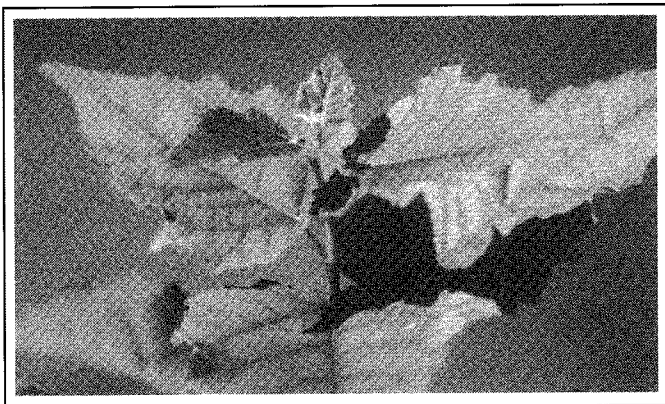


Für meine Eltern,
meine Geschwister
und Tommy

**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***



**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

Barbara Miller
aus Krumbach

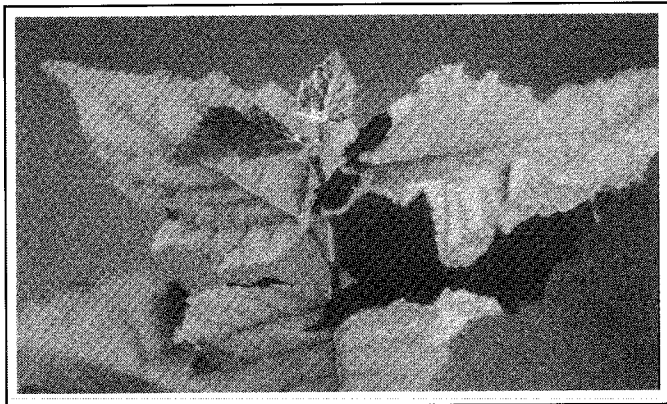
Shaker Verlag GmbH, Aachen
2001

Berichterstatter: PD Dr. Wolfgang Zimmer
Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.01

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***



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

Berichtersteller: PD Dr. Wolfgang Zimmer
Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.01



Fraunhofer Institut
Atmosphärische
Umweltforschung

Schriftenreihe

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*

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

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Miller, Barbara:

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* /

Barbara Miller. Aachen : Shaker, 2001

(Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung ;
Bd. 2001,68)

Zugl.: Köln, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9127-5

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.

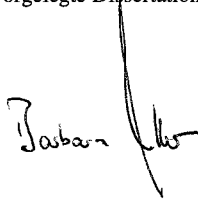
Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9127-5

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

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 Herrn PD Dr. Wolfgang Zimmer betreut worden.



Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

MILLER B., HEUSER T., ZIMMER W. (1999) A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis.
FEBS Lett. 460, 485-490

MILLER B., HEUSER T., ZIMMER W. (2000) Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis.
FEBS Lett. 481, 221-226

MILLER B., OSCHINSKI C., ZIMMER W. (2001) First isolation of an isoprene synthase gene and successful expression of the gene from poplar in *E. coli*.
Planta, im Druck.

Die folgenden DNA-Sequenzen wurden in der EMBL-Datenbank deponiert:

Y18874: *dxs*, ORF2, ORF3, ORF4

AJ25021: *dxr*, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6

AJ294819: *ispS*

**Ausnahmen sind nicht immer die Bestätigung einer alten Regel;
sie können auch Vorboten einer neuen sein.**

Marie Freifrau von Ebner-Eschenbach (1830-1916)

Gliederung

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Bedeutung von Isopren für die Atmosphärenchemie	1
1.2 Biogene Quellen des Isoprens.....	1
1.3 Biosynthese der Isoprenoide.....	2
1.4 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung des MEP-Stoffwechsels.....	6
1.5 Ziele dieser Arbeit.....	7
 2. Material und Methoden	8
2.1 Herkunft und Anzucht verwendeter Organismen	8
2.1.1 Verwendete Cyanobakterienstämme und ihre Kultivierung	8
2.1.2 Verwendete Pappelart	8
2.1.3 Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme als Wirtsbakterien und ihre Anzucht.....	9
2.1.4 Verwendete Vektoren für Klonierungen.....	10
2.2 Molekularbiologische Methoden	12
2.2.1 Nukleinsäureisolierung	12
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Cyanobakterien	12
2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen.....	13
2.2.1.3 RNA-Isolierung aus <i>Populus alba</i> x <i>Populus tremula</i>	14
2.2.1.4 Plasmidisolierung nach BIRNBOIM & DOLY.....	15
2.2.1.5 Plasmidisolierung mittels Cäsium-Chlorid-Gradienten	15
2.2.1.6 Plasmidisolierung mittels Säulenreinigung	16
2.2.1.7 Präparation einzelsträngiger DNA für Sequenzierungen	18
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten.....	18
2.2.3 Bestimmung der DNA-Reinheit und Menge.....	19
2.2.4 Klonierung, Umklonierung, Ligation und Transformation.....	20
2.2.4.1 Restriktion.....	20
2.2.4.2 Dephosphorylierung des Vektors.....	20
2.2.4.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	21
2.2.4.4 Ligation.....	22
2.2.4.5 Herstellung kompetenter Zellen.....	22
2.2.4.6 Transformation.....	23
2.2.4.7 Selektion positiver Klone	23

2.2.5 Erstellung von Genbanken	24
2.2.5.1 Erstellung einer Cosmid-Genbank von <i>Synechococcus leopoliensis</i>	24
2.2.5.2 Erstellung einer λ -Genbank von <i>P. alba</i> x <i>P. tremula</i>	26
2.2.5.2.1 Die Isolierung von mRNA	26
2.2.5.2.2 Die cDNA-Synthese.....	26
2.2.5.2.3 Die Adapter-Ligation	27
2.2.5.2.4 Verpackung der cDNA in λ -Phagen	28
2.2.5.2.5 Vermehrung der λ -Phagen	28
2.2.5.2.6 Bestimmung des Phagentiters.....	28
2.2.5.2.7 Die <i>in vivo</i> Excision	29
2.2.6 Die Polymeraseketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Segmente.....	29
2.2.6.1 Auswahl der Oligonukleotide	29
2.2.6.2 Reaktionsansätze für die Polymeraseketten-Reaktion	31
2.2.7 Markierung von Nukleinsäuren und Detektion	32
2.2.7.1 Synthese von Gensonden für Hybridisierungen	32
2.2.7.2 Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter.....	32
2.2.7.2.1 Transfer von Bakterienkolonien auf Nitrocellulosefilter	32
2.2.7.2.2 Transfer von Phagenplaques auf Nitrocellulosefilter	33
2.2.7.2.3 Transfer von restriktionsverdauter DNA auf Nitrocellulosefilter ["Southern Blot"].....	33
2.2.7.3 Detektion hybridisierender DNA	34
2.2.8 DNA-Sequenzierung.....	35
2.2.8.1 Die Sequenzierungsreaktion	35
2.2.8.2 Analyse der Sequenz am ABI PRISM 310.....	37
2.2.8.3 Computeranalyse von DNA- und Proteinsequenzen.....	38
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.3.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach LOWRY	38
2.3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD.....	39
2.3.1.3 Bestimmung eines Korrelationsfaktors zwischen Proteingehalt und OD _{600nm}	39
2.3.2 Proteinisolierung.....	39
2.3.2.1 Herstellung eines Bakterienrohextrakts.....	40
2.3.2.2 Bestimmung der Löslichkeit Histidin-markierter Proteine	40
2.3.2.3 Isolierung Histidin-markierter Proteine.....	41
2.3.2.4 Umpuffern gereinigter Proteine	41
2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42

2.4 Gaschromatographische Analytik.....	42
2.4.1 Gaschromatographie zur quantitativen Detektion von Isopren.....	43
2.4.2 Gaschromatographie zur quantitativen Detektion von Monoterpenen.....	44
2.4.3 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie zum Isoprennachweis	45
2.5 Versuchsaufbau für die Messung der <i>in vivo</i> Isoprenfreisetzung bei <i>S. leopoliensis</i> und <i>E. coli</i> für den Isoprennachweis	46
2.6 Funktionalitätstests isolierter Gene und Proteine	47
2.6.1 Bestimmung des zellulären <u>Dimethylallyldiphosphat</u> (DMADP)-Gehalts transformierter <i>E. coli</i> -Stämme.....	47
2.6.2 Messung der Isoprenfreisetzung transformierter <i>E. coli</i> -Stämme	48
2.6.3 <u>Deoxyxylulosephosphat</u> (DXP)-abhängige NAD(P)H-Oxidation durch die gereinigte <u>Deoxyxylulosephosphatreduktoisomerase</u> (Dxr).....	49
2.6.4 <u>Dimethylallyldiphosphat</u> (DMADP)-abhängige Isoprenbildung durch die gereinigte Isoprensynthase.....	50
2.6.5 <u>Geranyldiphosphat</u> (GDP)-abhängige Monoterpenbildung durch die gereinigte Isoprensynthase.....	51
3 Ergebnisse.....	52
3.1 Lichtabhängige Isoprenfreisetzung bei <i>Synechococcus leopoliensis</i>	52
3.2 Die Genbank von <i>S. leopoliensis</i>	55
3.3 Gaschromatographische Untersuchung der Genbank von <i>S. leopoliensis</i>	57
3.4 Isolierung zweier Gene des Isoprenoidstoffwechsels aus <i>S. leopoliensis</i> : das <u>Deoxyxylulosephosphatsynthase</u> -Gen (<i>dxs</i>) und das <u>Deoxyxylulosephosphat-</u> <u>reduktoisomerase</u> -Gen (<i>dxr</i>)	58
3.4.1 Herstellung einer <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -Gensonde.....	58
3.4.2 Verifizierung der Herkunft des <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -Amplifikats.....	62
3.4.3 Hybridisierungen der Gensonden mit der Genbank von <i>S. leopoliensis</i> zur Identifizierung <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -enthaltender Cosmide.....	64
3.4.4 Erstellung von Restriktionskarten der <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -tragender Cosmide sowie Umklonierung <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -tragender Fragmente.....	66
3.4.5 Sequenzanalyse der <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -enthaltenden Subklone	68
3.4.5.1 Sequenzanalyse des <i>dxs</i> -enthaltenden Inserts von pCR227	68
3.4.5.2 Sequenzanalyse des <i>dxr</i> -enthaltenden Inserts von pCR005	75
3.4.6. Bestimmung des zellulären DMADP-Gehalts transformierter <i>E. coli</i> -Stämme	82

3.4.6.1 Klonierung der Gene des <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -Operons in Expressionsvektoren	83
3.4.6.2 Bestimmung des DMADP-Gehalts von <i>E. coli</i> -Stämmen mit über- exprimierten Genen des <i>dxs</i> - oder <i>dxr</i> -Operons aus <i>S. leopoliensis</i>	83
3.4.6.3 Klonierungen zur Kombination mehrerer Gene in einer Zelle	84
3.4.6.4 Bestimmung des zellulären DMADP-Gehaltes mit pGS <i>dxs</i> transformierten <i>E. coli</i> TG1-Zellen	85
3.4.6.5 Bestimmung des DMADP-Gehalts von <i>E. coli</i> -Stämmen, die mit zwei Genen aus <i>S. leopoliensis</i> transformiert wurden	86
3.4.7 Funktionalitätsnachweis für das Deoxyxylulosephosphatreduktisomerase- Gen (<i>dxr</i>)	87
3.4.7.1 Klonierung der Gene <i>dxs</i> und <i>dxr</i> zur Reinigung der Genprodukte	87
3.4.7.2 Proteinisolierung der Deoxyxylulosephosphatsynthase (Dxs) und Deoxyxylulosephosphatreduktisomerase (Dxr) unter nativen Bedingungen	88
3.4.7.3 Photometrische Messung der NAD(P)H-Oxidation durch die Dxr	89
3.4.8 Gaschromatographische Bestimmung der Isoprenfreisetzung transformierter <i>E. coli</i> -Stämme	90
3.5 Isolierung des Isoprensynthase-Gens aus <i>Populus alba</i> x <i>Populus tremula</i>	91
3.5.1 Erstellung einer cDNA-Genbank aus <i>P. alba</i> x <i>P. tremula</i>	92
3.5.2 Amplifizierung eines Segments des Isoprensynthase-Gens aus Pappel-DNA zur Verwendung als Gensonde	92
3.5.3 Hybridisierung der Gensonde mit der Pappel-cDNA-Genbank zur Identifizierung des Phagen mit der kompletten Isoprensynthase-cDNA	93
3.5.4 Sequenzanalyse der für die Isoprensynthase codierenden cDNA	94
3.5.5 Funktionalitätsnachweis des Isoprensynthase-Gens	98
3.5.5.1 Klonierung des Isoprensynthase-Gens in Expressionsvektoren	98
3.5.5.2 Gaschromatographische Messung der <i>in vivo</i> Isoprenfreisetzung transformierter <i>E. coli</i> -Stämme	98
3.5.5.3 Aktivitätsbestimmung der isolierten rekombinanten Isoprensynthase	99
3.5.5.3.1 Proteinisolierung der Isoprensynthase unter nativen Bedingungen	100
3.5.5.3.2 Bestimmung der DMADP-abhängigen Bildung von Isopren durch die isolierte Isoprensynthase	101
3.5.5.3.3 Bestimmung der GDP-abhängigen Bildung von Monoterpenen durch die isolierte Isoprensynthase	102

4. Diskussion103

4.1 Das <i>dxs</i> -Gen und weitere im Operon befindliche Gene aus <i>Synechococcus leopoliensis</i>	103
4.2 Das <i>dxr</i> -Gen und weitere im Operon befindliche Gene aus <i>S. leopoliensis</i>	108
4.3 Die Verwandtschaft von Cyanobakterien mit Plastiden.....	112
4.4 Die funktionelle Bedeutung der ORFs des <i>dxs</i> - und <i>dxr</i> -Operons für den MEP-Stoffwechsel	113
4.5 Die erste erfolgreiche Isolierung eines Isoprensynthase-Gens.....	115
4.6 Warum emittieren Pflanzen Isopren?.....	119
4.7 Ausblick.....	120

5. Zusammenfassung122

6. Literaturverzeichnis123

7. Anhang135

7.1 Medien und Pufferlösungen.....	135
7.1.1. Medium für Cyanobakterien	135
7.1.2 Medien für die Kultivierung der <i>Escherichia coli</i> -Stämme	135
7.1.3 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten	136
7.2 Verwendete Chemikalien	136
7.3 Verwendete Kits.....	137
7.4 DNA- und Proteingrößenstandards	137
7.5 Der genetische Code	138
7.6 Abkürzungsverzeichnis	139
7.7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	140