

Barbara Miller: 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*. 2001

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von *Synechococcus leopoliensis* eine repräsentative Cosmid-Genbank mit 1384 Einzelklonen erstellt, die zur erfolgreichen Isolierung von Genen des MEP-Isoprenoidstoffwechsels eingesetzt wurde. In der Genbank von *S. leopoliensis* wurde das *dxs*-Gen des MEP-Stoffwechselweges auf einem Cosmid mit einem 18,7 kbp großen Insert lokalisiert. Der *dxs*-tragende 5,8 kbp große Bereich wurde umklont und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, daß das *dxs*-Gen mit zwei weiteren ORFs [ORF2*dxs* und ORF3*dxs*] in einem Operon organisiert ist. Ebenfalls wurde in der Genbank von *S. leopoliensis* ein Cosmid mit einem 26,5 kbp großen *dxr*-tragenden Insert lokalisiert. Ein 5,5 kbp großes Segment dieses Cosmids wurde sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, daß das *dxr*-Gen mit zwei weiteren ORFs [ORF2*dxr* und ORF3*dxr*] in einem Operon organisiert ist. Die identifizierten ORFs des *dxs*- und *dxr*-Operons wurden in Expressionsvektoren kloniert und in *E. coli* TG1 überexprimiert. Während nur die Überexpression des *dxs*-Gens zu einer achtfachen Erhöhung des zellulären DMADP-Gehaltes gegenüber dem Wildtyp führte, war der DMADP-Gehalt bei Überexpression der übrigen ORFs unverändert. Dies bestätigte die Identität des isolierten *dxs*-Gens aus *S. leopoliensis*. Die Funktionalität der gereinigten Dxr wurde durch photometrische Messung der DXP-abhängigen NADPH-Oxidationsrate nachgewiesen. DXP wurde zuvor mit Hilfe der ebenfalls gereinigten Dxs synthetisiert. Die Reaktion war mit Fosmidomycin, dem Strukturanalogon von DXP, hemmbar. Für die übrigen ORFs des *dxs*- und *dxr*-Operons wurde kein funktionaler Einfluß auf den MEP-Stoffwechsel gefunden. Obwohl bei *S. leopoliensis* mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie gezeigt wurde, daß dieses Cyanobakterium in Abhängigkeit von Licht Isopren freisetzt, konnte in *S. leopoliensis* kein Isoprensynthase-Gen nachgewiesen werden. Es wurde erstmalig ein Isoprensynthase-Gen isoliert. Die Isolierung gelang aus einer l-Genbank von *Populus alba* x *Populus tremula*. Sequenzvergleiche ergaben hohe Homologien zu Monoterpensynthasen. Ähnlich den Monoterpensynthasen besaß das Genprodukt eine N-terminale plastidäre Signalpeptidsequenz. Bei Überexpression des Isoprensynthase-Gens mit Signalpeptid wurde eine 100-fach erhöhte Isoprenfreisetzung gegenüber dem Wildtyp gemessen. Die Enzymaktivität war zusätzlich 1,9-fach höher, wenn stattdessen das Signalpeptid-freie Protein überexprimiert wurde. Durch gleichzeitige Überexpression des *dxs*-Gens aus *S. leopoliensis* wurde die Isoprenfreisetzung nochmals um den Faktor 4 erhöht. Die Bestimmung der Isopren- bzw. Monoterpenbildungsrate *in vitro* mit gereinigter rekombinanter Isoprensynthase ergab eine 200-fach höhere DMADP-abhängige Isoprenbildungsrate als die ebenfalls beobachtete GDP-abhängige Limonenbildungsrate. Andere Monoterpene wurden nicht gebildet. Diese Versuche belegten eindeutig die Funktionalität des identifizierten Isoprensynthase-Gens.

In order to show that the novel nonmevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis entered the plant via a cyanobacterial like ancestor of chloroplasts, the functional existence of this novel 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate [MEP]-pathway in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* was analysed. First of all it was proven that the isoprene emission rate of a *S. leopoliensis* culture was light-dependent. Aiming to find operon structures harboring still unknown genes of the novel pathway two genes of the pathway were isolated from a cosmid library of *S. leopoliensis*. For this purpose a segment of the deoxyxylulose 5-phosphate synthase (*dxs*) and the deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase (*dxr*) were amplified from *S. leopoliensis* DNA via PCR using oligonucleotides for conserved regions. Subsequent hybridization screening of the cosmid library using these segments after labeling led to the identification of a cosmid with a 18.7 kbp insert and a 26.5 kbp segment carrying the *dxs* and *dxr*, respectively. Although the *dxs* and the *dxr* are catalyzing subsequent steps in the pathway, the two genes were not organized in one operon structure. By DNA

sequencing of a 5.8 kbp segment the *dxs* was localized in an operon structure with two additional open reading frames (ORF2*dxs* and ORF3*dxs*). The *dxr* was identified by DNA sequencing on a 5.5 kbp locus with two adjacent open reading frames organized in one operon (ORF2*dxr*, ORF3*dxr*). In order to analyse the functionality of the identified genes, expression fusions were constructed. In vivo only the overexpression of the *dxs* led to an 8-fold increase of the cellular DMADP level, one basic intermediate of the MEP isoprenoid biosynthesis. The co-expression of the *dxs* and the *dxr* in one cell did not lead to an additional increase of the DMADP level indicating that the *Dxs* might be the limiting enzyme in the MEP pathway at least in bacteria. However purified *Dxr* of an *E. coli* strain expressing *dxr* of *S. leopoliensis* catalyzed indeed a DXP-dependent NADPH oxidation in vitro. For the other ORFs no function concerning the MEP pathway was detected. None of the ORFs encoded for an isoprene synthase. Therefore the first isolation of an isoprene synthase gene was done by amplifying a cDNA segment of *Populus alba* x *Populus tremula* via PCR using oligonucleotides of published isoprene synthase peptide fragments of *Populus tremuloides* (Silver & Fall, 1995). A screening of a cDNA library of *P. alba* x *P. tremula* led to the identification of a cDNA deriving from full length mRNA. There was a high similarity to monoterpene synthases, which led to the identification of a N-terminal signal peptide sequence in the identified clone. After construction of expression fusions the transformed *E. coli* strains released 100-fold more isoprene than the wildtype. Without signal peptide sequence the isoprene emission rate was again 1.9-fold higher. The co-expression of the *dxs* of *S. leopoliensis* and the identified clone without signal peptide sequence led to a 4 times further enhancement of the isoprene emission rate. The purified recombinant enzyme without signal peptide sequence led to a 200-fold higher isoprene synthesis rate in a DMADP dependent test than the GDP dependent synthesis rate of limonene, which was the only detectable monoterpene.