDLRETSRWRRVGL 300
*****
IS_Bakt      ATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDIDVYGTLEDELELF 360
IS_Linie1    ATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDIDVYGTLEDELELF 360
IS_Pappel    ATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDIDVYGTLEDELELF 360
*****
IS_Bakt      TDAVERWVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKAWADLCNAF 420
IS_Linie1    TDAVERWVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKAWADLCNAF 420
IS_Pappel    TDAVERWVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKAWADLCNAF 420
*****
IS_Bakt      LQEAKWLYNKSIPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLIFAYFAVVQNIKKEEENLQKYHDIISR 480
IS_Linie1    LQEAKWLYNKSIPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLIFAYFAVVQNIKKEEENLQKYHDIISR 480
IS_Pappel    LQEAKWLYNKSIPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLIFAYFAVVQNIKKEEENLQKYHDIISR 480
*****
IS_Bakt      PSHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRKGI SEELATESVMNLIDETWKKMNKEK 540
IS_Linie1    PSHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRKGI SEELATESVMNLIDETWKKMNKEK 540
IS_Pappel    PSHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRKGI SEELATESVMNLIDETWKKMNKEK 540
*****
IS_Bakt      LGGSLFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVITEPILPFERGSHHH 600
IS_Linie1    LGGSLFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVITEPILPFERGSHHH 600
IS_Pappel    LGGSLFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVITEPILPFERGSHHH 595
*****
IS_Bakt      HHH 603
IS_Linie1    HHH 603
IS_Pappel    ---

```

**Abb. 3.25:** Vergleich der Protein-Sequenzen entsprechend der Gensequenzen der *ispS* in *E. coli* TG1 (IS\_Bakt), in *A. thaliana* K1 (IS\_Linie1) und in der ursprünglichen cDNA der Pappel (IS-Pappel). ■ kennzeichnet den Aminosäureaustausch in K1 gegenüber der Sequenz in Pappel, der jedoch bereits in *E. coli* vorlag, ■ kennzeichnet den AS-Austausch in K1 gegenüber der Sequenz in Pappel, der in *E. coli* noch nicht vorlag.

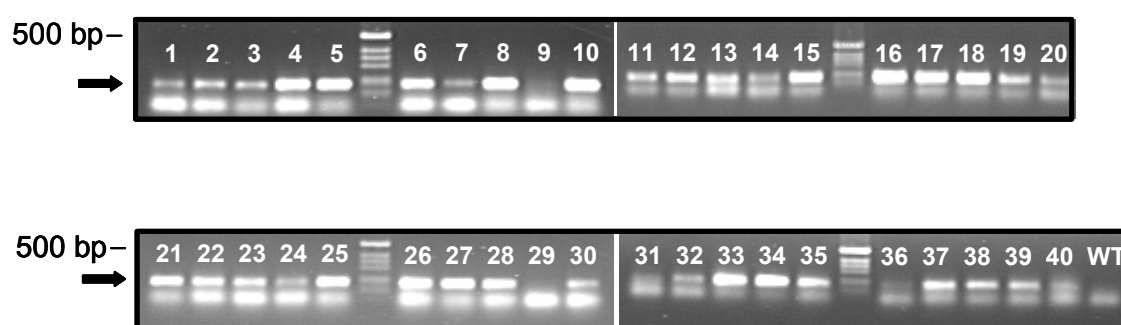
### 3.4.4 Nachweis der Genexpression der *ispS* und der Isoprenemission transgener *A. thaliana*-Pflanzen

In nachfolgenden Schritten wurde überprüft, ob das ins pflanzliche Genom inserierte *ispS*-Gen auch wirklich transkribiert, also die entsprechende mRNA synthetisiert wird, und ein funktionelles Enzym gebildet wird. Zum Nachweis der Genexpression wurde die Gesamt-RNA aus *A. thaliana*-Blättern isoliert (2.2.1.3) und daraus die mRNA revers in cDNA überschrieben (2.2.8.1), bevor diese zur qualitativen (3.4.4.1) und quantitativen (3.4.4.3)

Charakterisierung transgener *A. thaliana*-Pflanzen verwendet wurde. Die transgenen Pflanzen mit Genexpression wurden schließlich auf die Höhe ihrer Emission hin überprüft, um so einen indirekten Nachweis auf ein funktionelles Enzym zu führen.

### 3.4.4.1 Qualitativer Nachweis der *ispS*-mRNA über PCR

Zuerst wurde zum rein qualitativen Nachweis, welche Linien das *ispS*-Gen exprimieren, eine PCR mit den Primern *is\_for\_spez* und *is\_rev\_spez* durchgeführt, bei der die in cDNA umgeschriebene mRNA als Template diente.



**Abb. 3.26: Qualitativer Nachweis der Expression des *ispS*-Gens in den *A. thaliana*-Linien K1-K40.** Über PCR wurde mit den Primern *is\_for\_spez* und *is\_rev\_spez* eine 171 Bp große Teilsequenz des *ispS*-Gens (➔) aus der cDNA der Pflanzen vervielfältigt. Zur Kontrolle wurde die PCR auch mit der Wildtyp(WT)-cDNA durchgeführt. Das Ergebnis der PCR wurde über Gelelektrophorese analysiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein 1 kBp-Standard aufgetragen.

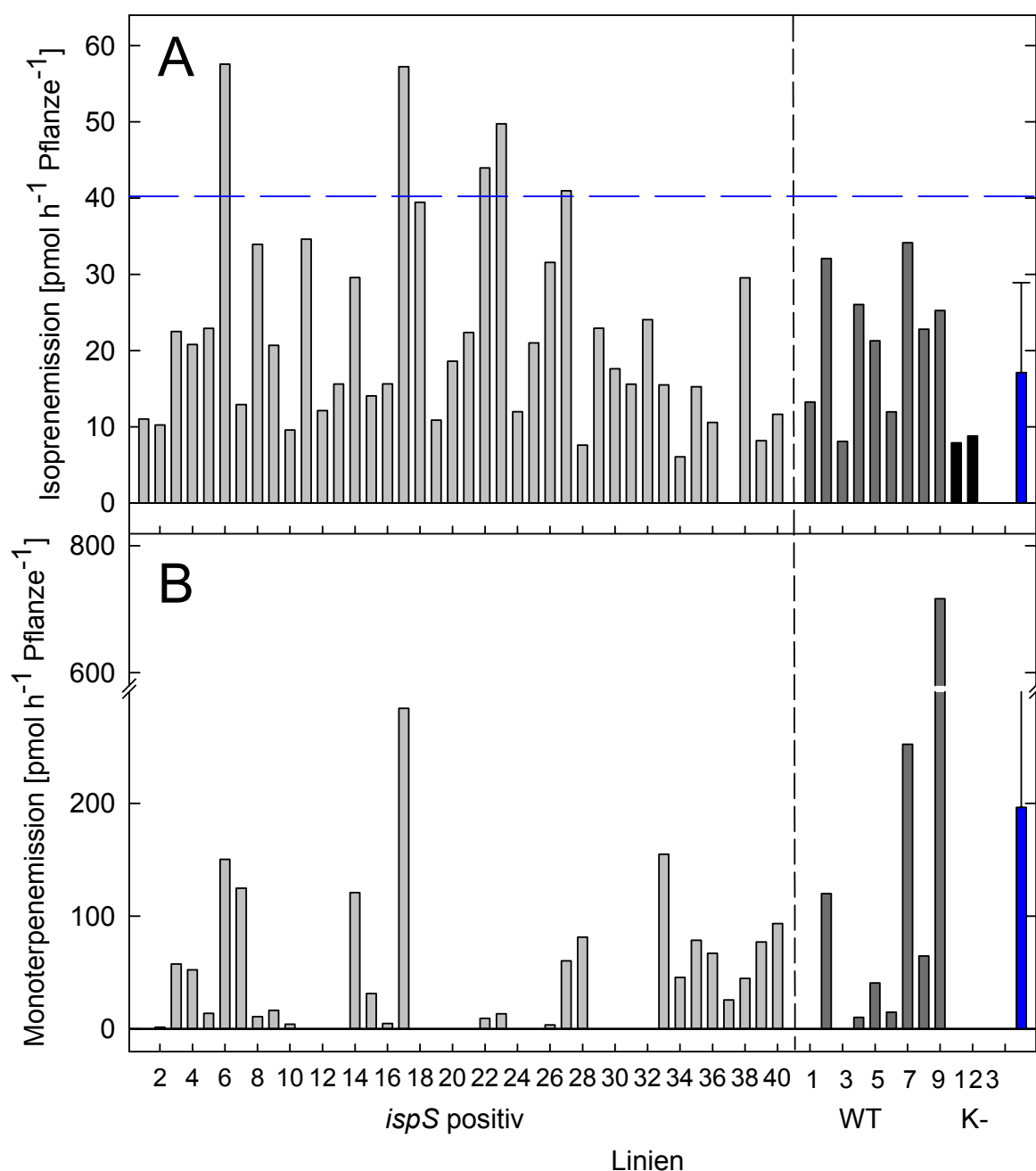
So konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.26), dass nahezu alle Linien die mRNA für die ISPS bildeten, lediglich die beiden Linien K9 und K29 wiesen kein PCR-Produkt in der entsprechenden Fragmentlänge auf, wurden jedoch trotzdem in die Emissionsmessung mit einbezogen (3.4.4.2).

### 3.4.4.2 Nachweis der Isoprenemission transgener *A. thaliana*-Linien

Zur Messung der Isoprenemission von *A. thaliana* wurden die Blattrosetten in Küvetten (siehe 2.4.2.1) fixiert, ohne dass die Pflanzen dabei beschädigt wurden. Die Küvetten wurden mit  $100 \text{ ml min}^{-1}$  ambienter Außenluft für 4-6 Stunden bei RT gespült. Das in der Küvettenluft enthaltene Isopren wurde dabei auf Adsorberröhrchen gesammelt und anschließend gaschromatographisch analysiert (siehe 2.4.2.2). Über die Messung am GC-

MS konnten gleichzeitig auch die enthaltenen Monoterpene gemessen werden. Die Emissionsmessung wurde an den 40 sechs bis zehn Wochen alten transgenen Pflanzen sowie an drei nur mit dem Vektor transformierten Pflanzen der Linie K- und neun Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. Bei den transgenen Linien K1-4 und K- handelte es sich dabei bereits um die zweite Filialgeneration, bei den transgenen Linien K5-40 konnte erst auf die erste Filialgeneration zurückgegriffen werden.

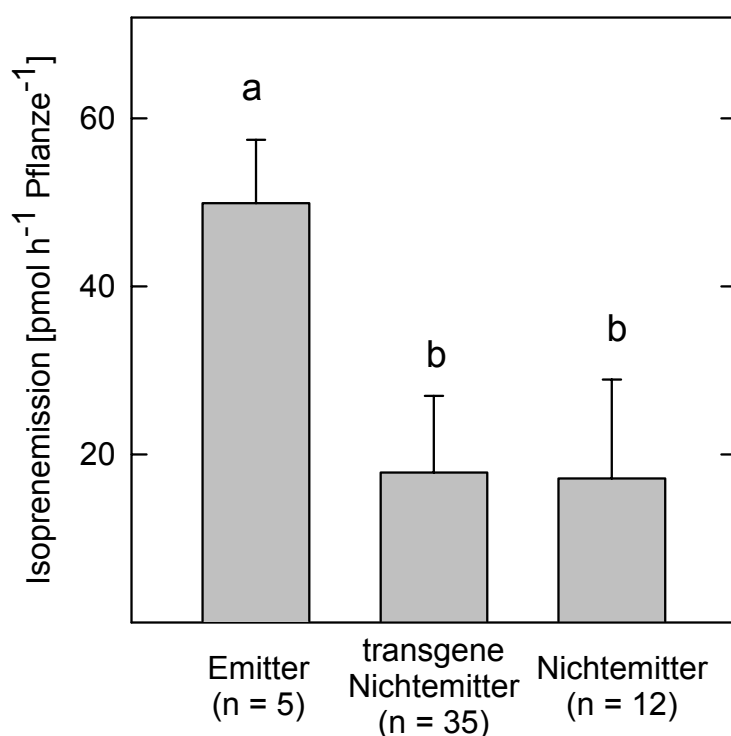
Die Messungen ergaben (Abb. 3.27), dass die Isoprenemissionen der transgenen Linien mit *ispS* nur geringfügig über den Werten der Kontrollpflanzen lagen. Lediglich fünf der 40 untersuchten Pflanzen wiesen eine Emission von  $\geq 40$  pmol Isopren pro Pflanze und Stunde auf und lagen damit mehr als 2,5-fach über dem Mittelwert der Emissionen der Kontrollpflanzen. Die lediglich mit dem Vektor transformierten Linien lagen mit ihrer Isoprenemission wie erwartet im Bereich des Wildtyps.



**Abb. 3.27: Isopren- (A) und Monoterpenemission (B) der transgenen *A. thaliana*-Linien K1-K40.** Gemessen wurde die Emission je einer Blattrosette der *ispS* positiven Linien K1-K40 (■) und im Vergleich dazu von neun Wildtyp-Pflanzen (WT) (■) und drei Pflanzen der Linie K-, die keine *ispS* besitzen. Eine erhöhte Isoprenemission im Vergleich zum Wildtyp und zur Linie K-, die über dem festgesetzten Schwellenwert von  $40 \text{ pmol h}^{-1} \text{Pflanze}^{-1}$  lag, konnte bei den Linien K6, K17, K22, K23 und K27 festgestellt werden. Der Wert der Pflanze mit der geringsten Emission aus dieser Gruppe (gestrichelte Linie) liegt etwa 2,5-fach über dem Mittelwert (■) der WT-Pflanzen und der Pflanzen der Linie K-.

Die Werte der so zur Gruppe der vermutlichen Emittler zusammengefassten fünf transgenen Linien wurden den Werten der als Nicht-Emitter gewerteten restlichen 35 transgenen

Pflanzen gegenübergestellt (Abb. 3.28) und ebenso wie gegenüber den in Bezug auf die *ispS* nicht transgenen Pflanzen der Linie K- und den Wildtyp-Pflanzen auf einen signifikanten Unterschied hin getestet. Dazu wurde der Mann-Whitney-Test angewendet, ein nichtparametrischer Test zum Vergleich unabhängiger Stichproben. Dabei weist die Gruppe der Emittler einen höchst signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe der Wildtyp- und (K-)Pflanzen auf ( $p \leq 0,01$ ), gegenüber den transgenen Nicht-Emittlern einen signifikanten Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) und gegenüber beiden Gruppen zusammengefasst ebenfalls einen höchst signifikanten Unterschied ( $p \leq 0,01$ ). Zwischen der Gruppe der ursprünglichen Nicht-Emittler und der Gruppe der transgenen Pflanzen, die als Nicht-Emittler gewertet wurden, besteht kein signifikanter Unterschied.

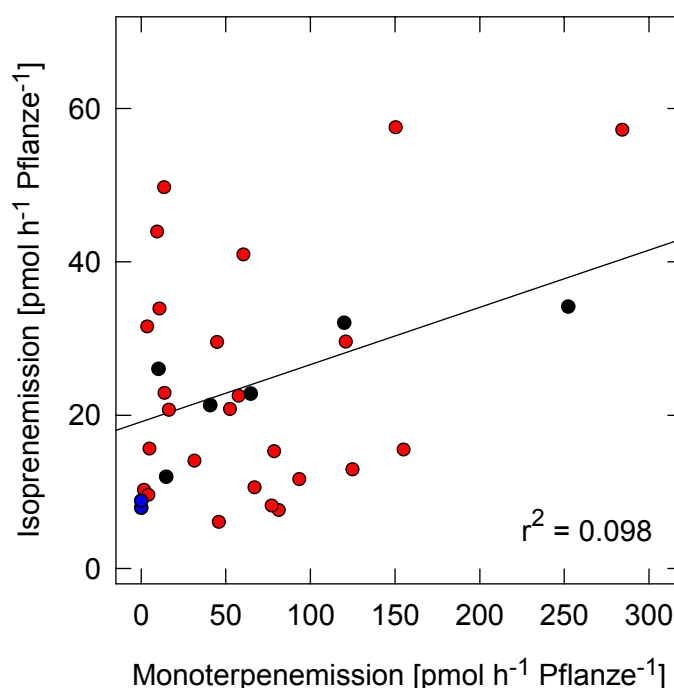


**Abb. 3.28: Mittlere Emission und Standardabweichung von Emittlern, transgenen Nicht-Emittlern und Nicht-Emittlern.** Als Emittler wurden alle transgenen Pflanzen gewertet, die mehr als 40 pmol h<sup>-1</sup> Isopren emittierten, als transgene Nicht-Emittler alle Pflanzen, die trotz der Integration des *ispS*-Gens ins Genom weniger als 40 pmol h<sup>-1</sup> Isopren emittierten. Die Pflanzen ohne *ispS*-Gen (WT und Pflanzen der Linie K-) sind Nicht-Emittler. Die Gruppen wurden über den Mann-Whitney-Test auf einen signifikanten Unterschied hin getestet. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Für eine weitere Untersuchung hinsichtlich der quantitativen Genexpression (3.4.4.3) wurden aufgrund dieser Messung die Linien K6, K17, K22, K23 und K27 herangezogen, die in ihrer Emission 2,5-fach über dem Wert der Kontrollpflanzen lagen (Abb. 3.27A) und als Isoprenemittler gewertet wurden. Hinzuzufügen ist, dass es sich bei diesen fünf gemessenen

Pflanzen um die erste Filialgeneration handelte, bei der davon ausgegangen werden muss, dass das *ispS*-Gen, zumindest an einem Genort, nur einfach im Genom vorliegt. Auf homozygote Linien kann erst nach Selbstung dieser Pflanzen zurückgegriffen werden.

Neben der Isoprenemission konnte auch die Höhe der Monoterpenemission gemessen werden. Sie fiel sehr unterschiedlich aus (Abb. 3.27B), die Werte korrelierten jedoch nicht mit den Werten der Isoprenemission (Abb. 3.29). Sie bewegten sich in einem Bereich von 0 bis über 700 pmol pro Pflanze und Stunde.



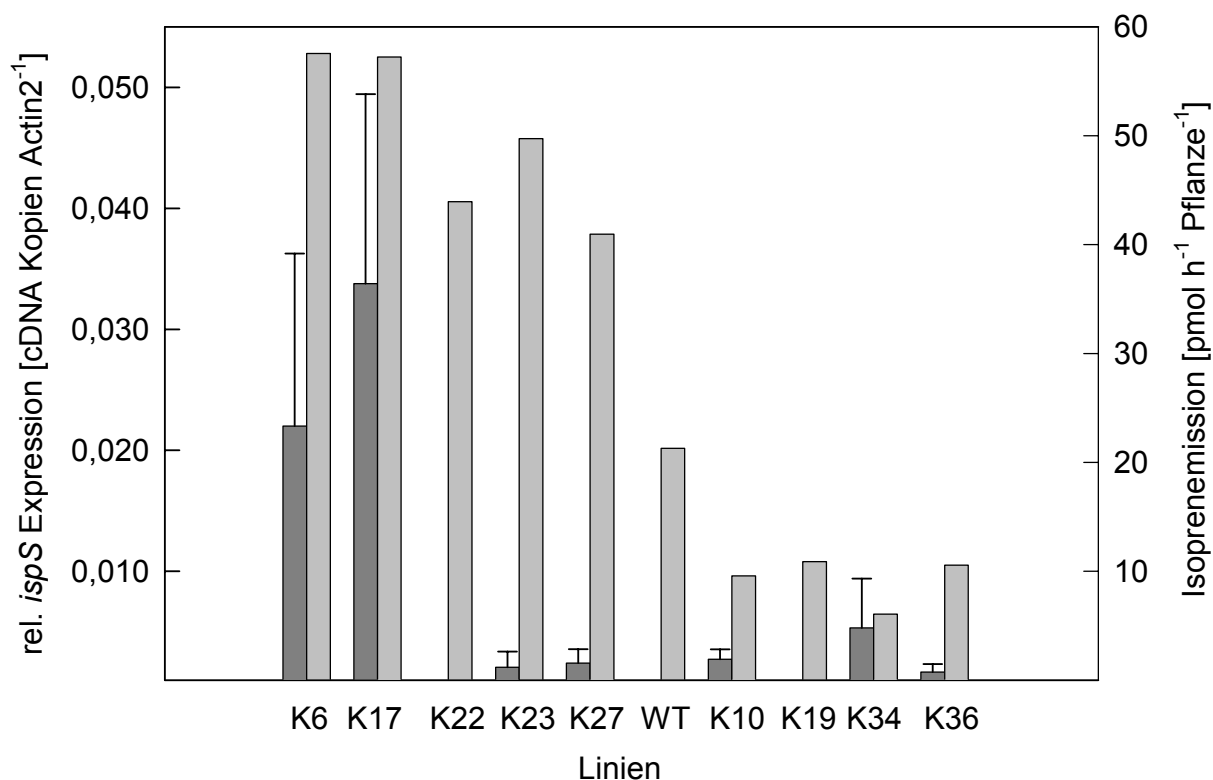
**Abb. 3.29:** Korrelation der Isoprenemission und der Monoterpenemission der Linien K1-K40, Wildtyp und K-. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden. ● K1-K40, ● Wildtyp, ● K-.

Die Zusammensetzung der Monoterpene wurde für die 27 Pflanzen, bei denen eine Terpenemission gemessen werden konnte, bestimmt. Die vorwiegend emittierten Monoterpene waren  $\alpha$ - (über 50%) und  $\beta$ -Pinen bzw. Sabinen (über 20%). Außerdem nachgewiesen werden konnten *p*-Cymol, Limonen,  $\Delta^3$ -Caren, Eucalyptol und Myrcen, die durchschnittlich jeweils 4 – 20 % am Gesamtspektrum ausmachten.

#### 3.4.4.3 Bestimmung der mRNA-Kopien der *ispS* in transgenen Linien

Zum quantitativen Nachweis der Genexpression wurde die Anzahl der mRNA-Kopien der *ispS* in transgenen Linien mittels quantitativer PCR (2.2.8.2) bestimmt. Diese wurde für die

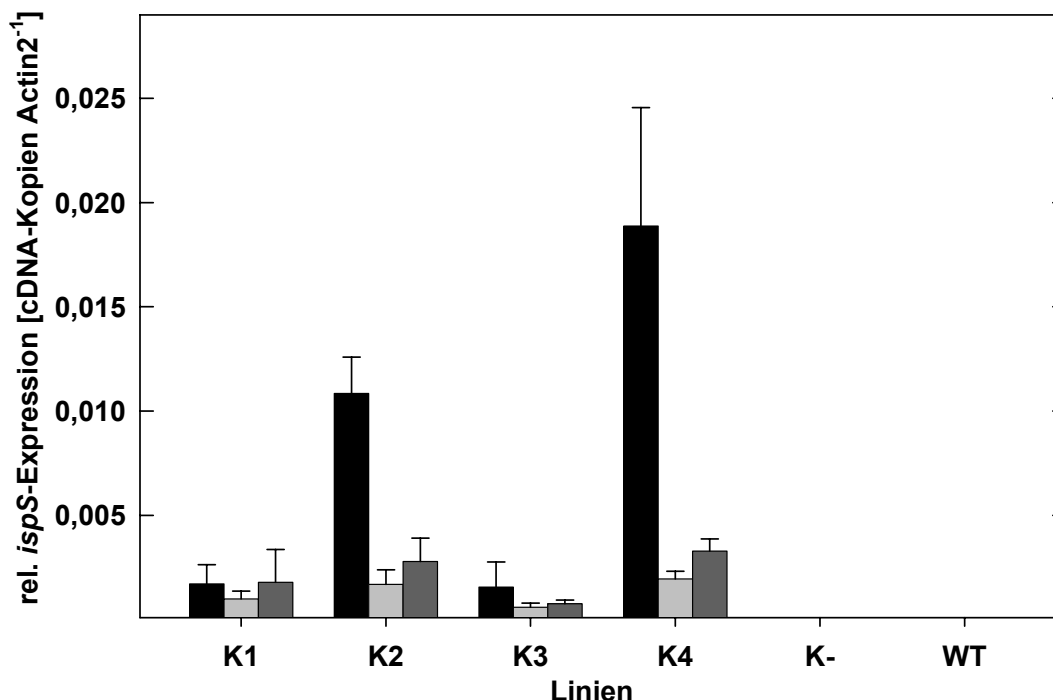
fünf Linien K6, K17, K22, K23 und K27, die bei der Emissionsmessung eine deutlich erhöhte Isoprenemission zeigten (siehe Abb. 3.27A), durchgeführt. Dazu wurde aus je ein bis zwei Blättern die RNA extrahiert und in cDNA überschrieben und anschließend in der quantitativen PCR mit den Primern *is\_for\_spez* und *is\_rev\_spez* eingesetzt. Die gemessenen *ispS*-Genkopien wurden dann auf die Kopienzahl des Actin2-Gens normiert. Zum Vergleich wurden auch vier Pflanzen, die eine deutlich niedrigere Emission zeigten, und eine Wildtyp-Pflanze vermessen (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30: Vergleich der Höhe der *ispS*-Genexpression im Blatt mit der Höhe der Isoprenemission der Blattrosette.** Abgebildet sind ■ die relative Anzahl der *ispS*-Genkopien ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ) und □ die Isoprenemission. Ausgewählt wurden transgene *A. thaliana*-Linien mit erhöhter Isoprenemission (K6, K17, K22, K23, K27) und transgene *A. thaliana*-Linien mit niedriger Isoprenemission (K10, K19, K34, K36) und zum Vergleich der Wildtyp (WT). Die Anzahl der *ispS*-Genkopien wurde über quantitative PCR ermittelt und auf eine Genkopie des Actin2 normiert.

Eine der höheren Isoprenemission entsprechende höhere Expression des *ispS*-Gens konnte bei den Linien K6 und K17 festgestellt werden. Die sehr wenig Isopren emittierenden Linien K10, K19, K34 und K36 zeigten auch eine sehr geringe Genexpression, die Wildtyp-Pflanze, wie erwartet, keinerlei Expression. Die Linien K22, K23 und K27 wiesen hingegen trotz messbarer Isoprenemission keine erhöhte Expression des *ispS*-Gens auf.

Ein möglicher Grund für die sehr niedrige *ispS*-Genexpression und die damit verbundene niedrige Isoprenemission kann ein Einbau in eine Genregion des *A. thaliana*-Genoms sein, die eventuell nicht oder nur schwach im Blatt exprimiert wird, dafür aber mehr in anderen Pflanzenorganen, wie Wurzel oder Stengel. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde von den Linien K1-4, die bereits in der zweiten Filialgeneration vorlagen, jeweils eine Pflanze komplett geerntet und ebenfalls über quantitative PCR (2.2.8.2) die Anzahl der mRNA-Kopien für die *ispS* in den verschiedenen Pflanzenteilen Blatt, Stengel und Wurzel bestimmt. Als Kontrolle wurden auch eine Wildtyp-Pflanze und eine Pflanze der Linie K- überprüft. Die erhaltenen Genkopien wurden wieder auf die Anzahl der Kopien des Actin2 normiert. Die beiden Kontrollpflanzen wiesen in allen Pflanzenteilen keine mit *ispS*-spezifischen Primern (*is\_for\_spez*, *is\_rev\_spez*) amplifizierten Genfragmente auf. Die Linien K1-K4 zeigten insgesamt eine unterschiedlich hohe Expression des *ispS*-Gens (Abb. 3.31). Bei den Linien K1 und K2 lag die Anzahl der Genkopien in allen Pflanzenteilen etwa im gleichen Bereich unter 0,005 Kopien pro Actin2, ebenso wie in Wurzel und Stengel der Linien K3 und K4. Bei diesen beiden Linien war jedoch eine um 5- bis 10-fach höhere Expression in den Blättern zu verzeichnen. Dieses Ergebnis widerlegt die Annahme, dass das *ispS*-Gen an einer Stelle im Genom inseriert wurde, die ungünstig für eine Expression des Gens im Blatt ist.



**Abb. 3.31:** Höhe der *ispS*-Genexpression in den Pflanzenorganen Blatt, Stengel und Wurzel der Linien K1-K4. Die Anzahl der *ispS*-Genkopien wurde über quantitative RT-PCR ermittelt und auf eine Genkopie des Actin2 normiert. Zur Kontrolle wurden auch K- und der Wildtyp beprobt. ■ Blatt; □ Stengel; ▒ Wurzel; n = 3 ± SD.

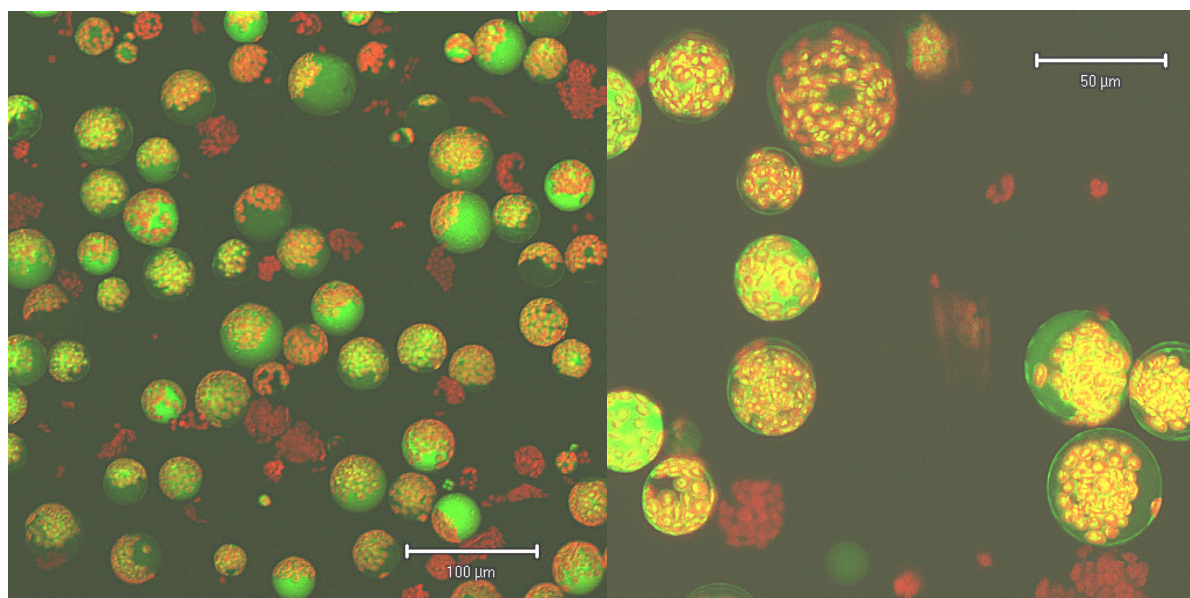


### 3.4.5 Nachweis der ISPS-Aktivität in Blattextrakten transgener *A. thaliana*-Linien

Zum Nachweis einer aktiven ISPS aus Blättern transgener *A. thaliana*-Linien wurden die Proteine aus den Blättern nach der in der Arbeitsgruppe etablierten Standardmethode (2.3.1.3) extrahiert und anschließend mit dem Extrakt ein Aktivitätstest (2.3.2) durchgeführt, der auch bei einem maximalen Einsatz von 88 µl Proteinextrakt pro Ansatz zu keiner messbaren Isoprenbildung führte. Der Test wurde auch mit 88 µl eines über ein Ni-NTA-Säulchen gereinigten Extrakts (2.3.1.2) durchgeführt, der zusätzlich über Membranfiltration aufkonzentriert wurde. Auch hierbei konnte keine ISPS-Aktivität gemessen werden.

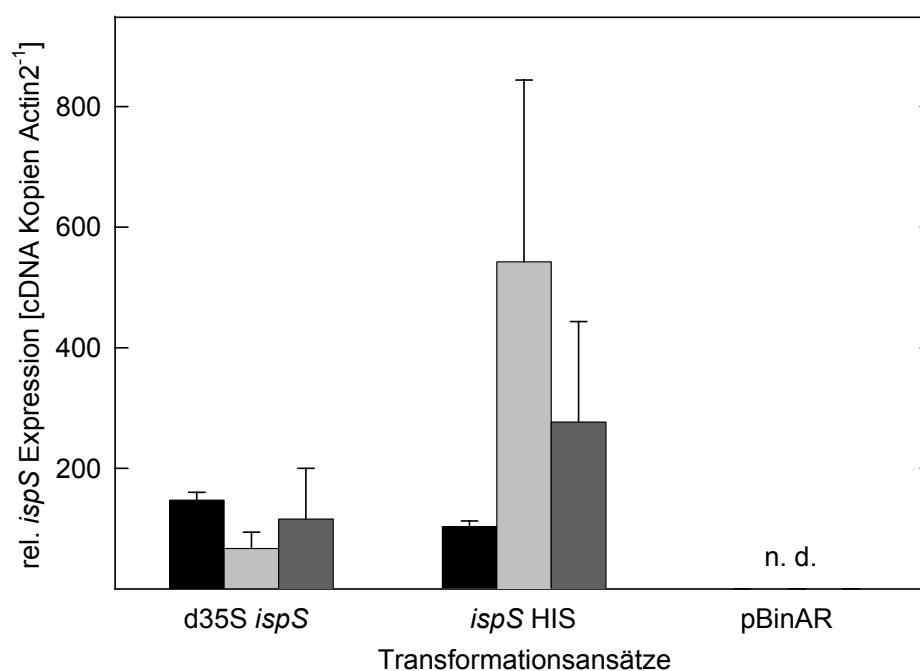
### 3.4.6 Transiente Genexpression der *ispS* in *A. thaliana*-Protoplasten

Eine transiente Genexpression der *ispS* wurde durchgeführt, um zu überprüfen, inwieweit das Anfügen des His-Tag zu einer Beeinträchtigung der ISPS-Synthese und –Aktivität in pflanzlichen Zellen führen und damit Einfluss auf die Isoprenemission haben kann. Hierfür wurden Protoplasten aus *A. thaliana*-Blättern isoliert (Abb. 3.32) und über chemische Poration der Vektor pBinAR (Abb. 2.1) mit dem His-Tag markierten *ispS*-Gen bzw. der leere Vektor eingeschleust. Als Vergleich diente die unmarkierte *ispS*, die im Vektor pJIT163 im Anschluss an zwei 35S-Promotoren vorlag. Dieser Vektor wurde so von Dr. T. Fenning vom MPI für ökologische Chemie in Jena zur Verfügung gestellt.



**Abb. 3.32: Vitalitätsfärbung protoplastierter *A. thaliana*-Zellen aus Blattgewebe mit Fluorescein-diacetat (0,1 % w/v).** Gezeigt ist eine Aufnahme am cLSM. Die Vitalität lag bei ca. 80 %. Die Anzahl der zur Transformation zur Verfügung stehenden Protoplasten wurde am Lichtmikroskop mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ohne Färbung ausgezählt.

Die Menge an Transkript wurde nach einer 16-stündigen Inkubation der Protoplasten im Licht mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Hierbei zeigte sich bei 3-maliger Wiederholung des Versuchs, dass die höchsten Kopienzahlen bei der Transformation mit dem Vektor pBinAR mit His-Tag markierter *ispS* gemessen werden konnten. Die Transkriptmenge der Protoplasten mit dem unveränderten Gen der ISPS hinter einem doppelten 35S-Promotor lag in zwei der drei Experimente niedriger. Die Kontrollen mit dem leeren Vektor ergaben kein Signal (Abb. 3.33).

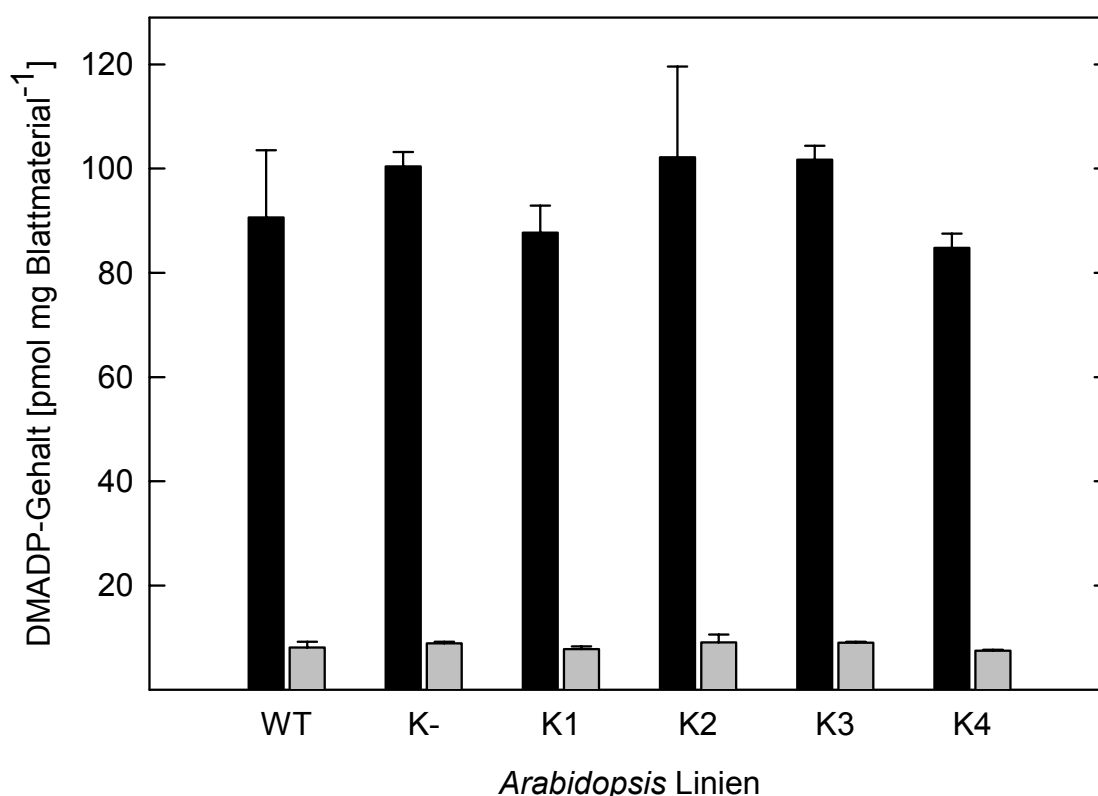


**Abb. 3.33: *ispS*-Genexpression transient transgener Protoplasten.** Je 500  $\mu$ l Protoplastensuspension (Protoplasten-Dichte: 340000  $\text{ml}^{-1}$ ) wurden mit unmarkiertem *ispS*-Gen mit doppeltem 35S-Promotor im Vektor pJT163 (*d35S ispS*), mit *ispS*-Gen mit His-Tag im Vektor pBinAR (*ispS* HIS) und zur Kontrolle mit dem leeren Vektor pBinAR (pBinAR) transformiert. Entsprechend ihrer Größe wurden, um etwa die gleiche Anzahl von Plasmiden pro Transformation zu verwenden, vom 14,5 kbp großen pBinARIS 10,7  $\mu$ g und vom 5,5 kbp großen pJT163IS 4,1  $\mu$ g eingesetzt. Die *ispS*-Genexpression wurde nach 16 h über quantitative RT-PCR bestimmt. ■ Versuch 1; □ Versuch 2; ▒ Versuch 3; n = 3  $\pm$  SD

Um zu testen, ob die beobachtete Transkription des *ispS*-Gens zu einer messbaren ISPS-Aktivität geführt hatte, wurde eine zweite Probe 40 Stunden nach PEG-Poration genommen, Proteinextrakte hergestellt und auf ihre ISPS-Aktivität hin getestet. Hierbei zeigte sich, dass die aus den Protoplasten gewonnene Proteinmenge im Bereich der Nachweisgrenze lag. Eine ISPS-Aktivität konnte auch bei einer 4-stündigen Inkubation unter für das Enzym optimalen Bedingungen nicht gemessen werden.

### 3.4.7 Der DMADP-Gehalt von *A. thaliana*-Blättern

Alle bekannten ISPS weisen bezüglich ihres Substrates DMADP extrem hohe  $K_m$ -Werte im Bereich von mM auf (siehe auch Tab. 3.1). Dies bedeutet für transformierte *A. thaliana*-Pflanzen, dass trotz positiver Transformation der DMADP-Gehalt in den Chloroplasten von *A. thaliana* möglicherweise so gering ist, dass es aufgrund von Substratmangel zu keiner deutlich messbaren Isoprenbildung kommen kann. Um einen möglichen Hinweis in diese Richtung zu bekommen, wurde der intrazelluläre DMADP-Gehalt in *A. thaliana*-Blättern von transgenen wie auch von Wildtyp-Pflanzen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass keine Unterschiede im DMADP-Gehalt zwischen den Varianten vorlagen, die Werte lagen bei allen Linien im Bereich von 80 bis und 100  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  (Abb. 3.34). Verglichen mit DMADP-Bestimmungen bei der Graupappel (*Populus x canescens*), einem starken natürlichen Isoprenemitter, die zu Werten von 100 – 600  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  Trockengewicht führten (MAYRHOFER persönliche Mitteilung), liegen die Messwerte in einem ähnlichen Bereich.

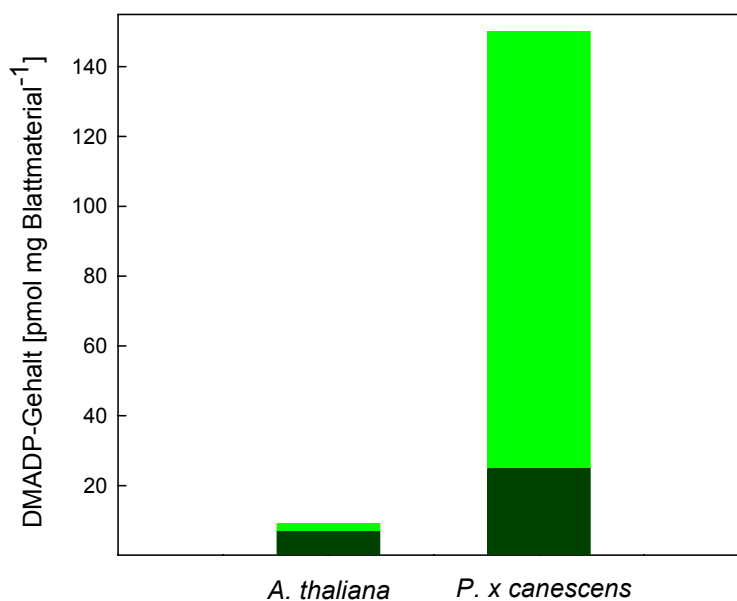


**Abb. 3.34: Gehalt an Dimethylallyl-diphosphat in Blättern von *A. thaliana* Wildtyp (WT), Linie K- und Linien K1 bis K4.** Es wurden je 4 bis 7 mg lyophilisiertes Blattpulver gemessen (2.3.3). Der Gehalt an Dimethylallyl-diphosphat in Blättern von *A. thaliana* Wildtyp (WT), Linie K- und Linien K1 bis K4 pro mg Frischgewicht wurde anhand der Werte pro mg Trockengewicht über das Verhältnis von Trocken- zu Frischgewicht (Tab. 3.2) umgerechnet. ■ DMADP-Gehalt im getrockneten Blattpulver; □ errechneter DMADP-Gehalt im frischen Blatt; n = 3 ± SD

Bei diesem Vergleich ist jedoch das unterschiedliche Verhältnis von Frisch- zu Trockengewicht bei *A. thaliana* und Graupappel zu beachten. Im Falle von *A. thaliana*-Blättern macht das Trockengewicht lediglich durchschnittlich 8,9 % vom Frischgewicht aus (siehe Tab. 3.2), während bei Pappelblättern dieses Verhältnis bei 24,5 % liegt (MAYRHOFER persönliche Mitteilung).

frisch(mg)	trocken(mg)	Prozentanteil trocken/frisch (%)
125	12	9,60
81	7,2	8,89
110	9,2	8,36
95	8,9	9,37
147	12,3	8,37
203	18,1	8,92
<b>Mittelwert:</b>		<b>8,92</b>

**Tab. 3.2: Bestimmung des Verhältnisses von Trockengewicht zu Frischgewicht bei *A. thaliana*-Blättern.** Dazu wurden frische Blattproben gewogen und deren Einwaage nach Gefriertrocknung bestimmt.



**Abb. 3.35: Unterschiedlicher DMADP-Gehalt von *A. thaliana*- und Pappelblättern.** Angegeben ist der jeweils niedrigste (■) und höchste (■) gemessene DMADP-Gehalt im frischen Blattmaterial. Die Werte für die Pappel stammen von MAYRHOFER, unveröffentlicht.

Bezogen auf das Frischgewicht liegen damit die DMADP-Gehalte der *A. thaliana*-Blätter mit umgerechnet ca. 7-9 pmol mg<sup>-1</sup> Blattmaterial deutlich unter den Werten von 25 -150 pmol mg<sup>-1</sup> frischem Blattmaterial, wie sie demnach für die Graupappel berechnet werden konnten (Abb. 3.35).

## 4 Diskussion

Die physiologische Bedeutung der Isoprenbildung und –emission bei Pflanzen wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* L., die kein nennenswerter Isoprenemitter ist, mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in einen Isoprenemitter zu verwandeln und diese transgenen Linien zu charakterisieren. Hierzu musste zunächst ein binärer Transformationsvektor mit dem *ispS* Gen der Graupappel (EMBL Nr.: AJ294819) hergestellt werden. Um das hieraus gebildete Enzym aus den transgenen Pflanzenlinien leicht aufzureinigen und detektieren zu können, sollten Markierungen eingefügt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten funktionelle Derivate der ISPS aus Pappel hergestellt werden, die zunächst im bakteriellen System exprimiert wurden. Die heterolog exprimierten Enzyme wurden eingehend hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften charakterisiert und mit der nativen ISPS aus Pappel verglichen. Schließlich wurde die Modell-Pflanze *A. thaliana* mit einem Genderivat transformiert und die daraus erhaltenen Linien auf ihre Transgenität und auf ihre Isoprenemission hin untersucht. Es konnten 40 eindeutig transgene *A. thaliana*-Linien isoliert werden, die das *ispS* Gen stabil ins pflanzliche Genom integriert haben und die entsprechende mRNA produzieren. Unter den ersten vier homozygot getesteten Linien aus dem ersten Transformationsansatz waren jedoch keine signifikanten Isoprenemitter zu finden. Unter den 36 heterozygot getesteten Linien der zweiten Transformation zeigten fünf eine leicht erhöhte Isoprenemission. Es bleibt daher zu diskutieren, woran dieser unerwartet geringe Erfolg der Expression des aus der Pappel stammenden Isoprensynthasegens in *A. thaliana* liegen könnte.

### 4.1 MEP-Stoffwechsel und DMADP-Gehalt als Voraussetzung zur Expression des *ispS*-Gens in *A. thaliana*

Zur Expression der *ispS* aus Pappel in einer nicht Isopren-emittierenden Pflanze wurde *A. thaliana* ausgewählt, ein Modellsystem, mit dem es bereits zahlreiche Erfahrung im Transformieren gibt und das mit einem Generationszyklus von ca. 8 Wochen eine Erfolgskontrolle in einem überschaubaren Zeitraum liefert. Besonders wichtig in diesem Fall war jedoch auch, dass alle Voraussetzungen gegeben waren, mit Hilfe der ISPS auch Isopren produzieren zu können. Dies bedeutet, in der Pflanze musste der Mevalonat unabhängige MEP-Stoffwechselweg vorhanden sein und gut funktionieren. Dies ist bei *A. thaliana* der Fall. Bereits im Rahmen der Aufdeckung der am MEP-Stoffwechselweg in Chloroplasten beteiligten Enzyme und der zugehörigen Gene wurden einige zunächst in *A. thaliana* nachgewiesen. SCHWENDER ET AL. (1999) gelang es, die *dxr* aus dieser Pflanze

zu isolieren, in *E. coli* zu exprimieren und die Funktion der DXR als 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase nachzuweisen. Als CMS (4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase) konnte das Genprodukt des Gens *ispD* aus *A. thaliana* von ROHDICH ET AL. (2000) identifiziert werden. Mittlerweile wurden noch weitere Gene des MEP-Pfades aus *A. thaliana* isoliert und in verschiedenen Datenbanken registriert (LICHTENTHALER 2000). Die *dxs* aus *A. thaliana* trägt die Nummer Q38854 in der Swissprot Datenbank (MANDEL ET AL. 1996), die *dxr* Nummer AJ242588 in der EMBL-Datenbank (SCHWENDER ET AL. 1999) und die *ispD* AF 230737 (ROHDICH ET AL. 2000), die *ispE* AAC32234 (UNVERÖFFENTLICHT) und die *ispF* AAF07360 (UNVERÖFFENTLICHT) in der GenBank Datenbank. Die Identifizierung des Gens für die DXS in *A. thaliana* erfolgte über eine *A. thaliana*-Mutante, die einen Defekt im Gen *CLA1* aufwies und dadurch einen chlorotischen Phänotyp zeigte. Durch Zugabe von 1-deoxy-D-xylulose konnte der Defekt behoben werden (MANDEL ET AL. 1996, ARAKI ET AL. 2000). NAGATA ET AL. (2002) verwendeten eine Null-Mutante, die keine DXS exprimierte, die sie als Albino-Mutante bezeichneten, da das Ausschalten des MEP-Stoffwechselweges dazu führte, dass keine funktionellen plastidären Isoprenoide, wie Chlorophyll und Carotinoide gebildet wurden, die zur Chloroplastenentwicklung nötig wären. Das bedeutet, dass der MEP-Stoffwechselweg in Wildtyp-Pflanzen intensiv abläuft und essentiell für die Bildung plastidärer Isoprenoide ist.

ESTEVEZ ET AL. (2001) zeigten ferner durch den Vergleich transgener *A. thaliana*-Linien, die die DXS unterschiedlich stark über- oder unterexprimierten, mit Wildtyp-Pflanzen einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivität des MEP-Stoffwechselweges dem Level verschiedener plastidärer Isoprenoide. KASAHARA ET AL. (2004) konnten über <sup>13</sup>C-Markierung feststellen, dass die Prenyl-Gruppe des *trans*-Zeatin und Isopentenyladenin bei *A. thaliana* hauptsächlich über den MEP-Weg produziert werden. Allerdings steht der plastidäre MEP-Weg vermutlich mit dem cytosolischen Mevalonat-Weg über den Austausch von Intermediaten in Verbindung. So zeigten NAGATA ET AL. (2002) und RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN ET AL. (2004), dass bei *A. thaliana* ein Austausch des IDP zwischen den Kompartimenten Cytosol und Chloroplast besteht, obwohl LORETO ET AL. (2004) für *Populus nigra* und *Phragmites australis* dagegen zu dem Ergebnis kommen, dass keine Verbindung zwischen den beiden Stoffwechselwegen besteht.

*A. thaliana* ist zudem eine Pflanze, die Monoterpene emittiert, die über den MEP-Pfad synthetisiert werden. CHEN ET AL. (2003) stellten dies vor allem für die Blüten von *A. thaliana* fest. Die Autoren konnten die Expression von 25 der im Genom von *A. thaliana* enthaltenen 32 putativen Terpensynthasen (*AtTPS*) über RT-PCR nachweisen, wobei 20 dieser Gene in den Blüten exprimiert wurden, sechs davon sogar ausschließlich dort. Bei der Analyse der emittierten Gase am GC-MS konnten 14 Mono- und Sesquiterpene identifiziert werden. Die

am meisten emittierten Monoterpene sind dabei  $\beta$ -Myrcen, Limonen und Linalool, die jedoch verglichen mit der Emission an Sesquiterpenen nur einen geringen Teil der emittierten Terpene darstellen. Beim Screening der vollständig vorhandenen Genomsequenz von *A. thaliana* nach Terpensynthasen der *AtTPS* Genfamilie (Terpensynthasen aus *A. thaliana*) durch AUBOURG ET AL. (2002) wurden 32 putative Terpensynthasen gefunden, die aber in den meisten Fällen noch isoliert und exprimiert werden müssen. Bis jetzt konnten SUN ET AL. (1994) und YAMAGUCHI ET AL. (1998) eine Kaurensynthase identifizieren (*AtTPSGA1*). BOHLMANN ET AL. (2000) beschrieben eine Myrcen-/ $\beta$ -Ocimen-Synthase (*AtTPS10*) und FÄLDT ET AL. (2003) eine Monoterpensynthase, die *in vitro* zu 94% (*E*)- $\beta$ -Ocimen produziert (*AtTPS03*). Eine Monoterpensynthase, die nur in der Wurzel von *A. thaliana* exprimiert wird wurde von CHEN ET AL. (2004) gefunden. Sie katalysiert dort die Bildung von 1,8-Cineol und wird als *AtTPS-Cin* bezeichnet. Die 32 putativen Terpensynthasen können der Sequenz nach fünf der sechs phylogenetischen Unterfamilien innerhalb der Familie der pflanzlichen Terpensynthasen zugeordnet werden.

Neben der Messung des von *A. thaliana* abgegebenen Isoprens am GC-MS für diese Arbeit wurde gleichzeitig auch die Monoterpenemission der Pflanzen gemessen (3.4.4.2), so dass gezeigt werden kann, dass kein Zusammenhang zwischen der Monoterpen- und Isoprenemission vorhanden war.

Die Monoterpenemission der getesteten Pflanzen fällt sehr unterschiedlich aus, korreliert jedoch nicht mit der Isoprenemission (Abb. 3.29), was bedeutet, dass die höhere Isoprenemission nicht darauf zurückzuführen ist, dass die Pflanzen verschieden groß oder verschieden aktiv waren und deshalb bei größeren oder aktiveren Pflanzen insgesamt eine höhere Emission pro Pflanze gemessen wurde, sondern dass die erhöhte Isoprenbildung wirklich durch die Transgenität dieser Linien ausgelöst wird. Dass bei einigen Pflanzen keine Monoterpenemission zu messen war, aber eine leichte Isoprenemission, dürfte darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle Pflanzen zur Messung blühten. Eine kontinuierliche Emission von Terpenen konnte bei *A. thaliana* bisher jedoch hauptsächlich von Blüten gemessen werden (AHARONI ET AL. 2003, CHEN ET AL. 2003). Bei den Blattrosetten dagegen ist die Bildung von Terpenen induzierbar (BOHLMANN ET AL. 2000, FÄLDT ET AL. 2003). Das in der vorliegenden Arbeit auf *A. thaliana* übertragene Isoprensynthasegen steht jedoch unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und wird somit ununterbrochen exprimiert.

Die Zusammensetzung der Monoterpene fällt jedoch sehr viel anders aus, als sie von CHEN ET AL. (2003) gemessen wurde. Dort wird als Hauptkomponente der Monoterpene  $\beta$ -Myrcen genannt, gefolgt von Linalool und Limonen, während in den vorliegenden Messungen als dominierendes Monoterpen  $\alpha$ -Pinen auftritt, dazu  $\beta$ -Pinen und einige andere Monoterpene,

die bei CHEN ET AL. (2003) gar nicht genannt wurden. Linalool konnte dagegen bei den Messungen für diese Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die einzig gemeinsam nachgewiesene Substanz ist Limonen.

In letzter Zeit konnten aber bereits transgene *A. thaliana*-Pflanzen hergestellt werden, die Terpensynthasen exprimieren. So gelang es AHARONI ET AL. (2003), eine Linalool-/Nerolidol-Synthase aus der Erdbeere erfolgreich in *A. thaliana* zu exprimieren und eine erhöhte Emission zu messen. Das für die Krebsbehandlung wichtige Taxol aus der Eibe konnte von BESUMBES ET AL. (2004) über transgene *A. thaliana*-Pflanzen gewonnen werden. Dazu wurde die Taxadien-Synthase aus der Eibe in *A. thaliana* exprimiert. Beide Enzyme nutzen aber im Unterschied zur Isoprensynthase als Substrat nicht DMADP, sondern das aus IPP und DMADP gebildete Geranyldiphosphat (GDP) bzw. Geranylgeranyldiphosphat (GGDP). Die C<sub>5</sub>-Einheit DMADP steht also nicht ausschließlich für die Isoprenbildung zur Verfügung, sondern stellt neben seiner isomeren Form, dem IDP, einen universellen Baustein für alle höheren Isoprenoide (Chlorophyll, Carotinoide, Abscissinsäure, Gibberelline und Plastoquinone) dar, die in hohem Maße von der Pflanze benötigt werden.

Die Messung des DMADP-Gehaltes in *A. thaliana*-Blättern (3.4.7) ergab ebenso, dass das Substrat für die Isoprensynthase zwar in geringerem Maße, als im natürlichen Isoprenemitter Pappel, aber doch vorhanden ist (3.4.7).

Bei der Methode zur Bestimmung des DMADP-Gehalts in Blattmaterial kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob das DMADP aus den Chloroplasten stammt oder aus dem Cytosol, bzw. wie es zwischen Cytosol und Chloroplasten verteilt vorliegt. Abschätzungen bzw. Messungen von BRÜGGEMANN & SCHNITZLER (2002) und ROSENSTIEL ET AL. (2002) deuten jedoch auf ein Verhältnis von 70 % plastidär zu 30 % cytosolisch hin.

Diese internen DMADP-Konzentrationen scheinen für die Monoterpenbildung ausreichend zu sein, da Monoterpene als Wundantwort (FÄLDT ET AL. 2003) oder auch ständig in Blüten (CHEN ET AL. 2003) gebildet werden können. Im Unterschied zu der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten ISPS der Graupappel (3.3.2), sowie ISPS anderer Arten, die ebenfalls apparente  $K_m$ -Werte im mmolaren Bereich haben (SCHNITZLER ET AL. 1996, LEHNING ET AL. 1999, SILVER & FALL 1991, 1995), zeichnen sich Monoterpensynthasen der verschiedensten Arten durch  $K_m$ -Werte im  $\mu$ molaren Bereich aus (ALONSO & CROTEAU 1991, LEWINSOHN ET AL. 1992, ALONSO ET AL. 1992, COLBY ET AL. 1993, CROTEAU ET AL. 1994, PICHESKY ET AL. 1995, FISCHBACH 2001). Dies könnte also bedeuten, dass die eingeschleuste ISPS im Chloroplast von *A. thaliana* unter Substratmangel arbeitet und damit die niedrigen Emissionsraten erklärt werden könnten.



## 4.2 Funktionsfähigkeit des *ispS*-Genkonstruktes

Die Sequenz der aus der Graupappel isolierten cDNA der ISPS (MILLER ET AL. 2001) musste zum Einbau in den binären Vektor verändert werden, da entsprechende Restriktionsschnittstellen sowie Markierungen eingefügt wurden. Des Weiteren kann bei der Übertragung des Gens auf die Pflanze ein Teil verändert werden, verloren gehen oder gedreht werden. Neben dem bereits diskutierten hohen  $K_m$ -Wert der ISPS und der damit verbundenen Substratverfügbarkeit, stellen diese Veränderungen eine weitere denkbare Möglichkeit dar, weshalb die Isoprenemission der transgenen *A. thaliana*-Linien sehr gering ausfiel bzw. bei vielen Linien gar nicht zu messen war.

Die einfachste Erklärung wäre eine Veränderung der Gensequenz oder gar der Verlust eines Teils der Sequenz bei der Übertragung durch *A. tumefaciens* auf *A. thaliana*. Beides kann jedoch dadurch ausgeschlossen werden, dass aus der genomischen DNA der transgenen Linie K1, die keine wesentliche Isoprenemission zeigte, das vollständige Isoprensynthasegen über PCR vervielfältigt, in *E. coli* kloniert und vollständig sequenziert werden konnte. Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz wurde auf eventuelle Veränderungen gegenüber der ursprünglichen Sequenz und der in *E. coli* getesteten Sequenz hin überprüft und es konnten keine Fehler gefunden werden, die eine weitreichende Veränderung der *ispS* zur Konsequenz haben könnten (3.3.3.2).

Grundsätzlich wurde die Funktionsfähigkeit des veränderten Isoprensynthasegens ja bereits in *E. coli* getestet. Die transformierten *E. coli*-Kulturen lieferten ein funktionsfähiges ISPS-Protein, was bedeutet, dass die vereinzelt Basenaustausche, die von der Synthese der Kernsequenz über Taq-Polymerase her rühren, weder zu einem Kettenabbruch, noch zu einer tief greifenden Veränderung der Proteinstruktur führten. Dies ergaben auch die Sequenzierungen der drei Teilsequenzen, also des Transitpeptids, der Kernsequenz sowie des PolyA-Signals samt His-Tag, aus denen das letztendlich auf *A. thaliana* übertragene *ispS*-Genderivat zusammengesetzt wurde. Welchen Einfluss aber das Verändern von Basen am Übergang von codierender Sequenz des Transitpeptids zur Kernsequenz hat, konnte nicht bestimmt werden. Die Sequenz musste so verändert werden, dass eine *NcoI*-Schnittstelle entstand, um beide Sequenzteile zusammenfügen zu können. Dabei erfolgte ein Aminosäureaustausch von einer Glutaminsäure durch ein Methionin. Diese Aminosäure wurde zwar mit in *E. coli* exprimiert und hatte dort keine Auswirkungen. Zum Anfügen des His-Tag und Polyadenylierungssignal an die Kernsequenz musste außerdem eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt werden, die dazu führte, dass die Proteinsequenz um zwei weitere Aminosäuren, Glycin und Serin verlängert wurde. Doch diese beiden Aminosäuren waren

auch bei der Expression in *E. coli* aufgrund der Schnittstelle zwischen Enzymsequenz und den sechs Histidinen eingefügt. Die Schnittstelle am Ende des Polyadenylierungssignals dürfte auch dessen Funktion nicht beeinträchtigen, da die Synthese der cDNA mit Hilfe von Oligo(dT) über das Poly-A-Ende der mRNA erfolgreich war.

Da jedoch nicht genau bekannt ist, wo die für das Abtrennen des Transitpeptids essentielle Stelle sitzt, könnte es sein, dass mit dem Einfügen der Schnittstelle *NcoI* am Übergang von codierender Sequenz für das Transitpeptid und Kernsequenz der ISPS eine sensible Zone getroffen und die Aminosäuresequenz so verändert wurde, dass die Abspaltung beim Eintritt des Enzyms in den Chloroplast nicht mehr erfolgen kann. Expressionsanalysen in *E. coli* haben bereits gezeigt, dass ein nicht abgespaltenes Transitpeptid die Aktivität der ISPS maßgeblich negativ beeinflusst (MILLER 2001). Die Isoprenemission mit Transitpeptid betrug im bakteriellen System nur etwa die Hälfte (ca. 53 %) der Emission ohne dieses. Des Weiteren hat die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte biochemische Charakterisierung der verschiedenen Derivate der Isoprensynthase gezeigt, dass durch das Einführen eines C-terminalen His-Tags die Aktivität der ISPS auf etwa 20 % reduziert wurde. Zusätzlich muss durch eine mögliche Nicht-Abtrennung des Transitpeptids mit einer weiteren Reduzierung bis hin zur Halbierung der Enzymaktivität gerechnet werden. Damit würden rechnerisch noch etwa 10% der ursprünglichen Aktivität der ISPS der Graupappel verbleiben, was sehr wenig ist. Dass die geringe bzw. fehlende Isoprenemission auf die Veränderungen in der Nukleotidsequenz zurückzuführen ist, dagegen spricht jedoch das Ergebnis einer ersten Transformation von Protoplasten von *A. thaliana*, die auch mit einem unveränderten *ispS*-Gen, das ohne eingefügte Schnittstellen und Markierung in eine Expressionsvektor hinter einen doppelten 35S-Promotor einkloniert worden war, durchgeführt wurde und bei erhöhter Genexpression zu keiner Isoprenemission führten (3.4.6). Dies kann jedoch auch daran liegen, dass in diesem geringen Maßstab von etwa 170 000 Zellen eine Emission unter der Nachweisgrenze lag. Sie hätte bei mindestens 30 pmol pro Testansatz im 2ml-Gefäß liegen müssen, um eine Messung zu ermöglichen (BRÜGGEMANN 2002).

Des Weiteren muss in diesem Zusammenhang bedacht werden, dass die codierende Sequenz des Transitpeptids aus der Pappel stammt und es durchaus sein kann, dass das Transitpeptid in *A. thaliana* nicht erkannt wird, was dazu führen könnte, dass das Enzym nicht prozessiert wird, was wieder die oben genannten Konsequenzen hätte, oder gar nicht im Chloroplast ankommt. Dagegen spricht jedoch, dass es AHARONI ET AL. (2003) sogar gelang, eine ursprünglich im Cytosol vorkommende Linalool-/Nerolidol-Synthase aus der Erdbeere mit einem ebenfalls artfremden angehängten Transitpeptid aus der wilden

Erdbeere erfolgreich in *A. thaliana*-Chloroplasten zu exprimieren. Die Lokalisation konnte durch ein Hybridkonstrukt mit dem green fluorescent protein *in vivo* nachgewiesen werden. BESUMBES ET AL. (2004) exprimierten sogar mit dem aus *Taxus baccata* L. stammenden Taxadien-Synthasegen ebenfalls ein aus einer verholzten Pflanze isoliertes Gen mit der eigenen Sequenz für das Transitpeptid und waren damit erfolgreich.

Durch das Anfügen eines Epitops an die Kernsequenz der *ispS* vor das Polyadenylierungssignal wurde jedoch eine nicht unbedeutende Veränderung vorgenommen, deren Einfluss auf die Enzymaktivität auch bei der Expression in Bakterien zu sehen ist (3.2.2). Das Anfügen des HA-Epitops führte zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Der angehängte His-Tag reduzierte die Funktion auf etwa 20 % gegenüber dem unmarkiert in *E. coli* exprimierten Enzym. Für eine genauere biochemische Charakterisierung der ISPS-Derivate wurden diese noch *in vitro* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität bei gleicher Enzymkonzentration im Vergleich zur ebenfalls heterolog exprimierten, aber N-terminal markierten Isoprensynthase durchschnittlich auf die gleichen etwa 20-25 % reduziert wurde. Das bedeutet, dass die verringerte Isoprenemission in der *in vivo*-Expression wohl nicht auf eine geringere Expression des Gens oder geringere Translationsraten zurückzuführen ist, sondern auf die Veränderung in der Proteinsequenz, die eine geringere Aktivität des Enzyms zur Folge hat.

### 4.3 Höhe der Expression des *ispS*-Gens in *A. thaliana*

Ein weiterer Faktor, der die Höhe der Isoprenemission der transgenen Linien bestimmt, ist die Höhe der Expression des Gens in der Pflanze. Grundsätzlich dürfte diese permanent hoch sein, da die übertragene *ispS* unter der Kontrolle eines 35S-Promotors steht. Es könnte aber sein, dass das Gen in einer Region im Genom der Pflanze inseriert ist, deren Transkription nur schwach oder unter speziellen Bedingungen oder gewebe- oder organspezifisch erfolgt. Da der Einbau jedoch zufällig passiert, ist es bei der Untersuchung von 40 Linien äußerst unwahrscheinlich, dass er niemals an einer für die Expression günstigen Stelle erfolgte. Außerdem zeigten die Analysen der Genexpression in den einzelnen Pflanzenorganen der ersten vier Linien K1-K4 auch, dass die *ispS* nicht etwa nur in der Wurzel oder im Stiel, sondern auch in der Rosette exprimiert wurde, obwohl beim Messen der Blattrosetten nur geringe Emissionen detektiert werden konnten. Im Gegenteil, in den Blättern zeigte sich sogar bei zwei der beprobten Linien eine erhöhte Genexpression gegenüber den anderen Organen (3.4.4.3).

Im Unterschied zu den Linien K1-K4 der ersten Transformation, die zum Zeitpunkt der Emissionsmessung in der zweiten Filialgeneration vorlagen, lagen die Linien K5-K40 nur als erste Filialgeneration vor. Diese tragen das *ispS*-Gen nur an einem Genort (BECHTHOLD ET AL. 1993, FELDMANN 1991), da jeweils nur die weiblichen Fortpflanzungsorgane transformiert werden, nicht die männlichen (DESFEUX ET AL. 2000). Dies führt im Vergleich zu homozygoten Linien zu einer niedrigeren Transkriptzahl und damit möglicherweise zu weniger aktivem Protein. Erst durch Selbstung dieser Generation können homozygote Linien gewonnen werden. Dies war jedoch aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

#### 4.4 Biochemische Eigenschaften der Isoprensynthase und ihrer Derivate

Die Isoprensynthase wurde bereits in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen und charakterisiert (KUZMA & FALL 1993, SILVER & FALL 1995, SCHNITZLER ET AL. 1996, WILDERMUTH & FALL 1998 und LEHNING ET AL. 1999). Für die aus Pflanzenextrakten isolierten ISPS beschreiben alle Autoren ähnliche Eigenschaften, die auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden konnten, ein pH-Optimum im alkalischen Bereich, das Benötigen von  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  als Cofaktor und einen relativ hohen  $K_m$ -Wert für DMADP im millimolaren Bereich.

Bereits bei der *in vivo*-Expression der ISPS-Derivate zeichnete sich ab, dass die Veränderung der Sequenz zu einer erheblichen Beeinflussung der Enzymaktivität führte. Die Erweiterung der Peptidsequenz um das Nonapeptid HA am C-terminalen Ende führte sogar zum vollkommenen Aktivitätsverlust. Das zur Transformation von *A. thaliana* verwendete *ispS*-Genderivat mit codierender Sequenz für einen C-terminal angehängten His-Tag zeigte auch bereits bei der heterologen Expression in *E. coli* eine geringere Aktivität. Die Isoprenemission war im Vergleich zur unmarkiert in *E. coli* exprimierten ISPS um ca. 80 % niedriger, was wohl auf eine Einschränkung der Enzymaktivität aufgrund der veränderten Proteinstruktur zurück zu führen ist.

Der *in vitro*-Vergleich der aus den Bakterien gewonnenen ISPS mit C-terminalem His-Tag und der unmarkierten Isoprensynthase aus *E. coli* kann hinsichtlich der maximalen Aktivität ( $v_{max}$ ) nicht direkt vorgenommen werden, da diese auf die Proteinmenge bezogen wird und die unmarkierte ISPS ohne Markierung nicht aus dem *E. coli*-Proteingemisch gereinigt werden konnte. Es ist dagegen nur ein direkter Vergleich mit der N-terminal markierten ISPS möglich, die ebenfalls gereinigt werden konnte. Die C-terminal markierte ISPS zeigte eine

$v_{\max}$ , die etwa einem Achtel der  $v_{\max}$  der N-terminal markierten entspricht. Dadurch, dass sich jedoch die Affinität zum Substrat nicht in gleichem Maße verschlechtert hat, was sich in einem niedrigeren  $K_m$ -Wert für die C-terminal markierte ISPS abzeichnete, ist die Einbuße in der Aktivität bei geringeren Konzentrationen weniger dramatisch. Die halbmaximale Geschwindigkeit ist für die C-terminal markierte ISPS bereits bei einer Enzymkonzentration von 1,2 mM DMADP erreicht. Bei gleicher DMADP-Konzentration war jedoch die Aktivität der N-terminal markierten ISPS erst etwa bei einem Viertel bis Fünftel der maximal möglichen Aktivität dieser Variante angelangt. Dies bedeutet der direkte Vergleich bei einer Substratkonzentration von 1,2 mM Substrat ergibt eine Aktivitätseinbuße der C-terminal markierten ISPS von nur 50 % im Vergleich zur N-terminal markierten. Erst bei höheren Enzymkonzentrationen klafft diese Schere immer weiter auseinander (Abb. 3.13).

Da jedoch in *A. thaliana*-Blättern ein relativ niedriger DMADP-Gehalt von 7-9 pmol mg<sup>-1</sup> frischem Blattmaterial zu messen war, dürfte bei der Expression der ISPS in *A. thaliana* die Aktivitätseinbuße im niedrigeren Konzentrationsbereich mehr von Bedeutung sein.

Hinzu kommt, dass die optimalen Bedingungen für das Enzym mit C-terminalem His-Tag *in vitro* bei einer noch höheren Temperatur von 45 - 50°C liegen. Da die Funktion der ISPS als Schutz bei erhöhter Temperatur überprüft werden soll, dürfte diese Tatsache jedoch nicht nachteilig sein, da eine mögliche Wirkung der ISPS bei einer deutlich erhöhten Blatttemperatur zu messen sein wird. SINGSAAS ET AL. (1997) konnten z. B. eine Erhöhung der Thermotoleranz des Photosyntheseapparates unter Isoprenbegasung bis zu einer Temperatur von 45 °C messen.

Die Erhöhung der Aktivierungsenergie der C-terminal mit einem His-Tag markierten ISPS ist mit etwa 50 % im Vergleich zur nativen Isoprensynthase sehr hoch. Hier verhält es sich jedoch ebenso, dass unter den angestrebten Vergleichsbedingungen einer Wildtyp-Pflanze mit einer transgenen Pflanze, die die Fähigkeit zur Isoprenemission besitzt, nämlich einer erhöhten Temperatur und Einstrahlung der nötige Energiebedarf ausreichend gedeckt sein dürfte.

Die Ergebnisse der Enzymkinetik, die auf eine positive Kooperativität des Enzyms hindeuten und damit auf eine Zusammenlagerung der ISPS-Monomere zu einem Di- oder Polymer sind dagegen zu bedenken. Denn dabei könnte das Anfügen eines Epitops an die Proteinsequenz einen gravierenden Einfluss haben. Es könnte bewirken, dass eine Zusammenlagerung der Monomere nicht mehr möglich ist. SILVER & FALL (1995) haben die ISPS aus der Zitterpappel als ein dimeres Enzym beschrieben. Sie vermuteten jedoch ein Heterodimer, was seit der Klonierung und heterologen Expression der *ispS* mit

Funktionsnachweis jedoch ausgeschlossen werden konnte. Gegen eine homodi- oder -polymere Struktur der ISPS spricht jedoch eindeutig das Ergebnis der Größenbestimmung der ISPS-Derivate, die unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde und verglichen mit der Berechnung der Größe anhand der Nukleinsäuresequenz einem Monomer entspricht. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass es auch monomere Enzyme gibt, die in ihrer Kinetik einem Enzym mit positiver Kooperativität ähneln. Ein Beispiel dafür ist die Ribonuclease I, deren Verhalten bereits 1974 von RÜBSAMEN ET AL. beschrieben wurde. Es handelt sich dabei um ein eindeutig monomeres Enzym, das ebenfalls eine sigmoide Kinetik zeigte. Ein weiteres Beispiel ist die Hexokinase D, die als einziges Mitglied der Familie der Hexokinasen eine positive Kooperativität mit dem Substrat Glukose eingeht, das eine Konformationsänderung des Enzyms bewirkt (CARDENAS ET AL. 1984). Dies wird auch als „slow transition model“ bezeichnet. Zudem hat dieses Enzym, wie die Isoprensynthase, einen sehr hohen  $K_m$ -Wert im millimolaren Bereich, bei allen anderen Hexokinasen liegt dieser Wert im mikromolaren Bereich (XU ET AL. 1995, AGIUS & STUBBS 2000). AGIUS & STUBBS (2000) favorisierten ein „two-site model“, das an dem Enzym zwei Bindungsstellen für Glukose annimmt, die Ergebnisse von MONASTERIO & CARDENAS (2003) unterstützen jedoch die Annahme, dass es sich nur um eine Bindungsstelle handelt.

Was jedoch durchaus sein könnte, ist, dass die ISPS zwar monomer vorliegt, jedoch eine Affinität zur Thylakoidmembran aufweist. Bereits WILDERMUTH & FALL (1996, 1998) konnten in Weide eine thylakoidgebundene ISPS-Aktivität nachweisen. Zudem konnten elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten der Pappel gemacht werden, bei denen die ISPS durch Immunogold-Färbung eindeutig lokalisierbar ist (SCHNITZLER, persönliche Mitteilung). Darin ist zu erkennen, dass 56% der Goldpartikel an die dem Stroma zugewandeten Seite der Thylakoidmembran angelagert waren. Falls diese Proteine, wie bei WILDERMUTH UND FALL (1998) diskutiert, einen Membrananker besitzen, der womöglich am C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert ist, dann könnte ein an diesem Ende angehängter His-Tag womöglich den Verlust der Fähigkeit zur Assoziation mit der Membran zur Folge haben.

In der Literatur sind verschiedenste Erfahrungen mit C-terminalen Modifikationen und mit der C-terminalen Markierung über His-Tag zu finden. OSTER ET AL. (2004) mussten z. B. eine Aktivitätseinbuße der Deacetoxycephalosporin-Synthase von *Streptomyces clavuligerus* feststellen, sobald die Proteinsequenz um mehr als die letzten vier C-terminalen Aminosäuren verkürzt wurde. BALDWIN ET AL. (2004) kamen zu dem Ergebnis, dass das C-terminale Ende einer Untereinheit des Neurotoxin Typ A aus *Clostridium botulinum* verantwortlich ist für die Löslichkeit, die katalytische Wirkung und die Stabilität der

Untereinheit. Dies bedeutet, dass eine Veränderung dieser Region durchaus zu Veränderungen der Eigenschaften des Enzyms führen kann, wie es die biochemische Charakterisierung der C-terminal markierten ISPS im Rahmen dieser Arbeit auch zeigte. Andererseits kann nicht zwingend davon ausgegangen werden, dass eine solche Modifikation Auswirkungen auf die Eigenschaften eines Enzyms hat. BESUMBES ET AL. (2004) hatten beispielsweise keine Probleme bei der Expression der C-terminal sechsfach Histidin-markierten Taxadiensynthase aus der Eibe in *A. thaliana*. Bei der Überexpression des Alpha-Apoproteins des LH1 Komplexes aus *Rhodospirillum rubrum* in *E. coli* mit C-terminalem His-Tag erhielten SHIMADA ET AL. (2004) ein voll funktionsfähiges Enzym, obwohl es sich dabei um ein Transmembranprotein handelt, das in der inneren Zellmembran lokalisiert ist.

Eine Markierung am N-terminalen Ende eines Enzyms scheint, wie es auch in dieser Arbeit für die ISPS festgestellt werden konnte, weniger Einfluss auf die Funktionalität eines Enzyms zu haben. So konnten MUELLER ET AL. (2004) die  $\beta$ -Untereinheit der mitochondrialen  $F_1$ -ATPase aus der Hefe mit einem N-terminalen His-Tag versehen, ohne anschließend eine Veränderung in der Aktivität zu verzeichnen. ICHIKAWA & MIZUNO (2004) markierten dasselbe Enzym auf die gleiche Weise und ersetzten zusätzlich das ursprüngliche Transitpeptid durch das Transitpeptid eines mitochondrialen ATPase-Inhibitors mit bekannter Prozessierungsstelle. Das Enzym konnte funktionell exprimiert werden. Ebenso waren Apoproteine der Phytochrome phyB und phyC, die am N-terminalen Ende mit sechs myc markiert worden waren bei der Expression in *A. thaliana* aktiv (SHARROCK & CLACK 2004). Eine N-terminale Markierung war aber nicht möglich, da sie bei der Prozessierung des Enzyms verloren gegangen wäre. Zudem konnte, wie die Beispiele zeigen, nicht zwingend davon ausgegangen werden, dass eine Veränderung am C-terminalen Ende einen so starken Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat.

## 4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein binärer Vektor zur Agrobakterien vermittelten Transformation von Pflanzen mit der *ispS* aus der Graupappel hergestellt. Mit diesem Genkonstrukt wurde die Modellpflanze *A. thaliana*, die kein nennenswerter Isoprenemitter ist, transformiert und mehrere transgene Linien isoliert, von denen einige auch eine erhöhte Isoprenemission zeigten. Da diese Erhöhung der Isoprenemission jedoch nicht so hoch ausfällt, wie sie eigentlich für einen Vergleich zwischen Wildtyp- und transgener Pflanze zu wünschen wäre, muss in nachfolgenden Arbeiten versucht werden, die vorhandene Emission noch weiter zu erhöhen.

Die erste Maßnahme dazu wird das Selbsten der heterozygoten Linien sein, die bereits eine erhöhte Isoprenemission zeigen, um homozygote Linien zu erhalten, die möglicherweise noch mehr ISPS exprimieren. Des Weiteren könnte eine Erhöhung des intrazellulären DMADP-Gehalt von *A. thaliana* zu einer erhöhten Isoprenemission dieser Linien führen, da so der ISPS eine höhere Substratkonzentration geboten werden könnte und der Fluss durch den MEP-Stoffwechselweg erhöht werden könnte, um so auch einem möglichen Mangel an C<sub>5</sub>-Einheiten für die höheren Isoprenoide vorzubeugen. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen wäre die Coexpression der DXS aus *Synechococcus leopoliensis* (MILLER 2001), deren Wirkung bereits bei MILLER 2001 und in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. LANGE & KETCHUM (2002) kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass die DXR das limitierende Enzym des MEP-Stoffwechselweges darstellt und konnten nach der Transformation von Pfefferminze mit dem *dxr*-Gen eine erhöhte Ölproduktion feststellen bzw. eine Verminderung der Ölproduktion bei Unterdrückung der Genexpression. Da von MAYRHOFER (UNVERÖFFENTLICHT) das *dxr*-Gen (EMBL-NR.: AJ574852) aus der Pappel isoliert werden konnte, wäre sogar eine Transformation mit dem aus der Pappel stammenden Gen möglich. Bereits MCCASKILL & CROTEAU kamen (1998) zu dem Schluss, dass es bei der Komplexität der Terpensynthese in Pflanzen zur Veränderung des Terpenoidprofils einer Pflanze vermutlich oft zweier oder mehrerer Manipulationen innerhalb des Stoffwechsels bedarf.

Gleichzeitig sollte auch der Versuch gemacht werden, die *ispS* unmarkiert in *A. thaliana* zu exprimieren, da die Modifikation mit einem His-Tag am C-terminalen Ende einen nicht unbedeutenden Einfluss auf die biochemischen Eigenschaften hat. Damit würde man allerdings die Möglichkeit verlieren die Isoprensynthase leicht detektieren und reinigen zu können.

Die Genkassette, die zur Transformation von *A. thaliana* bereits verwendet wurde, kann auch zur Transformation weiterer Pflanzenarten, wie der Pappel verwendet werden, um in diesem Isoprenemitter die *ispS* unter der Kontrolle des 35S Promotors über zu exprimieren. Durch das Epitop kann das zusätzlich exprimierte Gen identifiziert und die Höhe der Expression quantifiziert werden. Eine Expression in Pappel dürfte weniger Risiken bergen, da die meisten Unwägbarkeiten, die für die Expression in *A. thaliana* diskutiert wurden von vornherein ausgeschlossen werden können. So ist klar, dass bei einem natürlichen Isoprenemitter der MEP-Stoffwechsel als Grundvoraussetzung in geeignetem Maße vorhanden ist und damit auch das Substrat DMADP. Außerdem stammt das Transitpeptid aus der Pappel und wird daher auch in der Pappel sicher erkannt. Ob das Anfügen der Basensequenz für das Transitpeptid an die Kernsequenz des *ispS*-Gens über eine Schnittstelle und das damit einhergehende Einfügen von zwei Aminosäuren an dieser Stelle



Auswirkungen hat, kann in einer *in vitro* -Transkription und –Translation unter Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin mit anschließender *in vitro*-Prozessierung durch Zugabe eines stromalen Extraktes aus Pappelchloroplasten überprüft werden. Nachteilig in diesem Zusammenhang wäre aber sicherlich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigte Aktivitätsverlust durch den C-terminalen His-Tag.

Linien derselben Art mit deutlich unterschiedlich hoher Isoprenemission können dann verwendet werden, um sie unter verschiedenen Stressbedingungen (Temperaturstress, oxidativer Stress) zu testen. Durch einen entsprechenden Vergleich mit dem Wildtyp kann dann die physiologische Bedeutung der Isoprenbildung und –emission untersucht werden.



## 5 Literatur

- ABEL S, THEOLOGIS A (1994): Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: A versatile experimental system to study gene expression. *Plant J* **5**, 421-7.
- ADAM KP, ZAPP J (1998): Biosynthesis of of the isoprene units of chamomille sesquiterpenes. *Phytochem* **48**, 653-659.
- ADAM P, HECHT S, EISENREICH W, KAISER W, GRÄWERT T, ARIGONI D, BACHER A, ROHDICH F (2002): Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 12108-12113.
- AFFEK HP, YAKIR D (2002) Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiol* **129**, 269-277.
- AGIUS L, STUBBS M (2000): Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. *Biochem J* **346**, 413-421.
- AHARONI A, GIRI AP, DEUERLEIN S, GRIEPINK F, DE KOGEL WJ, VERSTAPPEN FW, VERHOEVEN HA, JONGSMA MA, SCHWAB W, BOUWMEESTER HJ. (2003): Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **15**, 2866-84.
- ALONSO WR & CROTEAU R (1991): Purification and characterization of the monoterpene cyclase  $\gamma$ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. *Arch Biochem Biophys* **286**, 511-517.
- ALONSO WR & CROTEAU R (1993): Prenyltransferases and cyclases. *Methods Plant Biochem* **9**, 239-260.
- ALONSO WR, RAJAONARIVONY JIM, GERSHENZON J, CROTEAU R (1992): Purification of 4S-Limonen Synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). *J Biol Chem* **267**, 7582-7587.
- ANDREAE MO, BROWELL EV, GARSTANG M, GREGORY GL, HARRISS RC, HILL GF, JACOB DJ, PEREIRA MC, SACHSE GW, SETZER AW, DIAS PLS, TALBOT RW, TORRES AL, WOFSY SC (1988): Biomass burning emissions and associated haze layers over amazonia, *J Geophys Res* **93**, 1509-1527.
- ARAKI N, KUSUMI K, MASAMOTO K, NIWA Y, IBA K (2000): Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-Xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiol Plant* **108**, 19-24.
- ARIGONI D, SAGNER S, LATZEL C, EISENREICH W, BACHER A, ZENK MH (1997): Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular rearrangement. *Proc Nat. Acad Sci USA* **94**, 10600-10605.
- ATKINSON R (1990): Gas-phase tropospheric chemistry of organic compounds: a review. *Atmos Environ* **24 A**, 1-41.
- AUBOURG S, LECHARNY A, BOHLMANN J (2002): Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **267**, 730-745.

- BALDWIN MR, BRADSHAW M, JOHNSON EA, BARBIERI JT. (2004): The C-terminus of botulinum neurotoxin type A light chain contributes to solubility, catalysis, and stability. *Protein Expr Purif* **37**, 187-195.
- BECHTHOLD N, ELLIS J, PELLETIER G (1993): *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris Life Sci* **316**, 1194-1199.
- BESUMBES O, SAURET-GUETO S, PHILLIPS MA, IMPERIAL S, RODRIGUEZ-CONCEPCION M, BORONAT A (2004): Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol Bioeng* **88**, 168-75.
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- BISSWANGER H (1984): Cooperativity in highly aggregated systems. *J Biol Chem* **259**, 2457-2465.
- BISSWANGER H (1994): Enzymkinetik. Theorie und Methoden 2nd Edn. VCH-Wiley, Weinheim, Germany.
- BOHLMANN J, MEYER-GAUEN G, CROTEAU R (1998): Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4126-4133.
- BOHLMANN J, MARTIN D, OLDHAM NJ, GERSHENZON J. (2000): Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/(E)- $\beta$ -ocimene synthase. *Arch Biochem Biophys* **375**, 262-269.
- BOUVIER F, D'HARLINGUE A, SUIRE C, BACKHAUS RA, CAMARA B (1998): Dedicatet roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol* **117**, 1423-1431.
- BRADFORD MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram Quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry* **72**, 248-254.
- BRÜGGEMANN N (2002): Untersuchungen zur Regulation der Isoprenbildung bei Eichen. Dissertation, *Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung* **70**.
- BRÜGGEMANN N, SCHNITZLER JP (2002): Diurnal variation of dimethylallyl diphosphate concentrations in oak (*Quercus robur* L.) leaves. *Physiol Plant* **115**, 190-196.
- CARDENAS ML, RABAJILLE E, NIEMEYER H (1984): Suppression of kinetic cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors. A slow transition model. *European J Biochem* **145**, 163-171.
- CHAMEIDES WL, LINDSAY RW, RICHARDSON J, KIANG CS (1988): The role of biogenic hydrocarbons in urban photochemical smog: Atlanta as a case study. *Science* **241**, 1473-1475.

- CHEN F, RO D-K, PETRI J, GERSCHENZON J, BOHLMANN J, PICHERSKY E, THOLL D (2004): Characterization of a Root-Specific *Arabidopsis* Terpene Synthase Responsible for the Formation of the Volatile Monoterpene 1,8-Cineole. *Plant Physiol* **135**, 1956-1966.
- CHEN F, THOLL D, D'AURIA JC, FAROOQ A, PICHERSKY E, GERSHENZON J (2003): Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **15**, 481-94.
- CLOUGH SJ, BENT AF (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-43.
- COLBY SM, ALONSO WR, KATAHIRA EJ, MCGARVEY DJ, CROTEAU R (1993): 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *J Biol Chem* **268**, 23016-23024
- CROTEAU R, ALONSO WR, KOEPP AE, JOHNSON MA (1994): Biosynthesis of monoterpenes: Partial purification, characterization, and mechanism of action of 1,8-cineole synthase. *Arch Biochem and Biophys* **309**, 184-192.
- DESFEUX C, CLOUGH SJ, BENT AF (2000): Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol* **123**, 895-904.
- DISCH A, HEMMERLIN A, BACH TJ, ROHMER M (1998B): Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side-chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J* **331**, 615-621.
- DISCH A, SCHWENDER J, MÜLLER C, LICHTENTHALER HK, ROHMER M (1998A): Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J* **333**, 381-388.
- DOELLING JH & PIKAARD CS (1993): Transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts derived from rapidly established cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* **12**, 241-244.
- DOELLING JH, GAUDINO RJ, PIKAARD CS (1993): Functional Analysis of *Arabidopsis thaliana* rRNA Gene and Spacer Promoters in vivo and by Transient Expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7528-7532.
- DUVOLD T, BRAVO JM, PALE-GROSDÉMANGE C, ROHMER M (1997): Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol, a putative C<sub>5</sub> intermediate in the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetr Lett* **38**, 4769-4772.
- EISENREICH W, ROHDICH F, BACHER A (2001): Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* **6**, 78-84.
- ESTEVEZ JM, CANTERO A, REINDL A, REICHLER S, LEON P (2001): 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphatase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* **276**, 22901-22909.

- FÄLDT J, ARIMURA G, GERSHENZON J, TAKABAYASHI J, BOHLMANN J (2003): Functional identification of AtTPS03 as (E)-beta-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 745-51.
- FALL R (1999): Biogenic emission of volatile organic compounds from higher plants. In: Reactive Hydrocarbons in the Atmosphere (ED.: HEWITT CN). *Academic Press San Diego*, 44-95.
- FELDMANN K (1991): T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J* **1**, 71-82.
- FELLERMEIER M, SAGNER S, SPITELLER P, SPITELLER M, ZENK M (2003): Early steps of deoxyxylulose phosphate pathway in chromoplasts of higher plants. *Phytochem* **64**, 199-207.
- FISCHBACH RJ (2001): Monoterpensynthesen in Blättern der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und der Steineiche (*Quercus ilex* L.). Dissertation, *Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung* **67**.
- FISCHBACH RJ, ZIMMER W, SCHNITZLER JP (2001): Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase of holm oak (*Quercus ilex* L.). *Eur J Biochem* **268**, 5633-5638.
- FLÜGGE U-I (1999): Phosphate translocators in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 27-45.
- GUENTHER AB, HEWITT CN, ERICKSON D, FALL R, GERON C, GRAEDEL T, HARLEY P, KLINGER L, LERDAU M, MCKAY WA, PIERCE T, SCHOLES B, STEINBRECHER R, TALLAMRAJU R, TAYLOR J, ZIMMERMAN P (1995): A global model of natural volatile organic compound emissions. *J Geophys Res* **100**, 8873-8892.
- HANSON DT, SWANSON S, GRAHAM LE, SHARKEY TD (1999): Evolutionary significance of isoprene emission of mosses. *Am J Bot* **86**, 634-639.
- HARLEY P, LERDAU M, MONSON RK (1999): Ecological and evolutionary aspects of isoprene emission from plants. *Oecologia* **118**, 109-123.
- HECHT S, EISENREICH W, ADAM P, AMSLINGER S, KIS K, BACHER A, ARIGONI D, ROHDICH F (2001): Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14837-14842.
- HELLENS R, MULLINEAUX P AND KLEE H (2000): A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors, *Trends Plant Sci* **5**, 446-451.
- HERZ S, WUNGSINTAWEEKUL J, SCHUHR CA, HECHT S, LÜTTGEN H, SAGNER S, FELLERMEIER M, EISENREICH W, ZENK MH, BACHER A, ROHDICH F (2000): Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2486-2490.
- ICHIKAWA N, MIZUNO M. (2004): Functional expression of hexahistidine-tagged beta-subunit of yeast F1-ATPase and isolation of the enzyme by immobilized metal affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **37**, 97-101.

- KASAHARA ET AL. (2004): Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosynthesis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **279**, 14049-14054.
- KEENE WC, GALLOWAY JN, HOLDEN JD JR. (1983): Measurement of weak organic acidity in precipitation from remote areas of the world. *J Geophys Res* **88**, 5122-5130.
- KELLER KR, THOMPSON R (1993): A rapid synthesis of isoprenoid diphosphates and their isolation in one step using either thin layer or flash chromatography. *J Chrom* **645**, 161-167.
- KESSELMEIER J, STAUDT M (1999): Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology, and ecology. *J Atm Chem* **33**, 23-88.
- KUZMA J, FALL R (1993): Leaf isoprene emission rate is dependent on leaf development and the level of isoprene synthase. *Plant Physiol* **101**, 435-440.
- KUZUYAMA T, SHIZIMU T, TAKAHASHI S, SETO H (1998): Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetr Lett* **39**, 7913-7916.
- KUZUYAMA T, TAKAGI M, TAKAHASHI S, SETO H (2000): Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL 190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol* **182**, 891-897.
- LANGE BM, CROTEAU R (1999): ISOPRENOID BIOSYNTHESIS VIA A MEVALONATE-INDEPENDENT PATHWAY IN PLANTS: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* **365**, 170-174.
- LANGE BM, KETCHUM REB (2002): Funktional genomics approaches to unravel essential oil biosynthesis. In: *Phytochemistry in the Genomics and Post-Genomics Eras* (Ed.: ROMEO JT, DICON RA). *Rec Adv Phytochem* **36**, 146-162.
- LANGE BM, RUJAN T, MARTIN W, CROTEAU R (2000): Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13172-13177.
- LANGE BM, WILDUNG MR, MCCASKILL D, CROTEAU R (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2100-2104.
- LEHNING A (1999): Untersuchungen zur molekularen Grundlage der Isoprenemission bei der Stieleiche (*Quercus robur* L.). Dissertation, *Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung* **66**.
- LEHNING A, ZIMMER I, STEINBRECHER R, BRÜGGEMANN N, SCHNITZLER JP (1999): Isoprene synthase activity and its relation to isoprene emission in *Quercus robur* L. leaves. *Plant Cell Environ* **22**, 495-504.
- LEWINSOHN E, GIJZEN M, CROTEAU R (1992): Wound-inducible pinene cyclase from grand fir: Purification, characterization and renaturation after SDS-PAGE. *Arch Biochem Biophys* **293**, 167-173.
- LICHTENTHALER HK (1998): The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Fett/Lipid* **100**, 128-138.

- LICHTENTHALER HK, SCHWENDER J, DISCH A, ROHMER M (1997): Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**, 271-274.
- LOGAN BA, MONSON RK (1999): Thermotolerance of leaf-discs from four isoprene-emitting species is not enhanced by exposure to exogenous isoprene. *Plant Physiol* **120**, 821-825.
- LOGAN BA, MONSON RK, POTOSNAK MJ (2000): Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends Plant Sci* **5**, 477-481.
- LOIS LM, CAMPOS N, PUTRA SR, DANIELSEN K, ROHMER M (1998): Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2105-2110.
- LORETO F, MANNOZZI M, MARIS C, NASCETTI P, FERRANTI F, PASQUALINI S (2001): Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiol* **126**, 993-1000.
- LORETO F, PINELLI P, BRANCALEONI E, CICCIOLI P (2004): <sup>13</sup>C labelling reveals chloroplastic and extra-chloroplastic pools of dimethylallyl pyrophosphate and their contribution to isoprene formation. *Plant Physiol* **135**, 1903-1907.
- LORETO F, SHARKEY TD (1990): A gas exchange study of photosynthesis and isoprene emission in *Quercus rubra* L.. *Planta* **182**, 523-531.
- LORETO F, VELIKOVA V (2001): Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol* **127**, 1781-1787.
- LÜTTGEN H, ROHDICH F, HERZ S, WUNGSINTAWEEKUL J, HECHT S, SCHUHR CA, FELLERMEIER M, SAGNER S, ZENK H, BACHER A, EISENREICH W (2000): Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1062-1067.
- MA J, VAN WEELE M (2000): Effect of stratospheric ozone depletion on the net production of ozone in polluted rural areas. *Chemosphere: Global Change Science* **2**, 23-37.
- MANDEL MA, FELDMANN KA, HERRERA-ESTRELLA L, ROCHA-SOSA M, LEON P (1996): CLA 1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J* **9**, 649-658.
- MCCASKILL D, CROTEAU R (1998): Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends Biotech* **16**: 349-355.
- MCGARVEY DJ, CROTEAU R (1995): Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.
- MGALOBISHVILI MP, KHETSURIANI ND, KALANDADZE AN, SANADZE GA (1979): Localization of isoprene biosynthesis in poplar chloroplasts. *Sov. Plant Physiol* **25**, 837-842.



- MILLER B (2001): Erstmalige Isolierung eines Isoprensynthase-Gens und heterologe Expression des aus der Pappel stammenden Gens sowie Charakterisierung der Eingangsgene des Mevalonat-unabhängigen Isoprenoidbiosyntheseweges aus dem Cyanobakterium *Synechococcus leopoliensis*. Dissertation, *Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung* **70**.
- MILLER B, HEUSER T, ZIMMER W (1999): A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harbouring the 1-desoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. *FEBS Lett* **460**, 485-490.
- MILLER ET AL. 1999 MILLER B, HEUSER T, ZIMMER W (2000): Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harbouring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* **481**, 221-226.
- MILLER ET AL. 2001 MILLER B, OSCHINSKI C, ZIMMER W (2001): First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli*. *Planta* **213**, 483-487.
- MONASTERIO O, CARDENAS ML (2003): Kinetic studies of rat liver hexokinase D ("glucokinase") in non-co-operative conditions show an ordered mechanism with MgADP as the last product to be released. *Biochem J* **371**, 29-38.
- MONSON RK, FALL R (1989): Isoprene emission from aspen leaves. *Plant Physiol* **90**, 267-274.
- MONSON RK, HARLEY PC, LITVAK ME, WILDERMUTH M, GUENTHER AB, ZIMMERMAN PR, FALL R (1994): Environmental and developmental controls over the seasonal pattern of isoprene emission from aspen leaves, *Oecologia* **99**, 260-270.
- MORRISON TB, WEIS JJ, WITTEWIT CT (1998): Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR® Green I Monitoring during Amplification. *BioTechniques* **24**, 954-62.
- MUELLER DM, PURI N, KABALEESWARAN V, TERRY C, LESLIE AG, WALKER JE. (2004): Nickelate-affinity purification and crystallization of the yeast mitochondrial F1-ATPase. *Protein Expr Purif* **37**, 479-85.
- NAGATA N, SUZUKI M, YOSHIDA S, MURANAKA T (2002): Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta* **216**, 345-350.
- O'BRIEN JM, SHEPSON PB, MUTHURAMU K, JAO C, NIKI H, HASTIE DR, TAYLOR R, ROUSSEL PB (1995): Measurements of alkyl and multifunctional organic nitrates at a rural site in Ontario. *J Geophys Res* **100**, 22795-22804.
- OSTER LM, VAN SCHELTINGA AC, VALEGARD K, HOSE AM, DUBUS A, HAJDU J, ANDERSSON I. (2004): Conformational flexibility of the C terminus with implications for substrate binding and catalysis revealed in a new crystal form of deacetoxycephalosporin C synthase. *J Mol Biol* **343**, 157-71.
- PEÑUELAS J, LLUSIÀ J (2003): BVOCs: plant defense against climate warming? *Trends Plant Sci* **8**, 105-109.

- PICHERSKY E, LEWINSOHN E, CROTEAU R (1995): Purification and characterisation of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of the floral scent in *Clarkia breweri*. *Arch Biochem Biophys* **316**, 803-807.
- RASMUSSEN RA (1970): Isoprene: Identified as a forest-type emission to the atmosphere. *Environ Sci Tech* **4**, 667-671.
- RICHARD SB, FERRER J-L, BOWMAN ME, LILLO AM, TETZLAFF CN, CANE DE, NOEL JP (2002): Structure and mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4, cyclodiphosphate synthase. *J Biol Chem* **277**, 8667-8672.
- RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN M, BORONAT A (2002): Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiol* **130**, 1079-1089.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION M, FORES O, MARTINEZ-GARCIA JF, GONZALEZ V, PHILLIPS MA, FERRER A, BORONAT A. (2004): Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* **16**, 144-56.
- ROHDICH F, HECHT S, GÄRTNER K, ADAM P, KRIEGER C, AMSLINGER S, ARIGONI D, BACHER A, EISENREICH W (2002): Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1158-1163.
- ROHDICH F, WUNGSINTAWEEKUL J, EISENREICH W, RICHTER G, SCHUHR CA, HECHT S, ZENK MH, BACHER A (2000A): Biosynthesis of terpenoids: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6451-6456.
- ROHDICH F, WUNGSINTAWEEKUL J, FELLERMEIER M, SAGNER S, HERZ S, KIS K, EISENREICH W, BACHER A, ZENK MH (1999): Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 11758-11763.
- ROHDICH F, WUNGSINTAWEEKUL J, LÜTTGEN H, FISCHER M, EISENREICH W, SCHUHR CA, FELLERMEIER M, SCHRAMEK N, ZENK MH, BACHER A (2000B): Biosynthesis of terpenoids: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8251-8256.
- ROHMER M, KNANI M, SIMONIN P, SUTTER B, SAHM H (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295**, 517-524.
- ROHMER M, SEEMANN M, HORBACH S, BRINGER-MEYER S, SAHM H (1996): Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J Am Chem Soc* **118**, 2564-2566.
- ROSENSTIEL TN, EBBETS AL, KHATRI WC, FALL R, MONSON RK (2004): Induction of poplar leaf nitrate reductase: a test of extrachloroplastic control of isoprene emission rate. *Plant Biol* **6**, 12-21.
- ROSENSTIEL TN, FISHER AJ, FALL R, MONSON RK (2002): Differential accumulation of dimethylallyl diphosphate in leaves and needles of isoprene- and methylbutenol-emitting and nonemitting species. *Plant Physiol* **129**, 1276-1284.

- RÜBSAMEN H, KHANDKER R, WITZEL H (1974): Sigmoidal kinetics of monomeric ribonuclease I due to ligand-induced shifts of conformation equilibrium. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* **355**, 687-708.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): Molecular Cloning – a laboratory manual, ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANADZE GA (1957): Emission of organic matters by leaves of *Robinia pseudacacia* L.. *Soobsh Acad Nauk GSSR* **19**, 83.
- SANADZE GA (1990): The principle scheme of photosynthetic carbon conversion in cells of isoprene releasing plants. *Curr Res Photosynth* **IV**, 231-237.
- SANADZE GA, DZHAINI GI, TEVZADZE TM (1972): Incorporation into the isoprene molecule from  $^{13}\text{CO}_2$  assimilated during photosynthesis. *Sov Plant Physiol* **19**, 17-20.
- SANADZE GA, KALANDADZE AN (1966): Light and temperature curves of the evolution of  $\text{C}_5\text{H}_8$  from poplar leaves. *Sov Plant Physiol* **13**, 411-413.
- SANADZE GA, KURSANOV AL (1966): On certain conditions of the evolution of the diene  $\text{C}_5\text{H}_8$  from poplar leaves. *Sov Plant Physiol* **13**, 184-189.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSEN AR (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463- 5468.
- SCHNITZLER JP, ARENZ R, STEINBRECHER R, LEHNING A (1996): Characterization of an isoprene synthase from leaves of *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.. *Bot Acta* **109**, 216-221.
- SCHNITZLER JP, GRAUS M, KREUZWIESER J, HEIZMANN U, RENNENBERG H, WISTHALER A, HANSEL A (2004A): Contribution of different carbon sources to isoprene biosynthesis in poplar (*Populus x canescens*) leaves. *Plant Physiol* **135**, 152-160.
- SCHNITZLER JP, STEINBRECHER R, ZIMMER I, STEIGNER D, FLADUNG M (2004B): Hybridisation of European oaks (*Quercus ilex x Q. robur*) results in a mixed isoprenoid emitter type. *Plant Cell Environ* **27**: 585-593.
- SCHWENDER J, MÜLLER C, ZEIDLER J, LICHTENTHALER HK (1999): Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **455**, 140-144.
- SCHWENDER J, SEEMANN M, LICHTENTHALER HM, ROHMER M (1996): Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem J* **316**, 73-80.
- SELVARAJ G, IYER VN (1985): A small mobilizable IncP group plasmid vector packageable into bacteriophage  $\lambda$  capsids *in vitro*. *Plasmid* **13**, 70-74.
- SHARKEY TD, CHEN X, YEH S (2001): Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiol* **125**, 2001-2006.
- SHARKEY TD, LORETO F (1993): Water stress, temperature and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. *Oecologia* **343**, 1-6.

- SHARKEY TD, LORETO F, DELWICHE CF (1991A): The biochemistry of isoprene emission from leaves during photosynthesis. In *Trace Gas Emissions by Plants* (eds: SHARKEY TD, HOLLAND EA, MOONEY HA) Academic Press, New York, 153-184.
- SHARKEY TD, LORETO F, DELWICHE CF (1991B): High carbon dioxide and sun/shade effects on isoprene emission from oak and aspen tree leaves. *Plant Cell Environ* **14**, 333-338.
- SHARKEY TD, SINGSAAS EL (1995): Why plants emit isoprene. *Nature* **374**, 769-769.
- SHARKEY TD, YEH S (2001): Isoprene emission from plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 407-436.
- SHARROCK RA, CLACK T (2004): Heterodimerization of type II phytochromes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11500-11505.
- SHIMADA Y, WANG ZY, MOCHIZUKI Y, KOBAYASHI M, NOZAWA T. (2004): Funktional expression and charakterisation of a bacterial light-harvesting membrane protein in *Escherichia coli* and cell-free synthesis systems. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 1942-8
- SILVER GM, FALL R (1991): Enzymatic synthesis of isoprene from dimethylallyl diphosphate in aspen leaf extracts. *Plant Physiol* **97**, 1588-1591.
- SILVER GM, FALL R (1995): Characterization of aspen isoprene synthase, an enzyme responsible for leaf isoprene emission to the atmosphere. *J Biol Chem* **270**, 13010-13016.
- SINGSAAS EL, LERDAU M, WINTER K, SHARKEY TD (1997): Isoprene increases thermotolerance of isoprene emitting species. *Plant Physiol* **115**, 1413-1420.
- SINGSAAS EL, SHARKEY TD (2000): The effects of high temperature on isoprene synthesis in oak leaves. *Plant Cell Environ* **23**, 751-757.
- SPRENGER GA, SCHÖRKEN U, WIEGERT T, GROLLE S, DE GRAAF AA, TAYLOR SV, BEGLEY TP, BRINGER-MEYER S, SAHM H (1997): Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12857-12862.
- STEINBRECHER R, ZIEGLER H (1997): Monoterpene production by plants. In *Trees - Contributions to Modern Tree Physiology*. Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H (eds). Backhuys Publishers, Leiden The Netherlands, 119-138.
- SUN TP, KAMIYA Y (1994): The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518.
- TAKAHASHI S, KUZUYAMA T, WATANABE H, SETO H (1998): A 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 9879-9884.
- THOMPSON AM (1992): The oxidizing capacity of the earth's atmosphere: Probable past and future changes. *Science* **256**, 1157-1165.

- TINGEY DT, EVANS RC, BATES EH, GUMPERTZ ML (1987): Isoprene emission and photosynthesis in three ferns- the influence of light and temperature. *Physiol Plant* **69**, 609-616.
- TINGEY DT, MANNING M, GROTHAUS LC, BURNS WF (1979): The influence of light and temperature on isoprene emission rates from live oak. *Physiol Plant* **47**, 112-118.
- TOCQUIN P, PÉRILLEUX C (2004): Design of a versatile device for measuring whole plant gas exchanges in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **162**, 223-229.
- TOGNETTI R, JOHNSON JD, MICHELOZZI M, RASCHI A (1998): Response of foliar metabolism in mature trees of *Quercus pubescens* and *Quercus ilex* to long-term elevated CO<sub>2</sub>. *Environ Exp Bot* **39**, 233-245.
- WILDERMUTH MC, FALL R (1996): Light-dependent isoprene emission. Characterization of a thylakoid-bound isoprene synthase in *Salix discolor* chloroplasts. *Plant Physiol* **112**, 171-182.
- WILDERMUTH MC, FALL R (1998): Biochemical characterization of stromal and thylakoid-bound isoforms of isoprene synthase in willow leaves. *Plant Physiol* **116**, 1111-1123.
- XU LZ, HARRISON RW, WEBER IT, PILKIS SJ (1995): Human  $\beta$ -cell glucokinase. *J Biol Chem* **270**, 9939-9946.
- YAMAGUCHI S, SUN TP, KAWAIDE H, KAMIYA Y (1998): The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes *ent*-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **116**, 1271-1278.



## 6 Anhang

### 6.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abb.	Bezeichnung	Seite
1.1	Der MEP-Stoffwechsel der Isoprenoid-Biosynthese.	6
1.2	Die Reaktion der Isoprensynthese [ISPS].	7
2.1	Schematische Darstellung des Transformationsvektors pBinAR.	14
2.2	Transformation und Absamen von <i>A. thaliana</i> .	30
2.3	Selektion der transgenen Linien von <i>A. thaliana</i> .	31
2.4	Schematische Darstellung der Ermittlung des C <sub>T</sub> -Wertes:	35
2.5	Reaktionsschema der Synthese von DMADP aus 3-Methyl-2-buten-1-ol.	38
2.6	Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung von DMADP:	39
2.7	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration.	43
2.8	Kalibrationsgeraden der sauren Hydrolyse von DMADP in ■ Abwesenheit und in ● Anwesenheit von Blattmaterial.	45
2.9	Messküvette für die Bestimmung der Isoprenemission einer <i>Arabidopsis</i> -Pflanze.	47
2.10	Messaufbau zur Ermittlung der Isoprenabgabe von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.	48
3.1	Schematischer Aufbau des <i>ispS</i> -Gens aus <i>Populus x canescens</i> .	52
3.2	Schematische Darstellung des <i>ispS</i> -Genderivates mit HA-Epitop.	53
3.3	Nukleotidsequenz der mit His-Tag markierten Isoprensynthase.	55
3.4	Schematische Darstellung des <i>ispS</i> -Genderivates mit His-Tag.	56
3.5	Schematische Darstellung des <i>ispS</i> -Genderivates mit HA-Epitop im Expressionsvektor pQE50.	57
3.6	Schematische Darstellung des <i>ispS</i> -Genderivates mit His-Tag im Expressionsvektor pQE60.	57
3.7	Isoprenemission von transgenen <i>E. coli</i> TG1-Kulturen.	58
3.8	Zeitabhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch ■ unmarkierte, ● N-terminal markierte und ▲ C-terminal markierte ISPS.	60
3.9	Substratabhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch ▼ native ■ unmarkierte, ● N-terminal markierte und ▲ C-terminal markierte ISPS.	61
3.10	Normierte Darstellung der Substratsättigungskurven und Bestimmung des K <sub>m</sub> -Wertes von (A) N-terminal markierter, (B) C-terminal markierter und (C) unmarkierter ISPS.	63
3.11	Versuch der linearisierten Darstellung der Substratabhängigkeit nach (A) Hanes, (B) Scatchard und (C) Michaelis-Menten.	64
3.12	Bestimmung des R <sub>S</sub> -Wertes am Beispiel der ■ unmarkierter und der ● N-terminal markierten ISPS.	65
3.13	Unterschied in der ISPS-Aktivität von N-terminal und C-terminal markierter ISPS bei unterschiedlicher Substratkonzentration.	66
3.14	pH-Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch (A) native (B) unmarkierte, (C) N-terminal markierte und (D) C-terminal markierte ISPS.	67
3.15	Normierte Darstellung der pH-Abhängigkeit der Isoprensynthase-Derivate.	68
3.16	Temperatur-Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Isopren durch (A) ▼ native und ■ unmarkierte ISPS und (B) ● N-terminal markierte und ▲ C-terminal markierte ISPS.	69
3.17	Normierte Darstellung der Temperatur-Abhängigkeit der Isoprensynthase-Derivate.	70
3.18	Bestimmung der Aktivierungsenergie der ▼ nativen, ■ unmarkierten, ● N-terminal markierten und ▲ C-terminal markierten ISPS.	71
3.19	Bestimmung des Molekulargewichts der ▼ nativen, ■ unmarkierten, ● N-terminal markierten und ▲ C-terminal markierten ISPS.	72
3.20	Nachweis der erfolgreichen Transformation von <i>A. tumefaciens</i> mit dem Vektor pBinARIS.	74
3.21	Nachweis der Transgenität der zur Transformation von <i>A. thaliana</i> verwendeten <i>A. tumefaciens</i> -Kulturen.	75
3.22	Selektion transgener <i>A. thaliana</i> -Linien auf Kanamycin-haltigem MS-Medium.	76
3.23	Nachweis der Insertion des <i>ispS</i> -Gens bzw. des <i>nptII</i> -Gens in das Genom der <i>A. thaliana</i> -Linien K1-K4 und K-.	77
3.24	Nachweis der Insertion des <i>ispS</i> -Gens in das Genom der <i>A. thaliana</i> -Linien K1-K40.	78
3.25	Vergleich der Protein-Sequenzen entsprechend der Gensequenzen der <i>ispS</i> in <i>E. coli</i> TG1 (IS_Bakt), in <i>A. thaliana</i> K1 (IS_Linie1) und in der ursprünglichen cDNA der Pappel (IS-Pappel).	80
3.26	Qualitativer Nachweis der Expression des <i>ispS</i> -Gens in den <i>A. thaliana</i> -Linien K1-K40.	81
3.27	Isopren- (A) und Monoterpenemission (B) der transgenen <i>A. thaliana</i> -Linien K1-K40.	83
3.28	Mittlere Emission und Standardabweichung von Emittlern, transgenen Nicht-Emittlern und Nicht-Emittlern.	84

3.29	Korrelation der Isoprenemission und der Monoterpenemission der Linien K1-K40, Wildtyp und K-.	85
3.30	Vergleich der Höhe der <i>ispS</i> -Genexpression im Blatt mit der Höhe der Isoprenemission der Blattrosette.	86
3.31	Höhe der <i>ispS</i> -Genexpression in den Pflanzenorganen Blatt, Stengel und Wurzel der Linien K1-K4.	87
3.32	Vitalitätsfärbung protoplastierter <i>A. thaliana</i> -Zellen aus Blattgewebe mit Fluorescein-diacetat (0,1 % w/v).	88
3.33	<i>ispS</i> -Genexpression transient transgener Protoplasten.	89
3.34	Gehalt an Dimethylallyl-diphosphat in Blättern von <i>A. thaliana</i> Wildtyp (WT), Linie K- und Linien K1 bis K4.	90
3.35	Unterschiedlicher DMADP-Gehalt von <i>A. thaliana</i> - und Pappelblättern.	91

## 6.2 Verzeichnis der Tabellen

Tab.	Bezeichnung	Seite
2.1	Auflistung der synthetisierten Oligonukleotide.	21
2.2	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide aus der Arbeit von MILLER (2001).	22
2.3	Restriktionsansätze zur Umklonierung eines DNA-Fragments in einen anderen Vektor.	24
2.4	Bakterienselektion über Antibiotika.	27
3.1	Zusammenfassende Tabelle der Eigenschaften der verschiedenen Isoprensynthese-Derivate.	73
3.2	Bestimmung des Verhältnisses von Trockengewicht zu Frischgewicht bei <i>Arabidopsis</i> -Blättern.	91

## 6.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenosin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
<b>Bp</b>	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderserum Albumin
<b>C</b>	Kohlenstoff
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	Complementäre DNA (zur mRNA)
CDP-ME	4-(Cytidin 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol
CDP-ME2P	4-(Cytidin 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol-2-phosphat
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
CMK	CDP-ME-Kinase
CMP	Cytidyl-monophosphat
CMS	CDP-ME-Synthase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidyl-triphosphat
<b>D(O)XP</b>	Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DMADP	Dimethylallyl-diphosphat
DNA	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	„double stranded“, doppelsträngig



DTT	Dithiothreitol
DXR	Deoxy-D-xylulose-5-phosphatreduktoisomerase (Protein)
<i>dxr</i>	Deoxy-D-xylulose-5-phosphatreduktoisomerase (Gen)
DXS	Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (Protein)
<i>dxs</i>	Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (Gen)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
<b>F</b>	Farad
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	“fast performance liquid chromatography”
<b>g</b>	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GC	Gaschromatograph
GDP	Geranyldiphosphat
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
H <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
HDS	HMBDP-Synthase
HMBDP	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphat
IDI	IDP/DMADP-Isomerase
IDP	Isopentenyl-diphosphat
IDS	IDP/DMADP-Synthase
IMP	Isopentenyl-monophosphat
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
ISPS	Isoprensynthase (Protein)
<i>ispS</i>	Isoprensynthase (Gen)
<b>KAS</b>	Kaltaufgabesystem
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Dalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani-Medium
<b>M</b>	molar
m	milli- (x 10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro- (x 10 <sup>-6</sup> )
MCS	ME-cPP-Synthase
MCS	“multiple cloning site”, multiple Klonierungsstelle
ME	Methylerythritol
ME-cPP	2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MFC	„Mass Flow Controller“, Massenflussregler
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPS	„Multi-Purpose“-Autosampler
mRNA	„messenger“ RNA
MS	Massenspektrometer
MS	Murashige und Skoog-Medium
Mt	Megatonne (10 <sup>6</sup> t)
MW	Mittelwert
<b>N</b>	Stickstoff
n	nano- (x 10 <sup>-9</sup> )
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO <sub>x</sub>	Stickoxid
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
Ω	Ohm

<b>p</b>	pico (x 10 <sup>-12</sup> )
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PPFD	Photosynthetische Protonen Fluss Dichte
ppmv	„parts per million by volume“, Volumenanteil pro eine Million Volumenanteile
pptv	„parts per trillion by volume“, Volumenanteil pro eine Milliarde Volumenanteile
PVP	Polyvinylpyrrolidon
<b>RNA</b>	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<b>s</b>	Sekunden
SD	„standard deviation“, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	„single stranded“, einzelsträngig
<b>T</b>	Thymin
TEAP	bis-(Triethylamino)orthophosphat TEAP
Tps	Terpensynthase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>V</b>	Volt
v/v	„volume per volume“, Volumenverhältnis
w/v	„weight per volume“, Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indol-β-galactopyranosid
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

### **Aminosäuren**

A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Asparagin
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H (His)	Histidin
I (Ile)	Isoleucin
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
N (Asn)	Asparagin
P (Pro)	Prolin
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptophan
Y (Tyr)	Tyrosin

## Danksagung

**Herrn Prof. Dr. W. Seiler** danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Institut für Meteorologie und Klimaforschung – Institut für atmosphärische Umweltforschung (IMK-IFU) des Forschungszentrums Karlsruhe in Garmisch-Partenkirchen.

**Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge**, Botanisches Institut der Universität zu Köln, danke ich für die Übernahme der universitären Betreuung.

**Herrn PD Dr. Wolfgang Zimmer** danke ich für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung und seine unbeschreibliche Kraft und unvergleichliche Fähigkeit, diese an andere weiter zu geben und sie stets zu begeistern und zu motivieren.

**Herrn PD Dr. Jörg-Peter Schnitzler** danke ich für die selbstverständliche Übernahme der Betreuung nach Wolfgangs Tod, die Hilfestellungen während der Arbeit und die konstruktive und rasche Korrektur des Manuskripts.

**Herrn Dr. Robert J. Fischbach** danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung und die vielen Anregungen zu meiner Arbeit und das Korrekturlesen des Manuskripts. Er versteht es, die Dinge auf den Punkt zu bringen, die einem quer durch den Kopf schwirren.

**Herrn PD Dr. Anton Schäffner**, Institut für Biochemische Pflanzenpathologie an der GSF Neuherberg, danke ich für die Einführung in die Kultivierung und Transformation von *A. thaliana* und die immer schnellen Antworten, wenn noch Fragen auftauchten.

**Herrn Dr. Trevor Fenning**, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena, danke ich für die Überlassung des Vektors pJIT163 mit ISPS.

**Herrn Dipl.-Ing. Dominik Steigner** danke ich für die Messungen am GC-MS und die stete Bereitschaft zu Erklärungen.

**Frau Ina Zimmer** danke ich für die Hilfe bei den vielen Proteintests, bei Fragen im Labor und bei der Korrektur des Manuskripts.

**Herrn Stefan Schmid** danke ich für den Bau der Messküvetten und für alle sonstigen Hilfen, wenn praktisches Geschick nötig war.

**Sabine, Martina, Christian, Edwin, Christoph, Tom, Magda, David, Carsten, Ralf, Nick, Linde, Robert, Lisa, Steve, Schorsch, Philip, Micha, Edgar, Ina, Gertrud, Marion, Astrid, Anita, Markus T., Markus H., Birgit, Kristin** und allen anderen, die ich vielleicht jetzt vergessen habe, möchte ich ganz herzlich für die schöne Zeit in Garmisch danken.

**Meinen Eltern und Hansi Haslberger** danke ich ganz besonders für die Tatsache, dass sie mich immer bei allem unterstützen, was ich mir vornehme und für die Sicherheit, die sie mir dadurch geben.

Diese Arbeit wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Untersuchung der Funktion der Isoprenabgabe bei Pflanzen, Projektnummer Zi 337/4-6) und durch Hausmittel des IMK-IFU.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.I. Flügge betreut worden.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Ein Teil der Arbeit ist eingereicht bei *Planta*:

Schnitzler J-P, Zimmer I, Bachl A, Arend M, Fromm J, Fischbach RJ: Biochemical properties of isoprene synthase in poplar (*Populus x canescens*).

# Lebenslauf

Anette Bachl, Dipl.-Biologin

---

## Persönliche Informationen

- Wohnort: 83329 Waging am See, Am Anger 4
- Familienstand: ledig
- Geboren am: 10.09.1974
- Geburtsort: Traunstein

---

## Berufserfahrung

06.2001-05.2004

**Doktorandin** am  
Fraunhofer Institut für Atmosphärische  
Umweltforschung  
neuer Träger seit 01.2002:  
Forschungszentrum Karlsruhe  
(IMK-IFU)

Garmisch-  
Partenkirchen

---

## Ausbildung

Seit 10.2001

**Promotionsstudentin** an der  
Universität zu

Köln

11.1994-11.2000

**Studium der Biologie** an der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
**Abschluß: Diplom**

München

### **Diplomprüfungsfächer:**

- Botanik/ Systematik
- Botanik/Physiologie(Molekularbiologie)
- Ökologie (Geobotanik)
- Bodenkunde

### **Thema der Diplomarbeit:**

Die reale und die potentiell natürliche Vegetation des Stadtwaldes von Traunstein.  
Distrikt Bürgerwald und Heiliggeistwald

09.1985-07.1994

Belegung des humanistischen Zweiges am  
Chiemgau-Gymnasium

Traunstein

### **Abschluß: Abitur**

09.1981-09.1985

Grundschule

Traunstein

---