

Monoterpensynthesen in Blättern
der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.)
und der Steineiche (*Quercus ilex* L.)

Charakterisierung, Klonierung
und zeitliche Variabilität

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Forstwissenschaftlichen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

vorgelegt von
Robert J. Fischbach

Freiburg im Breisgau, 2000

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Becker

Betreuer: Dr. J.-P. Schnitzler

Referent: Prof. Dr. H. Rennenberg

Korreferent: Prof. Dr. M. Boppré

Datum der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2001

Robert J. Fischbach

**Monoterpensynthesen in Blättern der Fichte
(*Picea abies* (L.) Karst.) und der Steineiche (*Quercus ilex* L.)
Charakterisierung, Klonierung und zeitliche Variabilität**

Diese Arbeit wurde durch die Europäische Union im Rahmen des ECOVOC-Projekts (Parameterization of Environmental and Physiological **C**ontrols of Volatile **O**rganic **C**ompound Emissions from European Forests; ENV4-CT97-0412) finanziell unterstützt.

Herausgeber: Prof. Dr. Wolfgang Seiler
Fraunhofer-Institut Atmosphärische Umweltforschung
Kreuzeckbahnstr. 19, 82467 Garmisch-Partenkirchen
Garmisch-Partenkirchen, 2001



Fraunhofer Institut
Atmosphärische
Umweltforschung

Schriftenreihe

Robert J. Fischbach

Monoterpensynthesen in Blättern der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.)
und der Steineiche (*Quercus ilex* L.)

Charakterisierung, Klonierung und zeitliche Variabilität

Herausgeber: Prof. Dr. Wolfgang Seiler
Fraunhofer-Institut Atmosphärische Umweltforschung
Kreuzeckbahnstr. 19, 82467 Garmisch-Partenkirchen
Garmisch-Partenkirchen, 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Fischbach, Robert J.:

Monoterpensynthesen in Blättern der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.)
und der Steineiche (*Quercus ilex* L.): Charakterisierung, Klonierung
und zeitliche Variabilität / Robert J. Fischbach.

Aachen : Shaker, 2001

(Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung;
Bd. 2001,67)

Zugl.: Freiburg, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9121-6

Copyright Shaker Verlag 2001

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 3-8265-9121-6

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

Für meine Eltern,
für Andreas und für Gerd

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Vorkommen von Monoterpenen.....	1
1.2. Biologische Bedeutung von Monoterpenen.....	3
1.3. Bedeutung der Monoterpenemission für die Chemie der Atmosphäre	5
1.4. Biosynthese von Monoterpenen.....	6
1.5. Monoterpensynthesen	12
1.6. Regulation der Monoterpenbildung	14
1.7. Die Fichte und die Steineiche	16
1.8. Ziele der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen.....	19
2.1.1. Fichte (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.).....	19
2.1.1.1. Fichtenkeimlinge	19
2.1.1.2. Freilandbäume der Fichte	20
2.1.2. Steineiche (<i>Quercus ilex</i> L.).....	21
2.1.2.1. Getopfte Steineichen.....	21
2.1.2.2. Freilandbäume der Steineiche.....	22
2.2. Freilandversuche	22
2.2.1. Freilandversuche an Fichten.....	22
2.2.2. Freilandversuche mit der Steineiche	24
2.3. Chemische Synthese von Geranyldiphosphat (GDP).....	25
2.3.1. Synthese von Geranyldiphosphat	25
2.3.2. Flash-Chromatographie zur Isolierung der Diphosphate	26
2.3.3. Detektion der Phosphate mittels Dünnschichtchromatographie.....	26
2.4. Biochemische Methoden.....	27
2.4.1. Entsalzung, Konzentrierung und Anreicherung von Proteinextrakten	27
2.4.2. Spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.4.3. Standardmethode zur Herstellung von Blattextrakten	29

2.4.4. Standardenzymtest der Monoterpensynthasen in Fichte und Steineiche	30
2.4.5. Gaschromatographische Analytik der Monoterpensynthasen.....	31
2.4.5.1. Identifizierung und Quantifizierung	33
2.4.5.2. Berechnung der Monoterpensynthese-Aktivität	36
2.4.6. Bestimmung der GDP-Phosphatase-Aktivität.....	37
2.4.7. Bestimmung endogener Monoterpene aus Fichtennadeln	38
2.4.7.1. Extraktion	38
2.4.7.2. Gaschromatographische Analyse.....	39
2.4.7.2.1. Identifizierung und Quantifizierung	41
2.4.8. Bestimmung des nativen Molekulargewichtes mittels Gelfiltration.....	42
2.5. Molekularbiologische Methoden.....	44
2.5.1. Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme und Vektoren.....	44
2.5.2. Isolierung der Gesamt-RNA aus Blättern der Steineiche.....	46
2.5.3. Konzentrationsbestimmung und Reinheitsabschätzung von Nukleinsäuren.....	47
2.5.4. Elektrophorese von Nukleinsäuren	47
2.5.5. Isolierung der mRNA.....	48
2.5.6. Herstellung von einzelsträngiger und doppelsträngiger cDNA.....	48
2.5.7. Spezifische Amplifikation von Genen aus einem cDNA-Gemisch.....	50
2.5.7.1. Auswahl genspezifischer Primer für Monoterpensynthasen	53
2.5.7.2. Bedingungen der PCR	55
2.5.8. Klonierung der PCR-Fragmente in <i>E. coli</i>	57
2.5.8.1. Ligation	57
2.5.8.2. Herstellung kompetenter Zellen.....	58
2.5.8.3. Transformation.....	58
2.5.8.4. Selektion und Anzucht positiver Klone	59
2.5.8.5. Präparation von Plasmid-DNA.....	60
2.5.8.6. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	62
2.5.9. DNA-Sequenzierung.....	62
2.5.9.1. <i>Cycle sequencing</i> mit Terminatoren	62
2.5.9.2. Kapillarelektrophorese	64
2.5.10. Sequenzdatenanalyse	65
2.6. Chemikalien und Kits	65
2.7. Verbrauchsmaterialien.....	67

3. Ergebnisse	68
3.1. Nachweis der Monoterpensynthese-Aktivität über <i>head space</i> -Analyse	68
3.1.1. Charakterisierung der Monoterpensynthese-Aktivität aus Blattextrakten der Fichte	73
3.1.1.1. Wahl des Extraktions- und Testpuffers.....	73
3.1.1.2. Substratabhängigkeit	75
3.1.1.3. Zeit- und Proteinabhängigkeit	78
3.1.1.4. pH-Abhängigkeit	79
3.1.1.5. Ionenabhängigkeit.....	81
3.1.1.6. Temperaturabhängigkeit	82
3.1.2. Charakterisierung der Monoterpensynthese-Aktivität aus Blattextrakten der Steineiche.....	85
3.1.2.1. Wahl des geeigneten Extraktions- und Testpuffers	85
3.1.2.2. Substratabhängigkeit	88
3.1.2.3. Zeit- und Proteinabhängigkeit	91
3.1.2.4. pH-Abhängigkeit	92
3.1.2.5. Ionenabhängigkeit.....	93
3.1.2.6. Temperaturabhängigkeit	94
3.1.3. Vergleichende Betrachtungen.....	96
3.2. Native Molekulargewichte von Monoterpensynthasen der Fichte und der Steineiche	99
3.3. Isolierung von Monoterpensynthese-Genen aus der Steineiche	102
3.3.1. Amplifikation eines Monoterpensynthese-Gensegments mittels degenerierter Primer.....	102
3.3.2. Amplifizierung des 5'- und 3'-Endes eines Monoterpensynthese-Gens.....	104
3.3.3. Amplifizierung von <i>full length</i> cDNA	106
3.4. Variabilität der Monoterpensynthese-Aktivität in Fichtennadeln	116
3.4.1. Tag / Nacht-Vergleich	116
3.4.2. Jahreszeitliche Variabilität.....	118
3.4.2.1. Die Untersuchungsjahre 1998 und 1999	119
3.4.2.2. Proteingehalte der Nadeln.....	122
3.4.2.3. Monoterpensynthese-Aktivität.....	124
3.4.3. Vergleich der Monoterpensynthese-Aktivität mit dem endogenen Monoterpengehalt	129

3.5. Variabilität der Monoterpensynthese-Aktivität in Blättern der Steineiche.....	133
3.5.1. Tag / Nacht - Vergleich	133
3.5.2. Jahreszeitliche Variabilität.....	135
3.5.2.1. Die Untersuchungsjahre 1998 und 1999	135
3.5.2.2. Proteingehalte der Blätter.....	138
3.5.2.3. Monoterpensynthese-Aktivität	139
3.5.3. Vergleich der Monoterpensynthese-Aktivität mit der Monoterpenemission.....	145
4. Diskussion	147
4.1. Neue Methode zur Messung der Monoterpensynthese-Aktivität	147
4.2. Charakteristika der Monoterpensynthesen aus Fichte und Steineiche	149
4.3. Nukleotidsequenzen möglicher Monoterpensynthesen der Steineiche.....	152
4.4. Monoterpensynthese-Aktivität in der Steineiche	157
4.5. Monoterpensynthese-Aktivität in der Fichte	162
4.6. Bedeutung der Monoterpensynthese-Aktivität bei Fichte und Steineiche	166
5. Zusammenfassung.....	170
6. Literatur	174

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	KP_i	Kaliumphosphat
A	Alanin	L	Leucin
ADP	Adenosindiphosphat	LB	Luria-Bertani-Medium
Ala	Alanin	M	Methionin
Arg	Arginin	MEP	Methylethylthritol-4-phosphat
Asp	Asparaginsäure	min	Minute
ATP	Adenosintriphosphat	N	Asparagin
BSA	Rinderserumalbumin	n	Stichprobenumfang
C	Cystein	OD	optische Dichte
C	Cytosin	P	Phosphatgruppe PO ₄ ³⁻
CDP	Cytidindiphosphat	P	Prolin
CMP	Cytidinmonophosphat	PAR	photosynthetisch aktive Strahlung (400 - 700 nm)
CoA	Coenzym A	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CTP	Cytidintriphosphat	PEG	Polyethylenglycol
D	Asparaginsäure	pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
Da	Dalton, Maßeinheit	Phe	Phenylalanin
ddNTP	Didesoxynukleotid	Pro	Prolin
DEAE	Diethylaminoethyl	PVP	Polyvinylpyrrolidon
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Q	Glutamin
DMADP	Dimethylallyldiphosphat	R	Arginin
dNTP	Desoxynukleotid	r²	Regressionskoeffizient
DTT	Dithiothreitol	RACE	rapid amplification of cDNA ends
E	Glutaminsäure	R_r-Wert	Quotient aus gelaufener Strecke und Laufmittelfront
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	s	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	S	Serin
F	Phenylalanin	σ	Standardabweichung
FID	Flammenionisationsdetektor	T	Threonin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²)	T	Thymin
G	Glycin	TAE	Tris-Acetat-EDTA
G	Guanin	Tg	Terragramm
GBF	Gesamtblattfläche	TLC	Dünnschichtchromatographie
GC	Gaschromatograph	Trp	Tryptophan
GDP	Geranyldiphosphat	V	Valin
Glu	Glutaminsäure	VOC	flüchtige organische Verbindungen
H	Histidin	W m⁻²	Einheit Bestrahlungsstärke
h	Stunde	W	Tryptophan
I	Isoleucin	Y	Tyrosin
IDP	Isopentenylidiphosphat		
IFU	Fraunhofer Institut für Atmosphärische Umweltforschung		
K	Lysin		
KAS	Kaltaufgabesystem		
kat	katal = mol s ⁻¹		
k_{av}	relative Mobilität der Eichproteine in der Gelmatrix		