

Andrea Lehning

Untersuchungen zur molekularen Grundlage der Isoprenemission bei der Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Die Arbeit wurde aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) gefördert. (Förderkennzeichen „Spurenstoffkreisläufe“ (Projekt Nr. A2b-7) und „Troposphärenforschungsprogramm“ (Projekt Nr. 2 C7).

Herausgeber: Prof. Dr. Wolfgang Seiler
Fraunhofer-Institut Atmosphärische Umweltforschung
Kreuzeckbahnstr. 19, 82467 Garmisch-Partenkirchen
Garmisch-Partenkirchen, 2000



Schriftenreihe

Andrea Lehning

Untersuchungen zur molekularen Grundlage
der Isoprenemission bei der Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Herausgeber: Prof. Dr. Wolfgang Seiler
Fraunhofer-Institut Atmosphärische Umweltforschung
Kreuzeckbahnstr. 19, 82467 Garmisch-Partenkirchen
Garmisch-Partenkirchen, 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Lehning, Andrea:

Untersuchungen zur molekularen Grundlage der Isoprenemission
bei der Stieleiche (*Quercus robur* L.) / Andrea Lehning.

Aachen : Shaker, 2000

(Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung;
Bd. 2000,66)

Zugl.: Freiburg, Univ., Diss., 2000

ISBN 3-8265-7545-8

Copyright Shaker Verlag 2000

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-7545-8

ISSN 1436-1094

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Untersuchungen zur molekularen Grundlage der Isoprenemission bei der Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades der Doktorwürde der
Forstwissenschaftlichen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

vorgelegt von **Andrea Lehning** aus Darmstadt

Datum der mündlichen Prüfung: 22.12.1999

Dekan: Prof. Dr. H. Rennenberg

Referent: Prof. Dr. H. Rennenberg

Korreferent: Prof. Dr. S. Fink

Betreuer der Dissertation: Dr. J.-P. Schnitzler

Korntal, 2000

1 Einleitung	1
1.1 Vorkommen und Bedeutung von Isopren	1
1.2 Bedeutung des Isoprens für die Chemie der Troposphäre	1
1.3 Biogene Quellen des Spurengases Isopren	4
1.4 Abschätzung der Isoprenemission	6
1.5 Zusammenhang zwischen Isoprenemission und Photosynthese	7
1.5.1 Lichtabhängigkeit	8
1.5.2 CO ₂ -Konzentration	9
1.5.3 Stomatäre Aktivität	10
1.5.4 Temperaturabhängigkeit	11
1.5.5 Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Isoprenemission	12
1.6 Biosynthese von Isoprenoiden	15
1.6.1 Die Isoprensynthese als Schlüsselenzym für die Isoprenemission	20
1.6.2 Ziele der Arbeit	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	22
2.1.1 Freilandmaterial der Stieleiche (<i>Q. robur L.</i>)	24
2.1.2 Pilzkultur (<i>Laccaria laccata</i>)	27
2.2 Messung der Isopren-Emission an der Stieleiche	28
2.2.1 Aufbau der Meßapparatur	28
2.2.2 Küvettenaufbau	28
2.2.3 Beleuchtungsaufsatz	31
2.2.4 Semi-kontinuierliche Gaschromatographie	32
2.2.5 Kalibrierung des GC	33
2.2.6 Berechnung der Emissionsraten	36
2.2.7 Berechnung der Emissionsfaktoren nach Guenther et al. (1993)	36
2.3 Freilandversuche und versuchsbegleitende Messungen	38
2.3.1 Freilandversuche	38
2.3.2 Ermittlung der relativen Luftfeuchte und Lufttemperatur	38
2.3.3 Detektion der UV-B- und PPF-D Strahlungsbedingungen	39
2.4 Chemische Synthese von Dimethylallyldiphosphat (DMADP)	40
2.4.1 Synthese von Dimethylallyldiphosphat, nach Keller und Thompson (1993)	40
2.4.2 Flash-Chromatographie zur Isolierung der Diphosphate	41
2.4.3 Nachweis der Phosphate	41
2.5 Automatisierte CN-Analyse	42
2.6 Bestimmung der Isoprensynthese-Aktivität	43
2.6.1 Herstellung von Blattextrakten	43

2.6.2	Isolierung von Mikrosomen.....	44
2.6.3	Standardenzymtest der Isoprensynthase.....	46
2.7	Gaschromatographische Analytik des Isoprensynthase-Tests.....	47
2.7.1	Berechnung der Isoprensynthase-Aktivität.....	51
2.8	Spektralphotometrische Analysen.....	52
2.8.1	Proteinbestimmung.....	52
2.8.2	Neutralzucker.....	53
2.8.3	Nitrat.....	54
2.8.4	Chlorophyll- und Carotenoidgehalte.....	55
2.9	Entsalzung und Konzentrierung von Proteinextrakten.....	56
2.9.1	Gelfiltration mit PD-10 und NAP-5 Säulen.....	56
2.9.2	Ultrafiltration.....	57
2.10	Chromatographische Methoden zur Proteinreinigung.....	57
2.10.1	Anionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Sepharose Fast Flow.....	57
2.10.2	Chromatofokussierung mit Mono P.....	58
2.10.3	Chromatographie mit Hydroxylapatit (HA).....	59
2.10.4	Gelfiltration.....	59
2.10.5	Liganden-Affinitätschromatographie mit anti-Rubisco-Antikörpern.....	60
2.11	Antikörper.....	61
2.11.1	Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen die Isoprensynthase aus der Stieleiche (<i>Q. robur</i> L.).....	61
2.11.2	Charakterisierung der Antikörper.....	62
2.12	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	63
2.12.1	Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese.....	63
2.12.2	Gießen des Gels.....	64
2.12.3	Elektrophoretische Trennung.....	65
2.12.4	Detektion von Proteinen im Gel.....	65
2.12.5	Molekulargewichtsbestimmung.....	66
2.13	Western Blotting und Detektionsmethoden.....	66
2.13.1	Proteintransfer.....	66
2.13.2	Detektionsmethoden für geblottete Proteine.....	67
2.14	Mikrosequenzierung von Proteinen.....	68
2.14.1	Tryptische Spaltung von Proteinen im Gel.....	68
2.14.2	Extraktion der Peptide aus dem Gel.....	69
2.14.3	HPLC-Analytik zur Trennung von Peptiden.....	69
2.14.4	Edman-Abbau.....	70
2.15	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	70
2.15.1	Chemikalien.....	70
2.15.2	Verbrauchsmaterial.....	71

3 Ergebnisse	72
3.1 Charakterisierung der Isoprensynthase-Aktivität	72
3.1.1 <i>Substratabhängigkeit der Isoprensynthase-Aktivität.....</i>	72
3.1.2 <i>Temperaturabhängigkeit der Isoprensynthase-Aktivität.....</i>	74
3.1.3 <i>pH-Abhängigkeit der Isoprensynthase-Aktivität.....</i>	76
3.1.4 <i>Zeitabhängigkeit.....</i>	78
3.1.5 <i>Proteinabhängigkeit der Isoprensynthase-Aktivität.....</i>	79
3.1.6 <i>Testgenauigkeit des Isoprensynthase-Tests</i>	80
3.1.7 <i>Lagerfähigkeit der Isoprensynthase-Aktivität</i>	81
3.2 Isolierung der Isoprensynthase	82
3.2.1 <i>Ionenaustauscher-Chromatographie mit DEAE-Sepharose Fast Flow</i>	82
3.2.2 <i>Chromatographie mit Hydroxylapatit.....</i>	84
3.2.3 <i>Chromatofokussierung mit Mono-P.....</i>	85
3.2.4 <i>Gelfiltration mit Superose-12</i>	86
3.2.5 <i>Liganden-Affinitätschromatographie mit anti-Rubisco-Antikörpern.....</i>	89
3.3 Charakterisierung der Sproßkultur der Stieleiche (<i>Quercus robur L.</i>).....	95
3.3.1 <i>Frischgewichtszunahme der Eichensprosse.....</i>	95
3.3.2 <i>Parameter des Nährbodens: pH-Wert, el. Leitfähigkeit, Glucose- und Nitratgehalt....</i>	96
3.3.3 <i>Chlorophyll- und Carotinoidgehalt der Blätter.....</i>	97
3.3.4 <i>Proteingehalt und Isoprensynthase-Aktivität.....</i>	99
3.3.5 <i>Prozentuale Gehalte an Kohlenstoff und Stickstoff</i>	99
3.3.6 <i>Löslichkeit der Isoprensynthase-Aktivität.....</i>	100
3.4 Untersuchungen zur Regulation der Isoprenbildung an Stieleichen (<i>Quercus robur L.</i>) im Freiland.....	101
3.4.1 <i>Tagesgang der Isoprensynthase-Aktivität.....</i>	101
3.4.2 <i>Isoprensynthase-Aktivität im Jahresverlauf.....</i>	104
3.4.2.1 <i>Untersuchungsjahr 1995.....</i>	104
3.4.2.2 <i>Untersuchungsjahr 1996.....</i>	108
3.4.2.3 <i>Untersuchungsjahr 1997.....</i>	115
3.4.3 <i>Zusammenfassende Betrachtungen aus den Ergebnissen von 1995-97</i>	125
3.4.3.1 <i>Variabilität der Isoprensynthase-Aktivität der Einzelbäume.....</i>	126
3.4.3.2 <i>Klimadaten und Isoprensynthase Aktivität.....</i>	129
3.5 Direkter Vergleich von Isoprenemissionsrate und Isoprensynthase-Aktivität.....	134
3.6 Einfluß der Stickstoffversorgung auf die Isoprensynthase-Aktivität und Isopren-Emission.....	141

4 Diskussion	150
4.1 Charakteristika der Isoprensynthese.....	150
4.2 Der biochemische Ursprung von Isopren	156
4.3 Kurzfristige Änderungen der Isoprensynthese-Aktivität.....	157
4.4 Unterschiede von Sonnenblättern und beschatteten Blättern	161
4.5 Saisonale Änderungen der Isoprensynthese-Aktivität	163
4.6 Variabilität	166
4.7 Einfluß der Stickstoffzufuhr auf die Isoprenbildung.....	167
4.8 Warum emittieren die Pflanzen Isopren?	168
Ausblick.....	170
5 Zusammenfassung	171
6 Literaturverzeichnis	173

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin	I	Inkubationszeit [s]
abs.	absolut	IDP	Isopentenylidiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat	IEP	Isoelektrischer Punkt
BAP	N-Benzyladenin	IFU	Fraunhofer Institut für Atmosphärische Umweltforschung
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	IMP	Isopentenylmonophosphat
BINOS	Infrarot-Gasanalysator	IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Bis-Tris	[Bis (2-hydroxyethyl) imino] tris(hydroxy-methyl) methan	I_s	Isopren-Emissionsfaktor
BSA	Rinderserumalbumin	ISP	Isoprensynthase-Puffer
CBB	Coomassie Brilliant Blue	IV	Injektionsvolumen [ml]
CHES	Cyclohexylaminoethansulfonsäure	J m⁻²	Joule pro Quadratmeter
cP	Konzentration der Pigmente	K	Lysin
D	Asparaginsäure	KAS	Kalt-Aufgabe-System
Da	Dalton, Maßeinheit	k_{av}	relative Mobilität der Eichproteine in der Gelmatrix (Gelfiltration)
DEAE	Diethylaminoethyl	K_{fl}	Küvettdurchflußrate
DMADP	Dimethylallyldiphosphat	K_{iso}	Isoprenkonzentration
DTT	Dithiothreitol	L	Leucin
DU	Dobson Units (Einheit der Ozon-schichtdicke)	LA	Blattfläche [m ²]
E	Einwaage [g]	M	Molekulargewicht [g mol ⁻¹]
E	Glutaminsäure	MED	minimale erythemwirksame Dosis
E_a	Aktivierungsenergie	MEP	2-Methylethritol-4-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
ER	Emissionsrate von Isopren	N	Asparagin
EV	Extraktionsvolumen	n	Stichprobenumfang
F	Phenylalanin	NAA	Naphtyleissäure
FA	Freund's Adjuvans	NADP	
FCA	Freund's Complete Adjuvans	NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
FE	Flächeneinheiten	NHS	N-Hydroxysuccimid
FG	Frischgewicht [g]	P	Prolin
FID	Flammenionisationsdetektor	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
FPLC	Fast Pressure Liquid Chromatography	PBS	Phosphatgepufferte Saline
G	Glycin	PEG	Polyethylenglycol
g	Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²)	PEP	Pflanzenextraktions-Puffer
g	Gramm	P_{FE}	Peakflächeneinheiten nach Prüf-gasinjektion
GC	Gaschromatographie	pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration
GDP	Geranylidiphosphat	PPFD	photosynthetische Photonenfluß-dichte [µmol Photonen m ⁻² s ⁻¹]
GGDP	Geranylgeranylidiphosphat	PVDF	Polyvinylidendifluorid
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH	PVPP	Polyvinyl-Polypyrrolidon
GV	Gesamtgasvolumen [ml]	Q	Glutamin
H	Histidin	Q_{10} -Wert	Temperaturkoeffizient, beschreibt die bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C steigende Reaktionsgeschwindigkeit
HA	Hydroxylapatit	R	Arginin
HDR	Hinterdruckregelung	R_{fact}	Responsefaktor
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography		
HRP	Meerrettich Peroxidase		

R_f -Wert	Quotient aus gelaufener Strecke/Laufmittelfront bei der TLC
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S	Sediment
SDS	Natriumdodecylsulfat
S_{iso}	Stoffmenge an Isopren im Prüfgasvolumen [nmol]
SLM	spezifische Blattmasse [$g\ m^{-2}$]
T	Threonin
TCA	Trichloressigsäure
TDS	Thermodesorptionssystem
TEAP	Triethylamin, Acetonitril, Phosphorsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Dünnschicht-Chromatographie
TM*LPM	Produkt aus mittlerer Tagestemperatur und Lichtperiodenmittelwert der PPFD
TPS	Taupunktspiegel
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
UE	Untereinheit
Ü	Überstand
ü. N. N.	über Normal Null
UV	ultraviolette Strahlung
UV-B	ultraviolette Strahlung im Wellenband 280 bis 320 nm
V	Valin
V	Volt
V_e	Elutionsvolumen der Eichproteine
V_0	Ausschlußvolumen einer Gelfiltrationssäule
V_t	Gesamttotalvolumen einer Gelfiltrationssäule
VOC	flüchtige organische Verbindun- gen
W	Tryptophan
$W\ m^{-2}$	Einheit der Bestrahlungsstärke
WLZ	Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle
x	unbekannte Aminosäure
Y	Tyrosin
z_{tExtr}	Enzymaktivität im Gesamtextrakt